

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0105949 (43) 공개일자 2018년10월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 19/60 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01) A61K 31/7048 (2006.01)	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	
(52) CPC특허분류 C12P 19/60 (2013.01) A23L 33/10 (2016.08)	(72) 발명자 심재훈 강원도 춘천시 지석로 63 현진에버빌 2차 210동 201호 임순성 강원도 춘천시 후석로 325, 105동 301호 (뒷면에 계속)	
(21) 출원번호 10-2017-0033309 (22) 출원일자 2017년03월16일 심사청구일자 2017년03월16일	(74) 대리인 특허법인태동	

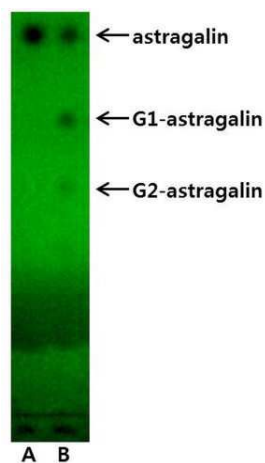
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈를 이용한 수용성이 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법 및 이로부터 제조된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 함유하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈를 통하여 아스트라갈린에 당 전이를 함으로써, 기존의 아스트라갈린 보다 65 ~ 420배 까지 수용성이 증대된 아스트라갈린 당전이 화합물을 제조할 수 있다. 또한, 이렇게 제조된 아스트라갈린의 당전이 화합물은 기존의 아스트라갈린에 비하여 알도오스 환원 저해 효과, 항염증 효과, 항산화 효과가 현저하게 증진되어 당뇨 합병증 예방 또는 치료용 조성물, 항염증 조성물로서 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



A: astragaloside 표준용액 (반응 전), B: astragaloside 당전이 산물 (반응 후)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)

C12Y 204/01019 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

(72) 발명자

정우재

서울특별시 동대문구 천장산로11길 17 삼성래미안
아파트 204동 1503호

황승환

경기도 남양주시 경춘로885번길 10-7, 40동 301호

명세서

청구범위

청구항 1

말토오스(maltose), 알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin; α -CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin; β -CD) 및 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin; γ -CD) 중 선택되는 어느 하나가 첨가된 아스트라갈린 용액에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 첨가한 후, 반응시키는 것을 특징으로 하는 수용성이 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아스트라갈린 용액은,

악염기성의 완충용액에 아스트라갈린이 용해되어 있는 것을 특징으로 하는 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 반응은,

말토오스(maltose), 알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin; α -CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin; β -CD) 및 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin; γ -CD) 중 선택되는 어느 하나가 첨가된 아스트라갈린 용액에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 첨가한 후, 55~65℃에서 2~4시간 동안 반응시키는 것을 특징으로 하는 수용성이 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법.

청구항 4

아스트라갈린에 글루코스 하나가 전이되어 결합된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 함유하는 당뇨 합병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

아스트라갈린에 글루코스 하나가 전이되어 결합된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 함유하는 당뇨 합병증 개선용 식품 조성물.

청구항 6

아스트라갈린에 글루코스 하나가 전이되어 결합된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

아스트라갈린에 글루코스 하나가 전이되어 결합된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 함유하는 염증 개선용 식품 조성물.

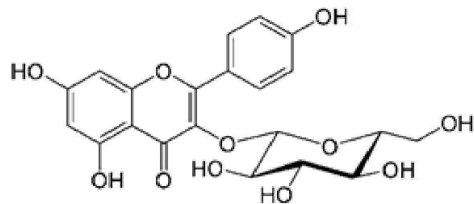
발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사이클로덱스트린 그루카노트랜스퍼레이즈를 이용한 수용성이 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법 및 이로부터 제조된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 함유하는 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 사이클로덱스트린 그루카노트랜스퍼레이즈를 이용하여 수용성이 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 제조하고, 이를 함유하는 알도오스 환원효소 억제효과, 항염증 효과, 항산화 효과를 발휘하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아스트라갈린(Astragallic acid, kaempferol-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-α-D-glucopyranoside)은 항산화 기능이 뛰어난 것으로 알려진 캄페놀에 글루코오스가 결합한 산물로서 감나무 잎, 녹차 씨앗, 전통적인 약초, 약용 식물 등에서 발견할 수 있는 플라보노이드의 일종이며, 하기 화학식 1의 구조를 가진다. 아스트라갈린은 항산화, 항종양, 항HIV, 항염증의 다양한 용도로 사용되고 있으나, 낮은 생체 이용률과 용해도로 인해 효능을 최대화시키는데 어려움이 있어 상업화에 걸림돌이 되고 있다.



[0005]

[0006] [화학식 1]

[0008] 한편, 대한민국 공개특허 제10-2016-0109969호에는, 아스트라갈린을 스테비올배당체와 혼합하여 용해시키는 경우 아스트라갈린의 용해능이 증가하는 내용이 기재되어 있다. 다만, 이는 스테비올배당체와 아스트라갈린이 복합체를 형성하고 스테비올배당체의 함량 증가에 따라 아스트라갈린의 용해능도 증가하는 것으로, 여전히 아스트라갈린 단독의 용해능은 증가시키지 못하고 있다.

[0009] 이에, 아스트라갈린의 낮은 생체이용률 및 수용성을 탁월하게 증대시킬 수 있는 방법의 개발이 더욱 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 아스트라갈린의 낮은 생체이용률 및 수용성을 문제를 해결하고자, 사이클로덱스트린 그루카노트랜스퍼레이즈를 이용하여 수용성이 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법 및 이를 함유하는 증진된 알도오스 환원효소 억제효과, 항염증 효과, 항산화 효과를 발휘하는 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 말토오스(maltose), 알파-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin; alpha-

CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin; beta-CD) 및 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin; gamma-CD) 중 선택되는 어느 하나가 첨가된 아스트라갈린 용액에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 첨가한 후, 반응시키는 것을 특징으로 하는 수용성이 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0014] 한편, 본 발명의 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 아스트라갈린 용액은, 바람직하게 약염기성의 완충용액에 아스트라갈린이 용해되어 있는 것이 좋다.

[0015] 한편, 본 발명의 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 반응은, 바람직하게 말토오스(maltose), 알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin; alpha-CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin; beta-CD) 및 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin; gamma-CD) 중 선택되는 어느 하나가 첨가된 아스트라갈린 용액에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 첨가한 후, 55~65℃에서 2~4시간 동안 반응시키는 것이 좋다.

[0016] 한편, 본 발명은 아스트라갈린에 글루코스 하나가 전이되어 결합된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 함유하는 당뇨 합병증 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 당뇨 합병증 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 한편, 본 발명은 아스트라갈린에 글루코스 하나가 전이되어 결합된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 함유하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 염증 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈를 통하여 아스트라갈린에 당 전이를 함으로써, 기존의 아스트라갈린 보다 65 ~ 420배 까지 수용성이 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 제조할 수 있다. 또한, 이렇게 제조된 아스트라갈린의 당전이 화합물은 기존의 아스트라갈린에 비하여 알도오스 환원 저해 효과, 항염증 효과, 항산화 효과가 현저하게 증진되어 당뇨 합병증 예방 또는 치료용 조성물, 항염증 증진용 조성물로서 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 아스트라갈린의 당전이 화합물을 TLC(thin layer chromatography)를 통하여 분석한 결과이다.

도 2는 기존의 물질인 아스트라갈린, 당전이 화합물 그리고 당전이 화합물을 분리 정제한 물질을 HPLC(high pressure liquid chromatography)를 통해 분석한 결과이다.

도 3은 아스트라갈린의 당전이 화합물의 당전이를 확인하기 위해 MALDI-TOF MS를 이용하여 질량을 분석한 결과이다.

도 4는 G1-아스트라갈린의 당전이를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C NMR로 분석한 결과이다.

도 5는 G1-아스트라갈린의 HSQC(heteronuclear single quantum coherence) 결과이다.

도 6은 G1-아스트라갈린의 HMBC(heteronuclear multiple bond correlation) 결과이다.

도 7은 G1-아스트라갈린의 세포생존력 평가에 대한 결과이다.

도 8은 G1-아스트라갈린의 NO 저해활성 평가에 관한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 아스트라갈린은 항산화, 항종양, 항HIV, 항염증 효과를 발휘함에도 낮은 생체이용률 및 수용성으로 그 효능이 제대로 발휘되지 못하며 산업화가 어려운 실정이었다. 이러한 문제점을 해결하고자 본 발명은 글루코스를 포함하는 기질을 포함하는 아스트라갈린 용액에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 첨가한 후, 반응시켜 수용성이 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 의해 제조된 아스트라갈린의 당전이 화합물은 당이 α -1,4 글루코사이드 결합으로 전이된 당전이 화합물로, 글루코스가 한 개 또는 두 개가 아스트라갈린에 전이되어 결합된 형태이다. 본 발명에

의해 제조된 아스트라갈린의 당전이 화합물은 기존의 아스트라갈린보다 65 ~ 420배 까지 수용성이 증대되어 종래의 문제를 일거에 해결할 수 있다.

[0023] 이와 같이 수용성이 대폭 증대된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 제조하기 위해서는 글루코스를 포함하는 기질이 포함된 아스트라갈린 용액에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 첨가한 후, 55~65℃에서 2~4시간 동안 반응시키는 것이 좋다. 상기 조건에서 더욱 수용성이 우수한 아스트라갈린의 당전이 화합물을 다량 제조할 수 있기 때문이다.

[0024] 이때, 상기 아스트라갈린 용액은, 바람직하게 약염기성의 완충용액에 아스트라갈린이 용해되어 있는 것이 좋은데, 약염기 조건하에서 당전이가 잘되며 수용성이 더욱 우수한 아스트라갈린의 당전이 화합물을 제조할 수 있다.

[0025] 한편, 아스트라갈린에 글루코스 하나가 전이되어 결합된 아스트라갈린의 당전이 화합물은 기존의 아스트라갈린에 비하여 알도오스 환원 저해 효과, 항염증 효과, 항산화 효과가 현저하게 증진되어 당뇨 합병증 예방 또는 치료용 조성물, 항염증용 조성물로서 제공할 수 있다.

[0026] 상기 알도오스 환원제 저해 효과는 알도오스 환원효소의 활성을 억제하는 것인데, 알도오스 환원효소는 당뇨 합병증에 작용하는 효소 중 하나이다. 특히 눈에 작용할 경우 백내장을 유발한다. 즉, 알도오스 환원효소 저해 효과를 발휘하는 것은 당뇨 합병증 치료효과가 있다는 것이다.

[0027] 또한, 상기 당뇨 합병증은 기술이 속하는 분야에서 통상적으로 의미하는 모든 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 당뇨성 망막증, 당뇨성 백내장, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증, 당뇨성 혈관합병증 중 선택될 수 있다.

[0028] 상기 염증성 질환은 본 기술이 속하는 분야에서 통상적으로 의미하는 모든 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 간염, 식도염, 위궤양, 위염, 장염, 궤장염, 십이지장궤양, 대장염, 치질, 통풍, 간직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 방광염, 신장염, 다발성 경화증 및 급성 또는 만성 염증 질환 중 선택될 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 구성을 하기 실시예를 통해 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase)를 이용한 아스트라갈린의 당전이 화합물의 생산]

[0033] 본 실시예에서는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase)를 이용하여 아스트라갈린의 당전이 화합물을 생산할 시, 최적 기질과 최적 시간을 확인하고, 제조된 아스트라갈린의 당전이 화합물의 수용성을 확인하였다.

[0035] 1) 최적 기질 반응 실험

[0036] 아스트라갈린에 당을 전이하는 최적 기질을 알아보기 위해 각각의 1% 기질 말토오스(maltose; G2), 가용성 전분(soluble starch), 알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin; α -CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin; β -CD), 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin; γ -CD)과 pH 6.0의 50 mM NaOAc 완충용액에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 5 U을 넣고, 60℃에서 3시간 동안 반응한 후, HPLC(high pressure liquid chromatography) 분석을 수행하였다. 그 결과는 하기 표 1과 같았다.

표 1

기질	Total product (mM)
가용성 전분(soluble starch)	0.47
말토오스(maltose)	0.50
알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin; α -CD)	0.60
베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin; β -CD)	0.63

감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin; γ -CD)	0.65
--	------

[0039] HPLC 결과, 상기 표 1에서 확인되는 바와 같이, 감마-사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin; γ -CD)를 사용할 경우 가장 우수한 수율을 보였지만, 말토오스(maltose; G2), 가용성 전분(soluble starch), 알파-사이클로덱스트린(α -cyclodextrin; α -CD), 베타-사이클로덱스트린(β -cyclodextrin; β -CD)도 수율이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0040] 한편, 이하 본 발명에서는 가격적인 효율 면에서 수율에서 큰 차이를 보이지 않았던 말토오스(maltose; G2)를 기질로 사용하여 실험하였다.

[0042] 2) 최적 시간 반응 실험

[0043] 아스트라갈린에 당을 전이하는 최적 시간을 알아보기 위해 각각 1% 말토오스(maltose; G2)를 이용하여 pH 6.0의 50 mM NaOAc 완충용액에 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGase) 5 U를 넣고, 60℃에서 1~12시간 동안 반응시킨 후, HPLC(high pressure liquid chromatography) 분석을 수행하였다. 그 결과는 하기 표 2와 같다.

표 2

반응시간 (h)	Total product (mM)
1	0.43
3	0.50
5	0.49
7	0.44
9	0.41
12	0.39

[0046] HPLC 결과, 상기 표 2에서 확인되는 바와 같이, 3~5시간 반응하였을 때 0.45 mM 이상의 당전이 화합물이 생성되고, 3시간 반응하였을 때 0.50 mM로 가장 많은 당전이 화합물이 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

[0048] [실험예 1: 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGase)를 이용하여 생산된 아스트라갈린의 당전이 화합물의 확인]

[0049] 본 실험예에서는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGase)를 이용하여 생산된 아스트라갈린의 당전이 화합물을 확인하고자 하였다. 이때, 아스트라갈린의 당전이 화합물은 상기 실시예 1의 '최적 기질 반응 실험'과 동일한 방법으로 제조하였고, 기질은 말토오스를 사용하였다.

[0050] 실험 결과, 도 1 내지 도 6에서 확인되는 바와 같이, 포도당이 아스트라갈린에 전이되어, 아스트라갈린의 당전이 화합물이 형성됨을 확인할 수 있었다.

[0051] 도 1은 아스트라갈린의 당전이 화합물의 TLC(thin layer chromatography) 분석 결과로써, 아스트라갈린 당전이 후, 글루코스 하나가 당전이된 'G1-astragalin', 글루코스 두 개가 당전이된 '이 생성되었음을 확인시켜준다.

[0052] 도 2는 아스트라갈린, 아스트라갈린의 당전이 화합물, 아스트라갈린의 당전이 화합물을 분리 정제한 물질의 HPLC(high pressure liquid chromatography) 분석 결과로써, 아스트라갈린 당전이 후, 글루코스 하나가 당전이된 'G1-astragalin', 글루코스 두 개가 당전이된 '이 생성되었음을 확인시켜준다.

[0053] 도 3은 MALDI-TOF MS를 이용하여 G1-아스트라갈린의 질량을 분석한 결과로써, G1-아스트라갈린이 형성되었음을 확인시켜준다.

- [0054] 도 4는 G1-아스트라갈린의 ^1H , ^{13}C NMR 분석 결과로써, G1-아스트라갈린이 형성되었음을 확인시켜준다.
- [0055] 도 5는 G1-아스트라갈린의 HSQC(heteronuclear single quantum coherence) 결과로써, G1-아스트라갈린이 형성되었음을 확인시켜준다.
- [0056] 도 6은 G1-아스트라갈린의 HMBC(heteronuclear multiple bond correlation) 결과로써, G1-아스트라갈린이 형성되었음을 확인시켜준다.

[실험예 2: 아스트라갈린의 당전이 화합물과 기존 아스트라갈린의 수용성 비교]

- [0059] 본 실험예에서는 본 발명의 효소적 당전이 반응을 통하여 생성된 아스트라갈린의 당전이 화합물(G1-아스트라갈린: 글루코스가 결합된 아스트라갈린, G2-아스트라갈린: 말토오스가 결합된 아스트라갈린)과 기존의 아스트라갈린의 수용성을 측정하였다.
- [0060] 아스트라갈린과 당전이 화합물을 DMSO를 통하여 완전히 용해한 샘플을 이용해 스탠다드 커브를 측정하였다. 각각 화합물의 수용성을 보기 위해 아스트라갈린과 당전이 화합물을 37℃에서 3시간 동안 소니케이션을 통해 포화된 수용액 상태로 만든 후 11,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 수용액화되지 않은 시료를 제거한 용액을 HPLC를 통하여 분석하였다. 그 후, 스탠다드 커브와 비교하여 포화된 시료의 몰농도를 측정하였다. 측정결과는 하기 표 3과 같았다.

표 3

[0061]

시료	수용성 (mM)	상대적 수용성
아스트라갈린	0.56	1
G1-아스트라갈린	36.19	6.5×10
G2-아스트라갈린	237.91	4.2×10^2

- [0063] 측정결과, 하기 표 3에서 확인되는 바와 같이, 당전이된 화합물 G1-아스트라갈린과 G2-아스트라갈린은 기존의 아스트라갈린에 비하여 수용성이 각각 65배, 420배 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[실험예 3: G1-아스트라갈린의 알도오스 환원 효소 억제율 평가]

- [0066] 본 실험예에서는 아스트라갈린의 당전이 화합물(G1-아스트라갈린)의 알도오스 환원 효소 억제율을 평가하고자 하였다.
- [0067] 저급 렌즈 알도오스 환원효소는 하기 방법에 따라 제조되었다. 250 내지 280 g의 SD-rat(Sprague Dawley 랫트)로부터 수정체(lens)를 제거하였으며, 사용하기 전 -70℃에 냉동시켰다. 그 후, 백내장이 아닌 투명한 수정체를 적출하고, 균질액은 0.1M PBS(phosphate buffer saline), (pH 6.2)에서 제조되었다. 상기 균질액은 10,000 rpm에서 30분 동안 냉장형 원심분리기를 이용하여 원심분리한 후, 그 상등액을 취하여 렌즈 알도오스 환원 효소 시험의 효소원으로 사용하였다. 모든 절차는 4℃에서 이루어졌다.
- [0068] 기질로 DL-글리세르알데하이드(DL-glyceraldehyde)를 사용하여 3분 동안 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 분광광도계로 측정함으로써 알도오스 환원 효소의 활성도를 평가하였다. 각 1.0 ml 큐벳에 상기 90 μl 의 알도오스 환원 효소(6.5 U/mg), 531 μl 의 칼륨완충(potassium buffer) (0.1M, pH 7.0), 90 μl 의 NADPH 용액(1.6mM, in potassium buffer), 90 μl 의 황산암모늄(ammonium sulfate) 용액(4M, in potassium buffer), 90 μl 의 DL-글리세르알데하이드(DL-glyceraldehyde) 용액(25 mM, in potassium buffer) 및 9 μl 의 G1-아스트라갈린 또는 퀘르세틴(quercetin)을 담아 각 실험군 및 양성대조군을 준비하였다.
- [0069] G1-아스트라갈린의 알도오스 환원 효소 억제율에 대해 평가를 위해 알도오스 환원효소 억제효과가 있다고 알려진 양성대조군으로 퀘르세틴을 사용하였으며, 상기와 같은 방법으로 각 실험군 및 대조군을 제조하여 3분 동안 340nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정한 후, 하기의 수학적 식 1을 이용하여 G1-아스트라갈린의 알도오스 환원 효소 억제율을 구하였다. 그 결과를 표 4에 나타내었다.

[0070] [수학식 1]

$$\text{알도오스 환원 효소 억제율(\%)} = \frac{(\text{대조군}(\text{control}) - \text{샘플}(\text{sample}))}{\text{대조군}(\text{control}) - \text{블랭크}(\text{blank})} \times 100$$

[0071]

[0072] 대조군(control): 효소와 기질을 포함한 용액에 대한 NADPH 흡광도

[0073] 블랭크(blank): 기질을 제외한 나머지를 모두 포함한 용액에 대한 NADPH 흡광도

[0074] 샘플(sample): G1-아스트라갈린 또는 퀘르세틴, 효소 및 기질을 모두 포함한 용액에 대한 NADPH 흡광도

[0076] 한편, G1-아스트라갈린에 대한 알도오스 환원 효소의 활성이 50% 억제되는 시점에 대한 각 실험군 및 양성대조군의 농도(IC₅₀)는 잔존 활성에 대해 표시된 로그 농도의 최소 제곱 회기선으로부터 산출하였다. 이 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0077]

구분	농도 (μg/ml)	억제율 (%)	IC ₅₀ (μg/ml)	IC ₅₀ (μM)
아스트라갈린	10	29.31±1.09	17.06±0.15	38.05
G1-아스트라갈린	5	75.13±3.71	1.91±0.09	0.32
	1	35.89±1.10		
	0.5	10.86±0.57		
양성대조군 (Quercetin)	1	88.73±4.97	0.32±0.01	0.10
	0.5	54.16±3.14		
	0.1	17.47±1.51		

[0078]

[0079] 확인결과, 상기 표 4에서 확인되는 바와 같이, G1-아스트라갈린 농도 5 μg/ml 에서는 75.13%, 1 μg/ml에서는 35.89%, 0.5 μg/ml 에서는 10.86%의 알도오스 환원 효소 억제율을 나타냈으며, G1-아스트라갈린의 농도가 높아질수록 알도오스 환원 효소 억제율이 증가됨을 확인하였다.

[0080] 또한, G1-아스트라갈린은 아스트라갈린보다 저농도에서 탁월한 알도오스 환원 효소 억제율을 나타내었다. 상기 표 4에서와 같이 G1-아스트라갈린은 0.32 μM 의 IC₅₀을 가짐으로써, 아스트라갈린보다 알도오스 환원 효소 억제 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다.

[0082] [실험예 4: G1-아스트라갈린의 항산화 활성을 확인하기 위한 ABTS 라디칼 소거율 평가]

[0083] 본 실험예에서는 G1-아스트라갈린의 항산화력을 측정하기 위해 ABTS법을 사용하였다.

[0084] ABTS법은 과황화칼륨(potassium persulfate)과의 반응에 의해 생성된 ABTS+가 시료 내 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화력을 측정하는 방법이다. 또한, 본 실험예에서는 양성대조군으로 트롤록스(Trolox)를 사용하였다.

[0085] 먼저, ABTS를 2.0mM 농도로 증류수에 용해한 다음 3.5mM의 과황화칼륨(potassium persulfate)을 가하여 ABTS+ 라디칼을 생성시켜 상온의 암조건에서 24시간 동안 방치 후 사용하였다. 소거율은 ABTS 용액 290 μl와 G1-아스트라갈린 또는 트롤록스(Trolox) 10 μl를 혼합하여 10분간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거율은 하기 수학식 2에 의하여 산출하였고, ABTS 라디칼 소거율의 결과는 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 억제율%로 나타내었으며, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[0086] [수학적식 2]

$$ABTS \text{ 라디칼 소거율}(\%) = 100 - \frac{OD_{\text{샘플}}}{OD_{\text{대조군}}}$$

[0087]

표 5

[0088]

구분	농도 ($\mu\text{g/ml}$)	억제율 (%)
아스트라갈린	33.33	23.84 ± 2.95
G1-아스트라갈린	33.33	20.74 ± 1.31
양성대조군 (Trolox)	8.33	88.73 ± 4.97
	3.33	54.16 ± 3.14
	1.66	17.47 ± 1.51

[0090]

확인결과, G1-아스트라갈린의 농도 $33.33 \mu\text{g/ml}$ 에서는 20.74%의 ABTS 라디칼 소거율을 나타내었고, 아스트라갈린은 같은 농도에서 23.84%의 ABTS 라디칼 소거율을 나타내었다. 이와 같은 결과로부터, G1-아스트라갈린은 당전이 되었음에도 불구하고 기존의 아스트라갈린과 오차수준 내에서 유사한 항산화효과를 보임을 확인할 수 있었다.

[0092] [실험예 5: G1-아스트라갈린의 세포 생존력 평가]

[0093]

본 실험예에서는 G1-아스트라갈린의 세포 생존력을 평가하고자 하였다.

[0094]

세포 생존력 평가에 이용한 Raw 264.7 세포의 배양은 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신(100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에 적응시켜 계대 배양하였다. G1-아스트라갈린이 Raw 264.7 세포주에 미치는 영향을 테스트하기 위하여 96웰 접시에 각 웰당 5×10^3 수의 세포를 분주하고, G1-아스트라갈린을 각 농도별(1.5, 7.5, 15 μM)로 처리하여 2일 동안 배양하였다.

[0095]

배양 후, 각 웰당 MTS 용액 20 μl 를 첨가하여 90분 동안 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에 배양한 후, 마이크로플레이트 리더기를 이용해 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이의 결과를 도 7에 나타내었다. 아무것도 처리하지 않은 군을 세포생존력 100%로 간주하였다.

[0096]

확인결과, 도 7에서 확인되는 바와 같이, 1.5 내지 15 μM 의 G1-아스트라갈린은 세포 생존력을 가지는 것을 확인하였으며, G1-아스트라갈린이 세포 독성이 없음을 확인할 수 있었다. 도 7은 G1-아스트라갈린의 세포생존력 평가에 대한 결과이다.

[0098] [실험예 6: G1-아스트라갈린의 NO 저해활성 평가]

[0099]

본 실험예에서는 G1-아스트라갈린에 대한 NO 저해활성 평가를 수행하고자 하였다.

[0100]

먼저, 상기 실험예 5와 같이 Raw 264.7 세포를 배양하였다. 다음, 12 웰 접시에 각 웰당 4×10^5 수의 Raw 264.7 세포를 분주하고, LPS(lipopolysacchride) 1 $\mu\text{g/ml}$ 및 실험군 또는 양성대조군을 농도별로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.

[0101]

여기서, LPS는 그람-음성 박테리아의 세포외막에 존재하며, 대식세포 (macrophage) 또는 단핵세포 (monocyte)에서 산화질소 (nitric oxide), 염증성사이토카인 (inflammatory cytokines), 프로스타글란딘 E2와 같은 다양한 전구염증성 인자들을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

[0102]

NO 생성량은 상층액을 모아 그리스 시약으로 10분간 반응시킨 후에 570nm에서 흡광도로 측정하였으며 하기 수학적식 3을 통해 각 실험군 및 양성대조군에 대한 NO 저해율을 산출하였다. 이의 결과를 도 8에 나타내었다. 여기서, 양성대조군으로 우수한 NO 저해제로 알려진 L-NAME(N-nitro l-arginine methyl ester)을 사용하였다.

[0103] [수학식 3]

$$NO \text{ 저해율}(\%) = \left[1 - \frac{C_{sample} - C_{blank}}{C_{control} - C_{blank}} \right] \times 100$$

[0104]

[0105] C_{sample} : LPS 및 각 실험군이 처리된 세포로부터의 NO 생성 농도

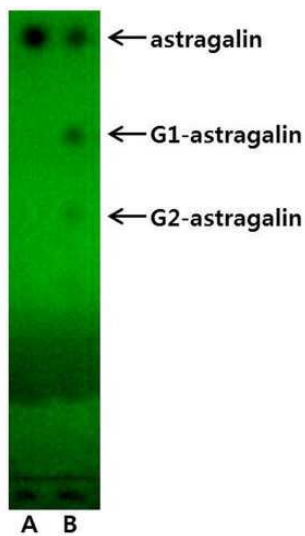
[0106] C_{blank} : 아무것도 처리하지 않은 세포로부터의 NO 생성 농도

[0107] $C_{control}$: LPS가 처리된 세포로부터의 NO 생성 농도

[0109] 확인결과, 도 8에서 확인되는 바와 같이, 7.5 내지 15 μM 의 G1-아스트라갈린은 NO 저해활성을 가지며, 처리 농도의 증가에 따라 NO 저해활성도 증가함을 확인할 수 있었다. 특히, G1-아스트라갈린 15 μM 처리군은 아스트라갈린 15 μM 처리군보다 우수한 NO 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다. 도 8은 G1-아스트라갈린의 NO 저해활성 평가에 관한 결과이다.

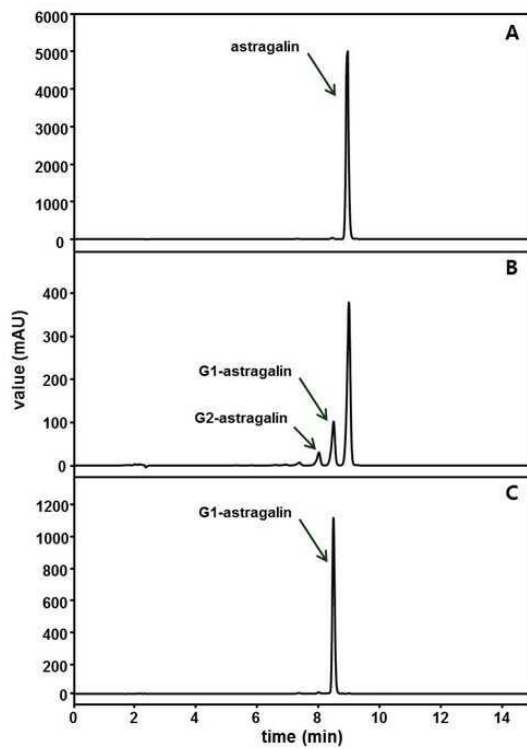
도면

도면1



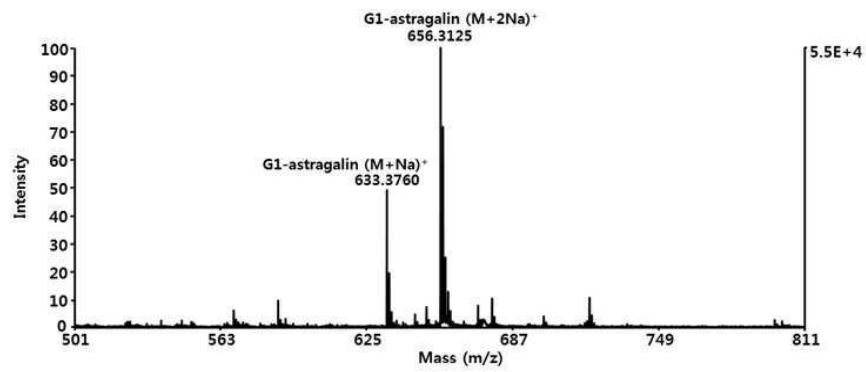
A: astragaloside 표준용액 (반응 전), B: astragaloside 당전이 산물 (반응 후)

도면2

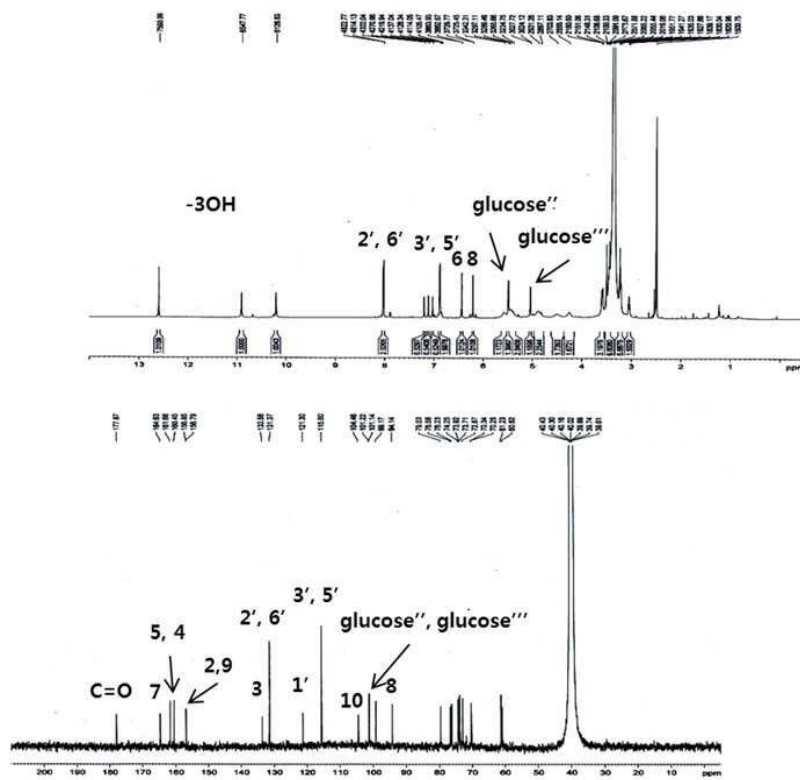


A: 반응 전 astragaloside, B: 반응 후 astragaloside와 당 전이산물, C: 분리 정제한 astragaloside 당 전이산물

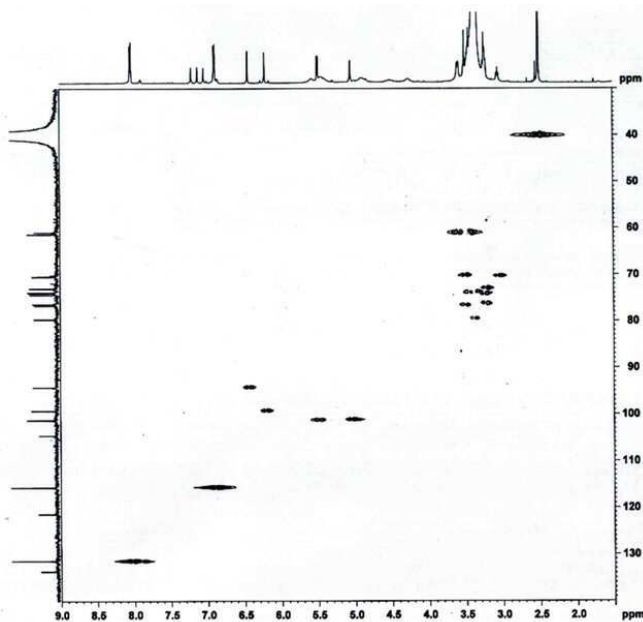
도면3



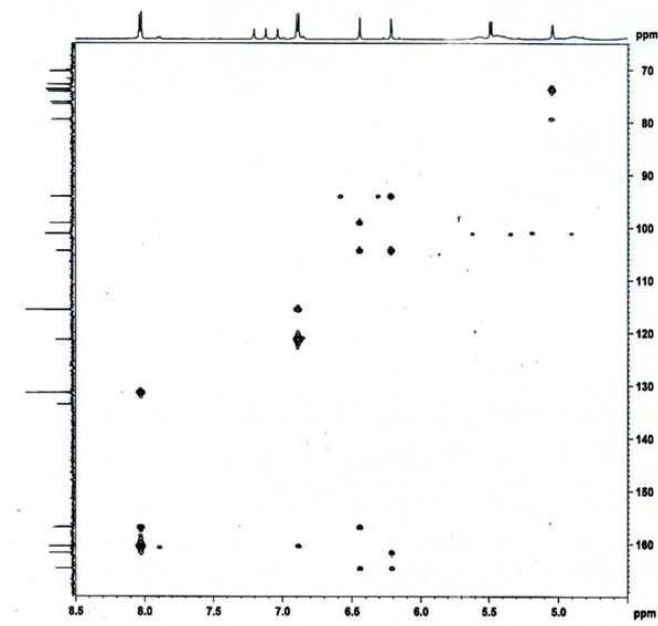
도면4



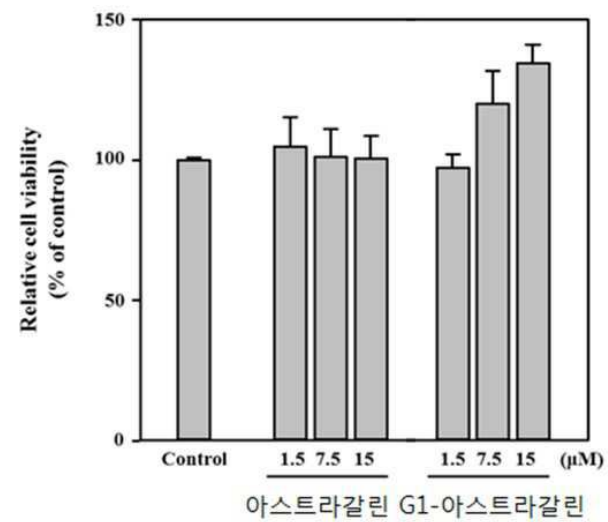
도면5



도면6



도면7



도면8

