(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0087422
(43) 공개일자 2011년08월03일

(51) Int. Cl.
A61K 36/28 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0006836
(22) 출원일자 2010년01월26일
심사청구일자 2010년01월26일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102동 401호
김진규
강원도 춘천시 퇴계동 퇴계뜨란채아파트 1005동 1103호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 까실쑥부쟁이 추출물을 포함하는 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 까실쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 상기 까실쑥부쟁이 추출물은 항산화 활성과 알도스 환원효소 억제활성 및 최종당화산물 억제작용이 우수한 것으로 확인되었을 뿐만 아니라, 천연물 추출물이므로 부작용과 안전성 관련 문제가 거의 없으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 약학 조성물 또는 건강 기능성 식품 조성물은 당뇨합병증의 치료, 예방 또는 개선을 위하여 사용될 수 있다.

(72) 발명자

이연실

강원도 춘천시 후평2동 포스코더샵아파트 103동 805호

강일준

강원도 춘천시 퇴계동 주공2차아파트 209동 403호

신현경

서울 성북구 안암동 1가 361번지 래미안 안암아파트 104동 602호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명 지식경제부

연구관리전문기관

연구사업명 지역혁신센터(RIC)사업

연구과제명 인삼 및 기능성 소재를 이용한 혈당조절 소재개발

기여율

주관기관 한림대학교

연구기간 2009년 03월 01일 ~ 2010년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

까실쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 까실쑥부쟁이 추출물은 까실쑥부쟁이 잎을 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 추출한 것인 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 당뇨합병증은 당뇨성 망막증, 당뇨성 백내장, 당뇨성 각막증, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증, 당뇨성 말초신경장해, 아테롬성 동맥경화 및 당뇨성 혈관합병증으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나인 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 4

까실쑥부쟁이 잎을 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 추출한 까실쑥부쟁이 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 개선 또는 예방용 식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 당뇨합병증 치료 또는 예방효과가 있는 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당뇨병은 인슐린의 부족으로 혈액 중의 포도당 즉, 혈당이 정상인보다 그 농도가 높아져서 소변에 포도당을 배출하는 만성질환으로서, 췌장 내 랑게르한스 섬의 β-세포에서 비정상적인 인슐린 대사과정 또는 인슐린의 이상 생리활성에 의해 발병되는 대표적인 성인병의 하나이다. 선진국의 경우에 당뇨병 환자 수가 매년 급증하고 있고, 우리나라도 생활수준의 향상과 더불어 생활양식이 서구화되면서 점차로 당뇨병 환자 수가 증가하고 있다. 최근에는 전체 인구의 약 5% 정도 또는 최소한 250만명 정도가 당뇨병 환자로 추정되고 있고, 당뇨병이 한국인의 사망요인 중 4위에 이르고 있는 실정이다.

[0003] 당뇨병에 의해 체내 고혈당환경이 장기간 계속 되는 경우, 고혈당에 의한 높은 삼투압 스트레스가 유발되거나 신장, 신경, 망막과 전신의 크고 작은 혈관에 당화산물이 침범함으로써 다양한 합병증이 유발될 수 있고, 당뇨병 그 자체보다 당뇨병에 의해 유발되는 합병증의 위험성이 더욱 크기 때문에, 오늘날에는 당뇨병 자체의 치료보다 당뇨병에 의한 합병증(당뇨합병증)의 유발이나 진행을 억제, 예방 또는 개선하기 위한 노력이 증대되고 있는 실정이다. 당뇨합병증은 당뇨병이 오래 지속되어 나타나는 질환으로, 보통 당뇨병이 발병한지 10년 내지 15년을 경과한 후에 생기는 만성 합병증이 주이며, 만성 합병증의 종류로는 당뇨성 망막증, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증 등을 포함한 다양한 질환이 보고되어 있다.

[0004] 당뇨합병증은 당뇨병에 의해 체내 혈당량이 높아진 상태가 장기간 계속됨으로써 당화산물이 신장, 신경, 망막과 전신의 크고 작은 혈관들을 침범하면서 발병하는 질병으로, 일 예로 성인 실명의 가장 큰 발병 원인인 당뇨병성 망막병증 등이 있다. 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) 등이 보고되고 있다.

[0005] 상기 폴리올 경로는 포도당 대사경로의 하나로, 이는 포도당이 소르비톨을 거쳐 과당으로 변환되는 경로로 두 개의 반응계로 구성되며, 2종의 효소가 관여한다.

[0006] 보다 구체적으로, 폴리올은 알도스(aldose)나 케토스(ketose)로부터 알도스 환원효소(aldose reductase; AR)에 의해 환원된 알코올을 의미하며, 일반적으로 포도당이 세포 내로 들어오게 되면 헥소키나제에 의하여 6-인산포도당으로 전환된 다음 해당경로를 거쳐 분해된다.

[0007] 포도당의 농도가 증가하는 경우 이에 결합하는 헥소키나제가 포화되어 여분의 포도당은 헥소키나제에 비하여 친화성이 낮은 알도스 환원효소에 결합하여 소르비톨로 합성됨으로써 세포 내에는 소르비톨이 축적된다. 소르비톨의 경우 극성이 높아 세포막 외로 확산이 어렵기 때문에 세포 내에 축적되게 된다.

[0008] 상기 소르비톨 합성과정에는 알도스 환원효소와 소르비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase)의 두 효소가 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 효소들은 말초신경, 망막, 각막, 홍채, 수정체, 신장, 적혈구 등의 신체 각 조직에 존재하며, 특히 알도스 환원효소는 망막, 공막, 렌즈, 신장, 적혈구, 뇌, 근육, 간 및 말초신경 등에 존재한다.

[0009] 상기 알도스 환원효소는 소르비톨 합성과정의 첫 반응을 일으키는 효소로서 NADPH를 조효소로 이용하여 포도당(glucose)를 소르비톨로 전환시켜 주는 반응제어 효소(rate limiting enzyme)이다. 일단 소르비톨이 생성되면 소르비톨 탈수소효소에 의해 소르비톨은 과당(fructose)으로 전환된다.

[0010] 생리학적 조건하에서는 이 두 효소에 의한 합성의 흐름은 대부분의 조직에서는 서로 평형을 이루고 있다. 따라서, 대부분의 조직에서는 소르비톨의 축적량이 거의 무시될 정도이며, 포도당에 대한 알도스 환원효소의 친화력은 헥소키나제(hexokinase)보다 더 낮고 대부분의 세포 내 포도당은 인산화되기 때문에 소르비톨의 생성속도는 낮아지게 된다. 그러나, 당뇨병 환자의 경우에 있어서 혈액 내의 포도당의 농도가 더 증가하게 되면 알도스 환원효소가 활성화되어 과도하게 포도당을 소르비톨로 환원시키고, 상기 알도스 환원효소에 의해 과도하게 생성된 소르비톨이 소르비톨 탈수소효소에 의해 과당으로 전환되며, 상기 과당은 포도당에 비하여 단백질의 비효소적 당화반응의 속도가 약 10배 정도 빠르기 때문에, 고농도의 과당이 단백질과 결합하여 결국은 최종당화산물(advanced glycosylation end-product, AGE)의 형성을 가속화시킨다.

[0011] 특히, 이러한 최종당화산물의 생성은 포도당 투과가 인슐린에 의해 영향을 받지 않는 말초신경 등에서 더욱 문제가 될 수 있다. 상기 말초신경을 포함한 세포 내 포도당의 흡수가 인슐린에 의존하지 않는 조직에서 포도당의 세포막투과는 세포 밖에 존재하는 포도당 농도에 의존하므로, 당뇨병에서 고혈당상태가 지속되면 말초신경, 수정체, 망막, 각막, 혈관, 신사구체 또는 적혈구 등의 인슐린 비의존성 조직의 세포 내 포도당 농도는 상승하고, 이들 조직의 세포 내에 다량 존재하는 폴리올 경로의 필수효소인 알도스 환원효소에 의하여 포도당의 대상가 항진되어 소르비톨이 과다 축적되면, 이로 인하여 삼투압이 증가하고, 이로 인하여 수초(myelin sheath)의 부종, 괴사 및 붕괴가 발생할 수 있으며, 지속적인 삼투압 증가로 인하여 삼투 조절 체계가 교란되어 수분이 인입됨으로써 당뇨합병증이 진행될 수 있다. 상기 당뇨합병증은 소르비톨이 축적되는 부위에 따라, 당뇨성 백내장, 당뇨성 망막증, 당뇨성 각막증, 당뇨성 신경증, 당뇨성 신증 등이 있다.

[0012] 또한, 상기 알도스 환원효소의 활성화는 산화스트레스를 악화시켜 세포 내 미요이노시톨과 타우린의 결핍을 초래하기도 하다. 이는 산화스트레스가 Na^+-myoinositol cotransporter와 taurien transporter를 직접 하향 조절하거나 sodium-potassium adenosine triphosphatase(ATPase)에 의한 sodium-경사의 방해를 통해 간접적으로 작용해서 미요이노시톨의 세포 내 결핍을 초래한다. 이는 수정체 및 말초신경 등 비교적 고농도의 소르비톨이 축적되는 조직의 합병증 유발기전으로 유력하다.

[0013] 이들 조직에서는 소르비톨의 농도가 높음에도 불구하고 지속적으로 알도스 환원효소를 발현하여 소르비톨의 축적을 더욱 진행시키게 된다. 따라서, 신경조직 내에서는 다양한 대사과정의 변이, 전기생리학적 변화, 신경조직에서의 에너지 소비의 감소, 신경조직에서의 변화 등이 일어나게 된다. 또한, 알도스 환원효소와 소르비톨 탈수소화효소에 의해 소르비톨과 과당의 축적에 의해 야기된 삼투압의 증가가 수정체 섬유세포(lens fiber) 내로 수분 유입을 촉진시켜, 세포 팽창(swelling)을 초래한다.

[0014] 이는 수정체 내 정상적으로 보유되어지고 있는 물질에 대한 투과성을 증가시켜, 수정체 내에 K^+, 아미노산(amino acid), 글루타치온(glutathione), 이노시톨(inositol) 및 ATP의 농도가 감소되는 반면, Na^+ 및 Cl^- 이온의 농도는 서서히 증가하게 된다. 이 과정이 진행됨에 따라 증가된 두 이온이 전해질 변화를 초래하게 되어 이차적 삼투변화를 야기시켜 결국 수정체 팽화를 일으킨다. 이러한 삼투변화에 의해, 수정체의 세포막은 일정 크기 이상의 큰 단백질을 제외한 거의 대부분 물질에 대한 투과성이 증가되어, 결국 핵경화 백내장(dense nuclear cataract)이 초래된다.

[0015] 상기한 바와 같이, 수정체에서 정상에 비하여 낮은 K^+/Na^+ 비율은 단백질 합성을 저하시킬 수 있으므로, K^+/Na^+ 비율은 당뇨합병증의 지표가 될 수 있다. 또한, 적혈구 내의 당대사관련 대사물질(sorbitol) 및 매개체인 효소들의 농도는 간적접인 당뇨합병증의 진행 지표가 될 수 있다. 임상연구보고에 의하면, 적혈구 내의 소르비톨의 함량이나 적혈구 내의 소르비톨 함량/혈장 내의 글루코스 함량의 농도비는 정상인과 비교하여 당뇨병 환자군에서 유의적으로 높게 나와, 이들 지표를 당뇨병의 진단 방법으로 이용할 수 있을 것으로 보고되었다.

[0016] 당뇨합병증 중 하나인 상기 당뇨망박병증 또는 핵경화 백내장은 소르비톨의 세포 내 축적이 주요 원인인 것으로 알려져 있다. 특히, 인슐린 비의존성 당뇨환자의 경우에는 당뇨망막병증의 진행은 상기 적혈구 내 소르비톨의 함량치 보다는 상기 비정상적인 소르비톨 고농도의 지속기간이 더 큰 영향을 미치므로, 당뇨환자의 소르비톨 함량이 정상치보다 높은 시기에 알도스 환원효소 억제제를 조기 사용하는 것이 당뇨망막병증의 예방 및 치료에 효과적일 수 있다는 임상연구가 보고되었다.

[0017] 또한, 상기 최종당화산물은 사람의 미세혈관 내피세포에서 폴리올 경로의 주효소인 알도스 환원효소를 활성화시키는 것으로 보고되고 있다. 일반적으로, 정상상태에서는 알도스 환원효소가 포도당에 대하여 친화력이 매우 낮지만, 고농도의 포도당에서는 알도스 환원효소가 활성화되어 과도하게 포도당을 소르비톨로 환원시키고, 상기 소르비톨이 소르비톨탈수소효소에 의해 과당으로 전환된다. 상기한 바와 같이, 상기 과당은 포도당에 비하여 단백질의 비효소적 당화반응(nonenzymatic glycation of protein)의 속도가 약 10배 정도 빠르기 때문에, 고농도의 과당이 단백질과 결합하여 결국은 최종당화산물의 형성을 가속화시킨다.

[0018] 상기 단백질의 비효소적 당화반응이란, 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당이 효소 작용 없이 축합반응 즉 밀리아드 반응을 수행하는 것으로, 상기 반응의 결과로 최종당화산물이 생성된다.

[0019] 상기 단백질의 비효소적 당화반응은 1) 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당의 알데히드 또는 케톤이 효소 작용 없이 친핵성 첨가 반응을 하여 초기 단계 산물인 쉬프염기(schiff base)를 형성하고, 상기 쉬프염기와 인접한 케토아민 어닥트(ketoamine adduct)가 서로 축합하여 가역적인 아마도리형의 조기당화산물이 생성되는 단계와 2) 고혈당 상태가 지속되어 가역적인 아마도리형의 조기당화산물이 분해되지 않고 재배열(rearrangement)되어, 단백질과 교차결합(cross-linking)함으로써 비가역적인 최종당화산물이 생성되는 단계로 나눌 수 있다.

[0020] 상기 가역적인 반응의 산물인 아마도리형의 조기당화산물과 달리 최종당화산물은 비가역적인 반응 산물이므로, 일단 생성되면 혈당이 정상으로 회복되어도 분해되지 않고 단백질 생존기간 동안 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시킨다. 이처럼 비효소적 단백질 당화반응에 의하여 기저막, 혈장 알부민, 수정체 단백질, 피브린, 콜라겐 등의 단백질에서 당화가 일어나면, 생성된 최종당화산물은 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시켜 당뇨성 망막병증(retinopathy), 당뇨성 백내장(cataract), 당뇨성 신증(nephropathy), 당뇨성 신경병증(Neuropathy) 또는 아테롬성 동맥경화 등의 만성 당뇨합병증을 유발시킬 수 있다.

[0021] 또한, 고혈당에 의한 산화 손상의 증가 또는 산화적 스트레스(oxidative stress)는 고혈당이 유리 산소 라디칼의 생성을 증가시키거나 항산화 기전을 감소시켜 발생하는데, 그 기전은 매우 다양하고, 포도당의 자가 산화(autooxidation)의 증가에 의한 유리 라디칼의 증가, 비효소적 당화 및 이에 의한 자가 산화의 증가, 폴리올 경로의 활성화에 따른 레독스 상태의 변화 등이 관여할 것으로 여겨지고 있다.

[0022] 상기 포도당의 자가 산화란 포도당 스스로 이놀화(enolize)되면서 산소분자를 환원시키고, 산화물질들을 만드는 것을 의미한다. 상기 포도당의 자가 산화의 증가에 의한 유리 라디칼의 생성과 관련하여, 하기와 같은 문제점들이 예상된다. 고혈당에 의해 상기 포도당의 자가 산화가 진행되면, 이 때 형성되는 슈퍼옥사이드 이온(O^{2-}), 하이드록시 라디칼(OH), 과산화수소(H_2O_2) 등이 형성되고, 이들은 교차결합, 분절화 등에 의해 지질과산화 현상을 일으키거나 단백질에 손상을 입히는 것으로 보고되어 있다. 또한, 유리 라디칼은 최종당화산물의 형성을 촉진시키고, 이렇게 형성된 최종당화산물은 다시 자가산화를 촉진시킬 수 있는 것으로 보고되어 있다.

[0023] 이와 같이 폴리올 경로, 비효소적 당화반응 및 산화적 스트레스 작용 기전들이 서로 연관되어 당뇨합병증을 유발시킨다. 그러므로, 당뇨합병증의 발병을 지연하거나 예방 또는 치료하기 위해서는 단순히 혈당량을 조절하는 것만으로는 부족하고, 알도스 환원효소 및 최종당화산물의 형성을 억제하는 것이 매우 중요하다. 따라서, 단순히 혈당을 낮추는 혈당 조절 효과를 강조하던 기존 당뇨합병증 치료 또는 예방용 치료제에 대한 연구에서 최근에는 알도스 환원효소 및 최종당화산물의 형성을 억제하는 것을 목적으로 하는 당뇨합병증 치료 또는 예방용제의 개발을 위한 연구가 진행되고 있다.

[0024] 지금까지 보고된 알도즈 환원효소 저해제로는 sorbinil, alrestatin, epalrestat, ponalestat, tolrestat이 있으며, 단백질 당화 억제제로는 아미노구아니딘·HCl(aminoguanidine·HCl)이 대표적이다. 상기 알도스 환원효소 저해제는 알도즈 환원효소에 결합하므로 포도당을 소르비톨로 전환시키는 것을 저해함으로써, 미요이노시톨의 감소와 sodium-potassium ATPase의 손상을 막으며, 포도당과 상호작용하는 위치와는 다른 위치에서 알도즈 환원효소와 반응하여 알도즈 환원효소에 대한 비경쟁적 저해반응(noncompetitive inhibition)을 일으킨다. 또한, 상기 아미노구아니딘은 친핵성 드라진(hydrazine)으로 아마도리 산물과 결합하여 단백질과의 교차결합을 방지함으로써 최종당화산물의 생성을 억제하여 합병증으로 진전되는 것을 지연 또는 방지할 수 있다.

[0025] 상기 알도스 환원효소 저해제 및 단백질 당화 억제제를 포함한 많은 종류의 저해제들이 개발되어 합성되어 오고 있지만 장기간 투여시 독성이 유발되는 문제점이 있어 보다 안전한 새로운 저해제에 대한 탐색 및 개발이 요망되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0026] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 알도스 환원효소를 저해하고, 최종 당산화물의 생성 및 소르비톨의 생성을 억제하며, 항산화 작용에 의한 산화적 스트레스를 조절할 수 있을 뿐만 아니라, 부작용이 문제되지 않는 천연물 유래 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0027] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 천연물 즉, 식물 유래 유효성분을 포함하는 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명은 까실쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명의 발명자들은 상기 까실쑥부쟁이 잎 추출물은 ABTS 자유라디칼 소거활성 및 DPPH 소거활성을 통하여 확인한 결과 항산화 효과가 인정되고, 알도스 환원효소 억제능이 우수하며, 최종당화산물 생성 억제능 및 적혈구 내에서 소르비톨 생성 억제능이 현저하게 뛰어난 것을 확인하여, 당뇨합병증의 치료, 개선 또는 예방 효과가 우수한 것으로 판명되었을 뿐만 아니라, 천연물로부터 유래된 것으로 부작용이 문제될 가능성도 낮다는 것을 확인하여, 이를 토대로 본 발명을 완성하였다.

[0029] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0030] 본 발명은 까실쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

[0031] 상기 까실쑥부쟁이(*Aster ageratoides*)는 초롱꽃목 국화과 여러해살이풀로 곰의수해라고도 한다. 산과 들에서 자라고, 높이 약 1m까지 자란다. 뿌리에 달린 잎과 줄기 밑 부분의 잎은 꽃이 필 때 진다. 줄기에 달린 잎은 어긋나며 긴 바소꼴로 끝이 뾰족하다. 꽃은 두상화로 8월 내지 10월에 줄기 끝에서 자주색 또는 연보라색으로 피며, 열매는 수과이며 11월에 익는다. 어린 순을 나물로 먹으며 한국 전역에 분포되어 있다.

[0032] 상기 까실쑥부쟁이 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 까실쑥부쟁이의 잎, 꽃, 뿌리, 열매 또는 줄기나 이의 분쇄물, 바람직하게는 까실쑥부쟁이의 잎에 추출용매를 가함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다.

[0033] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 희석수, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 상기 극성용매와 비극성용매의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 희석수는 알콜을 50 내지 99.9%(v/v)로 물에 희석한 것일 수 있다.

[0034] 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 희석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 75 내지 99% 에탄올 수용액일 수 있다. 상기 추출과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간일 수 있다.

[0035] 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 냉침추출법, 온침추출법, 열 추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.

[0036] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다. 또한, 상기 분획과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0037] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 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 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0038] 본 발명의 까실쑥부쟁이 잎 에탄올 추출물은 ABTS 자유라디칼 소거활성 및 DPPH 소거활성을 통하여 확인한 결과 항산화효과가 인정되어, 포도당의 자가 산화 증가에 따른 산화적 스트레스로 인한 당뇨합병증의 치료, 개선 또는 예방효과를 가지고, 실험동물의 수정체를 이용하여 측정한 결과 알도스 환원효소가 뛰어나, 폴리올 경로 및 최종당화산물에 의한 당뇨합병증의 진행을 억제하여, 우수한 당뇨합병증의 치료 효과를 가지며, 최종당화산물 및 적혈구 내 소르비톨의 생성을 억제하여, 당뇨합병증의 진행을 차단할 수 있다는 것이 확인되었다.

[0039] 상기 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물의 유효성분인 까실쑥부쟁이 추출물은 당뇨합병증 치료 또는 예방용 활성이 우수할 뿐만 아니라, 식용으로 사용될 수 있는 천연식물을 이용하여 제조한 것이므로 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수하다.

[0040] 본 발명의 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물은 유효성분으로 상기 까실쑥부쟁이 추출물을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 당뇨합병증이란 당뇨병의 합병증을 말하며, 고혈당에 의해 유발되는 폴리올 경로의 이상, 체내에서 고혈당과 단백질의 결합으로 인해 생성되는 최종당화산물 및 포도당의 자가 산화의 증가에 따른 산화적 스트레스로 인해 발생되는 질환을 의미한다. 상기 당뇨합병증은 크게 당뇨병성 혈관장애, 신경병증 및 감염증 등이 있다.

[0042] 상기 당뇨병성 혈관장애는 대동맥, 관동맥, 하지의 혈관 등 비교적 굵은 혈관의 동맥경화를 일으켜 최종적으로 심장 마비나 협심증, 뇌졸중과 같은 질환을 일으키기도 하고, 망막, 신장(사구체) 등의 세소혈관이나 모세 혈관과 같은 미세 혈관을 손상시키거나 혈액 순환을 변화시켜, 사구체경화증, 망막증, 신부전, 시력장애, 하지괴저 등의 원인이 된다. 상기 당뇨병성 신경장애는 상기 원인에 의해 발병되는 신경계 장애로, 탄수화물 및 지질중간대사의 이상으로 인한 말초신경장애가 대표적이며, 말초신경의 장애, 건반사의 소실, 운동신경의 마비, 자율신경 장애 등이 있고, 감염증으로는 요로감염증인 신우신염, 농피증, 모낭주위염, 습진이나 칸디다증이 있다.

[0043] 상기 당뇨합병증의 대표적인 질병으로는 당뇨성 망막증, 당뇨성 백내장, 당뇨성 각막증, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증, 당뇨성 말초신경장해, 아테롬성 동맥경화 및 당뇨성 혈관합병증으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0044] 상기 당뇨성 망막증은 미세혈관의 합병증 중의 하나로 당뇨병 환자에게 실명을 가져오는 심각한 합병증이다. 상기 당뇨성 신증은 미세혈관 합병증의 하나로, 신 사구체 모세혈관의 경화성 병변에 의해 일어나는 질병이다.

[0045] 상기 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설가관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0046] 상기 까실쑥부쟁이 추출물은 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물 내에 유효성분으로 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 까실쑥부쟁이 추출물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 까실쑥부쟁이 추출물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.

[0047] 이 경우 상기 조성물 내 상기 까실쑥부쟁이 추출물의 함량은 0.001 중량 % 내지 99.9 중량 %, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 20 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 까실쑥부쟁이 추출물의 함량은 약학적으로 유효한 양 또는 바람직한 양으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.

[0048] 상기 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 의미한다. 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0049] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물은 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 당뇨합병증 치료 또는 예방용으로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.

[0051] 상기 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0052] 또한, 상기 당뇨합병증 치료 또는 예방용 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캅셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSTESIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0053] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOULTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.

[0054] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.

[0055] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0056] 또한, 본 발명은 까실쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다. 상기 까실쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 개선 또는 예방용 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명의 식품 조성물의 예로는 식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제를 들 수 있다.

[0058] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0059] 상기 까실쑥부쟁이 추출물이 포함될 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영아식 또는 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실,채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료, 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0060] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0061] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 까실쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100㎖ 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 쥬스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0062] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제는 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물 100 중량부 당 0 내지 200 중량부, 바람직하게는 0.00001 내지 150 중량부 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 본 발명에서 기능성 음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.

[0064] 상기 기능성음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 까실쑥부쟁이 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 중량부 내지 20 중량부, 바람직하게는 1 중량부 내지 18 중량부, 더욱 바람직하게는 5 중량부 내지 12 중량부 포함될 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 개선 또는 예방용 식품 조성물에 있어서, 상기 까실쑥부쟁이 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g 의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0066] 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물은 ABTS 자유라디칼 소거활성 및 DPPH 소거활성을 통하여 확인한 결과 항산화 효과가 인정되고, 알도스 환원효소 억제능이 우수하며, 최종당화산물 생성 억제능 및 적혈구 내에서 소르비톨 생성 억제능이 현저하게 뛰어난 것을 확인하여, 당뇨합병증의 치료, 개선 또는 예방 효과가 우수한 것으로 판명되었을 뿐만 아니라, 천연물로부터 유래된 것으로 부작용이 문제될 가능성이 낮으므로, 당뇨합병증의 치료, 개선 및 예방을 위하여 여러 방면으로 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐으로 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으므로, 이는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0068] **<실시예 1> 까실쑥부쟁이추출물의 제조**

[0069] 까실쑥부쟁이(*Aster ageratoides*) 잎 100g을 에탄올 10L에 침지한 후, 온침 추출법으로 추출하였다.

[0070] 보다 구체적으로, 상기 까실쑥부쟁이 잎 100g에 90% 에탄올수용액 10L를 가하여 상기 까실쑥부쟁이 잎을 추출용매에 완전히 침지시킨 후, 70℃에서 환류시키면서 추출하였다. 상기 추출을 통해 제조된 까실쑥부쟁이 추출액을 각각 감압농축기를 이용하여 감압 농축한 뒤, -20℃에서 동결건조하였다. 상기 수득한 추출물은 실험에 사용하기 전까지 냉동보관하였다.

[0071] **<실시예 2> 당뇨합병증 치료 또는 예방 효과 측정1-항산화효과 측정**

[0072] 상기 실시예 1에서 제조된 까실쑥부쟁이 추출물의 당뇨합병증 치료 또는 예방 효과와 관련하여, 우선 산화적 스트레스에 의한 당뇨합병증 발병 저해효과를 측정하기 위하여, 까실쑥부쟁이 추출물의 항산화효과를 측정하였다. 상기 항산화효과는 ABTS 자유라디칼 소거활성 및 DPPH 소거활성으로 확인하였다. 하기 항산화효과를 확인하기 위한 실험에서, 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물은 실험에 사용하기 위하여, 상기 수득한 추출물에 메탄올을 첨가하여 1 mg/ml 농도로 추출액을 제조하였다.

[0073] 상기 ABTS 자유라디칼 소거활성의 측정은 2 mM 농도의 ABTS와 3.5 mM 농도의 potassium persulfate를 혼합하여 3차 증류수 10 ml에 용해시킨 후, 3차 증류수 290 ml을 첨가하여 30배 희석시키고, 밤샘(overnight) 반응시켜 ABTS 라디칼 생성을 유도하였다. 상기 실시예 1에서 제조된 까실쑥부쟁이 추출액 10 μl와 ABTS 라디칼 용액 290 μl를 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 까실쑥부쟁이 추출물의 ABTS 라디칼 억제율과 대조하기 위하여, 공지의 항산화제인 Trolox를 대조군으로 이용하였다. 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물의 라디칼 소거활성은 ABTS 라디칼을 50% 소거시키는데 필요한 농도로 계산하여 IC_{50}값으로 환산하여, 하기 표 1에 나타내었다.

[0074] 또한, 상기 DPPH 소거활성의 측정은 0.32 mM 농도로 HPLC급 메탄올에 녹인 DPPH 180 μl와 상기 추출물 30 μl를 섞어 실온에서 20분간 반응시킨 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 까실쑥부쟁이 추출물의 DPPH 라디칼 억제율과 대조하기 위하여, 공지의 항산화제인 Ascorbic acid를 대조군으로 이용하였다. 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물의 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼을 50% 소거시키는데 필요한 농도로 계산하여 IC_{50}값으로 환산하여, 하기 표 2에 나타내었다.

표 1

[0075]

	농도(ug/ml)	ABTS 라디칼 억제율(%)	IC_{50}(ug/ml)
까실쑥부쟁이 추출물	33.33	61.24	24.27
	16.67	44.97	
	3.33	13.06	
Trolox	3.33	63.49	2.62
	1.67	31.09	
	0.33	12.03	

표 2

[0076]

	농도(ug/ml)	DPPH 라디칼 억제율(%)	IC_{50}(ug/ml)
까실쑥부쟁이 추출물	142.86	63.31	117.31
	71.43	25.62	
	14.29	3.42	
Ascorbic acid	14.29	77.53	9.45
	7.15	31.69	
	1.43	13.04	

[0077] 상기 표 1 및 표 2에 나타낸 바와 같이, 까실쑥부쟁이 추출물은 항산화활성을 갖는 것으로 확인되었다. 상기 결과로부터 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물은 항산화효과가 인정되어, 포도당의 자가 산화에 의한 산화적 스트레스로 인한 당뇨합병증의 유발을 제어할 수 있을 것으로 확인되었다.

[0078] **<실시예 3> 당뇨합병증 치료 또는 예방 효과 측정2-알도스 환원효소 억제활성**

[0079] 상기 실시예 1에서 제조된 까실쑥부쟁이 추출물의 당뇨합병증 치료 또는 예방 효과와 관련하여, 알도스 환원효소 억제에 의한 당뇨합병증 발병 저해효과를 측정하기 위하여, 까실쑥부쟁이 추출물의 알도스 환원효소 억제능을 측정하였다. 상기 알도스 환원효소의 억제능은 흰쥐의 수정체를 적출하여 사용하였다. 하기 알도스 환원효소 억제 효과를 확인하기 위한 실험에서, 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물은 실험에 사용하기 위하여, 상기 수득한 추출물에 DMSO를 첨가하여 1 mg/ml 농도로 추출액을 제조하였다.

[0080] 실험동물은 10주령 된 수컷 WKY(Wistar Kyoto) 5마리를 중앙실험동물(대한민국)에서 공급받아 사용하였다. 상기 실험동물을 에테르를 이용하여 마취시킨 후, 실험동물로부터 수정체를 적출하고, 적출된 수정체의 습중량에 따라 일정량의 인산 완충액(sodium phosphate buffer, pH 6.2)를 가하고 마쇄하여 혼성화(homogenization)하였다. 상기 혼성화된 수정체를 4℃에서 원심분리한 후, 그 상등액을 취하여 황산암모늄(ammonium sulfate)로 40%까지 포화시키고, 원심분리한 상등액을 다시 취하여, 다시 70%가 되도록 황산암모늄을 가하여 1시간 정도 저어준 다음, 원심분리하여 얻어진 펠렛을 최소량의 완충액에 현탁하여 1일간 투석을 수행한 다음 이를 효소원으로 하였다.

[0081] 상기 효소원 100 μl, 반응완충액인 인산 완충액(pH 7.0) 700 μl 및 기질인 DL-글리세르알데하이드(DL-glyceraldehyde, 0.1 M) 100 μl 및 조효소인 NADPH(1.6 mM) 100 μl를 혼합하여 제조한 반응액에 상기 효소액을 첨가하여 반응시킨 후에, 340nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 분광광도계로 측정하였다. 상기 까실쑥부쟁이 추출물의 알도스 환원효소 억제능과 대조하기 위하여, 공지의 알도스 환원효소 억제물질인 Quercetin을 대조군으로 이용하였다. 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물의 알도스 환원효소 억제능은 알도스환원효소의 활성이 50% 억제되는 시점의 농도를 IC_{50}값으로 환산하여, 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0082]

	농도(ug/ml)	알도스 환원효소 억제능(%)	IC_{50}(ug/ml)
까실쑥부쟁이 추출물	5	76.98	2.66
	1	36.15	
	0.5	19.67	
Quercetin	5	77.01	2.40
	1	45.08	
	0.5	20.01	

[0083] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 까실쑥부쟁이 추출물은 공지의 알도스 환원효소 억제물질인 Quercetin과 비교하여 거의 동일한 알도스 환원효소 억제능을 갖는 것으로 확인되었다. 상기 알도스 환원효소 억제능이 뛰어나다는 결과로부터 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물은 폴리올 경로 이상 및 최종당산화물 생성에 의해 발병되는 당뇨합병증의 치료 또는 개선에 효과가 우수할 것임이 확인되었다.

[0084] **<실시예 4> 당뇨합병증 치료 또는 예방 효과 측정3-최종당화산물 생성 억제효과**

[0085] 상기 실시예 1에서 제조된 까실쑥부쟁이 추출물의 당뇨합병증 치료 또는 예방 효과와 관련하여, 최종당화산물 생성 억제에 의한 당뇨합병증 발병 저해효과를 측정하기 위하여, 까실쑥부쟁이 추출물의 최종당화산물 생성 억제효과를 측정하였다. 하기 최종당화산물 생성 억제효과를 확인하기 위한 실험에서, 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물은 실험에 사용하기 위하여, 상기 실시예 1에서 수득한 추출물에 DMSO를 첨가하여 1 mg/ml 농도로 추출액을 제조하였다.

[0086] 50 mg/ml의 단백질원인 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA) 및 당원인 메틸글리옥살(methyl glyosal) 5mM의 용액(solution)을 0.1 M 인산 완충액(sodium phosphate buffer, pH 7.4)에 녹인 후, 0.02%의 농도로 항균제인 아지드화 나트륨(sodium azide)를 넣어 반응기간 동안 박테리아 생성을 방지하였다. 상기 반응액에 까실쑥부쟁이 추출액을 첨가하여 37℃에서 5일간 반응시킨 후에, 형광 스펙트로미터(fluorescence spectophotometer)를 이용하여 형광도(Excitation(Ex): 350nm, Emission(EM): 450nm)를 측정하여 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다. 상기 까실쑥부쟁이 추출물의 최종당화산물 생성 억제능과 대조하기 위하여, 공지의 최종당화산물 생성 억제물질인 Aminoguanidine을 대조군으로 이용하였다.

표 4

[0087]

	농도(ug/ml)	최종당산화물 생성 억제능(%)	IC_{50}(ug/ml)
까실쑥부쟁이 추출물	196.09	26.58	-
Aminoguanidine	196.08	82.45	110.66
	98.04	46.71	
	19.61	13.91	

[0088] 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 까실쑥부쟁이 추출물은 공지의 최종당화산물 생성 억제물질인 Aminoguanidine과 비교하여 유사한 최종당화산물 생성 억제능을 갖는 것으로 확인되었다. 상기 최종당화산물 생성 억제능이 우수하다는 결과로부터 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물이 최종당산화물 생성에 의해 발병되는 당뇨합병증의 치료 또는 개선 효과가 뛰어날 것임이 확인되었다.

[0089] **<실시예 5> 당뇨합병증 치료 또는 예방 효과 측정4-소르비톨 생성 억제활성**

[0090] 상기 실시예 1에서 제조된 까실쑥부쟁이 추출물의 당뇨합병증 치료 또는 예방 효과와 관련하여, 소르비톨 생성 억제능에 의한 당뇨합병증 발병 저해효과를 측정하기 위하여, 까실쑥부쟁이 추출물의 소르비톨 생성 억제능을 측정하였다. 하기 소르비톨 생성 억제효과를 확인하기 위한 실험에서, 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물은 실험에 사용하기 위하여, 상기 실시예 1에서 수득한 추출물에 DMSO를 첨가하여 1 mg/ml 농도로 추출액을 제조하였다.

[0091] 상기 소르비톨 생성 억제능은 10주령 된 수컷 WKY(Wistar Kyoto) 5마리를 중앙실험동물(대한민국)에서 공급받아 사용하였다. 상기 실험동물을 에테르를 이용하여 마취시킨 후, 복부를 절개하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 2.2% 구연산 나트륨(Sodium citrate) 1 mL에 혈액 9 mL을 섞어 상하로 천천히 섞은 후, 4℃ 및 2,000 x g의 조건으로 5분 동안 원심분리하였다. 상기 원심분리 후, 상층을 버리고 식염수를 이용하여 3회 세척하였다.

[0092] 상기 방법에 의해 얻어진 적혈구(RBC)에 Kerbs-Ginger bicarbonate buffer와 까실쑥부쟁이 추출액을 처리하고, 5% CO_2 incubater에서 37℃의 조건으로 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 적혈구를 차가운 식염수로 3회 세척하고, 차가운 6% perchloride acid를 넣고, 4℃ 및 2,000 x g의 조건으로 10 분동안 원심분리하였다. 상기 원심분리 후 수득한 상층액에 차가운 2.5M K_2CO_3를 넣어 중화시켰다.

[0093] 상기 중화시킨 상층액 70 μl를 벤조일화(benzoylation)에 사용하였다. 구체적으로, 상기 중화시킨 시료 70 μl에 1M KH_2PO_4 20 μl와 3 μl 벤조일 클로라이드(benzoyl chloride) 및 8M NaOH를 첨가하고 볼텍싱(vortexing)하여 혼합한 뒤, 1.4 M H_3PO_4 10μl를 넣어 중화시키고, 100 μl 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 넣어 볼텍싱(vortexing)하여 혼합한 후 원심분리하여 상,하를 완전히 나누었다. 상기 상층액을 질소로 제거한 후, 아세토니트릴(acetonitrile)과 물 혼합액(70:30)으로 녹여 288 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0094] 상기 까실쑥부쟁이 추출물의 소르비톨 생성 억제능과 대조하기 위하여, 공지의 소르비톨 생성 억제물질인 Quercetin을 대조군으로 이용하였다. 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물의 소르비톨 생성 억제능은 상기 측정한 흡광도를 이용하여 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0095]

	농도(ug/ml)	세포내 소르비톨 생성 억제(%)
까실쑥부쟁이 추출물	10	33.35
Quercetin	10	25.86

[0096] 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, 까실쑥부쟁이 추출물은 공지의 소르비톨 생성 억제물질인 Quercetin과 비교하여 더 우수한 소르비톨 생성 억제능, 구체적으로 동일한 함량을 기준으로 확인하였을 때 약 130%의 억제능을 갖는 것으로 확인되었다. 상기 소르비톨 생성 억제능이 우수하다는 결과로부터, 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물이 폴리올 경로 이상 및 최종당산화물 생성에 의해 발병되는 당뇨합병증의 치료 또는 개선에 뛰어나다는 것이 확인되었다.