(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0082373
(43) 공개일자 2025년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/51 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *C07D 407/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/51 (2013.01)
A61K 31/352 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-0170601
(22) 출원일자 2023년11월30일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
임순성
강원특별자치도 춘천시 후석로 325, 105동 302호 (후평동, 춘천더샵 아파트)
황승환
경기도 안산시 단원구 원선1로 38 101동 2002호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
파도특허법인유한회사

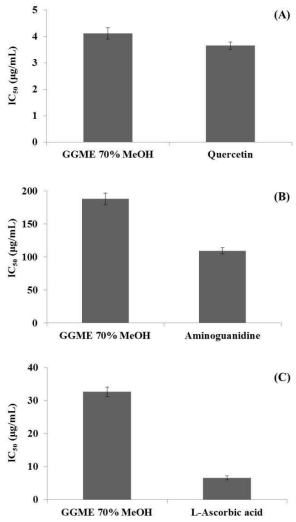
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 우수한 최종당화산물(AGE)의 형성 억제 효능을 가져 당뇨합병증을 예방하거나 치료할 수 있는 GG 추출물 또는 이의 활성 성분을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 3/10 (2018.01)
C07D 407/10 (2013.01)
(72) 발명자
이수경
강원특별자치도 춘천시 우석로85번길 1 (석사동)
김현용
세종특별자치시 보람로 95 도램마을 1305동 1601호
우 자오양
강원특별자치도 춘천시 한림대학길 1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180057
과제번호	2021R1A2C1005246
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	페루산 신규자원으로부터 마이크로분획-고효율 동일물질 회피법을 활용한 만성 당뇨 합병증 조절 신규소재개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물은 용매 추출법, 초음파 추출법, 초임계 추출법, 발효법 및 포제법에 의한 추출법으로부터 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 수득하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 용매 추출법은 물, C_1 내지 C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매를 이용하여 추출하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 2′,4′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소이플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스 및 캄페롤을 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물은 전체 조성물에 대해 0.1 내지 1,000㎍/ml 로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 당뇨합병증은 당뇨병성 신경병증, 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 심근경색증, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 백내장, 당뇨병성 혈관합병증 및 당뇨병성 족부궤양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

2′,4′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소이플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스 및 캄페롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 당뇨합병증은 당뇨병성 신경병증, 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 심근경색증, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 백내장, 당뇨병성 혈관합병증 및 당뇨병성 족부궤양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

아래 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물:

2′,4′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소이플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 및 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 우수한 최종당화산물(AGE)의 형성 억제 효능을 가져 당뇨합병증을 예방하거나 치료할 수 있는 GG 추출물 또는 이의 활성 성분을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당뇨합병증을 유발하는 기전으로는 크게 단백질의 비효소적 당화반응(non-enzymatic glycation of protein)과 폴리올 경로(polyol pathway)의 기작 변화에 의한 삼투압 스트레스 및 자유 라디칼에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress) 등으로 설명되고 있다.

[0003] 알도스 환원효소(AR)는 당뇨병 합병증과 관련된 폴리올 경로(PP)의 속도를 제한하는 효소로서, PP는 두 가지 효소로 구성된다. 첫 번째 효소인 AR은 보조 인자인 NADPH의 도움으로 포도당을 소르비톨로 환원시킨다. 두 번째 효소는 소르비톨 탈수소 효소로, 이 효소는 NAD 보조 인자의 개입으로 소르비톨을 과당으로 전환시킨다. PP를 통한 생성으로 증가된 소르비톨은 세포막을 통해 쉽게 확산되지 않으며, 소르비톨의 세포 내 축적은 백내장, 신경병증(neuropathy) 및 망막병증(retinopathy)을 포함한 만성 당뇨합병증을 유발시킬 수 있다. AR 활성의 억제는 당뇨병의 특정 합병증을 예방하는 중요한 약리학적 전략으로 간주된다.

[0004] 포도당과 과당 수치가 증가하면 글루코손, 글리옥살, 메틸글리옥살과 같은 반응성 디카보닐 종이 형성되는데, 이는 진행성 최종당화산물(advanced glycation endproducts, AGE)의 중요한 요소이다. 당화 반응에서는 환원당의 카르보닐기가 단백질, 지질 또는 핵산의 아미노기와 결합할 때 시작되는 일련의 복잡한 반응과 비효소적 갈변 반응이 포함된다. 이 때, 비효소적 반응은 조직 단백질의 화학적 변형으로 이어진다. AGE의 형성과 축적은 정상적인 생리적 노화 과정에서 진행되나, 당뇨병에 걸리면 가속화 되게 된다.

[0005] 용담과에 속하는 다년생 쌍떡잎식물인 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG)는 페루의 산악지대 고지대(3,500m 이상)에서만 자라는 토착종이다. GG는 분포가 매우 제한된 고지대 용담식물 종으로 칼 지기스문트 쿤트(Carl Sigismund Kunth)가 처음 기술하였고, 파브리스(Fabris)로 인해 알려지게 되었다. 그러나 GG의 많은 생리활성, 화학 성분 및 특성에 대하여는 보고된 바가 없다.

[0006] 본 발명자들은 당뇨합병증의 예방 또는 치료에 대한 효과를 가지는 천연물 유래 활성물질에 대한 연구를 진행하던 중, GG 추출물이 부작용과 독성이 없으며, 최종당화산물 생성에 대한 억제 효과가 있다는 것을 발견하였고, 이의 활성 성분을 분리하여 분리된 화합물의 RLAR, AGE 및 DPPH에 대한 억제 활성을 조사한 결과 당뇨합병증의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0008] 또한, 본 발명에서 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물로부터 활성 성분을 분리하고 이들을 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 일 실시예에서 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 이하, 본원에 기재된 다양한 실시예가 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나 특정의 실시예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 실시예" 또는 "실시예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 실시예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 실시예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 실시예에서" 또는 "실시예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 실시예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 실시예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0011] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물은 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 잎으로부터의 추출물임을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 추출물은 용매 추출법, 초음파 추출법, 초임계 추출법, 발효법 및 포제법에 의한 추출법으로부터 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 수득할 수 있다.

[0014] 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 잎의 분쇄물에 추출용매를 가함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 더 가하여 분획하여 제조될 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 용매 추출법은 물 및 유기 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기 용매는 C_1 내지 C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매일 수 있으며, 바람직하게는 70% 메탄올을 사용하여 추출하는 것이나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 추출 과정을 통하여 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 잎 내 포함된 유효성분을 더 많이 수득할 수 있다는 장점이 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물은 추출 후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 2′,4′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소이플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스 및 캄페롤을 포함하는 약학적 조성물이다.

[0018] 또한, 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에서는 2′,4′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소이플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-4′-β-D-글루코피라노스, 2′,3′,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스 및 캄페롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 조성물은 당뇨합병증 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 글루코오스 대사경로인 폴리올 경로의 촉매 효소인 알도스 환원 효소를 억제시키는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에서, 아래 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 제공한다:

[0021] 2′ ,4′ ,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소플라보놀-C-3′ -β-D-글루코피라노스, 2′ ,3′ ,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소이플라보놀-C-4′ -β-D-글루코피라노스, 2′ ,3′ ,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-4′ -β-D-글루코피라노스, 및 2′ ,3′ ,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-3′ -β-D-글루코피라노스.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물은 NO(nitric oxide) 저해 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물 또는 분획물은 전체 조성물에 대해 대해 0.1 내지 1,000㎍/ml 로 함유되어 있는 것을 특징으로 한다. 여기서 상기 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물이 전체 조성물에 대해 0.1㎍/ml 미만이면 상기 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물의 유효 성분이 매우 적어 상기 상술한 효과를 나타낼 수 없으며, 상기 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물이 전체 조성물에 대해 1,000㎍/ml 초과하면 상기 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물 내 포함된 유효성분 외의 물질에 의해 알도스 환원 효소 억제 및 항산화에 관한 효과가 떨어질 수 있다. 바람직하게는, 상기 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물이 전체 조성물에 대해 1 내지 250 ㎍/ml인 조성물이다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 당뇨합병증은 당뇨병성 신경병증, 당뇨병성 신장병증, 당뇨병성 심근경색증, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 백내장, 당뇨병성 혈관합병증 및 당뇨병성 족부궤양으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상이나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 '예방'이란 본 발명의 약학적 조성물의 투여에 의해 당뇨합병증을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 '치료'란 본 발명의 약학적 조성물의 투여에 의해 당뇨합병증에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0029] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[0031] 본 발명에서, '비경구'는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투

여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG) 추출물 및 이로부터 분리된 활성 성분들은 천연추출물로서 부작용 및 독성이 없으며, RLAR, AGE 및 DPPH에 대한 억제 활성을 가지므로 당뇨합병증의 예방 또는 치료 효능이 있는 것으로 확인되었다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스 추출물(GGME)이 갖는 A) 알도스 환원 효소(RLAR)에 대한 억제 활성, B) 최종당화산물(AGE) 형성에 대한 억제 활성, 및 C) DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 실시예 2에 따른 GGME로부터 분리한 화합물 1 내지 5의 A) UF-HPLC(with HRAR)를 이용한 RLAR 억제제 성분 스크리닝 및 B) DPPH-HPLC 분석에 따른 항산화 억제제 성분 스크리닝 분석 결과이다(여기서, 파란색 선은 HRAR 또는 DPPH를 사용하지 않은 반응 전을 나타내고, 빨간색 선은 HRAR 또는 DPPH를 사용한 반응 후를 나타냄).

도 3은 젠티아넬라 그라미네아 70% 메탄올 추출물에서 분리한 4가지 화합물의 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼이다.

도 4는 쥐 수정체의 소르비톨 축적과 진행성 당화 최종 산물(AGE)에 대한 젠티아넬라 그라미네아 70% 메탄올 추출물에서 분리한 5가지 화합물의 억제 활성을 나타낸 도표이다.

도 5는 본 발명의 화합물 1~5의 화학 구조이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0036] **실험 방법**

[0037] 생리활성이 있는 천연 성분을 신약 후보로 스크리닝 하기 위해 높은 감도와 선택성으로 천연물에서 잠재적 리간드를 빠르게 발견하고 특성화하기 위해 개발된 친화도 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 기반 분석법을 사용하였다. 이 방법에는 한외여과(UF), 자성 나노입자, 오프라인 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질(DPPH) 및 약물-단백질 결합이 포함됩니다(Wang et al., 2015; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2011; Anguizola et al., 2016). 그 중 효소와 저해제 간의 특이적 결합을 기반으로 한 UF-HPLC는 효소 저해제를 신속하게 스크리닝하는 효율적인 방법이며, 천연물에서 항산화 성분의 자유 라디칼 소거 활성을 스크리닝하기 위해 오프라인 DPPH 방법이 적용되었다.

[0038] GG에서 활성 성분을 분리하고 그 억제 활성을 측정하였다. GG의 활성 성분을 RLAR 및 DPPH에 대해 스크리닝하기 위해 UF 및 DPPH-HPLC를 수행하였다. 생리활성 성분의 피크는 두 가지 HPLC 방법으로 확인하고 생리활성 화합물을 분리하였다. 당뇨 합병증 치료에 대한 사용을 평가하기 위해 분리된 화합물의 RLAR, AGE 및 DPPH에 대한 억제 활성을 조사하였다. 생체 외 고 소르비톨 조건에서 쥐 수정체의 소르비톨 축적을 감소시키면서 항RLAR 활성을 나타내는 주요 화합물의 능력을 평가하였다. 마지막으로 분광학적 데이터 해석과 상관 분광법(COSY), 이종 핵 단일 양자 일관성(HSQC), 이종 핵 다중 결합 상관(HMBC)을 포함한 1차원(1D) 및 2차원(2D) 핵자기공명(NMR)을 통해 새로운 플라보노이드 성분의 구조를 확인하였다.

[0039] **화학 물질 및 시약**

[0040] L-아스코르브산, DPPH, 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산염(NADPH), DL-글리세랄데히드 이합체, 소 혈청 알부민(BSA), 메틸글리옥살, 케르세틴, 아미노구아니딘 및 포도당은 Sigma-Aldrich(미국 미주리주 세인트 루이스)에서 구입하였다. 사용된 다른 모든 화학 물질과 시약은 분석용 등급이었다.

[0041] **식물 재료**

[0042] 건조된 젠티아넬라 그라미네아 (쿤트) 파브리스(GG)를 2015년 5월 페루 라 리베르타드주 현지 시장에서 구입하였다. 한림대학교 기능성 식품 및 의약품 효능 평가 및 개발 센터에 바우처를 기탁하였다(P2016-P8). 이 표본은 페루 리마에 있는 국립산 마르코스 시장 자연사 박물관의 폴 곤잘레스(Paul H. Gonzales) 박사가 인증하였다.

[0043] **실시예 1. 추출 및 분리**

[0044] 말린 GG 잎(50 g)을 70% 메탄올(GGME, MeOH, 0.5 L × 2 회)로 실온에서 3 시간 동안 두 번 추출하였다. 결합된 여과액을 40℃에서 진공 상태에서 농축하여 건조시켰다. 이 추출물은 RLAR, AGE 및 DPPH에 대한 강력한 억제 효과를 보여주었다(도 1A-C). 이 추출물(3g)을 MeOH를 용매로 사용하여 Sephadex LH-20 컬럼에서 크로마토그래피에 사용하여 11개의 풀링 분획물(GG-SFrac 1-11)을 얻었다. 화합물 1(2.3 mg)과 2(3.8 mg)는 각각 GG-SFrac 3과 5에서 직접 얻었다. GG-SFrac 7을 정제하여 화합물 3(20.1 mg)을 30~40% MeOH의 구배를 갖는 재활용 HPLC로 얻었다. GG-SFrac 9를 70% MeOH를 사용하여 Sephadex LH-20으로 분리하여 화합물 4(5.6 mg)를 얻었다. 화합물 5(12.5 mg)를 얻기 위해 Sephadex LH-20을 아세톤으로 사용하여 GG-SFrac 10을 분리하였다. 또한, GGME에서 분리된 화합물 1, 2, 3, 4 및 5의 순도를 HPLC-DAD로 분석하였다. 확립된 방법에 따라 화합물 1(97.97%), 2(98.11%), 3(96.97%), 4(97.89%), 5(98.63%) 등 모든 각 화합물의 순도는 고순도임을 확인하였다.

[0045] **NMR 및 HR-FAB-MS 분석**

[0046] 각 화합물의 약 2.0-10.0 mg을 600 ㎕의 CD_3OD에 용해하고 3mm NMR 튜브에 분배하였다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼과 COSY, HMBC, HSQC를 포함한 상관관계 NMR 스펙트럼은 Avance DPX 400 분광기(브루커, 빌레리카, 매사추세츠주, 미국)를 사용하여 얻었다. 스펙트럼은 600(^{1}H) 및 125 MHz(^{13}C)의 작동 주파수에서 얻었으며 테트라메틸실란을 내부 표준으로 사용하였다. 화학적 이동은 δ 값으로 표기되며, 고해상도-고속 원자 폭격-질량 분석기(HR-FAB-MS) 데이터는 워터스 시냅트 G2(미국 매사추세츠주 밀포드)에서 수집하였다.

[0047] **HPLC 분석**

[0048] 진공 탈기 장치(G1322A), 4차 펌프(G1311A), 자동 샘플러(G1313A), 온도 조절 컬럼 컴파트먼트(G1316A) 및 DAD(G1315B)로 구성된 다이오드 어레이 검출기(DAD; Agilent, 미국 캘리포니아주 서니베일)가 장착된 Agilent 1100 시리즈 시스템에서 HPLC를 수행하였다. 분리는 30℃에서 가드 컬럼과 결합된 이클립스 XDB-페닐 컬럼(150mm × 4.6mm, 3.5㎛)에서 수행되었다. 10 마이크로리터의 샘플을 시스템에 주입하였다. 샘플을 산성화수(0.1% 트리플루오로아세트산, A) 및 MeOH(B)로 0.7mL/min의 유속으로 용출하였다. 최적화된 구배 크로마토그래피 조건은 0-50분에서 5-100% B, 50-55분에서 100-5% B, 55-60분에서 아이소크롬 5% B였다. 검출기는 파장 254nm에서 용매를 모니터링하였다.

[0049] **AR UF-HPLC 분석**

[0050] GGME에서 추출한 인간 재조합 AR(HRAR)의 억제 화합물은 AR UF 분석법으로 프로파일링하였다. 구체적으로, GGME(최종 농도 = 0.1mg/mL)를 0.6M 황산암모늄 및 3.9 μM HRAR과 함께 총 300 ㎕의 용액에 담아 37℃ 에서 30분 동안 배양하였다. 배양된 혼합물은 실온에서 30분 동안 5167 × g으로 원심분리하여 Microcon YM-10 원심 필터 장치를 사용하여 여과하였다. 여과액은 이후 HPLC 분석 섹션에 언급된 방법을 사용하여 HPLC로 분석하였다. HRAR 없이 배양한 샘플을 대조군으로 사용하였다. HRAR에 대한 GGME의 억제제의 상대적 결합 친화도를 "결합도(BD)"로 정의하고 다음과 같이 계산하였다:

[0051] $BD(\%) = (Aa - Ab) / Aa \times 100\%$

[0052] 여기서 Aa와 Ab는 각각 HPLC 크로마토그램에서 HRAR이 없을 때와 있을 때 상호 작용하는 화합물의 피크 영역이다(Wang et al., 2017a; Wang et al., 2017b).

[0053] **DPPH-HPLC 분석**

[0054] GGME의 항산화 화합물은 DPPH-HPLC로 프로파일링하였다. 90 마이크로리터 분량의 GGME(10.0 mg/mL)를 540 ㎕ DPPH 용액(0.32 mM)과 혼합하였다. 용액을 37℃ 에서 20분간 암실에서 배양한 후 0.45 ㎛ 멤브레인 필터를 사용하여 여과하였다. HPLC는 이전에 보고된 조건에서 수행되었다(Kim et al., 2017).

[0055] **실험 동물**

[0056] 본 연구에 사용된 실험동물은 (주)코아텍(서울, 대한민국)에서 구입한 체중 250~280g의 수컷 스프래그 다울리 10마리 쥐이다. 23 ± 1℃, 습도 60 ± 5%, 전화기 60개 이하, 냄새 20ppm 이하, 조도 150-300룩스, 12시간 명암 주기의 사육 환경에 1주일 동안 충분한 먹이와 물을 제공하였다. 동물 실험과 사육 및 관리는 '실험동물 보호 및 사용 지침'에 따라 수행하였으며, 한림대학교 동물실험윤리위원회(한림-2016-03)의 승인을 받아 실험을 진행하였다. 실험은 주기의 광기(10:00~17:00)에 수행되었다. 실험 종료 시점에 이산화탄소(CO_2) 흡입을 통해 동물들을 안락사 시켰다.

[0057] **실험예 1. 알도스 환원효소(RLAR)에 대한 억제 활성 측정**

[0058] 실시예 1에 따라 제조된 GGME이 갖는 RLAR에 대한 억제 활성을 측정하기 위해, 먼저 RLAR을 준비하였다. 250~280g의 수컷 스프래그 다울리 쥐에서 수정체를 분리하고 사용할 때까지 -70℃에서 냉동 보관하였다. 백내장이 없는 투명한 수정체를 모아 0.1 M 인산 완충 식염수(pH 6.2)에서 균질액을 준비하였다. RLAR 균질액을 냉장 원심분리기에서 4℃에서 20분간 10,000g으로 원심분리하였다. 상층액을 수집하여 RLAR로 사용하였다.

[0059] DL-글리세랄데히드를 기질로 사용하여 3분 동안 340 nm에서 NADPH의 흡수 감소를 측정하여 분광광도법을 통해 RLAR 활성을 분석하였다. 각 1.0 mL 큐벳에는 동일한 단위의 효소, 0.10 M 인산칼륨 완충액(pH 6.2), 1.6 mM NADPH, 25 mM DL-글리세랄데히드, GGME 또는 디메틸설폭사이드(DMSO)가 포함되었다.

[0060] RLAR의 억제율(%)은 다음과 같이 계산하였다:

[0061] [1-(△A 실시예 1/min)-(△A 블랭크/min)/(△A 대조군/min)-(△A 블랭크/min)] × 100%

[0062] 여기서 △A 실시예 1/min은 반응 용액, 시험 시료 및 기질에 대한 3분 동안의 흡광도 감소량이고, △A 대조군/min은 동일하지만 시험 시료 대신 DMSO를 사용한 경우이다.

[0063] 실시예 1에 따라 제조된 GGME의 RLAR 억제 활성을 분석한 결과를 도 1 (A)에 도시하였다. 그 결과, 도 1 (A)에서 볼 수 있는 바와 같이, 양성 대조군 (IC_{50}=케르세틴, 3.66 μg/mL) 보다 GGME (4.12 μg/mL)의 값이 더 높은 것을 볼 수 있다. 즉, GGME는 양성 대조군 보다 RLAR에 대한 높은 활성이 있으며, 이러한 결과는 GGME에 RLAR 저해제가 존재할 가능성을 시사한다.

[0064] **실험예 2. 최종당화산물(AGE) 형성에 대한 억제 활성 측정**

[0065] 실시예 1에 따라 제조된 GGME이 갖는 AGE 형성에 대한 억제 활성을 측정하기 위해, 다양한 농도의 GGME(대조군 포함)이 있는 상태에서 인산나트륨 완충액(0.1 M, pH7.4)에 메틸글리옥살(100 mM)과 함께 BSA(50 mg/mL)를 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 발광 분광기 LS50B(Perkin-Elmer Ltd., 영국 버킹엄셔)로 여기 파장 355 nm 및 방출 파장 460 nm에서 형광 세기를 측정하였다. DMSO는 반응에 영향을 미치지 않았다. 모든 시약과 시료는 0.2 mm 멤브레인 필터로 여과시켜 멸균시켰다.

[0066] 실시예 1에 따라 제조된 GGME의 AGE 형성 억제 활성을 분석한 결과를 도 1 (B)에 도시하였다. 그 결과, 도 1 (B)에서 볼 수 있는 바와 같이, 양성 대조군 (IC_{50}= 아모노구아니딘, 109.10 μg/mL) 보다 GGME (187.86 μg/mL)의 값이 확연히 더 높은 것을 볼 수 있다. 즉, GGME는 양성 대조군 보다 AGE 형성에 대한 높은 활성이 있으며, 이러한 결과는 GGME에 AGE 형성을 저해하는 저해제가 존재할 가능성을 시사한다.

[0067] **실험예 3. DPPH 라디칼 소거 능력 평가**

[0068] 실시예 1에 따라 제조된 GGME의 활성산소 제거 능력을 측정하기 위해, 안정한 자유 라디칼인 DPPH를 사용하였다. MeOH에 0.32 mM DPPH를 제조하고, 이 용액 180 ㎕를 0.05-1.0 mg/mL의 농도로 GGME 30 ㎕와 혼합하여 DMSO에 넣었다. 암실에서 20분간 배양한 후, 용액의 흡광도 감소를 EL800 범용 마이크로플레이트 판독기(미국 버지니아주 위노스키, Bio-Tek instruments)에서 570 nm로 측정하였다.

[0069] 이 분석 시스템에서 DPPH 라디칼 소거 활성은 DPPH의 억제 백분율(%)로 표현되며, (1-B/A)×100으로 계산되었다. 여기서 A와 B는 각각 시험 물질이 없는 경우와 있는 경우의 DPPH 활성이다.

[0070] 실시예 1에 따라 제조된 GGME의 DPPH 라디칼 소거 능력을 분석한 결과를 도 1 (C)에 도시하였다. 그 결과, 도 1 (C)에서 볼 수 있는 바와 같이, 양성 대조군 (IC_{50}= L-아스코르브산, 6.60 μg/mL) 보다 GGME (32.70 μg/mL)의 값이 훨씬 높은 것을 볼 수 있다. 즉, GGME는 양성 대조군 보다 DPPH 라디칼 소거 능력이 우수함을 확인하였다.

[0071] **실시예 2. GGME로부터 분리한 화합물 1 내지 5**

[0072] 상기 실시예 1에서 얻은 추출물(3g)을 MeOH 용매를 사용하여 Sephadex LH-20 컬럼에서 크로마토그래피를 사용하여 11개의 풀링 분획물(GG-SFrac 1-11)을 얻었다. 이어서, 상기 11개의 분획물을 HPLC로 분리하여 화합물 1 내지 5를 얻었다.

표 1

[0073]

화합물	중량(mg)
화합물 1	2.3
화합물 2	3.8
화합물 3	20.1
화합물 4	5.6
화합물 5	12.5

[0074] **실험예 4. 화합물 1 내지 5에 대한 성분 및 구조 분석**

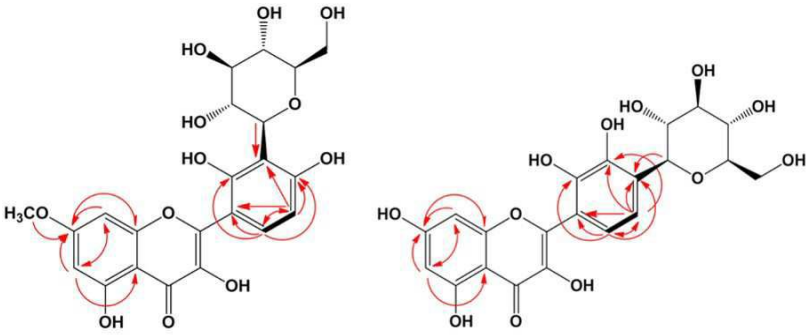
[0075] 상기 실시예 2에서 얻은 화합물 1 내지 5에 대한 성분 및 구조를 분석하고자, NMR, HR-FAB-MS, 및 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피로 분석하였다.

[0076] 분석을 통해, 신규한 플라보놀(FL) 배당체 유도체 4개와 이미 알려진 화합물 FL 1개를 확인하였다. 알려진 화합물(화합물 5)은 이전에 발표된 분광학적 데이터와 비교하여 캄페롤(Kaempferol) 로 확인되었다.

[0077] NMR 분석은 상기 화합물 1~5의 약 2.0-10.0 mg을 600 ㎕의 CD3OD에 용해하고 3 mm NMR 튜브에 분배하였다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼과 COSY, HMBC, HSQC를 포함한 상관관계 NMR 스펙트럼은 Avance DPX 400 분광기를 사용하여 얻었다. 스펙트럼은 600(^{1}H) 및 125 MHz(^{13}C)의 작동 주파수에서 얻었으며, 테트라메틸실란을 내부 표준으로 사용하였다. 화학적 이동은 δ 값으로 나타났다. 고해상도-고속 원자 폭격-질량 분석기(HR-FAB-MS) 데이터는 워터스 시냅트 G2(미국 매사추세츠주 밀포드)에서 수집하였다.

[0078] NMR 분석 결과, 상기 화합물 1~5의 화학 구조는 도 5와 같으며, 스펙트럼을 도 3에 정리하였다.

[0079] 화합물 1 ($C_{22}H_{22}O_{12}$)은 황색 비정질 분말 (2.3 mg)로 얻어졌다. 자외선 흡수 피크는 320, 276, 259nm에서 나타났으며, IR 스펙트럼은 3383(수산기), 1655(α, β-불포화 카르보닐), 1614, 1508, 1429(방향족 이중 결합)의 존재를 보여주었다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR의 방향족 스펙트럼은 δH 7.17 (d), δC 109.1 및 δH 7.24, δC 127.1 ppm에서 H-5′ 및 H-6′ 에 할당 가능한 신호로 각각 8.64 (d) 및 8.94 (d) Hz의 J 값으로 분해되었다. B- 링의 2′, 4′ di-OH 그룹의 경우 C-2′, C-4′ 의 δC 값은 C-3′ (δC : 118.7)에 비해 다운 필드에 나타났다. 따라서 δC 157.4 및 156.1 ppm은 각각 C-2′ 및 C-4′ 에 할당되었다. 또한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR은 δH 6.33 (d, J = 2.22Hz), δC 98.3 및 δH 6.61 (d, J = 2.22Hz), δC 93.1 ppm에서 신호를 보였으며 이는 FL의 H-6 및 H-8 공명에 특징적인 신호이다. 따라서 δH 6.33 및 6.61 ppm의 싱글레트는 H-6 및 H-8에 명확하게 할당되었다. δH 3.90 및 δC 61.1 ppm의 싱글 레트는 $-OCH_3$ 그룹의 존재를 나타낸다. ^{1}H NMR 스펙트럼은 또한 화합물 1에 하나의 이성질체 양성자 신호 (δH 4.75 ppm)와 이성질체 양성자의 결합 상수 (d, J = 7.62 Hz)로 설탕의 β- 결합을 확인하여 설탕의 존재를 보여주었다. 화합물 1의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 전형적인 FL 피크가 관찰되었으며 (93.1 ~ 182.7 ppm) 76.4 ppm에서 공명하는 피크는 β 형태의 C-1′′ 포도당 잔기로 특성화되었다. 도 5에서 볼 수 있듯이, B-링 모이티의 C-3′ 에서 δC 118.7 ppm으로 큰 상향 필드 이동이 관찰되었으며, 이는 전이된 포도당이 C-3′ 에 결합되었음을 나타낸다. 당의 위치를 확인하기 위해 HMBC 스펙트럼을 활용했으며, H-1″ /C-3′ 사이의 장거리 상관관계를 통해 C-3′ 에서 당의 부착을 확인하였다; H-5′ /C-1′, 3′, 4′, 6′ 과 H-6′ /C-1′, 2′, 4′, 5′ 사이의 다른 유용한 상관관계는 위치의 부착을 확인하였다. 화합물 1의 분자식은 HR-FAB-MS 스펙트럼에서 m/z 477.1140 ($C_{22}H_{21}O_{12}$, 477.1140에 대한 계산)에서 탈 양성자화 된 분자 이온 [M-H]-를 기준으로 확인되었다. 따라서 화합물 1의 구조는 2′,4′,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소플라보놀-C-3′-β-D-글루코피라노스로 결정되었다.



compound 1 compound 3

[0080]

[0081] 화합물 2 ($C_{22}H_{22}O_{12}$) 및 3 ($C_{21}H_{20}O_{12}$)은 각각 황색 비정질 분말 (3.8 및 20.1 mg)로 얻어졌다. 자외선 흡수 피크는 337, 268, 253nm 및 350, 265, 255nm에서, IR 스펙트럼은 3429, 3411 (수산기), 1642, 1639 (α, β- 불포화 카르보닐), 1630-1420 (방향족 이중 결합)의 존재를 보여주었다. 화합물 2와 3의 ^{1}H NMR 스펙트럼은 δH 7.13-7.17 및 δH 7.20-7.24 ppm (d, J = 8.89-8.77 및 8.94-8.82 Hz, H-5′ 및 H-6′)에서 δC 114.4, 112.7, 114.7 및 113.3 ppm 및 δH 6.25-6의 NMR 신호를 보여주었다. 18 ppm (d, J = 2.10-2.04 Hz, H-6), δC 98.5 및 98.7 ppm, δH 6.50-6.42 ppm (d, J = 1.98-2.16 Hz, H-8), δC 92.8 및 94.4 ppm, 각각 FL 유도체 B 및 A- 링의 특징이다. 화합물 2와 화합물 3의 ^{13}C NMR 데이터는 화합물 1의 데이터와 매우 유사하였다. 그러나 화합물 2와 화합물 3은 화합물 1에 비해 δC 74.0 및 75.1 ppm으로 다른 위치에서 β- 글리코 시드 결합 (δH 4.69 및 4.76 ppm, d, J = 각각 7.75 및 7.62 Hz,)을 보였으며, 화합물 2 만 δH 3.90 및 δC 61.6 ppm에서 하나의 -OCH_3기가 존재함을 나타냈다. HMBC를 통해 -OCH_3/C-7의 장거리 상관관계를 밝혀내어 부착 위치를 확인하였다. 화합물 2와 3의 B-링에 있는 2′ , 3′ di-OH기의 경우, C-2′ (δC 145.7 및 146.3 ppm), C-3′ (δC 142.1 및 142.3 ppm)의 δC 값이 C-4′ (δC 120.8 및 120.5 ppm)에 비해 다운필드에 나타났다. 포도당 그룹의 위치는 H-5′ 에서 C-1′ , 3′ , 4′ , 6′ 및 H-6′ 에서 C-1′ , 2′ , 4′ , 5′ 및 H-1′ ′ 에서 C-4′ 까지의 상관관계를 보여주는 HMBC 데이터 분석을 통해 C-4′ 에 있는 것으로 추론된다. 화합물 2와 3의 분자식은 HR-FAB-MS 스펙트럼에서 m/z 477.1140 ($C_{22}H_{21}O_{12}$, 477.1140에 대한 계산) 및 m/z 463.1038 ($C_{21}H_{19}O_{12}$, 463.1038에 대한 계산)의 탈 양성자화 분자 이온 [M-H]-에 기초하여 확인되었다. 따라서 화합물 2와 3의 구조는 화합물 3과 같이 확립되었다. 화합물은 2′ ,3′ ,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소플라보놀-C-4′ -β-D-글루코피라노스 및 2′ ,3′ ,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-4′ -β-D-글루코피라노스였다.

[0082] 화합물 4 ($C_{21}H_{18}O_{13}$)는 황색 비정질 분말 (5.6 mg)로 얻어졌다. 자외선 흡수 피크는 347, 264, 250nm에서 나타났으며, IR 스펙트럼은 3417(수산기), 1628(α, β-불포화 카르보닐), 1609, 1508, 1431(방향족 이중 결합)의 존재를 보여주었다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 데이터는 화합물 4를 확인했으며 또한 1의 아글리콘에 글루쿠론모이오티의 존재를 나타냈지만 4의 -OCH_3 그룹은 나타나지 않았다. 글루쿠론 잔기의 이성질체 양성자는 δH 4.77 ppm (d, J = 7.68 Hz)에서 δC 78.1 ppm으로 글루쿠론 잔기가 β- 구성에 있음을 나타냈다. 화합물 1의 δH 4.77ppm의 이성질체 글루쿠론 양성자 H-1′ 과 C-3′ (δC 118.7ppm) 사이에 3-결합 장거리 상관관계가 있음을 밝혀내 글루쿠론 잔기가 C-3′ 에 연결되어 있음을 추가로 확인하였다. 화합물 4의 분자식은 HR-FAB-MS 스펙트럼에서 m/z 491.0910 ($C_{22}H_{19}O_{13}$, 491.0910에 대한 계산)에서 탈 양성자화 된 분자 이온 [M-H]-를 기준으로 확인되었다. ^{1}H, ^{13}C NMR 및 HMBC 스펙트럼은 화합물 1과 매우 유사하였다. 따라서 화합물 4의 구조는 2′ ,4′ ,3,5,7- 펜타 하이드록시 플라보놀-C-3′ -β-D- 글루코피라노시 두론산으로 결정되었다.

[0083] 결론적으로 분리된 5개의 FL 유도체 화합물은 다음과 같다.

[0084] 화합물 1: (2′ ,4′ ,3,5-테트라하이드록시-7-메톡소플라보놀-C-3′ -β-D-글루코피라노스),

[0085] 화합물 2: (2′ ,3′ , 3,5-테트라하이드록시-7-메톡소이플라보놀-C-4′ -β-D-글루코피라노스),

[0086] 화합물 3: (2′ ,3′ ,3,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-4′ -β-D-글루코피라노스) 및

[0087] 화합물 4: (′ , 4′ ,3′ ,5,7-펜타하이드록시플라보놀-C-3′ -β-D-글루코피라노스)

[0088] 화합물 5: 캄페롤(Kaempferol)

[0089] **실험예 5. HPLC를 통한 순도 분석**

[0090] 상기 화합물 1 내지 5의 순도를 분석하기 위하여, 진공 탈기 장치, 4차 펌프, 자동 샘플러, 온도 조절 컬럼 컴파트먼트 및 다이오드 어레이 검출기(DAD; Agilent, 미국 캘리포니아주 서니베일)가 장착된 Agilent 1100 시리즈 시스템에서 HPLC를 수행하였다. 분리는 30℃에서 가드 컬럼과 결합된 이클립스 XDB-페닐 컬럼(150mm X 4.6mm, 3.5㎛)에서 수행되었다. 10 ㎕의 샘플을 시스템에 주입하고, 샘플을 산성화수(0.1% 트리플루오로아세트산, A) 및 MeOH(B)로 0.7mL/min의 유속으로 용출하였다. 검출기는 파장 254 nm에서 용매를 모니터링하였다.

[0091] 상기 화합물 1 내지 5의 순도를 분석한 결과, 화합물 1(97.97%), 2(98.11%), 3(96.97%), 4(97.89%), 5(98.63%)의 결과값으로, 각 화합물은 모두 고순도였다.

[0092] **실험예 6. 성분 스크리닝**

[0093] 1. UF-HPLC를 통한 RLAR 억제제 성분 스크리닝

[0094] 상기 실시예 2의 GGME로부터 분리한 화합물 1 내지 5의 RLAR 억제 활성을 확인하기 위해, 상기 화합물들을 HRAR과 함께 배양한 후, HRAR과 결합하는 활성 화합물을 분석하였다. 그 결과를 도 2 (A)에 도시하였다.

[0095] 분석 결과, HPLC 피크 영역을 비교하여 결합되지 않은 화합물을 직접 분석하였다. 결합된 화합물의 피크 영역은 감소하거나 사라지는 반면, 결합되지 않은 화합물의 피크 영역은 필터막을 자유롭게 통과하기 때문에 거의 변하지 않는 것으로 나타났다.

[0096] 도 2 (A)에서 볼 수 있는 바와 같이, 실시예 2의 5가지 화합물은 피크 영역이 뚜렷하게 감소하였다. 즉, 이들은 HRAR과 결합하여 RLAR 억제 활성을 갖는 GGME의 주요 억제제로 간주될 수 있음을 시사한다. 비활성화된 샘플의 용출액에서 표적 화합물이 여전히 검출되었지만 (도 2A, 파란색 선), 감소된 피크 면적은 HRAR과 억제제 성분 간의 결합이 특정 결합을 통해 이루어졌음을 증명하였다(도 2A, 빨간색 선).

[0097] 2. DPPH-HPLC를 통한 항산화 성분 스크리닝

[0098] 상기 실시예 2의 GGME로부터 분리한 화합물 1 내지 5의 항산화 능력을 확인하고자, DPPH-HPLC 분석을 실시하고, 그 결과를 도 2 (B)에 도시하였다.

[0099] 분석 결과, 잠재적인 항산화 활성을 가진 화합물의 피크 영역은 DPPH와 반응한 후, HPLC 크로마토그램에서 감소하거나 사라졌다. 반면, 항산화 활성이 없는 화합물의 경우 피크 영역은 거의 변화가 없었다.

[0100] 도 2 (B)에서 볼 수 있는 바와 같이, 실시예 2의 5가지 화합물은 피크 영역이 뚜렷하게 감소함에 따라, 항산화 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있다.

[0101] **실험예 7. RLAR 억제 활성, DPPH 라디칼 소거 활성 및 AGEs 형성 억제 활성**

[0102] 상기 실시예 2의 GGME로부터 분리한 화합물 1 내지 5의 RLAR 억제 활성, DPPH 라디칼 소거 활성 및 AGEs 형성 억제 활성에 대한 분석을 실시하고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0103]

	Compounds	RLAR		DPPH		AGEs
		IC_{50} (μM)[a]	TBD (%)[b]	IC_{50} (μM)	PAR (%)[c]	IC_{50} (μM)
화합물1	2',4'3,5-Tetrahydroxy-7-methxoyflavonol-*C*-3'-β-D-glucopyranose (1)	1.15	23.24	12.87	10.26	-
화합물2	2',3',3,5-Tetrahydroxy-7-methxoyflavonol-*C*-4'-β-D-glucopyranose (2)	1.29	21.53	6.70	17.15	-
화합물3	2',3',3,5,7-Pentahydroxyflavonol-*C*-4'-β-D-glucopyranose (3)	0.59	37.95	4.98	8.72	28.84
화합물4	2',3',3,5,7-Pentahydroxyflavonol-*C*-3'-β-D-glucopyranosiduronic acid (4)	1.98	49.85	9.71	11.46	15.66
화합물5	Kaempferol (5)	2.49	36.94	17.91	22.88	-
대조군	Quercetin[d]	1.21	-	-	-	-

대조군	L-ascorbic acid[e]	-	-	3.75	-	-
대조군	Aminoguanidine[f]	-	-	-	-	99.18

[0104] [a]IC_{50} 은 중복으로 수행한 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 반 최대 억제 농도의 평균 ± SEM으로 정의된다.

[0105] [b]TBD 는 알도스 환원효소 UF-HPLC에서 계산한 총 결합 정도이다.

[0106] [c]PAR 은 DPPH-HPLC에서 계산한 피크 면적 감소율이다.

[0107] [d-f]Quercetin([d-f]케르세틴), L-아스코르브산 및 아미노구아니딘은 각각 RLAR, DPPH 라디칼 소거 및 AGE 형성에 대한 양성 대조군이다.

[0108] 1. AR 및 소르비톨 축적에 대한 분리 화합물의 억제 효과

[0109] 화합물 1 내지 5의 RLAR 및 소르비톨 축적에 대한 억제 활성은 알려진 RLAR 억제제인 케르세틴을 양성 대조군으로 사용하여 실험하였다.

[0110] 실험 결과, 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 화합물 중 카테콜 모이오티 B-링의 3′ 및 4′ 위치에 -C-β-D-글루코피라노스와 -OH기를 포함하는 화합물 3이 가장 강력한 억제 활성을 보였으며, RLAR에 대해 0.59 μM, 소르비톨 축적에 대해 92.51%의 IC_{50} 값을 나타냈다. 또한, 7-OCH_3 그룹이 있는 카테콜 모이오티 B-링의 3′ 및 4′ 위치에 있는 -OH 그룹과 -C-β-D-글루코피라노스(화합물 2)와 7-OCH_3 그룹이 있는 카테콜 모이오티 A-링의 3′ 및 4′ 위치에 있는 -C-β-D-글루코피라노스 및 -OH 그룹(화합물 1)은 IC_{50} 값이 1. 29 및 1.15 μM, 소르비톨 축적을 각각 69.38% 및 63.94% 억제하는 것으로 나타났다. 케르세틴은 소르비톨 축적에 대해 각각 1.21 μM 및 85.71 %의 IC_{50}을 보였다. 또한 카테콜 모이티 B-링과 화합물 5의 3′ 및 4′ 위치에 있는 -C-β-D-글루코피라노시두론산과 -OH 그룹은 각각 1.98 및 2.49 μM, 81.63 및 97.95%의 IC_{50} 값으로 소르비톨 축적을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

[0111] 2. 분리된 화합물의 DPPH 라디칼 소거능

[0112] 화합물 1 내지 5의 DPPH 라디칼 소거 분석법으로, L-아스코르브산을 양성 대조군으로 사용하여 분석하였다. 결과는 표 2에 제시되어 있다.

[0113] 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 화합물 3의 IC_{50} 값이 4.98 μM으로 가장 높았다. 화합물 1, 2, 4, 5도 각각 12.87, 6.70, 9.71, 17.91 μM(2 > 4 > 1 > 5)의 IC_{50} 값으로 라디칼 소거 활성을 보였으며, 이는 L-아스코르브산(IC_{50}= 3.75 μM)과 비교했을 때 높은 수치이다.

[0114] 3. 최종당화산물(AGE) 형성에 대한 억제 활성 분석

[0115] 상기 실시예 2 내지 5에서 분리된 화합물의 AGEs 형성 억제 효과를 분석하기 위하여, 메틸글리옥살-BSA 분석을 실시하였다. 결과는 표 2에 제시되어 있다.

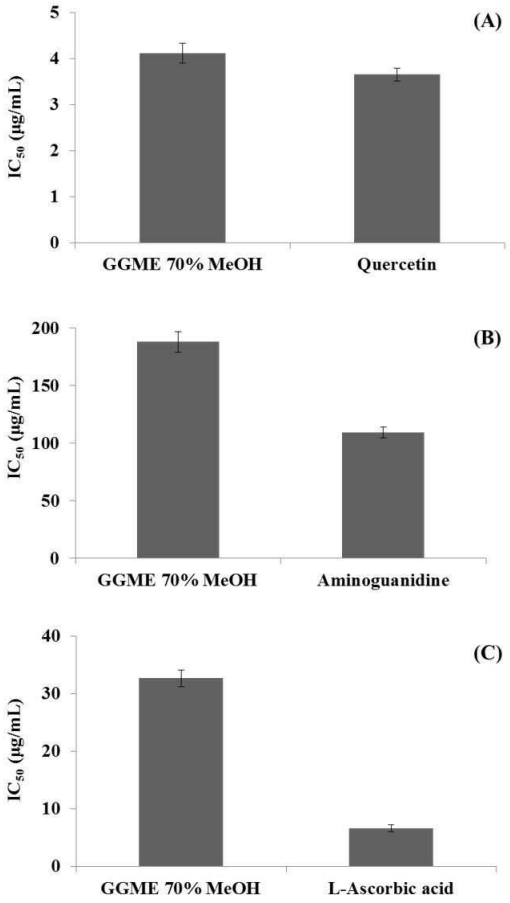
[0116] 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 화합물 3과 4는 FL 구조를 가지며 아미노구아니딘 양성 대조군(IC_{50} 99.18 μM)에 비해 각각 28.84 μM 및 15.66 μM의 IC_{50} 값으로 확연히 높은 억제 활성을 보였다. 화합물 1과 5는 20 μg/mL의 농도에서 다양하고 낮은 억제 효과(9.14 및 12.75%)를 보였다. 화합물 2는 비활성이었다.

[0117] 또한, 도 4에서는 쥐 수정체의 소르비톨 축적과 진행성 당화 최종 산물(AGE)에 대한 젠티아넬라 그라미네아 70% 메탄올 추출물에서 분리한 5가지 화합물의 억제 활성을 나타내었다. 이들 모두 대조군 대비 유사하거나 우수한 활성을 보여준다.

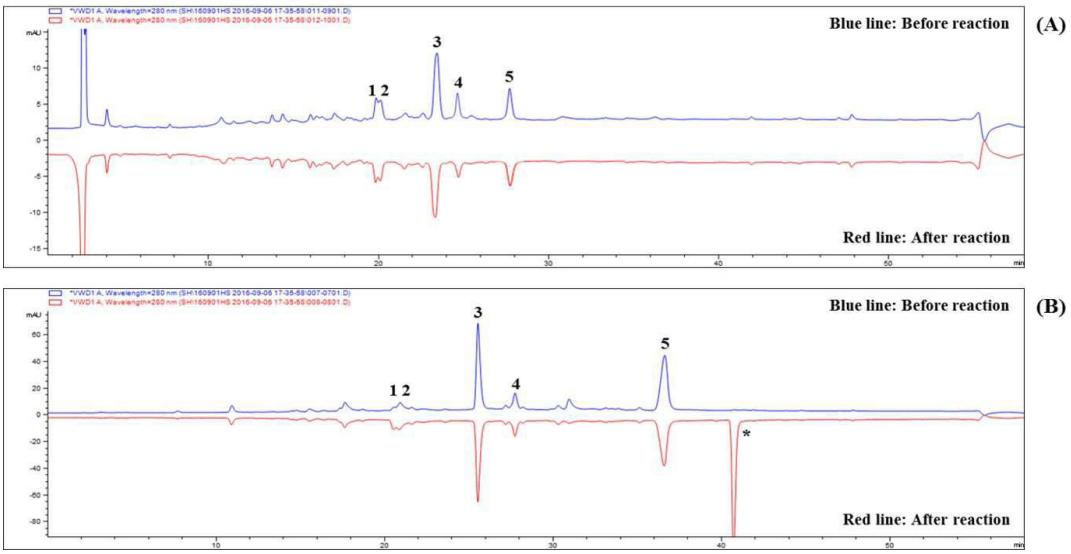
[0118] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

도면1


(A)
IC50 (μg/mL)
5
4
3
2
1
0
GGME 70% MeOH
Quercetin
(B)
IC50 (μg/mL)
200
150
100
50
0
GGME 70% MeOH
Aminoguanidine
(C)
IC50 (μg/mL)
40
30
20
10
0
GGME 70% MeOH
L-Ascorbic acid

도면2


Blue line: Before reaction
Red line: After reaction
1 2
3
4
5
(A)
Blue line: Before reaction
Red line: After reaction
1 2
3
4
5
*
(B)

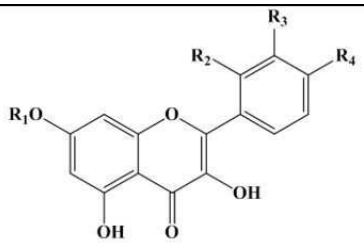
도면3

X	Compound (1)		Compound (2)		Compound (3)		Compound (4)	
	^1H (δ_H)	^{13}C (δ_C)	^1H (δ_H)	^{13}C (δ_C)	^1H (δ_H)	^{13}C (δ_C)	^1H (δ_H)	^{13}C (δ_C)
2	-	150.4	-	150.3	-	151.0	-	151.2
3	-	134.5	-	132.5	-	131.9	-	133.3
4	-	182.7	-	181.8	-	182.1	-	180.2
5	-	162.8	-	163.8	-	163.7	-	161.1
6	6.33 (d, 1H, *J* =2.22 Hz)	98.3	6.25 (d, 1H, *J* =2.10 Hz)	98.5	6.18 (d, 1H, *J* =2.04 Hz)	98.7	6.17 (d, 1H, *J* =1.74 Hz)	98.1
7	-	167.9	-	168.9	-	169.9	-	168.5
8	6.61 (d, 1H, *J* =2.22 Hz)	93.1	6.50 (d, 1H, *J* =1.98 Hz)	92.8	6.42 (d, 1H, *J* =2.16 Hz)	94.4	6.36 (d, 1H, *J* =1.98 Hz)	92.2
9	-	159.7	-	159.6	-	158.7	-	160.1
10	-	106.1	-	104.3	-	103.4	-	105.0
7-OCH$_3$	3.90 (s, 3H)	61.1	3.90 (s, 3H)	61.6	-	-	-	-
1'	-	104.7	-	110.3	-	111.2	-	105.7
2'	-	157.4	-	145.7	-	146.3	-	158.2
3'	-	118.7	-	142.1	-	142.3	-	118.7
4'	-	156.1	-	120.8	-	120.5	-	157.5
5'	7.17 (d, 1H, *J* = 8.64 Hz)	109.1	7.13 (d, 1H, *J* = 8.89 Hz)	114.4	7.20 (d, 1H, *J* = 8.94 Hz)	114.7	7.12 (d, 1H, *J* = 8.76 Hz)	107.2
6'	7.24 (d, 1H, *J* = 8.94 Hz)	127.1	7.17 (d, 1H, *J* = 8.77 Hz)	112.7	7.24 (d, 1H, *J* = 8.82 Hz)	113.3	7.24 (d, 1H, *J* = 8.94 Hz)	128.0
1''	4.75 (d, 1H, *J* = 7.62 Hz)	76.4	4.69 (d, 1H, *J* = 7.75 Hz)	74.0	4.76 (d, 1H, *J* = 7.62 Hz)	75.1	4.77 (d, 1H, *J* =7.68 Hz)	78.1
2''	3.92 (dd, 1H, *J* = 1.06, 12.07 Hz)	71.6	3.94 (dd, 1H, *J* = 1.50, 10.45 Hz)	70.3	3.93 (dd, 1H, *J* = 1.80, 10.09 Hz)	70.38	3.29-3.50 (m, 1H)	71.3
3''	3.40-3.42 (m, 1H)	78.3	3.39-3.42 (m, 1H)	76.3	3.39-3.41 (m, 1H)	78.6	3.29-3.50 (m, 1H)	76.8
4''	3.48 (t, 1H, *J* = 8.64, 9.12 Hz)	70.8	3.49 (t, 1H, *J* = 8.41, 9.30 Hz)	70.0	3.48 (t, 1H, *J* = 8.40, 8.66 Hz)	70.4	3.29-3.50 (m, 1H)	72.1
5''	3.40-3.42 (m, 1H)	80.1	3.39-3.42 (m, 1H)	77.6	3.39-3.41 (m, 1H)	79.7	3.92 (d, 1H, *J* = 9.71 Hz)	79.1
6''	3.54-3.71 (m, 2H)	66.2	3.58-3.73 (m, 2H)	64.9	3.52-3.73 (m, 2H)	65.1	-	173.1

도면4

Compounds	Sorbitol content (mg)/lens wet weight (g)	Inhibition (%) of sorbitol accumulation
Sorbitol free	No detection	-
Control	1.47 ± 0.04	-
Quercetin[a]	0.21 ± 0.02	85.71
2′,4′,3,5-Tetrahydroxy-7-methxoyflavonol-*C*-3′-β-D-glucopyranose (**1**)	0.53 ± 0.06	63.94
2′,3′,3,5-Tetrahydroxy-7-methxoyflavonol-*C*-4′-β-D-glucopyranose (**2**)	0.45 ± 0.06	69.38
2′,3′,3,5,7-Pentahydroxyflavonol-*C*-4′-β-D-glucopyranose (**3**)	0.11 ± 0.02	92.51
2′,3′,3,5,7-Pentahydroxyflavonol-*C*-3′-β-D-glucopyranosiduronic acid (**4**)	0.27 ± 0.03	81.63
Kaempferol (**5**)	0.03 ± 0.01	97.95

도면5



Compounds	R_1	R_2	R_3	R_4
1	CH_3	OH	-β-D-glucopyranose	OH
2	CH_3	OH	OH	-β-D-glucopyranose
3	H	OH	OH	-β-D-glucopyranose
4	H	OH	-β-D-glucopyranosiduronic acid	OH
5	H	H	H	OH