



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0003992
(43) 공개일자 2010년01월12일

(51) Int. Cl.

A61K 36/185 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0064072

(22) 출원일자 2008년07월02일

심사청구일자 2008년07월02일

(71) 출원인

주우홍

경남 창원시 상남동 44-1 대동아파트 119-302

(72) 발명자

주우홍

경남 창원시 상남동 44-1 대동아파트 119-302

최혜정

경상남도 창원시 동읍 용산 521-14번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

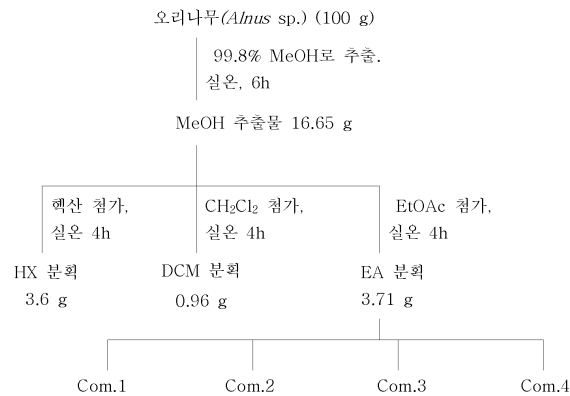
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 사방오리나무 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을유효성분으로 하는 비만 및 당뇨병 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 알파 글루코시다제(α -glucosidase) 저해 및 알도즈 환원효소(aldose reductase) 저해 활성을 통해 항당뇨 활성을 갖는 사방오리나무(*Alnus firma* Sieb. et Zucc) 추출물, 및 상기 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 사방오리나무 추출물 및 그로부터 분리된 화합물은 우수한 알파 글루코시다제 저해 활성 및 알도즈 환원효소 저해 활성 및 뛰어난 혈당강하 효과를 통해 우수한 항당뇨 활성을 가지므로, 이를 음료, 차, 과자류, 전식 등 다양한 기능성 식품에 적용할 수 있고 당뇨 예방 또는 치료를 위한 치료제 및 치료용 생약제에 적용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최영환

부산광역시 북구 화명동 롯데 낙천대 아파트 114동
1704호

이성태

전라남도 순천시 용당동 동아아파트 103-1607

조수동

경상남도 진주시 망경동 253번지 한보아파트 107동
1903호

김순신

경상남도 창원시 반림동 10번지 노블파크 103동
1203호

특허청구의 범위

청구항 1

사방오리나무(*Alnus firma* Sieb. et Zucc) 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 알파-글루코시다제 저해 활성 및 알도즈 환원효소 저해 활성을 갖는 항당뇨 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사방오리나무 추출물로부터 분리된 화합물이 갈산(gallic acid), 페룰산(ferulic acid), 베틀린산(betulinic acid) 또는 헤스페리딘(Hesperidin) 것을 특징으로 하는 항당뇨 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 항당뇨 조성물을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 또는 치료용 식품 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 따른 항당뇨 조성물을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 항당뇨 활성 사방오리나무(*Alnus firma* Sieb. et Zucc) 추출물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 알파-글루코시다제(α -glucosidase) 저해 및 알도즈 환원효소(aldose reductase) 저해 활성을 통해 항당뇨 활성을 갖는 사방오리나무 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물, 및 이를 유효성분으로 함유하는 항당뇨 활성 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 당뇨병은 혈액 내에 존재하는 포도당이 소변을 통해 배출되는 질환으로서, 근본적인 치유가 되지 않는 만성퇴행성질환중의 하나이다. 급속한 경제발전에 따른 식생활의 변화로 평균수명은 연장되는 것에 반하여 당뇨병 등의 만성퇴행성질환은 증가하는 현상을 보이고 있다. 국내에서의 당뇨병 유병율은 약 5-10%에 달하는 것으로 알려져 있으며, 지속적으로 증가하는 경향을 보이고 있다. 21세기에는 당뇨병이 국가적 차원에서도 심각한 건강장애 질환이 될 것으로 우려되고 있다. 당뇨병은 전 세계적으로 심각한 건강장애 질환이 될 것으로 우려되고 있으며, 전 세계적으로 3번째로 심각한 질병으로 망막, 신장, 신경, 심혈관계 등의 다양한 합병증을 유발한다.
- <3> 당뇨병은 인슐린 작용, 인슐린 분비 또는 이러한 두 가지 모두의 결함으로 발생하는 고혈당을 특징으로 하는 대사장애 증후군이다. 당뇨병을 일으키는 원인으로는 자가면역 기전에 의해서 췌장의 베타세포가 파괴되어 인슐린이 절대적으로 부족하게 되는 경우에서부터 인슐린의 작용에 대한 저항성에 이르기까지 다양하나 대부분의 환자에서는 인슐린 분비 장애와 인슐린 저항성이 동시에 존재하는 경우가 많다.
- <4> 최근 한약을 비롯한 천연물을 중심으로 한 학문이 크게 발전하고 천연물 성분 중에 함유된 생리활성 물질에 대한 관심이 증대되어 천연물 연구가 활발히 진행되고 있다. 생리활성 물질은 매우 적은 양으로도 현저한 활성을 나타내는 고부가 가치의 물질로서 수많은 종류가 인류에게 유용하게 이용되고 있으며, 새로운 물질들이 지속적으로 분리 개발되고 있다. 천연물 대상으로 한 연구에서는 생약재를 포함한 약용 식물류가 가장 많이 연구되고 있으며, 마늘, 대추, 버섯류도 향미 및 영양성분 이외의 항암 활성 및 면역증강 효과, 항산화 효과 등의 약리작용을 가지고 있기 때문에 건강식품 및 의약품 소재로 널리 이용되고 있다.
- <5> 오리나무속(*Alnus* sp.)식물은 자작나무과(Betulaceae)에 속하며 북반부 남아메리카에 30여종이 있고 우리나라에는 오리나무(*Alnus japonica*), 물오리나무(*Alnus hirsuta*), 떡오리나무(*Alnus borealis koidzumi*), 사방오리나무(*Alnus firma* sieb. et zucc), 물갯나무(*Alnus hirsuta* var. *sibirica*) 등 17여종 이상이 자생하는 것으로 알려져 있다.
- <6> 민간 및 한방에서는 오리나무의 수피를 적양(赤壤)이라 부르며, 봄·가을에 채취하여 말린 것을 약용으로 사용

하고 있다. 현재까지 알려진 약효로는 청열(淸熱), 강화(降火)하는 작용, 비출혈(鼻出血), 설사, 외상출혈의 치료와 그 외 민간요법으로 숙취해소에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 국내에 자생하는 사방오리나무는 메마른 땅에서도 잘 자라며 성장 속도가 빨라 재배가 용이하며 국내에서 사방사업과 국토 산지의 녹화사업에 주로 활용한 수종이므로 건강 식품 산업 및 의약 산업상 매우 유용한 발명이 될 것이다.

<7> 이와 같은 오리나무 추출물을 이용한 종래 기술로는, 대한민국 특허출원 제10-1999-0002231호 “당뇨에 효능이 있는 천연차 및 그 제조방법”에 당뇨병환자에 주기적으로 복용시켜 당뇨병환자의 혈당치를 현저하게 감소시킬 수 있는 효과가 있는, 오리나무와 산뽕나무의 잎·줄기 또는 뿌리의 추출물을 주원료로 하거나 또는 오리나무와 산뽕나무의 각 부분을 직접 분말화한 것을 주원료로 하고 마가목추출물 및 감초추출물의 배합비를 달리하여 제조한 천연차 및 그 제조방법이 개시되어 있고, 대한민국 특허출원 제10-2000-0077553호 “숙취해소용 음료 및 그 제조방법”에 오리나무 추출물을 주원료로 한 숙취해소용 음료가 개시되어 있다.

<8> 또한 대한민국 특허출원 제10-1998-0004963호 “당뇨병 치료용 혈당 강하 음료”에 동아열매, 하늘타리열매, 오리나무가지로 이루어진 주재료에 상백피, 유근피로 이루어진 부재료를 섞어 혼합재료에 각종 첨가제를 혼합하여서 제조된, 수분 섭취, 또는 갈증해소를 목적으로 복용할 수 있을 뿐 아니라 신체내의 혈당량을 강하시키게 되어 당뇨병 치료용 음료가 개시되어 있으며, 대한민국 특허출원 제10-2002-0079386호 “지구자와 오리나무를 주재료로 한 건강식품”에 지구자와 오리나무를 주재료로 한 항암효과는 물론 간보호효과, 항피로효과, 항노쇠효과, 면역력증강효과, 강장효과등 건강증진에 큰 도움이 될뿐만 아니라 취식이 용이한 건강식품이 개시되어 있다.

<9> 또한 대한민국 특허출원 제10-2005-0048335호 “물오리나무 추출물 또는 베틀리닉에시드를 포함하는 비만 및 제2형 당뇨병 예방 및 치료용 조성물”에 물오리나무(*Alnus hirsuta* S.) 추출물 또는 베틀리닉에시드(Betulinic acid)를 포함하는, 아실 코에이:디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(Acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 저해 활성을 가져서 비만 및 제2형 당뇨병에 대한 예방 및 치료 효과를 갖는 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 특허출원 제10-2006-0059191호 “좀사방오리나무 추출물을 함유하는 항바이러스 조성물”에 좀사방오리나무(*Alnus pendula*) 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 함유하는 조류 인플루엔자 바이러스 감염의 예방용 기능성 식품 조성물이 개시되어 있다.

<10> 하지만 국내 자생 및 식재된 사방오리나무의 항당뇨 활성을 이용한 기술은 개시된 바 없으며, 이에 본 발명자들은 예의 연구를 거듭한 결과 사방오리나무의 항당뇨 활성을 밝혀내어 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<11> 따라서 본 발명의 목적은 항당뇨 활성을 갖는 사방오리나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 항당뇨 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<12> 본 발명의 상기와 같은 목적은 사방오리나무로부터 추출물을 제조하고, 상기 추출물의 알파-글루코시다제 저해 활성 및 알도즈 환원효소 저해 활성을 통한 항당뇨 활성 관련 실험을 수행한 후, 인슐린 의존형 당뇨 마우스 모델을 이용하여 생체내 (in vivo) 실험을 통해 항당뇨 활성을 확인함으로써 달성되었다.

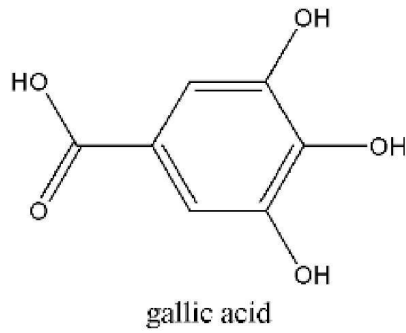
<13> 본 발명은 사방오리나무(*Alnus firma* Sieb. et Zucc) 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 알파-글루코시다제 저해 활성 및 알도즈 환원효소 저해 활성을 갖는 항당뇨 조성물을 제공한다.

<14> 본 발명에 따른 사방오리나무 추출물은 도 1에 도시한 바와 같이 사방오리나무를 메탄올로 추출하고, 수득된 메탄올 추출물을 각각 헥산, 디클로로메탄 및 에틸아세테이트로 분획하여 각각 HX 분획물, DCM 분획물 및 EA 분획물로서 수득된다.

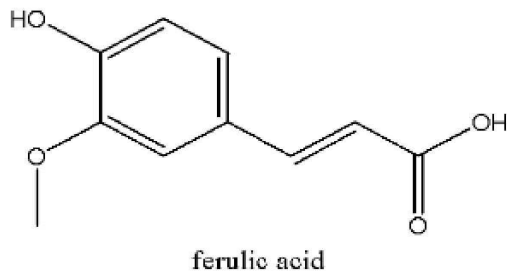
<15> 상기 사방오리나무 추출물에 대한 알파 글루코시다제 저해 활성을 측정한 결과 대조군인 1-테옥시노르지리마이신 보다 우수한 것으로 나타났으며, 알도즈 환원효소 저해 활성의 측정 결과 또한 우수함이 입증되었다. 또한 인슐린 의존성 당뇨 마우스 모델을 이용한 생체내 실험 결과 본 발명에 따른 사방오리나무 메탄올 추출물을 투여한 것이 스트렙토조토신이 투여된 당뇨 유발 쥐에서 혈당 강하 효과가 뛰어난 것으로 나타났다.

<16> 또한 본 발명에 따른 사방오리나무 추출물로부터 분리된 화합물은 상기 EA 분획물로부터 분리되었다. 이들을 ¹H-NMR, ¹³C-NMR을 통하여 구조 결정된 하기에 화학식으로 나타낸 바와 같이 갈산(gallic acid)(화합물 1), 퍼를

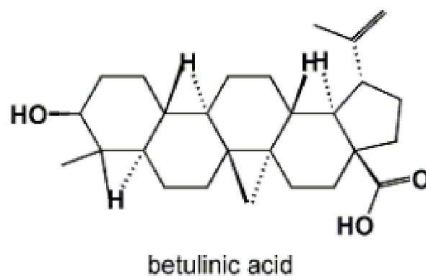
산(ferulic acid)(화합물 2), 베틀린(betulinic acid)산((화합물 3) 그리고 헤스페리딘(Hesperidin)(화합물 4)인 것으로 확인되었다.



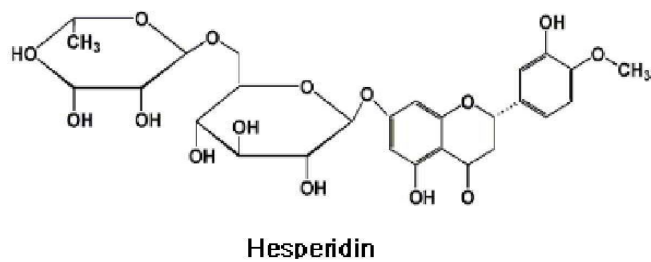
<17>



<18>



<19>



<20>

<21> 상기의 화합물 1 내지 4에 대한 알파 글루코시다제 저해 활성을 측정한 결과 매우 우수한 알파 글루코시다제 저해 효과가 있음을 알 수 있다.

<22> 본 발명에 따른 항당뇨 활성을 갖는 사방오리나무의 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물은 다양한 식품에 적용할 수 있다. 제조가 용이하고 간편하게 먹을 수 있는 음료, 차, 과자류, 전식 등 기능성 식품을 포함하며 당뇨 예방 치료제 및 치료용 생약제에도 적용될 수 있다.

<23> 따라서 본 발명은 사방오리나무의 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 또는 치료용 식품 조성물을 제공한다.

<24> 또한 본 발명은 사방오리나무의 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

효과

<25> 본 발명에 따른 사방오리나무 추출물 및 그로부터 분리된 화합물은 우수한 알파 글루코시다제 저해 활성 및 알

도즈 환원효소 저해 활성 및 뛰어난 혈당강하 효과를 통해 우수한 항당뇨 활성을 가지므로, 이를 음료, 차, 과자류, 전식 등 다양한 기능성 식품에 적용할 수 있고 당뇨 예방 또는 치료를 위한 치료제 및 치료용 생약제에 적용할 수 있어, 식품 및 의약품 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<26> 이하 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<27> 실시예 1 : 오리나무 추출물의 제조

<28> 본 실시예에 사용된 사방오리나무(*Alnus firma* Sieb. et Zucc)는 경남 고성지방에서 자생하는 것을 2005년 11월 채집하여 옮긴 후 세절한 뒤 -20℃ 냉동고에 보관하고 사용하였다.

<29> 도 1에 도시한 바와 같이, 사방오리나무의 가지, 잎, 열매를 포함하여 100 g을 세절하여 상온에서 99.5% 메탄올(MeOH) 1.5 L로 3회 반복 추출하여 MeOH 추출물 16.65 g을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수 1 L에 현탁시켜 용매의 극성차를 이용하여 헥산(HX), 디클로로메탄(DCM) 그리고 에틸아세테이트(EA) 층으로 순차적으로 분획하여 HX 분획물 3.6 g, DCM 분획물 0.96 g, EA 분획물 3.71 g을 각각 얻었다. 추출한 시료는 왓츠만 여과지(Whatman filter paper)로 여과하고 36℃에서 감압 농축하여 -20℃ 냉동고에 보관하여 사용하였다.

<30> 실시예 2 : α-글루코시다제 억제활성 측정

<31> 알파 글루코시다제는 소장점막 상피세포 밖에서 전분이나 이당류들이 가수분해를 촉진시켜 단당류 특히 포도당의 흡수를 도와주는 역할을 하는 효소로서, 기질로 p-니트로페닐-α-D-글루코피라노사이드(PNP-G)를 사용하여 시험관 내에서 활성 억제 정도를 측정하였다.

<32> 1 unit/mL의 효모기원의 α-글루코시다제 40 uL에 상기 실시예 1에서 제조한 각 용매 추출 시료액을 10 uL 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 뒤, 1 mM의 PNP-G 용액(in potassuim phosphate buffer, pH 6.9) 950 ul 첨가하였다. 37℃에서 20분간 반응 후 1 M Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하여 반응을 종결시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로 MeOH를 사용하였고, 양성대조군으로 1-데옥시노르지리마이신(1-Deoxynorjirimycin)을 사용하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<33> 실시예 3 : 알도스 환원효소(aldose reuctase) 억제 활성 측정

<34> 알도스 환원효소는 DL-글리세르알데하이드를 기질로 사용하여 측정하였다. 농도별로 조제한 각 추출시료 10 uL와 0.1 M의 SPB 완충액 500 uL, 0.1 M의 DL-글리세르알데하이드와 1.5 mM의 β-NADPH를 첨가하여 25℃에서 3분간 전반응 시켰다. 인간 근육 세포 기원의 알도스 환원효소 0.4 units을 첨가하고 즉시 340 nm에서 3분동안 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

<35> <표 1>

<36> 오리나무 추출물에 의한 알도스 환원효소 억제율

	inhibition (%)		
	10 ug/ml	50 ug/ml	100 ug/ml
MeOH	52.38	58.73	65.08
HX	9.52	30.51	22.22
DCM	3.17	28.81	28.81
EA	44.44	84.13	84.13

<37>

<38> 각 수치는 3회 평균 값이다.

<39> 실시예 4 : 인슐린 의존형 당뇨 마우스 모델을 이용한 생체내 실험

<40> 본 실시예에서는 (주)샘타코 바이오 코리아에서 생후 6주령의 수컷 ICR 마우스를 공급 받아 사용하였다. 온도 21±2℃, 습도 55±10% 의 환경에서 사육하였으며 사료는 (주)샘타코 바이오 코리아에서 공급받은 방사선 조사로 멸균된 실험동물용 고형사료를 사용하였으며, 물과 여과된 멸균 정제수를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기

를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 하여 예비 사육하였다.

<41> 대조군으로, 실험시작 전 14시간 이상 절식 시킨 마우스의 복강에 시트르산염 완충액(4℃, pH 4.2)에 용해한 스트렙토조토신(Sigma Co., USA)을 체중 kg 당 65 mg 수준에서 투여하고 48시간 후에 혈당(random blood glucose) 함량이 200 mg/dL 이상인 마우스만을 당뇨가 유발된 것으로 선별하였다.

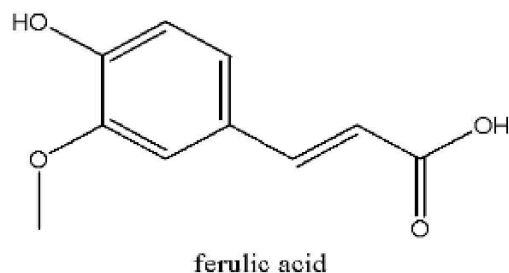
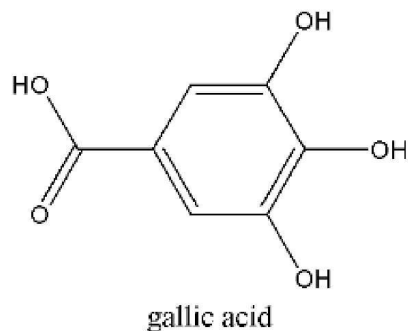
<42> 혈당은 일정한 시간에 꼬리정맥에서 채취한 혈액을 가지고 혈액 글루코스 센서(blood glucose sensor; Roche Diagnostics GmbH., Germany)로 측정하였다. 실험에 이용한 마우스는 혈당과 체중을 기준으로 실험군 당 5마리씩 완전임의 배치하여 실험동물 사육실에서 폴리카보네이트 사육상자(260×410×20 mm)에서 사육하였다.

<43> 실험군으로, 상기와 같이 스트렙토조토신(Sigma Co., USA)을 체중 kg 당 65 mg 수준에서 투여하고 48시간 후에 혈당(random blood glucose) 함량이 200 mg/dL 이상인 마우스만을 당뇨가 유발된 것으로 선별하였다. 변행초 MeOH 추출물을 체중 kg당 500 mg으로 PBS에 녹여서 400 uL씩 매일 경구투여하였다. 체중과 혈당은 2일에 한번씩 12시간 절식시킨 뒤 측정하였다. 그 결과를 도 3 및 4에 나타내었다.

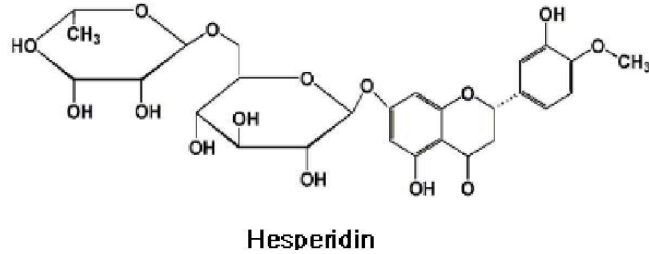
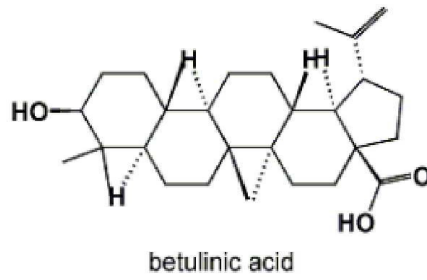
<44> 실시예 5. 기능성 물질 분리

<45> 오리나무속 식물의 MeOH 추출물 및 각 분획물의 항당뇨 효소활성 효과를 측정한 결과, 활성이 좋은 EA 분획물을 HX/DCM/MeOH의 용매조합으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 각 분획물은 순수하게 정제하기 위해서 예비 고성능 액체 크로마토그래피(JAI, Japan)를 이용하였으며 분석용 컬럼은 멀티컬럼인 GS-310 (particle size 13 μm)을 사용하였고, 200 nm의 UV 검출기 및 RI 검출기를 사용하여 분리를 진행시켰다. 전개 용매는 100% MeOH를 사용하였고, 유속은 각 분획물의 성질에 따라 5-7 mL/min 으로 조절하여 사용하였다.

<46> 분리된 물질의 구조분석에는 HPLC (CBM-20A, Shimadzu, Japan)와 가스 크로마토그래피/질량 분석기(Gas Chromatograph/Mass Spectrometry; GC/MS; HP6890, Agilent, USA)를 이용하였으며, 각각 ODS-C18 컬럼(250 × 4.6 mm, 5 μm, Japan)과 HP-5 컬럼(Agilent, USA)을 사용하였다. ¹H-NMR, ¹³C-NMR을 통하여 최종적으로 구조 결정을 하였으며, 그 결과 갈산(화합물 1), 페룰산(화합물 2), 베틀린산(화합물 3) 그리고 헤스페리딘(화합물 4)으로 확인되었다.



<48>



실시예 6 : 분리된 물질의 α -글루코시다제 억제활성 측정

상기 실시예 5에서 분리된 물질에 대해 대표적으로 α -글루코시다제에 대한 저해활성을 조사하였다. 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

<표 2>

	IC ₅₀ (μ M)
갈산	246.9
피루산	44.32
베툴린산	120.62
헤스페리딘	32.90

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 사방오리나무로부터 추출물 및 화합물을 분리하는 과정을 개략적으로 나타낸 도이다.

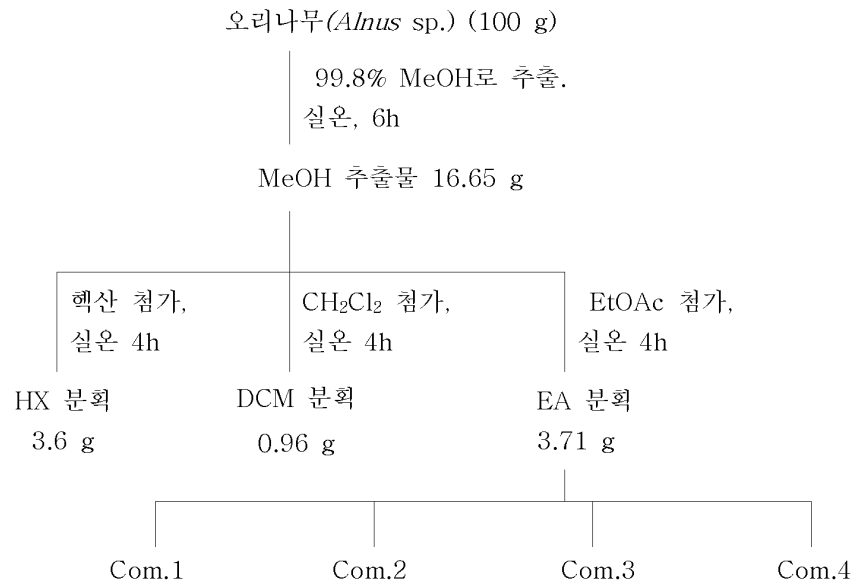
도 2는 본 발명에 따른 사방오리나무 추출물의 알파 글루코시다제 저해 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 사방오리나무 추출물의 인슐린 의존형 당뇨 마우스 모델을 이용한 생체내 실험에 있어 혈당 강하 효과를 나타낸 그래프이다.

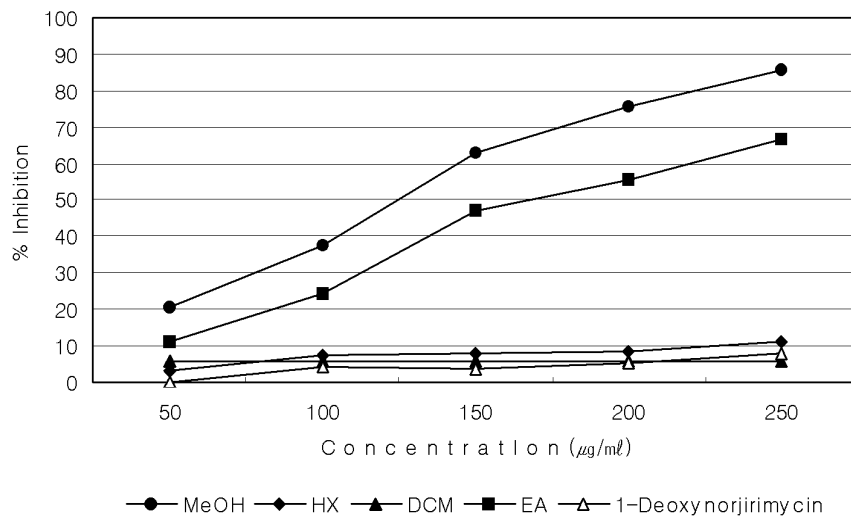
도 4는 본 발명에 따른 사방오리나무 추출물의 인슐린 의존형 당뇨 마우스 모델을 이용한 생체내 실험에 있어 체중 감량 효과를 나타낸 그래프이다.

도면

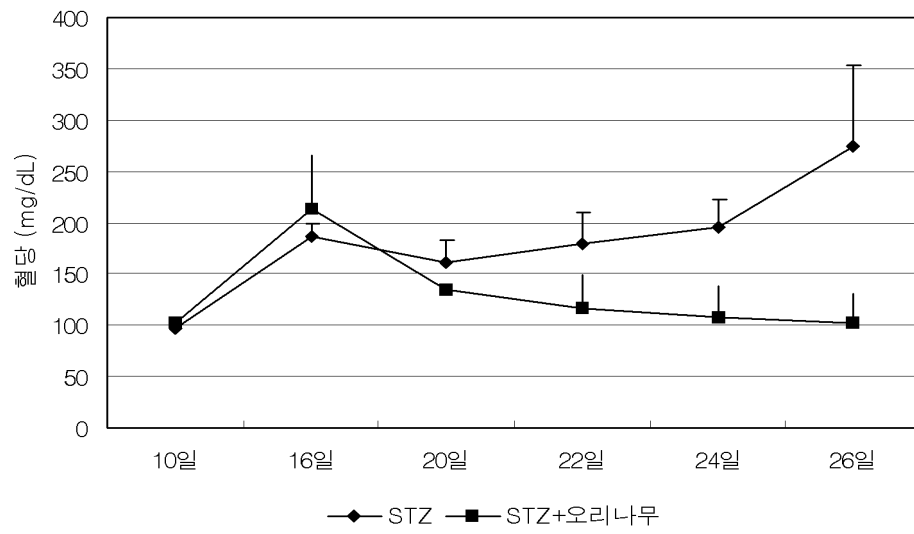
도면1



도면2



도면3



도면4

