



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0042953
(43) 공개일자 2013년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/536 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0107133
(22) 출원일자 2011년10월19일
심사청구일자 2011년10월19일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 춘주로 174, 102동 401호 (퇴계동, 그린타운아파트)
김진규
강원도 춘천시 승지골길16번길 47, 퇴계 1005동 1103호 (퇴계동, 뜨란채아파트)
이홍매
강원도 춘천시 한림대학길 1, 학생생활관 팔봉재 204호 (옥천동, 한림대학교)

(74) 대리인
김문재, 이종승, 권형중

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 억제 효과를 가지는 조성물

(57) 요약

본 발명은 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 억제 효과를 가지는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 억제 효과를 가지는 조성물은 최종당산화물 합성을 억제하여 항노화 및 당뇨합병증을 예방 및 치료할 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-04
부처명	지식경제부
연구사업명	지역혁신센터(RIC)사업
연구과제명	GGI-100EMX의 향당뇨 기능성 식품 개발인증 원료 및 제품의 개발
주관기관	한림대 산학협력단
연구기간	2011.03.01 ~ 2012.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 합성 억제 효과를 가지는 약학조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 하고초 추출물이 물로 추출한 것임을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 약학조성물이 조성물 총 중량에 대하여 하고초 추출물을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 약학조성물이 최종당산화물 합성을 억제하여 항노화 및 당뇨합병증을 예방 및 치료하는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 약학조성물이 알츠하이머병, 요독증, 미세혈관병, 거대혈관병, 백내장 또는 파킨슨병으로부터 선택된 질병을 예방 및 치료하는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 약학조성물이 산제, 과립제, 전제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸로 구성되는 군으로부터 선택된 경구형 제형인 약학조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 약학조성물이 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 제형인 약학조성물.

청구항 8

하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 합성 억제 효과를 가지는 식품조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 식품조성물이 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 형태인 식품조성물.

명 세 서

기술분야

본 발명은 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 억제 효과를 가지는 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 당뇨병은 인슐린의 부족으로 혈액 중의 포도당(혈당)이 정상인보다 그 농도가 높아져서 소변에 포도당을 배출하는 만성질환으로서, 당뇨병에 병발하는 질환에는 당뇨병 이외의 거의 모든 질환이 있다고 해도 좋을 정도로 많다. 당뇨병에 의해 체내 혈당량이 높아진 상태가 장기간 계속됨으로써 당화산물이 신장, 신경, 망막과 전신의 크고 작은 혈관들을 침범하면서 만성 합병증이 발병하는데, 당뇨합병증의 약 반수 이상이 당뇨병성 망막병증이며 성인 실명의 가장 큰 발병 원인이며, 증세로는 시력장애, 녹내장, 시력상실 등이 있다. 당뇨합병증을 유발하는 기전으로는 크게 단백질의 비효소적 당화반응(non-enzymatic glycation of protein)과 폴리올 경로(polyol pathway)의 기작 변화에 의한 삼투압 스트레스 및 자유 라디칼에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress) 등으로 설명되고 있다.
- [0003] 알도스 환원효소는 망막, 공막, 렌즈, 신장, 적혈구, 뇌, 근육, 간 및 말초신경 등에 존재하는데, 특히 말초신경에서는 포도당 투과가 인슐린에 의하여 영향을 받지 않기 때문에 문제가 될 수 있다. 즉, 고혈당 시 슈만세포에 소르비톨이 과다 축적되면 이로 인하여 삼투압이 증가하여 수초(myelin sheath)의 부종, 괴사 및 붕괴가 발생할 수 있고, 지속적으로 증가한 삼투압으로 인하여 수분이 인입되어 당뇨병 합병증으로 진행된다.
- [0004] 폴리올은 알도스(aldose)나 케토스(ketose)로부터 알도스 환원효소(aldose reductase; AR)에 의해 환원된 알코올을 의미하며, 일반적으로 포도당이 세포내로 들어오게 되면 헥소키나제에 의하여 6-인산포도당으로 전환된 다음 해당경로를 거쳐 분해된다.
- [0005] 포도당의 농도가 증가하는 경우 이에 결합하는 헥소키나제가 포화되어 여분의 포도당은 헥소키나제에 비하여 친화성이 낮은 알도스 환원효소에 결합하여 소르비톨로 대사됨으로써 세포내에는 소르비톨이 축적된다.
- [0006] 소르비톨(sorbitol) 합성과정에는 알도스 환원효소와 소르비톨 디하이드로게네이즈(sorbitol dehydrogenase)의 두 효소가 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 효소들은 말초신경, 망막, 각막, 홍채, 수정체, 신장, 적혈구 등의 신체 각 조직에 존재한다. 알도스 환원효소는 소르비톨 합성과정의 첫 반응을 일으키는 효소로서 NADPH를 조효소로 이용하여 포도당(glucose)을 소르비톨로 전환시켜 주는 반응제어 효소(rate limiting enzyme)이다. 일단 소르비톨이 생성되면 폴리올 디하이드로게네이즈에 의해 소르비톨은 과당(fructose)으로 전환된다. 생리학적인 조건하에서는 이 두 효소에 의한 합성의 흐름은 대부분의 조직에서는 서로 평형을 이루고 있다.
- [0007] 대부분의 조직에서는 소르비톨의 축적량이 거의 무시할 정도이며, 포도당에 대한 알도스 환원효소의 친화력은 헥소키나제(hexokinase)보다 더 낮고 대부분의 세포 내 포도당은 인산화되기 때문에 소르비톨의 형성속도는 낮아지게 된다. 따라서, 당뇨병 환자의 경우에 있어서, 혈액 내의 포도당의 농도가 더 증가하게 되면 알도스 환원효소가 활성화되어 과도하게 포도당을 소르비톨로 환원시키고, 이 소르비톨이 소르비톨 디하이드로게네이즈(sorbitol dehydrogenase)에 의해 과당으로 전환되며 포도당에 비하여 단백질의 비효소적 당화반응의 속도가 약 10배 정도 빠르기 때문에, 고농도의 과당이 단백질과 결합하여 결국은 최종당화산물의 형성을 가속화시킨다.
- [0008] 폴리올 경로에 의해 생성된 폴리올은 세포막을 쉽게 투과하지 못하기 때문에 세포 내에 이 대사물질의 농도가 증가하게 되고, 그 결과 몰삼투압 농도의 증가를 야기시킨다. 고혈당으로 인한 알도스 환원효소 활성화는 과다한 기질 공급으로 인해 소르비톨 축적이 일어나게 하여 삼투 조절 체계를 교란시킨다. 소르비톨 축적에 의한 삼투 스트레스(osmotic stress)를 완화시키기 위해 다른 대체 삼투물질(osmolyte)의 보상성 하향조절이 일어나게 되어 삼투물질 결핍이 발생한다. 또한, 알도스 환원효소 활성화는 산화스트레스를 악화시켜 세포내 미요이노시톨과 타우린의 결핍을 초래하기도 하다. 이는 산화스트레스가 Na^+ -미요이노시톨 콘트랜스포터(Na^+ -myoinositolcontransporter)와 타우린 트랜스포터(taurine transporter)를 직접 하향 조절하거나, 소듐-포타슘 아데노신 트리포스파테이즈(sodium-potassium adenosine triphosphatase, ATPase)에 의한 소듐-경사의 방해를 통해 간접적으로 작용해서 미요이노시톨의 세포내 결핍을 초래한다. 이는 수정체 및 말초신경 등 비교적 고농도의 소르비톨이 축적되는 조직의 합병증 유발기전으로 유력하다. 이들 조직에서는 소르비톨의 농도가 높음에도 불구하고 지속적으로 AR을 발현하여 소르비톨의 축적을 더욱 진행시키게 된다. 따라서, 신경조직 내에서는 다양한 대사과정의 변이, 전기생리학적 변화, 신경조직에서의 에너지 소비의 감소, 신경조직에서의 변화 등이 일어나게 된다.
- [0009] 또한 알도스 환원효소와 소르비톨 디하이드로게네이즈에 의해 소르비톨과 프룩토오스의 축적에 의해 야기된 삼투압(osmolality) 증가가 수정체 섬유(lens fiber) 내로 수분이 인입되어 팽윤되는 현상을 초래한다. 이는 렌즈내 정상적으로 보유되어 있는 물질에 대한 투과성을 증가시켜 K^+ , 아미노산, 글루타치온, 이노시톨, ATP의 농도

가 감소되는 반면, Na^+ , Cl^- 이온이 서서히 증가하게 된다. 이 과정이 진행됨에 따라 증가된 두 이온이 전해질 변화를 초래하게 되어 이차적 삼투변화를 야기시켜 결국 수정체 팽윤(lens swelling)을 일으킨다. 렌즈 막이 큰 단백질을 제외한 모든 물질에 대한 투과성을 증가시켜 결국 조밀 핵 백내장(dense nuclear cataract)을 가져오게 된다. 렌즈내 정상적으로 높은 K^+/Na^+ 비율이 단백질 합성을 유도하게 되는데, 상기의 생화학적 변화에 의해 당 백내장(sugar cataract)에서는 세포내 K^+ 농도가 감소하고 Na^+ 농도가 증가하여 단백질 합성을 저하시키게 된다. 또한 적혈구내에서도 당대사관련 대사물질(sorbitol)과 매개체(AR, SDH)들은 간접적인 당뇨병 합병증들의 진행의 지표가 될 수 있다. 임상연구보고에 의하면 적혈구 소르비톨 농도 및 적혈구 소르비톨/혈장 글루코오스 비는 당뇨병군에서 정상 대조군과 비교하여 유의적으로 높게 나와 이들 지표를 당뇨병의 진단 방법으로 이용할 수 있을 것으로 보고되었다. 적혈구 소르비톨, 적혈구 소르비톨/혈장 글루코오스 비율 및 AR 등의 당대사관련 인자들을 평가함으로써 당뇨병 환자의 향후 합병증 발생의 예측, 예후 추정에 활용될 수 있다. 또한 소르비톨의 세포내 축적이 당뇨망막병증을 유발시키는 원인으로 알려져 있다. 인슐린 비의존성 당뇨환자의 당뇨망막병증의 진행은 적혈구내 소르비톨 수치보다는 지속기간이 더 중요하며 소르비톨 수치가 정상치보다 높은 시기에 알도스 환원효소 억제제를 조기 사용하는 것이 당뇨망막병증의 예방 및 치료에 효과적일 수 있다는 임상연구가 보고되었다.

[0010] 최종당화산물이 사람의 미세혈관 내피세포에서 폴리올 경로의 주효소인 알도스환원효소(AR)를 활성화시키는 것이 보고된 바 있다. 정상상태에서는 알도스환원효소가 포도당에 대하여 친화력이 매우 낮지만, 고농도의 포도당에서는 알도스환원효소가 활성화되어 과도하게 포도당을 소르비톨로 환원시키고, 이 소르비톨이 소르비톨탈수소효소에 의해 과당으로 전환된다. 이 과당은 포도당에 비하여 단백질의 비효소적 당화반응의 속도가 약 10배 정도 빠르다. 따라서, 고농도의 과당이 단백질과 결합하여 결국은 최종당화산물의 형성을 가속화시킨다. 단백질의 비효소적 당화반응(noenzymatic glycation of protein)이란, 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당이 효소 작용 없이 축합반응 즉 밀리아드 반응에 의한 것으로, 이 반응의 결과로 최종당화산물(advanced glycation endproducts, AGEs)이 생성된다. 단백질의 비효소적 당화반응은 (1)단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당의 알데히드 또는 케톤이 효소 작용 없이 친핵성 첨가 반응을 하여 초기 단계 산물인 슈프염기(schiff base)를 형성하고, 상기 슈프염기와 인접한 케토아민 어닥트(ketoamine adduct)가 서로 축합하여 가역적인 아마도리형의 초기당화산물이 생성되는 단계와 (2) 고혈당 상태가 지속되어 가역적인 아마도리형의 초기당화산물이 분해되지 않고 재배열(rearrangement)되고 단백질과 교차결합(cross-linking)하여 비가역적인 최종당화산물이 생성되는 단계로 나눌 수 있다. 가역적인 아마도리형의 초기당화산물과 달리 최종당화산물은 비가역적인 반응 산물이므로, 일단 생성되면 혈당이 정상으로 회복되어도 분해되지 않고 단백질 생존기간동안 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시킨다. 이처럼 비효소적 단백질 당화반응에 의하여 기저막, 혈장 알부민, 수정체 단백질, 피브린, 콜라겐 등의 단백질에서 당화가 일어나며, 생성된 최종당화산물이 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시켜 당뇨병 망막병증(retinopathy), 당뇨병 백내장(cataract), 당뇨병 신증(nephropathy), 당뇨병 신경병증(Neuropathy) 등의 만성 당뇨합병증을 유발시킨다.

[0011] 이와 같이 폴리올 경로, 비효소적 당화반응 및 산화적 스트레스(oxidative stress) 작용 기전들이 서로 연관되어 당뇨합병증을 유발시킨다. 따라서, 당뇨합병증의 발병을 지연하거나 예방 또는 치료하기 위해서는 알도스 환원효소 및 최종당화산물의 형성을 억제하는 것이 매우 중요하다. 지금까지 알려진 알도스 환원효소 저해제로는 소르비닐(sorbinil), 알레스타틴(alrestatin), 에팔레스타트(epalrestat), 포날레스타트(ponalestat), 톨레스타트(tolrestat) 등이 대표적이고, 단백질 당화 억제제로는 아미아미노구아니딘·HCl(aminoguanidine·HCl) 등이 대표적이다.

[0012] 알도스 환원효소제는 알도스 환원효소에 결합하므로 포도당을 소르비톨로 전환시키는 것을 저해함으로써 미요이노시톨의 감소와 sodium- potassium ATPase의 손상을 막으며 포도당과 상호작용하는 위치와는 다른 위치에서 알도스 환원효소와 반응하여 알도스 환원효소에 대한 비경쟁적 저해반응(noncompetitive inhibition)을 일으킨다. 아미노구아니딘은 친핵성 드라진(hydrazine)으로 아마도리 산물과 결합하여 단백질과의 교차결합을 방지함으로써 최종당화산물의 생성을 억제하여 합병증으로 진전되는 것을 지연 또는 방지한다.

[0013] 이 외에 수많은 저해제들이 개발되어 합성되어 오고 있지만 장기간 투여시 독성이 유발되는 문제점이 있어 보다 안전한 새로운 저해제에 대한 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 억제 효과를 가지는 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 합성 억제 효과를 가지는 약학조성물을 제공한다. 본 발명의 바람직한 구체예에서 하고초 성분은 물로 추출되며, 약학조성물은 조성물 총 중량에 대하여 하고초 추출물을 0.1 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에서, 약학조성물은 최종당산화물 합성을 억제하여 항노화 및 당뇨합병증을 예방 및 치료하고, 알츠하이머병, 요독증, 미세혈관병, 거대혈관병, 백내장 또는 파킨슨병으로부터 선택된 질병을 예방 및 치료할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명의 약학조성물은 산제, 과립제, 전제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸로 구성되는 군으로부터 선택된 경구형 제형이거나, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 제형일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 합성 억제 효과를 가지는 식품조성물이 제공되며, 상기 식품조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 형태일 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 상기한 과제 해결 수단에 의한 본 발명에 따르면, 본 발명은 하고초 추출물을 유효성분으로 함유하는 최종당산화물 억제 효과를 가지는 조성물을 제공하며, 본 발명의 조성물은 최종당산화물 합성을 억제하여 항노화 및 당뇨합병증을 예방 및 치료할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0021] 실시예 1. 하고초 활성성분 분리를 위한 추출 및 분획
- [0022] 건조된 하고초 시료 1kg을 물 20L를 이용하여 95에서 2시간 추출하여 농축 후 동결건조하여 60g의 추출물을 얻었다. 추출물을 물에 현탁한 후 용매분획하여 헥산 분획물(2.6g), CH_2Cl_2 분획물(5.2g), 에틸아세테이트 분획물(12.03g), 부탄올 분획물(20.1g) 및 물 분획물(18.7g)을 얻었다.
- [0023] 구체적으로 용매분획은 동결건조하여 얻은 추출물 60g에 물을 넣어 용해시킨 후 헥산과 함께 분획깔대기에 넣고 흔든 후, 층을 분리시키고, 헥산 층을 제거한 다음, 나머지 물 층에 순서대로 CH_2Cl_2 , 에틸아세테이트, 부탄올 등을 순차적으로 넣고 추출하는 방법을 통해 그 용매에 녹는 성분을 얻는 과정을 통해 이루어진다.
- [0024] 실시예 2. 하고초 활성성분 분리를 위한 물질 분리 및 정제
- [0025] 하고초 분획물 중 알도스환원효소에 대한 억제 활성이 우수한 메틸렌클로라이드 분획물과 에틸아세테이트 분획물 각각 3 g씩 중압액체크로마토그래피(MPLC)를 이용하여 물질 분리하여 메틸렌클로라이드 분획물에서 화합물 5 (14.1 mg)와 6 (11.3 mg)을 에틸아세테이트 분획물에서 화합물 1 (34.8mg), 2 (33.1 mg), 3 (3.0 mg) 및 4 (30.7 mg)를 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 NMR, MS를 보고된 데이터와 비교하여 규명하였다.
- [0026] 메틸렌클로라이드 및 에틸 아세테이트 분획물의 중압 액체크로마토 그래피의 분리 조건은 아래의 표 1(하고초 메틸렌클로라이드 및 에틸아세테이트 분획물의 중압 액체크로마토그래피(MPLC) 분석조건)과 같다.

표 1

하고초 메틸렌클로라이드 및 에틸아세테이트 분획물의 중압 액체크로마토그래피 (MPLC) 분석조건

MPLC	Instrument	Buchi MPLC system
	Column size	Glass column 36(I.D) ×460(H)mm
	Packing Material (particle size)	Lichroprep RP-18 (25~40 μ m)
	Eluent condition	40% → 50% MeOH
	Flow rate	10ml/min
	wavelength	254nm
	Pressure	0~10 bar

[0027]

[0028] 실시예 3. 하고초 활성성분의 활성평가

[0029] 실시예 3-1. ABTS 자유라디칼 소거활성 효과 시험

[0030] ABTS (2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)-디아모늄 염, Fluka구입) 2 mM 농도로 3.5 mM 포타슘 퍼설파이트(potassium persulfate)와 혼합하여 3차 증류수 10 ml에 용해시켰다. 상기 얻어진 용액에 3차 증류수 290 ml를 첨가하여 30배 희석시킨 후, 하룻밤 동안 암소에 보관하여 ABTS 라디칼 생성을 유도하여, ABTS 라디칼 용액을 제조하였다. 하고초 추출물 및 화합물 10 μ l와 상기 제조된 ABTS 라디칼 용액 290 μ l를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 금불초 추출물의 라디칼 소거활성은 ABTS 라디칼을 50% 소거시키는데 필요한 농도를 계산하여 IC₅₀값으로 계산하였으며, 그 결과를 아래의 표 2(하고초 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능)와 표 3(하고초에서 분리된 성분의 ABTS⁺ 라디칼 소거능)에 나타내었다. 또한, ABTS 라디칼 소거제로 알려진 Trolox를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0031] 계산식 (ABTS 라디칼 소거율(%))={1-(Control/Sample)}*100

[0032] (control: ABTS와 용매(DMSO)만 있는 상태)

표 2

하고초 추출물 및 분획물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능

시료	농도($\mu\text{g/mL}$)	억제율(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Trolox ^{a)}	16.67	99.44	3.84
	3.33	45.48	
	1.67	21.76	
하고초 물 추출물	33.33	84.60	12.42
	16.67	63.67	
	8.33	33.98	
hexan분획물	33.33	14.73	-
메틸렌클로라이드 분획물	33.33	95.03	9.92
	16.67	69.59	
	8.33	43.36	
에틸아세테이트 분획물	8.33	96.99	2.59
	3.33	62.39	
	1.67	30.64	
부탄올 분획물	16.67	97.66	5.15
	8.33	71.54	
	3.33	31.36	
물 분획물	33.33	42.86	-

[0033]

표 3

하고초에서 분리된 성분의 ABTS⁺ 라디칼 소거능

시료	농도($\mu\text{g/mL}$)	억제율(%)	IC ₅₀ (μM)
Trolox	16.67	99.44	15.34
	3.33	45.48	
	1.67	21.76	
Caffeic acid (1)	3.33	75.14	12.03
	1.67	34.65	
	0.33	11.33	
Protocatechuic acid (2)	3.33	93.42	11.59
	1.67	53.79	
	0.33	14.90	
p-hydroxycinnamic acid (3)	8.33	74.05	5.94
	3.33	59.65	
	1.67	47.60	
Rosmarinic acid (4)	3.33	78.40	8.79
	1.67	36.50	
	0.33	9.93	
caffeic acid ethylene ester (5)	3.33	84.68	10.52
	1.67	50.17	
	0.33	13.00	
Protocatechualdehyde (6)	3.33	92.80	12.39
	1.67	52.73	
	0.33	13.73	

[0034]

[0035] 실시예 3-2. 알도스 환원효소 억제 효능 시험

[0036] 무게가 200g이 넘는 래트(Sprague-Dawley(SD) rats; 수컷, 12주령, 250~280g, 중앙실험동물센터]의 수정체 (lens)를 적출하여 그 안의 수정체의 습중량에 따라 0.05M의 소듐 버퍼(pH 6.8)를 수정체 1개당 250 μl 을 넣어

얼음 안에서 균질화시켰다. 이를 4℃, 7500rpm에서 30분간 원심분리(centrifuge UNION 55 R Hanil, Korea) 후, 그 상등액을 취하여 알도스 환원효소 시험의 효소원으로 사용하였다.

[0037] 알도스 환원효소(Aldose reductase) 활성 억제능은 Haymanh와 Kinoshita가 사용한 방법을 변형하여 실험을 수행하였다(Hayman S, Kinoshita JH. 1965. Isolation and properties of lens aldose reductase. J. Biol. Chem. 240(2): 877-882). 0.05M 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.0) 530 μ l에 상기 준비한 효소원 160 μ l와 1.6mM NADPH(Applichem, Germany) 100 μ l, 시료 (추출물 및 화합물, 1mg/mL) 10 μ l를 넣어주고, 마지막으로 0.1M DL-글리세르알데하이드(DL-Glyceraldehyde, Sigma, USA) 100 μ l를 넣어주었다. 큐벳내부에서 4.4 분 동안 반응시켜 340nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 큐벳내부에서 4.4분동안 반응시켜 0s와 280s의 흡광값으로 샘플의 흡광도값을 계산하였다.

[0038] 흡광도 값 = {0s에서의 흡광도 값-280s에서의 흡광도값}/반응시킨 시간}

[0039] 상기 계산식에서 얻어진 흡광도 값을 이용하여 아래의 계산식으로 억제율을 구하였다.

[0040] 억제율=((control-sample)/(control-blank))*100

[0041] (control: 약물을 넣지 않은 상태에서 효소와 기질을 넣은 것, blank: 기질을 뺀 나머지를 모두 넣은 상태)

[0042] 또한 알도스 환원효소 억제효과가 있다고 알려진 대조 물질로 퀘르세틴 (Quercetin, Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA))을 사용하여 상기와 같은 방법으로 처리하여 흡광도의 감소율을 측정하여 하고초 추출물 및 화합물의 결과와 비교하였다.

[0043] 50% 흡광도의 감소를 나타내는 각 시료의 농도 (IC₅₀)으로 표시하였고, 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하였으며, 그 결과를 아래의 표 4(랫드 수정체 알도스 환원효소에 대한 분획물의 억제 효능)와 표 5(알도스환원효소에 대한 화합물의 억제 효능)에 나타내었다.

표 4

랫드 수정체 알도스 환원효소에 대한 분획물의 억제 효능

시료	농도(μ g/mL)	억제율 (%)	IC ₅₀ (μ g/mL)
퀘르세틴(Quercetin)	10	75.33	1.53
	5	64.72	
	1	44.7	
물 분획물	10	36.18	-
헥산 분획물	10	33.94	-
디클로로 메탄 분획물	10	32.49	-
에틸아세테이트 분획물	10	87.33	2.99
	5	62.79	
	1	18.34	
부탄올 분획물	10	59.56	-
물 분획물	10	-	-

[0044]

표 5

알도스환원효소에 대한 화합물의 억제 효능

화합물	알도스환원효소 (랫드) (IC ₅₀ (μM))	알도스환원효소 (Human recombinant) (IC ₅₀ (μM))
Quercetin	5.66	19.23
caffeic acid (1)	-	-
protocatechuic acid (2)	-	-
p-hydroxycinnamic acid (3)	8.35	-
Rosmarinic acid (4)	2.77	18.62
caffeic acid ethylene ester (5)	3.2	12.58
Protocatechualdehyde (6)	-	-

[0045]

[0046] 실시예 3-3. 최종당화산물 (Advanced glycation end product, AGEs) 생성 억제 효과 시험

[0047] 50mg/ml BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma)와 5mM 메틸글리옥살 용액(Sigma)을 0.1 M 포스페이트 버퍼(pH7.4)에 녹였다. 또한, 0.02%(w/v) 소듐 아지드(sodium azide)를 넣어 반응기간 동안 박테리아 생성을 방지하였다. BSA와 메틸글리옥살 섞은 용액 1.5mL에 10mg/ml농도 금불초 추출물을 30ul를 넣어 37℃에서 5일 반응시킨 후, fluorescence spectrophotometer(Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 반응 전후의 형광 발광 정도(Excitation: 355 nm, Emission: 460 nm)를 측정하였다.

[0048] 흡광도의 억제율은 대조군의 발광도 증가값을 기준으로 시료의 발광도 증가값을 비교하여 계산하였다.

[0049] 억제율(%)={1-(S1-S0)/(C1-C0)}*100

[0050] (S0: toavmf 0 시간 발광도 반응값, S1: 샘플 24 시간 발광도 반응값, C0: control 0 시간 발광도 반응값, C1: control 24 시간 발광도 반응값)

[0051] (control: 약물을 넣지 않은 상태에서 BSA(5mg/mL)와 메틸글리옥살(2mg/mL)에 DMSO만 넣은 상태)

[0052] 또한, 최종당화산물에 억제효과가 있다고 알려진 양성대조군으로 아미노구아니딘 (aminoguanidine, Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA))을 사용하여 위와 같은 방법으로 발광도 억제율을 비교하였다.

[0053] 50% 흡광도의 감소를 나타내는 시료의 농도 (IC₅₀)으로 표시하였고, 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하였으며, 그 결과를 아래의 표 6(하고초 분획물의 최종당화산물 생성 억제 효능)과 표 7(하고초에서 분리된 화합물의 최종당화산물 억제 효능)에 나타내었다.

표 6

하고초 분획물의 최종당화산물 생성 억제 효능

시료	농도 (μg/mL)	최종당화산물 생성 억제율(%)	IC ₅₀ (μg/mL)
Aminoguanidine	196.08	66.85	143.92
	98.04	37.39	
	19.61	3.96	
하고초 물추출물	196.08	29.26	-
헥산 분획물	196.08	33.94	-
메틸렌클로라이드 분획물	196.08	54.03	186.72
	98.04	21.52	
	19.61	3.66	
에틸아세테이트 분획물	196.08	68.31	141.34
	98.04	37.36	
	19.61	4.92	
부탄올 분획물	196.08	40.47	-
물분획물	196.08	30.24	-

[0054]

표 7

하고초에서 분리된 화합물의 최종당화산물 억제 효능

시료	농도($\mu\text{g/mL}$)	억제율(%)	IC ₅₀ (μM)
	196.08	66.85	
Aminoguanidine	98.04	37.39	1944.86
	19.61	3.96	
caffeic acid (1)	19.61	9.33	-
protocatechuic acid (2)	19.61	-	-
p-hydroxycinnamic acid (3)	19.61	-	-
Rosmarinic acid (4)	19.61	20.67	-
	9.8	74.81	
caffeic acid ethylene ester (5)	4.9	33.94	33.16
	1.96	9	
Protocatechualdehyde (6)	19.61	9.85	304.36

[0055]

[0056]

실시에 3-4. 수정체내 갈락티톨 함량측정

[0057]

10주령의 랫드(rat)를 에테르로 마취시키고 수정체를 적출 하였다. 적출 후 15%의 FBS (Fetal Bovine Serum), 100 units/mL penicillin 및 0.1 mg/mL streptomycin이 포함된 TC-199 배지에 5mM glucose, 30mM의 갈락토오스를 첨가한다. 적출된 수정체에 모두 첨가한 media와 화합물 1mg/ml 농도를 50ul 첨가한다. 이 media는 24시간마다 교체를 하며, 6일 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양시켰다. 6일 후 150ul의 인산 버퍼(phosphate buffer)를 수정체에 넣은 후 분쇄한다. 그 후 11,000g 로 10분 동안 원심분리 한 후 상층액을 필터로 여과한다.

[0058]

상기 여과시킨 하층액 70 μl 를 벤조일화(benzoylation)에 사용하였다. 즉, 시료 70 μl 에 1M KH₂PO₄ 20 μl 와 3 μl 벤조일 클로라이드(benzoyl chloride) 및 8M NaOH를 첨가하고 볼텍싱(vortexing)하여 혼합한 뒤, 1.4 M H₃PO₄ 10 μl 를 넣어 중화시키고, 100 μl 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 넣어 볼텍싱(vortexing)하여 혼합한 후 원심분리하여 상, 하를 완전히 나누었다. 상기 상층액을 질소로 제거한 후, 아세토니트릴(acetonitrile)과 물 혼합액(70:30)으로 녹여 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 얻어진 결과를 표 8(화합물의 랫드 수정체와 적혈구내 갈락티톨 생성 억제 효과)에 나타내었다.

[0059]

실시에 3-5. RBC내 갈락티톨 함량 측정

[0060]

혈액 시료는 10 주령된 랫드(rat)에서 채취하여 헤파린이 함유되어 있는 폴리프로필렌 튜브에 담는다. 당과 당알코올 분석에 사용된 적혈구는 헤파린으로 처리한 후 혈장과 buffy coat를 2000g로 10 분동안 원심분리 하여 제거한 후 얻었다. 원심분리 후 상층부는 제거한 후 식염수로 3번 세척하였다. 얻어진 적혈구 1ml에 30mM Glucose포함하는 Kerbs-Ginger bicarbonate buffer(pH 7.4) 와 시료 5 μl 을 넣고 5% CO₂ 인큐베이터에서 37에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 적혈구를 차가운 식염수로 3회 세척하고 2,000g으로 10 분 동안 원심분리하였다. 차가운 6%(v/v) 퍼클로라이드산 3ml을 넣고, 4에서 2,000g으로 10 분동안 원심분리하여 얻어진 상층액에 2.5 M K₂CO₃를 넣어 중화시켰다. 중화시킨 상층액 70 μl 에 1M KH₂PO₄ 20 μl 와 3 μl 벤조일클로라이드 및 8M NaOH 넣고 볼텍싱하여 혼합하였다. 여기에 1.4 M H₃PO₄ 10ul를 넣어 중화시킨 후, 100ul 에틸아세테이트를 넣어 볼텍싱한 후 원심분리하여 상층액을 질소로 날린 후, 아세토니트릴과 물 (70:30, v/v) 혼합액으로 녹여 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 얻어진 결과를 표 8에 나타내었다.

표 8

화합물의 랫드 수정체와 적혈구내 갈락티톨 생성 억제 효과

시료	적혈구(랫드)내의 갈락티톨 함량 (μ M)	수정체내의 갈락티톨 함량 (μ g)/수정체 습중량 (g)
Galactitol free	0.98	-
Control	22.8	844.05
Quercetin ^{a)}	16.15	448.81
Rosmarinic acid (4)	15.05	532.38
Caffeic acid ethylene ester (5)	15.89	653.76

[0061]

[0062]

발명에 따른 물질을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0063]

본 발명의 추출물은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 0.01 <22> 내지 500 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 또한 그 추출물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0064]

지금까지 예시적인 실시 태양을 참조하여 본 발명을 기술하여 왔지만, 본 발명의 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명의 범주를 벗어나지 않고서도 다양한 변화를 실시할 수 있으며 그의 요소들을 등가물로 대체할 수 있음을 알 수 있을 것이다. 또한, 본 발명의 본질적인 범주를 벗어나지 않고서도 많은 변형을 실시하여 특정 상황 및 재료를 본 발명의 교시내용에 채용할 수 있다. 따라서, 본 발명이 본 발명을 실시하는데 계획된 최상의 양식으로서 개시된 특정 실시 태양으로 국한되는 것이 아니며, 본 발명이 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 태양을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.