



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0001924
(43) 공개일자 2013년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0062851
(22) 출원일자 2011년06월28일
심사청구일자 2011년06월28일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 춘주로 174, 102동 401호 (퇴계동,
그린타운아파트)
최세진
강원도 양구군 남면 정중앙로 799
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

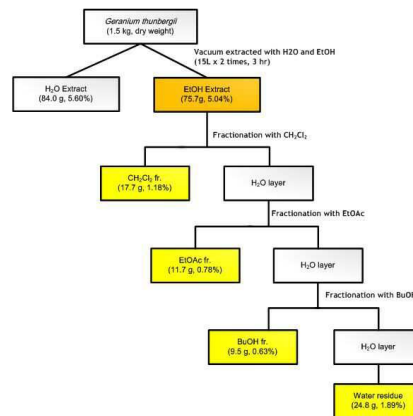
(54) 발명의 명칭 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 부작용 또는 독성 등의 우려가 없고 알도스 환원효소 억제활성 및 최종당화산물생성 억제활성이 뛰어난 효과가 있는 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

보다 구체적으로 본 발명에 따라 알도스 환원효소 억제, 갈락티톨 생성 억제, 및 최종당화산물 생성 억제 효과가 뛰어난 현초 추출물 및 이의 분획물, 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다. 상기 현초 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물은 복부팽만감, 구역감, 설사, 저혈당 유발 등의 원치 않는 부작용 내지 독성의 우려 없이 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 -

부처명 교육과학기술부

연구사업명 광역경제권 선도사업 인재양성사업

연구과제명 지역특산물을 이용한 혈당조절용 메디케어 제품개발

주관기관 한림의료관광인재양성센터(한림대학교)

연구기간 2010.06.10 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 현초 추출물은 물, 및 C₁ 내지 C₄의 저급 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 것인 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 저급 알코올 용매는 에탄올인 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 현초 추출물의 분획물은

물, 및 C₁ 내지 C₄의 저급 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 후, 디클로로메탄, 에틸 아세테이트, 부탄올 및 물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 분획용매로 분획하여 얻어진,

디클로로메탄 분획물, 에틸 아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 분획물인

당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물을 전체 조성물의 중량을 기준으로 0.0001~99.9 중량%로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 당뇨병 합병증은 당뇨병성 백내장, 당뇨병성 신장해, 당뇨병성 신경장해, 당뇨병성 망막증 및 당뇨병성 혈관 장애로 이루어진 군으로부터 선택된 질환인 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물을 전체 조성물의 중량을 기준으로 0.0001~99.9 중량%로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 부작용 또는 독성 등의 우려가 없고 알도스 환원효소 억제활성 및 최종당화산물생성 억제활성이 뛰어난 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병은 신체 내에서 혈당 조절에 필요한 인슐린의 분비나 작용 부족으로 인해 발생된 고혈당을 특징으로 하는 대사성 질환이다. 당뇨병으로 인한 만성적 고혈당은 신체 각 기관의 손상과 기능 부전을 초래하게 되는데 특히, 망막, 신장, 신경, 심혈관계에 심각한 합병증을 유발하게 된다. 일반적으로 당뇨병 환자의 경우 식후에 급격한 혈당 상승으로 인하여 심각한 합병증이 초래되므로 식후의 혈당 상승 억제가 치료제에 있어서 필수적으로 요구되고 있다. 특히 당뇨병 환자의 식후 혈당치가 급격히 상승함으로써 다양한 당뇨합병증의 문제를 야기하며 나아가 사망에 이르게 된다.(Choi et al., 2008)

[0003] 고혈당으로 인한 합병증의 발생 원인으로는 당화반응(glycation)으로 알려진 비효소적 당화, 폴리올 경로(polyol pathway)의 활성화, 지질대사 이상, 산화에 의한 손상 증가 등이 거론되고 있다. 신경(nerve), 신사구체(renal glomerulus), 수정체(lens), 망막(retina) 같은 인슐린 비 의존형 조직의 경우에는 혈액 내에 존재하는 포도당이 세포 내로 이동하는 과정에 인슐린이 관여하지 않으므로 혈액 중에 존재하는 높은 농도의 포도당은 바로 세포내 포도당의 농도를 증가시킨다. 하지만 정상상태에서는 세포 내에 존재하는 포도당은 헥소키나제(hexokinase)에 의하여 글루코스-6-인산염(glucose-6-phosphates)으로 변환되어 해당과정(glycolysis pathway)으로 들어가게 되지만, 비정상적으로 세포 내에 과다하게 존재하는 포도당은 헥소키나제(hexokinase)를 포화시켜 알도스(aldose)를 기질로 하는 알도스 환원효소(aldose reductase)에 의해 소르비톨(sorbitol)로 변환되어 폴리올 경로를 활성화시킨다. 소르비톨은 소르비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase)에 의하여 프룩토오스(fructose)로 변환되어 세포막의 투과가 가능한 형태로 전환되며 과다한 포도당에 의해 생성된 폴리올은 그 활성이 알도스 환원효소의 5%밖에 되지 않는 소르비톨 탈수소효소를 포화시켜 프룩토오스로 변환되지 못하고 세포 내에 축적되며 축적된 폴리올은 세포막을 투과하지 못하여 세포 내 삼투압을 증가시킨다. 삼투압의 증가에 따라 팽윤현상이 일어나게 되고 세포막의 안정성이 파괴되어 심한 경우에는 세포의 사멸에까지 이르게 된다. 즉, 폴리올 경로의 활성화에 의해 슈반(schwann) 세포와 모세혈관에 소르비톨이 과다 축적되면 삼투압 증가로 인한 수초(myelin sheath)의 부종, 괴사 및 붕괴가 발생할 수 있고, 지속적으로 증가한 삼투압으로 인하여 수분이 인입되어 당뇨병 합병증으로 진행된다.(김응진 외, 1998; Constantino et al., 1999)

[0004] 최종당화산물(AGEs)은 단백질의 비효소적 당화반응에서는 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹이 환원당과 효소 작용 없이 축합 및 교차 반응하여 생성된 비가역적 반응산물이므로, 일단 생성되면 혈당이 정상으로 회복되어도 분해되지 않고 단백질 생존기간 동안 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시킨다. 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(Vinson et al., 1996; Smith et al., 1992). 따라서 당뇨환자는 혈당의 조절과 함께 당뇨합병증의 유발과 진전을 억제하는 것이 중요한 치료방법이 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 부작용 또는 독성 등의 우려가 없고 알도스 환원효소 억제활성 및 최종당화산물생성 억제활성이 뛰어난 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료에 유용한 현초 추출물 및 이의 분획물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0007] 또한 본 발명은 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0008] 또한 본 발명은 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0009]
- [0010] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0011] 현초(*Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.)는 쥐손이풀목(Geraniales) 쥐손이풀속(*Geranium*) 쥐손이풀과(Geraniaceae)에 속하는 다년생초본으로, 한방에서는 현초(玄草) 또는 현지초(玄之草)라고 하며 전초를 가을에 채취하여 다듬어서 말린 것을 말한다. 현초는 고, 신, 미운의 성미를 나타내며, 거풍제습 및 지사 효능 즉 풍습을 제거시키고 경락을 소통시켜 골격과 근육을 강건하게 하므로 사지마비동통, 관절불리, 타박상 등에 활용되고, 이질과 만성설사복통, 장염에 효과 있으며, 피부가려움증과 옴, 악창에도 효력을 보인다고 알려져 있다(박종희, 2002). 그런데 현초(*Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.)의 성분에 관한 연구를 보면 탄닌(tannin) 계열과 플라보노이드(flavonoid) 계열 화합물에 대한 분리와 항산화 및 항균실험이 대부분을 이루고 있으며, 현초의 당뇨병 합병증 치료 또는 예방과 관련된 효능에 관한 연구는 이루어지지 않고 있었다.
- [0012] 본 발명자들이 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료와 관련하여 복부팽만감, 구역감, 설사, 저혈당 유발 등의 원치 않는 부작용이 빈번히 발생하는 기존의 약제들을 대체할 수 있는, 부작용 내지 독성이 없고 알도스 환원효소 억제활성, 갈락티톨 및 최종당화산물의 생성 억제활성이 뛰어난 새로운 형태의 천연물 유래 치료제 개발을 위해 연구한 결과, 현초의 추출물 및 이의 분획물의 효과가 현저히 뛰어남을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 본 명세서에서 ‘현초 추출물’은 현초의 다양한 기관, 예컨대 잎, 꽃, 줄기 및 뿌리 등으로부터 추출하여 얻은 것을 의미하며, 바람직하게는 현초의 전초로부터 추출하여 얻은 것을 의미한다.
- [0014] 또한 본 명세서에서, ‘치료’는 증상의 경감 또는 개선, 질환의 범위의 감소, 질환 진행의 지연 또는 완화, 질환 상태의 개선, 경감 또는 안정화, 부분적 또는 완전한 회복, 생존의 연장 기타 다른 이로인 치료 결과 등을 모두 포함하는 의미로 사용된다.
- [0015] 현초의 전초는 탄닌(tannin)과 플라보노이드(flavonoid)를 주성분으로 포함하고 있다. 구체적으로 탄닌은 잎에 약 20%, 전초에 약 5%로 함유되어 있고 주요 성분은 가수분해형 탄닌 중 하나인 제라닌(geraniin)이며, 그 외 피로갈롤(Pyrogallol), 에피카테킨(epicatechin), 갈산(gallic acid), 및 엘라기탄닌(ellagitannin) 등이 있다. 플라보노이드(flavonoid)는 퀘세틴(quercetin), 프로토키테쿠산(protocatechuic acid), 캠페리트린(kaempferitrin), 캠페롤-7-O-람노사이드(kaempferol-7-O-rhamnoside), 및 캠페롤(kaempferol) 등이 함유되어 있다(박종희, 2002; 배기환, 2000). 그 밖에 현초의 CH_2Cl_2 분획으로부터 4-히드록시코부신(4-hydroxykobusin), (+)메틸 피페리톨((+)-methyl piperitol), 7,7'-dihydroxyburshehnerin, 캠페롤-3-O- α -L-람노사이드(kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside) 등의 화합물이 분리 보고되었다.(Liu et al., 2006)
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 따라, 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.
- [0017] 또한 본 발명의 다른 일 구현예에 따라, 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물을 제조하는 방법이 제공된다.
- [0018] 바람직하게는 상기 현초 추출물은 물, 및 C_1 내지 C_4 의 저급 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 것일 수 있다.
- [0019] 상기 C_1 내지 C_4 의 저급 알코올 용매는 에탄올, 메탄올, 프로판올, 또는 부탄올이 될 수 있으며, 바람직하게는 에탄올, 가장 바람직하게는 75~99%(v/v)의 에탄올이 될 수 있다.
- [0020] 상세하게는 상기 현초 추출물은, 1) 현초에 물, 및 C_1 내지 C_4 의 저급 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 첨가하는 단계; 및 2) 상기 용매가 첨가된 현초를 2 내지 5시간 동안 환류 냉각 추출 및 여과하는 단계를 포함하여 제조할 수 있다.
- [0021] 바람직하게는 상기 2) 단계 이후에, 3) 상기 여과단계를 거쳐 얻어진 여액과 잔사를 분리하고, 상기 분리된 잔

사에 대해 상기 1) 및 2) 단계를 2회 내지 3회 반복하여 실시하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [0022] 또한 상기 2) 단계 및/또는 상기 3) 단계를 거쳐 얻어진 여액을 모아 감압 농축, 동결 건조 또는 분무 건조 등을 수행하는 추가 공정을 더 포함함으로써 상기 현초 추출물을 분말 상태로 제조할 수 있다.
- [0023] 상기 용매는 현초 건조 중량의 5 내지 15배, 바람직하게는 8 내지 12배로 사용할 수 있다.
- [0024] 상기 용매로서 물을 사용할 경우, 바람직하게는 상기 2) 단계를 80~120℃로 수행할 수 있으며, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 용매를 사용할 경우에는 바람직하게는 상기 2) 단계를 40~80℃로 수행할 수 있다.
- [0025] 상기 현초 추출물의 분획물은 바람직하게는 물, 및 상기 C₁ 내지 C₄의 저급 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 추출된 현초 추출물을 디클로로메탄(CH₂Cl₂), 에틸 아세테이트(EtOAc), 부탄올(BuOH) 및 물(H₂O)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 분획용매로 순차적으로 분획하여 얻어진, 디클로로메탄 분획물, 에틸 아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 분획물일 수 있으며, 바람직하게는 부탄올 분획물일 수 있고, 가장 바람직하게는 에탄올 용매로 추출된 현초 추출물의 부탄올 분획물일 수 있다.
- [0026] 상제하게는 상기 분획물은 바람직하게는 상기 현초 추출물 제조방법에 의해 제조된 추출물을 증류수에 용해시키는 단계; 및 상기 용해된 현초 추출물 용액을 디클로로메탄(CH₂Cl₂), 에틸 아세테이트(EtOAc), 부탄올(BuOH) 및 물(H₂O) 층으로 극성에 따라 순차 분획을 실시하는 단계를 포함하여 제조할 수 있다.
- [0027] 바람직하게는 현초 추출물 건조 중량의 10 내지 20배의 증류수에 상기 현초 추출물을 현탄한 후, 동량의 분획용매로 분획을 실시할 수 있으며 또한 바람직하게는 상기 분획은 2회 내지 4회로 이루어질 수 있다.
- [0028] 구체적으로, 상기 현초 추출물 용액에 디클로로메탄을 첨가하여 상기 디클로로메탄으로 분획된 디클로로메탄 분획물을 얻을 수 있으며, 이후 상기 디클로로메탄 분획물을 제거한 물 층을 다시 에틸 아세테이트로 분획하여 에틸 아세테이트 분획물을 얻을 수 있고, 이후 상기 에틸아세테이트 분획물을 제거한 물 층을 부탄올로 분획하여 부탄올 분획물을 얻을 수 있으며, 상기 부탄올 분획물을 제거한 물 분획물을 얻을 수 있다.
- [0029] 상기 분획 공정에 적합한 온도 내지 시간 등의 조건은 당업자가 적절히 조절하여 수행할 수 있으나, 바람직하게는 20 내지 35℃에서 수행할 수 있다.
- [0030] 또한 바람직하게는 상기 순차 분획 단계 이후에, 각 순차 분획단계에서 얻어진 분획물을 감압 농축 및 동결 건조 하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0031] 바람직하게는 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물은 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물의 전체 중량을 기준으로 0.0001~99.9 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1~99중량%로 포함될 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서, 현초 추출물 또는 이의 분획물의 중량은 현초 추출물 또는 이의 분획물 내의 용매가 제거된 상태의 건조 중량을 기준으로 한다.
- [0033] 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물은 우수한 알도스 환원효소(aldose reductase, AR) 억제 활성을 가지고 있는 것을 특징으로 한다(실시예 2 참조). 또한 갈락티톨(galactitol) 생성 억제활성, 및 최종당화산물(Advanced glycation endproducts, AGEs) 생성 억제 활성이 뛰어난 특성을 가진다(실시예 3 및 실시예 4 참조).
- [0034] 당뇨병 합병증이란, 당뇨병으로 인한 고혈당과 단백질의 반응이 비가역적으로 진행되어 최종당화산물이 생성되어 혈중이나 조직의 다른 단백질과 교차결합하여 유발시키는 여러 가지 합병증을 의미하고, 예컨대, 상기 당뇨병 합병증은 당뇨병성 백내장, 당뇨병성 신장해, 당뇨병성 신경장해, 당뇨병성 망막증 또는 당뇨병성 혈관 장애 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 상기 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물은 알도스 환원효소의 활성을 억제하거나, 갈락티톨 생성을 억제하거나 또는 최종당화산물의 생성을 억제함으로써 상기 당뇨병 합병증을 예방 또는 치료하는 것일 수 있다.
- [0035] 당뇨병 합병증의 발생 원인으로는 당화반응(glycation)으로 알려진 비효소적 당화, 폴리올 경로(polyol pathway)의 활성화, 지질대사 이상, 산화에 의한 손상 증가 등이 거론되고 있다. 신경(Nerve), 신사구체(renal glomerulus), 수정체(lens), 망막(retina) 같은 인슐린 비 의존형 조직의 경우에는 혈액 내에 존재하는 포도당(glucose)이 세포 내로 이동하는 과정에 인슐린이 관여하지 않으므로 혈액 중에 존재하는 높은 농도의 포도당은 바로 세포내 포도당의 농도를 증가시킨다. 하지만 정상상태에서는 세포 내에 존재하는 포도당은 헥소키나아제

(hexokinase)에 의하여 글루코스-6-포스페이트(glucose-6-phosphates)로 변환되어 해당과정(glycolysis pathway)으로 들어가게 되지만, 비정상적으로 세포 내에 과다하게 존재하는 포도당은 헥소키나아제를 포화시켜 알도스를 기질로 하는 알도스 환원효소에 의해 소르비톨(sorbitol)로 변환되어 폴리올 경로를 활성화 시킨다.

[0036] 이에 따라, 소르비톨(sorbitol)과 프룩토오스(fructose)가 생성되며, 생성된 소르비톨은 축적되는 부위의 발병 증상에 따라 당뇨병 백내장, 당뇨병 망막증, 당뇨병 각막증, 당뇨병 신경장애, 당뇨병 신증 등의 당뇨병 합병증을 일으킨다. 그러므로 알도스 환원효소 억제제는 글루코스를 소르비톨로 변환하는 알도스 환원효소를 억제하는 효소 억제제이며, 소르비톨의 생산을 저하시키는 것이 목적이다. 소르비톨은 소르비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase)에 의하여 프룩토오스로 변환되어 세포막의 투과가 가능한 형태로 전환되며 과다한 포도당에 의해 생성된 폴리올은 그 활성이 알도스 환원효소의 5%밖에 되지 않는 소르비톨 탈수소효소를 포화시켜 프룩토오스로 변환되지 못하고 세포 내에 축적되며 축적된 폴리올은 세포막을 투과하지 못하여 세포 내 삼투압을 증가시킨다. 삼투압의 증가에 따라 팽윤현상이 일어나게 되고 세포막의 안정성이 파괴되어 심한 경우에는 세포의 사멸에까지 이르게 된다.

[0037] 즉, 폴리올 경로의 활성화에 의해 슈반(Schwann) 세포와 모세혈관에 소르비톨이 과다 축적되면 삼투압 증가로 인한 수초(myelin sheath)의 부종, 괴사 및 붕괴가 발생할 수 있고, 지속적으로 증가한 삼투압으로 인하여 수분이 인입되어 세포내의 다양한 대사과정에 변이를 야기하고, 세포막의 안정성을 감소시켜 신경병증(neuropathy), 신장병증(nephropathy), 망막증(retinopathy), 백내장(cataract) 등의 당뇨병 합병증으로 진행된다.(김웅진 외, 1998; Constantino et al., 1999). 특히 수정체에서 폴리올의 축적으로 인한 삼투압 스트레스는 당뇨병성 망막증을 일으키는 주요 원인 중 하나로 알려져 있다.

[0038] 따라서, 상기 알도스 환원효소 억제효과가 뛰어난 현초 추출물 또는 분획물은 소르비톨의 생산을 감소시킴에 따라 세포 내의 소르비톨 축적으로 인한 삼투압의 증가를 억제할 수 있어, 최종적으로 당뇨병 합병증을 치료 또는 예방하는데 효과적으로 이용될 수 있다.

[0039] 한편, 체내에서의 당화(glycation) 반응은 식이를 통해 흡수된 포도당이나 포도당의 대사과정 중 생성된 카르보닐(carbonyl) 화합물과 알부민(albumin), 헤모글로빈(hemoglobin), 콜라겐(collagen), 저밀도 지단백질(low-density lipoprotein, LDL)과 같은 단백질의 ε-아미노그룹이나 N-말단 부위와 반응하여 몇 단계의 중간생성물을 거쳐 비가역적 반응 생성물로서 최종당화산물을 만들게 된다(Baynes et al., 1989). 상기 최종당화산물은 당뇨에 있어 고혈당과 단백질의 반응이 비가역적으로 진행되어 생성되는 산물로써 혈중이나 조직의 다른 단백질과 교차 결합하여 조직의 기능 및 구조를 비정상적으로 변화시켜 여러 당뇨 합병증의 초기 진행에 있어 치명적인 역할을 하는 인자이다.(Singh et al., 2001) 따라서 최종당화산물 생성을 저해할 수 있다면 당뇨병 및 당뇨병으로 인한 합병증에 대하여 예방 및 진행을 완화시킬 수 있다고 볼 수 있다.

[0040] 따라서, 상기 최종당화산물 생성 억제효과가 뛰어난 현초 추출물 또는 분획물은 최종당화산물의 생성을 감소시킴으로써 기저막의 비후, 지질단백이나 IgG의 침착 억제 및 미세혈관의 음전화 감소 억제 등을 유도하여, 최종적으로 당뇨병 합병증의 치료 또는 예방에 효과적으로 이용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 다른 일 구현예에 따라, 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물이 제공된다.

[0042] 바람직하게는 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물은 당뇨병 합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물의 전체 중량을 기준으로 0.0001~99.9 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1~99중량%로 포함될 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것으로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이며, 각각 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0044] 예컨대, 각종 식품류, 즉 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 껌류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 각종 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 차류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등) 등과 각종 건강보조식품, 건강기능식품 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0045] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성

식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 음료란 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 필수 성분으로서 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0047] 이외에도 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 예컨대 본 발명의 현초 추출물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업자에 의해 적절히 조절할 수 있다.

[0048] 상기 의약 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제 등을 더욱 포함할 수 있다.

[0049] 상기 담체, 부형제 및 희석제는 예컨대 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 등이 될 수 있다.

[0050] 또한 상기 의약 조성물은 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물 이외에 공지의 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료 활성을 갖는 화합물 또는 식물 추출물을 더욱 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않으나 바람직하게는 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물 100 중량부에 대해 각각 5 내지 200 중량부로 포함할 수 있다.

[0051] 상기 의약 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 예컨대 경구 투여시에는 산제, 과립제, 정제, 현탁제, 에멀전, 시럽 등의 제형으로 사용될 수 있다.

[0052] 바람직한 투여량은 투여대상 및/또는 질환의 치료 또는 예방에 적합한 함량이 될 수 있으며, 이는 투여대상의 연령, 성별, 일반 건강 상태 및 체중, 질병의 종류 및 중증도, 제형의 종류, 조성물에 함유된 다른 성분의 종류 및 함량, 조성물의 분비율, 투여경로 및 기간 등을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0053] 상기 투여대상은 인간을 포함하는 포유류가 될 수 있으며, 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료를 위한 유효 투여량은 예컨대, 유효성분을 기준으로 하였을 때 1 회 성인 체중 1 kg을 기준으로 하여 0.1 내지 500 mg의 용량으로 1회 이상 투여 가능하다. 그러나 상기한 투여량은 예시하기 위한 일예에 불과하며 상기 범위에 한정되지는 않는다.

발명의 효과

[0054] 본 발명에 따라 알도스 환원효소 억제, 갈락티톨 생성 억제, 및 최종당화산물 생성 억제 효과가 뛰어난 현초 추출물 및 이의 분획물, 상기 현초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다. 상기 현초 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 조성물은 복부팽만감, 구역감, 설사, 저혈당 유발 등의 원치 않는 부작용 내지 독성의 우려 없이 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 현초를 추출 및 순차분획하는 공정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 얻어진 각 용매별 현초 추출물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 얻어진 현초 분획물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] **참조예 1. 재료의 준비**

[0058] A. 현초(*Geranium thunbergii*)

[0059] 하기 실시예 및 실험예에 사용된 현초(*Geranium thunbergii*)는 강원도 춘천 소재의 약업사에서 구입하여 외부형태를 비교 조사하고 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 현초는 한림대학교 생명과학관 5층 천연물화학실험실에 보관되어 있다.

[0060] B. 시약

[0061] 하기 실시예 및 실험예에서 사용된 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 에틸 아세테이트(EtOAc), 에탄올(EtOH) 등의 추출용매, 분획용매, 및 컬럼 크로마토그래피에 사용된 용매는 국내 덕산 제품을 사용하였고, HPLC 분석에 사용된 아세트나이트릴, MeOH은 HPLC용으로 Fisher scientific (Fair Lawn, NJ, USA), 트리플루오로아세트산은 Applichem GmbH (Darmstadt, Germany)으로부터 HPLC급으로 구입하여 사용하였다.

[0062] 물질 분리를 위한 컬럼 크로마토그래피용 RP-18은 Merck (LiChroprep RP-18, 40-63 μm , Merck, Darmstadt, Germany)사에서 구입하여 사용하였다. 1,1-디페닐-2-피크릴히드라질(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS), p-니트로페닐- α -D-글루코피라노사이드(p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside), 소혈청알부민(BSA), 소듐 카보네이트, 소듐 아자이드, β -니코틴아미드 아데노신 뉴클레오티드 포스페이트(β -nicotinamide adenosine nucleotide phosphate)(NADPH, 환원형), DL-글리세르알데히드 다이머(dl-glyceraldehyde dimer), 퀘르세틴 이수화물(quercetin dehydrate), 메틸글리옥살(40% 수용액), 아미노구아니딘 하이드로클로라이드는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

[0063]

[0064] **참조예 2. 통계처리**

[0065] 통계처리는 SAS (statistical analysis system) program을 사용하여 각각의 시료에 대한 평균(Mean)±표준편차(SED)로 나타내었으며, 각 군의 평균치에 대한 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

[0066] **실시예 1. 현초 추출물의 제조**

[0067] 현초의 최적 추출용매를 확보하기 위해 현초를 각각 95%(v/v) EtOH, H_2O 로 추출하였다.

[0068] 상세하게는 건조된 현초 1.5 kg을 분말화(20-30 mesh)한 후 각각의 용매 15 L를 가하여 H_2O 추출은 100℃로, 95%(v/v) EtOH 추출은 50℃ 조건에서 3시간 동안 환류 냉각 추출 한 후, Whatman No. 2 여과지로 여과하여 여액과 잔사를 얻었다. 이후 상기 얻어진 잔사를 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출, 여과하였다(도 1). 각 단계에서 얻어진 여액을 모아 감압 농축한 후 동결 건조하여 95%(v/v) EtOH, H_2O 각 용매별 추출물을 얻었다.

[0069] 얻어진 용매별 추출물들은 각각 95%(v/v) EtOH 추출물 75.7g(5.04%)과 H_2O 추출물 84.0g(5.60%)이었으며, 이를 HPLC로 분석하여 도 2에 나타냈다.

[0070] **실시예 2. *In vitro* 에서 현초의 알도스 환원효소(Aldose reductase, AR) 억제 활성 평가**

[0071] **실시예 2-1. 용매별 추출물의 AR 억제 활성 평가**

[0072] 당뇨병병증 치료 또는 예방 효과와 관련하여, 당뇨병병증 발병 저해를 위한 알도스 환원 효소 억제능을 알아보기 위해 상기 각 용매별 추출물의 RLAR 및 HRAR 억제활성을 측정하고 그 결과를 IC_{50} 값으로 나타내었다.

[0073] 1) RLAR 측정

[0074] 효소원으로는 흰쥐(Rat)의 수정체를 적출하고, 그 습중량에 따라 일정량의 소듐 버퍼(sodium buffer, pH 6.2)를 가하여 균질화 시킨 후, 균질화된 수정체를 4℃ 10000rpm에서 20분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 황산암모늄(ammonium sulfate)로 40%까지 포화시키고 원심분리한 상등액을 다시 취하여, 다시 70%가 되도록 황산암모늄을 가하여 1 시간 정도 저어준 다음, 원심분리하여 얻어진 펠렛(pellet)을 최소량의 완충액에 현탁하여 1일간 투석을 수행한 다음 이를 효소원으로 하였다.

[0075] 흰쥐 수정체 알도스 환원효소(Rat lens aldose reductase, RLAR)의 활성은 DL-글리세르알데하이드(DL-glyceraldehyde)를 기질로 사용하여 340nm에서 4분 동안 NADPH의 흡광도 감소율을 분광광도계로 측정하여 확인하였다.

[0076] 구체적으로 각각 1ml 큐벳(cuvette)에 조제한 효소원 90 μL, 0.1M 소듐 포스페이트 버퍼(pH 6.2) 621 μL, 0.3mM NADPH 90 μL, 10mM DL-glyceraldehyde 90 μL(첨가 또는 불첨가), 및 각 용매별 추출물 9 μL를 넣어 반응시킨 후, 340nm에서 4분 동안 NADPH의 흡광도 감소율을 측정하여 그 결과를 상기 표 1에 나타내었다. 대조 물질로는 알도스 환원 효소 억제효과가 있다고 알려진 표준물질인 퀘르세틴(Quercetin)을 사용하여 상기와 같은 방법으로 처리하여 흡광도의 감소율을 측정하여 각 용매별 추출물과 비교하였다.

[0077] 2) HRAR 측정

[0078] 한국과학기술연구원 강릉分院에서 제조한 재조합 인간 알도스 환원효소를 분양 받아 Haymanh와 Kinoshita가 사용한 방법(Hayman S., Kinoshita J. H., *J. Biol. Chem.*, 240, 877-882, (1965))을 변형하여 실험을 수행하였다. 효소 90 μL와 조효소인 NADPH (1.6 mM) 90 μL 를 인산칼륨 버퍼(pH 7.0) 621 μL에 첨가한 다음 각 용매별 추출물 9 μL과 DL-glyceraldehyde 90 μL를 넣어 반응을 시작하고, 이 반응액을 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 4분간 NADPH의 감소율을 측정하였다. 또한 알도스 환원 효소 억제제로 알려진 퀘르세틴(Quercetin)을 양성대조군으로 사용하여 그 효능을 비교하였다.

[0079] 각 효소(rat lens aldose reductase, RLAR; human recombinant aldose reductase, HRAR) 활성의 저해도(%)는 다음 식에 의하여 산출하고, 그 결과를 IC₅₀값(50% 억제시의 농도)으로 표현하여 하기 표 1에 나타내었다.

[0080] 효소활성 저해도(%) = {1-(S/C)}x 100

[0081] S: 시료 첨가군의 기질 첨가 전 후의 흡광도 변화

[0082] C: 음성 대조군의 기질 첨가 전 후의 흡광도 변화

표 1

[0083] 현초(*Geranium thunbergii*) 추출물의 알도스 환원효소 억제 효과

시료	IC ₅₀ (μg/mL)*	
	RLAR	HRAR
H ₂ O ext.	5.24	
EtOH ext.	6.39	7.24
퀘르세틴(quercetin)**	2.00	3.15

[0084] *상기 IC₅₀ 값은 50% 억제시의 농도임.

[0085] **퀘르세틴은 양성 대조군임.

[0086] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 현초 물, EtOH 추출물의 IC₅₀값이 각각 5.24, 6.39 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(표 1). 양성 대조군으로 사용된 퀘르세틴의 IC₅₀값이 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 인 것과 비교했을 때, 보다 높은 농도에서 50% 억제효과를 나타냈으나 퀘르세틴은 단일 성분으로 정제된 것이므로, 추출물의 형태로서 실험한 것임을 고려할 때 각 용매별 추출물은 우수한 AR 억제 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0087] 실시예 2-2. 95%(v/v) EtOH로 추출된 추출물의 순차분획 및 이의 알도스 환원효소(Aldose reductase, AR) 억제 활성 평가

[0088] 상술한 바와 같이, 추출용매 95% EtOH과 H₂O 중 특히 95%(v/v) EtOH로 추출된 추출물에서 가장 우수한 활성 결과가 확인되어, 95%(v/v) EtOH로 추출된 추출물 에 대해 순차분획을 더 실시하였다. 구체적으로 95%(v/v) EtOH 추출물 79.5g을 증류수 1.5L에 완전히 녹인 후, 동량의 CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH 그리고 H₂O 층으로 극성에 따라 순차분획을 실시하여 각 분획물들(CH₂Cl₂ 분획물 17.7g(1.18%), EtOAc 분획물 11.7g(0.78%), BuOH 분획물 9.5g(0.63%) 및 H₂O 분획물 24.8g(1.89%))을 얻었으며(도 1), 이를 HPLC로 분석하여 도 3에 나타냈다. 이후 상기 얻어진 각 분획물들을 감압 농축한 후 동결건조를 실시하여 0.001~10mg/mL 농도로 사용하였다.

[0089] 상기 순차적 분획물의 AR(RLAR, HRAR) 억제활성은 상기 실시예 2-1의 용매별 추출물의 AR 억제활성 측정 방법과 동일하게 측정하여 이에 대한 결과를 각각 IC₅₀값으로 표현하여 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0090] 95%(v/v) EtOH로 추출된 현초(*Geranium thunbergii*) 추출물의 순차분획물의 알도스 환원효소 억제 효과

시료	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)*	
	RLAR	HRAR
CH ₂ Cl ₂ fr.	8.69	>10
EtOAc fr.	2.64	4.21
BuOH fr.	1.92	3.22
H ₂ O fr.	>10	>10
퀘르세틴(quercetin)**	2.00	3.15

[0091] *상기 IC₅₀ 값은 50% 억제시의 농도임.

[0092] **퀘르세틴은 양성 대조군임.

[0093] 상기 표 2에 나타난 바와 같이 95%(v/v) EtOH로 추출된 현초 추출물을 이용한 순차적 분획물 모두에서 처리농도에 따라 농도 의존적으로 AR 억제활성이 증가함을 보였으며, 구체적으로 BuOH(1.92 $\mu\text{g/mL}$) > EtOAc (2.64 $\mu\text{g/mL}$) > CH₂Cl₂ (8.69 $\mu\text{g/mL}$) > H₂O (>10 $\mu\text{g/mL}$)순서로 억제 억제활성을 나타내었다. 특히 BuOH 분획물의 경우 RLAR의 IC₅₀값은 1.92 $\mu\text{g/mL}$ 이고, HRAR의 IC₅₀값은 3.22 $\mu\text{g/mL}$ 로서, 양성 대조군인 퀘르세틴의 RLAR IC₅₀값인 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 및 HRAR의 IC₅₀값인 3.15 $\mu\text{g/mL}$ 과 동등한 수준으로 나타나 분획물 수준임을 고려할 때, 현초 추출물의 각 분획물들은 RLAR 뿐만 아니라 HRAR 억제 활성 효과 모두 월등히 뛰어남을 확인할 수 있었다.

[0094] 실시예 3. *Ex vivo* 에서 수정체 내의 갈락티톨(galactitol) 생성 억제활성 평가

[0095] 상기 실시예 2에서 측정된 현초 추출물 및 분획물의 *in vitro* 내 AR 억제 활성 결과를 토대로 당뇨병성 망막증의 주요 발현 인자인 수정체 내의 갈락티톨 생성 억제 활성을 측정하여 하기 표 3에 나타내었다.

[0096] 구체적으로, 수정체 내의 갈락티톨 생성 억제 활성을 측정하기 위해 10 주령의 수컷 Wistar rat을 구입하여 수정체를 적출하여 사용하였다. 적출한 수정체는 TC-199 배양액(medium)(sigma-aldrich, USA)에 15% 우태아혈청

(fetal bovin serum)(sigma-aldrich, USA)과 100 units/mL의 페니실린(penicillin) (sigma-aldrich, USA), 0.1 mg/mL의 스트렙토마이신(streptomycin) (sigma-aldrich, USA)을 첨가한 후, 3 그룹으로 나누어 시료군과 대조군에는 5 mM의 글루코스와 30 mM의 갈락토스를 blank군에는 5 mM의 글루코스와 30 mM의 만니톨을 첨가하여 6일 동안 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 수정체 내에 생성된 갈락티톨 측정은 수정체를 PBS 버퍼에 넣은 후 균질기(homogenizer)를 이용하여 균질화 시킨 후 10000rpm 에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 그 상등액을 벤조일화(benzoylation) 시킨 후 HPLC를 사용하여 288 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 퀘르세틴(Quercetin)을 사용하여 활성을 비교하였다.

표 3

[0097]

고농도의 갈락토스로 배양된 쥐 수정체에서 현초의 갈락티톨 축적에 대한 저해효과

시료	갈락티톨 함량 [(μ g/수정체 습중량(g))*]	억제율 (%)
Blank(Galactose-free)	1.06	
Control	58.03	
Quercetin**	10.54	83.36
95% EtOH ext.	34.52	41.27
EtOAc fr.	22.43	62.49
BuOH fr.	12.51	79.90

[0098]

* 100 μ g/mL 농도의 시료로 처리한 쥐 수정체의 3회 반복 분석 평균

[0099]

** 양성 대조군

[0100]

상기 표 3에 나타난 바와 같이, 95%(v/v) EtOH 추출물은 100 μ g/mL의 농도에서 갈락티톨의 생성을 41.27% 억제하였으며, EtOAc 분획물은 같은 농도에서 62.49%로 갈락티톨의 생성을 억제하였다. 특히 BuOH 분획물의 경우 같은 농도에서 79.90%에 달하는 억제율을 나타내, 양성 대조군인 퀘르세틴의 갈락티톨 생성 억제율인 83.36%과 대등한 정도의 매우 높은 억제율을 나타냈다. 또한 다른 현초 추출물 및 분획물의 경우에도 비록 본 실험에서는 퀘르세틴보다 낮은 억제율을 나타냈으나 추출물 및 분획물 수준에서 측정된 결과임을 고려할 때, 갈락티톨 생성 억제 효과가 매우 뛰어나함을 확인할 수 있었다. 따라서, 현초 추출물 및 분획물은 당뇨병성 망막증의 진행을 지연시키는 신규한 천연물로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0101]

실시예 4. 최종당화산물 (Advanced glycation endproducts, AGEs) 생성 억제 활성 평가

[0102]

단백질원으로 소혈청알부민(bovine serum albumin) 50 mg/mL를, 항균제인 소듐 아지드(sodium azide)를 포함하는 0.1 M 인산 완충액(sodium phosphate buffer, pH 7.4) 1.5 mL에 가하고, 상기 실시예 1의 현초 추출물 또는 실시예 2-2의 분획물을 하기 표 4의 농도로 각각 첨가하여 실온에서 30분간 전반응시켰다. 이후 5mM 메틸글리옥살(methyl glyoxal solution)를 첨가하여 37°C에서 2주간 배양하였다. 효능의 우수함을 비교할 수 있는 양성 대조군으로는 아미노구아니딘을 하기 표 4의 농도로 사용하였다.

[0103]

상기 배양과정을 수행한 후, 생성된 최종당화산물의 함량은 형광물질(Fluorescence) 및 스펙트로포토미터(spectrofluorometer)(Excitation: 350nm, Emission: 450nm)를 이용하여 확인하였으며 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0104]

Sample	Concentration (μ g/ml)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (μ g/mL)*
H ₂ O ext.	196.08	20.68	-
EtOH ext.	196.08	25.33	-
CH ₂ Cl ₂ fr.	196.08	33.57	-
EtOAc fr.	196.08	62.67	76.58
	98.04	53.76	
	19.61	31.17	

BuOH fr.	196.08	75.18	61.47
	98.04	61.86	
	19.61	23.84	
H ₂ O fr.	196.08	-	-
Aminoguanidine	196.08	80.44	77.14
	98.04	52.77	
	19.61	10.99	

[0105] 억제율은 대조군에 대한 비율(%)로 측정하였다.

[0106] *상기 IC₅₀ 값은 50% 억제시의 농도임.

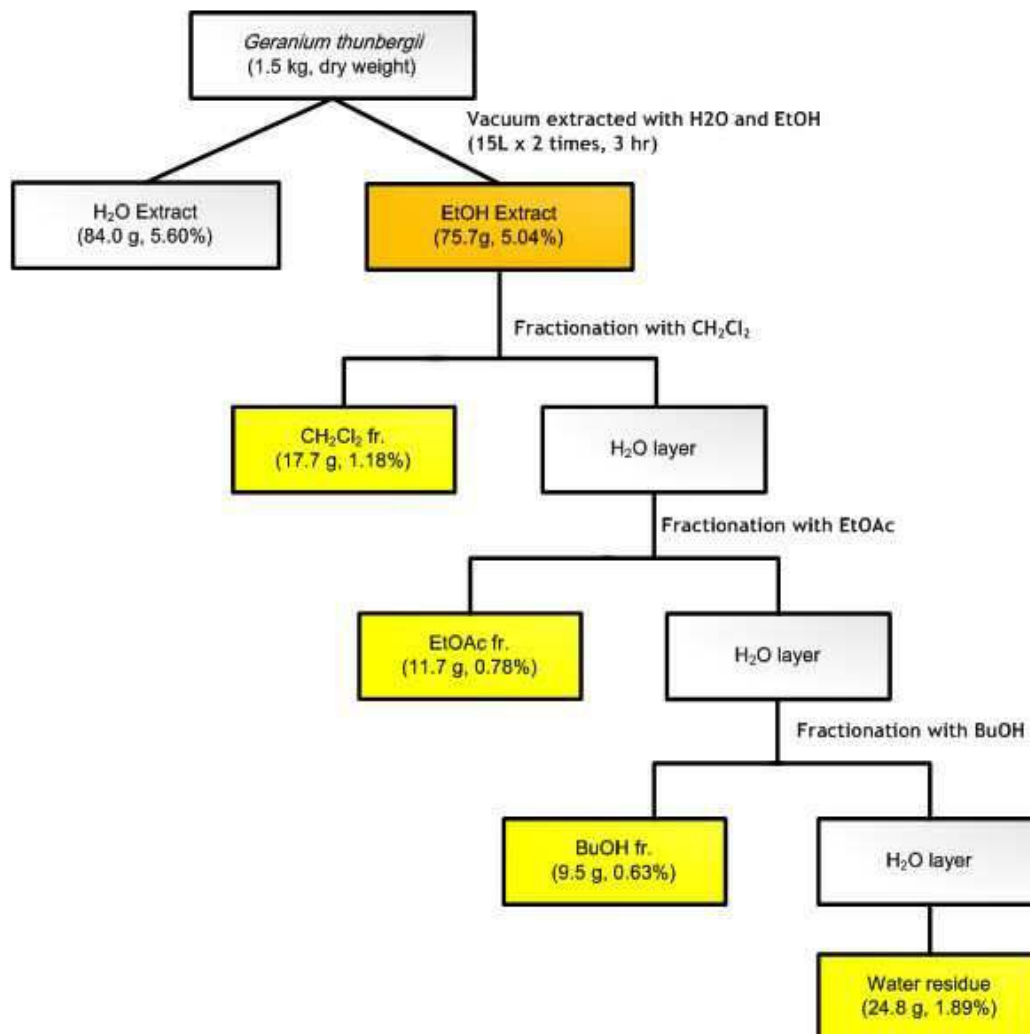
[0107] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 현초 용매별 추출물의 최종당화산물 생성 억제 효과를 확인한 결과, 현초의 물, 95%(v/v) EtOH 추출물은 196.08 µg/mL의 농도에서 각각 20.68%, 25.33%의 저해 효과를 나타내 EtOH 추출물이 비교적 높은 최종당화산물 생성 억제효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0108] 현초 분획물의 최종당화산물 생성 억제 효과를 확인한 결과에 따르면, BuOH과 EtOAc 분획물은 처리 농도에 따라 의존적으로 최종당화산물 생성 억제 효과가 증가하였으며, 특히 BuOH 분획물이 가장 우수한 최종당화산물(AGE) 생성 억제 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, EtOAc 분획물 또한 양성 대조군인 아미노구아니딘에 비해 우수한 최종당화산물 생성 억제 활성이 있음을 알 수 있었다.

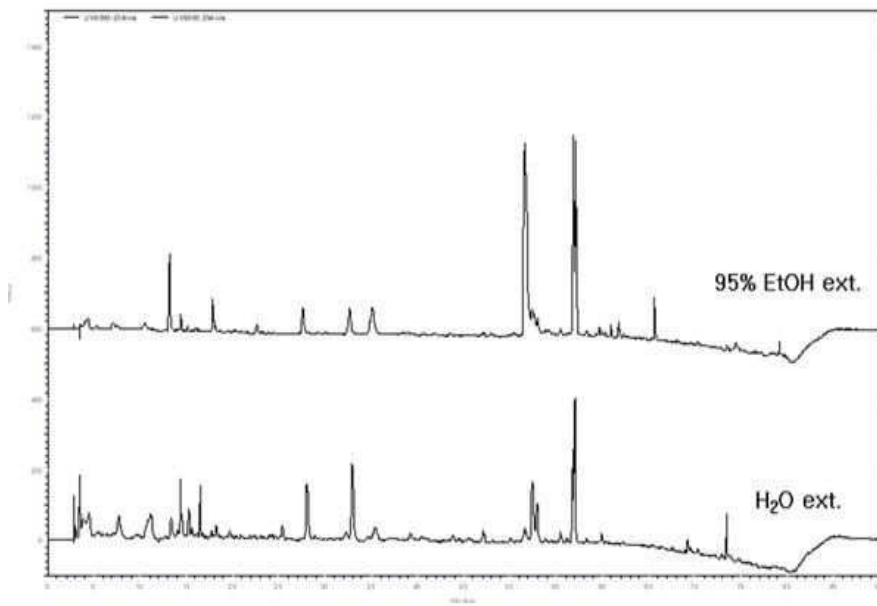
[0109] 구체적으로, 최종당화산물 생성억제효과가 인정된 아미노구아니딘의 IC₅₀을 기준으로 효능을 비교하였을 때, 아미노구아니딘의 IC₅₀값이 77.14 µg/mL로 나타난 것과 비교하여, 현초 분획물, 특히 EtOAc 분획물 및 BuOH 분획물은 각각 76.58 µg/mL 및 61.47 µg/mL로 나타나 아미노구아니딘 보다 높은 우수한 최종당화산물 생성 억제효과가 인정되었으며, 그 중에서도 BuOH 분획물이 월등히 높은 최종당화산물 생성 억제효과를 나타냈다. 상기 현초 분획물은 억제 효과상의 우수성뿐만 아니라, 임상 3상 실험에서 독성이 드러난 아미노구아니딘과 달리 식용으로 사용되는 천연식물의 추출물이므로 안정성이 인정된다는 점에서 그 산업적 효과가 매우 크다 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

