



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월30일
(11) 등록번호 10-2271683
(24) 등록일자 2021년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 17/07 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/7048 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07H 17/07 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0141297
(22) 출원일자 2019년11월06일
심사청구일자 2019년11월06일
(65) 공개번호 10-2021-0054950
(43) 공개일자 2021년05월14일
(56) 선행기술조사문헌
KR101812760 B1*

(73) 특허권자
한남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 유성대로 1646 (전민동)
(72) 발명자
권영인
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트
306-1602
(74) 대리인
박노준

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 조호정

(54) 발명의 명칭 식후혈당상승억제 효능을 가진 유색미로부터 분리 정제된 신규한 (2R,3R)-4'-O-methyltaxifolin 3-O-β-D-glucopyranoside

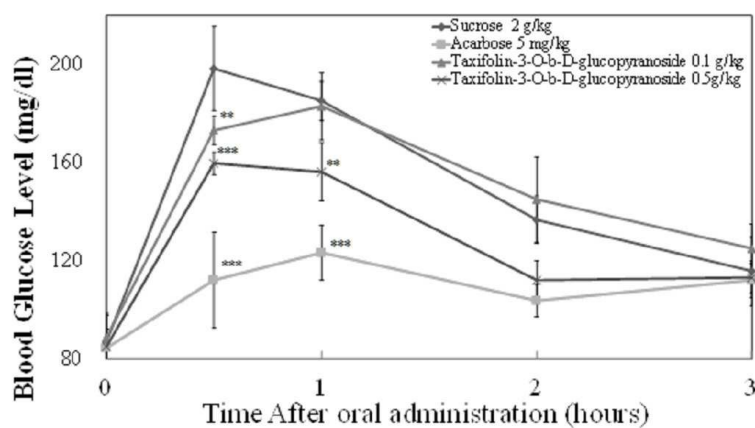
(57) 요약

본 발명은 식후혈당상승억제 효능을 가진 신규한 화합물 및 이를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명은 쉽고 간단하게 제조할 수 있으며 약효가 우수한 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

또한 본 발명은 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 최소화할 수 있는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)
A61P 3/10 (2018.01)
C07H 1/08 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20040109882 A1*
 KR101812754 B1
 W02016082209 A1
 JP11279167 A
 KR1020140000944 A
 KR1020150015611 A
 US20020013481 A1
 Biochemical Systematics and Ecology, 1986,
 Vol.14, No.2, pp.199-202
 Journal of Applied Sciences Research, 2012,
 Vol.8, No.11, pp.5564-5571
 Journal of Chromatography B, 2013, Vol.929,
 pp.56-62

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ0131402019
부처명	농진청
과제관리(전문)기관명	농진청
연구사업명	차세대바이오그린21, 식물분자육종사업단
연구과제명	기능성 신형질 벼 품종개발 및 고부가가치 실용화
기여율	1/1
과제수행기관명	한남대학교 산학협력단
연구기간	2018.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

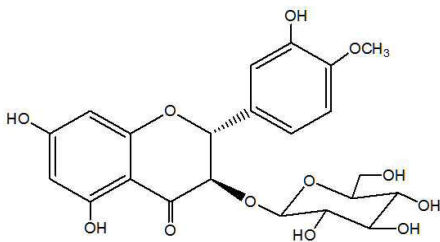
청구항 4

삭제

청구항 5

하기 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

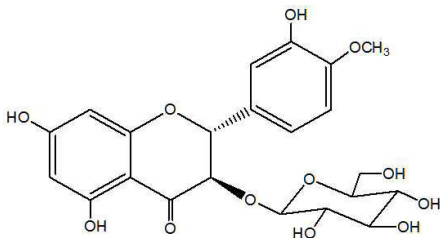
[화학식 3]



청구항 6

하기 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 3]



발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 식후혈당상승억제 효능을 가진 신규한 화합물 및 이를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학

조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 식물 유래의 다양한 화학물질들은 항염증 작용과 세포보호 작용을 포함한 여러 가지 생리활성들을 나타내어 의약품 및 건강기능식품의 유용한 소재로서 각광을 받고 있다.
- [0004] 쌀은 옥수수, 밀과 더불어 세계 3대 식량자원으로서, 한국, 일본, 중국을 비롯한 동양에서는 쌀을 주식으로 하는 국가가 대부분이며, 세계 쌀 생산량의 90% 정도가 아시아에서 생산되고 있다.
- [0005] 쌀의 영양 성분은 품종 등에 따라 차이가 있으나 탄수화물 70~80%, 단백질 6~7%, 지방 1~2%를 함유하고 있으며, 호분층을 제거한 백미는 현미보다 탄수화물은 많고 단백질과 지방의 비율은 낮다.
- [0006] 벼 열매의 껍질을 벗기고 남은 부분을 쌀 또는 현미라고 하며, 쌀 또는 현미는 전분층, 백미, 호분층(속미강), 쌀겨(중간 미강), 겉미강 및 배아(쌀눈)로 이루어진다.
- [0007] 일반적으로 현미가 100이 되는 경우 미강이 5~6%, 쌀눈이 2~3%가 되고 나머지 성분은 백미가 된다.
- [0008] 도정 정도는 일반적으로 10분도 또는 12분도로 나누어지고, 10분도 또는 12 분도로 도정되면 백미만 남게 되고 도정의 분도 수가 낮아질수록 미강 또는 쌀눈의 양이 많아지게 된다.
- [0009] 최근에 쌀의 다양한 생리활성에 대한 연구결과들이 다수 보고되고 있으며, 이와 관련하여 한국등록특허 제10-0726834호는 건조공정을 포함하는 쌀의 제조에 있어서, 열수 또는 에탄올을 이용하여 양파를 추출한 양파추출액을 단독으로 하거나 또는 상기의 양파추출액 이외에 홍삼추출액, 구기자추출액, 황기추출액 중에서 선택된 어느 하나 이상을 추가로 더 포함하는 코팅액을 쌀에 감압 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 양파를 이용한 혈당강하 쌀의 제조방법을 개시하고 있다.
- [0010] 또한 한국등록특허 제10-1171258호는 쌀단백 60~80중량%, 쌀가루 16~38중량%, 자일로스 1~2중량% 및 타가토스 1~2중량%를 혼합하는 단계; 상기 혼합물을 물을 가하면서 쌍축형 압출 성형기에 주입하여 압출 성형하는 단계; 및 상기 압출 성형 단계에서 수득된 성형물을 건조하는 단계를 포함하는, 혈당 저하 능이 있는 인공미의 제조 방법을 개시하고 있다.
- [0011] 한편 한국등록특허 제10-1300378호는 혈당강하 기능성 쌀의 제조방법에 있어서, 뽕나무, 뽕잎 또는 뽕나무뿌리 1kg에 암반광천수 10L를 넣고 90~120℃에서 30분~3시간 동안 가열하여 추출한 후 여과시킨 뽕나무추출물 100중량부에 채질시킨 상황버섯 1kg에 물 10L를 넣고 교반한 후 90~110℃에서 3시간 내지 10시간 가열하여 추출한 후 여과시킨 상황버섯추출물 50~150중량부, 감식초 5~20중량부, 알긴산나트륨 1~5중량부를 혼합하여 코팅액을 제조한 다음 이 코팅액을 쌀에 코팅시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 기능성 쌀을 개시하고 있다.
- [0012] 그러나 상기 문헌에 개시된 기술은 코팅액을 쌀에 코팅하거나 쌀단백이나 쌀가루를 직접 사용하는 것으로서, 제조방법이 복잡하고 약효가 우수하지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0014] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0726834호
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1171258호
- (특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-1300378호

발명의 내용

해결하려는 과제

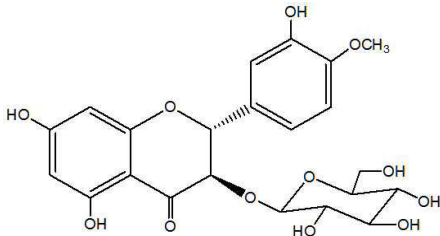
- [0015] 본 발명은 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 쉽고 간단하게 제조할 수 있으며 약효가 우수한 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0016] 또한 본 발명은 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 최소화할 수 있는 당뇨병 예방 또는 치

료용 약학 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 3의 화합물을 제공한다.

[0020] [화학식 3]

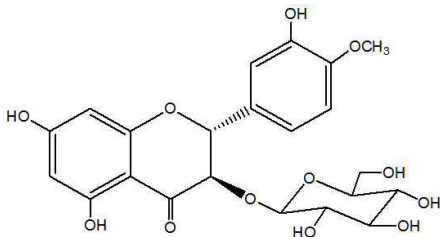


[0021] 또한 본 발명은 (a) 슈퍼홍미로부터 미강을 분리하는 단계;

[0024] (b) 상기 미강을 용매로 가열 추출하고 여과한 후 감압 농축한 다음 농축액을 동결 건조하여 추출물을 수득하는 단계; 및

[0025] (c) 상기 추출물로부터 HPLC(High performance counter-current chromatography)를 이용하여 하기 화학식 3의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는 슈퍼홍미로부터 화합물을 분리하는 방법을 제공한다.

[0027] [화학식 3]

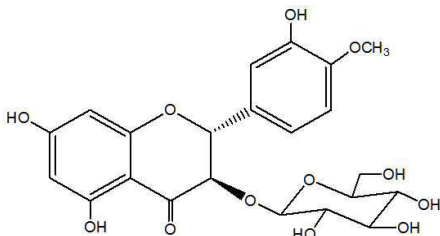


[0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 가열 추출은 미강 100중량부에 대하여 용매 500~2,000중량부를 가하고 30~95℃에서 1~3시간 가열하여 추출하는 것을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 용매는 주정, 에탄올, 메탄올, 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

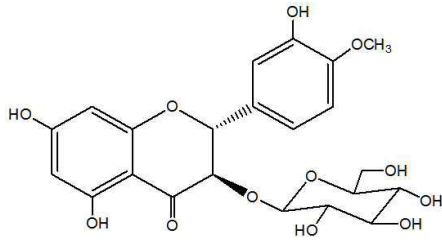
[0032] 또한 본 발명은 하기 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0034] [화학식 3]



[0035] 아울러 본 발명은 하기 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0039] [화학식 3]



[0040]

발명의 효과

[0042] 본 발명은 쉽고 간단하게 제조할 수 있으며 약효가 우수한 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

[0043] 또한 본 발명은 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 최소화할 수 있는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 280nm 및 520nm에서 측정된 슈퍼홍미 추출물의 HPLC 분석 결과를 나타낸다.
- 도 2는 화학식 3의 화합물의 ¹H-NMR (500MHz) 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 3은 화학식 3의 화합물의 ¹³C-NMR (125MHz) 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 4는 화학식 3의 화합물의 HSQC 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 5는 화학식 3의 화합물의 HMBC 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 6은 화학식 3의 화합물의 Rat Intestinal α-glucosidase, α-amylase, Sucrase, Maltase 및 Glucoamylase에 대한 저해 활성을 나타낸다.
- 도 7은 화학식 3의 화합물의 Sucrose에 의한 식후 혈당상승 저해작용을 나타낸다.
- 도 8은 화학식 3의 화합물의 Starch에 의한 식후 혈당상승 저해작용을 나타낸다.

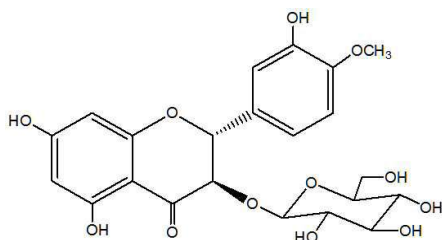
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하 실시예를 바탕으로 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 사용된 용어, 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고 통상의 기술자의 이해를 돕기 위하여 예시된 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 권리범위 등이 이에 한정되어 해석되어서는 안 된다.

[0047] 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 나타낸다.

[0049] 본 발명은 하기 화학식 3의 화합물에 관한 것이다.

[0051] [화학식 3]



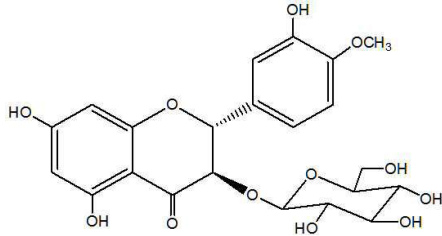
[0052]

[0054] 또한 본 발명은 (a) 슈퍼홍미로부터 미강을 분리하는 단계;

[0055] (b) 상기 미강을 용매로 가열 추출하고 여과한 후 감압 농축한 다음 농축액을 동결 건조하여 추출물을 수득하는 단계; 및

[0056] (c) 상기 추출물로부터 HPLC(High performance counter-current chromatography)를 이용하여 하기 화학식 3의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는 슈퍼홍미로부터 화합물을 분리하는 방법에 관한 것이다.

[0058] [화학식 3]



[0059]

[0060]

[0061] 상기 슈퍼홍미는 기능성 성분을 강화하는 것을 목적으로 하여 육종학으로 새로이 개발된 신품종으로서, 갈색을 띄는 플라보노이드의 함량이 많아 외관상 갈색 또는 붉은색을 나타낸다.

[0062] 최근에 개발된 슈퍼홍미는 일반 벼에 비하여 폭이 넓고 부피가 상대적으로 큰 반면 밀도는 낮은 특성을 나타낸다.

[0063] 상기 가열 추출은 미강 100중량부에 대하여 용매 500~2,000중량부를 가하고 30~95℃에서 1~3시간 가열하여 추출하는 것이 바람직하다.

[0064] 상기 미강은 호분층(속미강), 쌀겨(중간 미강), 겉미강 및 배아(쌀눈)를 포함할 수 있다.

[0065] 상기 용매는 주정, 에탄올, 메탄올, 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0066] 가열 추출하고 여과한 후 감압 농축하여 용매를 모두 제거한 다음 농축액을 동결 건조하여 추출물을 수득한다.

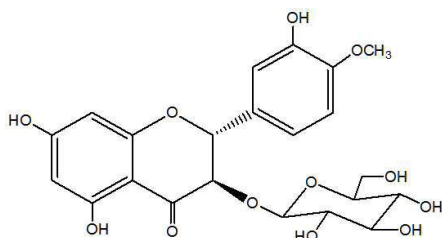
[0067] 상기 추출물로부터 HPLC(High performance counter-current chromatography)를 이용하여 화학식 3의 화합물을 분리한다.

[0068] 분리한 화합물은 ¹H NMR, ¹³C NMR 등의 핵자기공명분석(NMR), 융점, 적외선 분광분석(IR), MS 등을 이용하여 분자구조를 결정하였다.

[0069] 화학식 3의 화합물은 (2R,3R)-4'-O-메틸탁시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드((2R,3R)-4'-O-methyltaxifolin 3-O-β-D-glucopyranoside)이다.

[0071] 또한 본 발명은 하기 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0073] [화학식 3]



[0074]

[0075]

[0076] 본 발명의 화학식 3의 화합물은 당뇨병의 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있다.

[0077] 상기 화학식 3의 화합물은 항당뇨 활성, 항산화 활성 및 식후 혈당조절 특성이 우수하여 당뇨병의 예방 또는 치료를 위하여 효율적으로 사용될 수 있다.

[0078] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

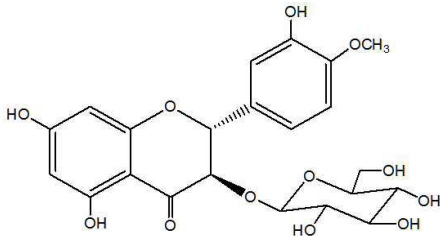
[0079] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0080] 본 발명의 약학 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0081]

[0082] 아울러 본 발명은 하기 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0084] [화학식 3]



[0085]

[0086]

[0087] 식품은 각종 식품류, 캔디, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등의 형태일 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 음료 등의 형태로 제공될 수 있다.

[0088]

[0089] 이하 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 실시를 위하여 예시된 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0091] (실시예 1) 슈퍼홍미 추출물 제조

[0092] 일반적인 미강분리 방법에 따라 슈퍼홍미로부터 미강을 분리하였다.

[0093] 슈퍼홍미의 미강 500g에 6L의 메탄올(0.1% 트리플루오로아세트산 포함)을 혼합한 후 40℃에서 2시간 추출하였다.

[0094] 추출액을 원심분리기에서 원심분리한 후(8,000rpm; 4℃; 30분), 상등액을 Watman No.1 필터로 여과하였다.

[0095] 여과액을 감압 농축하여 용매를 모두 제거한 후 동결 건조기에서 동결 건조하여 추출물 43g를 수득하였다.

[0097] (실시예 2) 슈퍼홍미 추출물로부터 활성물질 분리

[0098] 슈퍼홍미 추출물로부터 활성물질을 분리하기 위하여 HPLC(High performance counter-current chromatography; preparative scale; MIDI)를 이용하여 280 및 520nm에서 분석을 하였다(표 1).

[0100]

표 1

Mobile Phase	TBME:n-BuOH:MeCN:Water:TFA (1:7:1:5:0.05)
Detector	Agilent 1260 DAD
Flow	5.0 mL/min
Loading amount	10 g

[0102]

280nm로 분석한 경우, Fraction 1, 2, 3, A에서 활성물질이 검출되었다(도 1).

[0103]

Fraction 1로부터 화학식 1의 화합물, Fraction 2로부터 화학식 2의 화합물, Fraction 3으로부터 화학식 3의 화합물을 수득하였다.

[0104]

Fraction A 부분은 표 2의 조건으로 HPLC 분석을 수행하여 화학식 4 및 5의 화합물을 분리하였다.

[0106]

표 2

Mobile Phase	n-hexane:ethyl acetate:methanol:water (2:8:2:8)
Detector	Agilent 1260 DAD
Flow	5.0 mL/min

[0108]

(실시예 3) 화학식 1 내지 5의 화합물 분리

[0109]

실시예 2에서 분리된 화학식 1 내지 5의 화합물은 ¹H NMR, ¹³C NMR, MS 등을 이용하여 분자구조를 결정하였다.

[0110]

화학식 1의 화합물은 시아니딘-3-글루코사이드(cyanidin-3-glucoside; C3G)이고, 화학식 2의 화합물은 (2R,3R)-디하이드로퀘세틴-3-O-β-D-글루코피라노사이드((2R,3R)-dihydroquercetin-3-O-β-D-glucopyranoside)이며, 화학식 3의 화합물은 (2R,3R)-4'-O-메틸탁시폴린 3-O-β-D-글루코피라노사이드((2R,3R)-4'-O-methyltaxifolin 3-O-β-D-glucopyranoside)이고, 화학식 4의 화합물은 (2R,3R)-디하이드로퀘세틴((2R,3R)-dihydroquercetin; 탁시폴린; taxifolin)이며, 화학식 5의 화합물은 (2R,3R)-3-메톡시-디하이드로퀘세틴((2R,3R)-3-methoxy-dihydroquercetin)이다.

[0112]

화학식 3의 화합물은 MS 분절 패턴으로부터 메틸탁시폴린 모노글리코사이드(분자식 C₁₆H₁₄O₇)를 포함하고, [M-H]⁻는 479.1204 m/z에서, [M-Glc+H]⁺는 319.0808 m/z에서, [M+Na]⁺는 503.1152 m/z에서 피크를 나타낸다.

[0113]

화학식 3의 화합물의 아노머릭 프로톤(anomeric proton) 및 식스 카본 레저넌스(six carbon resonance)는 δ_H 3.72 ppm (1H, d, J=7.7 Hz, H-1'), δ_C 102.56 (C-1'), 74.69 (C-2'), 78.38 (C-3'), 71.28 (C-4'), 77.62 (C-5'), 62.65 (C-6') ppm에서 피크를 나타내며, 이는 β-D-glucopyranoside 모이어티의 특성피크이다.

[0114]

H-1' (3.72 ppm) 및 C-3 (77.23 ppm)의 HMBC 상관관계와 H-3 (5.06 ppm) 및 C-1' (102.56 ppm)의 HMBC 상관관계로부터, 글루코실 모이어티는 4'-O-methyltaxifolin의 C-3에 연결됨을 알 수 있다.

[0115]

화학식 3의 화합물의 CD 스펙트럼은 329.7 nm ([θ] +7,680) 및 293.9 nm ([θ] -27,840)에서 cotton 효과를 나타내며, 이는 2R,3R-dihydroflavonol 기의 특성피크이다.

[0116]

화학식 3의 화합물의 특성피크는 아래와 같다(도 2 내지 5).

[0117]

$[\alpha]_D^{24}$ -23.4° ; CD(MeOH)[θ](nm): +34,560 (221.5), +7,680 (329.7), -27,840 (293.9); ¹H-NMR(500MHz, CD₃OD): δ 7.15 (1H, d, J=1.8 Hz, H-2'), 6.96 (1H, dd, J=8.1, 1.8 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, J=8.1 Hz, H-5'), 5.95 (1H, d, J=2.1 Hz, H-6), 5.94 (1H, d, J=2.1 Hz, H-8), 5.28 (1H, d, J=10.5 Hz, H-2), 5.06 (1H, d, J=10.5 Hz, H-3), 3.91 (3H, s, OCH₃-4'), 3.79 (1H, dd, J=12.0, 2.0 Hz, H-6" a), 3.72 (1H, d, J=7.7 Hz, H-1'), 3.62 (1H, dd, J=12.0, 6.0 Hz, H-6" b), 3.26 (1H, dd, J=9.6, 9.1 Hz, H-4"),

3.25 (1H, dd, $J=9.2, 7.7$ Hz, H-2'), 3.09 (1H, t, $J=9.1$ Hz, H-3'), 2.98 (1H, ddd, $J=9.6, 6.0, 2.0$ Hz, H-5'); $^{13}\text{C-NMR}$ (126MHz, CD_3OD): δ 196.23 (C-4), 169.00 (C-7), 165.54 (C-5), 164.27 (C-9), 148.94 (C-4'), 148.43 (C-3'), 129.12 (C-6'), 121.95 (C-2'), 116.12 (C-5'), 112.79 (C-1'), 102.58 (C-10), 102.56 (C-1'), 97.36 (C-8), 96.32 (C-6), 83.84 (C-2), 78.38 (C-3'), 77.62 (C-5'), 77.23 (C-3), 74.69 (C-2'), 71.28 (C-4'), 62.65 (C-6'), 56.48 (4'-OCH₃).

- [0119] (실시예 4) 화학식 3의 화합물의 In-vitro 항당뇨 활성
- [0120] (가) Rat intestinal α -glucosidase inhibition assay
- [0121] ● 효소: 래트 소장 아세톤 분말
- [0122] ● substrate: PNP-glycoside (pNPG, p-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside)
- [0123] 래트 소장 아세톤 분말 300mg에 0.1M 소듐 포스페이트 버퍼(pH 6.9) 9ml를 첨가한 후 30초간 12회 ice water bath에서 초음파 조사한 다음, 13,000rpm, 4℃에서 30분간 원심 분리하였다.
- [0125] 상층액을 바로 assay에 사용하거나 -20℃에 보관하면서 사용하였다.
- [0126] 100 μl 의 rat α -glucosidase 용액에 50 μl 의 샘플 용액을 넣은 후, 37℃에서 10분간 반응시켰다.
- [0127] 50 μl 의 5mM pNPG 용액을 가한 다음 37℃에서 30분간 반응시키고 405nm에서 ELISA reader를 사용하여 흡광도를 측정하여 rat α -glucosidase에 대한 저해활성을 분석하였다.
- [0128] 화학식 3의 화합물이 나타내는 Rat Intestinal α -glucosidase에 대한 저해 활성은 도 6에 제시된다.
- [0129] 화학식 3의 화합물은 몰농도에 따라 저해 활성을 나타내지 않았다.
- [0130]
- [0131] (나) Porcine pancreatic α -amylase inhibition assay
- [0132] ● enzyme: porcine pancreatic α -amylase
- [0133] ● substrate: 1% starch solution in 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 6.9)
- [0134] ● coloring reagent: 3,5-dinitrosalicylic acid solution (DNS) in 2 M NaOH with 30% sodium potassium tartrate tetrahydrate
- [0135] 0.02M 소듐 포스페이트 버퍼 (pH 6.9; 0.006M 소듐 클로라이드 포함)에 녹인 1U 농도의 porcine pancreatic α -amylase 용액 300 μl 에 샘플 용액 200 μl 을 넣고 25℃에서 10분간 배양시켰다.
- [0136] 이 용액에 25℃에서 10분 동안 예비 배양시킨 1% starch 용액 500 μl 를 첨가하여 25℃에서 10분간 반응시켰다.
- [0137] 30% Rochelle 염에 녹인 1% DNS 용액을 1 ml 첨가하여 반응을 정지시킨 후 boiling water bath에서 5분간 처리한 다음 실온으로 식히고 10 ml의 증류수를 첨가하였다.
- [0138] α -amylase에 의해서 기질로부터 분해된 당과 DNS 용액과의 반응액을 540nm에서 ELISA reader를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, 샘플 대신 샘플을 용해시킨 용매를 넣은 것을 대조구로 하였다.
- [0139] 화학식 3의 화합물이 나타내는 α -amylase에 대한 저해 활성은 도 6에 제시된다.
- [0140] 화학식 3의 화합물은 몰농도에 따라 저해 활성을 나타내지 않았다.
- [0142] (다) Rat intestinal glucose oxidase assay (Maltose, Sucrose, Glucoamylase) 저해활성 분석
- [0143] 효소는 래트 소장 아세톤 분말 (Sigma S9765)을 사용하였고 기질은 maltose, sucrose, starch (Junsei)를 사용하였다.
- [0144] 래트 소장 아세톤 분말 100 mg을 3 ml의 0.9% NaCl 용액 (Junsei)에 첨가한 후 30초간 12회 iced water bath에서 초음파 조사한 다음 10,000rpm, 4℃에서 30분간 원심 분리하였다.
- [0145] 분리된 상층액을 실험에 사용하였다.

- [0146] 측정방법은 96 clear plate에 100 μ l의 rat α -glucosidase 용액에 50 μ l의 시료를 넣은 다음 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 10분간 정치시켰다.
- [0147] 각각의 실험 방법에 따라 50 μ l의 100mM maltose, 또는 200mM sucrose, 1% starch 용액을 가한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 30분간 반응 사이에 Glucose oxidase/peroxidase reagent (Sigma G3660) 와 O-Dianisidine reagent (Sigma D2679) 섞은 용액 1 ml을 2ml Epp Tube에 넣은 후 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 5분간 방치하여 온도를 37 $^{\circ}$ C로 맞춘 후 앞서 30분 동안 반응한 래트 소장 아세톤 분말과 샘플, 기질 용액 혼합시약 200 μ l을 취하여 1 ml Glucose oxidase/peroxidase reagent와 O-Dianisidine reagent를 섞은 용액에 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 10분간 2차 반응을 시킨다.
- [0148] 각각의 2ml Epp tube 12N 황산 1ml을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 96 clear plate에 200 μ l씩 넣은 후 540 nm에서 ELISA reader를 사용하여 흡광도를 측정하여 Rat intestinal glucose oxidase (maltose, sucrose, glucoamylase) 저해활성을 분석하였다.
- [0149] 시료 대신 시료를 용해시킨 용매를 넣은 것을 대조구로 하였다.
- [0150] 화학식 3의 화합물이 나타내는 Sucrase, Maltase 및 Glucoamylase에 대한 저해 활성은 도 6에 제시된다.
- [0151] 화학식 3의 화합물의 농도가 증가함에 따라 Sucrase, Maltase 및 Glucoamylase에 대한 저해 활성이 유의적으로 증가하는 것을 보였다.
- [0152] 화학식 3의 화합물은 Sucrase, Maltase 및 Glucoamylase 저해에 도움을 줄 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0153] 특히, Sucrose를 분해하는 sucrase의 50% 저해활성 농도가 0.54 mM으로 가장 낮은 농도를 나타내고, Starch를 분해하는 glucoamylase의 50% 저해활성 농도는 6.73 mM 을 나타낸다.
- [0155] (실시에 5) 화학식 3의 화합물의 In-vivo test에 의한 식후 혈당조절 작용
- [0156] (가) 실험동물
- [0157] 생후 4주령의 수컷 SD rat을 오리엔트바이오로부터 구입하여 환경에 적응시키기 위해 동물 사육실에서 일반 배합사료(오리엔트바이오 Pico 5053)와 물을 충분히 공급하면서 일주일간 실험실 환경에 적응시켜 건강한 동물만을 선별 후 실험에 사용하였다.
- [0159] (나) Sucrose 섭취에 대한 혈당상승 억제작용 평가
- [0160] 실험동물을 실험 전 20시간 이상 절식시킨 후 2g/kg body weight의 Sucrose에 Control(물), Acarbose(5mg/kg Glucobay, Bayer korea), 화학식 3의 화합물(0.1g/kg, 0.5g/kg)을 투여하였으며, 시료는 경구 투여용 존대를 이용하여 1 ml/마리로 경구 투여하였다.
- [0161] 투여군은 5군으로 각 군당 6마리씩 사용하였다. 경구 투여 후 30분, 60분, 120분, 180분에 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 정맥혈의 혈당 농도 변화를 혈당계 (Caresens II)로 측정하였다.
- [0162] Sucrose에 의한 화학식 3의 화합물의 식후 혈당상승 저해작용은 도 7에 제시된다.
- [0163] Control 군은 식후 0.5시간에 혈당이 198.40 \pm 17.07 mg/dl 으로 상승하는 것으로 나타났다.
- [0164] 화학식 3의 화합물(0.5g/kg body weight)의 혈당은 식후 0.5시간에 159.63 \pm 4.50 mg/dl으로, control 군 대비 약 19%의 식후 혈당 상승을 억제하는 것을 알 수 있고, 식후 1시간에는 혈당이 156.13 \pm 11.85 mg/dl으로 control 군 (185.10 \pm 8.05 mg/dl) 대비 약 15%의 식후 혈당 상승을 억제하는 것을 알 수 있다.
- [0165] 이러한 결과를 통해 화학식 3의 화합물은 자당섭취 후 혈당의 급격한 상승을 억제하고 혈당의 흡수를 저해하는 것을 확인할 수 있다.
- [0167] (다) Starch 섭취에 대한 혈당상승 억제작용 평가
- [0168] 실험동물을 실험 전 20시간 이상 절식시킨 후 2g/kg body weight의 Starch에 Control(물), Acarbose(5mg/kg_Glucobay, Bayer korea), 화학식 3의 화합물(0.1g/kg, 0.5g/kg)을 투여하였으며, 시료는 경구 투여용 존대를 이용하여 1 ml/마리로 경구 투여하였다.
- [0169] 투여군은 5군으로 각 군당 6마리씩 사용하였다. 경구 투여 후 30분, 60분, 120분, 180분에 꼬리 정맥으

로부터 채혈하여 정맥혈의 혈당 농도 변화를 혈당계 (Caresens II)로 측정하였다.

[0170] Starch에 의한 화학식 3의 화합물의 식후 혈당상승 저해작용은 도 8에 제시된다.

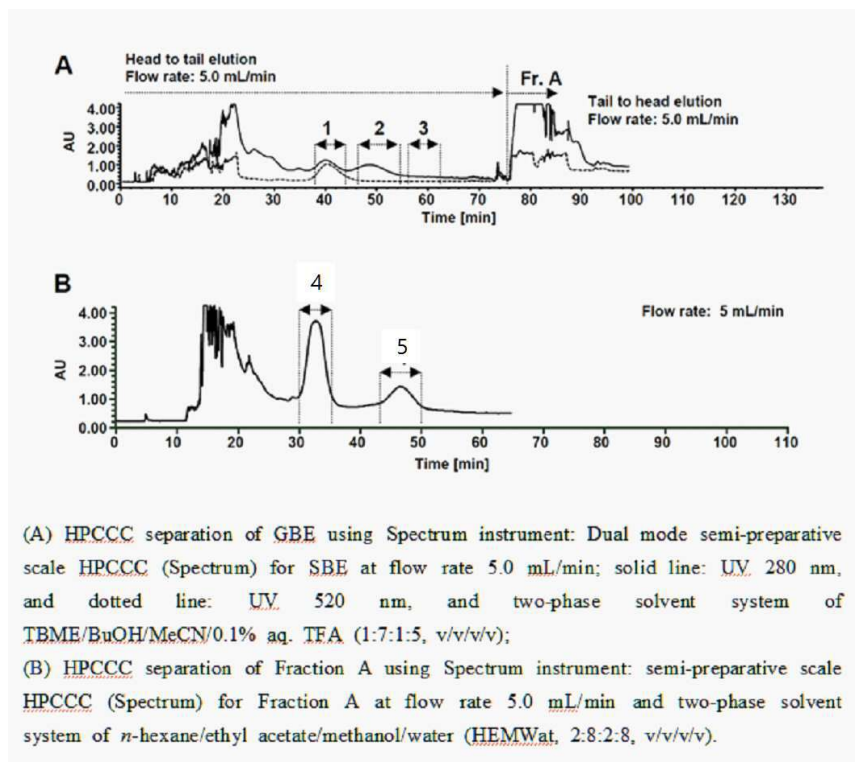
[0171] Control 군은 식후 0.5시간에 혈당이 195.25 ± 17.10 mg/dl 으로 상승하는 것으로 나타났다.

[0172] 화학식 3의 화합물(0.5g/kg body weight)의 혈당은 식후 0.5시간에 167.25 ± 10.86 mg/dl으로, control 군 대비 약 14%의 식후 혈당 상승을 억제하는 것을 알 수 있고, 식후 1시간에는 혈당이 159.63 ± 22.18 mg/dl으로 control 군 (182.17 ± 10.05 mg/dl) 대비 약 12%의 식후 혈당 상승을 억제하는 것을 알 수 있다.

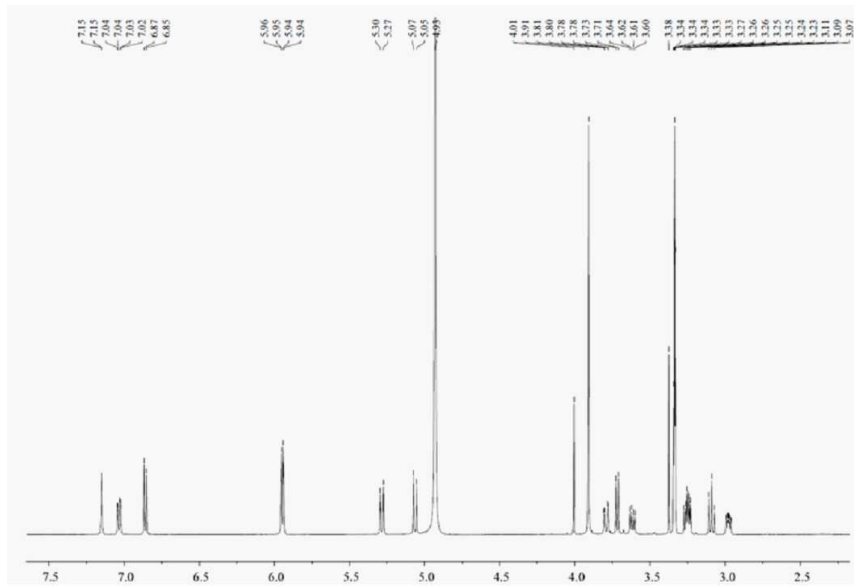
[0173] 이러한 결과를 통해 화학식 3의 화합물은 전분섭취 후 혈당의 급격한 상승을 억제하고 혈당의 흡수를 저해하는 것을 확인할 수 있다.

도면

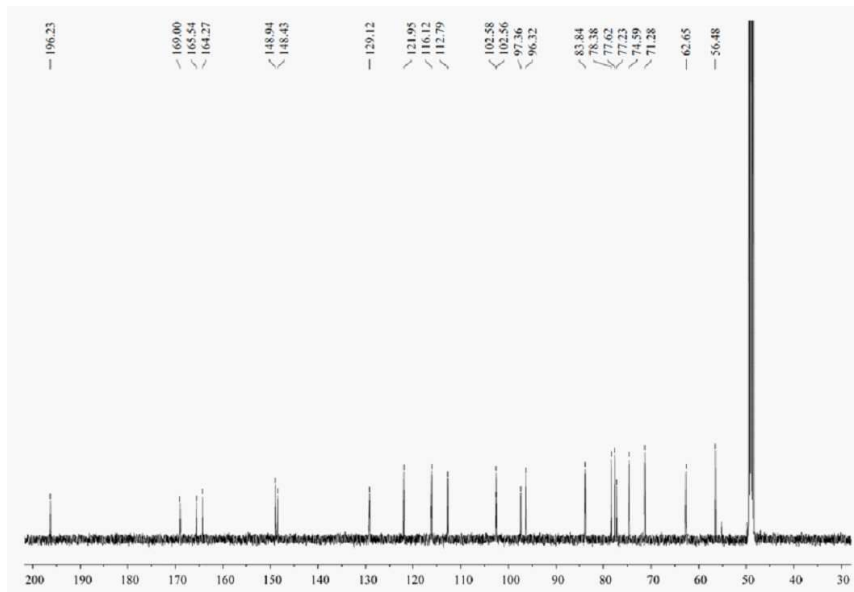
도면1



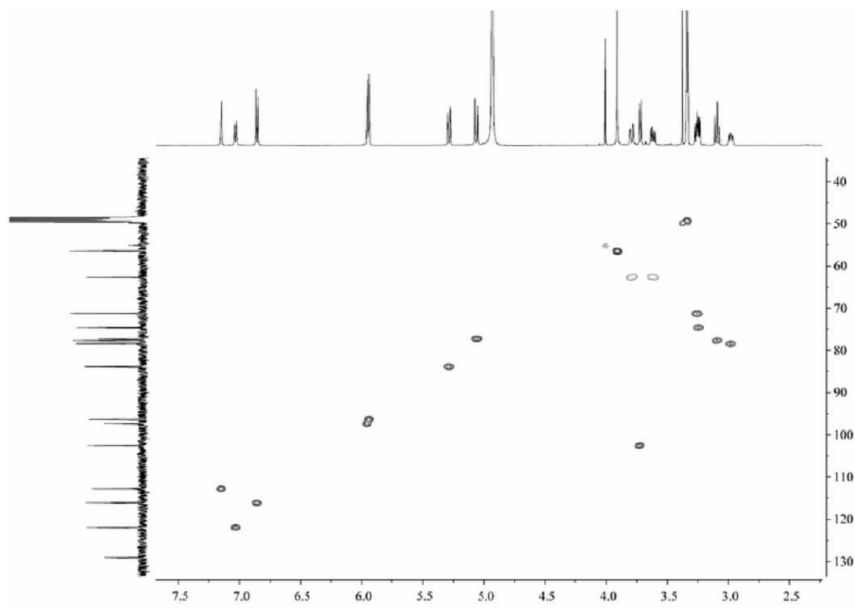
도면2



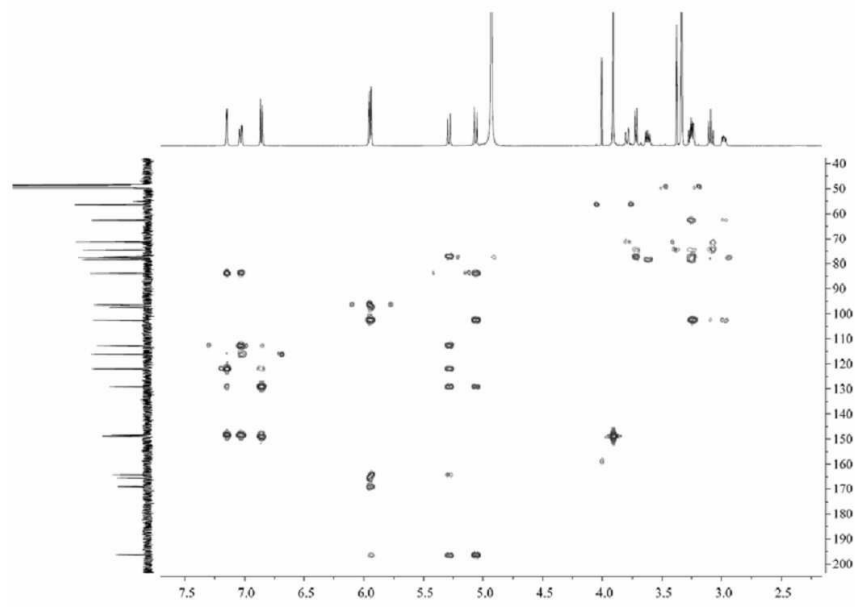
도면3



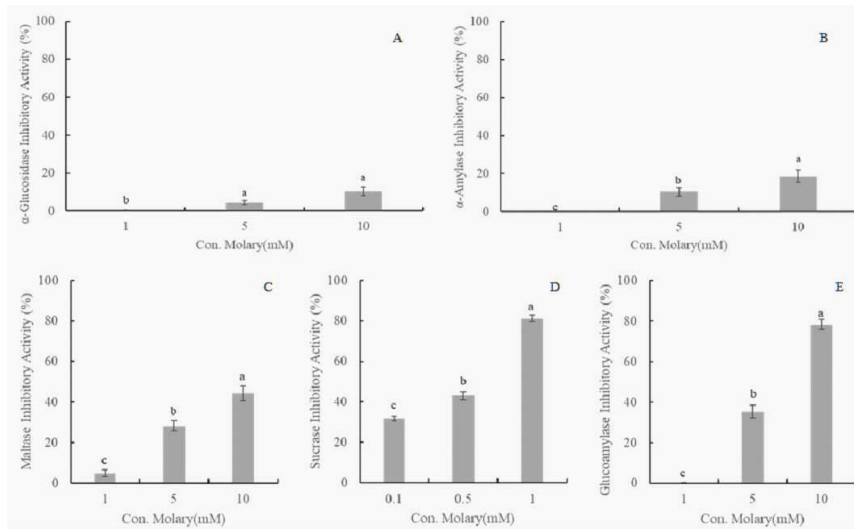
도면4



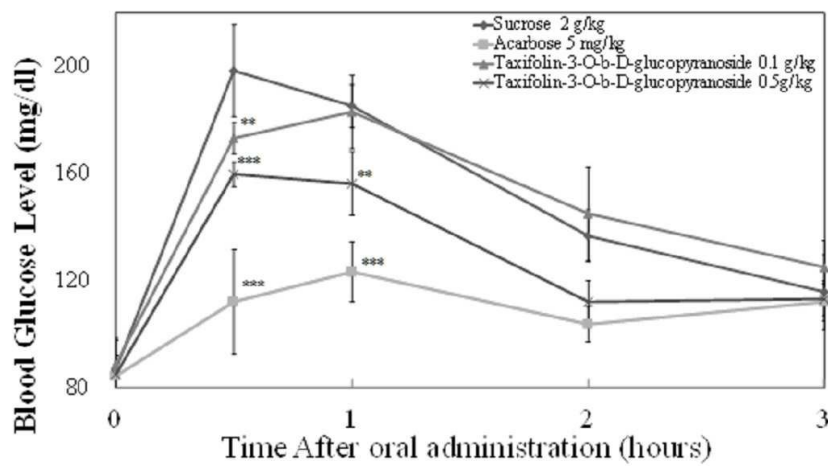
도면5



도면6



도면7



도면8

