

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0048905 (43) 공개일자 2014년04월24일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/409 (2006.01) A61K 36/02 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)		(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(21) 출원번호	10-2014-0024156(분할)	(72) 발명자
(22) 출원일자	2014년02월28일	최재수
심사청구일자	2014년02월28일	부산광역시 남구 오륙도로 85, 109동 204호(용호 동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)
(62) 원출원	특허 10-2011-0021388	우희철
원출원일자	2011년03월10일	부산광역시 남구 분포로 111 LG메트로시티아파트 113동 406호
심사청구일자	2011년03월10일	(뒷면에 계속)
		(74) 대리인 김태선

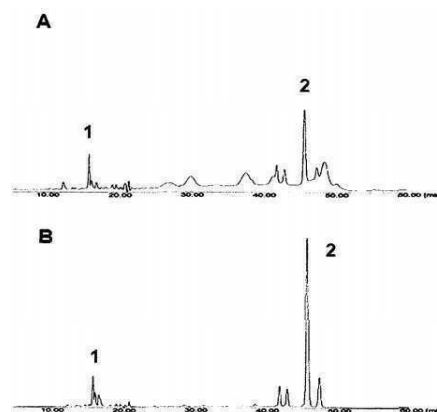
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 다시마 추출물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 화합물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨병 증의 예방 및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 다시마 추출물 또는 그로부터 분리한 폴피린계 화합물(porpyrin-related compounds)을 함유하는 당뇨병 합병증 억제에 활성을 갖는 약학 조성물 또는 건강 식품에 관한 것으로, 상기 추출물은 알도스 환원 효소 및 최종당화산물 생성 억제 활성을 나타내고, 천연 약제로서 안전성이 확보되어 있으므로 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약학조성물과 식품 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김형락

부산광역시 남구 황령대로 319번길 26, 경동메르빌
아파트 104동 2102호

손유경

부산광역시 해운대구 대천로 35 코오롱아파트 104
동 406호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1489000201001700

부처명 농림수산식품부

연구사업명 용역연구

연구과제명 건강신소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.06 ~ 2011.08.05

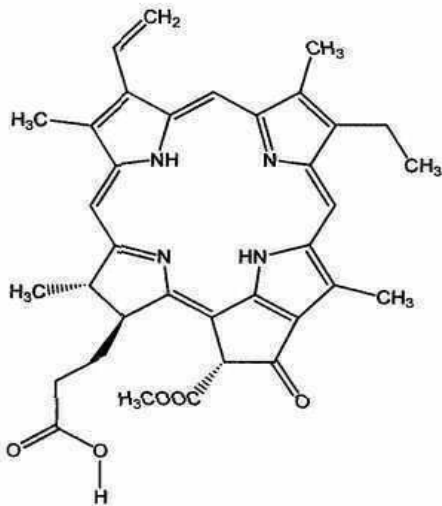
특허청구의 범위

청구항 1

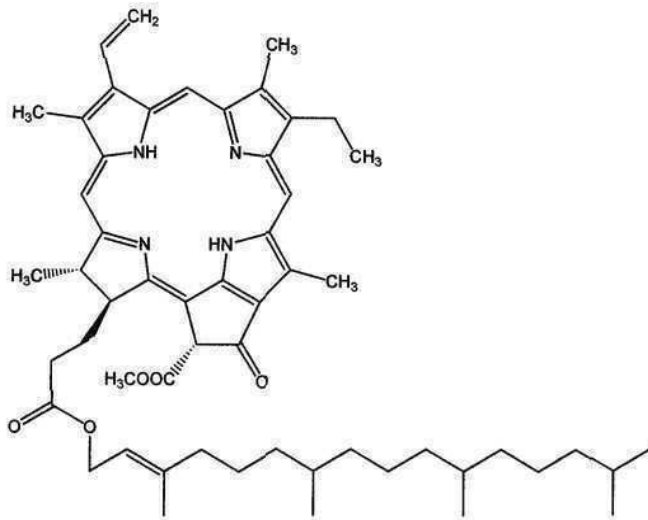
- (1) 다시마(*Laminaria japonica*)를 건조하고 마쇄하여 분말화하는 단계;
- (2) 상기 (1)단계에 의해 제조된 다시마 분말에 에탄올을 가하고, 70 ℃의 온도에서 환류냉각 추출한 후, 감압 여과한 다음, 40 ℃에서 감압농축하여 에탄올 조추출물을 획득하는 단계;
- (3) 상기 (2)단계에 의해 획득한 에탄올 조추출물에 n-헥산을 가하고 혼합한 후 분획하여 n-헥산 가용성 분획물을 획득하는 단계;
- (4) 상기 (3)단계에 의해 획득한 n-헥산 가용성 분획물에 에틸아세테이트를 가하고 혼합한 후 분획하여 에틸아세테이트 가용성 분획물을 획득하는 단계; 및
- (5) 상기 (3)단계에 의해 획득한 에틸아세테이트 가용성 분획물에 n-부탄올 을 가하고 혼합한 후 분획하여 n-부탄올 가용성 분획물을 획득하는 단계; 를 포함하여 제조되고,

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 폴피린계 화합물을 유효 성분으로 함유하여 알도즈 환원 효소 및 최종 당화산물 생성의 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 당뇨병 합병증의 예방 및 치료용 약학 조성물의 제조 방법.

<화학식 1>



<화학식 2>



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (2) 내지 (5)단계는 각각 복수회 실시되는 것을 특징으로 하는 당뇨병 합병증의 예방 및 치료용 약학 조성물의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 당뇨병 합병증은 당뇨병 백내장, 당뇨병 망막증, 당뇨병 각막증, 당뇨병 신경증 및 당뇨병 신증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 다시마(Laminaria japonica) 추출물 또는 이로부터 분리한 폴리페놀계 화합물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨병 합병증의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 당뇨병 합병증의 원인인 소르비톨 축적을 일으키는 알도스 환원효소 및 최종당화산물 생성을 억제 활성을 갖고 있어 당뇨병 합병증의 예방 및 치료용 조성물로 다양하게 이용될 수 있다.

배경기술

[0002] 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않아 혈중 포도당 농도가 높아져 소변에 포도당을 배출하는 질환으로 당뇨병이 인간사회에서 문제가 되는 것은, 그 특유한 합병증 때문이다. 인슐린이 개발되기 전 시대의 당뇨병은 혼수, 감염증 등이 인류의 생명을 위협했으나 현재의 화학 및 생화학의 발전에 힘입어 식사요법, 혈당강하제 요법, 인슐린 요법 등으로 갑작스런 생명의 위협을 막을 수 있게 되었다.

[0003] 당뇨병은 그 자체보다는 합병증이 더 위험하기 때문에, 오늘날 당뇨병 치료에 있어서 가장 큰 목표는 당뇨병 합병증의 유발이나 진행을 억제하는데 있다. 합병증은 당뇨병이 오래 지속되어 나타나는 현상으로 보통 10~15년을 경과한 후에 생기는 만성 합병증이 주이며, 그 대표적인 만성 합병증으로 당뇨병 망막증, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경증 등이 있다. 당뇨병 신경증은 당뇨병으로 인해 신경계에 장애가 오는 것으로 말초신경의 장애, 건반사의

소실, 운동신경의 마비, 자율신경 장애 등으로 발바닥이 저릿저릿하고, 화끈거리고, 통증이 심하며, 성기능의 장애가 오고, 뇨나 대변을 가리지 못하는 증상을 가져오기도 한다. 당뇨병 신증은 미세혈관 합병증의 하나로 신사구체 모세혈관의 경화성 병변에 의해 일어나는 것으로 특별한 증상이 없어도 소변검사를 통해 단백질이 나타나면 신증이 있음을 예측할 수 있다. 혈압의 상승은 당뇨병 신증을 악화시키는 요인으로도 작용하는데 보통 10~15년 이상 당뇨병을 앓은 사람들의 약 5% 정도가 당뇨병 신증이 온다. 당뇨병 망막증은 미세 혈관의 합병증 중의 하나로 당뇨병 환자에게 실명을 가져오는 심각한 합병증이다. 최근에 당뇨병 조절과 합병증과의 관계연구에 의하면 인슐린 치료를 강화시켜 혈당이 정상화되면 당뇨병 합병증 발생을 크게 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다 (Seaquist E. R. et al., New Eng. J. Haematol., 320, pp1161-1165, 1989).

[0004]

당뇨병에 있어서 고혈당이 합병증을 유발시키는 기전으로 polyol pathway의 이상 (Sato Y. and Rifkin D. B., J. Cell. Biol., 109, pp309-315, 1989), 체내에서 고혈당과 단백질의 결합, 산화적 스트레스 (Williamson J. R. et al., Diabetes, 42, pp801-813, 1993), myoinositol의 감소와 Na⁺, K⁺-ATPase활성의 감소 (Greene D. A. et al., New Eng. J. Med., 316, pp599-606, 1987) 등이 발표되었다. 그 중 polyol pathway는 포도당 대사경로의 하나로, 이는 포도당이 술비톨을 거쳐 과당으로 변환되는 경로로 두 개의 반응계로 구성되며, 2종의 효소가 관여한다 (Gabbay K. H. and O'Sullivan J. B., Diabetes, 17, pp239, 1968; Dvornik D. et al., Science, 182, pp1146, 1973). 포도당은 에너지원으로 이용되는 중요한 물질로서 정상인의 경우 세포내에 흡수된 후에 대부분은 헥소키나아제에 의하여 글루코오스-6-포스페이트로 되어 해당계에서 대사되고, 불과 몇 %만이 polyol pathway를 거쳐 대사된다 (Collins J. G. and Corder C. N., Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 16, pp242, 1977). 그러나 당뇨병에 의해 고혈당 상태가 되면 세포내의 포도당 흡수가 인슐린에 의존하지 않는 조직에서 포도당의 세포막 투과는 세포 밖의 포도당 농도에 의존하므로 수정체, 망막, 각막, 말초신경, 혈관, 신사구체, 적혈구 등과 같은 인슐린 비의존성 조직의 세포내 포도당 농도는 상승하게 되고, 이들 세포내에 다량 존재하는 polyol pathway의 필수효소인 알도즈 환원효소에 의하여 포도당의 대사가 항진되어 술비톨이 과잉생성된다 (Collins J. G. and Corder C. N., Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 16, pp242, 1977; Dvornik D. et al., Science, 182, pp1146, 1973). 그 결과 술비톨이 축적되는 부위에 따라 발병 증상이 나타나는데, 당뇨병 백내장, 당뇨병 망막증, 당뇨병 각막증, 당뇨병 신경증, 당뇨병 신증 등의 당뇨병 합병증을 일으키게 된다 (Heath H. and Hamlett Y. C., Diabetologia, 12, pp43, 1976). 알도즈 환원효소를 촉매하는 포도당이 술비톨로 되는 환원반응은 그 평형에서 역반응이 일어나지 않으며, sorbitol dehydrogenase의 활성이 알도즈 환원효소의 활성보다 낮기 때문에 술비톨에서 과당으로의 변환량이 아주 적으므로 결과적으로 polyol pathway의 항진은 술비톨을 축적시키게 된다 (Collins J. G. and Corder C. N., Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 16, pp 242, 1977). 당알콜인 술비톨은 극성이 높아 세포막 외로 확산이 어렵기 때문에 술비톨이 세포내에 축적되며, 이로 인해 세포내 삼투압을 상승시켜, 수정체내로 수분유입을 촉진하여 세포의 팽화를 일으킨다 (Gabbay K. H. and O'Sullivan J. B., Diabetes, 17, pp239, 1968; Dvornik D. et al., Science, 182, pp1146, 1973). 이 팽화는 수정체 섬유세포의 투과성을 항진시키고, Na⁺, Cl⁻의 유입과 K⁺, 아미노산, 펩티드, ATP, 미오-이노시톨(myo-inositol) 등의 유출을 일으킨다. Na⁺ 이나 K⁺ 등의 전해질의 평형과파에 의해 삼투압이 더 증가하게 되고, 세포의 팽화를 촉진하여 세포막은 정상을 유지할 수 없게 된다. 그와 동시에 세포내 단백질 변성이 증가되어 수정체가 혼탁하게 되는데, 이와 같이 수정체가 혼탁해져 나타나는 백내장 증상을 당뇨병 합병증 진행과정의 한 지표로 사용한다. 따라서 술비톨을 생성하는 효소인 알도즈 환원효소를 억제하게 되면, 술비톨의 생성을 억제하는 물질이 당뇨병 백내장의 발병을 억제하는 것이 가능하다고 알려져 있다.

[0005]

당뇨병에서 합병증을 유발시키는 기전으로 polyol pathway의 이상 이외에 혈중의 과량의 당과 단백질과의 결합에 의한 단백질 당화 (glycation)가 있다. 단백질의 당화는 단백질의 아미노기와 당의 카르보닐기 사이의 반응에 의해 초기화되고, 가역적인 쉬프베이스 (Schiff base)를 생성한다. 이 반응은 수 시간에 걸쳐서 이루어지며, 불안정한 구조로 형성된 쉬프베이스는 더 안정한 구조인 케토아민 (ketoamine) 혹은 아마도리 생성물(Amadori Products)로 재배열하게 된다. 아마도리 생성물의 형성은 수일간에 걸쳐서 생성되며, 생성물은 비가역적이다. 당이 결합된 단백질은 더 많은 결합을 하여 3-deoxyglucosones (3-DG)와 같은 다이카보닐(dicarbonyl) 중간 생성물을 형성하고, 이를 최종당화산물 (Advanced Glycation Endproducts, AGEs)이라 부른다.

[0006]

생성된 최종당화산물은 복합체로서 단백질과 교차결합을 하고, 갈변화와 형광을 생성한다. 수많은 최종당화산물은 조직에서 검출되는데 크게 세 가지로 분류될 수 있다.

- [0007] 첫째, 형광성을 띠며, 교차결합된 최종 당화산물로 펜토시딘 (pentosidine)과 크로스린 (crossline)이 있다. 펜토시딘은 라이신 (lysine)과 아르기닌 (arginine) 잔기 사이에 교차결합을 형성하고, 당뇨가 유발되면 그 농도는 증가한다 (McCance D. R. et al., J. Clin. Invest., 91, pp2470-2478, 1993). 크로스린 (crossline)은 당뇨 쥐의 신장에서 처음으로 발견되었으며, in vitro와 in vivo에서 형성 될 수 있다.
- [0008] 둘째, 비형광성이며, 교차결합된 최종당화산물로 imidazolium dilysine과 교차결합된 것과 AFGP (alkyl formyl glycosyl pyrrole) 교차결합된 것, 그리고 ALI (arginine-lysine imidazole)이 교차결합된 것이 있다. Imidazolium dilysine이 교차결합된 것은 GOLD (glyoxal lysine dimer) 또는 MOLD (methylglyoxal lysine dimer)로 알려져 있으며, 글리옥살 (glyoxal) 유도체와 라이신 잔기 사이의 반응에 의해 형성된다 (Frye E. B. et al., J. Biol. Chem., 273, pp18714-18716, 1998). ALI는 내부세포와 교차결합한다 (Al-Abed Y. and Bucala R., Bioconjugate Chem., 11, pp39-45, 2000).
- [0009] 세 번째, 교차결합이 없는 최종당화산물로 피랄린 (pyrraline)과 CML (N-carboxy methyllysine)이 있다. 피랄린은 교차결합이 없는 최종당화산물이며, 인간의 피부, 혈장, 뇌의 플라크(plaque)에서 발견되며 (Smith M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91, pp5710-5714, 1994), CML은 단백질 존재하에 다중불포화 지방산의 금속 촉매에 의한 산화과정에서 아마도리 생성물의 산화적 분해에 의해 생성된다 (Reddy S. et al., Biochemistry, 34, pp10872-10878, 1995). 그것은 최종당화산물의 주성분 중 하나이며, 그것의 농도는 당뇨병 환자 피부의 콜라겐에서 정상인 경우보다 두 배 증가하였다 (Dyer D. G. et al., J. Clin. Invest., 91, pp2463-2469, 1993). 당뇨 합병증 발병에서 최종당화산물의 다른 작용은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 예를 들어 혈청에서 CML의 농도는 망막증이 있는 당뇨병 환자의 경우 증가하나 신증을 가진 환자에서는 증가하지 않았다. 그러나 펜토시딘의 농도는 두 개의 군에서 모두 증가하는 것으로 나타났다.
- [0010] 증가된 당화와 축적된 조직 최종당화산물은 효소의 활성을 변화시키고, 리간드 결합을 감소시키며, 면역성을 변화시킬 수 있기 때문에 당뇨 합병증과 관련이 있다 (Vlassara H. and Dalace M. R., J. Intern. Med., 251, pp87-101, 2002). 최근 연구에서 당뇨병 환자에서 ACE-면역 복합체를 형성하는 혈청 최종당화산물의 작용에 대한 자동 항체가 존재함을 보고하였고, 그것은 아테롬성동맥경화증에 중요한 역할을 한다. 당화로 유도된 자유라디칼은 단백질 분해와 핵산과 지질에 산화를 일으킬 수 있다 (Baynes J. W., Diabetes, 40, pp405-412, 1991; Turk Z. et al., Clin. Chim. Acta., 303, pp105-115, 2001). 또한 최종당화산물은 인지질에서도 형성될 수 있는데, 포스파티딜에탄올아민 (phosphatidylethanolamine)과 포스파티딜세린(phosphatidylserine) 잔기와 같은 인지질에서 포도당과 아미노산 사이에 직접적인 반응에 의해서 지질 과산화를 유도할 수 있다 (Vlassara H., Annal. Med., 28, pp419-426, 1996).
- [0011] 체내에는 3-DG를 불활성화 시키고, 최종당화산물의 생성을 억제하는 α -ketoglutaraldehyde dehydrogenase와 같은 효소가 간에 존재하여 당화와 최종당화산물의 생성에 대한 체내를 보호할 수 있는 기전을 가지고 있으며 (Hata F. et al., Diabetes Res. Clin., 5, pp5413, 1988), 항산화제는 당화로 유도된 자유라디칼에 대해 생체를 방어할 수 있는 기능을 가지고 있다. 그러나 in vivo에서 당화와 최종당화산물에 대한 자연적 방어의 효능은 아직 잘 알려져 있지 않다.
- [0012] 당뇨병 환자에서 치료의 목적은 식이 조절에 의해 고혈당증을 감소시키는 것이다. 그러나, 식이 조절은 어렵기 때문에 약리학적인 효과를 가진 화합물을 사용하여 고혈당을 저하시키고, 고혈당으로 인한 최종당화산물 생성을 감소시킬 수 있다. 일단 당뇨병이 발생하여 혈당이 금방 떨어지지 않으면 당뇨합병증 예방제를 복용하여 당뇨합병증을 예방하여야 한다.
- [0013] 현재, 단백질 당화 억제제로 유일한 합성제제인 아미노구아니딘 HCl(aminoguanidine HCl)은 친핵성 히드라진 (hydrazine)으로 축합반응의 산물과 결합하여 단백질과의 교차결합을 방지함으로써 최종당화산물의 생성을 억제하여 합병증으로 진전되는 것을 지연 또는 방지한다(Brownlee M et al., Sciences, 232, 1629-1632, 1986; Edelstein D et al., Diabetes, 41, 26-29, 1992). 아미노구아니딘 HCl은 당뇨합병증의 예방 및 치료에 가장 유망한 합성 의약품으로 제 3상 임상실험까지 진행되었으나, 장기간 투여 시 독성이 유발되는 문제점이 있어 보다 안전한 약제의 개발이 요망되고 있다.
- [0014] 한편, 다시마(Laminaria)는 갈조식물 다시마목 다시마과의 한 속으로, 전통적인 해조식품이다. 한국, 일본, 캄차카반도, 사할린섬 등의 태평양 연안에 분포하며, 크기는 1.5 내지 3.5m 이고, 나비는 25 내지 40cm 이다. 다시마속 식물은 태평양 연안에 20여 종이 자라고 있으며, 10 m 이상의 큰 종류도 있는데, 주요 종으로는 참다시

마(*L. japonica*), 오토크다시마(*L. ochotensis*), 애기다시마(*L. religiosa*)등이 있다. 다시마에는 카로틴류, 크산토펜류, 엽록소 등의 여러 가지 색소 외에 탄소동화작용으로 만들어지는 마니트, 라미나린 등의 탄수화물과 세포벽의 성분인 알긴산이 많이 들어 있고, 요오드, 비타민 B2, 글루탐산 등의 아미노산이 들어 있다고 알려져 있다.

[0015] 그러나, 알도스 환원 효소 및 최종당화산물을 억제함으로써 당뇨병 합병증 질환을 치료 및 예방할 수 있는 다시마 추출물을 함유하는 조성물에 관한 보고는 없는 실정이다. 따라서, 본 발명자는 알도스 환원 효소 및 최종당화산물 생성을 억제하여 당뇨병 합병증을 예방 및 치료하는 새로운 추출물 및 폴리피린계 화합물을 다시마에서 분리 동정한 후, 그 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 상기와 같은 과제를 위하여 알도스 환원 효소 및 최종당화산물 생성 억제 활성을 갖는 새로운 추출물 및 화합물로서 다시마 추출물 또는 이로부터 분리한 폴리피린계 화합물을 유효 성분으로 함유하는 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

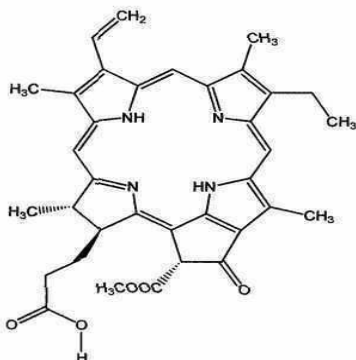
[0017] 본 발명은 상기와 같은 목적을 위하여 다시마(*Laminaria japonica*) 추출물 또는 이로부터 분리한 폴리피린계 화합물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨병 합병증의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 다시마(*Laminaria japonica*) 추출물 또는 이로부터 분리한 폴리피린계 화합물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨병 합병증 예방 및 치료용 식품 조성물을 제공한다.

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

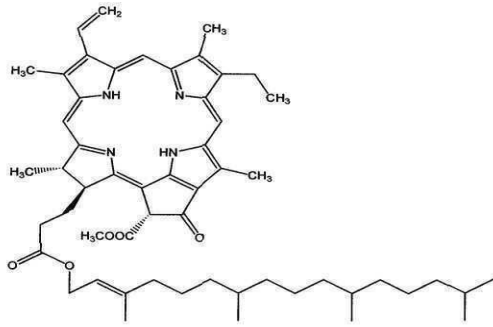
[0020] 본 발명에 있어서, 상기 폴리피린계 화합물은 하기 화학식 1로 나타내어지는 페오폴리이드 에이 또는 화학식 2로 나타내어지는 페오피틴 에이인 것을 특징으로 한다.

[0021] <화학식 1>



[0022]

[0023] <화학식 2>



[0024]

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 다시마 추출물은 다시마를 C1 내지 C4의 저급 알콜로 추출한 다시마 조추출물인 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 다시마 조추출물은 다시마 에탄올 추출물인 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 다시마 추출물은 다시마 조추출물을 n-헥산, 에틸 아세테이트 또는 n-부탄올로 구성된 군으로부터 선택된 비극성 용매로 추출한 다시마 비극성 용매 가용성 추출물인 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명의 다시마 조추출물, 다시마 비극성 용매 가용성 추출물은 다음과 같이 수득될 수 있다.

[0029] 우선 다시마를 동결건조한 후 마쇄하여 분말화한다. 이어서, 다시마 분말을 용매로 추출한다. 이 때 추출 용매로는 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올과 같은 저급 알콜 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합 용매를 다시마 건조 중량의 약 3 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배의 양으로 사용할 수 있고, 이중 에탄올이 바람직하다.

[0030] 다시마의 추출은 20 내지 100 ℃, 바람직하게는 20 내지 70 ℃의 추출 온도에서 약 0.5시간 내지 2일, 바람직하게는 1 시간 내지 1일 동안 수행할 수 있고, 추출 방법으로는 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등을 사용하여 1회 내지 5회, 바람직하게는 3회 연속 추출한 후, 감압여과하고 여액을 진공회전농축기로 20 내지 100 ℃, 바람직하게는 40 내지 70 ℃에서 감압농축하여 물, 저급알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 다시마 조추출물을 수득할 수 있다.

[0031] 이어서, 다시마 조추출물로부터 비극성용매 가용추출물을 추출한다.

[0032] 상기 다시마 조추출물을 물에 현탁한 후, n-헥산, 에틸아세테이트, n-부탄올 순으로 용매를 이용하여 비극성용매 가용추출물을 얻을 수 있다.

[0033] 보다 구체적으로는 다시마 조추출물에 n-헥산, 바람직하게는 n-헥산: 물: 에탄올 혼합물을 일정 비율, 바람직하게는 10: 9: 1로 혼합하여 n-헥산 가용성 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있다. 이어서, 상기 수가용성 분획물에 에틸아세테이트를 가하여 에틸 아세테이트 가용성 분획물, 즉 본 발명의 에틸 아세테이트 가용성추출물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있고, 마지막으로 상기 수가용성 분획물을 부탄올로 추출하여 부탄올 가용성 분획물을 수득할 수 있다.

[0034] 이어서, 상기 비극성용매 가용성추출물로부터 폴피린계 화합물을 분리해 낼 수 있다. 우선, 상기 비극성용매 가용성추출물을 유기용매로 컬럼크로마토그래피하여 분획물을 수득하고, 이 분획물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 분리한 후, 정제하여 본 발명에 따른 폴피린계 화합물을 분리 및 동정할 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 비극성용매 가용성추출물인 n-헥산 분획물에 대하여 설명하면, 우선 n-헥산 : 에틸 아세테이트의 혼합용매, 바람직하게는 n-헥산 : 에틸 아세테이트의 20:1 내지 0:100 의 혼합 용매로 시간당 일정용량, 바람직하게는 1000 ml의 속도로 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 HF1 부터 HF18까지 18개의 분획물을 수득할 수 있다.

[0035] 상기 HF9 분획물은 다시 다이아이온 HF-20 컬럼 크로마토그래피(Diaion HP-20 column chromatography)로 에탄올, 메탄올, 그리고 아세톤을 이용하여 HF9-1 부터 HF 9-4까지 4개의 분획물을 수득할 수 있다. 상기 HF 9-4 분획물을 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 n-헥산 : 아세톤의 10:1 -> 0 : 1 의 혼합 용매로 분리한 후,

RP-18로 정제하여 상기 화학식 1, 화학식 2로 표시되는 화합물을 분리 및 동정할 수 있다.

- [0036] 상기에서 수득된 본 발명에 따른 다시마 조추출물 또는 비극성용매 가용성추출물, 또는 그로부터 분리된 폴피린계 화합물의 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성 억제 효능을 조사하기 위하여, 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성반응을 이용하여 이들의 생성 억제효과를 측정된 결과, 본 발명에 따른 다시마 조추출물 또는 비극성 용매 가용성추출물, 또는 그로부터 분리된 폴피린계 화합물이 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성을 억제함을 확인하였다.
- [0037] 또한, 본 발명은 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성을 억제 활성을 갖는 다시마 조추출물, 다시마 비극성용매 가용추출물 또는 다시마 폴피린계 화합물과 같은 다시마 추출물을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0038] 상기 본 발명에 따른 다시마 조추출물 또는 비극성용매 가용성추출물, 또는 그로부터 분리된 폴피린계 화합물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 약학조성물은 다시마 조추출물 또는 비극성용매 가용성추출물, 또는 그로부터 분리된 폴피린계 화합물을 총 조성물 중량에 대하여 0.5 내지 50 중량%로 함유한다.
- [0040] 또한, 본 발명에 따른 약학조성물은 통상의 약학조성물의 제조에 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 사용가능한 이들 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 타르크, 스테아린산 마그네슘 및 광유 등을 포함할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명에 따른 추출물 또는 화합물의 약학적 투여 형태는, 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합한 형태 뿐만 아니라 적절한 집합으로 사용하는 것도 가능하다.
- [0042] 본 발명에 따른 약학조성물의 제형화는, 통상의 제형화에 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0043] 경구투여용 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되고, 이들 고형제제는 상기 본 발명에 따른 추출물 또는 화합물을 적어도 하나 이상의 부형제, 바람직하게는 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등과 혼합하여 제조된다. 또한, 이들 외에도 마스네슘 스테아레이트, 타르크와 같은 윤활제를 사용할 수도 있다.
- [0044] 경구투여용 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 포함되고, 통상적으로 사용되는 물, 액상 과립 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들어 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0045] 비경구투여를 위한 제제로는 멸균 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제 또는 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레에이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제로는 당업계에서 통상적으로 사용되는 위템솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등을 사용할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명에 따른 추출물 또는 화합물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 상태, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다양할 수 있으나, 당업자들에 의해 적절하게 선택되어질 수 있다. 그러나, 바람직한 약리효과를 위하여, 본 발명에 따른 추출물 또는 화합물은 1 일 0.0001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0047] 투여 횟수는 1일 1회 투여할 수도 있고, 수회로 나누어 투여할 수도 있다. 하지만 이러한 투여량이 본 발명의 범위를 한정하거나 제한하는 것은 아니다.
- [0048] 또한, 본 발명은 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성을 억제활성을 갖는 다시마 조추출물, 다시마 비극성용매 가용추출물 또는 다시마 폴피린계 화합물과 같은 다시마 추출물을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 식품 조성물을 제공한다.

[0049] 상기의 본 발명에 따른 식품 조성물은 식품에 첨가, 분무 또는 혼합하여 첨가할 수 있으며, 이러한 첨가 비율은 식품 전체 중량에 대하여 0.01 내지 10 중량%의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0050] 상기 식품은 과일, 야채, 과일이나 야채의 건조제품이나 절단제품, 과일주스, 야채주스, 이들의 혼합 주스이거나 칩류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효유식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 중 어느 하나 이상을 포함한다.

발명의 효과

[0051] 본 발명에 따른 다시마 추출물 또는 그로부터 분리된 폴리페린의 화합물은 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성을 억제함으로써, 강력한 당뇨병 합병증 억제활성을 나타내고, 천연재료로서 독성 및 부작용은 거의 없어 안전성이 확보되어 있으므로 예방 목적으로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 효과가 있어, 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약화조성물 또는 식품조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1A는 본 발명의 일 실시예에 따른 에탄올 조추출물을 HPLC 실시한 결과를 나타낸다.

도 1B는 본 발명의 일 실시예에 따른 n-헥산 추출물을 HPLC 실시한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0054] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0055] <실시예 1. 다시마 에탄올 조추출물의 제조>

[0056] 본 발명에 사용한 다시마는 부산시 기장군 연근해에서 채집하여 사용하였다. 다시마는 동결건조 후, 마쇄하여 얻은 분말 5.5 kg을 에탄올 4 L를 넣고 70 °C에서 일정시간 간격 (12h, 6h, 3h)으로 5회 반복하여 환류 냉각 추출한 후 여지(와트만사, 미국)로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 40 °C에서 에탄올을 제거한 후 추출된 잔사로서 다시마 조추출물 990.85 g을 수득하였으며, 이 중 2 g을 취하여 알도즈 환원효소 및 최종 당화산물 생성억제 활성 검사를 위한 시료로 사용하였다.

[0057] <실시예 2. 다시마 n-헥산 가용 추출물의 제조>

[0058] 상기 실시예 1에서 얻은 다시마 조추출물 2 ℓ에 n-헥산 2 ℓ를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 L 및 n-헥산 가용성 분획물 2 L를 얻은 후 n-헥산 가용성 분획물을 건조하여 n-헥산 가용 추출물 100.05 g을 수득하여 시료로 사용하였으며, 이 중 2 g을 취하여 알도즈 환원 효소 억제 활성검사를 위한 시료로 사용하였다.

[0059] <실시예 3. 다시마 에틸 아세테이트 가용 추출물의 제조>

[0060] 상기 실시예 2에서 얻은 수가용성 분획물 2 ℓ에 에틸 아세테이트 2 ℓ를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 ℓ 및 에틸 아세테이트 가용성 분획물 2 ℓ를 얻은 후, 이 에틸 아세테이트 가용성 분획물을 건조하여 에틸 아세테이트 가용 추출물 1.6 g을 수득하여 시료로 사용하였으며, 이 중 0.2 g을 취하여 알도즈 환원효소 억제 활성검사를 위한 시료로 사용하였다.

[0061] <실시예 4. 다시마 n-부탄올 가용 추출물의 제조>

[0062] 상기 실시예 3에서 얻은 수가용성 분획물 2 ℓ에 부탄올 2 ℓ를 가하여 혼합한 후 3 ~ 4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 ℓ 및 부탄올 가용성 분획물 2 ℓ를 각각 얻은 후, 수가용성 분획물 및 n-부탄올 가용성 분획물을 건조하여 수가용 추출물 및 n-부탄올 가용 추출물 36.52 g을 수득하여 시료로 사용하였으며, 이 중 2 g을 취하여 알도즈 환원 효소 억제 활성 검색을 위한 시료로 사용하였다.

[0063] **실험예 1. 다시마 조추출물 및 각 용매 분획물의 알도즈 환원효소 (AR) 억제활성**

[0064] 다시마 조추출물 및 각 용매 분획물의 알도즈 환원효소 억제활성을 측정하기 위한 효소원의 조제는 Hayman and Kinoshite (Hayman S. and Kinoshite I. H., J. Biol. Chem., 240, pp877-882, 1965)가 사용한 방법을 수정하여 실시하였다.

[0065] 먼저, 효소원을 제조하는데, 흰쥐의 수정체를 적출하고 수정체 1개당 0.5 ml 정도의 인산염 완충액(pH 6.2)를 가하여 균질화하였다. 이를 4 ℃에서 10,000 rpm으로 20분간 원심 분리한 후 그 상등액을 취하여 황산 암모늄으로 40 %까지 포화시키고 원심 분리한 상등액을 취하여 다시 70 %가 되도록 황산 암모늄을 가하여 1시간 가량 저어준 다음 원심 분리하여 얻어진 펠렛을 최소량의 인산염 완충액에 현탁하여 1일 정도 투석한 다음, 효소원으로 하였다. 반응 완충액인 인산 칼륨 완충액 (pH 7.0), 효소원, NADPH (1.6 mM ; Sigma, St. Louis, MO, USA), DMSO에 녹인 시료, 기질로 DL-글리세르알데하이드(DL-glyceraldehyde) (10 mM : Sigma, St. Louis, MO, USA) 순으로 셀에 넣어 U/V 분광광도계(ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Sweden)를 이용하여 340 nm 에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다.

[0066] 대조군은 시료를 녹이지 않은 DMSO 만을 사용하여 측정하고, 양성 대조군은 퀘르세틴(Quercetin : Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 농도별로 측정하였다. 알도즈 환원제 억제활성 실험 % 는 하기의 수학적 식 1로 구하였고, 선회귀 방정식을 사용하여 통계처리 하였다.

[0067] **<수학적 식 1>**

[0068]
$$\% \text{ 억제율} = 1 - (\text{시료의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}) / \text{표준흡광도} \times 100$$

[0069] 그 결과, 표 1에서 나타낸 바와 같이 에틸 아세테이트 가용성 분획물에서 억제율이 $50.83 \pm 0.12 \%$ 로 두드러진 활성을 나타내었다. 다음으로 n-부탄올, n-헥산 가용성 분획물이 31.85 ± 1.01 , $30.24 \pm 0.36 \%$ 로 두드러진 활성을 나타내었다.

표 1

[0070]

	시료	농도(μg/ml)	저해율(%)
실시예 1	다시마 조추출물	100	27.44 ± 1.13
실시예 2	다시마 n-헥산 가용성 분획물	100	30.24 ± 0.36
실시예 3	다시마 에틸 아세테이트 가용성 분획물	100	50.83 ± 0.12
실시예 4	다시마 n-부탄올 가용성 분획물	100	31.85 ± 1.01
	다시마 수가용성 분획물	100	19.11 ± 1.34
비교예	퀘르세틴	10	65.89 ± 0.95

[0071] **<실시예 5. 폴피린계 화합물의 분리>**

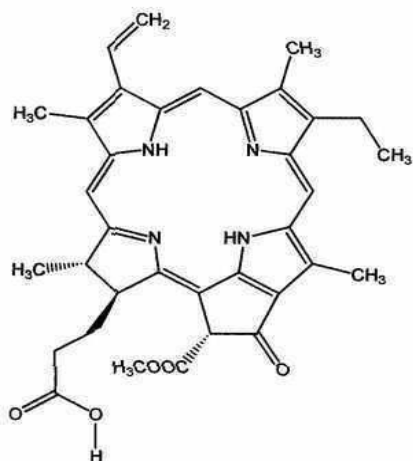
[0072] 상기 실시예 2의 다시마 n-헥산 가용 추출물 100.05 g 중 46 g 을 전개용매로서 n-헥산 : 에틸 아세테이트의 20:1 과 0:100 의 혼합 용매를 사용하여 칼럼 크로마토그래피를 수행하였다.

[0073] 고정상으로는 키에셀 겔 60 (Kiesel gel 60, 230-400 메쉬)을 사용하여 시간당 1,000 mL 씩 분획을 수행하여 18개의 하부 분획물 (EF01~EF10)로 나누었다. HF09 (2.3 g)을 에탄올, 메탄올, 그리고 아세톤으로 다이아이온 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 4개의 하부 분획물 (HF9-1~HF9-4)로 나누었다. HF9-4를 n-헥산 : 아세톤의 10:1 -> 0:1 의 혼합 용매를 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피와 디클로로메탄 : 메탄올 : 물의 8:22:1 혼합 용매로 RP-18로 정제하여 화합물 1과 2 를 분리하였다. HF 10(1.9 g)에서도 동일한 방법으로 화합물 2를 얻었다.

[0074] 각각의 화합물을 NMR 및 MS 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기와 같다.

[0075] (1) 화합물 1 : 페오폴바이드 에이 (pheophorbide a)

[0076] <화학식 1>



[0077]

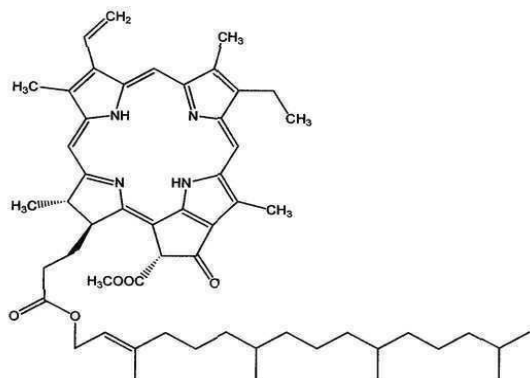
[0078] 물질의 성상 : 녹색의 무정형 고체

[0079] 물질의 분자식 : $C_{35}H_{36}N_4O_5$

[0080] ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 9.42(s, 10-H), 9.25(s, 5-H), 8.53(s, 20-H), 7.90(dd, J=18, 12Hz, 3¹-H_x), 6.13(d, J=11Hz, 3²-H), 6.23(s, 13²-H), 4.19(brd, J=8, 17-H), 4.43(q, J=9, 18-H), 3.63(q, J=9, 8¹-CH₂), 3.55(s, 12¹-Me), 3.34(s, 2¹-Me), 3.13(s, 7¹-Me), 3.85(s, 13²-CO₂Me), 2.58(m, 17¹-CH₂), 2.24(m, 17²-CH₂), 1.63(t, J=8, 8²-Me), 1.81(d, J=7, 18¹-Me), 0.00(NH)

[0081] ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃): 11.1 (C-7¹), 12.0(C-2¹), 12.0(C-12¹), 17.3(C-8²), 19.3(C-8¹), 23.0(C-18¹), 29.5(C-17²), 30.7(C-17¹), 50.0(C-18), 50.9(C-17), 52.8(C-13², CO₂Me), 64.6(C-13²), 93.0(C-20), 97.4(C-5), 104.3(C-10), 105.0(C-15), 122.7(C-3²), 128.8(C-13), 128.9(C-3¹), 128.9(C-12), 131.8(C-2), 136.0(C-3), 136.2(C-7), 136.4(C-4), 137.8(C-11), 142.0(C-1), 145.1(C-8), 149.5(C-9), 150.8(C-14), 155.5(C-6), 161.0(C-16), 169.6(C-13², CO₂), 172.0(C-19), 177.8(C-17², CO₂), 189.6(C-13¹)

[0082] (2)화합물 2 : 페오피틴 에이 (pheophytin a)



[0083]

[0084] 물질의 성상 : 녹색의 무정형 고체

[0085] 물질의 분자식 : $C_{55}H_{74}N_4O_6$

[0086] $^1\text{H-NMR}(400\text{ MHz, CDCl}_3)$: δ 9.34(s, 10-H), 9.16(s, 5-H), 8.52(s, 20-H), 7.82(dd, J=18, 11.6Hz, 3¹-H), 6.19(dd, J=11.6, 1.6Hz, 3²-CH₂), 6.28(s, 13²-H), 4.23(br.d, J=9, 17-H), 4.49(q, J=8, 18-H), 3.49(q, J=9, 8¹-CH₂), 3.90(s, 12¹-Me), 3.33(s, 2¹-Me), 3.04(s, 7¹-Me), 3.64(s, 13²-OMe), 2.50-2.64(m, 17¹-C), 2.21-2.36(m, 17²-C), 1.49(t, J=8, 8²-Me), 1.82(d, J=8, 18¹-Me)

[0087] **Phytygroup**: 5.16(t, J=6.5, P2-H), 4.44(dd, J=12.9 6.5, P1-H), 1.88(m, P4-C), 1.59(s, P17-Me), 0.9-1.3(m, P5-P14-C), 0.85(m, P18, 19-CH₃), 0.79(P16, 20-CH₃)

[0088] $^{13}\text{C-NMR}(100\text{ MHz, CDCl}_3)$: 11.0(C-7¹), 12.0(C-2¹), 12.0(C-12¹), 16.3(C-P17), 17.3(C-8²), 19.2(C-8¹), 22.6(C-P20), 22.7(C-P16), 23.1(C-18¹), 24.4(C-P15), 24.7(C-P9), 24.9(C-P5), 27.9(C-P13), 29.8(C-17²), 31.2(C-17¹), 32.6(C-P11), 32.7(C-P7), 36.6(C-P14), 37.2(C-P12), 37.3(C-P10), 37.3(C-P8), 39.3(C-P6), 39.8(C-P4), 50.1(C-18), 51.1(C-17), 52.8(C-13², OMe), 61.5(C-P1), 64.7(C-13²), 93.0(C-20), 97.3(C-5), 104.2(C-10), 105.2(C-15), 117.7(C-P2), 122.6(C-3²), 128.8(C-13), 128.8(C-3¹), 128.9(C-12), 131.8(C-2), 135.9(C-7), 136.0(C-3), 136.3(C-4), 137.8(C-11), 141.9(C-1), 142.8(C-P3), 145.0(C-8), 150.8(C-9), 149.6(C-14), 155.4(C-6), 161.2(C-16), 172.9(C-13², OH), 172.1(C-19), 172.9(C-17², CO₂), 189.6(C-13¹)

[0089] **실험예 2. 2 개의 폴피린계 화합물(porphyrin related compounds) 의 알도즈 환원효소 (AR) 억제활성**

[0090] 상기 실시예 5 에서 획득된 2가지 폴피린 화합물의 알도즈 환원효소에 대한 억제 활성을 상기 실험예 1과 같은 방법으로 실시하여, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0091] 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 페오폴바이드 에이는 알도즈 환원효소 억제활성에서 IC₅₀ 12.31±1.19 μM로 측정된 폴피린계 화합물 중 가장 높은 억제 활성을 나타낸 반면에, 페오피틴 에이는 알도즈 환원효소 억제활성을 나타내지 않았다.

표 2

연번	시료	IC ₅₀
		μM
1	페오폴바이드 에이	12.31 ± 1.19
2	페오피틴 에이	-
대조군	퀘르세틴	1.17 ± 0.17

[0093] **실험예 3. 다시마 조추출물 및 각 용매 분획물의 최종당화산물 (AGEs) 생성 억제활성**

[0094] 다시마 조추출물 및 각 용매 분획물의 최종당화산물 생성 억제 활성의 측정은 Vinson (Vinson J. A., J. Nutr. Biochem., 7, pp 659-663, 1996)가 사용한 방법을 수정하여 실시하였다.

[0095] AGE 반응 시약은 세균 증식을 막기 위해서 0.02% 아지드화 나트륨이 첨가된 50 mM 인산 나트륨 완충액 (pH 7.4)에 10 mg/ml의 소 혈청 알부민(bovine serum albumin) (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 0.2 M 과당(fructose)과 0.2 M 글루코오스(glucose)를 넣어 만든다. 10% DMSO에 녹인 추출물과 분획물은 1600, 800, 400, 200, 100, 50 μg/ml의 농도로, 화합물은 200, 100, 50, 25 μg/ml 의 농도로 희석 시킨다. AGE 반응 시약 950 μl에 반응시료 50 μl를 넣은 후, 37 °C에서 7 일간 배양한다. 배양 후, 반응 생성물의 형광강도를 분광형광검출기 (spectrofluorometric detector)로 여기 파장과 방출 파장을 350 nm과 450 nm에서 측정한다. 최종당화산물 생성 억제활성 실험 % 는 하기의 수학적 식 2로 구하였고, 선회귀 방정식을 사용하여 통계처리 하였다.

[0096] <수학적 식 2>

[0097] % 억제율 = 1-(시료의 흡광도-대조군의 흡광도)/표준흡광도×100

[0098] 그 결과, 표 3에서 나타난 바와 같이 에틸 아세테이트 가용성 분획물과 n-헥산 분획물에서 IC₅₀ 값이 150.32 ± 2.84 μg /mℓ 과 167.65 ± 1.76 μg /mℓ 로 강력한 최종당화산물 형성 억제 활성을 나타내었다.

표 3

[0099]

시료	IC ₅₀ (μg/mℓ)
다시마 조추출물	1206.08 ± 21.29
다시마 n-헥산 가용성 분획물	167.65 ± 1.76
다시마 에틸 아세테이트 가용성 분획물	150.32 ± 2.84
다시마 n-부탄올 가용성 분획물	-
다시마 수가용성 분획물	-
대조약물 (케르세틴)	86.77 ± 0.62

[0100] **실험예 4. 2 개의 폴피린계 화합물 (porphyrin related compounds) 의 최종당화산물 (AGEs) 생성 억제활성**

[0101] 상기 실시예 5에서 수득된 2 가지 폴피린계 화합물의 최종당화산물 생성 억제활성을 상기 실험예 3과 같은 방법으로 실시하여, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[0102] 하기 표 4에 나타난 바와 같이 2 가지 폴피린계 화합물 중에 페오폴바이드 에이이 IC₅₀ 49.43±1.32 μM로 강력한 최종당화산물 생성 억제 활성이 나타났다. 다음으로 페오피틴 에이이 IC₅₀ 228.71 ± 0.07 μM 로 대조약물인 아미노구아니딘과 비교하였을 때, 훨씬 높은 억제활성을 가지는 것으로 나타났다.

표 4

[0103]

연번	시료	IC ₅₀
		μ M
1	페오폴바이드 에이	49.43 ± 1.32
2	페오피틴 에이	228.71 ± 0.07
대조군	아미노구아니딘	735.63 ± 6.71

[0104] **실험예 5. 추출 용매에 따른 폴피린계 화합물 (porphyrin related compounds)의 추출 효능 분석**

[0105] 상기 실시예 1 의 에탄올 조추출물과 상기 실시예 2의 다시마 n-헥산 추출물에 대해서 활성 성분의 정량 분석을 위하여 HPLC 분석을 실시하였다.

[0106] 균질화 이후 5,000rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액을 취해 질소로 flushing하였다. 위의 과정을 3 회 반복 회수하였고, 이후 2 mL 이동상을 첨가하고 2,000rpm에서 2분간 원심분리 이후 상층액을 0.45μm filter로 필터 하여 2010pump(Jasco Europe S.R.L., Como, Italy)가 장착된 HPLC(Jasco Europ S.R.L., Como, Italy) system 을 이용하여 분석하였다.

[0107] HPLC의 분석조건은 UV 360 nm, 용매는 0.5M 암모늄 아세테이트와 메탄올의 80:20 혼합 용액 A, 메탄올과 아세톤의 70 : 30 혼합 용액 B로 만들고, A:B 100 : 0 혼합 용매를 35분간 흘려 보내고, ODS Hypersil column (5 um, 4.6 mm I.D. x 250 mm, 25 °C), 그리고 유속 0.8 mL/min였다.

[0108] 상기 실시예 1 의 에탄올 조추출물을 HPLC 실시한 결과를 도 1에, 상기 실시예 2의 다시마 n-헥산 추출물을 HPLC 실시한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0109] 도 1, 도 2에서 보는 바와 같이 페오폴바이드 에이 피크 (피크 1)와 페오피틴 에이 피크 (피크 2)를 각각 확인할 수 있으며, 각각의 추출물에서 페오폴바이드 에이, 페오피틴 에이이 주요 화합물이며, 다시마 n-헥산 추출물의 경우 추출능이 더 뛰어남을 확인할 수 있다.

도면

도면1

