(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0015795
(43) 공개일자 2018년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/73 (2006.01) *A61K 9/14* (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/73 (2013.01)
A61K 9/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0099199
(22) 출원일자 2016년08월04일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 후석로 325, 105동 302호(후평동, 춘천더샵아파트)
서홍원
강원도 춘천시 방송길 70, 102동 1301호 (온의동, 온의 롯데캐슬 스카이클래스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 정안

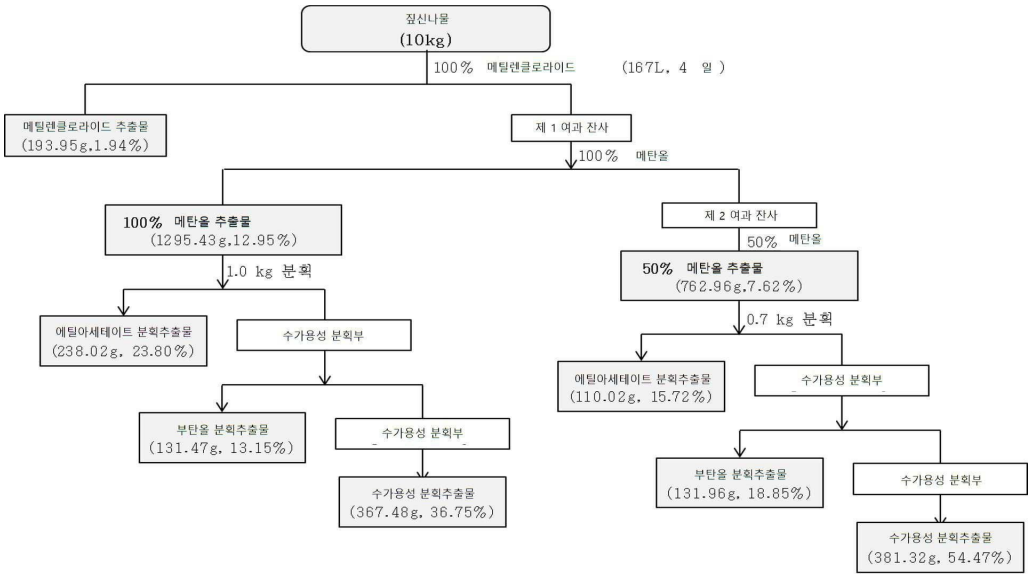
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **짚신나물 분획추출물 및 이를 포함하는 알도오스 환원 효소를 억제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 짚신나물로부터 분리한 조성물 및 분획추출방법에 관한 것으로, 1차적으로 메틸렌클로라이드로 추출하고 여과 잔사를 100% 메탄올로 추출한 후 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하며, 2차적으로 100% 메탄올로 추출하고 남은 여과 잔사를 50% 메탄올로 추출한 후 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하는 과정을 포함한다. 이러한 일련의 과정을 통해 얻은 조성물은 알도오스 환원 효소 억제를 통해 NF-kB를 포함한 염증성 시토카인을 억제시킴으로써 당뇨, 당뇨합병증, 백내장, 결장암, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 치료 및 예방에 이용 될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 9/20 (2013.01)
A61K 9/48 (2013.01)
Y10S 514/826 (2013.01)
Y10S 514/866 (2013.01)
Y10S 514/912 (2013.01)

(72) 발명자
김샛별
강원도 춘천시 후석로186번길 9, 103동 802호 (석사동, 진흥아파트)
왕지강
강원도 춘천시 한림대학길 1, 5층 5010호 (옥천동)
이수경
강원도 춘천시 우석로85번길 1 (석사동)
이재령
서울특별시 강북구 오패산로38길 12-2 (미아동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 115001-3
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 2015년 고부가가치식품기술개발사업
연구과제명 짚신나물/단삼복합추출물을 이용한 관절건강 개별인정형 건강기능식품 제품개발
기 여 율 1/1
주관기관 성신비에스티㈜
연구기간 2015.10.23 ~ 2018.10.22

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 건조된 짚신나물에 메틸렌클로라이드를 가하고 이를 여과하여 메틸렌클로라이드 추출물 및 제 1 여과 잔사를 수득하는 단계;

(2) 상기 제 1 여과 잔사에 100% 메탄올을 가하고 이를 여과하여 100% 메탄올 추출물 및 제 2 여과 잔사를 수득하는 단계; 및

(3) 상기 100% 메탄올 추출물을 증류수로 현탁한 다음 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 분획추출물 및 수가용성 분획부를 수득하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 짚신나물 분획추출물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 제 3단계로부터 얻은 수가용성 분획부에 부탄올을 가하여 부탄올 분획추출물을 얻는 방법을 특징으로 하는 짚신나물 분획추출물.

청구항 3

(4) 제 1항의 제 2 여과 잔사에 50% 메탄올을 가하고 이를 여과하여 50% 메탄올 추출물을 얻는 단계; 및

(5) 상기 50% 메탄올 추출물을 증류수로 현탁한 다음 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 분획추출물 및 수가용성 분획부를 얻는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 짚신나물 분획추출물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 제 5단계로부터 얻은 수가용성 분획부에 부탄올을 가하여 부탄올 분획추출물을 얻는 방법을 특징으로 하는 짚신나물 분획추출물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항의 짚신나물 분획추출물을 유효성분으로 포함하는 알도오스 환원 효소 억제 효과를 가지는 약제학적 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 조성물은 당뇨, 당뇨합병증, 백내장, 결장암, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환(COPD) 중 어느 하나 이상의 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 당뇨합병증이 망막병증, 말초 신경증 및/또는 신증을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 약제학적 제제가 정제, 환제, 산제, 캡슐제, 시럽 또는 에멀젼 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 담체, 보강제 및 부형제를 포함하는 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 짚신나물 분획추출물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 메틸렌클로라이드, 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올로 분획하여 수득한 짚신나물 분획추출물 및 이를 유효성분으로 함유한 알도오스 환원 효소 억제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 알도스 환원효소(이하, AR)는 생체내 포도당대사 경로 중 하나인 폴리올(polyol) 경로에 관여하는 효소이다. 폴리올 경로는 두 경로, 즉 AR이 관여하여 포도당을 솔비톨(sorbitol)로 환원시키는 경로; 및 솔비톨 탈수소효소(이하에서 SDH로 언급되는)가 관여하여 솔비톨을 D-프럭토오스(fructose)로 탈수소화시키는 경로로 구성된다. 폴리올 경로는 뇌, 간, 췌장, 신장, 부신, 정소, 정낭, 태반, 적혈구, 수정체, 망막 및 말초신경을 포함하는 많은 조직에 존재한다. 그러나, 폴리올 경로의 생리학적 중요성은 단지, 정자의 에너지원을 생산하는 경로로서 작용하는 정낭에서만 확인되어 왔다. 정상 세포의 다른 당대사 경로에서 세포내 혼입된 대부분의 포도당은 헥소키나아제(hexokinase)의 작용에 의해 포도당 6-인산으로 전환되어 해당경로를 통해 대사되는 반면, 단지 몇 퍼센트의 포도당만이 폴리올 경로를 통해 대사된다고 여겨진다[Tsuyoshi Tanimoto, Pharmacia, 24:459-463(1988)].

[0004] 세포내 포도당 유입량이 증가하면, 해당경로를 거치지 못한 포도당은 폴리올 경로에 이르게된다. SDH활성은 AR 활성보다 낮다. 그러므로, 포도당이 계속적으로 유입될 경우, 많은 양의 중간 대사물, 솔비톨이 생산된다. 솔비톨은 고도로 극성이므로, 세포밖으로 효과적으로 확산되지 못한다. 따라서, 솔비톨은 세포내에 축적되어, 결국 세포내 삼투압을 증가시키는 결과를 초래한다[Tsuyoshi Tanimoto, Pharmacia, 24:459-463(1988)]. 혈액내 존재하는 포도당(혈당)이 세포내로 제한없이 유입되는 조직의 예는, 중추 신경계같은 인슐린-비의존성 조직, 혈액

세포 및 수질 선세포를 포함한다[Medical Dictionary, 17th edition, Nanzando, Co. Ltd. (1990)].

[0005] 알도스 환원효소는 솔비톨 탈수소효소와 함께, ROS 생성에 관연한다. 여기서, 알도스 환원 효소는 포도당을 솔비톨로 환원시키기 위해 NADPH를 이용한다. 또한, 정상적인 환경에서 알도스 환원효소에 의한 솔비톨 생성은 부차 반응(minor reaction)이다. 그러나, 고혈당 조건에서는 포도당의 약 30~50%까지 이 경로에 의해 대사된다. 이러한 과정이 발생될 때 NADPH의 가용성이 감소하고 차례로 글루타치온(glutathione) 재생과 산화질소 생성효소(NO synthase)를 감소시켜 산화스트레스를 발생시킨다. 이와 같이 발생된 산화스트레스는 PKC, nuclear factor kappa B (NF-κB)와 JNK stress-associated kinases를 활성화시키는 일련의 세포반응을 일으킨다. 특히, NF-κB는 염증성 사이토카인을 생성해내는 전사인자이다.

[0006] 솔비톨 축적에 기인한 질병이 보고되어 왔다. 예를 들면, 당뇨병 백내장은 하기 단계의 결과로서 발병된다고 보고되어 왔다: 눈동자의 수정체내의 AR이 포도당과 갈락토오스를 상응하는 당 알콜로 전환시킨다. 당 알콜이 부적절하게 수정체에 축적되어 삼투압을 증가시킨다. 증가된 삼투압은 수정체에 손상을 입혀 백내장을 일으킨다. [참조 J. H. Kinoshita et al., Biochimica et Biophysica Acta, 158:472 (1968) 및 여기 인용된 참조문헌]. 또한, 당뇨병에 걸린 동물의 수정체, 말초 신경삭 및 신장내에서 솔비톨 축적에 기인한 다양한 악영향이 보고되어 왔다[참조 A. Pirie et al., Experimental Eye Research, 3:124(1964); L, T. Chylack Jr., et al., Investigative Ophthalmology, 8:401 (1968); 및 J. D. Ward et al., Diabetologia, 6:531(1970)].

[0007] AR은 혈당이 높은 당뇨병의 합병증 중에, 예를 들면, 백내장, 레티놀증, 말초 신경증 및/또는 신증에 관여한다. 그들을 예방, 완화 또는 치료하기 위하여 상기 언급된 합병증의 원인이 되는 AR의 활성을 가능한 한 강하게 억제하는 것이 필수적이다.

[0008] 다른 당뇨병 합병증은 예를 들면, 백혈병 및 당뇨성 코마(diabetic coma)중에 식세포분해 감소에 기인한 감염성 질병[Shin-ban Katei No Igaku, 11th edition, Jiji Press, Ltd(1996)] 및 대혈관벽내 아테롬성(atheromatous) 퇴화에 기인한 동맥경화증을 포함한다[Medical Dictionary, 17th edition, Nanzando,Co. Ltd (1990)].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 짚신나물 유래의 알도오스 환원 효소 억제용 분획추출물을 수득하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 짚신나물 분획추출물을 유효성분으로 함유하는 알도오스 환원 효소 억제용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 짚신나물 추출물을 유효성분으로 함유하는 알도오스 환원 효소 억제 효과를 가지는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 짚신나물 분획추출물은 건조된 짚신나물에 메틸렌클로라이드를 가하고 이를 여과하여 메틸렌클로라이드 추출물 및 제 1 여과 잔사를 얻는 단계; 상기 제 1 여과 잔사에 100% 메탄올을 가하고 이를 여과하여 100% 메탄올 추출물 및 제 2 여과 잔사를 얻는 단계; 및 상기 100% 메탄올 추출물을 증류수로 현탁한 다음 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 분획추출물 및 수가용성 분획부를 얻는 단계; 상기 수가용성 분획부에 부탄올을 가하여 부탄올 분획추출물을 얻는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 짚신나물 분획추출물은 상기 제 2 여과 잔사에 50% 메탄올을 가하고 이를 여과하여 50% 메탄올 추출물을 얻는 단계; 및 상기 50% 메탄올 추출물을 증류수로 현탁한 다음 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 분획추출물 및 수가용성 분획부를 얻는 단계; 상기 수가용성 분획부에 부탄올을 가하여 부탄올 분획추출물을 얻는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 한 구체예에 있어서, 보다 우수한 알도오스 환원 효소 억제 효과를 달성하기 위하여, 메틸렌클로라이드, 메탄올, 에틸아세테이트, 부탄올을 포함하는 군에서 선택된 1종 이상으로 분획하여 얻어진 것일 수 있다.

보다 바람직하게는, 상기 분획추출물은 상기 얻어진 추출물을 상기 에틸아세테이트 및 부탄올을 포함하는 군에서 선택된 1종 이상을 극성 순으로 적용하여 각 적용 시마다 얻어지는 분획추출물들을 포함하는 군에서 선택된 것일 수 있다. 예컨대, 상기 메탄올 추출물을 에틸아세테이트로 분획하여 얻어진 에틸아세테이트 분획추출물, 상기 에틸아세테이트 분획추출물을 분리하고 남은 수가용성 분획부를 부탄올로 분획하여 얻어진 부탄올 분획추출물 및 상기 부탄올 분획추출물을 분리하고 남은 수가용성 분획추출물을 포함하는 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있다. 보다 바람직하게는, 상기 분획 과정을 3회 반복할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0018] 짚신나물은 다년생 숙근초로 장미과에 속하며, 북반구 온대와 브라질 및 남아메리카 등에 10여종이 분포하는 것으로 알려져 있다. 우리나라의 경우에는 야산의 길가, 들판 등에 흔히 자라며, 선학초, 용아, 용아초, 황아초, 황용초, 지선초 등으로 부르기도 한다. 키는 15~60㎝쯤 자라고 전체 흰 털이 있으며 버들잎 모양 또는 긴 타원꼴의 쪽잎이 어긋나게 붙는다. 6~8월에 꽃대 위에 노란색의 작은 꽃이 모여서 핀다. 전통적으로 민간요법, 녹즙 등으로 널리 이용되어 왔고, 폐암, 간암, 식도암, 종양, 통증제거, 지혈, 지사, 토혈, 혈토, 자궁출혈, 열기 등의 약용으로 널리 이용되어 왔다. 최근에는 짚신나물 추출물로부터 많은 물질들이 제약원료, 건강식품, 산채, 식물성 영양제 등으로 쓰여지고 있으며 Vitatmin K, 탄닌, 정유, luteolin-7--glucosidase, apigeni-7--glucosidase, 페놀성배당체, agrimoniin, agrimonolide 등이 알려져 있으며 특히 agrimoniin의 항암효과가 잘 알려져 있다.

[0019] 또한, 짚신나물 추출물을 포함하는 항노화 화장품(일본 특허등록제10,226,617호), 항암효과(ACS Symp. Ser. 662, pp245-259, 1997), 미백효과 (일본 특허등록 제8,175,957호) 에 대한 연구가 보고되어 있으나, 상기 문헌 어디에도 짚신나물 추출물이 알도오스 환원 효소 억제 효과를 갖는 특성에 대해서는 개시되고 있지 않다.

[0020] 본 발명의 짚신나물 추출물은 그 형태에 특별한 제한이 없으며, 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있고, 짚신나물의 꽃, 잎, 가지, 뿌리나 이의 분쇄물에 추출용매를 가함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다. 또한, 구체적으로는 냉침추출법, 온침추출법, 열추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.

[0021] 또한, 상기한 바와 같이 제조된 추출물은 이후 감압 여과과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다. 따라서, 본 발명에서의 짚신나물 추출물은 통상적 방법으로 건조된 건조물과 통상적 방법으로 농축된 농축물을 포함하는 의미로 사용된다.

[0022] 본 발명의 조성물은 유효성분인 짚신나물 추출물 및/또는 분획물 외에, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다. 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 짚신나물의 추출물 또는 분획물 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위에서 추가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 상기 조성물 내의 상기 짚신나물 추출물 및/또는 분획물의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50중량%인 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0024] 상기 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0025] 상기 조성물을 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 고형 제제는 적어도 한 가지 이상의 부형제 및/또는 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구투여를 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, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.

[0026] 상기 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 보다 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물의 투여량은 유

효성분을 기준으로 1일 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg으로 하는 것이 좋으나 이에 제한되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 유효성분의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0027] 또 다른 예에서, 짚신나물 추출물 및/또는 분획물은 당뇨 및 당뇨합병증의 예방 및/또는 개선용 조성물을 포함한 식품으로 제공되는 것이 가능하다. 상기 식품의 예로서 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실,채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 음료, 식품첨가제 또는 음료첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0028] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0029] 또한, 상기 식품에 있어서, 상기 짚신나물 추출물 및/또는 분획물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 식품이 음료인 경우에는 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0031] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 짚신나물로부터 분리한 조성물 및 분획추출방법에 관한 것으로, 1차적으로 메틸렌클로라이드로 추출하고 여과 잔사를 100% 메탄올로 추출한 후 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하며, 2차적으로 100% 메탄올로 추출하고 남은 여과 잔사를 50% 메탄올로 추출한 후 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하는 과정을 포함한다. 이러한 일련의 과정을 통해 얻은 조성물은 알도오스 환원 효소 억제를 통해 NF-kB를 포함한 염증성 시토카인을 억제시킴으로써 당뇨, 백내장, 결장암, 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환의 치료 및 예방에 이용 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 짚신나물을 추출 및 순차분획하는 공정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 실시예 1로부터 얻어진 짚신나물 추출물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 실시예 2로부터 얻어진 짚신나물 분획추출물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 3로부터 얻어진 짚신나물 분획추출물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것을 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0035] **실시예 1: 시료 제조 1**

[0036] 건조된 짚신나물 10kg에 메틸렌클로라이드 167 L를 가하고, 상온에서 4 일간 추출한 다음 이를 여과하여 메틸렌클로라이드 추출물 및 제 1 여과 잔사를 얻었다. 얻어진 제 1 여과 잔사를 100% 메탄올에 동일 조건으로 추출한 다음, 이를 여과하여 100% 메탄올 추출물 및 제 2 여과 잔사를 얻었고, 얻어진 제 2 여과 잔사에 50% 메탄올을 가하여 동일 조건으로 추출한 다음, 이를 여과하여 50% 메탄올 추출물을 얻었다. 얻어진 메틸렌클로라이드 추출물, 100% 메탄올 추출물, 50% 메탄올 추출물을 각각 40℃ 이하에서 감압 농축한 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물을 얻었다.

[0037] **실시예 2: 시료 제조 2**

[0038] 상기 시료의 제조 예 1에서 얻은 3개의 짚신나물 추출물 중 100% 메탄올 추출물 1.0kg에 증류수 2.5L를 가하여 현탁하고, 에틸아세테이트 2.5L를 가하여 혼합한 후 에틸아세테이트 가용성 분획부 및 수가용성 분획부로 분리하였다. 동일 과정을 3회 반복하여 에틸아세테이트 가용성 분획부만을 모은 후 이를 감압 건조하여 분말형태의 에틸아세테이트 가용성 분획추출물을 얻었다. 분획 후 남은 잔사에 부탄올 2.5L를 가하고 동일 과정을 3회 반복하고, 이를 감압 건조하여 분말 형태의 부탄올 가용성 분획추출물 및 수가용성 분획추출물을 얻었다.

[0039] **실시예 3: 시료 제조 3**

[0040] 50% 메탄올 추출물 0.7kg에 증류수 2L를 가하여 현탁하고, 에틸아세테이트 2L를 가하여 혼합한 후 에틸아세테이트 가용성 분획부 및 수가용성 분획부로 분리하였다. 동일 과정을 3회 반복하여 에틸아세테이트 가용성 분획부만을 모은 후 이를 감압 건조하여 분말형태의 에틸아세테이트 가용성 분획추출물을 얻었다. 분획 후 남은 잔사에 부탄올 2L를 가하고 동일 과정을 3회 반복하고, 이를 감압 건조하여 분말 형태의 부탄올 가용성 분획추출물 및 수가용성 분획추출물을 얻었다.

[0041] **실험예 1: HPLC를 이용한 추출물 및 분획추출물 확인**

[0042] HPLC의 컬럼은 에질런트 이클립스 XDB-페닐 (Agilent Eclipse XDB-Phenyl) 4.6x150mm를 사용하였다. HPLC 방법은 하기 표 1에 기재된 바와 같으며, 유량(Flow rate)은 0.7㎖/분, 컬럼 온도는 30℃, 주입량은 10㎕, UV 디텍터는 254nm로 하였다.

표 1

[0043]

시간 (분)	%A	%B
	물(+0.1% 트리플루오로아세틸(TFA))	메탄올
0	80	20
3	70	30
10	60	40
20	50	50
25	40	60
35	0	100
40	80	20
50	80	20

[0045] 도 2에 기재된 HPLC 결과는 실시예 1에 따라 추출한 메틸렌클로라이드 추출물, 100& 메탄올 추출물, 50% 메탄올 추출물을 확인한 것으로, 메틸렌클로라이드 추출물은 비극성 물질이며, 그 여과 잔사로부터 나온 100& 메탄올 추출물, 50% 메탄올 추출물은 극성 물질임을 확인할 수 있었다.

[0046] 도 3에 기재된 HPLC 결과는 실시예 2에 따라 100% 메탄올 추출물을 극성에 따라 순차적으로 분획한 에틸아세테이트 분획추출물, 부탄올 분획추출물, 수가용성 분획추출물을 확인한 것이다.

[0047] 도 4에 기재된 HPLC 결과는 실시예 3에 따라 50% 메탄올 추출물을 극성에 따라 순차적으로 분획한 에틸아세테이트 분획추출물, 부탄올 분획추출물, 수가용성 분획추출물을 확인한 것이다.

[0048] **실험예 2: 알도오스 환원 효소의 분리 및 정제**

[0049] 무게가 250-300g 넘는 래트(Sprague-Dawley rat; 수컷, 중앙실험동물센터)의 수정체(lens)를 적출하여 인산 나트륨 (sodium phosphate, pH 6.2) 완충액 0.1M을 첨가 한 후 균질화 하였다. 균질화 된 시료를 4℃에서 10,000 rpm으로 20분 동안 원심 분리(centrifuge UNION 55 R Hanil, Korea) 한 후 그 상등액을 -20℃에서 보관하며 사용하였다.

[0050] **실험예 3: 알도오스 환원 효소 저해활성 측정**

[0051] 알도오스 환원 효소 저해 활성 억제능은 Haymanh와 Kinoshita가 사용한 방법을 변형하여 실험을 수행하였다. 340nm에서 NADPH의 흡광도 변화를 분광 광도계 (spectrophotometer)로 측정하는 방법을 사용하였고 효소 활성도 1unit는 4분 동안 1μmol NADPH를 소모시키는 효소의 양으로 정하였다(Hayman S, Kinoshita JH. 1965.

Isolation and properties of lens aldose reductase. J. Biol. Chem.240(2): 877-882). 0.1 M 인산 나트륨 완충액(pH 6.8) 440㎕에 상기 준비한 효소원 180 ㎕와 1.6 mM NADPH(Applichem, Germany) 90 ㎕, 시료 (실시예 2 및 실시예 3)에서 얻어진 추출물 및 분획추출물, 10 ㎍/mL) 9 ㎕를 넣어주고, 마지막으로 4 M 황산암모늄과 0.1M DL-글리세르알데하이드(DL-Glyceraldehyde, Sigma, USA) 각 90㎕를 넣어주었다.

[0052] 여기서 DL-글리세르알데하이드(DL-Glyceraldehyde, Sigma, USA)는 기질로서 작용한다.

[0053] 큐벳 내부에서 4분 동안 반응시켜 340nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 큐벳 내부에서 4분 동안 반응시켜 0s와 240s에서의 흡광도 값으로 샘플처리군의 흡광도 값을 계산하였다.

[0054] 계산식1 ={0s에서의 흡광도 값-240s에서의 흡광도 값)/반응 시킨 시간}

[0055] 상기 계산식 1에서 얻어진 흡광도 값을 이용하여 아래의 계산식으로 억제율을 구하였다.

[0056] 계산식 2={(대조군-샘플처리군)/(대조군-블랭크)}*100

[0057] (대조군: 약물을 넣지 않은 상태에서 효소와 기질을 넣은 것, 블랭크: 기질을 뺀 나머지를 모두 넣은 상태)

[0058] 또한, 알도스 환원 효소 억제효과가 있다고 알려진 대조 물질로 퀘르세틴 (Quercetin, Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA))을 사용하여 상기와 같은 방법으로 처리하여 흡광도의 감소율을 측정하여 실시예 2 및 실시예 3에서 제조된 짚신나물 추출물과 분획추출물의 결과와 비교하였다.

[0059] 상기 얻어진 결과를 표1에 나타내었다. 대조군과 실시예1, 실시예 2 및 실시예 3으로부터 얻어진 시료에서 측정된 흡광도의 값을 이용하여 억제율을 계산한 결과, 짚신나물 추출물의 경우 50% 메탄올 추출물이 61.38±0.01%로 억제능을 나타내었고 분획추출물 중 50% 메탄올 추출물의 부탄올(EtOAc) 분획층이 106.74±0.18%로 분획추출물 중 가장 높은 억제능을 나타내었다.

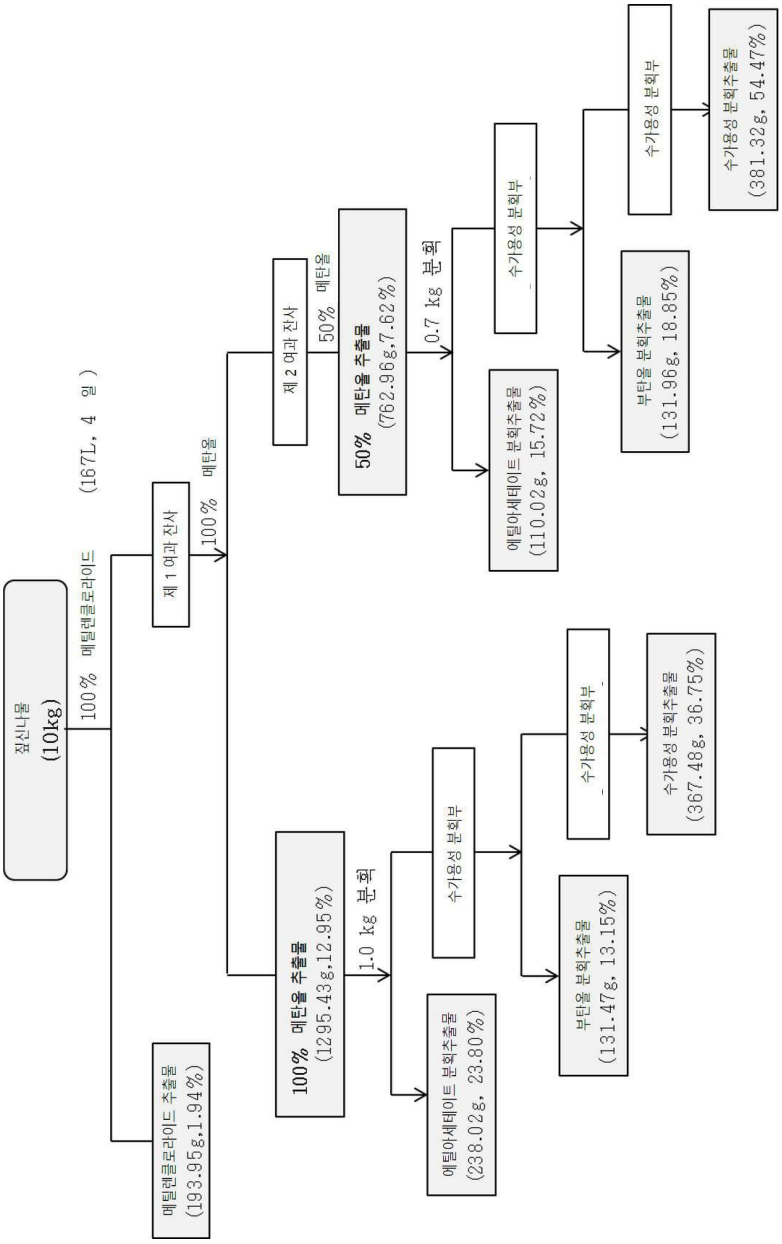
표 2

[0060] 표2. 짚신나물 추출물 및 분획추출물의 알도오스 환원 효소 저해 활성 효과

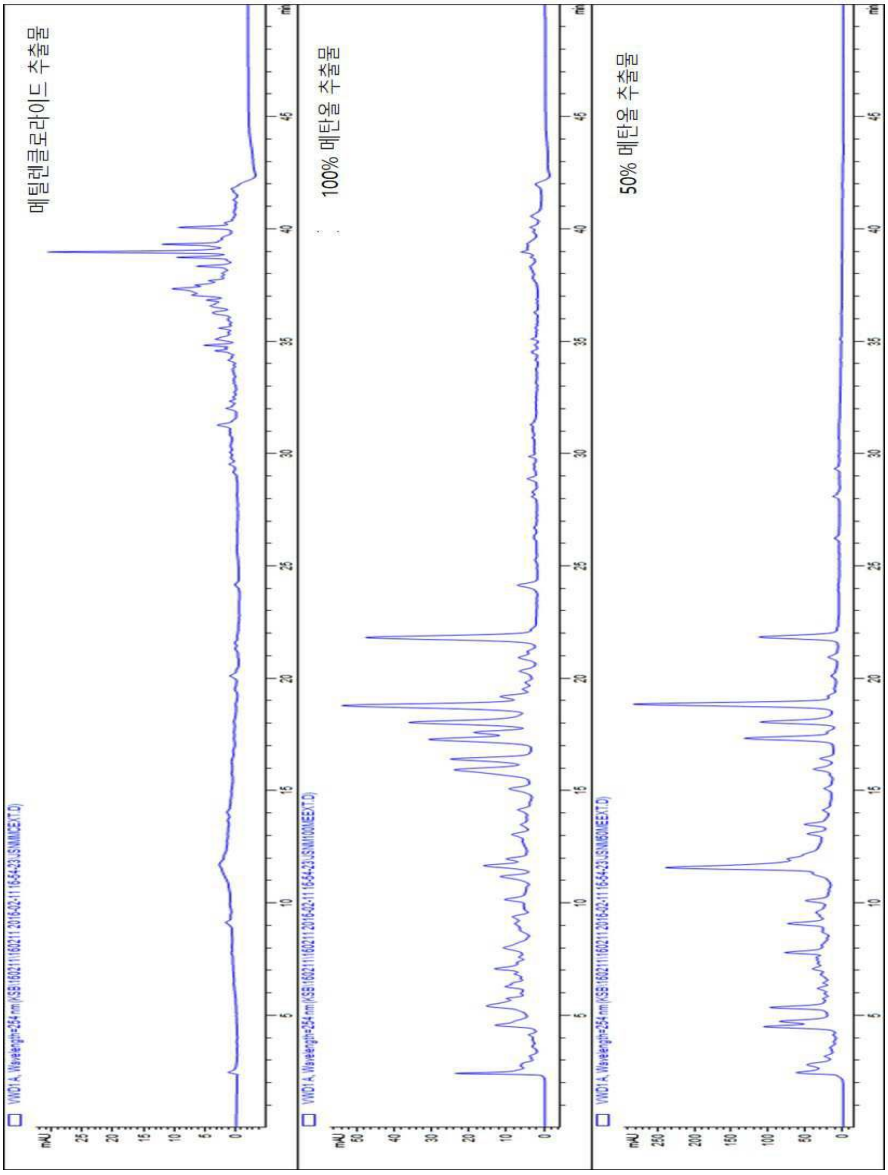
추출물 및 분획추출물 (10ug/ml)		알도오스 환원효소 억제율 (%)
메틸렌클로라이드 추출물		7.28±0.17
100% 메탄올 추출물	100% 메탄올 추출물	48.21±0.01
	에틸아세테이트 분획추출물	94.09±0.01
	부탄올 분획추출물	92.33±0.18
	수가용성 분획추출물	24.42±0.17
50% 메탄올 추출물	50% 메탄올 추출물	61.38±0.01
	에틸아세테이트 분획추출물	93.13±0.73
	부탄올 분획추출물	106.74±0.18
	수가용성 분획추출물	45.14±0.55
대조군: 퀘르세틴(Quercetin, 1ug/ml)		49.13±0.1

도면

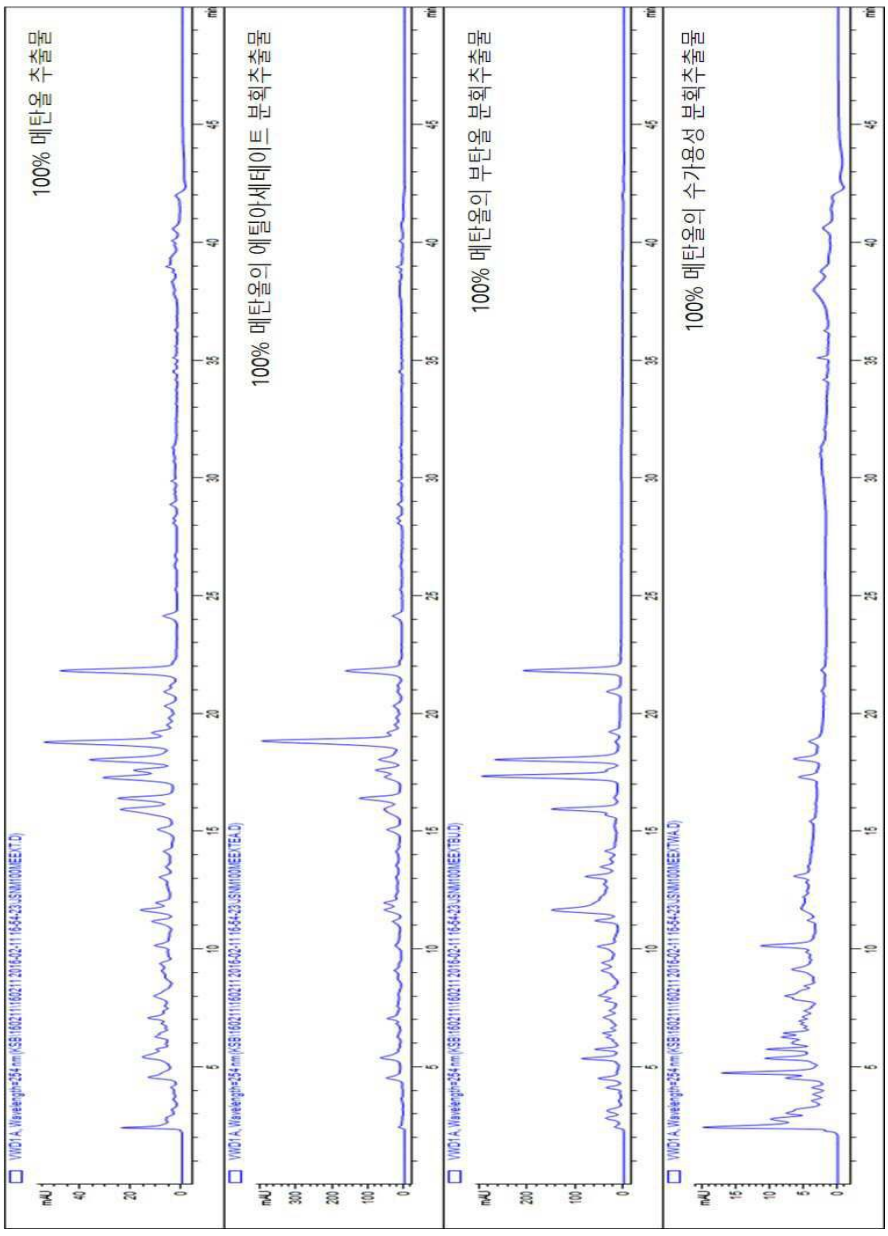
도면1


잚신나물
(10kg)
100% 메틸렌클로라이드 (167L, 4 일)
메틸렌클로라이드 추출물
(193.95g,1.94%)
제 1 여과 잔사
100% 메탄올
100% 메탄올 추출물
(1295.43g,12.95%)
1.0 kg 분획
에틸아세테이트 분획추출물
(238.02g, 23.80%)
수가용성 분획부
부탄올 분획추출물
(131.47g, 13.15%)
수가용성 분획부
수가용성 분획추출물
(367.48g, 36.75%)
제 2 여과 잔사
50% 메탄올
50% 메탄올 추출물
(762.96g,7.62%)
0.7 kg 분획
에틸아세테이트 분획추출물
(110.02g, 15.72%)
수가용성 분획부
부탄올 분획추출물
(131.96g, 18.85%)
수가용성 분획부
수가용성 분획추출물
(381.32g, 54.47%)

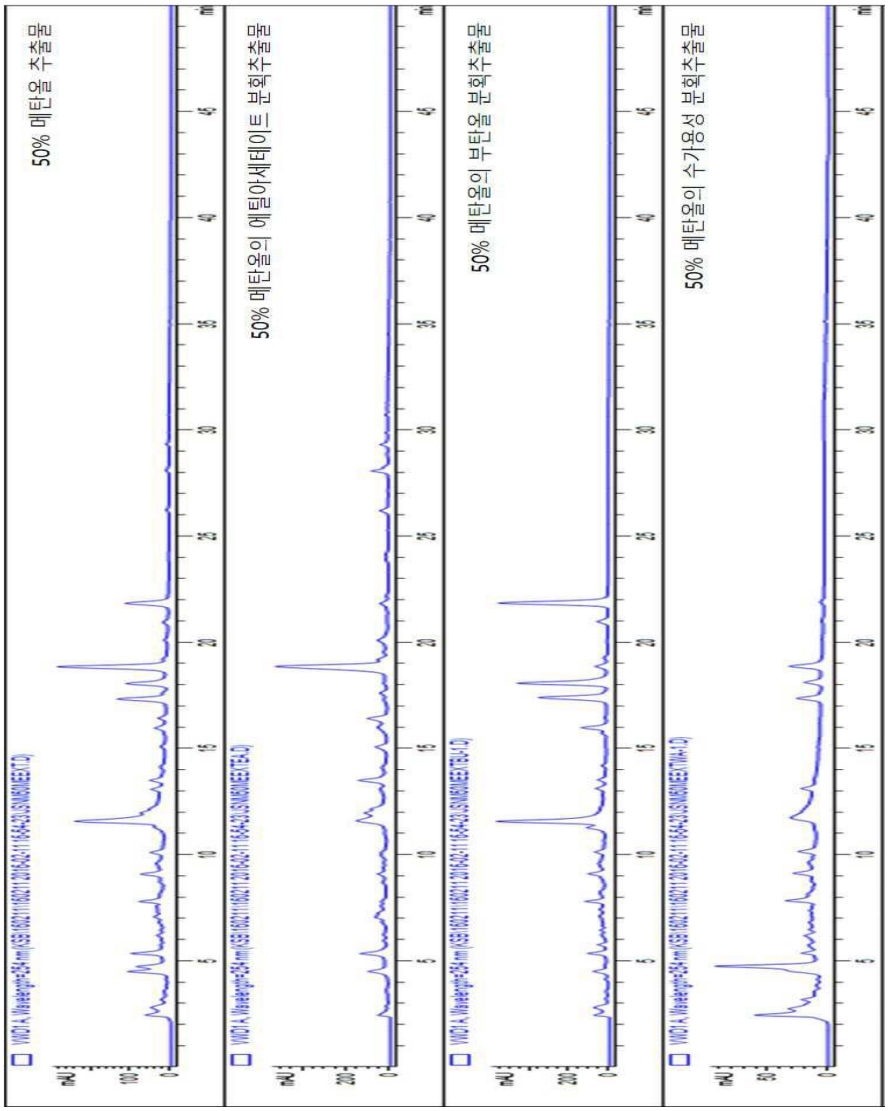
도면2



도면3


100% 메탄올 추출물
100% 메탄올의 에틸아세테이트 분획추출물
100% 메탄올의 부탄올 분획추출물
100% 메탄올의 수가용성 분획추출물

도면4


50% 메탄올 추출물
50% 메탄올의 에틸아세테이트 분획추출물
50% 메탄올의 부탄올 분획추출물
50% 메탄올의 수가용성 분획추출물