



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0071770
(43) 공개일자 2017년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/29 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/7034 (2006.01) C07H 7/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/29 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0179845
(22) 출원일자 2015년12월16일
심사청구일자 2015년12월16일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
나민균
대전시 유성구 엑스포로 448 208동 602호 (전민동, 엑스포아파트)
이정인
전라남도 목포시 삼학로 363, 102동 902호 (용해동, 신안인스빌아파트)
배종섭
대구광역시 수성구 옥수천로 7, 103동 1603호 (옥수동, 태왕월드하이츠아파트)
(74) 대리인
특허법인 공간

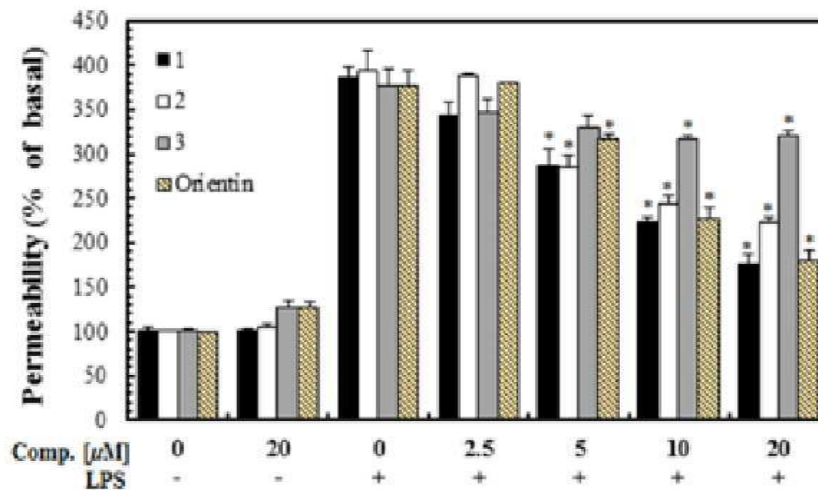
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 남천으로부터 분리한 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 남천 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 남천 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물은 혈관 염증과 관련되어 있는 혈관 내피의 기능장애를 억제함으로써 고혈압, 허혈성 심장질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색, 동맥경화증, 뇌혈관질환, 뇌졸중, 부정맥과 같은 심혈관질환 및 폐혈증 등과 같은 혈관 염증 질환을 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 31/7034 (2013.01)

C07H 7/04 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/60 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2010-00734

부처명 한국생명공학연구원

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외우수연구기관유치사업 (위탁과제)

연구과제명 식물자원의 생리활성 대사산물 발굴

기 여 율 2/4

주관기관 충남대학교산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2016.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C2202

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 저분자단일물질을 이용한 패혈증 치료 후보물질 개발

기 여 율 1/4

주관기관 경북대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201420590000

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업

연구과제명 새로운 패혈증 치료 기전연구 및 후보물질 발굴

기 여 율 1/4

주관기관 경북대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

청구항 4

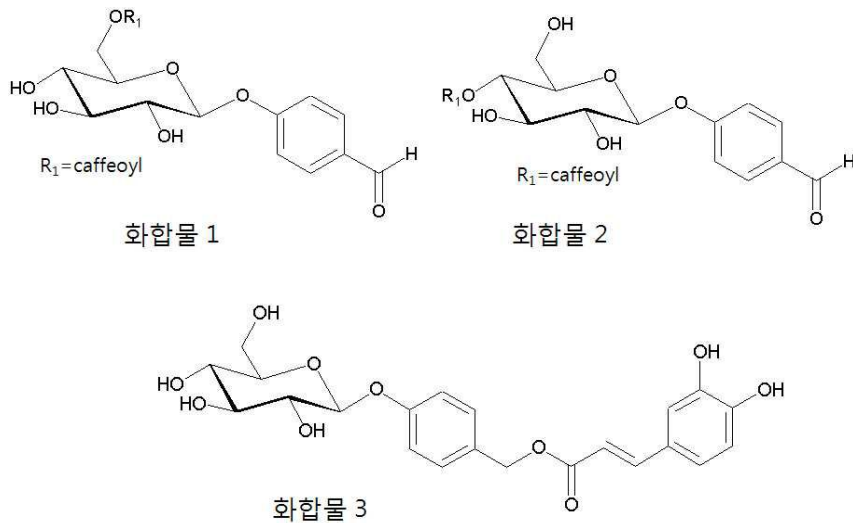
제1항 또는 제3항에 있어서,

상기 혈관 염증 질환은 고혈압, 허혈성 심장질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색, 동맥경화증, 뇌혈관질환, 뇌졸중, 부정맥과 같은 심혈관질환 및 폐혈증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐)프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 1), 4-포르밀페닐-4-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐)프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 2) 및 가스트로딘-7-*O*-트랜스-카페오일 에스터(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 남천 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[화학식 1]



청구항 6

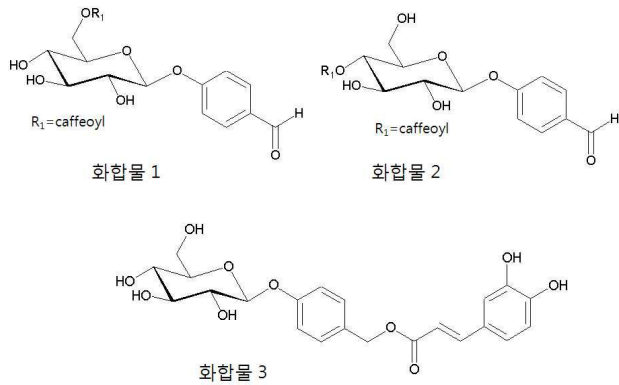
제5항에 있어서,

상기 남천 추출물은 남천 열매를 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, n-헥산, 디클로로메탄 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

남천으로부터 분리된 하기 화학식 1의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐)프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 1), 4-포르밀페닐-4-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐)프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 2) 및 가스트로딘-7-*O*-트랜스-카페오일 에스터(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[화학식 1]



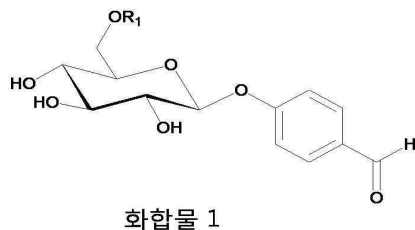
청구항 8

제5항 또는 제7항에 있어서,

상기 혈관 염증 질환은 고혈압, 허혈성 심장질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색, 동맥경화증, 뇌혈관질환, 뇌졸중, 부정맥과 같은 심혈관질환 및 패혈증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

하기의 화학구조를 갖는 신규 화합물 4-포르밀페닐-6-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐)프로펜오일]-β-D-글루코피라노사이드.



청구항 10

남천 열매를 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들이 혼합 용매로 남천 추출물을 제조하는 단계;

상기 남천 추출물을 헥산 및 물을 이용하여 순차적으로 분획한 후 물층 잔사의 pH를 맞추고 클로로포름을 이용하여 산성 및 알칼리성 알칼로이드를 제거하여 알칼로이드 미함유 분획물을 얻는 단계;

상기 알칼로이드 미함유 분획물을 에틸아세테이트와 부탄올을 이용하여 에틸아세테이트 분획물을 얻는 단계;

상기 에틸아세테이트 분획물을 메탄올 농도 구배 조건으로 조제용 역상-고성능 액체 크로마토그래피로 소분획물을 얻는 단계; 및

상기 소분획을 에탄올 등용매 조건으로 조제용 역상-고성능 액체 크로마토그래피 단계를 거쳐 상기 화학식 1의 4-포르밀페닐-6-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐)프로펜오일]-β-D-글루코피라노사이드를 분리하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 남천(*Nandian domestica*) 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 서구화된 식습관, 인구의 고령화 등의 요인으로 혈관 관련 질환들이 급격히 증가되고 있다. 혈관 관련 질환을

일으키는 주요 원인으로는 혈관의 염증을 들 수 있으며 이러한 혈관 염증으로 인해 고혈압, 허혈성 심장질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색, 동맥경화증(Virdis A. et al., 2003), 뇌혈관질환, 뇌졸중, 부정맥과 같은 심혈관질환, 패혈증(Aird W. C., 2003) 및 혈관염 등과 같은 질환들이 발생할 수 있다.

- [0003] 혈관 염증 반응은 혈관 내피(endothelium)의 기능장애(dysfunction)와 관련되어 있다(Aird W. C., 2003). 내피는 혈관벽의 내부를 감싸는 기관 중의 하나로(Dauphinee S. M. et al., 2006) 내피세포(endothelial cell)로 구성되어 있다. 혈관 내피는 혈관의 확장과 수축, 혈소판 활성화, 백혈구 유착(adhesion), 평활근 세포의 증식과 이동 등 혈관의 항상성을 유지하는 주요한 조절 역할을 한다(Pober J. S. et al., 2007). 내피의 기능장애는 염증 반응, 지단백의 산화, 평활근 증식, 세포외 간질 침착과 용해, 혈소판의 활성화를 일으킨다. 내피의 기능장애가 일어나면 혈관 수축과 혈관 확장의 균형이 깨져 내피세포 투과율(permeability)이 증가하고, 혈소판 응집, 백혈구가 내피세포 밑으로 이동하여 내피세포 표면에 유착되는 백혈구-내피세포 유착이 과정이 단계적으로 일어나고, 사이토카인 생성이 증가한다(정해영 et al., 2010; 김성구, 2001). 혈관 내피의 기능장애를 일으키는 원인으로는 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 심부전증, 흡연, 자연적인 노화, 유전적인 요인 및 미생물에 의한 감염 등으로 알려져 있다.
- [0004] 따라서 내피의 기능을 회복시켜 혈관 염증을 효율적으로 제어할 수 있는 신규 물질의 발굴은 심혈관질환, 패혈증 및 혈관염과 같은 혈관질환을 예방 또는 치료할 수 있는 새로운 실마리를 제공해 줄 수 있을 것으로 기대되고 있다.
- [0005] 남천(*Nandina domestica*)은 매자나무과에 속하며 중국 남부와 인도가 원산인 나무로, 남천축, 남천죽이라고도 부른다. 남천의 성숙한 열매를 남천실이라 하며 장과로서 구형이며 10월에 붉게 익는데, 과실에는 난테닌(nantenine), 이소코리딘(isocorydine) 등의 알칼로이드 성분이 있어 해수, 천식, 백일해, 간 기능 장애 등에 약제로 사용되었으며, 잎은 강장제로 사용되어왔다. 남천에는 알칼로이드 성분(Iwasa K. et al., 2008)뿐만 아니라 트라이테펜(triterpene)(Kodai T. et al., 2010), 리그난(lignan), 플라보노이드(flavonoid) 및 카페오일 글루코사이드(caffeoyl glucoside)(Fusa K. et al., 1997) 등이 포함되어 있다. 카페오일 글루코사이드의 경우에는 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 유도된 마크로파지(macrophage)의 NO(nitric oxide) 생성을 억제한다(Choi J. et al., 2015)는 것이 밝혀져 있다.
- [0006] 이에 따라, 본 발명인들은 남천으로부터 추출한 추출물과 이로부터 분리한 화합물이 내피의 기능장애를 억제하여 혈관 염증을 억제할 수 있다는 것을 밝힘으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.
- [0007] 한편, 한국등록특허 제1453609호에서는 조팝나무로부터 추출한 카페오일 글루코사이드 화합물이 염증 반응을 억제한다고 개시하고 있으나, 글루코사이드 화합물의 종류가 상이하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1453609호, 조팝나무잎으로부터 분리된 신규 헤미테르펜 글루코사이드 화합물 및 이의 항산화 및 항염 용도, 2014. 10. 15. 등록.

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) 김성구, 관상동맥 질환에서 염증 지표, Korean circulation J., 31(7), 617-619, 2001.
- (비특허문헌 0002) 정해영 et al., 노화와 혈관질환의 기전으로서 분자염증, KSBMB NEWS, 9월호, 1-12, 2010.
- (비특허문헌 0003) Aird W. C., The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome, Blood, 101(10), 3765-3777, 2003.
- (비특허문헌 0004) Choi J. et al., Two New Phenolic Glucosides from Lagerstroemia speciosa., Molecules, 20(3), 4483-4491, 2015.
- (비특허문헌 0005) Dauphinee S. M. et al., Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells, Lab. Invest., 86(1), 9-22, 2006.
- (비특허문헌 0006) Fusa K. et al., Extraction of 4-formylphenyl 4-O-[3-(3,4-

dihydroxyphenyl)propenoyl]- β -D-glucopyranoside from *Nandina domestica* Thunb, Hasegawa, T., Co., Ltd., Japan; Hasegawa, Koryo Co., Ltd., 7pp, 1997)

(비특허문헌 0007) Iwasa K. et al., Online structural elucidation of alkaloids and other constituents in crude extracts and cultured cells of *Nandina domestica* by combination of LC-MS/MS, LC-NMR, and LC-CD analyses, J. Nat. Prod., 71(8), 1376-1385, 2008.

(비특허문헌 0008) Kodai T. et al., Novel cycloartane-type triterpenoid from the fruits of *Nandina domestica*, J. Nat. Med., 62(2), 216-218, 2010.

(비특허문헌 0009) Pober J. S. et al., Evolving function of endothelial cells in inflammation, Nat. Rev. Immunol., 7(10), 803-815, 2007.

(비특허문헌 0010) Viridis A. et al., Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension?, Curr. Opin. Nephrol. Hyperten., 12(2), 181-187, 2003.

발명의 내용

해결하려는 과제

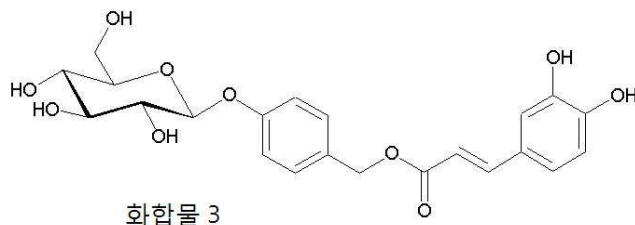
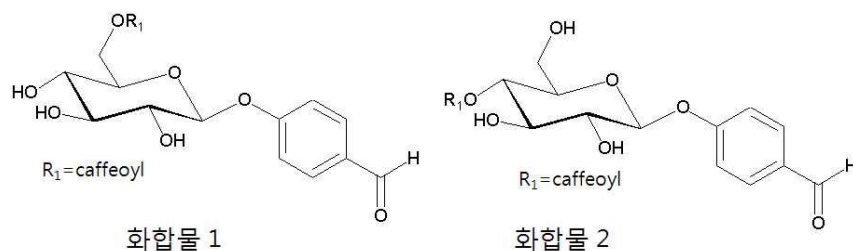
[0010] 본 발명의 목적은 남천(*Nandina domestica*) 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 남천(*Nandina domestica*) 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0012] 보다 자세하게는, 하기 화학식 1의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 1), 4-포르밀페닐-4-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 2) 및 가스트로딘-7-*O*-트랜스-카페오일 에스터(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 남천 추출물을 함유하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0013] [화학식 1]



[0014]

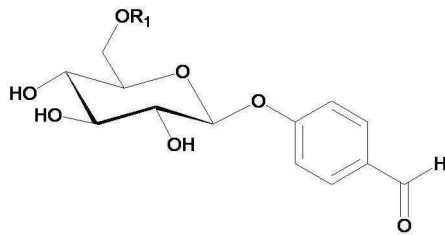
[0015] 또한, 본 발명은 남천 추출물로부터 분리한 상기 화학식 1의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 1), 4-포르밀페닐-4-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 2) 및 가스트로딘-7-*O*-트랜스-카페오일 에스터(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0016] 본 발명은 남천 추출물로 분리된 상기 화학식 1의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -

D-글루코피라노사이드(화합물 1), 4-포르밀페닐-4-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]-β-D-글루코피라노사이드(화합물 2) 및 가스트로딘-7-O-트랜스-카페오일 에스터(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 남천 추출물을 함유하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0017] 또한, 본 발명은 남천 추출물로 분리된 상기 화학식 1의 4-포르밀페닐-6-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]-β-D-글루코피라노사이드(화합물 1), 4-포르밀페닐-4-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]-β-D-글루코피라노사이드(화합물 2) 및 가스트로딘-7-O-트랜스-카페오일 에스터(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0018] 본 발명은 또한, 하기 화학구조를 갖는 신규 화합물인 4-포르밀페닐-6-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]-β-D-글루코피라노사이드 및 이의 분리 방법을 제공한다.



화합물 1

[0019]

[0020] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0021] 본 발명은 남천 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0022] 상기 남천 추출물은 남천 열매를 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, n-헥산, 디클로로메탄 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출하여 얻을 수 있으며, 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올로는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등을 이용할 수 있다. 또한, 상기 남천 추출물은 유기용매로 재분획한 분획물일 수 있으며, 상기 유기용매로는 헥산, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름 등을 이용할 수 있다.

[0023] 상기 남천으로부터 분리된 화합물은 남천 열매의 추출물을 크로마토그래피로 분획하여 얻을 수 있으며, 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), HP-20 컬럼 크로마토그래피(HP-20 column chromatography), RP-18 컬럼 크로마토그래피(RP-18 column chromatography), LH-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 조제용 역상-고성능 액체 크로마토그래피(preparative reversed-phase high performance chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography) 등에서 선택하여 사용할 수 있다.

[0024] 한편, 본 발명의 화합물은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 합성될 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수도 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 남천 추출물 또는 이로부터 분리된 상기 화학식 1의 화합물 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 추출물 또는 화합물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 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 고형제제는 상기 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외

에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 상기 약학 조성물의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 남천 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0028] 또한, 본 발명은 남천 추출물 또는 이로부터 분리된 상기 화학식 1의 화합물 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 추출물 또는 화합물은 본 발명의 건강기능식품에 0.001중량%~100중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물 또는 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

[0029] 상기 혈관 염증 질환은 고혈압, 허혈성 심장 질환, 관상동맥 질환, 협심증, 심근경색, 동맥경화증, 뇌혈관질환, 뇌졸중, 부정맥과 같은 심혈관질환 및 패혈증일 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 하기 화학식 구조를 가지는 신규 화합물인 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜 오일]- β -D-글루코피라노사이드는 남천 열매를 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들이 혼합 용매로 남천 추출물을 제조하는 단계; 상기 남천 추출물을 헥산과 물을 이용하여 순차적으로 분획한 후 물층 잔사의 pH를 맞춘 후 클로로포름을 이용하여 산성 및 알칼리성 알칼로이드를 제거하여 알칼로이드 미함유 분획물을 얻는 단계; 상기 알칼로이드 미함유 분획물을 에틸아세테이트와 부탄올을 이용하여 에틸아세테이트 분획물을 얻는 단계; 상기 에틸아세테이트 분획물을 메탄올 농도 구배 조건으로 조제용 역상-고성능 액체 크로마토그래피로 소분획물을 얻는 단계; 및 상기 소분획물을 에탄올 등용매 조건으로 조제용 역상-고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 화합물 1을 얻는 단계; 를 거쳐 분리할 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 남천 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 혈관 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 남천 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물은 혈관 염증과 관련되어 있는 혈관 내피의 기능장애를 억제함으로써 고혈압, 허혈성 심장질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색, 동맥경화증, 뇌혈관질환, 뇌졸중, 부정맥과 같은 심혈관질환 및 패혈증 등과 같은 혈관 염증 질환을 치료할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명의 화합물 1의 HMBC ($\rightarrow$) 상관관계를 나타낸다.
 도 2는 세포 투과성에 미치는 화합물들의 영향을 확인한 결과를 나타낸다. 세포의 투과성은 아무것도 처리하지 않은 세포의 투과성을 100%로 하고, 이에 따라 증가한 세포의 투과성을 %로 나타내었다.
 도 3은 세포의 유착성에 미치는 화합물들의 영향을 확인한 결과를 나타낸다.
 도 4는 세포의 이동 활성에 미치는 화합물들의 영향을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [0034] <실시예 1. 남천 추출물 및 화합물의 분리>
- [0035] 본 발명에서 사용된 남천 열매는 대전에 있는 허브 농장에서 구입하였다. 건조된 남천 열매 3.7kg에 3ℓ 메탄올을 넣어 추출물을 얻는 과정을 3회 반복하였다(3ℓ×3). 남천 열매-메탄올 추출물을 진공상태에서 증발시켜 410g의 메탄올 추출물을 얻었다.
- [0036] 메탄올 추출물 360g을 물에 녹이고, 에틸아세테이트를 넣어 pH가 4가 되도록 한 뒤, 침전된 고체 침전물을 제거하여 분획물(Fr1)을 얻었다. 분획물 Fr1을 헥산/에틸아세테이트/포름산 혼합 용매의 농도구배(헥산/에틸아세테이트/포름산=100:1.67:0.5, 3 L; 100:3.33:0.83, 2 L; 100:5:2.5, 1.5 L; 100:7.5:3.75, 1.5 L; 100:10:5, 1.5 L; 100:15:7.5, 1.5 L; MeOH 100%, 2 L) 및 유속 40mℓ/min으로 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography, MPLC)를 수행하여 7개의 소분획물(Fr1-1~Fr1-7)을 얻었다. 헥산/에틸아세테이트/포름산=100:3.33:0.83 혼합 용매로 얻은 소분획물 Fr1-2 800mg을 아세토니트릴(acetonitrile) 농도 구배(10→70%) 조건으로 조제용 역상-고성능 액체 크로마토그래피(preparative reversed-phase high performance chromatography)(유속 8mℓ/min로 1시간 이상)를 수행하여 머무른 시간(retention time, t_R)이 30분에서 화합물 2(2.0mg)를 얻었다.
- [0037] 메탄올 추출물 중 50g을 헥산과 물을 이용하여 분획하였고, 이 중 물-용해 분획물에 HCl을 첨가하여 pH 4가 되도록 하였다. pH를 맞춘 물-용해 분획물에 클로로포름을 넣어 침전된 산성 알칼로이드를 제거하고, 상층액에는 수산화암모늄을 넣어 pH 11로 맞춘 후 클로로포름을 첨가하여 침전된 알칼리성 알칼로이드를 제거하여 알칼로이드가 미함유 된 물 분획물을 얻었다. 알칼로이드-미함유 물 분획물을 에틸아세테이트와 부탄올을 가하여 에틸아세테이트 분획물(Fr2) 600mg을 얻었다. 에틸아세테이트 분획물 Fr2 600mg을 메탄올 농도 구배(10→100%) 조건으로 조제용 역상-고성능 액체 크로마토그래피(preparative reversed-phase high performance chromatography)(유속 5mℓ/min로 1시간 이상)를 수행하여 7개의 소분획물(Fr2-1~Fr2-7)을 얻었다. 소분획물 중 20분 내지 22분 사이에 얻은 소분획물 Fr2-4 170mg을 메탄올 등용매(메탄올:물=30:70) 조건으로 조제용 역상-고성능 액체 크로마토그래피(유속 5mℓ/min)를 수행하여 머무른 시간이 12분에서 화합물 1(7.0mg)을 얻었고, 머무른 시간이 45분에서 화합물 3(6.0mg)을 얻었다.
- [0038] <실시예 2. 남천으로부터 분리한 화합물의 물리화학적 구조 확인>
- [0039] 실시예 2-1. 4-포르밀페닐-6-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]-β-D-글루코피라노사이드(화합물 1)
- [0040] 4-formylphenyl-6-O-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)propenoyl]-β-D-glucopyranoside;
- [0041] nandinaside A;
- [0042] 갈색 무정형 분말;
- [0043] HR-ESI-MS: $[M+Na]^+$ 469.1110 m/z (calcd. for $C_{22}H_{22}O_{10}Na$, 469.1111);
- [0044] 1H NMR 및 ^{13}C NMR 데이터는 하기 표 1 참조;
- [0045] HR-ESI-MS 분석결과와 ^{13}C NMR 데이터를 통해 분자식이 $C_{22}H_{22}O_{10}$ 로 확인되었다.
- [0046] 화합물 1에 대한 1H NMR 스펙트럼(표 1 참조)에서, δ_H 9.71 (1H, s), δ_H 7.20 (2H, d, J = 8.6 Hz; δ_C 117.8) 및 δ_H 7.79 (2H, d, J = 8.6 Hz; δ_C 132.8)의 양성자 신호는 *p*-히드록시벤즈알데히드(hydroxybenzaldehyde)의 존재를 나타내고, δ_H 6.80 (1H, d, J = 8.1 Hz; δ_C 116.6), δ_H 6.93 (1H, dd, J = 1.7 및 8.1 Hz; δ_C 123.1) 및 δ_H 7.04 (1H, d, J = 1.7 Hz; δ_C 115.1)은 1,3,4-치환 벤젠링을, δ_H 6.27 (1H, d, J =15.9 Hz, δ_C 114.9)과 δ_H 7.53 (1H, d, J = 15.9 Hz; δ_C 147.2)은 α,β-불포화 카보닐 그룹(unsaturated carbonyl group)을 의미하며, δ_C 168.9의 카보닐 탄소(carbonyl carbon)의 존재로부터 카페오일 그룹이 하나 치환된 카페오일 글루코사이드계 화합물로 추정하였다.

[0047] NMR 데이터를 통해 화합물 1이 이미 알려진 화합물인 4-포르밀페닐-4-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 2)와 C-6' 당의 다운 필드 이동 된(downfield-shifted) 메틸렌 탄소를 제외하고 거의 일치하는 것을 알 수 있었다.

[0048] HMBC 스펙트럼 분석을 통해서 화합물 1이 이미 알려진 화합물의 1,6이 치환된 이성질체임을 재확인하였다. C-6'에 카페오일 잔기가 배치된 당의 δ_H 4.37 및 4.54에 해당하는 2H-6'는 C-9" 카페오일 카르보닐 탄소(δ_C 168.9)와 HMBC 상관관계를 보였다(도 1 참조). 아노머 양성자(anomeric proton) H-1'가 C-4의 HMBC 상관관계는 아노머 양성자와 C-4 사이의 에테르 결합으로 재확인하였다.

[0049] 따라서, 화합물 1은 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드의 구조를 화합물을 갖는 신규 화합물로 확인되었고, 난디나사이드 A(nandinaside A)로 명명하였다.

표 1

[0050]

No	화합물 1	
	δ_H	δ_C
1	-	132.5
2	7.79 (1H, d, 8.6)	132.8
3	7.20 (1H, d, 8.6)	117.8
4		163.7
5	7.20 (1H, d, 8.6)	117.8
6	7.79 (1H, d, 8.6)	132.8
7	9.71 (1H, s)	192.8
1'	5.08 (1H, d, 7.1)	101.3
2'	3.53 (1H, m)	74.7
3'	3.53 (1H, m)	77.8
4'	3.43 (1H, m)	71.8
5'	3.80 (1H, t, 7.1)	75.7
6'	4.54 (1H, dd, 1.9, 11.9) 4.37 (1H, dd, 7.1, 11.9)	64.5
1' '	-	127.7
2' '	7.04 (1H, d, 1.7)	115.1
3' '	-	146.9
4' '	-	149.7
5' '	6.80 (1H, d, 8.1)	116.6
6' '	6.93 (1H, dd, 1.7, 8.1)	123.1
7' '	7.53 (1H, d, 15.9)	147.2
8' '	6.27 (1H, d, 15.9)	114.9
9' '	-	168.9
¹ H NMR : 600MHz, ¹³ C-NMR : 150MHz in MeOH- <i>d</i> ₄		

[0051] 실시예 2-2. 4-포르밀페닐-4-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드(화합물 2)

[0052] 4-formylphenyl-4-*O*-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)propenoyl]- β -D-glucopyranoside

[0053] 갈색 무정형 분말;

[0054] NMR 데이터에서 δ_H 9.88(1H, s), δ_H 7.27 (2H, d, J = 7.3 Hz; δ_C 118.2) 및 δ_H 7.90 (2H, d, J = 8.7 Hz; δ_C 133.2)은 *p*-히드록시벤즈알데히드(hydroxybenzaldehyde)를 나타내고, δ_H 6.79 (1H, d, J = 8.2 Hz; δ_C 116.8) δ_H 6.98 (1H, dd, J = 1.6 및 8.1 Hz; δ_C 123.4) 및 δ_H 7.07(1H, d, J = 1.6 Hz; δ_C 115.5)은 1,3,4-치환 벤젠링을, δ_H 6.33(1H, d, J = 15.9 Hz, δ_C 114.9)과 δ_H 7.63 (1H, d, J = 15.9 Hz; δ_C 148.0) 및 δ_C 168.8의 카보닐 탄소(carbonyl carbon)는 α , β -불포화 카보닐 그룹(unsaturated carbonyl group)을 함유하는 카페오일 그룹을 나타내었다.

[0055] 따라서, 화합물 2는 4-포르밀페닐-4-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드로 확인되

었다.

[0056] 실시예 2-3. 가스트로딘-7-*O*-트랜스-카페오일 에스터(화합물 3)

[0057] Gastrodin-7-*O*-trans-caffeoyl ester;

[0058] 갈색 무정형 분말;

[0059] HR-ESI-MS: $[M + Na]^+$ 471.1260 m/z (calcd. for $C_{22}H_{24}O_{10}Na$, 471.1267);

[0060] HR-ESI-MS 분석결과와 ^{13}C NMR 데이터를 통해 분자식이 $C_{22}H_{22}O_{10}$ 로 확인되었다.

[0061] NMR 데이터를 통해 메틸렌 그룹 δ_H 5.15 (2H, s; δ_C 66.9)은 화합물 2의 알데하이드 대신 알코올기가 치환되어 있음을 나타내었다. NMR 데이터를 통해 화합물 3은 카페오닐칼레리아닌(caffeoylcalleryanin)의 *p*-하이드록시벤질 알코올 (C-3)를 제외하고 거의 유사하였다. HMBC 스펙트럼을 통하여 *p*-하이드록시벤질 알코올의 메틸렌 양성자(methylene proton) (δ_H 5.15)는 카페오닐 카보닐 탄소(δ_C 169.1)와 상관관계를 보였다. 그리고 아노머 양성자(anomeric proton) δ_H 4.92 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)는 벤젠 C-4와 HMBC 상관관계를 보여 H-1'와 C-4의 에테르 결합을 재확인하였다. 따라서, 화합물 3은 가스트로딘-7-*O*-트랜스-카페오일 에스터로 확인되었다.

[0062] <실시예 3. 세포배양>

[0063] 인간 내피세포(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)는 Cambrex Bioscience사(Charles City, IA, USA)에서 구입하였다. 구입한 인간 내피세포를 10% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 EGM(endothelial cell growth medium, Cambrex Bioscience사) 배양액으로 배양하였다.

[0064] 단핵구세포(monocyte)인 THP-1 세포(human leukemic monocyte)(ATCC, Manassas, VA, USA)는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% HEPES, 1% 1-글루타민(glutamine) 및 50 μ g/ml의 세포타시메(cefotaxime)가 포함된 RPMI-1640 배양액으로 배양하였다.

[0065] <실시예 4. 세포 투과성 확인>

[0066] 3 μ m 구멍이 있는 12mm 트랜스웰 플레이트(transwell plate)의 상부 챔버에 인간 내피세포를 웰 당 5×10^4 개를 넣고 3일 동안 배양하였다. 내피세포가 한 층으로 딱 차면 LPS(lipopolysaccharide)를 100ng/ml이 되도록 처리하여 4시간 동안 배양한 후 각 화합물 0 내지 20 μ M을 6시간 동안 처리하였다. 이때 양성대조군으로 오리엔틴(orientin)을 화합물과 같은 농도로 처리하였다. 트랜스웰의 삽입물을 TBS(tris-buffered saline, pH7.4)로 세척하고, 트랜스웰의 하부 챔버에는 신선한 배양액을 넣고, 상부 챔버에는 4% BSA(bovine serum albumin)가 포함되어 있는 배양액에 0.67mg/ml 농도로 희석한 에반스 블루(Evans blue) 0.5ml를 넣어주었다. 10분 후에 650nm에서 하부 챔버의 광학 밀도를 측정하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0067] 도 2에서 보여주듯이, LPS에 의해 유도된 세포 투과성의 증가를 화합물 1 내지 3이 억제하는 것을 확인하였다. 화합물 3의 경우에는 화합물 1 및 2에 비해 억제 효과가 약하게 나타났다. 이러한 화합물들의 세포 투과성 억제 활성은 농도-의존적으로 나타나는 것을 알 수 있었다.

[0068] <실시예 5. 세포 유착성 확인>

[0069] 96웰 플레이트에 내피세포가 한 층으로 딱 차도록 배양하고, 여기에 LPS를 100ng/ml이 되도록 처리하여 4시간 동안 배양한 후 각 화합물 0 내지 20 μ M을 6시간 동안 처리하였다. 이때 양성대조군으로 오리엔틴을 화합물과 같은 농도로 처리하였다. 화합물들을 처리하는 동안 THP-1 세포에 형광 물질을 표지시키기 위해 5 μ M의 비브란트 디드(Vybrant DiD)와 5% FBS가 포함된 페놀 레드 미함유(phenol red-free) RPMI-1640 배지를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. TBS로 세척한 다음 2% FBS와 20mM HEPES가 포함된 RPMI-1640 배양액으로 1.5×10^6 /ml이 되도록 현탁한 후 인간 내피세포를 배양한 플레이트에 웰 당 200 μ l씩 넣어주고 형광 마이크로플레이트 리더(fluorescence microplate reader)를 이용하여 형광 표지된 세포의 총 형광 신호를 측정하였다. 총 형광 신호를 측정한 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하고 유착되지 않은 세포를 RPMI-1640 배지로 세척하여 제거한 다음 유착된 세포의 형광 신호를 측정하였다. 세포 유착 정도는 유착%=(유착세포 형광 신호/총 형광 신호) $\times$ 100 공식을 이용하여 분석하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0070] 도 3에서 보여주듯이, LPS만 처리한 경우에 세포의 유착이 증가한 것을 알 수 있었다. 여기에 오리엔틴, 화합물

1 및 2를 처리하면 농도-의존적으로 세포의 유착이 감소되었으며, 화합물 3의 세포 유착의 감소 효과가 약하게 나타나는 것을 알 수 있었다.

[0071] <실시예 6. 세포 이동성 확인>

[0072] 8 μ m 구멍이 있는 6.5mm 트랜스웰 플레이트(transwell plate)의 하부 챔버에 인간 내피세포를 웰 당 6×10^4 개를 넣고 3일 동안 배양하였다. 3일 후에 인간 내피세포에 LPS를 100ng/ml가 되도록 처리하여 16시간 동안 배양한 후 각 화합물을 0 내지 20 μ M의 농도로 6시간 동안 처리하였다. 이때 양성대조군으로 오리엔틴을 화합물과 같은 농도로 처리하였다. 플레이트의 상부 챔버에 THP-1 세포를 넣은 후 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소가 있는 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 상부 챔버의 세포를 흡입하고 필터 위쪽에 존재하는 이동하지 못한 세포를 면봉으로 제거하였다. 필터의 아래쪽에 존재하는 세포를 8% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)로 고정시키고 0.25% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색한 후 현미경을 이용해 이동한 세포수를 헤아려 이동 지수(migration indices)로 표기하였다.

[0073] 도 4에서는 세포의 이동 실험 결과를 보여주고 있다. 화합물 1 및 2는 농도-의존적으로 세포의 이동을 억제하는 반면에 화합물 3은 세포의 이동을 억제하지 못하였다.

[0074] <실시예 7. 독성실험>

[0075] 실시예 7-1. 급성독성

[0076] 본 발명의 화합물을 단기간에 과량을 섭취하였을 시 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 20마리를 대조군은 10마리, 실험군은 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 아무것도 투여하지 않았으며, 실험군은 본 발명의 남천 추출물 및 이로부터 분리한 화합물들을 2.0g/kg(일반적인 동물실험에서 사용되는 양의 50배 정도)의 농도로 경구 투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 2.0g/kg 농도의 본 발명의 남천 추출물 및 이로부터 분리한 화합물들을 투여한 실험군은 모두 생존하였다.

[0077] 실시예 7-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험

[0078] C57BL/6J 생쥐를 대상으로 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 발명의 남천 추출물 및 이로부터 분리한 화합물들을 투여한 실험군과 용매만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(Blood Urea Nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0079] <제제예 1. 약학적 제제>

[0080] 제제예 1-1. 정제의 제조

[0081] 본 발명의 4-포르밀페닐-6-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0082] 제제예 1-2. 주사제의 제조

[0083] 본 발명의 4-포르밀페닐-6-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0084] <제제예 2. 식품 제조>

[0085] 제제예 2-1. 조리용 양념의 제조

[0086] 본 발명의 4-포르밀페닐-6-O-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드를 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0087] 제제예 2-2. 밀가루 식품의 제조

[0088] 본 발명의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드를 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0089] 제제예 2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0090] 본 발명의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드를 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 스프 및 육즙을 제조하였다.

[0091] 제제예 2-4. 유제품(dairy products)의 제조

[0092] 본 발명의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드를 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0093] 제제예 2-5. 야채주스 제조

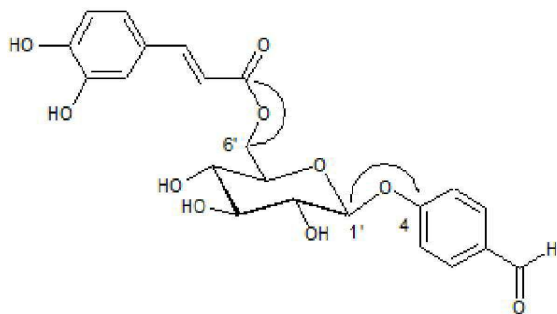
[0094] 본 발명의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드 0.5g을 토마토주스 또는 당근주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0095] 제제예 2-6. 과일주스 제조

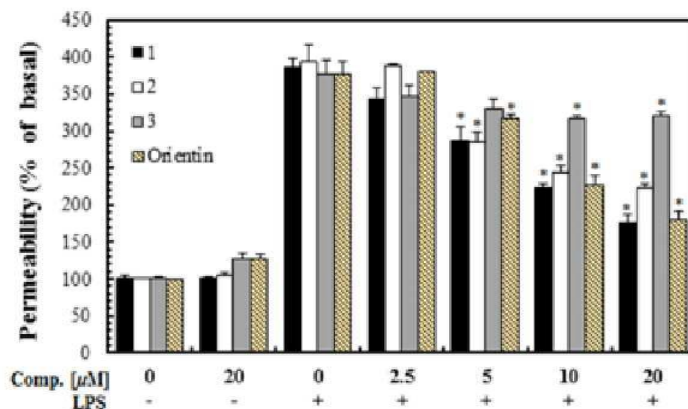
[0096] 본 발명의 4-포르밀페닐-6-*O*-[3-(3,4)-디히드로시페닐]프로펜오일]- β -D-글루코피라노사이드 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

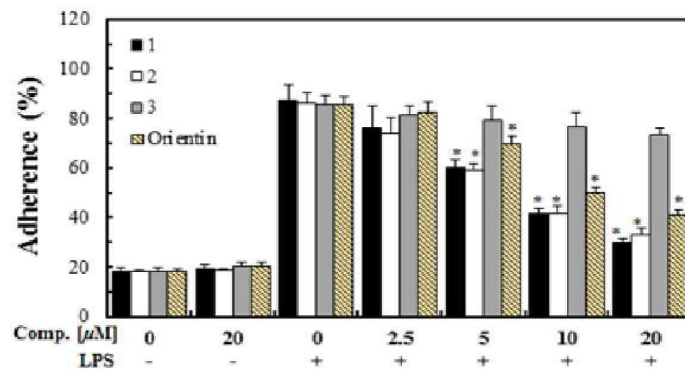
도면1



도면2



도면3



도면4

