(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0047247
(43) 공개일자 2014년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/40 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0112981
(22) 출원일자 2012년10월11일
심사청구일자 2012년10월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울시 성북구 안암로 145 (안암동)
(72) 발명자
이광원
경기도 성남시 분당구 양현로 220 이매촌삼환아파트 1104동 1901호
홍충의
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 CJ식품안전과 203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 8 항

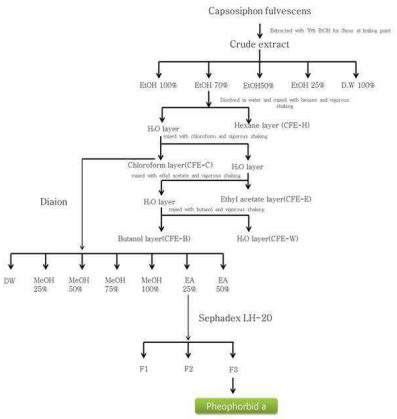
(54) 발명의 명칭 **페오포바이드 A와 같은 포피린계 물질을 유효성분으로 함유하는 항산화 제재와, 당뇨병 및 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 매생이 조추출물 유래의 페오포바이드 A의 혈당 조절용 및 항산화용 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증 치료 또는 예방용 약학 조성물, 항산화용 화장료 조성물, 기능성 식물 및 상기 페오포바이드 A(Pheophorbide A)의 추출방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물 및 기능성 식품은 당질소화기전에 관여하는 α-글루코시다아제(α-glucosidase) 및 알도오즈 환원효소(aldose reducase) 억제능을 가지기 때문에, 고혈당 증상이 억제되는 효과가 있고, 글라이케이션을 저해하기 때문에, 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증 등을 포함하는 대사성 질환 치료 또는 예방에 유용하며, 또한 상기 물질의 항산화능에 의하여, 노화 지연, 생리활성 기능 회복 등의 효과가 있기 때문에, 기능성 식품으로서 유용하다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

남미현

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 CJ식품안전과 203호

오지선

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 CJ식품안전과 203호

홍승택

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 CJ식품안전과 203호

손다희

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 CJ식품안전과 203호

오준구

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 CJ식품안전과 203호

강정한

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 CJ식품안전과 203호

정하영

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 CJ식품안전과 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 111091-3-1-SP010

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 수산실용화

연구과제명 한국산 해조류인 매생이(Capsosiphon fulvescens)를 이용한 미백 기능성 및 항당뇨합병증 소재개발과 제품화 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.22 ~ 2014.09.21

특허청구의 범위

청구항 1

페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 페오포바이드 A(Pheophorbide A)는 매생이(*Capsosiphon fulvescens*) 유래인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 당뇨성 합병증은 당뇨성 망막병증, 당뇨성 백내장, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증 또는 당뇨성 지방간인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 항산화용 화장료 조성물.

청구항 5

페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하며, 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증의 예방 또는 개선용 기능성 식품.

청구항 6

페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 항산화용 기능성 식품.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 페오포바이드 A(Pheophorbide A)의 추출방법:

(a) 건조 매생이에 알콜을 가하여 추출한 다음, 건조에 의하여 분말화하는 단계;

(b) (a) 단계에서 얻어진 분말을 물에 용해시킨 다음, 유기용매를 가하여 추출물을 수득하는 단계;

(c) (b) 단계로부터 얻어진 유기용매 추출액에 대하여 크로마토그래피를 수행하고, 메탄올:에틸아세테이트가 혼합된 용매로 용출된 분획물을 수득하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, (c) 단계에서 얻어진 분획물에 대해 컬럼 크로마토그래피로 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 페오포바이드 A(Pheophorbide A)의 추출방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 매생이 조추출물 유래의 페오포바이드 A(Pheophorbide A)의 혈당 조절용 및 항산화용 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 페오포바이드 A를 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증 치료 또는 예방용 약학 조성물, 항산화용 화장료 조성물, 기능성 식물 및 상기 페오포바이드 A의 추출방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생활습관이 급속하게 서구화되면서, 지방 및 당 섭취의 증가, 활동량 감소 등의 요인이 복합적으로 작용하여, 비만, 고지혈증, 당뇨, 동맥경화 등의 대사성 질환 증가현상이 사회적 문제로 대두하고 있다.

[0003] 당뇨병은 신체 세포들이 혈당(glucose)을 정상적으로 사용할 수 있는 능력에 장애가 생겨 혈당치가 증가하여, 혈당이 증가됨에 따라 과량의 당분이 소변으로 배설되는 대사성 질환이다. 우리나라의 당뇨병 환자는 전체 인구의 약 5 % 정도, 최소 250만 명으로 추정되고 있으며, 선진국의 경우에 당뇨병 환자 수가 매년 격증하고 있고, 우리나라도 생활수준의 향상과 더불어 생활양식이 서구화되면서 점차 환자의 수가 증가할 것으로 예상된다.

[0004] 당뇨병은 인슐린이 부족하거나 인슐린 저항성이 생긴 경우에 발병하게 되는데 인슐린을 대체하여 혈액 내의 포도당 농도를 낮추는 약물이 당뇨 치료제로 사용되고 있다. 종래 당뇨 치료제는 여러 가지 부작용으로 사용에 한계가 있으며, 또한 당뇨병의 위험성은 당뇨로 인해 나타나는 여러 가지 합병증 때문이므로, 합병증의 예방 및 치료가 매우 중요하다.

[0005] 당뇨병 치료의 경우 현재 합성 및 생약성분을 원료로 하는 많은 당뇨병치료제가 개발되었거나 개발 중에 있으며, 당뇨병 치료제는 크게 경구용 혈당강하제와 인슐린주사제로 구분한다. 일반적으로 인슐린이 분비되지 않는 제1형 당뇨병 환자는 인슐린주사를, 인슐린 비의존성 당뇨병 환자는 혈당강하제를 복용한다.제1형 당뇨에서는 인슐린투여 이외에는 실질적으로 다른 치료 대안이 없기 때문에, 주로 제2형 당뇨병치료 약물의 개발에 많은 노력을 기울이고 있는 실정이다.

[0006] 제2형 당뇨 환자의 주요 치료제로서 사용되는 경구용 혈당강하제는 설포닐우레아계 및 비구아니드계 약물로 구분될 수 있으며 생약제를 성분으로 하는 당뇨개선, 예방, 치료용 약물 및 식품 등도 다수 개발되었다.

[0007] 현재 당뇨치료에 효능이 있는 것으로 보고된 것으로는 곡물류와 녹차, 자황 등의 생약성분을 포함하는 혈당강하 효과가 있는 건강식품조성물(대한민국특허 제126431), 동충하초, 우황 등의 17종의 생약성분을 포함하는 당뇨병 치료용 조성물(대한민국특허 제195886호), 상백피를 주성분으로 함유하는 당뇨환자용 과자류 조성물(대한민국특허 제237974호), 인삼, 황련 등의 15종의 생약성분을 포함하는 당뇨병 치료용 조성물(대한민국특허 제395619호) 등이 보고되어 있다. 그러나 상기치료제는 혈당강하에 중점을 두고 있는 것으로서, 혈당강하, 고혈압 및 고지혈증 등 대사증후군의 증상을 동시에 개선할 수 있는 소재나 약제는 아직까지 보고된 바가 없다

[0008] 따라서, 종래의 당뇨 치료제와 동등하거나 그 이상의 효능을 나타내면서도 인체에 대해서는 좀 더 안전한 새로운 항산화 제재와 당뇨병/당뇨병 합병증 예방, 치료 또는 개선용 물질을 개발해야 할 필요성이 지속적으로 대두하고 있다.

[0009] 대부분의 대사성 질환 환자는 비만이거나, 과체중 상태이기 때문에, 약물처방뿐만 아니라, 단순 당 섭취를 제한하는 식이조절, 및 운동에 의한 복부비만 감소 및 체중조절 등의 방법을 권장하고 있으며, 또한 당질 소화조절, 식욕조절, 지방분해 또는 당 대사작용 억제 등의 효과를 유발할 수 있는 기능성 식품을 보편적으로 사용하고 있다.

[0010] 당질은 소장 상부에서 아밀라아제 등에 의해 소화되어 올리고당과 2당류가 되고, 다시 말타제(maltase), 수크라제(sucrase), 글루코아밀라아제(glucoamylase) 등의 2당류 수산화효소에 의해 단당류로 분해되어 흡수되게 되는데, 이러한 효소들의 활성을 억제하면 당질의 소화, 흡수가 지연되고, 식후 고혈당이 억제될 수 있기 때문에, 밀 추출물(US5444046), 현미 추출물(JP2004-091462), 포도씨 추출물(KR2005-0115017) 등과 같이 아밀라아제(amylase)나 α-글루코시다제(α-glucosidase) 억제능의 특징이 있는 성분을 포함하는 기능성 식품으로 다수 개발되어 있으나, 효과적인 치료효과 보다는 보조적인 역할로 만족해야 하는 상황이다.

[0011] 최종당화산물(Advanced glycation end product, AGE)이 알려져 있는데, 상기 물질은 당(sugar) 분자가 효소 작

용 없이 열에 의하여 단백질이나 지질과 결합하는 당화반응(non-enzymatic glycosylation)에 의해 생성되는 물질로서, 생체 분자기능을 방해하여, 여러 가지 문제를 야기하는 것으로 알려져 있다.

[0012] 최종당화산물(AGE)는 sugar를 지방이나 단백질과 함께 가열하는 조리 방식으로 생성되기도 하지만, 신체의 정상 대사 과정이나 노화로도 만들어지며, 최근에는 알츠하이머와 같은 신경퇴행성 질병과 당뇨병과 그와 관련된 합병증 및 여러 성인성 질병 등과 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Reddy and Beyaz, *Drug Discovery Today*, 11:646-54, 2006)

[0013] 일반적으로 조리과정에서 음식의 색깔과 향미를 만들어 내기 위하여 가열하는 과정에서 갈변현상, 즉 마이알 반응(Maillard Reaction) 또는 글라이케이션(glycation)이 일어나는데, 구운 빵(Toasted bread), 비스킷(Biscuit), 몰트 위스키나 맥주 등 Malted barley, 구운 육류(Roasted) 또는 표면을 태운 육류(seared meat), 건조 또는 농축 우유, 구운 커피(Roasted coffee)등이 이러한 반응을 이용하여 독특한 풍미를 갖도록 한다.

[0014] 1912년 프랑스 과학자 Louis-Camille Maillard에 의하여 처음 체계화된 마이알 반응은 아미노산의 아미노기와 환원당의 활성 카보닐기가 반응하여 향미나 냄새가 다양한 분자를 생성하는 반응으로, 155도의 고온 및 저습도 조건이 필요하며, 이로 인하여 최종당화산물(AGE)이 만들어진다(Maillard, *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences,* 154:66-68, 1912, 도 1).

[0015] 신체 내에서 일어나는 동일 반응은 글라이케이션으로 불리며, 환원당의 카보닐 그룹과 단백질, 핵산, 인지질 등의 아미노 그룹 사이의 비효소적 반응에 의하여 최종당화산물인 AGEs(advanced glycation end-product)이 생성되는데, 초기 Schiff base를 형성하고 산화, 축합, 전위, 재배열에 의해 아마도리 화합물(Amadori compound)이 만들어진 후, 최종적으로 비가역적인 최종당화산물이 생성되는 것으로 알려져 있다(Reddy and Beyaz, 2006, *Drug Discovery Today*, 11:646-54, 2006).

[0016] 글라이케이션에 의한 구조적 변화가 야기된 당화된 단백질은 당화된 단백질은 알부민, 피부 콜라겐, 면역글로불린, 눈, 신장, 혈관조직과 같은 short 및 long-lived proteins에 형성되며, 세포에 존재하는 다양한 수용체를 변화시켜, 생리활성 기능상실 및 세포의 손상을 야기함으로써, 질병적 증상을 초래한다(Vlassara *et al.*, *Laboratory Investigation,* 70:138-151, 1994; Thorpe and Baynes, *Amino Acids,* 25:275-281, 2003).

[0017] 지금까지의 연구를 통해 AGEs는 당뇨병에 걸린 사람의 혈액과 조직에서 발견되며, 그 외에도 동맥경화, 알츠하이머, 말기신부전증, 류머티스 관절염, 간 경화증 등 다양한 병리학적인 상태에서도 발견되고 있는데, 특히 AGEs가 가진 화학적 변형(chemical modification)과 교차결합이 단백질, 지질 그리고 DNA 조직의 구조와 기능에 영향을 미치고, 이로 인해 조직기능이 감소됨으로써, 당뇨와 당뇨합병증이 유발된다는 연구결과가 있다(Sebekova *et al.*, *J Hepatol* 36:66-71, 2002; Jakus and Rietbrock, *Physiol Res,* 53:131-42, 2004).

[0018] 따라서, 상기 증상의 치료 목적으로 전이 금속 킬레이터 또는 자유 라디칼 소거능을 사용하거나 AGEs의 교차결합을 깨서 산화를 막아주는 즉, 반응성 디카보닐 종(reactive dicarbonyl species)을 억제하는 AGE 저해제(AGE inhibitor) 또는 브레이커(breaker)에 대한 많은 연구가 진행되었으며, 대표적으로 반응성 카보닐 중간체(reactive carbonyl intermediates)를 소거하여 AGEs 형성 저해능을 가진 아미노구아니딘(Aminoguanidine, AG), 피리독사민(pyridoxamine), 2,3-디아미노-펜나진(2,3-diamino-phenazine), OPB-9195, 및 테닐세탐(tenilsetam) 등이 알려져 있고, AGE-크로스-링크 브레이커(AGE-cross-link breakers)로서 N-phenacetylthiazoliumbromide (PTB)과 ALT-711가 연구되었다.

[0019] 이 중에서 아미노구아니딘(AG)은 대표적인 최종당화산물 저해제로서 *in vitro*와 *in vivo*에서 메틸글리옥살(methylglyoxal), 3-디오시글루코손(3-deoxyglucosone)과 같은 아마도리(Amadori) 생성물, 중간생성물, 그리고 환원당의 카보닐 그룹과 반응하여 최종당화산물의 형성을 억제하는 것이 알려져 있다(도 2).

[0020] 페오포바이드 A(Pheophorbide A, PhA)는 녹조류에서 색깔을 구성하는 주요 구성물질로서, 종양세포에 대하여 세포독성능을 가진 감광제(photosensitizer)로 알려져 있으며, 반지연(*Scutellaria barbata*)에서 정제된 페오포바이드 A는 인간의 간암세포에서 apoptosis 효능이 확인되어, 이를 이용한 항종양 물질로 사용되고 있으나, 페오포바이드와 같은 포피린계 물질의 여러 기능성에 관한 연구가 많지 않고, 특히 이의 항산화능, 비만 및 당뇨를 포함하는 대사 증후군에 대한 치료 및 예방 효과에 대해서는 알려진 바가 없다(S.W. Jeffrey, *Marine Biology*, 37(1976):33?37, 1976; Xu *et al.*, *Laser Physics*, 21: 1670, 2011; Chan *et al*, *Planta Med*, 72(1):28, 2006).

[0021] 이에 본 발명자들은 효과적이고 안전한 대사 증후군 및 당뇨병 예방 및 치료능의 신규 성분을 개발하고자, 예의 노력한 결과, 매생이로부터 포피린계 물질인 페오포바이드 A를 분리 정제하였으며, 상기 물질의 총폴리페놀 함량, 철이온의 환원력을 이용한 항산화 효과, 글라이케이션 저해효과, 알파-글루코시데이즈 활성 억제능력, 및 알도오즈 환원효소 활성억제 능력을 분석하고, 그 결과를 통하여 상기 페오포바이드 A를 대사 증후군, 비만, 당뇨 등의 예방 및 치료 용도로 이용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0022] 본 발명의 목적은 페오포바이드 A(Pheophorbide A)의 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증의 치료 또는 예방용도를 제공하는데 있다.

[0023] 본 발명의 다른 목적은 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 항산화용 화장용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 항산화용 화장료 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명은 또한 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하며, 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증의 예방 또는 개선용 기능성 식품을 제공한다.

[0027] 본 발명의 또한 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는, 항산화용 기능성 식품을 제공한다.

[0028] 본 발명은 또한 (a) 건조 매생이에 알콜을 가하여 추출한 다음, 건조에 의하여 분말화하는 단계; (b) (a) 단계에서 얻어진 분말을 물에 용해시킨 다음, 클로로포름을 가하여 추출물을 수득하는 단계; 및 (c) (b) 단계로부터 얻어진 유기용매 추출액에 대하여 크로마토그래피를 수행하고, 메탄올:에틸아세테이트가 혼합된 용매로 용출된 분획물을 수득하는 단계를 포함하는 페오포바이드 A(Pheophorbide A)의 추출방법을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물 및 기능성 식품은 당질 소화기전에 관여하는 α-글루코시다아제(α-glucosidase) 및 알도오즈 환원효소(aldose reducase) 억제능을 가지기 때문에, 고혈당 증상이 억제되는 효과가 있고, 글라이케이션을 저해하기 때문에, 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증 등을 포함하는 대사성 질환 치료 또는 예방에 유용하며, 또한 상기 물질의 항산화능에 의하여, 노화 지연, 생리활성 기능 회복 등의 효과가 있기 때문에, 기능성 식품으로서 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 마이알 반응(Maillard reaction)에 의한 AGEs의 생성 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 아미노구아니딘(AG)에 의한 AGEs 생성 저해과정을 나타낸 모식도이다.

도 3은 매생이로부터 페오포바이드 A의 추출, 분리 및 정제 단계를 나타낸 모식도이다.

도 4는 매생이 조추출물, 페오포바이드 A 및 대조군으로 비타민 C에 대한 항산화능 평가 결과이다(각 값은 3회 반복 실험결과의 평균±표준편차로서, 철이온 환원력(FRAP)는 mole FeSO4/μg sample, 총폴리페놀은 추출물의 μg-gallic acid equivalents/mg, 총플라보노이드는 μg-quercitin equivalents/mg로 나타내었음).

도 5는 매생이 조추출물(CFE) 및 이로부터 극성을 달리한 용매로 분획된 정제물들의 항글라이케이션능을 평가한 결과이다(A: 다양한 에탄올 함량에 따른 추출물; B:극성 분리를 통해 얻어진 추출물; C: 클로로포름 층에서 분리된 추출물; D: 세파덱스를 통해 정제된 추출물).

도 6은 매생이 조추출물로부터 분리정제된 페오포바이드 A의 HPLC/MS 결과이다.

도 7는 매생이 조추출물로부터 분리정제된 페오보바이드 A의 NMR 결과이다.

도 8은 매생이 조추출물(CFE)과 그로부터 분리, 정제된 페오포바이드 A의 알파-글루코시데이즈 활성 억제능을 평가한 결과이다(% of control은 블랭크 그룹(100%)와 비교하여 계산되었고, 값은 평균(n=3)±SD를 나타내고, 양성 대조군인 아카보오즈의 최종농도는 0.12mM임).

도 9은 매생이 조추출물(C250 및 C500) 및 이로부터 분리, 정제된 페오포바이드 A(P30 및 P60)의 알도오즈 환원효소 활성 억제능을 평가한 결과이다(값은 평균(n=3)±SD를 나타내었음)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다

[0032] 생활습관의 서구화에 의하여, 지방 및 당 섭취의 증가, 활동량 감소 등의 요인이 복합적으로 작용하여, 비만, 고지혈증, 동맥경화, 당뇨 등의 대사성 질환의 증가 현상이 사회적 문제로 대두하고 있기 때문에, 종래의 대사성 질환 치료제와 동등하거나 그 이상의 효능을 나타내면서도 인체에 대해서는 좀 더 안전한 새로운 항산화 제재와 대사성 질환 예방, 치료 또는 개선용 물질 개발에 대한 요구가 지속적으로 이루어져 왔다.

[0033] 이에 본 발명자들은 매생이 조추출물로부터 포피린계 물질인 페오포바이드 A를 분리 정제하였으며, 이에 대한 활성을 연구하는 과정에서, 상기 물질의 총폴리페놀 함량, 철이온의 환원력을 이용한 항산화 효과, 글라이케이션 저해효과, 알파-글루코시데이즈 활성 억제능력, 및 알도오즈 환원효소 활성억제 효능을 분석하고, 그 결과를 통하여 상기 페오포바이드 A가 비만, 당뇨 등의 예방 및 치료제로서 이용 가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0034] 본 발명은 일 관점에서, 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증의 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에 따른 페오포바이드 A(Pheophorbide A)는 매생이(*Capsosiphon fulvescens*) 유래인 것을 특징으로 한다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물의 유효성분인 페오포바이드 A(Pheophorbide A)는 매생이 조추출물 유래인 것을 특징으로 하며, 보다 상세하게는 상기 조성물의 유효성분은 매생이 조추출물, 매생이 조추출물로부터 분리된 분획물, 또는 상기 분획물로부터 분리정제된 페오포바이드 A(Pheophorbide A)인 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명에 따른 페오포바이드 A(Pheophorbide A)는 α-글루코시다아제(α-glucosidase) 및 알도오즈 환원효소(aldose reducase) 억제능을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0038] 본 발명에서, 상기 글리코시다아제는 전분, 수크로오스와 같은 다당류, 올리고당의 분해를 통하여 음식물 소화에 관여하고 있기 때문에, 상기 글리코시다아제를 저해하는 물질은 항당뇨병제, 항비만제로 사용될 수 있다(Diabetes 1991, 40, 825-830). 따라서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 글리코시다아제 저해 활성을 갖는 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유함으로써, 당뇨병, 비만, 대사 증후군 등의 예방 및 치료용 약학 조성물로 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 페오포바이드 A(Pheophorbide A)는 글라이케이션(glycation)의 억제능을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0040] 보다 상세하게는, 본 발명의 페오포바이드 A(Pheophorbide A)는 글라이케이션으로 생성되는 AGEs의 생성을 억제하기 때문에, AGEs에 의해 기인하는 당뇨 또는 당뇨성 망막병증, 당뇨성 백내장, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증, 당뇨성 지방간 등과 같은 당뇨성 합병증의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있으며, 이에 한정된 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 약학 조성물은 당업계에 알려진 통상의 방법에 의해 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 주사제, 크림, 젤, 패취, 분무제 또는 연고제 등의 형태로 제제화될 수 있으며, 또한 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0042] 통상적으로 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 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), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 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, 동결건조제제, 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 물질의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 기준으로 0.001 내지 2000 mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해 0.01 내지 150 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.

[0044] 본 발명의 물질은 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.

[0045] 나아가, 본 발명의 약학 조성물은 비만, 당뇨 또는 당뇨 합병증을 예방 및 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0046] 본 발명은 다른 관점에서, 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 항산화용 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물의 유효성분은 페오포바이드 A(Pheophorbide A)는 매생이 추출물 유래인 것을 특징으로 하며, 보다 상세하게는, 상기 화장료 조성물의 유효성분은 매생이 조추출물, 매생이 조추출물로부터 분리된 분획물, 또는 상기 분획물로부터 분리정제된 페오포바이드 A(Pheophorbide A)인 것을 특징으로 한다.

[0048] 피부가 자외선에 조사되었을 때나 피부내 세포의 호흡 과정에서도 발생하는 활성 산소(Reactive Oxygen Species, ROS)는 다단계의 연쇄 반응을 통하여 세포막의 구성 성분인 지질의 과산화를 일으키며, 지질의 과산화는 라디칼, 과산화물, 데하이드(Aldehyde), 에폭사이드(Epoxide) 등의 다양한 활성종을 발생시키고 DNA, RNA, 단백질, 세포막 및 세포구조에 손상을 입힘으로써, 암, 조직손상, 노화 등의 주원인으로 여겨지고 있다(Black HS, *Photochem photobiol*, 46(2), 213,1987).

[0049] 본 발명에서의 용어 '항산화'는 이러한 활성 산소의 중화 작용을 하는 것을 특징으로 하며, 본 발명의 화장료 조성물은 항산화용으로 사용되기 위하여, 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 단독으로 함유할 수 있으며, 추가로 통상의 항산화 물질을 혼합하여 함유할 수 있다.

[0050] 상기 통상의 항산화 물질로는 토코페롤, 폴리페놀류, Coenzyme Q 10, BHT, BHA 등을 사용할 수 있으며, 이에 한정된 것은 아니다.

[0051] 본 발명은 또 다른 관점에서, 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하며, 비만, 당뇨, 또는 당뇨성 합병증의 예방 또는 개선용 기능성 식품에 관한 것이다.

[0052] 본 발명은 또 다른 관점에서, 페오포바이드 A(Pheophorbide A)를 유효성분으로 함유하는 항산화용 기능성 식품에 관한 것이다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 기능성 식품의 유효성분인 페오포바이드 A(Pheophorbide A)는 매생이 조추출물 유래인 것을 특징으로 하며, 보다 상세하게는, 상기 기능성 식품의 유효성분은 매생이 조추출물, 매생이 조추출물로부터 분리된 분획물, 또는 상기 분획물로부터 분리정제된 페오포바이드 A(Pheophorbide A)인 것을 특징으로 한다.

[0054] 본 명세서에서의 용어 '식품'은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함한다.

[0055] 본 명세서에서의 용어 '기능성 식품'은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 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.

[0056] 본 발명의 기능성 식품에 의한 비만, 당뇨 또는 당뇨성 합병증의 증상 개선은 고혈당 증상이 섭취하기 전과 비교하여 개선된 것을 의미하며, 기술분야의 당업자라면 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 고혈당의 정확한 기준을 알고, 개선된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0057] 본 발명의 항산화용 기능성 식품에 의한 증상 개선은 피부 노화 개선, 체내 염증 완화, 암 예방 등의 기능을 기대할 수 있으며, 이에 한정된 것은 아니다.

[0058] 본 발명의 기능성 식품에 있어서, 유효성분의 혼합량은 사용목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0059] 또한 본 발명의 기능성 식품은 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 더 포함할 수도 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료 형태로 제제화될 수 있다.

[0060] 예를 들어, 상기 정제 형태의 기능성 식품은 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 적당한 방법으로 과립상으로 한 다음 활택제 등을 넣어 압축성형하여 조제하거나 정제 형태의 건강기능식품을 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 직접 압축성형하여 만들거나 또는 미리 만든 과립에 건강기능식품을 그대로 혹은 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 다음 압축성형하여 조제하거나 건강기능식품에 부형제, 결합제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 분말을 용매로 습윤시키고, 습윤된 분말을 저압으로 틀에 넣어서 성형한 후, 적당한 방법으로 건조하여 조제한다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품에 필요에 따라 교미제 등을 넣을 수 있으며, 적당한 제피제로 제피 가능하다.

[0061] 상기 캅셀 형태의 기능성 식품 중 경질캅셀제는 보통 캅셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 고르게 섞은 것 또는 적당한 방법으로 입상으로 한 것 또는 입상으로 한 것에 적당한 제피제로 제피한 것을 그대로 또는 가볍게 성형하여 충전하여 조제하며, 연질캅셀제는 보통 캅셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 넣은 것을 젤라틴 등 적당한 캅셀기제에 글리세린 또는 소르비톨 등을 넣어 소성을 높인 캅셀기제로 피포하여 일정한 형상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 상기 캅셀기제에 착색료 보존료 등을 첨가할 수 있다.

[0062] 상기 환형태의 기능성 식품은 통상의 기능성 식품에 사용되는 부형제, 결합제, 붕해제 등을 고르게 섞은 다음 적당한 방법으로 구상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

[0063] 또한, 본 발명의 기능성 식품은, 관련 질환의 예방을 위한 건강보조식품의 식품보조첨가제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0064] 본 발명에서 정의되는 물질 이외의 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충진제, 안정화제 등을 포함한다.

[0065] 본 발명에서의 기능성 식품의 경우, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물 이외 함유하는 액체 성분에는 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 예를 들어, 포도당, 과당 등의 모노사카라이드 예를 들어, 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드 예를 들어, 덱스트린, 사이클로 덱스트린 등의 폴리사카라이드 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖당 일반적으로 약 1 내지

20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0066] 상기 외에 본 발명의 기능성 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 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 100 중량부 당 0.001 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0067] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 건조 매생이에 알콜을 가하여 추출한 다음, 건조에 의하여 분말화하는 단계; (b) (a) 단계에서 얻어진 분말을 물에 용해시킨 다음, 유기용매를 가하여 추출물을 수득하는 단계; 및 (c) (b) 단계로부터 얻어진 유기용매 추출액에 대하여 크로마토그래피를 수행하고, 메탄올:에틸아세테이트가 혼합된 용매로 용출된 분획물을 수득하는 단계를 포함하는 페오포바이드 A(Pheophorbide A)의 추출방법에 관한 것이다.

[0068] 본 발명에 따른 추출방법은 상기 (c) 단계에서 얻어진 분획물에 대해 컬럼 크로마토그래피로 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0069] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서 사용하는 알콜은 에탄올 또는 메탄올을 사용할 수 있으며, 25%, 50%, 70%의 희석 비율 또는 100%의 농도로 하여 추출에 사용할 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니다.

[0070] 또한 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 매생이 추출물의 분말화를 위한 건조 방법은 동결건조, 진공건조, 열풍건조 방법을 사용할 수 있으며, 이에 한정된 것은 아니다.

[0071] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 추출방법은 냉침 또는 온침인 것을 특징으로 한다.

[0072] 본 발명의 추출방법에서 (b) 단계의 유기용매는 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올일 수 있으며, 이에 한정된 것은 아니다.

[0073] 본 발명의 추출방법에서 (b) 및 (c) 단계의 크로마토그래피는 젤여과 크로마토그래피를 사용할 수 있으며, 보다 상세하게는 다이아이온 에이치피-20 컬럼 또는 세파덱스 엘에이치-20 컬럼을 이용할 수 있다.

[0074] 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0075] 이 때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[0076] **[실시예1] 매생이 조추출물 및 분획물의 수득**

[0077] 매생이로부터 포피린계 물질을 분리 정제하기 위하여, 매생이(*Capsosiphon fulvescens*)를 물로 3회 이상 수세 후 동결건조기를 이용하여 건조하고, 이로부터 500g 취하여, 여기에 70% 에탄올 5 L를 이용하여 3시간 동안 환류냉각 추출하여 얻은 후 7,500 rpm, 30 min, 4에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 원심분리된 상층액에 남아 있을지 모르는 불용성 물질을 제거하기 위하여 재차 상등액을 whatman No. 42 여과하였다.

[0078] 여과된 상등액을 감압증류한 다음 동결건조를 통하여 분말 형태의 매생이 70% 에탄올 추출물(CFE)을 얻었다. 이렇게 얻어진 CFE를 물에 녹인 뒤 순차적으로 유기용매의 극성도를 달리하며 헥산(CFE-H), 클로로포름(CFE-C), 에틸아세테이트 (CFE-E), 부탄올(CFE-B), 물(CFE-D) 획분으로 극성에 따라 일차적 분리를 하였다. 항산화와 항글라이케이션 활성, 알파-글루코시데이즈 활성 억제능력 및 알도즈 환원효소 활성억제 능력저해효과가 가장 높은 CFE-C를 연속적으로 다이아이온 에이치피-20 크로마토그래피에 흡착시킨 후 <물:메탄올:에틸아세테이트> 혼합용출액의 농도를 달리하여 7개의 획분을 얻은 뒤, 역시 항산화와 항글라이케이션 활성이 가장 높은 <75% 메탄올 : 25% 에틸아세테이트> 획분(EA-25)을 재차 Sephadex LH-20 column (2X35cm)를 이용하여 분리하였다(도 3).

[0079] **[실시예 2] 분리정제된 페오포바이드 A의 항산화 효과**

[0080] 항산화 효과에 의하여 라디칼이 반응성이 적거나 또는 불활성화 되는데, 특히 식물 추출물에 널리 분포되어 있는 포피린계와 같은 페놀성 화합물로서 대표적인 폴리페놀은 페놀 하이드록실기를 가지고 있기 때문에, 단백질 등의 거대 분자와 결합하여, 항산화, 항미생물 효과등의 생리활성을 갖으며, 생체 내 활성산소를 제거하는 항산화제인 플라보노이드는 비효소계로서, 일산화산소, 지질 과산화물 들의 다양한 라디칼을 제거하는 능력이 있다. FRAP은 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridytriazine(Fe^{3+}-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridytriazine (Fe^{2+}-TPTZ)로 환원되는 것을 이용하여 총 항산화능력을 측정하는 방법이며, DPPH는 안정화된 프리 라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 517 nm 부근에서 최대 흡광도를 가지고 전자를 받으면 흡광도가 감소하며 다시 산화되기 어려워지는 특징이 있는데, 항산화활성이 있는 물질과 만날 경우, 전자를 내어주면서 라디칼(DPPH)이 소멸되면 색의 변화가 일어나는 특성을 이용하여 SC50을 구하고 이를 이용해 항산화 능력을 비교할 수 있다.

[0081] 매생이 조추출물 및 이로부터 정제된 페오포바이드 A에 대하여, 상기의 원리를 이용하여 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량과 철이온 환원력과 DPPH 라디컬 소거능력을 통해 항산화능을 확인하였다.

[0082] 총폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteau reagent(Anesini *et al.*, *Agricultural and Food Chemistry*, 56:9225, 2008)를 사용하여 측정하였으며, 총 플라보노이드 함량은 2% $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 및 샘플을 동일 양 혼합한 후, 10분 동안 실온에서 반응을 시킨 다음, 430 nm에서 측정을 하였으며, 퀘세틴을 이용하여 표준곡선을 작성하여, 함량을 계산하였다.

[0083] 철이온 환원력은 매생이 조추출물과 페어포바이드 A의 동일 양의 폴린용액과 10 % 탄산 나트륨 용액을 혼합 한 다음, 30분 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 말산을 이용한 표준곡선을 근거로 함량을 계산하였다. 철이온 환원력은 10 mM 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)와 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$를 0.3 M 아세테이트 버퍼에 용해시킨 FRAP 시험액을 각 농도 별로 희석한 샘플과 5분 동안 반응시켜 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0084] DPPH 자유라디컬 소거능은 에탄올에 용해시킨 200 μM DPPH에 샘플을 농도별로 첨가하고 37℃ 항온 인큐베이터에서 30분 동안 방치하였다.. 그 다음 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였으며, 대조군으로는 비타민C를 동일 실험방법으로 하여 흡광도 수치를 비교하였다.

[0085] 그 결과, 매생이 조추출물(CFE)의 함유된 폴리페놀은 18.12 ㎍ gallic acid/㎎ sample, 총 플라보이드 함량은 2.73 ㎍ QE/mg sample, 철이온 환원력은 0.14 mM $FeSO_4$/㎎ sample, DPPH 라디칼 소거능 능력은 2250 ㎍ DM/mL로 나타나, 특히 철이온 환원력에 있어서는 비타민 C에 비하여 47배 이상 우수한 것으로 나타났다. 또한, 페어포바이드 A의 철이온 환원력은 0.026 mM $FeSO_4$/㎎ sample, DPPH 라디칼 소거능 능력은 149 ㎍ DM/mL인 것으로 나타나, 라디칼 소거능에 의한 항산화 활성이 비타민 C에 비하여 3배 이상 우수한 것으로 나타났다(도 4).

[0086] **[실시예 3] 매생이 조추출물과 그로부터 분리된 분획물들 및 페오포바이드 A의 항글라이케이션 효과**

[0087] 에탄올 함량을 달리하여 추출된 매생이 조추출물(CFE) 및 열수 추출물, 그로부터 분획된 CFE-H(헥산층), CFE-C(클로로포름 층), CFH-E(에틸아세테이트 층), CFE-B(부탄올 층), 및 CFE-D(물 층) 등을 샘플로 하여, 항글라이케이션능을 다음과 같이 측정하였다.

[0088] 10 ㎎ BSA, 10 mM glycolaldahyde가 포함된 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 1 mM DTPA 및 0.02% sodium azide와 활성이 있는 물질을 농도별로 혼합한 후, 37 ℃에서 30분간 인큐베이션하고, 이 혼합물 중 1 ㎖을 1.5 ㎖ ep-tube (Corning Costar Co.)에 옮긴 후 밀봉하여 O_2 incubator에서 7일 동안 반응시켰다. 이를 100㎕씩 3등분하여 96 well plate에 옮기고 spectrofluorometer(VICTOR3™, PerkinElmer, USA)을 사용하여 excitation 파장 370 nm, emission 파장 440 nm에서 형광도를 측정하였다. 이 때, 대조군으로는 글라이케이션 저해제(Glycation inhibitor)인 아미노구아니딘(AG)을 증류수에 녹여서 사용하였다.

[0089] 에탄올 함량에 차이를 두고 추출된 매생이 조추출물의 항글라이케이션능을 비교한 결과, 70% 에탄올로 추출한 경우, 62.3%로 가장 높은 것으로 나타났으며(도 5A), 이로부터 분획된 분획물 중에서는 클로로포름 층 분획물인 CFE-C의 글라이케이션 억제 효과가 70.3%로 제일 우수한 것으로 확인되었다(도 5B).

[0090] 또한 상기 CFE-C 분획에 대하여, 추가로 다이아이온 에이치피-20 컬럼(Diaion HP-20 column)과 세파덱스 엘에이치-20 컬럼(Sephadex LH-20 column)을 사용하여 stepwise gradient식으로 다시 분리정제를 실시하였으며, 이때 용매는 물, 메탄올 및 에틸아세테이트를 혼합사용하였고, 각각 7개 및 3개의 호기분으로 분리하여 각 획분에 대한 항글라이케이션 효과실험을 수행하였다.

[0091] 그 결과, 다이아이온 에이치피-20 컬럼에서 메탄올과 에틸아세티에트 75:25 (v/v) 분획(EA-25) 1000 μg/ml 에 대하여 70% 이상의 가장 높은 항글라이케이션 활성을 확인하였다(도 5C).

[0092] 따라서, 상기 EA-25에 매생이 조추출물의 항글라이케이션을 나타내는 활성물질이 있는 것으로 추정하고 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용해 추가 정제하여 수득된 분획에 대한 항글라이케이션 활성을 파악하였으며, 그 결과 72.8%로 항글라이케이션능이 가장 우수한 분획이 S-F-3임을 확인하였다(도 5D).

[0093] **[실시예 4] 매생이 조추출물의 항글라이케이션 유효성분 분석**

[0094] 실시예 3에서 확인된 항글라이케이션능이 가장 높은 분획인 S-F-3의 유효성분을 명확하게 파악하기 위하여, 다음의 실험을 수행하였다.

[0095] 분리 정제된 물질의 LC-HR/MS 분석은 Finnigan Surveyer MS Pump Plus (Thermo Electron corporation, Sanjose, USA)를 가지고 있는 LTQ Orbitrap (Thermo Electron corporation, Bremen, Germany) 기계를 사용하였다. 이동상은 물과 메탄올을 80%:20%에서 0%:100%기 되도록 기울기를 주었으며, 컬럼은 Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 50mm, 2.7 Micron, Agilent Technolgies Inc., CA, USA)를 사용하고 electrospray positive ionization (ESI+) 소스는 다음과 같다: sheath gas flow rate: 40 arb, aux gas flow rate: 5 arb, sweep gas flow rate: 2 arb, spray voltage: 4.2 kV, capillary temperature: 230℃, capillary voltage: 2 V, tube lens: 90 V. 소프트웨어는 Xcalibur version 2.2이다.

[0096] NMR 분석은 tetramethylsilane (TMS)를 internal standard로 하여 Varian NMR system 500 MHz (Varian, Palo Alto, CA) 기계를 사용하여 분석하였고, chemical shifts는 δ values로 표기하였다.

[0097] 그 결과, 매생이 조추출물의 항글라이케이션 효과를 유도하는 유효성분은 페오포바이드 A인 것으로 확인하였다(도 6 및 도 7).

[0098] **[실시예 5] 매생이 조추출물 및 상기 유래의 페오포바이드 A의 α-글루코시데이즈 활성 억제능 확인**

[0099] 혈당 상승 예방을 위해 사용되는 경구용 혈당 강하제로는 탄수화물의 소화를 제한하여 식후 고혈당을 예방하는 α-글루코시다아제 저해제를 사용하는데, 대표적으로 아카보오즈 등이 알려져 있다. 본 실시예에서 매생이 조추출물 및 이로부터 유래된 페오포바이드 A의 α-글루코시다아제 저해능을 확인하고자 하였으며, 대조군으로는 아카보오즈를 사용하여 비교실험을 실시하였다.

[0100] 0.1 M 인산칼륨 완충용액(pH 7.0)에 각 농도별 시료와 α-글루코시다아제인 효소액, DL-글라이세르알데하이드 기질 순으로 가하여 37℃에서 30 분간 반응시킨 후, 90℃에서 효소를 불활성화 하여 반응을 정지시킨 다음, 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0101] 그 결과, 대조군인 아카보오즈 0.12 mM(ACO.12)에서 73.6% 의 억제효과를 보였으며, 매생이 조추출물(CFE) 1 mg/mL(1) 및 10 mg/mL(10)에 대한 효소활성 억제능은 각각 40.2%, 53%인 것으로 나타났다. 반면 페오포바이드 A는 대조군인 아카보오즈와 동일 농도로 처리하였을 때 75.4%의 효소활성 억제효과가 있는 것으로 나타나, 우수한 α-글루코시다아제 저해능이 있는 것으로 확인하였다(도 8).

[0102] **[실시예 6] 매생이 조추출물 및 상기 유래 페오포바이드 A의 알도오즈 환원효소 억제능 확인**

[0103] 당뇨성 합병증 중에서 고혈당이 직접적인 원인으로 알려진 증상은 망막증, 백내장 등이 있으며, 그 발생 기전의 하나로 폴리오 대사계 이상을 들 수 있다. 폴리올 대사계는 포도당 대사경로의 하나로 포도당은 알도오스 환원효소에 의하여 소르비톨로 전환된다. 정상상태에서의 알도오즈 환원효소의 포도당에 대한 기질 친화성은 매우 낮아 소르비톨 형성은 거의 일어나지 않으나, 당뇨병 상태에서는 수정체, 망막과 같은 인슐린 비감수성의 조직에서의 포도당 농도가 상승하면 위의 경로에 의하여 대량의 소르비톨을 생성하게 되며, 상기 물질의 조직 내 축

적에 의하여 당뇨성 백내장, 망막증 형태의 증상이 나타난다. 따라서 당뇨성 합병증 예방 및 치료제로서 알도오스 환원효소 억제제가 주목을 받고 있으며, 매생이 추출물이 알도오스 환원효소 억제작용을 하는지 알아보고자 하였다.

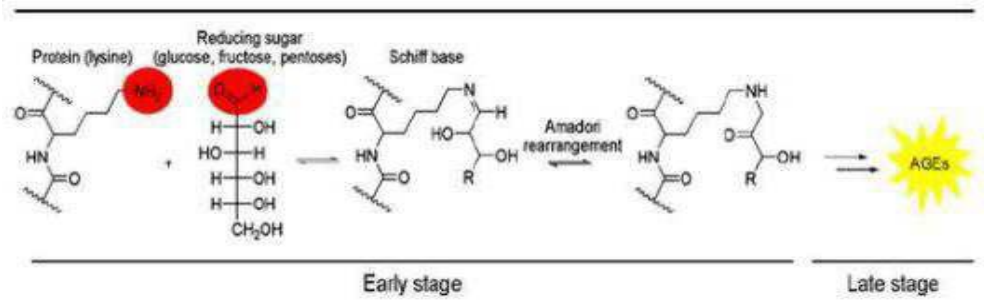
[0104] 알도오즈 환원효소를 얻기 위하여, IRB 마우스(㈜ 샘타코)를 CO2 마취를 한 다음 수술도구를 사용하여 수정체를 적출하였다. 그 후, 0.1 M 인산나트륨 완충용액(pH 6.2)에 담가 4℃, 10,000rpm으로 20분 동안 원심분리한 후 얻어진 상등액을 수득하여, 이에 포함된 효소를 활성 억제능 확인에 사용하였다.

[0105] 9 μl의 30 μM(P30) 및 60 μM(P60)의 페어포바이드 A에 대하여 각각 90μl 효소, 90μl 의 1.6mM 니코틴마디으 아데닌 디뉴클레오티드 인산, 90μl 의 100 mM DL-글라이세르알데하이드, 및 620 μl의 0.1M 인산칼륨 완충용액을 혼합하여 4분 동안 반응시킨 후, 340nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

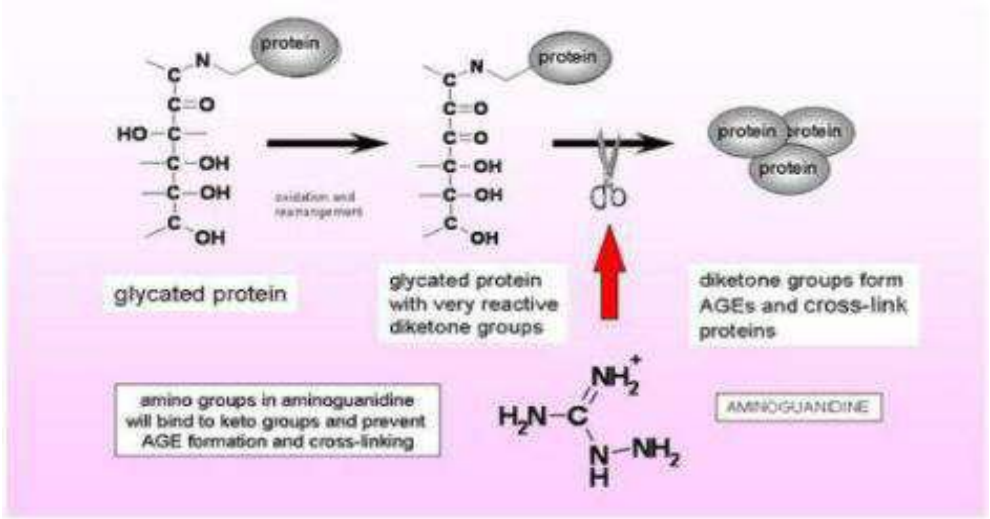
[0106] 그 결과, 양성대조군인 쿼세틴 120 μM(Q120), 500 μM(Q500)을 처리했을 경우, 각각 33.6% 및 53.8%의 활성 억제능이 있는 반면, 매생이의 유효성분인 페어포바이드 A는 그 보다 낮은 농도인 60 μM(P60)를 처리하였을 때, 양성대조군과 유사한 정도인 46.1%의 효소활성 억제능이 있는 것으로 나타나, 효소활성 억제능이 낮은 농도에서도 매우 우수한 것으로 확인되었다.

도면

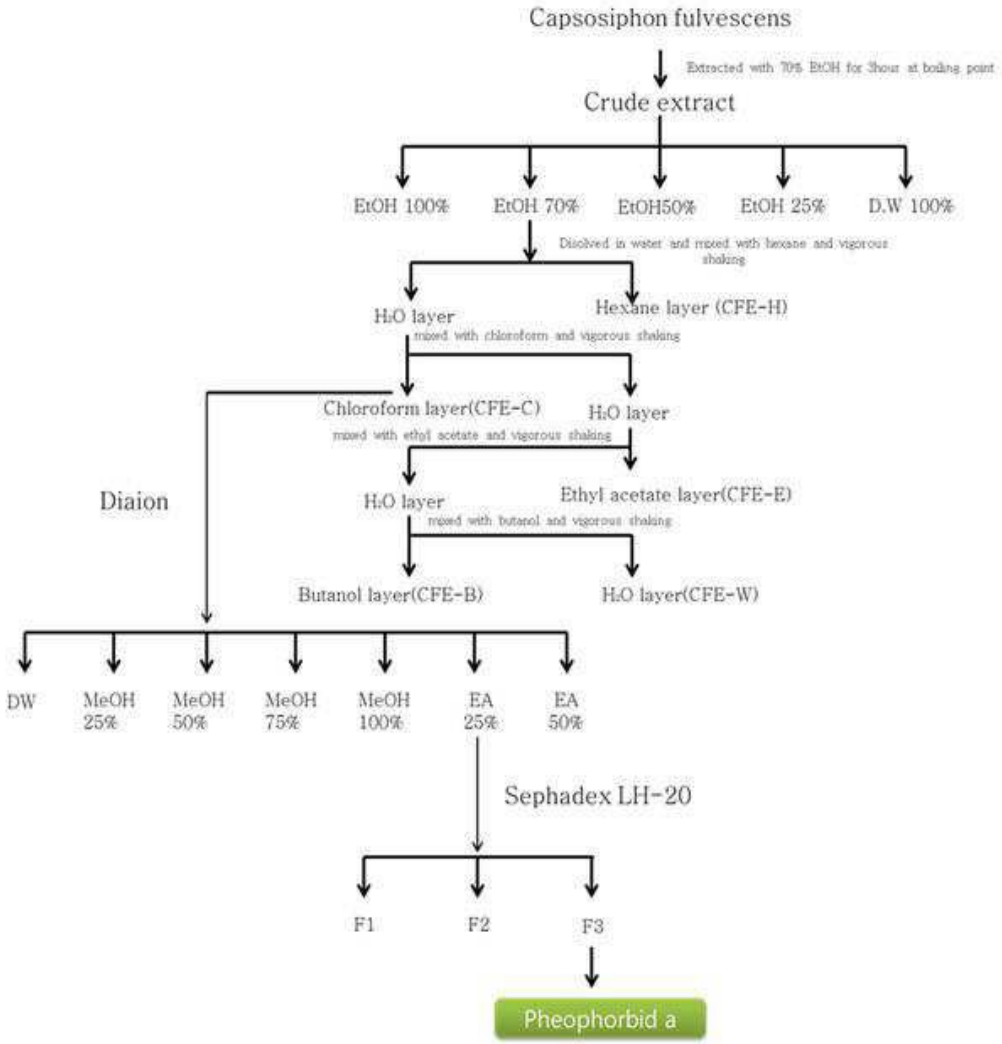
도면1



도면2



도면3

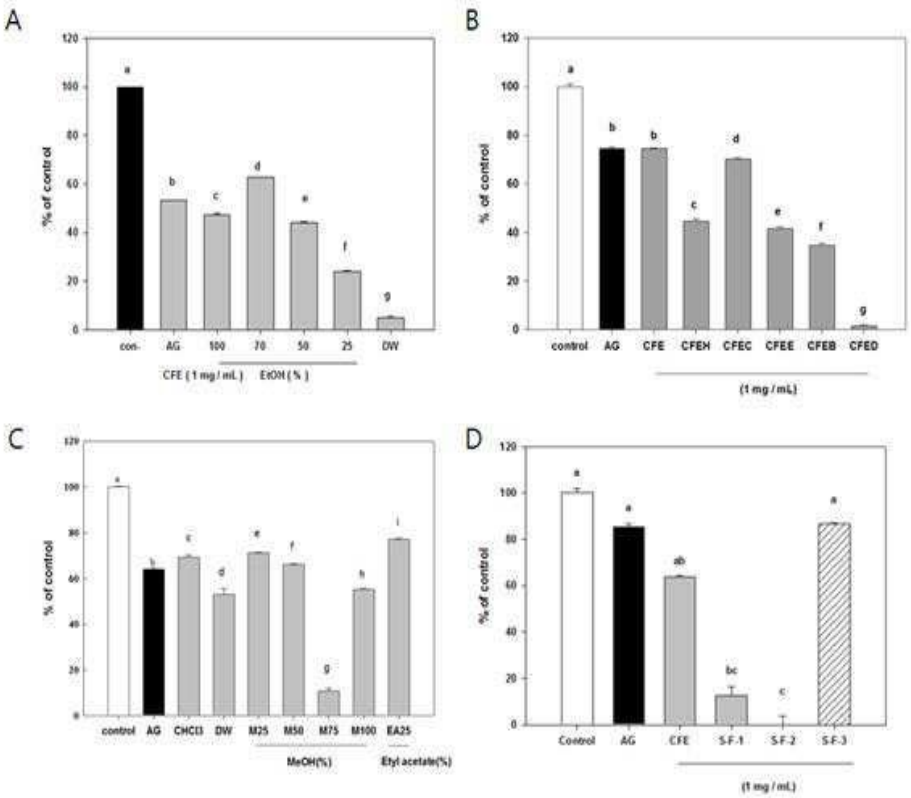


도면4

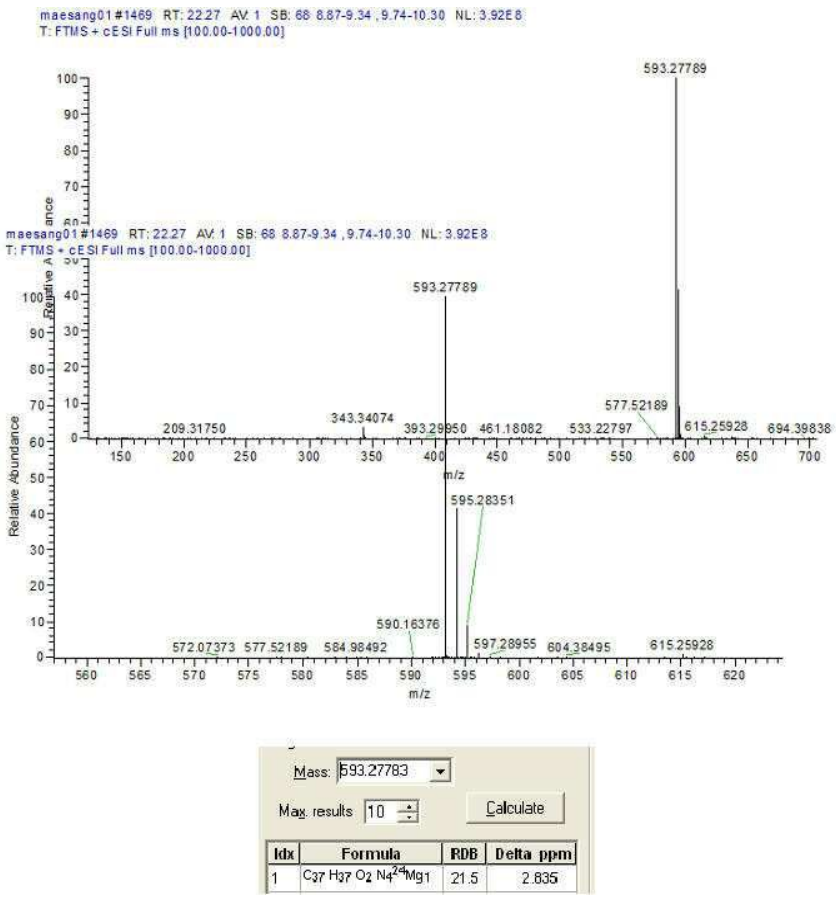
[매생이 추출물과 페어포바이드A의 항산화능력]

	폴리페놀 (μg GAE/mg DM)	플라보노이드 (μg QE/mg DM)	FRAP (mM Fe(II)/mg DM)	DPPH·SC_{50} (μg DM/mL)
매생이 추출물	18.12±1.71	2.73±0.36	0.14±0.00	2250.69±0.17
페어포바이드A	-	-	0.02614	149±0.2
비타민 C	-	-	7.44±0.12	46.67±2.84

도면5

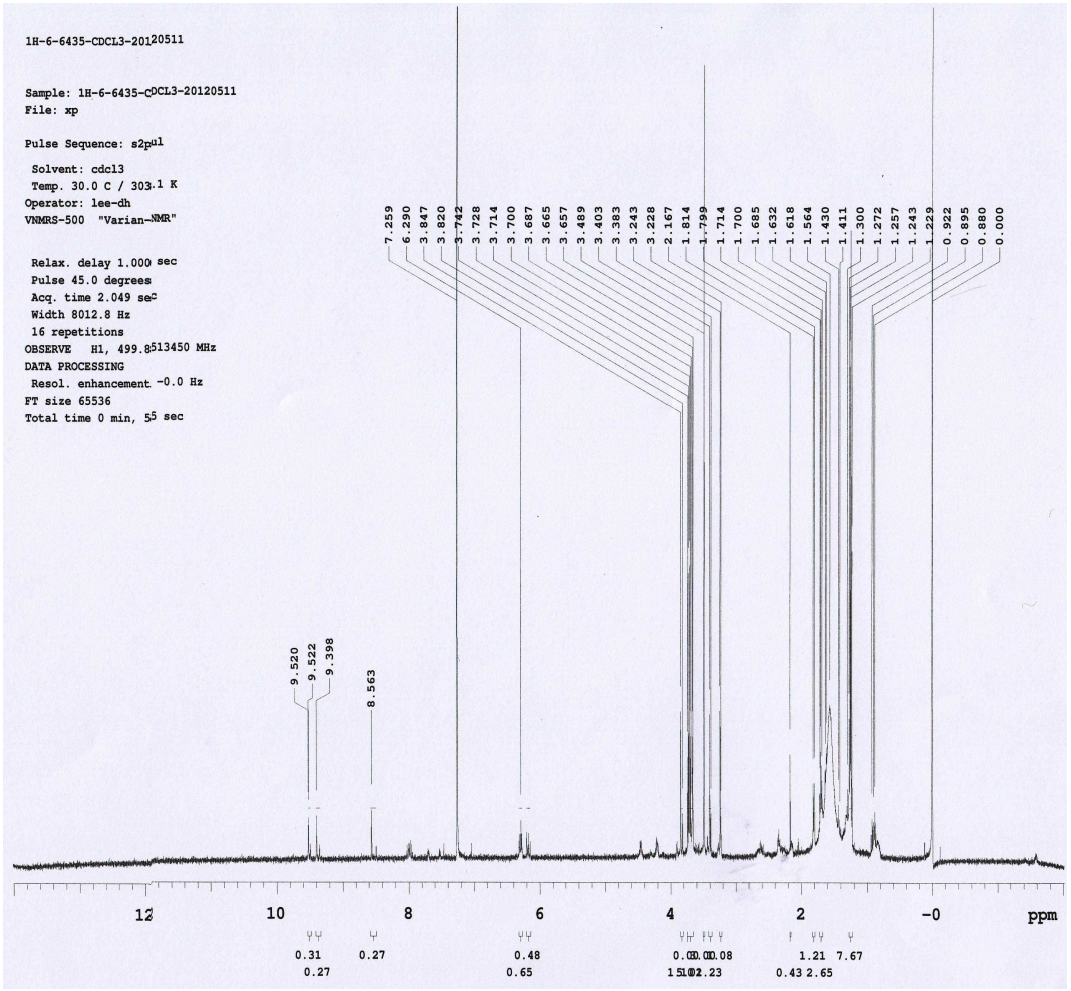

A
% of control
con-
AG
100
70
50
25
DW
CFE (1 mg/mL)
EtOH (%)
B
% of control
control
AG
CFE
CFEH
CFEC
CFEE
CFEB
CFED
(1 mg/mL)
C
% of control
control
AG
CHCl3
DW
M25
M50
M75
M100
EA25
MeOH(%)
Etyl acetate(%)
D
% of control
Control
AG
CFE
S.F.1
S.F.2
S.F.3
(1 mg/mL)

도면6

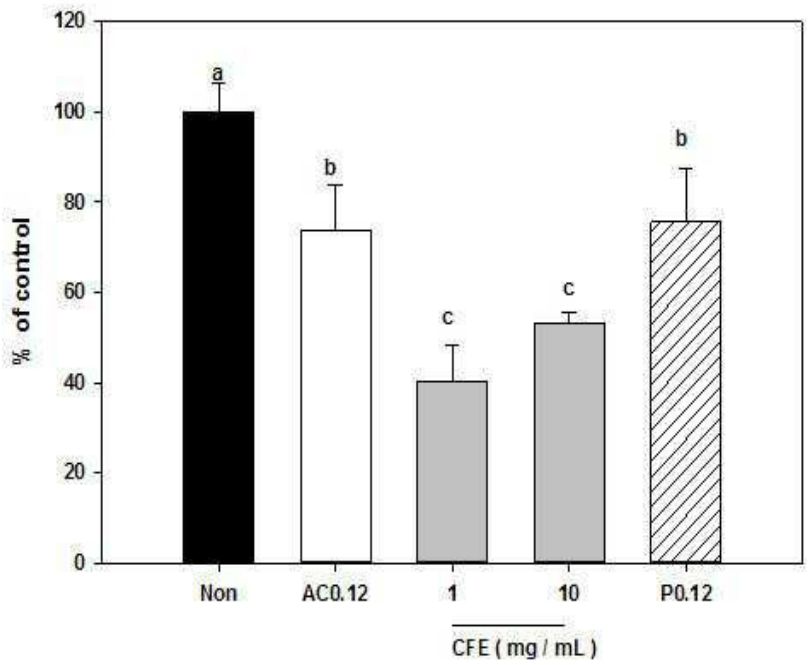

maesang01 #1469 RT: 22.27 AV: 1 SB: 68 8.87-9.34 , 9.74-10.30 NL: 3.92E8
T: FTMS + cESI Full ms [100.00-1000.00]
593.27789
577.52189
615.25928
694.39838
209.31750
343.34074
393.29950
461.18082
533.22797
595.28351
590.16376
572.07373
584.98492
597.28955
604.38495
Relative Abundance
m/z

Mass: 593.27783
Max. results 10
Calculate
Idx
Formula
RDB
Delta ppm
1
C37 H37 O2 N4 24Mg1
21.5
2.835

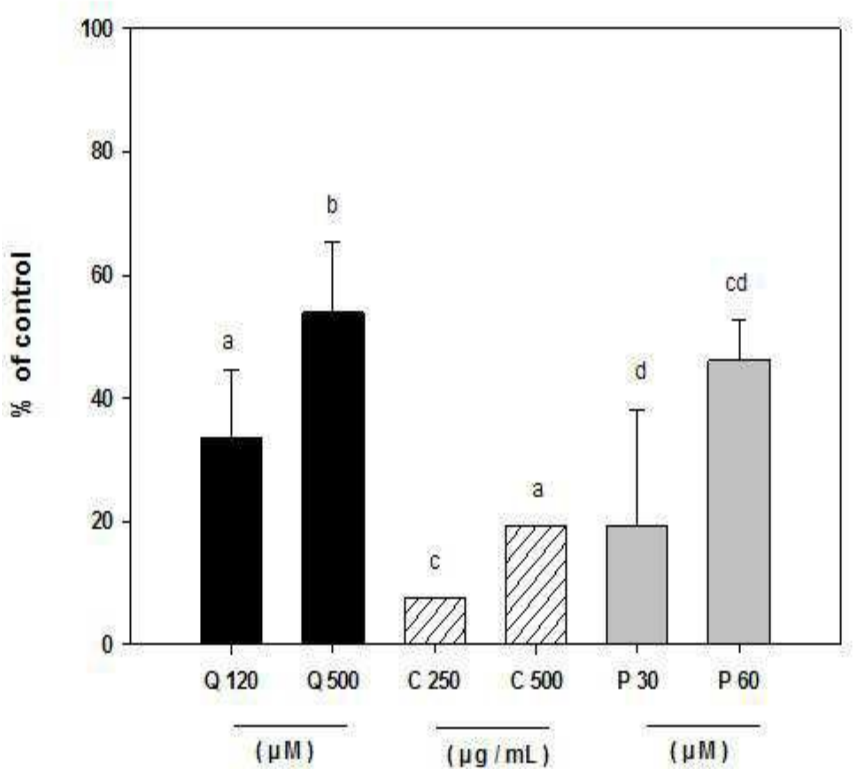
도면7


1H-6-6435-CDCL3-20120511
Sample: 1H-6-6435-CDCL3-20120511
File: xp
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cdcl3
Temp. 30.0 C / 303.1 K
Operator: lee-dh
VNMRS-500 "Varian-NMR"
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.049 sec
Width 8012.8 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 499.8513450 MHz
DATA PROCESSING
Resol. enhancement -0.0 Hz
FT size 65536
Total time 0 min, 55 sec
7.259
6.290
3.847
3.820
3.742
3.728
3.714
3.700
3.687
3.665
3.657
3.489
3.403
3.383
3.243
3.228
2.167
1.814
1.799
1.714
1.700
1.685
1.632
1.618
1.564
1.430
1.411
1.300
1.272
1.257
1.243
1.229
0.922
0.895
0.880
0.000
9.520
9.522
9.398
8.563
12
10
8
6
4
2
-0
ppm
0.31
0.27
0.27
0.48
0.65
1.21
7.67
2.65

도면8


120
100
80
60
40
20
0
% of control
a
b
c
c
b
Non
AC0.12
1
10
P0.12
CFE (mg / mL)

도면9


100
80
60
40
20
0
% of control
a
b
c
a
d
cd
Q 120
Q 500
C 250
C 500
P 30
P 60
(μM)
(μg / mL)
(μM)