(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0084439
(43) 공개일자 2009년08월05일

(51) Int. Cl.
A61K 31/35 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61K 36/489 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0010638
(22) 출원일자 2008년02월01일
심사청구일자 2008년02월01일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
최재수
부산 해운대구 좌동 화목아파트 105-1502
윤나영
부산 수영구 광안2동 172-1 삼정그린코아 아파트 101-805
정현아
부산 남구 대연동 6-5 레이듐 오피스텔 604호
(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 프레닐레이티드플라보노이드 화합물을 함유한 당뇨성 합병증의 예방 또는치료용 조성물

(57) 요 약

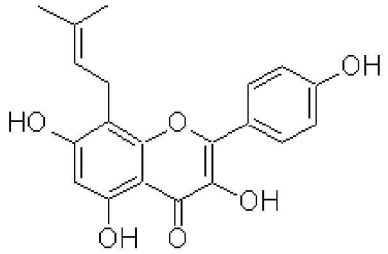
본 발명은 고삼 (*Sophora flavescens*) 추출물 또는 이로부터 분리한 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids) 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 프레닐레이티드 플라보노이드 화합물은 랫드 렌즈 알도즈 환원효소 (rat lens aldose reductase), 휴먼 재조합 알도즈 환원효소 (recombinant human aldose reductase) 및 최종당화산물 (Advanced Glycation Endproducts, AGEs) 생성 활성을 급격히 억제시켜 당뇨성 합병증의 예방 및 치료를 위한 약학조성물 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

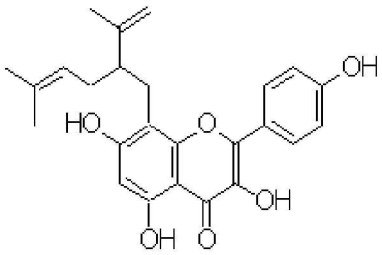
고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 하기 구조식 **(1)** 내지 **(14)**로 표기되는 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨성 합병증의 예방 및 치료용 약학조성물:

데스메틸안하이드로이카리틴 (desmethylanhydroicaritin)



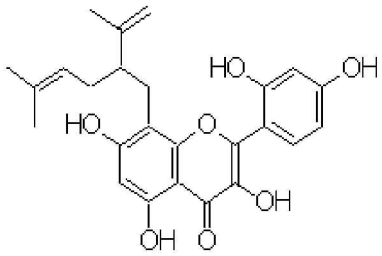
(1)

8-C-라반주릴캠프페롤 (8-C-lavandulylkaempferol)



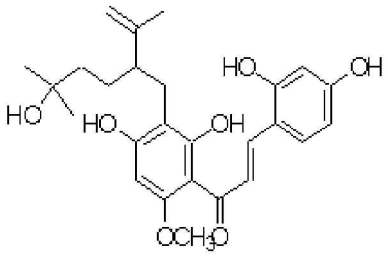
(2)

쿠세놀 C (Kushenol C)



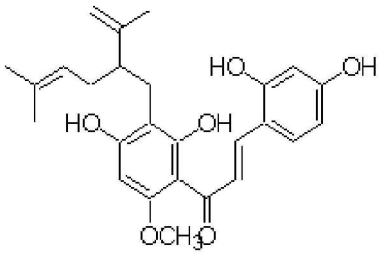
(3)

쿠라리디놀 (Kuraridinol)



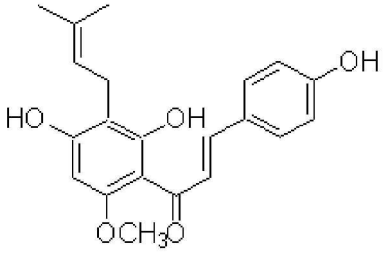
(4)

쿠라리딘 (Kuraridin)



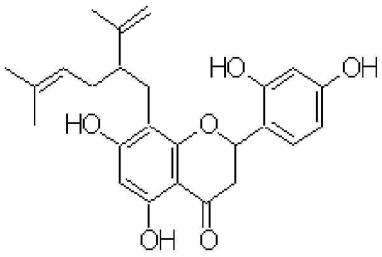
(5)

잔소후몰 (Xanthohumol)



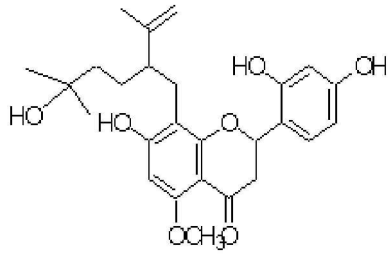
(6)

소포라플라바논 G (Sophoraflavanone G)



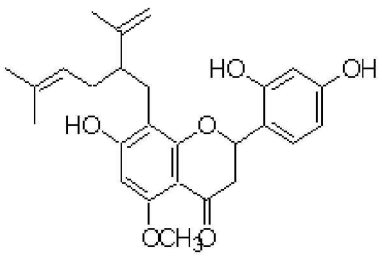
(7)

쿠라리놀 (Kurarinol)



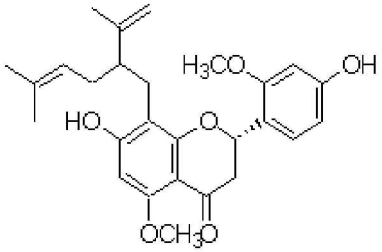
(8)

쿠라리논 (Kurarinone)



(9)

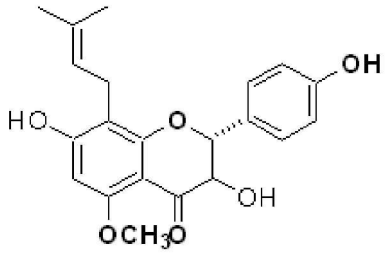
(2S)-2'-메톡시쿠라리논 [(2*S*)-2'-Methoxykurarinone]



(10)

(2S)-3,7,4'-트리하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논

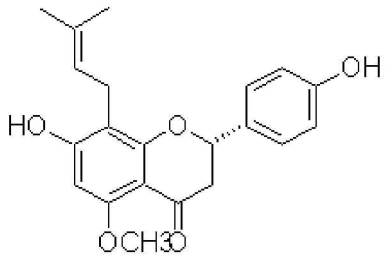
[(2*S*)-3,7,4'-Trihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone]



(11)

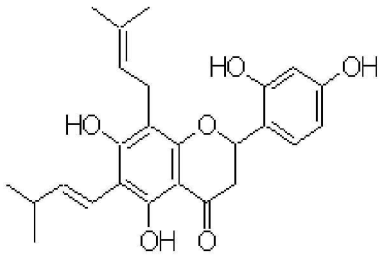
(2S)-7,4'-디하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논

[(2S)-7,4'-Dihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone]



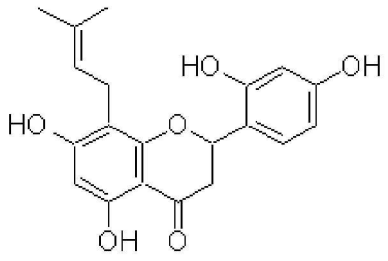
(12)

쿠세놀 E (Kushenol E)



(13)

리아키아논 G (Leachianone G)



(14)

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 조추출물 또는 비극성용매 가용 추출물임을 특징으로 하는

약학조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올과 같은 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물인 약학 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 비극성용매 가용 추출물은 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트에 가용 추출물을 포함하는 약학조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 3,5,7-트리히드록시-2-(4''-히드록시-페닐)-8-3'''-메틸-부-2''-에닐)-chromen-4-one(1), 3,5,7-트리히드록시-2-(4''-히드록시-페닐)-8-(2''-이소프레닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-크로멘-4-온(2), 2-(2',4''-디히드록시-페닐)-3,5,7-트리히드록시-8-(2''-이소프레닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-크로멘-4-온(3), 1-{2,4-디히드록시-3-[2''-(3'''-히드록시-3'''-메틸-부틸)-3''-메틸-부-3''-에닐]-6-메톡시-페닐-3''''-(2'''',4''''-디히드록시-페닐)-2-히드록세-프로페논 (4), 1-[2,4-디히드록시-3-(2''-이소프레닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-6-메톡시-페닐]-3''''-(2'''',4''''-디히드록시-페닐-2-히드록시-프로페논 (5), 1-[2,4-디히드록시-6-메톡시-3-(3'-메틸-부-2'-에닐)-페닐]-3''-(4'''-히드록시-페닐-프로페논 (6), 2-(2',4'-디히드록시-페닐)-5,7-디히드록시-8-(2''-이소프로페닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-크로멘-4-온 (7), 2-(2',4'-디히드록시-페닐)-7-히드록시-8-[2''-(3'''-히드록시-3'''-메틸-부틸-3''-메틸-3''-에닐]-5-메톡시-크로멘-4-온 (8), 2-(2',4'-디히드록시-페닐)-7-히드록시-8-(2''-이소프레닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-5-메톡시-크로멘-4-온 (9), 7-히드록시-2S-(4'-히드록시-2'-메톡시-페닐)-8-(2''-이소프레닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-5-메톡시-크로멘-4-온 (10), 3,7-디히드록시-2S-(4'-디히드록시-페닐)-5-메톡시-8-(3''-메틸-부-2''-에닐)-크로멘-4-온 (11), 7-히드록시-2S-(4'-히드록시-페닐)-5-메톡시-8-(3''-메틸-부-2''-에닐)-크로멘-4-온 (12), 2-(2',4'-디히드록시-페닐)-5,7-디히드록시-8-(3''-메틸-부-2''-에닐)-6-(3'''-메틸-부-1'''-에닐)-크로멘-4-온 (13) 또는 2-(2',4'-디히드록시-페닐)-5,7-디히드록시-8-(3''-메틸-부-2''-에닐)-크로멘-4-온 (14)로부터 선택되는 화합물을 포함하는 약학조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 당뇨성 합병증 질환으로는 동맥경화증, 고혈압, 뇌혈관경색증, 뇌졸중, 심근경색, 협심증, 신장병, 신경장애, 당뇨병성 망막증, 백내장 또는 녹내장인 약학조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 고삼 추출물은 고삼의 뿌리, 줄기 또는 잎으로부터 추출됨을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 프레닐레이티드 플라보노이드 화합물은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 50% 중량으로 포함됨을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 9

고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 제 1항의 구조식 (1) 내지 (14)로 표기되는 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨성 합병증의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제 9항에 있어서, 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제인 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids) 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨성 합병증의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> [문헌 1] Seaquist E. R. *et al.*, *New Eng. J. Haematol.*, 320, pp1161-1165, 1989

<3> [문헌 2] Sato Y. and Rifkin D. B., *J. Cell. Biol.*, 109, pp309-315, 1989

<4> [문헌 3] Williamson J. R. *et al.*, *Diabetes*, 42, pp801-813, 1993

<5> [문헌 4] Greene D. A. *et al.*, *New Eng. J. Med.*, 316, pp599-606, 1987

<6> [문헌 5] Gabbay K. H. and O'Sullivan J. B., *Diabetes*, 17, pp239, 1968

<7> [문헌 6] Dvornik D. *et al.*, *Science*, 182, pp1146, 1973

<8> [문헌 7] Collins J. G. and Corder C. N., *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 16, pp242, 1977

<9> [문헌 8] Collins J. G. and Corder C. N., *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 16, pp242, 1977

<10> [문헌 9] Dvornik D. *et al.*, *Science*, 182, pp1146, 1973

<11> [문헌 10] Heath H. and Hamlett Y. C., *Diabetologia*, 12, pp43, 1976

<12> [문헌 11] Collins J. G. and Corder C. N., *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 16, pp242, 1977

<13> [문헌 12] Gabbay K. H. and O'Sullivan J. B., *Diabetes*, 17, pp239, 1968

<14> [문헌 13] Dvornik D. *et al.*, *Science*, 182, pp1146, 1973

<15> [문헌 14] Okuda J. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, pp2990, 1985

<16> [문헌 15] Varma S. D. and Kinoshit J. H., *Biochem. Pharmacol.*, 25, pp2505, 1976

<17> [문헌 16] Parmar N. S. and Ghosh M. N., *Exp. Eye. Res.*, 29, pp229, 1979

<18> [문헌 17] Shin K. H. *et al.*, *Kor. J. Pharmacogn.*, 25, pp41, 1994

<19> [문헌 18] Aida K. *et al.*, *Planta Med.*, 53, pp121, 1987

<20> [문헌 19] Aida K. *et al.*, *Planta Med.*, 56, pp254, 1989

<21> [문헌 20] McCance D. R. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 91, pp2470-2478, 1993

<22> [문헌 21] Frye E. B. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273, pp18714-18716, 1998

<23> [문헌 22] Al-Abed Y. and Bucala R., *Bioconjugate Chem.*, 11, pp39-45, 2000

<24> [문헌 23] Smith M. A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, pp5710-5714, 1994

<25> [문헌 24] Reddy S. *et al.*, *Biochemistry*, 34, pp10872-10878, 1995

<26> [문헌 25] Dyer D. G. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 91, pp2463-2469, 1993

<27> [문헌 26] Vlassara H. and Dalace M. R., *J. Intern. Med.*, 251, pp87-101, 2002

<28> [문헌 27] Baynes J. W., *Diabates*, 40, pp405-412, 1991

<29> [문헌 28] Turk Z. *et al.*, *Clin. Chim. Acta.*, 303, pp105-115, 2001

<30> [문헌 29] Vlassara H., *Annal. Med.*, 28, pp419-426, 1996

<31> [문헌 30] Hata F. *et al.*, *Diabates Res. Clin.*, 5, pp5413, 1988

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<32> 당뇨병은 대표적인 만성 성인병의 하나로, 우리나라의 당뇨병 환자는 전체 인구의 약 5% 정도로 최소한 250만 명으로 추정되고 있다. 선진국의 경우에 당뇨병 환자 수가 매년 급증하고 있으며, 우리나라도 생활수준의 향상과 더불어 생활양식이 서구화되면서 점차로 환자의 수가 증가되고 있다. 폴리펩티드성 호르몬인 인슐린은 췌장에 있는 랑게르한스섬의 베타세포에서 만들어지며, 체내의 대부분의 세포에서 포도당을 사용하는데 필요로 한다. 당뇨병은 인슐린의 부족으로 인해 (인슐린의 절대량이 부족한 것은 아니며, 인슐린 이외의 다른 호르몬이 많이 분비되어 상대적으로 부족한 것을 의미) 체세포들이 포도당을 정상적으로 사용할 수 있는 능력에 장애가 생겨 혈당치가 증가하여, 과량의 당분이 소변으로 배설되는 대사성 질환이다. 췌장 호르몬인 인슐린은 뇌하수체, 부신, 갑상선 등 인슐린에 대항작용을 하는 호르몬으로 체내에서 균형이 이루어졌을 때, 혈당이 정상적으로 유지되도록 한다. 그러나 인슐린의 분비량이 부족하거나 인슐린 분비량은 거의 정상이나 대항 호르몬이 상대적으로 많아 인슐린 부족이 일어날 때 당뇨병이 발병하게 된다. 당뇨병은 크게 두 개로 나눌 수 있는데, 인슐린 의존형 당뇨병 (Type I. Insulin dependent diabetes mellitus, IDDM)은 당뇨병 환자의 약 10%를 차지하며, 대개 20세 이하의 어린 연령층에 발병하므로 유전성인 것으로 보이며, 일명 소아당뇨병 (juvenile onset diavetes)이라고 한다. 이는 특정한 human lymphocyte antigen (HLA)과 바이러스 감염 등으로 랑겔한스섬의 베타세포가 파괴되어 인슐린의 분비가 되지 않아 발병하는 당뇨병으로, 일반적으로 체중이 감소하고 케톤증(Ketonacidosis)이 되기 쉽다. 인슐린 투여로 치료가 가능하고 급성 형태가 많으며, 여아에게 발생빈도가 높고 성인보다 어린이에게 주로 나타난다. 인슐린 비의존형 당뇨병 (Type II. Noninsulin dependent diabetes mellitus NIDDM)은 40세 이후에 발병하는 성인형 당뇨병 (adult onset diabetes)이라고도 하며, 운동부족과 비만, 과식, 스트레스 등으로 인하여 근육이나 지방조직 등 말초조직에서 인슐린에 대한 감수성이 둔화되어 당대사의 장애가 4~5년 이상 오랜 기간 지속되어 발병하게 된다. 제 2형 당뇨병은 식사요법과 운동요법으로 체중을 줄이면 50~80%는 치유가 되며, 인슐린을 투여하지 않아도 생명에는 지장이 없을 정도이므로 인슐린 비의존형 당뇨병이라고 한다. 이 외에 영양실조 관련 당뇨병 (제 3형 당뇨병)이 있으며, 이것은 제 3세계, 특히 열대지방에서 나타나는 젊은이 당뇨병으로 유아기에 영양실조의 병력을 가진 경우에 나타나는 당뇨병으로, 앞서 두 형태의 당뇨병과 약간 다른 모습을 보여, 세계보건기구는 이를 독립된 형으로 분리하였다.

<33> 당뇨병은 그 자체보다는 합병증이 더 위험하기 때문에, 오늘날 당뇨병 치료에 있어서 가장 큰 목표는 당뇨성 합병증의 유발이나 진행을 억제하는데 있다. 합병증은 당뇨병이 오래 지속되어 나타나는 현상으로 보통 10~15년을 경과한 후에 생기는 만성 합병증이 주이며, 그 대표적인 만성 합병증으로 당뇨성 망막증, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경증 등이 있다. 당뇨성 신경증은 당뇨병으로 인해 신경계에 장애가 오는 것으로 말초신경의 장애, 건반사의 소실, 운동신경의 마비, 자율신경 장애 등으로 발바닥이 저릿저릿하고, 화끈거리고, 통증이 심하며, 성기능의 장애가 오고, 뇨나 대변을 가리지 못하는 증상을 가져오기도 한다. 당뇨성 신증은 미세혈관 합병증의 하나로 신 사구체 모세혈관의 경화성 병변에 의해 일어나는 것으로 특별한 증상이 없어도 소변검사를 통해 단백질이 나타나면 신증이 있음을 예측할 수 있다. 혈압의 상승은 당뇨병 신증을 악화시키는 요인으로도 작용하는데 보통 10~15년 이상 당뇨병을 앓은 사람들의 약 5% 정도가 당뇨성 신증이 온다. 당뇨성 망막증은 미세혈관의 합병증 중의 하나로 당뇨병 환자에게 실명을 가져오는 심각한 합병증이다. 최근에 당뇨병 조절과 합병증과의 관계연구에 의하면 인슐린 치료를 강화시켜 혈당이 정상화되면 당뇨병 합병증 발생을 크게 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다 (Seaquist E. R. *et al.*, *New Eng. J. Haematol.*, 320, pp1161-1165, 1989).

<34> 당뇨병에 있어서 고혈당이 합병증을 유발시키는 기전으로 polyol pathway의 이상 (Sato Y. and Rifkin D. B., *J. Cell. Biol.*, 109, pp309-315, 1989), 체내에서 고혈당과 단백질의 결합, 산화적 스트레스 (Williamson J. R. *et al.*, *Diabetes*, 42, pp801-813, 1993), myoinositol의 감소와 Na^+, K^+-ATPase활성의 감소 (Greene D. A. *et al.*, *New Eng. J. Med.*, 316, pp599-606, 1987) 등이 발표되었다. 그 중 polyol pathway는 포도당 대사경로의 하나로, 이는 포도당이 솔비톨을 거쳐 과당으로 변환되는 경로로 두 개의 반응계로 구성되며, 2종의 효소가 관여한다 (Gabbay K. H. and O'Sullivan J. B., *Diabetes*, 17, pp239, 1968; Dvornik D. *et al.*, *Science*, 182, pp1146, 1973). 포도당은 에너지원으로 이용되는 중요한 물질로서 정상인의 경우 세포내에 흡수된 후에 대부분은 헥소키나아제에 의하여 글루코오스-6-포스페이트로 되어 해당계에서 대사되고, 불과 몇 % 만이 polyol pathway를 거쳐 대사된다 (Collins J. G. and Corder C. N., *Invest. Ophthalmol. Visual*

Sci., 16, pp242, 1977). 그러나 당뇨병에 의해 고혈당 상태가 되면 세포내의 포도당 흡수가 인슐린에 의존하지 않는 조직에서 포도당의 세포막 투과는 세포 밖의 포도당 농도에 의존하므로 수정체, 망막, 각막, 말초신경, 혈관, 신사구체, 적혈구 등과 같은 인슐린 비의존성 조직의 세포내 포도당 농도는 상승하게 되고, 이들 세포내에 다량 존재하는 polyol pathway의 필수효소인 알도즈 환원효소에 의하여 포도당의 대사가 항진되어 솔비톨이 과잉생성 된다 (Collins J. G. and Corder C. N., *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 16, pp242, 1977; Dvornik D. *et al.*, *Science*, 182, pp1146, 1973). 그 결과 솔비톨이 축적되는 부위에 따라 발병 증상이 나타나는데, 당뇨성 백내장, 당뇨성 망막증, 당뇨성 각막증, 당뇨성 신경증, 당뇨성 신증 등의 당뇨병 합병증을 일으키게 된다 (Heath H. and Hamlett Y. C., *Diabetologia*, 12, pp43, 1976). 알도즈 환원효소를 촉매하는 포도당이 솔비톨로 되는 환원반응은 그 평형에서 역반응이 일어나지 않으며, sorbitol dehydrogenase의 활성이 알도즈 환원효소의 활성보다 낮기 때문에 솔비톨에서 과당으로의 변환량이 아주 적으므로 결과적으로 polyol pathway의 항진은 솔비톨을 축적시키게 된다 (Collins J. G. and Corder C. N., *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 16, pp242, 1977). 당알콜인 솔비톨은 극성이 높아 세포막 외로 확산이 어렵기 때문에 솔비톨이 세포내에 축적되며, 이로 인해 세포내 삼투압을 상승시켜, 수정체내로 수분유입을 촉진하여 세포의 팽화를 일으킨다 (Gabbay K. H. and O'Sullivan J. B., *Diabetes*, 17, pp239, 1968; Dvornik D. *et al.*, *Science*, 182, pp1146, 1973). 이 팽화는 수정체 섬유세포의 투과성을 항진시키고, Na^+, Cl의 유입과 K^+, 아미노산, 펩티드, ATP, 미오-이노시톨 (myo-inositol) 등의 유출을 일으킨다. Na^+이나 K^+ 등의 전해질의 평형파괴에 의해 삼투압이 더 증가하게 되고, 세포의 팽화를 촉진하여 세포막은 정상을 유지할 수 없게 된다. 그와 동시에 세포내 단백질 변성이 증가되어 수정체가 혼탁하게 되는데, 이와 같이 수정체가 혼탁해져 나타나는 백내장 증상을 당뇨성 합병증 진행과정의 한 지표로 사용한다. 따라서 솔비톨을 생성하는 효소인 알도즈 환원효소를 억제하게 되면, 솔비톨의 생성을 억제하는 물질이 당뇨성 백내장의 발병을 억제하는 것이 가능하다고 알려져 있다. 실제로, 많은 보고에 의하면, *in vitro* 실험에서 알도즈 환원효소를 억제하는 성분이 당뇨성 백내장의 실험동물 모델인 갈락토오스혈증 흰쥐 (galactosemic rats)에서 백내장의 형성을 억제하는 것으로 밝혀졌다. Okuda 등 (Okuda J. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, pp2990, 1985)은 알도즈 환원효소에 대한 억제활성을 가지는 1-[(p-bromo-phenyl)-sulfonyl] hydantoin이 갈락토오스혈증 흰쥐에서 백내장 형성을 억제하는 것을 보고하였고, 알도즈 환원효소 억제활성을 가지는 플라보노이드 성분이 당뇨성 백내장 생성억제와 관련성이 있다는 보고도 있다 (Varma S. D. and Kinoshit J. H., *Biochem. Pharmacol.*, 25, pp2505, 1976; Parmar N. S. and Ghosh M. N., *Exp. Eye. Res.*, 29, pp229, 1979). 또한, Shin 등 (Shin K. H. *et al.*, *Kor. J. Pharmacogn.*, 25, pp41, 1994)은 흰쥐 수정체로부터 제조한 알도즈 환원효소를 이용한 실험에서 황금에 함유된 플라보노이드 성분이 이 효소의 활성을 억제하며 동시에 갈락토오스혈증 흰쥐의 백내장 형성을 억제하는 것으로 보고하였으며, Aida 등 (Aida K. *et al.*, *Planta Med.*, 53, pp121, 1987)은 오랫동안 일본에서 당뇨성 신경증 치료에 사용되었던 한방약에 대하여 이들 추출물이 *in vitro* 실험에서 알도즈 환원효소의 활성을 억제함을 보고하였고, 그 성분인 이소리퀴리티게닌 (iso-liquiritigenin)이 알도즈 환원효소에 대한 강력한 억제활성을 가짐을 보고하였다 (Aida K. *et al.*, *Planta Med.*, 56, pp254, 1989).

<35> 당뇨병에서 합병증을 유발시키는 기전으로 polyol pathway의 이상 이외에 혈중의 과량의 당과 단백질과의 결합에 의한 단백질 당화 (glycation)가 있다. 단백질의 당화는 단백질의 아미노기와 당의 카르보닐기 사이의 반응에 의해 초기화되고, 가역적인 쉬프베이스 (Schiff base)를 생성한다. 이 반응은 수 시간에 걸쳐서 이루어지며, 불안정한 구조로 형성된 쉬프베이스는 더 안정한 구조인 케토아민 (ketoamine) 혹은 아마도리 생성물 (Amadori Products)로 재배열하게 된다. 아마도리 생성물의 형성은 수일간에 걸쳐서 생성되며, 생성물은 비가역적이다. 당이 결합된 단백질은 더 많은 결합을 하여 3-deoxyglucosones (3-DG)와 같은 다이카보닐(dicarbonyl) 중간 생성물을 형성하고, 이를 최종당화산물 (Advanced Glycation Endproducts, AGEs)이라 부른다. 생성된 최종당화산물은 복합체로서 단백질과 교차결합을 하고, 갈변화와 형광을 생성한다. 수많은 최종당화산물은 조직에서 검출되는데 크게 세 가지로 분류될 수 있다.

<36> 첫째, 형광성을 띠며, 교차결합된 최종당화산물로 펜토시딘 (pentosidine)과 크로스린 (crossline)이 있다. 펜토시딘은 라이신 (lysine)과 아르기닌 (arginine) 잔기 사이에 교차결합을 형성하고, 당뇨가 유발되면 그 농도는 증가한다 (McCance D. R. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 91, pp2470-2478, 1993). 크로스린 (crossline)은 당뇨 쥐의 신장에서 처음으로 발견되었으며, *in vitro*와 *in vivo*에서 형성 될 수 있다.

<37> 둘째, 비형광성이며, 교차결합된 최종당화산물로 imidazolium dilysine과 교차결합된 것과 AFGP (alkyl formyl glycosyl pyrrole) 교차결합된 것, 그리고 ALI (arginine-lysine imidazole)이 교차결합된 것이 있다. Imidazolium dilysine이 교차결합된 것은 GOLD (glyoxal lysine dimer) 또는 MOLD (methylglyoxal

lysine dimer)로 알려져 있으며, 글리옥살 (glyoxal) 유도체와 라이신 잔기 사이의 반응에 의해 형성된다 (Frye E. B. *et al., J. Biol. Chem.*, 273, pp18714-18716, 1998). ALI는 내부세포와 교차결합 한다 (Al-Abed Y. and Bucala R., *Bioconjugate Chem.*, 11, pp39-45, 2000).

<38> 세 번째, 교차결합이 없는 최종당화산물로 피랄린 (pyrraline)과 CML (*N*-carboxy methyllysine)이 있다. 피랄린은 교차결합이 없는 최종당화산물이며, 인간의 피부, 혈장, 뇌의 플라크(plaque)에서 발견되며 (Smith M. A. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, pp5710-5714, 1994), CML은 단백질 존재하에 다중불포화 지방산의 금속촉매에 의한 산화과정에서 아마도리 생성물의 산화적 분해에 의해 생성된다 (Reddy S. *et al., Biochemistry,* 34, pp10872-10878, 1995). 그것은 최종당화산물의 주성분 중 하나이며, 그것의 농도는 당뇨병 환자 피부의 콜라겐에서 정상인 경우보다 두 배 증가하였다 (Dyer D. G. *et al., J. Clin. Invest.*, 91, pp2463-2469, 1993). 당뇨 합병증 발병에서 최종당화산물의 다른 작용은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 예를 들어 혈청에서 CML의 농도는 망막증이 있는 당뇨병 환자의 경우 증가하나 신증을 가진 환자에서는 증가하지 않았다. 그러나 펜토시딘의 농도는 두 개의 군에서 모두 증가하는 것으로 나타났다.

<39> 증가된 당화와 축적된 조직 최종당화산물은 효소의 활성을 변화시키고, 리간드 결합을 감소시키며, 면역성을 변화시킬 수 있기 때문에 당뇨 합병증과 관련이 있다 (Vlassara H. and Dalace M. R., *J. Intern. Med.*, 251, pp87-101, 2002). 최근 연구에서 당뇨병 환자에서 ACE-면역 복합체를 형성하는 혈청 최종당화산물의 작용에 대한 자동 항체가 존재함을 보고하였고, 그것은 아테롬성동백경화증에 중요한 역할을 한다. 당화로 유도된 자유라디칼은 단백질 분해와 핵산과 지질에 산화를 일으킬 수 있다 (Baynes J. W., *Diabates*, 40, pp405-412, 1991; Turk Z. *et al., Clin. Chim. Acta.,* 303, pp105-115, 2001). 또한 최종당화산물은 인지질에서도 형성될 수 있는데, 포스파티딜에탄올아민 (phosphatidylethanolamine)과 포스파티딜세린(phosphatidylserine) 잔기와 같은 인지질에서 포도당과 아미노산 사이에 직접적인 반응에 의해서 지질 과산화를 유도할 수 있다 (Vlassara H., *Annal. Med.*, 28, pp419-426, 1996).

<40> 체내에는 3-DG를 불활성화 시키고, 최종당화산물의 생성을 억제하는 α-ketogluteraldehyde dehydrogenase와 같은 효소가 간에 존재하여 당화와 최종당화산물의 생성에 대한 체내를 보호할 수 있는 기전을 가지고 있으며 (Hata F. *et al., Diabates Res. Clin.,* 5, pp5413, 1988), 항산화제는 당화로 유도된 자유라디칼에 대해 생체를 방어할 수 있는 기능을 가지고 있다. 그러나 *in vivo*에서 당화와 최종당화산물에 대한 자연적 방어의 효능은 아직 잘 알려져 있지 않다.

<41> 당뇨병 환자에서 치료의 목적은 식이 조절에 의해 고혈당증을 감소시키는 것이다. 그러나 식이 조절은 어렵기 때문에 약리학적인 효과를 가진 화합물을 사용하여 고혈당을 저하시키고, 고혈당으로 인한 최종당화산물 생성을 감소시킬 수 있다. 많은 화합물들이 항당화 활성에 대해 연구되고 있으며, 알려진 당화 생성 억제제로는 아스피린 (aspirin), 아미노구아니딘 (aminoguanidine), PTB (phenacylthiazolium bromide)와 항산화제 등이 있다. 당뇨병 환자의 경우 당화와 최종당화산물의 생성은 자연적으로 발생하기 때문에 이것을 억제하는 억제제는 긴 반감기를 가져야 하고, 장기간 투여 했을 때 독성을 나타내지 않아야 한다.

<42> 고삼 (*Sophora flavascens*)은 콩과 (Leguminosae)의 다년생 초본으로서 주피를 벗긴 뿌리로 한방에서는 이뇨, 이질, 해열과 위출혈 등에 쓰이는 생약제이며, 한국, 중국, 일본, 시베리아 등지에서 자생한다. 임상학적으로 습진, 피부 화농증, 여성의 음부소양 등의 피부병에 대하여 외용하였다 (신민교, 임상본초학, 남산당, 1986). 고삼 성분으로는 quinolizidine alkaloids와 prenylated flavonoids 그리고 triterpenoid saponins 등을 함유하고 있으며 (Ding Y. *et al., Chem. Pharm Bull.*, 40, pp2990-2994, 1992; Kyogku K. *et al., Chem. Pharm. Bull.*, 21, pp2733-2738, 1973; Ryu S. H. *et al., Phytotheraphy Res.*, 11, pp51-53, 1997; Wu L. J. *et al., Yakugaku Zasshi*, 105, pp1034-1039, 1985; Yagi A. *et al., Shoyakugaku Zasshi*, 43, pp343-347, 1989), 이들 성분은 항당뇨 활성 (Kim J. H. *et al., Biol. Pharm. Bull.*, 29, pp302-305, 2006; Jung C. H. *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 70, pp2556-2559, 2006), anti-apoptosis 활성 (Jiang *et al., Eur. J. Pharmacol.*, 559, pp98-108, 2007), 항균 활성 (Chen H. *et al., J. Clin. Microbiol.*, 43, pp3574-3575, 2005), 항염증 활성 (Kim D. W. *et al., Arch. Pharm. Res.*, *25*, pp329-335, 2002), 항산화 활성 (Jung H. J. *et al., Arch. Pharm. Res.,* 28, pp1333-1336, 2005a; Jung H. J. *et al., Arch. Pharm. Res.*, 28, pp534-540, 2005b; Piao X. L. *et al., Biol. Pharm. Bull.*, 29, pp1911-1915, 2006), 항 바이러스 활성 (Ding P. L. *et al., Bioorg. Med. Chem. Lett.,* 16, pp1231-1235, 2006), 세포독성 효과 (Ko W. G. *et al.*, 14, pp429-433, 2000; Kang T. H. *et al., J. Nat. Prod.*, 63, pp680-681, 2000) 등의 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이들 고삼 성분 중 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)는 항염증 활성 (Kim D. W. *et al., Arch. Pharm. Res.*, *25*, pp329-335, 2002), 항산화 활성 (Jung H. J. *et al., Arch. Pharm. Res.,*

28, pp1333-1336, 2005a; Jung H. J. *et al.*, *Arch. Pharm. Res.*, 28, pp534-540, 2005b; Piao X. L. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, pp1911-1915, 2006), 항당뇨 활성 (Kim J. H. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, pp302-305, 2006), MAO (monoamine oxidase) 억제활성 (Hwang J. S. *et al.*, *Arch. Pharm. Res.*, 28, pp190-194, 2005)과 세포독성 효과 (Ko W. G. *et al.*, 14, pp429-433, 2000; Kang T. H. *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 63, pp680-681, 2000) 등의 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다. 이들 플라보노이드 성분 중 소포라플라바논 G와 쿠라리논은 세포독성 활성 (Kang T. H. *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 63, pp680-681, 2000; De Naeyer A, *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 67, pp1829-1832, 2004), 라디칼 소거활성 (Piao X. L. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, pp1911-1915, 2006), 티로시나제 억제활성 (Son J. K. *et al.*, *Planta Med.*, 69, pp559-561, 2003; Kim S. J. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 26, pp1348-1350, 2003)과 글리코시다제 억제활성 (Kim J. H. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, pp302-305, 2006)이 알려져 있다. 또한, 쿠라리딘, 쿠라리논과 소포라플라바논 G는 COX (cyclooxygenases)와 지질산화효소 (lipoxygenases) 억제활성 (Kim D. W. *et al.*, *Arch. Pharm. Res.*, 25, pp329-335, 2002; Chi Y. S. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 62, pp1185-1191, 2001)이 알려져 있으며, 8-라반주릴캠프페롤은 라디칼 소거활성 (Jung H. J. *et al.*, *Arch. Pharm. Res.*, 28, pp1333-1336, 2005; Jung H. J. *et al.*, *Arch. Pharm. Res.*, 28, pp534-540, 2005)이 알려져 있다.

<43> 당뇨성 합병증의 병태는 다양하며, 고혈당에 의한 것으로서 말초신경장애, 망막증, 신증, 백내장, 각막증 등이 있으며, 그 기전으로 polyol pathway 이상과 혈중의 과량의 당과 단백질의 결합을 들 수 있다. Polyol pathway는 포도당 대사경로의 하나로 포도당은 알도즈 환원효소에 의하여 솔비톨로 전환된다. 정상상태에서의 알도즈 환원효소는 포도당에 대한 기질친화성이 매우 낮아 솔비톨을 거의 생성하지 않지만, 당뇨병 상태에서는 수정체, 말초신경, 망막과 같은 인슐린 비감수성의 조직에서의 포도당 농도가 상승하면 위의 경로에 의하여 대량의 솔비톨을 생성하게 되며, 이러한 각 조직에서의 솔비톨 축적이 당뇨성 백내장, 말초신경장애, 당뇨성 망막증 등의 원인으로 알려져 있다. 또한 당뇨병의 고혈당 상태에서 당의 카보닐기와 단백질의 아미노기가 결합하여 최종당화산물을 생성하게 되고, 이것은 체내에 축적되어 당뇨성 망막증, 신증, 백내장, 아테롬성동맥경화증과 같은 당뇨성 합병증을 유발하게 된다. 그리하여 백내장 등의 당뇨성 합병증 예방 및 치료제로서 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성 억제제가 주목을 받고 있으며, 이들 몇몇 억제제가 동물실험 및 임상시험에서 당뇨성 합병증을 개선함이 보고되는 등 합성물질 뿐만 아니라 천연물질로부터 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성 억제 성분을 규명하려는 활발한 연구가 이루어지고 있다. 그리하여 플라보노이드, 탄닌, 쿠마린, 정유 성분 등이 소나 흰쥐 또는 사람의 여러 조직으로부터 조제된 알도즈 환원효소 활성에 대한 억제 효과가 있음이 보고되었다. 그러나 지금까지 고삼 추출물의 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성 억제효과는 보고되지 않았으며, 또한 이에 의한 당뇨병과 그 합병증 치료 효과는 보고된 바가 없다. 따라서 본 발명자는 고삼에서 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성을 억제하여, 당뇨성 합병증을 예방 및 치료하는 새로운 추출물 및 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 화합물을 분리동정한 후, 그 억제효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

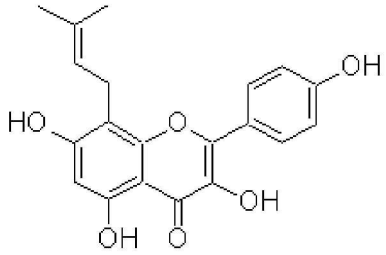
과제 해결수단

<44> 상기 목적을 달성하기 위하여, 고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 하기 구조식 **(1)** 내지 **(14)**로 표기되는 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨성 합병증의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

<45> 또한 본 발명은, 고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 하기 구조식 **(1)** 내지 **(14)**로 표기되는 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨성 합병증의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

화학식 1

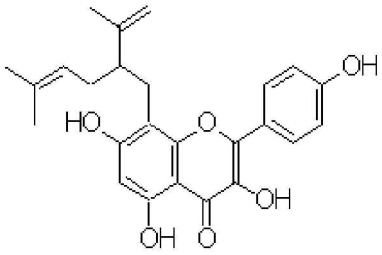
<46> 데스메틸안하이드로이카리틴 (desmethylanhydroicaritin)

<47> 

(1)

화학식 2

<48> 8-C-라반주릴캠프페롤 (8-C-lavandulylkaempferol)

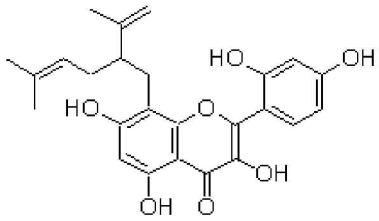
<49> 

(2)

<50>

화학식 3

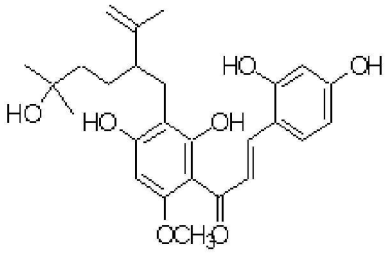
<51> 쿠세놀 C (Kushenol C)

<52> 

(3)

화학식 4

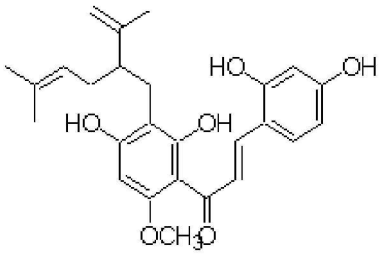
<53> 쿠라리디놀 (Kuraridinol)

<54> 

(4)

화학식 5

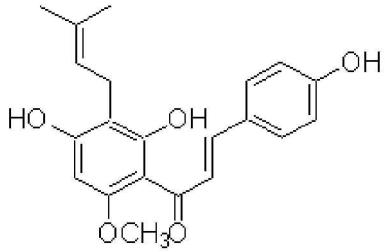
<55> 쿠라리딘 (Kuraridin)

<56> 

(5)

화학식 6

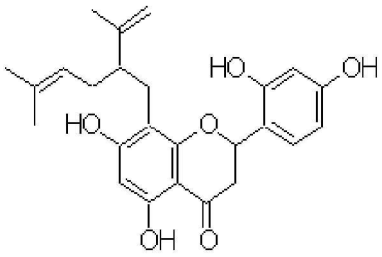
<57> 잔소후몰 (Xanthohumol)

<58> 

(6)

화학식 7

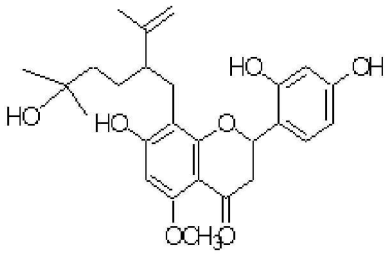
<59> 소포라플라바논 G (Sophoraflavanone G)

<60> 

(7)

화학식 8

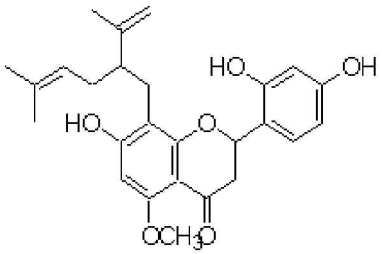
<61> 쿠라리놀 (Kurarinol)

<62> 

(8)

화학식 9

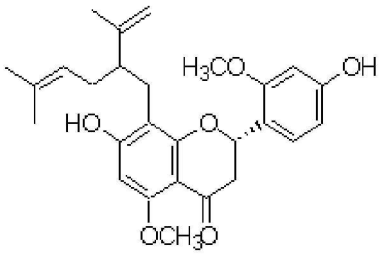
<63> 쿠라리논 (Kurarinone)

<64> 

(9)

화학식 10

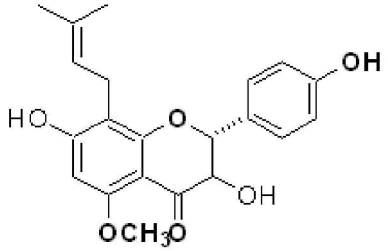
<65> (2S)-2'-메톡시쿠라리논 [(2*S*)-2'-Methoxykurarinone]

<66> 

(10)

화학식 11

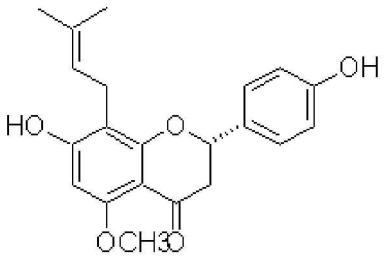
<67> (2S)-3,7,4'-트리하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논 [(2*S*)-3,7,4'-Trihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone]

<68> 

(11)

화학식 12

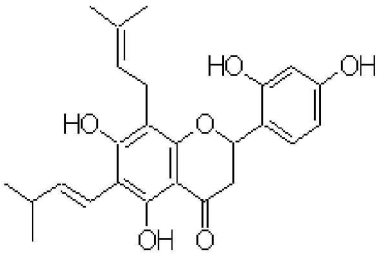
<69> (2S)-7,4'-디하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논- [(2S)-7,4'-Dihydroxy-5-methoxy-8-(γ,γ-dimethylallyl)-flavanone]

<70> 

(12)

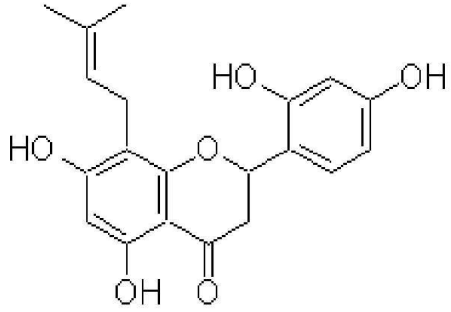
화학식 13

<71> 쿠세놀 E (Kushenol E)

<72>  (13)

화학식 14

<73> 리아키아논 G (Leachianone G)

<74>  (14)

<75> 본원에서 정의되는 상기 " 추출물 " 은 조추출물 또는 비극성용매 가용 추출물임을 특징으로 한다.

<76> 본원에서 정의되는 상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올과 같은 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 에탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

<77> 또한, 본원에서 정의되는 비극성용매 가용 추출물은 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트로부터 선택된 비극성 용매로, 바람직하게는 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트에 가용한 추출물을 포함한다.

<78> 본원에서 정의되는 "프레닐레이티드 플라보노이드 화합물"은 3,5,7-트리히드록시-2-(4''-히드록시-페닐)-8-3''-메틸-부-2''-에닐)-chromen-4-one**(1)**, 3,5,7-트리히드록시-2-(4''-히드록시-페닐)-8-(2''-이소프레닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-크로멘-4-온 **(2)**, 2-(2'',4''-디히드록시-페닐)-3,5,7-트리히드록시-8-(2''-이소프레닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-크로멘-4-온 **(3)**, 1-{2,4-디히드록시-3-[2''-(3''-히드록시-3''-메틸-부틸)-3''-메틸-부-3''-에닐]-6-메톡시-페닐-3'''-(2'''',4''''-디히드록시-페닐)-2-히드록세-프로페논 **(4)**, 1-[2,4-디히드록시-3-(2''-이소프레닐-5''

<79> -메틸-헥-4''-에닐)-6-메톡시-페닐]-3'''-(2'''',4''''-디히드록시-페닐-2-히드록시-프로페논 **(5)**, 1-[2,4-디히드록시-6-메톡시-3-(3''-메틸-부-2''-에닐)-페닐]-3'''-(4'''-히드록시-페닐-프로페논 **(6)**, 2-(2'',4''-디히드록시-페닐)-5,7-디히드록시-8-(2''-이소프로페닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-크로멘-4-온 **(7)**, 2-(2'',4''-디히드록시-페닐)-7-히드록시-8-[2''-(3'''-히드록시-3'''-메틸-부틸-3''-메틸-3''-에닐]-5-메톡시-크로멘-4-온 **(8)**, 2-(2'',4''-디히드록시-페닐)-7-히드록시-8-(2''-이소프레닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-5-메톡시-크로멘-4-온 **(9)**, 7-히드록시-2S-(4''-히드록시-2''-메톡시-페닐)-8-(2''-이소프레닐-5''-메틸-헥-4''-에닐)-5-메톡시-크로멘-4-온 **(10)**, 3,7-디히드록시-2S-(4''-디히드록시-페닐)-5-메톡시-8-(3''-메틸-부-2''-에닐)-크로멘-4-온 **(11)**, 7-히드록시-2S-(4''-히드록시-페닐)-5-메톡시-8-(3''-메틸-부-2''-에닐)-크로멘-4-온 **(12)**, 2-(2'',4''-디히드록시-페닐)-5,7-디히드록시-8-(3''-메틸-부-2''-에닐)-6-(3'''-메틸-부-1'''-에닐)-크로멘-4-온 **(13)** 또는 2-(2'',4''-디히드록시-페닐)-5,7-디히드록시-8-(3''-메틸-부-2''-에닐)-크로멘-4-온 **(14)**로부터 선택되는 화합물을 포함한다.

<80> 본 발명과 관련된 당뇨성 합병증 질환으로는 동맥경화증, 고혈압, 뇌혈관경색증, 뇌졸중, 심근경색, 협심증, 신장병, 신경장애, 당뇨병성 망막증, 백내장 또는 녹내장, 바람직하게는 당뇨병성 망막증, 백내장 또는 녹내장을 포함한다.

<81> 상기 고삼 추출물은 고삼의 뿌리, 줄기 또는 잎 바람직하게는, 뿌리로부터 추출됨을 특징으로 한다.

<82> 상기 고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 화합물은 약학조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 50% 중량으로 포함됨을 특징으로 한다.

<83> 본 발명의 고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 화합물을 분리하는 방법은 하기와 같다.

<84> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<85> 본 발명의 고삼으로부터 조추출물, 비극성용매 가용 추출물 및 이로부터 분리되는 프레닐레이티드 플라보노이드 화합물은 하기와 같이 수득될 수 있다.

<86> 본 발명의 고삼 조추출물은 고삼을 마쇄하여 분말화 한 후, 고삼 건조 중량의 약 3 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 에탄올, 메탄올 및 부탄올과 같은 저급 알콜 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매로, 바람직하게는 메탄올로 20 내지 100 ℃, 바람직하게는 20 내지 70℃의 추출 온도에서 약 0.5시간 내지 2일, 바람직하게는 1시간 내지 1일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법으로 1회 내지 5회, 바람직하게는 3회 연속 추출하여 수득한 후, 감압여과하고 여액을 진공회전농축기로 20 내지 100 ℃, 바람직하게는 40 내지 70℃에서 감압농축하여 본 발명의 고삼 조추출물을 수득할 수 있다.

<87> 상기 고삼 조추출물을 물에 현탁한 후, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, *n*-부탄올 순으로 용매를 이용하여 추출하여 본 발명의 고삼 비극성용매 가용 추출물, 바람직하게는 디클로로메탄 가용성 분획물을 수득할 수 있고, 더욱 구체적으로는 고삼 조추출물 즉, 고삼 에탄올추출물에 디클로로메탄: 물: 메탄올을 일정 비율, 바람직하게는 10:9:1로 혼합하여 디클로로메탄 가용성 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있고, 다시 상기 수가용성 분획물을 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 가용성 분획물 및 수가용성 분획물을 수득할 수 있었으며, 마지막으로 상기 수가용성 분획물을 부탄올로 추출하여 부탄올 가용성 분획물과 수가용성 분획물을 수득할 수 있다.

<88> 상기 비극성 용매 디클로로메탄 분획물에 대하여 디클로로메탄 : 메탄올의 혼합용매, 바람직하게는 디클로로메탄 : 메탄올의 80:1 → 1:1의 혼합용매로 시간당 일정용량, 바람직하게는 1000 ㎖의 속도로 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 CF01 부터 CF18까지 18개의 분획물을 수득할 수 있다.

<89> 상기 디클로로메탄 분획물은 다시 키에셀 겔 60 칼럼 크로마토그래피로 디클로로메탄 : 메탄올 100:1 → 1:1의 혼합용매로 분리한 후, 세파덱스로 정제하여 데스메틸안하이드로이카리틴 **(1)**, 잔소후몰 **(6)**, (2S)-2'-메톡시쿠라리논 **(10)**, (2S)-3,7,4'-트리하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논 **(11)**, (2S)-7,4'-디하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논 **(12)**의 화합물을 분리 및 동정할 수 있다.

<90> 상기 비극성 용매 에틸아세테이트 분획물에 대하여 디클로로메탄 : 메탄올의 혼합용매, 바람직하게는 디클로로메탄 : 메탄올의 20:1 → 1:1의 혼합용매로 시간당 일정용량, 바람직하게는 1000 ㎖의 속도로 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 EF01 부터 EF21까지 21개의 분획물을 수득할 수 있다.

<91> 상기 에틸아세테이트 분획물은 다시 키에셀 겔 60 칼럼 크로마토그래피로 디클로로메탄 : 메탄올 40:1 → 1:1의 혼합용매로 분리한 후, 세파덱스로 정제하여 상기 8-C-라반주릴캠프페롤 **(2)**, 쿠세놀 C **(3)**, 쿠라리디놀 **(4)**, 쿠라리딘 **(5)**, 소포라플라바논 G **(7)**, 쿠라리놀 **(8)**, 쿠라리논 **(9)**, 쿠세놀 E **(13)**, 리아키아논 G **(14)**의 화합물을 분리 및 동정할 수 있다.

<92> 본 발명은 상기 방법으로 수득된 고삼 추출물 및 이로부터 분리된 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨성 합병증의 예방 및 치료를 위한 약학조성물 및 건강기능식품을 제공한다.

<93> 상기에서 수득된 고삼 추출물 또는 이로부터 분리된 프레닐레이티드 플라보노이드 화합물의 당뇨성 합병증을 억제하는 조성물로서의 효능을 조사하기 위하여, 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성 억제효과를 측정한 결과, 본 발명에 따른 고삼 추출물 또는 이로부터 분리된 프레닐레이티드 플라보노이드의 화합물이 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성을 억제함을 확인하였다.

<94> 본 발명의 고삼 추출물 또는 이로부터 분리된 프레닐레이티드 플라보노이드 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

<95> 본 발명의 추출물 또는 화합물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<96> 본 발명의 추출물 또는 화합물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합 뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

<97> 본 발명에 따른 추출물 또는 화합물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물 또는 화합물을 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 추출물 및 정제 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트 (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 프로필렌 글리콜(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.

<98> 본 발명의 추출물 또는 화합물의 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 추출물 또는 화합물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 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.

<99> 본 발명의 추출물 또는 화합물은 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.

<100> 또한, 본 발명은 고삼 추출물 또는 이로부터 분리한 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨성 합병증의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

<101> 본 발명의 화합물은 당뇨성 합병증의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물 및 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

<102> 본 발명의 상기 추출물 및 화합물은 당뇨성 합병증의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 30 g, 바람직하게는 0.3 내지 10 g의 비율로 가할 수 있다.

<103> 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등의 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, 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 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

<104> 상기 외에 본 발명의 추출물 및 화합물은 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 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 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

효 과

<105> 본 발명의 고삼추출물 또는 이로부터 분리된 프레닐레이티드 플라보노이드 화합물은 알도즈 환원효소 및 최종 당화산물 생성 억제를 나타내는 바, 당뇨성 합병증의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<106> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<107> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<108> **실시예 1. 고삼 조추출물의 제조**

<109> 경북 영천에서 채집한 고삼을 마쇄하여 얻은 분말 10 kg을 에탄올 10 ℓ를 넣고 70℃에서 일정시간 간격 (12h, 6h, 3h)으로 3회 반복하여 환류냉각 추출한 후 여지 (와트만사, 미국)로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 40℃에서 에탄올을 제거한 후 추출된 잔사로서 고삼 조추출물 2.2 kg을 수득하고, 이를 물 2 L에 넣어 현탁시킨 후에 (이하 '수가용성분획물' 이라 함) 하기 분획 과정에 사용하였다.

<110> **실시예 2. 고삼 디클로로메탄 가용 추출물의 제조**

<111> 상기 실시예 1에서 얻은 수가용성 분획물 2 ℓ에 디클로로메탄 2 ℓ를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 ℓ 및 디클로로메탄 가용성 분획물 2 ℓ를 얻은 후, 이 디클로로메탄 가용성 분획물을 건조하여 디클로로메탄 가용 추출물 230 g을 수득하여 하기 실험예로 사용하였다.

<112> **실시예 3. 고삼 에틸아세테이트 가용 추출물의 제조**

<113> 상기 실시예 2에서 디클로로메탄 가용 추출물을 제거하고 남은 수가용성 분획물 2 ℓ에 에틸아세테이트 2 ℓ를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 ℓ 및 에틸아세테이트 가용성 분획물 2 ℓ를 얻은 후, 이 에틸아세테이트 분획물을 건조하여 에틸아세테이트 가용 추출물 250 g을 수득하여 하기 실험예로 사용하였다.

<114> **실시예 4. 고삼 *n*-부탄올 가용 추출물의 제조**

<115> 상기 실시예 3에서 에틸아세테이트 가용 추출물을 제거하고 남은 수가용성 분획층 2 ℓ에 부탄올 2 ℓ를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 ℓ 및 부탄올 가용성 분획물 2 ℓ를 얻은 후, 수가용성 분획물 및 *n*-부탄올 가용성 분획물을 건조하여 수가용 추출물 및 *n*-부탄올 가용 추출물 610 g을 수득하여 하기 실험예로 사용하였다.

<116> **실시예 5. 데스메틸안하이드로이카리틴 (desmethylanhydroicaritin) 분리**

<117> 상기 실시예 2의 고삼 디클로로메탄 가용 추출물 230 g 중 70 g을 전개용매로서 디클로로메탄 : 메탄올의 80:1 → 1:1의 혼합용매를 사용하여 칼럼 크로마토그래피를 수행하였다. 고정상으로는 키에셀 겔 60 (Kiesel gel 60, 230-400 매쉬)을 사용하여 시간당 1000 mℓ씩 분획을 수행하여 18개의 하부 분획물 (CF01~CF18)로 나누었다. CF11 (6.6 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 40:1 → 1:1의 혼합용매를 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피와 메탄올로 세파덱스 LH-20 (st. Louis, MO, 시그마 사)으로 정제하여 화합물 데스메틸안하이드로이카리틴 (desmethylanhydroicaritin)**(1)**을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<118>

<119> **데스메틸안하이드로이카리틴 (desmethylanhydroicaritin)**

<120> 물질의 성상: 노란색의 결정;

<121> 물질의 분자식: $C_{20}H_{18}O_{6.}$;

<122> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 12.40 (1H, s), 10.73 (1H, s), 10.12 (1H, s), 9.36 (1H, s), 8.03 (2H, d, J = 8.9 Hz), 6.93 (2H, d, J = 8.9 Hz), 6.29 (1H, s), 5.17 (1H, t, J = 6.8 Hz), 3.42 (2H, d, J = 6.8 Hz), 1.74 (3H, br s), 1.62 (3H, br s);

<123> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 176.1, 161.1, 159.1, 158.3, 153.4, 146.7, 135.5, 130.9, 129.3, 122.5, 121.9, 115.4, 105.6, 102.9, 97.8, 25.4, 21.2, 17.8.

<124> **실시예 6. 8-C-라반주릴캠프페롤 (8-C-lavandulylkaempferol) 분리**

<125> 상기 실시예 3의 고삼 에틸아세테이트 가용 추출물 250 g을 전개용매로서 디클로로메탄 : 메탄올의 20:1 → 1:1의 혼합용매를 사용하여 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 21개의 하부 분획물 (EF01~EF21)로 나누었다. 하부 분획물 중 EF05 (2.29 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 40:1 → 0:1의 혼합용매로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 7개의 하부 분획물 (EF0501~EF0507)로 나누었다. 하부 분획물 중 EF0503 (360 mg)을 디클로로메탄 : 메탄올의 30:1의 혼합용매로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피와 메탄올로 세파덱스 LH-20으로 정제하여 화합물 8-C-라반주릴캠프페롤 (8-C-lavandulylkaempferol)**(2)**을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<126>

<127> **8-C-라반주릴캠프페롤 (8-C-lavandulylkaempferol)**

<128> 물질의 성상: 무정형 분말;

<129> 물질의 분자식: $C_{25}H_{26}O_6$;

<130> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 12.42 (1H, s), 10.66 (1H, s), 10.13 (1H, s), 9.39 (1H, s), 8.07 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.93 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.27 (1H, s), 4.97 (1H, t, J = 6.9 Hz), 4.61 (1H, s), 4.48 (1H, s), 2.81 (2H, m), 2.49 (1H, m), 2.07 (2H, m), 1.65 (3H, br s), 1.56 (3H, br s) 1.46 (3H, br s);

<131> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 176.1, 161.7, 159.2, 158.3, 153.8, 147.4, 146.5, 135.5, 131.0, 129.3, 122.9, 122.0, 115.4, 111.2, 105.0, 102.9, 97.6, 46.6, 30.8, 26.8, 25.5, 18.4, 17.6.

<132> **실시예 7. 쿠세놀 C (Kushenol C) 분리**

<133> 상기 실시예 6의 하부 분획물 EF19 (23.62 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 8:1 → 1:1의 혼합용매를 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피하고, 메탄올로 세파덱스 LH-20으로 정제하여 화합물 쿠세놀 C (Kushenol C)**(3)**를 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<134> **쿠세놀 C (Kushenol C)**

<135> 물질의 성상: 무정형 분말;

<136> 물질의 분자식: $C_{25}H_{26}O_{7;}$

<137> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 13.18 (1H, s), 11.04 (1H, s), 10.24 (1H, s), 7.80 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.89 (1H, s), 6.84 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.75 (1H, s), 5.45 (1H, t), 5.04 (1H, s), 4.95 (1H, s), 3.19 (2H, d), 2.98 (2H, d), 2.09 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.96 (3H, s);

<138> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 176.6 , 161.2, 160.4, 158.4, 157.7, 154.5, 149.0, 147.6, 136.2, 131.1, 130.8, 123.2, 111.0, 109.8, 106.5, 104.9, 103.4, 103.2, 97.4, 46.4, 30.9, 26.6, 25.5, 18.4, 17.6.

<139> **실시예 8. 쿠라리디놀 (Kuraridinol) 분리**

<140> 상기 실시예 6의 하부 분획물 EF15 (32.38 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 20:1 → 1:1의 혼합용매로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피하여 6개의 하부 분획물을 얻었다. 하부 부획물 중 EF1503 (2.77 g)을 *n*-헥산 : 에틸아세테이트의 1:1 →0:1의 혼합용매로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피하여 화합물 쿠라리디놀 (Kuraridinol)**(4)**를 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<141>

<142> **쿠라리디놀 (Kuraridinol)**

<143> 물질의 성상: 무정형 분말;

<144> 물질의 분자식: $C_{26}H_{32}O_7$;

<145> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 14.86 (1H, s), 10.17 (1H, s), 7.94 (1H, d, *J*= 15.6 Hz), 7.86 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.38 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.32 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz), 6.04 (1H, s), 4.57 (1H, br s), 4.47 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 3.83 (3H, s), 2.55 (2H, m), 2.35 (1H, m), 1.64 (3H, s), 1.35 (2H, m), 1.19 (2H, m), 1.02 (3H, s), 1.01 (3H, s).

<146> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 192.0, 165.3, 162.8, 161.1, 160.3, 159.0, 148.0, 138.6, 130.3, 122.8, 113.7, 110.9, 108.1, 106.7, 104.4, 102.6, 90.7, 68.6, 55.5, 46.4, 41.6, 29.6, 29.0, 27.1, 26.7, 17.9.

<147> **실시예 9. 쿠라리딘 (Kuraridin) 분리**

<148> 상기 실시예 6의 하부 분획물 EF07 (8.54 g)을 메탄올로 세파덱스 LH-20으로 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 20개의 하부 분획물 (EF0701~EF0720)을 얻었다. 하부 분획물 중 EF0718 (350 mg)을 고정상으로 리크로프렙 RP-18 겔 (Lichroprep RP-18, Merck사, Germany)을 사용하고, 용매는 60% 아세토나이트라일 용액을 사용하여 칼럼 크로마토그래피하여 화합물 쿠라리딘 (Kuraridin)**(5)**을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<149> **쿠라리딘 (Kuraridin)**

<150> 물질의 성상: 오렌지색 오일;

<151> 물질의 분자식: $C_{21}H_{22}O_5$;

<152> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.42 (1H, s), 10.19 (1H, s), 9.94 (1H, s), 7.95 (1H, d, *J* = 15.4 Hz), 7.86 (1H, d, *J* = 15.4 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.38 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.32 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.8 Hz), 6.05 (1H, s), 4.98 (1H, br t, *J* = 6.2 Hz), 4.58 (1H, br s), 4.50 (1H, br s), 3.84 (3H, s), 2.53 (2H, m), 2.48 (1H, m), 2.01 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 1.65 (3H, s), 1.59 (3H, s), 1.51 (3H, s);

<153> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 192.0, 165.3, 162.6, 161.2, 160.3, 159.0, 147.8, 138.7, 130.5, 130.3, 123.5, 122.8, 113.7, 110.8, 108.1, 106.6, 104.5, 102.6, 90.6, 55.5, 46.2, 30.8, 26.7, 25.6, 18.5, 17.7.

<154> **실시예 10. 잔소후몰 (Xanthohumol) 분리**

<155> 상기 실시예 2의 고삼 디클로로메탄 가용 추출물 230 g 중 70 g을 전개용매로서 디클로로메탄 : 메탄올의 80:1 → 1:1의 혼합용매를 사용하여 칼럼 크로마토그래피를 수행하였다. 고정상으로는 키에셀 겔 60 (Kiesel gel 60, 230-400 매쉬)을 사용하여 시간당 1000 ㎖씩 분획을 수행하여 18개의 하부 분획물 (CF01~CF18)로 나누

었다. CF09 (8.77 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 100:1 → 1:1의 혼합용매를 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 잔소후몰 (Xanthohumol)**(6)**을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<156> **잔소후몰 (Xanthohumol)**

<157> 물질의 성상: 노란색 분말;

<158> 물질의 분자식: $C_{21}H_{22}O_5$;

<159> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 7.76 (1H, d, J = 15.3 Hz), 7.66 (1H, d, J = 15.3 Hz), 7.57 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.84 (2H, d, J = 8.6 Hz), 6.07 (1H, s), 5.14 (1H, br t, J = 6.9 Hz), 3.86 (3H, s), 3.13 (2H, d, J = 6.9 Hz), 1.70 (3H, br s), 1.60 (3H, br s);

<160> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 191.4, 164.6, 162.9, 160.5 159.9, 142.3, 130.4, 129.8, 126.0, 123.8, 123.1, 115.9, 107.3, 104.4 91.1, 55.7, 25.5, 21.0, 17.7.

<161> **실시예 11. 소포라플라바논 G (Sophoraflavanone G) 분리**

<162> 상기 실시예 6의 하부 분획물 EF08 (5.7 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 40:1 → 1:1의 혼합용매로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 10개의 하부 분획물 (EF0801~EF0810)을 얻었다. 하부 분획물 중 EF0807 (1.35 g)을 n-헥산 : 에틸아세테이트의 2:1의 혼합용매로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하고, 70% 메탄올로 리크로프렙 칼럼 크로마토그래피하여 화합물 소포라플라바논 G (Sophoraflavanone G)**(7)**를 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<163> **소포라플라바논 G (Sophoraflavanone G)**

<164> 물질의 성상: 무정형 분말;

<165> 물질의 분자식: $C_{25}H_{29}O_6$;

<166> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 12.48 (1H, s), 7.18 (1H, d, J = 8.40 Hz), 6.34 (1H, d, J = 2.2 Hz), 6.26 (1H, dd, J = 2.2, 8.4 Hz), 5.92 (1H, s), 5.54 (1H, dd, J = 2.8, 13.2 Hz), 4.99 (1H, t, J = 6.9 Hz), 4.59 (1H, br s), 4.51 (1H, br s), 3.25 (1H, dd, J = 13.2, 17.2 Hz), 2.56 (1H, dd, J = 2.8, 17.2 Hz), 2.47 (1H, m), 2.44 (1H, m), 2.02 (2H, m), 1.65 (3H, s), 1.60 (3H, s), 1.52 (3H, s);

<167> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 196.8, 165.0, 161.3, 161.0, 158.5, 155.7, 147.6, 130.6, 128.2, 123.3, 115.5, 111.0, 106.8, 106.4, 102.4, 101.2, 94.2, 73.7, 46.2, 41.2, 30.9, 26.3, 25.6, 18.4, 17.7.

<168>

<169> **실시예 12. 쿠라리놀 (Kurarinol) 분리**

<170> 상기 실시예 6의 하부 분획물 EF1504 (25 g)을 n-헥산 : 에틸아세테이트의 1:1 → 0:1의 혼합용매로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피하여 화합물 쿠라리놀 (Kurarinol)**(8)**을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<171> **쿠라리놀 (Kurarinol)**

<172> 물질의 성상: 무정형 분말;

<173> 물질의 분자식: $C_{26}H_{32}O_7$;

<174> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.30 (1H, s), 9.54 (1H, s), 9.30 (1H, s), 7.21 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.32 (1H, d, J = 2.0 Hz), 6.25 (1H, dd, J = 2.0, 8.6 Hz), 6.12 (1H, s), 5.41 (1H, dd, J = 2.3, 13.2

Hz), 4.56 (1H, br s), 4.48 (1H, br s), 3.70 (3H, s), 2.80 (1H, dd, *J* = 13.2, 16.2 Hz), 2.50 (1H, dd, *J* = 2.3, 16.2 Hz), 2.48 (2H, m), 2.31 (1H, m), 1.56 (3H, s), 1.22 (2H, m), 1.00 (2H, m), 0.95 (each 3H, s);

<175> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 189.2, 162.7, 162.5, 162.3, 159.8, 158.3, 155.4, 148.3, 127.5, 116.6, 111.0, 107.3, 106.5, 104.6, 92.7, 73.8, 68.9, 55.5, 46.9, 44.6, 41.7, 29.6, 29.2, 27.6, 26.7, 18.2.

<176> **실시예 13. 쿠라리논 (Kurarinone) 분리**

<177> 상기 실시예 6의 하부 분획물 EF10 (4.65 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 40:1 → 1:1의 혼합용매로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피하여 하부 분획물 9개 (EF1001~EF1009)를 얻었다. 하부 분획물 중 EF1009 (1.52 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 30:1의 혼합용매로 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피하여 화합물 쿠라리논 (Kurarinone)**(9)**을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<178>

<179> **쿠라리논 (Kurarinone)**

<180> 물질의 성상: 무정형 분말;

<181> 물질의 분자식: $C_{26}H_{30}O_6$;

<182> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.30 (1H, s), 9.55 (1H, s), 9.31 (1H, s), 7.21 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.40 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.6 Hz), 6.33 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.11 (1H, s), 5.42 (1H, dd, *J* = 2.4, 13.4 Hz), 4.91 (1H, m), 4.55 (1H, br s), 4.48 (1H, br s), 3.70 (3H, s), 2.80 (1H, dd, *J* = 13.4, 16.4 Hz), 2.50 (2H, m), 2.48 (1H, m), 2.43 (1H, dd, *J* = 2.4, 16.4 Hz), 1.94 (2H, m), 1.57 (3H, s), 1.52 (3H, s), 1.42 (3H, s);

<183> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ: 188.9, 162.4, 162.0, 159.6, 158.0, 155.2, 147.9, 130.6, 127.2, 123.4, 116.3, 110.7, 106.9, 106.3, 104.3, 102.3, 92.4, 73.5, 55.3, 46.8, 44.5, 30.7, 26.9, 25.5, 18.6, 17.6.

<184> **실시예 14. (2S)-2'-메톡시쿠라리논 [(2*S*)-2'-Methoxykurarinone] 분리**

<185> 상기 실시예 5의 하부 분획물 CF11 (6.6 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 40:1 → 1:1의 혼합용매를 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피와 메탄올로 세파덱스 LH-20 (st. Louis, MO, 시그마 사)으로 정제하여 화합물 (2S)-2'-메톡시쿠라리논 [(2*S*)-2'-Methoxykurarinone]**(10)**을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<186> **(2S)-2'-메톡시쿠라리논 [(2*S*)-2'-Methoxykurarinone]**

<187> 물질의 성상: 노란색 분말;

<188> 물질의 분자식: $C_{27}H_{32}O_6$;

<189> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 7.30 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.42 (2H, m), 6.12 (1H, s), 5.44 (1H, d, *J* = 2.4, 13.4 Hz), 4.87 (1H, br t, *J* = 6.7 Hz), 4.55 (1H, br s), 4.47 (1H, br s), 3.72 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.17 (1H, dd, *J* = 13.4, 16.4 Hz), 2.86 (1H, dd, *J* = 2.4, 16.4 Hz), 2.50 (2H, m), 2.49 (1H, m), 1.92 (2H, m), 1.58 (3H, s), 1.52 (3H, s), 1.42 (3H, s);

<190> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 188.7, 162.3, 162.1, 159.6, 158.8, 157.3, 147.9, 130.6, 127.3, 123.4, 117.5, 110.7, 106.9, 106.8, 104.3, 98.9, 92.5, 73.1, 55.3, 55.2, 46.8, 44.1, 30.7, 26.8, 25.5, 18.5, 17.5.

<191> **실시예 15. (2S)-3,7,4'-트리하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논 [(2*S*)-3,7,4'-Trihydroxy-5-**

methoxy-8-(ɣ,ɣ-dimethylallyl)-flavanone] 분리

<192> 상기 실시예 5의 하부 분획물 CF11 (6.6 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 40:1 → 1:1의 혼합용매를 키에셀겔 칼럼 크로마토그래피와 메탄올로 세파덱스 LH-20 (st. Louis, MO, 시그마 사)으로 정제하여 화합물 (2S)-3,7,4'-트리하이드록시,5-메톡시-8-(ɣ,ɣ-디메틸아릴)-플라바논[(2*S*)-3,7,4'-Trihydroxy-5-methoxy-8-(ɣ,ɣ-dimethylallyl)-flavanone] **(11)**을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<193> **(2S)-3,7,4'-트리하이드록시,5-메톡시-8-(ɣ,ɣ-디메틸아릴)-플라바논**

<194> **[(2*S*)-3,7,4'-Trihydroxy-5-methoxy-8-(ɣ,ɣ-dimethylallyl)-flavanone]**

<195> 물질의 성상: 노란색 분말;

<196> 물질의 분자식: $C_{21}H_{22}O_6$;

<197> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 7.29 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.77 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.16 (1H, s), 5.08 (1H, br t, *J* = 6.8 Hz), 4.90 (1H, d, *J* = 11.3 Hz), 4.25 (1H, d, *J* = 11.3 Hz), 3.70 (3H, s), 3.06 (2H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.53 (3H, br s), 1.50 (3H, br s);

<198> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 190.3, 161.1, 160.9, 160.8, 159.5, 130.0, 129.0, 128.1, 122.6, 114.8, 107.3, 102.4, 92.8, 82.2, 72.5, 55.3, 25.5, 21.3, 17.5.

<199> **실시예 16. (2S)-7,4'-디하이드록시,5-메톡시-8-(ɣ,ɣ-디메틸아릴)-플라바논 [(2S)-7,4'-Dihydroxy-5-methoxy-8-(ɣ,ɣ-dimethylallyl)-flavanone] 분리**

<200> 상기 실시예 5의 하부 분획물 CF11 (6.6 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 40:1 → 1:1의 혼합용매를 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피와 메탄올로 세파덱스 LH-20 (st. Louis, MO, 시그마 사)으로 정제하여 화합물 (2S)-7,4'-디하이드록시,5-메톡시-8-(ɣ,ɣ-디메틸아릴)-플라바논[(2S)-7,4'-Dihydroxy-5-methoxy-8-(ɣ,ɣ-dimethylallyl)-flavanone] **(12)**을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<201> **(2S)-7,4'-디하이드록시,5-메톡시-8-(ɣ,ɣ-디메틸아릴)-플라바논**

<202> **[(2S)-7,4'-Dihydroxy-5-methoxy-8-(ɣ,ɣ-dimethylallyl)-flavanone]**

<203> 물질의 성상: 노란색 분말 ;

<204> 물질의 분자식: $C_{21}H_{22}O_5$;

<205> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 7.28 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.77 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.14 (1H, s) 5.31 (1H, dd, *J* = 3.0, 12.4 Hz), 5.09 (1H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.70 (3H, s), 3.11 (2H, d, *J* = 7.1 Hz), 2.93 (1H, dd, *J* = 12.4, 16.4 Hz), 2.54 (1H, dd, *J* = 3.0, 16.4 Hz), 1.58 (3H, br s), 1.53 (3H, br s);

<206> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 188.2, 161.6, 161.4, 159.6, 157.4, 130.0, 129.6, 127.8, 122.9, 115.1, 107.4, 104.5, 92.7, 77.9, 55.3, 44.6, 25.5, 21.5, 17.5.

<207> **실시예 17. 쿠세놀 E (Kushenol E) 분리**

<208> 상기 실시예 6의 하부 분획물 EF0503 대신 EF0504로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 하기 물성치를 갖는 쿠세놀 E (Kushenol E)**(13)**를 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<209> **쿠세놀 E (Kushenol E)**

<210> 물질의 성상: 무정형 분말 ;

<211> 물질의 분자식: $C_{25}H_{29}O_6$;

<212> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 12.40 (1H, s), 9.60 (1H, s), 7.19 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.34 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.26 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz), 5.51 (1H, dd, *J* = 2.9, 12.4 Hz), 5.08 (2H, m), 3.22 (4H, m), 3.17 (1H, dd, *J* = 12.4, 17.2 Hz), 2.63 (1H, dd, *J* = 2.9, 17.2 Hz), 1.71, 1.62 (each 3H, br s), 1.58, 1.54 5 (each 3H, br s);

<213> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 197.5, 161.5, 158.5, 158.4, 158.0, 155.6, 130.3, 130.1, 127.8, 122.8, 115.8, 107.7, 107.1, 106.3, 102.3, 101.8, 73.7, 41.3, 25.5, 21.6, 17.7, 17.6.

<214> **실시예 18. 리아키아논 G (Leachianone G) 분리**

<215> 상기 실시예 6의 하부 분획물 EF07 (8.54 g)을 메탄올로 세파덱스 LH-20으로 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 20개의 하부 분획물 (EF0701~EF0720)을 얻었다. 하부 분획물 중 EF0718 (350 mg)을 고정상으로 리크로프렙 RP-18 겔 (Lichroprep RP-18, Merck사, Germany)을 사용하고, 용매는 60% 아세토나이트라일 용액을 사용하여 칼럼 크로마토그래피하여 화합물 리아키아논 G (Leachianone G)**(14)**를 얻어 실험예의 시료로 사용하였다. 분리한 각각의 화합물을 NMR (JNM-ECP 400 spectrometer, JEOL Ltd., Japan) 및 MS (JMS-700, JEOL Ltd., Japan) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기에 나타내었다.

<216> **리아키아논 G (Leachianone G)**

<217> 물질의 성상: 무정형 분말 ;

<218> 물질의 분자식: $C_{20}H_{20}O_6$;

<219> ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 12.11 (1H, s), 10.72 (1H, s), 9.62 (1H, s), 9.37 (1H, s), 7.19 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.34 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.26 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.4 Hz), 5.96 (1H, s), 5.53 (1H, dd, *J* = 3.1, 13.1 Hz), 5.10 (1H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.18 (1H, dd, *J* = 12.7, 17.1 Hz), 3.07 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 2.63 (1H, dd, *J* = 3.1, 17.1 Hz), 1.58 (3H, s), 1.55 (3H, s);

<220> ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 197.2, 164.2, 161.1, 160.2, 158.4, 155.7, 130.1, 127.8, 122.7, 115.7, 106.8, 106.3, 102.4, 101.6, 95.1, 73.8, 41.1, 25.5, 21.2, 17.5.

<221> **실험예 1. 고삼 조추출물 및 각 용매 분획물의 랫드 렌즈 알도즈 환원효소 (RLAR) 억제활성**

<222> 고삼 조추출물 및 각 용매 분획물의 랫드 렌즈 알도즈 환원효소 억제활성을 측정하기 위하여 효소원의 조제는 기존 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (Hayman S. and Kinoshite I. H., *J. Biol. Chem.*, 240, pp877-882, 1965).

<223> 흰쥐의 안구에서 수정체를 적출하고, 그 습중량에 따라 일정량 [수정체 1개당 sodium phosphate buffer (pH 6.2) 0.5 ml 첨가]의 인산나트륨버퍼(sodium phosphate buffer :pH 6.2)를 가하여 균질화(homogenization)하였다. 이를 4℃에서 10,000 g로 20분간 원심 분리한 후, 그 상등액을 취하여 효소원으로 사용하였다. 1.5 ml 석영 큐벳에 인산칼륨버퍼 (potassium phosphate buffer : pH 7.0) 621 μl, 효소 90 μl, 조효소인 NADPH (1.6 mM) 90 μl, DMSO에 녹인 측정시료 9 μl를 넣고, 마지막으로 기질인 DL-glyceraldehyde (50 mM)을 90 μl을 넣어 총 반응액이 900 μl가 되도록 하여 340 nm에서 4분간 분광 광도계(spectrophotometer)로 NADPH의 흡광도 감소율을 측정하였다. 대조군은 시료 대신에 DMSO를 첨가하여 측정하고, 양성 대조군은 시그마사 (미국)에서 구입한 퀘르세틴 (quercetin), 캠프페롤 (kaempferol) 및 에팔레스탓(epalrestat)을 이용하여 농도별로 측정하였다. 랫드 렌즈 알도즈 환원효소 억제활성 실험 % 는 하기의 수학식 1로 구하였고, 선회귀방정식을 사용하여 통계처리 하였다.

수학식 1

<224> % 억제율 = 1-(시료의 흡광도-대조군의 흡광도)/표준흡광도×100

표 1

<225>

시료	IC_{50} (μg/ml)
고삼 조추출물	8.20 ± 0.16
고삼 디클로로메탄 가용성 분획물	6.21 ± 0.35
고삼 에틸아세테이트 가용성 분획물	6.92 ± 0.03
고삼 부탄올 가용성 분획물	112.26 ± 4.09
고삼 수가용성 분획물	261.42 ± 15.75
대조약물 (퀘르세틴)	2.16 ± 0.06

<226> 실험 결과, 표 1에서 나타낸 바와 같이 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 6.21 ± 0.35 μg/ml과 6.92 ± 0.03 μg/ml로 강력한 랫드 렌즈 알도즈 환원효소 억제활성을 확인하였다.

<227> **실험예 2. 고삼으로부터 분리된 14가지의 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids) 화합물의 랫드 렌즈 알도즈 환원효소 (RLAR) 억제활성**

<228> 상기 실시예 5 내지 14에서 수득된 14가지 프레닐레이티드 플라보노이드 화합물의 랫드 렌즈 알도즈 환원효소에 대한 억제활성을 상기 실험예 1과 같은 방법으로 실시하였다.

표 2

<229>

연번	시료	IC_{50} (μM)
1	**데스메틸안하이드로이카리틴**	**0.95 ± 0.04**
2	**8-C-라반주릴캠프페롤**	**3.80 ± 0.23**
3	쿠세놀 C	18.54 ± 0.55
4	쿠라리디놀	22.14 ± 2.34
5	쿠라리딘	21.60 ± 0.31
6	잔소후몰	10.73 ± 0.40
7	소포라플라바논 G	59.58 ± 0.75
8	쿠라리놀	2.13 ± 0.29
9	쿠라리논	2.99 ± 0.08
10	(2S)-2'-메톡시쿠라리논	3.77 ± 0.00
11	(2S)-3,7,4'-트리하이드록시, 5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논	3.63 ± 0.27
12	(2S)-7,4'-디하이드록시, 5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논	32.69 ± 8.47
13	쿠세놀 E	7.74 ± 0.47
14	리아키아논 G	12.97 ± 1.23
대조군	퀘르세틴	7.73 ± 0.29
대조군	캠프페롤	9.67 ± 0.13
대조군	에팔레스탓	0.28 ± 0.01

<230> 실험결과, 표 2에 나타낸 바와 같이 데스메틸안하이드로이카리틴은 IC_{50} 값이 0.95 ± 0.04 μM로 화합물 중 가장 높은 억제활성을 나타내었고, 8-C-라반주릴캠프페롤, 쿠라리놀, 쿠라리논, (2S)-2'-메톡시쿠라리논, (2S)-3,7,4'-트리하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논, 쿠세놀 E는 IC_{50} 값이 3.08 ± 0.23, 2.13 ± 0.29, 2.99 ± 0.08, 3.77 ± 0.00, 3.63 ± 0.27, 7.74 ± 0.47 μM로 대조 화합물인 퀘르세틴 (IC_{50} = 7.73 ± 0.29 μM)과 캠프페롤 (IC_{50} = 9.67 ± 0.13 μM) 보다 더 강력한 알도즈 환원효소 억제활성을 나타내었다.

<231> **실험예 3. 고삼으로부터 분리된 14가지의 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids) 화합물의 휴먼 재조합 알도즈 환원효소 (HRAR) 억제활성**

<232> 재조합 인간 알도즈 환원효소 억제활성 측정법은 기존 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (Nishimura C. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1078, pp171-178, 1991).

<233> 1.5 ml 석영 큐벳에 인산나트륨버퍼 (pH 6.2) 790 μl, 조효소인 NADPH (0.15 mM) 100 μl, 기질인 DL-glyceraldehyde (100 mM)를 100 μl와 재조합 인간 알도즈 환원효소 (Wako Chemicals USA, Inc.) 5 μl를 넣은 후, DMSO에 녹인 측정시료 5 μl를 넣어 반응액이 1 ml이 되도록 하여 340 nm에서 1분간 분광 광도계로 NADPH의 흡광도 감소율을 측정하였다. 대조군은 시료 대신에 DMSO를 첨가하여 측정하고, 양성 대조군은 퀘르세틴, 캠프페롤 및 에팔레스탓을 이용하여 농도별로 측정하였다. 알도즈 환원효소 억제활성 실험 % 는 하기의 수학식 2로 구하였고, 선회귀방정식을 사용하여 통계처리 하였다.

수학식 2

<234> % 억제율 = 1-(시료의 흡광도-대조군의 흡광도)/표준흡광도×100

표 3

<235>

연번	시료	IC_{50} (μM)
1	데스메틸안하이드로이카리틴	0.45
2	8-C-라반주릴캠프페롤	0.79
3	쿠세놀 C	0.85
4	쿠라리디놀	1.32
5	쿠라리딘	0.27
6	잔소후몰	-
7	소포라플라바논 G	1.42
8	쿠라리놀	4.39
9	쿠라리논	3.81
10	(2S)-2'-메톡시쿠라리논	11.06
11	(2S)-3,7,4'-트리하이드록시, 5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논	4.50
12	(2S)-7,4'-디하이드록시, 5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논	0.37
13	쿠세놀 E	2.09
14	리아키아논 G	2.49
대조군	퀘르세틴	2.54
대조군	캠프페롤	8.04
대조군	에팔레스탓	0.28

<236> 실험결과, 표 3에 나타낸 바와 같이 데스메틸안하이드로이카리틴, 8-C-라반주릴캠프페롤, 쿠세놀 C, 쿠라리디놀, 쿠라리딘, 소포라플라바논 G, (2S)-7,4'-디하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논, 쿠세놀 E, 리아키아논 G는 재조합 인간 알도즈 환원효소 억제활성에서 IC_{50} 값이 0.45, 0.79, 0.85, 1.32, 0.27, 1.42, 0.37, 2.09, 2.49 μM로 대조 화합물인 퀘르세틴 (IC_{50} = 2.54 μM)과 캠프페롤 (IC_{50} = 8.04 μM) 보다 더 강력한 억제활성을 나타내었고, 쿠라리놀, 쿠라리논, (2S)-2'-메톡시쿠라리논, (2S)-3,7,4'-트리하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논은 IC_{50} 값이 4.39, 3.81, 11.06, 4.50 μM로 강한 재조합 인간 알도즈 환원효소 억제활성을 나타내었다.

<237> **실험예 4. 고삼으로부터 분리된 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 최종당화산물 (AGEs) 생성 억제활성**

<238> 고삼으로부터 분리된 프레닐레이티드 플라보노이드 (prenylated flavonoids)의 최종당화산물 생성 억제활성의 측정은 기존 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (Vinson J. A., *J. Nutr. Biochem.*, 7, pp659-663, 1996).

<239> AGE 반응 시약은 세균 증식을 막기 위해서 0.02% 아지드화나트륨 (sodiumazide)이 첨가된 50 mM 인산나

트륨버퍼 (pH 7.4)에 10 mg/ml의 시그마사 (미국)에서 구입한 BSA (bovine serum albumin)와 0.2 M 과당 (fructose)과 0.2 M 포도당 (glucose)을 넣어 만든다. 시료는 10% DMSO에 녹인 후, AGE 반응 시약 950 μl에 반응시료 50 μl를 넣은 후, 37℃에서 7 일간 배양한다. 배양 후, 반응 생성물의 형광강도를 spectrofluorometric detector로 excitation과 emission 파장을 350 nm과 450 nm에서 측정한다. 최종당화산물 생성 억제활성 실험 % 는 하기의 수학식 3로 구하였고, 선회귀방정식을 사용하여 통계처리 하였다.

수학식 3

<240> % 억제율 = 1-(시료의 흡광도-대조군의 흡광도)/표준흡광도×100

표 4

<241>

연번	시료	IC_{50} (μM)
1	데스메틸안하이드로이카리틴	294.62 ± 0.57
2	8-C-라반주릴캠프페롤	313.12 ± 0.53
3	쿠세놀 C	193.07 ± 0.04
11	(2S)-3,7,4'-트리하이드록시, 5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논	705.41 ± 0.87
대조군	아미노구아니딘	1051.49 ± 1.41

<242> 실험결과, 표 4에서 나타낸 바와 같이 데스메틸안하이드로이카리틴, 8-C-라반주릴캠프페롤, 쿠세놀 C, (2S)-3,7,4'-트리하이드록시,5-메톡시-8-(γ,γ-디메틸아릴)-플라바논은 IC_{50} 값이 294.62 ± 0.57, 313.12 ± 0.53, 193.07 ± 0.04, 705.41 ± 0.87 μM로 양성 대조군인 아미노구아니딘 (IC_{50} 값 = 1051.49 ± 1.41 μM) 보다 더 강력한 최종당화산물 생성 억제활성을 나타내었다.

<243> 하기에 본 발명의 고삼추출물 또는 이로부터 분리되는 프레닐레이티드 플라보노이드 화합물을 함유하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<244> **제제예 1. 산제의 제조**

<245> 8-C-라반주릴캠프페롤 300 mg

<246> 유당 100 mg

<247> 탈크 10 mg

<248> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

<249> **제제예 2. 정제의 제조**

<250> 데스메틸안하이드로 300 mg

<251> 옥수수전분 100 mg

<252> 유당 100 mg

<253> 스테아린산 마그네슘 2 mg

<254> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<255> **제제예 3. 캅셀제의 제조**

<256> 8-C-라반주릴캠프페롤 300 mg

<257> 결정성 셀룰로오스 3 mg

<258> 락토오스 14.8 mg

<259> 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

<260> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<261> **제제예 4. 주사제의 제조**

<262> 쿠라리디놀 300 mg

<263> 만니톨 180 mg

<264> 주사용 멸균 증류수 2974 mg

<265> $Na_2HPO_4 12H_2O$ 26 mg

<266> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ㎖) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<267> **제제예 5. 액제의 제조**

<268> 소포라플라바논 G 300 mg

<269> 이성화당 10 g

<270> 만니톨 5 g

<271> 정제수 적량

<272> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ㎖로 조절한 후 갈색 병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<273> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<274> 고삼추출물 1000 mg

<275> 비타민 혼합물 적량

<276> 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

<277> 비타민 E 1.0 mg

<278> 비타민 B_1 0.13 mg

<279> 비타민 B_2 0.15 mg

<280> 비타민 B_6 0.5 mg

<281> 비타민 B_{12} 0.2 ㎍

<282> 비타민 C 10 mg

<283> 비오틴 10 ㎍

<284> 니코틴산아미드 1.7 mg

<285> 엽산 50 ㎍

<286> 판토텐산 칼슘 0.5 mg

<287> 무기질 혼합물 적량

<288> 황산제1철 1.75 mg

<289> 산화아연 0.82 mg

<290> 탄산마그네슘 25.3 mg

<291> 제1인산칼륨 15 mg

<292> 제2인산칼슘 55 mg

<293> 구연산칼륨 90 mg

<294> 탄산칼슘 100 ㎎

<295> 염화마그네슘 24.8 ㎎

<296> 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

<297> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<298> 고삼 에틸아세테이트 가용성 분획물 300 ㎎

<299> 비타민 C 15 g

<300> 비타민 E(분말) 100 g

<301> 젖산철 19.75 g

<302> 산화아연 3.5 g

<303> 니코틴산아미드 3.5 g

<304> 비타민 A 0.2 g

<305> 비타민 B_1 0.25 g

<306> 비타민 B_2 0.3 g

<307> 물 정량

<308> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

<309> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.