



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년09월23일
(11) 등록번호 10-0857691
(24) 등록일자 2008년09월02일

(51) Int. Cl.

A61K 36/533 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0053211

(22) 출원일자 2007년05월31일

심사청구일자 2007년05월31일

(56) 선행기술조사문헌

韓藥作誌, 12(6), 463-472, 2004

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39

재단법인춘천바이오산업진흥원

강원 춘천시 후평동 198-53 하이테크벤처타운 생
물동 112호

서림바이오 주식회사

강원 춘천시 후평동 198-60 춘천바이오벤처프라자
2-1-2

(72) 발명자

강일준

강원 춘천시 퇴계동 중앙하이츠빌아파트 103-1508

임순성

강원 춘천시 퇴계동 현진아파트 102-805

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 6 항

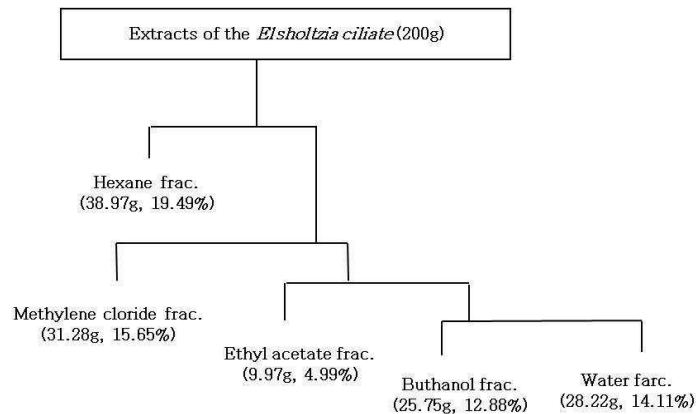
심사관 : 강태현

(54) 향유 추출물을 포함하는 당뇨병 합병증의 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 향유 추출물을 포함하는 당뇨병 합병증 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 향유를 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸 아세테이트, 헥산, 아세톤, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드 및 이들의 희석수로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 추출용매를 이용하여 추출한 향유 추출물을 포함하며, 항산화 활성 및 최종당화산물 억제활성, 알도스 환원효소 억제 작용 등이 뛰어나 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 조성물을 제공한다.

대표도 - 도13



(72) 발명자

박진서

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105동 1404호

원무호

강원도 춘천시 신북읍 용산리 147-2

최수영

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105-706

권형주

대전 유성구 신성동 삼성한울아파트 105-801

고인영

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 104-1401

한승준

서울 서대문구 홍제1동 현대아파트 105-205

(56) 선행기술조사문헌

Arch. Pharm. Res., 26, 232-236, 2003

JP15252776 A

JP19016053 A

JP19277128 A

특허청구의 범위

청구항 1

향유 추출물을 포함하는 당뇨병 합병증 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 향유 추출물은 향유를 유기용매로 추출한 것인 당뇨병 합병증 억제용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트, 헥산, 아세톤, 클로로포름 및 메틸렌 클로라이드로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 것인 당뇨병 합병증 억제용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 향유 추출물은 향유를 에탄올 수용액으로 추출하여 얻어진 향유 에탄올 추출물을 헥산으로 추출하여 분획물을 얻고, 상기 헥산 분획추출물을 제거한 후, 메틸렌클로라이드로 재 추출한 후, 에틸아세테이트로 분획추출하여 얻어진 분획추출물인 당뇨병 합병증 억제용 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 당뇨병 합병증 억제용 식품.

청구항 6

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 당뇨병 합병증 억제용 약제.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <2> [산업상 이용분야]
- <3> 본 발명은 향유 추출물을 포함하는 조성물로 항산화 활성 및 최종당화산물 억제활성, 알도스 환원효소 억제 작용 등이 뛰어난 조성물에 관한 것이다.
- <4> [종래기술]
- <5> 당뇨병환자의 혈액에 고농도로 존재하는 포도당은 인체 내 단백질 성분의 자유 아미노기와 비효소적 당화반응에 의해 결합하여 최종당화산물(AGE, advanced glycosylation end-product)을 형성한다. 최종당화산물은 당뇨병성 합병증을 일으키는 대표적인 물질이다.
- <6> 본 발명은 향유의 비효소적 당화반응 억제를 통한 당뇨병성 합병증 억제에 관한 것으로, 보다 자세하게는 향유로부터 분획물 및 활성 성분의 분리방법과 이 추출물의 높은 비효소적 당화반응 억제 활성작용을 규명하고 동물 실험을 통한 검증으로 당뇨병성 합병증 억제 및 치료제와 비효소적 당화반응 억제에 관련된 노인성 질환 억제제에 관한 것이다.
- <7>
- <8> 향유(Elsholtzia ciliate)는 아시아와 지중해 연안에 널리 자생하는 방향성 1년생 초본으로 정유를 생산하는 선

모조직이 식물 전체의 표면에 분포하여 6% 이상의 정유를 생산하는 꿀풀과 향유 속 식물이다(Hsu, H.-Y. (1986) *Oriental Materia Medica*, p. 51, Oriental Healing Art Institute, Long Beach, CA.). 국내에는 동속식물로 꽃향유(*Elsholtzia splendens*), 애기향유(*Elsholtzia saxatilis*), 좁향유(*Elsholtzia minima*)등이 분포하는데, 이들은 모두 식용, 관상용, 밀원용, 약용으로 사용되고, 발한, 이뇨, 수종, 해열 및 지혈의 효능이 있다고 한다(Yeung, Him-Che. *Handbook of Chinese Herbs and Formulas*. Institute of Chinese Medicine, Los Angeles 1985, Isobe, T and Noda, Y. (1992) *Nippon Kagaku Kasshi* 4, 423, Hsu, H.-Y. (1986) *Oriental Materia Medica*, p. 51, Oriental Healing Art Institute, Long Beach, CA.). 특히 향유는 향이 좋아서 욕탕의 향료로도 이용된다고 하였는데, 지 등(Chi, H.J. et al. (1992) *Kor. J. Pharmacog.* 23, 77)은 향유의 주요성분 중 관능적으로 좋은 성분이 시트랄(citral), 리모넨(limonene)등에 의한 것이라고 하였다. 다른 이름으로 노야기, 소양기, 석향유, 향여라고 불리며, 높이 30~60cm 정도 되며, 긴 타원형의 잎이 마주 붙으며 가지 끝에 분홍색의 연한 가지색 작은 꽃이 한쪽 면에만 모여 꽃 이삭을 이룬다. 전국 각지의 산기슭, 길옆, 들판에서 자라며, 가을 꽃 필 때에 줄기를 베서 엮어 그늘에 말린다.

- <9> 성분으로는 향유의 전초에 정유가 있으며, 그 중 주성분으로는 엘숏트지아케톤(*elsholtzia ketone*)이고, 그 밖에 스테롤, 페놀성 물질과 프라보노이드(flavonoid) 배당체 등을 함유하고 있다. 뿐만 아니라 *naginataketone*, α -pinene, cineole, p-cymene, isovaleric acid, isobutyl-isovalerate, 초산, α - β -naginatene, octanol-3,1-octen-3-ol, linalool, camphor, geraniol, n-caproic acid, isocaproic acid 등을 함유하고 있다.
- <10> 향유의 비효소적 당화반응 억제 및 알도스환원효소 억제를 통한 당뇨병성 합병증 억제나 비효소적 당화반응 관련 질환에 대한 것에서는 어떠한 개시나 교시된 바 없다.
- <11> [당뇨병의 미세혈관 합병증의 병인]
- <12> 당뇨병성 혈관합병증의 병인은 아직 확실히 규명되어 있지 않은 상태이나 당뇨병의 이병기간이 길어질수록, 혈당조절상태가 불량할수록 그 발생이 증가하는 것으로 알려져 있어, 당뇨병의 미세혈관합병증의 발생에 고혈당이 중요한 역할을 할 것으로 추정되어 왔다. 최근 미국에서 시행된 DCCT (Diabetes Control & Complication Trial) 연구결과는 철저한 혈당 조절이 인슐린의존형 당뇨병(IDDM) 환자에서의 미세혈관합병증 발생을 뚜렷하게 감소시킬 수 있음을 보고함으로써 고혈당이 미세혈관합병증 발생에 중요한 역할을 함을 증명하였다.
- <13> 한편 잘 조절되지 않은 당뇨병을 오랜 기간 가지고 있던 환자에서도 미세혈관합병증이 전혀 발생하지 않는 경우도 있으며, DCCT 연구결과에서도 나타난 사실이지만 혈당조절을 철저히 하더라도 미세혈관합병증의 발생을 완전히 예방하지는 못한다는 점으로 보아 고혈당 이외에 당뇨병의 다른 대사장애가 미세혈관합병증의 원인이 될 가능성이 있으며 아직까지 밝혀지지 않은 어떤 유전적 요인이 합병증 발생의 감수성을 결정할 것으로 여겨지고 있어, 최근에는 이에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다. (Giugliano D, Paolisso G, Ceriello A: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267, 1996)
- <14> [학설(glucose hypothesis)에 의한 미세혈관 합병증 발생 기전]
- <15> 고혈당이 어떠한 기전에 의해서 혈관합병증을 유발하는지는 아직까지 완전히 규명되지 않은 상태로 (1) 만성적 고혈당이 체내 여러 가지 단백질의 당화(glycation)를 향진시키므로 이들 단백질의 기능을 저하시킬 가능성, (2) 폴리올 경로(polyol pathway)에 의해 세포 내 솔비톨(sorbitol) 농도를 올리고 myoinositol의 감소를 초래하여 세포 내 삼투압 상승 및 변성을 촉진시킬 가능성, (3) 세포 내 redox status를 변화시킬 가능성 및 (4) 세포에 대한 산화손상(oxidative damage)을 촉진시킬 가능성, 이러한 기전들은 상호 배타적으로 작용하는 것이 아니라 여러 개의 기전이 동시에 관여하거나 하나의 기전의 결과로 다른 기전이 발생하는 등 서로 복합적으로 작용하고 있다고 생각된다.
- <16> 고혈당 상태에서 최종당화산물이 생성되는 과정에서 지질대사에 이상이 일어나고 동시에 생성되는 유해한 산소자유라디칼에 대한 방어시스템기능이 저하되어 산화적스트레스가 유발된다고 보고된 바 있다(Yokozawa, T., et al, 2001, *J. of Trad. Med.*, 18: 107-112). 이처럼 비효소적 당화반응과 산화적 스트레스(oxidative stress) 작용 기전이 서로 연관되어 있다.
- <17> 폴리올 경로란 알도스나 케토스로부터 알도스 환원효소 (AR)작용에 의해 환원되어 솔비톨을 형성하는 단계 및 솔비톨(sorbitol)이 솔비톨 탈수소효소에 의해 산화되어 과당을 생성하는 단계로 이루어지는 과정이다. 고혈당에 의하여 폴리올 경로가 활성화되고, 이로 인해 솔비톨과 과당이 과도하게 생성되고 조직에 축적되어 삼투압이 증가된다. 증가된 삼투압으로 인하여 수분이 인입되어 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신경병증 등으로 진행된다(당뇨병학, 김응진 외, 대한 당뇨병학회, 고려의학, 483쪽; Soulis-Liparota, T., et al., 1995,

Diabetologia, 38: 357-394).

<18> 최종당화산물이 사람의 미세혈관 내피세포에서 폴리올 경로의 주효소인 알도스 환원효소(AR)를 활성화시키는 것이 보고된 바 있다(Nakamura, N., et al., 2000, Free Radic Biol, Med., 29: 17-25). 정상상태에서는 알도스 환원효소가 포도당에 대하여 친화력이 매우 낮지만, 고농도의 포도당에서는 알도스 환원효소가 활성화되어 과도하게 포도당을 술비톨로 환원시키고, 이 술비톨이 술비톨 탈수소효소에 의해 과당으로 전환된다. 이 과당은 포도당에 비하여 단백질이 비효소적 당화반응의 속도가 약 10배 정도 빠르다. 따라서 고농도의 과당이 단백질과 결합하여 결국은 최종당화산물의 형성을 가속화시킨다. 이와 같이 비효소적 당화반응, 폴리올 경로 및 산화적스트레스 작용 기전들이 서로 연관되어 당뇨병증을 유발시킨다. 따라서 당뇨병증의 발병을 지연하거나 예방 또는 치료하기 위해서는 최종당화산물의 형성을 억제하는 것이 매우 중요함이 밝혀졌다(Brownlee, M., et al., 1988, N. Engl. Med., 318, 1315-1321).

<19> (1) 포도당의 자가산화 및 유리 라디칼의 생성

<20> 포도당은 스스로 이눌화(enolize)되면서 산소분자를 환원시키고 산화물질을 만들게 된다. 고혈당에 의해 포도당의 자가산화(autooxidation)가 증가하면 이때 형성되는 superoxide anion(O_2^{2-}), hydroxyl radical($\cdot OH$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 등이 형성되고 이들은 cross-linking, fragmentation 등에 의해 지질과 산화 및 단백질에 손상을 입힌 유리 라디칼은 AGE(advanced glycation endproduct)의 형성도 촉진시키고 이렇게 형성된 AGE는 다시 자가산화를 촉진시키게 된다. (Baynes JW, Thorpe SR: The role of oxidative stress in diabetic complications. Current Opinions Endocrinol 3, 277-284, 1996)

<21> (2) 비효소적 당화 (non-enzymatic glycosylation pathway)

<22> 고혈당에 의한 미세혈관장애는 일단 발생하기 시작한 이후에는 정상혈당 상태를 만들어도 지속되거나 진행되는 여러 가지 증거들이 보고되어, 고혈당이 체내 장기간 존재하는 물질에 비가역적이고 지속적인 변화를 초래하여 고혈당이 없어진 상태에서도 계속적인 병적 기능을 유발시킬 가능성이 제시되었다. 이에 따라 고혈당에 의한 세포손상의 기전으로 제시된 것이 비가역적 단백질의 당화현상이다. 포도당의 aldehyde나 ketone기는 단백질의 free amino기와 반응하여 가역적인 당화물질인 Schiff base를 형성한다. 형성된 Schiff base는 좀 더 안정되고 아직은 가역적인 ketoamine (Amadori products)형태로 재배열되고, 더욱 오랫동안 이런 상태로 유지되면 탈수, 농축을 일으켜 비가역적 당화생성물(advanced glycation end-products, AGEs)이 형성된다. 당화생성물은 특이한 흡광도 및 형광을 나타내고, 특히 단백질의 아미노기가 서로 cross-link 반응을 일으키는 성질을 가지고 있다.

<23> 당화산물은 collagen과 같은 단백질의 browning을 일으키고 기저막의 비후 및 변화된 collagen이 lipoprotein이나 IgG의 침착을 유도한다. Brownlee는 macrophage에 glycosylated products를 인지하고 제거할 수 있는 수용체가 있으며, interleukin-1, tumor necrosis factor (TNF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1)등의 분비를 자극하여 fibroblast, smooth muscle cell, mesangial cell 및 endothelial cell의 증식을 유발시키며, glycosylated matrix는 proteoglycan을 고정시키는 능력이 감소되어 있어 미세혈관의 negative charge를 감소시켜 당뇨병성 혈관 합병증의 발생에 기여할 것으로 보고하였다.

<24> (3) 폴리올 경로 (polyol pathway) 의 활성화

<25> 단백질의 당화와 함께 최근 가장 각광을 받고 있는 것은 polyol pathway의 증가가 세포손상을 일으키는 기전이다. 고혈당 상태가 되면 세포 내 포도당 대사의 변화가 일어나는데, 과잉의 포도당이 세포 내로 들어오면 aldose reductase에 의해 sorbitol로 전환되며, sorbitol dehydrogenase에 의해 fructose로 전환이 된다. 정상혈당 상태에서는 포도당에 대한 aldose reductase의 Km 값이 높아 (70mM) 세포 내 sorbitol 농도는 매우 낮으나 고혈당에 의해 세포 내 포도당 농도가 올라가면 세포 내 sorbitol농도가 증가되고 sorbitol dehydrogenase의 반응이 느리므로 sorbitol이 세포 내에 축적이 되게 된다. 이렇게 세포 내에 축적된 sorbitol의 높은 삼투압으로 세포가 팽창하게 되고 세포가 손상을 된다. 이러한 원리로 인해 대표적으로 생기는 합병증이 백내장이다.

<26> 고혈당에 의해 sorbitol이 세포 내에 축적이 되는 정도는 조직마다 큰 차이를 보이는 것으로 되어 있고, 특히 신경조직이나 혈관조직에서는 sorbitol농도의 증가가 심각한 삼투압성 변화를 보이기에는 충분치 않기 때문에 직접적인 삼투압의 증가에 따른 기전 이외에 다른 손상기전에 대한 연구가 이루어지고 있다.

<27> 현재 거론되고 있는 가설로는 (1) polyol pathway의 증가에 따라 세포 내 myoinositol이 감소한다는 설, (2) polyol pathway의 증가가 세포 내 redox status를 감소시킨다는 설 및 (3) polyol pathway의 증가가

free radical에 의한 세포손상을 증가시킨다는 설이다.

<28> 폴리올 경로의 증가가 산화 손상을 증가 시키는 기전은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫번째로는 polyol pathway의 증가가 세포 내 redox status를 감소시키므로써 유리 라디칼의 생성을 증가시키고 산화 손상을 증가시킨다는 것이다. 저 산소증시 나타나는 특징적인 혈관의 변화는 혈관의 확장과 혈류량이 증가로서, 이것은 저 산소상태에서 NADH가 NAD+로의 산화가 억제되어 NADH/NAD+비가 증가되는 것과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. 저산소증이 없는 상태에서도 고혈당 상태가 되면 저산소증에서와 마찬가지로 세포질 내에 NADH/NAD+비가 증가된다("hyperglycemic pseudohypoxia"). 고혈당 상태에서 NADH/NAD+비가 증가되는 것은 polyol pathway의 증가 및 해당작용의 증가와 관련이 있다. 고혈당 상태가 되면 sorbitol pathway로의 포도당 대사가 증가하게 되는데 sorbitol은 다시 sorbitol dehydrogenase에 의해 fructose로 전환된다. 이때 NAD+가 NADH로 환원되며 세포 내 NADH/NAD+ 비가 증가하게 된다.

<29> NADH/NAD+ 비가 증가하게 되면 NADH가 NAD+로 산화 될 때 부산물로 O_2^- 가 나올 수 있다. 또한 NADH가 증가되면 NADH를 조효소로 이용하는 prostaglandin hydroperoxidase에 의해 prostaglandin G_2 로부터 prostaglandin H_2 형성을 촉진시키며, 이때 O_2^- 가 발생하게 되어 세포 손상이 일어날 수 있다.

<30> 두 번째로는 polyol pathway가 활성화되면 여러 가지 산화손상에 대한 방어기전이 약해지고 이로 인해 세포막에 손상을 입게 된다는 것이다. 정상적인 상태에서는 free radical은 glutathione, vitamin E 및 vitamin C등의 세포내의 항산화제에 의해 급격히 제거된다. 당뇨병 상태에서는 포도당의 자가산화(autooxidation) 및 비효소적 단백질 당화(non-enzymatic protein glycosylation)등 고혈당에 의해 free radical생성이 증가되어 있고, 또한 항산화 역할을 하는 항산화제 등이 감소 되어 있어 각종 free radical에 의한 산화 손상에 매우 취약한 것으로 되어 있다. 또한 당뇨병으로 인해 고혈당 상태가 오래 지속되면 polyol pathway가 활성화되고 aldose reductase에 의해 glucose가 sorbitol로 전환될 때 NADPH를 소모하게 된다. Aldose reductase의 NADPH에 대한 K_m 값은 0.02mM로 glutathione reductase의 K_m 값 0.23mM에 비해 낮아 aldose reductase가 훨씬 NADPH에 대한 affinity가 강하다. 따라서 증가된 polyol pathway는 GSSG가 GSH로 환원되는 데 필요한 NADPH를 써버리게 되므로 세포 내에서 충분한 양의 GSH를 유지할 수가 없어 당뇨병 환자의 경우 세포 내 GSH의 농도는 감소하게 된다. 따라서 여러 가지 산화손상에 대한 방어기전이 약해지고 이로 인해 세포막에 손상을 입게 된다. Free radical은 지질과산화물을 통하여 단백질에 손상을 주며 혈관내피세포나 혈소판에 장애를 일으킨다. 산화된 단백질은 당화단백질과 마찬가지로 cross-link를 일으키며, 손상된 혈관내피세포에서는 heparan sulfate의 합성이 감소하게 되어 단백질의 유출을 가져오게 되며 prostacyclin의 합성도 감소되어 혈관 확장의 장애와 혈소판의 응고가 항진된다. 혈소판에서도 phospholipase A2가 활성화 되어 thromboxane A2의 합성이 증가되어 결과적으로 혈관 수축과 혈소판의 응고가 항진되게 된다.

<31> Jain등은 인슐린의존형 당뇨병 환자의 적혈구내 GSH농도가 대조군에 비하여 유의하게 감소되어 있고 GSH농도는 고혈당의 정도와 음의 상관관계가 있다고 하여 혈당조절이 잘되지 않은 당뇨병 환자의 세포 손상에 세포 내 GSH 농도의 감소가 중요한 역할을 할 것이라고 하였다. Mattia등은 인슐린비의존형 당뇨병 환자에서 대조군에 비해 적혈구내 GSH농도는 감소되어 있고, GSSG농도는 증가되어 있으며, GSH/GSSG비도 감소되어 있다고 하였다. 이들 환자에서 aldose reductase inhibitor인 tolrestat를 1주일간 치료하였을 경우 GSH농도 및 GSH/GSSG비가 증가된다고 하여 당뇨병 환자에서 glutathione redox status의 장애에 polyol pathway의 증가가 중요한 역할을 할 것이라고 하였다. (Nadler J and Natarajan R: Oxidative stress, inflammation, and diabetic complications. In LeRoith D, Taylor, Olefsky JM: Diabetes Mellitus. A fundamental and clinical text. 2nd Eds. 1008-1016)

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<32> 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 본 발명의 향유 추출물을 포함하는 조성물은 당뇨병 합병증을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

<33> 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, 향유 추출물을 포함하는 당뇨병 합병증 억제용 조성물을 제공한다.

<34> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- <35> 본 발명자들은 인체 안정성이 확보되는 한약재를 대상으로 당뇨병 합병증을 억제하는 활성을 갖는 성분을 검색하던 중, 향유 추출물이 항산화 효능 및 비효소적 당화반응을 억제하고, 알도스 환원효소의 억제 작용을 나타냄을 확인하여, 이를 토대로 본 발명을 완성하게 되었다.
- <36> 본 발명은 당뇨병 합병증 억제 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 향유 추출물을 유효성분으로 포함한다. 향유 추출물은 물 또는 유기용매로 추출 및/또는 분획하여 제조할 수 있으며, 바람직하기로는 유기용매로 추출 및/또는 분획하여 제조한다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 저가 알코올, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 아세톤 및 메틸렌 클로라이드로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 저가 알코올은 에탄올, 메탄올, 부탄올, 프로판올 및 이소프로판올일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 알코올 희석수는 알코올을 50 내지 97 부피%로 물에 희석한 것일 수 있다.
- <37> 본 발명의 향유 추출물은 바람직하기로는 에탄올 수용액으로 추출한 향유 에탄올 추출물과 물추출물이며, 가장 바람직하기로는 상기 향유 에탄올 추출물 및 물추출물을 헥산으로 추출한 향유 헥산 분획추출물을 제거하고, 다시 메틸렌 클로라이드로 추출한 향유 메틸렌 클로라이드 분획추출물을 제거한 후, 에틸아세테이트로 추출하여 얻어진 비극성 분획과 에틸아세테이트 분획추출물을 제거한 후, 부탄올로 추출하여 얻어진 부탄올분획 추출물이다.
- <38> 일례로, 향유 추출물은 향유전초 50g당 물 및 70% 에탄올 0.5ℓ 내지 2ℓ를 가한 후 추출하는 방법으로 실시된다. 추출 온도는 50 내지 80℃일 수 있으나, 이에 한정되진 않는다. 추출시간은 한정되진 않으나 30분 내지 1달일 수 있으며, 통상의 추출기거나 초음파분쇄 추출기를 이용할 수 있다. 제조된 추출액은 이후 감압 여과 및 동결건조하여 용매를 제거한다.
- <39> 또한, 본 발명의 일례로 향유 아세틸 클로라이드 분획추출물은 향유 전초 100 g당 물 및 70% 에탄올 0.5 내지 2 L를 가해 얻어진 향유 에탄올 추출물을 농축하여 얻은 농축물 10 내지 15 g을 물 100 내지 1000 ml에 현탁하고, 헥산 100 내지 1000 ml를 가한 후 추출하여 향유 헥산 분획물(이하, '헥산 분획추출물')을 얻어낸다. 상기 향유 헥산 분획추출물을 제거한 후, 나머지 물층에 다시 메틸렌 클로라이드 100내지 1000ml를 가한 후, 추출하여 향유 메틸렌 클로라이드 분획물(이하, '메틸렌 클로라이드 분획추출물')을 얻는다. 상기 메틸렌 클로라이드 분획추출물을 제거한 후, 나머지 물층에 다시 에틸아세테이트 100 내지 1000ml를 가한 후, 추출하여 향유 에틸아세테이트 분획물(이하, '에틸아세테이트 분획추출물')을 얻는 방법으로 실시된다. 상기 헥산, 메틸렌 클로라이드 또는 에틸아세테이트로 추출할 경우 추출 온도는 20 내지 40℃일 수 있으나, 이에 한정되진 않으며, 추출시간도 한정되진 않으나 30분 내지 20 시간일 수 있으며, 통상의 추출기거나 초음파분쇄 추출기를 이용할 수 있다. 제조된 추출액은 이후 감압 여과 및 동결건조하여 용매를 제거한다.
- <40> 또한, 본 발명의 일례로 향유 부탄올분획추출물은 향유 전초 100 g당 물 및 70% 에탄올 0.5 내지 2 L를 가해 얻어진 향유 에탄올 추출물을 농축하여 얻은 농축물 10 내지 15 g을 물 100 내지 1000 ml에 현탁하고, 헥산 100 내지 1000 ml를 가한 후 추출하여 헥산 분획추출물을 얻어낸다. 상기 향유 헥산 분획추출물을 제거한 후, 나머지 물층에 다시 메틸렌 클로라이드 100내지 1000ml를 가한 후, 추출하여 메틸렌 클로라이드 분획추출물을 얻는다. 상기 메틸렌 클로라이드 분획추출물을 제거한 후, 나머지 물층에 다시 에틸아세테이트 100 내지 1000 ml를 가한 후, 추출하여 에틸아세테이트 분획추출물을 얻는다. 상기 에틸아세테이트 분획추출물을 제거한 후, 나머지 물층에 다시 부탄올 100 내지 1000ml를 가한 후, 추출하여 부탄올 분획추출물을 얻는 방법으로 실시된다.
- <41> 본 발명에 따른 향유 추출물 또는 향유 분획추출물은 당뇨병 합병증의 발생시 증가되는 알도스 환원효소의 활성 및 최종당화산물의 형성을 억제하고, 프리 라디칼 소거능을 증가시켜 항산화 활성을 가지며, 지질과산화물과 단백질의 결합을 억제하는 효과를 가진다.
- <42> 이에 본 발명에서는 상기 향유 추출물을 포함하는 당뇨병 합병증 억제용 약제조성물을 제공한다. 상기 향유 추출물은 바람직하기로는 향유 물 및 70%EtOH 추출물이며, 가장 바람직하기로는 상기의 향유 에틸 아세테이트 및 부탄올 분획추출물이다.
- <43> 본 발명의 당뇨병 합병증 억제용 약제조성물은, 상기 유효성분을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용 방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 유효성분은 당뇨병 합병증 억제용 약제조성물에 0.001 내지 99.9 중량%로 포함될 수 있으나, 통상 0.01 내지 50 중량%의 함량으로 포함되는 것이 바람직하다. 당뇨병 합병증 억제용 약제조성물은 각종 당뇨병성 신질환, 당뇨병성 백내장, 당뇨병성 신경증, 당뇨병성 심장질환 등의 예방 또는 치료의 목적으로 사용

가능하다.

- <44> 상기 담체 또는 부형제로는 물, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수, 텍스트로스, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이들은 1종이상 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체 및 부형제는 모두 사용 가능하다. 또한 당뇨병 합병증 억제용 조성물을 약제화하는 경우, 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 봉해제, 계면활성제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구 모두 사용 할 수 있으나, 바람직하기로는 경구 투여용으로 할 수 있다.
- <45> 당뇨병 합병증 억제용 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에서 공지된 방법을 채택하여 제형화하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제, 과립제, 로션제, 리니먼트제, 리모나데제, 산제, 시럽제, 안연고제, 액제, 에어로솔제, 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제, 연고제, 유동엑스제, 유제, 현탁제, 진제, 침제, 점안제, 정제, 좌제, 주사제, 주정제, 캡셀제, 크림제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 등이 있다.
- <46> 본 발명에 따른 당뇨병 합병증 억제용 조성물의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일례로, 본 발명의 당뇨병 합병증 억제용 조성물은 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.1 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여 가능하다. 그러나 상기한 투여량은 예시하기 위한 일례에 불과하며 상기 범위에 한정되진 않는다.
- <47> 또한 본 발명의 당뇨병 합병증 억제용 약제조성물은, 향유 추출물 이외에 공지의 당뇨병 합병증 억제활성을 갖는 화합물 또는 식물 추출물을 더욱 포함할 수 있으며, 향유 추출물 100 중량부에 대하여 각각 5 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.
- <48> 본 발명의 당뇨병 합병증 억제용 조성물은 식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제 등으로 사용 가능하다. 당뇨병 합병증 억제용 조성물은 식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제로 사용되는 경우, 각종 식품류, 육류, 음료수, 초콜렛, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료, 비타민 복합제, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 당뇨병 합병증 억제용 조성물은 최종 제조된 식품 또는 음료에 0.001 내지 50 중량%으로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <49> 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 기재한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 일 실시예일뿐, 본 발명이 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <50> 실시예 1: 향유 물추출물의 제조
- <51> 건조과쇄 된 향유 전초 50g에 1L의 증류수에 넣은 후 100℃에서 2시간씩 3회 교반하면서 온침 추출하였다. 추출액을 여과지(Watman Paper No. 2)로 여과한 후에 동결 건조하여 최종 11g의 분말형태인 물추출물을 얻었다.
- <52> 실시예 2: 향유 70% EtOH추출물의 제조
- <53> 건조과쇄 된 향유 전초 총 4.5kg을 가지고 50g씩 1L의 70% EtOH에 넣은 후 70℃에서 2시간씩 3회 교반하면서 온침 추출하였다. 추출액을 여과지(Watman Paper No. 2)로 여과한 후에 감압 농축한 뒤 동결 건조하여 최종 200g의 분말형태인 70% EtOH추출물을 얻었다.
- <54> 실시예 3: 향유 헥산 분획추출물의 제조
- <55> 실시예 2에서 얻은 향유 70% EtOH추출물 200g에 물을 넣고 완전히 녹인 후 동량의 노르말헥산을 넣고 흔들어 층이 나누어지면 노르말헥산 층을 분리한다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 n-Hexane층을 여과한 후 감압 농축하여, 건조형태의 분획추출물(이하, '향유 헥산 분획추출물' 이라 함) 38.97g(19.49%)을 얻었다.
- <56> 실시예 4: 향유 메틸렌 클로라이드 분획추출물의 제조
- <57> 실시예 3의 향유 헥산 분획물을 제거한 향유 추출물에 동량의 메틸렌 클로라이드를 넣고 흔들어 층이 나누어지면 메틸렌 클로라이드 층을 분리한다. 이 과정을 3회 반복하여 분획추출물을 얻고, 이를 여과하고 감압 농축하여, 건조형태의 분획추출물(이하, '향유 메틸렌 클로라이드 분획추출물' 이라 함) 31.28g(15.65%)을 얻었다.

- <58> 실시예 5: 향유 중간층의 제조
- <59> 실시예 4의 향유 메틸렌 클로라이드 분획물과 물층사이에 중간 층의 서로 섞이지 않는 층(이하, ‘향유 중간층’ 이라 함)로 20.65g(10.33%)을 얻었다.
- <60> 실시예 6: 향유 에틸 아세테이트 분획추출물의 제조
- <61> 실시예 4의 향유 메틸렌 클로라이드 분획물을 제거한 나머지 향유 추출물에 동량의 에틸 아세테이트를 넣고 흔들어 층이 나누어지면 에틸 아세테이트 층을 분리한다. 이 과정을 3회 반복하여 분획추출물을 얻고, 이를 여과하고 농축하여, 건조물 형태의 분획추출물(이하, ‘향유 에틸 아세테이트 분획추출물’ 이라 함)로 9.97g(4.99%)을 얻었다.
- <62> 실시예 7 및 8: 향유 부탄올 분획추출물 및 물 분획추출물의 제조
- <63> 실시예 6의 향유 에틸 아세테이트 분획물을 제거한 나머지 향유 추출물에 동량의 부탄올을 넣고 흔들어 층이 나누어지면 부탄올 층을 분리한다. 이 과정을 3회 반복하여 분획추출물을 얻고, 이를 여과 농축시켜 건조물 형태(이하, ‘향유 부탄올 분획추출물’ 이라 함)를 25.75g(12.88%) 얻었으며, 이 때 부탄올층과 분리된 물층을 농축시켜 건조물 형태(이하, ‘향유물 분획추출물’ 이라 함)로 20.65g(10.33%)을 얻었다.
- <64> 실시 예 9: 향유추출물을 포함하는 제형의 제조
- <65> 9-1: 정제의 제조
- <66> 하기 [표 1]의 성분으로 원료를 균질하게 혼합하여 약전 제제 총척 중 정제 제조방법에 따라 1정이 200mg이 되도록 타정하였다.

표 1

성분	함량 (mg)
실시예 1 혹은 2	60
유당	81
미결정 셀룰로오스	50
경질 무수규산	1
크로스포비돈	6
스테아린산 마그네슘	2

- <68> 9-2: 캡셀제의 제조
- <69> 하기 표 2의 원료를 균질하게 혼합하여 약전 제제총척 중 캡셀제 제조방법에 따라서 1캡셀에 270mg이 함유되도록 충전하였다.

표 2

성분	함량 (mg)
실시예 1 혹은 2	60
유당	204
경질 무수규산	4.8
스테아린산 마그네슘	1.2

- <71> 9-3: 연질캡셀제의 제조
- <72> 하기 표 3 및 표 4의 원료를 균질하게 혼합하여 약전 제제총척 중 연질캡셀제 제조방법에 따라 1 캡셀 중 695mg이 함유되도록 충전하였다.
- <73> 1) 충전조성물

표 3

<74>

성분	함량 (mg)
실시에 1 혹은 2	60
레시틴	20
콩기름	149.4
아자경화유	38
황납	12

<75>

2) 건조한 외피조성물

표 4

<76>

성분	함량 (mg)
젤라틴	247.2
농글리세린	78
디소르비톨액 70%	90.05
파라옥시안식향산메칠	0.28
파라옥시안식향산프로필	0.07
에칠바닐란	적량
청색 1호	적량
황색 203호	적량
산화티탄	적량
분획아자유	적량

<77>

9-4: 액제의 제조

<78>

하기 표 5의 원료를 약전 제제 총칙 중 액제 제조방법에 따라서 제조하고, 100ml 용량의 갈색병에 충전, 밀봉하여 저온살균 처리 하였다.

표 5

<79>

성분	함량 (mg)
실시에 1 혹은 2	100
구연산	4
별꿀	20
액상 과당	58
니코틴산아미드	20
안식향산나트륨	70
포비돈	적량
황색 203호, 청색 1호	적량
멘톨후라보노향	적량
정제수	적량

<80>

실험 예 1 : 향유 추출물의 알도스환원효소 억제효능

<81>

1-1: 효소원의 제조

<82>

원위의 수정체를 적출하고, 그의 습증량에 따라 일정량의 인산 완충액을 가하여 혼성화하였다. 이를 4℃에서 원심 분리한 후, 그 상등액을 취하여 황산암모늄으로 40% 까지 포화시켜 원심 분리한 상등액을 다시 취하고, 70%가 되도록 황산암모늄을 가하여 1시간 가량 저어준 다음, 원심 분리하여 얻어진 펠렛을 최소량의 완충액에 현탁하여 투석을 하루 정도 하여 이를 효소원으로 하였다.

<83>

1-2: 알도스환원효소 활성 측정

<84> 제조한 효소원 100 μ L 및 DL-글리세르알데하이드 10 μ L에 향유 분획추출물을 농도별로 처리한 후, 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 또한, 표준물질로 알도스환원 효과가 있다고 알려진 Quercetin에 대하여도 비교하여 상기와 같은 방법으로 처리하여 흡광도의 감소율을 측정하였다.

표 6

<85>

Sample	농도 (μ g/ml)	억제율 (%)
비교 예 1	1.1	77.72
실시예 1	1.1	34.86
	5.5	66.43
	11	72.05
실시예 2	1.1	43.85
	5.5	76.49
	11	88.93

<86> 표 6에 나타난 바와 같이 실시 예 1 (향유 물추출물)과 실시 예 2(70% EtOH)의 aldose reductase 비교 측정결과 1.1, 5.5, 11 μ g/ml의 농도 별 모두 실시 예 2 억제효능이 다소 높은 것으로 나타났다. 그리고 비교 예 1은 천연물에서 가장 흔히 활성물질로 나타나는 quercetin을 사용하여 비교 하였다.

<87> 도 1에는 향유 분획물들의 aldose reductase 측정 결과를 막대그래프로 나타내었다. 측정결과 실시 예 5, 6, 7, 3, 4, 8의 순으로 나타났다. 표준물질로는 Quercetin을 사용하였고 실시 예 5, 6, 7의 3가지 분획물들이 Quercetin(비교예 1)과 같이 높은 억제효과를 나타내었다.

<88> 실험 예 2: Methylglyoxal (이하 'MG' 이라 함)을 촉진제로 사용한 최종당화산물 (AGE' s)생성 억제 효과

<89> MG와 BSA를 이용하여 최종당화산물(advanced glycation endproducts)형성억제실험을 실시하였다. BSA(5 mg/mL)와 MG (2 mM)에 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 녹인 시료(11, 110 mg/mL)를 넣고 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)로 total volume 5 mL을 맞추었다. 이때 향 박테리아제로 0.02% sodium azide를 첨가한 뒤 37℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응시키기 전의 시료와 반응시키고 난 후의 시료의 형광을 spectrofluorometer (Excitation: 355nm, Emission: 460nm)를 사용하여 측정하였다. 형광의 억제율은 control의 형광 증가값을 기준으로 분획물들의 형광증가값을 비교하여 계산하였다.

<90> 계산식 = $\{1-(S_1-S_0)/(C_1-C_0)\} \times 100$

<91> (S_0 : sample 0hr 형광반응값, S_1 : sample 24hr 형광반응값, C_0 : control 0hr 형광반응값, C_1 : control 24hr 형광반응값)

표 7

<92>

비효소적 당화반응 형광억제능		
	농도(μ g/ml)	Methylglyoxal-BSA(%)
비교 예 2	20	94%
실시예 1	20	37%
실시예 2	20	43%

<93> 향유 물추출물과 70% EtOH추출물의 최종당화산물 형광억제능의 측정결과 도 2와 표 7에 나타난 바와 같이 blank와 control의 차가 뚜렷하게 나타났으며 aminoguanidine의 경우 MG 을 이용한 실험에서 94%의 높은 억제효과를 나타내었으며, 향유의 경우 향유 70% EtOH추출물이 억제율 43%로 물추출물보다 형광억제효과가 다소 높은 것으로 나타났다.

표 8

<94>

비효소적 당화반응 형광억제능		
Sample	농도 (μ g/ml)	억제율 (%)

비교예 2	20	94
실시 예 3	20	18
	200	34
실시 예 4	20	20
	200	70
실시 예 5	20	36
	200	80
실시 예 6	20	67
	200	90
실시 예 7	20	17
	200	70
실시 예 8	20	16
	200	70

<95> 도 3, 도 4와 [표 8]에 나타난 바와 같이 MG 을 이용한 24시간 단기검색법으로 향유의 각 분획물에 대해 최종당 화산물(AGE' s)의 억제효과를 살펴보았다. Blank와 control을 기준으로 형광의 증가 정도를 측정한 결과 실시예 6인 향유 에틸에세이트 분획이 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 67% 억제율로 분획 물 중 가장 높은 것으로 나타났다. 시료의 농도를 10배 높여 측정한 결과 실시 예 3인 헥산분획을 제외하고 다른 분획물 대부분 높은 효과를 나타내었으나 역시 실시 예 6이 90%로 가장 높은 효과를 나타내었으며 비교 예 2인 aminoguanidine과 거의 동일한 효과를 보였다.

<96> 실험예 3: 형광분광계를 통한 MG 과 BSA의 47일 결합 억제 효능 측정

<97> AGE' s 가 형성되면 형광성 화합물이 함유된 경우가 많아 형광성 물질의 검출을 확인 함으로서 AGE' s 형성을 예측할 수 있다. 검색할 용액에 광원을 쬐이면 (Excitation) 조사광으로부터 장파장의 빛이 방사되는데 (Emission) 그 양을 측정하여 정량 분석한다.

<98> (번호는 위에서부터 아래로)

<99> 1: Control , 2 : 실시예 3- 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3: 실시예 7- 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4: 실시예 1 -500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5: 실시 예 4- 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6: 비교예 2-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 7: 실시예 6- 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8: 비교예 2-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 9: 비교예 2-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10: Blank

<100> 결과를 확인하기 위하여 MG을 이용하여 47일 동안 반응시킨 후 형광정도를 측정하였다. 도 5에 나타난 바와 같이 측정결과 blank와 control의 차이가 뚜렷하게 나타났고 비교 예 2의 활성 표준물질 aminoguanidin의 농도 별에 따라서 형광 억제 정도가 증가하였다. 향유 분획물 중에서는 실시 예 6, 4, 8, 7, 3 순이었으며 실시 예 6이 가장 높은 효과가 있는 것으로 비교 예 2의 aminoguanidin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 넣었을 때와 동일한 억제효과를 나타내었다.

<101> 실험예 4: 지질과산화물과 단백질의 결합 억제효과

<102> 4-1: Malondialdehyde (이하 'MDA' 이라 함) 제조

<103> Gomez-Sancheza (Gomez-Sancheza et al., 1990)의 방법에 따라, Dowex 50WX8-200 resin (supelco) 5 g이 들어 있는 수용액 40 ml에 1,1,3,3-tetramethoxy-propane 5 ml를 가하고 격렬히 흔든 후 실온에서 15-20분 정도 방치하여 1,1,3,3-tetramethoxy-propane을 분산시켰다. 이 분산물을 여과하여 resin을 제거하고, NaOH로 pH 7.0 이 되도록 중화한 후 중성의 1,1,3,3-tetramethoxy-propane 분산물을 동결건조하였다. 여기에 methanol을 넣어 포화용액을 만든 다음 ethyl ether 300 ml에 방울방울 가하여 연노란색의 MDA 침전물이 생기면 진공 evaporator를 이용하여 ether를 제거하여 MDA 분말을 얻었다.

<104> 체내에서 대표적인 지질과산화물인 malondialdehyde(MDA)는 두 개의 알데히드기를 갖고 있어 매우 불안정하여 주변의 단백질 내부의 아미노산 잔기 들 사이에서 뿐만 아니라 외부 단백질분자의 잔기 사이에서도 교차결합 (cross-linking)을 일으킬 수 있다(Monnier, 1990) 체내에서 생성된 지질과산화물이 어떤 효소와 결합한다면 그 효소의 활성을 저하시키거나 변화시킴으로써 질병을 유도할 수 있으며, 만일 DNA 변이를 교정하는 작용과 같은 보호기능에 관여하는 효소에 손상을 준다면 암을 유발할 수도 있다고 알려져 있다(Hong et al., 1990).

<105> 4-2: 지질과산화물과 단백질의 결합 억제효과

<106> MDA와 BSA를 이용하여 최종당화산물(advanced glycation endproducts)형성 억제 실험을 실시하였다. Park 방법
에 따라 BSA(2 mg/mL)와 MG (1 mM)에 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 녹인 시료(11, 110 mg/mL)를 넣고 50mM
Sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 total volume 5mL을 맞추었다. 이때 항 박테리아제로 0.02% sodium azide
를 첨가한 뒤 37℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응시키기 전의 시료와 반응시키고 난 후의 시료의 형광을
spectrofluorometer (Excitation: 355nm, Emission: 460nm)로 측정하였다. 형광의 억제율은 MG과 BSA의 결합
억제 효과와 동일한 방법으로 계산하였다.

표 9

<107>

지질과산화물과 단백질의 결합 억제효과		
Sample	농도 (μg/ml)	억제율 (%)
비교 예 3	20	40
실시 예 1	20	25
실시 예 2	20	37
실시예 3	20	39
	200	80
실시예 4	20	31
	200	81
실시예 5	20	39
	200	93
실시예 6	20	60
	200	96
실시예 7	20	14
	200	73
실시예 8	20	-
	200	54

<108>

도 6, 7, 8 과 표 9에 최종당화산물 형성을 촉진하기 위하여 지질과산화물의 최종형태인 MDA를 이용한
24시간 단기검색법으로 향유의 최종당화산물(AGEs)의 억제효과를 살펴보았다. 비교 예 3 물질은 aminoguanidin
을 20μg/ml 사용 하였으며 40%의 억제효과를 나타내었다. 향유의 경우 실시 예 2 (70% EtOH추출물)가 실시 예 1
보다 (물추출물)보다 12% 더 형광억제효과가 있는 것으로 나타났다.

<109>

Blank와 control을 기준으로 형광의 증가 정도를 측정한 결과 실시 예 6 (향유 에틸아세테이트분획물)이 20 μg
/ml의 농도에서 60%로 분획물 중 가장 형광 억제가 높은 것으로 나타났다. 그 다음으로 실시 예 3 (Hex 분획
물), 실시 예 5 (중간층 물질)가 39%로 나타났으며 비교 예 3의 억제효과는 40%로 실시 예 6에 비해 형광억제
효과가 낮게 나타났다. 시료의 농도를 10배 높여 실험을 수행한 결과 모든 분획물이 형광억제율 50%를 넘었으며
실시 예 6, 5, 4, 3, 7, 8 (향유E.A 분획물, 중간층, MC, Hex, BuOH, 물분획) 순으로 위의 20 μg/ml의 농도에
서 실험결과와 동일하게 실시 예 6이 억제율이 96%로 가장 큰 효과가 있는 것으로 나타났다.

<110>

실험예 5: 유리기 소거 활성 측정

<111>

시료의 DPPH 라디칼 소거 효과는 DPPH에 대한 환원력으로 측정하였다. 향유 추출물을 DMSO에 녹여 농도별로 희
석하여 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl)용액 2mL과 ethanol 2mL을 넣은 시험관에 1분 단위로 시료 1mL을
넣고 섞은 후, 30분 동안 방치한 뒤에 517nm에서 흡광도를 측정한 후, 대조군에 비하여 감소된 흡광도로부터 라
디칼 소거율을 계산하였다. 항산화효과가 있다고 알려진 비타민 C(아스코르브산)을 상기와 같은 방법으로 처리
하여 DPPH 소거능을 측정하여 결과를 기재하였다.

표 10

<112>

	DPPH 라디칼 소거능 측정	
Sample	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	억제율 (%)
비교 예 4	100	93.93
	50	55.32
	10	11.11
실시예 3	100	3.68
	50	2.24
	10	-
실시예 4	100	3.40
	50	-
	10	-
실시예 5	100	7.84
	50	3.68
	10	-
실시예 6	100	27.91
	50	11.48
	10	3.87
실시예 7	100	6.86
	50	2.24
	10	-
실시예 8	100	-
	50	-
	10	-

<113>

항유 분획 시료를 가지고 농도별에 따라 DPPH free radical 소거능을 측정하였다. 도 9 및 [표 10]에 나타난 바와 같이 비교물질로는 비교 예 4 (ascorbic acid)를 사용하였고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 93.9%의 높은 억제능을 나타내었다. 실험 결과 분획물 중에서 실시 예 6, 5, 7, 3, 4 (항유 에틸아세테이트, 중간층, BuOH, Hex, MC) 순으로 나타났으며 이 중에서 효과가 높은 실시 예 6은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 27.91%로 표준물질에 비해 항산화 효능은 낮은 것으로 나타났다.

<114>

도 10에 나타난 바와 같이 실시 예 1과 2의 TLC 전개 후 황산발색 결과 실시 예 1에 비해 실시 예 2가 많은 전개물질을 가지는 것으로 확인할 수 있었으며, DPPH 라디칼 소거능 효과도 실시 예 1에 비해 실시 예 2의 추출물이 더 큰 것으로 나타났다.

<115>

실험예 6: Photochem 을 이용한 항유 분획물의 항산화측정

<116>

PCL방법을 사용하여 photosensitizer로부터 생성된 free radical (superoxide radical)에 대한 각 실시 예들의 소거능을 측정하였다. 반응은 photochem 장치를 사용하였으며 buffer solution pH 10.5, 1.5ml 과 water 1ml, photosensitizer 25ul 와 sample 10ul을 혼합하여 5분간 반응시킨 후 측정하였다. Photochem은 luminol을 이용한 화학발광에 대한 소거능력을 측정하는 것으로 비교물질인 tocopherol 을 이용하여 검량선을 먼저 구한 뒤 그것을 기준으로 시료의 항산화능을 tocopherol 당량(equivalent)으로 표현하였다.

표 11

<117>

Sample	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Quantity (nmol)
실시예 3	0.386	0.875
실시예 4	0.386	1.425
실시예 5	0.386	2.426
실시예 6	0.193	2.194

실시예 7	0.386	2.414
실시예 8	0.386	0.907

<118> Photochem을 이용하여 각 실시 예의 항산화 측정 결과를 도 11, 12와 [표 11]에 나타내었다. 표준물질로는 tocopherol을 사용하였으며 농도에 따라 그래프로 나타내었다. 측정결과 실시 예 6, 5, 7, 4, 8, 3 (향유 에틸 아세테이트, 향유중간층, 부탄올, 메틸렌클로라이드, 물층, 핵산) 순이었으며 실시 예 6은 $0.193\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 tocopherol 2.194nmol 과 같은 항산화능을 가지며 각 실시 예들 중 가장 높은 효능을 나타내었다.

발명의 효과

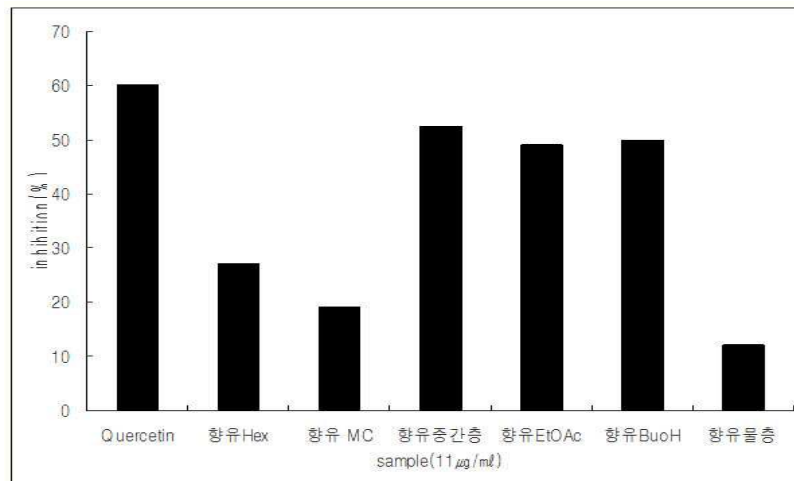
<119> 본 발명의 향유 추출물을 포함하는 조성물은 항산화 효능 및 비효소적 당화반응을 억제하고, 알도스 환원효소 억제 작용 등이 뛰어나므로 당뇨병 합병증을 억제하거나 예방하는 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

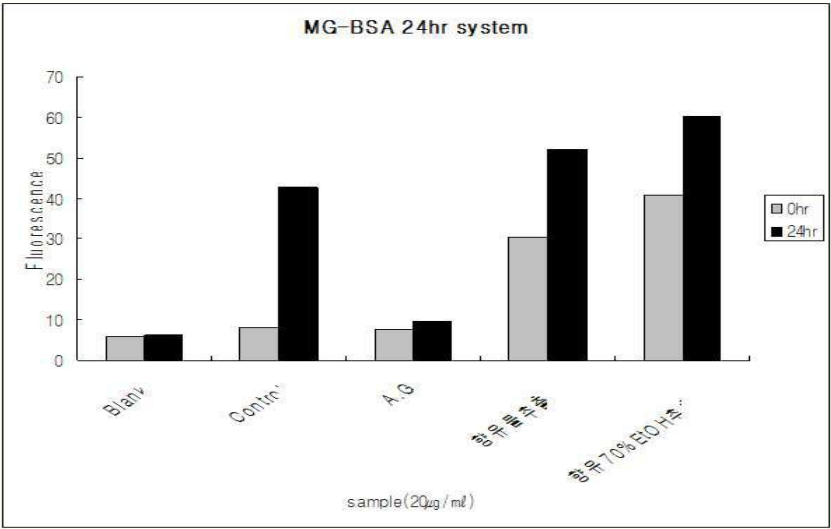
<1> 도 13은 동결 건조하여 최종 200g의 분말형태인 향유 70% EtOH추출물을 분획한 과정을 나타낸다. EtOH추출물을 물에 현탁 시킨 후 동량의 n-Hexane을 가하여 일정시간 분리시켰고, 이 과정을 3회 반복하여 얻은 Hexane층을 여과한 후 감압시켜 최종 Hexane 분획물을 얻었다. 위와 같이 비극성 용매 순으로 Hexane분획, methylene chloride 분획, ethyl acetate분획, butanol 분획, water분획으로 순차적으로 최종 분획물을 얻었다. 얻은 분획물은 각각 Hexane분획 (38.97g, 19.49%), methylene chloride 분획 (31.28g, 15.65%), ethyl acetate분획 (9.97g, 4.99%), butanol분획 (25.75g, 12.88%), water분획 (28.22g, 14.11%)이다. 분획 과정 중에 methylene chloride와 물층 사이에 분리되지 않는 중간층이 생겨서 중간층 분획물(20.65g, 10.33%)을 따로 두었다.

도면

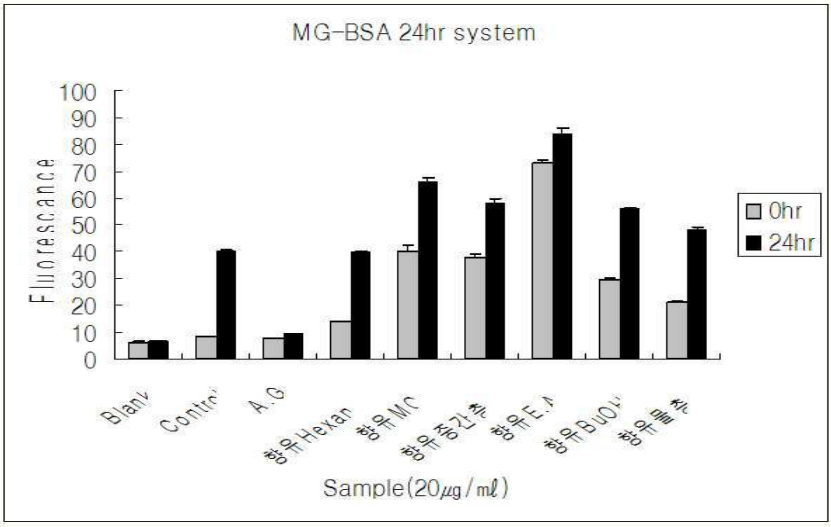
도면1



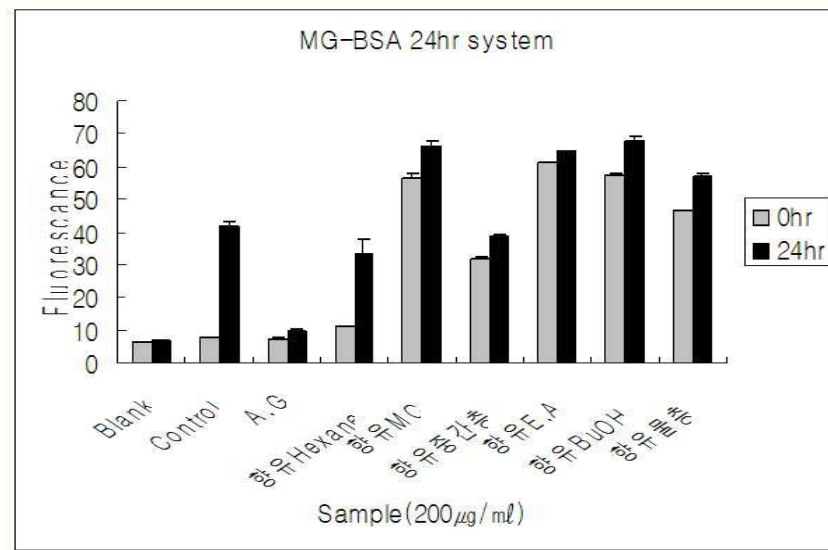
도면2



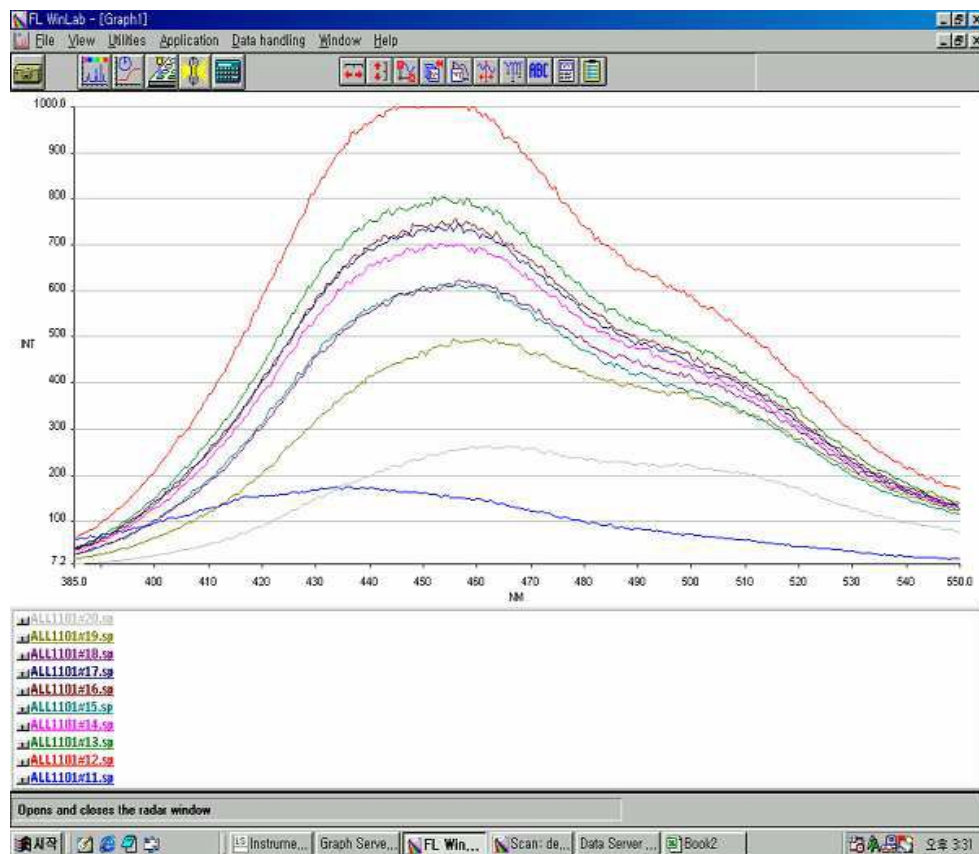
도면3



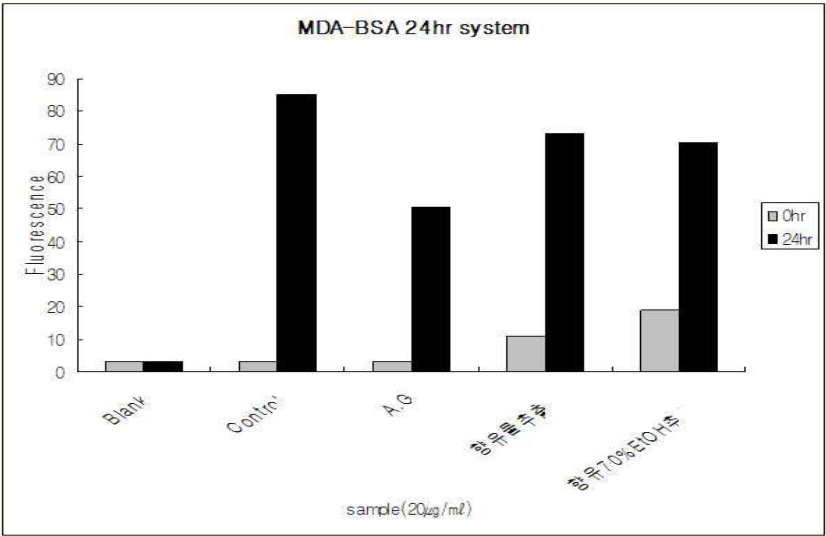
도면4



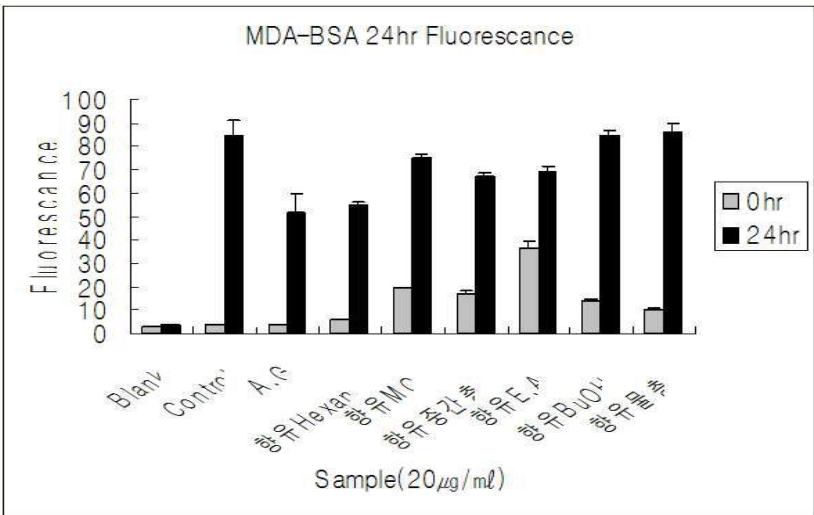
도면5



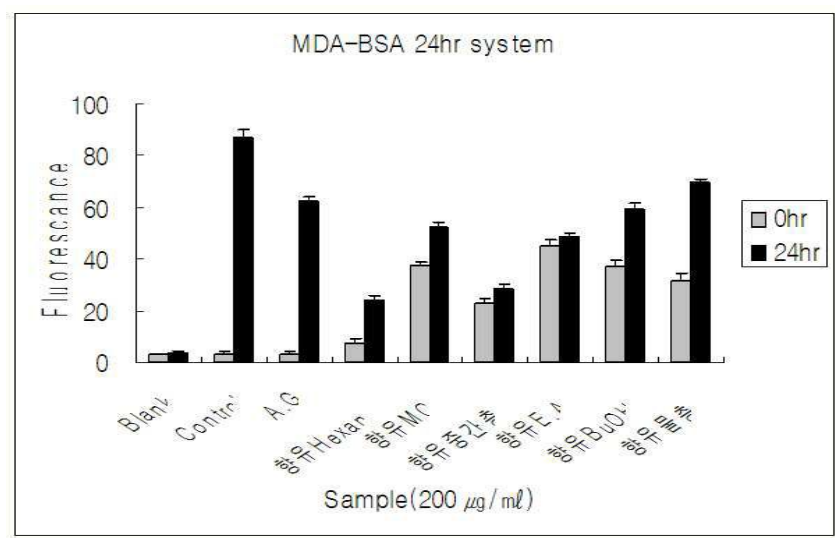
도면6



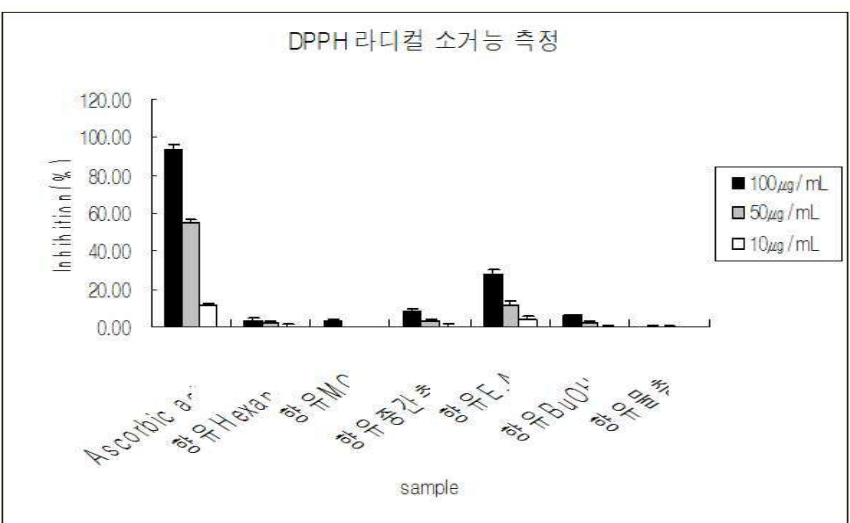
도면7



도면8



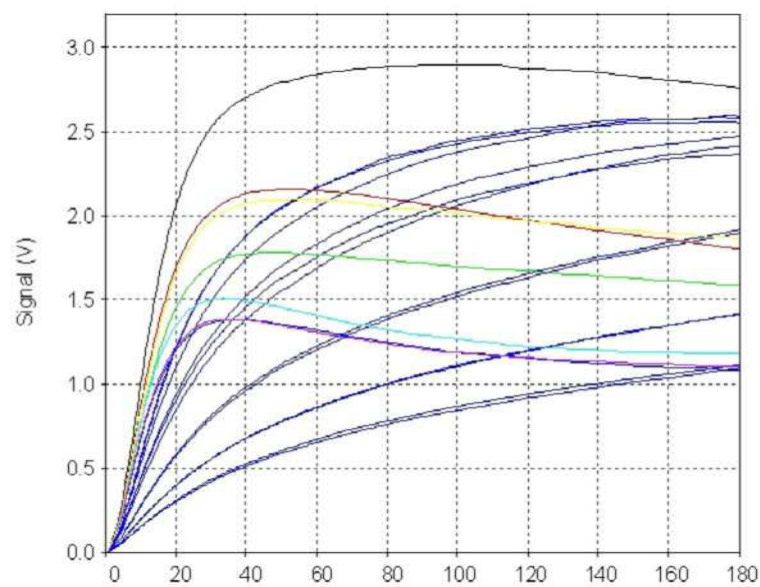
도면9



도면10



도면11



도면12



도면13

