



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 36/748 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0070308

(43) 공개일자 2007년07월04일

(21) 출원번호 10-2005-0079888

(22) 출원일자 2005년08월30일

심사청구일자 2006년04월26일

(71) 출원인 경희대학교 산학협력단  
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내

(72) 발명자 김동현  
경기도 용인시 기흥읍 서천리1 경희대학교 식물대사연구센터  
오영준  
경기도 용인시 기흥읍 서천리1 경희대학교 한방재료가공학과  
백남인  
경기도 용인시 기흥읍 서천리1 경희대학교 생명공학원  
정태숙  
대전시 유성구 어은동 52, 한국생명공학연구원 지질대사연구  
김민정  
대전시 유성구 어은동 52, 한국생명공학연구원 지질대사연구  
김성훈  
경기도 용인시 기흥읍 서천리1 경희대학교 동서의학대학원  
이효정  
경기도 용인시 기흥읍 서천리1 경희대학교 동서의학대학원

(74) 대리인 김석현  
이희숙

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 이리도이드 배당체를 함유하는 항산화제 및 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 이리도이드 배당체(iridoid glycoside)를 함유하는 항산화제 및 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 백화사설초 유래 이리도이드 배당체를 함유하는 항산화제 및 심장순환계 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 이리도이드 배당체는 LDL의 산화를 효과적으로 억제하는 효과가 있다.

대표도

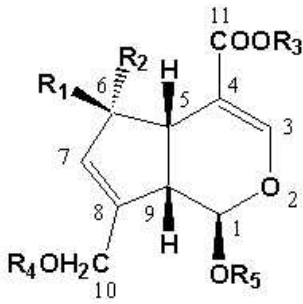
도 1

## 특허청구의 범위

### 청구항 1.

하기 화학식 1로 표시되는 이리도이드 배당체(irdoid glycoside)를 유효성분으로 함유하는 항산화제.

<화학식 1>

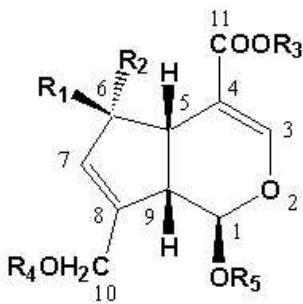


상기에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소, 히드록시 또는 비치환되거나 히드록시로 치환된 C1-C5 알킬이고; R<sub>3</sub>는 수소 또는 메틸이고; R<sub>4</sub>는 수소, 비치환되거나 카르복실산으로 치환된 C1-C5 알킬, 비치환되거나 카르복실산으로 치환된 페닐 또는 비치환되거나 카르복실산으로 치환된 벤질이고; 및 R<sub>5</sub>는 Glc 또는 Glc-Ara이다.

### 청구항 2.

하기 화학식 1로 표시되는 이리도이드 배당체를 유효성분으로 함유하는 심장순환계 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

<화학식 1>



상기에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소, 히드록시 또는 비치환되거나 히드록시로 치환된 C1-C5 알킬이고; R<sub>3</sub>는 수소 또는 메틸이고; R<sub>4</sub>는 수소, 비치환되거나 카르복실산으로 치환된 C1-C5 알킬, 비치환되거나 카르복실산으로 치환된 페닐 또는 비치환되거나 카르복실산으로 치환된 벤질이고; 및 R<sub>5</sub>는 Glc 또는 Glc-Ara이다.

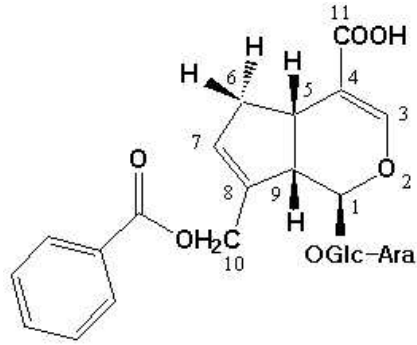
### 청구항 3.

제2항에 있어서, 상기 심장순환계 질환은 고지혈증, 관상동맥 심장병, 동맥경화, 죽상경화 및 심근경색증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 4.

하기 화학식 2로 표시되는 이리도이드 배당체.

<화학식 2>



#### 청구항 5.

- (a) 백화사설초(*Oldenlandia diffusa* Roxb.)를 C1-C5의 유기용매로 추출하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계에서 얻은 추출물을 물, 에탄올 및 n-부탄올로 분획화하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계에서 얻은 n-부탄올 분획을 크로마토그래피로 분리 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제4항의 이리도이드 배당체의 제조 방법.

#### 청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 (a)의 유기용매는 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane), 시클로헥산(cyclohexane) 및 석유에테르(petroleum ether)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

#### 청구항 7.

제5항에 있어서, 상기 (c) 단계는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 2회 연속 수행하거나 또는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피와 옥타데실(octadecyl) 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 병행하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

#### 청구항 8.

제5항 또는 제7항에 있어서, 상기 (c) 단계의 크로마토그래피는 클로로포름, 메탄올 및 물로 이루어진 군에서 선택되는 2개 이상의 혼합 용매를 용리액으로 사용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

## 발명의 목적

### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 이리도이드 배당체(iridoid glycoside)를 함유하는 항산화제 및 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 백화사설초 유래 이리도이드 배당체를 함유하는 항산화제 및 심장순환계 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.

저밀도 지질 단백질(low-density lipoprotein, 이하 'LDL'이라 함)은 콜레스테롤 에스테르의 형태로 콜레스테롤을 운반하는 중요한 운반체이다. LDL은 모세관 내피 세포들 사이의 접합점을 통과하여 아포(apo) B-100 단백질을 인식하는 세포막의 LDL 수용체에 결합한다. LDL 수용체와 결합한 후, LDL은 세포 내로 들어오게 되고, 리소좀 분해(lysosomal degradation)를 통해 유리 콜레스테롤로 된다. 유리 콜레스테롤은 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(acyl-CoA:cholesterol acyltransferase; ACAT)의 자극을 받아 콜레스테롤 에스테르로 에스테르화된다. LDL 수용체는 세포 내 콜레스테롤이 증가하면 감소하는 방향으로 조절된다. 이와 같이 정상적인 천연 LDL은 세포 내에서 콜레스테롤의 합성을 조절하는 역할을 하는데, 이것이 산화 변형되어 산화된 LDL(oxidized LDL, 이하 'Ox-LDL'이라 함)로 되면, 고지혈증, 관상동맥 심장병, 동맥경화, 죽상경화 및 심근색색증 등과 같은 심장순환계 질환을 초래한다(Steinberg, D. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 320:915-924, 1989). 처음 LDL이 산화되는 동안 최소한으로 변형된 LDL(minimally modified low density lipoprotein, 이하 'MM-LDL'이라 함)은 내피하강(subendothelial space)을 형성한다. MM-LDL은 내피에 점착하여 단핵구 화학주성 단백질(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)과 대식세포-콜로니 자극인자(macrophage-colony stimulation factor, M-CSF)의 분비를 유도한다. 상기 M-CSF-1은 조직 대식세포의 증식을 촉진시키고, 대식세포는 MM-LDL을 더욱 산화시켜 Ox-LDL은 더 이상 LDL 수용체에 인식되지 못하고, 그 대신 단핵구(monocyte)-대식세포의 스캐빈저(scavenger) 수용체에 포착되어 세포 내의 콜레스테롤 함량을 조절하지 못하게 된다. 따라서 대식세포 내에 콜레스테롤이 축적되어 포말세포(foam cell)를 형성하게 된다. Ox-LDL은 단핵구에 대한 효과적인 화학 친화물질이며, 대식세포의 이동을 강하게 억제시켜 동맥벽에 대식세포가 오래 머물게 한다. Ox-LDL은 세포독성을 나타내며 내피의 기능이상을 촉진하고 지방 선조(fatty streak)를 형성하여 그 영역을 더 넓혀가고 동맥벽의 다른 유전자의 발현에 변화를 가져와 동맥경화를 촉진시킬 수도 있다.

일반적으로 LDL 산화는 항산화제로부터 격리된 마이크로도메인(microdomain)과 동맥의 맥관 내막(intima)에서 일어나는 것으로 믿어져 왔으며, 동맥경화에서 Ox-LDL의 역할에 대한 연구는 계속 이루어지고 있다. LDL은 단핵구-대식세포와 같은 평활근 세포(smooth muscle cell), 내피 세포(endothelial cell)와 같은 동맥벽의 주요 세포에서 철과 구리와 같은 전이금속에 의해 산화적으로 변형된다. LDL의 내부를 살펴보면,  $\alpha$ -토코페롤,  $\beta$ -카로틴과 같은 지방친화성(lipophilic) 항산화제와 인지질(phospholipid)이 콜레스테롤 에스테르 핵을 둘러싸고 있다. LDL을 구리 이온과 함께 반응시키면, 시험관 내(in vitro)에서나 세포 내에서 모두 LDL의 산화가 유도되며, 궁극적으로 LDL의 물리화학적 성질이 변하게 된다. 초기에는 지방친화성 항산화제가 LDL의 변형을 저해한다. 그러나 항산화제가 모두 소모된 후에는 인지질의 고도 불포화지방산(polyunsaturated fatty acid)이 산화된다. 초기 산화에서 상대적으로 아포 B-100 단백질은 고유의 성질을 유지하고, LDL는 최소한으로 변형된다. 그러나 반응이 계속 진행된다면, 산화된 지질 산물이 LDL 내에서 증가 및 축적되어 아포 B-100 단백질의 아미노산 잔기를 변형시켜 결국 LDL의 음전하가 증가되고, 단백질 구성 성분이 단편화된다. 이러한 아포 B-100 단백질의 산화적 변형은 LDL 수용체와의 결합을 막고, 스캐빈저 아세틸-LDL 수용체와 상호 작용하는 새로운 결합 에피토프(binding epitope)를 생성한다. 또한 LDL의 지질 코어에서 콜레스테롤 에스테르로부터 옥시스테롤(oxysterols)을 생성하게 할 뿐 아니라 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC)을 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine, lyso PC)으로 전환시켜 세포 독성을 나타낸다.

LDL 내의 항산화제 함량은 LDL의 산화 억제에 중요하다. LDL 내에 지방친화성 항산화제가 충분히 존재한다면 LDL은 산화 공격으로부터 보호될 수 있다. 프로옥시던트(prooxidant)의 공격과 항산화제 함량 사이의 균형은 동맥벽 내에 존재하는 변형된 LDL의 함량에 의해 결정된다. 프로부콜(probucol)이나 N, N'-디페닐렌디아민, BHT와 같은 항산화제는 LDL의 산화정도를 약화시키고 죽종형성 영역을 감소시키나, 부작용이 따른다. 따라서  $\alpha$ -토코페롤과  $\beta$ -카로틴, 아스코르빈산과 같은 천연 항산화제가 관심을 끌게 되었다. 특히, 유기합성 항산화제와 비교하여 "GRAS(generally recognized as safe)"로 평가되는 천연 항산화제의 장점 때문에 최근 들어 유럽 및 미주 지역에서 천연물 유래 항산화제에 대한 중요성이 크게 부각되고 있다.

한편, 백화사설초(*Oldenlandia diffusa* Roxb.)(Rubiaceae)는 인도와 중국에서 자라는 일반적인 약용 식물이다(Ho *et al.*, *Phytochemistry*, 25:1988-1989, 1986). 상기 식물의 지상부(aerial part)는 항균활성이 있어서 암과 충수염(appendicitis), 요도염(urethritis), 기관지염(bronchitis)과 같은 염증의 치료에 사용되어져 왔다(Kim, *Korean J.*

*Medicinal Crop Sci.*, 3:91-95, 1995; Jung *et al.*, In 'Hyang Yak Dae Sa Jun'. Young Lim Sa(3rd Ed.), Seoul, Korea, 1990). 백화사설초의 화학 성분들은 많은 연구자들에 의하여 연구되어 왔다. 예컨대, 안쓰라퀴논(anthraquinone) 이외에 아스페룰로시드, 페레토시드, 아스페룰로시드산(asperulosidic acid), 게니포시드산(geniposidic acid), 스칸도시드 등과 같은 이리도이드 배당체들이 백화사설초로부터 분리된 바 있다(Ho *et al.*, *Phytochemistry*, 25:1988-1989, 1986). 그러나 백화사설초 유래 이리도이드 배당체의 LDL-산화 억제 효과에 대해서는 지금까지 전혀 보고된 바 없다.

이에 본 발명자들은 LDL 산화 억제 효과를 갖는 천연 항산화제를 개발하기 위하여 연구를 거듭하던 중, 백화사설초로부터 LDL 산화 억제 효과를 갖는 이리도이드 배당체를 분리·정제함으로써 본 발명을 완성하였다.

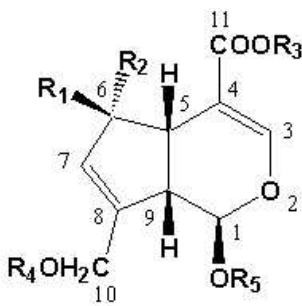
### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명의 목적은 LDL 산화 억제 효과를 갖는 백화사설초 유래 이리도이드 배당체 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

### 발명의 구성

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이리도이드 배당체를 유효성분으로 함유하는 항산화제를 제공한다.

#### <화학식 1>

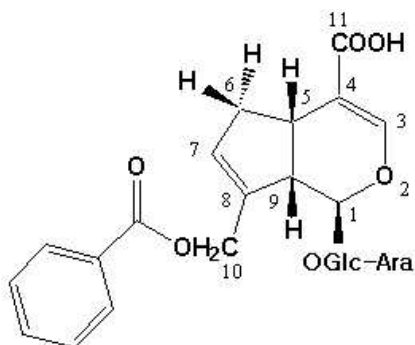


상기에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소, 히드록시 또는 비치환되거나 히드록시로 치환된 C1-C5 알킬이고; R<sub>3</sub>는 수소 또는 메틸이고; R<sub>4</sub>는 수소, 비치환되거나 카르복실산으로 치환된 C1-C5 알킬, 비치환되거나 카르복실산으로 치환된 페닐 또는 비치환되거나 카르복실산으로 치환된 벤질이고; 및 R<sub>5</sub>는 Glc 또는 Glc-Ara이다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이리도이드 배당체를 유효성분으로 함유하는 심장순환계 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 화학식 1에서 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>3</sub>이 H이고, R<sub>4</sub>가 벤조일이고, R<sub>5</sub>가 Glc-Ara인 이리도이드 배당체를 제공한다. 상기 이리도이드 배당체는 하기 화학식 2로 표시될 수 있다.

#### <화학식 2>



나아가, 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 화학식 2로 표시되는 이리도이드 배당체의 제조방법을 제공한다.

본 발명에 따른 화학식에 있어서, Glc는 D-글루코스(Glucose)이고, Ara는 L-아라비노스(L-Arabinose)를 말하는 것이며 이는 당업자에게 자명하다.

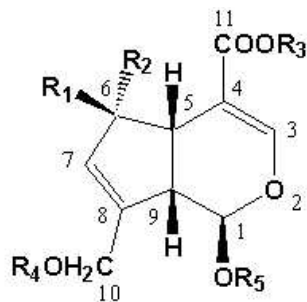
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 백화사설초로부터 분리된 이리도이드 배당체 및 이의 신규한 용도를 제공한다는 점에 특징이 있다.

본 발명자들은 백화사설초로부터 LDL의 산화를 억제하는 활성을 갖는 이리도이드 배당체를 분리·정제하였다. 백화사설초 유래의 이리도이드 배당체가 LDL 산화를 억제하는 항산화효과를 나타낸다는 것은 본 발명에 의해 처음으로 보고되는 것이다.

본 발명의 이리도이드 배당체는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

<화학식 1>



상기 화학식 1에 있어서, 바람직한 이리도이드 배당체는 하기 표 1에 기재된 바와 같은 치환기를 갖는 7개의 화합물일 수 있다(실시예 <2-1> 내지 <2-7> 참조).

**[표 1]**

| 번호 | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> |
|----|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| 1  | H              | H              | H               | H              | Glc            |
| 2  | OH             | H              | H               | H              | Glc            |
| 3  | OH             | H              | CH <sub>3</sub> | H              | Glc            |
| 4  | OH             | H              | CH <sub>3</sub> | 벤조일(benzoyl)   | Glc            |
| 5  | H              | H              | H               | 벤조일            | Glc-Ara        |
| 6  | H              | OH             | H               | Ac             | Glc            |

|   |   |    |   |   |     |
|---|---|----|---|---|-----|
| 7 | H | OH | H | H | Glc |
|---|---|----|---|---|-----|

본 발명의 이리도이드 배당체 중에서 상기 화학식 1에서  $R_1$  내지  $R_3$ 이 H이고,  $R_4$ 가 벤조일이고,  $R_5$ 가 Glc-Ara인 화합물 5(올텐란도시드 III)는 신규 화합물이다(실시에 <2-5> 참조).

본 발명의 이리도이드 배당체는 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

본 발명의 이리도이드 배당체는 종래의 물질을 추출하고 분리하는 방법을 이용하여 식물 또는 식물의 일부로부터 수득될 수 있다. 줄기, 뿌리 또는 잎은 목적하는 추출물을 획득하기 위하여 적절히 탈수하여 침연(macerated)하거나 단지 탈수하여 적절한 유기용매로 추출하고, 목적하는 추출물은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 알려진 정제 방법을 이용하여 정제된다. 또한 상기 화학식 1로 표시되는 이리도이드 배당체에 상응하는 합성 화합물 또는 이들의 유도체는 당업계에 공지된 통상적인 합성 방법을 이용하여 화학적으로 제조될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 이리도이드 배당체는 백화사설초, 보다 바람직하게는 이의 지상부로부터 분리·정제될 수 있다.

본 발명의 이리도이드 배당체의 분리를 위한 추출 용매로는 C1-C5의 유기용매를 사용할 수 있다. 바람직하게는 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane), 시클로헥산(cyclohexane), 석유에테르(petroleum ether) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 보다 바람직하게는 메탄올과 부탄올을 연속 사용할 수 있다. 백화사설초 추출물로부터 본 발명의 이리도이드 배당체의 분리·정제는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina)등의 각종 합성수지를 충전한 컬럼 크로마토그래피(column chromatography) 및 고속액체크로마토그래피(HPLC) 등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 실리카겔을 이용한 반복 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 보다 바람직하게는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 2회 연속 수행하거나, 또는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피와 옥타데실(octadecyl) 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 병행하여 사용할 수 있다. 그러나 유효성분의 추출 및 분리정제 방법은 반드시 상기한 방법에 한정되는 것은 아니다.

이와 같이 본 발명의 이리도이드 배당체는 순수하게 분리·정제된 화합물의 형태로 사용될 수 있으며, 또한 이를 함유하는 추출물, 이의 부분 정제된 형태로도 사용될 수 있다. 예컨대, 추출물은 상기 기재한 바와 같은 백화사설초의 지상부를 C1-C5의 유기용매로 추출하여 얻을 수 있다. 바람직하게는 백화사설초의 지상부를 메탄올로 반복 추출한 후, 다시 n-부탄올로 추출하여 얻을 수 있으며, 또한 상기 추출물을 크로마토그래피로 부분 정제하여 사용할 수도 있다.

혈관벽 내의 LDL이 산화되어 대식세포 내로 들어가게 되면 포말세포(foam cell)를 형성하게 되고, 그 결과 혈관이 생성되어 동맥경화가 초래된다. 또한 LDL의 산화는 심장 질환을 초래하는 죽상경화의 진행을 촉진한다. 이외에도 LDL의 산화는 고지혈증, 심근경색증 등과 같은 다른 심장순환계 질환 등의 발병을 초래한다. 본 발명의 이리도이드 배당체는 이와 같이 동맥경화, 죽상경화 등 상기 기재한 질환을 유발하는 LDL의 산화를 효과적으로 억제한다(표 2 참조).

따라서 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이리도이드 배당체를 유효성분으로 함유하는 항산화제 및 심장순환계 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 항산화제 및 약학적 조성물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 일반적인 의약품의 형태로 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 이리도이드 배당체에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 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, 연고제, 크림제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

또한, 본 발명의 항산화제 및 약학적 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 이리도이드 배당체를 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제화한다. 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배로, 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

본 발명의 화학식 1로 표시되는 이리도이드 배당체의 유효용량은 1회 복용량이  $0.1 \mu\text{g/kg/day} \sim 10 \text{ mg/kg/day}$ 이며, 하루 1 - 3 회 투여될 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물이 적용될 수 있는 질환은 심장순환계 질환일 수 있다. 상기 심장순환계 질환은 LDL 산화에 의해 유발되는 것일 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 고지혈증, 관상동맥 심장병, 동맥경화, 죽상경화 및 심근경색증 등을 포함한다(Steinberg, D. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 320:915-924, 1989). 또한 본 발명의 약학적 조성물은 상기 심장순환계 질환 이외에 LDL 산화에 의해 유발되는 다른 질환에도 적용될 수 있다.

본 발명의 이리도이드 배당체는 상기 질환의 예방/개선을 목적으로 식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 이리도이드 배당체를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 화합물 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 개선, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 화합물은 원료에 대하여 0.01-10중량%, 바람직하게는 0.05-1중량%로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.

상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 예컨대, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디, 스낵, 과자, 피자, 라면을 비롯한 면류, 껌, 유제품(치즈, 요구르트, 아이스크림 등), 소스, 조리용 양념, 스프, 음료, 차, 드링크제, 알콜 음료, 생식, 전식 및 비타민 복합제 등이 모두 포함된다.

나아가 본 발명은 상기 화학식 1에서  $R_1$  내지  $R_3$ 이 H이고,  $R_4$ 가 벤조일이고,  $R_5$ 가 Glc-Ara인 이리도이드 배당체(화학식 2)를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다:

- (a) 백화사설초를 C1-C5의 유기용매로 추출하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계에서 얻은 추출물을 물, 에탄올 및 n-부탄올로 분획화하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계에서 얻은 n-부탄올 분획을 크로마토그래피로 분리·정제하는 단계.

상기 (a) 단계의 백화사설초는 이의 지상부를 건조하여 분말화한 것을 사용하는 것이 바람직하다. 또한 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 상기 C1-C5의 유기용매는 위에서 기재한 바와 같으며, 바람직하게는 메탄올을 사용할 수 있다. 상기 추출은 1-5회, 바람직하게는 3회 반복 하는 것이 바람직하다.

상기 (b) 단계는 상기 메탄올 추출물을 에틸아세테이트(EtOAc)와 물의 혼합액으로 분배추출한 후, 상기 물층을 다시 n-부탄올과 물의 혼합액으로 분배 추출하여 수행할 수 있다. 최종적으로 얻은 n-부탄올 추출물은 감압농축될 수 있다.

상기 (c) 단계는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 2회 연속 수행하거나 또는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피와 옥타데실(octadecyl) 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 병행하여 수행할 수 있다. 크로마토그래피 수행시 용리액으로는 클로로포름, 메탄올 및 물로 이루어진 군에서 선택되는 2개 이상의 혼합 용매를 사용할 수 있다. 바람직하게는 메탄올과 물의 혼합 용매 또는 클로로포름, 메탄올 및 물의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 상기 용매의 혼합 비율은 당업자가 적절하게 조절할 수 있다.



이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## <실시예 1>

### 백화사설초로부터 이리도이드 배당체의 추출 및 분리

본 발명에 사용된 백화사설초(*Oldenlandia diffusa* Roxb.)는 2003년 대한민국 서울의 동양 약제 시장에서 구입하였으며, 증명 표본(voucher specimen, KHU 03128)은 대한민국 수원 경희대학교 천연물화학 실험실에서 보존하였다. 건조 분말화된 백화사설초의 지상부(2.9 kg)에 80% 메탄올(20 ℓ×3)을 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 얻어진 여액을 45 °C에서 감압농축하고, 이 농축물을 물(2 ℓ)과 에틸 아세테이트(EtOAc, 2 ℓ×3)로 분배 추출하였다. 이후, 물층은 다시 *n*-부탄올(*n*-BuOH, 2 ℓ×3)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압농축하여 에틸아세테이트 분획(51 g), *n*-부탄올 분획(86 g) 및 물분획(296 g)을 각각 얻었다.

각 분획 중 TLC(thin layer chromatography) 상에서 UV 흡수 특성과 10% 수성 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 담근 후, 건조 가열한 발색반응에 의하여 활성물질이 함유되어 있을 것으로 추정되는 *n*-부탄올 추출물 분획에 대하여 실리카겔 상에서 반복 크로마토그래피(repetitive chromatography)를 수행하였다. 이때 용리액으로는 클로로포름과 메탄올의 혼합 용매(이하, 'CHCl<sub>3</sub>-MeOH'라 함)를 사용하였으며, 클로로포름과 메탄올의 비율은 10:1→7:1→5:1→3:1로 하여 점차 극성을 높여갔다. 크로마토그래피로 정제한 결과, 24개의 분획(ODB1 내지 ODB24)을 얻었다. 24개의 분획 중에서 이리도이드 배당체가 함유되어 있을 것으로 추정되는 일부 분획들을 대상으로 하기 실시예 <1-1> 내지 <1-7>에 기재한 바와 같이 크로마토그래피를 더욱 수행하였다.

#### <1-1> 화합물 1의 분리·정제

다량의 이리도이드를 함유하는 ODB15(5 g)를 대상으로 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(5:1)를 용리액으로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 그 결과, 11개의 분획(ODB15-1 내지 ODB15-11)을 얻었다. 11개의 분획 중에서 ODB15-2(287 mg)를 대상으로 다시 NH<sub>2</sub>-실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 이때 용리액으로 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(7:1)를 사용하였다. 그 결과, 최종적으로 화합물 1(41 mg)을 수득하였다.

#### <1-2> 화합물 2의 분리·정제

ODB22(3.5 g)를 대상으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 이 때 용리액으로는 클로로포름, 메탄올 및 물이 혼합된 용매(이하, 'CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O'라 함)를 사용하였으며, 혼합 비율은 클로로포름:메탄올:물= 6:4:1이었다. 그 결과, 화합물 2(57 mg)를 수득하였다.

#### <1-3> 화합물 3의 분리·정제

상기 실시예 <1-1>에서 얻은 ODB15-4(163 mg)를 대상으로 MeOH-H<sub>2</sub>O(1:10)를 이용하여 옥타데실(octadecyl) 실리카겔(ODS) 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 그 결과, 6개의 분획(ODB15-4-1 내지 ODB15-4-6)을 얻었다. 6개의 분획 중 ODB15-4-3(41 mg)을 대상으로 다시 MeOH-H<sub>2</sub>O(1:5)를 이용하여 ODS 컬럼 크로마토그래피로 다시 정제하였다. 그 결과, 화합물 3(20 mg)을 수득하였다.

#### <1-4> 화합물 4의 분리·정제

ODB11(44 mg)을 대상으로 NH<sub>2</sub>-실리카겔 크로마토그래피를 수행하였다. 이때 용리액으로는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(1:1)를 사용하였다. 그 결과, 화합물 4(98 mg)를 수득하였다.

#### <1-5> 화합물 5의 분리·정제

ODB16(1.7 g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 적용하여  $\text{CHCl}_3$ -MeOH(3:1)로 용출한 결과, 9개의 분획(ODB16-1 내지 ODB16-9)을 수득하였다. 그 중에서 ODB16-8(171 mg)을 대상으로 다시 MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ (1:2)를 이용하여 ODS 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 6개의 분획(ODB16-8-1 내지 ODB16-8-6)을 수득하였다. 최종적으로 화합물 5(35 mg)를 수득하였다.

#### <1-6> 화합물 6의 분리·정제

상기 실시예 <1-5>에서 얻은 ODB16-8-1(90 mg)를 대상으로  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ (7:3:1)를 용리액으로 이용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 그 결과, 화합물 6(30 mg)을 수득하였다.

#### <1-7> 화합물 7의 분리·정제

ODB19(3.1 g)를 용리액으로서  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ (7:3:1→6:4:1)를 이용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 그 결과, 화합물 7(50 mg)을 수득하였다.

#### <실시예 2>

##### 백화사설초로부터 분리·정제된 이리도이드 배당체의 분석

상기 실시예 1에서 분리·정제된 7개의 이리도이드 배당체에 대하여 다음과 같은 방법으로 융점(melting point), 광 회전(optical rotation), GC(gas chromatography), IR 스펙트럼 및 NMR 분석을 수행하였다. 먼저, 융점(melting point)은 피셔-존 장치(Fisher-John apparatus) 및 언코르(uncorr) 상에서 결정하였다. 광 회전은 JASCO P-1010 디지털 편광계 상에서 조사하였다. GC는 GC-14B 및 FABMS로 수행하였으며, JEOL JMSAX 505-MA로 기록하였다. IR 스펙트럼은 퍼킨 엘머 스펙트럼 원 FT-IR 스펙트로미터로 수행하였다.  $^1\text{H}$  NMR(400 MHz)와  $^{13}\text{C}$ (100 MHz) 스펙트럼은 버라이언 유니티 이노바 AS 400 FT-NMR 스펙트로미터로 수행하였다. 상기 분석 방법들에 사용되는  $\text{CuSO}_4$ , EDTA, TCA

(trichloroacetic acid), TBA(thiobarbituric acid) 및 MDA(malondialdehyde bis(dimethyl acetal))과 같은 모든 시약 등급 화학물질들은 Sigma-Aldrich Korea Ltd.에서 구입하였다. 분석 결과는 하기 <2-1> 내지 <2-7>과 같다.

#### <2-1> 화합물 1의 분석 결과

화합물 1을 분석한 결과는 다음과 같다.

- 무정형 분말(Amorphous powder) (MeOH)

-  $[\alpha]_D + 19.3^\circ$  (MeOH;  $c$ 0.6)

- UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  nm(log  $\epsilon$ ): 237 (3.64)

- IR (Films)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3500, 1680, 1630

-  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 400 MHz): 87.69 (1H, s, H-3), 5.94 (1H, br s, H-7), 5.67 (1H, d,  $J$ = 7.1 Hz, H-1), 5.39 (1H, d,  $J$ = 8.0 Hz, H-1'), 4.77 (1H, d,  $J$ = 15.2 Hz, H-10a), 4.51 (1H, d,  $J$ = 15.2, H-10b), 3.32 (1H, ddd,  $J$ = 16.0, 7.4, 1.2 Hz, H-5), 3.01 (1H, dd,  $J$ = 7.4, 7.1 Hz, H-9), 2.87 (1H, br dd,  $J$ = 16.0, 8.4 Hz, H-6a), 2.16 (1H, m, H-6b)

- pos. FABMS  $m/z$ : 375  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , HR-FABMS  $m/z$  375.1297 (Calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$ , 375.1291)

분석 결과, 화합물 1은 게니포시드산(Geniposidic acid)(IUPAC 명: 1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,5,6,9-tetrahydro-8-(hydroxymethyl)-cyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid)인 것으로 판명되었다(Takeda *et al.*, *Phytochemistry*, 14:2647-2650, 1975; El- Nagggar *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 43:649-707, 1980).

## <2-2> 화합물 2의 분석 결과

화합물 2를 분석한 결과는 다음과 같다.

- 흰색 분말(White powder)(MeOH)

- 융점 139-143 °C

-  $[\alpha]_D -53.3^\circ$  (H<sub>2</sub>O, c0.6)

- UV(MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm(log ε): 235 (4.16)

- IR (Films)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3350, 1680, 1635

- <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz): δ 7.31 (1H, s, H-3), 5.79 (1H, br s, H-7), 4.82 (1H, *d*, *J* = 7.2 Hz, H-1), 4.58 (1H, *d*, *J* = 7.6 Hz, H-1'), 4.51 (1H, m, H-6), 4.33 (1H, *d*, *J* = 15.6, H-10a), 4.14 (1H, *d*, *J* = 15.6 Hz, H-10b), 2.87 (1H, *dd*, *J* = 7.5, 7.2 Hz, H-9), 2.77 (1H, *dd*, *J* = 7.5, 7.5 Hz, H-5)

- pos. FABMS *m/z*: 391 [M+ H]<sup>+</sup>, HR-FABMS *m/z* 391.1243 (Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>11</sub>, 391.1240).

분석 결과, 화합물 2는 스칸도시드(scandoside)(IUPAC 명: 1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,5,6,9-tetrahydro-6-hydroxy-8(hydroxymethyl)cyclopenta [c]pyran-4-carboxylic acid)인 것으로 판명되었다(El- Nagggar *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 43:649-707, 1980).

## <2-3> 화합물 3의 분석 결과

화합물 3를 분석한 결과는 다음과 같다.

- 무정형 분말 (MeOH)

-  $[\alpha]_D -34.8^\circ$  (MeOH, c0.2)

- UV(MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm(log ε): 238 (3.89)

- IR (Films)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3450, 1695, 1635

- <sup>1</sup>H NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 400 MHz): δ 7.68 (1H, s, H-3), 6.31 (1H, br s, H-7), 5.80 (1H, *d*, *J* = 5.8 Hz, H-1), 5.38 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H-1'), 4.92 (1H, br s, H-6), 4.78 (1H, *d*, *J* = 15.6, H-10a), 4.48 (1H, *d*, *J* = 15.6 Hz, H-10b), 3.48 (1H, *dd*, *J* = 7.2, 5.8 Hz, H-9), 3.44 (1H, *dd*, *J* = 7.2, 4.0 Hz, H-5)

- pos. FAB-MS *m/z*: 427 [M+ Na]<sup>+</sup>, HR-FABMS *m/z* 427.1221 (Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>Na, 427.1216).

분석 결과, 화합물 3은 페레토시드(feretoside)(IUPAC 명: 1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,5,6,9-tetrahydro-6-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-cyclopenta [c]pyran-4-carboxylic acid methyl ester)인 것으로 판명되었다(Inouye *et al.*, *Phytochemistry*, 13:2219-2224, 1974; El- Naggar *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 43:649-707, 1980; Otsuka *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 39:2049-2052, 1991).

#### <2-4> 화합물 4의 분석 결과

화합물 4를 분석한 결과는 다음과 같다.

- 무정형 분말 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH)

- [α]<sub>D</sub> -22.5°(MeOH, c1.0)

- UV(MeOH) λ<sub>max</sub> nm(log ε): 213 (3.60)

- IR (Films) ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3375, 2875, 1705, 1630

- <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.97 (1H x 2, *d*, *J* = 7.8 Hz, H-2', 6'), 7.49 (1H, *dd*, *J* = 7.6, 7.6 Hz, H-4'), 7.43 (1H, *s*, H-3), 7.36 (1H x 2, *dd*, *J* = 7.8, 7.6 Hz, H-3', 5'), 5.80 (1H, *br s*, H-7), 5.40 (1H, *d*, *J* = 15.4 Hz, H-10a), 4.70 (1H, *d*, *J* = 7.6 Hz, H-1''), 4.67 (1H, *d*, *J* = 8.2 Hz, H-1), 4.60 (1H, *d*, *J* = 15.4 Hz, H-10b), 4.50 (1H, *br s*, H-6), 3.69 (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>), 2.88 (1H, *d*, *J* = 6.8 Hz, H-5), 2.83 (1H, *dd*, *J* = 8.2, 6.8 Hz, H-9)

- pos. FABMS *m/z*: 531 [M+ Na]<sup>+</sup>, HR-FABMS *m/z* 531.1483 (Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>12</sub>Na, 531.1478).

분석 결과, 화합물 4는 10-*O*-벤조일스칸도시드 메틸 에스터(10-*O*-benzoylscandoside methyl ester)(IUPAC 명: 8-[(benzoyloxy)methyl]-1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,5,6,9-tetrahydro-6-hydroxy-cyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid methyl ester)인 것으로 판명되었다(Otsuka *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 39:2049-2052, 1991). 10-*O*-벤조일스칸도시드 메틸 에스터가 백화사설초로부터 분리된 것은 본 발명에서 처음이다.

#### <2-5> 화합물 5의 분석 결과

화합물 5를 분석한 결과는 다음과 같다.

- 무정형 분말 (MeOH-H<sub>2</sub>O)

- [α]<sub>D</sub> + 7.7°(MeOH-DMSO, c0.6)

- UV(MeOH) λ<sub>max</sub> nm(log ε): 228 (3.15), 204 (3.11)

- IR (Films) ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3369, 2919, 1716, 1643, 1548

- <sup>1</sup>H NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 400 MHz): δ 8.20 (1H x 2, *d*, *J* = 7.6 Hz, H-2', 6'), 7.88 (1H, *s*, H-3), 7.70 (1H, *dd*, *J* = 7.4, 7.4 Hz, H-4'), 7.58 (1H x 2, *dd*, *J* = 7.6, 7.4 Hz, H-3', 5'), 6.04 (1H, *br s*, H-7), 5.52 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, H-1), 5.36 (1H, *d*, *J* = 15.8 Hz, H-10a), 5.32 (1H, *d*, *J* = 15.8 Hz, H-10b), 5.23 (1H, *d*, *J* = 7.6 Hz, H-1''), 4.84 (1H, *d*, *J* = 6.8, H-1'''), 3.61 (1H, *br dd*, *J* = 15.0, 7.2 Hz, H-5), 3.24 (1H, *dd*, *J* = 15.0, 8.0, H-6a), 2.94 (1H, *dd*, *J* = 7.8, 7.2 Hz, H-9), 2.53 (1H, *m*, H-6b)

-  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 100 MHz):  $\delta$  175.2 (C-11), 166.8 (C-7'), 148.9 (C-3), 138.8 (C-8), 133.6 (C-4'), 131.2 (C-7), 130.7 (C-1'), 129.9 (C-2', 6'), 129.0 (C-3', 5'), 118.3 (C-4), 105.0 (C-1'''), 100.5 (C-1''), 97.7 (C-1), 77.7 (C-5''), 77.3 (C-3''), 74.5 (C-2''), 73.9 (C-3'''), 72.0 (C-2'''), 71.5 (C-4''), 69.4 (C-6''), 69.0 (C-4'''), 66.4 (C-5'''), 63.9 (C-10), 47.2 (C-9), 40.0 (C-6), 37.4 (C-5)

- pos. FABMS  $m/z$ : 611 $[\text{M} + \text{H}]^+$ , HR-FABMS  $m/z$  611.1980 (Calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{O}_{15}$ , 611.1976).

화합물 5의 분석 결과를 보다 구체적으로 살펴보면, 무정형 분말인 화합물 5는 IR 스펙트럼에서 히드록시( $3369\text{ cm}^{-1}$ ), 카르보닐기( $1716\text{ cm}^{-1}$ ) 및 올레핀( $1643\text{ cm}^{-1}$ ) 으로 인한 흡수 밴드(absorbance bands) 및 양성 FABMS 스펙트럼의  $m/z$  611에서 분자적 이온 피크  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 를 보였다. 이것은 카르복실산에 연결된 메톡시 기와 수산화된 메틴 그룹(hydroxylated methine group)이 존재하지 않으며 메틸렌 그룹( $\delta_{\text{H}}$  3.24 ( $d$ ,  $J = 6.8\text{ Hz}$ ),  $\delta_{\text{H}}$  2.53 (m);  $\delta_{\text{C}}$  40.0)과  $\alpha$ -L-아라비노피라노즈(arabinopyranose)( $\delta_{\text{H}}$  4.84,  $d$ ,  $J = 6.8\text{ Hz}$ ;  $\delta_{\text{C}}$  105.0, 73.9, 72.0, 69.0)가 존재하는 것을 제외하고는 상기 화합물 4(10-*O*-벤조일스칸도시드 메틸 에스터)의 NMR 스펙트럼 특성과 유사한 것이다(Seo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 100:3331-3339, 1978; Otsuka *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 39:2049-2052, 1991).

또한 gHMBC 분석 결과, 메틸렌과 아리비노실 유닛의 위치가 각각 C-6 및 C-6''인 것으로 확인되었다. gHMBC 스펙트럼은 C-6( $\delta_{\text{C}}$  40.0)과 H-7( $\delta_{\text{H}}$  6.04)의 사이, C-6과 H-5( $\delta_{\text{H}}$  3.61)의 사이, 그리고 C-6''( $\delta_{\text{C}}$  69.4)과 H-1'''( $\delta_{\text{H}}$  4.84) 사이의 크로스 피크(cross peak)를 보여주었다. 또한 화합물 5의 아세틸화는 6개의 아세틸 그룹으로 인한 NMR 시그널을 보이는 헥사아세테이트를 생성하였다.

따라서 화합물 5(IUPAC 명: 8-[(benzoyloxy)methyl]-1-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (6''')- $\alpha$ -L-arabinopyranosyloxy]-1,5,6,9-tetrahydro-cyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid)는 신규 화합물로 규명되었으며, 이를 "올덴란도시드 III (oldenlandoside III)"라 명명하였다.

## <2-6> 화합물 6의 분석 결과

화합물 6을 분석한 결과는 다음과 같다.

- 무정형 분말 ( $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ )

-  $[\alpha]_{\text{D}} + 22.7^\circ$  ( $\text{MeOH}$ ,  $c 0.6$ )

- UV( $\text{MeOH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  nm(log  $\epsilon$ ): 201.5 (3.80), 239.1 (4.00)

- IR (Films)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3368, 2927, 1737, 1634, 1371

-  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  7.62 (1H, s, H-3), 6.01 (1H, br s, H-7), 5.05 (1H,  $d$ ,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , H-1), 4.93 (1H,  $d$ ,  $J = 15.4\text{ Hz}$ , H-10a), 4.82 (1H, br s, H-6), 4.80 (1H,  $d$ ,  $J = 15.4\text{ Hz}$ , H-10b), 4.72 (1H,  $d$ ,  $J = 7.6\text{ Hz}$ , H-1'), 3.01 (1H, br  $dd$ ,  $J = 8.0, 6.4\text{ Hz}$ , H-5), 2.62 (1H,  $dd$ ,  $J = 8.0, 8.0\text{ Hz}$ , H-9), 2.08 (3H, s, Ac-Me)

-  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz) : 172.4 (CO-AcO), 171.2 (C-11), 154.8 (C-3), 145.8 (C-8), 131.8 (C-7), 108.3 (C-4), 101.1 (C-1), 100.5 (C-1'), 78.5 (C-5'), 77.8 (C-3'), 75.4 (C-6), 74.9 (C-2'), 71.5 (C-4'), 63.8 (C-10), 62.9 (C-6'), 46.3 (C-9), 42.6 (C-5), 20.8 (Ac-Me)

- pos. FABMS  $m/z$ : 433 $[\text{M} + \text{H}]^+$ , HR-FABMS  $m/z$  433.1350 (Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$ , 433.1346).

분석 결과, 화합물 6은 아스페롤로시드산(asperulosidic acid)(IUPAC 명: 8-[(acetyloxy)methyl]-1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,5,6,9-tetrahydro-6-hydroxy-cyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid methyl ester)인 것으로 판명되었다(Kamiya *et al.*, Heterocycles, 56:537-544, 2002).

### <2-7> 화합물 7의 분석 결과

- 무정형 분말 (MeOH-pyridine)

-  $[\alpha]_D + 4.13^\circ$  (MeOH,  $c 0.6$ )

- UV(MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm(log  $\epsilon$ ): 202.0 (3.70), 233.0 (3.80)

- IR (Films)  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3340, 2921, 1730, 1645, 1557, 1404

-  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta$  7.49 (1H, s, H-3), 5.99 (1H, br s, H-7), 4.91 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1), 4.82 (1H, br s, H-6), 4.80 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-1'), 4.41 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz, H-10a), 4.23 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz, H-10b), 3.05 (1H, br dd,  $J = 8.0, 6.4$  Hz, H-5), 2.59 (1H, dd,  $J = 8.0, 8.0$  Hz, H-9)

-  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz) : 173.5 (C-11), 152.8 (C-3), 149.4 (C-8), 128.8 (C-7), 110.0 (C-4), 100.5 (C-1), 99.1 (C-1'), 76.3 (C-5'), 75.9 (C-3'), 74.5 (C-6), 73.0 (C-2'), 69.7 (C-4'), 60.8 (C-6'), 60.4 (C-10), 44.7 (C-9), 41.4 (C-5)

- pos. FABMS  $m/z$ : 391 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ). HR-FABMS  $m/z$  391.1245 (Calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{11}$ , 391.1240).

분석 결과, 화합물 7은 디아세틸아스페롤로시드산(deacetylasperulosidic acid)(IUPAC 명: 1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,5,6,9-tetrahydro-6-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-cyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid)인 것으로 판명되었다(Kamiya *et al.*, Heterocycles, 56:537-544, 2002).

### <실시예 3>

#### 항산화 활성 분석

상기 실시예 1에서 분리된 백화사철초 유래 이리도이드 배당체들이 LDL의 산화를 억제하는 항산화 활성을 나타내는지를 확인하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

LDL의 산화 억제 활성은 부에그 및 어스트의 TBARS 어세이(Buege *et al.*, *Method Enzymol.*, 52:302-310, 1978)를 약간 변형하여 측정하였다. 먼저, 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 분리한 LDL을 10 mM BPS(pH 7.4, 0.15M NaCl)와 혼합하였다. LDL 용액( $250 \mu\text{l}$ , 50-100  $\mu\text{g}$  단백질)에 상기 실시예 1에서 분리한 이리도이드 배당체(화합물 1 내지 7)를 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 각각 첨가하였다. 상기 이리도이드 배당체는 DMSO에 용해하여 사용하였다. 음성 대조군에는 용매만을 첨가하였으며, 양성대조군으로는 관상동맥질환 치료제로 사용되고 있는 합성 항산화제인 프로부콜(probucol) (Sigma Co.)을 사용하였다(Jeong *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14:2719-2723, 2004). 이후, 상기 용액에 LDL의 산화를 촉진하는 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ 를 첨가하였다. 산화 실험은 37°C 진탕 항온수조에 있는 스크류 캡 5 ml 글래스 바이얼(screw-capped 5 ml glass vial)에서 수행하였다. 혼합 용액을 37°C에서 4시간 배양한 후, 20% TCA 1ml를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 0.05N NaOH에 녹인 0.67% TBA 1ml를 상기 반응 혼합물에 첨가하여 볼텍싱(vortexing)하였다. 이후, 95°C에서 5분간 가열하여 발색반응이 일어나도록 한 후, 다시 얼음 위에서 냉각시켰다. 이후, 1000g로 2분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 자외선-가시광선 분광기로 532 nm에서 흡광도(optical density)를 측정함으로써 상기 발색 반응으로 생성된 말론디알데히드(malondialdehyde, MDA)의 양을 구하였다. 한편, 테트라메톡시프로판(tetramethoxypropane)의 저장용액을 이용하여 0-5 nmol 말론디알데히드를 포함하는 PBS 표준용액을 250  $\mu\text{l}$ 씩 제조한 후, 상기 표준용액을 상기와 같은 방법으로 발색시켜 흡광도를 측정하고, 말론디알데히드의 표준곡선을 구하였다(Ahn

*et al., J. Nat. Prod.*, 64:1562-1564, 2001). 상기 표준곡선을 이용하여 본 발명의 이리도이드 배당체 처리에 의해 생성된 말론알데하이드의 양을 정량화하였다. 모든 실험을 3회 반복 수행하였으며, LDL 산화 억제 활성도(%)는 '평균±표준편차'로 나타내었다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

**[표 2]**  
백화사설초 유래 이리도이드 배당체의 LDL 산화 억제 활성

|             | LDL 산화 억제 활성도(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |
|-------------|--------------------------------------------|
| 양성대조군(프로부콜) | 78.1 $\pm$ 2.8 %                           |
| 화합물 1       | 63.3 $\pm$ 2.0 %                           |
| 화합물 2       | 62.2 $\pm$ 1.6 %                           |
| 화합물 3       | 34.4 $\pm$ 1.2 %                           |
| 화합물 4       | 50.8 $\pm$ 1.1 %                           |
| 화합물 5       | 58.7 $\pm$ 1.3 %                           |
| 화합물 6       | 55.8 $\pm$ 1.6 %                           |
| 화합물 7       | 63.8 $\pm$ 1.5 %                           |

상기 표 2에서 보는 바와 같이, 본 발명의 화합물 1, 2 및 7은 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 63.3 $\pm$ 2.0, 62.2 $\pm$ 1.6 및 63.8 $\pm$ 1.5%의 LDL-산화 저해 활성을 보였으며, 이는 동일 농도에서 78.1 $\pm$ 2.8%의 LDL-산화 저해 활성을 보인 프로부콜과 거의 유사하였다(표 2 참조). 이외 다른 화합물들도 현저한 저해 활성을 나타내었다. 상기 결과들로부터 본 발명에 따른 화합물 1 내지 7이 LDL의 산화를 효과적으로 저해하는 활성을 가진 것을 확인할 수 있었다. 상대적으로 높은 LDL-산화 저해 활성을 갖는 천연 성분의 예가 극히 희박함을 볼 때, 본 발명에 따른 백화사설초 유래 이리도이드 배당체는 매우 효과적인 항산화제라 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 이리도이드 배당체는 LDL이 산화되어 유발되는 것으로 알려진 고지혈증, 관상동맥 심장병, 동맥경화, 죽상경화 및 심근경색증 등과 같은 심장순환계 질환의 예방제 또는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

#### <제제예 1>

본 발명의 이리도이드 배당체를 함유하는 약학적 제제의 제조

##### <1-1> 정제의 제조

본 발명의 이리도이드 배당체(화합물 1 내지 7) 25 mg을 부형제 직타용 락토오스 26 mg과 아비셀(미결정 셀룰로오스) 3.5 mg, 붕해 보조제인 나트륨 전분 글리코네이트 1.5 mg, 그리고 결합제인 직타용 L-HPC(low-hydrosyrophylcellulose) 8 mg과 함께 U형 혼합기에 넣고 20분간 혼합하였다. 혼합이 완료된 후 활탁제로서 마그네슘 스테아레이트 1 mg을 추가로 첨가하고 3분간 혼합하였다. 정량 시험과 항습도 시험을 거쳐 타정하고 필름 코팅하여 정제를 제조하였다.

##### <1-2> 시럽제의 제조

본 발명의 이리도이드 배당체(화합물 1 내지 7) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분 2%(W/V)로 함유하는 시럽은 다음과 같은 방법으로 제조하였다: 본 발명의 이리도이드 배당체의 산부가염 2 g, 사카린 0.8 g 및 당 25.4 g을 온수 80 g에 용해시켰다. 상기 용액을 냉각시킨 후, 여기에 글리세린 8.0 g, 향미료 0.04 g, 에탄올 4.0 g, 소르브산 0.4 g 및 적량의 증류수를 혼합하였다. 상기 혼합물에 물을 첨가하여 100 ml가 되도록 하였다.

##### <1-3> 캡슐제의 제조

본 발명의 이리도이드 배당체(화합물 1 내지 7) 50 mg, 유당 50 mg, 전분 46.5 mg, 탈크 1 mg 및 적량의 스테아린산 마그네슘을 혼합하고 이를 경질 젤라틴 캡슐에 충전함으로써 캡슐제를 제조하였다.

##### <1-4> 주사액제의 제조

유효성분 10 mg을 함유하는 주사액은 다음과 같은 방법으로 제조하였다: 본 발명의 이리도이드 배당체의 염산염 1 g, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르브산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 ml를 제조하였다. 상기 용액을 병에 넣고 20℃에서 30 분간 가열하여 멸균시켰다.

### <적용예 1>

본 발명의 이리도이드 배당체를 함유하는 약학적 제제의 질환 적용예

#### <1-1> 죽상경화

LDL의 산화를 방지하는 것은 죽상경화의 진행을 억제하는데 있어서 중요한 요인으로서 인식되어 왔다. 항산화제로 공지된 몇몇 카로티노이드가 LDL 산화를 억제하여 죽상경화의 진행을 정지시키는 것으로 보고되었다(Krinsky, N., Free Radical Biology and Medicine, 7:617-635, 1989). 또한 국제특허출원 제PCT/IL98/00286호에는 LDL 산화를 억제함으로써 죽상경화의 진행을 정지시키는 데에 있어서 라이코펜(lycopene)과 비타민 E의 상승작용성 혼합물의 효과가 기재되어 있다. 따라서, LDL의 산화를 효과적으로 억제하는 활성을 갖는 이리도이드 배당체를 유효성분으로 함유하는 본 발명의 약학적 제제는 죽상경화의 치료 또는 예방에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

#### <1-2> 동맥경화

동맥경화의 발병 요인으로는 여러 가지가 알려져 있으나, 그 중에서도 특히 LDL이 산화되어 생성된 Ox-LDL이 가장 주요한 발병 요인으로 지적되고 있다(Steinberg, D. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 320:915-924, 1989). LDL은 혈중 콜레스테롤을 운반하는 단백질 중 하나로서, 이것이 산화되면 본래의 기능을 하지 못하고 혈관 내에서 대식세포에 의해 작은 거품세포로 변화되는데, 이 거품세포는 혈관 내피세포로 침투되어 평활근을 비후시킨다. 또한 Ox-LDL은 대식세포를 동맥벽에 머무르게 하므로 혈관 내피에 지방선이 형성되고, 이로 인해 동맥경화가 유발된다. 따라서 LDL의 산화를 효과적으로 억제하는 활성을 갖는 이리도이드 배당체를 유효성분으로 함유하는 본 발명의 약학적 제제는 동맥경화의 치료 또는 예방에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

### 발명의 효과

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 백화사설초로부터 LDL의 산화를 억제하는 활성을 갖는 이리도이드 배당체를 처음으로 분리하였다. 본 발명의 이리도이드 배당체는 LDL의 산화를 억제하는 항산화제로서 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, LDL의 산화에 의해 유발되는 질환의 치료 또는 예방에도 효과적으로 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 백화사설초로부터 LDL 산화 억제 활성을 갖는 7개의 이리도이드 배당체를 분리·정제하는 과정을 간략하게 도시한 것이다.

### 도면



도면1

