



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0089893
(43) 공개일자 2012년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/899 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0130143
(22) 출원일자 2010년12월17일
심사청구일자 2010년12월17일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
백남인
경기도 수원시 영통구 영통로173번길 37, 쌍용1차 아파트 104동 2001호 (매향동)
정락훈
경기도 이천시 부발읍 신원2리 416
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다울

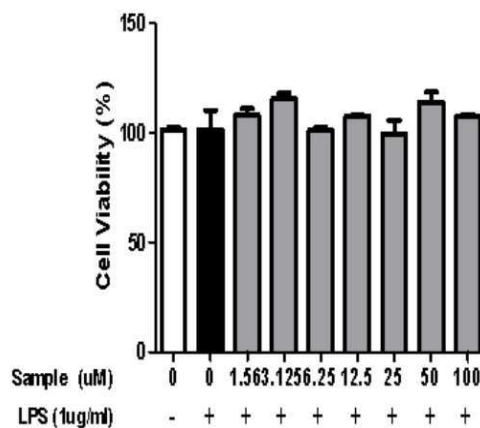
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물은 염증유발물질 중 하나인 NO(Nitric Oxide)에 대해 생성 억제 활성을 가짐으로써 종래의 염증성 질환 치료제에 비해 부작용을 현저히 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이대영

경기도 수원시 영통구 봉영로 1620, 대우월드마크
102동 705호 (영통동)

조진경

경기도 수원시 영통구 매영로415번길 43, 303호 (영통동)

김지영

서울특별시 서초구 나루터로4길 28, 한신8차 A 30
6동 1204호 (잠원동)

김성환

서울특별시 중랑구 중랑천로 20, 한신아파트 9동
1005호 (면목동)

특허청구의 범위

청구항 1

벼 지상부 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

벼 지상부 추출물은 벼 지상부 생체를 알코올 수용액으로 추출하여 얻어진 추출물인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 알코올 수용액은 80% 메탄올 수용액인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제2항의 벼 지상부 추출물로부터 분획하여 얻은 벼 지상부 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 벼 지상부 분획물은 벼 지상부 추출물을 *n*-헥산과 H₂O로 분배 추출하고 H₂O층을 에틸 아세테이트로 분배 추출한 후, H₂O층을 *n*-부탄올로 분배추출하여 수득되는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

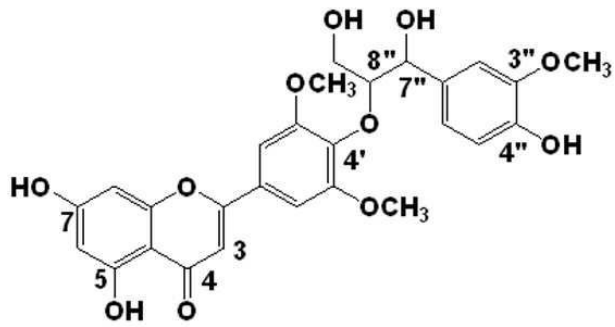
제5항의 벼 지상부 분획물로부터 분리되어 수득되는 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 플라보노리그난 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 살코린 B(salcolin B)인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]

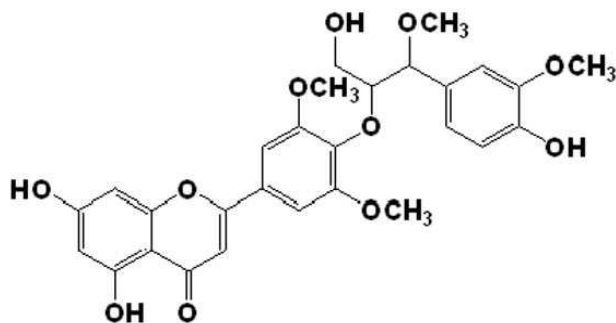


청구항 8

제6항에 있어서,

상기 플라보노리그난 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 살코린 C(salcolin C)인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 2]

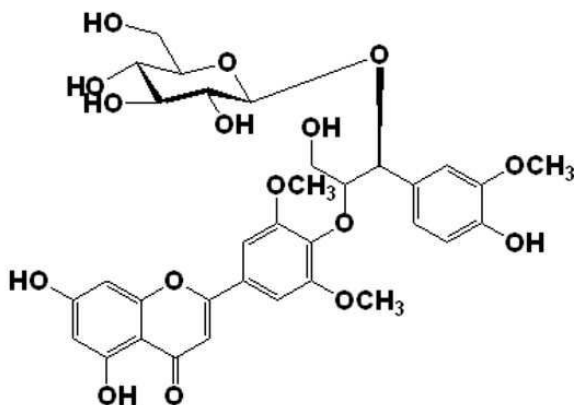


청구항 9

제6항에 있어서,

상기 플라보노리그난 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 살코리노사이드 A(salcolinoside A)인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 3]

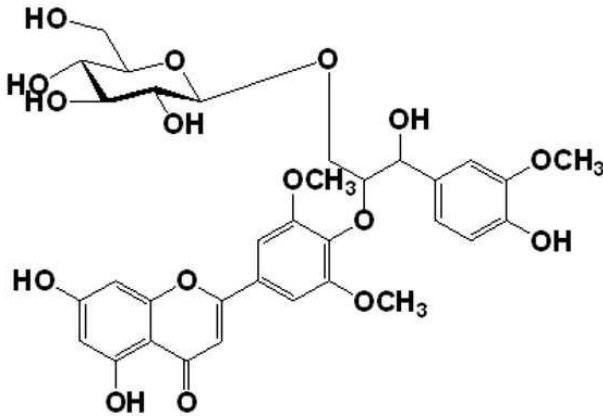


청구항 10

제6항에 있어서,

상기 플라보노리그난 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 살코리노사이드 B(salcolinoside B)인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 4]

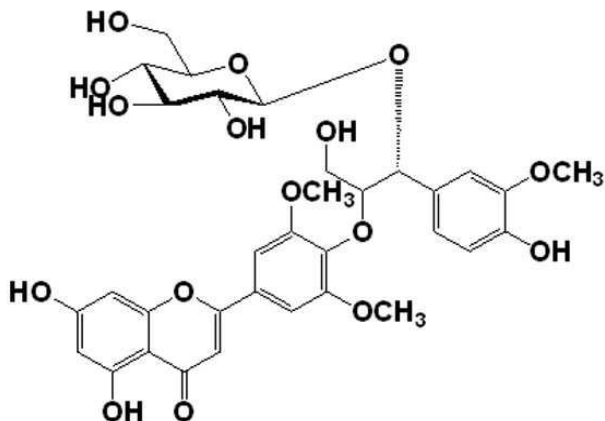


청구항 11

제6항에 있어서,

상기 플라보노리그난 화합물은 하기 화학식 5로 표시되는 살코리노사이드 C(salcolinoside C)인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 5]



청구항 12

제1항, 제4항 및 제6항중 어느 한 항에 있어서,

상기 염증성 질환은 비염, 기관지염, 관절염, 폐혈증, 치주염, 위궤양, 궤장염, 염증성 피부질환 또는 염증성 장질환인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제1항, 제4항 및 제6항중 어느 한 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 세포로부터의 NO 생성 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치

료용 약학적 조성물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 염증반응(inflammation)은 비염(rhinitis), 기관지염(bronchitis), 간염(hepatitis), 관절염(arthritis) 등 다양한 질환의 원인이 되므로, 평생 한두가지 염증 질환을 앓아보지 않은 사람이 없을 정도로 우리 건강과 밀접한 관련을 가지고 있다. 특히 평균수명의 연장으로 인구의 노령화로 그 문제가 심각한 퇴행성 질환의 경우, 그 병태생리가 염증?면역 반응과 밀접한 관계가 있다는 연구 보고들이 증가하면서 염증 반응의 기전 및 역할에 대한 관심이 급격히 증가하고 있다.
- [0003] 염증유발물질 중 하나인 NO(Nitric Oxide)는 정상상태에서는 내피세포나 대식세포에서 생산되며 세포살상과 살균작용 이외에도 다양한 생리활성을 나타내는데, 특히, 혈관 내피세포의 이완작용에 있어서 혈압의 항상성(homeostasis)을 유지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. LPS, 염증유발인자 및 방사선조사 등의 자극은 특히, 유도형 산화질소 합성효소인 iNOS(inducible nitric oxide synthetase)의 발현을 유도하여 많은 양의 NO를 4 내지 6시간 동안 계속적으로 생성시키는데 이와 같이 생성된 과도한 양의 NO는 상기와 같은 질환들을 유발한다.
- [0004] 따라서, iNOS 활성 억제제의 개발은 상기 질병의 치료제로서 개발 가능성이 높으며, 또한 이러한 관점에서 iNOS에 의한 NO 생성을 억제하는 화합물은 인체의 다양한 염증질환의 치료제로 사용될 수 있다. 또 다른 염증유발물질인 PGE₂, PGF_{2a} 그리고 PGI₂와 같은 프로스타글란딘은 아라키돈산(arachidonic acid)에서 유래한 일종의 호르몬으로 다양한 생리활성에 관여하고 상기 호르몬의 율속효소인 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase, COX)에 의해 발현이 조절된다. COX의 활성을 저해하여 프로스타글란딘의 합성을 저해하는 아스피린 인도메타신 같은 비스테로이드성 소염진통제는 관절염에 우수한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- [0005] 마지막으로 TNF- α 는 BCG, LPS 및 염증유발인자에 의해 활성화된 대식세포와 섬유아세포 등에서 생산되어 세포살상 효과, 프로스타글란딘 및 IL-1, IL-6와 같은 사이토카인(cytokine)의 생산을 유도한다. 종양괴사인자로 발견된 TNF- α 는 류마티스 관절염, 장기이식거부반응 등의 자가면역질환, 천식, 아토피성 피부염 등의 알러지성 염증질환 및 폐혈증, 급성간질환 등의 급성면역질환 등에 대한 관련성이 보고되면서 TNF- α 의 합성을 억제하는 화합물에 대한 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- [0006] 한편, 벼(*Oryza sativa* L.)는 벼과(Gramineae)에 속하는 1년생 초본식물로 아시아 전역에 널리 분포하고 있다. 높이는 50?100 cm이며 뿌리에 가까운 곳에서 가지를 쳐서 포기를 형성하여 자란다. 꽃이 필 때는 곧추 서지만 익을 때는 밑으로 처지며 많은 소수가 달리고 소수는 가지에 호생하며 짧은 대가 있고 1개의 꽃으로 된다. 꽃은 7~8월경에 피며 자가수분에 의하여 결실한다.
- [0007] 벼에 대한 연구는 농업 재배적 측면에서 육종개발에 의한 생산성 향상과 병충해 질병에 대한 저항성 증대와 관련된 연구가 주로 이루어져 왔다. 쌀로부터 수종의 스테로이드(steroid), 테르페노이드(terpenoid)와 알칼로이드(alkaloid)가 분리 보고되어 있으며, 그 중 에르고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide)와 7-옥소-스티그마스테롤(7-oxo-stigmasterol)은 식물독성 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 쌀의 껍질인 왕겨에서의 추출물은 대표적으로 1-테트라트리아콘탄올(1-tetratriacontanol), β -시토스테롤(β -sitosterol), 모미락톤 A(momilactone A), 모미락톤 B(momilactone B), 트리신(tricin)이 보고된 바 있으며, 모미락톤 A는 제초제 활성이 모미락톤 B는 항암 활성이 보고된 바 있다. 하지만 벼의 지상부에 관한 성분 연구는 거의 이루어지지 않았으며, 벼의 지상부로부터 추출된 플라보노리그난 화합물의 NO 생성 억제 활성은 보고된 바 없다.
- [0008] 이에 본 발명자들은 벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물에 대해 연구하던 중, 벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물들이 NO 생성 억제 활성을 가짐을 확인하였고, 이들의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도를 밝힘으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 같은 천연성분 물질을 함유하여 부작용을 감소시킬 수 있는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 전술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 벼 지상부 추출물은 벼 지상부 생체를 알코올 수용액으로 추출하여 수득될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 벼 지상부 분획물은 벼 지상부 추출물을 n -헥산과 H_2O 로 분배 추출하고 H_2O 층을 에틸 아세테이트로 분배 추출한 후, H_2O 층을 n -부탄올로 분배추출하여 수득될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 플라보노리그난 화합물은 벼 지상부 생체를 알코올 수용액으로 추출하여 벼 지상부 추출물을 수득하는 단계; 상기 벼 지상부 추출물을 벼 지상부 추출물을 n -헥산과 H_2O 로 분배 추출하고 H_2O 층을 에틸 아세테이트로 분배 추출한 후, H_2O 층을 n -부탄올로 분배추출하여 벼 지상부 분획물을 수득하는 단계 및 벼 지상부 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 화합물을 분리하고 정제하는 단계를 수행하여 수득될 수 있다.
- [0015] 상기 염증성 질환은 비염, 기관지염, 관절염, 폐혈증, 치주염, 위레양, 궤양염, 염증성 피부질환, 염증성 장질환 등일 수 있다.
- [0016] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 염증유발물질 중 하나인 NO(Nitric Oxide)에 대해 생성 억제 활성을 가진다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물은 염증유발물질 중 하나인 NO(Nitric Oxide)에 대해 생성 억제 활성을 가짐으로써 종래의 염증성 질환 치료제에 비해 부작용을 현저히 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명의 실험예 1에서 살코린 B를 처리한 세포 배양액에 대해 세포독성실험을 하여 측정된 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 실험예 1에서 살코린 C를 처리한 세포 배양액에 대해 세포독성실험을 하여 측정된 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 실험예 1에서 살코리노사이드 A를 처리한 세포 배양액에 대해 세포독성실험을 하여 측정된 세

포 생존률을 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실험예 1에서 살코리노사이드 B를 처리한 세포 배양액에 대해 세포독성실험을 하여 측정한 세포 생존률을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 실험예 1에서 살코리노사이드 C를 처리한 세포 배양액에 대해 세포독성실험을 하여 측정한 세포 생존률을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 실험예 1에서 살코린 B를 처리한 세포 배양액에 대해 일산화질소 억제 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 실험예 1에서 살코린 C를 처리한 세포 배양액에 대해 일산화질소 억제 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 실험예 1에서 살코리노사이드 A를 처리한 세포 배양액에 대해 일산화질소 억제 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 실험예 1에서 살코리노사이드 B를 처리한 세포 배양액에 대해 일산화질소 억제 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명의 실험예 1에서 살코리노사이드 C를 처리한 세포 배양액에 대해 일산화질소 억제 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 버 지상부 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 버 지상부 추출물은 버 지상부 생체를 80% 메탄올 수용액 등과 같은 알코올 수용액으로 추출하여 수득될 수 있으며, 버 지상부 생체는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 버 지상부 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 여과법, 환류추출법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 버 지상부 추출물은 버 지상부 생체를 80% 메탄올 수용액에 넣고 추출물을 수득한 후 여과하고 감압 농축하여 얻을 수 있다.

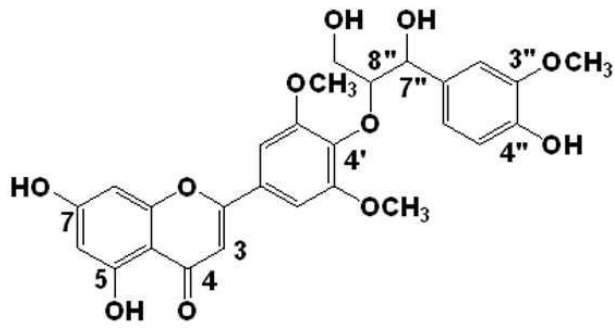
[0023] 또한, 본 발명은 버 지상부 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 버 지상부 분획물은 상술한 바에 따라 수득한 버 지상부 추출물을 n -헥산과 H_2O 로 분배 추출하고 H_2O 층을 에틸 아세테이트(EtOA)로 분배 추출한 후, H_2O 층을 n -부탄올로 분배추출함으로써 n -헥산 분획물, 에틸 아세테이트 분획물, n -부탄올 분획물 및 H_2O 분획물을 얻을 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 버 지상부 분획물로부터 분획하여 얻은 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

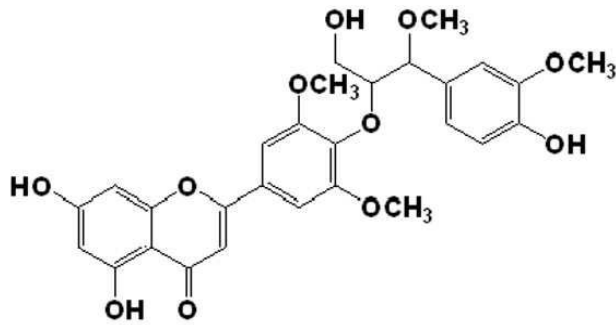
[0026] 상기 플라보노리그난 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 살코린 B(salcolin B), 화학식 2로 표시되는 살코린 C(salcolin C), 화학식 3으로 표시되는 살코리노사이드 A(salcolinoside A), 화학식 4로 표시되는 살코리노사이드 B(salcolinoside B) 또는 화학식 5로 표시되는 살코리노사이드 C(salcolinoside C)일 수 있다.

[0027] [화학식 1]



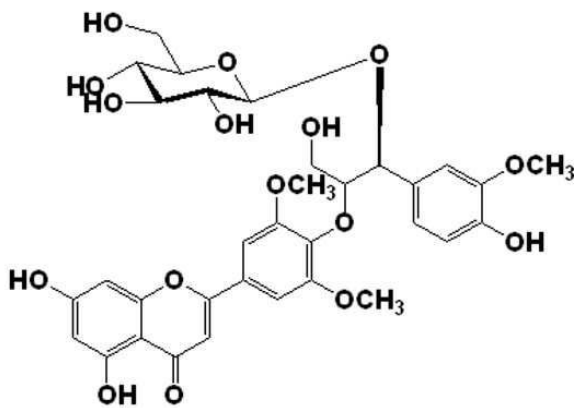
[0028]

[0029] [화학식 2]



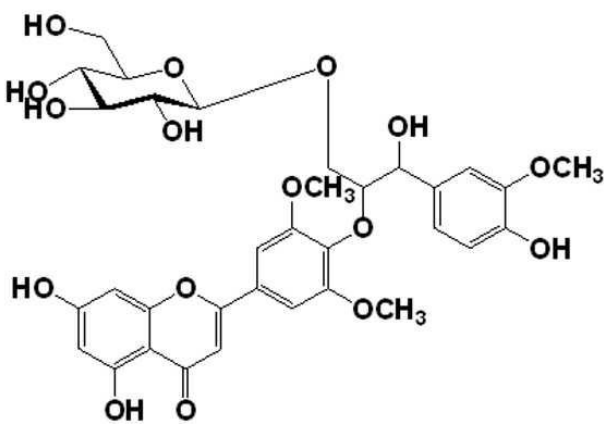
[0030]

[0031] [화학식 3]



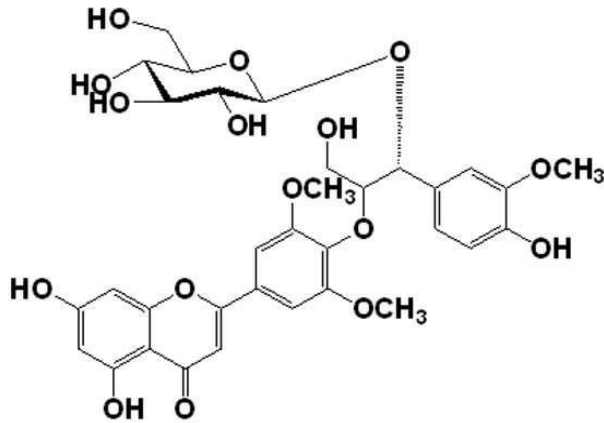
[0032]

[0033] [화학식 4]



[0034]

[0035] [화학식 5]



[0036]

[0037] 본 발명에서 상기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 상술한 바에 따라 수득된 에틸 아세테이트 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리하고 정제함으로써 수득될 수 있다.

[0038] 에틸 아세테이트 분획물로부터 상기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물을 분리하기 위해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 경우, 이동상으로는 *n*-헥산, 에틸 아세테이트, 메탄올 혼합용매 및 CHCl_3 ·메탄올 혼합용매를 사용할 수 있다. 상기 실리카겔 컬럼 크로마토그래피는 단일 화합물이 정제될 때까지 1회 내지 수회에 걸쳐 수행할 수 있으며, 필요에 따라 농축, 재결정을 실시할 수 있다.

[0039] 상술한 바와 같이 제조되는 본 발명에 따른 버 지상부 추출물, 버 지상부 분획물, 이로부터 분리된 플라보노리그난 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 세포로부터의 NO 생성 억제 활성을 가짐으로써 항염증성 질환의 예방 및 치료용으로 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명에서 상기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0041] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.

[0042] 동량의 상기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물에 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 염을 제조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0043] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

- [0044] 상기 조성물은 약학적 조성물로 사용할 수 있으며, 경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0045] 본 발명의 상기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등에 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 등을 사용할 경우 잘 혼합되지 않기 때문에 경구투여를 위한 액상제제로는 부적합하다. 그러나, 버 지상부 추출물 또는 버 지상부 분획물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 액상제제로 조제될 수 있다.
- [0046] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0047] **실시예 1: 버 지상부 추출물의 제조**
- [0048] 버 지상부 생체로는 경기도 이천시 부발읍에서 채집된 추청버를 사용하였으며, 상기 버 지상부 생체 26.7 kg을 80% MeOH 수용액(18 ℓ)에 24시간 실온에서 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과하고, 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과하여 모두 합치고, 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다.
- [0049] **실시예 2: 버 지상부 분획물의 제조**
- [0050] 상기 MeOH 추출물을 *n*-헥산(3 ℓ × 3)과 H₂O(3 ℓ)로 분배 추출하였고, H₂O층을 에틸 아세테이트(EtOAc, 3 ℓ × 3)로 분배 추출하였다. 다시 H₂O층을 *n*-부탄올(*n*-BuOH, 3 ℓ × 3)로 분배하여 얻었으며, 각 층을 감압 농축하여, *n*-헥산 분획물(135 g, OSH), 에틸 아세테이트 분획물(47 g, OSE), *n*-부탄올 분획물(90 g, OSB) 및 H₂O 분획물을 얻었다.
- [0051] **실시예 3: 버 지상부 분획물로부터 플라보노리그난 화합물의 분리**
- [0052] 실시예 2에서 얻은 에틸 아세테이트 분획물로부터 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(c.c.)(φ 12 × 20 cm, *n*-헥산-EtOAc-MeOH = 25:3:1→23:3:1→CHCl₃-MeOH = 20:1→18:1→16:1→13:1→7:1→5:1→3:1→1:1)를 실시하여 70 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 SiO₂ TLC로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 17개의 분획물(OSE-1~OSE-17)을 얻었다. 그 중 OSE-5 분획(3.5 g)에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Kiesel gel 60, Merck Darmstadt, Germany)(실리카겔 c.c.)(φ 5.5 × 14 cm, CHCl₃-MeOH = 50:1)를 실시하여 15개의 분획물(OSE-1~OSE-15)을 얻었으며, 이 중 OSE-5-7~9 분획(573 mg)에 대하여 옥타데실 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(ODS c.c.)(φ 3 cm × 6 cm, MeOH-H₂O = 1:1)를 실시하여 14개의 분획물(OSE-5-7~9-1~OSE-5-7~9-14)을 얻었다. 그 중 OSE-5-7~9-5~8 분획(111 mg)을 ODS c.c.(φ 3 cm × 5 cm, MeOH-H₂O = 3:2)를 실시하여 9개의 분획(OSE-5-7~9-8~10-1~OSE-5-7~9-5~8-9)으로 나누었고, 이 중에서 상기 화학식 1로 표시되는 살코린 B(salcolin B)[OSE-5-7~9-8~10-9, 24 mg, TLC(RP-18 F_{254S}) R_f 0.4, MeOH-H₂O = 3:1]를 분리하였다.
- [0053] 이후, OSE-6 분획(4.2 g)에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(c.c.)(φ 5.5cm × 15 cm, CHCl₃-MeOH = 15:1)를 실시하여 9개의 분획(OSE6-1~OSE-6-9)을 얻었다. OSE-6-2 분획(210 mg)을 ODS c.c.(φ 3.5 × 6 cm, MeOH-H₂O = 1:1)를 실시하여 13개의 분획(OSE-6-2-1~OSE-6-2-13)을 얻었으며, 그 중 OSE-6-2-10~12 분획(103 mg)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(c.c.)(φ 3 cm × 13 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O = 26:3:1)를 실시하여 6개의 분획(OSE-6-2-10~12-1~OSE-6-2-10~12-6)으로 나누었고, 이 중 OSE-6-2-10~12-1~3 분획(57 mg)을 ODS c.c.(φ 3 × 5 cm, MeOH-H₂O = 2:1)를 실시하여 7개의 분획(OSE-6-2-10~12-1~3-1~OSE-6-2-10~12-1~3-7)으로 나누었고, 이

중에서 상기 화학식 2로 표시되는 살코린 C(salcolin C)[OSE-6-2-10~12-1-3-4+5, 24 mg, TLC(RP-18 F_{254S}) R_f 0.5, MeOH-H₂O = 4:1]를 분리하였다.

[0054] 이후, OSE-12 분획(1.96 g)에 대하여 ODS c.c.(φ 5.5cm × 7 cm, MeOH-H₂O = 2:3)를 실시하여 14개의 분획(OSE-12-1~OSE-12-14)을 얻었다. OSE-12-9 분획(80 mg)을 ODS c.c.(φ 3.5 × 6 cm, MeOH-H₂O = 1:1)를 실시하여 12개의 분획(OSE-12-9-1~OSE-12-9-12)으로 나누었고, 이 중에서 상기 화학식 3으로 표시되는 살코리노사이드 A(salcolinoside A)[OSE-12-9-10, 20 mg, TLC(RP-18 F_{254S}) R_f 0.5, MeOH-H₂O = 1:1]를 분리하였다.

[0055] 이후, OSE-14 분획(1.4 g)에 대하여 ODS c.c.(φ 4 × 6 cm, MeOH-H₂O = 1.5:1)를 실시하여 18개의 분획(OSE-14-1~OSE-14-17)을 얻었고, 그 중 OSE-14-11 분획(152 mg)을 ODS c.c.(φ 3.5 × 6 cm, MeOH-H₂O = 1:1)를 실시하여 11개의 분획(OSE-14-11-1~OSE-14-11-11)으로 나누었고 이 중에서 상기 화학식 4로 표시되는 살코리노사이드 B(salcolinoside B)[OSE-14-11-6, 34 mg, TLC(RP-18 F_{254S}) R_f 0.5, MeOH-H₂O = 1:1]를 분리하였다.

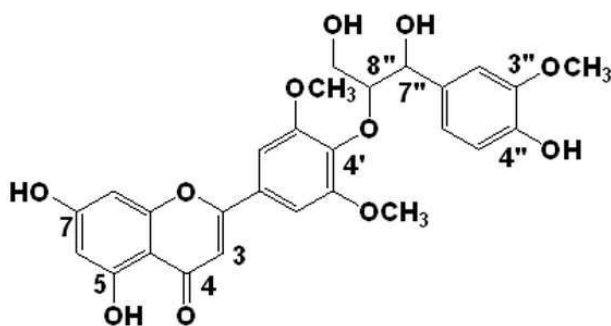
[0056] 이후, OSE-15 분획(1.82 g)에 대하여 ODS c.c.(φ 4.5 cm × 7 cm, MeOH-H₂O = 1:4)를 실시하여 20개의 분획(OSE-15-1~OSE-15-20)을 얻었다. OSE-15-15 분획(230 mg)을 ODS c.c.(φ 3.5 × 6 cm, MeOH-H₂O = 1:2→3:2)를 실시하여 12개의 분획(OSE-15-15-1~OSE-15-15-12)으로 나누었고, 이 중에서 상기 화학식 5로 표시되는 살코리노사이드 C(salcolinoside C)[OSE-15-15-12, 19 mg, TLC(RP-18 F_{254S}) R_f 0.5, MeOH-H₂O = 3:2]를 분리하였다.

[0057] 시험예 1: 플라보노리그난 화합물의 구조 분석

[0058] 상기 실시예 3에서 수득된 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물에 대해 IR 스펙트럼은 Perkin model 599B(Buckinghamshire, England)를 사용하여 측정하였고, NMR은 400 MHz FT-NMR 스펙트로미터(a AS 400, FT-NMR 스펙트로미터(Varian Inova AS 400, Palo Alto, CA)로 측정하였고, 빠른 원자충격법 매스 스펙트럼(Fast atom bombardment mass spectrum)은 JMSAX 700(JEOL)을 사용하여 측정하였고, UV 램프(UV lamp)는 spectrolin(Spectronics Corporation, Westbury, NY)을 사용하였으며, 비선광도는 polarimeter P-1020(JASCO, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였고, 융점은 Fisher-John's Melting Point Apparatus(Fisher Scientific, Miami, FL, USA)를 사용하여 측정함으로써 구조 분석을 하였고 그 결과는 하기와 같다.

[0059] (1) 살코린 B(salcolin B)

[0060] [화학식 1]



[0061]

[0062] 1) 노란색 분말

[0063] 2) $[\alpha]_D^{24} +15^\circ$ ($c=0.05$, MeOH); IR(MeOH, cm^{-1}) : 3457, 2939, 2640, 2558, 1653, 1591, 1498, 1354; Negative FAB/MS m/z : 525[M-H]⁻, 329, 297, 151; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD); 7.07 (H-2', 6', s), 6.56 (H-3), 6.36 (H-8), 6.11 (H-6), 6.99 (H-2'', d, $J=1.6$ Hz), 6.74 (H-5'', d, $J=8.0$ Hz), 6.82 (H-6'', dd, $J=8.0, 1.6$ Hz), 4.94 (H-7'', d, $J=5.2$ Hz), 4.41 (H-8'', dd, $J=5.2, 3.6$ Hz), 3.93 (H-9''a, dd, $J=12.0, 5.6$ Hz), 3.65 (H-9''b, dd, $J=12.0, 3.0$ Hz), 3.86 (H-3', 5', s), 3.83 (H-3'', s); ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD); 183.4 (C-4), 166.0 (C-7), 164.7 (C-2), 162.9 (C-5), 159.1 (C-9), 154.5 (C-3', 5'), 148.4 (C-3''), 146.7 (C-4''),

140.3 (C-4'), 133.6 (C-1"), 127.4 (C-1'), 105.3 (C-10), 120.6 (C-6"), 115.5 (C-5"), 111.3 (C-2"), 105.5 (C-3), 104.7 (C-2', 6'), 100.1 (C-6), 95.1 (C-8), 87.47 (C-8"), 74.16 (C-7"), 61.8 (C-9"), 56.8 (C-3', C-5'), 56.3 (C-3").

[0064]

3) 분석 결과

[0065]

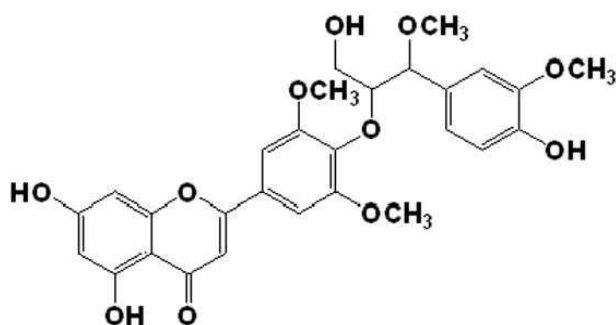
실시에 3에서 분리된 살코린 B를 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 있었고, 10% 황산으로 분무하고 가열하면 노란색으로 발색되었다. FAB/MS에서 m/z 525[M-H]⁻의 피크가 관찰되어 분자량은 526[M+1]⁺으로 결정하였고, IR 스펙트럼에서 수산기(3484 cm⁻¹) 및 이중결합(1640 cm⁻¹)의 존재를 확인하였다. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 스펙트럼의 저자장 영역에서 관측된 5개의 싱글렛 메틸 프로톤 시그널(singlet methyl proton signal)[δ_H 7.07 (H-2', 6', s), 6.56 (H-3), 6.36 (H-8), 6.11 (H-6)]로부터 다수의 벤젠환이 존재함을 알 수 있었다. 또한 2개의 더블렛 메틸 프로톤 시그널(doublet methyl proton signal)[δ_H 6.99 (H-2", d, J=1.6 Hz), 6.74 (H-5", d, J=8.0 Hz)]과 1개의 더블렛 올레핀 메틸 프로톤 시그널[δ_H 6.82 (H-6", dd, J=8.0, 1.6 Hz)]로부터 1,2,4-3 치환 벤젠환의 존재를 확인하였다. 산소가 치환된 영역에서는 2개의 산화 메틸 프로톤 시그널(oxygenated methine proton signal)[δ_H 4.94 (H-7", d, J=5.2 Hz), 4.41 (H-8", dd, J=5.2, 3.6 Hz)]과 1개의 산화 메틸 프로톤 시그널[δ_H 3.93 (H-9"a, dd, J=12.0, 5.6 Hz), 3.65 (H-9"b, dd, J=12.0, 3.0 Hz)], 2개의 산화 메틸 프로톤 시그널[δ 3.86 (H-3', H-5'), 3.83 (H-3")]을 관측하였다. ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD, δ_C) 스펙트럼에서는 3개의 메톡시 외에 24개의 시그널이 관측되었으며, DEPT 실험을 통하여 각 탄소의 다중도를 결정하였다. 저자장 영역에서 공역 케톤(δ_C 183.4)과 9개의 산화 올레핀 4급 카본 시그널[δ_C 166.0 (C-7), 164.7 (C-2), 162.9 (C-5), 159.1 (C-9), 154.5 (C-3', C-5'), 148.4 (C-3"), 146.7 (C-4"), 140.3 (C-4')]이 관측되었고, 3개의 올레핀 4급 카본 시그널[δ_C 133.6 (C-1"), 127.4 (C-1'), 105.3 (C-10)], 8개의 올레핀 메틸 카본 시그널[δ_C 120.6 (C-6"), 115.5 (C-5"), 111.3 (C-2"), 105.5 (C-3), 104.7 (C-2', 6'), 100.1 (C-6), 95.1 (C-8)]이 관측되어 다수의 벤젠환의 존재가 확인되었다. 또한 2개의 산화 메틸 카본 시그널[δ_C 87.4 (C-8"), 74.1 (C-7")]과 1개의 산화 메틸렌 카본 시그널[δ_C 61.8 (C-9")], 3개의 메톡시 카본 시그널[(δ_C 56.8 (C-3'), (C-5'), 56.3 (C-3"))이 관측되었다. 이를 종합한 결과, 플라보노이드 1분자에 페닐프로파노이드(phenylpropanoid) 1분자가 결합한 플라보노리간 구조로 결정하였다. 2D-NMR 중 COSY 스펙트럼을 통해 페닐프로파노이드 H-7", 8" 및 9"번의 연결을 확인하였으며, HMBC 스펙트럼으로부터 H-7"이 C-1", 2", 6"과의 크로스 피크(cross peak)를 보여 구조 동정한 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 플라보노리간 화합물은 플라보노이드 화합물에 페닐프로파노이드가 결합한 살코린 B로 구조 결정하였다.

[0066]

(2) 살코린 C(salcolin C)

[0067]

[화학식 2]



[0068]

1) 노란색 분말

[0069]

[0070]

2) FAB/MS m/z : 539[M-H]⁻; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD); 7.07 (H-2', 6', s), 6.58 (H-3), 6.39 (H-8), 6.13 (H-6), 6.89 (H-2", s), 6.73 (H-5", d, J=8.0 Hz), 6.81 (H-6", dd, J=8.4 Hz), 4.45 (H-8", d, J=6 Hz), 3.93 (H-9"a, dd, J=12.0, 4.8 Hz), 3.73 (H-9" b, dd, J=12.0, 2.6 Hz), 3.29 (H-3', H-5', H-7", s), 3.24 (H-

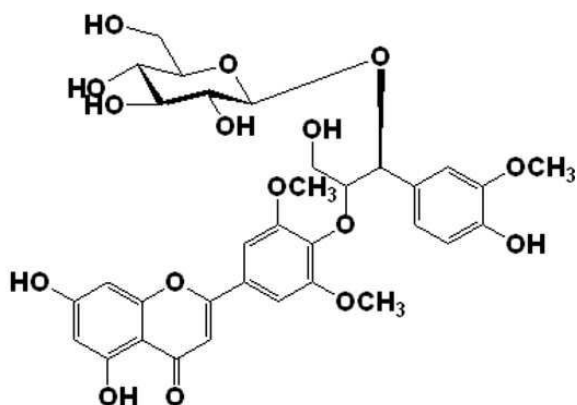
3", s); ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD); 183.4 (C-4), 165.9 (C-7), 164.8 (C-2), 162.9 (C-5), 159.1 (C-9), 154.5 (C-3', C-5'), 148.6 (C-3"), 147.1 (C-4"), 141.4 (C-4'), 130.9 (C-1"), 127.3 (C-1'), 105.3 (C-10), 121.9 (C-6"), 115.5 (C-5"), 111.9 (C-2"), 105.5 (C-3), 104.7 (C-2', 6'), 100.1 (C-6), 95.1 (C-8), 86.62 (C-8"), 83.74 (C-7"), 61.7 (C-9"), 56.7 (C-3', C-5'), 56.3 (C-3").

[0071] 3) 분석 결과

[0072] 실시예 3에서 분리된 살코린 C를 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 있었고, 10% 황산으로 분무하고 가열하면 노란색으로 발색되었다. FAB/MS에서 m/z 539[M-H]⁻의 피크가 관찰되어 분자량은 540[M+1]⁺으로 결정하였다. ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD , δ_{H}) 스펙트럼의 저자장 영역에서 관측된 5개의 싱글렛 올레핀 메틴 프로톤 시그널[δ_{H} 7.07 (H-2', 6', s), 6.58 (H-3), 6.39 (H-8), 6.13 (H-6)]로부터 다수의 벤젠환이 존재함을 알 수 있었다. 또한 2개의 더블렛 올레핀 메틴 프로톤 시그널[δ_{H} 6.89 (H-2", s), 6.73 (H-5", d, $J=8.0$ Hz)]과 1개의 더블렛 올레핀 메틴 프로톤 시그널[δ_{H} 6.81 (H-6", dd, $J=8.4$ Hz)]로부터 1,2,4-3 치환 벤젠환의 존재를 확인하였다. 산소가 치환된 영역에서는 1개의 산화 메틴 프로톤 시그널[δ_{H} 4.45 (H-8", d, $J=6$ Hz)]과 1개의 산화 메틸렌 프로톤 시그널[δ_{H} 3.93 (H-9"a, dd, $J=12.0, 4.8$ Hz), 3.73 (H-9"b, dd, $J=12.0, 2.6$ Hz)], 3개의 산화 메틸 프로톤 시그널[δ_{H} 3.29 (H-3', 5', H-7" s), 3.24 (H-3", s)]을 관측하였다. ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD , δ_{C}) 스펙트럼에서는 3개의 메톡시 외에 24개의 시그널이 관측되었으며, DEPT 실험을 통하여 각 탄소의 다중도를 결정하였다. 저자장 영역에서 공역 케톤(δ_{C} 183.4)과 9개의 산화 올레핀 4급 카본 시그널[δ_{C} 165.9 (C-7), 164.8 (C-2), 162.9 (C-5), 159.1 (C-9), 154.5 (C-3', C-5'), 148.6 (C-3"), 147.1 (C-4"), 141.4 (C-4')]이 관측되었고, 3개의 올레핀 4급 카본 시그널[δ_{C} 130.9 (C-1"), 127.3 (C-1'), 105.3 (C-10)], 8개의 올레핀 메틴 카본 시그널[δ_{C} 121.9 (C-6"), 115.5 (C-5"), 111.9 (C-2"), 105.5 (C-3), 104.7 (C-2', 6'), 100.1 (C-6), 95.1 (C-8)]이 관측되어 다수의 벤젠환의 존재가 확인되었다. 또한 2개의 산화 메틴 카본 시그널[δ_{C} 86.6 (C-8"), 83.7 (C-7")]과 1개의 산화 메틸렌 카본 시그널[δ_{C} 61.7 (C-9")], 2개의 메톡시 카본 시그널(δ_{C} 56.7, 56.3)이 관측되었다. 이를 종합한 결과, 살코린 B와 유사한 플라보노이드 1분자에 페닐프로파노이드 1분자가 결합한 플라보노리간 구조로 결정하였다. 2D-NMR 실험인 COSY 스펙트럼을 통해 페닐프로파노이드 H-7", 8" 및 9"번의 연결을 확인하였으며, HMBC 스펙트럼으로부터 산화 메틸 프로톤(H-7")이 산화 메틴 카본(C-1", C-2", C-6")과 크로스 피크를 보였으며, 또한 H-7"이 산화 메틸 카본[δ_{C} 56.7 (OCH_3)]과의 연결고리를 보여줌에 따라 C-7"에 OCH_3 가 결합되어 있는 것을 확인하였다. 플라보노이드의 경우는 스펙트럼 데이터를 문헌과 비교한 결과 트리신으로 결정하였다. 플라보노이드와 페닐프로파노이드의 연결부위를 결정하기 위하여 산화 메틴 프로톤(H-8")이 트리신의 141.4 (C-4")과의 연결고리를 확인함에 따라 페닐프로파노이드는 트리신의 C-4 "에 결합되어 있는 것을 확인하였다. 이를 종합한 결과 상기 화학식 2로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 살코린 C로 구조 결정하였다.

[0073] (3) 살코리노사이드 A(salcolinoside A)

[0074] [화학식 3]



[0075]

[0076]

1) 노란색 분말

[0077]

2) FAB/MS m/z : 539[M-H]⁻; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD); 7.07 (H-2', 6', s), 6.58 (H-3), 6.39 (H-8), 6.13 (H-6), 6.89 (H-2'', s), 6.73 (H-5'', d, $J=8.0$ Hz), 6.81 (H-6'', dd, $J=8.4$ Hz), 4.45 (H-8'', d, $J=6$ Hz), 3.93 (H-9''a, dd, $J=12.0$, 4.8 Hz), 3.73 (H-9'' b, dd, $J=12.0$, 2.6 Hz), 3.29 (H-3', H-5', H-7'', s), 3.24 (H-3'', s); ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD); 183.4 (C-4), 165.9 (C-7), 164.8 (C-2), 162.9 (C-5), 159.1 (C-9), 154.5 (C-3', C-5'), 148.6 (C-3''), 147.1 (C-4''), 141.4 (C-4'), 130.9 (C-1''), 127.3 (C-1'), 105.3 (C-10), 121.9 (C-6''), 115.5 (C-5''), 111.9 (C-2''), 105.5 (C-3), 104.7 (C-2', 6'), 100.1 (C-6), 95.1 (C-8), 86.62 (C-8''), 83.74 (C-7''), 61.7 (C-9''), 56.7 (C-3', C-5'), 56.3 (C-3'').

[0078]

3) 분석 결과

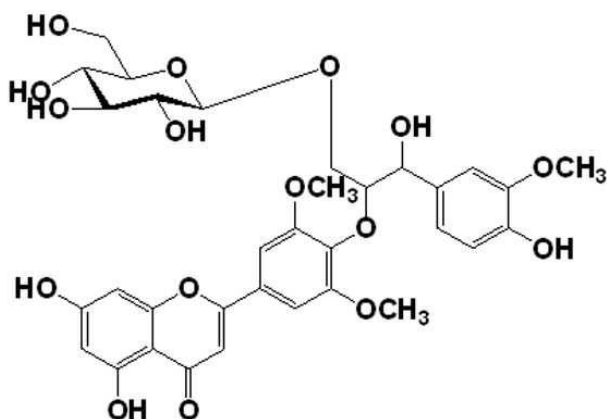
[0079]

실시에 3에서 분리된 살코리노사이드 A를 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 있었고, 10% 황산으로 분무하고 가열하면 노란색으로 발색되었다. Negative FAB-MS에서 m/z 687 [M-H]⁻의 피크가 관찰되어 분자량은 688[M+1]⁺로 결정하였다. IR 스펙트럼에서 수산기와(3405 cm⁻¹) 및 이중결합(1654 cm⁻¹)의 존재를 확인하였다. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 스펙트럼에서 저자장 영역에서 관측된 5개의 올레핀 메틴 프로톤 시그널(δ_H 7.13 (H-2', 6', s), 6.61 (H-3), 6.39 (H-8), 6.14 (H-6))로부터 다수의 벤젠환이 존재함을 알 수 있었다. 또한 2개의 더블렛 올레핀 메틴 프로톤 시그널(δ_H 7.09 (H-2'', d, $J=1.2$ Hz), δ_H 6.76 (H-5'', d, $J=8.0$ Hz))과 1개의 더블렛 올레핀 메틴 프로톤 시그널(δ_H 6.94 (H-6'', dd, $J=8.0$, 1.6 Hz))로부터 1,2,4-3 치환 벤젠환의 존재함을 확인하였다. 산소가 치환된 영역에서는 1개의 산화 메틴 프로톤 시그널(δ_H 4.51 (H-8'', m))과 1개의 산화 메틸렌 프로톤 시그널(δ_H 3.69 (H-9''a, dd, $J=12.0$, 4.0 Hz), 3.73 (H-9''b, dd, $J=12.0$, 2.4 Hz)), 3개의 산화 메틸 프로톤 시그널(δ_H 3.19 (H-3', 5'), 5.18 (H-7'', d, $J=6.0$ Hz), 3.85 (H-3'', s))을 관측하였다. 그리고 아노머 프로톤 시그널(anomeric proton signal)(δ_H 4.62(H-1'', d, $J=7.6$ Hz))과 당에서 유래하는 산화 메틴 및 메틸렌 프로톤 시그널(δ_H 3.8~3.3)이 관측된 점으로 보아 당이 결합한 구조로 결정하였고, 아노머 프로톤 결합 상수(anomeric proton coupling constant)($J=7.6$ Hz)로부터 β 결합으로 결정하였다. ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD, δ_C) 스펙트럼에서는 3개의 메톡시 외에 30개의 시그널이 관측되었으며, DEPT 실험을 통하여 각 탄소의 다중도를 결정하였다. 저자장 영역에서 공역 케톤(δ_C 183.4)과 9개의 산화 올레핀 4급 카본 시그널(δ_C 166.1 (C-7), 164.6 (C-2), 162.9 (C-5), 159.1 (C-9), 154.4 (C-3', 5'), 148.3 (C-3''), 147.0 (C-4''), 140.2 (C-4'))이 관측되었고, 3개의 올레핀 4급 카본(δ_C 131.5 (C-1''), 127.7 (C-1'), 105.2 (C-10)), 8개의 올레핀 메틴 카본 시그널(δ_C 121.2 (C-6''), 115.5 (C-5''), 112.4 (C-2''), 105.7 (C-3), 104.8 (C-2', 6'), 100.2 (C-6), 95.1 (C-8))이 관측되어 다수의 벤젠환의 존재가 확인되었다. 또한 2개의 산화 메틴 카본 시그널(δ_C 86.8 (C-8''), 81.8 (C-7''))과 1개의 산화 메틸렌 카본 시그널(δ_C 61.6 (C-9'')), 3개의 메톡시 카본 시그널(δ_C 56.9 (C-3', C-5'), 56.4 (C-3''))이 관측되었다. 그리고 아노머 카본(δ_C 105.2 (C-1''))과 당에서 유래하는 4개의 산화 메틴 카본 시그널(δ_C 78.0 (C-3''), 77.7 (C-5''), 75.6 (C-2''), 71.3 (C-4''))과 1개의 산화 메틸렌 카본 시그널(δ_C 62.5 (C-6''))이 케미컬 시프트(chemical shift)로부터 글루코피라노스(glucopyranose) 한 분자가 β 결합하고 있음을 확인하였다. 이상의 데이터로부터 상기 화학식 3으로 표시되는

플라보노리그난 화합물은 상기 화학식 1로 표시되는 플라보노리그난 화합물에 β -글루코피라노즈가 결합한 구조로 예상할 수 있었다. 당의 결합위치는 2D-NMR인 HMBC 스펙트럼으로 결정하였다. HMBC 스펙트럼에서 아노머 카본 시그널[δ_c 105.7 (C-1'')]이 산화 메틴 프로톤 시그널[δ_H 5.18 (H-7'', d, $J=6.0$ Hz)]과 크로스 피크를 보여 상기 화학식 3으로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 살코린 B의 C-7'' 위치에 β -글루코피라노즈가 결합한 구조로 동정하였고, 이를 종합한 결과 상기 화학식 3으로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 살코리노사이드 A로 구조 결정하였다.

[0080] (4) 살코리노사이드 B(salcolinoside B)

[0081] [화학식 4]



[0082] 1) 노란색 화합물

[0083] 2) $[\alpha]_D^{20} -20^\circ$ ($c=0.25$, MeOH); Negative FAB/MS m/z : 687[M-H] $^-$; IR(CaF₂ window, cm^{-1}); 3406, 1652, 1615, 1496, 1456, 1360, 1251, 1123; 1H -NMR(400 MHz, CD₃OD); 7.04 (H-2', 6', s), 6.54 (H-3, s), 6.34 (H-8, s), 6.11 (H-6, s), 7.00 (H-2'', br s), 6.73 (H-5'', d, $J=8.0$ Hz), 6.81 (H-6'', br d, $J=7.6$ Hz), 4.94 (H-7''), 4.51 (H-8'', m), 3.97 (H-9''), 3.86 (H-3', 5', s), 3.81 (H-3'', s), 4.33 (H-1'', d, $J=7.6$), 3.99 (H-9''a, dd, $J=12.0, 5.2$ Hz), 3.68 (H-9''b, dd, $J=12.0, 5.6$ Hz), ^{13}C -NMR(100 MHz, CD₃OD); 183.3 (C-4), 166.0 (C-7), 164.6 (C-2), 162.8 (C-5), 159.0 (C-9), 154.3 (C-3', 5'), 148.4 (C-3''), 146.7 (C-4''), 140.4 (C-4'), 133.2 (C-1''), 127.2 (C-1'), 105.2 (C-10), 120.8 (C-6''), 115.5 (C-5''), 111.5 (C-2''), 105.4 (C-3), 104.8 (C-2', 6'), 100.2 (C-6), 95.1 (C-8), 86.0 (C-8''), 74.1 (C-7''), 69.8 (C-9''), 104.6 (C-1''), 77.8 (C-3''), 77.7 (C-5''), 75.1 (C-2''), 71.5 (C-4''), 62.6 (C-6''), 56.8 (C-3', C-5'), 56.4 (C-3'').

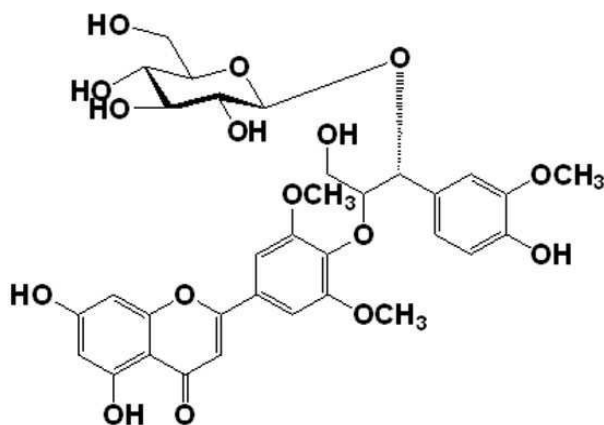
[0084] 3) 분석 결과

[0085] 실시예 3에서 분리된 살코리노사이드 B를 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 있었고, 10% 황산으로 분무하고 가열하면 노란색으로 발색되었다. negative FAB-MS에서 m/z 687 [M-H] $^-$ 의 피크가 관찰되어 분자량은 688[M+1] $^+$ 으로 결정하였다. IR 스펙트럼에서 수산기(3406 cm^{-1}) 및 이중결합(1652 cm^{-1})의 존재를 확인하였다. 1H -NMR(400 MHz, CD₃OD, δ_H) 스펙트럼에서 저자장 영역에서 관측된 5개의 올레핀 메틴 프로톤 시그널[δ_H 7.04 (H-2', 6', s), 6.54 (H-3, s), 6.34 (H-8, s), 6.11 (H-6, s)]로부터 다수의 벤젠환이 존재함을 알 수 있었다. 또한 3개의 올레핀 메틴 프로톤 시그널[δ_H 7.00 (H-2'', br s), 6.73 (H-5'', d, $J=8.0$ Hz), 6.81 (H-6'', br d, $J=7.6$ Hz)]로부터 1,2,4-3 치환 벤젠환의 존재함을 확인하였다. 산소가 치환된 영역에서는 2개의 산화 메틴 프로톤 시그널[δ_H 4.94 (H-7''), 4.51 (H-8'', m)]과 1개의 산화 메틸렌 프로톤 시그널[δ_H 3.97 (H-9'')]과 2개의 산화 메틸 프로톤 시그널[δ_H 3.86 (H-3', 5', s), 3.81 (H-3'', s)]을 관측하였다. 그리고 δ_H 4.33 (H-1'', d, $J=7.6$)에서 아노머 프로톤 시그널과 당에서 유래하는 산화 메틴 및 메틸렌 프로톤 시그널(δ_H 4.3~3.9)이 관측

된 점으로 보아 당이 결합한 구조임을 예상하였고 아노머 프로톤 결합 상수($J=7.6$ Hz)으로부터 β 결합임을 확인하였다. ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD , δ c) 스펙트럼에서는 3개의 메톡시 외에 30개의 시그널이 관측되었으며, DEPT 실험을 통하여 각 탄소의 다중도를 결정하였다. 저자장 영역에서 공역 케톤(δ c 183.3)과 9개의 산화 올레핀 4급 카본 시그널[δ c 166.0 (C-7), 164.6 (C-2), 162.8 (C-5), 159.0 (C-9), 154.3 (C-3', C-5'), 148.4 (C-3''), 146.7 (C-4''), 140.4 (C-4'')]이 관측되었고, 3개의 올레핀 4급 카본 시그널[δ c 133.2 (C-1''), 127.2 (C-1'), 105.2 (C-10)], 8개의 올레핀 메틴 카본 시그널[δ c 120.8 (C-6'), 115.5 (C-5''), 111.5 (C-2''), 105.4 (C-3), 104.8 (C-2', 6'), 100.2 (C-6), 95.1 (C-8)]이 관측되어 다수의 벤젠환의 존재가 확인되었다. 또한 2개의 산화 메틴 카본 시그널[δ c 86.0 (C-8''), 74.1 (C-7'')]과 1개의 산화 메틸렌 카본 시그널[δ c 69.8 (C-9'')], 3개의 메톡시 카본 시그널[(δ c 56.8 (C-3', C-5, '), 56.4 (C-3'')]이 관측되었다. 그리고 아노머 카본 시그널[δ c 104.6 (C-1'')]과 당에서 유래하는 4개의 산화 메틴 카본 시그널[δ c 77.8 (C-3''), 77.7 (C-5''), 75.1 (C-2''), 71.5 (C-4'')]과 1개의 산화 메틸렌 카본 시그널[δ c 62.6 (C-6'')]의 케미컬 시프트로부터 글루코피라노스 한 분자가 β 결합하고 있음을 확인하였다. 이상의 데이터로부터 상기 화학식 4로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 살코린 B에 β -글루코피라노스가 결합한 구조로 예상할 수 있었다. 당의 결합위치는 2D-NMR인 HMBC 스펙트럼으로 결정하였다. HMBC 스펙트럼에서 아노머 카본 시그널[δ c 104.6 (C-1'')]이 산화 메틸렌 프로톤 시그널[δ H 3.97 (H-9'')]과 크로스 피크를 보여 상기 화학식 4로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 살코린 B의 C-9'' 위치에 β -글루코피라노스가 결합한 구조로 동정하였고, 이를 종합한 결과 상기 화학식 4로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 살코리노사이드 B로 구조 결정하였다.

[0087] (5) 살코리노사이드 C(salcolinoside C)

[0088] [화학식 5]



[0089]

[0090] 1) 노란색 분말

[0091] 2) Negative FAB/MS m/z : 687[M-H] $^-$; IR(KBr, MeOH, cm^{-1}); 3405, 1654, 1616, 1496, 1358, 1252, 1165, 1123; ^1H -NMR(400 MHz, CD_3OD); 7.19 (H-2', 6', brs), 6.62 (H-3), 6.40 (H-8), 6.16 (H-6), 7.10 (H-2'', brs), 6.76 (H-5'', d, $J=8.0$ Hz), 6.91 (H-6'', dd, $J=8.4, 1.6$ Hz), 5.28 (H-7'', d, $J=4.0$ Hz), 4.43 (H-8'', m), 4.18 (H-1'', d, $J=6.8$ Hz), 3.83 (H-3', H-5', s), 3.79 (H-3'', s), 3.92 (H-9''a, dd, $J=12.0, 6.4$ Hz), 3.68 (H-9''b, dd, $J=12.0, 6.0$ Hz), ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD); 183.4 (C-4), 166.0 (C-7), 164.9 (C-2), 162.9 (C-5), 159.1 (C-9), 154.4 (C-3', 5'), 148.5 (C-3''), 147.0 (C-4''), 140.7 (C-4'), 130.4 (C-1''), 127.5 (C-1'), 105.2 (C-10), 121.9 (C-6''), 115.4 (C-5''), 112.8 (C-2''), 105.6 (C-3), 104.6 (C-2', 6'), 100.1 (C-6), 95.1 (C-8), 86.8 (C-8''), 77.8 (C-7''), 61.8 (C-9''), 100.7 (C-1''), 77.8 (C-3''), 77.7 (C-5''), 75.0 (C-2''), 71.8 (C-4''), 62.7 (C-6''), 56.3 (C-3', C-5'), 49.6 (C-3'').

[0092] 3) 분석 결과

[0093] 실시예 3에서 분리된 살코리노사이드 C를 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 있었고, 10% 황산으로 분무하고 가열하면 노란색으로 발색되었다. Negative FAB-MS에서 m/z 687 [M-H] $^-$ 의 피크가 관찰되어 분자량은

688[M+1]⁺로 결정하였다. IR 스펙트럼에서 수산기(3405 cm⁻¹) 및 이중결합(1654 cm⁻¹)의 존재를 확인하였다. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 스펙트럼에서 저자장 영역에서 관측된 5개의 올레핀 메틴 프로톤 시그널[δ_H 7.19 (H-2', 6', brs), 6.62 (H-3), 6.40 (H-8), 6.16 (H-6)]로부터 다수의 벤젠환이 존재함을 알 수 있었다. 또한 2개의 더블렛 올레핀 메틴 프로톤 시그널[δ_H 7.10 (H-2'', brs), δ_H 6.76 (H-5'', d, J=8.0 Hz)]과 1개의 더블렛 올레핀 메틴 프로톤 시그널[δ_H 6.91 (H-6'', dd, J=8.4, 1.6 Hz)]로부터 1,2,4-3 치환 벤젠환의 존재함을 확인하였다. 산소가 치환된 영역에서는 1개의 산화 메틴 프로톤 시그널[δ_H 4.43 (H-8'', m)]과 1개의 산화 메틸렌 프로톤 시그널[δ_H 3.92 (H-9''a, dd, J=12.0, 6.4 Hz), 3.68 (H-9''b, dd, J=12.0, 6.0 Hz)], 3개의 산화 메틸 프로톤 시그널[δ_H 3.83 (H-3', H-5', s), 5.28 (H-7'', d, J=4.0 Hz), 3.79 (H-3'', s)]을 관측하였다. 그리고 아노머 프로톤 시그널[δ_H 4.18 (H-1'', d, J=6.8 Hz)]과 당에서 유래하는 산화 메틴 및 메틸렌 프로톤 시그널(δ_H 3.8~3.3)이 관측된 점으로 보아 당이 결합한 구조임을 예상하였고, 아노머 프로톤 결합 상수(J=6.8 Hz)으로부터 α 결합으로 결정하였다. ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD, δ_C) 스펙트럼에서는 3개의 메톡시 외에 30개의 시그널이 관측되었으며, DEPT 실험을 통하여 각 탄소의 다중도를 결정하였다. 저자장 영역에서 공역 케톤(δ_C 183.4)과 9개의 산화 올레핀 4급 카본 시그널[δ_C 166.0 (C-7), 164.9 (C-2), 162.9 (C-5), 159.1 (C-9), 154.4 (C-3', C-5'), 148.5 (C-3''), 147.0 (C-4''), 140.7 (C-4')]이 관측되었고, 3개의 올레핀 4급 카본 시그널[δ_C 130.4 (C-1''), 127.5 (C-1'), 105.2 (C-10)], 8개의 올레핀 메틴 카본 시그널[δ_C 121.9 (C-6''), 115.4 (C-5''), 112.8 (C-2''), 105.6 (C-3), 104.6 (C-2', 6'), 100.1 (C-6), 95.1 (C-8)]이 관측되어 다수의 벤젠환의 존재가 확인되었다. 또한 2개의 산화 메틴 카본 시그널[δ_C 86.8 (C-8''), 77.8 (C-7'')]과 1개의 산화 메틸렌 카본 시그널[δ_C 61.8 (C-9'')], 3개의 메톡시 카본 시그널[δ_C 56.3 (C-3', C-5'), 49.6 (C-3'')]이 관측되었다. 그리고 아노머 카본[δ_C 100.7 (C-1'')]과 당에서 유래하는 4개의 산화 메틴 카본 시그널[δ_C 77.8 (C-3''), 77.7 (C-5''), 75.0 (C-2''), 71.8 (C-4'')]과 1개의 산화 메틸렌 카본 시그널[δ_C 62.7 (C-6'')]의 케미컬 시프트로부터 글루코피라노스 한 분자가 α 결합하고 있음을 확인하였다. 이상의 데이터로부터 상기 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 살코린 B에 글루코피라노스가 결합한 구조로 예상할 수 있었다. 당의 결합위치는 2D-NMR인 HMBC 스펙트럼으로 결정하였다. HMBC 스펙트럼에서 아노머 카본 시그널[δ_C 100.7 (C-1'')]이 산화 메틴 프로톤 시그널[δ_H 5.28 (H-7'', d, J=4.0 Hz)]과 크로스 피크를 보여 상기 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 살코린 B의 C-7'' 위치에 글루코피라노스가 α 결합한 구조로 동정하였고, 이를 종합한 결과 상기 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물은 살코리노사이드 C로 구조 결정하였다.

[0094] **실험예 1: 플라보노리그난 화합물의 항염증 활성 측정**

[0095] **(1) 세포 배양**

[0096] RAW 264.7 세포(한국세포주은행, Korean Cell Line Bank; KCLB)는 10% FBS 및 페니실린(penicillin)(100 μg/mL), 스트렙토마이신(streptomycin)(100 U/mL)이 포함된 DMEM 배지에서 37 °C, 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 배양하였다. RAW 264.7 세포에 상기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물이 포함된 시료용액의 여러 농도(0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM) 또는 양성 대조군을 1시간 전처리한 후 LPS(1 μg/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다.

[0097] **(2) 세포독성 시험**

[0098] 96-웰 플레이트(96-well plate)에 1×10⁵ 셀/웰로 세포를 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 두 군으로 나누어 배지에 희석하여 첨가하였다. 1시간 후 한 군에만 LPS(1 μg/mL)를 처리하였다. 24시간이 지난 후 MTT 시약을 넣고 4시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하고 형성된 포르마잔(formazan)을 DMSO 100 μL를 첨가하여 녹였다. 30분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존률은 하기 수학적 1에 따라 상기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물을 처리한 그룹과 아무것도 처리하지 않은 대조군 그룹 내에 있는 생존세포의 비율로써 측정하였고, 그 결과를 각각 도 1 내지 도 5에 나타내었다.

[0099] [수학적 1]

[0100] 세포 생존률(%) = [OD (화합물처리 세포수) - OD (백지세포수) / OD (대조군 세포수) - OD (백지세포수)] ×

100

[0101] (3) 일산화질소(Nitric Oxide, NO) 양의 측정

[0102] RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로써 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100 μL 와 Griess시약[1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid과 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl] 100 μL 를 혼합하여 96-웰 플레이트에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양 상등액으로는 RAW 264.7 세포에 상기 화학식 1 내지 화학식 5로 표시되는 플라보노리그난 화합물이 포함된 시료용액의 여러 농도(0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM)로 처리한 것으로 5 종류의 세포배양 상등액에 대해 일산화질소 양을 측정하였고, 그 결과를 각각 도 6 내지 도 10에 나타내었다.

[0103] (4) 결과

[0104] 도 1 내지 도 10을 참조하면, 상기 화학식 1로 표시되는 살코린 B의 경우, 농도 의존적인 염증 저해 활성을 확인하였다. 특히, 25 μM 의 농도에서는 세포독성 효과도 보이지 않으면서 50 % NO 생성 억제 활성을 확인하였다.

[0105] 상기 화학식 2로 표시되는 살코린 C의 경우, 농도 의존적으로 아주 좋은 염증 저해 활성을 확인하였으며, 12.5 μM 의 농도에서는 세포독성 효과도 보이지 않으면서 60 % 정도의 NO 생성 억제 활성을 확인하였다. 하지만 100 μM 의 농도의 활성은 RAW 264.7의 세포독성을 나타냈다.

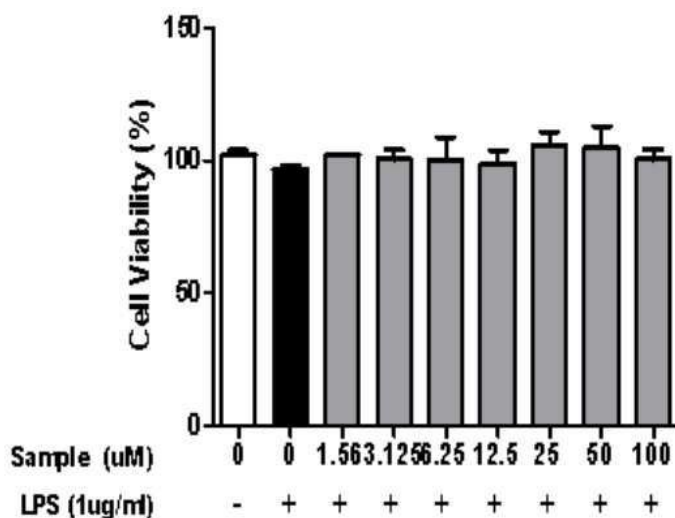
[0106] 상기 화학식 3으로 표시되는 살코리노사이드 A의 경우, 농도 의존적으로 염증 저해 활성을 확인하였으며, 50 μM 의 농도에서는 세포독성 효과도 보이지 않으면서 40 % 정도의 NO 생성 억제 활성을 확인하였으며 RAW 264.7의 세포독성은 없는 것으로 확인하였다.

[0107] 상기 화학식 4로 표시되는 살코리노사이드 B의 경우, 농도 의존적인 염증 저해 활성을 확인하였으며, 100 μM 의 농도에서는 세포독성 효과도 보이지 않으면서 80% 정도의 NO 생성 억제 활성을 확인하였다.

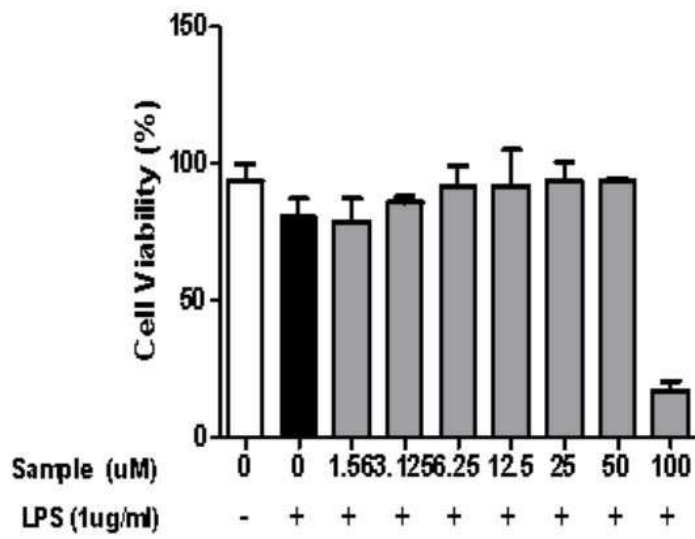
[0108] 상기 화학식 5로 표시되는 살코리노사이드 C의 경우, 농도 의존적으로 염증 저해 활성을 확인하였으며, 100 μM 의 농도에서는 세포독성 효과도 보이지 않으면서 80% 정도의 NO 생성 억제 활성을 확인하였다.

도면

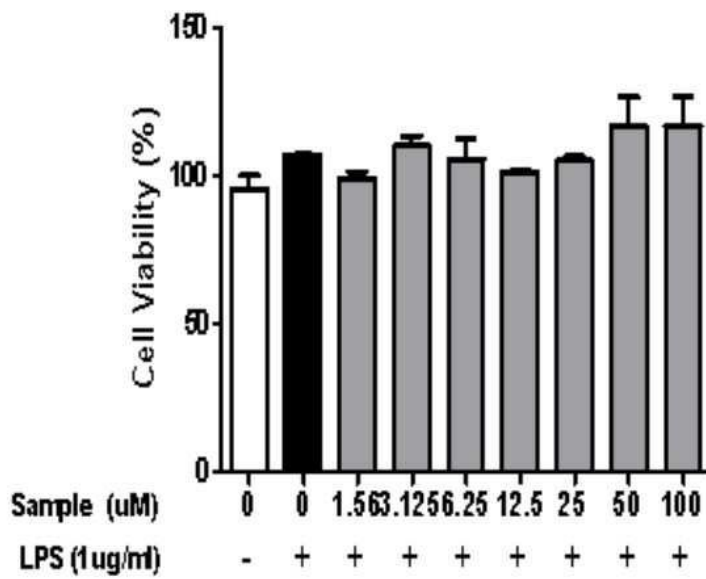
도면1



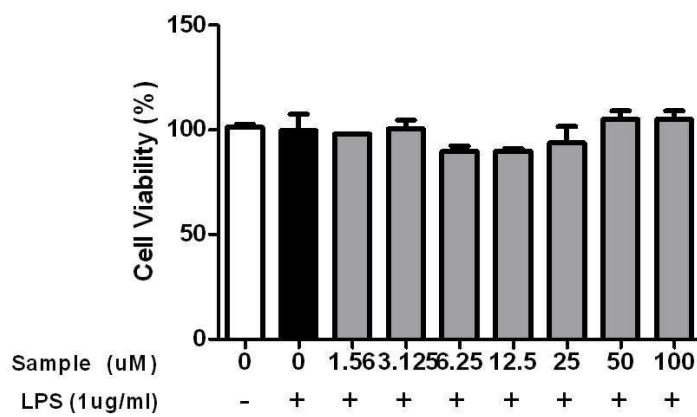
도면2



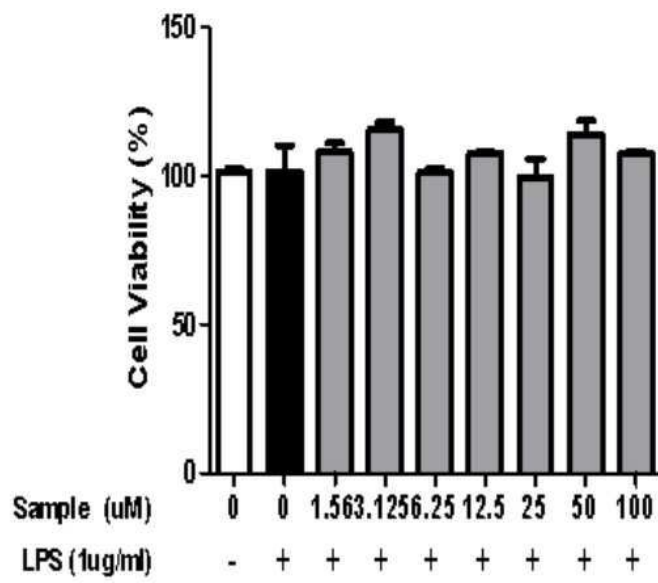
도면3



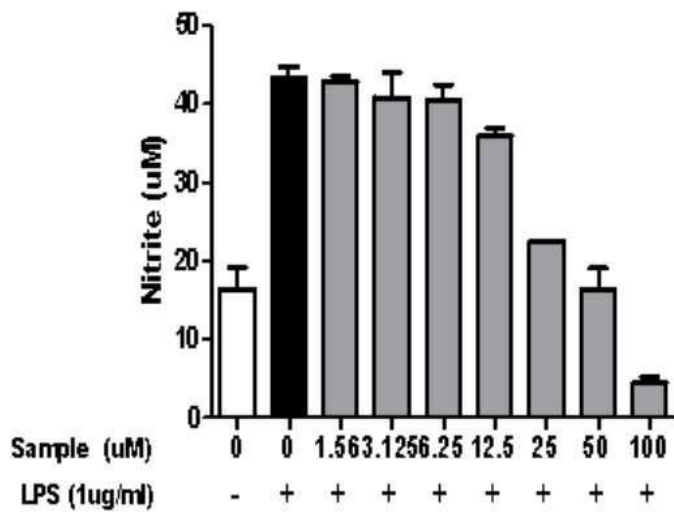
도면4



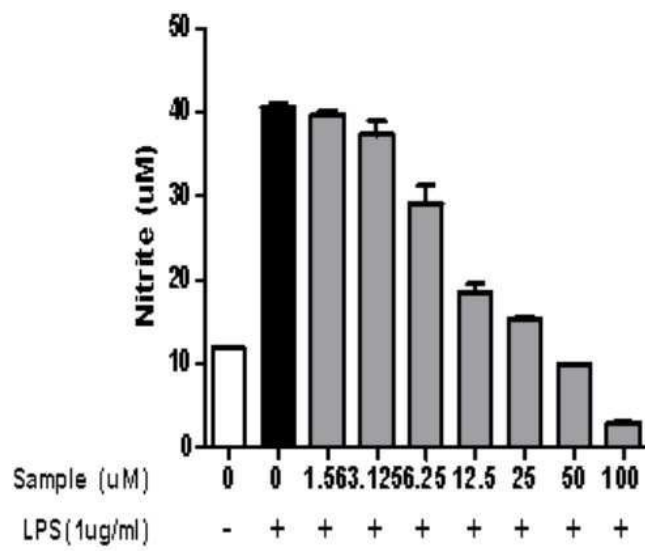
도면5



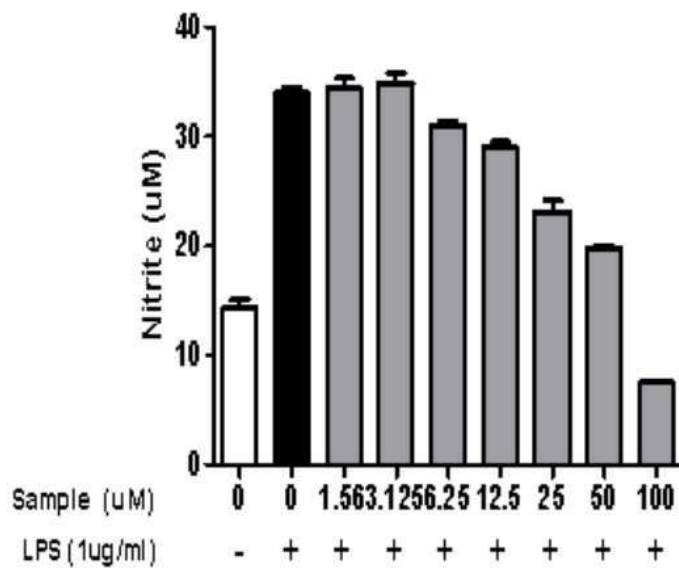
도면6



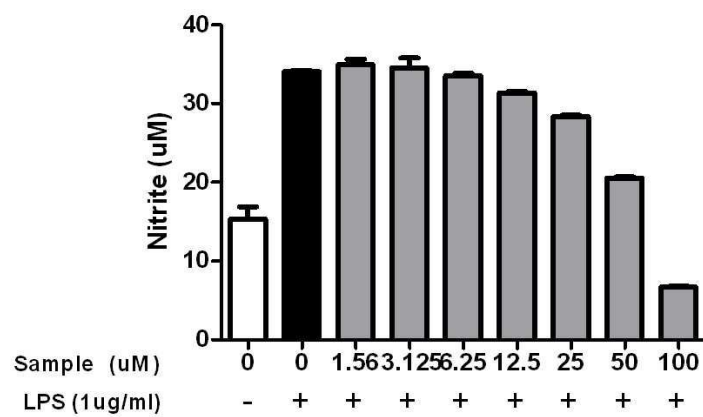
도면7



도면8



도면9



도면10

