(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0068073
(43) 공개일자 2016년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0172981
(22) 출원일자 2014년12월04일
심사청구일자 2014년12월04일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
한국식품연구원
경기도 성남시 분당구 안양판교로1201번길 62 (백현동)
(72) 발명자
백남인
경기도 화성시 반송동 동탄중앙로 51 동탄나루마을 한화꿈에그린아파트 629동 901호
서경화
경남 통영시 산양읍 이운길 48-13, 이운
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 12 항

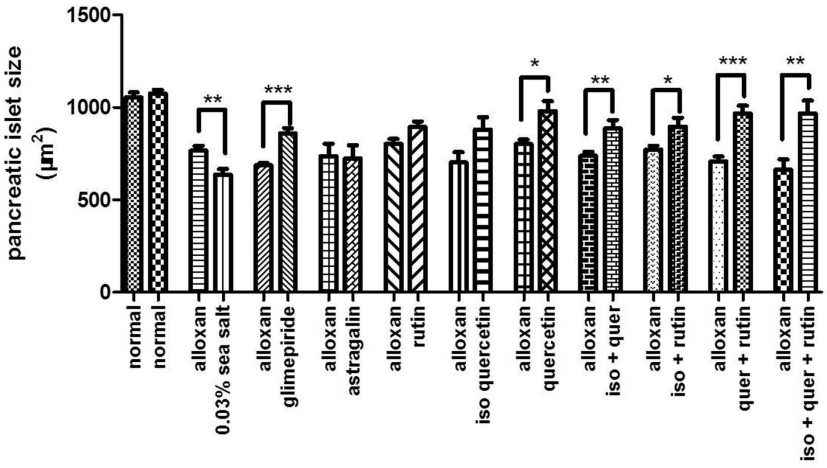
(54) 발명의 명칭 **플라보노이드 화합물을 포함하는 항당뇨용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물; 및 사료 조성물에 관한 것이다.

퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 손상된 췌장도의 크기 및 손상된 췌장도 세포내 글루코스 수치를 시너지적으로 현저하게 증가시킬 수 있으므로, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도10



(72) 발명자

강동호

서울특별시 마포구 광성로 6길 16 (신수동)

남윤희

경기 수원시 권선구 금호로 55, 1동 101호 (금곡동, 장미빌라)

김영언

경기도 용인시 수지구 수지로 342번길 18 109동 101호

홍빛나

경기 성남시 분당구 판교원로82번길 30,1304동 901호(운중동,산운마을13단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	311025-03-3-SB010
부처명	농림수산식품부
연구관리전문기관	농림기술관리센터
연구사업명	오디 수확 후 관리기술 및 고부가가치 가공제품 개발
연구과제명	오디로부터 색소 및 기능성 소재의 분리 동정 및 표준화
기 여 율	1/1
주관기관	농림기술관리센터
연구기간	2011.08.19 ~ 2014.08.18

명 세 서

청구범위

청구항 1

퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 루틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 중량 기준으로 1 내지 10 : 1 내지 10으로 혼합된 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 이소퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 이소퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 루틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 중량 기준으로 1 내지 10 : 1 내지 10 : 1 내지 10으로 혼합된 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 손상된 췌장 베타 세포를 회복시키거나, 또는 세포 내 글루코스 수치를 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 당뇨병은 인슐린 의존성 당뇨병인 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조성물은 이소퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함하는 것인,

식품 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 식품 조성물.

청구항 11

퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물은 이소퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함하는 것인, 사료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물; 및 사료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당뇨병(糖尿病, diabetes mellitus)은 인슐린이 부족하거나 인슐린에 대한 감수성이 떨어져 탄수화물대사(carbohydrate metabolism)에 이상이 생기는 질환이다. 폴리펩티드성 호르몬인 인슐린은 췌장에 있는 랑게르한스섬의 베타세포에서 만들어지며, 신체 내의 대부분의 세포가 글루코스 즉, 포도당을 사용하는 데 필요한 물질이다. 당뇨병 환자의 경우에는 신체 세포들이 글루코스를 정상적으로 사용할 수 있는 능력에 장애가 생겨 혈당치가 증가하고 글루코스가 혈액 속에 점점 많이 쌓이게 됨에 따라 과량의 당분이 소변으로 배설되게 된다.

[0003] 당뇨병에는 두 가지 형이 있다. I형은 전에는 연소 당뇨병이라 부르던 인슐린의존성 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus/IDDM)으로, 인슐린 주사가 필요하다. 이는 췌장에서 인슐린이 분비되지 않기 때문으로 주사를 통해 인슐린을 공급해주어야 한다. II형은 성인형 당뇨병이라 일컬어지던 인슐린 비의존성 당뇨병(non-insulin-dependent diabetes mellitus/NIDDM)으로, 식이요법으로 조절이 가능하다. 이것은 췌장의 인슐린 분비 기능이 떨어지거나 인슐린에 대한 조직의 거부반응에서 비롯되며, II형의 당뇨병을 이전에는 연소 당뇨병과 성인형 당뇨병으로 분류했지만, 2종 모두 어느 나이에서나 발생할 수 있다. 그렇지만 전체 당뇨병 환자 중 90%를 차지할 정도로 인슐린 비의존성 당뇨병이 훨씬 더 흔하다.

[0004] 상기한 바와 같이 인슐린의존성 당뇨병 즉, 타입 1(I형) 당뇨병의 치료 방법으로는 현재까지 인슐린 주사가 거의 대부분이다.

[0005] 또한, 종래의 당뇨병 약제들은 각각의 기작에 기인한 부작용을 보이고 있다. 예를 들어, 간이나 신장, 근육 및 심장에 대한 독성과 함께 체중증가 증상 등이 대표적인 부작용이라 할 수 있다. 따라서, 부작용이 적고 체중증가 등을 유발하지 않으면서, 동시에 효과적으로 당뇨병을 치료 또는 예방할 수 있는 당뇨병 치료제에 대한 개발의 필요성이 절실이 요구되고 있다.

[0006] 제브라피시(Zebrafish, *Danio rerio*)는 인도원산 잉어과의 소형 열대 담수어이다. 체외 수정을 하고 배아가 투명하여 형광 염색을 하여 각종 장기를 구성하는 특정세포들의 형성 및 분화 과정을 일반 해부 현미경 하에서 쉽

게 관찰할 수 있다. 현재 인슐린 의존성 당뇨병(제 1형 당뇨병)의 연구는 당뇨 유발 약물로 알려진 알록산 및 스트렙토조토신을 실험동물에 투여하여 수행되고 있다. 알록산은 선택적으로 췌장의 베타세포에 빠르게 축적되어, 베타세포의 글루코키나제를 억제하여 인슐린 분비를 감소시킨다.

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 천연물 유래 항당뇨 효과를 가진 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물이 각 화합물을 단독으로 사용하는 것보다 손상된 췌장도(pancreatic islet)의 크기 및 손상된 췌장도 세포내 글루코스 수치를 시너지적으로 현저하게 증가시킬 수 있음을 확인하여 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허공보 제10-2013-0134295호

(특허문헌 0002) 대한민국공개특허공보 제10-2014-0125594호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다

[0010] 본 발명의 다른 목적은 퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 하나의 양태는 퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 상기 약학적 조성물은 이소퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다.

[0014] 상기 퀘르세틴, 루틴 또는 이소퀘르세틴은 단독으로도 항당뇨 효과가 있지만, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 시너지 효과가 있어, 각각 단독으로 사용하는 것보다 매우 높은 항당뇨 효과를 가진다는 것은 전혀 보고된 바 없다. 구체적으로, 상기 조성물은 손상된 췌장 베타 세포를 회복시키거나, 또는 세포 내 글루코스 수치를 증가시켜 혈중 글루코스 수치를 낮추는 효과를 가지므로, 당뇨병 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0015] 상기 퀘르세틴, 루틴 또는 이소퀘르세틴은 도 1에 나타낸 화학식을 가진 화합물을 의미한다. 본 발명의 조성물은 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함하고, 가능한 모든 입체이성체도 포함할 수 있다. 또한 상기 퀘르세틴, 루틴 또는 이소퀘르세틴의 용매화물, 수화물 및 입체이성체는 통상적인 방법들을 사용하여 도 1에 표시되는 화합물로부터 제조할 수 있다.

[0016] 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 산 부가 염과 같이, 당업계에서 통상적으로 사용되는 것으로 특별히 제한되는 것은 아니다. 바람직한 약학적으로 허용 가능한 산 부가 염으로는, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 인산, 오르토인산 또는 황산과 같은 무기산; 또는 예를 들어 메탄술폰산, 벤젠설폰산, 톨루엔술폰산, 아세트산, 프로피온산, 락트산, 시트르산, 푸마르산, 말산, 숙신산, 살리실산, 말레산, 글리세로인산 또는 아세틸살리실산과 같

은 유기산을 들 수 있다.

[0017] 또한, 염기를 사용하여 통상적인 방법으로 약학적으로 허용가능한 금속염을 얻을 수 있다. 예를 들어 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 약학적으로 허용가능한 금속염을 얻을 수 있다. 이때 금속염으로서, 특히 나트륨염, 칼륨염 또는 칼슘염을 제조하는 것이 바람직하며, 이들 금속염을 적당한 염(예를 들어, 질산염)과 반응시킬 수 있다.

[0018] 본 발명에서, 상기 퀘르세틴, 루틴 또는 이소퀘르세틴은 공지된 합성 방법으로 합성하여 사용할 수도 있고, 식물에서 분리 및 정제하여 사용할 수도 있으며, 또는 상업적으로 판매되는 것을 입수하여 사용할 수도 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서는 오디의 에탄올 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하여 컬럼 크로마토그래피를 통해 화합물 1 및 2를 분리 및 정제하였다. 또한, 오디의 에탄올 추출물을 물 및 n-부탄올로 순차적으로 분획하여 컬럼 크로마토그래피를 통해 화합물 3 및 4를 분리 및 정제하였다. 또한, 상기 화합물 1 내지 4를 NMR, MS, IR 등을 통해 구조를 분석한 결과 각각, 퀘르세틴, 아스트라갈린, 이소퀘르세틴, 루틴으로 동정되었다(실시예 2 및 3).

[0020] 또한, 본 발명에서, 상기 퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 루틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 중량 기준으로 1 내지 10 : 1 내지 10, 구체적으로 1 내지 5 : 1 내지 5, 더욱 구체적으로 1 : 1로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 또한, 본 발명에서, 상기 이소퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 퀘르세틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 루틴 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 중량 기준으로 1 내지 10 : 1 내지 10 : 1 내지 10, 구체적으로 1 내지 5 : 1 내지 5 : 1 내지 5, 더욱 구체적으로 1 : 1 : 1로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서는 실시예 3에서 분리 및 정제한 퀘르세틴 및 루틴을 1:1 중량비로, 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴을 1:1:1 중량비로 혼합하여 10 μM로 제조하였고, 상기 혼합물을 알록산을 처리한 제브라피시 유충에 1시간 동안 노출시킨 결과, 상기 혼합물이 손상된 췌장도(pancreatic islet)의 크기 및 손상된 췌장도 세포내 글루코스 수치를 시너지적으로 현저하게 증가시킬 수 있음을 확인하여 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0023]

[0024] 본 발명에서 용어 "당뇨병"이란 인슐린의 분비량이 부족하거나 인슐린의 작용 및 기능이 충분히 이루어지지 않을 때 나타나는 질병을 의미하며, 이 병에 걸릴 경우 글리코겐, 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 랑게르한스섬의 베타 세포에서 분비되고, 혈중 글루코스 농도가 증가하면 분비되며, 감소하면 분비가 억제되어 에너지원의 적절한 활동을 조절하게 된다. 이 병은 인슐린 의존형 당뇨병(I형)과 인슐린 비의존성 당뇨병(II형)으로 구분된다. 당뇨병 진단은 일반적으로 혈중 글루코스 농도 측정을 통해서 가능한데, 기준에 따라서 차이를 나타낸다. 인간에게서는 일반적으로 혈중에서 글루코스가 평소 200 mg/dl 이상, 공복시 140 mg/dl 이상일 때 당뇨병으로 진단한다. 따라서, 손상된 췌장 베타 세포를 회복시키거나 세포 내 글루코스 수치를 증가시켜 혈중 글루코스 수치를 낮추면 당뇨병을 치료 또는 예방을 할 수 있다. 본 발명자들은 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물이 각 화합물을 단독으로 사용하는 것보다 손상된 췌장도의 크기 및 손상된 췌장도 세포내 글루코스 수치를 시너지적으로 현저하게 증가시킬 수 있음을 확인하였으므로, 상기 조성물은 인슐린 의존성 당뇨병 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 당뇨병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.

[0027] 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0029] 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0030] 상세하게는, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0031] 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0032] 상기 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 상기 퀴르세틴, 루틴, 이소퀘르세틴 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염은 각각 1일 0.0001 내지 1000mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여할 수 있다.

[0033] 상기 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0034] 본 발명의 조성물을 매일 투여 또는 간헐적으로 투여해도 좋고, 1일당 투여 횟수는 1회 또는 2~3회로 나누어 투여하는 것이 가능하다. 두 유효성분이 각각 단제인 경우의 투여횟수는 같은 횟수여도 좋고, 다른 횟수로 해도 된다. 또한, 본 발명의 조성물은 당뇨병 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 다른 약물 치료와 병용하여 사용할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0035] 상기 개체란 당뇨병이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는 퀘르세틴, 아스트라갈린, 이소퀘르세틴, 루틴 및 이들의 혼합물의 항당뇨 효과를 확인하기 위해 도 9에 나타난 제브라피시 췌장도의 크기 변화를 측정하여 도 10에 나타내었다.

[0037] 그 결과, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 그룹에서는 퀘르세틴(22.3%) 또는 루틴(11.3%)을 각각 처리한 경우보다 매우 높은 약 36.5%의 췌장도 크기 증가를 나타내었다(도 10). 이는 시판되는 당뇨병 치료제인 지메피리드에 버금가는 효과였다. 또한, 이소퀘르세틴 및 퀘르세틴, 또는 이소퀘르세틴 및 루틴은 혼합하더라도 오히려 각각의 화합물보다 췌장도 크기 증가 효과가 낮아, 당뇨병 치료효과가 오히려 저해됨을 확인하였다.

[0038] 이를 통해 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 손상된 췌장도의 크기 증가에 시너지적인 현저한 효과를 가짐을 확인한바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0039] 또한, 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 그룹에서는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 또는 루틴을 각각 처리하거나, 이소퀘르세틴 및 퀘르세틴 혼합물, 이소퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 경우보다 매우 높은 약 45.8%의 췌장도 크기 증가를 나타내었다(도 10).

[0040] 이를 통해 이소퀘르세틴 및 퀘르세틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴 및 루틴 혼합물과 달리 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 췌장도 크기 증가에 시너지적인 현저한 효과를 가짐을 확인한바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서는 아스트라갈린, 루틴, 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 이들의 혼합물의 항당뇨 효과를 확인하기 위해, 알록산으로 췌장도를 손상시킨 제브라피시에 상기 화합물을 처리하여 형광 염색 강도를 측정하였다.

[0042] 그 결과, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 퀘르세틴 또는 루틴 각각보다 매우 높은 형광 염색 강도 증가를 나타내었다(도 11). 이를 통해 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 손상된 췌장도의 세포내 글루코스 수치 증가에 시너지적인 현저한 효과를 가짐을 확인한바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0043] 또한, 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 또는 루틴을 각각 처리하거나, 이소퀘르세틴 및 퀘르세틴 혼합물, 이소퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 퀘르세틴 및 루틴 혼합물보다 매우 높은 형광 염색 강도 증가를 나타내었다(도 11). 이를 통해 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 손상된 췌장도의 세포내 글루코스 수치 증가에 시너지적인 현저한 효과를 가짐을 확인한바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0044] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 당뇨병 치료방법을 제공한다.

[0045] 상기 투여, 당뇨병, 및 치료는 전술한 바와 같다.

[0046] 본 발명의 다른 하나의 양태는 퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0047] 구체적으로, 상기 퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염은 중량 기준으로 1 내지 10 : 1 내지 10, 구체적으로 1 내지 5 : 1 내지 5, 더욱 구체적으로 1 : 1로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 또한, 상기 식품 조성물은 이소퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다.

[0049] 구체적으로, 상기 이소퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염; 퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염은 중량 기준으로 1 내지 10 : 1 내지 10 : 1 내지 10, 구체적으로 1 내지 5 : 1 내지 5 : 1 내지 5, 더욱 구체적으로 1 : 1 : 1로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 상기 퀘르세틴, 루틴 및 이소퀘르세틴은 천연 유래 물질로서 오랫동안 사용되어 안정성이 입증되었으므로, 상식할 수 있으면서도 당뇨병 예방 또는 개선을 도모할 수 있는 식품의 형태로 제조되어 섭취할 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에서는 실시예 3에서 분리 및 정제한 퀘르세틴 및 루틴을 1:1 중량비로, 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴을 1:1:1 중량비로 혼합하여 10 μM로 제조하였고, 상기 혼합물을 알록산을 처리한 제브라피시 유충에 1시간 동안 노출시킨 결과, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물이 손상된 췌장도의 크기 증가에 시너지적인 현저한 효과(도 10) 및 손상된 췌장도의 세포내 글루코스 수치 증가에

시너지적인 현저한 효과(도 11)를 가짐을 확인한바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0052] 상기 퀘르세틴, 루틴, 이소퀘르세틴, 당뇨병, 및 예방은 전술한 바와 같다.

[0053] 본 발명의 용어 "생리학적으로 허용 가능"은 생리학적으로 허용되고 생물체에게 투여될 때, 통상적으로 위장장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않으면서, 투여되는 화합물이 목적하는 효과를 발휘할 수 있는 통상적으로 사용되는 것을 의미한다.

[0054] 본 발명의 용어 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 당뇨병 질환이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0055] 본 발명의 용어 "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강 식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[0056] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 관절염 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0057] 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)는 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 호용된다.

[0058] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

[0059] 본 발명의 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 높은 당뇨병 예방 또는 개선 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.

[0060] 상기 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데,담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

[0061] 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크륨(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0062] 또한, 상기 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[0063] 상기 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 바람직하게는 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물으로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖ 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0065] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0066] 본 발명의 식품 조성물은 당뇨병 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 식품 조성물의 총중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명의 다른 하나의 양태는 퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0068] 구체적으로, 상기 퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염은 중량 기준으로 1 내지 10 : 1 내지 10, 구체적으로 1 내지 5 : 1 내지 5, 더욱 구체적으로 1 : 1로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 또한, 상기 사료 조성물은 이소퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다.

[0070] 구체적으로, 상기 이소퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용 가능한 염; 퀘르세틴 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염; 및 루틴 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염은 중량 기준으로 1 내지 10 : 1 내지 10 : 1 내지 10, 구체적으로 1 내지 5 : 1 내지 5 : 1 내지 5, 더욱 구체적으로 1 : 1 : 1로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 상기 퀘르세틴, 루틴 및 이소퀘르세틴은 천연 유래 물질로서 오랫동안 사용되어 안정성이 입증되었으므로, 상식할 수 있으면서도 당뇨병 예방 또는 개선을 도모할 수 있는 사료의 형태로 제조되어 섭취할 수 있다.

[0072] 본 발명의 일 실시예에서는 실시예 3에서 분리 및 정제한 퀘르세틴 및 루틴을 1:1 중량비로, 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴을 1:1:1 중량비로 혼합하여 10 μM로 제조하였고, 상기 혼합물을 알록산을 처리한 제브라피시 유충에 1시간 동안 노출시킨 결과, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물이 손상된 췌장도의 크기 증가에 시너지적인 현저한 효과(도 10) 및 손상된 췌장도의 세포내 글루코스 수치 증가에 시너지적인 현저한 효과(도 11)를 가짐을 확인한바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0073] 상기 퀘르세틴, 루틴, 이소퀘르세틴, 생리학적으로 허용 가능, 당뇨병, 예방, 및 개선은 전술한 바와 같다.

[0074] 본 발명의 용어 "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분으로, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루

틴 혼합물을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계의 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 바람직하게는 농후사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있다.

[0075] 본 발명의 사료 조성물에 포함되는 상기 퀘르세틴, 루틴, 이소퀘르세틴, 이의 이성질체, 이의 유도체 또는 생리학적으로 허용가능한 염, 또는 이들의 혼합물은 사료의 사용목적 및 사용조건에 따라 달라질 수 있으며, 일 예로 가축 사료 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 구체적으로는 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0076] 퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 손상된 췌장도의 크기 및 손상된 췌장도 세포내 글루코스 수치를 시너지적으로 현저하게 증가시킬 수 있으므로, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 퀘르세틴(1), 아스트라갈린(2), 이소퀘르세틴(3), 및 루틴(4)의 화학식을 나타낸 도이다.

도 2는 퀘르세틴의 ^{1}H NMR 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 퀘르세틴의 ^{13}C NMR 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 아스트라갈린의 ^{1}H NMR 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 이소퀘르세틴의 ^{1}H NMR 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 이소퀘르세틴의 ^{13}C NMR 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 루틴의 ^{1}H NMR 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 루틴의 ^{13}C NMR 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 퀘르세틴, 아스트라갈린, 이소퀘르세틴, 루틴 및 이들의 혼합물을 알록산으로 손상시킨 제브라피시 췌장도에 처리한 결과 항당뇨 효과를 나타내는 형광현미경 이미지이다(빨간 동그라미: 췌장도).

도 10은 퀘르세틴, 아스트라갈린, 이소퀘르세틴, 루틴 및 이들의 혼합물을 알록산으로 손상시킨 제브라피시 췌장도에 처리한 결과 손상된 췌장도의 크기 변화를 나타내는 그래프이다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

도 11은 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물이 손상된 췌장도 세포내 글루코스 수치를 시너지적으로 현저하게 증가시킴을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0079] **실시예 1. 재료, 기기 및 시약**

[0080] **1-1. 재료**

[0081] 본 실시예에서 사용한 오디(*Morus alba* L.)는 2011년 한국식품연구원에서 제공받았고, 표본시료(KHU-NPCL-

20110826)는 경희대학교 천연물화학실험실에 보관되어 있다.

[0082] **1-2. 기기 및 시약**

[0083] 컬럼 크로마토그래피용 실리카겔은 Kiesel gel 60(70~230 mesh, Merck)와 옥타데실 실리카겔(octadecyl silica gel, ODS)은 Lichroprep RP-18(40~63 μm, Merck)을 사용하였고, 박층 크로마토그래피(TLC)는 Kiesegel 60 F254와 RP-18 F254s(Merck)를 사용하였다. 핵자기 공명(NMR)스펙트럼은 400 MHz, Inova AS 400, FT-NMR spectrometer(Varian)으로 측정하였고, Electron ionization/Mass spectrometer(EI/MS)는 JMS-700(JEOL)를 사용하여 측정하였다.

[0084] 알록산 모노하이드레이트(Alloxan monohydrate)및 바다 소금은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 이용하였다.

[0085] 2-(N-(7-니트로벤즈-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(OR, USA)제품을 사용하였다. 형광현미경은 Olympus 1X70(Olympus, Japan)를 사용하였다. 이미지 분석을 위한 소프트웨어는 Focus Lite(Focus Co, Daejeon, Korea)와 Image J(National Institutes of Health)를 사용하였다.

[0086] **실시예 2. 오디의 용매 추출 및 분획**

[0087] 오디 15.4 kg에 100% 에탄올(EtOH)(35 L x 1)을 가하여 실온에서 25시간 추출한 후 여과지로 여과하고, 남은 것을 70% 에탄올(35 L x 2)을 이용하여 동일한 방법으로 2회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압 농축하여 EtOH 추출물(2219 g)을 얻었다. 얻어진 EtOH 추출물을 H_2O(1.7 L)와 에틸 아세테이트(EtOAC, 1.7 L x 4)로 분배 추출하였고, H_2O(1.7 L)분획을 다시 n-부탄올(n-BuOH, 1.5 L x

[0088] 4)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 EtOAc 분획(MAE, 41 g), n-BuOH 분획(MAB, 247 g), H_2O 분획(MAH, 1932 g)을 얻었다.

[0089] **실시예 3. 오디 분획물로부터 화합물의 분리 및 동정**

[0090] **3-1. 오디 분획물로부터 화합물의 분리**

[0091] 실시예 2의 EtOAc 분획(40 g)으로 SiO_2 컬럼 크로마토그래피(Φ 9 x 14 cm, n-hexane-EtOAc = 10:1 → 8:1 → 6:1 → 3:1 → 1:1 → CHCl3-MeOH = 8:1 → 6:1 → 4:1 → 1:1)를 실시하였고, 각 분취액을 TLC로 확인하여 14개의 분획물(MAE-1 ~ MAE-14)을 얻었다.

[0092] 그 중에서 MAE-13 분획[800 mg, elution volume/total volume(Ve/Vt) 0.821-0.874]을 실리카겔(SiO_2) 컬럼 크로마토그래피(Φ 4×15 cm, $CHCl_3$-MeOH-H_2O = 16:3:1→12:3:1)를 실시하여 30개의 분획(MAE-13-1 ~ MAE-13-30)으로 나누었으며, 화합물 1 [MAE-13-15, 24 mg, Ve/Vt 0.186 - 0.202, TLC(RP-18 F254s) Rf 0.68, MeOH-H_2O(3:1)]을 분리하였다.

[0093] 또한, 상기 MAE-13-22(42 mg, Ve/Vt 0.380-0.411)를 옥타데실 실리카(ODS) 컬럼 크로마토그래피(Φ 2×5 cm, MeOH-H_2O = 1:1)를 실시하여 8개의 분획(MAE-13-22-1 ~ MAE-13-22-8)으로 나누었으며, 화합물 2 [MAE-13-22-5, 2.7 mg, Ve/Vt 0.486 - 0.502, TLC(RP-18 F254s) Rf 0.52, MeOH-H_2O(1:1)]를 분리하였다.

[0094] 또한, n-부탄올 분획(247 g)을 Diaion HP-20 컬럼 크로마토그래피(Φ 12 x 38 cm, H_2O → 50% MeOH → MeOH)를

실시하여 8개의 분획(MAB-1 ~ MAB-8)로 나누었다. 소분획 MAB-5(1.31 g, Ve/Vt 0.522 - 0.601)를 ODS 컬럼 크로마토그래피(Φ 4.5×10 cm, MeOH-H_2O = 2:3)를 실시하여 12개의 분획(MAB-5-1 ~ MAB-5-12)으로 나누었다. 그 중에서 MAB-5-7 분획(271 mg, Ve/Vt 0.247-0.369)을 SiO_2 컬럼 크로마토그래피(Φ 2.5×15 cm, CHCl3-MeOH-H2O = 8:3:1)를 실시하여 12개의 분획(MAB-5-7-1 ~ MAB-5-7-12)으로 나누었으며, 화합물 3 [MAB-5-7-6, 11.4 mg, Ve/Vt 0.104-0.185, TLC(RP-18 F254s) Rf 0.35, MeOH-H_2O = 3:2]과 화합물 4 [MAB-5-7-9, 58 mg, Ve/Vt 0.210-0.275, TLC(RP-18 F254s) Rf 0.28, MeOH-H_2O = 3:2]를 분리하였다.

[0095] **3-2. 분리된 화합물의 동정**

[0096] 오디로부터 분리 및 정제된 4종의 화합물(화합물 1 내지 4)을 NMR, MS, IR 등을 통해 구조를 동정하였다.

[0097] 하기와 같이, 화합물 1의 NMR 데이터(도 2 및 3)을 분석한 결과, 화합물 1이 플라보노이드 화합물인 퀘르세틴임을 확인하였다.

[0098] 퀘르세틴: IR(KBr, cm^{-1}): 3420, 1662, 1600, 1502; positive FAB/MS *m/z* 303 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR(400 MHz, pyridine, δ) 8.54(1H, d, *J*=2.4 Hz, H-2'), 8.06(1H, dd, *J*=8.0, 2.4 Hz, H-6'), 7.30(1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 6.70(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.64(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6); ^{13}C-NMR(100 MHz, pyridine, δ) 177.2(C-4), 165.4(C-7), 162.3(C-5), 157.4(C-9), 147.6(C-4'), 147.0(C-3'), 146.9(C-2), 137.8(C-3), 123.8(C-1'), 121.0(C-6'), 116.5(C-2'), 116.4(C-5'), 104.3(C-10), 99.1(C-6), 94.1(C-8).

[0099] 하기와 같이, 화합물 2의 NMR 데이터(도 4)를 분석한 결과, 화합물 2가 플라보노이드 화합물인 아스트라갈린임을 확인하였다.

[0100] 아스트라갈린: $[\alpha]_D$ +16(*c*=1.0, MeOH); IR(KBr, cm^{-1}): 3345, 2922, 1654, 1608; positive FAB/MS *m/z* 471 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR(400 MHz, CD_3OD, δ) 8.01(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2', 6'), 6.88(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3', 5'), 6.39(1H, d, *J*=1.6 Hz, H-8), 6.19(1H, d, *J*=1.6 Hz, H-6), 5.21(1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1''), 3.68(1H, dd, *J*=12.0, 2.4 Hz, H-6''a), 3.53(1H, dd, *J*=12.0, 2.4 Hz, H-6''b), 3.44~3.37(4H, overlapped, H-2'', 3'', 4'', 5''); ^{13}C-NMR(100 MHz, pyridine, δ) 178.6(C-4), 166.0(C-7), 162.7(C-5), 161.6(C-4'), 157.5(C-9), 157.2(C-2), 136.0(C-3), 131.9(C-2',6'), 121.9(C-1'), 116.0(C-3',5'), 105.2(C-10), 104.1(C-1''), 99.9(C-6), 94.6(C-8), 79.1(C-3''), 78.6(C-2''), 76.1(C-5''), 71.6(C-4''), 62.6(C-6'').

[0101] 하기와 같이, 화합물 3의 NMR 데이터(도 5 및 6)을 분석한 결과, 화합물 3이 플라보노이드 화합물인 이소퀘르세틴임을 확인하였다.

[0102] 이소퀘르세틴: $[\alpha]_D$ -12.5(*c*=0.9, MeOH); IR(KBr, cm^{-1}): 3382, 2942, 1656; positive FAB/MS *m/z* 487 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR(400 MHz, CD_3OD, δ) 7.88(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 7.78(1H, dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.84(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.39(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.20(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.20(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1''), 3.70(1H, dd, *J*=12.0, 2.4 Hz, H-6''a), 3.57(1H, dd, *J*=12.0, 5.6 Hz, H-6''b), 3.34~3.19(4H, overlapped, H-2'', 3'', 4'', 5''); ^{13}C-NMR(100 MHz, pyridine, δ) 179.4(C-4), 166.0(C-7), 163.0(C-5), 159.0(C-9),

158.4(C-2), 149.8(C-4'), 145.9(C-3'), 135.6(C-3), 123.1(C-1'), 123.0(C-6'), 117.5(C-5'), 115.9(C-2'), 105.6(C-10), 104.3(C-1''), 99.9(C-6), 94.7(C-8), 78.3(C-3''), 78.1(C-5''), 75.7(C-2''), 71.2(C-4''), 62.5(C-6'').

[0103] 하기와 같이, 화합물 4의 NMR 데이터(도 7 및 8)을 분석한 결과, 화합물 4가 플라보노이드 화합물인 루틴임을 확인하였다.

[0104] 루틴: $[\alpha]_D$ -8.2(*c*=1.2, MeOH); IR(KBr, cm^{-1}): 3382, 2932, 1656; positive FAB/MS *m/z* 633 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR(400 MHz, CD_3OD, δ) 7.68(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 7.65(1H, dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.87(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.40(1H, d, *J*= 2.0 Hz, H-8), 6.23(1H, d, *J*= 2.0 Hz, H-6), 5.10(1H, d, *J*= 7.6 Hz, H-1''), 4.46(1H, d, *J*=1.2 Hz, H-1'''), 1.12(3H, d, *J*=6.4 Hz, H-6'''); ^{13}C-NMR(100 MHz, pyridine, δ) 179.9(C-4), 154.3(C-7), 161.9(C-5), 160.2(C-9), 158.7(C-2), 150.2(C-4'), 146.8(C-3'), 137.3(C-3), 121.9(C-1'), 114.3(C-10), 121.8(C-6'), 119.1(C-5'), 118.7(C-2'), 103.5(C-1''), 102.4(C-1'''), 99.9(C-6), 96.8(C-8), 78.1(C-5''), 77.2(C-3''), 75.7(C-2''), 73.9(C-4'''), 72.2(C-3'''), 72.0(C-2'''), 71.4(C-4''), 69.7(C-5'''), 68.5(C-6''), 17.9(C-6''').

[0105] **실시예 4. 제브라피시 췌장도(pancreatic islet) 변화 측정**

[0106] **4-1. 제브라피시(Zebrafish) 사육**

[0107] 제브라피시 성어는 제브라피시 시스템 S Type(1500(W)x 400(D)x 2050(H)mm)(지노믹디자인, 대전, 한국)에서 유지되었다. 알과 성어를 분리하기 위한 망을 설치한 수조에 암컷과 수컷을 1:1 비율로 넣고 12시간 후에 제브라피시 배아를 수집하였다. 채취 후에 0.03% 바다 소금 용액을 사용하여 3회 세척하여 이물질 등을 제거하고 28.5 ℃ 광주기(14 빛 : 10 어둠)가 설정된 인큐베이터에서 사육하였다.

[0108] **4-2. 제브라피시 췌장도 변화 측정 방법**

[0109] 5 dpf(수정 후 경과일, day post fertilization)의 제브라피시 유충을 96 well에 위치시킨 후 25 μM 2-NBDG로 12시간 동안 염색하였다. 이후 상기 제브라피시 유충을 췌장도 내 베타 세포만을 선택적으로 파괴시키는 당뇨 유발물질인 알록산 100 μM에 15분간 노출시켰으며, 0.03% 바다 소금 용액으로 바꾸어 5시간째까지 노출시켰다. 직접적으로 췌장도의 관찰을 위해 형광현미경(Olympus 1X70, Olympus, Japan)을 사용하였으며, 형광현미경 관찰 전에 25 μM 2-NBDG를 1시간 동안 재염색하였다.

[0110] 1차 현미경 촬영 후 상기 알록산에 노출된 제브라피시 유충을 실시예 3에서 분리 및 정제한 화합물(퀘르세틴, 아스트라갈린, 이소퀘르세틴, 및 루틴)을 10 μM로 제조하여 1시간 동안 노출시켰다. 또한, 상기 화합물을 1:1 또는 1:1:1의 중량비로 혼합하여 10 μM로 제조하였고, 상기 알록산에 노출된 제브라피시 유충에 1시간 동안 노출시켰다. 양성 대조군으로 항당뇨 물질인 지메피리드(gimepiride)를 사용하였다.

[0111] 화합물로 인한 췌장도의 변화를 관찰하기 위해 2차 현미경 촬영을 하였으며, 1차 현미경 촬영과 동일하게 형광현미경 관찰 전에 25 μM 2-NBDG를 1시간 동안 재염색하였다. 형광현미경을 통해 획득한 이미지(도 9)는 Focus Lite 및 Image J 소프트웨어를 사용하여 제브라피시의 췌장도 크기(도 10)와 췌장도의 형광 염색 강도(도 11)을 분석하였다. 도 9의 이미지에서 2-NBDG 염색 밝기를 측정하면 세포 내 당 흡수 능력 평가가 가능하므로, 상기 염색 밝기는 항당뇨를 평가하는 지표로 사용되고 있다.

[0112] **4-3. 통계분석**

[0113] 실험결과는 Graphpad Prism(version 5)를 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였고, 집단 간 비교를 위한 사후 분석은 Tukey로 검증하였으며, $P < 0.05$ 일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었다.

[0114] **실시예 5. 제브라피시 췌장도 크기 변화 측정 결과**

[0115] 퀘르세틴, 아스트라갈린, 이소퀘르세틴, 루틴 및 이들의 혼합물의 항당뇨 효과를 확인하기 위해 도 9에 나타난 제브라피시 췌장도의 크기 변화를 측정하여 도 10에 나타내었고, 하기 식을 이용하여 췌장도 크기의 증가 및 감소를 분석하였다.

[0116] 알록산 처리 그룹 췌장도 크기 감소 %

[0117] =(알록산 처리 그룹 췌장도 크기 - 정상그룹 췌장도 크기)/정상그룹 췌장도 크기 X 100

[0118] 약물 처리군 그룹 췌장도 크기 증가 %

[0119] =(약물 처리 그룹 췌장도 크기 - 알록산 처리 그룹 췌장도 크기)/알록산 처**리** 그룹 췌장도 크기 X 100

[0120] 먼저, 알록산에 노출된 제브라피시는 알록산을 처리하지 않은 제브라피시에 비해 40.9% 췌장도 크기가 감소하여 췌장도가 손상된 것을 확인하였고, 손상된 췌장도를 항당뇨 물질로 알려진 지메피리드에 노출시킨 결과, 지메피리드는 감소된 췌장도 크기를 25.3% 증가시킴을 확인하였다.

[0121] 이에 비해 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 그룹에서는 퀘르세틴(22.3%) 또는 루틴(11.3%)을 각각 처리한 경우보다 매우 높은 약 36.5%의 췌장도 크기 증가를 나타내었다(도 10). 이는 시판되는 당뇨병 치료제인 지메피리드에 버금가는 효과였다.

[0122] 반면 이소퀘르세틴 및 퀘르세틴 혼합물을 처리한 그룹에서는 약 20.1%(도 12), 이소퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 그룹에서는 약 16.1%(도 13)의 췌장도 크기 증가를 보였으나, 이는 이소퀘르세틴(25.46%) 또는 퀘르세틴(22.3%) 각각을 처리한 경우보다 낮은 수치였다.

[0123] 이러한 결과는 이소퀘르세틴 및 퀘르세틴, 또는 이소퀘르세틴 및 루틴은 혼합하더라도 오히려 각각의 화합물보다 췌장도 크기 증가 효과가 낮아, 당뇨병 치료효과가 오히려 저해됨을 시사하는 것이다. 반면, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 췌장도 크기 증가에 시너지적인 현저한 효과를 가짐을 확인한바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0124] 또한, 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 그룹에서는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 또는 루틴을 각각 처리하거나, 이소퀘르세틴 및 퀘르세틴 혼합물, 이소퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 경우보다 매우 높은 약 45.8%의 췌장도 크기 증가를 나타내었다(도 10).

[0125] 이를 통해 이소퀘르세틴 및 퀘르세틴 혼합물, 또는 이소퀘르세틴 및 루틴 혼합물과 달리 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 췌장도 크기 증가에 시너지적인 현저한 효과를 가짐을 확인한바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0126] **실시예 6. 제브라피시 췌장도 세포 내 글루코스 수치 분석 결과**

[0127] 실시예 4에서 세포 내 글루코스 수치를 분석하기 위해 형광 염색 강도를 측정하여 하기 식을 통해 분석한 형광

염색 강도 변화를 도 11에 나타내었다.

[0128] 알록산 처리 그룹 형광 염색 강도 변화 %

[0129] =(알록산 처리 그룹 췌장도 형광값 - 정상 그룹 췌장도 형광값)/정상그룹 췌장도 형광값 X 100

[0130] 약물 처리군 형광 염색 강도 변화 %

[0131] =(약물 처리 그룹 췌장도 형광값 - 알록산 처리 그룹 췌장도 형광값)/알록산 처리 그룹 췌장도 형광값 X 100

[0132]

[0133] 그 결과, 알록산에 노출된 제브라피시는 알록산을 처리하지 않은 제브라피시(정상 그룹)에 비해 형광 염색 강도가 감소한 것을 확인하였고, 알록산 양성 대조군인 지메피리드의 경우, 알록산 처리 그룹에 비해 형광 염색 강도가 49.4% 증가한 것을 확인하였다.

[0134]

[0135] 한편, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 그룹에서는 퀘르세틴 또는 루틴을 각각 처리한 경우보다 매우 높은 형광 염색 강도 증가를 나타내었다.

[0136] 이를 통해 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 형광 염색 강도 증가에 시너지 효과를 가짐을 알 수 있었다. 그러므로, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 손상된 췌장도의 세포내 글루코스 수치 증가에 시너지적인 현저한 효과를 가진바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0137] 또한, 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 그룹에서는 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 또는 루틴을 각각 처리하거나, 이소퀘르세틴 및 퀘르세틴 혼합물, 이소퀘르세틴 및 루틴 혼합물, 또는 퀘르세틴 및 루틴 혼합물을 처리한 경우보다 매우 높은 형광 염색 강도 증가를 나타내었다(도 11).

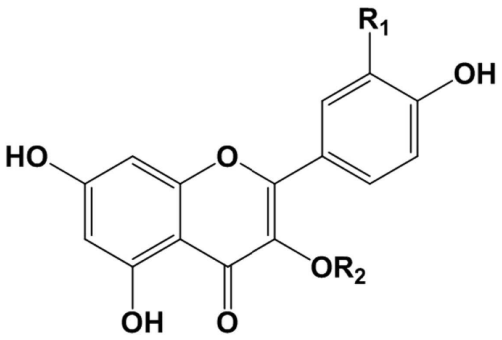
[0138] 이를 통해 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 형광 염색 강도 증가에 시너지 효과를 가짐을 알 수 있었다. 그러므로, 이소퀘르세틴, 퀘르세틴 및 루틴 혼합물은 손상된 췌장도의 세포내 글루코스 수치 증가에 시너지적인 현저한 효과를 가진바, 당뇨병 예방, 치료 및 개선에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0139] 이에 비해 퀘르세틴 처리 그룹은 33.5%, 이소퀘르세틴 처리 그룹은 32.6%, 루틴 처리 그룹은 22.4%의 형광 염색 강도 증가를 나타냈다. 아스트라가린 처리 그룹은 형광 염색 강도가 4.22% 증가하여 유의적인 증가율을 나타내지 않았다.

[0140] 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 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 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.

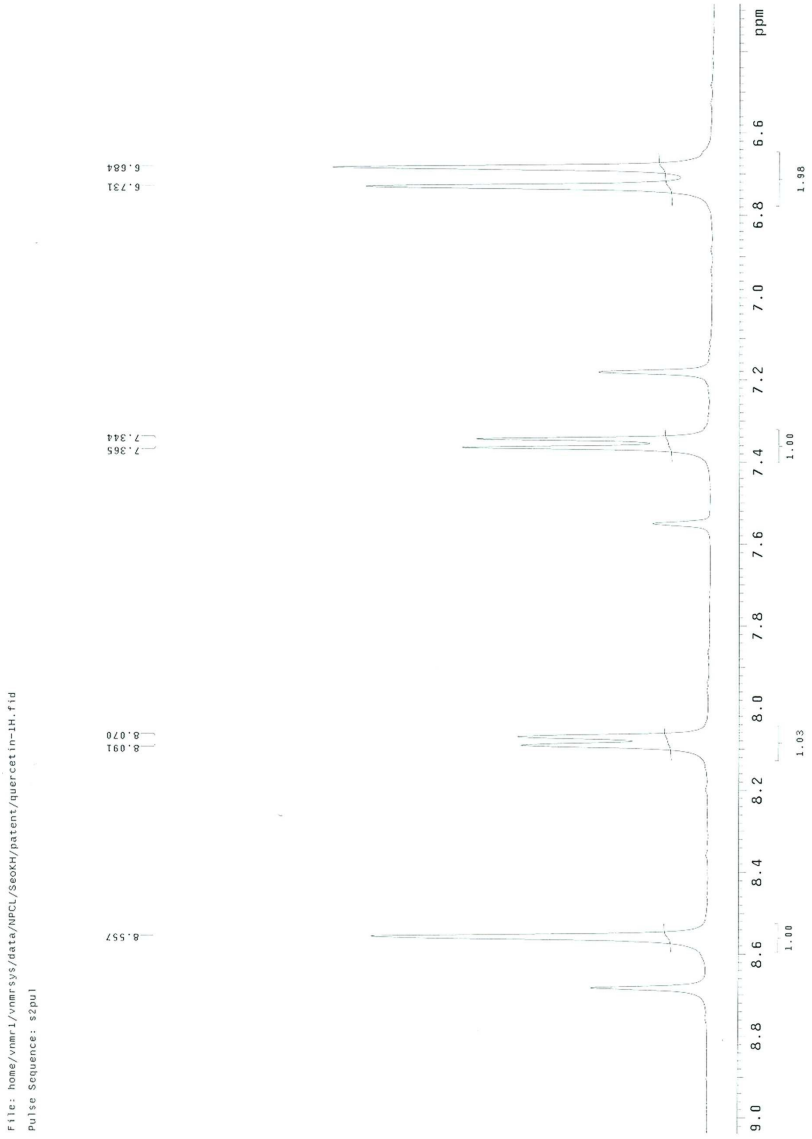
도면

도면1

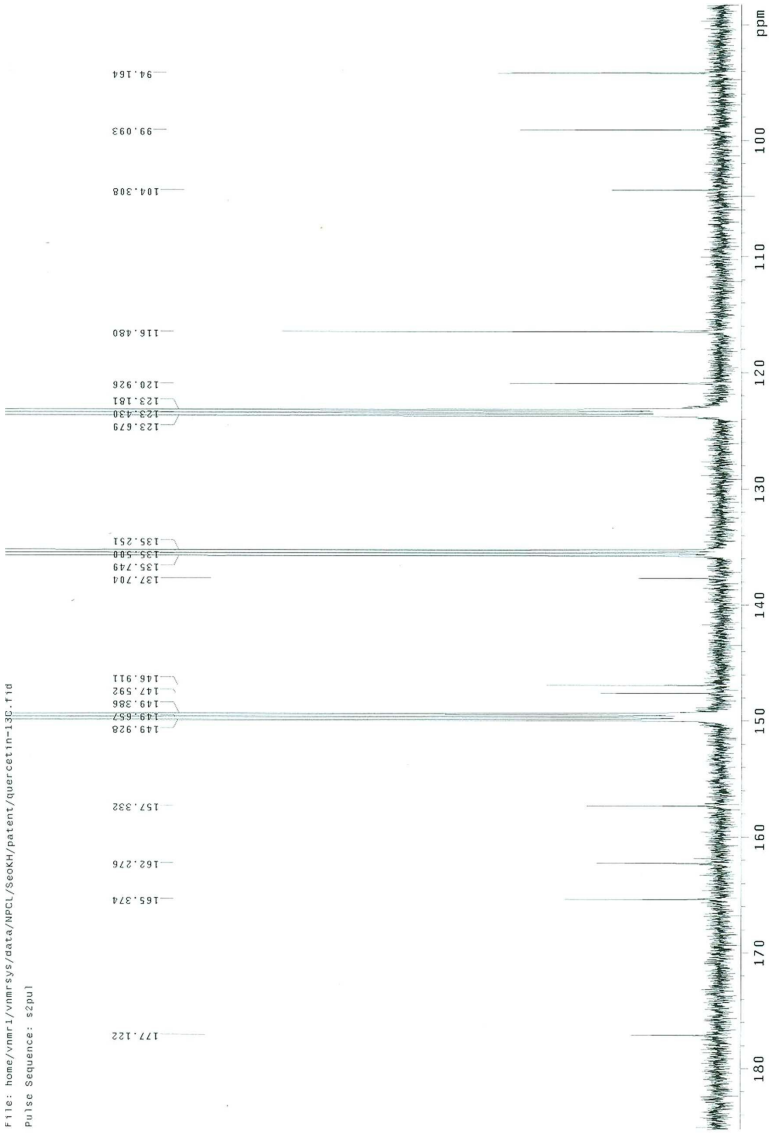


	1	2	3	4
R_1	OH	H	OH	OH
R_2	H	glc	glc	glc(1→6)rhm

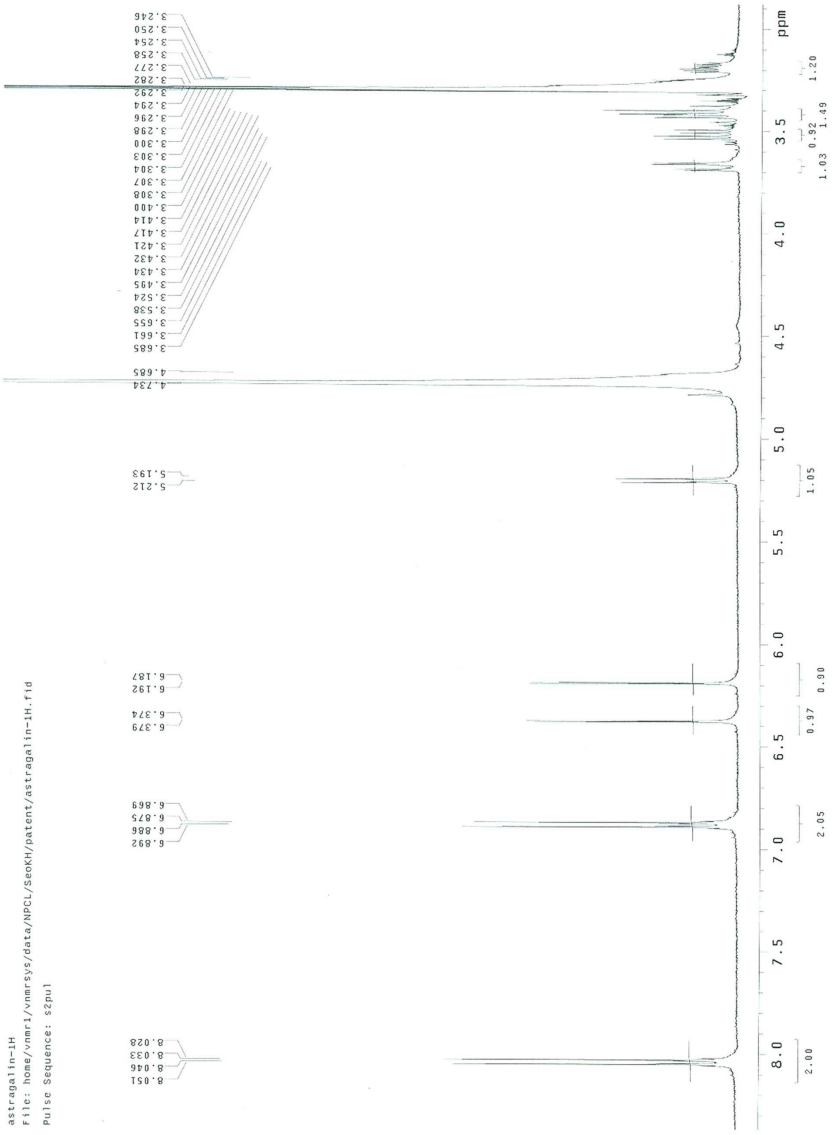
도면2


File: home/vnmrsys/data/NPCL/SeoKH/patent/quercetin-1H.fid
Pulse Sequence: s2pul
8.557
8.091
8.070
7.365
7.344
6.731
6.684
ppm
9.0
8.8
8.6
8.4
8.2
8.0
7.8
7.6
7.4
7.2
7.0
6.8
6.6
1.00
1.03
1.00
1.00
1.98

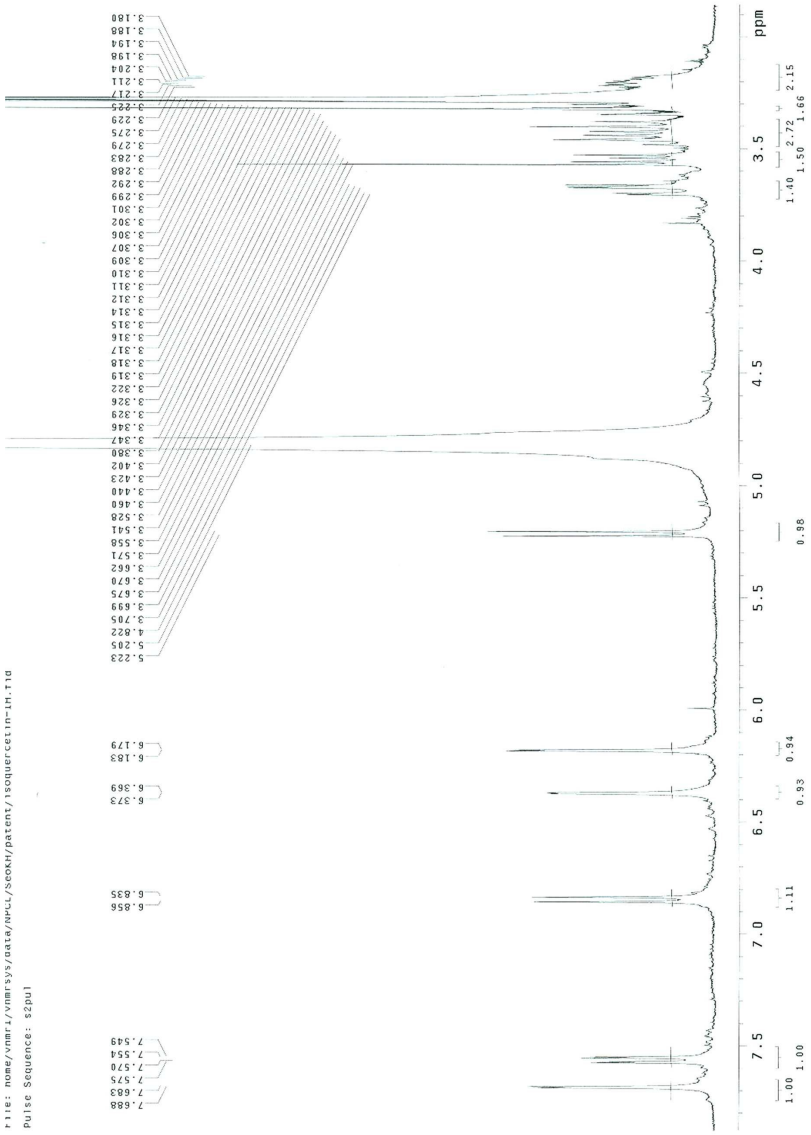
도면3


94.164
99.093
104.308
116.480
120.926
123.161
123.430
123.679
135.251
135.500
135.749
137.704
146.911
147.592
149.386
149.657
149.928
157.332
162.276
165.374
177.122
ppm
100
110
120
130
140
150
160
170
180
File: home/vnmrsys/data/NPCL/SeoKH/patent/quercetin-13C.fid
Pulse Sequence: s2pul

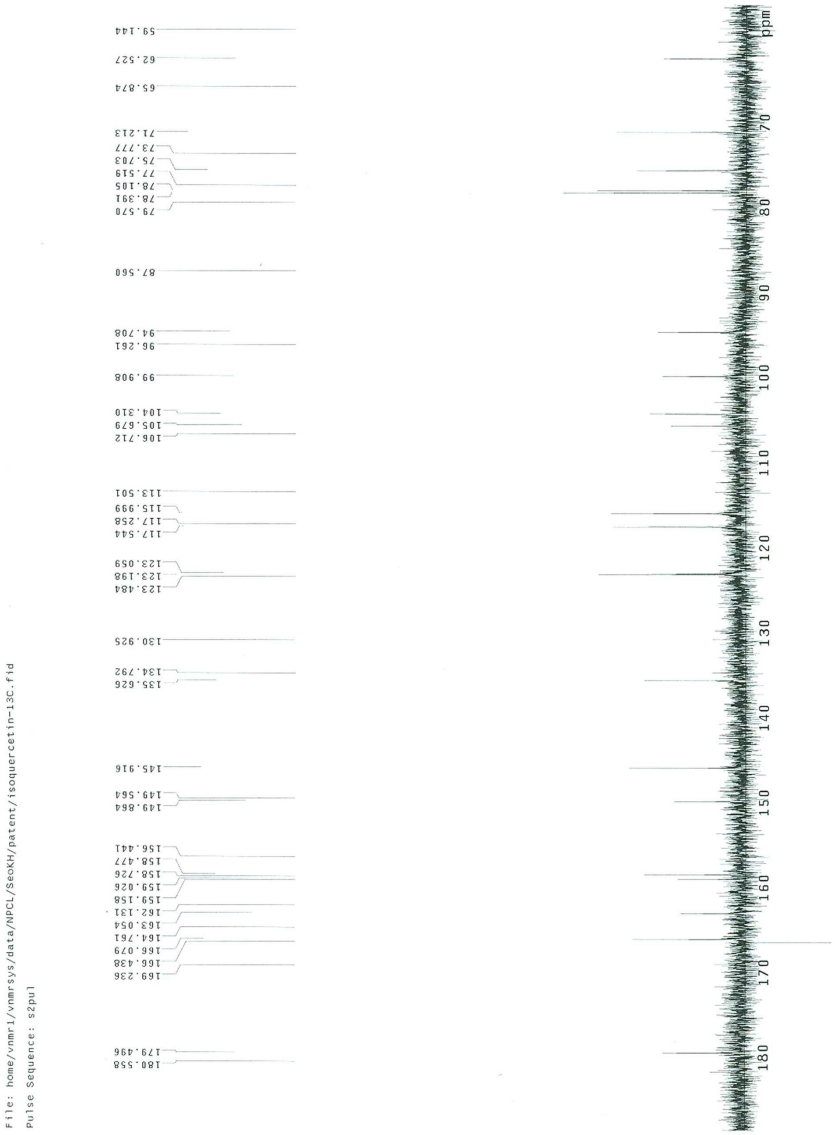
도면4


astragalin-1H
File: home/vnmr1/vnmrsys/data/NPCL/SeoKH/patent/astragalin-1H.fid
Pulse Sequence: s2pul
ppm

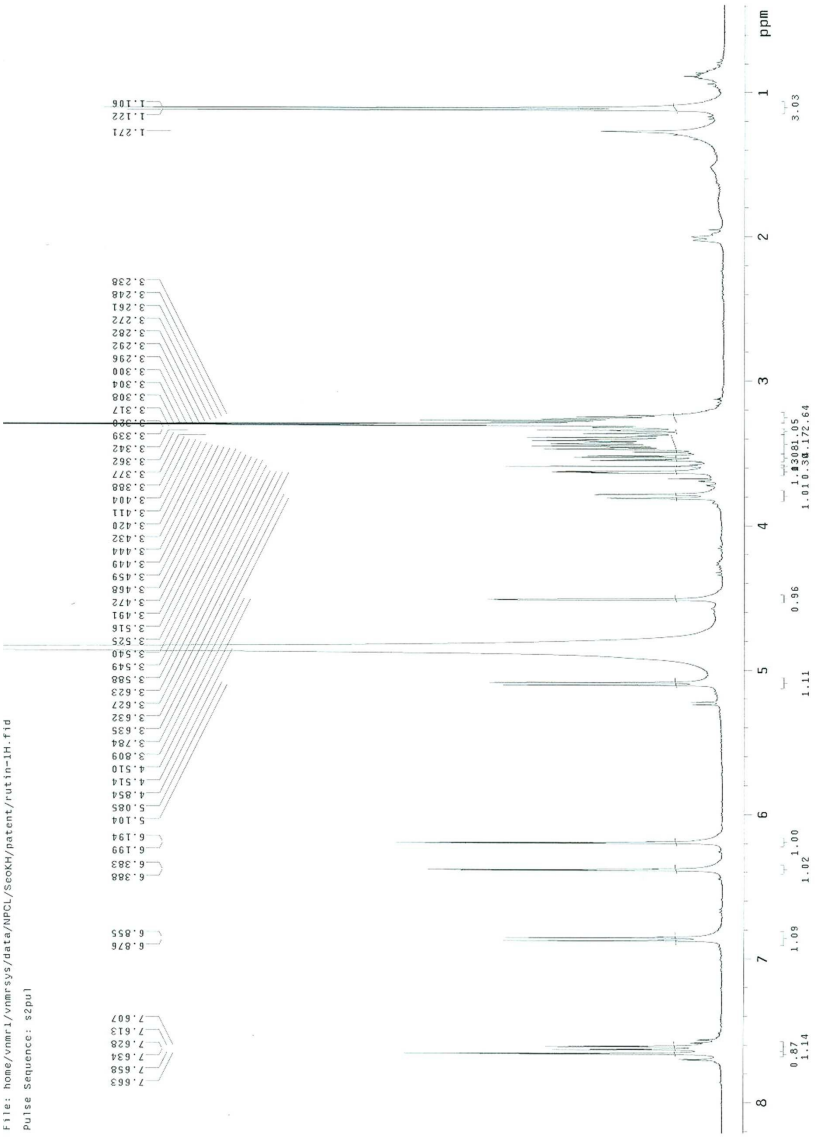
도면5


File: nome/vnmrsys/data/NMLL/SeoKH/patent/isoquercetin-1H.fid
Pulse Sequence: s2pul
ppm

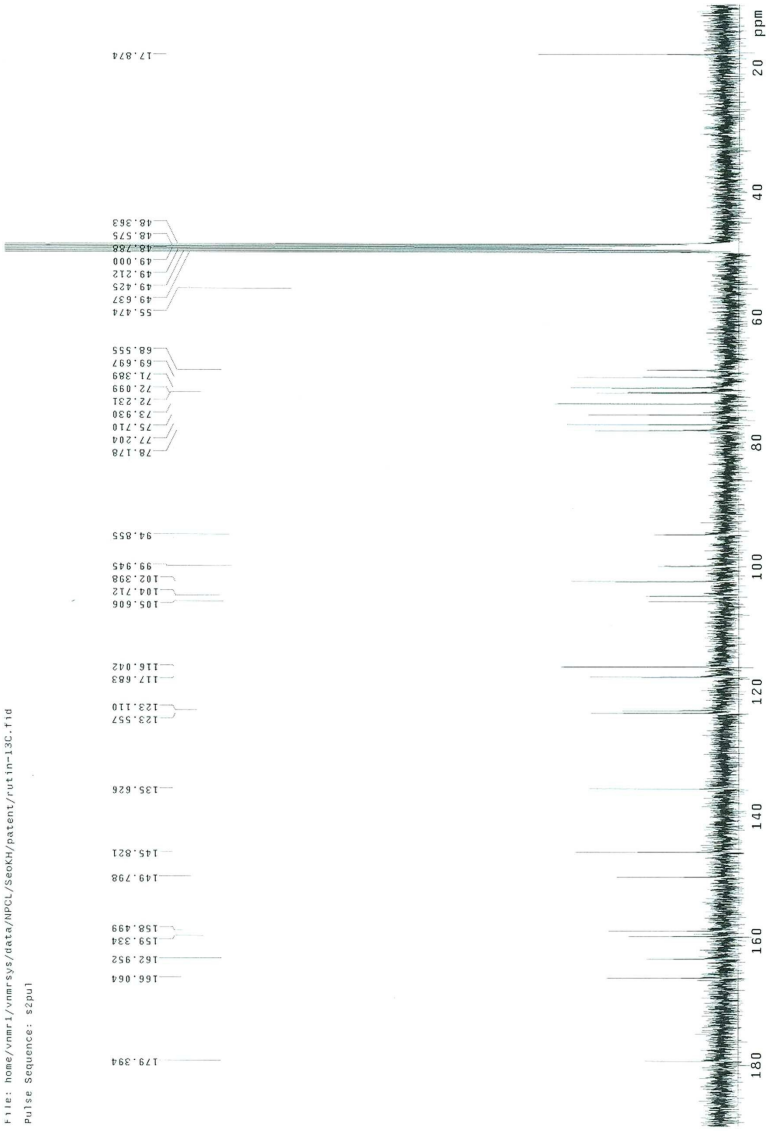
도면6


59.144
62.527
65.874
71.213
73.777
75.703
77.519
78.185
78.391
79.570
87.560
94.708
96.261
99.908
104.310
105.679
106.712
113.501
115.999
117.258
117.544
123.059
123.198
123.484
130.925
134.792
135.626
145.916
149.564
149.864
156.441
158.477
158.726
159.026
159.158
162.131
163.054
164.761
166.079
166.438
169.236
179.496
180.558
ppm
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
File: home/ynmr1/ynmrsys/data/NPCL/SeoKH/patent/isoquercetin-13C.fid
Pulse Sequence: s2pul

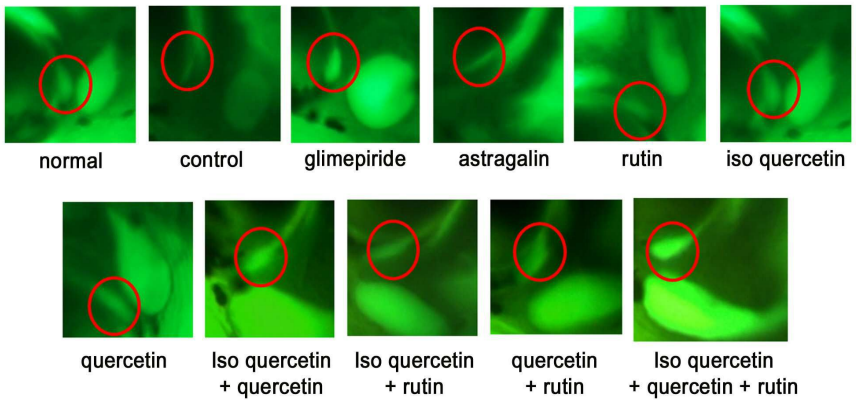
도면7


File: home/vnmrs1/vnmrsys/data/NPCL/ScoKH/patent/rutin-1H.fid
Pulse Sequence: s2pul
ppm

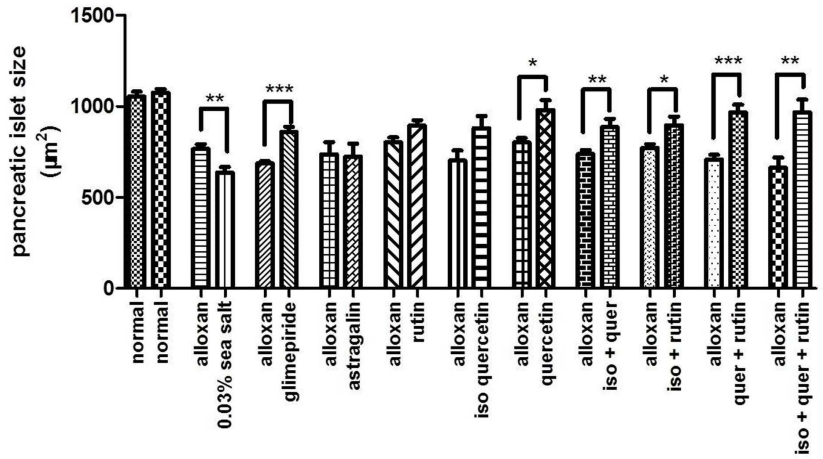
도면8


ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
File: home/vnmr1/vnmrsys/data/NPCL/SeoKH/patent/rutin-13C.fid
Pulse Sequence: s2pul

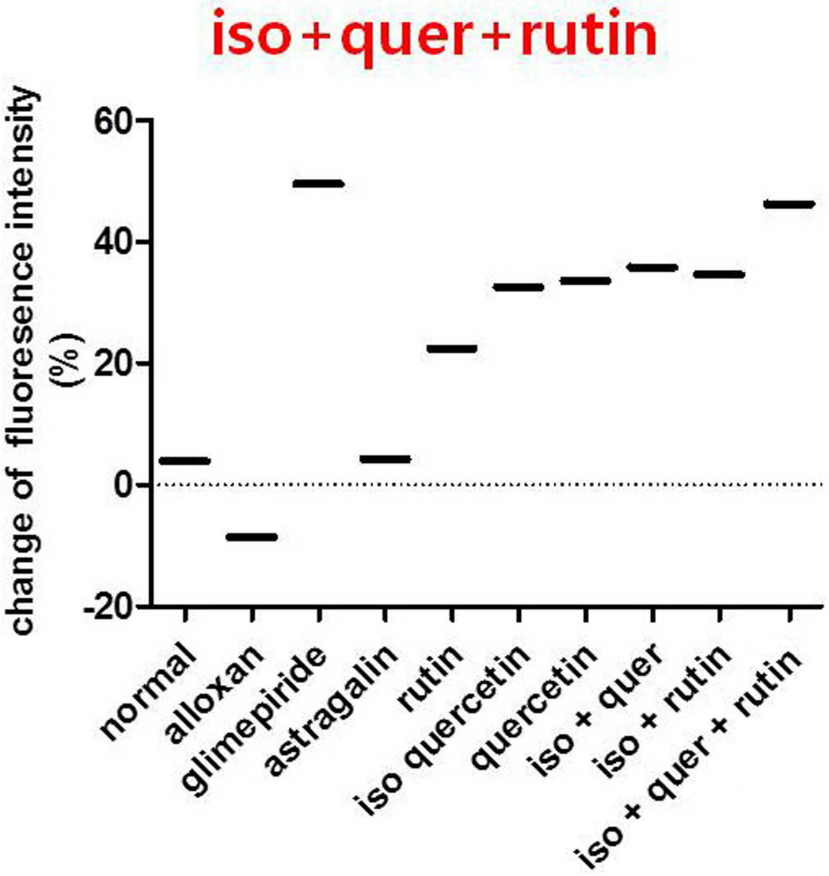
도면9


normal
control
glimepiride
astragalin
rutin
iso quercetin
quercetin
Iso quercetin + quercetin
Iso quercetin + rutin
quercetin + rutin
Iso quercetin + quercetin + rutin

도면10


pancreatic islet size (μm²)
1500
1000
500
0
**
***
*
**
*
***
**
normal
normal
alloxan
0.03% sea salt
alloxan
glimepiride
alloxan
astragalin
alloxan
rutin
alloxan
iso quercetin
alloxan
quercetin
alloxan
iso + quer
alloxan
iso + rutin
alloxan
quer + rutin
alloxan
iso + quer + rutin

도면11


iso+quer+rutin
change of fluoresence intensity (%)
60
40
20
0
-20
normal
alloxan
glimepiride
astragalin
rutin
iso quercetin
quercetin
iso + quer
iso + rutin
iso + quer + rutin