(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0101332
(43) 공개일자 2022년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/87 (2006.01) *A61K 31/194* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 39/04* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/87 (2013.01)
A61K 31/194 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0003236
(22) 출원일자 2021년01월11일
심사청구일자 2021년01월11일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 후석로 325, 105동 302호(후평동, 춘천더샵 아파트)
김현용
강원도 춘천시 향교앞길 13-10 , 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이정훈, 진현정

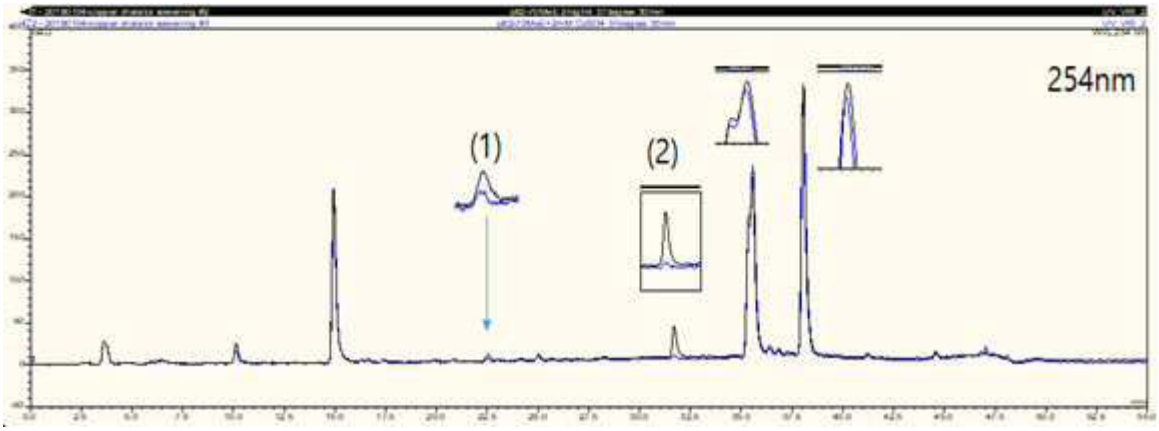
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **뮤렌베키아(Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 *Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl.* 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암, 심혈관 질환, 신경 장애, 당뇨성 합병증, 또는 망막증을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 체내 과량으로 존재하는 금속, 특히 철과 구리에 대한 킬레이션(Chelation) 효능이 우수하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 27/02 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 39/04 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
A61K 2236/30 (2013.01)

(72) 발명자
조광례
강원도 춘천시 한림대학길 1
이수경
강원도 춘천시 우석로85번길 1
김강혁
강원도 춘천시 후석로228번길 47, 301동 103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345314742
과제번호	2018R1D1A1A09081945
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인기초연구지원사업(기본연구)
연구과제명	식량자원으로부터 최종당화산물 억제소재 도출을 위한 신규의 효율적 분석법 개발 및 억제성분 규명에 관한 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

뮤렌베키아(Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl.)의 추출물을 유효성분으로 함유하는 암, 심혈관 질환, 신경 장애, 당뇨성 합병증, 또는 망막증을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 뮤렌베키아에 물, C_1 내지 C_4의 직쇄 또는 분지형 알코올, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 1종 이상의 용매를 가하여 50 내지 70 ℃에서 2 내지 4시간 동안 추출된 것인 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 70% 농도의 에탄올로 추출한 것인 약제학적 조성물.

청구항 4

제4항에 있어서,

상기 추출물로부터 크로마토그래피(Chromatography)에 의하여 분리된 분획물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 분획물은 클로로포름($CHCl_3$)과 메탄올의 혼합 용액, n-헥산과 에틸아세테이트의 혼합 용액 및 에틸아세테이트와 메탄올의 혼합용액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종의 용매를 사용하여 크로마토그래피(Chromatography)로 분리한 것인 약제학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 크로마토그래피에 의한 분리는

a) 산도조절-향류크로마토그래피(pH-zone-refining counter-current chromatography)에 의한 1차 분리 단계; 및

b) 고속향류크로마토그래피(high-speed counter-current chromatography)에 의한 2차 분리 단계를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 a) 산도조절-향류크로마토그래피의 용매 시스템은 에틸아세테이트와 n-부탄올을 포함하는 제1 용매 및 메탄올과 물을 포함하는 제2 용매를 사용하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 b) 고속향류크로마토그래피의 용매 시스템은 n-헥산, 에틸아세테이트, 메탄올 및 물을 사용하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

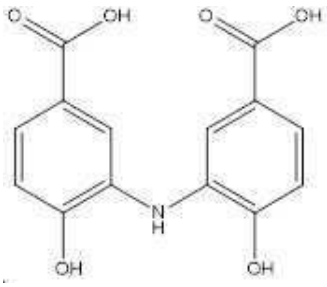
상기 용매 시스템은 n-헥산: 에틸아세테이트: 메탄올: 물을 2:5:2:5 부피비로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 분획물의 유효성분 중 하나가 하기 화학식 1의 구조를 갖는 4,4'-디하이드록시-3,3'-이미노-디-벤조산인 것인 약제학적 조성물.

<화학식 1>



청구항 11

제10항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물이 철 이온 및 구리 이온에 대한 킬레이션 효능을 갖는 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 약학적 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 뮤렌베키아(*Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl.*) 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암, 심혈관 질환, 신경 장애, 당뇨성 합병증 또는 망막증을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 철과 구리와 같은 금속 이온에 의해 촉진되는 것으로 알려져 있는 생리적 산화 환원 반응(Redox-active metal ion)은 체내 생체 반응에 치명적이다.

[0004] 생물학적 시스템에 대해 수행된 많은 연구에 따르면, 철 및 구리와 같은 산화 환원 활성 금속 및 기타 전이 금속은 산화 환원 순환 반응을 겪고 활성산소종(ROS) 또는 반응성질소종(RNS)이라고 하는 활성 자유 라디칼을 생성할 수 있다. 이러한 ROS 및 RNS의 가장 대표적인 예는 각각 생물학적 시스템에서 이중 역할을 하는 슈퍼 옥사이드 음이온 라디칼과 산화질소에 해당한다. 낮거나 중간 농도의 ROS 및 RNS에서는 감염원에 대한 방어, 다수의 세포 신호 전달 경로 및 기타 중요한 생물학적 과정과 같은 많은 생리적 역할에 관여할 수 있으나, 고농도의 ROS와 RNS는 DNA, 막 지질 및 단백질과 관련된 생체 분자 손상의 중요한 매개체가 될 수 있다.

[0005] 생물학적 시스템에서 발생하는 가장 해로운 ROS 중 하나는 미량의 철, 구리 및 기타 금속 (Fenton 반응)에 의해 촉매되는 과산화수소 분해를 통해 형성된 하이드 록실 라디칼이다. 하이드록실 라디칼은 DNA 분자와 반응하여 8-OH-Guanine 부가물을 형성하는 것으로 알려져 있으며, 이는 유기체의 산화 스트레스에 대한 바이오 마커이자 발암의 잠재적 바이오 마커이다. 즉, 체내 과도한 산화 환원 활성 금속은 암, 심혈관 질환, 신경 장애(알츠하이머 병, 파킨슨 병 등), 당뇨성 합병증, 망막증 등의 발생과 관련된다.

[0006] 이에 따라, 자유 라디칼의 유해한 작용에 대한 다양한 보호 항산화 네트워크에 대한 논의가 시급하다. 이전 연구에 따르면 금속 이온에 대한 킬레이터는 금속 유발 산화 스트레스 관련 증상을 완화할 수 있다고 한다('Potential Treatment of Retinal Diseases with Iron Chelators, Pharmaceuticals 2018, 11, 112 및'Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy', Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 1069 참조).

[0007] 이에 본 발명자들은 뮤렌베키아(*Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl.*) 추출물 및/또는 이의 분획물이 철과 구리에 대한 킬레이션(Chelation) 효능이 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 'Potential Treatment of Retinal Diseases with Iron Chelators, Pharmaceuticals 2018, 11, 112

(비특허문헌 0002) 'Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy', Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 1069

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서, 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 뮤렌베키아 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 뮤렌베키아 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암, 심혈관 질환, 신경 장애, 당뇨성 합병증, 또는 망막증을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물 및 이를 포

함하는 약학적 제제를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 뮤렌베키아 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 체내 과량으로 존재하는 금속, 특히 철과 구리에 대한 킬레이션(Chelation) 효능이 우수하다.

[0015] 따라서, 뮤렌베키아 추출물 및/또는 이의 분획물의 유효성분을 암, 심혈관 질환, 신경 장애, 당뇨성 합병증 및 망막증에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 약학적 제제로 적용하기에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 뮤렌베키아 추출물이 구리 이온에 대한 킬레이션 반응을 나타내는 HPLC offline 결과 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 뮤렌베키아 추출물이 철 이온에 대한 킬레이션 반응을 나타내는 HPLC offline 결과 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 뮤렌베키아 추출물을 산도조절-향류크로마토그래피(pH-zone-refining CCC)를 이용하여 분리한 결과 그래프로서, (A) pH-zone-refining CCC 크로마토그램, (B) 추출물의 HPLC 크로마토그램 및 유효성분을 함유하는 pH-zone-refining CCC 분획물의 HPLC 크로마토그램이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 뮤렌베키아 추출물의 분획물을 고속향류크로마토그래피(HSCCC)를 이용하여 분리한 결과 그래프로서, (A) HSCCC 크로마토그램, (B) 유효성분을 함유하는 pH-zone-refining CCC 분획물(fractions 74-78)의 HPLC 크로마토그램 및 유효성분을 함유하는 HSCCC 분획물(fractions 78-79)의 HPLC 크로마토그램이다.

도 5 내지 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 뮤렌베키아 추출물의 분획물을 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)을 이용하여 분석 그래프이다.

도 9 내지 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 뮤렌베키아 추출물의 분획물로부터 분리하여 얻은 화합물 DIDBA가 구리/철 이온에 대하여 갖는 킬레이션 효능을 나타내는 검정 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 *Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl.* (이하,'뮤렌베키아'이라 함) 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0021] 상기 뮤렌베키아 는 다년생의 포도나무(관목 또는 덩굴)인 Muehlenbeckia 속에 속하는 식물의 일종으로, 원산지는 멕시코, 베네수엘라, 볼리비아 등의 남미와 북미, 태평양 국경 그리고 유럽 등지이다. 종에 따라 성장 습관이 다양하며, 상세 불명의 의학적 장애를 치료하는데 사용된 적이 있는 것으로만 알려져 있다.

[0022] 한편, 아직까지 상기의 뮤렌베키아 추출물 및/또는 이의 분획물을 이용하여 약제학적 조성물로 개발하거나 시도된 사례는 없으나, 본 발명에서는 뮤렌베키아 추출물 및/또는 이의 분획물이 철과 구리에 대하여 우수한 킬레이션 효능이 있음을 확인하고, 본 연구를 완성하였다.

[0023] 본 발명에서 사용된 뮤렌베키아 는 그 형태에 특별한 제한이 없으며, 본 발명의 조성물은 뮤렌베키아로부터 얻어진 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명에서 용어"추출물"은 천연물로부터 분리된 활성 성분을 의미하며, 여기서는 상기 뮤렌베키아 로부터 분리된 물질을 의미한다.

[0025] 상기 뮤렌베키아 추출물은 물 및 C_1 내지 C_4의 직쇄 또는 분지형 알코올 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군에서

선택된 1종 이상의 용매를 이용하여 통상의 천연물 추출 방법에 의해 얻어진 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 효과적인 킬레이션 효과를 달성하기 위하여, 뮤렌베키아 를 50 내지 80 %(v/v) 에탄올로 추출하여 얻어진 에탄올 추출물일 수 있다.

[0027] 상기 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 바람직하게는 가온추출법, 가압추출법, 환류추출법, 온침추출법, 용매추출법, 초음파분쇄 추출법 등에 의할 수 있고, 바람직하게는 용매추출법에 의할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 용어 "분획물"은 추출물의 활성 성분을 분획한 것으로, 여기서는 상기 뮤렌베키아 추출물을 크로마토그래피를 통해 여러 개로 분리시킨 일부분을 의미한다.

[0029] 크로마토그래피(chromatography)란, 복잡한 혼합물을 분리 또는 분석하기 위해 이용되는 기법중의 하나이다. 이 기법은 다양한 방법을 포함하나, 공통적인 특징은 이동상과 고정상의 두 가지 재료를 포함한다. 여기서, 분리 또는 분석하려는 대상인 혼합물 시료를 이동상 중에 도입하고, 이동상과 함께 거시적으로 고정상 내부를, 미시적으로는 고정상을 구성하는 부재의 표면과 접하면서 이동시킨다. 이때, 여러 가지 성분으로 혼합된 성분인 시료(샘플)중의 각각의 성분들은 고정상에 대한 친화성이 서로 다르기 때문에 고정상을 통과하는 속도가 각 성분마다 다르게 되며, 친화성이 강할수록 통과속도가 늦어지게 된다.

[0030] 이러한 크로마토그래피는 이동상과 고정상의 조합의 선택에 의해 몇 가지 종류로 분류된다. 그 중에서 이동상을 시료가 용해 가능한 액체인 용매로 하는 것을 액체 크로마토그래피(liquid chromatography)라고 하는데, 적용할 수 있는 분석시료가 많기 때문에 상당히 유효한 수단으로서 널리 이용되고 있다.

[0031] 본 발명에서 사용하는 상기 크로마토그래피는 용해도, 크기, 이온, 전하(극성), 소수성 또는 친화성에 따른 분획물의 분리를 수행할 수 있는 것이면 어느 것이나 가능하나, 바람직하게는 향류크로마토그래피일 수 있다.

[0032] 향류크로마토그래피는 Itoh에 의해 개발되었는데, 고정상과 이동상으로 모두 액체를 사용하는 액체-액체 분배크로마토그래피(liquid-liquid partition chromatography)의 일종으로, 최근 천연 물질을 분리하는데 이용되고 있다. 향류크로마토그래피를 이용하여 물질을 분리할 경우에는 물질의 화학적 특성 (특히, 용해도)에 따라 고정상 및 이동상을 구성하게 될 용매의 종류와 조성이 달라져야 하며, 또한 선택된 용매를 이용하여 크로마토그래피를 수행하는 과정에서 분리 효율과 시간을 향상시키기 위한 조건도 설정되어야 한다.

[0033] 본 발명에서는 고속향류크로마토그래피(high-speed counter-current chromatography, 이하 HSCCC라 함)법과 산도조절-향류크로마토그래피(pH-zone-refining counter-current chromatography, 이하 pH-CCC라 함)법을 적용함으로써 천연물로부터 핵심 유효성분을 분리한다.

[0034] 천연물 분리에 일반적으로 사용되는 HSCCC법은 서로 섞이지 않고 혼합 후 2개의 층(상층액과 하층액)으로 분리되는 용매시스템을 이용한 것으로서, 중력장 하에서 높은 이동상 속도와 높은 분리효율과 짧은 분리시간을 특징으로 하고 있다. 분리되는 2개의 층에 한 층을 이동상으로, 또 다른 한 층을 고정상으로 하여 고체 지지체가 없이 물질을 분리 및 정제 가능하며(Ito Y J. Chromatography, 147, p.221, 1978), 분배 과정은 한 개의 모세관 내에서 연속적으로 일어나도록 고안되어, 칼럼은 PTFE (polytetrafluoroethylene)튜브가 다층으로 감겨 있는 원통형의 홀더 3개가 회전과 공전을 통해 튜브의 꼬임을 방지하는 시스템이다. 고정상을 액체로 사용함으로써 기존 분리 방법에서 시료의 고체 고정상에 대한 흡착으로 인한 손실, 고체 고정상과의 반응으로 인한 물질의 변형 등을 막을 수 있고, 빠른 시간에 대량의 시료를 분리할 수 있는 점 및 분리 비용의 저렴성 등의 많은 장점을 지니고 있다. 또한, 재사용이 한정되어 있는 값비싼 칼럼을 사용하지 않아도 되며, 용매의 사용량을 대폭 줄일 수 있는 장점이 있다.

[0035] HSCCC에 이용되는 용매는 통상적으로 유기용매, buffer 등 제한없이 사용 가능하나, 많이 사용되는 구성은 n-헥산: 에틸아세테이트: 메탄올: 물 구성이다. 본 발명의 일 실시예에서는 n-헥산: 에틸아세테이트: 메탄올: 물 = 2:5:2:5 부피비로 구성하여 사용할 수 있다.

[0036] 또한, 상기 pH-CCC법은 pH GRADIENT와 같이 버퍼용매를 이용하는 기술로서, 소수성에 따라 유기산과 염기를 분리 가능하다. 1991년 시료 용액의 유기산이 산 분석물의 날카로운 피크를 형성한다는 우연한 발견을 통해 pH-zone-refining CCC라는 새로운 용출 모드가 도입된 바 있다. 이 날카로운 피크 형성의 원인은 산성 분석물을 포획하기 위해 날카로운 후행 경계를 형성하는 시료 용액에 존재하는 브로모아세트산 때문인 것으로 밝혀졌다. DNP- 아미노산의 분리에 대한 추가 연구에 따르면 시료의 크기가 증가하면 융합된 직사각형 피크가 형성되고, 각 피크는 날카로운 경계로 높은 순도와 pH 구역을 보존하는 경향을 갖는 것으로 나타났다. 이러한, pH-CCC법은

기존 HSCCC법에 비해 시료 로딩 용량이 10배 이상이며, 분획은 포화 수준 근처에 고도로 집중되어 있다.

[0037] pH-CCC에 이용되는 용매는 통상적으로 사용되는 다양한 용매를 포함하지만, 바람직하게는 n-헥산: 에틸아세테이트: 메탄올: 물 구성에 pH를 조정한 용매를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 에틸아세테이트: n-부탄올 = 4:1 부피비 및 메탄올: 물 = 1:5 부피비로 구성하여 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 상기 분획물은 뮤렌베키아 추출물로부터 크로마토그래피에 의하여 분리되나, 바람직하게는 pH-CCC에 의한 1차 분리 단계를 거친 후, HSCCC에 의한 2차 분리 단계를 통해 분획물을 획득할 수 있다. 구체적으로는 pH-CCC에 의해 1차적으로 분획하고, 상기 분획물을 HSCCC에 의해 2차적으로 분획함으로써 분획물 내 핵심 유효성분만을 분리한다. 이와 같이, 상이한 방식의 크로마토그래피에 의하여 연속적 분리를 수행함으로써, 천연물로부터 핵심 유효성분의 분리가 가능하며, 분리 수율을 향상시킬 수 있다.

[0039] 아울러, 상기한 바와 같이 추출된 추출물 및/또는 이의 분획물은 이후 감압 여과 과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결 건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다. 따라서, 본 발명에서의 추출물은 통상적 방법으로 건조된 건조물과 통상적 방법으로 농축된 농축물을 포함하는 의미로 사용된다.

[0040] 이하, 본 발명의 뮤렌베키아 로부터 얻어진 추출물 및/또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물 및 이의 제조 방법을 구체적으로 하기의 다양한 실시예를 통하여 상세히 설명한다.

[0042] **실시예 1. 추출**

[0043] 뮤렌베키아(Muehlenbeckia volcanica (Benth.) Endl.)를 세척 및 건조시켜 준비하였다. 준비된 뮤렌베키아 331 g에 70% 에탄올 4 L를 가하여 25 ℃에서 48 시간 추출 진행 후, 이를 여과하여 추출액을 얻었다. 상기와 같은 추출 과정을 2회 반복하여 얻어진 추출액을 37 ℃의 온도에서 감압 농축 후, 동결 건조하여 분말상의 뮤렌베키아 추출물(71g, 21.45 %)을 수득하였다.

[0045] **실험예 1. 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 킬레이션 효능 분석**

[0046] 상기 실시예 1에서 수득한 뮤렌베키아 추출물의 킬레이션 효능을 분석하기 위하여, HPLC(high performance liquid chromatography) 분석을 실시하였다.

[0047] HPLC 조건은 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 80 Åcolumn (4.6 X 150 mm, 5 μm)을 이용하여 분석되었으며, 기기는 Dionex equipment(Sunnyvale, CA, USA)를 사용하였다. 0.1% trifluoroacetic acid (A)와 methanol(B)를 용매로 유속 0.7 mL/min의 조건이 적용되었다. 용매 시스템은 5-25% B (0-15 min); 25-60% B (15-40 min); 60-100% B (40-43 min); 100-5% B (43-45 min); 5% B (45-55 min)으로 구성되었다. 파장은 250 nm 또는 254 nm가 사용되었다.

[0049] **1-1. Cu^{2+} 킬레이션 HPLC 오프라인**

[0050] buffer 150 ul에 sample 50 ul, $CuSO_4$ 50 ul를 혼합 후, 37 ℃에서 30분 동안 반응시킨 뒤 1분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 이때 최종 시료농도는 2 mg/ml, Cu^{2+}는 2 mM이었다. HPLC injection volume은 15 ul로 하여, 분석한 HPLC 오프라인 결과를 도 1에 도시하였다.

[0051] 도 1에서 보면, 참고로 그래프에 있는 HPLC 크로마토그램의 검은색선은 킬레이트하기 전 시료의 크로마토그램이고, 파란색선은 구리 이온과 킬레이션 반응을 한 후에 결과를 보여주는 크로마토그램이다.

[0052] 여기서 피크 (1)과 피크 (2)의 면적 차이가 현저하게 줄어든 것을 볼 수 있는데, 이는 이 두개의 물질이 구리 이온과 킬레이트를 형성하여 원래 나타나는 피크의 면적이 줄어든 것을 의미한다.

[0054] **1-2. Fe^{2+} 킬레이션 HPLC 오프라인**

[0055] buffer 300 ul에 sample 200 ul, Fe^{2+} 500 ul(450 um)를 혼합 후, 37 ℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 0.22 um 필터 멤브레인으로 여과시켰다. 이때 시료 최종 농도는 10 mg/mL이었다. 상기 필터된 시료를 HPLC를 이용하여 분석하였고, injection volume은 20 uL로 하였다. 분석한 HPLC 오프라인 결과를 도 2에 도시하였다.

[0056] 도 2에서 보면, 그래프에 있는 HPLC 크로마토그램의 검은색선은 킬레이트하기 전 시료의 크로마토그램이고, 파란색선은 구리 이온과 킬레이션 반응을 한 후에 결과를 보여주는 크로마토그램이다.

[0057] 여기서 피크 (1)과 피크 (2)의 면적 차이가 현저하게 줄어든 것을 볼 수 있는데, 이는 이 두개의 물질이 철 이온과 킬레이트를 형성하여 원래 나타나는 피크의 면적이 줄어든 것을 의미한다.

[0059] **실험예 2. 효능 물질의 분리**

[0060] 효능물질 분리는 1차 분리로 산도조절-향류크로마토그래피(pH-zone-refining CCC)와 2차 분리로 고속향류크로마토그래피(high-speed CCC)를 통해 수행되었으며, TBE 300C HSCCC system(Tauto Biotech. Co., Ltd., Shanghai, China)에 3가지 코일 (diameter of tube: 2.6 mm; total volume: 300 mL)을 적용하여 진행되었다. Isolera FLASH 정화 시스템(Biotage, Uppsala, Sweden)은 펌프, UV 모니터, 자동 분수 수집기가 구축된 HSCCC system으로 구성되었다.

[0062] **2-1. 산도조절-향류크로마토그래피(pH-zone-refining CCC)를 활용한 분리방법**

[0063] (1) 분리용매 구성: 용매 시스템은 (에틸아세테이트/n-부탄올 4:1, v/v)/ (메탄올/물 1:5, v/v)가 사용되었다. 2L의 용매 시스템이 용매분획을 통해 준비되었으며, 이후 용매는 상층액과 하층액으로 분리되었다. 상층액은 26 mM의 트리플루오로 아세트산을 포함하였으며 고정상으로 이용되었고, 하층액은 45 mM의 암모니아 용액을 포함하였고 이동상으로 사용되었다. 모든 용매는 20분간 초음파 처리하여 가스가 제거되었다.

[0064] (2) 시료 준비: 5.29 g의 추출물은 13 mL의 상층액(트리플루오로 아세트산 포함)과 6 mL의 하층액(암모니아 미포함)에 용해하였다. 시료는 초음파처리 후 4000 rpm에서 20분간 원심분리 되었고, 상등액이 분리를 위해 사용되었다.

[0065] (3) 분리: HSCCC 코일을 고정상으로 충전 후, 850 rpm의 속도로 회전을 시작하였다. 시료를 주입한 후 이동상을 3 mL/min의 속도로 넣어주면서 분리 공정을 진행하였다. 분리물은 UV 흡광도(250nm)로 측정되고 기기에 의해 자동으로 수집값(collection)이 확인되었다(도 3 참조).

[0066] (4) 결과: 분리 후 203 mg의 타겟층이 확보되었다(fraction 74-78).

[0067] 도 3에는 pH-zone-refining CCC에 의한 효능 물질의 분리 결과 그래프를 나타낸다. 여기에서 그래프 (A)는 pH-zone-refining CCC 크로마토그램, (B)는 상기 추출물 및 효능 물질을 함유하고 있는 CCC 분획물의 HPLC 크로마토그램이다.

[0068] 이 결과를 추출물의 HPLC 패턴과 비교하여 보면, fraction 74-78 수집값에서 유효성분이 다량 보유되어 있음을 확인할 수 있다.

[0070] **2-2. 고속향류크로마토그래피(HSCCC)를 활용한 분리 방법**

[0071] (1) 분리용매 구성: 용매 시스템은 (n-헥산/에틸아세테이트/메탄올/물 (2:5:2:5, v/v))가 사용되었다. 2L의 용매 시스템이 용매분획을 통해 준비되었으며, 이후 용매는 상층액과 하층액으로 분리되었다. 상층액과 하층액은 각각 고정상과 이동상으로 사용되었다. 모든 용매는 20분간 초음파 처리하여 가스가 제거되었다.

[0072] (2) 시료 준비: 앞서 확보된 200 mg의 fraction 74-78 수집값을 5 mL의 상층액과 7 mL의 하층액에 용해하여 준비하였다.

[0073] (3) 분리: HSCCC 코일을 고정상으로 충전 후, 860 rpm의 속도로 회전을 시작하였다. 이후 이동상을 3 mL/min의 속도로 이동상이 column outline으로 용출되는 유체역학적 평형 상태를 이룰 때까지 주입하였다. 이후 시료를 주입하고, 3 mL/min의 속도로 분리가 진행되었다. 용출되는 분리물은 UV 흡광도(250nm)로 측정되고, 기기에 의

해 자동으로 수집값(collection)이 확인되었다(도 4 참조).

[0074] (4) 결과: 16 mg의 target 물질이 확보되었다(fraction 78-79).

[0075] 결과적으로, 1차로 분획된 fraction 78-79 로부터 2차로 산도조절-향류크로마토그래피를 통한 분리 결과, 단일 피크의 순수물질을 확보할 수 있다.

[0077] **실험예 3. 효능 물질의 구조동정**

[0078] 상기 실험예 2에서 분리한 효능물질의 구조를 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)을 이용하여 동정하고, 그 결과를 도 5 내지 8에 도시하였다.

[0079] 도 5는 ^{1}H NMR (600 MHz, MeOD-d_4) 분광기에 의하여 M. volcanica로부터 얻은 4,4'-디하이드록시-3,3'-이미노-디-벤조산인의 스펙트럼이다.

[0080] 도 6은 ^{13}C NMR (150 MHz, MeOD-d_4) 분광기에 의하여 M. volcanica로부터 얻은 4,4'-디하이드록시-3,3'-이미노-디-벤조산인의 스펙트럼이다.

[0081] 도 7은 HMBC NMR 분광기에 의하여 M. volcanica로부터 얻은 4,4'-디하이드록시-3,3'-이미노-디-벤조산인의 스펙트럼이다.

[0082] 도 8은 High resolution ESI-MS (TOF, positive ion) m/z: 290.0663 [M+H]+ (calculated for $C_{14}H_{12}NO_6^+$ 290.0665); 312.0487 $[M+Na]^+$, (calculated for $C_{14}H_{11}NO_6Na^+$ 312.0484) 이다.

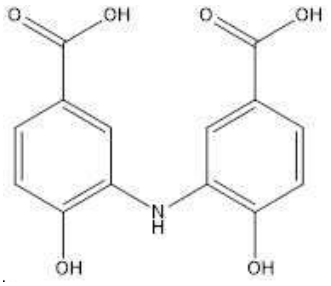
[0084] **NMR data**

[0085] ^{1}H-NMR. 600 MHz (MeOD-d_4) δ_H: 7.88 (2H, d, J= 2.0 Hz, 2, 2'-H), 7.49 (2H, dd, J=8.3 Hz, 2.0 Hz, 6, 6'-H), 6.87 (2H, d, J= 8.3 Hz, 5, 5'-H).

[0086] ^{13}C NMR. 150 MHz (MeOD-d_4) δ_C: 170.63 (C-7), 152.98 (C-4), 132.75 (C-3), 124.66 (C-6), 123.40 (C-1), 118.57 (C-2), 115.15 (C-5).

[0088] 구조동정 확인 결과, 분리된 물질은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 4,4'-디하이드록시-3,3'-이미노-디-벤조산인(compound (2, DIDBA))인 것으로 M. volcanica 추출물로부터 킬레이션 효능을 갖는 유효성분의 물질과 구조를 규명하였다.

[0089] <화학식 1>

[0090] 

[0091] **실험예 4. 구리/철 이온에 대한 킬레이션 효능 분석**

[0092] **4-1.구리 이온에 대한 킬레이션 검정**

[0093] 96 웰 플레이트에 buffer 174 ul에 시료 26 ul, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 용액 30 ul를 배합 후, 5분간 혼합시켰다. 이후, Pyrocatechol violet 30 ul를 첨가하고 5분간 혼합한 후, 25 ℃에서 10분 동안 반응시켰다. 흡광도(λ)는 632

nm에서 측정하였다. 양성대조군 1은 EDTA, 양성 대조군 2는 quercetin을 사용하였다.

[0095] **4-2. 철 이온에 대한 킬레이션 검정**

[0096] 96 웰 플레이트에 buffer 184 ul에 시료 26 ul, $FeSO_4$ 용액 20 ul를 배합 후, 5분간 혼합시켰다. 이후, ferrozine solution 30 ul를 첨가하고 5분간 혼합시킨 후 25 ℃에서 10분 동안 반응시켰다. 흡광도(λ)는 570 nm에서 측정하였다. 양성대조군 1은 EDTA, 양성대조군 2는 quercetin을 사용하였다.

[0098] **4-3. 구리/철 이온에 대한 킬레이션 정도 분석**

[0099] 4,4'-디하이드록시-3,3'-이미노-디-벤조산인(DIDBA)와 구리 이온 및 4,4'-디하이드록시-3,3'-이미노-디-벤조산인(DIDBA)와 철 이온과의 킬레이션 정도를 평가하기 위하여, 대조군으로 Quercetin, EDTA를 사용하여 평가하고, 그 결과를 하기 표 1 및 도 9 내지 10에 나타내었다.

표 1

[0100]

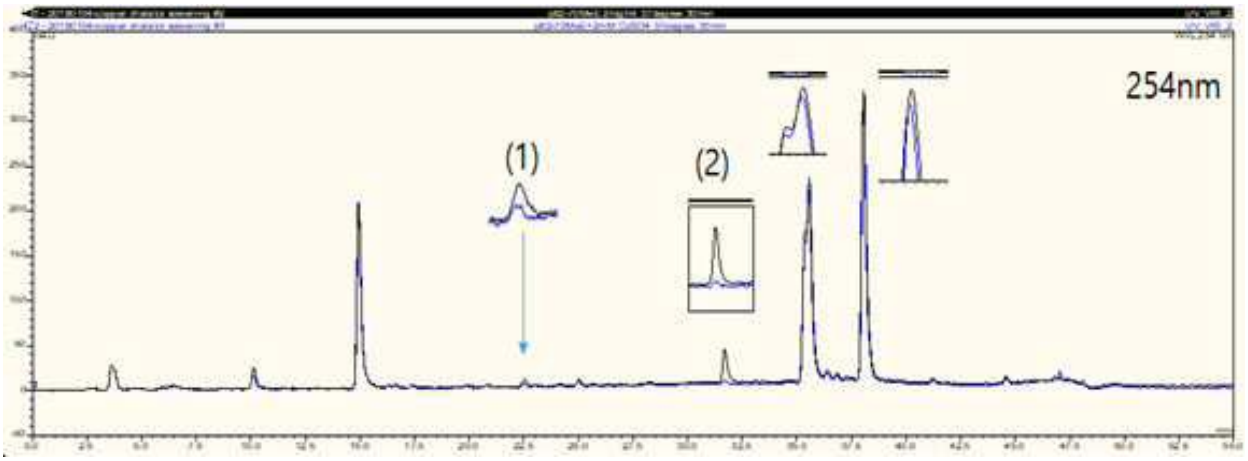
Compound	IC_{50}, μM	
	Fe^{2+} chelation	Cu^{2+} chelation
Quercetin	18.50	33.68
EDTA	10.80	25.59
DIDBA	2.35	44.07

[0102] 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따라 M. volcanica 추출물로부터 분리하여 얻은 화합물 DIDBA는 구리 이온과 철 이온에 대하여 킬레이션 효능이 있음을 볼 수 있으며, 특히 철 이온에 대한 킬레이션 효능은 EDTA의 5배 정도로 우수함을 확인할 수 있다.

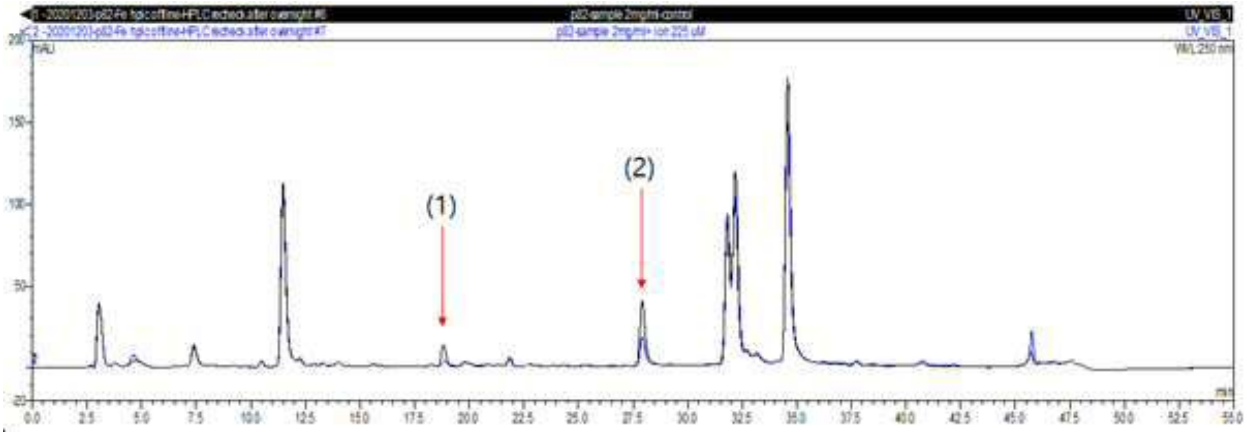
[0104] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

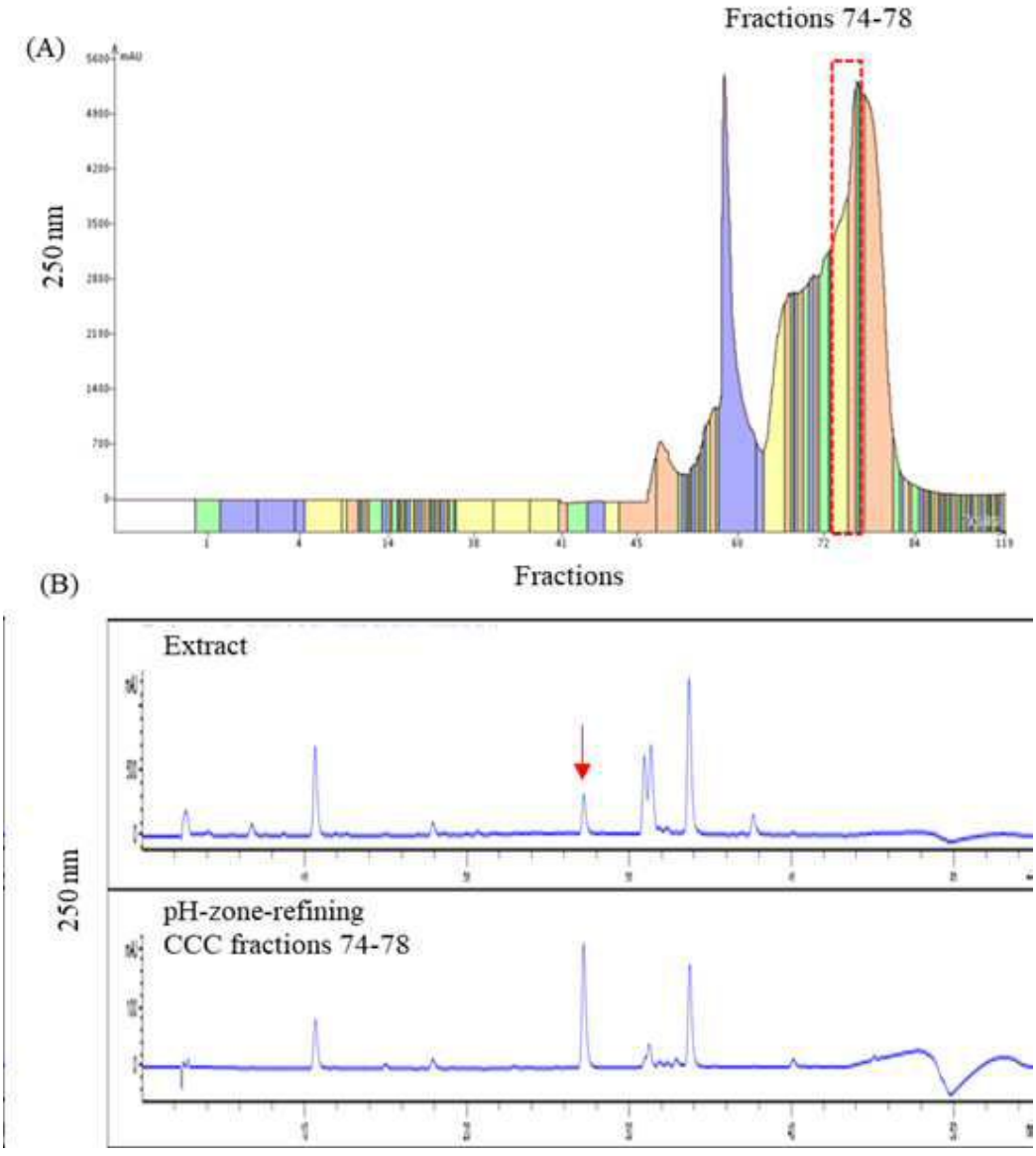
도면1



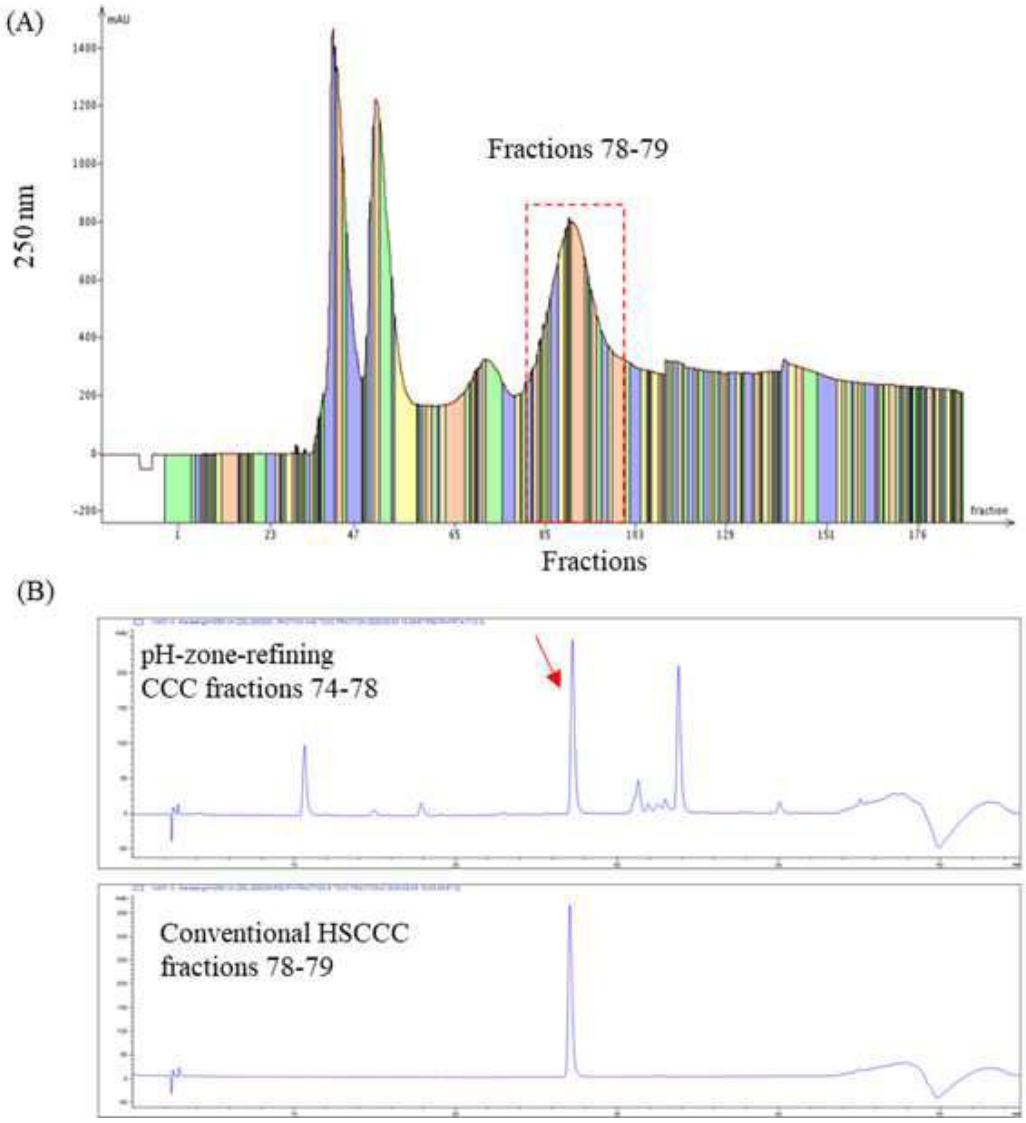
도면2


(1)
(2)

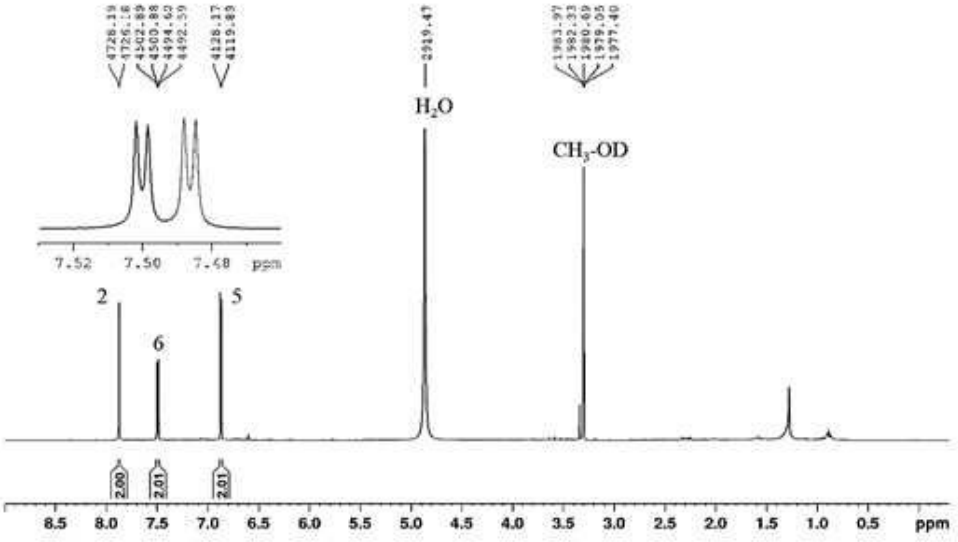
도면3


(A)
Fractions 74-78
250 nm
Fractions
(B)
Extract
pH-zone-refining
CCC fractions 74-78
250 nm

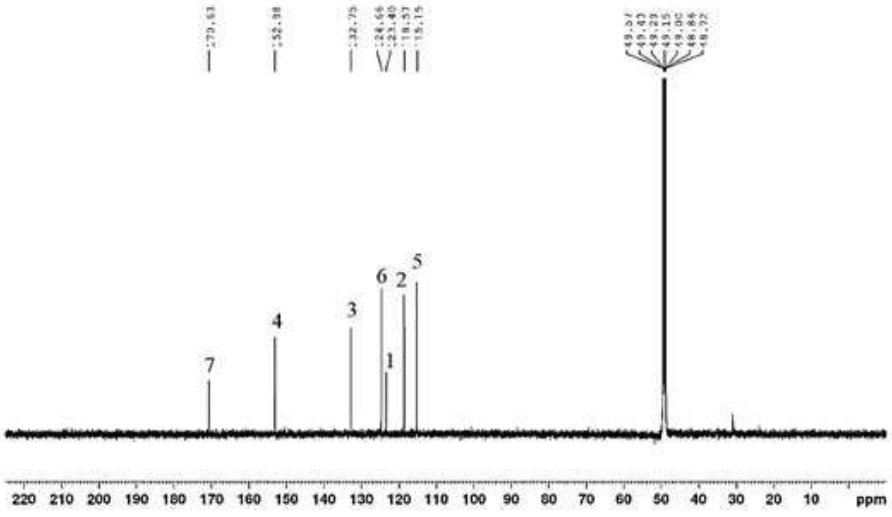
도면4


(A)
mAU
250 nm
Fractions 78-79
Fractions
(B)
pH-zone-refining
CCC fractions 74-78
Conventional HSCCC
fractions 78-79

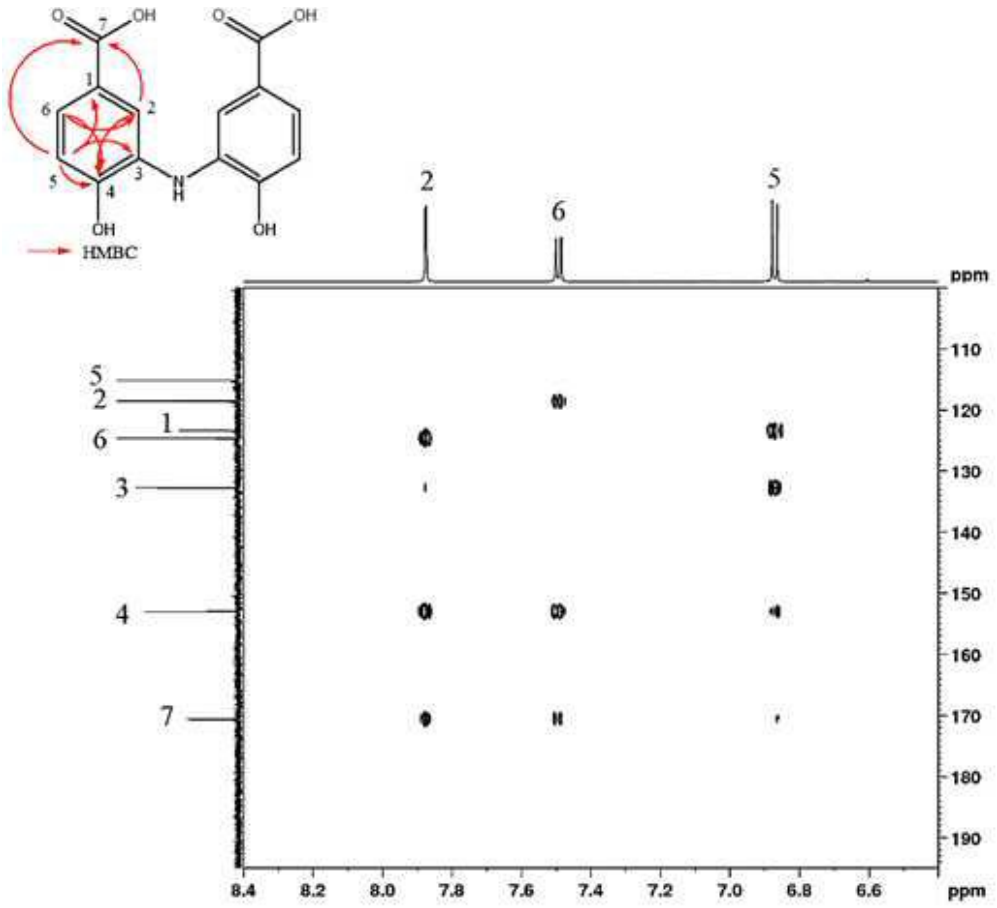
도면5


H2O
CH3-OD
2
6
5
7.52
7.50
7.48
ppm
2.00
2.01
2.01
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
ppm

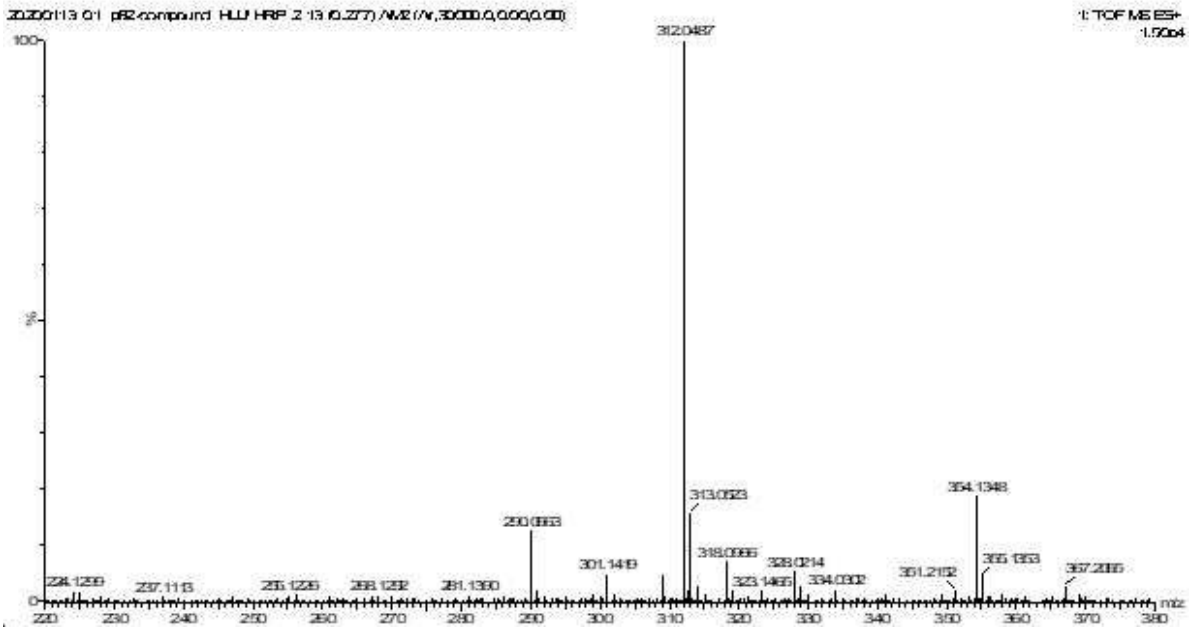
도면6


7
4
3
6
2
1
5
220
210
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
ppm

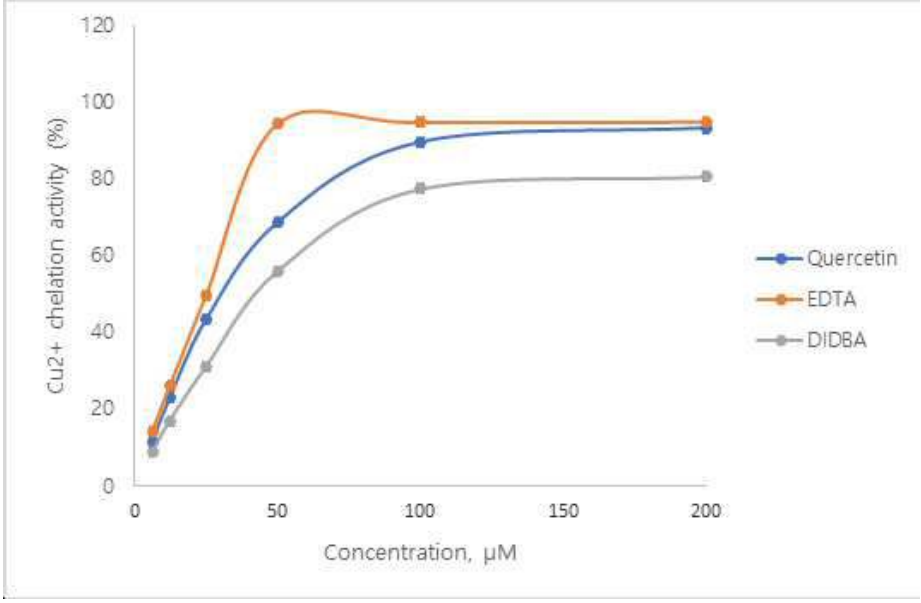
도면7


HMBC
2
6
5
ppm
110
120
130
140
150
160
170
180
190
8.4
8.2
8.0
7.8
7.6
7.4
7.2
7.0
6.8
6.6
ppm

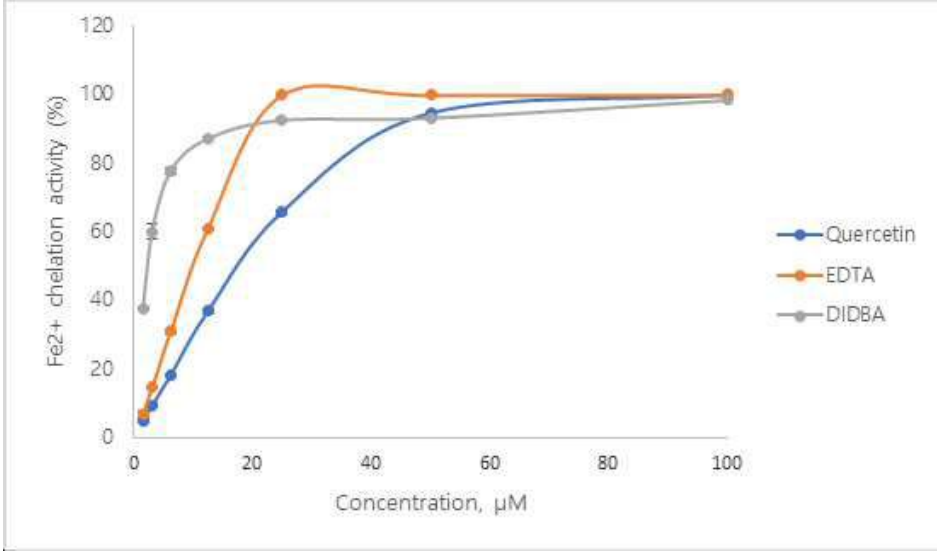
도면8


312.0487
313.0523
354.1348
290.0863
301.1419
318.0096
328.0214
355.1353
367.2089
228.1259
237.1113
235.1229
288.1252
281.1390
323.1465
394.0302
351.2152
m/z

도면9


120
100
80
60
40
20
0
Cu2+ chelation activity (%)
0
50
100
150
200
Concentration, μM
Quercetin
EDTA
DIDBA

도면10


120
100
80
60
40
20
0
Fe2+ chelation activity (%)
0
20
40
60
80
100
Concentration, μM
Quercetin
EDTA
DIDBA