

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0114579
(43) 공개일자 2010년10월26일

(51) Int. Cl.
A61K 31/37 (2006.01) A61K 36/8964 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0033011
(22) 출원일자 2009년04월16일
심사청구일자 2009년04월16일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
서은경
서울특별시 성북구 정릉동 674-7
황은숙
서울특별시 양천구 신정1동 목동아파트 909동 303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 지모로부터 분리된 화합물들을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 지모 (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 화합물들을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 상세하게는 지모로부터 분리된 화합물들은 지방세포 분화 억제 효과가 탁월하므로, 상기 조성물은 지질대사 질환의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

(72) 발명자

윤의중

대전광역시 대덕구 법동 280-2 삼호아파트 2동
1307호

남주원

서울특별시 관악구 신림동 1709 7/7

특허청구의 범위

청구항 1

지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 (*E*)-5,7-디하이드록시-3-(4'-하이드록시벤질리덴)-6-메틸크로만-4-온((*E*)-5,7-dihydroxy-3-(4'-hydroxybenzylidene)-6-methylchroman-4-one), 7-하이드록시-3-(4'-하이드록시벤질)쿠마린(7-hydroxy-3-(4'-hydroxybenzyl)coumarin) 또는 1,3-비스(4'-하이드록시페닐)프롭-2-인-1-온(1,3-bis(4'-hydroxyphenyl)prop-2-yn-1-one) 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 2

지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 제 1항의 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 지질대사 질환은 비만, 당뇨병, 고콜레스테롤증, 고지혈증, 저지질증, 지방단백질증 또는 동맥경화인 약학 조성물.

청구항 4

지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 4'-*O*-메틸니아졸(4'-*O*-Methylnyasol), 니아졸(Nyasol), 브로우소닌 A(Broussoinin A), 1,3-비스-디-*p*-하이드록시페닐-4-펜텐-1-온(1,3-bis-di-*p*-hydroxyphenyl-4-penten-1-one), 2',4',4'-트리하이드록시칼콘(2',4',4'-Trihydroxychalcone), 7,4'-디하이드록시호모이소플라반(7,4'-Dihydroxyhomoisoflavane), 2'-*O*-메틸이소리퀴리티게닌(2'-*O*-Methylisoliquiritigenin), 2,4',6-트리하이드록시-4-메톡시벤조페논(2,4',6-Trihydroxy-4-methoxybenzophenone), 4',7-디하이드록시-5-메톡시플라바논(4',7-Dihydroxy-5-methoxyflavanone), 2'-*O*-메틸플로레틴(2'-*O*-Methylphloretin) 또는 4,4'-디하이드록시칼콘(4,4'-Dihydroxychalcone)으로부터 선택된 화합물을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 제 1항의 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 6

지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 4'-*O*-메틸니아졸(4'-*O*-Methylnyasol), 니아졸(Nyasol), 브로우소닌 A(Broussoinin A), 1,3-비스-디-*p*-하이드록시페닐-4-펜텐-1-온(1,3-bis-di-*p*-hydroxyphenyl-4-penten-1-one), 2',4',4'-트리하이드록시칼콘(2',4',4'-Trihydroxychalcone), 7,4'-디하이드록시호모이소플라반(7,4'-Dihydroxyhomoisoflavane), 2'-*O*-메틸이소리퀴리티게닌(2'-*O*-Methylisoliquiritigenin), 2,4',6-트리하이드록시-4-메톡시벤조페논(2,4',6-Trihydroxy-4-methoxybenzophenone), 4',7-디하이드록시-5-메톡시플라바논(4',7-Dihydroxy-5-methoxyflavanone), 2'-*O*-메틸플로레틴(2'-*O*-Methylphloretin) 또는 4,4'-디하이드록시칼콘(4,4'-Dihydroxychalcone)으로부터 선택된 화합물을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제 5항 또는 제 6항에 있어서, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태인 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 지방세포 분화 억제 효과를 갖는 지모 (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 화합물들을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] [문헌 1] 박중열 외 8명, 한국인 인슐린비의존형 당뇨병 환자의 체중변화 양상, 당뇨병, 17, pp.51-57, 1993
- [0003] [문헌 2] Carey VJ. et al., Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women, The nurses' health study, Am J Epidemiol, 145, pp.614-619, 1997
- [0004] [문헌 3] Golay A. et al., Obesity and NIDDM, the retrograde regulation concept, Diabetes Rev, 5, pp.69-82, 1997
- [0005] [문헌 4] Hotamisligil GS. et al., Tumor necrosis factor α , a key component of the obesity-diabetes link, Diabetes, 43, pp.1271-1278, 1994
- [0006] [문헌 5] 박중희, 한약백과도감(하), 신일상사, pp.746-748, 2002
- [0007] [문헌 6] Preparative isolation and purification of four compounds from the Chinese medicinal herb rhizoma Anemarrhenae by high-speed counter-current chromatography, Journal of chromatography, 1104, pp.6974, A 2006
- [0008] [문헌 7] Minami E., et al., Stereochemistry of cis- and trans-hinokiresinol and their estrogen-like activity, Chemical & pharmaceutical bulletin, 48, pp.389-392, 2000
- [0009] [문헌 8] Takasugi M., et al., Studies on phytoalexins of the Moraceae. 5. Broussonins A and B, new phytoalexins from diseased paper mulberry, Chemistry Letters 3, pp.339-340, 1980
- [0010] [문헌 9] Jeong S J., et al., Norlignans with Hyaluronidase Inhibitory Activity From *Anemarrhena asphodeloides* Planta Med, 65, pp.367-368, 1999
- [0011] [문헌 10] Abd El-Hafiz M A., et al., Minor phenolic constituents of Crinum augustum, Journal of Natural Products, 53, pp.1349-1352, 1990
- [0012] [문헌 11] Camarda L., et al., Dragon's blood from Dracaena draco, structure of novel homoisoflavonoids, Heterocycles, 20, pp.39-43, 1983
- [0013] [문헌 12] Namikoshi M., et al., Homoisoflavonoids and related compounds. III. Phenolic constituents of *Caesalpinia japonica* Sieb. et Zucc., Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 35, pp.3568-3575, 1987
- [0014] [문헌 13] Matsuda H., et al., Testosterone 5-reductase inhibitory active constituents from *Anemarrhena* rhizoma, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 24, pp.586-587, 2001
- [0015] [문헌 14] Herath W., et al., Identification and biological activity of microbial metabolites of xanthohumol, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 51, pp.1237-1240, 2003
- [0016] [문헌 15] Barrero A F., et al., Resorcinol Derivatives and Flavonoids of *Ononis natrix* subspecies ramosissima, Journal of Natural Products, 60, pp.6568, 1997
- [0017] [문헌 16] Ohashi H., et al., 4,4'-Dihydroxychalcone from the heartwood of *Chamaecypar isobtusa*.

Phytochemistry, 27, pp.3993-3994, 1988

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0018] 산업사회에서 비만은 가장 흔한 영양학적 문제로, 미국 통계에 의하면 미국 국민의 1/3, 어린이의 20%가 비만 환자로 보고되고 있으며, 제2형 당뇨병 환자의 70% 이상이 비만하고, 이들에서 고혈압, 고지혈증 및 일부 암 발병 위험이 증가한다. 비만한 사람에서 탄수화물 대사 이상 및 인슐린비의존형 당뇨병이 흔히 동반되며, 체중증가가 기존의 당뇨병 상태를 악화시킨다는 것은 잘 알려져 있으나, 비만과 당뇨병의 상호관계의 정확한 특성에 관해서는 아직 논란이 많은 상태이다. 아주 심한 비만이 있는 사람이 모두 당뇨병이 있는 것은 아니므로, 비만 자체가 인슐린비의존형 당뇨병을 유발하기에는 충분치 않고 당뇨병에 대한 유전적 소인이나 환경 인자가 함께 관여함으로써 당뇨병이 발생하는 것으로 여겨진다. 그러나 인슐린비의존형 당뇨병의 발생 빈도가 비만한 사람에서 훨씬 높으며, 또한 인슐린비의존형 당뇨병의 발생률은 과거의 비만 정도 및 기간과도 밀접한 관계가 있으므로 비만은 인슐린비의존형 당뇨병의 강력한 위험 인자이다.
- [0019] 한편, 단순한 비만 정도 뿐 아니라 지방 분포가 비만과 관련된 질병위험과 밀접한 관련을 가지는 것으로 최근 알려지고 있는데, 복부 지방이 특히 문제시 되고 있다.
- [0020] 인슐린비의존형 당뇨병 환자는 흔히 비만하거나 비만의 기왕력을 갖고 있다. 서구인의 경우 인슐린비의존형 당뇨병 환자의 60~90%가 비만하며, 우리나라에서도 인슐린비의존형 당뇨병 환자의 약 70%가 비만의 기왕력을 갖는 것으로 보고되었다(박중열 외 8명, 한국인 인슐린비의존형 당뇨병 환자의 체중변화 양상, 당뇨병, 17, pp.51-57, 1993).
- [0021] 많은 전향적 연구를 통해서도 비만이 내당 능력 장애 및 인슐린비의존형 당뇨병에 선행한다는 사실이 관찰되었다(Carey VJ. et al., Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women, The nurses' health study, *Am J Epidemiol*, 145, pp.614-619, 1997). 프라밍함(Framingham) 연구에서는 비만한 사람에서 내당 능력 장애가 빈발함이 관찰되었고, 대부분의 연구들에서 내당 능력 장애를 갖는 비만한 사람들은 인슐린비의존형 당뇨병 발생의 고위험군임이 관찰되었다.
- [0022] 비만으로부터 당뇨병으로의 진행에 관한 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 인슐린 저항성의 증가가 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다. 펠버(Felber) 등은 역학적 관찰들에 근거하여 비만한 사람을 경구 당 부하 검사 시 혈당과 인슐린 반응에 따라 정상 내당능군, 내당능 장애군, 고인슐린혈증을 보이는 당뇨군 및 저인슐린혈증을 보이는 당뇨군의 네 군으로 분류하였고, 비만에서 당뇨병으로의 진행도 이러한 과정을 거친다고 하였다(Golay A. et al., Obesity and NIDDM, the retrograde regulation concept, *Diabetes Rev*, 5, pp.69-82, 1997).
- [0023] 비만증에 있어서 탄수화물 대사는 경부 당 부하에 대한 혈당 반응은 정상이나 인슐린 분비 반응이 정상보다 높게 나타나는 인슐린 저항성의 양상을 보이며, 인슐린 저항성은 비만과 비만한 인슐린비의존형 당뇨병 환자의 주된 병태생리 이상의 하나로 비만 초기부터 관찰된다. 비만증에서 어떤 기전에 의해 인슐린의 작용이 감소되는지에 관해서는 다양한 가설이 제시되고 있으나 아직 확실히 밝혀진 바는 없다. 즉, 인슐린 작용에 관련된 인슐린 수용체, 포도당 수송체, 당원 합성과 당 산화에 관련된 효소들 등의 기능 감소가 비만시 관찰되거나 비만에 의한 이차적인 현상으로 이해되고 있다(Golay A. et al., Obesity and NIDDM, the retrograde regulation concept, *Diabetes Rev*, 5, pp.69-82, 1997).
- [0024] 여러 정황적 증거들을 고려할 때 지방세포가 인슐린 저항성의 발생에 기여할 것으로 생각되는데, 즉 지방세포에서 분비되는 인자들 혹은 대사 전달자(metabolic messenger) 들이 근육 및 간에서 인슐린의 작용을 억제할 것으로 여겨진다. 이러한 인자로서 가장 먼저, 그리고 널리 인정받고 있는 것이 지방 조직에 저장된 중성 지방으로부터 가수분해되어 나오는 유리 지방산이다. 그 외에 최근 지방세포에서 분비되는 TNF- α 및 렙틴(leptin)등도 비만에서 인슐린 저항성의 원인으로 제시된 바 있다(Hotamisligil GS. et al., Tumor necrosis factor α , a key component of the obesity-diabetes link, *Diabetes*, 43, pp.1271-1278, 1994).
- [0025] 비만증에서 에너지 대사는 지질이 주가 되며 지질 분해와 지질 합성이 모두 증가된다. 지질 분해의 증가와 그에 따른 유리 지방산의 이용 증가는 비만, 특히 복부 비만의 특징이며, 지방 용적과 지질 산화 간에 높은 상관관계가 관찰되어 지방 용적의 증가가 혈중 유리 지방산치 및 지질 산화 증가의 원인으로 생각된다. 지질 산화는 비만의 초기에도 증가되어 관찰되며, 공복시나 당부하 후에도 증가되어 있다.

[0026] 최근 우리나라에서는 식습관이 서구화되고, 문화수준이 향상됨에 따라 단순 비만자가 현저히 증가하고 있다. 비만은 고혈압, 동맥경화, 지방간 및 당뇨 등 각종 질병의 발생에 관여하거나 악화시키는 원인이 되고 있다. 따라서 비만은 미리 예방하는 것이 좋으며, 비만증이 된 경우에는 체지방의 감소와 지질대사의 개선을 통하여 신체가 건강하게 이루어지도록 조절하는 것이 각종 질병의 예방과 건강을 위하여 매우 중요하다.

[0027] 지모(知母, *Anemarrhena asphodeloides* Bunge)는 백합과(Liliaceae)의 여러해살이 풀로 지모의 뿌리줄기를 건조한 것을 약으로 사용하고, 중국의 북부가 원산으로 한국(황해, 평남), 중국, 몽골 등지에 고르게 분포한다. 지모는 뿌리의 모양이 벌레와 비슷하다고 하여 지모라고 부르며, 특징은 특이한 냄새를 가지고, 맛은 조금 달고 점액성이며 나중에는 쓴 편으로, 이뇨, 해열, 진해, 진해에 효과가 있다.

[0028] 성분은 스테로이드사포닌(steroidsaponin) 약 6%, 티모사포닌(timosaponin) A-I, A-II, A-III, A-IV(메틸알콜 엑스의 수불용부(水不溶部)에서) 및 티모사포닌(timosaponin) B-I, B-II(수용부(水溶部)에서)가 있으며, 기본 사포닌(saponin)으로서 사르사사포닌(sarsasapogenin), 마르코게닌(markogenin), 네오지토게닌(neogitogenin)이 알려져 있고, 그밖의 잔톤(xanthone); 망지페린(mangiferin), 이소망지페린(isomangiferin)이 있으며, 비타민으로서 니코틴 산(nicotinic acid) 200 μ g/g 등을 함유한다고(박종희, 한약백과도감(하), 신일상사, pp.746-748, 2002) 알려져 있으나, 상기 문헌의 어디에도 지모로부터 분리된 화합물들의 지질대사 개선효과에 대해서는 개시되거나 교시된 바 없다.

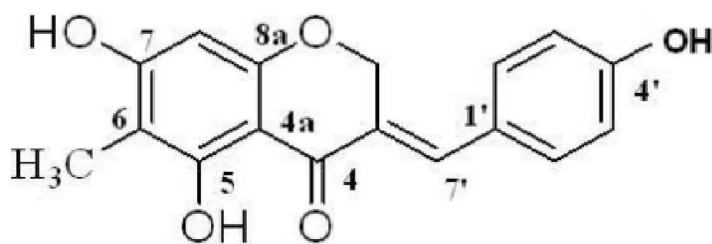
[0029] 이에 본 발명자들은 지모로부터 분리된 화합물들을 이용하여, 지방세포 분화 억제 효과를 측정한 결과, 지방세포 분화 개선능이 우수하여 지질대사 질환의 예방 및 치료에 탁월한 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

[0030] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 하기 화학식 (a), (b) 또는 (c)로 표기되는 (*E*)-5,7-디하이드록시-3-(4'-하이드록시벤질리덴)-6-메틸크로만-4-온((*E*)-5,7-dihydroxy-3-(4'-hydroxybenzylidene)-6-methylchroman-4-one), 7-하이드록시-3-(4-하이드록시벤질)쿠마린(7-hydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)coumarin) 또는 1,3-비스(4-하이드록시페닐)프로프-2-인-1-온(1,3-bis(4-hydroxyphenyl)prop-2-yn-1-one) 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염;

[0031]

화학식 1

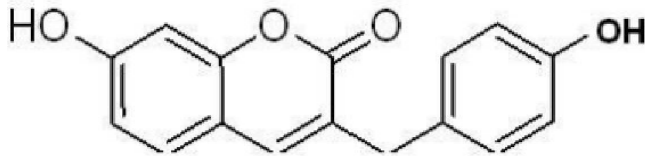


[0032]

[0033] (a)

[0034] 본원에서 정의되는 화학식 (a)의 화합물은 (*E*)-6-메틸레우코말린((*E*)-6-Methyleucomalin, (*E*)-5,7-dihydroxy-3-(4'-hydroxybenzylidene)-6-methylchroman-4-one)으로 명명됨을 특징으로 한다.

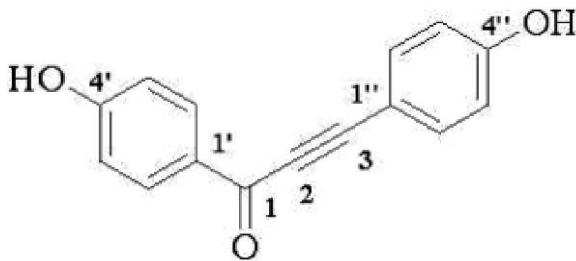
화학식 2



(b)

본원에서 정의되는 화학식 (b)의 화합물은 아네말쿠마린 A(Anemarcoumarin A, 7-hydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)coumarin)로 명명됨을 특징으로 한다.

화학식 3



(c)

본원에서 정의되는 화학식 (c)의 화합물은 아네말칼콘인(Anemarchalconyn, 1,3-bis(4-hydroxyphenyl)prop-2-yn-1-one)으로 명명됨을 특징으로 한다.

상기 화학식 (a), (b) 또는 (c)로 표시되는 화합물은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수 있다.

염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산 (free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올 (예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술포산, *p*-톨루엔술포산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 구연산 (citric acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycolic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있다.

또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

상기의 화학식 (a), (b) 또는 (c) 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식 (a), (b) 또는 (c) 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로 브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트 (메실레이트) 및 *p*-톨루엔설포네이트 (토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0047] 본 발명은 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 상기 화학식 (a), (b) 또는 (c)로 표기되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

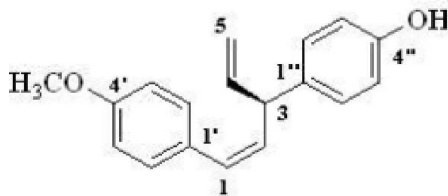
[0048] 본 발명은 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 하기 화학식 (d) 내지 (n)으로 표기되는 4'-*O*-메틸니아졸(4'-*O*-Methylnyasol), 니아졸(Nyasol), 브로우소닌 A(Broussoin A), 1,3-비스-디-*p*-하이드록시페닐-4-펜텐-1-온(1,3-bis-di-*p*-hydroxyphenyl-4-penten-1-one), 2',4',4'-트리하이드록시칼콘(2',4',4'-Trihydroxychalcone), 7,4'-디하이드록시호모이소플라반(7,4'-Dihydroxyhomoisoflavane), 2'-*O*-메틸이소리퀴리티게닌(2'-*O*-Methylisoliquiritigenin), 2,4',6-트리하이드록시-4-메톡시벤조페논(2,4',6-Trihydroxy-4-methoxybenzophenone), 4',7-디하이드록시-5-메톡시플라바논(4',7-Dihydroxy-5-methoxyflavanone), 2'-*O*-메틸플로레틴(2'-*O*-Methylphloretin) 또는 4,4'-디하이드록시칼콘(4,4'-Dihydroxychalcon) 으로부터 선택된 화합물을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0049] 또한, 본 발명은 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 상기 화학식 (a), (b) 또는 (c)로 표기되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0050] 본 발명은 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 하기 화학식 (d) 내지 (n)으로 표기되는 4'-*O*-메틸니아졸(4'-*O*-Methylnyasol), 니아졸(Nyasol), 브로우소닌 A(Broussoin A), 1,3-비스-디-*p*-하이드록시페닐-4-펜텐-1-온(1,3-bis-di-*p*-hydroxyphenyl-4-penten-1-one), 2',4',4'-트리하이드록시칼콘(2',4',4'-Trihydroxychalcone), 7,4'-디하이드록시호모이소플라반(7,4'-Dihydroxyhomoisoflavane), 2'-*O*-메틸이소리퀴리티게닌(2'-*O*-Methylisoliquiritigenin), 2,4',6-트리하이드록시-4-메톡시벤조페논(2,4',6-Trihydroxy-4-methoxybenzophenone), 4',7-디하이드록시-5-메톡시플라바논(4',7-Dihydroxy-5-methoxyflavanone), 2'-*O*-메틸플로레틴(2'-*O*-Methylphloretin) 또는 4,4'-디하이드록시칼콘(4,4'-Dihydroxychalcon)으로부터 선택된 화합물을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

화학식 4

[0051] 4'-*O*-메틸니아졸(4'-*O*-Methylnyasol)

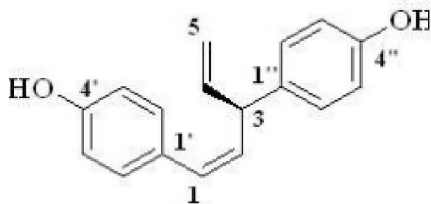


[0052]

[0053] (d)

화학식 5

[0054] 니아졸(Nyasol)

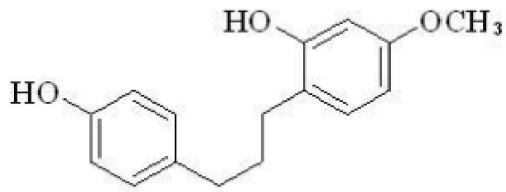


[0055]

[0056] (e)

화학식 6

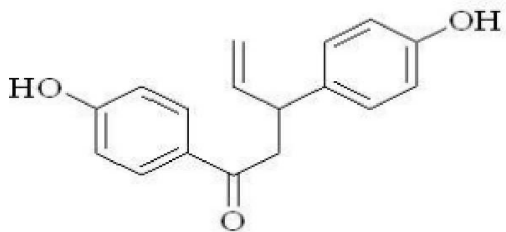
브로우소닌 A(Broussoinin A)



(f)

화학식 7

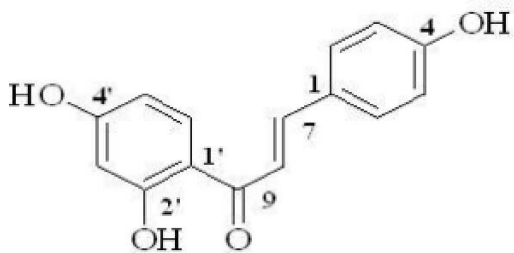
1,3-비스-디-*p*-하이드록시페닐-4-펜텐-1-온(1,3-bis-di-*p*-hydroxyphenyl-4-penten-1-one)



(g)

화학식 8

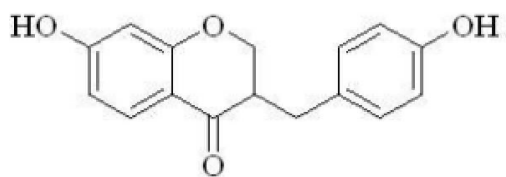
2',4',4'-트리하이드록시칼콘(2',4',4'-Trihydroxychalcone)



(h)

화학식 9

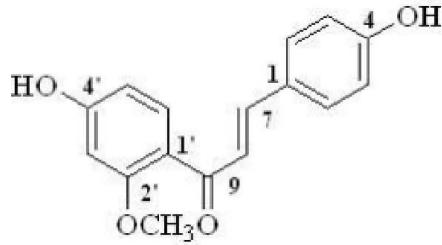
7,4'-디하이드록시호모이소플라반(7,4'-Dihydroxyhomoisoflavane)



[0068] (i)

화학식 10

[0069] 2'-O-메틸이소리퀴리티게닌(2'-O-Methylisoliquiritigenin)

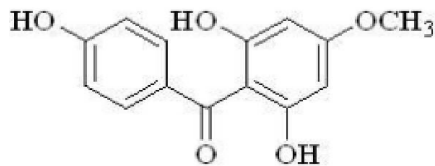


[0070]

[0071] (j)

화학식 11

[0072] 2,4',6-트리하이드록시-4-메톡시벤조페논(2,4',6-Trihydroxy-4-methoxybenzophenone)

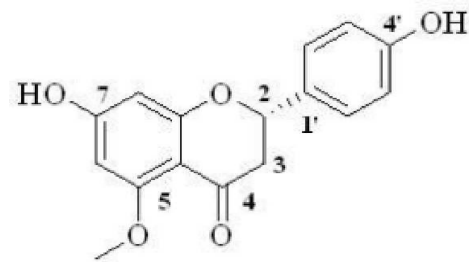


[0073]

[0074] (k)

화학식 12

[0075] 4',7-디하이드록시-5-메톡시플라바논(4',7-Dihydroxy-5-methoxyflavanone)

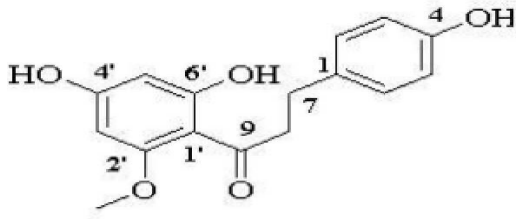


[0076]

[0077] (l)

화학식 13

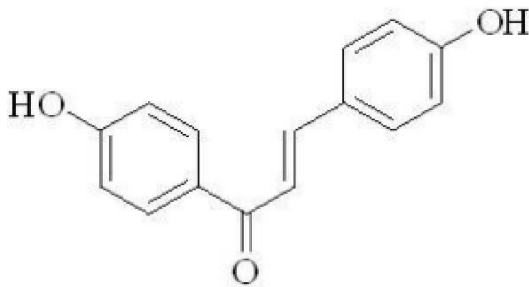
[0078] 2'-O-메틸플로레틴(2'-O-Methylphloretin)



(m)

화학식 14

4,4'-디하이드록시칼콘(4,4'-Dihydroxychalcone)



(n)

상기 지질대사 질환은 비만, 당뇨병, 고콜레스테롤증, 고지혈증, 저지질증, 지방단백질증 또는 동맥경화 등이며, 바람직하게는 비만 또는 당뇨병을 포함한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 화합물은, 건조된 지모 바람직하게는 지모를 세절하여 건조 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 1 내지 10배의 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 메탄올로, 상온(20 내지 100℃, 바람직하게는 20 내지 30℃) 추출온도에서 약 1시간 내지 10일, 바람직하게는 약 20시간 내지 30시간동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출 등의 추출방법, 바람직하게는 환류냉각 추출 방법을 이용하여 수득한 1 내지 10회, 바람직하게는 2 내지 7회 반복 추출한 후 감압 농축하여 조추출물을 수득하는 제 1단계; 상기 조추출물을 물에 현탁한 후, 에틸 아세테이트 및 물로 각각 추출하는 제 2단계; 제 2단계에서 수득한 에틸 아세테이트 용매 추출물을 *n*-헥산 : 에틸아세테이트(1~50 : 1(v/v))을 용출용매로 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 25개의 분획으로 나누는 제 3단계; 상기 3단계의 분획물 중 하나의 분획물을 선택하여 다시 클로로포름 : 메탄올 혼합용매 (1~100 : 1(v/v))를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 분획을 나누는 제 4단계; 상기 제 4단계의 분획물로부터 실리카겔 컬럼크로마토그래피 또는 Semiprep. HPLC를 이용하여 본 발명의 신규화합물 1 내지 3 및 기존에 공지된 화합물 4 내지 14를 수득할 수 있었다.

본 발명의 지질대사 질환의 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1 내지 50% 중량으로 포함된다.

그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.

본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 화합물을 포함하는 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 있으며, 본 발명의 화합물을 포함하는 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, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0091] 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0092] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 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(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0093] 또한, 본 발명은 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 상기 화학식 (a), (b) 또는 (c)로 표기되는 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0094] 본 발명은 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)로부터 분리된 상기 화학식 (d) 내지 (n)으로 표기되는 4'-*O*-메틸니아솔(4'-*O*-Methylnyasol), 니아솔(Nyasol), 브로우스닌 A(Broussonin A), 1,3-비스-디-*p*-하이드록시페닐-4-펜텐-1-온(1,3-bis-di-*p*-hydroxyphenyl-4-penten-1-one), 2',4',4'-트리하이드록시칼콘(2',4',4'-Trihydroxychalcone), 7,4'-디하이드록시호모이소플라반(7,4'-Dihydroxyhomoisoflavane), 2'-*O*-메틸이소리퀴리티게닌(2'-*O*-Methylisoliquiritigenin), 2,4',6'-트리하이드록시-4-메톡시벤조페논(2,4',6'-Trihydroxy-4-methoxybenzophenone), 4',7-디하이드록시-5-메톡시플라바논(4',7-Dihydroxy-5-methoxyflavanone), 2'-*O*-메틸플로레틴(2'-*O*-Methylphloretin) 또는 4,4'-디하이드록시칼콘(4,4'-Dihydroxychalcon)으로부터 선택된 화합물을 유효성분으로 함유하는 지질대사 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0095] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 지질대사 질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0096] 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0097] 본 발명의 상기 화합물은 지질대사 질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0098] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스

테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0099] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

효 과

[0100] 상기와 같이, 본 발명의 지모로부터 분리된 화합물들은 탁월한 지방세포 분화 억제 효과를 지니므로, 지질대사 질환의 예방 및 치료용 약학조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0101] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0102] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0103] 참고예 1. 화합물 구조 결정

[0104] 하기의 화합물들은 분석 TLC(analytical TLC)를 이용하여 각 성분의 순도를 평가하였으며, 단일 활성 성분임이 확인 된 상태에서 각종 분광학적 IR(Bio-Rad Laboratories사, USA), Mass(JOEL사, Japan), ¹H-NMR(Varian사, CA), ¹³C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC, COSY, NOESY, 편광계 (Jasco P-1010), CD (Jasco J-810) 등을 실시하여 화합물의 구조를 결정하였다.

[0105] 실시예 1. 지모 (Anemarrhena asphodeloides Bunge) 조추출물의 제조

[0106] 옴니 허브 닷컴 (www.omniherb.com)에서 구매한 지모 20 kg을 100% 메탄올 20 l에 넣고 환류 냉각 장치를 이용하여 수욕조 상에서 24시간 동안 추출하였다. 이 과정을 3회 이상 반복하여 상층액을 모은 후, 감압 농축하여 지모 조추출물 4000g을 수득하였다.

[0107] 실시예 2. 지모 극성 및 비극성 용매 분획물의 제조

[0108] 상기 실시예 1에서 얻은 지모 조추출물 4000g을 증류수 1 l에 현탁시킨 후, 헥산 1 l를 첨가하여 용해한 다음 이를 헥산층에 용해되는 성분만 분리하여 진공 건조하였다. 이 과정을 10회 반복하여 헥산 분획물 80g을 수득하였다. 남은 수층에 에틸아세테이트 1 l를 첨가하여 에틸아세테이트층에 용해되는 성분만 분리해서 진공 건조하였다. 이 과정을 10회 반복 수행하여 에틸아세테이트 분획물 75g을 수득하였다. 상기과 동일한 과정으로 수행하여 n-부탄올 분획물 180g 및 수층 3665g을 수득하였다.

[0109]

[0110] 실시예 3. 지모로부터 분리된 화합물들

[0111] 3-1. (-)-4'-O-메틸니아졸 ((-)-4'-O-methylnyasol)의 분리 정제

[0112] 상기 실시예 2에서 얻은 용매 분획 중 가장 활성이 높은 에틸아세테이트 분획 75g를 헥산: 에틸아세테이트 혼합

용매 (50:1 → 1:1 v/v)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Ø15 × 70 cm, Merk사)를 실시하여 25개의 분획(F1 ~ F25)으로 분리하고, 이들 분획 중 8번 분획(F8) 10g을 클로로포름: 메탄올 혼합용매 (100:1 → 10:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Ø8 × 70 cm, Merk사)를 실시하였고, 5개의 소분획(F8-1 ~ F8-5)으로 분리하였다. 이들 분획 중 3번 분획(F8-3) 10g을 다시 클로로포름: 메탄올 혼합용매 (100:1 → 10:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Ø5 × 60 cm, Merk사)를 실시하고, 5개의 소분획(F8-3-1 ~ F8-3-5)을 얻은 후, 이로부터 나온 2번째 분획(F8-3-2)을 Semiprep. HPLC (YMC-pack ODS-A, Ø2 × 30 cm, 메탄올: 물 (75:25 v/v))를 실시하여 하기 일반식 (4)로 표기되는 기준에 공지된 화합물(Preparative isolation and purification of four compounds from the Chinese medicinal herb rhizoma Anemarrhenae by high-speed counter-current chromatography, *Journal of chromatography*, **1104**, pp.69-74, A 2006)인, 화합물 4 (15 mg)을 분리하였다.

[0113] 화합물 (4): (-)-4'-O- 메틸니아졸((-)-4'-O- Methylnyasol)

[0114] 무색 수지 (Colorless gum);

[0115] C₁₈H₁₈O₂.

[0116] $[\alpha]_D^{20} = -65.7^\circ$ (c = 0.75, MeOH). CD (MeOH, c = 0.15 × 10⁻² M): [Θ]₂₂₈ +12.5, [Θ]₂₅₂ -52.9;

[0117] EI-MS: m/z (%) = 266;

[0118] ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.24 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2' , 6'), 7.12 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2" , 6"), 6.87 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3' , 5'), 6.78 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3" , 5"), 6.54 (1H, d, J = 11.6 Hz, H-1), 6.05 (1H, m, H-4), 5.70 (1H, t, J = 11.4, 10.6 Hz, H-2), 5.14 5.19 (2H, m, H-5), 4.52 (1H, t, J = 9.6, 6.0 Hz, H-3), 3.80 (3H, s, OCH₃);

[0119] ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 158.7 (s, C-4'), 154.2 (s, C-4"), 140.9 (d, C-4), 135.8 (s, C-1"), 131.9 (d, C-2), 130.0 (s, C-1'), 129.9 (d, C-2' , 6'), 129.1 (d, C-2" , 6"), 128.8 (d, C-1), 115.6 (d, C-3" , 5"), 115.2 (t, C-5), 113.9 (d, C-3' , 5'), 55.4 (q, OCH₃), 47.0 (d, C-3).

[0120] 3-2. (-)-니아졸((-)-Nyasol)과 브로우소닌 A (Broussonin A)의 분리 정제

[0121] 상기 실시예 2에서 얻은 용매 분획 중 가장 활성이 높은 에틸아세테이트 분획 75g를 헥산: 에틸아세테이트 혼합용매 (50:1 → 1:1 v/v)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Ø15 × 70 cm, Merk사)를 실시하여 25개의 분획(F1 ~ F25)으로 분리하고, 이들 분획 중 8번 분획(F8) 10g을 클로로포름: 메탄올 혼합용매 (100:1 → 10:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Ø8 × 70 cm, Merk사)를 실시하였고, 5개의 소분획(F8-1 ~ F8-5)으로 분리하였다. 이들 분획 중 3번 분획(F8-3) 10g을 다시 클로로포름: 메탄올 혼합용매 (100:1 → 10:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Ø5 × 60 cm, Merk사)를 실시하고, 5개의 소분획(F8-3-1 ~ F8-3-5)을 얻은 후, 이로부터 나온 3번째 분획(F8-3-3)을 헥산: 에틸아세테이트 혼합용매 (50:1 → 10:1 v/v)를 전개용매로 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Ø8 × 70 cm, Merk사)를 실시하여 하기 일반식 (5) 내지 (6)로 표기되는 기준에 공지된 화합물들(Minami E., et al., Stereochemistry of cis- and trans-hinokiresinol and their estrogen-like activity, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, **48**, pp.389-392, 2000; Takasugi M., et al., Studies on phytoalexins of the Moraceae. 5. Broussonins A and B, new phytoalexins from diseased paper mulberry, *Chemistry Letters* **3**, pp.339-340, 1980)인, 화합물 5 (2.0g) 및 화합물 6 (10 mg)을 각각 분리하였다.

[0122] 화합물 (5): (-)-니아졸((-)-Nyasol)

[0123] 황색 점액성 오일 (Yellow sticky oil)

- [0124] $C_{17}H_{16}O_2$. $[\alpha]_D^{20} = -75.3^\circ$ (c 0.5, MeOH)
- [0125] IR_{max} 3369, 1609, 1511, 1460, 1033, 918 cm^{-1}
- [0126] UV_{max} (log ϵ) 207 nm (4.47), 257 nm (4.09)
- [0127] 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.18 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2' and H-6'), 7.11 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2'' and H-6''), 6.80 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' and H-5'), 6.78 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-3'' and H-5''), 6.53(1H, d, $J =11.2$ Hz, H-1), 6.05 (1H, ddd, $J =16.8, 11.2, 6.4$ Hz, H-4), 5.70(1H, t, $J =11.6, 10$ Hz, H-2), 5.13-5.18 (2H, m, H-5), 4.51(1H, dd, $J =6, 10$ Hz, H-3);
- [0128] ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 128.8 (C-1), 131.9 (C-2), 47.0 (C-3), 140.9 (C-4), 115.2(C-5), 130.1 (C-1'), 130.2(C-2' and 6'), 115.3 (C-3' and 5'), 154.7 (C-4'), 135.8 (C-1''), 129.1 (C-2'' and 6''), 115.6 (C-3'' and 5''), 154.2 (C-4'')
- [0129] LREIMS m/z (% rel. int.) 252 ($[M]^+$, 100), 237 (25), 158 (54), 145 (50), 131 (22), 107 (58).
- [0130] 화합물 (6): 브로우소닌 A(Broussonin A)
- [0131] 무정형 고체 (Amorphous solid).
- [0132] IR_{max} 3400, 1615, 1590, 1515 cm^{-1}
- [0133] UV_{max} (log ϵ) 287.0 nm (3.63), 280.0 nm (3.69), and 225 nm (4.23);
- [0134] 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.96 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'' and 6''), 6.86 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 6.70 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'' and 5''), 6.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3'), 6.31 (1H, dd, $J = 7.6, 2.0$ Hz, H-5'), 3.72 (3H, OCH_3), 2.50 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-1), 2.49 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-3), 1.79 (2H, m, H-2).
- [0135] ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 159.8 (s, C-4'), 157.7 (s, C-2''), 156.2 (s, C-4''), 135.0 (s, C-1''), 131.2 (d, C-6'), 130.4 (d, C-2'' and 6''), 122.9 (s, C-1'), 116.1 (d, C-3'' and 5''), 107.6 (d, C-5''), 99.8 (d, C-3'), 55.7 (q, OCH_3), 35.9 (C-3), 33.6 (C-2), 30.3 (C-1); LREIMS m/z (% rel. int.) 258 ($[M]^+$, 100), 151 (22), 137 (100), 134 (21), 107 (35), 91 (4), 77 (10).
- [0136] 3-3. (*E*)-6-메틸레우컴날린 ((*E*)-5,7-dihydroxy-3-(4'-hydroxybenzylidene)-6-methylchroman-4-one), 1,3-비스-디-*p*-하이드록시페닐-4-펜텐-1-온 (1,3-bis-di-*p*-hydroxyphenyl-4-penten-1-one), 2',4',4'-트리하이드록시칼콘 (2',4',4'-Trihydroxychalcone) 및 7,4'-디하이드록시호모이소플라반 (7,4'-Dihydroxyhomoisoflavane)의 분리 정제
- [0137] 상기 실시예 2에서 얻은 용매 분획 중 가장 활성이 높은 에틸아세테이트 분획 75g를 hexan: 에틸아세테이트 혼합용매 (50:1 $\rightarrow$ 1:1 v/v)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 ($\varnothing 15 \times 70$ cm, Merk사)를 실시하여 25개의 분획(F1 ~ F25)으로 분리하고, 이들 분획 중 11번 분획(F11) 3g을 클로로포름: 메탄을 혼합용매 (50:1 $\rightarrow$ 5:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 ($\varnothing 8 \times 70$ cm, Merk사)를 실시하였고, 16개의 소분획(F11-1 ~ F11-16)으로 분리하였다. 이들 분획 중 16번 분획(F11-16)을 Semiprep. HPLC (YMC-pack ODS-A, $\varnothing 2 \times 30$ cm, 메탄올: 물 (75:25 v/v))을 실시한 결과, 하기 일반식 (1)로 표기되는 1종의 신규화합물인, 화합물 1(5mg)과 하기 일반식 (7) 내지 (9)로 표기되는 기준에 공지된 화합물들(Jeong S J., et al., Norlignanswith Hyaluronidase Inhibitory Activity From *Anemarrhena asphodeloides* *Planta Med*, 65, pp.367-368, 1999; Abd El-Hafiz M A., et al., Minor phenolic constituents of *Crinum augustum*, *Journal of Natural Products*, 53, pp.1349-

1352, 1990; Camarda L., et al., Dragon's blood from *Dracaena draco*, structure of novel homoisoflavonoids, *Hetero cycles*, 20, pp.39-43, 1983)인, 화합물 7(8mg), 8(10mg) 및 화합물 9 (2mg)을 각각 분리하였다.

[0138] 화합물 (1): (E)-5,7-디하이드록시-3-(4'-하이드록시벤질리덴)-6-메틸크로만-4-온((E)-5,7-dihydroxy-3-(4'-hydroxybenzylidene)-6-methylchroman-4-one, 이하 (E)-6-Methyleuconnalin로 명명함)

[0139] 황색 가루 (Yellow powder).

[0140] IR $\nu_{\max}$ (KBr) 3368, 2913, 1730, 1595, 1467 cm^{-1} ;

[0141] UV $_{\max}$ (log) (MeOH) 288 (3.8)nm;

[0142] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ : 5.27(2H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 5.88 (1H, s, H-8), 6.87 (2H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-3', 5'), 7.23(2H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-2', 6'), 7.72(1H, s, H-7'), 1.95(3H, s, 6- CH_3);

[0143] $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD_3OD) δ 68.6(C-2), 128.9(C-3), 186.6(C-4), 103.4(C-4a), 163.5(C-5), 105.7(C-6), 166.3(C-7), 95.1(C-8), 161.6(C-8a), 127.2(C-1'), 133.6(C-2', 6'), 116.9(C-3', 5'), 160.7(C-4'), 137.9(C-7'), 7.1(6- CH_3);

[0144] HRFABMS m/z 299.0922 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$, 299.0919).

[0145] 화합물 (7): 1,3-비스-디-*p*-하이드록시페닐-4-펜텐-1-온(1,3-bis-di-*p*-hydroxyphenyl-4-penten-1-one)

[0146] 무정형 고체 (Amorphous solid).

[0147] $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3$.

[0148] IR $\nu_{\max}$ 3370, 1653, 1511, 1460 cm^{-1} ;

[0149] UV $\nu_{\max}$ (log ϵ) 265 nm (4.09);

[0150] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.85 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'' and H-6''), 7.11 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' and H-6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'' and H-5''), 6.74 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' and H-5'), 6.03 (1H, m, H-4), 4.95 (2H, m, H-5), 4.00 (1H, q, $J = 7.2$ Hz, H-3), 3.32 (2H, dd, $J = 3.2, 7.2$ Hz, H-2);

[0151] $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 196.0 (C-1), 44.2 (C-2), 45.1 (C-3), 143.1 (C-4), 113.9 (C-5), 135.2 (C-1'), 139.7 (C-2' and 6'), 116.0 (C-3' and 5'), 156.7 (C-4'), 130.6 (C-1''), 131.4 (C-2'' and 6''), 116.0 (C-3'' and 5''), 162.6 (C-4'');

[0152] EIMS m/z : 268 $[\text{M}]^+$.

[0153] 화합물 (8): 2',4',4'-트리하이드록시칼콘(2',4',4'-Trihydroxychalcone)

[0154] 황색 고체 (Yellow powder).

[0155] $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$.

[0156] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.28 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 6.41 (1H, dd, $J = 2.8, 8.8$ Hz, H-5'), 6.83 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 7.62 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5),

7.77 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.96 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-6');

[0157] ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 127.9 (C-1), 131.8 (C-2, 6), 116.9 (C-3, 5), 161.6 (C-4), 145.7 (C-7), 118.4 (C-8), 193.5 (C-9), 114.7 (C-1'), 167.5 (C-2'), 103.8 (C-3'), 166.4 (C-4'), 109.2 (C-5'), 133.4 (C-6').

[0158] EIMS m/z : 256 $[\text{M}]^+$.

[0159] 화합물 (9): 7,4'-디하이드록시호모이소플라반

[0160] (7,4'-Dihydroxyhomoisoflavane)

[0161] 황색 고체 (Yellow powder).

[0162] $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$.

[0163] UV (MeOH) max (log) 288(4.03)nm;

[0164] IR (KBr) 3350(br), 1670, 1610, 1520, 1022, 930 cm^{-1} ;

[0165] EI-MS: m/z (%) = 270 $[\text{M}]^+$.

[0166] ^1H -NMR (400MHz, CD_3OD) δ 2.6, 3.0 (2H, m, H-7'), 2.7 (1H, m, H-3), 4.0 (2H, m, H-2), 6.2 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.4 (1H, dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz, H-6), 6.70 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3' , 5'), 7.0 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2' , 6'), 7.7 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, H-5);

[0167] ^{13}C -NMR (100MHz, CD_3OD) δ 70.0 (C-2), 49.0 (C-3), 195.2 (C-4), 130.4 (C-5), 111.2 (C-6), 166.5 (C-7), 103.3 (C-8), 114.6 (C-4a), 165.0 (C-8a), 130.5 (C-1'), 131.4(C-2' /C-6'), 116.2(C-3' /C-5'), 157.9 (C-4').

[0168] 3-4. 2'-O-메틸이소리퀴리티게닌 (2'-O-Methylisoliquiritigenin) 8mg 및 2,4',6-트리하이드록시-4-메톡시벤조페논(2,4',6-Trihydroxy-4-methoxybenzophenone)의 분리 정제

[0169] 상기 실시예 2에서 얻은 용매 분획 중 가장 활성이 높은 에틸아세테이트 분획 75g를 헥산: 에틸아세테이트 혼합용매 (50:1 $\rightarrow$ 1:1 v/v)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 ($\emptyset 15 \times 70$ cm, Merk사)를 실시하여 25개의 분획(F1 ~ F25)으로 분리하고, 이들 분획 중 11번 분획(F11) 3g을 클로로포름: 메탄을 혼합용매 (50:1 $\rightarrow$ 5:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 ($\emptyset 8 \times 70$ cm, Merk사)를 실시하였고, 16개의 소분획(F11-1 ~ F11-16)으로 분리하였다. 이들 분획 중 14번 분획(F11-14)을 메탄을 : 클로로포름 혼합용매 (1:1)를 사용하여 재결정을 유도한 결과, 하기 일반식 (10) 내지 (11)로 표기되는 기준에 공지된 화합물들(Namikoshi M., et al., Homoisoflavonoids and related compounds. III. Phenolic constituents of *Caesalpinia japonica* Sieb. et Zucc., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 35, pp.3568-3575, 1987; Matsuda H., et al., Testosterone 5-reductase inhibitory active constituents from *Anemarrhenaerhizoma*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24, pp.586-587, 2001)인, 화합물 10(8mg) 및 화합물 11(1.5g) 을 각각 분리하였다.

[0170] 화합물 (10): 2'-O-메틸이소리퀴리티게닌(2'-O-Methylisoliquiritigenin)

[0171] 황색 고체 (Yellow powder).

[0172] $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$.

[0173] UV (MeOH) max (log) 286(3.88)nm;

[0174] IR (KBr) 3360(br), 1675, 1620, 1510, 930 cm^{-1} ;

- [0175] EI-MS: m/z (%) = 270 $[M]^+$.
- [0176] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ 6.44 (1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-5'), 6.51 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3'), 6.81 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3, 5), 7.38 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8), 7.50 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3), 7.53 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 7.56 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-3');
- [0177] $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD_3OD) δ 128.0 (C-1), 131.5 (C-2, 6), 117.0 (C-3, 5), 161.3 (C-4), 144.2 (C-7), 125.2 (C-8), 193.0 (C-9), 121.9 (C-1'), 162.6 (C-2'), 100.0 (C-3'), 164.6 (C-4'), 109.0 (C-5'), 133.8 (C-6').
- [0178] 화합물 (11): 2,4',6-트리하이드록시-4-메톡시벤조페논(2,4',6-Trihydroxy-4-methoxybenzophenone)
- [0179] 황색 고체 (Yellow powder).
- [0180] $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$.
- [0181] IR $_{\text{max}}$ (KBr) 3177, 1661, 1249, 831 cm^{-1} ;
- [0182] UV $_{\text{max}}$ (log ϵ) (MeOH) 298 (4.3) nm;
- [0183] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.97 (2H, s, H-3, 5), 6.76 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-3' , 5'), 7.61 (2H, d, J = 8.9 Hz, H-2' , 6'), 3.77 (3H, s, OCH_3);
- [0184] $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 108.1 (C-1), 162.5 (C-2, 6), 94.5 (C-3, 5), 166.1 (C-4), 197.8 (C=O), 133.1 (C-1'), 115.2 (C-2' , 6'), 132.4 (C-3' , 5'), 162.0 (C-4'), 55.9 (OCH_3);
- [0185] EIMS m/z 260 $[M]^+$.
- [0186] 3-5. 아네말쿠마린 A (Anemarcoumarin A), 4',7-디하이드록시-5-메톡시플라바논 (4',7-Dihydroxy-5-methoxyflavanone) 및 2'-O-메틸플로레틴(2'-O-Methylphloretin)의 분리 정제
- [0187] 상기 실시예 2에서 얻은 용매 분획 중 가장 활성이 높은 에틸아세테이트 분획 75g를 헥산: 에틸아세테이트 혼합용매 (50:1 $\rightarrow$ 1:1 v/v)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 ($\text{Ø}15 \times 70$ cm, Merk사)를 실시하여 25개의 분획(F1 ~ F25)으로 분리하고, 이들 분획 중 22번 분획(F22) 5g을 클로로포름: 메탄올 혼합용매 (50:1 $\rightarrow$ 5:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 ($\text{Ø}10 \times 70$ cm, Merk사)를 실시하였고, 이로부터 나온 5번째 분획(F22.5)을 Semiprep. HPLC (YMC-pack ODS-A, $\text{Ø}2 \times 30$ cm, 메탄올: 물 (60:40 v/v))을 실시한 결과, 하기 일반식 (2)로 표기되는 1종의 신규화합물인, 화합물 2(2mg)와 하기 일반식 (12) 내지 (13)로 표기되는 기존에 공지된 화합물들(Herath W., et al., Identification and biological activity of microbial metabolites of xanthohumol, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 51, pp.1237-1240, 2003; Barrero A F., et al., Resorcinol Derivatives and Flavonoids of Ononis natrix subspecies ramosissima, *Journal of Natural Products*, 60, pp.6568, 1997)인, 화합물 12(5mg) 및 화합물 13(10mg) 을 각각 분리하였다.
- [0188] 화합물 (2): 7-하이드록시-3-(4-하이드록시벤질)쿠마린(7-hydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)coumarin, 이하 Anemarcoumarin A라 명명함)
- [0189] 황색 가루 (Yellow powder).
- [0190] IR $_{\text{v max}}$ (KBr) 3298, 2918, 1690, 1610, 1454 cm^{-1} ;

- [0191] $UV_{\max}$ (log) (MeOH) 286 (4.2)nm;
- [0192] 1H -NMR(400MHz, CD_3OD) δ : 3.6(2H, s, H-7'), 6.68(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.73(2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.75(1H, dd, $J=2.0$, 8.4Hz, H-6), 7.10(2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.32(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 7.45(1H, s, H-3);
- [0193] ^{13}C -NMR(100MHz, CD_3OD) δ 164.3(C-2), 126.2(C-3), 141.7(C-4), 113.8(C-4a), 130.1(C-5), 114.5(C-6), 162.3(C-7), 103.1(C-8), 156.2(C-8a), 130.6(C-1'), 131.3(C-2', 6'), 116.5(C-3', 5'), 157.3(C-4'), 36.5(C-7');
- [0194] HREIMS m/z 268.0738 $[M]^+$ (calcd for $C_{16}H_{12}O_4$, 268.0735).
- [0195] 화합물 (12): 4',7-디하이드록시-5-메톡시플라바논(4',7-Dihydroxy-5-methoxyflavanone)
- [0196] 황색 가루 (Yellow powder).
- [0197] $C_{16}H_{14}O_5$.
- [0198] EI-MS: m/z (%) = 286;
- [0199] IR $\nu_{\max}$ (KBr) 3300, 1670, 1620, 1510 cm^{-1} ;
- [0200] $UV_{\max}$ (log) (MeOH) 260 (4.0)nm;
- [0201] 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.10 (2H, m, H-3), 5.31 (1H, dd, $J = 2.8$, 12.8 Hz, H-2), 5.94 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.04 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 6.76 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3',5'), 7.27 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'/H-6'), 3.73 (3H, OMe-5);
- [0202] ^{13}C -NMR (100MHz, $CDCl_3$) δ 78.0 (C-2), 44.7 (C-3), 187.7 (C-4), 162.1 (C-5), 93.1 (C-6), 164.2 (C-7), 95.5 (C-8), 104.0 (C-4a), 164.2 (C-8a), 129.3 (C-1'), 128.0 (C-2'/C-6'), 115.0 (C-3'/C-5'), 157.5 (C-4'), 55.7 (OMe).
- [0203] 화합물 (13): 2'-O-메틸플로레틴(2'-O-Methylphloretin)
- [0204] 황색 고체 (Yellow powder).
- [0205] $C_{16}H_{16}O_5$.
- [0206] UV (MeOH) max (log) 288 (3.98) nm;
- [0207] IR (KBr) 3400(br), 1670, 1620, 1510, 930 cm^{-1} ;
- [0208] EI-MS: m/z (%) = 288 $[M]^+$.
- [0209] 1H -NMR (400MHz, CD_3OD) δ 5.88 (1H, dd, $J = 8.4$, 2.0 Hz, H-5'), 5.95 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3'), 6.68 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3/5), 7.02 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2/6), 2.83, 3.15 (2H, m, H-7), 3.2 (2H, m, H-8);
- [0210] ^{13}C -NMR (100MHz, CD_3OD) δ 133.9 (C-1), 130.4 (C-2, 6), 116.3 (C-3, 5), 156.6 (C-4), 31.5 (C-7), 47.5 (C-8), 206.1 (C-9), 106.1(C-1'), 165.0 (C-2'), 92.2 (C-3'), 168.4 (C-4'), 97.1 (C-5'), 166.6 (C-6').

- [0211] 3-6. 아네말칼콘인(1Anemarchalconyn) 및 4,4'-디하이드록시칼콘(4,4'-Dihydroxychalcon)의 분리 정제
- [0212] 상기 실시예 2에서 얻은 용매 분획 중 가장 활성이 높은 에틸아세테이트 분획 75g를 헥산: 에틸아세테이트 혼합 용매 (50:1 → 1:1 v/v)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Ø15 × 70 cm, Merk사)를 실시하여 25개의 분획(F1 ~ F25)으로 분리하고, 이들 분획 중 22번 분획(F22) 5g을 클로로포름: 메탄올 혼합용매 (50:1 → 5:1)를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (Ø10 × 70 cm, Merk사)를 실시하였고, 이로부터 나온 6번째 분획 (F22.6)을 Semiprep. HPLC (YMC-pack ODS-A, Ø2 × 30 cm, 메탄올: 물 (40:60 v/v))을 실시한 결과, 하기 일반식 (3)으로 표기되는 1종의 신규화합물인, 화합물 3(2mg)과 하기 일반식 (14)로 표기되는 기존에 공지된 화합물(Ohashi H., et al., 4,4'-Dihydroxychalcone from the heartwood of *Chamaecypar isobtusa*. *Phytochemistry*, 27, pp.3993-3994, 1988)인, 화합물 14 (5mg) 을 각각 분리하였다.
- [0213] 화합물 (3): 1,3-비스(4-하이드록시페닐)프로프-2-인-1-온(1,3-bis(4-hydroxyphenyl)prop-2-yn-1-one, 이하 Anemarchalconyn라 명명함)
- [0214] 황색 가루 (Yellow powder).
- [0215] UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (loge) 286 (4.2) nm ;
- [0216] IR $\nu_{\max}$ (KBr)3350, 2193, 1620, 1159 cm^{-1} ;
- [0217] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ :6.85(2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-3' , 5'), 6.90(2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-3' , 5'), 7.55(2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-2' , 6'), 8.07(2H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-2' , 6');
- [0218] $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD_3OD) δ :178.5(C-1), 87.2(C-2), 95.7(C-3), 130.3(C-1'), 133.2(C-2' ,6'), 116.6(C-3' ,5'), 165.2(C-4'), 111.5(C-1'), 136.3(C-2' ,6'), 117.1(C-3' ,5'), 161.8(C-4');
- [0219] HREIMS m/z 238.0630 [M] $^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3$, 238.0630).
- [0220]
- [0221] 화합물 (14): 4,4'-디하이드록시칼콘(4,4'-Dihydroxychalcon)
- [0222] 황색 고체 (Yellow powder).
- [0223] $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3$.
- [0224] UV (MeOH) max (log) 234, 350 (3.98) nm;
- [0225] IR (KBr) 3500(br), 1750, 1655 cm^{-1} ;
- [0226] EI-MS: m/z (%) = 240 [M] $^+$.
- [0227] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ 6.83 (2H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-3/5), 6.88 (2H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-3' /5'), 7.55 (2H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-2/6), 7.99 (2H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-2' /6'), 7.61 (1H, d, $J = 16.0\text{ Hz}$, H-7), 7.68 (1H, d, $J = 16.0\text{ Hz}$, H-8);
- [0228] $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD_3OD) δ 132.4 (C-1), 129.8 (C-2, 6), 121.9 (C-3, 5), 156.6 (C-4), 125.3 (C-7), 145.0 (C-8), 190.5 (C-9), 134.2(C-1'), 130.1 (C-2' /6'), 120.0 (C-3'/5'), 168.4 (C-4').
- [0229] 참고예 2. 0.3% Oil-red O 염색 용액 제조

[0230] 100% 이소프로판올(isopropanol)에 0.3% 오일-레드 0(Oil-red 0)가 되도록 가루를 용해시킨 후, 용해가 잘 되기 위해서, 약 16시간 동안 계속 젖는다. 0.3% Oil-red 0 : 증류수 = 6 : 4 (v/v)의 비율이 되게 증류수를 넣고 다시 섞은 후, 3M paper로 한번 거르고, 0.2 μ m 시린지 필터(syringe filter)로 여과하고 사용한다.

[0231] 실험예 1. 지방세포 분화 억제 효과

[0232] 지방전구세포 (pre-adipocytes), 3T3-L1 세포(American Tissue Culture. Collection, ATCC)를 10% 우태아혈청 (bovine calf serum)이 들어있는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에서 세포배양 한 후, 24웰 플레이트에 웰 당 4 x 10⁴ 개수의 세포를 0.5ml에 현탁(suspension)하여 분주 (seeding) 한다. 동일 배지에서 48시간 동안 배양한 다음, 100%가 되면 5 μ g/ml 인슐린(insulin), 10 μ M 로시글라타존(Rosiglitazone), 1 μ M 텍사메타손(Dexamethasone), 10% 우태혈청(Fetal Bovine Serum)이 포함된 DMEM 배지로 갈아주고 성숙한 지방세포로의 분화를 유도한다. 이때 상기 실시예 3-1 내지 3-6에서 얻은 화합물 들을 DMSO에 녹인 후 동일 농도의 DMSO가 각각의 농도 처리군에서 사용되도록 함께 처리한 후, 대조군으로는 성숙지방세포로의 분화 억제효과 및 당뇨병을 예방하는 효과가 있다고 알려진 레스베라트롤(resveratrol, Sigma-ALdrich, 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene, 5-[(1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol)을 DMSO에 녹여 동일농도로 처리한다. 분화유도를 시작하고 48시간 후에 5 μ g/ml 인슐린(insulin)이 포함된 10% FBS/DMEM 배지로 다시 교환하면서 약물도 다시 처리하고, 48시간 후에 10% FBS/DMEM 배지로 다시 갈아준다. 성숙 지방세포로의 분화를 시작하지 7일이 되었을 때, Oil-red 0 염색을 통해 생성된 지방을 확인한다. 세포배양 액을 제거하고 세포를 PBS로 한 번 세척하는데, 이때 너무 세게 PBS를 첨가하게 되면 세포가 떨어지므로 주의한다. 10% 포르말린(Formalin)을 넣고 세포를 실온에서 1시간동안 고정시키고, 10% 포르말린(Formalin)을 제거하고 증류수로 두 번 세척하여 상기 참고예 2에서 제조한 Oil-red 0 염색 시약을 넣고 실온에서 1시간 동안 염색 한다. 염색후 염색시약을 걷어낸 후, 증류수로 세척한 뒤, 뚜껑을 열어 건조시킨 다음 이미지 스캔을 하고, 염색된 세포에 100% 이소프로판올(isopropanol) 을 넣고 10분 동안 염색시약을 녹여 낸 다음, 500 nm 파장에서 흡광도를 측정하여, 화합물과 대조군의 Oil-red 0 염색정도를 비교하며 관찰하였고, 지방세포 분화에 대한 각각의 화합물의 영향을 정량화하기 위하여 IC₅₀값은 컴퓨터(BioDataFit 1.02)를 사용하였다.

[0233] 실험결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 지방세포(adipocyte)의 분화를 억제하는 약물은 4'-O-메틸니아솔(4'-O-Methylnyasol), 2'-O-메틸이소리퀴리티게닌(2'-O-Methylisoliquiritigenin), 브로우소닌 A(Broussonin A), 2',4',4'-트리하이드록시칼콘(2',4',4'-Trihydroxychalcone)으로 나타났으며, 특히, 아네말칼콘인 (Anemarchalconyn)은 대조군으로 사용된 레스베라트롤 (Resveratrol)보다 더 낮은 농도에서 강력한 지방세포 분화 억제 효과를 나타내어, 지질대사 질환의 탁월한 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0234]

표 1

[0235]

분리된 화합물들의 지방세포분화억제율 (IC ₅₀)		
화합물		IC ₅₀
화합물 1	(E)-6-Methyleucomnal in	336.1
화합물 2	Anemarcoumarin A	nd
화합물 3	Anemarchalconyn	5.3
화합물 4	4'-O-Methylnyasol	45.9
화합물 5	Nyasol	107.8
화합물 6	Broussonin A	74.5
화합물 7	1,3-bis-di- <i>p</i> -hydroxyphenyl-4-penten-1-one	326.2
화합물 8	2',4',4'-Trihydroxychalcone	96.4
화합물 9	7,4'-Dihydroxyhomoisoflavane	>500
화합물 10	2'-O-Methylisoliquiritigenin	41.8
화합물 11	2,4',6-Trihydroxy-4-methoxybenzophenone	nd ^b
화합물 12	4',7-Dihydroxy-5-methoxyflavanone	259.7

화합물 13	2'- <i>O</i> -Methylphloretin	>500
화합물 14	4,4'-Dihydroxychalcon	>500
양성표준물질 (대조군)	레스베라톨(Resveratrol) ^a	31.4
^a 양성대조군		
^b 검출되지 않음		

[0236] 본 발명의 화합물을 포함하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명 은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0237] **제제예 1. 산제의 제조**

[0238] (*E*)-6-메틸레우코말닌((*E*)-6-Methyleucommalin) 20 mg

[0239] 유당 100 mg

[0240] 탈크 10 mg

[0241] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0242] **제제예 2. 정제의 제조**

[0243] 아네말쿠마린 A(Anemarcoumarin A) 10 mg

[0244] 옥수수전분 100 mg

[0245] 유당 100 mg

[0246] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0247] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0248] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

[0249] 아네말칼콘인(Anemarchalconyn) 10 mg

[0250] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0251] 락토오스 14.8 mg

[0252] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0253] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0254] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0255] 브로우소닌 A(Broussoinin A) 10 mg

[0256] 만니톨 180 mg

[0257] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0258] Na₂HPO₄ 12H₂O 26 mg

[0259] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플 당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0260] **제제예 5. 액제의 제조**

[0261] 4'-*O*-메틸니아졸(4'-*O*-Methylnyasol) 20 mg

[0262] 이성화당 10 g

[0263] 만니톨 5 g

[0264] 정제수 적량

[0265] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수 에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0266] **제제예 6. 건강 음료의 제조**

[0267] 2',4',4-트리하이드록시칼콘(2',4',4-Trihydroxychalcone) 100 mg

[0268] 비타민 C 15 g

[0269] 비타민 E (분말) 100 g

[0270] 젖산철 19.75 g

[0271] 산화아연 3.5 g

[0272] 니코틴산아미드 3.5 g

[0273] 비타민 A 0.2 g

[0274] 비타민 B₁ 0.25 g

[0275] 비타민 B₂ 0.3g

[0276] 물 정량

[0277] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0278] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요 국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.