



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0114160
(43) 공개일자 2010년10월25일

(51) Int. Cl.

A61K 36/03 (2006.01) A61K 31/357 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0032559

(22) 출원일자 2009년04월15일

심사청구일자 2009년04월15일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

전유진

제주특별자치도 북제주군 아라2동 1138번지 프로
빌아파트 105-101

이승홍

제주특별자치도 제주시 한림읍 한림리 585

이정석

제주특별자치도 북제주군 오등동 영도그린빌라 A
동 305호

(74) 대리인

특허법인명문

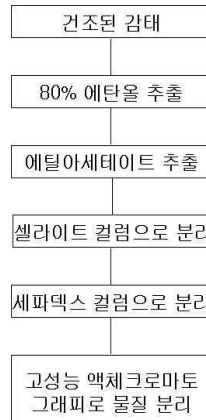
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 탄수화물 소화효소 저해용 조성물

(57) 요약

본 발명은 감태(*Ecklonia cava*)로부터 분리된 디에콜을 유효성분으로 함유하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 감태에서 분리된 디에콜은 알파-글루코시다이스(α -glucosidase), 알파-아밀라제(α -amylase) 등의 탄수화물 소화효소에 대한 저해능이 우수하므로, 당뇨병 및 당뇨병병증을 예방 또는 치료하는데 유용하다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 감태를 70~100% 에탄올로 추출한 다음, 농축하는 단계;
- (b) 상기 수득된 농축물을 물로 녹인 후, 물과 에틸아세테이트를 첨가하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 단계;
- (c) 셀라이트가 충전된 컬럼에 상기 에틸아세테이트 분획물을 로딩시킨 후, 디에틸에테르를 용리시켜 제1 활성성분을 수득하는 단계;
- (d) 세파텍스 LH-20가 충전된 컬럼에 상기 제1 활성성분을 로딩시킨 후, 클로로포름:메탄올의 비율을 2:1~0:1로 용리시켜 제2 활성성분을 수득하는 단계; 및
- (e) 고속액체크로마토그래피를 이용하여 상기 제2 활성성분으로부터 디에콜을 정제하는 단계를 포함하는 디에콜을 유효성분으로 함유한 탄수화물 소화효소 저해용 조성물의 제조방법.

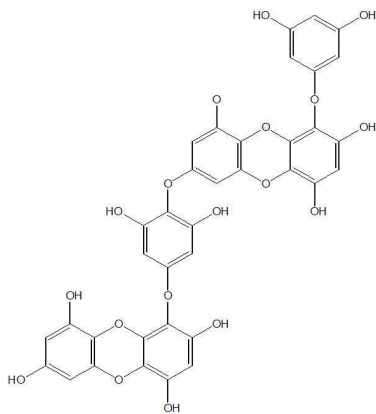
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고속액체크로마토그래피에 사용된 용매는 30~40% 메탄올인 것을 특징으로 하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물의 제조방법.

청구항 3

감태로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 디에콜을 유효성분으로 함유하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물.

[화학식 1]



청구항 4

제3항에 있어서, 상기 디에콜은 감태의 에탄올 추출물에 물과 에틸아세테이트를 첨가하여 획득한 에틸아세테이트 분획물을 셀라이트가 충전된 컬럼, 세파텍스 LH-20가 충전된 컬럼 및 고속액체크로마토그래피를 순차적으로 이용하여, 분리한 것을 특징으로 하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 탄수화물 소화효소는 알파-글루코시데이즈(α -glucosidase) 또는 알파-아밀라제(α -amylase)인 것을 특징으로 하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 디에콜은 탄수화물 소화효소 저해기작을 통하여 항당뇨 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 감태(*Ecklonia cava*)로부터 분리된 디에콜을 유효성분으로 함유하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지난 30년간 급속한 경제 발전과 함께 식생활의 서구화로 우리나라의 당뇨병 환자 수는 꾸준히 증가하고 있으며, 전 세계적으로 당뇨병을 가진 성인의 수가 급격하게 증가하고 있는 가운데 2025년에는 3억만 명에 이를 것으로 예측된다. 더욱이 당뇨병은 발병 연령이 갈수록 낮아지고 있어 21세기 전 세계인구의 생명을 위협하는 주된 요인 중의 하나가 될 것으로 보인다 (Sung YA, The prevention of type 2 diabetes. *J Korean Medical Assac.*, 43:1103-1109, 2000; Rolo AP, Palmeira CM., Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 212:167-178, 2006).

[0003] 당뇨병(Diabetes)은 인간 및 포유류에서 나타나는 비정상적으로 높은 혈장내의 당(glucose) 수치에 의해 발생하는 질환으로서, 이 비정상적인 당 수치는 혈장내의 헤모글로빈(hemoglobiin)의 수치를 높히게 되며, 만성적인 고혈당증(hyperglycemia), 아테롬성 동맥경화증(atherosclerosis), 미세혈관병증(microangiopathy), 신장 질환, 심장 질환, 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy) 및 다른 안과 질환과 같은 일련의 합병증을 야기하게 된다 (Harrison, T.R., Diabetes Mellitus: Principles of internal medicine, 11:1778, 1987; Mahler, R.J. and Adler, M.L., J. Clin. Endocrinol. Metab., 84:1165, 1999).

[0004] 진성 당뇨병(Diabetes mellitus)은 두가지 유형으로 특징지워지는데, 인슐린 의존형인 I형 당뇨병(insulin dependent diabetes, IDDM)은 혈액 내의 글루코스 조절 호르몬인 인슐린(Insulin)의 분비 결핍으로 야기되며, 주로 10-20대의 젊은 연령층에서 발병되기 때문에 소아당뇨병(juvenile diabetes)이라 불리우기도 한다. II형 당뇨병(non-insulin dependent diabetes, NIDDM)은 주로 40대 이후에 발병되며, 우리나라 당뇨병 환자의 대부분을 차지한다. 제 I 형과는 달리 성인형 당뇨병이라 불리우며 발병 원인은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나, 유전적인 요인과 환경적 요소가 함께 관여되어 발생하는 것으로 알려졌다. 제 II형 당뇨병의 병인으로 췌장베타세포에서 인슐린 분비의 장애와 표적세포에서 인슐린 작용의 결함(인슐린 저항성)이 모두 관찰되는데, 이중 어떠한 변화가 일차적 중요성을 갖는지는 아직 확실하지 않다.

[0005] 현재 제 II형 당뇨병 및 인슐린 저항성 같은 합병증에 사용되는 제제로는 5 종류의 화합물군, 즉 비구아니드(biguanides), 티아졸리딘디온(thiazolidine diones), 설폰닐우레아(sulfonylureas), 벤조산(benzoic acid) 유도체 화합물 및 α -글루코시

[0006] 다제 저해제(α -glucosidase inhibitor) 등이 사용되고 있으며, 이중 메트포민(metformin)과 같은 비구아니드 화합물은 과도한 혈액내 글루코네오제네시스(gluconeogenesis)를 예방하는 것으로 알려져 있다. 티아졸리딘디온 화합물은 말초 신경의 글루코스 소비율을 증가시키는 작용을 하며, 톨부타미드(tolbutamide) 및 글리부리드(glyburide)와 같은 설폰닐우레아, 레파글리니드(repaglinide) 화합물과 같은 벤조산 유도체 및 아카보스(acarbose)와 같은 α -글루코시다제 저해제는 인슐린 분비를 자극하여 혈장 글루코스를 낮추는 작용을 한다. 상기의 설폰닐우레아 화합물은 인슐린 의존형인 제 I 형 당뇨병 환자에게는 투여할 수 없으며, 비인슐린 의존형인 제 II형 당뇨병 환자는 인슐린 분비를 감소하게 되고, 여성 환자에게 비정상적인 태아 출생, 유산(abortion) 및 사산(stillbirth)과 같은 부작용을 야기할 수 있다. 추가적으로, 대부분의 설폰닐우레아 화합물은 설폰닐우레아의 대사작용으로 인해 간 및 신장 기능에 장애가 있는 환자에게는 조심스럽게 투여해야 한다. 메트포민과 같은

비구아니드 함유 제제의 메카니즘은 확실하게 규명되지는 않았으나, 비구아니드 화합물은 췌장의 인슐린 분비를 증가시킬 수 없음에도 불구하고 설폰닐우레아보다 더 효과적으로 혈당을 강하하고 저혈당 유발의 빈도도 낮다. 그러나 투여 초기에 구역질, 구토, 설사 및 발진 등을 야기할 수 있으며, 치명적인 락트산증(lactic acidosis)과 같은 부작용을 야기할 수 있으므로, 미국내에서는 임상실험용 시약으로만 사용가능하다. 설폰닐우레아 및 비구아니드 함유 제제들은 상기와 같은 결점 및 부작용을 가지고 있으므로, 낮은 부작용 및 높은 안전성을 갖는 탁월한 혈당강하제가 필요한 실정이다.

[0007] 한편, 해양생물은 육상생물에 없는 특유의 대사과정과 독특한 환경으로 인하여 항산화, 항암, 항응고, 항균 활성 등 다양한 신규 생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있다. 또한, 육상생물은 이미 많은 연구가 진행되었으나 해양생물은 아직 제한된 연구로 인하여 미지의 천연물질의 개발에 대한 기대가 높고 평가되고 있다 (Park JC., Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation, *J Kor Soc Food Sci Nutr.*, 35: 278-283, 1996; Kashiwagi M, Mynderse JS, Moore RE, Norton TR., Antineoplastic evaluation of pacific basin marine algae, *J Pharm Sci* 69: 735-738, 1980; Gonzalez AG, Darias V, Estevez E., Chemotherapeutic activity of polyhalogenated terpenes from Spanish algae, *Planta Med.*, 44: 44-46, 1982; Kosovel V, Avanzini A, Scarcia V, Furlani A., Algae as possible sources of antitumoral agents, Preliminary evaluation of the in vitro cytostatic activity of crude extracts, *Pharmacol Res Commun.*, 20: 27-31, 1988). 따라서 미이용 해양 자원을 이용한 산업적 이용은 고갈되어가는 육상자원을 대체할 만한 새로운 천연자원으로의 활용될 만한 가치가 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 감태(*Ecklonia cava*)의 에탄올 추출물에 물과 에틸아세테이트를 첨가하여 에틸아세테이트 분획물을 획득하고, 셀라이트가 충전된 컬럼, 세파텍스 LH-20가 충전된 컬럼 및 고속액체크로마토그래피를 순차적으로 이용할 경우, 감태로부터 디에콜을 분리할 수 있으며, 분리된 디에콜은 탄수화물 소화효소 저해능이 우수하기 때문에 당뇨병 및 당뇨 합병증을 예방 또는 치료할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 디에콜을 유효성분으로 함유한 탄수화물 소화효소 저해용 조성물의 제조방법을 제공하는데 있다.

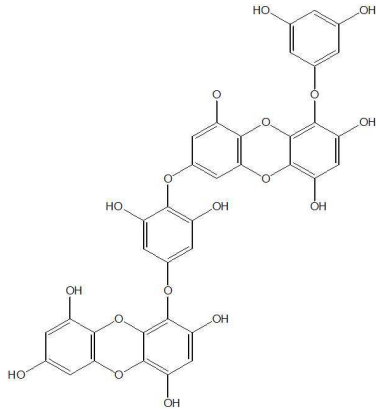
[0010] 본 발명의 다른목적은 감태로부터 분리된 디에콜을 유효성분으로 함유하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 감태를 70~100% 에탄올로 추출한 다음, 농축하는 단계; (b) 상기 수득된 농축물을 물로 녹인 후, 물과 에틸아세테이트를 첨가하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 단계; (c) 셀라이트가 충전된 컬럼에 상기 에틸아세테이트 분획물을 로딩시킨 후, 디에틸에테르를 용리시켜 제1 활성성분을 수득하는 단계; (d) 세파텍스 LH-20가 충전된 컬럼에 상기 제1 활성성분을 로딩시킨 후, 클로로포름:메탄올의 비율을 2:1~0:1로 용리시켜 제2 활성성분을 수득하는 단계; 및 (e) 고속액체크로마토그래피를 이용하여 상기 제2 활성성분으로부터 디에콜을 정제하는 단계를 포함하는 디에콜을 유효성분으로 함유한 탄수화물 소화효소 저해용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 감태로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 디에콜을 유효성분으로 함유하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물을 제공한다.

[0013] [화학식 1]



[0014]

효 과

[0015] 본 발명에 따른 감태에서 분리된 디에콜은 알파-글루코시데이즈(α -glucosidase), 알파-아밀라제(α -amylase) 등의 탄수화물 소화효소에 대한 저해능이 우수할 뿐만 아니라, 혈당상승 억제 및 강하 효과가 우수하여 당뇨병 및 당뇨 합병증을 예방 또는 치료하는데 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명에서는 알파-글루코시데이즈 저해제가 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시켜 식후 혈당 증가를 완화 시킬 수 있다는 연구결과(Hanefeld M, The role of acarbose in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus, *J Diabetes Complications.*, 12:228-237, 1998)로부터, 천연물로부터 탄수화물 소화효소에 대한 저해능이 우수한 화합물을 분리할 경우, 당뇨병 및 당뇨 합병증을 예방 또는 치료하는데 유용하게 이용할 수 있을 것으로 예측하였다.

[0017] 또한, 많은 연구가 진행된 육상생물 보다는 아직까지 연구가 많이 이루어지지 않은 해양생물에서 신규의 탄수화물 소화효소에 대한 저해능이 우수한 화합물을 발견할 수 있을 것으로 예측하였다.

[0018] 본 발명에서는, 해양생물로부터 신규의 탄수화물 소화효소에 대한 저해능이 우수한 화합물을 분리하기 위하여, 갈조식물문에 속하는 해조류종들을 에탄올로 추출한 후, 이들의 탄수화물 소화효소에 대한 저해능을 확인한 결과, 감태 에탄올 추출물이 가장 우수한 탄수화물 소화효소에 대한 저해능을 가지고 있음을 확인하였다.

[0019] 따라서, 본 발명의 일 실시예에서는, 감태(*Ecklonia cava*)를 에탄올로 추출한 후, 감태의 에탄올 추출물에 물, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 첨가하여 각각의 분획물을 획득한 후, 에틸아세테이트 분획물에서 탄수화물 소화효소에 대한 저해능이 가장 우수함을 확인하였다. 그리고, 감태로부터 활성본체를 분리하기 위하여, 셀라이트가 충전된 컬럼을 이용하여 에틸아세테이트 분획물로부터 제1 활성성분을 수득하였고, 세파텍스 LH-20가 충전된 컬럼을 이용하여 제1 활성성분으로부터 제2 활성성분을 수득하였으며, 고속액체크로마토그래피를 이용하여 제2 활성성분으로부터 활성본체를 정제한 후, 질량분석, NMR 분석 등을 통하여 탄수화물 소화효소에 대한 저해능을 갖는 활성본체가 디에콜(dieckol)임을 확인할 수 있었다.

[0020] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 감태를 70~100% 에탄올로 추출한 다음, 농축하는 단계; (b) 상기 수득된 농축물을 물로 녹인 후, 물과 에틸아세테이트를 첨가하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 단계; (c) 셀라이트가 충전된 컬럼에 상기 에틸아세테이트 분획물을 로딩시킨 후, 디에틸에테르를 용리시켜 제1 활성성분을 수득하는 단계; (d) 세파텍스 LH-20가 충전된 컬럼에 상기 제1 활성성분을 로딩시킨 후, 클로로포름:메탄올의 비율을 2:1~0:1로 용리시켜 제2 활성성분을 수득하는 단계; 및 (e) 고속액체크로마토그래피를 이용하여 상기 제2 활성성분으로부터 디에콜을 정제하는 단계를 포함하는 디에콜을 유효성분으로 함유한 탄수화물 소화효소 저해용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 감태로부터 항산화 활성과 탄수화물 소화효소 저해 활성을 나타내

는 디에콜을 분리하는 과정을 나타낸 도면이다.

[0022] 본 발명에 따른 감태 추출물은 통상의 방법에 따라 획득할 수 있다. 예를 들면, 동결건조된 감태를 분쇄시킨 후, 부탄올, 에탄올, 메탄올 등의 저가알코올, 헥산, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트 등의 유기용매로 추출할 수 있으며, 알코올로 추출하는 것이 바람직하며, 70~100% 에탄올로 추출하는 것이 더욱 바람직하다.

[0023] 감태 유기용매 추출물은 농축된 후, 유기용매의 극성에 따라 분획시킬 수 있다. 분획과정은 하기의 통상의 방법에 따라 수행될 수 있다. 감태 에탄올 추출물에 헥산을 가하여 헥산 분획물을 제조하고, 잔류물에 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물을 순차적으로 가하여 분획함으로써 클로로포름 추출물, 에틸아세테이트 추출물과 부탄올 추출물을 각각 제조할 수 있으며, 상기 용매에서 추출되지 않은 물 분획은 물 추출물로 제조된다. 상기 용매를 이용한 분획시, 추출대상물에 대하여 용매를 1: 0.1 내지 10 부피비로 가하여 실시할 수 있다.

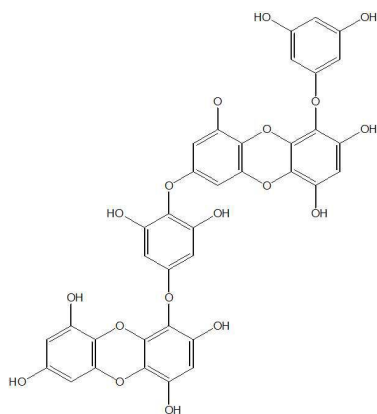
[0024] 본 발명에서는 각각의 분리과정마다 탄수화물 소화효소에 대한 저해능을 확인하였다.

[0025] 즉, 셀라이트가 충전된 컬럼에 항산화 활성 및 탄수화물 소화효소에 대한 저해능이 가장 우수한 것으로 확인된 에틸아세테이트 분획물을 로딩시킨 후, 디에틸에테르를 용리시켜 제1 활성성분을 수득하였고, 세파텍스 LH-20가 충전된 컬럼에 상기 제1 활성성분을 로딩시킨 후, 클로로포름:메탄올의 비율을 2:1~0:1로 용리시켜 제2 활성성분을 수득하였으며, 고속액체크로마토그래피를 이용하여 상기 제2 활성성분으로부터 디에콜을 정제하였다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 고속액체크로마토그래피에 사용된 용매는 30~40% 메탄올인 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명은 다른 관점에서, 감태로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 디에콜을 유효성분으로 함유하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물에 관한 것이다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] 앞서, 언급한 바와 같이, 상기 디에콜은 감태의 에탄올 추출물에 물과 에틸아세테이트를 첨가하여 획득한 에틸아세테이트 분획물을 셀라이트가 충전된 컬럼, 세파텍스 LH-20가 충전된 컬럼 및 고속액체크로마토그래피를 순차적으로 이용하여, 분리할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 디에콜이 저해능을 갖는 상기 탄수화물 소화효소는 알파-글루코시데이스(α -glucosidase)나 알파-아밀라제(α -amylase) 등을 예시할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다

[0032] 본 발명에 따른 상기 디에콜은 탄수화물 소화효소 저해기작을 통하여 당뇨병을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 탄수화물 소화효소는 식이 중에 함유된 탄수화물을 다당→이당→단당으로 분해하는 효소로서, 탄수화물 소화효소 저해제는 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시켜 식후 혈당 증가를 완화시킬 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 상기 탄수화물 소화효소 저해용 조성물은 상기 유효성분(디에콜)을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 상기 유효성분은 해당노 약학 조성물에 0.1~10중량%로 포함될 수 있으나, 통상 0.5~5중량%의 함량으로 포함되는 것이 바람직하다.

[0035] 상기 디에콜을 유효성분으로 함유하는 탄수화물 소화효소 저해용 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. 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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. 제제화 할 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 화합물에 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 단순희석제인 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 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0036] 또한, 상기 감태 유래 디에콜을 함유하는 탄수화물 소화효소 저해용 조성물의 인체에 대한 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 화합물은 1일 0.0001 내지 1000mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/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.

[0037] 본 발명에 따른 탄수화물 소화효소 저해용 조성물은 당뇨병 및 당뇨 합병증의 예방 및 치료의 목적으로 사용가능하다. 상기 당뇨 합병증으로는 당뇨병성 백내장, 신장병, 말초신경장애, 고지혈증 등을 예시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038]

실시예

[0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0040] [실시예 1] 감태로부터 탄수화물 소화효소 저해능을 갖는 활성물질의 분리

[0041] 1-1: 감태의 에탄올 추출물 제조

[0042] 제주연안에서 직접 채취한 해조류를 대상으로 품질이 좋은 감태를 선별하여 수회 반복하여 수세하였고, 동결건조시켜 시료를 50 메쉬 이하로 분말화 하였다. 분말화한 감태 50g을 5L의 80% 에탄올에 침지시켜 20℃에서 24시간동안 추출한 후, 저온에서 원심분리하여 잔사를 제거시키고, 상층액을 와트만 필터(Whatman No.4)를 이용하여 여과시켰다. 여과된 감태의 80% 에탄올 추출물을 감압농축기를 이용하여 농축시켰다.

[0043] 1-2: 감태의 에탄올 추출물로부터 디에콜의 분리

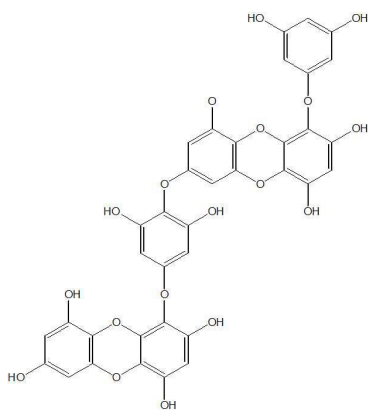
[0044] 1-1에서 제조된 감태의 80% 에탄올 추출물(10g)을 물(1ℓ)에 녹인 후, 동량의 에틸아세테이트(1ℓ)를 혼합하여 에틸아세테이트층과 수용성층으로 분획하였다.

[0045] 다음으로 75-150 μm 직경의 셀라이트를 55×400mm의 유리관에 충전시킨 후, 에틸아세테이트 분획물을 흡착시킨 다음, 디에틸에테르를 용리시켜 활성성분(A1)을 분리하였다.

[0046] 분리된 활성성분(A1)을 25×300mm의 유리관에 25-100 μm 직경의 세파텍스 LH-20 충전제를 충전한 컬럼에 로딩시킨 후 클로로포름:메탄올을 2:1에서 0:1 비율로 용리시켜 활성성분(B2)을 분리하였다. 그런 후, 활성성분(B2)을 고성능 액체크로마토그래피 (메탄올:물 = 35:65, 유속 = 1.0 ml/min, 10×250mm C-18 컬럼)에 주입시켜 탄수화물 소화효소 저해 활성이 우수한 물질(C1)을 분리하였다.(RT 23.5min)

[0047] 분리된 물질(C1)의 자외선-가시광선 스펙트럼의 측정값은 UV (EtOH) λ_{max} nm = 225, 적외선 스펙트럼의 측정값은 IR (KBr) ν_{max} 3250, 1605 cm^{-1} , 그리고 질량분석 스펙트럼의 측정값은 FABMS m/z 742 $[\text{M}]^+$ ($\text{C}_{36}\text{H}_{22}\text{O}_{18}$) 이었다. 또한, ^1H -NMR (400 MHz, methanol- d_4)을 이용하여 분석한 결과 δ ^1H (mult, J = Hz)는 6.15 (1H, s), 6.13 (1H, s), 6.09 (1H, d, 2.9 Hz), 6.06 (1H, d, 2.9), 6.05 (1H, d, 2.9), 5.98 (1H, d, 2.8), 5.95 (1H, d, 2.8), 5.92 (3H, m), ^{13}C -NMR (100 MHz, methanol- d_4)을 이용하여 분석한 결과 δ ^{13}C 는 δ 161.8, 160.1, 157.8, 155.9, 154.5, 152.4, 147.3, 147.2, 147.1, 146.9, 144.3, 144.1, 143.4, 143.3, 138.6, 138.5, 126.5, 126.2, 125.6, 125.5, 124.9, 124.6, 124.5, 99.9, 99.7, 99.5, 99.4, 97.6, 96.2, 95.8, 95.7, 95.3 이었으며, 상기 분석결과로부터 상기물질(C1)의 구조가 하기 화학식 1의 디에콜임을 확인하였다.

[0048] [화학식 1]



[0049]

[0050] [실험예 1] 고농도 포도당 처리에 의해 산화 스트레스를 입은 세포에 대한 디에콜의 세포 생존율 측정

[0051] 고농도 포도당 처리에 의해 산화 스트레스를 입은 세포에 대한 디에콜의 세포 생존율 측정은 다음과 같이 수행하였다.

[0052] 휴백(Human umbilical vein endothelial cells) 세포들을 웰(Well)당 4×10^4 cells/mL로 하여 24-웰 플레이트(Well plate)에 주입하고, 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 48시간 배양하여 부착시켰다. 다음으로 정상농도의 포도당 5.5 mM과 고농도의 포도당 30 mM을 각각 세포에 처리하여 산화스트레스를 유발시켜 48시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양 한 후, 디에콜(10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리하고 20시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양시켰다. 다음으로 24-웰 플레이트(Well plate)에서 배지를 제거하고, 1.14 mmol/L의 neutral red가 포함된 배지를 0.5mL 첨가하고, 3시간 동안 배양시킨 후, phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)으로 2번 세척하였다. 세포에 아세트산(1%, v/v)과 에탄올(50%, v/v)을 함유하는 1mL의 cell lysis buffer(50 mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L dithiothreitol, Triton X-100 (1%, v/v)를 넣어 15분간 배양시켜 세포로부터 neutral red를 방출시킨 후, 세포 용해 산물을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 취해 540nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0053] 도 2로부터, 정상농도의 포도당 5.5mM을 처리한 세포에서는 100%의 세포 생존율을 보인 반면, 고농도의 포도당 30mM을 처리한 세포에서는 약 3배가 낮은 36.25%의 세포 생존율을 보이는 것을 확인하였다. 하지만 고농

도의 포도당 30mM을 처리하고 디에콜을 처리한 세포에서는 세포의 생존율이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이 결과로부터 디에콜의 처리가 고농도의 포도당에 의해 유도된 산화스트레스를 입은 세포의 생존율을 높여준다는 것을 확인할 수 있었다.

[0054] [실험예 2] 고농도 포도당 처리에 의해 생성된 세포내 지질 과산화물에 대한 디에콜의 억제활성 측정

[0055] 고농도 포도당 처리에 의해 생성된 세포내 지질 과산화물에 대한 디에콜의 억제활성 측정은 다음과 같이 수행하였다.

[0056] 휴백(Human umbilical vein endothelial cells) 세포들을 웰(Well)당 4×10^4 cells/mL로 하여 24-웰 플레이트(Well plate)에 주입하고, 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 48시간 배양하여 부착시켰다. 다음으로 정상농도의 포도당 5.5 mM과 고농도의 포도당 30 mM을 각각 세포에 처리하여 산화스트레스를 유발시켜 48시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 배양 한 후, 디에콜(10, 25, 50μg/ml)을 처리하고 20시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 배양시켰다. 다음으로, 각 웰(well)당 200μl의 상층액을 코닝튜브에 담아 30분 배양 한 후, 400 μL의 치오바르비탈산 반응물질 용액(TBARS solution)(시그마)을 넣어서 혼합하고 4000 rpm에서 10분간 원심분리 한 상층액으로 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질 과산화물은 malondialdehyde(MDA)의 양으로 환산하여 계산하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0057] 도 3으로부터, 정상농도의 포도당 5.5mM을 처리한 세포에서는 지질 과산화물 생성이 적은 반면, 고농도의 포도당 30mM을 처리한 세포에서는 약 3배 정도가 높은 많은 양의 지질 과산화물이 생성된 것을 확인하였다. 하지만 고농도의 포도당 30mM을 처리하고 디에콜을 처리한 세포에서는 지질 과산화물 생성이 농도 의존적으로 현저히 줄어드는 것을 확인하였으며, 디에콜 50μg/ml을 처리했을 때 정상농도의 포도당 5.5 mM을 처리한 세포에서의 지질 과산화물 생성량과 비슷하게 나타났음을 확인하였다. 이 결과로부터 디에콜의 처리가 고농도의 포도당에 의해 생성된 지질 과산화물의 생성을 억제하는 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

[0058] [실험예 3] 고농도 포도당 처리에 의해 생성된 세포내 활성산소종에 대한 디에콜의 소거능 측정

[0059] 고농도 포도당 처리에 의해 생성된 세포내 활성산소종에 대한 디에콜의 소거능 측정은 다음과 같이 수행하였다.

[0060] 휴백(Human umbilical vein endothelial cells) 세포들을 웰(Well)당 4×10^4 cells/mL로 하여 24-웰 플레이트(Well plate)에 주입하고, 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 48시간 배양하여 부착시켰다. 다음으로 정상농도의 포도당 5.5 mM과 고농도의 포도당 30 mM을 각각 세포에 처리하여 산화스트레스를 유발시켜 48시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 배양 한 후, 디에콜(10, 25, 50μg/ml)을 처리하고 20시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 배양시켰다. 24-웰 플레이트(Well plate)를 phosphate buffered saline(PBS, pH7.4)으로 세척 한 후 5μM의 DCF-DA(시그마)를 처리하여 30분간 반응 시킨 후 fluorescence plate reader(테칸)로 세포내 활성산소종 생성율을 측정하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0061] 도 4로부터, 고농도의 포도당 30mM을 처리한 세포에서는 정상농도의 포도당 5.5 mM을 처리한 세포에 비해 약 2.8배가 높은 284.1%의 활성산소종을 생성하였음을 확인하였다. 반면에 고농도의 포도당 30mM을 처리하고 디에콜을 처리한 세포에서는 활성산소종의 생성율이 농도 의존적으로 현저히 줄어드는 것을 확인하였다. 이 결과로부터 디에콜의 처리가 고농도의 포도당에 의해 유도된 활성산소종의 생성을 억제하는 효과를 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] [실험예 4] 고농도 포도당 처리에 의해 생성된 세포내 Nitric oxide에 대한 디에콜의 소거능 측정

[0063] 고농도 포도당 처리에 의해 생성된 세포내 Nitric oxide에 대한 디에콜의 소거능 측정은 다음과 같이 수행하였다.

[0064] 휴백(Human umbilical vein endothelial cells) 세포들을 웰(Well)당 4×10^4 cells/mL로 하여 24-웰

플레이트(Well plate)에 주입하고, 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 48시간 배양하여 부착시켰다. 다음으로 정상농도의 포도당 5.5 mM과 고농도의 포도당 30 mM을 각각 세포에 처리하여 산화스트레스를 유발시켜 48시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 배양 한 후, 디에콜(10, 25, 50μg/ml)을 처리하고 20시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 배양기에서 배양시켰다. 다음으로, 각 웰(well)당 50μl의 상층액을 50μl의 Griess 시약(0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid)과 혼합하여 30분간 반응시킨 후, 550nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide (NO) 생성은 대조구의 NO 생성량과 비교하여 백분율로 환산하여 계산하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0065] 도 5로부터, 정상농도의 포도당 5.5mM을 처리한 세포에서는 NO 생성이 적은 반면 고농도의 포도당 30mM을 처리한 세포에서는 약 3.9배 정도가 높은 NO가 생성되었음을 확인하였다. 하지만 고농도의 포도당 30mM을 처리하고 디에콜을 처리한 세포에서는 NO 생성이 농도 의존적으로 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었으며, 디에콜 50μg/ml을 처리했을 때 정상농도의 포도당 5.5mM을 처리한 세포에서의 NO 생성율이 비슷하게 나타났음을 확인하였다. 이 결과로부터 디에콜의 처리가 고농도의 포도당에 의해 생성된 NO의 생성을 억제하는 효과를 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

[0066] [실험예 5] 디에콜의 탄수화물 소화 효소인 알파-글루코시데이즈의 저해활성 측정

[0067] 디에콜의 탄수화물 소화 효소인 알파-글루코시데이즈의 저해활성 측정은 다음과 같이 수행하였다.

[0068] 먼저, 100mM PBS 100ml에 2g/L BSA(bovineserum albumin), 0.2g/L 아지트화나트륨(Na₃N)을 용해시킨 다음, 0.7U의 yeast α-glucosidase(시그마) 0.008g을 용해시켜 효소용액을 제조하였고, p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside를 PBS에 5mM 농도로 용해하여 기질용액을 제조하였다. 효소용액 50μl에 시료(디에콜, 0~50 ug/ml) 10μl를 넣어 405nm에서 반응 전의 흡광도를 측정한 후 5분간 실온에 방치시키고, 기질용액 50μl를 넣고 5분간 반응시킨 후, 다시 흡광도를 측정하여 흡광도 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다. 계산된 디에콜의 알파-글루코시데이즈의 저해율은 도 6에 나타내었다.

[0069] 도 6으로부터, 디에콜은 농도 의존적으로 탄수화물 소화 효소인 알파글루코시데이즈의 활성을 저해하는 것을 확인하였으며, 디에콜의 농도가 증가할수록 현재 시판되고 있는 알파글루코시데이즈 저해제인 acarbose 보다 우수한 저해 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 표 1은 알파-글루코시데이즈를 50% 저해하는 디에콜과 acarbose의 농도를 나타낸 표로서 디에콜이 acarbose 보다 훨씬 낮은 농도에서 알파글루코시데이즈를 50% 저해하는 것을 알 수 있다. 이 결과로부터 디에콜이 알파-글루코시데이즈의 활성을 저해하는 효과를 가진다는 것을 확인하였다.

표 1

알파-글루코시데이즈를 50% 저해하는 디에콜과 acarbose의 농도

Sample	50% 저해하는 농도 (mg/mL)
	α-glucosidase
Acarbose	0.68±0.03
디에콜	0.18±0.05*

[0070]

[0071] [실험예 6] 디에콜의 탄수화물 소화 효소인 알파-아밀라제의 저해활성 측정

[0072] 디에콜의 탄수화물 소화 효소인 알파-아밀라제의 저해활성 측정은 다음과 같이 수행하였다.

[0073] PBS 50ml에 0.1g/L BSA, 0.01g/L 아지트화나트륨(Na₃N), porcine pancreas α-amylase(시그마) 0.2857g을 용해시켜 효소용액을 제조하였고, p-nitrophenyl-α-D-maltopentoglycoside (시그마)를 PBS에 5mM

농도로 용해하여 기질용액을 제조하였다. 효소용액 50 μ l에 시료(디에콜, 0~50 μ g/ml) 10 μ l를 넣어 405nm에서 반응 전의 흡광도를 측정한 후 5분간 실온에 방치시키고, 기질용액 50 μ l를 넣고 5분간 반응시킨 후, 다시 흡광도를 측정하여 흡광도 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다. 계산된 디에콜의 알파-아밀라제의 저해율은 도 7에 나타내었다.

[0074]

도 7로부터, 디에콜은 농도 의존적으로 탄수화물 소화 효소인 알파-아밀라제의 활성을 저해하는 것을 확인하였으며, 디에콜의 농도가 증가할수록 현재 시판되고 있는 알파아밀라제 저해제인 acarbose와 비슷한 저해활성을 나타냄을 알 수 있다. 표 2는 알파-아밀라제를 50% 저해하는 디에콜과 acarbose의 농도를 나타낸 표로서 디에콜이 acarbose 보다 낮은 농도에서 알파아밀라제를 50% 저해하는 것을 알 수 있다. 이 결과로부터 디에콜이 알파-아밀라제의 활성을 저해하는 효과를 가진다는 것을 확인하였다.

표 2

알파-아밀라제를 50% 저해하는 디에콜과 acarbose의 농도

Sample	50% 저해하는 농도 (mg/mL)
	α -amylase
Acarbose	0.71 $\pm$ 0.07
디에콜	0.49 $\pm$ 0.06*

[0075]

[실험예 7] 스트렙토조토신(streptozotocin:STZ) 유발 당뇨병쥐와 정상쥐에 있어서 디에콜의 혈당 강하 효과 측정

[0076]

4주령의 수컷 ICR mice를 (주)중앙실험동물에서 구입하여 2주일간 일반식으로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험군은 정상군과 STZ 투여 당뇨병군으로 무작위 배정하였다. 사육실의 온도와 습도는 20 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 50 $\pm$ 10%로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 조절하였으며, 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. STZ 투여 당뇨병군으로 배정된 12시간 공복 상태의 ICR mice에게 0.1M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 streptozotocin(STZ, 60mg/kg of body weight)을 복강에 주사하여 당뇨를 유발시켰다. STZ 투여 1주일 후 공복 상태의 ICR mice 꼬리정맥으로부터 채혈하여 간헐혈당계로 측정한 혈당이 250mg/dL 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하여 실험에 사용하였다. STZ로 유도된 당뇨병군과 정상군을 난괴법으로 대조군, 디에콜 투여군으로 각각 나누고 ICR mice를 밤 동안 12시간 절식 시킨 후, 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 간헐 혈당계로 측정하였다. 대조군은 ICR mice에 가용성 전분(2g/kg of body weight)을, 디에콜 투여군은 가용성 전분(2 g/kg of body weight) 및 디에콜 (100mg/kg of body weight)을 증류수에 용해하여 12시간 절식 시킨 ICR mice의 경구에 투여하였다. 투여 후 정해진 시간(0, 30, 60, 120분)에 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 각 시점의 혈당 증가치를 계산하여 혈당증가곡선을 구하고, 혈당증가곡선의 면적(area under the curve, AUC)을 계산하였다.

[0077]

[0078]

도 8은 스트렙토조토신(streptozotocin:STZ) 유발 당뇨병쥐에 대한 디에콜의 혈당 강하효과를 측정한 그래프로서, 도 8로부터, 당뇨병쥐에 있어서 디에콜의 투여군은 실험동물의 혈당이 최고치에 달하는 전분 투여 60분 후 대조군보다 낮은 수준의 혈당을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, STZ-유발 당뇨병쥐에 전분을 투여한 후 혈당의 증가를 살펴본 결과 대조군은 30, 60, 120분에 혈당이 크게 증가된 것으로 나타난 반면, 디에콜 투여군은 대조군에 비해 낮은 수준의 혈당을 유지하였다. 또한 디에콜 투여군의 식후 혈당증가곡선의 면적 (AUC)은 4,668mg $\cdot$ min/dL로 나타나 대조군 8,700mg $\cdot$ min/dL에 비해 낮은 것으로 나타났다 (표 3). 이 결과로부터 디에콜은 당뇨병쥐에 있어서 식후 혈당증가를 저하하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0079]

또한, 도 9는 정상쥐에 대한 디에콜의 혈당 강하효과를 측정한 그래프로서, 도 9로부터 정상쥐에 있어서도 디에콜 투여군은 대조군보다 낮은 수준의 혈당을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 공복상태의 대조군에게 전분을 투여한 후의 혈당변화는 30, 60, 120분에 혈당이 크게 증가된 것으로 나타난 반면, 전분과 디에콜을 함께 투여한 디에콜 투여군은 대조군에 비해 식후 혈당 증가를 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 디에콜 투여군의 식후 혈당증가곡선의 면적은 3,615mg $\cdot$ min/dL로 나타나 대조군 6,738mg $\cdot$ min/dL에 비해 적게 나타났다 (표 3). 이 결과로부터 디에콜은 대조군보다 혈당 수준을 감소시키면서 내당능을 개선하는 것을 확인할 수 있었다.

다.

표 3

정상 생쥐와 STZ-유발 당뇨생쥐의 혈당증가곡선의 면적

Group	AUC (mgmin/dL)	
	정상생쥐	당뇨유발쥐
대조군	6,738±112.5	8,700±118.4
디에콜	3,615±124.7**	4,668±132.1**

본 실험예에 있어서, 모든 실험결과는 SAS 프로그램을 이용하여 평균±표준편차로 나타내었고, 유의성은 one-way ANOVA로 사전 검증한 후 Duncan's multiple range test에 의해 사후 검정하였다. 통계적인 유의수준은 P 값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 감태로부터 항산화 활성과 탄수화물 소화효소 저해 활성을 나타내는 디에콜을 분리하는 과정을 나타낸 도면이다.

도 2는 고농도 포도당 처리에 의해 산화스트레스를 입은 세포에 대한 디에콜의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.

도 3은 고농도 포도당 처리에 의해 생성된 세포내 지질 과산화물에 대한 디에콜의 억제활성을 측정한 그래프이다.

도 4는 고농도 포도당 처리에 의해 생성된 세포내 활성산소종에 대한 디에콜의 소거능을 측정한 그래프이다.

도 5는 고농도 포도당 처리에 의해 생성된 세포내 Nitric oxide에 대한 디에콜의 소거능을 측정한 그래프이다.

도 6은 디에콜의 알파-글루코시데이즈의 저해활성을 측정한 그래프이다.

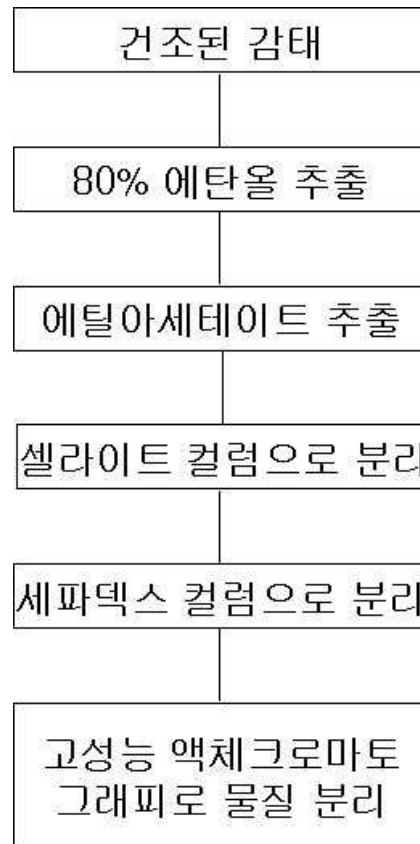
도 7은 디에콜의 알파-아밀라제의 저해활성을 측정한 그래프이다.

도 8은 스트렙토조토신(streptozotocin:STZ) 유발 당뇨쥐에 대한 디에콜의 혈당 강하효과를 측정한 그래프이다.

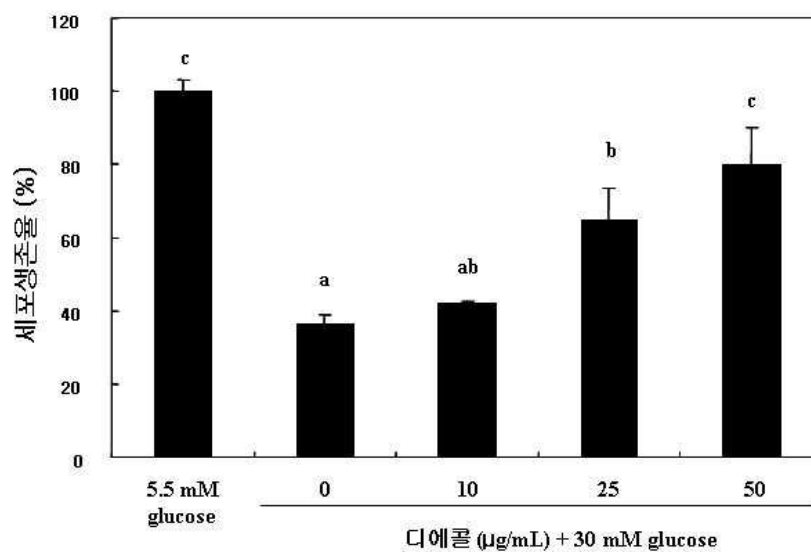
도 9는 정상쥐에 대한 디에콜의 혈당 강하능을 측정한 그래프이다.

도면

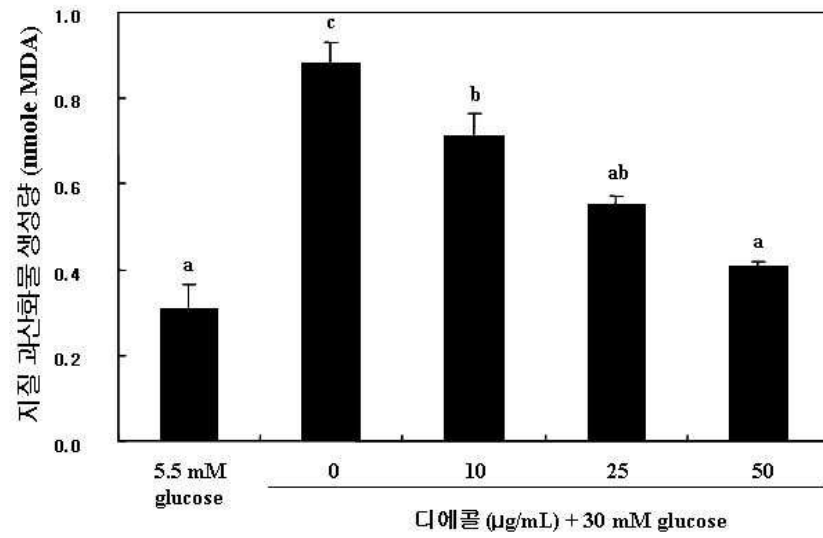
도면1



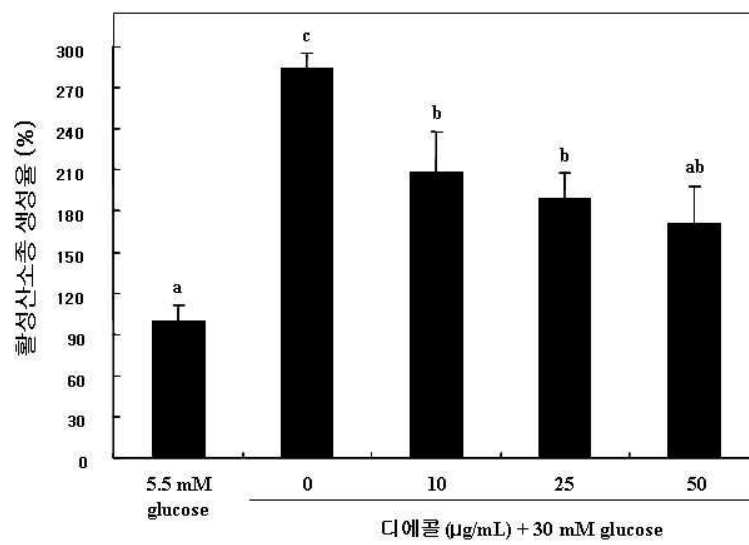
도면2



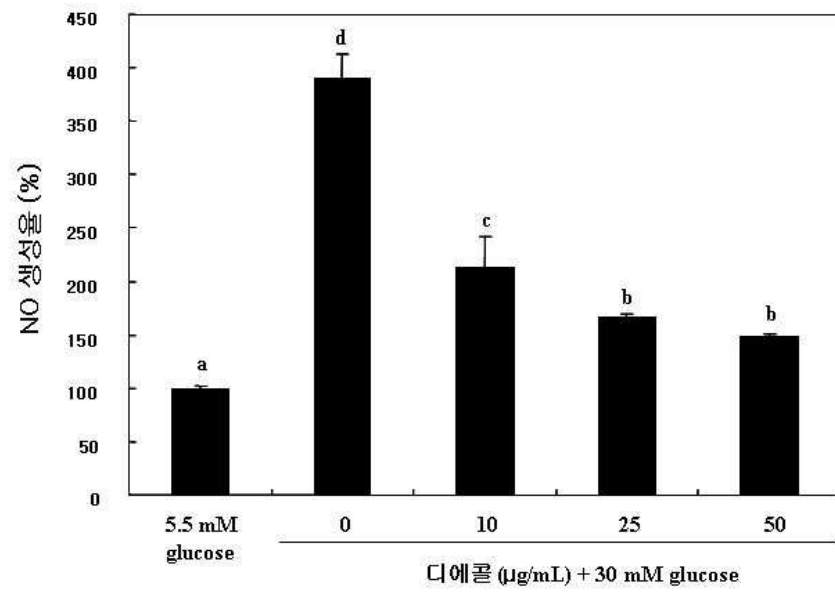
도면3



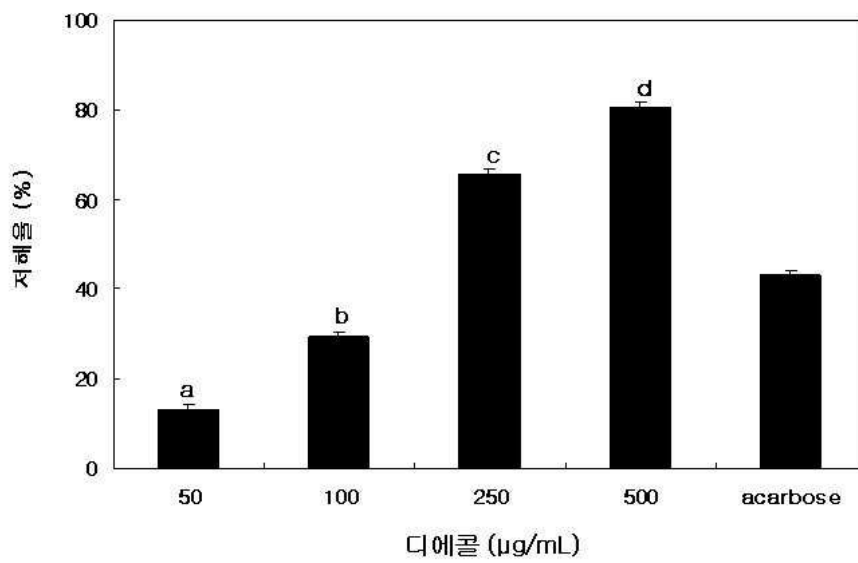
도면4



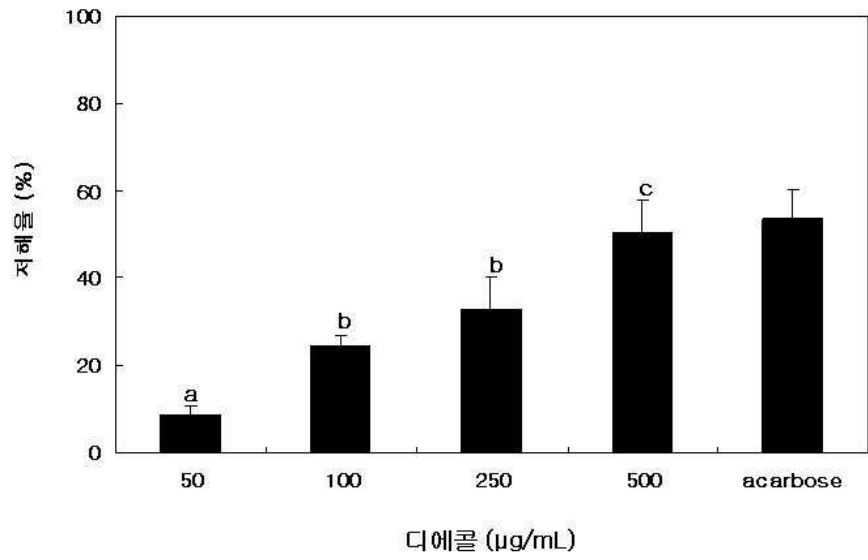
도면5



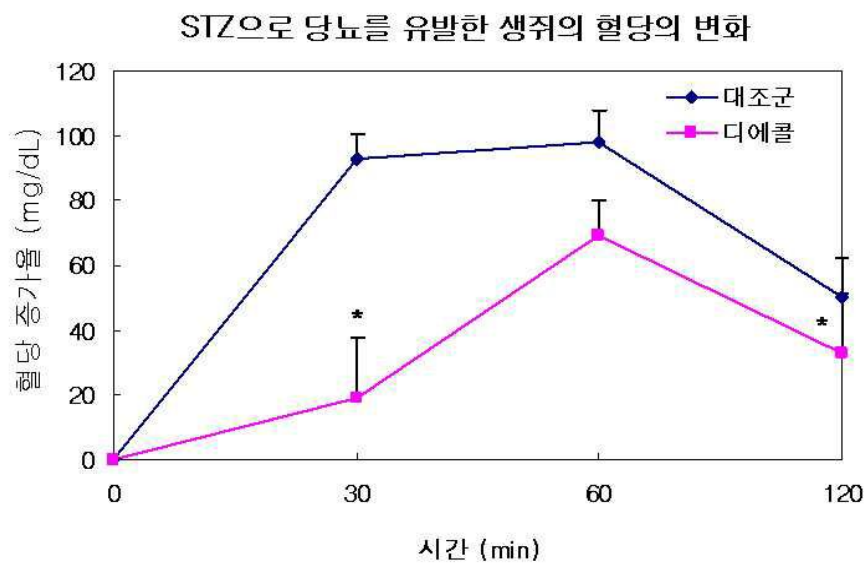
도면6



도면7



도면8



도면9

