

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0090584
(43) 공개일자 2011년08월10일

(51) Int. Cl.
A61K 36/28 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0010455
(22) 출원일자 2010년02월04일
심사청구일자 2010년02월04일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102동 401호
김진규
강원도 춘천시 퇴계동 프란체아파트 1005동 1103호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 금불초 추출물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 저해제

(57) 요약

금불초 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 및/또는 당뇨합병증 억제용 조성물이 제공된다. 본 발명에 따른 조성물은 α -글루코시데이즈 저해활성, 항산화활성 및 알도스 환원효소 억제활성 및 최종당화산물 억제작용 등이 뛰어나 당뇨 및/또는 당뇨합병증의 예방 및/또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

(72) 발명자

이수경

강원도 춘천시 칠전동 대우1차아파트 104동 603호

강일준

강원도 춘천시 퇴계동 주공2차아파트 209동 403호

신현경

서울특별시 성북구 안암동1가 361번지 래미안 안암
아파트 104동 602호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명 지식경제부

연구관리전문기관

연구사업명 지역혁신센터(RIC)사업

연구과제명 인삼 및 기능성 소재를 이용한 혈당조절 소재개발

기여율

주관기관 한림대학교

연구기간 2009.03.01 ~ 2010.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

금불초를 물, C₃ 내지 C₅의 케톤, 및 C₁ 내지 C₄의 직쇄 또는 분지형 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 추출하여 얻어진 추출물; 및

상기 추출물을 물, C₅ 내지 C₇의 알칸, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 및 C₁ 내지 C₄의 직쇄 또는 분지형 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 분획하여 얻어진 분획물

로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는,

당뇨 또는 당뇨병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금불초는 *Inula britannica* var. *japonica*인,

당뇨 또는 당뇨병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 당뇨병증은 당뇨병성 혈관장애, 당뇨병성 신경장애 또는 당뇨병성 감염증인,

당뇨 또는 당뇨병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 당뇨병증은 당뇨병 망막증(diabetic retinopathy), 당뇨병 백내장(diabetic cataract), 당뇨병 신증(diabetic nephropathy), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy), 당뇨병 혈관합병증인,

당뇨 또는 당뇨병증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨병증의 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품.

명세서

기술분야

[0001]

금불초 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 또는 당뇨병증 억제용 조성물이 제공된다. 본 발명에 따른 조성물은 알파-글루코시데이즈 억제율이 우수하여 당뇨 예방 및/또는 치료 효과가 있을 뿐 아니라, 항산화활성 및 알도스 환원효소 억제활성 및 최종당화산물 억제작용 등이 뛰어나 당뇨병증의 예방 및/또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

배경기술

[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, 당뇨병증의 약 반수 이상이 당뇨병성 망막병증이며 성인 실명의 가장 큰 발병 원인이며, 증세로는 시력장애, 녹내장, 시력상실 등이 있다. 당뇨병증을 유발

하는 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 당뇨병증으로 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. 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.
- [0007] 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^+ -myoinositol cotransporter)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.
- [0008] 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 농도가 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

증들의 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 활용할 수 있다. 또한 소르비톨의 세포내 축적이 당뇨병망막병증을 유발시키는 원인으로 알려져 있다. 인슐린 비의존성 당뇨병환자의 당뇨병망막병증의 진행은 적혈구내 소르비톨 수치보다는 지속기간이 더 중요하며 소르비톨 수치가 정상치보다 높은 시기에 알도스 환원효소 억제제를 조기 사용하는 것이 당뇨병망막병증의 예방 및 치료에 효과적일 수 있다는 임상연구가 보고되었다.

[0009] 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(nonenzymatic 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 조기당화산물이 생성되는 단계와 (2) 고혈당 상태가 지속되어 가역적인 아마도리형의 조기당화산물이 분해되지 않고 재배열(rearrangement)되고 단백질과 교차결합(cross-linking)하여 비가역적인 최종당화산물이 생성되는 단계로 나눌 수 있다. 가역적인 아마도리형의 조기당화산물과 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.

[0010] 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 아미노구아니딘·HCl(aminoguanidine·HCl) 등이 대표적이다.

[0011] 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.

[0012] 이 외에 수 많은 저해제들이 개발되어 합성되어 오고 있지만 장기간 투여시 독성이 유발되는 문제점이 있어 보다 안전한 새로운 저해제에 대한 탐색 및 개발이 요망되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 이에 본 발명자들은 금불초 추출물로부터 당뇨 및/또는 당뇨합병증의 치료 및 예방에 사용될 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서, 본 발명의 일례는 금불초의 추출물 및 분획물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 당뇨 및/또는 당뇨합병증 예방 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0015] 또 다른 예는 금불초의 추출물 및 분획물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 당뇨 및/또는 당뇨합

병증 예방 및/또는 개선용 건강 기능성 식품을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은 알도스 환원효소의 활성을 저해하고, 최종당화산물생성을 억제하여 당뇨 및/또는 당뇨합병증을 예방 및/또는 치료할 수 있는 천연 식물 추출물을 유효성분으로 하는 조성물 및/또는 건강 기능성 식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0017] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0018] 금불초 추출물 및/또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 및/또는 당뇨합병증 예방 및/또는 치료용 조성물이 제공된다.
- [0019] 금불초 (金佛草, Chineses elecampane, *Inula britannica*)은 초롱꽃목, 국화과에 속하는 여러해살이풀로, *Inula britannica* var. *japonica* [*Inula britannica* var. *japonica* (Thunb.) Franch. & Sav], *Inula britannica* var. *chinensis*, 등이 있으며, 우리나라 전역과 일본, 중국, 내몽고, 소련에 분포한다. 바람직한 구체예에서, 상기 금불초는 *Inula britannica* var. *japonica*일 수 있다.
- [0020] 약초명으로 선복화, 금불초, 옷풀, 하국, 6월국이라고 하며 노란색으로 피는 꽃이 환하고 잔잔하여 마치 부처님의 얼굴처럼 평화로워 보이기 때문에 금불초라는 이름을 가진다. 습기를 잘 견디고 건조한 곳에서 잘 자라 재배하기 쉽다. 땅속 줄기가 발달하여 퍼지고 줄기는 곧게 자라며 잎은 끝이 뽕족한 타원형이다. 7-9월에 지금 3-4cm의 노란색 꽃이 피는데 한방에서는 금불초의 꽃을 말린 것을 선복화라고 하여 약으로 쓰이며 이는 거담, 진해, 건위, 진통, 진정 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 어린순은 나물 또는 국거리 등의 식용으로 이용된다. 금불초에 관한 연구로는 추출 에센셜 오일에 대한 성분 분석, 클로로포름 추출물에서 분리한 *mataraxasteryl acetate*의 간보호 효과, 선복화로부터 분리된 세스퀴테르펜 락톤류(*sesquiterpene lactones*)의 암세포 사멸유도효과, 산화질소 합성효소(*nitric oxide synthase*)와 사이클로옥시게네이스-2(*cyclooxygenase-2*)의 억제능, 글루타메이트에 의해 유도된 뇌세포 괴사에 대한 보호능, 자가면역성 당뇨에 대한 보호능 등이 있다. 금불초의 활성성분으로 *O*,*O*-디아세틸브리안니락톤(*O,O*-diacetylbrannilactone), *O*-아세틸브리안니락톤(*O*-acetylbrannilactone) 등의 세스퀴테르펜류(*sesquiterpenes*)가 밝혀졌으며, 그 외에 *n*-BuOH 추출물에서 분리된 파툴레틴(*patuletin*), 네페틴(*nepetin*), 악실라린(*axillarin*) 등의 플라보노이드류에 대한 활성이 보고 되어 있다.
- [0021] 본 발명에서는 금불초(*Inula britannica* var. *japonica*)의 최종당화산물(*advanced glycation endproducts*)의 형성 억제와 알도스 환원효소(*aldose reductase*) 억제 활성이 있음을 밝혀서, 당뇨 및/또는 당뇨합병증 예방 및/또는 치료 활성을 확인하였다.
- [0022] 금불초는 그 사용 부위에 특별한 제한이 없으며, 진초를 사용하거나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 등의 특정 부위를 사용하여도 무방하며, 건조시키거나 건조시키지 않은 상태로 모두 사용 가능하다. 보다 바람직하게는 금불초 뿌리, 줄기, 및 잎으로 이뤄진 군에서 선택된 1종 이상의 부위를 사용할 수 있고, 건조된 것으로 사용할 수 있다.
- [0023] 상기 금불초 추출물은 물, C₃ 내지 C₅의 케톤, 및 C₁ 내지 C₄의 직쇄 또는 분지형 알코올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 이용하여 통상의 식물 추출방법으로 얻어진 것일 수 있다. 또한, 상기 분획물은 앞서 설명한 금불초 추출물을 물, C₅ 내지 C₇의 알칸, C₁ 내지 C₄의 직쇄 또는 분지형 알코올, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 C₅ 내지 C₇의 알칸, 메틸렌클로라이드, 및 에틸아세테이트를 순차적으로 이용하여 통상의 방법으로 분획하여 얻어진 것일 수 있다.
- [0024] 금불초 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 바람직하게는 가압추출법, 환류추출법, 온침 추출법, 초음파 분쇄 추출법 등에 의할 수 있고, 바람직하게는 가압추출법에 의할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 상기한 바와 같이 제조된 추출물은 이후 감압 여과과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다. 따라서, 본 발명에서의 금불초 추출물은 통상적 방법으로 건조된 건조물과 통상적 방법으로 농축된 농축물을 포함하는 의미로 사용된다.
- [0026] 당뇨합병증은 당뇨병으로 인한 고혈당과 단백질의 반응이 비가역적으로 진행되어 최종당화산물(*Advanced*

glycation endproducts, AGEs) 이 생성되어 혈중이나 조직의 다른 단백질과 교차결합하여 유발시키는 여러 가지 합병증을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서 금불초 추출물 및/또는 분획물이 예방 및/또는 치료 효과를 갖는 당뇨병증은 당뇨병성 혈관장애, 당뇨병성 신경장애 또는 당뇨병성 감염증 등일 수 있으며, 바람직하게는 당뇨병 망막증(diabetic retinopathy), 당뇨병 백내장(diabetic cataract), 당뇨병 신증(diabetic nephropathy), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy), 당뇨병 혈관합병증 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 당뇨병 망막증, 당뇨병 백내장 또는 당뇨병 신증일 수 있다.

[0027] 본 발명의 당뇨병증 치료 활성은 최종당화산물(Advanced Glycation End-products, AGEs)의 형성 억제능 및 알도오스 환원효소(Aldose reductase) 억제능을 통하여 시험하였다.

[0028] 최종당화산물은 비효소적 당화반응에 의해 당이 단백질과 결합하여 schiff base와 아마도리 산물(amadori product)을 거쳐서 생성된다. 그러나 만성적인 고혈당 상태에서는 아마도리 산물이 가역적으로 최종당화산물을 생성하는 비가역적인 반응으로 가속화되어 조직과 혈청 중에 대량 생성되어 축적된다. 따라서, 최종당화산물의 생성은 심각한 당뇨병증을 일으키는 주요원인 중 하나로 된다.

[0029] 제2형 당뇨병 환자의 혈액 내 최종당화산물의 농도와 심혈관계질환의 유무 및 중증도와 연관이 뚜렷하고 여러 동물 모델 연구에서도 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 만성적인 고혈당과 생체 단백질과의 비효소적 당화 반응에 의해 생성되는 최종당화산물은 당뇨병증의 주요 원인중 하나이다. 당뇨병증은 혈당이 정상적으로 회복되었음에도 불구하고 발병하는 경우가 많다. 최종당화산물은 고혈당의 농도에 비례하여 조직에 축적되는 단백질 당화산물로 특이한 흡광도 및 형광을 나타내고, 특히 단백질의 아미노기가 서로 cross-link 반응을 일으키는 성질을 가지고 있다. 최종당화산물은 한번 생성되면 혈당이 정상적으로 조절되어도 분해되지 않고 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시키며, atheroma성 동맥경화증, DNA의 돌연변이, 노화, 알츠하이머병, 당뇨병증등에 관여한다고 알려져 있다.

[0030] 또한, 당뇨병증의 유발기전 중 하나인 폴리올 경로(polyol pathway- y)의 증가는 세포손상을 일으키는 기전이다. 알도오스 환원효소(Aldose

[0031] reductase)는 폴리올 경로에서 글루코오스를 소르비톨에서 프룩토오스로 전환하는 과정에 관여하는 효소이다. 고혈당 상태가 되면 세포내 포도당 대사의 변화가 일어나는데, 과잉의 포도당이 세포내로 들어오면 알도오스 환원효소에 의해 소르비톨로 전환되며, 소르비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase)에 의해 프룩토오스(fructose)로 전환된다. 정상혈당 상태에서는 포도당에 대한 알도오스 환원효소의 Km값(70 mM)이 높아 세포 내 소르비톨 농도는 매우 낮다. 그러나 고혈당에 의해 세포 내 포도당 농도가 올라가면 세포 내 소르비톨 농도가 증가될 뿐만 아니라 소르비톨 탈수소효소의 반응속도가 느려 소르비톨이 세포내에 축적하게 된다. 결국 세포내에 축적된 소르비톨의 높은 삼투압으로 세포가 팽창하게 되고 세포가 손상을 입게 되며 결국 백내장, 당뇨병성 신경증, 망막증 등의 합병증을 야기하게 된다.

[0032] 따라서 본 발명에서는 부작용이 없으며 효과적으로 당뇨병증을 예방할 수 있는 새로운 천연물을 개발하기 위하여, 금불초 추출물 및 분획물의 알도오스 환원효소 활성 억제능, 최종당화산물 생성 억제능, 및 RBC (Red Blood Cell, 적혈구) 내 소르비톨 함량 감소 효과를 시험하였다 (실험예 3 내지 5 참조).

[0033] 또한, 본 발명에 따른 금불초의 추출물 및/또는 분획물은 우수한 항산화 활성을 갖는 것으로 나타났다. 본 발명의 조성물의 항산화 효과를 시험하기 위하여 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거효과를 시험하였다. DPPH는 화학적으로 안정한 자유 가디칼을 지니고 있는 화합물로 항산화 활성을 가진 물질을 만나면 환원되어 항산화 능력을 확인하는데 널리 사용되는 물질이다. DPPH를 이용한 전자공여작용은 자유 라디칼에 전자를 공여하여 식품 중의 지방 산화를 억제하는 목적으로 사용되고 인체 내에서는 자유 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용으로 이용되고 있다.

[0034] 금불초의 추출물 및/또는 분획물의 DPPH 라디칼 소거능을 시험하여 항산화능을 평가한 결과, 금불초의 추출물 및/또는 분획물은 우수한 항산화능을 갖는 것으로 나타났다 (실험예 1 및 2 참조).

[0035] 본 발명의 금불초 추출물 및/또는 분획물의 α -글루코시데이스에 대해서 억제율을 기존의 혈당강하제로 사용되는 아카보오스(acarbose)와 비교한 결과, 아카보오스에는 미치지 못하지만 높은 억제율을 보였으며, 이와 같은 결과는 본 발명의 조성물이 유효성분이 정제되어 있는 형태가 아닌 천연 추출물 형태임을 고려할 때, 우수한 효과로 인정될 수 있다 (실험예 6 참조).

[0036] 본 발명의 조성물은 유효성분인 금불초의 추출물 및/또는 분획물 외에, 당노 및/또는 항당노합병증에 효과를 갖는 것으로 알려진 다른 성분, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 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 금불초의 추출물 또는 분획물 100 중량부 당 0.1 내지 50 중량부 범위 범위에서 추가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 상기 조성물 내의 상기 금불초의 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%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0038] 상기 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0039] 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, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.

[0040] 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 유효성분을 기준으로 1일 0.1 mg/kg 내지 200 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.

[0041] 또 다른 예에서, 상기한 바와 같은 금불초 추출물 및/또는 분획물을 포함하는 당뇨합병증의 예방 및/또는 개선용 건강 기능성 식품이 제공된다. 본 발명에서 식품은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의미로 사용된다. 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, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일,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.

[0042] 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.

[0043] 또한, 상기 식품에 있어서, 상기 금불초 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

[0044] 본 발명에 따른 금불초 추출물 및/또는 분획물을 포함하는 조성물은 당뇨 및/또는 당뇨합병증 치료 효과가 우수하면서도 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 조성물이므로, 당뇨 또는 당뇨합병증의 치료에 보다 안전하게 적용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하도록 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 대표적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0046] 실시예 1: 금불초 추출물의 제조

[0047] 금불초(*Inula britannica* var. *japonica*) 잎 부분을 건조시킨 후, 건조된 금불초 잎 100g에 상기 중량 기준으로 10배(v/v)의 50%(v/v) 에탄올을 가하고 70℃에서 3시간 동안 추출한 다음 이를 여과하여 금불초 잎 추출액을 얻었다. 상기 추출 과정을 2회 반복하여 얻어진 추출액을 40℃ 이하에서 감압 농축한 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물을 얻었다

[0048] 실험예 1: ABTS 자유라디칼 소거활성 효과 시험

[0049] ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)-Diammonium salt, Fluka 구입)는 2 mM 농도로 3.5 mM 포타슘 퍼설페이트(potassium persulfate)와 혼합하여 3차 증류수 10 ml에 용해시켰다. 상기 얻어진 용액에 3차 증류수 290 ml를 첨가하여 30배 희석시킨 후, 하룻밤 동안 두어 ABTS 라디칼 생성을 유도하여, ABTS 라디칼 용액을 제조하였다. 상기 실시예 1에서 제조된 금불초 추출물 10 μl와 상기 제조된 ABTS 라디칼 용액 290 μl를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 금불초 추출물의 라디칼 소거활성은 ABTS 라디칼을 50% 소거시키는데 필요한 농도를 다음의 계산식 1로 계산하여 IC₅₀값으로 계산하였으며, 그 결과를 아래의 표 1에 나타내었다.

[0050] 계산식 1

[0051] $(\text{ABTS 라디칼 소거율}(\%)) = \{1 - (\text{Control}/\text{Sample})\} * 100$

[0052] (control: 시료를 넣지 않은 상태로, ABTS와 용매(DMSO)만 있는 상태)

[0053] ABTS 라디칼 소거제로 알려진 Trolox(CALBIOCHEM 구입 Catalog No.-648471)를 양성 대조군으로 사용하였다

표 1

	농도 (μg/ml)	ABTS radical 억제율 (%)	IC ₅₀ (μg/ml)
금불초 추출물	33.33	31.74	-
Trolox	3.33	63.49	2.62
	1.67	31.09	
	0.33	12.03	

[0055] 실험예 2: DPPH 소거활성 효과 시험

[0056] 실시예 1에서 얻어진 금불초 추출물을 DMSO(1mg/ml)에 용해시킨 후, 1 mg/ml을 stock solution으로 하여 0.5mg/ml, 0.1mg/ml로 희석하여 사용하였다. 농도별로 라디칼 소거능을 측정하여 3가지 농도를 기준으로 IC₅₀ 값을 측정하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma에서 구입)는 0.32 mM 농도로 HPLC급 MeOH에 녹여 사용하고, 상기 실시예 1에서 제조된 금불초 추출물 30 μl와 DPPH 180 μl를 섞어 실온에서 20분간 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 금불초 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 다음의 계산식 2에 의하여 계산하였으며, DPPH를 50% 소거시키는데 필요한 농도를 여 IC₅₀값으로 계산하였으며, 그 결과를 아래의 표 2에 나타내었다.

[0057] 계산식 2(라디칼 소거율(%))= $\{1 - (\text{Control}/\text{Sample})\} * 100$

[0058] (control: 시료를 넣지 않은 상태로, DPPH와 용매만 있는 상태)

[0059] DPPH 소거제로 알려진 아스코르베이트 (Showa Chemicals Inc., Japan, 제마무역)를 양성 대조군으로 사용하였다

표 2

	농도 (μg/ml)	DPPH radical 억제율 (%)	IC ₅₀ (μg/ml)
금불초 추출물	142.86	25.93	-
Ascorbate	14.29	77.53	9.45
	7.15	31.69	
	1.43	13.04	

실험예 3: 알도스 환원효소 억제작용 시험

당뇨성합병증 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 글루코오스 대사경로인 폴리올 경로의 촉매 효소인 알도스 환원효소(aldose reductase) 활성에 대한 금불초 추출물의 효과를 확인하였다. 알도오스 환원효소 억제제는 글루코오스를 소르비톨로 변환하는 알도오스 환원효소를 억제하는 효소 억제제이며 소르비톨의 생산을 저하시키는 것이 목적이다. 많은 연구에서 폴리올 대사 이상이 당뇨병성 합병증을 유발하는 것으로 알려져 있으므로, 알도오스 환원효소 억제제는 당뇨병성 합병증의 치료제로서 유용할 수 있다.

이에, 본 실험예에서는 당뇨병성 치료 효과를 입증하기 위하여, 더덕 추출물 및 분획물의 알도스 환원효소 활성 억제능을 시험하였다.

무게가 200g이 넘는 래트(Sprague-Dawley(SD) rats; 수컷, 12주령, 250~280g, 중앙실험동물센터]의 수정체 (lens)를 적출하여 그 안의 수정체의 습증량에 따라 0.05M의 소듐 버퍼(pH 6.8)를 수정체 1개당 250 μL을 넣어 얼음 안에서 균질화시켰다. 이를 4℃, 7500rpm에서 30분간 원심분리(centrifuge UNION 55 R Hanil, Korea) 후, 그 상등액을 취하여 알도오스 환원효소 시험의 효소원으로 사용하였다.

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 μL에 상기 준비한 효소원 160 μL와 1.6mM NADPH(Applichem, Germany) 100 μL, 시료 (실시에 1에서 얻어진 금불초 추출물, 1mg/mL) 10 μL를 넣어주고, 마지막으로 0.1M DL-글리세르알데하이드(DL-Glyceraldehyde, Sigma, USA) 100 μL를 넣어주었다. 큐벳내부에서 4.4 분 동안 반응시켜 340nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 큐벳내부에서 4.4분동안 반응시켜 0s와 280s의 흡광값으로 sample의 흡광도값을 계산하였다.

계산식 2={0s에서의 흡광도 값-280s에서의 흡광도값}/반응시킨 시간}

상기 계산식 3에서 얻어진 흡광도 값을 이용하여 아래의 계산식으로 억제율을 구하였다.

계산식 3={(control-sample)/(control-blank)}*100

(control: 약물을 넣지 않은 상태에서 효소와 기질을 넣은 것,

blank: 기질을 뺀 나머지를 모두 넣은 상태)

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 실시예 1에서 제조된 금불초 추출물의 결과와 비교하였다.

50% 흡광도의 감소를 나타내는 각 시료의 농도 (IC₅₀)으로 표시하였고, 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하였으며, 그 결과를 아래의 표 3에 나타내었다

표 3

금불초 추출물의 흰쥐 수정체 알도스 환원효소 억제활성

	농도 (μg/ml)	억제율 (%)	IC ₅₀ (μg/ml)
금불초 추출물	10	87.85	4.00
	5	60.77	
	1	27.87	

Quercetin	5	77.01	2.40
	1	45.08	
	0.5	20.01	

[0074] 상기 표 3에서 알 수 있는 바와 같이, 금불초 추출물은 기존의 알도스 환원효소 억제물질로서 알려져 있는 퀘르세틴과 비교하여 동등 정도의 IC₅₀ 수치 및 각 농도에서의 억제율을 나타내었다.

[0075] 실험예 4: 최종당화산물 (Advanced glycation end product, AGEs) 생성 억제 효과 시험

[0076] 50 mg/ml BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma 구입, 카탈로그번호-A6003)과 5mM 메틸글리옥살 용액(Sigma 구입, 카탈로그번호-M0252)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/ml 농도의 금불초 추출물(실시예 1)을 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.

[0077] 흡광도의 억제율은 대조군의 발광도 증가값을 기준으로 시료의 발광도 증가값을 비교하여 계산하였다.

[0078] 계산식 4(억제율(%))={1-(S₁-S₀)/(C₁-C₀)}*100

[0079] (S₀: sample 0hr 발광도 반응값, S₁: sample 24hr 발광도 반응값, C₀: control 0hr 발광도 반응값, C₁: control 24hr 발광도 반응값)

[0080] (control: 약물을 넣지 않은 상태에서 BSA(5mg/mL)와 메틸글리옥살(2mg/mL)에 DMSO(dimethyl sulfoxide)만 넣은 상태)

[0081] 또한, 최종당화산물에 억제효과가 있다고 알려진 양성대조군으로 아미노구아니딘 (aminoguanidine, Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA))을 사용하여 위와 같은 방법으로 발광도 억제율을 비교하였다.

[0082] 50% 흡광도의 감소를 나타내는 시료의 농도 (IC₅₀)으로 표시하였고, 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하였으며, 그 결과를 아래의 표 4에 나타내었다.

표 4

[0083] 금불초 추출물의 최종당화산물 생성 억제효과

	농도 (μg/ml)	최종당화산물 생성억제율 (%)	IC ₅₀ (μg/ml)
금불초 추출물	196.09	49.12	-
Aminoguanidin	196.08	82.45	110.66
	98.04	46.71	
	19.61	13.91	

[0084] 실험예 5: RBC내 소르비톨 함량 측정

[0085] 10 주령된 수컷 Wistar 랫드를 구입하여 (중앙동물실험동물㈜) 약 350g), 에테르로 마취 후 복부를 절개하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 2.2%(w/v) 소듐 시트레이트 1 mL에 상기 채취된 혈액 9 mL를 섞어 상하로 천천히 섞어주었다. 얻어진 혼합물을 4℃에서 2,000g으로 5분동안 원심분리하여, 상층을 버리고, saline으로 3회 세척하였다. 얻어진 RBC (Red Blood Cell, 적혈구)에 30mM Glucose포함하는 Kerbs-Ginger bicarbonate buffer (Sigma-Aldrich, K4002 구입)와 시료(실시예 1)의 금불초 추출물 1mg/mL농도로 DMSO(dimethyl sulfoxide) 녹여서 사용, RBC 500ul에 금불초 추출물을 5ul를 넣어 5% CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 1시간 동안 반응시킴)를 처리하였다. 이것을 5% CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0086] 반응이 끝난 RBC를 차가운 Saline로 3회 세척하고, 차가운 6%(v/v) 퍼클로라이드산을 넣고, 4℃에서 2,000g으로 10 분동안 원심분리하였다. 얻어진 상층액에 차가운 2.5M K₂CO₃를 넣어서 중화시켰다. 중화시킨 상층액70ul에

1M KH_2PO_4 20 μl 와 3 μl 벤조일클로라이드와 8M NaOH 넣고 볼텍싱하여 혼합하였다. 여기에 1.4 M H_3PO_4 10 μl 를 넣어 중화시킨 후, 100 μl 에틸아세테이트를 넣어 볼텍싱하였다. 그리고 나서 원심분리하여 (실온, 2000rpm, 5분), 상,하를 완전히 나눈 후, 상층액을 질소로 날린 후, 아세토니트릴과 물 (70:30(v/v)) 혼합액으로 녹여 288 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0087] 상기 흡광도 측정은 YMC, 250X4.6mm, 4 μm 컬럼을 이용하였다. 벤조일화(benzoylation)시킨 샘플을 5 μl 주입하여 분당 0.8ml를 아세토니트릴과 물로 흘렸다. 0분 때에는 아세토니트릴과 물 (70:30(v/v))로 시작하여 5분 때에는 아세토니트릴과 물 (80:20(v/v)), 30분까지는 아세토니트릴과 물 (83:17(v/v))로 용매 그라디언트(Gradient)를 주었다. Glucose는 20.84분에 fructose는 23.34분, myoinositol은 23.92분, sorbitol은 27.12분에 측정된다. 면적값을 측정하여 본 결과를 얻었다.

[0088] 상기 얻어진 결과를 아래의 표 5에 나타내었다.

[0089] 양성 대조 물질로는 퀘르세틴 (Quercetin, Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA))을 사용하였다.

표 5

[0090] 금불초의 고혈당으로 처리(30mM Glucose포함하는 Kerbs-Ginger bicarbonate buffer이용) 한 적혈구내 소르비톨 생성 억제효과

	농도 ($\mu\text{g/ml}$)	세포내 소르비톨 생성 억제율 (%)
금불초 추출물	10	45.24
Quercetin	10	25.86

[0091] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 금불초 추출물은 대조물질인 퀘르세틴과 비교하여 동일 농도에서 약 2배에 가깝게 우수한 소르비톨 생성 억제율을 나타내었다.

[0092] 실험예 6: α -글루코시데이즈 활성 억제능 시험

[0093] 당뇨병환자의 식후 급격한 혈당 상승을 억제하는 α -글루코시데이즈 억제제 작용기전은 인슐린 분비를 통하지 않고 이당류 분해효소를 가역적으로 억제하여 장에서의 탄수화물 흡수를 지연시켜 식후 혈당을 감소시키고 인슐린 비의존성 당뇨병의 고혈당으로 인한 인슐린 분비 지연의 개선시킨다. 따라서, α -글루코시데이즈 억제 활성에 의하여 당뇨병 치료 활성을 시험할 수 있다.

[0094] 본 실시예에서는 당류가 단당류로 분해되는 경로의 억제능을 알아볼 수 있는 에세이로 Watanabe 등의 방법(Watanabe H, Kobavashi A, Yamamoto T, Suzuki S, Hayashi H, Yamazaki N. 1990. Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. Free Radic Biol Med. 8(6): 507-514)에 따라 α -글루코시데이즈 활성 억제능을 측정하여, α -글루코시데이즈에 대한 활성 억제능을 시험하였다.

[0095] 본 실험에서 사용한 시료는 상기 실시예 1에서 얻어진 금불초 추출물을 DMSO에 1 mg/mL 농도로 녹여서 사용하였다. PBS에 2 g/L BSA(bovine serum albumin), 0.2 g/L NaN_3 를 용해시킨 다음, 2.1 Unit의 효모 α -글루코시데이즈(Sigma, USA) 0.024 g/L을 용해시켜 효소 용액을 만들고, 상기 효소용액 2 mL에 시료 400 μL 를 첨가한 후, 1.2 mL를 취하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0096] 25°C에서 10분간 water bath incubation하고 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(Sigma, USA)를 PBS에 0.55mM 농도로 용해하여 만든 기질용액 1 mL를 첨가하고 25°C에서 10분간 water bath incubation한 후, 반응 종결을 위해 증류수에 0.1M 농도로 용해하여 만든 반응 정지시약 NaCO_3 1.6 mL를 첨가하고 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로 DMSO를 사용하였고 양성대조군으로 기존에 α -글루코시데이즈 억제제로 알려진 아카보오스(acarbose, Sigma, USA)를 상기와 같은 방법으로 사용하였다.

[0097] 50% 흡광도의 감소를 나타내는 시료의 농도 (IC_{50})으로 표시하였고, 각 시료를 3회 반복 실시하여 평균하였다.

[0098] 상기 얻어진 금불초 추출물의 α -글루코시데이즈 에 대한 저해 활성 결과를 아래의 표 6에 나타내었다.

표 6

금불초 추출물의 α -글루코시데이즈 저해 활성

식물명	농도(mg/ml)	억제율%
금불초 추출물	1	50.48
Acarbose	1	79.29

[0099]