

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국(43) 국제공개일
2012년 10월 11일 (11.10.2012)(10) 국제공개번호
WO 2012/138146 A9

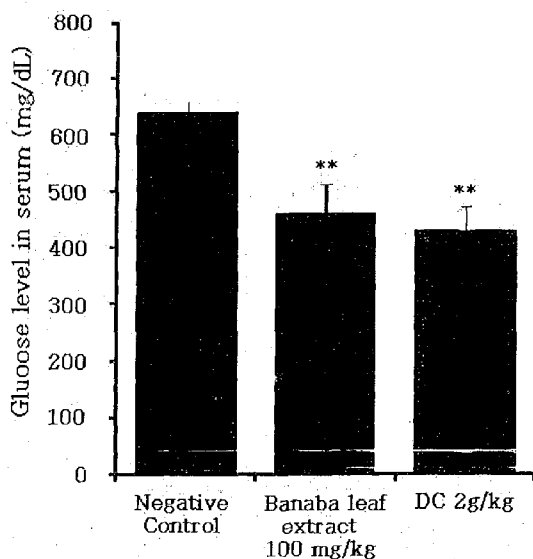
- (51) 국제특허분류: A61K 36/48 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002574
- (22) 국제출원일: 2012년 4월 5일 (05.04.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2011-0032805 2011년 4월 8일 (08.04.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 케이오씨바이오텍 (KOC BIOTEC CO., LTD) [KR/KR]; 305-811 대전 유성구 전민동 461-6 한남대학교 대덕밸리캠퍼스 사이언스파크 312 호, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 장동규 (JANG, Dong Gyu) [KR/KR]; 302-777 대전 서구 둔산2동 908 샘머리 아파트 222-804, Daejeon (KR). 김문일 (JIN, Wen Yi) [CN/KR]; 305-755 대전 유성구 어은동 99 한빛아파트 113-1305, Daejeon (KR). 김석무 (KIM, Seog Mu) [KR/KR]; 302-838 대전 서구 변동 252-77 목운 203 호, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 유병선 (YOU, Byung Sun); 302-282 대전 서구 월평동 241 만년오피스텔 610 호, Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING HEAT-TREATED POWDER OR EXTRACT OF GLYCINE SOJA AS ACTIVE GRADIENT FOR PREVENTION AND TREATMENT OF DIABETES MELLITUS AND DIABETIC COMPLICATIONS

(54) 발명의 명칭 : 돌콩의 열처리분말 또는 추출물을 유효성분으로 하는 당뇨병 및 당뇨합병증의 예방 및 치료를 위한 조성물

[Fig. 2]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing steamed powder or an extract of Glycine soja having a hypoglycemic effect as an active gradient for the prevention and treatment of diabetes mellitus and diabetic complications. The steamed powder or extract of Glycine soja of the present invention has excellent effects on hypoglycemic action and diabetic complications. The composition containing steamed powder or extract of Glycine soja as an active ingredient of the present invention is useful as a pharmaceutical composition or food composition for the prevention and treatment(improvement) of diabetes mellitus and diabetic complications.

(57) 요약서: 본 발명은 혈당강하 효과를 갖는 돌콩의 증자분말 또는 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 및 당뇨합병증의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 돌콩 증자분말 및 추출물은 혈당강하 및 당뇨합병증에 대해 탁월한 효과가 있다. 본 발명의 돌콩 증자분말 및 추출물을 유효성분으로 하는 조성물은, 당뇨병 또는 당뇨합병증의 예방 및 치료(개선)를 위한 약학적 조성물 및 식품조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.



KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못된 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(48) 본 정정판 공개일:

2013 년 1 월 3 일

(15) 정정사항에 관한 정보:

2013 년 1 월 3 일 자 공지 참조

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 돌콩의 열처리분말 또는 추출물을 유효성분으로 하는 당뇨병 및 당뇨합병증의 예방 및 치료를 위한 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 혈당강하 효과를 갖는 돌콩의 열처리분말 또는 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 및 당뇨합병증의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 당뇨병(diabetes mellitus)은 인슐린 분비가 감소되거나 인슐린의 기능이 저하되어 체내의 세포가 당을 이용하지 못하여 고혈당이 나타나는 질환이다. 당뇨병의 경우 인슐린을 비롯한 호르몬 불균형으로 탄수화물을 비롯한 단백질, 지질 및 전해질 대사 등 생리적 대사 조절 기능 이상으로 고혈당의 특징적인 증세를 나타내며, 이러한 고혈당 증세가 지속되면 혈액순환 장애, 망막손상, 신경세포 손상, 신장 기능 저하, 혈관 합병증 등을 유발하고 심각한 만성적 합병증을 가져오게 된다.
- [3] 특히, 정상인에 비해서 당뇨병환자에 있어서는 동맥경화증, 뇌경색, 뇌혈전, 심근경색과 같은 심혈관계 질환의 발병율이 높다(Fuller, J.H., Lancet, 1, pp1373-1376, 1980). 당뇨병환자는 관상동맥질환이나 뇌혈관질환에 의한 사망 위험률이 높고, 이는 고혈압과 고지혈증, 비만 등에 의해 흔히 발병된다(허갑범, 한국영양학회. 초록발표논문집. pp15-18, 1984). 제2형 당뇨병환자 중 67%가 한 종류 또는 그 이상의 지질대사 이상을 가지고 있다고 보고되었다(Harris, M.I. Diabetes Care, 23, pp754-758, 2000). 제2형 당뇨병환자는 중성지방 및 콜레스테롤 농도가 증가하고 HDL-콜레스테롤이 감소하는 지질대사의 이상이 일어나며(Goldberg, R.B. Diabetes Care, 4, pp561-572, 1981), 이것은 당뇨 합병증인 관상동맥 질환의 원인이 된다(Reaven, J.W. Am. J. Med., 83, pp31-40, 1987).
- [4] 당뇨병은 췌장 세포에서 분비되는 인슐린의 분비 장애 및 작용 부족에 의해 유발된 대사장애로 정의되며 포도당의 과잉생산, 체지방의 분해 및 단백질의 낭비를 수반하고 글루카곤의 분비를 비정상적으로 항진시켜 대사상의 혼란을 야기시킨다(Abrams, J.J., Ginsberg, H, et al., Diabetes, 31, pp903-910, 1982).
- [5] 진성 당뇨병 (Diabetes mellitus)은 두 가지 유형으로 특징 지워지는데, 제 1형 당뇨병 (Type 1 diabetes mellitus)은 혈액 내의 글루코스 (Glucose) 조절 호르몬인 인슐린 (Insulin)의 분비 결핍으로 야기되며, 주로 10~20대의 젊은 연령층에서 발병되기 때문에 소아당뇨병 (Juvenile diabetes)이라 불리기도 한다. 제2형 당뇨병 (Type 2 diabetes mellitus)은 주로 40대 이후에 발병되며, 우리나라 당뇨병 환자의 대부분을 차지한다. 제2형 당뇨병은 성인형 당뇨병이라 불리며

발병원인은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나, 유전적인 요인과 환경적 요인이 함께 관여되어 발생하는 것으로 알려져 있다. 제2형 당뇨병의 병인으로서는, 췌장베타세포에서의 인슐린 분비 장애와 표적세포에서의 인슐린 작용 결함(인슐린 저항성)이 모두 관찰된다.

- [6] 당뇨병 치료에 있어서 가장 중요한 목표는 혈당치를 가능한 정상치에 가깝게 조절하는 것인데, 공복혈당과 함께 식후 혈당 조절이 당뇨병 증세의 개선과 합병증의 예방 및 치료에 있어서 중요하며, 치료 방법으로 약물요법, 식이요법 및 운동요법이 있다.
- [7] 현재 제 1형 및 제2형 당뇨병환자에게 사용되는 경구혈당강하제로 알파-글루코시다제 (Alpha-glucosidase) 억제제, 설폰닐우레아 (Sulfonylurea) 제제 및 비구아니드 (Biguanide) 제제가 있다. 알파-글루코시다제 억제제는 섭취한 식이 중의 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시켜 식후 혈당 및 혈중 인슐린의 상승을 감소시킴으로써 당뇨병의 치료효과를 나타내는데, 고인슐린혈증이나 저혈당을 유발하지 않고, 인슐린분비를 촉진시키며 글루카곤 분비를 억제하는 글루카곤-유사-펩티드-1 (Glucagon-like peptide-1)의 소장에서의 분비를 촉진하는 장점을 가지고 있다(Mooradian, A.D., Thurman, J.E. et al., Drugs, 57, pp19-29, 1999; Baron, A.D. et al., Diabetes Research and Clinical Practice, 40, ppS54-S55, 1998). 그러나 알파-글루코시다제 저해제를 장기 복용한 경우, 일부 환자에 있어서 복부 팽만감, 구토, 설사 등 부작용을 나타낼 수 있어 그 사용이 제한될 수 있다 (Hanefeld, M. et al., Journal of Diabetes and its Complications, 12, pp228-237, 1998). 알파-글루코시다제 억제제로 현재 임상에서 사용하고 있는 것으로는, 아카보스 (Acarbose), 보글리보스 (Voglibose) 및 미글리톨 (Miglitol) 등이 있다. 설폰닐우레아 제제는 인체가 인슐린을 더 많이 배출하도록 하고, 인체가 인슐린에 반응하는 것을 도와주며, 또 간에 저장된 글루코오스를 혈액 속에 내보내는 것을 막아줌으로써 혈당을 낮춰준다. 설폰닐우레아 제제의 부작용으로는, 변비, 설사, 구역, 구토 등의 위장관 장애, 가려움, 두드러기 등의 피부반응, 체중 증가 등이 보고되어 있다. 이 계열에 속하는 약으로는, 글리메피리드(아마릴™), 글리피자이드(글루코트론™), 글리부라이드(다이아베타™) 등이 있다. 비구아니드 (Biguanide) 제제로는 메트포르민(글루코파지™)이 현재 시판되고 있는데, 비구아니드 제제는 간이 저장 포도당을 보다 서서히 내놓게 하고 또한 인체가 인슐린에 반응하는 것을 도와줌으로써 혈당을 보다 일정하게 유지시켜 준다. 비구아니드 제제의 부작용으로는, 구역, 팽만감, 갑갑함, 설사, 식욕부진 등이 보고되어 있다.
- [8]
- [9] 돌콩 (*Glycine soja* Siebold & Zucc.)은 콩과 (Zingiberaceae)에 속하는 덩굴성 1년초로 길이는 2m이며 전체에 갈색의 거친 털이 난다. 잎은 호생이고 잎자루는 길며 3출엽이다. 작은잎은 타원상 피침형으로 끝이 둔하고 길이는 3-8cm이고 가장자리는 밋밋하며, 턱잎은 넓은 피침형이다. 꽃은 7~8월에 홍자색으로

피는데 총상꽃차례는 길이 2~5cm이다. 꽃받침은 종형이고 털이 있으며 5개로 갈라진다. 화관은 나비모양이다. 수술은 10개로서 각각 2개로 갈라진다. 열매는 2~3cm로 털이 많고 콩꼬투리와 비슷하며, 종자는 타원형이거나 신장형 비슷하며 약간 편평하다 (이영노, 원색한국식물도감, (주)교학사, 403p, 1998). 돌콩은 이명으로 갱미두, 녹곽으로 불리며, 생약명으로는 야대두등(野大豆藤), 야료두(野料豆)로 불리운다 (안덕균, 한국본초도감, 교학사, 728p, 2000). 돌콩은 콩(*Glycine max*)의 기원종으로 여겨지고 있으며, 현재 식용 가능한 것으로 인정되고 있으나 실제 식용으로 이용되는 경우는 거의 없으며, 대부분 자연계에서 자생하고 있고 강한 유전자를 지니고 있어 콩의 유전적 개량 연구 등을 위해 일부 재배되기도 한다.

- [10] 콩과식물의 항당뇨효과와 관련하여, 한국 공개특허 제10-2006-0107183호에서는, 쥐눈이콩 또는 쥐눈이콩을 식초에 10일 정도 담가 절인 쥐눈이식초콩의 분말이나 추출물의 혈당강하 등의 항당뇨효과를 개시하고 있다. 쥐눈이콩은 콩과의 다년생 만초로 서목테, 여두 등으로도 불리는데, 예로부터 약성이 좋아 약콩으로 사용되고 있다. 특히 신장병, 혈액순환 등에 좋고 해독작용이 있으며 소갈증에 사용하는 것으로 알려져 있는데, 본초강목 등에도 약으로 기재되어 있다. 쥐눈이콩은 앞에서 설명한 돌콩에 비해 콩이 커 외관상으로도 돌콩과 잘 구분이 되는데, 돌콩과 달리 현재 식용으로도 많이 사용하고 있다.
- [11] 한국 공개특허 제10-2009-004503호에서는, 검정콩(*Glycine max*)껍질로부터 추출한 안토시아닌을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료용 약학조성물을 개시하고 있는데, 검정콩으로부터 추출한 안토시아닌이 체내 글루코스를 감소시키거나 또는 췌장세포의 자멸사를 억제함으로써 당뇨를 예방 또는 치료하는 효과가 있다고 기재하고 있다. 한국 공개특허 제10-2010-0127728호에서는, 저농도 저급 알코올로 추출한 콩 추출물 또는 그 분획물이 혈액순환 개선효과가 우수하고, 비만상태를 개선시키며, 당뇨, 고지혈증 등의 예방, 증상 완화 또는 치료에 효과적이라고 기재하고 있다. 한국 공개특허 제10-2006-0107183호에서는, 쥐눈이콩 및 쥐눈이식초콩 분말 또는 추출물이, 당뇨가 유발된 실험쥐에서 높은 인슐린감수성을 가짐으로써 식이이용효율증가, 혈당강하효과 및 장기의 무게를 감소시키는 등의 효과를 나타낸다고 기재하고 있다. EP 2172206에서는, 콩과식물로부터 당뇨병 치료효과가 있는 세콰이톨(sequoyitol) 함유 추출물을 얻는 방법을 개시하고 있다. 그러나 상기 문헌들에 개시된 콩과식물의 항당뇨효과는, 유효성분으로 알려진 안토시아닌이나 세콰이톨에 기반한 것으로, 콩 추출물 자체는 유의성이 없거나 낮은 혈당강하효과를 보이는 정도에 불과하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명은 생체에 부작용이 없으면서 혈당강화작용이 우수한, 당뇨병 예방 및 치료를 위한 새로운 약학적 조성물 및 식품소재를 제공하고자 하는 것이다. 특히, 본 발명은 기존 콩과 식물에 대해 알려져 있는 항당뇨 효과와 다른 매우 현저한 항당뇨 효과가 돌콩에 있음을 예기치 않게 발견하고 효과를 확인한 것으로서, 본 발명은 항당뇨 효과가 매우 뛰어난 돌콩 증자분말 및 추출물을 제공함으로써 안전하면서도 효과 높은 당뇨병 예방 및 치료를 가능하게 하는 것을 목적으로 한다. 이를 위해 본 발명에서는, 돌콩의 증자분말 및 추출물의 약리학적 효과를 db/db 생쥐모델을 이용한 실험을 통해 확인한다.
- [13] 본 발명의 목적은 탁월한 혈당강화 효과를 갖는 돌콩의 증자분말 또는 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 및 당뇨합병증의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 또한, 본 발명의 목적은 탁월한 혈당강화 효과를 갖는 돌콩의 증자분말 또는 추출물을 당뇨병 및 당뇨합병증의 예방 및 개선을 위한 유효성분으로 함유하는 식품조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명에서는,
- [16] 돌콩(*Glycine soja*)의 열처리된 분말 또는 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 또는 당뇨합병증의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물이 제공된다.
- [17] 상기 돌콩 추출물은, 추출물을 다시 물 또는 탄소수 1 내지 4의 유기용매로 분획하여 얻은 분획물을 포함한다.
- [18] 상기 당뇨합병증은 동맥경화증, 뇌경색, 뇌혈전, 심근경색증, 고혈압, 고지혈증, 비만증 등을 포함한다.
- [19] 또한, 본 발명에서는,
- [20] 당뇨합병증의 예방 및 개선을 위한 유효성분으로 함유하는 식품 조성물이 제공된다. 상기 식품 조성물은, 특히 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 중 어느 하나의 형태를 갖는 건강기능식품을 포함한다. 또한, 상기 식품은 음료, 분말음료, 고형물, 츄잉검, 차, 비타민 복합제, 식품 첨가제 중 어느 하나의 형태를 가질 수도 있다.

발명의 효과

- [21] 본 발명에서는 db/db 생쥐모델을 이용한 혈중 포도당 측정실험, 혈청중 중성지방, 총콜레스테롤 등의 다양한 시험을 통해, 본 발명에 따라 얻어진 돌콩의 증자분말 및 추출물이, 탁월한 혈당강화 효과와 더불어 지질대사 개선 등 당뇨병에 의한 합병증에 탁월한 치료 효과가 있음을 확인하였다. 본 발명의 돌콩 증자분말 및 추출물은 기존에 콩과식물에 대해 알려져 있는 항당뇨 효과를 훨씬 뛰어넘는 월등한 새로운 효과가 있는 것으로, 이를 유효성분으로 하는 본 발명의 조성물은 당뇨병 또는 당뇨 합병증의 예방 및 치료(개선)를 위한 약학적 조성물 및 식품조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23]

도 1은 각 실험군별로 약물(시험물질)을 3주간 경구투여하면서(DC 2 g/kg, 바나바 추출물 100 mg/kg, 생리식염수) 주 1회 꼬리정맥에서 채혈한 혈액의 혈당을 측정된 결과이다 (수치는 mean $\pm$ SEM으로 표시하고 서로 상이한 표시를 갖는 수치는 개개 특정시간 시점에서 서로 상이함; 통계학적으로 T 시험법에 의하여 음성 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의함 (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)).

[24]

도 2는 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 포도당(glucose) 변화를 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[25]

도 3은 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 중성지방 (triglyceride, TG) 변화를 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[26]

도 4는 각 실험군별로 약물(시험물질)을 6주간 경구투여하면서 주 1회 꼬리정맥에서 채혈한 혈액의 혈당을 측정된 결과이다 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

[27]

도 5는 10주령에서 실험 종료 후 혈청중 포도당(glucose) 수준을 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[28]

도 6은 10주령에서 실험 종료 후 혈청중 중성지방(TG) 변화를 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[29]

도 7은 10주령에서 실험 종료 후 혈청중 총 콜레스테롤양을 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[30]

또 11은 10주령에서 실험 종료 후 혈청중 저밀도-콜레스테롤양을 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[31]

도 9는 10주령에서 실험 종료 후 혈청중 고밀도-콜레스테롤양을 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[32]

도 10은 10주령에서 실험 종료 후 혈청중 ALT와 AST 수준을 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[33]

도 11은 10주령에서 실험 종료 후 혈청중 인슐린 수준을 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[34]

도 12는 실험이 종료된 10주령의 *db/db* 생쥐에서 각 실험동물을 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 중량을 측정된 결과이다 (* $p < 0.01$).

[35]

도 13은 각 실험군별로 약물(시험물질)을 5주간 경구투여하면서 주 1회 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 측정된 결과이다 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

[36]

도 14는 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 중성지방(TG) 수준을 측정된 결과이다 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

[37]

도 15는 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 총콜레스테롤 수준을 측정된 결과이다 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

- [38] 도 16은 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 저밀도-콜레스테롤 및 고밀도-콜레스테롤양을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [39] 도 17은 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 ALT와 AST 수준을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [40] 도 18은 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 인슐린 수준을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [41] 도 19는 실험 종료된 10주령의 *db/db* 생쥐에서 각 실험동물의 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 중량을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [42] 도 20은 각 실험군별로 약물(시험물질)을 5주간 경구투여하면서 주 1회 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [43] 도 21은 9주령에서 혈청중 혈당 수준을 측정 한 결과이다.
- [44] 도 22는 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 중성지방(TG) 수준을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [45] 도 23은 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 총콜레스테롤 수준을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [46] 도 24는 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 저밀도-콜레스테롤 및 고밀도-콜레스테롤 양을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [47] 도 25는 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 ALT와 AST 수준을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [48] 도 26은 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 인슐린 수준을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [49] 도 27은 실험 종료된 10주령의 *db/db* 생쥐에서 각 실험동물의 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 중량을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [50] 도 28은 실험 종료된 10주령의 *db/db* 생쥐에서 간조직 (liver)을 적출하여 총 중량을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [51] 도 29는 각 실험군별로 약물(시험물질)을 6주간 경구투여하면서 주 1회 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [52] 도 30은 각 실험군별로 약물(시험물질)을 6주간 경구투여하면서 주 1회 체중 변화를 측정 한 결과이다.
- [53] 도 31은 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 중성지방(TG) 수준을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [54] 도 32는 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 총콜레스테롤 수준을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [55] 도 33은 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 저밀도-콜레스테롤 및 고밀도-콜레스테롤 양을 측정 한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [56] 도 34는 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 BUN 수준을 측정 한 결과이다

- (**p<0.01, ***p<0.001).
- [57] 도 35는 9주령에서 실험 종료 후 혈청중 인슐린 수준을 측정한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [58] 도 36은 실험 종료된 10주령의 *db/db* 생쥐에서 각 실험동물의 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 중량을 측정한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [59] 도 37은 실험 종료된 10주령의 *db/db* 생쥐에서 각 실험동물의 간조직 (liver)을 적출하여, 총 중량을 측정한 결과이다 (**p<0.01, ***p<0.001).
- [60] 도 38 내지 40은 DC60-1, DC60-2, DC5 및 DC25 중의 유효성분을 분석한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [61] 본 발명의 약학적 조성물 또는 식품 조성물은 당뇨 및 당뇨합병증의 예방 및 치료(개선)를 위한 유효성분으로 돌콩(*Glycine soja*)의 열처리된 분말 또는 추출물을 함유한다.
- [62] 상기 당뇨합병증은 당뇨와 관련하여 생긴 질환을 의미하며, 한정되는 것은 아니나 특히 동맥경화증, 뇌경색, 뇌혈전, 심근경색증, 고혈압, 고지혈증, 비만증을 포함한다.
- [63] 본 발명에서 정의되는 "돌콩"은 학명이 "*Glycine soja* Siebold & Zucc."로, 콩과(Zingiberaceae)에 속하는 덩굴성 1년초이며, 이명으로 갱미두, 녹곽 등으로 불리고, 생약명으로 야대두등(野大豆藤), 야료두(野料豆)로 불리는 식물이다. 돌콩 열매는 2~3cm로 털이 많고 콩꼬투리와 비슷하다. 돌콩 종자는 타원형이거나 신장형 비슷하며 약간 편평한데, 본 명세서에서 "돌콩" 또는 "돌콩 종자"는 이것을 의미한다. 본 발명에서 "돌콩분말"은 돌콩 종자를 익히지 않고 건조시킨 건조상태의 분말을 의미한다. 본 발명에서 돌콩은 자연계에서 자생하는 것이나 재배된 것 모두 이용 가능하다. 본 발명에서 돌콩의 "열처리된 분말"은 돌콩 또는 돌콩분말을 100°C 이하로 열처리하여 얻은 돌콩분말을 의미한다. 본 발명에서 돌콩의 "증자분말"은 돌콩 또는 돌콩분말을 100°C 이하로 증자시켜 얻은 분말을 의미한다.
- [64] 본 발명의 약학적 조성물 또는 식품 조성물에서 유효성분으로 함유되는 돌콩(*Glycine soja*)의 열처리된 분말은 바람직하게는 돌콩분말을 40~100°C로 열처리하여 얻은 것이며, 더욱 바람직하게는 돌콩분말을 60~90°C로 증자시켜 얻은 증자분말이다.
- [65] 본 발명의 조성물에 유효성분으로 함유되는 돌콩 추출물은, 돌콩분말에 시료 중량의 약 2 내지 15배, 바람직하게는 약 5 내지 10배에 달하는 부피의 용매를 가하고 바람직하게는 100°C 이하, 더욱 바람직하게는 0~100°C로 추출하여 얻은 것이며, 특히 바람직하게는 0~90°C로 추출하여 얻은 것이다. 상기 용매로는, 바람직하게는 물 또는 탄소수 1 내지 4의 유기용매, 또는 이들의 혼합용매를

사용하며, 특히 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등) 및 이들의 혼합용매 중에서 선택된 어느 하나의 극성 용매를 사용한다. 추출방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 공지의 추출방법을 적용할 수 있으며, 바람직하게는 90°C 이하의 온수 추출한 후 감압여과 및 농축하여 본 발명의 돌콩 추출물을 수득할 수 있다. 상기 돌콩 추출물은, 추출물을 다시 물 또는 탄소수 1 내지 4의 유기용매로 분획하여 얻은 분획물을 포함한다. 돌콩 분획물은 상기 돌콩 추출물에 대해 통상의 분획 공정을 수행하여 수득할 수 있다 (Harborne J.B. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd Ed., pp6-7, 1998).

[66] 상기 돌콩분말은 자연상태에서 자생하는 돌콩 또는 재배된 돌콩을 수확하여 통상적인 건조방법에 따라 건조시킨 후 분쇄기로 갈아 제조할 수 있다. 상기 돌콩분말은 돌콩분말을 제조한 후 동결건조시킨 것을 포함한다.

[67]

[68] 본 발명에서는, 상기와 같은 방법으로 얻은 돌콩 증자분말 및 추출물에 대해 db/db 생쥐모델을 이용한 다양한 실험을 통해 항당뇨 및 당뇨합병증에 대한 치료효과를 확인할 수 있었다. 제2형 당뇨 동물모델인 BKS.Cg-m^{+/+}Lepr^{db/j} 생쥐에서의 항당뇨 효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 변형하여 하기 실시예 및 실험예와 같은 방법으로 실험을 수행하였다 [Am J Physiol Endocrinol Metab. 288: E510-E518(2005); Diabetologia 49: 1647-1655(2006); J. Ethnopharmacol. 103: 491-495 (2006); J. Med. Chem. 43: 3487-3494(2003); Metabolism 50: 1049-1053(2001); Nutrition & Metabolism 53: 488-499(2004)].

[69]

[70] 먼저, 본 발명의 돌콩 증자분말에 대하여, 최근 연구에서 제2형 당뇨에 효능이 보고된 바나바엽을 양성 대조군으로 하여, 항당뇨 및 당뇨합병증에 대한 치료효과를 확인하였다 [실험예 1]. 바나바엽은 열대나 아열대지방에서 자생하고 있는 다년생 상록수인 바나바 (*Lagerstroemia speciosa* Pers.)의 잎으로, 주요성분으로 콜로소린산 (Corosolic Acid), 아연, 철분, 칼슘, 마그네슘 등이 포함되어 있으며, 활성성분 중 콜로소린산 (Corosolic Acid)은 잎 마다 차이는 있지만 평균적으로 0.1 ~ 0.35% 정도가 들어 있는데, 최근 연구에서는 상기 콜로소린산이 인슐린과 동일하게 글루코스를 세포내에 신속하게 흡수시키는 것 즉, 포도당 운반체(Glucose Transporter)를 활성화시키는 기능을 하여 혈당 강하작용 및 정상혈당에 영향을 미치지 않으면서 혈당치의 재상승을 억제하는 작용 등을 하는 것으로 확인되었다.

[71] 6주령의 db/db 생쥐모델에 양성대조군으로 바나바추출물 100mg/kg, 시험군으로 본 발명의 돌콩 증자분말(DC) 2g/kg, 그리고 음성대조군(NC)으로 같은 양의 생리식염수를 오전과 오후에 일일 2회 3주간 경구투여 하였다. 그 결과 도 1에서 보듯이 음성대조군(NC)의 혈당은 6주령 342.1 mg/dL에서 9주령에는 582.1 mg/dL로 70% 이상 증가하였으나, 본 발명의 DC 투여군은 6주령에서 9주령까지

비투여군에 비하여 혈당변화가 크게 억제되는 것으로 나타났다. 9주령에서 DC 투여군은 360.5 mg/kg으로 비투여군에 비하여 37.9%의 큰 혈당 감소를 나타내었다. 9주령에서 실험 종료 후 측정된 혈청중 포도당(glucose) 변화에서는 비투여군(NC)의 포도당(glucose) 수준이 641 mg/dL이었고, 본 발명의 DC 투여군이 427.0mg/dL로 비투여군에 비하여 33.4%의 큰 감소를 나타내었다(도 2).

[72] 제2형 당뇨병 환자들에서 흔히 볼 수 있는 지질대사 이상으로 인한 고지혈증은 고중성지방혈증이 가장 높은 빈도로 나타나며, 이와 같이 혈중 중성지방 (TG)의 증가는 인슐린 저항성을 촉진시켜 혈당조절을 더욱 악화시키게 되는 요인으로 동맥경화 질환으로 발병하게 되는 원인을 제공한다. 같은 실험에서 9주령에서 실험 종료 후 혈청을 분리하여 측정된 혈청중 중성지방(TG) 변화에서는 비투여군의 중성지방 (TG) 수준이 67.0 mg/dL이었고, 본 발명의 DC 투여군이 37.0 mg/dL로 비투여군에 비하여 44.7% 이상의 통계학적으로 유의성 있는 큰 감소를 나타내었다 (도 3).

[73] 이상의 실험을 통해 본 발명의 돌콩 증자분말(DC)이 *db/db* 생쥐에서 비투여군과 비교하여 유의적으로 ($p<0.01$, $p<0.001$) 혈당 및 중성지방 수준을 감소시켰고, 감소의 정도가 양성대조군으로 사용된 바나바추출물 보다도 월등하게 높다는 것을 확인할 수 있었다. 특히 본 발명의 돌콩 증자분말(DC)은 금식 후 고혈당증 (fasting hyperglycemia)을 완화시키는 혈당강하 효능이 관찰되었다. 또한, 급성독성실험을 통해 본 발명의 DC가 안전한 약물 및 식품 소재임을 확인할 수 있었다.

[74]

[75] 또한, 본 발명의 돌콩 증자분말과 최근 당뇨병 치료에 가장 널리 사용되고 있는 메트포르민의 항당뇨 효능을 비교시험함으로써 본 발명의 돌콩 증자분말의 효능을 확인하였다 [실험예 2]. 메트포르민은 당을 새로 생성하는 효소(gluconeogenic enzymes)를 억제하여 간에서 당의 생성을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는, 본 발명의 돌콩 증자분말(DC)과 양성대조군인 메트포르민을 각각 6주간 투여하면서 혈당변화를 측정하였다. 그 결과 DC와 메트포르민 투여군 모두 비투여군(NC)에 비하여 혈당변화가 억제되는 것으로 나타났으며, 본 발명의 DC는 메트포르민 보다 높은 혈당 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 10주령에서 비투여군(NC) 545.8mg/dL에 비하여 본 발명의 DC 투여군은 240.5 mg/dL로 55.9% 이상의 통계학적으로 유의성 있는 큰 혈당 감소를 나타내었다.

[76] 메트포르민의 주요 효과 중 하나는 인슐린민감성 (insulin sensitivity)을 개선시키는 것이다. 이 메트포르민이 인슐린민감성을 증가시키는 주된 기전은 내인성 당생성(endogenous glucose production)을 감소시키는 것이고, 그 중에서도 주로 당신생 (gluconeogenesis)을 감소시킨다. 또 메트포르민은 유리지방산 수치 (FFA level)를 낮추는 것으로도 알려져 있다. 현재까지의 연구결과들을 보면, 이상 지질혈증을 가진 제2형 당뇨병 환자에서 메트포르민은 총콜레스테롤과

LDL콜레스테롤을 유의하게 떨어뜨리고, 또 통계적으로 의미는 없지만 중성지방(TG)을 낮추고 HDL콜레스테롤을 높여주는 추세(trend)가 관찰되고 있다. 본 발명의 실험에서도 메트포르민 투여군에서 총콜레스테롤 수치와 LDL-콜레스테롤 수치, 그리고 중성지방 수치가 비처리군(NC)에 비하여 현저하게 감소되는 결과를 나타내었고, 본 발명의 DC 투여군은 이러한 메트포르민 보다는 총콜레스테롤 수치와 LDL-콜레스테롤 수치, 그리고 중성지방(TG) 수치가 더욱 현저하게 통계학적 유의성 있게 감소되는 경향을 나타내었다(도 6 내지 도 8). 이러한 결과는 본 발명의 DC가 혈행개선 효과가 탁월함을 시사한다.

[77] 본 발명의 실험에서 혈청중 인슐린 수준은 비투여군(NC)이 5.72ng/ml이었고, DC 투여군은 4.07mg/dL로 비투여군에 비하여 28.8%의 인슐린 감소를 나타내었으나 통계학적 유의성은 나타나지 않았다. 그리고 메트포르민 투여군과 대두 분말 투여군도 비투여군에 비하여 약간 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 이러한 결과는 메트포르민과 유사하게 본 발명의 DC가 혈당의 억제 효능과 더불어 제2형 당뇨병의 문제점인 인슐린에 대한 저항성을 개선 효능이 있음을 시사하는 것이다.

[78] 이상의 실험을 통해 본 발명의 돌콩 증자분말(DC)이 db/db 생쥐에서 양성대조군인 메트포르민 및 비투여군과 비교하여 유의적으로 혈당, 중성지방, 총콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤 수준을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 본 발명의 DC 투여군은 공복 후 고혈당증(fasting hyperglycemia)을 완화시키는 혈당강하 효능과 인슐린에 대한 저항성을 개선시키는 효능 등 혈행개선 효과가 관찰 되었다.

[79]

[80] 또한, 4주령의 db/db 생쥐모델에서 돌콩분말(1.5 g/kg/day), 물추출물(300 mg/kg/day), 메탄올추출물(300 mg/kg/day), 헥산층분획물(100 mg/kg/day), 부탄올층분획물(100 mg/kg/day), 에틸아세트층분획물(100 mg/kg/day), 물층분획물(100 mg/kg/day)을 경구투여 하여 5주간 혈당 강하 효과를 측정하였다[실험예 3]. 그 결과 대조군 대비, 돌콩의 시험군들 모두 통계학적으로 유의성(최소 $p < 0.01$ 이상) 있게 현저한 혈당 감소효과를 나타내었다.

[81] 9주령에서 돌콩분말(DC-p) 투여군은 대조군(NC)에 비하여 264.7 mg/dL로 49% 감소하였고, 추출물들에 있어서는 물추출물(DC-WE)이 223.0 mg/dL로 57% 감소효과를, 메탄올 추출물(DC-ME)이 294.6 mg/dL로 43% 감소효과를 나타내었다. 용매분획물들에 있어서는 물층분획물(DC-WF)이 179.4 mg/dL로서 65%의 혈당 감소효과를, 에틸아세트이트층분획물(DC-EF)이 253.9 mg/dL로서 51%의 감소효과를, 부탄올층분획물(DC-BF)이 275.0 mg/dL로서 47%의 감소효과를, 헥산층분획물(DC-HF)이 346 mg/dL로서 33%의 감소효과를 나타내었다.

[82] 또한, 시험군들 모두에서 체중, 지방조직(adipose tissue) 무게, 혈청 중 ALT 및

AST에 있어서 통계학적으로 유의적인 변화를 나타내지 않았으므로, 독성이 없는 것으로 평가되었다.

- [83] 결론적으로 제2형 당뇨 동물모델에 있어서 돌콩의 증자분말, 돌콩의 물 또는 유기용매추출물, 이들 추출물의 용매분획물들은 모두 대조군에 비하여 혈당조절, 인슐린 저항성 및 지질대사 개선효과가 우수한 것으로 나타나, 돌콩 증자분말 또는 돌콩 추출물의 섭취는 공복 후 고혈당증 (fasting hyperglycemia)을 완화시키는 혈당강하 효능과 인슐린에 대한 저항성을 개선시키는 효능 등이 뛰어난 것으로 평가되었다.

[84]

- [85] 4주령의 db/db생쥐모델에 9주령까지 온도별 돌콩 추출물인 DC60 추출물, DC80추출물, DC100추출물, DC40E추출물을 경구투여 하여 5주간 혈당 강하 효과를 측정 하였다 [실험예 4]. 그 결과 대조군 642.0 mg/dl에 비하여 DC80 추출물 투여군이 400.5 mg/dl로 37.6%의 혈당 감소가 있었고 통계학적으로 유의성 ($p < 0.01$)을 나타내었다. 또한, DC80, DC100, 그리고 DC40E 투여군에서 중성지방(TG), 총콜레스테롤, LDL-cholesterol, 복부 지방무게, 간무게, 그리고 인슐린 저항성이 비투여 대조군에 비하여 감소한 것으로 나타났다.

[86]

- [87] 또한, 본 발명의 돌콩 추출물(DC5, DC25) 및 칼럼 분획물들(DC60-1, DC60-2), 그리고 종래에 콩과 식물 또는 다른 천연물에서 유래된 항당뇨 유효물질로 알려진 안토시아닌(Anthocyanins), 피니톨(Pinitol), 그리고 바나바와 크롬복합물(BANABA)의 효능을 비교하는 검증시험을 실시하였다 [실험예 5]. 9주령에서 혈당저하 효과는 시험시료들 모두에서 나타났고, 그 효력은 Pinitol (52.1%) > DC25 (47.6%) > DC60-2 (38.6%) > DC5 (34.6%) = BANABA (34.6%) > Anthocyanins (26.5%) = DC60-1 (25.8%) 순으로 강하게 나타났다. 9주령에서 DC25와 Anthocyanins을 제외한 모든 시료들에서 인슐린저항성 억제 효과가 나타났고, 그 효력은 BANABA (82.4%) > DC60-1 (67.6%) > DC5 (60.9%) = DC60-2 (59.8%) > Pinitol (35.3%) 순으로 강하게 나타났다. 실험에 사용한 Pinitol과 BANABA는 유효성분만을 분리 정제하여 고용량으로 사용하거나 일반적인 투여량 보다 높여 사용한 것인데, 본 발명의 시험군은 이러한 비교시험군과도 대등한 효능을 보여 혈당강하 및 인슐린저항성 억제에 대한 분명한 효능을 확인할 수 있었다.

[88]

- [89] 본 발명의 돌콩 추출물의 항당뇨 효과가 종래 일반적인 콩에서 알려져 있는 유효물질(세퀴이톨, 키로-이노시톨, 피니톨)에 의한 것인지 확인하기 위하여 함유 여부 및 함유량을 분석하는 실험을 실시하였다 [실험예 6]. 분석결과, DC60-1, DC60-2, DC5, DC25 모두에서 세퀴이톨과 키로-이노시톨은 검출되지 않았다. 피니톨은 일부 함유되어 있었는데, 실험예 5의 결과를 참고할 때 피니톨 함유량과 시험물질의 혈당저하 효과는 비례하지 않는 것으로 나타났다 (실험예

5의 2-1 및 도 29 참조). 이러한 결과는 본 발명의 조성물에 함유된 돌콩 증자분말 또는 추출물의 유효성분이 기존에 알려져 있는 콩과식물의 유효성분과 다름을 보여주는 것이다.

[90]

[91] 돌콩은 오랫동안 식용되거나 생약으로 사용되어 오던 식품재 및 약재로서 이로부터 얻은 본 발명의 증자분말이나 추출물들 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없다. 그리고, 이점은 본 발명에서 급성독성실험을 통해 다시 한 번 확인되었다.

[92]

[93] 상기 본 발명의 돌콩 증자분말 또는 추출물을 함유하는 당뇨병 또는 당뇨합병증의 예방 및 치료용 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 증자분말 또는 추출물을 0.1 내지 99.9 중량%로 포함한다.

[94] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[95] 본 발명의 추출물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[96] 본 발명의 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스 (Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 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, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의

기제로는 위텡솔 (Witepsol), 마크로골, 트윈 (Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[97] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 증자분말이나 추출물은 1일 0.0001 내지 10000 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[98] 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (Intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[99] 본원 발명의 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향료 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).

[100]

[101] 상기 본 발명의 돌콩 증자분말 또는 추출물을 함유하는 당뇨병 또는 당뇨합병증의 예방 및 개선용 식품 조성물은 총 중량에 대하여 상기 증자분말 또는 추출물을 0.1 내지 99.9 중량%로 포함한다. 상기 식품은 특히 건강기능식품을 포함한다. 본 발명에서 정의되는 "건강기능식품"은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 상기 건강기능식품은 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 중 어느 하나의 형태를 가질 수 있다.

[102] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 상기 돌콩의 증자분말 또는 추출물을 혈당 개선, 지질대사 개선 및 당뇨합병증의 예방 및 치료 효과를 목적으로 다양한 식품 또는 음료 등에 첨가한 형태의 식품 조성물이 될 수 있으며, 특히 건강보조식품의 형태로 제공될 수 있다. 상기 식품은, 예를 들어, 음료, 분말음료, 고형물, 츄잉검, 차, 비타민 복합제, 식품 첨가제 중 어느 하나의 형태를 가질 수 있다.

[103] 본 발명의 식품 조성물은 필수 성분으로 상기 돌콩의 증자분말 또는 추출물을 함유하는 것 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 식품이나 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 다양한 성분을 추가로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의

향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[104] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 시료는 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 전체 중량 중 0 내지 약 20 중량%의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[105]

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

[107]

[108] <실시예 1> 돌콩 증자분말의 제조

[109] 1. 돌콩분말

[110] 돌콩은 경북 문경시 우지동에서 자생하는 돌콩을 채집하여 사용하였다. 채집된 돌콩을 건조시킨 후 믹서로 분쇄하여 돌콩분말을 얻었다.

[111] 2. 돌콩 증자분말

[112] 1에서 얻은 돌콩분말을 약 80°C에서 2시간 정도 증자시켜 돌콩의 열처리된 분말을 얻었다 (이하, "DC"라 함).

[113]

[114] <실시예 2> 돌콩 추출물 및 분획물의 제조

[115] 1. 돌콩 물 추출물

[116] 상기 실시예 1의 1에서 제조된 돌콩분말 1kg에 물 10ℓ를 가하여 60°C에서 4시간동안 추출한 다음, 여지(와트만사, 미국)로 감압여과한 후 여액을 모아 진공회전농축기로 45°C에서 감압농축하여 돌콩분말의 물추출물(이하, "DC-WE"라 함) 130g을 수득하였다.

[117] 2. 돌콩 메탄올 추출물

[118] 상기 실시예 1의 1에서 제조된 돌콩분말 1kg에 메탄올 10ℓ를 가하여 60°C에서 4시간동안 추출한 다음, 여지(와트만사, 미국)로 감압여과한 후 여액을 모아 진공회전농축기로 37°C에서 감압 농축하여 돌콩분말의 메탄올추출물(이하, "DC-ME"라 함) 180g을 수득하였다.

[119] 3. 돌콩 용매분획물

[120] 상기 2에서 제조된 돌콩 메탄올 추출물 100g을 증류수 2L에 현탁시키고, 동량의 헥산을 넣고 진탕한 후 2회 분획하여 헥산층과 물층으로 분리하였다. 분리된 물층에 동량의 에틸아세테이트를 가하여 진탕한 후 2회 분획하여 에틸아세이트층과 물층으로 분획하였다. 다시 분리된 물층에 동량의 수포화부탄올을 가하여 진탕한 후 2회 분획하여 부탄올층과 물층으로 분리하였다. 유기용매분획물들은 각각 감압건조하고, 수층분획물은 동결건조하여, 헥산층 분획물(이하, "DC-HF"라 함) 19.6g, 에틸아세테이트층분획물(이하, "DC-EF"라 함) 12.7g, 부탄올층분획물(이하, "DC-BF"라 함) 29.0g, 물층 분획물(이하 "DC-WF"라 함) 27.7g을 수득하였다.

[121]

[122] <실시예 3> 돌콩의 온도별 추출물 제조

[123] 상기 실시예 1의 1에서 제조된 돌콩분말 1kg에 물 10ℓ를 가하고 각각 60°C, 80°C, 100°C에서 4시간동안 추출한 다음, 여지(와트만사, 미국)로 감압여과한 후 여액을 모아 진공회전농축기로 45°C에서 감압농축하여 각각의 온도별 물 추출물들인 DC60 추출물, DC80 추출물, DC100 추출물을 제조하였다. 또한 물 대신 에탄올을 사용하고 40°C에서 추출하는 것을 제외하고는 동일하게 실시하여 에탄올 추출물인 DC40E 추출물을 제조하였다.

[124]

[125] <실험예 1> 돌콩 증자분말의 당뇨 및 당뇨합병증에 대한 효과

[126] 1. 재료 및 방법

[127] 1-1. 시험물질 및 투여방법

[128] 상기 실시예 1의 2에서 얻은 돌콩 증자분말을 생리식염수에 희석시켜 1일 2회 경구투여하였다 (오전 10시, 오후 6시). 양성대조군은 바나바추출물 (Banaba leaf extract, 구입처: 웰리스바나바(주), 성상: 갈색 tablet)을 분말로 만든 후에 생리식염수에 녹여 동일하게 1일 2회 경구투여하였다 (오전 10시, 오후 6시). 음성대조군은 동일한 양의 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하였다.

[129]

[130] 1-2. 항 당뇨병제 투여 효능평가 예비 동물실험

[131] 6주령의 수컷 db/db 마우스(26g, Taconic Farms, Inc.)를 이용하여 각각의 항 당뇨병제 투여군마다 7마리씩 3개 군으로 분류한 다음 온도 22±2°C, 습도 55±10% 및 12시간 간격의 명암으로 조절되는 SPF (specific pathogen free) 사육환경 하에서 유지하면서 시료 투여 후 0, 3, 6, 9, 12 및 15일에 체중과 혈당을 측정하여 각각의 시료별로 혈당강하 효능이 확인되는 적절한 농도를 선택하였다.

[132]

[133] 1-3. 항 당뇨병제 투여 효능평가 동물실험 및 시료 채취

[134] 비만이면서 당뇨병 증상이 나타나는 6주령의 수컷 db/db 마우스는 인위적으로 유전적변이를 일으켜 렙틴(leptin)의 피드백 신호전달을 차단하여 성장함에 따라

체중과다와 함께 제2형 당뇨병이 유발되도록 한 실험용 생쥐로서 이 생쥐모델을 대상으로 시료를 경구투여 하였다. 실험군은 3개군으로 나누어 db/db 마우스를 각 군당 7마리씩 무작위로 배정하였다. 1개군은 시험군으로 돌콩 증자분말(DC) 2g/kg를 매일 오전 10시와 오후 18시에 경구투여하였으며, 1개군은 양성대조군으로 바나바 추출물(banaba leaf extract) 100mg/kg을 동일한 방법으로 투여하였고, 1개군은 음성대조군으로 동량의 생리식염수를 같은 방법으로 투여하였다. 각 군의 사육조건은 예비 동물실험과 동일하게 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 10\%$ 및 12시간 간격의 명암으로 조절되는 SPF 환경을 유지하였다. 투여 0, 7, 14, 21일에 체중과 혈당 변화를 휴대용 혈당계 (OneTouch™, Johnson & Johnson, USA)를 사용하여 측정하였으며, 실험군별로 평균값을 나타내었다.

[135]

[136] 1-4. 혈액분석부검 및 병리조직분석

[137] 위와 같은 실험군의 동물들로부터 혈액을 채혈하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상층액 혈장을 분리하여 글루코오스 및 트리글리세라이드에 대한 분석을 시행하였다. 혈액 내 당 지질 및 기타 장기독성 등과 관련된 혈액생화학적 지표들에 대하여 대조군과의 차이를 통계학적 방법 (student t-test)을 이용하여 유의성 분석을 수행하였다.

[138] 또한, 주요 장기들에 대한 조직병리학적 관찰을 수행하기 위해 간, 신장, 심장, 췌장, 및 폐장 등을 절취하여 10% neutral buffered formalin에 보관 및 장기 일부를 RNASol[®]에 보관하였다.

[139]

[140] 1-5. 통계처리

[141] 다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

[142]

[143] 2. 결과[144] 2-1. 혈당 변화

[145] 6주령의 db/db 생쥐모델에 시험군(DC 2 g/kg)과 대조군(양성대조군: 바나바 추출물 100 mg/kg, 음성대조군: 생리식염수)을 오전과 오후에 일일 2회 3주간 경구투여하면서 주 1회 휴대용 혈당 측정기로 생쥐의 꼬리정맥에서 혈액을 채혈하여 혈당을 측정하였고, 측정 전날에 모든 생쥐의 diet를 제거하였다 (약 12시간). 실험 결과, 혈당 변화는 도 1과 같다. 도 1에서 보듯이 음성대조군(NC)의 혈당은 6주령에서 342.1 mg/dL에서 9주령에는 582.1 mg/dL로 70% 이상 증가를 나타내었다. DC 투여군은 6주령에서 9주령까지 NC와 비교하여 혈당이 현저하게 감소한 것으로 나타났으며, 9주령에서 360.5 mg/kg로 NC에 비해 혈당이 37.9%(약 40%) 감소한 것으로 나타났다 ($p<0.001$). DC 투여군은 양성대조군인 바나바 잎 추출물 투여군과 비교하여서도 월등하게 혈당이 감소한 것으로 나타났다.

[146]

[147] **2-2. 혈청중 포도당(glucose) 변화**

[148] 9주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 12시간)에서 에틸에테르로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 혈청자동측정기로 혈청중 포도당(glucose)변화를 측정하였다. 결과는 도 2와 같다. NC의 포도당(glucose) 수준은 641 mg/dL이었고, 돌콩 증자분말(DC)을 투여한 시험군은 427 mg/dL로 NC에 비하여 33.4%의 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p<0.01$). 양성대조군인 바나바 추출물은 463mg/dL로 NC에 비하여 27.7%의 통계학적 유의성 있는 감소를 나타내었으나 ($p<0.01$), 시험군(DC)과 비교하면 시험군(DC)이 월등한 혈당강하 효과가 있는 것으로 나타났다.

[149]

[150] **2-3. 지질대사 및 당뇨합병증에 대한 효과**

[151] 지질대사 및 당뇨합병증 효과를 확인하기 위하여 혈청중 중성지방 (triglyceride, TG) 변화 측정하였다. 9주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 12시간)에서 에틸에테르로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 혈청자동측정기로 혈청중 중성지방(Triglyceride)변화를 측정하였다. 결과는 도 3과 같다. 도 3에서 보듯이 NC의 중성지방 (TG) 수준은 67.0 mg/dL이었고, 돌콩 증자분말(DC)을 투여한 시험군이 37.01 mg/dL로 NC군에 비하여 44.7%이상 통계학적으로 유의성 있는 감소를 나타내었다 ($p<0.001$). 이러한 결과는 상기 2-2의 혈청중 포도당 억제 효능 결과와 거의 일치하는 것으로, DC의 혈행개선 효과를 관찰할 수 있었다. 양성대조군인 바나바 추출물은 50.0mg/dL로 NC에 비해 25.3%의 통계학적 유의성 있는 감소 ($p<0.01$)를 나타내었으나, DC 투여군과 비교하면 DC 투여군 쪽이 현저히 높은 중성지방 감소 효과가 있는 것으로 나타났다.

[152]

[153] **2-4. 급성독성실험**

[154] 6 주령의 특정병원체부재 (Specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 각 그룹당 5마리씩의 동물에 본 발명의 돌콩 증자분말(DC)을 5,000 mg/kg의 용량으로 1회 경구투여 하였다. 실험 물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 강장기와 흉강 장기의 이상여부를 관찰하였다. 실험 결과, 시험 물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 본 발명의 돌콩 증자분말(DC)은 랫트에서 각각 5,000 mg/kg 까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량 (LD_{50})은 5,000 mg/kg 이상인 안전한

물질로 판단되었다.

[155]

[156] <실험예 2> 돌콩 증자분말과 메트포르민의 항 당뇨에 대한 비교 효능 시험

[157] 1. 재료 및 방법

[158] 1-1. 시험물질 및 투여방법

[159] 돌콩 증자분말(DC)을 생리식염수에 희석시켜 2g/kg/day을 매일 오전 10시와 오후 16시에 마우스존데를 이용하여 0.2ml씩 나누어 경구투여하였다. 양성대조군은 혈당강하제로 널리 사용하고 있는 메트포르민(metformin : 1,1-dimethylbiguanide)을 양성대조물질로 선택하여 0.25% carboxymethylcellulose (CMC)에 녹여 150 mg/kg/day을 0.2ml씩 2회로 나누어 시험군과 동일하게 경구투여하였다. 음성대조군은 동일한 양의 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하였다. 또 다른 비교시험군으로 일반콩(대두)의 증자분말을 사용하였다. 대두의 증자분말은 돌콩대신 대두를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 얻었으며, 돌콩 증자분말(DC)과 동일한 양과 방법으로 1일 2회 경구투여하였다.

[160] 1-2. 실험군 분류 및 실험 설계

[161] 숫컷 db/db 마우스 3주령을 분양 받아 1주간 동물사육실에서 적응을 시킨 후 각 실험군을 6마리씩 배정하고, 4주령에서 혈당측정을 1주일 간격으로 총 6주간 수행하였다. 그리고 약물 투여는 매일 오전 10시와 오후 16시에 마우스존데를 이용하여 0.2ml씩 경구투여하였다. 주 1회 혈당측정은 매주 수요일 오전 09시에 식이(diet)를 제거하여 절식시킨 다음, 공복 6시간 후인 15시에 마우스 꼬리 미정맥에서 휴대용 혈당계 (OneTOUCH@Ultra, Johnson & Johnson, USA)로 측정하였다. 또한 최종 생화학분석을 위한 혈청은 12시간 이상 공복시 혈액을 채취하여야 하므로 최종 8주차에 혈당을 측정하고, 부검은 2일이 경과된 후에 실시하였다. 실험동물 부검시 모든 동물은 12시간 절식 후 에테르로 마취하여 심장에서 혈액을 취해 혈청분리용 tube에 담고, 혈청분리용 tube의 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심분리 후 혈청을 얻어 생화학적 지표 분석을 위한 시료로 이용하였다.

[162] - 실험군 분류

[163] ① 대조군 (db/db 마우스) (n=6)

[164] ② 양성대조군 (Metformin, 150mg/kg/day, o.p)(n=6)

[165] ③ 돌콩 증자분말(DC) 분말 (2.0g/kg/day, o.p)(n=6)

[166] ④ 대두 분말 (2.0g/kg/day, o.p)(n=6)

[167]

[168] 1-3. 혈중 포도당, 인슐린 분석

[169] 각 실험군별로 시험물질을 6주간 투여한 후 최종 8주차에 혈당을 측정하고, 부검은 2일이 경과된 후에 실시하였다. 실험동물 부검시 모든 동물은 12시간 절식 후 에테르로 마취하여 심장에서 혈액을 취해 혈청분리용 튜브에 담고,

혈청분리용 튜브의 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심분리 후 혈청을 얻어 생화학적 지표 분석을 위한 시료로 이용하였다. 분리한 혈청중 포도당 인슐린 분석하였다. 8 주간의 약물 투여 기간 동안 각 실험군의 인슐린 및 인슐린 저항성 지수 (HOMAIR)의 변화를 아래의 계산식을 사용하여 계산하였다. 혈중 인슐린 농도는 동일한 방법으로 수득한 혈장을 시료로 하고 마우스 인슐린 ELISA 키트 (Shibayagi, Japan)를 이용하여 ELISA 리더 (Labsystems, Finland)로 측정하였다.

[170]

[171] 1-4. 지방조직 중량 측정

[172] 각 실험군별로 시험물질을 6주간 투여한 후 각 실험동물을 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 지방조직의 중량을 산출하였다.

[173]

[174] 1-5. 혈장중 지질생화학적 분석

[175] 1-3과 같은 방법으로 얻은 혈액을 혈청분리용 튜브에 담고, 3000 rpm에서 20분간 원심분리 후 혈청을 얻어 생화학적 지표 분석을 위한 시료로 사용하였다. 분리한 혈장(plasma)에서 혈장 및 간의 지질함량의 지표인 총콜레스테롤, HDL(High-density lipoprotein), LDL(Low-density lipoprotein), 중성지방(triglyceride), 인지질의 함량을 생화학자동 분석기 (Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[176]

[177] 1-6. 통계처리

[178] 다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

[179]

[180] 2. 결과[181] 2-1. 혈당 변화

[182] 4주령의 db/db 생쥐모델에 양성대조군으로 메트포르민 150mg/kg/day, 시험군 돌콩의 증자분말(DC) 2g/kg/day, 그리고 비교 시험군으로 대두 분말 2g/kg/day를 오전과 오후로 나누어 1일 2회 6주간 경구투여 하였으며, 주 1회 휴대용 혈당 측정기를 사용하여 생쥐의 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였으며, 측정 6시간 전에 모든 생쥐의 diet를 제거하였다. 실험 결과는 도 4와 같다. 도 4에서 보듯이 비투여군(NegativeControl, NC)의 혈당은 4주령에서 155.8mg/dL, 10주령에서 545.8 mg/dL로, 6주 동안 3.5배의 증가를 나타내었다. 본 발명의 돌콩 증자분말(DC) 투여군은 10주령에서 240.5 mg/dL으로 비투여군(NC) 545.8mg/dL에 비하여 55.9% 이상의 통계학적으로 유의성 있는 혈당 감소를 나타내었다 ($p < 0.001$). 그리고 양성대조군인 메트포르민과 비교시험군인 대두 분말은 NC에 비해 각각 각각 34.6% 및 17.6%의 혈당감소를 나타내었다 ($p < 0.001$, $p < 0.01$). 돌콩 증자분말(DC)을 투여한 시험군과 양성 대조군인 메트포르민

투여군은 각각 6주 동안 비투여군(NC)에 비하여 혈당이 크게 억제되는 것으로 나타났으며, 특히 본 발명의 DC 투여군은 메트포르민 투여군보다도 훨씬 높은 혈당 억제 효과를 나타내었다.

[183]

[184] **2-2. 혈청 중 포도당 변화**

[185] 10주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 ethyl ether로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고, 혈청자동측정기로 혈청중 포도당(glucose)변화를 측정하였으며, 결과는 도 5와 같다. 음성대조군인 비투여군 (NC)의 포도당(glucose) 수준은 575.0 mg/dL이었고, 양성대조군인 메트포르민 투여군과 본 발명의 돌콩 증자분말(DC)을 투여한 시험군은 각각 376.0mg/dL과 231.0mg/dL으로 비투여군에 비하여 34.6%와 59.8%의 통계학적으로 유의성 있는 큰 감소를 나타내었으며 ($p<0.001$), 특히 본 발명의 DC 투여군은 양성대조군인 메트포르민 투여군 보다도 월등하게 높은 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 도 4에서 꼬리정맥에서의 혈당 변화 결과와 거의 일치하는 결과로, DC 투여에 따른 실시간 항당뇨 효과와 일치하였다. 비교시험군인 대두분말(bean powder) 투여군은 426.3mg/dL으로 비투여군에 비하여 25.8%의 유의성 있는 감소를 나타내었으나 ($p<0.05$), 본 발명의 DC 투여군에 비해서는 크게 낮은 감소를 나타내었다.

[186]

[187] **2-3. 혈청 중 중성지방 (triglyceride, TG) 변화**

[188] 10주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 ethyl ether로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 혈청자동측정기로 혈청중 중성지방(TG)변화를 측정하였으며, 결과는 도 6과 같다. 비투여군(NC)의 중성지방(TG) 수준은 128.8mg/dL이었다. 양성대조군인 메트포르민 투여군과 본 발명의 DC 투여군은 각각 78.8mg/dL과 57.2mg/dL으로 NC에 비하여 38.8%와 55.6%의 통계학적으로 유의성 있는 높은 중성지방 (TG) 감소를 나타내었으며 ($p<0.01$, $p<0.001$), 특히 본 발명의 DC 투여군은 양성대조군인 메트포르민 투여군 에 비해서도 월등하게 높은 중성지방 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 본 발명의 DC가 양성대조군인 메트포르민 보다 중성지질저하를 통한 혈행개선 효과가 크다는 것을 시사한다. 그러나 일반콩 분말 투여군은 중성지방 (TG)은 101.8mg/dL로 비투여군에 비하여 큰 차이가 없었다.

[189]

[190] **2-3. 혈청 중 총콜레스테롤 (total cholesterol) 변화**

[191] 10주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 에틸 에테르로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서

1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고, 혈청자동측정기로 혈청중 총콜레스테롤양을 측정하였다. 결과는 도 7과 같다. 비투여군 (NC)의 총콜레스테롤 수준은 168.2mg/dL이었고, 본 발명의 DC 투여군은 107.7mg/dL으로 비투여군에 비하여 35.9%의 통계학적으로 유의성 있는 총콜레스테롤 감소를 나타내었다 ($p<0.001$). 그러나 메트포르민 투여군은 비투여군에 비하여 감소하기는 하였으나 통계학적 유의성이 없었다. 대두 분말 투여군은 총콜레스테롤이 123.2mg/dL로 비투여군에 비하여 26.7%의 유의성있는 감소를 나타내었다 ($p<0.01$). 이러한 결과는 본 발명의 DC 투여가 총콜레스테롤 감소 및 이를 통한 혈행개선 면에서도 가장 효과가 좋다는 것을 나타낸다.

[192]

[193] **2-4. 혈청 중 저밀도-콜레스테롤 (Low Density Lipoprotein-Cholesterol) 변화**

[194] 10주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 에틸 에테르로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 혈청자동측정기로 혈청중 저밀도-콜레스테롤양을 측정하였다. 결과는 도 8과 같다. 비투여군 (NC)의 총콜레스테롤 수준은 9.3mg/dL이었고, 본 발명의 DC 투여군은 4.9mg/dL으로 비투여군에 비하여 47.3%의 통계학적으로 유의성 있는 큰 감소를 나타내었다 ($p<0.05$). 메트포르민 투여군과 대두 분말 투여군은 비투여군에 비해 감소는 하였으나 통계학적 유의성이 없었다. 이러한 결과는 본 발명의 DC 투여가 저밀도-콜레스테롤 감소 및 이를 통한 혈행개선 면에서도 가장 효과가 좋다는 것을 나타낸다.

[195]

[196] **2-5. 혈청 중 고밀도-콜레스테롤 (High Density Lipoprotein-Cholesterol) 변화**

[197] 10주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 에틸 에테르로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 혈청자동측정기로 혈청중 고밀도-콜레스테롤양을 측정하였다. 결과는 도 9와 같다. 메트포르민 투여군, 본 발명의 DC 투여군, 그리고 대두 분말 투여 모두 비투여군(NC)에 비하여 큰 차이가 없었다.

[198]

[199] **2-6. 혈청 중 ALT와 AST 변화**

[200] 10주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 에틸 에테르로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 혈청자동측정기로 혈청중 ALT와 AST 수준을 측정하였다. 결과는 도 10과 같다. ALT 수준은 비투여군(NC)이 68.5 U/L이었고, 양성대조군 메트포르민 투여군이 54.9U/L, 본 발명의 DC 투여군이 57.4U/L, 그리고 대두 분말 투여군이

64.6U/L으로, 모든 실험군에서 간독성이 나타나지 않았다. AST 수준은 비투여군이 119.7U/L이었고, 메트포르민 투여군이 120.0U/L, 본 발명의 DC 투여군이 112.7U/L, 그리고 대두 분말 투여군이 144.5U/L으로, 모든 실험군에서 간독성이 나타나지 않았다.

[201]

[202] **2-7. 혈청 중 인슐린 변화**

[203] 10주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 에틸 에테르로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고, mouse insulin ELISA kit (SHIBAYAKI, Japan)로 혈청중 인슐린 수준을 측정하였다. 결과는 도 11과 같다. 혈청중 인슐린 수준은 비투여군(NC)이 5.72ng/ml이었고, 본 발명의 DC 투여군은 4.07mg/dL로 비투여군에 비하여 28.8%의 인슐린 감소를 나타내었으나 통계학적 유의성이 나타나지 않았다. 메트포르민 투여군과 일반콩 투여군도 비투여군에 비하여 혈청 중 인슐린이 약간 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 제2형 당뇨병은 인슐린의 분비가 정상임에도 불구하고 혈당의 인슐린에 대한 내성이 증가하여 인슐린 저항성을 지니게 되고 이로 인해 혈중 인슐린의 양이 증가하여 각종 대사장애가 발생하는 것으로 알려져 있다. 본 실험 결과는 본 발명의 DC 투여군에서 혈당의 억제 효능과 더불어 제2형 당뇨병의 문제점인 인슐린에 대한 저항성이 개선되는 효과를 보여주고 있다.

[204]

[205] **2-8. 지방조직 변화**

[206] 실험이 종료된 10주령의 db/db 생쥐에서 각 실험동물을 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 중량을 측정하였다. 결과는 도 12와 같다. 지방조직의 변화는 비투여군 (NC)이 5.9g이었고, 본 발명의 DC 투여군이 5.0g으로 비투여군에 비하여 15.3%의 지방조직 감소를 나타내었으며 통계학적으로 유의성이 나타났다 ($p<0.01$).

[207]

[208]

[209] **<실험예 3> 돌콩 추출물 및 용매분획물의 당뇨 및 당뇨합병증에 대한 효과**[210] **1. 재료 및 방법**[211] **1-1. 당뇨병 모델동물 및 실험설계**

[212] 숏컷 db/db 마우스 3주령을 분양받아 1주간 동물사육실에서 적응을 시킨 후 각 실험군마다 6마리씩 배정하고, 4주령에서 총 6주간 수행하였다. 약물 투여는 매일 오전 10시와 오후 16시에 마우스존데를 이용하여 0.2ml씩 경구투여하였다. 주 1회 혈당측정은 매주 수요일 오전 09시에 식이(diet)를 제거하여 절식시킨 다음, 공복 6시간 후인 15시에 마우스 꼬리 미정맥에서 휴대용 혈당계

(OneTOUCH@Ultra, Johnson & Johnson, USA)를 사용하여 측정하였다. 전체적인 실험설계는 실험방법은 실험에 2와 동일하게 하였다.

[213]

[214] 1-2. 시험물질 및 투여방법

[215] 실시예 1에서 얻은 돌콩 증자분말과 실시예 2에서 얻은 돌콩 추출물 및 분획물을 시험물질로 사용하였다. 시험물질은 생리식염수에 현탁시켜 1일 용량을 매일 오전 10시와 오후 16시에 마우스존데를 이용하여 0.2ml씩 나누어 경구투여하였다. 실험군은 다음과 같이 총 8개군으로 나누어 실시하였다.

[216] 실험 군 :

[217] ① 대조군(db/db 마우스)(n=6)

[218] ② 돌콩물추출물(DC-WE)(300 mg/kg, o.p)(n=6)

[219] ③ 돌콩메탄올추출물(DC-ME)(300 mg/kg, o.p)(n=6)

[220] ④ 돌콩메탄올추출물의 헥산용매분획물(DC-HF)(100 mg/kg, o.p)(n=6)

[221] ⑤ 돌콩메탄올추출물의 부탄올용매분획물(DC-BF)100 mg/kg, o.p)(n=6)

[222] ⑥ 돌콩메탄올추출물의 에틸아세테이트용매분획물(DC-EF)(100 mg/kg, o.p)(n=6)

[223] ⑦ 돌콩메탄올추출물의 물용매분획물분획물(DC-WF)(100 mg/kg, o.p)(n=6)

[224] ⑧ 돌콩 증자분말(DC-p)(1.5 g/kg, o.p)(n=6)

[225]

[226] 1-3. 지방조직 중량 측정

[227] 시험물질을 6주간 투여한 후 각 실험동물의 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 지방조직의 중량을 산출하였다.

[228]

[229] 1-4. 제2형 당뇨병 db/db 마우스의 혈장중 지질생화학적 분석

[230] 시험물질을 투여한 6주간의 사육 종료 후 최종8주차 혈당을 측정하고, 2일이 경과된 후에 부검을 실시하였다. 실험동물 부검시 모든 동물은 12시간 절식 후에 테르로 마취하여 심장에서 혈액을 취해 혈청분리용 튜브에 담고, 혈청분리용 튜브의 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻은 다음 이 혈청을 생화학적 지표 분석을 위한 시료로 사용하였다. 분리한 혈장(plasma)에서 간 기능의 지표인 ALT 및 AST를, 혈장 및 간의 지질함량의 지표인 총콜레스테롤, HDL(High-density lipoprotein), LDL(Low-density lipoprotein), 중성지방(triglyceride) 등의 함량을 생화학자동 분석기 (Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[231]

[232] 1-5. 혈청중 포도당, 인슐린 분석

[233] 상기 1-4와 같은 방법으로 분리한 혈청으로 혈청중 포도당과 인슐린을 분석하였다. 혈중 인슐린 농도는 동일한 방법으로 수득한 혈장을 시료로 하고

마우스 인슐린 ELISA 키트 (Shibayagi, Japan)를 이용하여 ELISA 리더 (Labsystems, Finland)로 측정하였다.

[234]

[235] 1-6. 통계처리

[236] 다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

[237]

[238] **2. 결과**

[239] **2-1. 혈당 변화**

[240] 4주령의 db/db 생쥐 모델에 돌콩물추출물 (water extract, 300mg/kg/day, **DC-WE**), 메탄올추출물 (methanol extract, 300mg/kg, **DC-ME**), 헥산층분획물 (Hexane fraction, 100mg/kg/day, **DC-HF**), 부탄올층분획물 (BuOH fraction/day, 100mg/kg/day, **DC-BF**), 에틸아세트층분획물 (EtOAC fraction, 100mg/kg/day, **DC-EF**), 물층분획물 (water fraction, 100mg/kg/day, **DC-WF**), 그리고 돌콩 증자분말 (DC-p, 1.5g/kg/day, **DC-p**)을 오전과 오후에 일일 2회 5주간 경구투여 하면서, 주 1회 휴대용 혈당 측정기로 생쥐의 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 측정 6시간 전에 모든 생쥐의 diet를 제거하였으며, 결과는 도 13과 같다. 비처리 대조군(Negative Control, **NC**)의 혈당은 4주령 142.8 mg/dL에서, 5주령 175.8 mg/dL, 6주령 270.5 mg/dL, 7주령 461.5 mg/dL, 8주령 479.8 mg/dL로 지속적으로 증가하여, 시험종료일인 9주령에는 516.3 mg/dL로 5주 동안 혈당이 3.6배 증가하였다. 반면 돌콩의 시험군들은 모두 통계학적으로 유의성(최소 $p < 0.01$ 이상) 있게 현저한 혈당 감소효과를 나타내었다.

[241] 9주령에서 돌콩 증자분말 투여군(**DC-p**)은 대조군 (**NC**)에 비하여 264.7 mg/dL로 49%의 감소를 나타내었고, 추출물들에 있어서는 물추출물(**DC-WE**)이 223.0 mg/dL로 57%의 감소를, 메탄올 추출물(**DC-ME**)이 294.6 mg/dL로 43%의 감소를 나타내었다. 용매분획물들에 있어서는 물층분획물(**DC-WF**)이 179.4 mg/dL로 65%의 감소를, 에틸아세테이트층분획물(**DC-EF**)이 253.9 mg/dL로서 51%의 감소를, 부탄올층분획물(**DC-BF**)이 275.0 mg/dL로서 47%의 감소를, 헥산층분획물(**DC-HF**)이 346 mg/dL로서 33%의 감소를 나타내었다.

[242]

[243] **2-2. 혈청중 중성지방 (triglyceride, TG) 변화**

[244] 9주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 ethyl ether로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 혈청자동측정기로 혈청중 중성지방(TG)변화를 측정하였다. 결과는 도 14와 같다. 비처리 대조군의 중성지방 (TG) 수준은 209.3 mg/dL이었고, **DC-WE**, **DC-ME**, **DC-HF**, **DC-BF**, **DC-EF**, **DC-WF**, 그리고 **DC-p** 투여군은 비처리 대조군에 비하여 54.0% 이상의 통계학적으로 유의성 있는 현저한 중성지방 (TG)

감소를 나타내었다 ($p<0.05$, $p<0.01$). 이러한 결과로부터 본 발명의 돌콩 증자분말, 돌콩추출물, 돌콩분획물이 모두 현저한 혈행개선 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[245]

[246] **2-3. 혈청중 총콜레스테롤 (total cholesterol) 변화**

[247] 상기 2-2와 동일한 방법으로 분리한 혈청에 대해 혈청자동측정기로 혈청중 총콜레스테롤양을 측정하였으며, 결과는 도 15와 같다. 비처리 대조군(NC)의 총콜레스테롤 수준은 181.5 mg/dL이었고, DC-WE, DC-ME, DC-HF, DC-BF, DC-EF, DC-WF, 그리고 DC-p 투여군은 모두 비처리 대조군에 비하여 총콜레스테롤 감소를 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다.

[248]

[249] **2-4. 혈청중 저밀도-콜레스테롤 (Low Density Lipoprotein-Cholesterol) 및 고밀도-콜레스테롤 (HighDensity Lipoprotein-Cholesterol) 변화**

[250] 상기 2-2와 동일한 방법으로 분리한 혈청에 대해 혈청자동측정기로 혈청중 저밀도-콜레스테롤과 고밀도-콜레스테롤양을 측정하였으며, 결과는 도 16과 같다. 비처리 대조군 (NC)의 저밀도-콜레스테롤 수준은 20.7 mg/dL이었고, DC-WE, DC-ME, DC-HF, 그리고 DC-EF 투여군은 모두 비처리 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 저밀도-콜레스테롤 감소를 나타내었다 ($p<0.05$, $p<0.01$). 이러한 결과로 돌콩추출물 및 DC-HF, DC-EF 투여가 저밀도-콜레스테롤 감소 및 그에 따른 혈행개선 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 고밀도-콜레스테롤은 DC-WE, DC-ME, DC-HF, DC-BF, DC-EF, DC-WF, 그리고 DC-p 투여군 모두 비처리 대조군과 차이가 없었다.

[251]

[252] **2-5. 혈청중 ALT와 AST 변화 측정**

[253] 상기 2-2와 동일한 방법으로 분리한 혈청에 대해 혈청자동측정기로 혈청중 ALT와 AST 수준을 측정하였으며, 결과는 도 17과 같다. 비처리 대조군과 DC-WE, DC-ME, DC-HF, DC-BF, DC-EF, DC-WF, 그리고 DC-p 투여군 모두 ALT와 AST 수준에서 별다른 차이가 없었다. 따라서 모든 실험군에서 간독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.

[254]

[255] **2-5. 혈청중 인슐린 변화**

[256] 상기 2-2와 동일한 방법으로 분리한 혈청에 대해 mouse insulin ELISA kit (SHIBAYAKI, Japan)로 혈청중 인슐린 수준을 측정하였으며, 결과는 도 18과 같다. 혈청중 인슐린 수준은 비처리 대조군(NC)이 6.55ng/ml이었고, DC-WE 4.15ng/ml, DC-ME 4.43ng/ml, DC-HF 4.31ng/ml, DC-BF 4.83ng/ml, DC-EF 4.63ng/ml, DC-WF 3.89ng/ml, 그리고 DC-p 4.15ng/ml으로 시험군은 모두 비처리 대조군에 비하여 25% 이상의 통계학적으로 유의성 있는 인슐린 감소를 나타내었고, 특히 DC-WF 투여군의 인슐린 수치는 비처리 대조군에 비하여

40% 이상의 큰 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 DC-WE, DC-WF, 그리고 DC-p 등이 혈당의 억제 효과와 더불어 제2형 당뇨병의 문제점인 인슐린에 대한 저항성을 개선하는 효능이 있음을 시사하는 것이다.

[257]

[258] **2-6. 지방조직 변화**

[259] 실험 종료된 10주령의 db/db 생쥐에서 각 실험동물의 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 중량을 측정하였으며, 결과는 도 19와 같다. DC-WE 투여군은 복부 (Abdominal), 부고환 (Epididymal) 및 사타구니 (Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue) 무게가 비처리 대조군(NC)에 비하여 약 19% 이상 감소하는 것으로 관찰되었으나 통계학적 유의성은 없었다.

[260]

[261] **<실험예 4> 돌콩 추출물의 추출 온도에 따른 항당뇨 효과 비교**[262] **1. 재료 및 방법**[263] **1-1. 당뇨병 모델동물 및 실험설계**

[264] 숫컷 db/db 마우스 3주령을 분양받아 1주간 동물사육실에서 적응을 시킨 후 각 실험군마다 6마리씩 배정하고, 4주령에서 총 6주간 수행하였다. 약물 투여는 매일 오전 10시와 오후 16시에 마우스존데를 이용하여 0.2ml씩 경구투여하였다. 주 1회 혈당측정은 매주 수요일 오전 09시에 식이(diet)를 제거하여 절식시킨 다음, 공복 6시간 후인 15시에 마우스 꼬리 미정맥에서 휴대용 혈당계 (OneTOUCH@Ultra, Johnson & Johnson, USA)를 사용하여 측정하였다. 전체적인 실험설계는 실험방법을 상기 실험예 2와 동일하게 하였다.

[265]

[266] **1-2. 시험물질 및 투여방법**

[267] 실시예 3에서 얻은 추출 온도별 돌콩 추출물을 시험물질로 사용하였다. 시험물질은 생리식염수에 현탁시켜 1일 용량을 매일 오전 10시와 오후 16시에 마우스존데를 이용하여 0.2ml씩 나누어 경구투여하였다. 실험군은 다음과 같이 총 5개군으로 나누어 실시하였다.

[268] **시험군의 분류**

[269] ① 대조군 (db/db 마우스)(n=4)

[270] ② DC60 추출물 (0.4ml/day, o.p)(n=4)

[271] ③ DC80 추출물 (0.4ml/day, o.p)(n=4)

[272] ④ DC100 추출물 (0.4ml/day, o.p)(n=4)

[273] ⑤ DC40E 추출물 (0.4ml/day, o.p)(n=4)

[274]

[275] **1-3. 제2형 당뇨 db/db 마우스의 지방조직 중량 측정**

[276] DC 추출물을 6주간 투여 후 각 실험동물을 복부(Abdominal), 부고환 (Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로

적출하여, 지방조직들의 총 지방조직의 중량을 산출하였다.

[277]

[278] 1-4. 제2형 당뇨병 db/db 마우스의 혈장 중 지질생화학적 분석

[279] 약물을 투여하는 6주간 사육 종료 후 최종 8주차에 혈당을 측정하고, 2일이 경과된 후에 부검을 실시하였다. 실험동물 부검시 모든 동물은 12시간 절식 후에 테르로 마취하여 심장에서 혈액을 취해 혈청분리용 튜브에 담고, 혈청분리용 튜브의 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 얻어 생화학적 지표 분석을 위한 시료로 사용하였다. 분리한 혈장(plasma)에서 간 기능의 지표인 ALT 및 AST를, 혈장 및 간의 지질함량의 지표인 총콜레스테롤, HDL(High-density lipoprotein), LDL(Low-density lipoprotein), 중성지방(triglyceride) 등의 함량을 생화학자동 분석기 (Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[280]

[281] 1-5. 제2형 당뇨병 db/db 마우스의 혈중 포도당, 인슐린 분석

[282] 상기 1-4와 같은 방법으로 분리한 혈청에 대해 혈청중 포도당 및 인슐린 수준을 분석하였다. 혈중 인슐린 농도는 동일한 방법으로 수득한 혈장을 시료로 하고 마우스 인슐린 ELISA 키트 (Shibayagi, Japan)를 이용하여 ELISA 리더 (Labsystems, Finland)로 측정하였다.

[283]

[284] 1-6. 통계처리

[285] 다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

[286]

[287] **2. 결과**

[288] 2-1. 혈당 변화

[289] 4주령의 db/db 생쥐 모델에 DC60 추출물, DC80 추출물, DC100 추출물, DC40E 추출물을 오전과 오후에 1일 2회 5주간 경구투여 하였으며, 주 1회 생쥐의 꼬리정맥에서 채혈하여 휴대용 혈당 측정기로 혈당을 측정하였다. 측정 6시간 전에 모든 생쥐의 diet를 제거하였으며, 결과는 도 20과 같다. 미처리 대조군(NegativeControl, NC)의 혈당은 4주령 146.8 mg/dL에서, 5주령 160.5 mg/dL, 6주령 215.0 mg/dL, 7주령 353.8 mg/dL, 8주령 401.8 mg/dL로 지속적으로 증가하여, 시험종료일인 9주령에는 516.5 mg/dL로 5주 동안 혈당이 3.5배 이상 증가하였다. 반면에 본 발명의 DC 추출물 시험군들은 모두 통계학적으로 유의성 (최소 $p < 0.01$ 이상) 있게 현저한 혈당 감소효과를 나타내었다. 9주령에서 측정한 혈청중 혈당 수준은 도 21과 같으며, DC60 추출물 투여군이 317.0 mg/dL로 대조군 (NC)에 비하여 38.6%의 혈당감소를, DC80 추출물 투여군이 299.3 mg/dL로 42.0%의 감소를, DC100 추출물 투여군이 410.3 mg/dL로 20.5%의 감소를, DC40E 추출물 투여군이 334.0 mg/dL로 35.3%의 감소를 나타내었다.

[290]

[291] **2-2. 혈청 중 중성지방 (triglyceride, TG) 변화**

[292] 9주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 에틸 에테르로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고, 혈청자동측정기로 혈청 중 중성지방(TG) 변화를 측정하였다. 결과는 도 22와 같다. 미처리 대조군의 중성지방 (TG) 수준은 179.0 mg/dL이었고, DC60 투여군은 126.8 mg/dL, DC80 투여군은 92.3 mg/dL, DC100 투여군은 158.3 mg/dL, DC40E 투여군은 85.5 mg/dL로, 미처리 대조군에 비하여 DC100 투여군을 제외하고 29.0% 이상의 통계학적으로 유의성 있는 중성지방 (TG) 감소를 나타내었다 ($p<0.01$, $p<0.001$). 그리고 DC60 추출물과 DC40E 추출물은 비투여 대조군에 비하여 50% 이상으로 중성지방을 억제하여 현저한 혈행개선 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

[293]

[294] **2-3. 혈청 중 총콜레스테롤 (total cholesterol) 변화**

[295] 상기 2-2와 같은 방법으로 분리한 혈청에 대해 혈청자동측정기로 혈청 중 총콜레스테롤양을 측정하였으며, 결과는 도 23과 같다. 미처리 대조군 (NC)의 총콜레스테롤 수준은 160.3 mg/dL이었고, DC80 투여군, DC100 투여군, 그리고 DC40E 투여군은 미처리 대조군에 비하여 총 콜레스테롤이 통계학적으로 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다. 그러나 DC60 투여군은 미처리 대조군에 비하여 약간 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다.

[296]

[297] **2-4. 혈청 중 저밀도-콜레스테롤 (Low Density Lipoprotein-Cholesterol) 및 고밀도-콜레스테롤 (HighDensity Lipoprotein-Cholesterol) 변화**

[298] 상기 2-2와 같은 방법으로 분리한 혈청에 대해 혈청자동측정기로 혈청 중 저밀도-콜레스테롤과 고밀도-콜레스테롤 양을 측정하였으며, 결과는 도 24와 같다. 미처리 대조군 (NC)의 저밀도-콜레스테롤 수준은 7.4 mg/dL이었고, DC40E 투여군 ($p<0.001$) 만이 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 54% 이상의 감소를 나타냈다. DC60투여군, DC80투여군, DC100투여군은 미처리 대조군에 비하여 감소하기는 하였으나 통계학적으로 유의성은 없었다. 이러한 결과로부터 DC 추출물 및 DC-HF, DC-EF 투여가 저밀도-콜레스테롤의 감소 및 이에 따른 혈행개선 효과가 있다는 것을 알 수 있다. 고밀도-콜레스테롤은 DC60투여군, DC80투여군, DC100투여군, 그리고 DC40E 투여군 모두 미처리 대조군과 차이가 없었다.

[299]

[300] **2-5. 혈청 중 ALT와 AST 변화**

[301] 상기 2-2와 같은 방법으로 분리한 혈청에 대해 혈청자동측정기로 혈청 중 ALT와 AST 수준을 측정하였으며, 그 결과는 도 25와 같다. ALT와 AST 수준은 미처리 대조군과 DC60투여군, DC80투여군, DC100투여군, 그리고 DC40E

투여군 사이에 별 차이가 없었다. 따라서 모든 실험군에서 간독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.

[302]

[303] **2-6. 혈청 중 인슐린 변화**

[304] 상기 2-2와 같은 방법으로 분리한 혈청에 대해 mouse insulin ELISA kit (SHIBAYAKI, Japan)로 혈청 중 인슐린 수준을 측정하였으며, 그 결과는 도 26과 같다. 혈청 중 인슐린 수준은 미처리 대조군(NC)이 8.06 ng/ml이었고, DC60 투여군이 7.73 ng/ml, DC80 투여군이 4.59 ng/ml, DC100 투여군이 4.52 ng/ml, 그리고 DC40E 투여군이 5.82 ng/ml 투여군이 5.35 ng/ml로, 본 발명의 DC80 ($p<0.01$), DC100 ($p<0.001$) 투여군이 33.1% 이상의 통계학적 유의성 있게 인슐린 감소를 나타내었다. 특히, DC80 투여군과 DC100 투여군의 인슐린 수치는 미처리 대조군에 비하여 43% 이상의 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 DC80, DC100 투여가 혈당의 억제 효능과 더불어 제2형 당뇨병의 문제점인 인슐린에 대한 저항성을 개선에도 효능이 있음을 시사하는 것이다.

[305]

[306] **2-7. 지방조직 변화**

[307] 실험 종료된 10주령의 *db/db* 생쥐에서 각 실험동물을 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 중량을 측정하였다. 결과는 도 27과 같다. DC60 투여군 ($p<0.01$), DC80 투여군 ($p<0.01$), DC40E 투여군 ($p<0.01$)은 복부 (Abdominal), 부고환 (Epididymal) 및 사타구니 (Inguinal)의 지방조직 (adipose tissue) 무게에서 미처리 대조군(NC)에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 감소를 나타내었다.

[308]

[309] **2-8. 간조직 변화**

[310] 실험 종료된 10주령의 *db/db* 생쥐에서 각 실험동물에서 간조직 (liver)을 적출하여 총 중량을 측정하였다. 그 결과는 도 28과 같다. DC60 투여군 ($p<0.001$), DC80 투여군 ($p<0.05$)은 미처리 대조군(NC)에 비하여 간조직의 총 무게에서 감소를 나타내었다.

[311]

[312] **<실험예 5> 비교 효력 검증시험**

[313] 본 발명의 돌콩 추출물과, 다른 온도 범위의 추출물, 그리고 종래에 콩과 식물 또는 다른 천연물에서 유래된 항당뇨 유효물질로 알려진 안토시아닌, 피니톨, 그리고 바나바와 크롬복합물의 효능을 BKS.Cg-m^{+/+}Lepr^{db/db} homozygous diabetic (*db/db*) 생쥐를 대상으로 비교 검증하는 시험을 실시하였다.

[314]

[315] **1. 재료 및 방법**[316] **1-1. 시험물질 및 비교시험물질**

[317] 1) 시험군

[318] 각각 5°C 및 25°C에서 추출하는 것을 제외하고는 실시예 3과 동일한 방법으로 실시하여 "DC5 추출물" 및 "DC25 추출물"을 얻었다. 그리고 실시예 3에서 제조한 돌콩의 60°C 물추출물 (DC60 추출물) 100g을 물 2ℓ용해한 후, D101 컬럼에 통과시켜 분획물 1, 그 다음 30% 에탄올 2ℓ를 통과시켜 분획물 2를 얻었다. 각각의 분획물들을 진공회전농축기로 45°C에서 감압농축하여 돌콩 물추출물의 컬럼분획물 분획물 1에 해당하는 DC60-1과 분획물 2에 해당하는 DC60-2를 얻었다.

[319]

[320] 2) 비교시험군

[321] "Anthocyanins": 검은콩(서리태)로부터 분리, 정제된 안토시아닌(Anthocyanins) 30% 함유 추출물

[322] "Pinitol": Pinitol 95% 이상 함유물 (Sigma-Aldrich)

[323] "바나바와 크롬복합물": 웰니스바나바골드크롬™ (바나바 추출물 400 mg/g, 난소화성말토덱스트린 200 mg/g 및 크롬 0.1mg/g 함유)

[324]

[325] 1-2. 당뇨병 모델동물 및 실험설계

[326] 숫컷 db/db 마우스 3주령을 분양받아 1주간 동물사육실에서 적응을 시킨 후 각 실험군마다 4마리씩 배정하고, 4주령에서 총 6주간 약물을 투여하면서 혈당,식이섭취량, 체중 변화를 1주일 간격으로 측정하였다. 약물 투여는 매일 오전 10시와 오후 16시에 마우스존데를 이용하여 0.2ml씩 경구투여하였다. 주 1회 혈당측정은 매주 수요일 오전 09시에 식이(diet)를 제거하여 절식시킨 다음, 공복 6시간 후인 15시에 마우스 꼬리 미정맥에서 휴대용 혈당계 (OneTOUCH@Ultra, Johnson & Johnson, USA)를 사용하여 측정하였다. 전체적인 실험설계는 실험방법을 상기 실험예 2와 동일하게 하였다.

[327]

[328] 1-3. 투여방법 및 실험군 분류

[329] 시험물질은 생리식염수에 현탁시켜 1일 용량을 매일 오전 10시와 오후 16시에 마우스존데를 이용하여 0.2ml씩 나누어 경구투여하였다. 실험군은 다음과 같이 총 8개군으로 나누어 실시하였다.

[330] 실험군의 분류

[331] ① NC: 대조군 (4주령 db/db 마우스) (n=4)

[332] ② DC60-1 (100 mg/kg, o.p)(n=4)

[333] ③ Anthocyanins (100 mg/kg, o.p)(n=4)

[334] ④ DC25 (100 mg/kg, o.p)(n=4)

[335] ⑤ Pinitol (100 mg/kg, o.p)(n=4)

[336] ⑥ DC60-2 (100 mg/kg, o.p)(n=4)

[337] ⑦ DC5 (100 mg/kg, o.p)(n=4)

[338] ⑧ BANABA: (300mg/kg, *o.p*)(n=4)

[339]

[340] 1-4. 지방조직 중량 측정

[341] 약물(시험물질)을 6주간 투여한 후 각 실험동물의 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직(adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 지방조직의 중량을 산출하였다.

[342]

[343] 1-5. 혈장 중 지질생화학적 분석

[344] 6주간 사육 종료 후 최종 8주차에 혈당을 측정하고, 부검은 2일이 경과된 후에 실시하였다. 실험동물 부검 시 모든 동물은 12시간 절식 후 에테르로 마취하여 심장에서 혈액을 취해 혈청분리용 튜브에 담고, 혈청분리용 튜브의 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심분리 후 혈청을 얻어 생화학적 지표 분석을 위한 시료로 사용하였다. 분리한 혈장(plasma)에서 총콜레스테롤, HDL(High-density lipoprotein), LDL(Low-density lipoprotein), 중성지방(triglyceride), BUN, 인지질의 함량을 생화학자동 분석기 (Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[345]

[346] 1-6. 혈중 포도당, 인슐린 분석

[347] 상기 1-5와 같은 방법으로 분리한 혈청에 대하여 혈청 중 포도당 및 인슐린을 분석하였다. 혈중 인슐린 농도는 동일한 방법으로 수득한 혈장을 시료로 하고 마우스 인슐린 ELISA 키트 (Shibayagi, Japan)를 이용하여 ELISA 리더 (Labsystems, Finland)로 측정하였다.

[348]

[349] 1-7. 통계처리

[350] 다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

[351]

[352] **2. 결과**

[353] **2-1. 혈당 변화**

[354] 4주령의 *db/db* 생쥐에 BANABA는 300 mg/kg/day 용량으로, 다른 모든 시료들은 100 mg/kg/day 용량으로 하여, 오전과 오후로 나누어 1일 2회 6주간 경구투여 하면서 주 1회 휴대용 혈당 측정기로 생쥐의 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 측정 6시간 전에 모든 생쥐의 diet를 제거하였다. 결과는 도 29와 같다. 비처리 대조군 (NC)의 혈당은 4주령 113.5 mg/dL에서, 5주령 216.5 mg/dL, 6주령 303.8 mg/dL, 7주령 44.8 mg/dL, 8주령 467.5 mg/dL로 지속적으로 증가하여, 시험종료일인 9주령에는 484.8 mg/dL로 5주 동안 혈당이 4.2배 증가하였다. 반면 본 발명의 시험군과 비교시험군 모두 통계학적으로 유의성 (최소 $p < 0.01$ 이상) 있게 현저한 혈당 감소효과를 나타내었다. 9주령에서 대조군

(NC)의 혈당순준은 약 485mg/dL로 나타났고, 비교시험군 중 Pinitol은 231.8 mg/dL로서 52.1%의 감소효과를, BANABA는 316.8 mg/dL로 34.6%의 감소를, Anthocyanins은 356.3 mg/dL로 26.5%의 감소를 나타내었다. 시험군에서는 DC25는 253.8 mg/dL로 대조군 (NC)과 비교하여 47.6%의 혈당 감소를, DC5는 316.8 mg/dL로 34.6%의 감소를, DC60-1이 359.5 mg/dL로 25.8%의 감소를, DC60-2은 302.5 mg/dL로 38.6%의 감소를 나타내었다. 최종적으로 9주령에서 모든 시험군 및 비교시험군이 혈당 저하 효과를 나타냈고, 그 효력은 다음과 같은 순서로 나타났다.

Pinitol(52.1%)>DC25(47.6%)>DC60-2(38.6%)>DC5(34.6%)= BANABA (34.6%) > Anthocyanins (26.5%) = DC60-1 (25.8%).

[355]

[356] **2-2. 체중, 사료섭취량 및 식이효율**

[357] 6주간 약물 투여를 진행하는 동안 대조군에 대한 시험물질 투여군의 체중 변화를 측정하였으며, 결과는 도 30과 같다. DC60-1, DC25, Pinitol, 그리고 DC60-2투여군에서 변화가 나타났다. 즉, 실험군내에서 1-2마리가 평균 체중에서 아주 높던지, 낮은 체중을 나타내었다. 사료섭취량의 측정 결과는 아래 표 1과 같다. 시험 종료 후 투여군당 하루 사료섭취량은 DC60-1, DC25, Pinitol 투여군에서 비처리 대조군(NC)에 비하여 적은 사료섭취량이 관찰 되었다. 사료섭취량과 체중증가량을 이용하여 각 군의 5주간 식이효율을 구해보았을 때, 비처리 대조군 (NC)에 비하여 군간에 통계학적으로 유의적인 차이는 DC25 ($p<0.05$), DC60-2 ($p<0.05$), BANABA ($p<0.05$) 투여군에서 나타났고, 식이효율변화에서는 DC25와 Pinitol 투여군이 비처리 대조군 (NC)과 식이효율 (FER, %)이 비슷하였고, 또한 DC25와 Anthocyanins, BANABA 투여군이 비처리 대조군 (NC)에 비하여 20% 이상 식이효율 (FER, %)이 감소하였고, DC60-1와 DC60-2 투여군이 비처리 대조군 (NC)에 비하여 28% 이상 식이효율 (FER, %)이 현저하게 감소하였다.

[358] 표 1

[Table 1]

실험군	사료섭취량(g/day)	체중증가(g/day)	식이효율(FER,%)
비처리대조군(NC)	5.45	0.661±0.05	12.1±0.88
DC60-1	4.93	0.429±0.09	8.69±1.77
Anthocyanins	5.47	0.518±0.09	9.47±1.71
DC25	4.70	0.468±0.03	9.95±0.64
Pinitol	4.20	0.500±0.05	11.9±1.28
DC60-2	5.14	0.429±0.07	8.34±1.45
DC5	5.37	0.443±0.15	11.0±0.55
BANABA	5.95	0.561±0.02	9.70±0.34

[359]

[360] **2-3. 혈청 중 중성지방 (triglyceride, TG) 변화**

[361] 9주령에서 실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 에틸 에테르로 마취하고, 3ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치하고 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고, 혈청자동측정기로 혈청 중 중성지방 (TG) 변화를 측정하였다. 결과는 도 31과 같다. 비처리 대조군의 중성지방 (TG) 수준은 22 mg/dL이었고, 이와 비교하여 DC60-1, DC6-2, DC25, DC5 및 Pinitol 투여군은 2배 정도로 중성지방 (TG)이 증가하였다. Anthocyanins과 BANABA 투여군은 비처리 대조군 (NC)에 비하여 4배 정도로 중성지방 (TG)이 크게 증가한 것으로 나타났다.

[362]

[363] **2-3. 혈청 중 총콜레스테롤 (total cholesterol) 변화**

[364] 상기 2-2와 같은 방법으로 분리된 혈청에 대하여 혈청자동측정기로 혈청 중 총콜레스테롤양을 측정하였으며, 결과는 도 32와 같다. 비처리 대조군 (NC)의 총콜레스테롤 수준은 168.3 mg/dL이었고, DC60-1와 BANABA 투여군이 비처리 대조군 (NC)에 비하여 총콜레스테롤 감소를 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다. 그리고 DC60-2, DC25, DC5, Anthocyanins 및 Pinitol은 비처리 대조군 (NC)과 혈청내 총콜레스테롤 수준의 차이가 없었다.

[365]

[366] **2-4. 혈청 중 저밀도-콜레스테롤 (Low Density Lipoprotein-Cholesterol) 및 고밀도-콜레스테롤 (HighDensity Lipoprotein-Cholesterol) 변화**

[367] 상기 2-2와 같은 방법으로 분리된 혈청에 대하여 혈청자동측정기로 혈청 중 저밀도-콜레스테롤 (LDL-Chol.)과 고밀도-콜레스테롤 (HDL-Chol.) 양을 측정하였으며, 결과는 도 33과 같다. 비처리 대조군 (NC)의 저밀도-콜레스테롤

수준은 10.1 mg/dL이었고, DC60-1은 통계적 유의성 ($p < 0.01$)을 가지고 대조군 수치의 65% 수준으로 감소하였다. 통계적 유의성은 없으나 DC60-2와 BANABA 투여군이 비처리 대조군에 비하여 저밀도-콜레스테롤 감소를 나타내었다. 그러나 DC25, DC5, Anthocyanins, Pinitol 및 BANABA 투여군은 비처리 대조군 (NC)과 혈청 내 총콜레스테롤 수준이 차이가 없었다. 고밀도-콜레스테롤은 모든 투여군이 비처리 대조군과 차이가 없었다.

[368]

[369] **2-5. 혈청 중 BUN 변화**

[370] 상기 2-2와 같은 방법으로 분리된 혈청에 대하여 혈청자동측정기로 혈청 중 BUN 수준을 측정하였으며, 결과는 도 34와 같다. 혈청 중 BUN 수준은 당뇨로 인해 변동이 있을 수 있고, 근육 등에서 분비가 되기도 하므로 비만으로 인한 근육량 감소로 변화가 있을 수 있다. 비처리 대조군의 BUN 수치인 30.2 mg/dL에 비하여 Pinitol 투여군의 4번 생쥐가 92.8 mg/dL로 3배 이상 높게 나타나, 신독성의 가능성을 배제할 수 없는 것으로 평가되었다. 그 외 DC60-1, DC60-2, DC25, DC5, Anthocyanins 및 BANABA 투여군은 비처리 대조군 (NC)과 혈청 내 BUN의 차이가 없었다.

[371]

[372] **2-6. 혈청 중 인슐린 변화**

[373] 상기 2-2와 같은 방법으로 분리된 혈청에 대하여 mouse insulin ELISA kit (SHIBAYAKI, Japan)로 혈청 중 인슐린 수준을 측정하였으며, 결과는 도 35와 같다. 혈청 중 인슐린 수준은 비처리 대조군(NC)이 10.2 ng/mL이었고, DC60-1이 3.3 ng/mL, DC60-2이 4.1 ng/mL, DC5가 4.0 ng/mL, BANABA가 1.8 ng/mL로, 모두 통계학적 유의성 ($p < 0.001$)을 가지고 대조군 대비 60% 이상의 감소를 나타내었다. Pinitol 또한 6.6 ng/mL 수준으로 대조군에 비하여 35.3%의 수준으로 통계학적으로 유의성 ($p < 0.01$)있는 저하효과를 나타내었다. DC25와 Anthocyanins은 저하효과를 나타내지 않았다. 최종적으로 인슐린저항성 억제에 관한 효능을 비교하면, BANABA (82.4%) > DC60-1 (67.6%) > DC5 (60.9%) ?? DC60-2 (59.8%) > Pinitol (35.3%) 순서로 강하게 나타났다.

[374]

[375] **2-7. 지방조직 변화**

[376] 실험 종료된 10주령의 db/db 생쥐에서 각 실험동물의 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직(adipose tissue)을 부위별로 적출하여, 지방조직들의 총 중량을 측정하였으며, 결과는 도 36과 같다. DC60-1, Anthocyanins, DC25, Pinitol, 그리고 DC60-2투여군은 복부(Abdominal), 부고환(Epididymal) 및 사타구니(Inguinal)의 지방조직(adipose tissue)의 무게에서 비처리 대조군 (NC)에 비하여 통계학적으로 유의성 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 있게 약 5.4% 감소한 것으로 나타났다. 그러나 DC5와 BANABA 투여군은 비처리 대조군 (NC)과 차이가 없었다.

[377]

[378] **2-8. 간 조직 변화**

[379] 실험 종료된 10주령의 *db/db* 생쥐에서 각 실험동물의 간조직 (liver)을 적출하여, 총 중량을 측정하였으며, 그 결과는 도 37과 같다. DC25, Pinitol, 그리고 DC60-2 투여군이 간조직의 무게에서 비처리 대조군 (NC)에 비하여 각각 약 7.0% 이상 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다 ($p<0.05$). 그러나 DC60-1, Anthocyanins, Pinitol, DC5, 그리고 BANABA 투여군은 비처리 대조군 (NC)과 차이가 없었다.

[380]

[381] **<실험예 6>**

[382] 본 발명의 돌콩 추출물 중의 주요 유효성분이 종래에 콩과 식물로부터 유래된 항당뇨 유효물질로 알려진 세콰이톨(sequoyitol)이나 피니톨인지 여부를 직접적으로 확인하고, 또 돌콩 추출물 중에 세콰이톨, 피니톨, 키로-이노시톨(chiro-inositol)이 어느 정도 함유되어 있는지 확인하기 위하여, 실험예 5에서 사용한 시험물질 DC60-1, DC60-2, DC5, DC25에 대하여 분석실험을 실시하였다. 분석조건은 아래와 같으며, 분석결과 도 38~40 및 표 2와 같다. DC60-1, DC60-2, DC5, DC25 모두 세콰이톨과 키로-이노시톨은 검출되지 않았으며, 피니톨은 일부 함유되어 있었으나 피니톨 함유량과 시험물질의 혈당저하 효과는 비례하지 않았다 (실험예 5의 2-1 및 도 29 참조).

[383]

[384] **분석조건**

[385] 기기 : HITACHI Elite Lachrom HPLC

[386] 검출기 : ELSD Detector

[387] 컬럼 : NH₂ column (5 μ m, 4.6 x 250 mm)

[388] 컬럼온도 : 40 °C

[389] 유속 : 1.0 ml/min

[390] 주입량 : 10 μ l[391] 용매조건 : Acetonitrile 85% : H₂O 15% (Isocratic)

[392] 표 2

[Table 2]

시험물질	Pinitol	Sequoyitol	Chiro-inositol
DC60-1	6.3%	불검출	불검출
DC60-2	10.7%	불검출	불검출
DC5	1.2%	불검출	불검출
DC25	1.5%	불검출	불검출

[393]

[394]

[395] <실시예 4>

[396] 하기에 본 발명의 추출물을 포함하는 약학적 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[397]

[398] 제제예 1. 산제의 제조

[399] DC-WE 추출물 20 mg

[400] 유당 100 mg

[401] 탈크 10 mg

[402] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[403]

[404] 제제예 2. 정제의 제조

[405] DC-WE 추출물 10 mg

[406] 옥수수전분 100 mg

[407] 유당 100 mg

[408] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[409] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[410]

[411] 제제예 3. 캡슐제의 제조

[412] DC-WE 추출물 10 mg

[413] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[414] 락토오스 14.8 mg

[415] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[416] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[417]

[418] 제제예 4. 주사제의 제조

[419] DC-WE 추출물 10 mg

[420] 만니톨 180 mg

[421] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[422] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[423] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[424]

[425] 제제예 5. 액제의 제조

[426] DC-WE 추출물 20 mg

[427] 이성화당 10 g

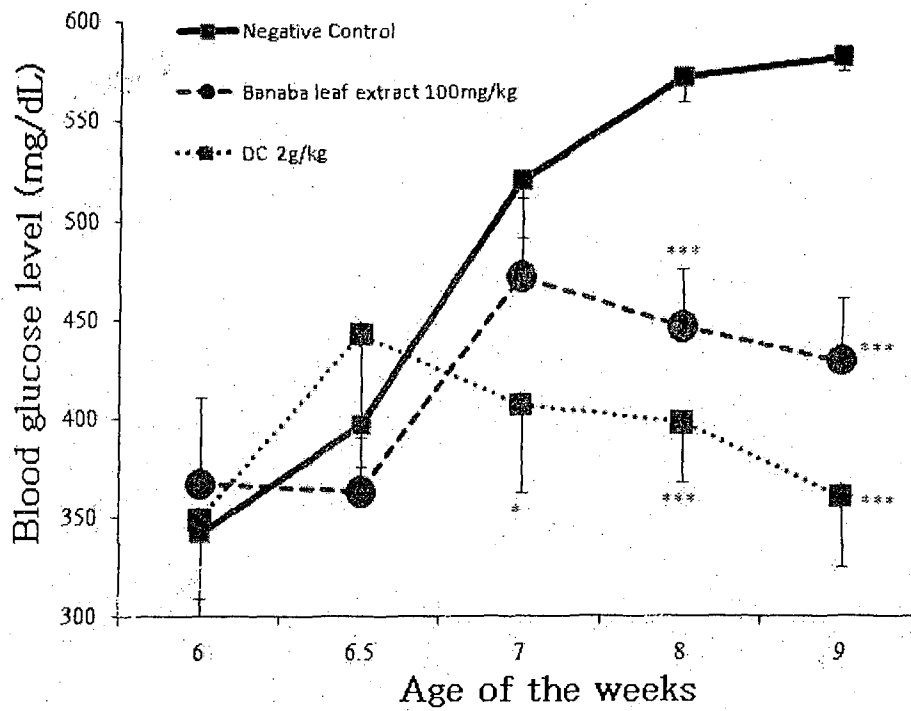
- [428] 만니톨 5 g
- [429] 정제수 적량
- [430] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체 100 ml 로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

청구범위

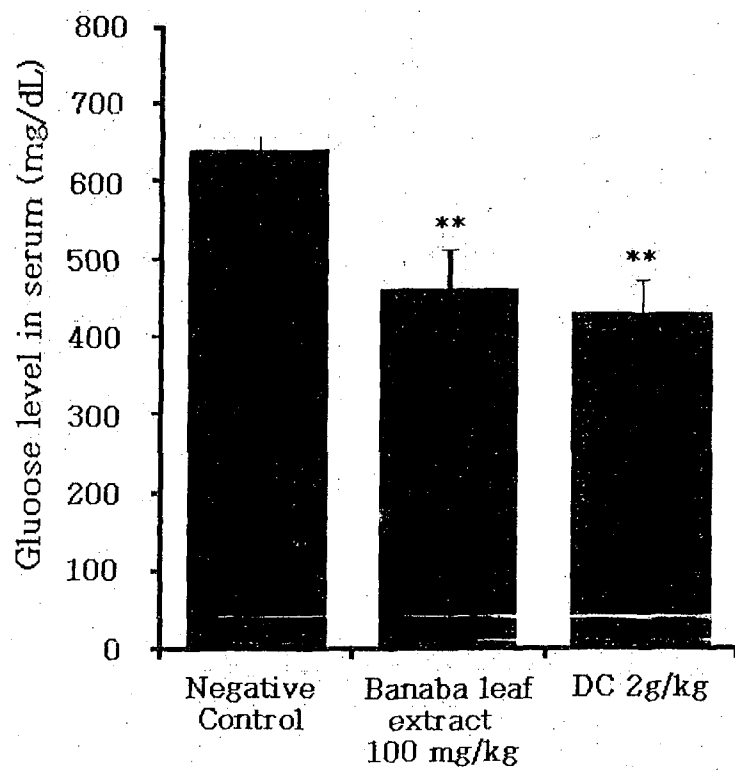
- [청구항 1] 돌콩(*Glycine soja*)의 열처리된 분말 또는 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 또는 당뇨합병증의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 열처리된 분말은 돌콩 또는 돌콩분말을 40~100°C로 열처리하여 얻은 것인 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 열처리된 분말은 돌콩 또는 돌콩분말을 60~90°C로 증자시켜 얻은 것인 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 돌콩분말을 100°C 이하에서 추출하여 얻은 것인 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 추출물은 돌콩분말을 0~90°C에서 물, 탄소수 1 내지 4의 유기용매 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 얻은 것인 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 돌콩분말을 추출한 후 물 또는 탄소수 1 내지 4의 유기용매로 분획하여 얻은 분획물인 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 당뇨합병증은 동맥경화증, 뇌경색, 뇌혈전, 심근경색증, 고혈압, 고지혈증, 비만증 중 어느 하나인 약학적 조성물.
- [청구항 8] 당뇨병 또는 당뇨합병증의 예방 및 개선을 위한 유효성분으로 돌콩(*Glycine soja*)의 열처리된 분말 또는 추출물을 함유하는 식품 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 열처리된 분말은 돌콩 또는 돌콩분말을 40~100°C로 증자시켜 얻은 것인 식품 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 열처리된 분말은 돌콩 또는 돌콩분말을 60~90°C로 증자시켜 얻은 것인 식품 조성물.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 추출물은 돌콩분말을 100°C 이하에서 추출하여 얻은 것인 식품 조성물.
- [청구항 12] 제8항 또는 제11항에 있어서, 상기 추출물은 돌콩분말을 0~90°C에서 물, 탄소수 1 내지 4의 유기용매 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 얻은 것인 식품 조성물.
- [청구항 13] 제8항에 있어서, 상기 추출물은 돌콩분말을 추출한 후 물 또는 탄소수 1 내지 4의 유기용매로 분획하여 얻은 분획물인 식품 조성물.
- [청구항 14] 제8항에 있어서, 상기 당뇨합병증은 동맥경화증, 뇌경색, 뇌혈전, 심근경색증, 고혈압, 고지혈증, 비만증 중 어느 하나인 식품 조성물.

- [청구항 15] 제8항에 있어서, 상기 식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 중 어느 하나의 형태를 갖는 건강기능식품인 식품 조성물.
- [청구항 16] 제8항에 있어서, 상기 식품은 음료, 분말음료, 고형물, 츄잉검, 차, 비타민 복합제, 식품 첨가제 중 어느 하나의 형태를 갖는 식품 조성물.

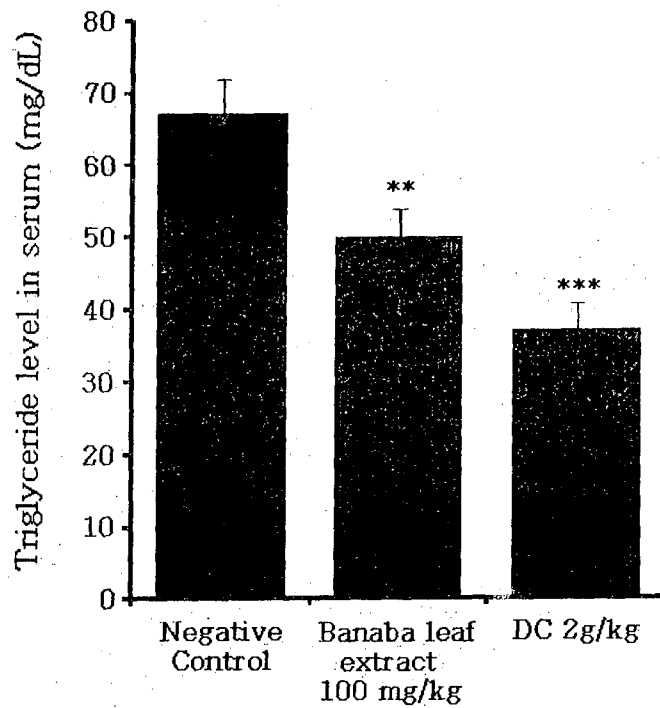
[Fig. 1]



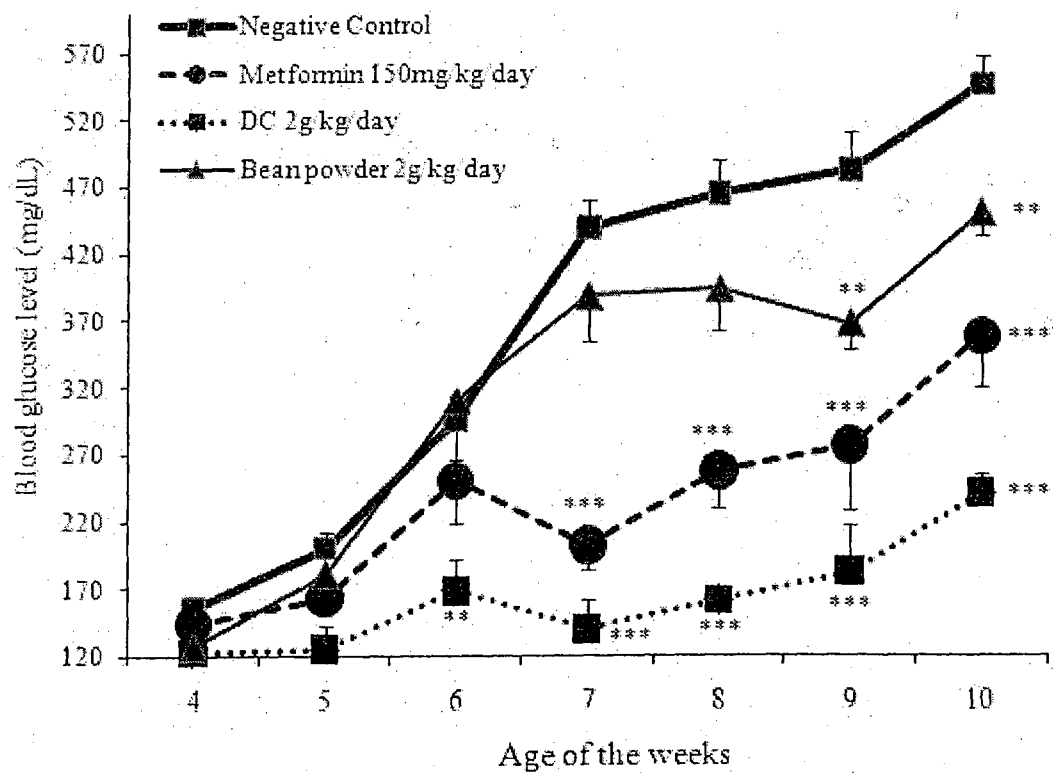
[Fig. 2]



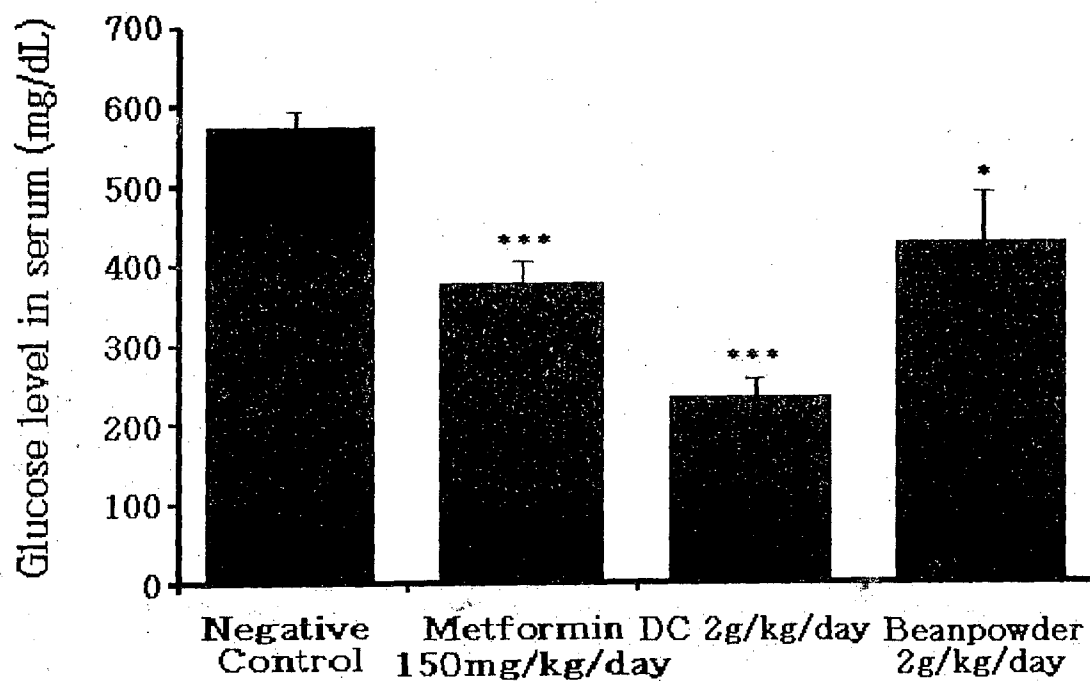
[Fig. 3]



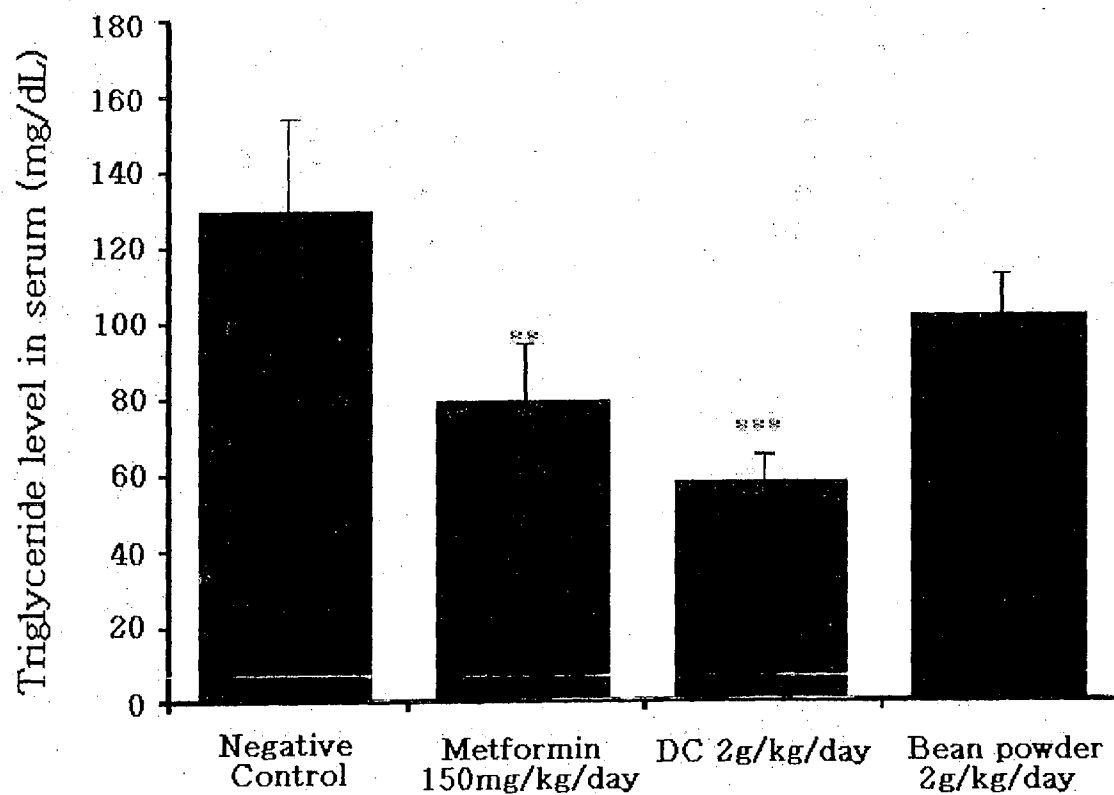
[Fig. 4]



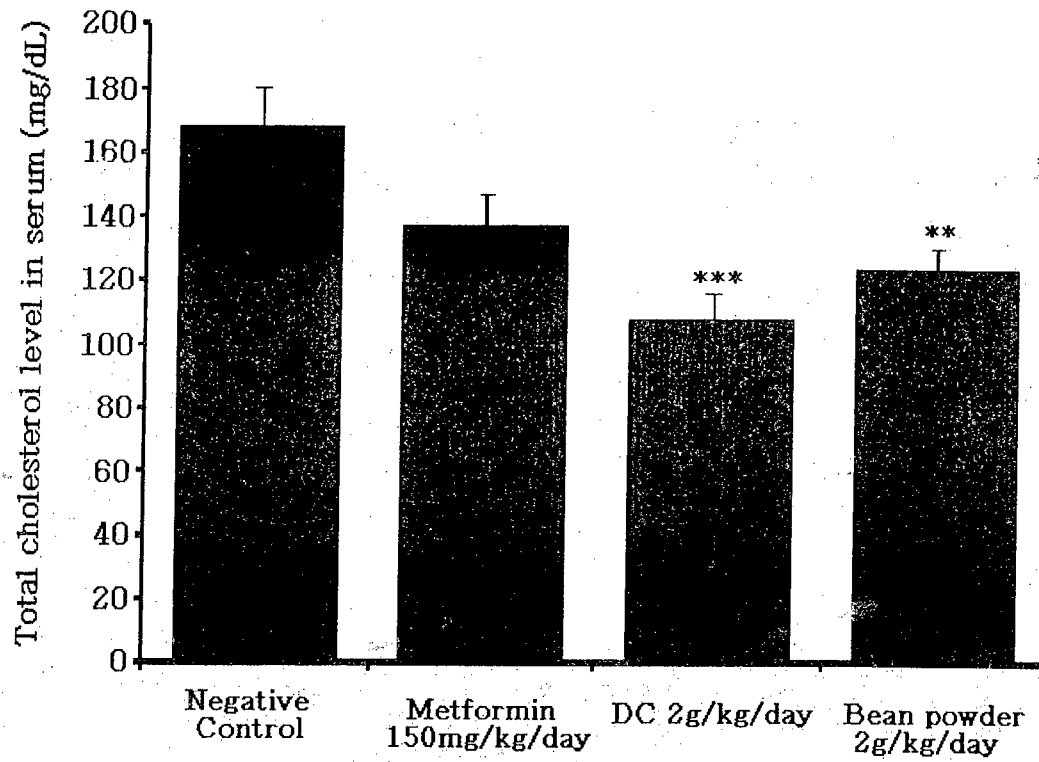
[Fig. 5]



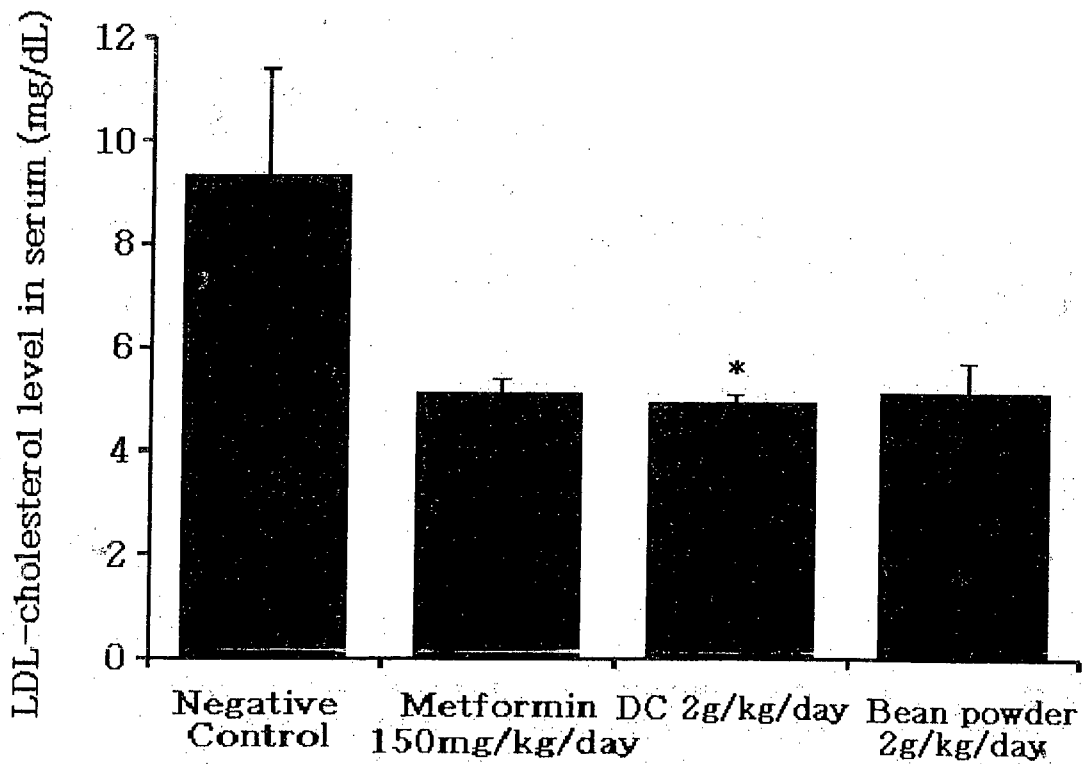
[Fig. 6]



[Fig. 7]

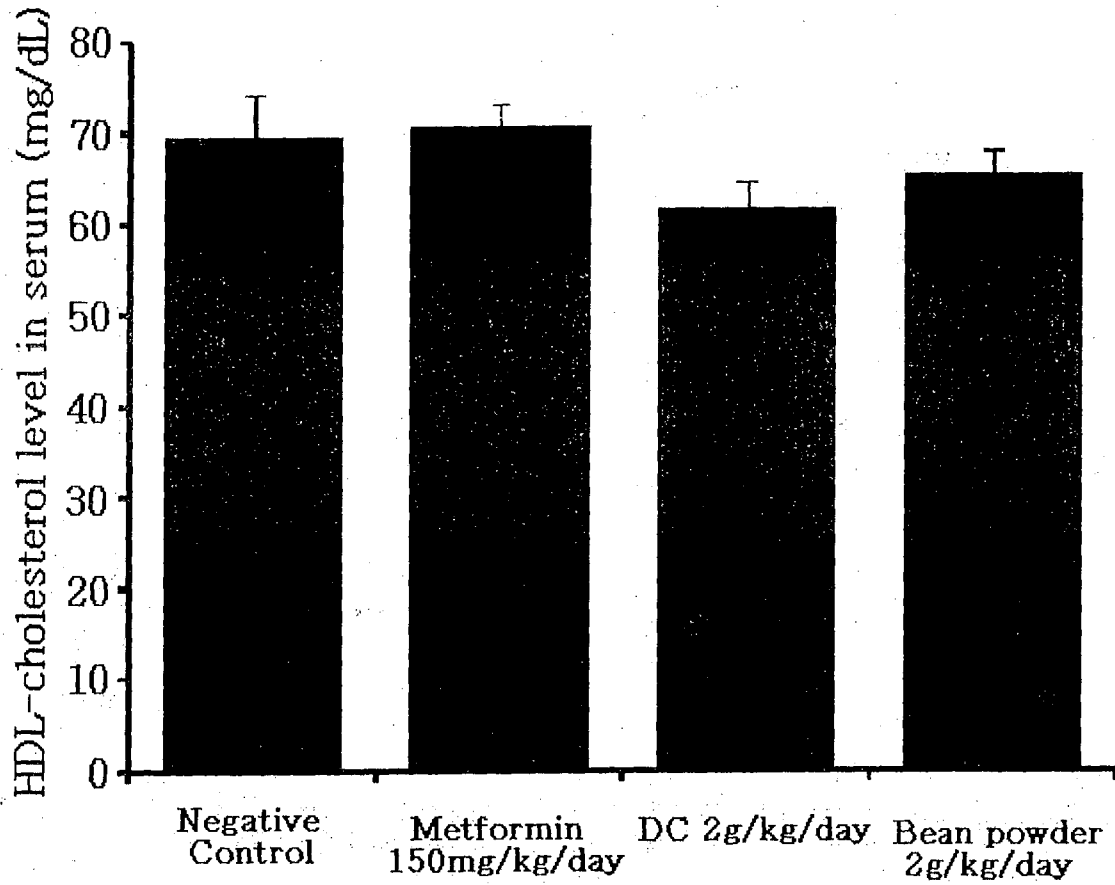


[Fig. 8]

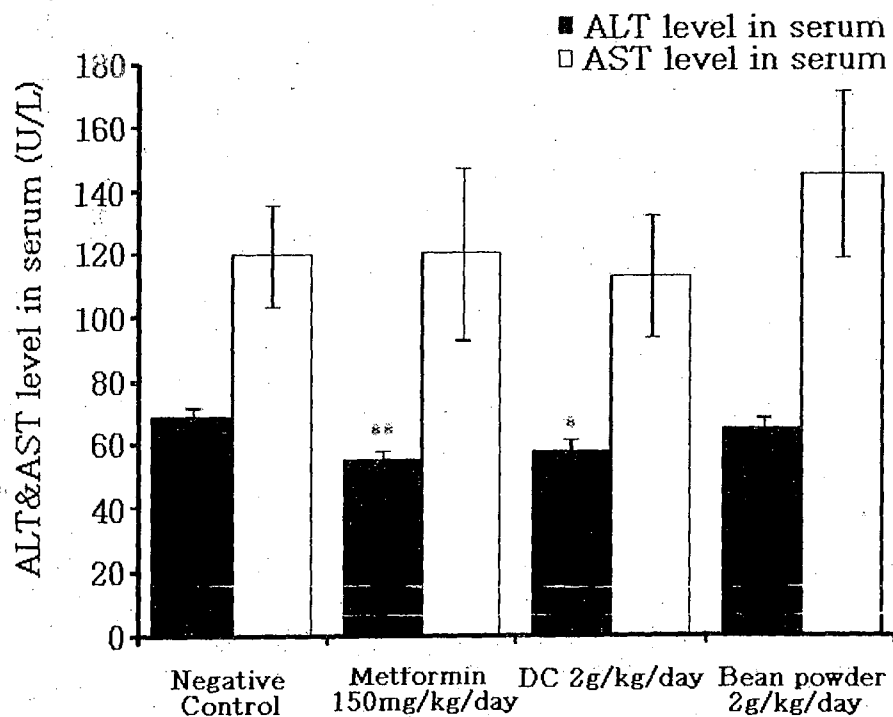


5/21

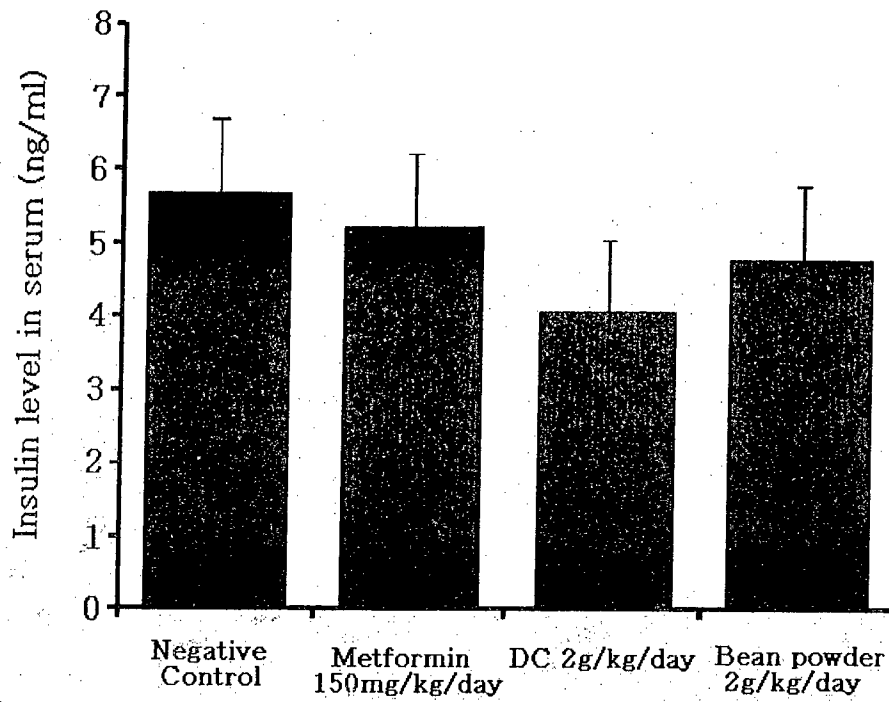
[Fig. 9]



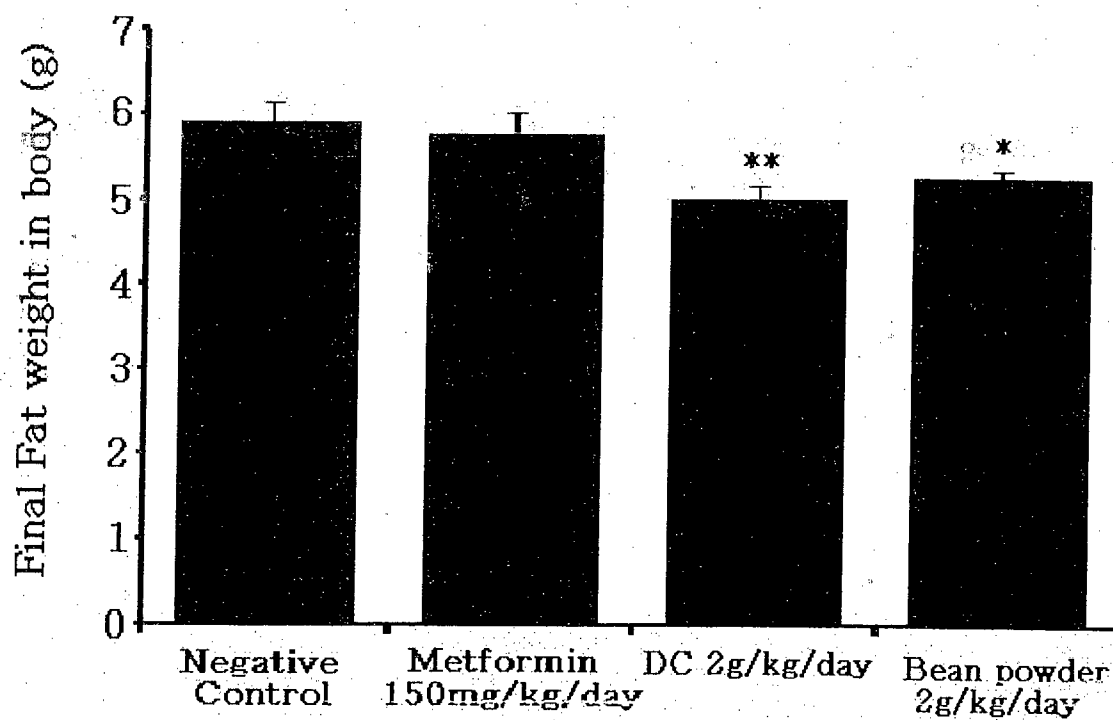
[Fig. 10]



[Fig. 11]

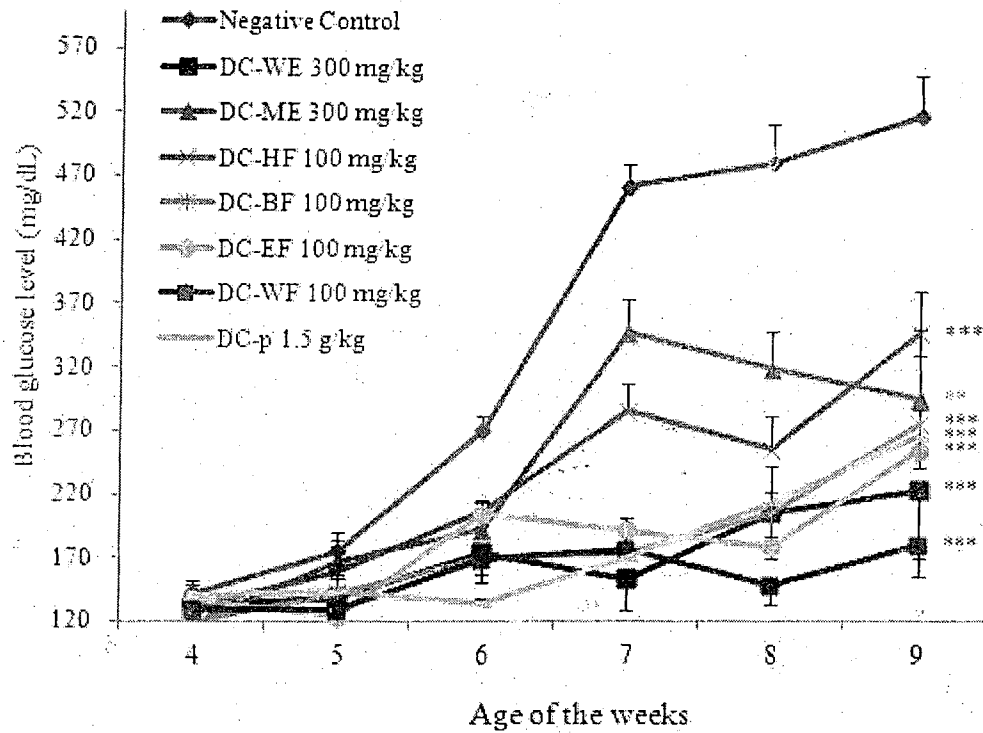


[Fig. 12]

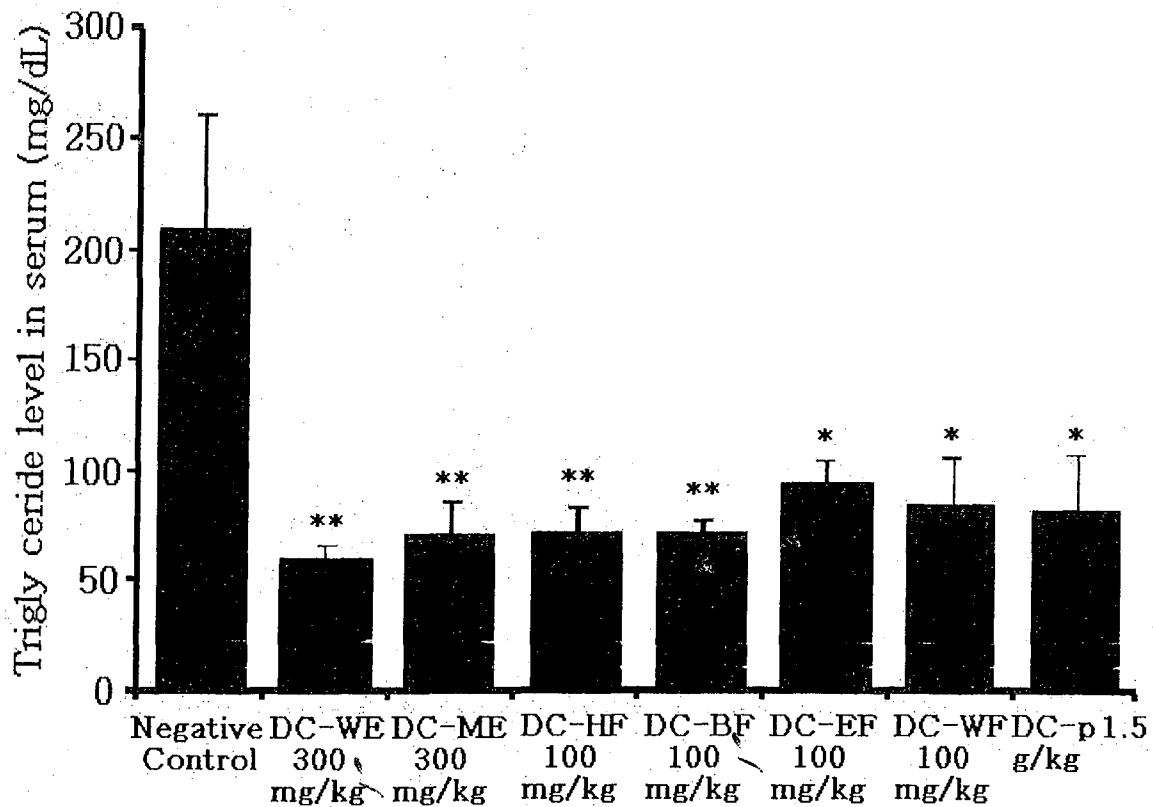


7/21

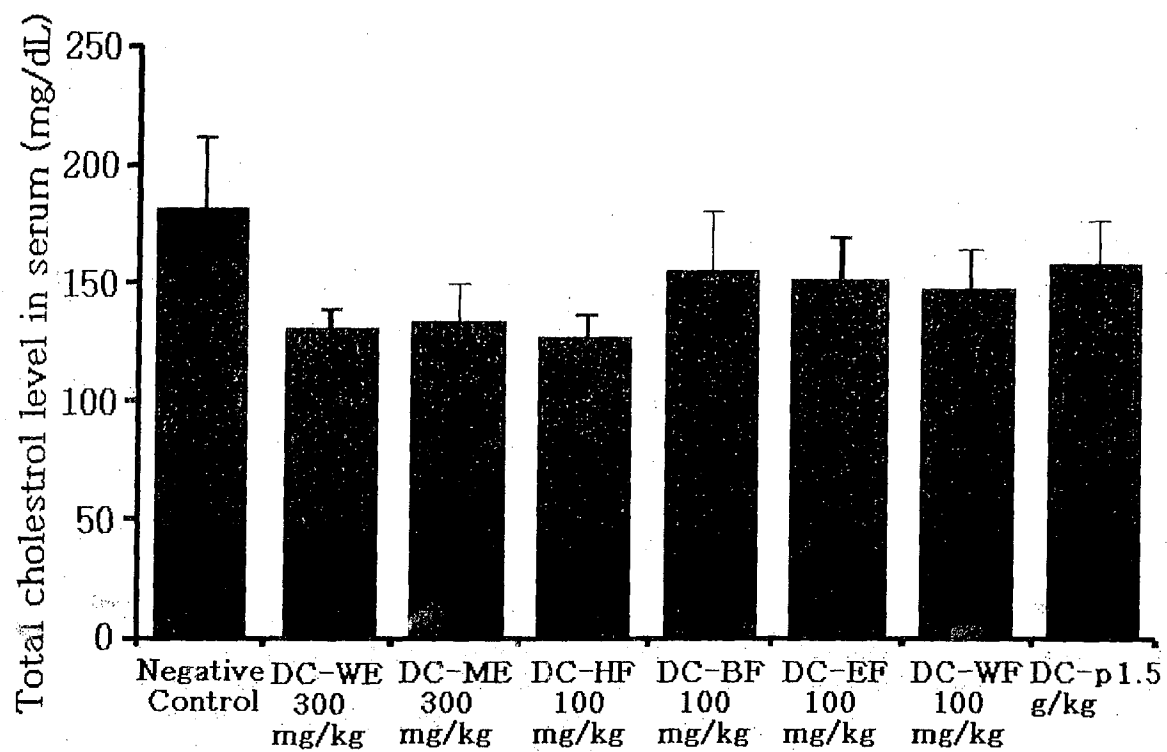
[Fig. 13]



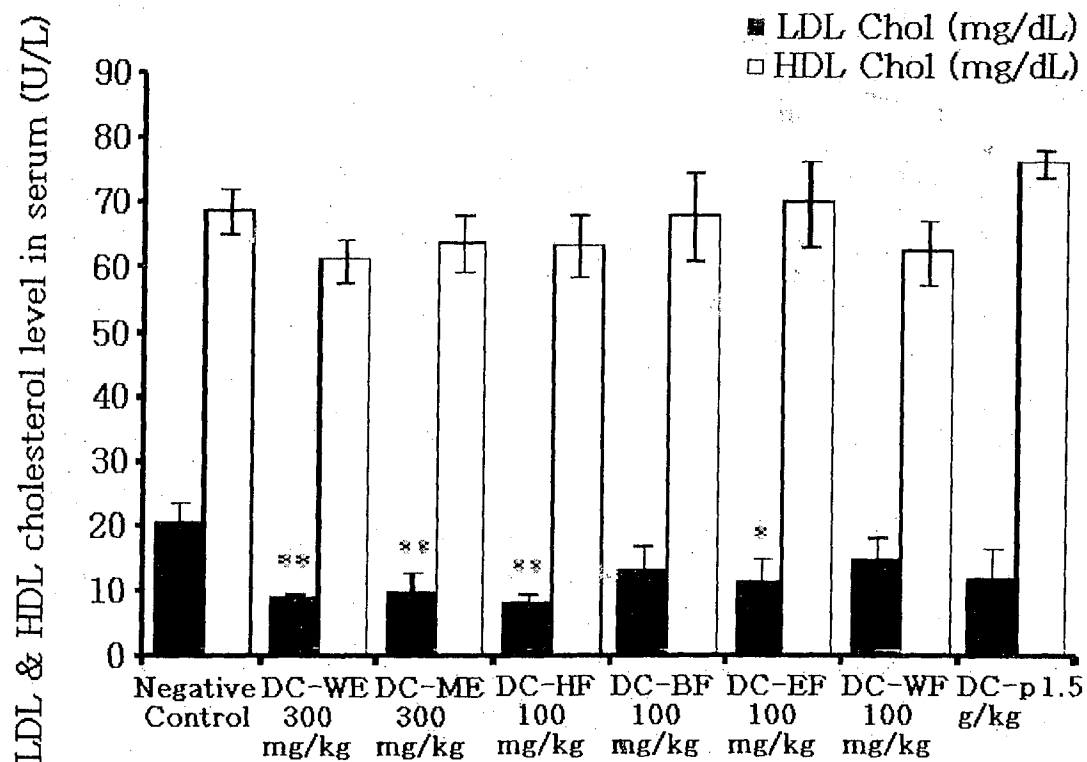
[Fig. 14]



[Fig. 15]

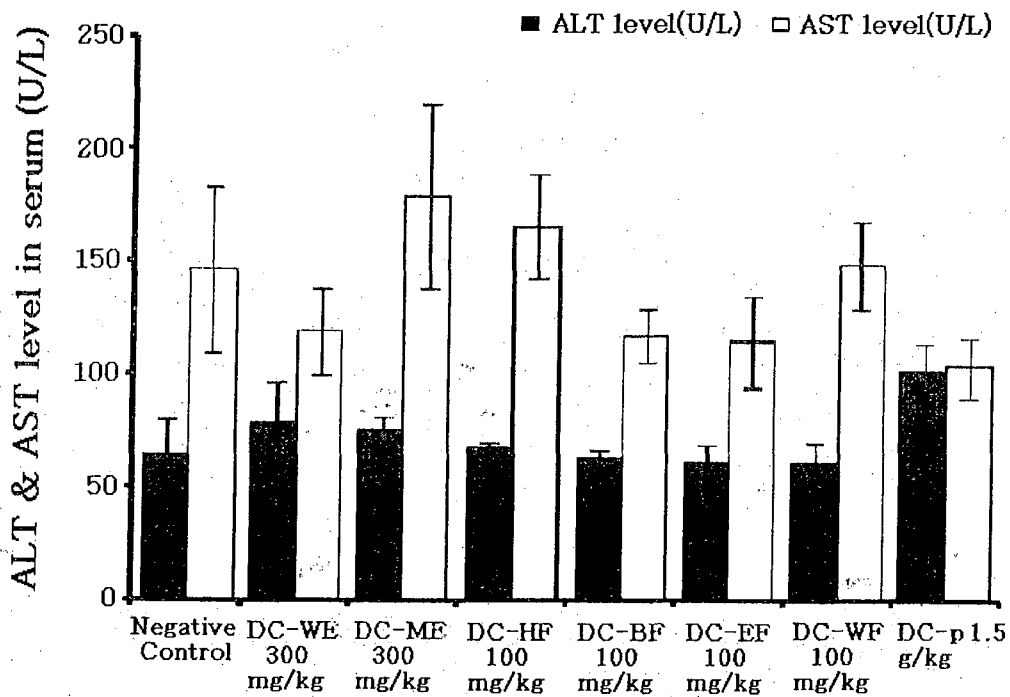


[Fig. 16]

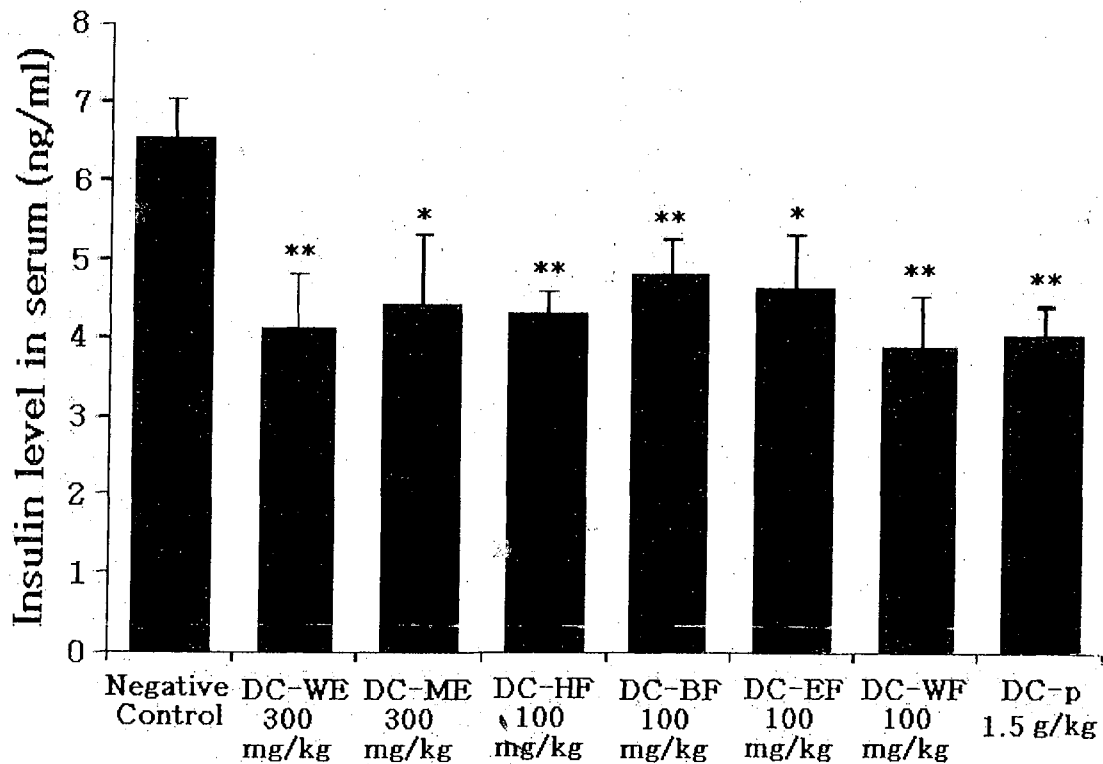


9/21

[Fig. 17]

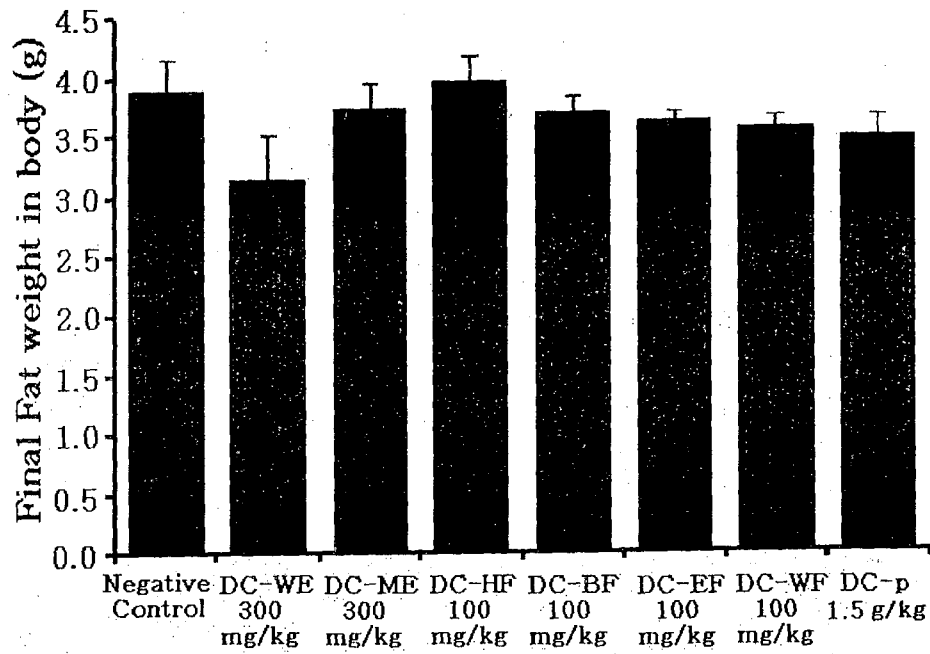


[Fig. 18]

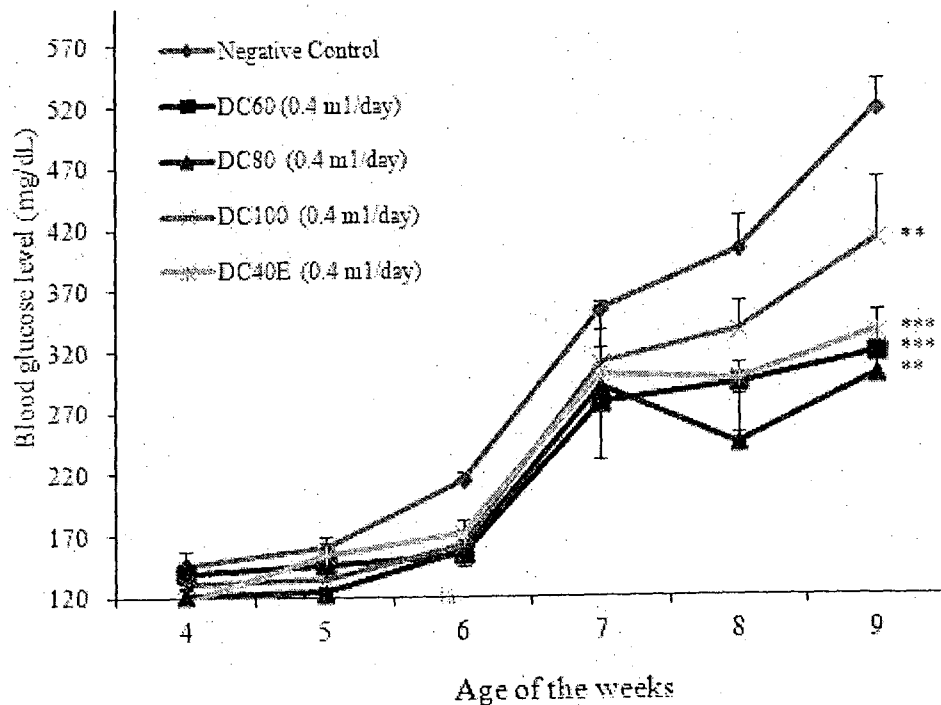


10/21

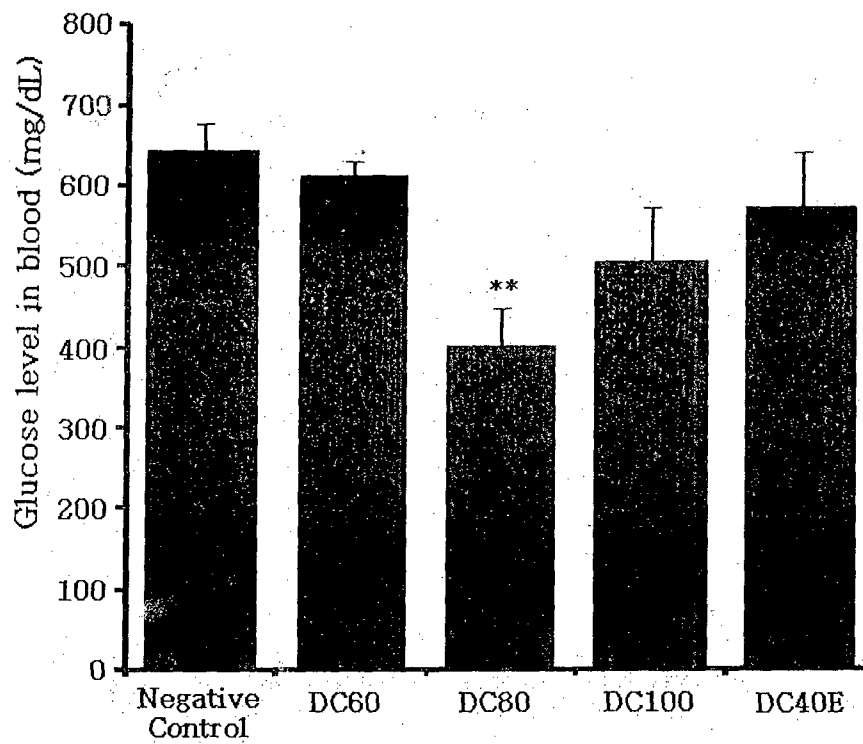
[Fig. 19]



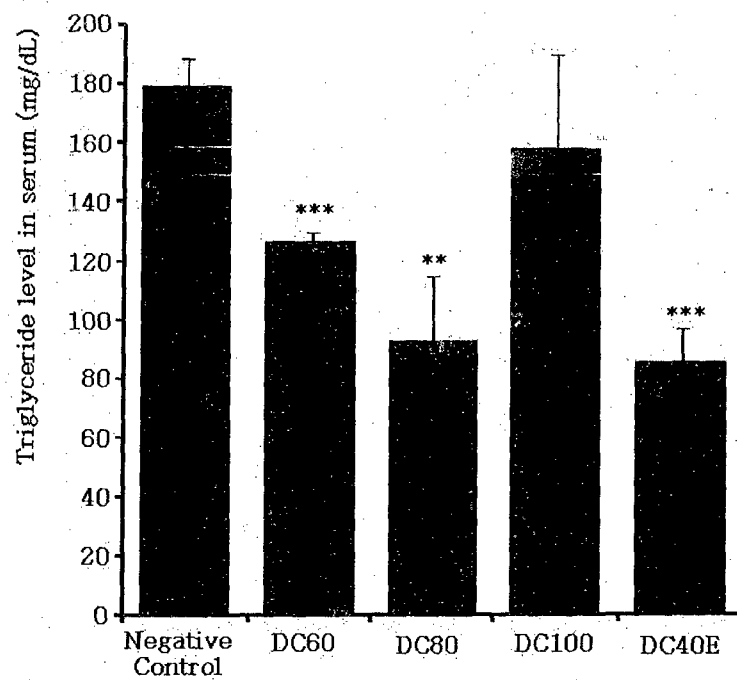
[Fig. 20]



[Fig. 21]

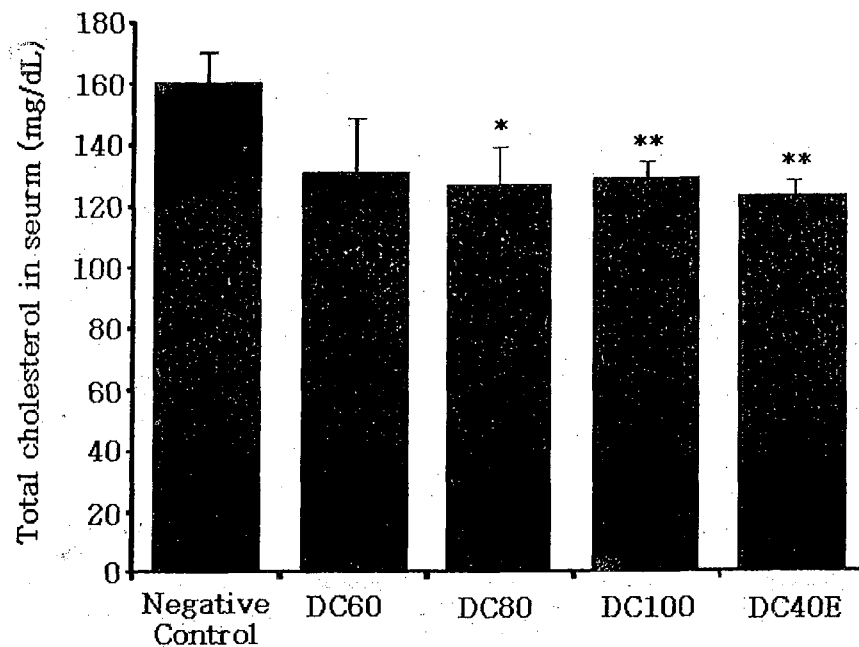


[Fig. 22]

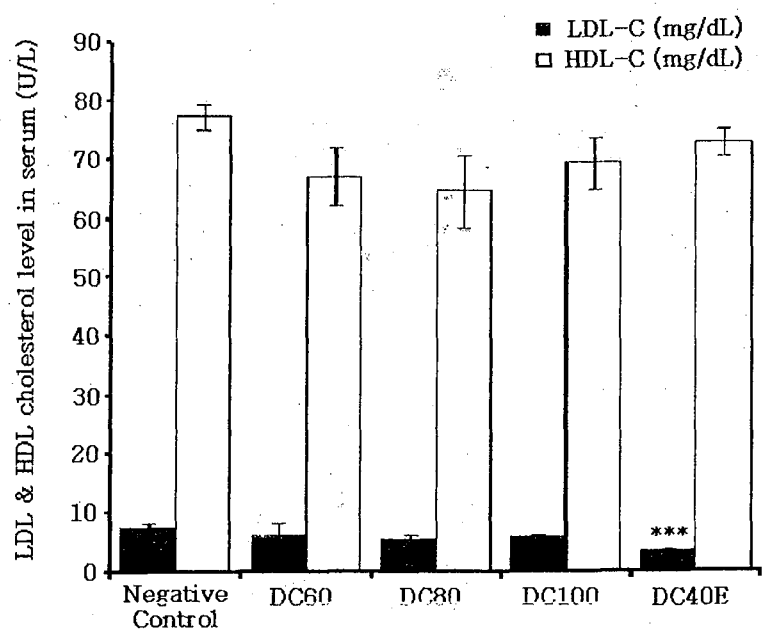


12/21

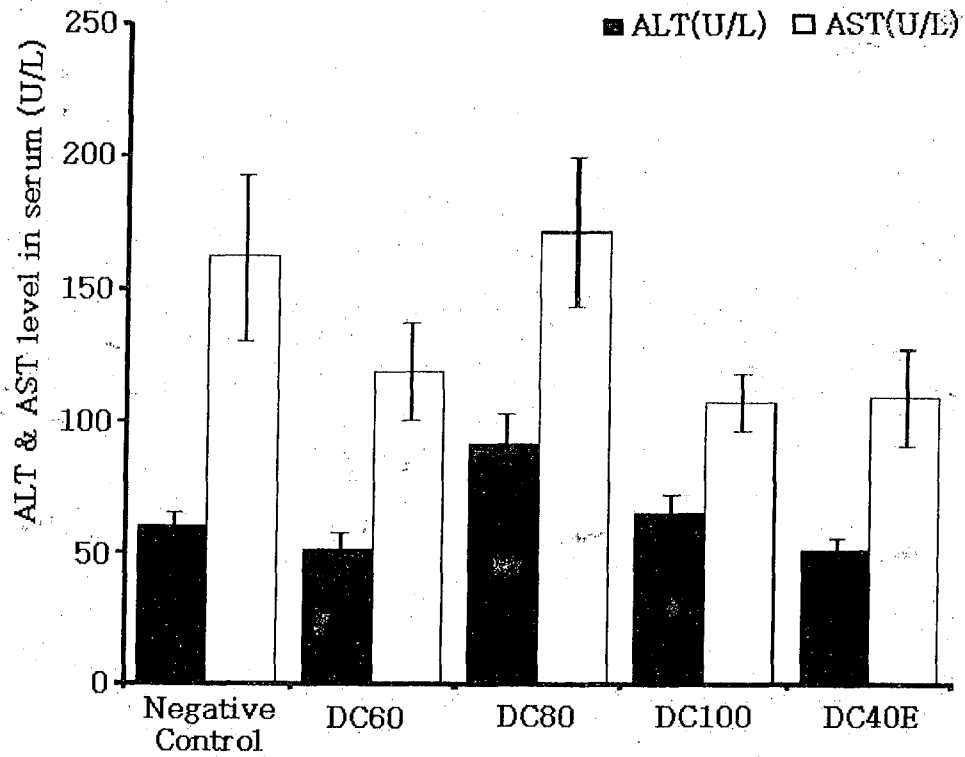
[Fig. 23]



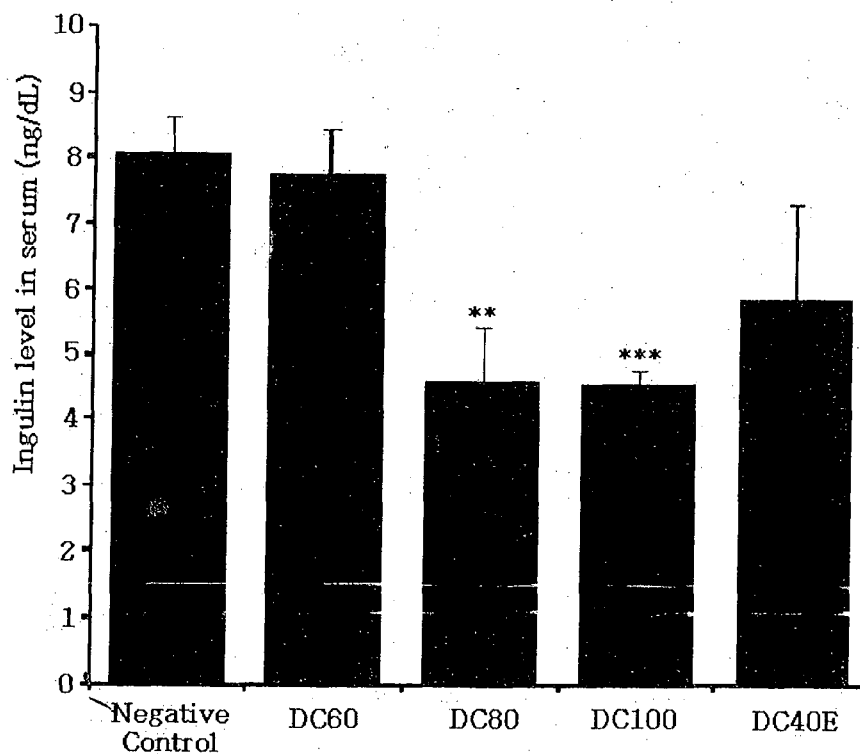
[Fig. 24]



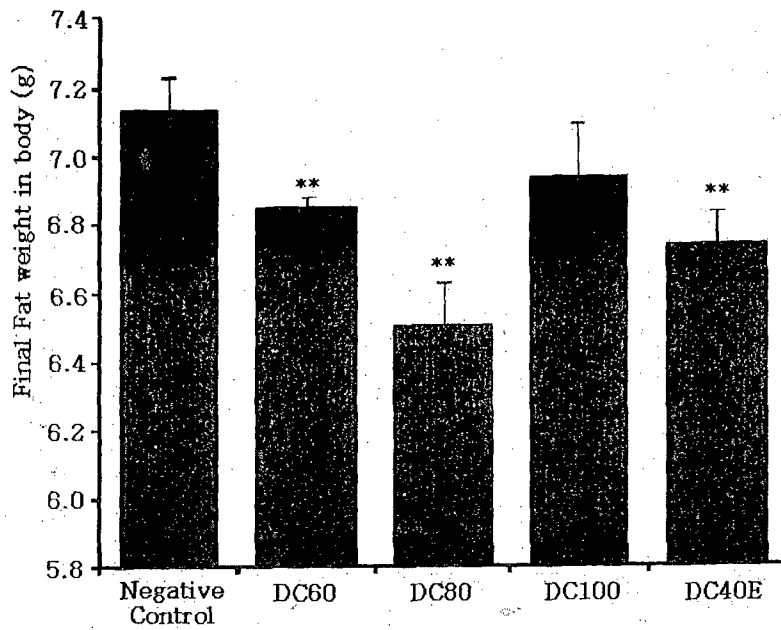
[Fig. 25]



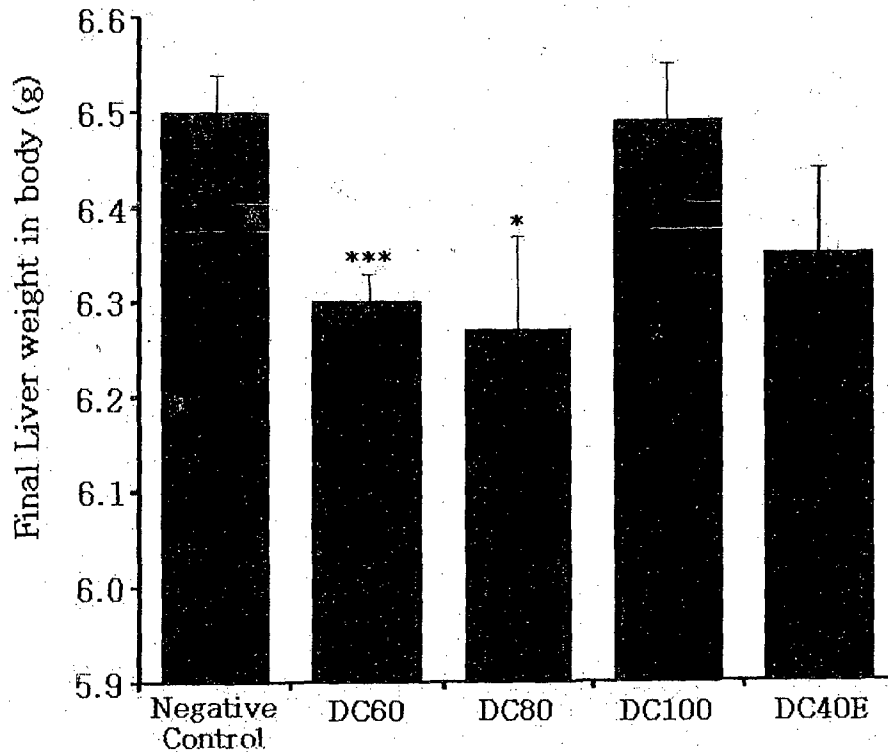
[Fig. 26]



[Fig. 27]

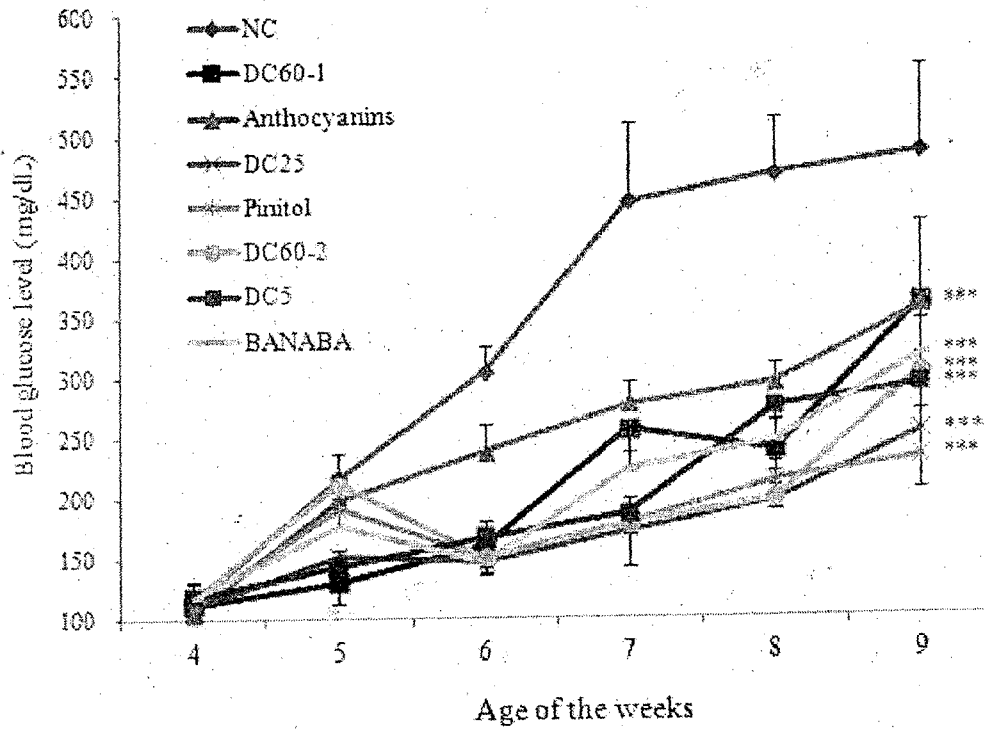


[Fig. 28]

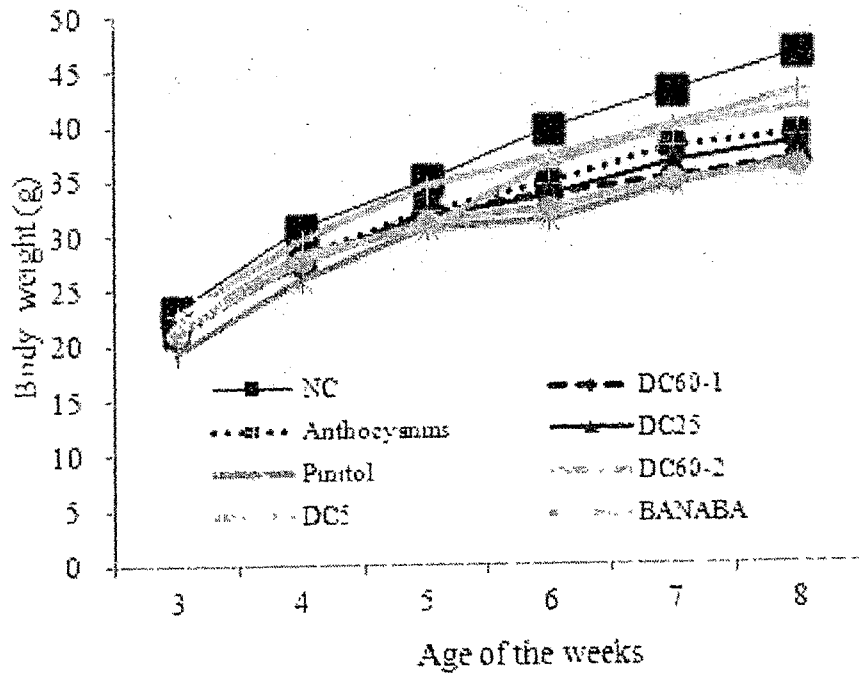


15/21

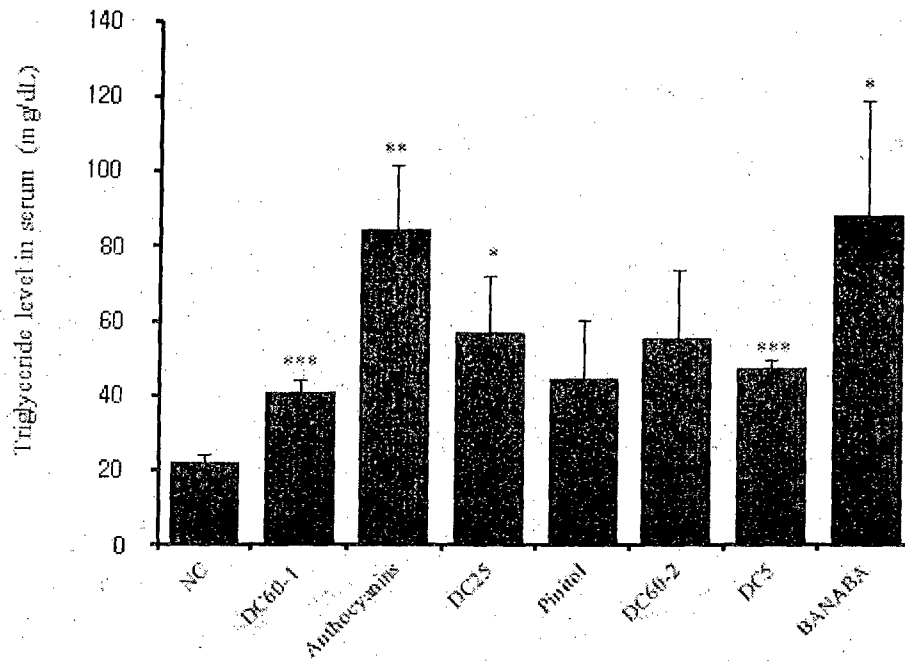
[Fig 29]



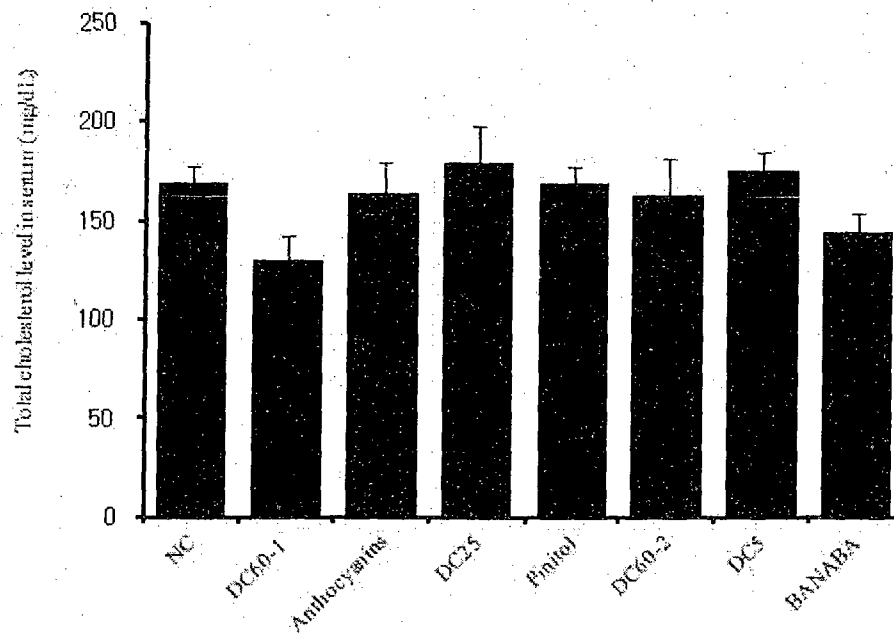
[Fig 30]



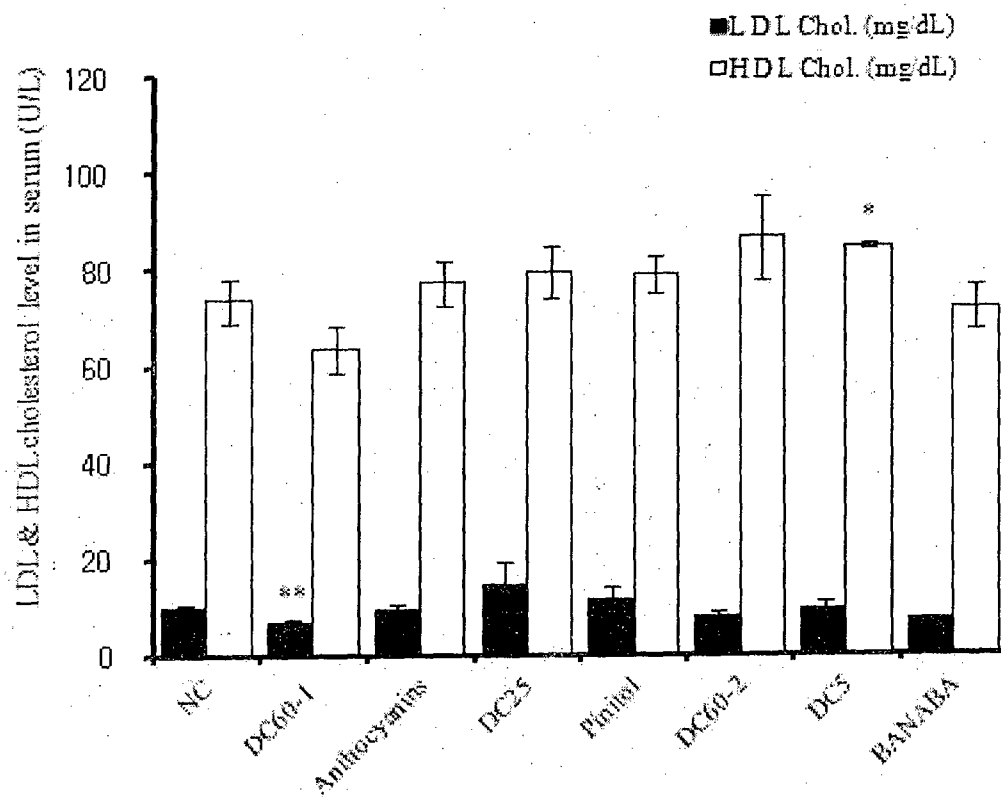
[Fig. 31]



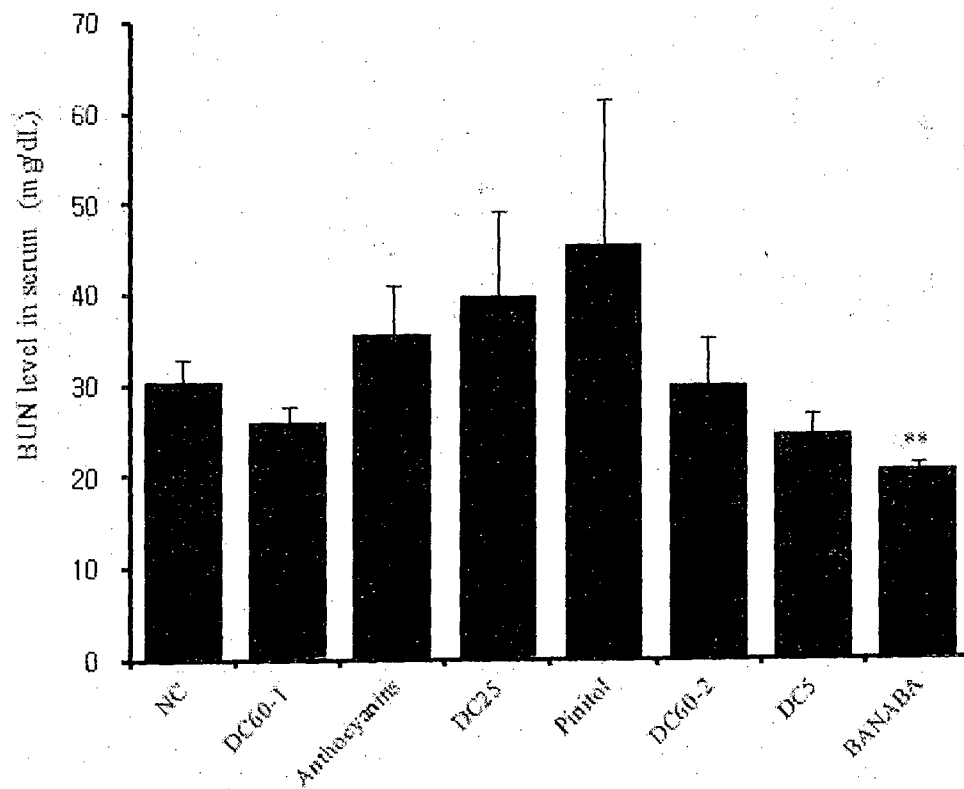
[Fig. 32]



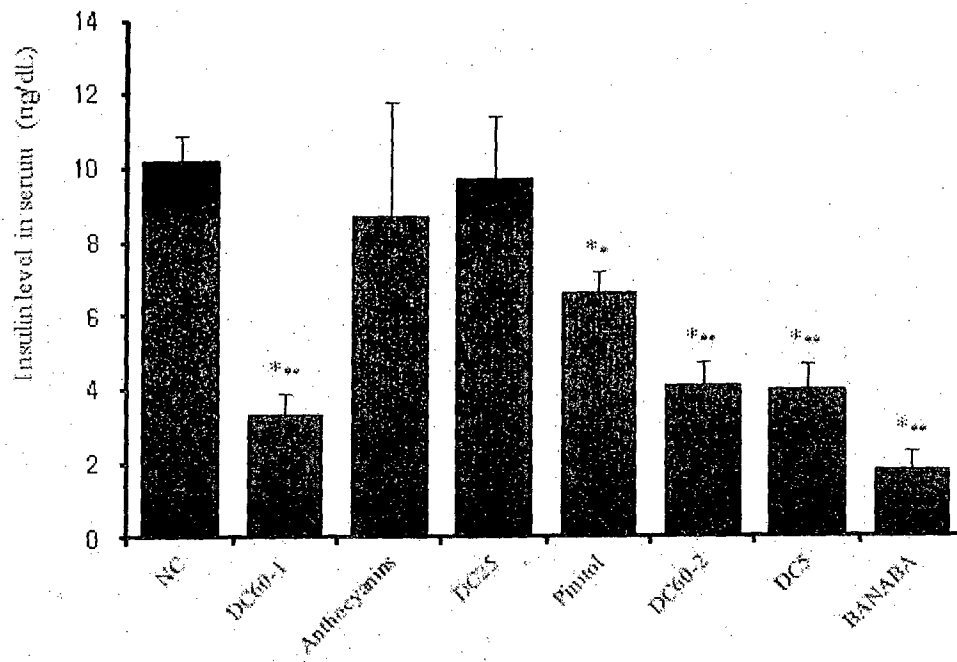
[Fig. 33]



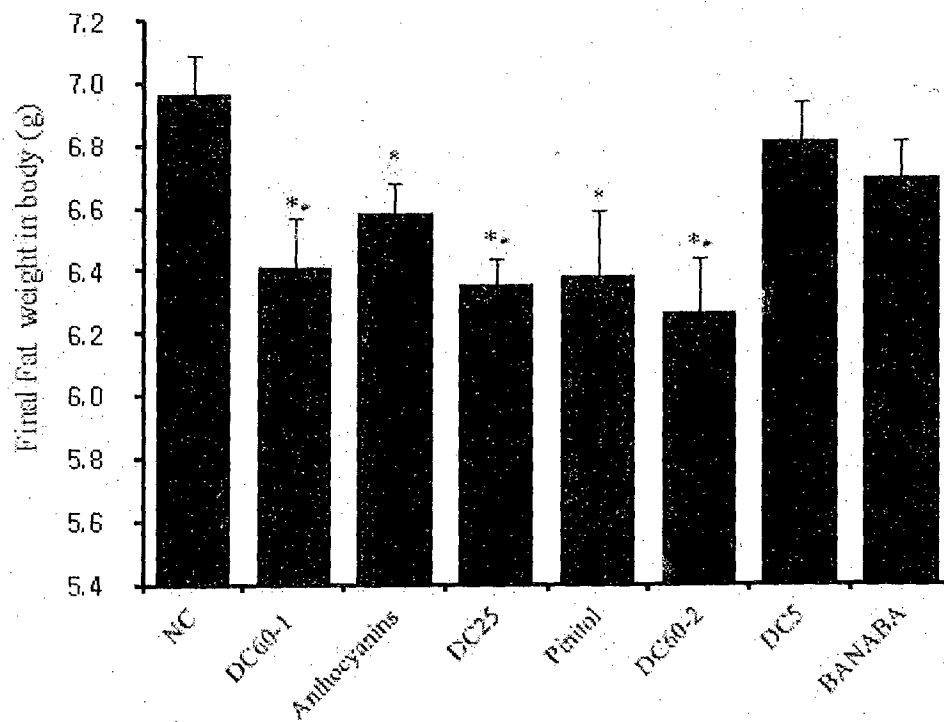
[Fig. 34]



[Fig. 35]

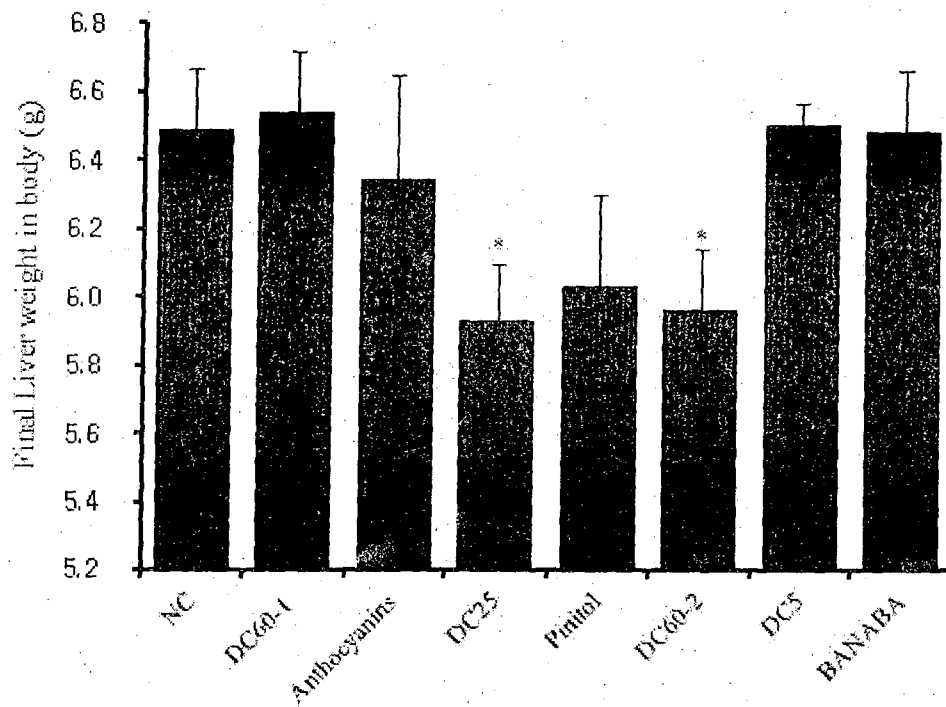


[Fig. 36]

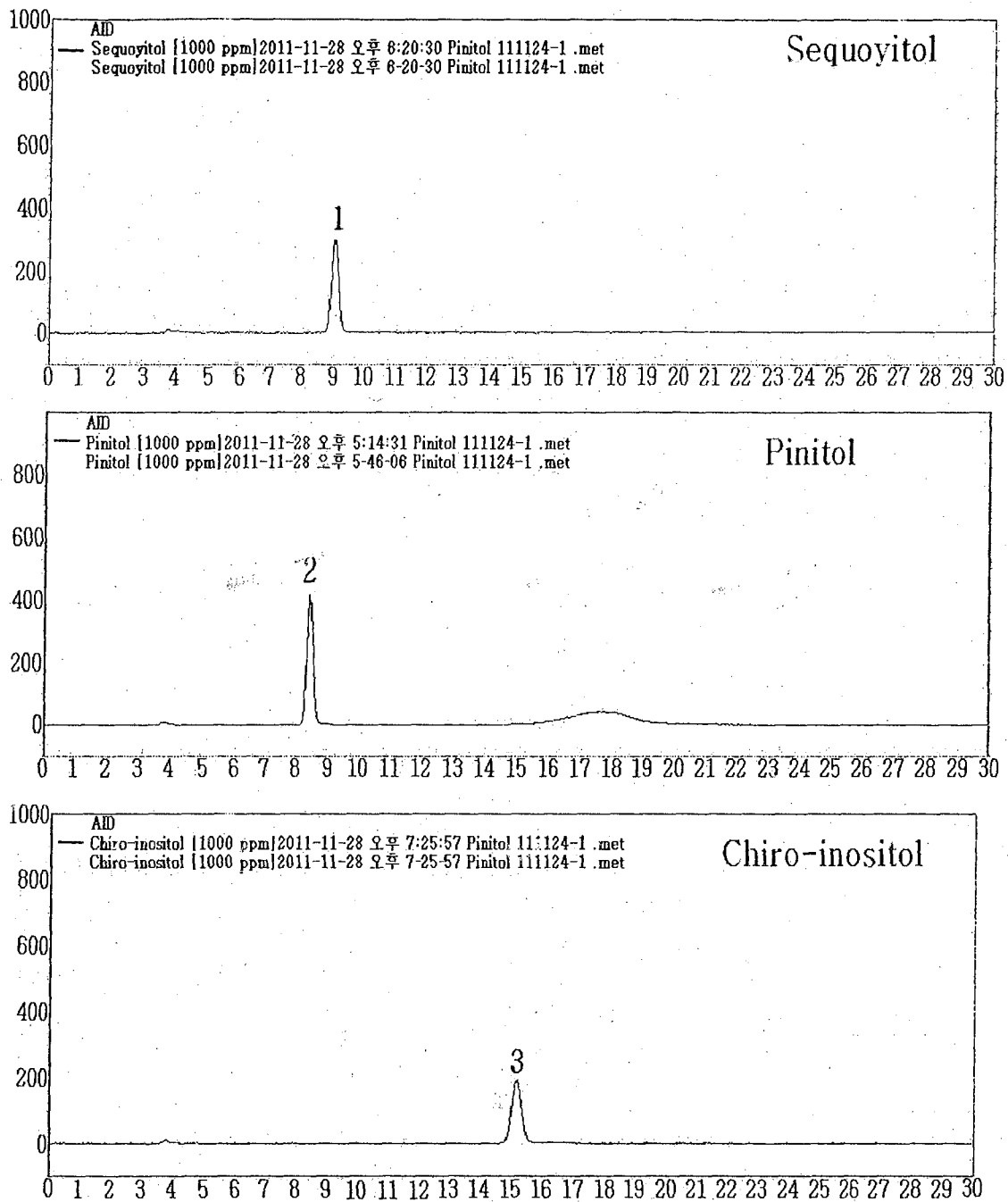


19/21

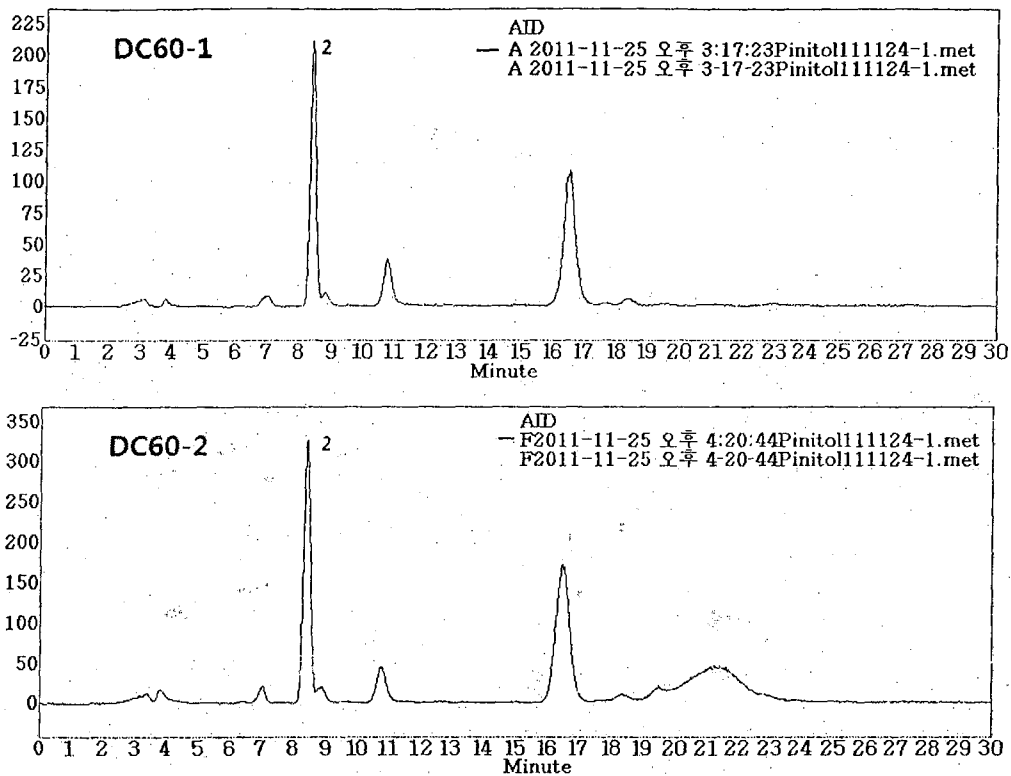
[Fig.37]



[Fig. 38]



[Fig. 39]



[Fig. 40]

