



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0008425
(43) 공개일자 2020년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/185 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0082517

(22) 출원일자 2018년07월16일

심사청구일자 2018년07월16일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

백남인

경기도 화성시 동탄순환대로21길 53 1306동 403호(청계동, 롯데캐슬 알바트로스)

고정환

경기도 고양시 덕양구 호국로 1059-72

강동호

서울특별시 마포구 광성로6길 16 . (신수동)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 10 항

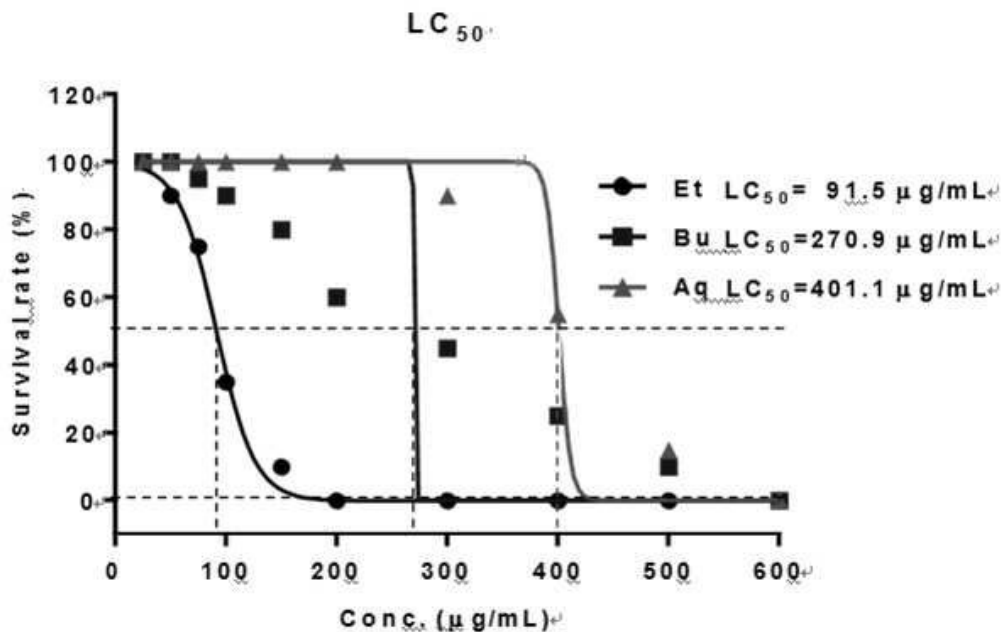
(54) 발명의 명칭 플라보노이드 8-O-글루쿠로니드 화합물을 포함하는 향당료 및 향산화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아욱으로부터 유래된 신규 화합물 1종이 포함된, 플라보노이드 8-O-글루쿠로니드 (Flavonoid 8-O-glucuronide) 화합물들을 유효성분으로 포함하는, 향당료 및 향산화 효과를 가지는 약학적 조성물, 식품 조성물에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도6



본 발명에서 아욱 분획물로부터 유래된 화합물에 의해 알록산을 통해 유도된 제브라피쉬 당뇨모델에서 손상된 췌장도 회복능 및 K_{ATP} 채널을 폐쇄하는 메커니즘을 통해 항당뇨 효과가 나타나는 것으로 확인되었다. 또한 아욱으로부터 분리된 모든 플라보노이드 8-*O*-글루쿠로니드 화합물들은 ABTS, ORAC, 및 SOD 분석에서 뛰어난 항산화 활성을 가짐으로써 플라보노이드의 8번 위치에 결합한 글루쿠론산 모이어티가 항산화 활성 발현에 기인하는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명의 조성물은 항당뇨용 및 항산화용 조성물과 건강기능식품의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 36/185 (2013.01)

A61P 3/10 (2018.01)

A61P 39/06 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

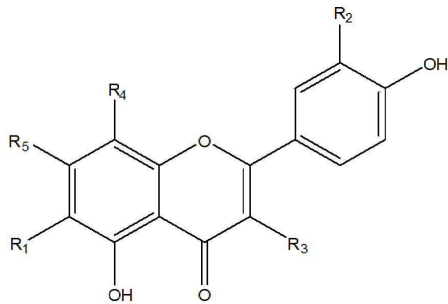
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]

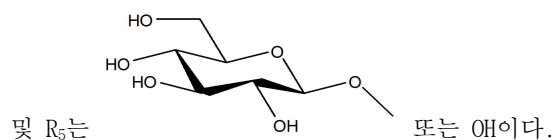
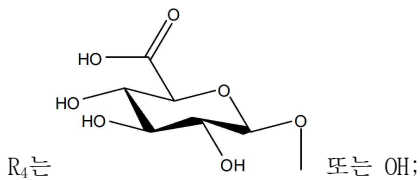


상기 식에서,

R₁은 OH 또는 H;

R₂는 OH 또는 H;

R₃은 OH, H 또는 *O*-β-D-글루코피라노시드;



또는 OH이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 노탄게레틴-8-*O*-β-D-글루쿠로노피라노시드 (nortangeretin-8-*O*-β-D-glucuronopyranoside: 화합물 1), 이소스쿠텔라레인 8-*O*-β-D-글루쿠로노피라노시드 (isoscuteallarein 8-*O*-β-D-glucuronopyranoside: 화합물 2), 하이폴레틴 8-*O*-β-D-글루쿠로노피라노시드 (hypolaetin 8-*O*-β-D-glucuronopyranoside: 화합물 3), 헤르바세틴 8-*O*-β-D-글루쿠로노피라노시드 (herbacetin 8-*O*-β-D-glucuronopyranoside: 화합물 4), 헤르바세틴 3-*O*-β-D-글루코피라노실-8-*O*-β-D-글루쿠로노피라노시드 (herbacetin 3-*O*-β-D-glucopyranosyl-8-*O*-β-D-glucuronopyranoside: 화합물 5), 또는 이소스쿠텔라레인 7-*O*-β-D-글루코피라노시드 (isoscuteallarein 7-*O*-β-D-glucopyranoside: 화합물 6)인, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 유래된 것인, 조성물.

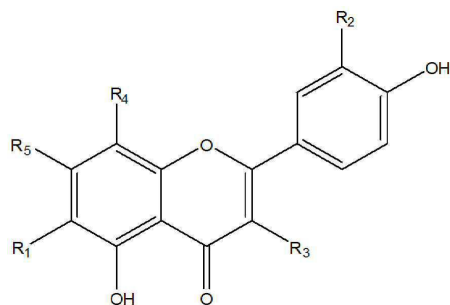
청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 손상된 체장도의 크기를 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]

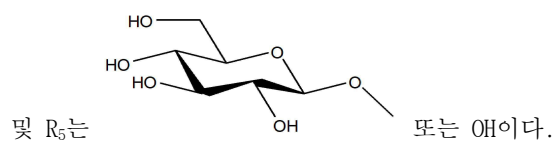
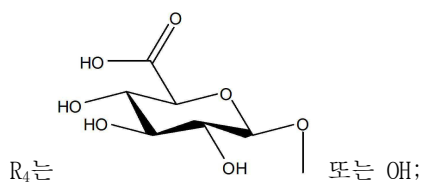


상기 식에서,

R₁은 OH 또는 H;

R₂는 OH 또는 H;

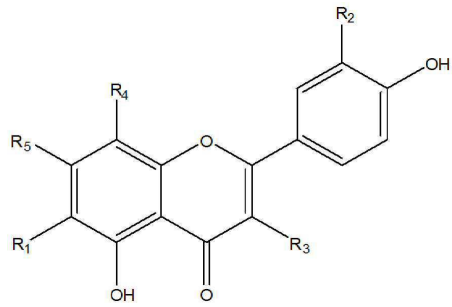
R₃은 OH, H 또는 *O*-β-D-글루코피라노시드;



청구항 6

아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 방법.

[화학식 1]

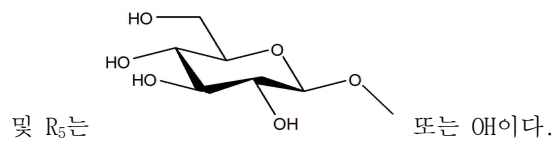
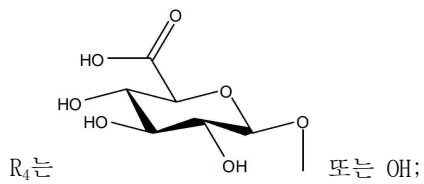


상기 식에서,

R_1 은 OH 또는 H;

R_2 는 OH 또는 H;

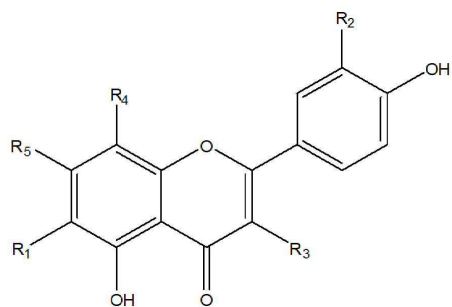
R_3 은 OH, H 또는 *O*- β -D-글루코피라노시드;



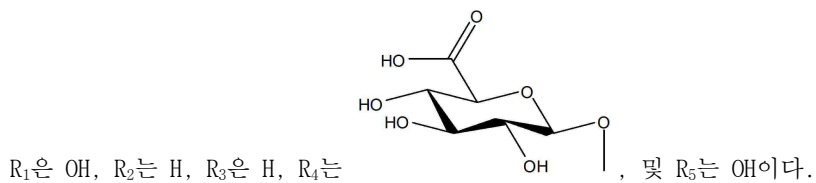
청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 화합물.

[화학식 1]



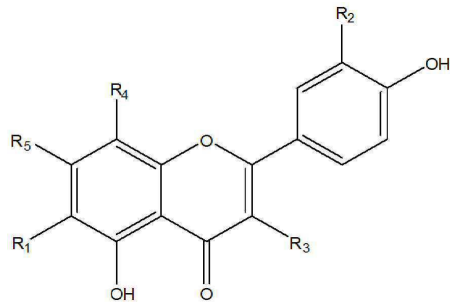
상기 식에서,



청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물.

[화학식 1]

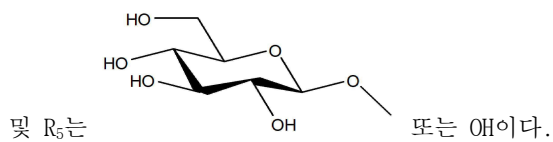
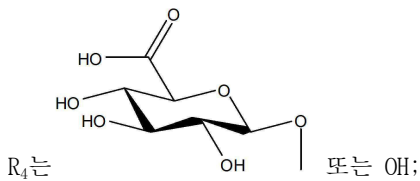


상기 식에서,

R₁은 OH 또는 H;

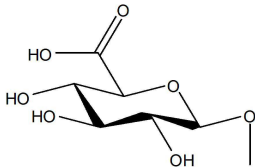
R₂는 OH 또는 H;

R₃은 OH, H 또는 *O*-β-D-글루코피라노시드;



또는 OH이다.

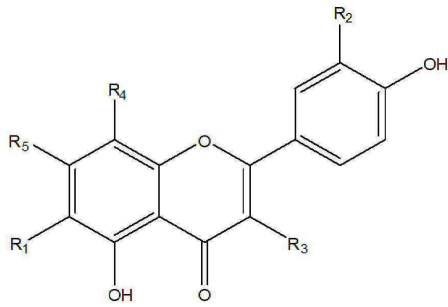
청구항 9

제8항에 있어서,

인 R₄에 의해 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 것인, 조성물.

청구항 10

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항산화용 식품 조성물.

[화학식 1]

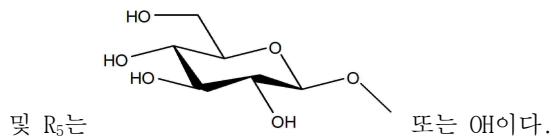
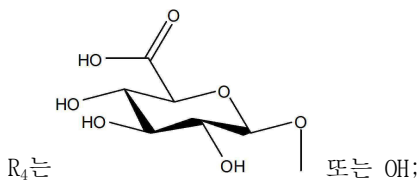


상기 식에서,

R_1 은 OH 또는 H;

R_2 는 OH 또는 H;

R_3 은 OH, H 또는 *O*-β-D-글루코피라노시드;



또는 OH이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 플라보노이드 8-*O*-글루쿠로니드 (Flavonoid 8-*O*-glucuronide) 화합물을 유효성분으로 포함하는, 향당뇨용 및/또는 항산화용 약학적 조성물; 및 식품 조성물;에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 당뇨병 (Diabetes mellitus)은 인슐린이 부족하거나 인슐린에 대한 감수성이 떨어져 탄수화물 대사 (carbohydrate metabolism)에 이상이 생기는 질환이다. 폴리펩티드성 호르몬인 인슐린은 췌장에 있는 췌장도 (Pancreatic islets: PI)의 β-세포에서 만들어지는데, 혈중 글루코스 농도가 증가하면 분비되며 감소하면 분비가 억제되어 에너지원의 적절한 활동을 조절하게 된다. 당뇨병 환자의 경우 β-세포 수의 감소와 이의 기능 이상이 생긴 것이다.

[0004] 미국 당뇨병 협회는 당뇨병에 대한 의학적 분류를 인슐린 의존형 당뇨병 (제1형)과 인슐린 비의존성 당뇨병 (제2형) 두 가지로 구분하고 있다. 당뇨병의 95% 이상을 차지하는 인슐린 비의존성 당뇨병 (제2형)의 병인은 두 가지 원인, 즉 인슐린 분비장애 및 인슐린 저항성의 복합 장애로 알려져 있다. 인슐린 분비장애란 혈당 농도에 따라 췌장의 β-세포에서 적절한 양의 인슐린이 분비되지 않는 상황을 말하며, 이는 인슐린을 분비하는 β-세포의 양적인 감소나 기능적인 분비 장애를 모두 포함한다. 인슐린 저항성이란 분비된 인슐린이 혈류를 타고 표적장기에 도달했으나 그 표적세포에서 인슐린 작용 및 민감성이 저하된 상황을 의미하는데, 일반적으로 세포막 수용체 결합 후의 신호전달장애로 생각되며, 그 원인으로 유전적인 소인, 비만, 육체적 활동저하 및 고혈당 또는 이상지질혈증 등이 있다. 인슐린 저항성이 있으면 저항성을 극복하기 위해 더 많은 양의 인슐린이 분비되어야 하고,

반대로 인슐린 분비가 충분하지 않아 생긴 고혈당 자체가 다시 인슐린 저항성을 악화시킬 수 있다. 당뇨병을 치료하지 않고 방치하면 당뇨병성 망막증, 신장병, 유선증, 심장혈관 합병증 및 미세혈관 합병증이 발생할 수 있다. 그러므로 인슐린제제나 저혈당 약물의 조절을 통해서 당뇨에 의한 사망을 예방하고 사망률을 줄일 수 있다.

[0005] 따라서, 손상된 췌장 β -세포를 회복시키는 것은 당뇨병의 의미 있는 치료법이 될 수 있다 (Sunil C et al., Effect of ethanolic extract of *Pisonia alba* Span. leaves on blood glucose levels and histological changes in tissues of alloxan-induced diabetic rats. Int J Appl Res Nat Prod 2009;2:4-11). 현재까지 당뇨병 치료제에 사용되는 물질은 인슐린 분비를 증가시키거나 인슐린에 대한 감수성을 높이는 약제들로서, 인슐린의 반응을 증강시키는 피오글리타존 (pioglitazone)과 로지글리타존 (rosiglitazone), 인슐린 저항성을 개선시키는 메트포민 (metformin), 췌장의 β -세포에서 인슐린분비를 자극하는 설폰요소제 (sulfonylurea)와 메글리티나이드 (meglitinide)계열 등이 있다. 그러나, 이러한 약물은 간이나 신장, 근육 및 심장에 대한 독성과 함께 체중증가 증상 등의 부작용을 가지기 때문에, 부작용이 적고 체중증가 등을 유발하지 않으면서 효과적으로 당뇨병을 치료 또는 예방할 수 있는 당뇨병 치료제에 대한 개발의 필요성이 절실이 요구되고 있다.

[0007] 한편, 생체 내에서는 에너지 생산을 위한 산화과정 중 상당량의 활성산소가 생성된다. 활성산소가 순간적으로 다량 발생되거나 만성적으로 활성산소가 발생하게 되면 세포의 구성성분과 강하게 반응하여 세포와 조직에 손상을 유발하며, 지속적인 세포의 손상은 DNA 변성, 지질 산화, 단백질 분해 등을 초래할 수 있다.

[0008] 인체 내에는 과산화물제거효소(Superoxide dismutase, SOD), 글루타티온과산화효소(glutathione peroxidase, GPX), 카탈라아제(catalase, CAT), 글루타티온환원효소(glutathione reductase), 글루타티온-S-전달효소 (glutathione-S-transferase) 등과 같이 활성산소에 대항하는 항산화 효소가 존재하나, 산업화와 함께 증가하는 각종 환경오염 물질, 흡연, 스트레스 등으로 인해 인체 내의 항산화 효소 등의 활성만으로는 단백질 분해, DNA 손상을 방어하는데 한계가 있다.

[0009] 항산화제로 부틸레이트하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸레이트하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT)과 같은 합성물질들이 개발되었으나, 인체에 대한 여러 가지 부작용을 야기할 수 있어 천연물질로부터 유래한 안전한 항산화 물질을 찾는 연구가 요구되고 있다. 또한 식물 유래의 천연 화합물들은 자유라디칼, 그리고 활성 산소종의 소거제 혹은 환원제로서 산화과정을 지연시키는 것으로 알려져 있다(Pratt, D.E., *American Chemical Society*, 54-71, 1994 : Larson, R. A., *Phytochem.*, 27:969, 1988).

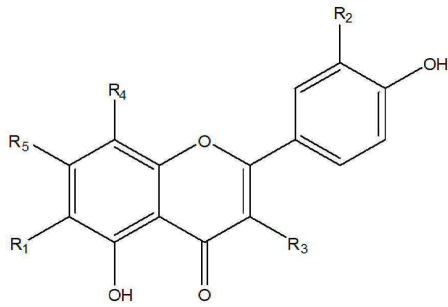
[0011] 상기와 같은 배경 하에, 본 발명자들은 천연물 유래 항당뇨 및 항산화 효과를 가진 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 아욱 지상부 분획물로부터 유래된 플라보노이드 8-O-글루쿠로니드 화합물들을 분리 및 동정하였으며, 플라보노이드 8-O-글루쿠로니드 화합물들을 처리하였을 때 손상된 췌장도 크기의 회복을 통한 항당뇨 효과가 나타남을 확인하였다. 또한, 뛰어난 항산화 활성을 가짐을 확인하였고, 이와 관련하여, 플라보노이드의 8번 위치에 결합한 글루쿠론산 (glucuronic acid) 모이어티가 항산화 활성 발현에 기인하는 것임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 하나의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항당뇨용 및/또는 항산화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] [화학식 1]



[0015]

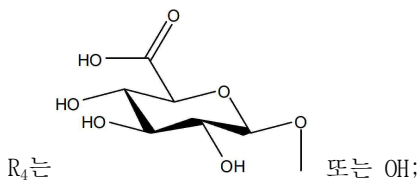
[0016] 상기 식에서,

[0017] R₁은 OH 또는 H;

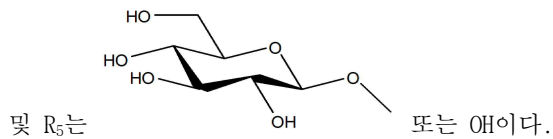
[0018] R₂는 OH 또는 H;

[0019] R₃은 OH, H 또는 *O*-β-D-글루코피라노시드;

[0020]



[0021]

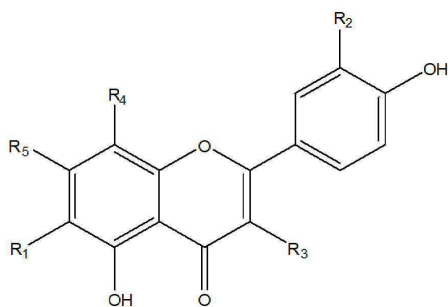


[0023] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항당뇨용 및/또는 항산화용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0025] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] [화학식 1]



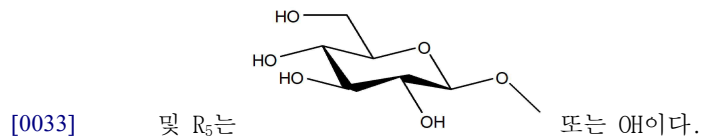
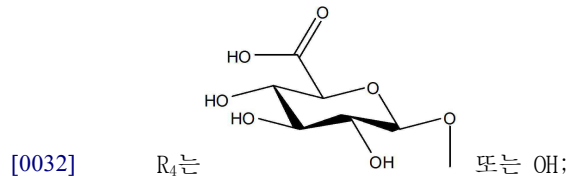
[0027]

[0028] 상기 식에서,

[0029] R₁은 OH 또는 H;

[0030] R_2 는 OH 또는 H;

[0031] R_3 은 OH, H 또는 $O-\beta$ -D-글루코피라노시드;



[0035] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 플라보노이드 8-O-글루쿠로니드 (Flavonoid 8-O-glucuronide) 화합물들로서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 당뇨병 치료 효과는 기존에 알려진 바 없고 본 발명에서 최초로 확인하였다. 본 발명의 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리하여 동정한 화학식 1로 표시되는 화합물은 당뇨병을 예방 또는 치료하는 효능이 있고, 이는 본 발명자들에 의하여 최초로 규명된 것이다.

[0036] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 노탄게레틴-8-O- β -D-글루쿠로노피라노시드 (nortangeretin-8-O- β -D-glucuronopyranoside: 화합물 1), 이소스쿠텔라레인 8-O- β -D-글루쿠로노피라노시드 (isoscuteallarein 8-O- β -D-glucuronopyranoside: 화합물 2), 하이폴레틴 8-O- β -D-글루쿠로노피라노시드 (hypolaetin 8-O- β -D-glucuronopyranoside: 화합물 3), 헤르바세틴 8-O- β -D-글루쿠로노피라노시드 (herbacetin 8-O- β -D-glucuronopyranoside: 화합물 4), 헤르바세틴 3-O- β -D-글루코피라노실-8-O- β -D-글루쿠로노피라노시드 (herbacetin 3-O- β -D-glucopyranosyl-8-O- β -D-glucuronopyranoside: 화합물 5), 또는 이소스쿠텔라레인 7-O- β -D-글루코피라노시드 (isoscuteallarein 7-O- β -D-glucopyranoside: 화합물 6)일 수 있다.

[0037] 본 발명에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리하여 동정한 것일 수 있다. 이 때, '아욱 (*Malva verticillata*)'은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다. 상기 아욱 추출물은 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어, 지상부, 뿌리, 줄기, 잎 뿐만 아니라 아욱 조직 배양물로부터 추출하여 생산할 수 있고, 특히 아욱 지상부를 사용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에서 '아욱 추출물'은 아욱 지상부를 대상으로 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 부탄올, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 균으로부터 선택되는 용매, 보다 구체적으로, 메탄올을 용매로 하여 추출한 결과물일 수 있다. 또한, 추출 온도는 20 내지 100°C, 20 내지 80°C, 20 내지 50°C일 수 있고, 추출 기간은 약 1시간 내지 4일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 당뇨병 치료 효과를 가지는 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하기 위해 아욱 추출물을 생산하는 방법이라면 제한되지 않고 이용할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 '분획물'은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서는 아욱 추출물을 용매 분획법, 한외여과 분획법, 크로마토그래피 분획법 등의 다양한 방법으로 분획한 결과물 등을 포함하며, 구체적으로 상기 아욱 추출물의 물 분획물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

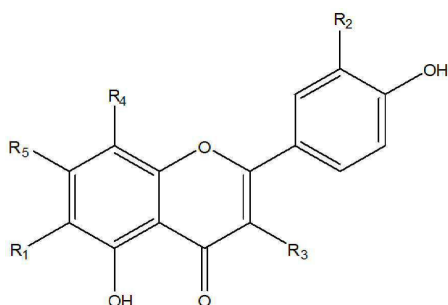
[0040] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 아욱의 메탄올 추출물을 수득하고 이의 물 분획물을 수득한 후, 이를 다양한 종류의 컬럼 크로마토그래피에 적용시킴으로써 본 발명의 6종의 화합물을 분리하였다.

[0041] 이외에도, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 아욱을 제외한 다른 천연 공급원으로부터 분리된 것일 수 있고, 당업계에서 공지된 방법을 통해 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질일 수 있으며, 이를 포함하여 입수 경로에 관계없이 본 발명에서 사용할 수 있다.

- [0043] 본 발명에서 '약학적으로 허용 가능한 염'은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1로 표시되는 화합물의 이로온 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기부가염을 의미한다. 이러한 염으로는 약학적으로 허용되는 유리산 (free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 있다.
- [0044] 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산 (fumaric acid), 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 구연산 (citric acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산 (hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 또한, 염기를 사용하여 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상, 또는 식품상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [0046] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은 달리 명시되지 않는 한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트 (메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트 (토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 '당뇨병'은 인슐린의 분비량이 부족하거나 인슐린의 작용 및 기능이 충분히 이루어지지 않을 때 나타나는 질병을 의미한다. 당뇨병에 걸릴 경우 글리코젠, 단백질 및 지방질의 과도한 분해로 간 또는 혈액 중 글루코스 농도의 비정상적인 증가를 일으켜 당뇨 및 케톤뇨를 초래하고, 수분 및 전해질 대사의 이상으로 전해질 상실에 의한 혈액 농축 상태와 함께 순환장애, 신장장애 등의 병적 상태를 가져오게 된다. 인슐린은 췌장 내에 존재하는 췌장도의 β-세포에서 분비되고 혈중 글루코스 농도가 증가하면 분비되며, 감소하면 분비가 억제되어 에너지원의 적절한 활동을 조절하게 된다. 당뇨병 진단은 일반적으로 혈중 글루코스 농도 측정을 통해서 가능한데, 인간에게서는 일반적으로 혈중 글루코스가 평소 200 mg/dl 이상, 공복시 140 mg/dl 이상일 때 당뇨병으로 진단한다. 따라서, 손상된 췌장 β-세포를 회복시키거나 췌장도 세포 내 글루코스 흡수를 증가시켜 당뇨병을 치료 또는 예방 용도에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 '예방'은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로, 당뇨병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 '치료'는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 당뇨병의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0051] 본 발명에서 당뇨병 예방 또는 치료는 손상된 췌장도의 크기를 증가시킴으로써 달성되는 것일 수 있다. 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물을 처리할 경우 손상된 췌장도가 회복되어 췌장도의 크기가 증가됨을 확인하였다. 즉, 화학식 1로 표시되는 화합물은 당뇨병 치료 효능을 나타내어 항당뇨용 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 실시예에서는, 화학식 1의 화합물에 알록산 (alloxan: AX)을 처리한 결과 손상된 췌장도의 크기를 증가시키는 것을 확인하였다.
- [0053] 본 발명에서 '약학적 조성물'은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

- [0054] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.
- [0055] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 혼합 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose), 락토오스 (Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0056] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구투여하거나 비경구투여할 수 있으며, 비경구투여시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 또는 당뇨병 예방, 치료, 또는 개선 효과를 나타내는 기타 약학적 활성 화합물과 결합하여 또는 적당한 집합을 이루어 사용될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 다른 양태로서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0062] [화학식 1]



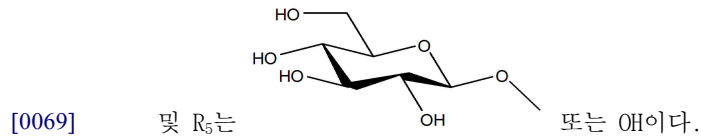
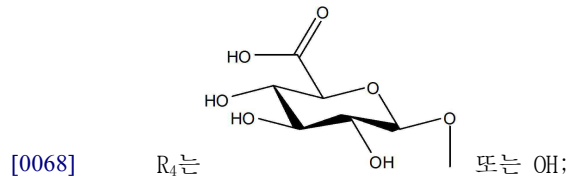
[0063]

[0064] 상기 식에서,

[0065] R₁은 OH 또는 H;

[0066] R_2 는 OH 또는 H;

[0067] R_3 은 OH, H 또는 $O-\beta$ -D-글루코피라노시드;



[0071] 화학식 1로 표시되는 화합물, 약학적으로 허용 가능한 염, 당뇨병, 예방에 대한 설명은 전술한 바와 같다. 또한, 화학식 1로 표시되는 화합물의 당뇨병 치료 효과에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0073] 본 발명에서 '개선'은 상기 식품 조성물의 섭취로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0074] 본 발명에서 식품 조성물은 유효성분인 화학식 1로 표시되는 화합물 이외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함할 수 있다.

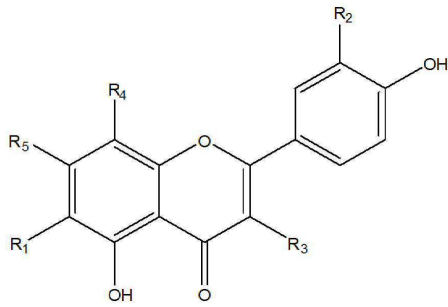
[0075] 본 발명에서 '식품보조첨가제'란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능 식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0076] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능식품'이란 특정보건용 식품, 기능성 식품, 건강식품과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 탈모 관련 질환의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다. 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 당뇨병 예방 또는 개선을 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0077] 본 발명의 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있고, 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다. 구체적으로, 상기 식품은 본 발명의 식품 조성물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등으로 사용될 수 있다. 당업자의 선택에 따라 식품에 포함될 수 있는 적절한 기타 보조성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함한다.

[0079] 본 발명의 다른 양태로서, 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이들의 혼합물을 분리하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이들의 혼합물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0080] [화학식 1]



[0081]

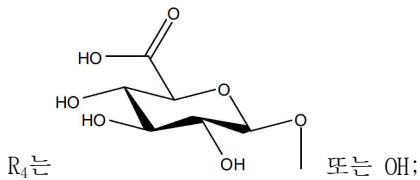
[0082] 상기 식에서,

[0083] R₁은 OH 또는 H;

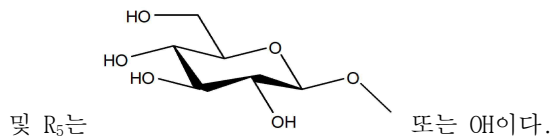
[0084] R₂는 OH 또는 H;

[0085] R₃은 OH, H 또는 *O*-β-D-글루코피라노시드;

[0086]



[0087]



[0089] 아욱, 추출물, 분획물, 화학식 1로 표시되는 화합물에 대한 설명은 전술한 바와 같다. 또한, 화학식 1로 표시되는 화합물의 당뇨병 치료 효과에 대해서는 전술한 바와 같다.

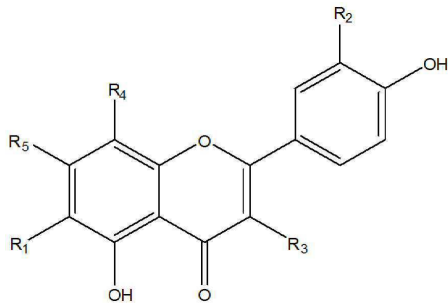
[0091] 더 나아가, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 당뇨병 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 당뇨병 치료 방법을 제공한다.

[0092] 약학적 조성물, 당뇨병에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0093] 본 발명에서 개체는 당뇨병이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 당뇨병을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여함으로써 시너지적인 효과를 나타낼 수 있다.

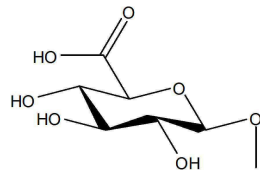
[0095] 본 발명의 다른 양태로서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0096] [화학식 1]



[0097]

[0098] 상기 식에서,

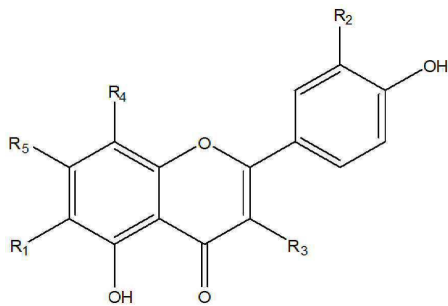


[0099] R₁은 OH, R₂는 H, R₃은 H, R₄는 , 및 R₅는 OH이다.

[0101] 상기 화합물은 기존에 알려진 바 없는 신규 화합물로서, 본 발명에서 아욱 추출물의 분획물로부터 분리한 새로운 화합물이다. 또한 상기 화합물은 항당뇨 활성을 가진다.

[0103] 본 발명의 다른 양태로서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물을 제공한다.

[0104] [화학식 1]



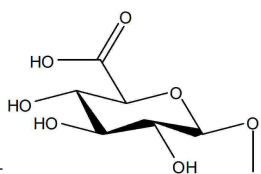
[0105]

[0106] 상기 식에서,

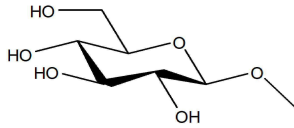
[0107] R₁은 OH 또는 H;

[0108] R₂는 OH 또는 H;

[0109] R₃은 OH, H 또는 *O*-β-D-글루코피라노시드;



[0110] R₄는 또는 OH;

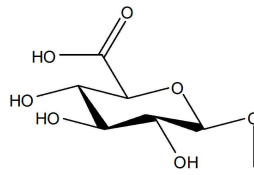


[0111] 및 R₅는 또는 OH이다.

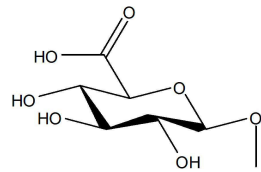
[0113] 화학식 1로 표시되는 화합물, 약학적으로 허용 가능한 염에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0114] 본 발명에서 '항산화'란 생체 내 활성산소의 생성을 방지하고 세포에 회복 불가능한 손상을 야기하는 산화현상을 방지하는 활성을 의미한다. 인체는 산화촉진물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)이 균형을 이루고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 이런 균형상태가 불균형을 이루게 되고 산화촉진 쪽으로 기울게 되면, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포손상 및 병리적 질환을 일으키게 된다. 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)은 불안정하고 반응성이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하고, 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하게 된다. NO, HNO₂, ONOO⁻와 같은 활성 질소종(reactive nitrogen species; RNS)은 염증 반응 시 대식세포 호중구 및 다른 면역 세포 들의 면역반응으로 인해 다량 생성되며, 이때 ROS도 같이 생성된다. 상기와 같은 활성산소는 체내에서 세포를 산화시켜 파괴시키며, 그에 따라 각종 질환에 노출되게 된다. 본 발명의 항산화용 조성물을 이용하여 건강증진에 기여할 수 있다.

[0115] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 항산화용 조성물에 포함된 화학식 1로 표시되는 화합물의 DPPH 라디칼 소거 활성, ABTS 라디칼 소거 활성, 산소 라디칼 흡광능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성을 분석하여, 각 화합물이 강한 항산화 효과를 갖는 것을 확인하였다.



[0116] 본 발명에서 상기 화합물의 항산화 활성은 R₄인 에 의한 것일 수 있다. 구체적으로, 본



발명의 일 실시예에서는 를 포함하는 화합물 5종(본 발명의 화합물 1 내지 5)에서 항산화 활성이 더욱 강하게 발현되는 것을 확인함으로써, 상기 모이어티가 항산화 활성에 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

[0118] 본 발명의 다른 양태로서, 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항산화용 식품 조성물을 제공한다.

[0119] 화학식 1로 표시되는 화합물, 약학적으로 허용 가능한 염, 항산화, 식품 조성물에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0121] 본 발명에서 아욱 분획물로부터 유래된 화합물에 의해 손상된 채널도가 회복되고, K_{ATP} channel closing mechanism을 통해 항당뇨 효과가 발현되는 것을 확인하였으며, ABTS, ORAC, 및 SOD 항산화 실험을 통해 뛰어난 항산화 활성을 가지는 것으로 확인하였다. 따라서 본 발명의 조성물은 항당뇨용 및 항산화용 조성물과 건강기능 식품의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0123] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 화합물(화합물 1)의 Proton NMR 데이터이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 화합물(화합물 1)의 Carbon NMR 데이터이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 화합물(화합물 1)의 2D-HSQC NMR 데이터이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 화합물(화합물 1)의 2D-HMBC NMR 데이터이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 화합물(화합물 1)의 UPLC-TOF Mass 데이터이다.
- 도 6은 96시간 동안 EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물, 및 물 분획물에 노출된 제브라피쉬 배아의 LC50값을 보여주는 그래프이다.
- 도 7은 채장도 면적 및 형광 강도 이미지를 나타낸 도로서, (A) 채장도의 DIC 이미지 및 형광 이미지, (B) NOR: 정상군, AX: 알록산-유도군, GLM: 글리메피리드, Et: EtOAc 분획물, Bu: *n*-BuOH 분획물, Aq: 물 분획물에서 유발된 채장도 면적 변화 (^{###} $p < 0.001$; 정상군과 비교됨), (^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$; 알록산 유도군과 비교됨), (C) 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 2-NBDG로 처리한 후 각 분획물로 처리한 채장도의 형광 이미지, (D) 화합물 1-6에 의한 채장도 면적 변화, (E) 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 2-NBDG로 처리한 후 화합물 1 내지 6으로 처리한 채장도의 형광 이미지를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 플라보노이드 8-*O*-글루쿠로니드의 K_{ATP} channel closing mechanism 확인 결과를 보여주는 그래프 및 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0124] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0126] <실시예 1> 재료, 기기, 및 시약

[0128] 1-1. 재료

- [0130] 본 실시예에서 사용한 아욱 (*Malva verticillata*) 지상부는 2016년 4월에 한국 남양주시의 상업 농장에서 수집하였고, 표본 시료 (KHU20160419)는 경희대학교 천연물 화학 (Natural Product Chemistry) 실험실에 보관되어 있다.

[0132] 1-2. 시약 및 기기

- [0134] 컬럼 크로마토그래피 (CC)에 사용된 실리카 겔 (SiO₂) 및 옥타데실 SiO₂ (ODS) 수지는 각각 Kiesel gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) 및 Lichroprep RP-18 (40-60 μm , Merck, Darmstadt, Germany)이다. Sephadex LH-20은 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)로부터 구입하였다. Kiesel gel 60 F254 및 RP-18 F254S (Merck) TLC 플레이트로 박층 크로마토그래피 (Thin layer chromatography; TLC)를 수행하였고, Spectroline Model ENF-240 C/F UV lamp (Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA) 및 10% 황산 용액으로 화합물을 검출하였다. 핵자기 공명 (Nuclear magnetic resonance; NMR) 스펙트럼은 400 MHz FT-NMR 분광계 (Varian Inova AS-400, Palo Alto, CA, USA)에 기록하였다. 중수소 용매는 Merck Co. Ltd 및 Sigma Aldrich Co. Ltd (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. IR 스펙트럼은 Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer (Buckinghamshire, England)를 사용하여 얻었다. 4중극 비행-시간형 이중 질량 분석기 (ESI-QToF-MS) 스펙트럼을 Vion IMS QToF Mass Spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA)에 기록하였다. 녹는점 (Mp)은 Fisher-John's Melting Point Apparatus (Fisher Scientific, Miami, FL, USA)를 현미경과 함께 사용하여 얻었

고, 얻은 값은 보정하지 않았다. 선광도 (Optical rotation)는 JASCO P-1010 digital polarimeter (Jasco, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 알록산 (alloxan; AX) 및 해염은 Sigma Chem Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. GLM은 Cayman Chem Co. (Ann Arbor, MI, USA)로부터 얻었다. 2-[N-(7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸-4-일)아미노]-2-데옥시글루코스 (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose; 2-NBDG)는 Invitrogen (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. DZ는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. 형광현미경은 Olympus 1X70 microscope (Tokyo, Japan)로 수행하였다. 이미지 분석을 위해서 Focus Lite (Focus Co., Daejeon, Korea)를 사용하였다.

[0136] <실시예 2> 아욱 분획물로부터 화합물 6종의 분리

[0138] 건조한 아욱의 지상부 (3.1 kg)를 80% 메탄올 (MeOH, 54.0 L X 5)로 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 여과지를 통해 여과하고, 43 °C에서 감압 하에 증발시켜 794g의 추출물을 수득하였다. 수득한 메탄올 추출물을 물 (2 L)에 현탁시키고, 에틸아세테이트 (EtOAc, 2 L X 4) 및 *n*-부탄올 (*n*-BuOH, 2 L X 4)로 연속하여 추출하였다. 각 층을 농축시켜 에틸아세테이트 분획물 (MVE, 80g), *n*-부탄올 분획물 (MVB, 75g) 및 물 분획물 (MVW, 637g)을 수득하였다.

[0139] 물 분획물 (MVW, 637g)을 Diaion HP-20 컬럼 (φ 9 X 30 cm)에 적용시키고, 물(H₂O)-메탄올(MeOH) (H₂O → 5:1 → 3:2 → 2:3 → 1:4, 각각 7.2 L)로 용출시켜 9개의 분획물 (MVW-1 내지 MVW-9)을 수득하였다.

[0140] 분획물 MVW-5 [18.3 g, 용출 부피/총 부피(V_e/V_t) 0.478-0.778]를 ODS CC (φ 5 X 15 cm)에 적용시키고, 메탄올-물 (1:4, 2.6 L)로 용출시켜 9개의 분획물 (MVW-5-1 내지 MVW-5-9)을 수득하였다. 분획물 MVW-5-4 [1.4 g, V_e/V_t 0.167-0.189]을 SiO₂ CC (φ 4.5 X 15 cm)에 적용시키고, CHCl₃-메탄올-물 (9:3:1→6:4:1, 모두 4.4 L)로 용출시켜 17개의 분획물 (MVW-5-4-1 내지 MVW-5-4-17)을 수득하였다. 분획물 MVW-5-4-13 (444.1 mg, V_e/V_t 0.520-0.627)을 ODS CC (φ 3 X 5 cm)에 적용시키고, 아세톤-물 (1:4, 1.5 L)로 용출시켜 7개의 분획물 (MVW-5-4-13-1 내지 MVW-5-4-13-7)을 수득하였다.

[0141] 분획물 MVW-5-4-13-3 [116.1 mg, V_e/V_t 0.273-0.358]을 SiO₂ CC (φ 2.5 X 5 cm)에 적용시키고, CHCl₃-메탄올-물 (6:4:1, 3.2 L)로 용출시켜 6개의 분획물 (MVW-5-4-13-3-1 내지 MVW-5-4-13-3-6)을 수득하였고, 이들은 2개의 정제된 화합물 4[MVW-5-4-13-3-2, 24.2 mg, V_e/V_t 0.200-0.369, TLC (Kiesel gel 60 F₂₅₄) R_f 0.51, CHCl₃-메탄올-물 (6:4:1), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.91, 아세톤-물 (2:3)] 및 화합물 5[MVW-5-4-13-3-4, 20.5 mg, V_e/V_t 0.494-0.756, TLC (Kiesel gel 60 F₂₅₄) R_f 0.25, CHCl₃-메탄올-물 (6:4:1), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.80, 아세톤-물 (2:3)]를 포함하고 있었다.

[0142] 분획물 MVW-5-4-13-4 [107.9 mg, V_e/V_t 0.359-0.552]를 SiO₂ CC (φ 2.5 X 15 cm)에 적용시키고, EtOAc-*n*-부탄올-물 (4:3:1, 2.2 L)로 용출시켜 9개의 분획물 (MVW-5-4-13-4-1 내지 MVW-5-4-13-4-9)을 수득하였고, 이들은 2개의 정제된 화합물 1[MVW-5-4-13-4-6, 16.4 mg, V_e/V_t 0.306-0.404, TLC (Kiesel gel 60 F₂₅₄) R_f 0.90, EtOAc- 이소프로판올-물 (1:4:1), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.68, 아세톤-물 (1:2)] 및 화합물 6[MVW-5-4-13-4-8, 28.2 mg, V_e/V_t 0.557-1.000, TLC (Kiesel gel 60 F₂₅₄) R_f 0.72, EtOAc-이소프로판올-물 (1:4:1), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.88, 아세톤-물 (1:2)]을 포함하고 있었다.

[0143] 분획물 MVW-5-4-13-5 [86.0 mg, V_e/V_t 0.553-0.670]를 ODS CC (φ 2.0 X 7 cm)에 적용시키고, 메탄올-물 (1:3, 2.9 L)로 용출시켜 4개의 분획물 (MVW-5-4-13-5-1 내지 MVW-5-4-13-5-4)을 수득하였고, 이는 2개의 정제된 화합물 3[MVW-5-4-13-5-1, 18.0 mg, V_e/V_t 0.001-0.027, TLC (Kiesel gel 60 F₂₅₄) R_f 0.50, CHCl₃- 메탄올-물 (6:4:1), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.68, 아세톤-물 (2:3)] 및 화합물 2[MVW-5-4-13-5-3, 31.2 mg, V_e/V_t 0.537-1.000, TLC (Kiesel gel 60 F₂₅₄) R_f 0.50, CHCl₃- 메탄올-물 (6:4:1), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.62, 아세톤-물 (2:3)]를 포함하고 있었다.

- [0145] 아욱으로부터 분리 및 정제된 6종의 화합물 (화합물 1 내지 6)을 NMR, MS, IR 등을 통해 구조를 동정하였다.
- [0147] 하기와 같이, 화합물 1의 데이터를 분석한 결과, 화합물 1이 황색 비정질 분말의 말바플라본 A (Malvaflavone A)임을 확인하였다.
- [0149] 말바플라본 A (MVW-5-4-13-4-6, 화합물 1): $[\alpha]_D -31.9^\circ$ (c 0.10, 50% 메탄올); Mp (decomposed) > 300 °C; IR (KBr, $\bar{\nu}$) 3386, 1630, 1617, 1580 cm^{-1} ; 양성 ESI-QToF-MS m/z 479.0828 $[M + H]^+$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{13}$ 에 대한 계산값: 479.0826); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 피리딘- d_5 및 D_2O , δ_{H}) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, 피리딘- d_5 및 D_2O , δ_{C}); 도 1 내지 도 5 및 표 2에 나타내었다.
- [0151] 하기와 같이, 화합물 2의 데이터를 분석한 결과, 화합물 2가 황색 비정질 분말의 이소스쿠텔라레인 8-*O*- β -D-글루쿠로노피라노시드 (Isoscutellarein 8-*O*- β -D-glucuronopyranoside)임을 확인하였다.
- [0153] 이소스쿠텔라레인 8-*O*- β -D-글루쿠로노피라노시드 (MVW-5-4-13-5-3, 화합물 2): $[\alpha]_D -11.2^\circ$ (c 0.10, 50% MeOH); Mp (decomposed) > 300 °C; IR (KBr, $\bar{\nu}$) 3384, 1632, 1619, 1582 cm^{-1} ; 양성 ESI-QToF-MS m/z 463 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 피리딘- d_5 및 D_2O , δ_{H}) 8.40 (2H, d, $J = 8.0$, H-2',6'), 7.48 (2H, d, $J = 8.0$, H-3',5'), 6.76 (1H, s, H-3), 6.56 (1H, s, H-6), 5.07 (1H, d, $J = 7.6$, H-1"), 4.35 (1H, m, H-4"), 4.31 (1H, 겹쳐짐, H-2",3"), 4.19 (1H, d, $J = 8.8$, H-5"); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, 피리딘- d_5 및 D_2O , δ_{C}) 181.4 (C-4), 173.8 (C-6"), 163.8 (C-2), 160.8 (C-4'), 156.5 (C-5,7), 148.8 (C-9), 128.5 (C-2',6'), 125.3 (C-8), 120.7 (C-1'), 115.7 (C-3',5'), 106.1 (C-1"), 102.6 (C-10), 101.6 (C-3), 99.4 (C-6), 76.7 (C-3"), 75.5 (C-5"), 73.1 (C-2"), 71.8 (C-4").
- [0155] 하기와 같이, 화합물 3의 데이터를 분석한 결과, 화합물 3이 황색 비정질 분말의 하이포레틴 8-*O*- β -D-글루쿠로노피라노시드 (Hypolaetin 8-*O*- β -D-glucuronopyranoside)임을 확인하였다.
- [0157] 하이포레틴 8-*O*- β -D-글루쿠로노피라노시드 (MVW-5-4-13-5-1, 화합물 3): $[\alpha]_D -7.1^\circ$ (c 0.10, 50% MeOH); Mp (decomposed) > 300 °C; IR (KBr, $\bar{\nu}$) 3383, 1635, 1620, 1580 cm^{-1} ; 양성 ESI-QToF-MS m/z 479 $[M + H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 피리딘- d_5 및 D_2O , δ_{H}) 7.78 (1H, d, $J = 2.0$, H-2'), 7.40 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$, H-6'), 6.90 (1H, d, $J = 8.4$, H-5'), 6.48 (1H, s, H-3), 6.06 (1H, s, H-6), 4.51 (1H, d, $J = 7.6$, H-1"), 3.71 (1H, m, H-4"), 3.63 (2H, 겹쳐짐, H-2",3"), 3.49 (1H, d, $J = 8.8$, H-5"); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, 피리딘- d_5 및 D_2O , δ_{C}) 182.7 (C-4), 173.8 (C-6"), 165.7 (C-2), 159.8 (C-7), 158.3 (C-5), 151.2 (C-4'), 150.4 (C-9), 146.9 (C-3'), 130.2 (C-8), 124.1 (C-1'), 120.3 (C-6'), 114.3 (C-2',5'), 106.1 (C-1"), 102.7 (C-3,10), 99.5 (C-6), 76.7 (C-3"), 75.5 (C-5"), 73.1 (C-2"), 71.8 (C-4").
- [0159] 하기와 같이, 화합물 4의 데이터를 분석한 결과, 화합물 4가 황색 비정질 분말의 헤르바세틴 8-*O*- β -D-글루쿠로노피라노시드 (Herbacetin 8-*O*- β -D-glucuronopyranoside)임을 확인하였다.
- [0161] 헤르바세틴 8-*O*- β -D-글루쿠로노피라노시드 (MVW-5-4-13-3-2, 화합물 4): $[\alpha]_D -5.0^\circ$ (c 0.10, 50% MeOH);

Mp (decomposed) >300 °C; IR (KBr, ν) 3380, 1633, 1622, 1579 cm^{-1} ; 양성 ESI-QToF-MS m/z 479 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, 피리딘-*d*5 및 D₂O, δ_{H}) 8.74 (2H, d, J = 7.6, 2',6'), 7.31 (2H, d, J = 7.6, 3',5'), 6.50 (1H, s, H-6), 4.89 (1H, d, J = 6.8, H-1"), 4.16 (1H, m, H-4"), 4.05 (2H, 겹쳐짐, H-2",3"), 3.90 (1H, d, J = 8.0, H-5"); ¹³C-NMR (100 MHz, 피리딘-*d*5 및 D₂O, δ_{C}) 181.5 (C-4), 171.2 (C-6"), 159.4 (C-2), 159.2 (C-4'), 156.0 (C-5,7), 147.9 (C-9), 133.0 (C-3), 131.1 (C-2',6'), 125.5 (C-8), 120.1 (C-1'), 114.6 (C-3',5'), 105.7 (C-1"), 102.1 (C-10), 99.1 (C-6), 76.4 (C-3"), 75.7 (C-5"), 74.1 (2"), 71.5 (C-4").

[0163] 하기와 같이, 화합물 5의 데이터를 분석한 결과, 화합물 5가 황색 비정질 분말의 헤르바세틴 3-*O*- β -D-글루코피라노실-8-*O*- β -D-글루쿠로노피라노시드 (Herbacetin 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-8-*O*- β -D-glucuronopyranoside)임을 확인하였다.

[0165] 헤르바세틴 3-*O*- β -D-글루코피라노실-8-*O*- β -D-글루쿠로노피라노시드 (MVW-5-4-13-3-4, 화합물 5): [α]D-5.7° (c 0.10, 50% MeOH); Mp (decomposed) > 300 °C; IR (KBr, ν) 3378, 1632, 1625, 1583 cm^{-1} ; 양성 ESI-QToF-MS m/z 641 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, 피리딘-*d*5 및 D₂O, δ_{H}) 8.76 (2H, d, J = 7.2, H-2',6'), 7.33 (2H, d, J = 7.2, 3',5'), 6.54 (1H, s, H-6), 5.79 (1H, d, J = 6.8, H-1"), 4.92 (1H, d, J = 6.8, H-1'''), 4.18 (1H, m, H-4'''), 4.15 (1H, m, H-6"a), 3.92-4.10 (4H, 겹쳐짐, H-2"-5"), 4.07 (2H, 겹쳐짐, H-2''',3'''), 4.00 (2H, 겹쳐짐, H-6"b,5'''); ¹³C-NMR (100 MHz, 피리딘-*d*5 및 D₂O, δ_{C}) 182.0 (C-4), 171.7 (C-6'''), 159.9 (C-2), 159.8 (C-4'), 156.3 (C-5,7), 148.3 (C-9), 133.5 (C-3), 131.5 (C-2',6'), 125.9 (C-8), 120.6 (C-1'), 115.0 (C-3',5'), 106.1 (C-1'''), 102.8 (C-1"), 102.6 (C-10), 99.5 (C-6), 77.4 (C-3"), 76.7 (C-3'''), 76.1 (C-5'''), 76.0 (C-5"), 74.5 (C-2'',2'''), 71.9 (C-4'''), 69.8 (C-4"), 60.9 (C-6").

[0167] 하기와 같이, 화합물 6의 데이터를 분석한 결과, 화합물 6이 황색 비정질 분말의 이소스쿠텔라레인 7-*O*- β -D-글루코피라노시드 (Isoscutellarein 7-*O*- β -D-glucopyranoside)임을 확인하였다.

[0169] 이소스쿠텔라레인 7-*O*- β -D-글루코피라노시드 (MVW-5-4-13-4-8, 화합물 6): [α]_D-19.2° (c 0.10, 50% MeOH); Mp (decomposed) > 300 °C; IR (KBr, ν) 3477, 1616, 1579 cm^{-1} ; 양성 ESI-QToF-MS m/z 449 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, 피리딘-*d*5, δ_{H}) 8.40 (2H, d, J = 8.0, H-2',6'), 7.48 (2H, d, J = 8.0, H-3',5'), 6.91 (1H, s, H-6), 6.71 (1H, s, H-3), 5.56 (1H, d, J = 7.2, H-1"), 4.21 (1H, dd, J = 12.0, 2.0, H-6"a), 3.85-4.10 (4H, 겹쳐짐, H-2"-5"), 3.68 (1H, dd, J = 12.0, 5.2, H-6"b"); ¹³C-NMR (100 MHz, 피리딘-*d*5, δ_{C}) 182.0 (C-4), 163.8 (C-2), 161.9 (C-4'), 156.2 (C-7), 156.0 (C-5), 144.1 (C-9), 129.9 (C-2',6'), 125.6 (C-8), 121.0 (C-1'), 115.8 (C-3',5'), 104.7 (C-10), 102.5 (C-3), 101.2 (C-1"), 98.7 (C-6), 77.2 (C-5"), 75.8 (C-3"), 73.1 (C-2"), 69.6 (C-4"), 60.9 (C-6").

[0171] <실시예 3> 제브라피쉬에서 항당뇨 효과 확인

[0173] 3-1. 제브라피쉬 (Zebrafish) 관리 및 유지 보수

[0175] 성체 제브라피쉬는 제브라피쉬 시스템 S 타입 (1500[W] × 400[D] × 2050[H] mm) (Daejeon, Korea)에서 유지하였고, 28.5 °C에서 14시간 빛/ 10시간 암흑의 주기를 반복하였다. 제브라피쉬 치어 (larvae)를 얻기 위해, 성

체 제브라피쉬 두 쌍을 밤새도록 산란상자에 두었다. 제브라피쉬는 빛을 주는 30분 동안 알을 낳았다. 배양을 위해, 수정 3시간 후에 제브라피쉬 배아를 채취하고, 28.5 °C의 배양기에서 14시간 빛과 10시간 암흑의 광주기로, 0.03% 해염 용액에서 유지시켰다. 이 피쉬는 경희대학교의 동물 관리 및 사용 위원회 (Animal Care and Use Committee)가 승인한 표준 제브라피쉬 프로토콜에 따라 처리하였다 (KHUASP [SE] -15-10).

3-2. 통계 분석

통계 분석은 GraphPad Prism (버전 5)을 사용하여 수행하였다. 데이터는 3회 반복에 대한 평균 $\pm$ 표준 오차 (standard error of the mean: SEM)로써 표현하였다. 유효성은 반복적인 일원 분산 분석 (one-way ANOVA)과 Tukey test를 사용하여 확인하였다. $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

3-3. 제브라피쉬 배아의 독성 평가

20개의 제브라피쉬 배아를 독성 테스트를 위한 처리에 사용하였다. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) 테스트 [Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test Guideline 236: Guideline for Testing of Chemicals, Fish Embryo Acute toxicity (Fet) Test. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*; OECD Publishing: Paris, France, 2013; pp. 1-22.]를 위해 OECD TG 236에 요약된 대로 96시간 동안 제브라피쉬 배아의 노출을 수행하였다(Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test Guideline 236: Guideline for Testing of Chemicals, Fish Embryo Acute toxicity (Fet) Test. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*; OECD Publishing: Paris, France, 2013; pp. 1-22. 참조). 31개의 처리군을 사용하였다: 표준, 각각 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 및 600 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물, 및 물 분획물. 제브라피쉬를 96시간 처리 후 현미경으로 관찰하였고, 죽은 제브라피쉬를 기록하였다. LC_{50} 값을 GraphPad Prism 버전 5.01 소프트웨어를 사용하여 비-선형 회귀에 의해 계산하였다.

EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물, 및 물 분획물의 LC_{50} 값은 각각 91.5, 270.9 및 401.1 $\mu\text{g/mL}$ 이었다(도 6).

3-4. 제브라피쉬 치어에서의 AX-유도 PI 손상에 대한 회복 효능의 평가

제브라피쉬 치어에서 상기 화합물 1-6의 PI (췌장도, pancreatic islets) 회복 효능을 확인함으로써, 각 화합물의 해당노 효과를 평가하였다.

먼저, 제브라피쉬 치어를 정상군, AX (알록산, alloxan)-유도군 (대조군), 및 다른 분획물과 화합물 1 내지 6으로 처리한 AX-유도군으로 나누었다. 자연상태 제브라피쉬 치어 (5 dpf)를 24-웰 플레이트에 두었다. 치어를 3시간 동안 600 μM AX에 노출시켜 PI 손상을 유도하였다. 분획물 및 화합물들의 회복 효능을 규명할 수 있도록 AX-유도된 치어를 12시간 동안 10 $\mu\text{g/mL}$ 분획물 또는 0.1 μM 화합물들로 처리하였다. 그리고 나서, 치어를 40 μM 2-NBDG로 30분 동안 염색하고, 20분 동안 0.03% 해염 용액으로 행구었다. 염색 후, PI를 형광 현미경으로 확인하고 Focus Lite 소프트웨어로 분석하였다.

PI 크기는 정상군보다 AX 유도군에서 40.2% ($p < 0.0001$) 더 작았다(도 7). AX-처리된 제브라피쉬 치어에 화합물 1 내지 6을 첨가하였을 때, 화합물 1, 3, 4, 및 6은 AX 단독 처리군에 비해 손상된 PI의 크기를 각각 49.4% ($p = 0.0072$), 46.8% ($p = 0.0028$), 62.4% ($p < 0.0001$), 및 54.9% ($p = 0.0088$)으로 크게 증가시켰다(도

7D,E).

[0195] 3-5. AX-유도된 당뇨병 제브라피쉬에 대한 다이아조옥사이드(diazoxide, DZ)의 작용

[0197] DZ를 K_{ATP} 채널 개막제로 사용하여 췌장 β -세포 K_{ATP} 채널 자극 활성을 측정하였다.

[0199] 자연상태의 제브라피쉬 치어 (5 dpf)를 24-웰 플레이트 (웰 당 10 제브라피쉬)에 두었다. 치어를 하기의 14 그룹으로 나누었다: 정상군; DZ 또는 AX로 처리한 정상군; 및 DZ, GLM, GLM + DZ, 화합물 1, 화합물 1 + DZ, 화합물 3, 화합물 3 + DZ, 화합물 4, 화합물 4 + DZ, 화합물 6, 및 화합물 6 + DZ으로 처리한 AX-유도된 당뇨병군. 화합물들을 각각 0.1 μ M에서 적용하고, DZ를 25 μ M에서 적용하였다. 제브라피쉬 치어를 3시간 동안 600 μ M AX로 처리한 후, 용액을 0.03% 해염 용액으로 행구었다. AX-유도된 제브라피쉬 치어를 12시간 동안 각각의 화합물들 및/또는 처리제로 처리하였다. 처리 후, 제브라피쉬 치어를 30분 동안 40 μ M 2-NBDG로 염색하고, 20분 동안 0.03% 해염 수용액으로 행구었다. 염색 후, PI 이미지를 형광 현미경으로 캡처하고 Focus Lite 소프트웨어로 분석하였다.

[0201] PI의 크기는 DZ 처리하지 않은 정상군에 비하여, DZ-처리 정상군에서 상당히 작았다(23.5%, $p = 0.0105$). 반면, AX 처리군에서는, 제브라피쉬 치어를 25 μ M의 DZ로 처리한 후에도 PI의 크기가 크게 변하지 않았다.

[0203] 0.1 μ M의 GLM로 처리한 AX-유도된 제브라피쉬 치어에서의 PI의 크기는, 25 μ M의 DZ를 함께 처리한 경우에 훨씬 작은 것을 확인하였다(41.1%, $p = 0.0001$). 유사하게, AX-유도된 제브라피쉬 치어를 화합물 1 또는 6으로 처리한 경우, DZ가 없는 것에 비하여 25 μ M의 DZ를 함께 처리한 경우에 PI의 크기가 각각 32.2% ($p = 0.0027$) 및 29.7% ($p = 0.0182$) 작은 것을 확인하였다(도 7 참조).

[0205] 따라서, 화합물 1, 3, 4, 및 6 (0.1 μ M)은 제브라피쉬에서 AX에 의해 손상된 PI의 크기에 상당한 회복효과를 나타내었고, 화합물 1 및 6은 DZ 실험에서 K_{ATP} 채널에 영향을 주는 것으로 확인되었다. 즉, 상기 화합물은 K_{ATP} 채널을 폐쇄함으로써 K_{ATP} 채널의 개막제로 잘 알려진 DZ로 동시 처리하였을 때의 효과를 억제하여 인슐린 분비를 증가시키고 결과적으로 글루코스 흡수를 증가시키는 것을 알 수 있었다.

[0207] <실시예 4> 제브라피쉬에서 항산화 효과 확인

[0209] 4-1. DPPH 라디칼 소거능 분석

[0210] DPPH 라디칼은 유기 용매에 녹은 상태에서 540 nm에서 최대 흡광도를 가지며, 이 때 항산화 물질은 DPPH 라디칼을 소거하여 고유의 색을 잃고 황색으로 변화시킨다. 문헌 (Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C.L.W.T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 1995, 28, 25-30.)에 기재된 방법에 따라, DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다.

[0211] 먼저, 100 μ M DPPH 라디칼을 70% 수성 메탄올에 용해시켰다. 그 다음, 화합물 1 내지 6 (0.1 mL)을 메탄올성 DPPH 라디칼 용액 2.9 mL에 첨가하였다. 혼합물을 격렬하게 흔들고 암실에서 30분 동안 23 $^{\circ}$ C에서 방치하였다. 생성된 용액의 흡광도의 감소를 517 nm에서 30분 동안 모니터링하였다. 대조군은 0.1 mL의 70% 수성 메탄올 및 2.9 mL의 DPPH 라디칼 용액으로 구성하였다. 양성 대조군 (천연 항산화제 퀘르세틴 및 합성 항산화제 BHA [부틸화 히드록실 아니솔]) 또한 비교를 위해 동일한 절차를 적용하였다. 3회 분석하여 결과를 확인하였고, DPPH 라디칼 소거능은 하기의 방정식을 사용하여 계산하였다.

[0213] DPPH 라디칼 소거능 (%) = $(A_{517\text{대조군}} - A_{517\text{샘플}}) / A_{517\text{대조군}} \times 100$

[0215] EC50은 50%의 라디칼 소거능을 얻기 위해 필요한 농도를 계산하여 결정하였다.

[0216] 4-2. ABTS 라디칼 소거능 분석

[0217] 홀수-전자 상태에서 특정 청녹색을 나타내는 ABTS 라디칼은 그 비공유 전자가 항산화제의 전자와 쌍을 이루면 색이 없어진다. ABTS 라디칼 소거능 측정은 문헌 [Chen, D.; Shi, J.; Hu, X. Enhancement of polyphenol content and antioxidant capacity of oat (*Avena nuda* L.) bran by cellulase treatment. *Appl. Biol. Chem.* **2016**, *59*, 397-403.]에 따라 수행하였다.

[0218] 1.0 mM AAPH인 라디칼 개시제를 인산완충생리식염수 (PBS; pH 7.4; 0.1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 ; 150 mM NaCl) 중의 2.5 mM ABTS에 첨가하였다. 혼합된 용액을 물 수조에서 68 °C로 가열하였다. 생성된 청녹색 ABTS 라디칼 용액을 추가의 PBS로 734 nm에서 0.650 ± 0.020 의 흡광도로 조정하였다. 그런 다음, 샘플 20 μ L를 ABTS 라디칼 용액 980 μ L에 첨가하였다. 혼합물을 제한된 빛 조건 하에서 37 °C의 물 수조에서 10분 동안 배양하였다. 대조군 (70% 메탄올 20 μ L 및 ABTS 라디칼 용액 980 μ L)을 각 일련의 샘플로 수행하였다. 양성 대조군 (천연 항산화제 케르세틴 및 합성 항산화제 BHA) 또한 비교를 위해 동일한 절차를 적용하였다. 10분 후에 734 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 3회 분석하여 결과를 확인하였고, ABTS 라디칼 소거능을 하기의 방정식으로 계산하였다.

[0220] ABTS 라디칼 소거능 (%) = $(A_{734\text{대조군}} - A_{734\text{샘플}}) / A_{734\text{대조군}} \times 100$

[0222] EC50은 50%의 라디칼 소거능을 얻기 위해 필요한 농도를 계산하여 결정하였다.

[0224] 4-3. 산소 라디칼 흡광능(Oxygen radical absorbance capacity; ORAC) 분석

[0225] 산소 라디칼 흡광능 측정을 문헌 [Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Prior, R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, *50*, 4437-4444.]에 따라 수행하였다.

[0226] 적절하게 희석된 샘플 및 150 μ L의 81.6 nM 플루오레세인 용액을 갖는 표준 용액을 96-웰 플레이트에 첨가하고 3분간 흔들어주면서 37 °C에서 10분 동안 배양하였다. 153 mM AAPH 용액 25 μ L를 첨가한 다음 485 nm 여기 및 520 nm 방출 파장을 갖는 마이크로 플레이트 리더 (Infinite M200, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)를 사용하여 90분 동안 매 분마다 형광을 검출하였다. ORAC 값을 Cao et al., (Cao, G.; Alessio, H.M.; Cutler, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* **1993**, *14*, 303-311.)의 방법에 따라 계산하였고, Trolox 등가물 (μ mol TE/ μ mol)로 표현하였다.

[0228] 4-4. 슈퍼옥사이드(superoxide) 라디칼 소거능 분석

[0229] 리보플라빈-빛-NBT 시스템(riboflavin-light-NBT system)에서 슈퍼옥사이드의 광화학 생산을 억제하는 화합물들의 용량에 기초하여, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능을 측정하였다.

[0230] 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능의 측정을 위한 반응 혼합물은 50 mM 인산 칼륨 완충액 (pH 7.8) 중 0.02 mM 리보플라빈, 3 mM 메티오닌, 및 0.18 mM NBT를 함유하였다. DMSO (10 μ L) 중 샘플 및 150 μ L의 반응 혼합물을 96-웰 플레이트로 분배하였다. 형광 조명 (1000 lux)으로 반응을 시작하고, 실온에서 6분 동안 진행시켰다. 530 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 리더로 측정하였다 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). 천연 항산화제 케르세틴 및 합성 항산화제 BHA를 양성 대조군으로 사용하였다. 3회 분석하여 결과를 확인하였고, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능을 하기의 방정식으로 계산하였다.

[0232] 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 (%) = $(A530_{\text{대조군}} - A530_{\text{샘플}}) / A530_{\text{대조군}} \times 100$

[0234] EC50은 50%의 라디칼 소거능을 얻기 위해 필요한 농도를 계산하여 결정하였다.

[0236] 4-5. 결과 분석

[0238] 상기 실시예 4-1 내지 4-4에서 측정한, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, 산소 라디칼 흡광능, 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능 결과값을 하기의 표 1로 나타내었다.

표 1

Compounds	DPPH EC ₅₀ ^a (μM)	ABTS EC ₅₀ (μM)	ORAC (μmol TE/ μmol)	SOD EC ₅₀ (μM)
Quercetin	4.08 ± 0.36 ^b	1.73 ± 0.09	7.33 ± 0.15	0.43 ± 0.10
BHA	8.33 ± 0.46	4.65 ± 0.18	2.86 ± 0.26	0.44 ± 0.09
1	>50	2.22 ± 0.05	14.38 ± 0.35	0.73 ± 0.09
2	>50	3.38 ± 0.15	8.06 ± 0.36	1.51 ± 0.15
3	5.98 ± 0.24	1.52 ± 0.04	12.48 ± 1.27	0.98 ± 0.13
4	31.79 ± 2.22	4.51 ± 0.13	6.56 ± 0.32	1.04 ± 0.21
5	33.80 ± 1.89	4.05 ± 0.14	6.42 ± 0.18	0.70 ± 0.18
6	>50	21.62 ± 1.26	3.83 ± 0.30	1.31 ± 0.20

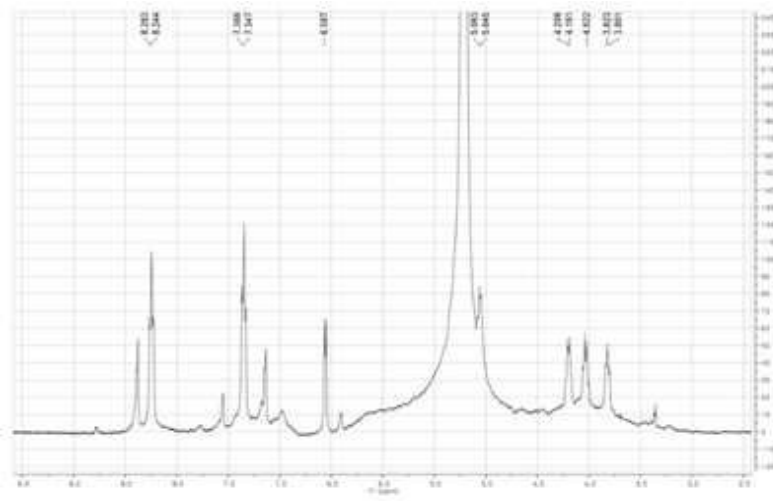
[0240]

[0242] ABTS RS, 산소 라디칼 흡광도 용량 (ORAC), 및 과산화물 불균등화효소 (superoxide dismutase: SOD) 분석 모두에서, 화합물 1 내지 6은 양성 대조군과 비교하여 상당한 활성을 나타내었다 (표 1). 화합물 1 내지 5는 ABTS, ORAC, 및 SOD 분석에서 높은 항산화제 활성을 갖는 것으로 밝혀졌으며, 이는 8-*O*-글루쿠론산 모이어티가 항산화제 활성 발현의 핵심 구조임을 나타낸다. 특히, 화합물 1 및 3은 매우 높은 항산화제 활성을 나타내기 때문에, 플라보노이드 A-고리 내의 1,2,3-트리하이드록시 벤젠 모이어티 및 플라보노이드 B-고리 내의 1,2-디하이드록시 벤젠 모이어티가 항산화제 활성에 기여하는 것으로 보인다.

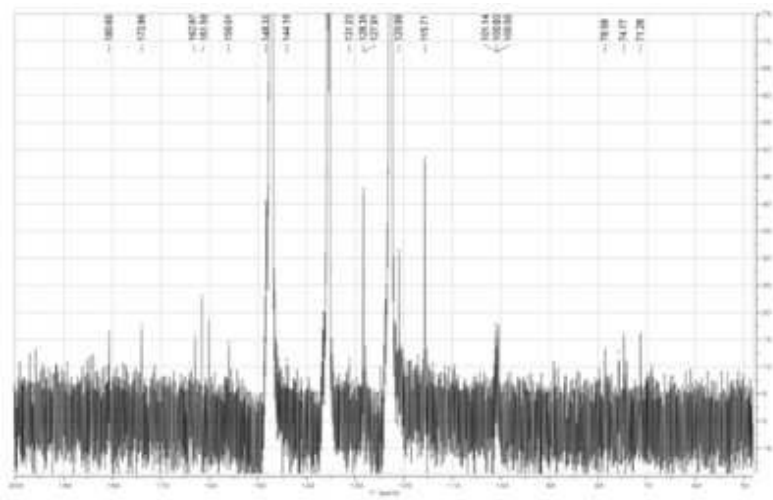
[0244] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

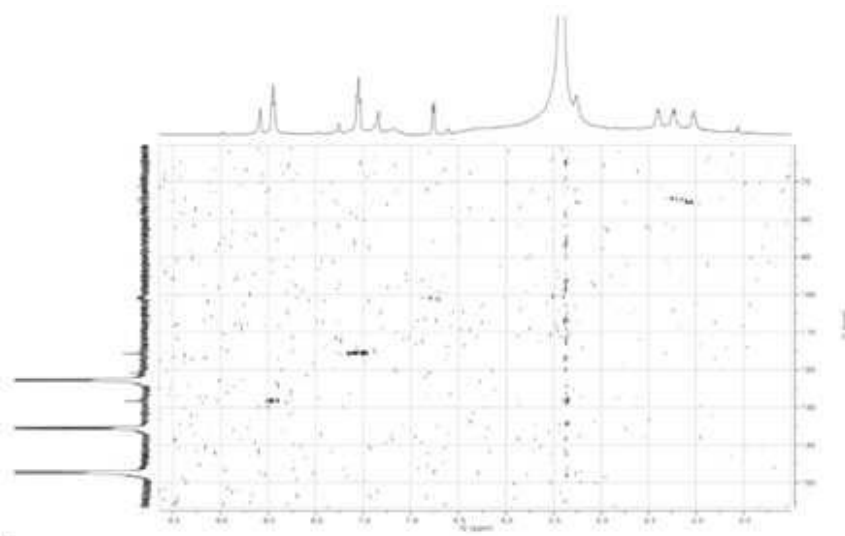
도면1



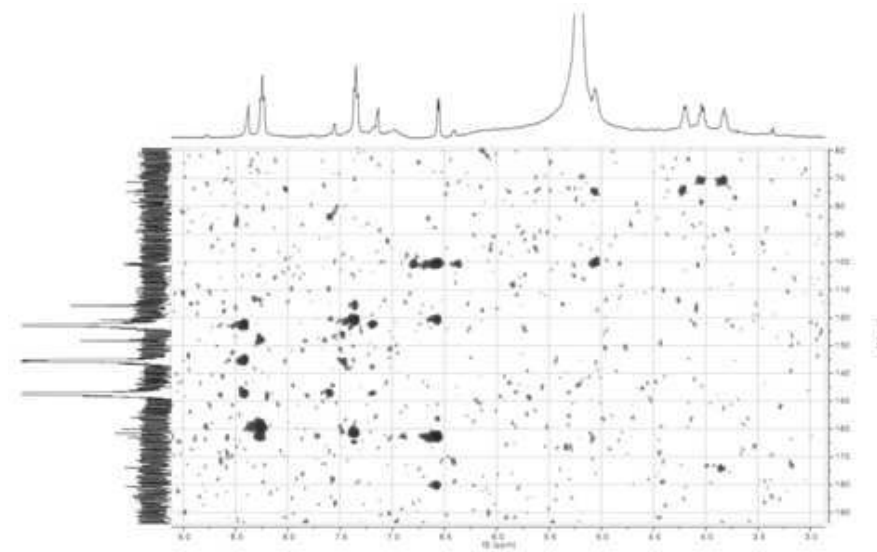
도면2



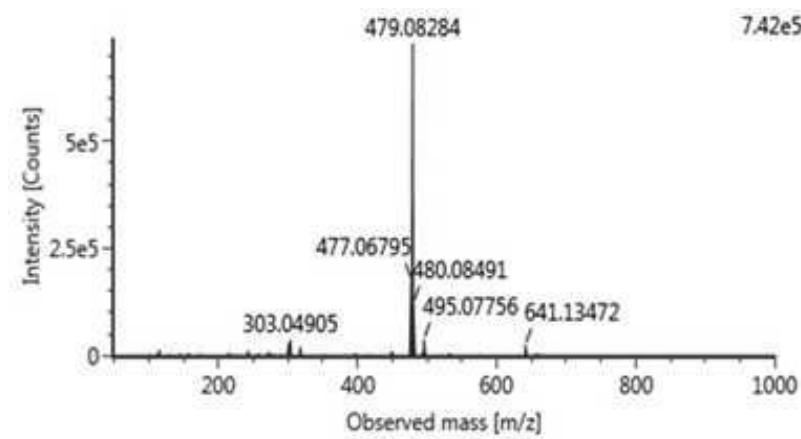
도면3



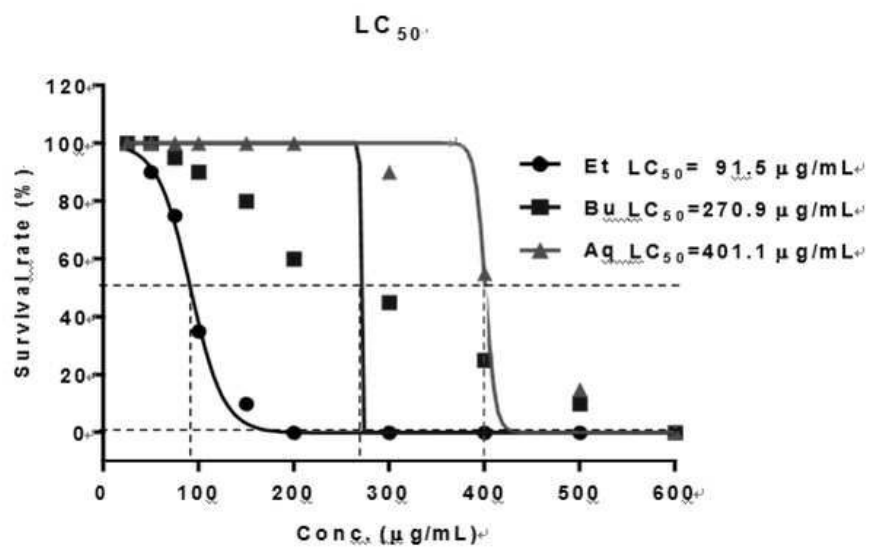
도면4



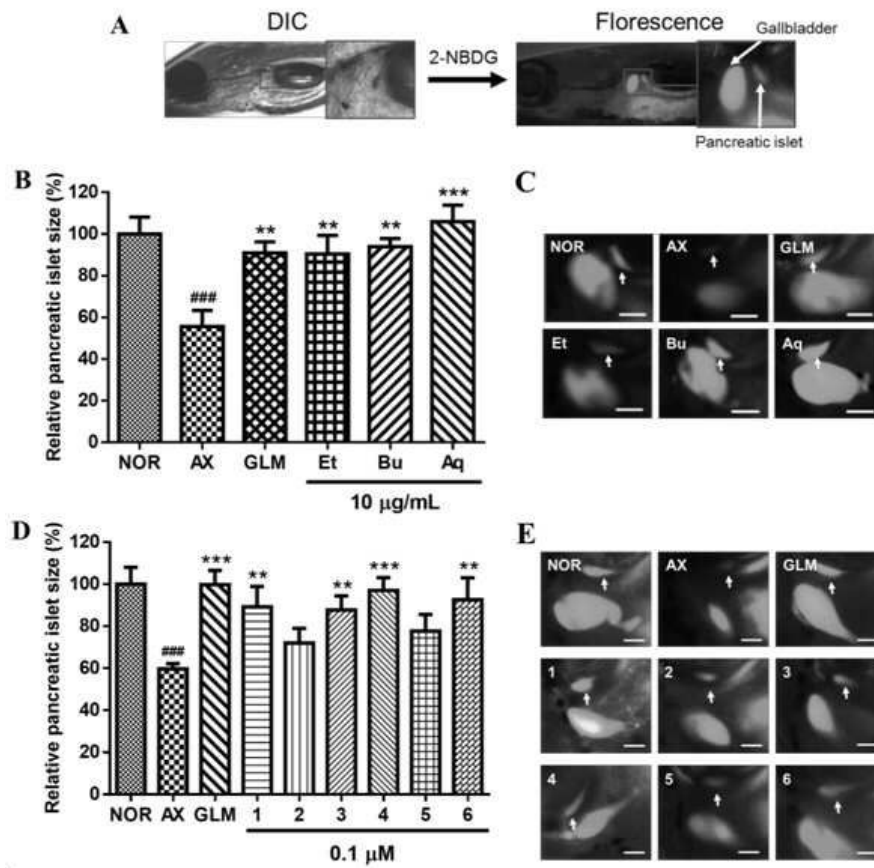
도면5



도면6



도면7



도면8

