



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0008424
(43) 공개일자 2020년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/185 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 31/7004 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0082516

(22) 출원일자 2018년07월16일

심사청구일자 2018년07월16일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

백남인

경기도 화성시 동탄순환대로21길 53 1306동 403호(청계동, 롯데캐슬 알바트로스)

고정환

경기도 고양시 덕양구 호국로 1059-72

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 14 항

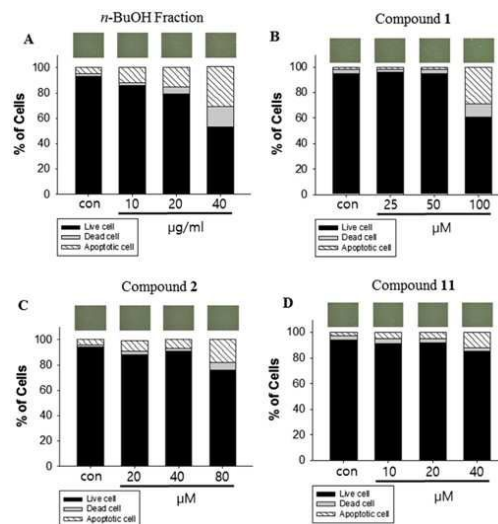
(54) 발명의 명칭 아욱 유래 글리코실 글리세라이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아욱(*Malva verticillata*) 추출물, 이의 분획물, 이들로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 식품 조성물; 및 상기 화합물의 제조방법 등에 관한 것이다.

본 발명의 아욱 추출물, 이의 분획물, 이들로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물은 다양한 암 세포에 대해 세포독성을 나타내고 세포사멸을 유도하는바, 암의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 등으로 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 31/7004 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자

강세찬

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 국제경영대학
325호(서천동)

조세민

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교

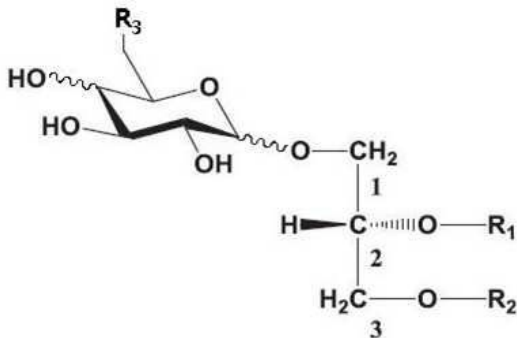
명세서

청구범위

청구항 1

아욱(*Malva verticillata*) 추출물, 이의 분획물, 이들로부터 분리한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R_1 은 -H, 리놀레노일(linolenoyl), 팔미토일(palmitoyl) 또는 스테아로일(stearoyl)이고; R_2 는 리놀레노일, 팔미토일 또는 스테아로일이고; R_3 는 $-SO_3^-$, -OH 또는 글리코실(glycosyl)인, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출된 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 C1 내지 C4의 알코올은 메탄올인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분획물은 n-부탄올 분획물인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화합물은 (2S)-1-O-(6-데옥시-6-설폰)- α -D-글루코피라노실-2-O-리놀레노일-3-O-팔미토일 글리세라이드(화합물 1), (2S)-1-O-(6-데옥시-6-설폰)- α -D-글루코피라노실-2,3-다이-O-리놀레노일 글리세라이드(화합물 2), (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-3-O-팔미토일 글리세라이드(화합물 3), (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-3-O-스테아로일 글리세라이드(화합물 4), (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-3-O-이소스테아로일 글리세라이드(화합물 5), (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-3-O-리놀레노일 글리세라이드(화합물 6), (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-팔미토일 글리세라이드(화합물 7), (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-리놀레노일 글리세라이드(화합물 8), (2S)-1-O-6'-O-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-3-O-팔미토일 글리세라이드(화합물 9), (2S)-1-O-6'-O-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-3-O-리놀레노일 글리세라이드(화합물 10),

(2S)-1-O-6'-O-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-팔미토일 글리세라이드(화합물 11), (2S)-1-O-(6-O- α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2-O-스테아로일-3-O-리놀레노일 글리세라이드(화합물 12) 및 (2S)-1-O-(6-O- α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-리놀레노일-글리세라이드(화합물 13)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화합물은 (2S)-1-O-(6-데옥시-6-설폰)- α -D-글루코피라노실-2-O-리놀레노일-3-O-팔미토일 글리세라이드 (화합물 1); (2S)-1-O-(6-데옥시-6-설폰)- α -D-글루코피라노실-2,3-다이-O-리놀레노일 글리세라이드 (화합물 2); 또는 (2S)-1-O-6'-O-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-팔미토일 글리세라이드 (화합물 11)인 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제1 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 암 세포에 대해 세포 독성을 나타내는 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 암은 위암, 폐암, 대장암 또는 간암인, 약학적 조성물.

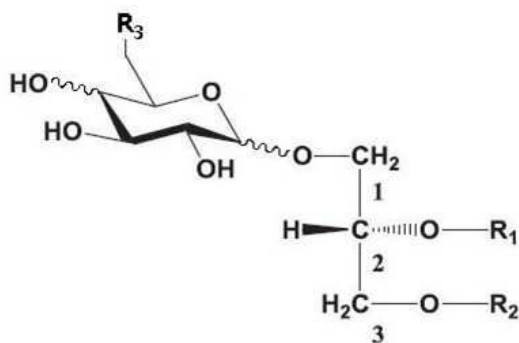
청구항 9

제1 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 암 세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

아욱(*Malva verticillata*) 추출물, 이의 분획물, 이들로부터 분리한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R_1 은 -H, 리놀레노일(linolenoyl), 팔미토일(palmitoyl) 또는 스테아로일(stearoyl)이고; R_2 는 리놀레노일, 팔미토일 또는 스테아로일이고; R_3 는 $-SO_3^-$, -OH 또는 글리코실(glycosyl)인, 식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 분획물은 n-부탄올 분획물인 것인, 식품 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 화합물은 (2S)-1-O-(6-데옥시-6-설포)- α -D-글루코피라노실-2-O-리놀레노일-3-O-팔미토일 글리세라이드 (화합물 1); (2S)-1-O-(6-데옥시-6-설포)- α -D-글루코피라노실-2,3-다이-O-리놀레노일 글리세라이드 (화합물 2); 또는 (2S)-1-O-6'-O-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-팔미토일 글리세라이드 (화합물 11)인 것인, 식품 조성물.

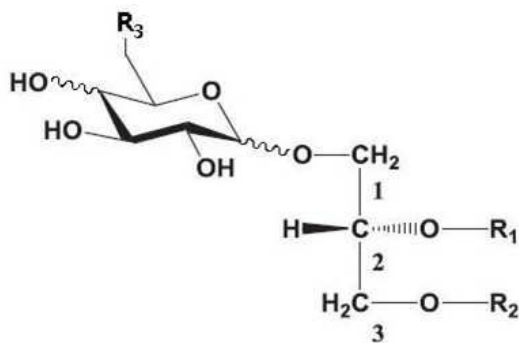
청구항 13

항암 활성을 갖는, (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-3-O-이소스테아로일 글리세라이드((2S)-1-O- β -D-galactopyranosyl-3-O-isostearoyl glyceride, 화합물 5).

청구항 14

아욱(*Malva verticillata*) 추출물 또는 분획물로부터 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법으로서,

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R_1 은 -H, 리놀레노일(linolenoyl), 팔미토일(palmitoyl) 또는 스테아로일(stearoyl)이고; R_2 는 리놀레노일, 팔미토일 또는 스테아로일이고; R_3 는 $-SO_3^-$, -OH 또는 글리코실(glycosyl)인, 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아욱(*Malva verticillata*) 추출물, 이의 분획물, 이들로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 식품 조성물; 및 상기 화합물의 제조방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 전세계적으로 높은 사망률을 나타내는 질환 중 하나이다. 현재 화학요법, 수술 및 방사선 요법과 같은 암 치료법이 개발되었으나, 그 적용에 있어 수많은 부작용 및 비용에 관한 문제가 관련되어 있다. 역학적 증거에

따르면 특정 식품의 섭취가 잠재적으로 암의 발병을 35%까지 예방할 수 있음이 입증되었다. 이와 관련하여, 자연에 존재하는 생체 활성성분 및 식이 요법은 건강의 유지와 증진뿐만 아니라 암을 포함한 만성 질환의 예방에 대한 필수적인 연결고리를 제공한다. 암의 발병률 및 사망률을 줄이기 위한 가장 실질적인 방법은 화학적 암 예방 제제를 사용하여 발암 과정을 지연시키는 것이다. 이것은 보다 안전한 화합물, 특히 화학적 암 예방을 위한 천연 원료 유래의 화합물을 필요로 한다.

[0004] 아욱(*Malva verticillata*, *Chinese mallow*)은 기록된 문헌에 인용되는 오래된 식물 중 하나로, 한국과 중국에서 오랫동안 사용된 잎 채소이다. 아욱의 씨앗은 한방에서 이노제, 완하제 및 최유제 등을 위한 약제로 사용되어 왔다. 아욱 씨앗의 주요 성분인 다당류는 항-보체성, 면역학적, 혈당강화 활성을 나타내는 것으로 보고되었다. 한편, 아욱의 잎 또한 한방에서 위장 및 호흡기 질환의 치료를 위한 약제로 사용되어 왔다. 그러나, 아욱 잎의 화학적 성분 및 그의 생물학적 활성에 관한 연구는 거의 없었다.

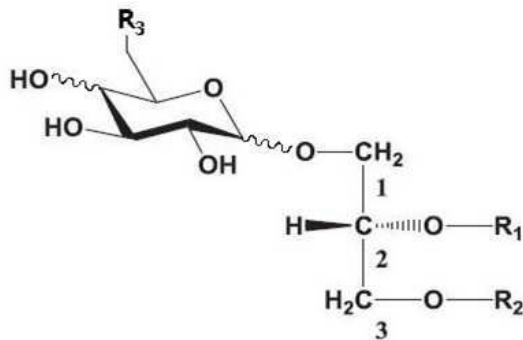
[0005] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 천연 원료 유래의 화학적 암 예방 제제를 찾고자 예의 노력한 결과, 아욱 지상부 분획물로부터 글리코실 글리세라이드 화합물을 분리 및 동정하였으며, 상기 화합물 중 특히 (2S)-1-O-(6-테옥시-6-설포)- α -D-글루코피라노실-2-O-리놀레노일-3-O-팔미토일 글리세라이드; (2S)-1-O-(6-테옥시-6-설포)- α -D-글루코피라노실-2,3-다이-O-리놀레노일 글리세라이드; 또는 (2S)-1-O-6'-O-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-팔미토일 글리세라이드가 암 세포에 대한 세포독성을 나타내며 세포사멸을 유도하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 아욱 추출물, 이의 분획물, 이들로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, R_1 은 -H, 리놀레노일(linolenoyl), 팔미토일(palmitoyl) 또는 스테아로일(stearoyl)이고; R_2 는 리놀레노일, 팔미토일 또는 스테아로일이고; R_3 는 $-SO_3^-$, -OH 또는 글리코실(glycosyl)인, 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] [화학식 1]



[0008]

[0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 유효성분을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 아욱 추출물 또는 분획물 유래의 신규한 화합물, (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-3-O-이소스테아로일 글리세라이드((2S)-1-O- β -D-galactopyranosyl-3-O-isostearoyl glyceride, 화합물 5)를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 아욱 추출물 또는 분획물로부터 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

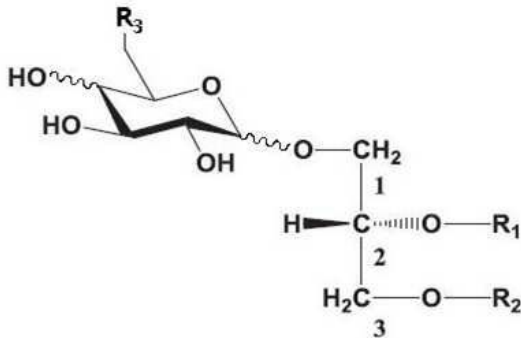
과제의 해결 수단

[0013] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에

속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 아욱 추출물, 이의 분획물, 이들로부터 분리한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 상기 화학식 1에서 R_1 은 -H, 리놀레노일, 팔미토일 또는 스테아로일(stearoyl)이고; R_2 는 리놀레노일, 팔미토일 또는 스테아로일이고; R_3 는 $-SO_3^-$, -OH 또는 글리코실인, 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 구체적으로, 상기 분획물은 아욱의 n-부탄올 분획물일 수 있으며, 상기 화합물은 (2S)-1-0-(6-데옥시-6-설포)- α -D-글루코피라노실-2-0-리놀레노일-3-0-팔미토일 글리세라이드(화합물 1), (2S)-1-0-(6-데옥시-6-설포)- α -D-글루코피라노실-2,3-다이-0-리놀레노일 글리세라이드(화합물 2), (2S)-1-0- β -D-갈락토피라노실-3-0-팔미토일 글리세라이드(화합물 3), (2S)-1-0- β -D-갈락토피라노실-3-0-스테아로일 글리세라이드(화합물 4), (2S)-1-0- β -D-갈락토피라노실-3-0-이소스테아로일 글리세라이드(화합물 5), (2S)-1-0- β -D-갈락토피라노실-3-0-리놀레노일 글리세라이드(화합물 6), (2S)-1-0- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-0-팔미토일 글리세라이드(화합물 7), (2S)-1-0- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-0-리놀레노일 글리세라이드(화합물 8), (2S)-1-0-6'-0-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-3-0-팔미토일 글리세라이드(화합물 9), (2S)-1-0-6'-0-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-3-0-리놀레노일 글리세라이드(화합물 10), (2S)-1-0-6'-0-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-0-팔미토일 글리세라이드(화합물 11), (2S)-1-0-(6-0- α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2-0-스테아로일-3-0-리놀레노일 글리세라이드(화합물 12) 및 (2S)-1-0-(6-0- α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-0-리놀레노일-글리세라이드(화합물 13)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물일 수 있으며, 보다 구체적으로 (2S)-1-0-(6-데옥시-6-설포)- α -D-글루코피라노실-2-0-리놀레노일-3-0-팔미토일 글리세라이드(화합물 1); (2S)-1-0-(6-데옥시-6-설포)- α -D-글루코피라노실-2,3-다이-0-리놀레노일 글리세라이드(화합물 2); 또는 (2S)-1-0-6'-0-(α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-0-팔미토일 글리세라이드(화합물 11)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 화합물 1 및 2는 6-데옥시-6-설포 당류((6-deoxy-6-sulfo)- α -D-glucopyranose)를 포함하고, 천연 원료로부터 거의 발견되지 않는 화합물로, 상기 화합물 1 및 2의 항암 효과는 기준에 알려진 바 없으며, 화합물 11은 본 발명의 화합물 중 가장 우수한 항암 효과를 나타낸 것으로, 화합물 1, 2 및 11을 비롯한 본 발명의 아욱 유래 화합물의 항암 효과는 본 발명에서 최초로 확인하였다.

[0021] 즉, 본 발명은 아욱 추출물 및 분획물 뿐만 아니라, 이로부터 분리 및 동정된 화합물 1, 2 및 11을 비롯한 화합물이 HepG2, AGS, HCT-15, 및 A549 등 다양한 암 세포에 대해 우수한 항암 활성을 나타낸다는 기술사상에 기초하며, 이는 본 발명자들에 의하여 최초로 규명된 것이다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서, 아욱 지상부의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물, 구체적으로 아욱 지상부의 n-부탄올 분획물, 화학식 1의 화합물은 암 세포에 대해 세포독성을 나타내고, 세포사멸과 관련된 단백질의 발현 수준을 조절하여 암 세포의 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였는바, 상기 분획물 또는 화합물은 암의 예방 또는 치료 효과를 갖는다.

- [0024] 본 발명에서 "아욱(*Malva verticillata*, Chinese mallow)"은 아욱목(Malvales) 아욱과(Malvaceae)에 속하는 쌍떡잎식물로, 한방에서는 이뇨제, 완하제, 최유제로 사용하거나, 위장 및 호흡기 질환의 치료 목적으로 사용하는 것으로 알려져 있으나, 그 항암 효과에 대해서는 전혀 알려져 있지 않다. 상기 아욱은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다. 구체적으로 아욱의 뿌리, 줄기, 잎 등을 제한 없이 사용할 수 있고, 보다 구체적으로 아욱의 지상부 전체를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에서 "추출물"은 상기 아욱을 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.
- [0026] 본 발명에서 상기 추출물을 추출하는데 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물; 메탄올, 에탄올, 프로필알코올, 부틸알코올 등의 C1 내지 C4의 저급 알코올; 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 다가 알코올; 및 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 아세톤, 벤젠, 헥산, 디에틸에테르, 디클로로메탄 등의 탄화수소계 용매; 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 구체적으로 메탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명에서 상기 추출물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획 방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서는 상기 아욱 추출물을 용매 분획법, 한외여과 분획법, 크로마토그래피 분획법 등의 다양한 방법으로 분획한 결과물 등을 포함하며, 보다 구체적으로 상기 아욱 추출물의 n-부탄올 분획물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에서, 건조한 아욱의 지상부를 80% 메탄올로 실온에서 추출 및 여과하고, 감압 및 증발시켜 추출물을 수득하였으며, 상기 추출물로부터 물, 에틸아세테이트(EtOAc) 및 n-부탄올(n-BuOH) 분획물을 수득하였다. 아욱 지상부의 n-부탄올 분획물은 물, 에틸아세테이트의 분획물 대비 암 세포에 대해 현저히 우수한 세포독성을 나타내고, 세포사멸을 유도하는 효과가 있음을 확인하였다. 아울러, 상기 n-부탄올 분획물로부터 글리코실 글리세라이드 화합물 1 내지 13을 분리·동정하였으며, 각각의 화합물의 항암 효과를 확인하였다. 특히, 화합물 1, 2 및 11이 암 세포에 대해 현저히 우수한 세포독성을 나타내고, 세포사멸을 유도하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [0030] 이외에도, 본 발명의 아욱 추출물 또는 분획물 유래의 화합물은 그밖에 다른 천연 공급원으로부터 분리된 것일 수 있고, 당업계에 공지된 방법을 통해 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질일 수 있으며, 이를 포함하여 입수 경로에 관계없이 본 발명에서 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 "약학적으로 허용 가능한 염"은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하며, 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 본 발명의 아욱 추출물 또는 분획물 유래의 화합물, 구체적으로는 화합물 1, 2 및 11의 이로인 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기부가염을 의미한다. 이러한 염으로는 약학적으로 허용되는 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 있다.
- [0033] 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산 (fumaric acid), 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 구연산 (citric acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산 (hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 또한, 염기를 사용하여 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알

칼리 토금속 염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상, 또는 식품상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0035] 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 달리 명시되지 않는 한, 본 발명의 아욱 추출물 또는 분획물 유래의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로미드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르trate, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0037] 본 발명에서 "암"은 정상적인 조직 세포가 각종 물리적·화학적·생물학적인 암원성 물질의 작용 또는 요인에 의해 형성되는 종양을 의미하는 것으로, 상기 암은 암의 종류에 제한없이 포함되나, 그 예로, 식도암, 위암, 대장암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종 또는 다발성 골수종 혈액암일 수 있고, 구체적으로 위암, 폐암, 대장암 또는 간암일 수 있으며, 보다 구체적으로 위암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에서는 아욱 지상부의 n-부탄을 분획물, 화합물 1, 2 및 11을 비롯한 본 발명의 화합물이 HepG2, AGS, HCT-15, 및 A549 등 다양한 암 세포에 대해 우수한 항암 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0040] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 조성물 투여에 의해 암의 발병 또는 진행이 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0041] 본 발명에서 "치료"는 본 발명의 조성물 투여에 의해 암의 발병에 따른 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0042] 본 발명에서 "개선"은 암의 증상 정도를 적어도 감소시키거나, 암 세포의 세포사멸이 증가시키거나 증식을 억제하는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명에서 "약학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0044] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

[0045] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 혼합 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0046] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구투여하거나 비경구투여할 수 있으며, 비경구투여시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택할 수

있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있다.

[0048] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배설 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 또는 암의 예방, 치료, 또는 개선 효과를 나타내는 기타 약학적 활성 화합물과 결합하여 또는 적당한 집합을 이루어 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0051] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 아욱 추출물, 이의 분획물, 이들로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 식품 조성물을 제공한다. 상기 아욱, 추출물, 분획물 및 암은 전술한 바와 같다.

[0052] 본 발명에서 용어 "식품"은 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능(성)식품류 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 식품은 공지의 제조방법에 따라 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상의 용액 및 환 등의 제형으로 제조할 수 있으며, 본 발명에 따른 추출물의 함량은 제형에 따라 식품 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001중량% 내지 100중량%로 조절할 수 있다. 본 발명의 아욱 추출물, 분획물 또는 이로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다.

[0053] 상기 "건강기능(성)식품"은 특정 보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 상기 "기능(성)"은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없으며, 휴대성이 뛰어난 장점이 있다.

[0054] 구체적으로, 상기 건강기능식품은 본 발명의 조성물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

[0055] 상기 건강기능식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 제한 없이 포함할 수 있으며, 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[0057] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 신규한 화합물, (2S)-1-O-β-D-갈락토피라노실-3-O-이소스테아로일 글리세라이드((2S)-1-O-β-D-galactopyranosyl-3-O-isostearoyl glyceride, 화합물 5)를 제공한다. 상기 화합물은 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 유래될 수 있다. 상기 아욱, 추출물, 분획물은 전술한 바와 같다.

[0059] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 아욱 추출물 또는 분획물로부터 상기 화학식 1로

표시되는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 아욱, 추출물, 분획물 및 화학식 1로 표시되는 화합물은 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0061] 본 발명의 아욱 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물은 다양한 암 세포에 대해 세포독성을 나타내고 세포사멸을 유도하는바, 암의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 등으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 본 발명에서 아욱 지상부로부터 분리한 글리코실 글리세라이드(glycosyl glyceride) 화합물 1 내지 13의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 아욱의 n-부탄올 분획물, 화합물 1, 2 및 11을 AGS(인간 위암 세포)에 처리하였을 경우, 세포사멸 분석(apoptotic analysis) 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 아욱의 n-부탄올 분획물, 화합물 1, 2 및 11을 AGS(인간 위암 세포)에 처리하였을 경우, 세포사멸(apoptosis)과 관련된 단백질(PARP, caspase-3, Bax 및 Bcl-2)의 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0066] 실시예 1: 재료, 시약 및 기기

[0068] 1-1: 식물 재료

[0069] 본 실시예에서 사용한 아욱(*Malva verticillata*)의 지상부는 2016년 4월에 한국 남양주시의 상업 농장에서 수집하였고, 표본 시료 (KHU20160419)는 경희대학교 천연물 화학 (Natural Product Chemistry) 실험실에 보관되어 있다.

[0071] 1-2: 시약 및 기기

[0072] 컬럼 크로마토그래피(CC)에 사용된 실리카겔(SiO_2) 및 옥타데실 SiO_2 (ODS) 레진은 각각 Kiesel gel 60(Merck, Darmstadt, Germany) 및 Lichroprep RP-18 (40-60 μm , Merck)이다. 박층 크로마토그래피(TLC) 분석은 Kiesel gel 60 F₂₅₄ 및 RP-18 F_{254S}(Merck) TLC 플레이트를 사용하여 수행하였고, 화합물은 Spectroline Model ENF-240 C/F (Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA) UV 램프 및 10% H_2SO_4 용액을 사용하여 검출하였다. 핵 자기 공명(NMR) 스펙트럼은 400 MHz FT-NMR 스펙트로미터(Varian Inova AS-400, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 기록하였다. 듀테륨(deuterium) 용매는 Merck Co. Ltd and Sigma Aldrich Co. Ltd(St, Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. IR 스펙트럼은 Perkin Elmer Spectrum One FT-IR 스펙트로미터(Buckinghamshire, England)부터 얻었다. 펄스-질량분석(Fast atom bombardment mass spectrometry, FAB-MS)은 JEOL JMS-700 (Tokyo, Japan)으로 기록하였다. 가스 크로마토 그래피 질량분석(Gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)은 Shimadzu GC-MSQP2010 Plus (Kyoto, Japan)으로 기록하였다. 광 회전(optical rotation)은 JASCO P-1010 digital polarimeter (Jasco, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

[0074] 실시예 2: 아욱 추출물 및 분획물의 제조

[0076] 건조한 아욱의 지상부 (3.1kg)를 80% 메탄올 (MeOH, 54.0L X 5)로 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 여과지를 통해 여과하고 43℃에서 감압 하에 증발시켜 794g의 추출물을 수득하였다.

[0077] 수득한 메탄올 추출물을 물 (2L)에 현탁시키고, 에틸아세테이트 (EtOAc, 2L X 4) 및 n-부탄올 (n-BuOH, 2L X 4)로 연속하여 추출하였다. 각 층을 농축시켜 에틸아세테이트 분획물 (MVE, 80g), n-부탄올 분획물 (MVB, 77g) 및 물 분획물 (MVW, 637g)을 수득하였다.

[0079] 실시예 3: 아욱의 n-부탄올 분획물로부터 화합물의 분리 및 동정

[0081] 3-1: 아욱의 n-부탄올 분획물로부터 화합물의 분리

[0082] 상기 실시예 2의 n-부탄올 분획물 (MVB, 77g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CC)(ϕ 10 X 15cm)에 적용시키고, 클로로포름(CHCl₃)-메탄올(MeOH)-물(H₂O) (25 : 3 : 1 → 22 : 3 : 1 → 20 : 3 : 1 → 18 : 3 : 1 → 15 : 3 : 1 → 12 : 3 : 1, 각각 18.8L)로 용출시켜, 14개의 분획물 (MVB-1 내지 MVB-14)을 수득하였다.

[0083] 분획물 MVB-6(3.6g, 용출 부피/총 부피(V_e/V_t) 0.053-0.096)를 ODS CC(ϕ 4.5 X 6cm)에 적용시키고 아세톤 (Acetone)-물 (3 : 2 → 2 : 1, 모두 3.6L)로 용출시켜 분리한 결과 11개의 분획물(MVB-6-1 내지 MVB-6-11)을 수득하였다. 이 중, 분획물 MVB 6-4(659.4mg, V_e/V_t 0.031-0.092)를 실리카겔 CC(ϕ 2.5 X 15cm)에 적용시키고 클로로포름-메탄올-물 (20 : 3 : 1, 1.4L)로 용출시켜, 11개의 분획물(MVB-6-4-1 내지 MVB-6-4-11)과 함께 정제된 화합물 3 [MVB6-4-10, 21.2 mg, V_e/V_t 0.286-0.514, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.38, 클로로포름-메탄올-물 (10:3:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.74, 메탄올-물 (3:1)]을 수득하였다.

[0084] 분획물 MVB-7 (5.0g, V_e/V_t 0.098-0.126)를 ODS CC(ϕ 4.5 X 5cm)에 적용시키고 메탄올-물 (1 : 1 → 2 : 1 → 6 : 1 → 8 : 1, 각각 3.8L)로 용출시켜 분리한 결과, 22개의 분획물(MVB-7-1 내지 MVB-6-22)과 함께 정제된 화합물 5 [MVB-7-9, 84.2 mg, V_e/V_t 0.212-0.217, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.90, 클로로포름-메탄올-물 (7:3:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.70, 메탄올-물 (5:1)], 화합물 6 [MVB-7-12, 142.8 mg, V_e/V_t 0.323-0.366, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.90, 클로로포름-메탄올-물 (7:3:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.41, 메탄올-물 (5:1)], 화합물 12 [MVB-7-18, 34.0 mg, V_e/V_t 0.737-0.750, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.90, 클로로포름-메탄올-물 (7:3:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.52, 메탄올-물 (14:1)], 및 화합물 13 [MVB-7-20, 586.2 mg V_e/V_t 0.787-0.842, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.90, 클로로포름-메탄올-물 (7:3:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.24, 메탄올-물 (14:1)]을 수득하였다.

[0085] 분획물 MVB-8 (3.5g, V_e/V_t 0.128-0.383)를 ODS CC(ϕ 4.5 X 8cm)에 적용시키고 메탄올-물 (3 : 1 → 4 : 1 → 5 : 1 → 6 : 1, 각각 1.0L)로 용출시켜 분리한 결과 17개의 분획물(MVB-8-1 내지 MVB-8-17)을 수득하였다. 이 중, MVB-8-17(879.3mg, V_e/V_t 0.602-1.000)를 ODS CC(ϕ 4 X 8cm)에 적용시키고 아세톤-물 (3 : 1, 3.0L)로 용출시켜, 13개의 분획물(MVB-8-17-1 내지 MVB-8-17-13)과 함께 정제된 화합물 8 [MVB-8-17-10, 26.0 mg, V_e/V_t 0.480-0.580, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.35, 클로로포름-메탄올-물 (10:3:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.20, 메탄올-물 (2:1)]을 수득하였다.

[0086] 분획물 MVB-9 (4.0g, V_e/V_t 0.385-0.557)를 ODS CC(ϕ 4 X 6cm)에 적용시키고 메탄올-물 (3 : 2 → 2 : 1 → 2.5 : 1 → 3 : 1 → 5 : 1, 각각 3.6L)로 용출시켜 분리한 결과, 16개의 분획물(MVB-9-1 내지 MVB-9-16)과 함께 화합물 2 [MVB-9-10, 44.4 mg V_e/V_t 0.602-0.668, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.25, 클로로포름-메탄올-물 (8:3:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.28, 메탄올-물 (5:1)]를 수득하였다.

[0087] 분획물 MVB-9-5 (383.9mg, V_e/V_t 0.116-0.263)를 ODS CC(ϕ 2.5 X 6cm)에 적용시키고 아세톤-물 (2 : 3, 4.0L)

로 용출시켜, 14개의 분획물(MVB-9-5-1 내지 MVB-9-5-14)과 함께 정제된 화합물 11 [MVB-9-5-9, 96.3 mg V_e/V_t 0.602-0.668, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.25, 클로로포름-메탄올-물 (8:3:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.48, 아세톤-물 (2:1)]을 수득하였다.

[0088]

분획물 MVB-11 (8.7g, V_e/V_t 0.560-0.755)를 ODS CC(ϕ 4.5 X 8cm)에 적용시키고 메탄올-물 (2 : 1 $\rightarrow$ 4 : 1 $\rightarrow$ 6 : 1, 각각 3.0L)로 용출시켜 분리한 결과, 16개의 분획물(MVB-11-1 내지 MVB-11-16)과 함께 정제된 화합물 10 [MVB-11-10, 732.4 mg V_e/V_t 0.582-0.629, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.71, 클로로포름-메탄올-물 (65:35:10), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.18, 메탄올-물 (4:1)]을 수득하였다.

[0089]

분획물 MVB-11-6 (1.5g, V_e/V_t 0.102-0.289)를 실리카겔 CC(ϕ 3.5 X 15cm)에 적용시키고 클로로포름-메탄올 (5 : 2 $\rightarrow$ 2 : 1, 모두 1.5L)로 용출시켜 분리한 결과, 10개의 분획물(MVB-11-6-1 내지 MVB-11-6-10)을 수득하였다. 이 중, 분획물 MVB-11-6-5(263.0mg, V_e/V_t 0.240-0.473)를 ODS CC(ϕ 3 X 5cm)에 적용시키고 메탄올-물 (3 : 2 $\rightarrow$ 1 : 1, 모두 1.8L)로 용출시켜 분리한 결과, 12개의 분획물(MVB-11-6-5-1 내지 MVB-11-6-5-12)과 함께 정제된 화합물 9 [MVB-11-6-5-10, 38.8 mg V_e/V_t 0.502-0.746, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.18, 클로로포름-메탄올 (2:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.50, 메탄올-물 (3:1)]을 수득하였다.

[0090]

분획물 MVB-11-16 (1.8g, V_e/V_t 0.998-1.000)를 실리카겔 CC(ϕ 4 X 15cm)에 적용시키고 에틸아세테이트 (EtOAc)-n-부탄올(n-BuOH)-물 (7: 3 : 1 $\rightarrow$ 2 : 5 : 1, 모두 3L)로 용출시켜 분리한 결과, 14개의 분획물(MVB-11-16-1 내지 MVB-11-16-14)을 수득하였다. 이 중, 분획물 MVB-11-16-7(99.0mg, V_e/V_t 0.120-0.237)를 ODS CC (ϕ 2.5 X 5cm)에 적용시키고 아세톤-물 (2 : 1, 0.46L)로 용출시켜 분리한 결과, 12개의 분획물(MVB-11-16-7-1 내지 MVB-11-16-7-12)과 함께 정제된 화합물 1 [MVB-11-16-7-5, 23.8 mg V_e/V_t 0.110-0.209, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.85, 클로로포름-메탄올-물 (6:4:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.46, 아세톤-물 (3:1)]을 수득하였다.

[0091]

분획물 MVB-12 (11.0g, V_e/V_t 0.756-0.898)를 ODS CC(ϕ 6.5 X 5cm)에 적용시키고 메탄올-물 (1 : 1 $\rightarrow$ 2 : 1 $\rightarrow$ 3 : 1 $\rightarrow$ 5 : 1, 각각 3.8L)로 용출시켜 분리한 결과, 18개의 분획물(MVB-12-1 내지 MVB-12-18)과 함께 정제된 화합물 4 [MVB-12-10, 632.4 mg V_e/V_t 0.303-0.349, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.50, 클로로포름-메탄올-물 (65:35:10), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.78, 메탄올-물 (5:1)]을 수득하였다.

[0092]

물 분획물(MVW, 635g)을 음이온 HP-20 컬럼 (ϕ 9 X 30cm)에 적용시키고 메탄올-물 (0 : 1 $\rightarrow$ 1 : 4 $\rightarrow$ 2 : 3 $\rightarrow$ 3 : 2 $\rightarrow$ 4 : 1 $\rightarrow$ 1 : 0, 각각 6.0L)로 용출시켜 분리한 결과, 9개의 분획물(MVW -1 내지 MVW-9)을 수득하였다. 이 중, 분획물 MVW-7 (1.0g, V_e/V_t 0.911-0.967)를 실리카겔 CC(ϕ 4.5 X 15cm)에 적용시키고 클로로포름-메탄올 (40 : 1 $\rightarrow$ 15 : 1 $\rightarrow$ 10 : 1 $\rightarrow$ 5 : 1, 각각 5.6L)로 용출시켜 분리한 결과, 23개의 분획물(MVW-7-1 내지 MVW-7-23)과 함께 정제된 화합물 7 [MVW-7-18, 22.8 mg V_e/V_t 0.476-0.500, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.50, 클로로포름-메탄올 (5:1), TLC (RP-18 F254S) R_f 0.82, 아세톤-물 (4:1)]을 수득하였다.

[0094]

3-2: 분리된 화합물 1 내지 13의 동정

[0095]

상기 실시예 3-1에서 수득한 화합물 1 내지 13을 대상으로 NMR, IR 및 FAB-MS, GC-MS 분석을 수행하여, 각 화합물의 구조를 동정하였다. 구체적으로, 화합물 1, 2 및 5의 ^1H (400MHz) 및 ^{13}C (100MHz) NMR 결과는 아래 표 1에 나타내었다.

[표 1]

¹H (400 MHz) and ¹³C (100 MHz) NMR data for compounds 1, 2 and 5 (1 and 2, CD₃OD; 5, CD₃OD and CDCl₃; δ ppm, coupling patterns, J in Hz).^a

Carbon No.	1	2	Carbon No.	2	5
	<i>δ_H</i>	<i>δ_C</i>		<i>δ_H</i>	<i>δ_C</i>
Glycerol			Glycerol		
1	67.1	4.10 ^b	1	67.1	4.07 ^b
		3.58 (dd, 10.4, 6.8)			3.56 (dd, 10.4, 6.8)
2	71.7	5.30 (m)	2	71.7	5.30 (m)
3	64.3	4.51 (dd, 10.4, 2.8), 4.19 (dd, 10.4, 6.8)	3	64.3	4.48 (dd, 10.4, 2.8), 4.18 (dd, 10.4, 6.8)
Sugar moiety			Sugar moiety		
1'	100.0	4.76 (d, 3.6)	1'	100.1	4.76 (d, 3.6)
2'	73.5	3.39 (m)	2'	73.5	3.40 (m)
3'	75.0	3.10 (m)	3'	74.9	3.10 (m)
4'	74.9	3.62 (m)	4'	74.9	3.63 (m)
5'	69.9	4.08 ^b	5'	69.8	4.07 ^b
6'	54.2	3.36 (dd, 12.0, 4.0), 2.92 (dd, 12.0, 8.0)	6'	54.3	3.36 (dd, 12.0, 4.0), 2.93 (dd, 12.0, 8.0)
Acyl			Acyl		
1''	175.1	-	1''	175.0	-
1'''	174.9	-	1'''	174.8	-
2''	35.2	2.31 ^b	2''	35.2	2.31 ^b
2'''	35.0	2.30 ^b	2'''	35.0	2.30 ^b
3''-10''	26.0	1.59 ^b	3''-10''	26.0	1.58 ^b
4''-7''	30.3	1.28-1.33 ^b	4''-7''	30.2	1.28-1.33 ^b
4'''-13'''	-30.8	-	4'''-13'''	-30.7	-
8''	28.2	2.04 ^b	8''-11''	28.2	2.06 ^b
9''	131.1	5.33-5.36 ^b	9''-11''	131.1	5.33-5.36 ^b
10''	128.2	5.33-5.36 ^b	10''-13''	128.2	5.33-5.36 ^b
11''	26.4	2.80 ^b	11''-13''	26.4	2.80 ^b
12'', 13''	129.2	5.33-5.36 ^b	12''-13'', 13''-15''	129.2	5.33-5.36 ^b
14''	26.6	2.80 ^b	14''-15''	26.6	2.80 ^b
15''	128.9	5.33-5.36 ^b	15''-17''	128.9	5.33-5.36 ^b
16''	132.7	5.33-5.36 ^b	16''-17''	132.7	5.33-5.36 ^b
17''	21.5	2.04 ^b	17''-18''	21.5	2.06 ^b
18''	14.7	0.97 (t, 7.2)	18''-19''	14.7	0.96 (t, 7.2)
14'''	33.1	1.28-1.33 ^b			
15'''	23.8	1.28-1.33 ^b			
16'''	14.5	0.89 (t, 7.2)			

^a All proton and carbon positions were assigned by HSQC and HMBC data.
^b Overlapped signals.

화합물 1을 분석한 결과는 다음과 같다.

- 옅은 황색 왁스(pale yellow wax)

- [α]_D +30.8° (c 0.10, MeOH)

- IR (KBr, m) 3390, 1735, 1612, 1186 cm⁻¹

- negative FAB-MS m/z 815 [M-H]⁻, m/z 559 [M-H-R₃]⁻, m/z 537 [M-H-R₂]⁻, m/z 277 [R₂-H]⁻, m/z 255 [R₃-H]⁻, m/z 225 [the dehydrated product of the (6-deoxy-6-sulfo)-D-glucopyranose ion m/z 243], m/z 80 [SO₃]⁻

- negative HR-FAB-MS m/z 815.4982 [M-H]⁻ (calcd for C₄₃H₇₅O₁₂S⁻, 815.4985)

- GC-MS t_R = 10.27분 (palmitic acid methyl ester), 13.76분 (linolenic acid methyl ester).

분석 결과, 화합물 1은 (2S)-1-O-(6-데옥시-6-설포)-α-D-글루코피라노실-2-O-리놀레노일-3-O-팔미토일 글리세라이드((2S)-1-O-(6-deoxy-6-sulfo)-α-D-glucopyranosyl-2-O-linolenoyl-3-O-palmitoyl glyceride)임을 확인하였다. 화합물 1은 천연 원료로부터는 처음 분리, 동정된 화합물이다.

화합물 2을 분석한 결과는 다음과 같다.

- 옅은 황색 왁스(pale yellow wax)

- [α]_D +28.4° (c 0.10, MeOH)

- IR (KBr, v) 3386, 1732, 1610, 1178 cm⁻¹

- positive FAB-MS m/z 861 [M+Na]⁺

- negative FAB-MS m/z 837 [M-H]⁻, m/z 559

- [0114] - $[M-H-R_2 \text{ or } _3]^-$, m/z 277 $[R_2 \text{ or } _3-H]^-$, m/z 225 [the dehydrated product of the (6-deoxy-6-sulfo)-D-glucopyranose ion m/z 243], m/z 80 $[SO_3]^-$, negative HR-FAB-MS m/z 837.4822 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{45}H_{73}O_{12}S^-$, 837.4828)
- [0115] - GC-MS t_R = 13.76분 (linolenic acid methyl ester).
- [0117] 분석 결과, 화합물 2는 (2S)-1-O-(6-데옥시-6-설포)- α -D-글루코피라노실-2,3-다이-O-리놀레노일 글리세라이드 ((2S)-1-O-(6-deoxy-6-sulfo)- α -D-glucopyranosyl-2,3-di-O-linolenoyl Glyceride)임을 확인하였다. 화합물 2는 천연 원료로부터는 처음 분리, 동정된 화합물이다.
- [0119] 화합물 3을 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0120] - 옅은 황색 왁스
- [0121] - $[a]_D +9.3^\circ$ (c 0.10, MeOH)
- [0122] - IR (KBr, m) 3379, 1725 cm^{-1}
- [0123] - positive FAB-MS m/z 515 $[M+Na]^+$
- [0124] - GC-MS t_R = 11.06분 (palmitic acid).
- [0126] 분석 결과, 화합물 3은 (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-3-O-팔미토일 글리세라이드((2S)-1-O- β -D-galactopyranosyl-3-O-palmitoyl glyceride)임을 확인하였다.
- [0128] 화합물 4를 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0129] - 옅은 황색 왁스
- [0130] - $[a]_D +2.6^\circ$ (c 0.10, MeOH)
- [0131] - IR (KBr, m) 3383, 1723 cm^{-1}
- [0132] - positive FAB-MS m/z 543 $[M+Na]^+$
- [0133] - GC-MS t_R = 14.36분 (stearic acid methyl ester)
- [0135] 분석 결과, 화합물 4는 (2S)-1-O- β -D-갈락토피라노실-3-O-스테아로일 글리세라이드((2S)-1-O- β -D-galactopyranosyl-3-O-stearoyl glyceride)임을 확인하였다.
- [0137] 화합물 5을 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0138] - 옅은 황색 왁스
- [0139] - $[a]_D +5.5^\circ$ (c 0.10, MeOH)
- [0140] - IR (KBr, m) 3380, 1722 cm^{-1} ;
- [0141] - negative FAB-MS m/z 555 $[M+Cl]^-$, m/z 339 $[M-H-180 \text{ (hexose + H}_2\text{O)}]^-$, m/z 283 $[R_3-H]^-$,

- [0142] - negative HR-FAB-MS m/z 555.3289 $[M+Cl]^-$ (calcd for $C_{27}H_{52}O_9Cl$, 555.3299)
- [0143] - GC-MS t_R = 14.36분 (isostearic acid methyl ester)
- [0145] 분석 결과, 화합물 5는 (2S)-1-O-β-D-갈락토피라노실-3-O-이소스테아로일 글리세라이드((2S)-1-O-β-D-galactopyranosyl-3-O-isostearoyl glyceride)임을 확인하였다. 화합물 5는 신규한 글리코실 글리세라이드 화합물로, 말바글리코리피드(malvaglycolipid) A로 명명된다.
- [0147] 화합물 6을 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0148] - 옅은 황색 왁스
- [0149] - $[α]_D +3.7^\circ$ (c 0.10, MeOH)
- [0150] - IR (KBr, m) 3386, 1722, 1612 cm^{-1}
- [0151] - positive FAB-MS m/z 537 $[M+Na]^+$
- [0152] - GC-MS t_R = 13.76분 (linolenic acid methyl ester)
- [0154] 분석 결과, 화합물 6은 (2S)-1-O-β-D-갈락토피라노실-3-O-리놀레노일 글리세라이드((2S)-1-O-β-D-galactopyranosyl-3-O-linolenoyl glyceride)임을 확인하였다.
- [0156] 화합물 7을 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0157] - 옅은 황색 왁스
- [0158] - $[α]_D +26.4^\circ$ (c 0.10, MeOH)
- [0159] - IR (KBr, m) 3383, 1723 cm^{-1}
- [0160] - negative FAB-MS m/z 729 $[M-H]^-$
- [0161] - GC-MS t_R = 11.06분 (palmitic acid)
- [0163] 분석 결과, 화합물 7은 (2S)-1-O-β-D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-팔미토일 글리세라이드((2S)-1-O-β-D-galactopyranosyl-2,3-di-O-palmitoyl glyceride)임을 확인하였다.
- [0164]
- [0165] 화합물 8을 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0166] - 옅은 황색 왁스
- [0167] - $[α]_D -4.0^\circ$ (c 0.10, MeOH)
- [0168] - IR (KBr, m) 3383, 1723, 1612 cm^{-1}
- [0169] - positive FAB-MS m/z 776 $[M+H]^+$
- [0170] - GC-MS t_R = 13.76분 (linolenic acid methyl ester)

- [0172] 분석 결과, 화합물 8은 (2S)-1-O-β-D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-리놀레노일 글리세라이드((2S)-1-O-β-D-galactopyranosyl-2,3-di-O-linolenoyl glyceride)임을 확인하였다.
- [0174] 화합물 9를 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0175] - 옅은 황색 왁스
- [0176] - $[\alpha]_D +49.1^\circ$ (c 0.10, MeOH)
- [0177] - IR (KBr, m) 3383, 1723 cm^{-1}
- [0178] - positive FAB-MS m/z 655 $[\text{M}+\text{H}]^+$
- [0179] - GC-MS t_R = 10.27분 (palmitic acid methyl ester)
- [0181] 분석 결과, 화합물 9는 (2S)-1-O-6'-O-(α-D-갈락토피라노실)-β-D-갈락토피라노실-3-O-팔미토일 글리세라이드((2S)-1-O-6'-O-(α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosyl-3-O-palmitoyl Glyceride)임을 확인하였다.
- [0183] 화합물 10을 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0184] - 옅은 황색 왁스
- [0185] - $[\alpha]_D +14.4^\circ$ (c 0.10, MeOH)
- [0186] - IR (KBr, m) 3386, 1722, 1610 cm^{-1}
- [0187] - positive FAB-MS m/z 677 $[\text{M}+\text{H}]^+$
- [0188] - GC-MS t_R = 13.76분 (linilenic acid methyl ester)
- [0190] 분석 결과, 화합물 10은 (2S)-1-O-6'-O-(α-D-갈락토피라노실)-β-D-갈락토피라노실-3-O-리놀레노일 글리세라이드((2S)-1-O-6'-O-(α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosyl-3-O-linolenoyl Glyceride)임을 확인하였다.
- [0192] 화합물 11을 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0193] - 옅은 황색 왁스
- [0194] - $[\alpha]_D -0.8^\circ$ (c 0.10, MeOH)
- [0195] - IR (KBr, m) 3383, 1723 cm^{-1}
- [0196] - Positive FAB-MS m/z 893 $[\text{M}+\text{H}]^+$
- [0197] - GC-MS t_R = 10.27분 (palmitic acid methyl ester), 11.06분 (palmitic acid)
- [0199] 분석 결과, 화합물 11은 (2S)-1-O-6'-O-(α-D-갈락토피라노실)-β-D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-팔미토일 글리세라이드((2S)-1-O-6'-O-(α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosyl-2,3-di-O-palmitoyl glyceride)임을 확인하였다.

- [0201] 화합물 12을 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0202] - 옅은 황색 왁스
- [0203] - $[\alpha]_D^{+7.0^\circ}$ (c 0.10, MeOH)
- [0204] - IR (KBr, m) 3386, 1723, 1612 cm^{-1}
- [0205] - negative FAB-MS m/z 815 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$
- [0206] - GC-MS t_R = 13.76분 (linilenic acid methyl ester), 14.36분 (stearic acid methyl ester)
- [0208] 분석 결과, 화합물 12는 (2S)-1-O-(6-O- α -D-갈락토피라노실)- β -D- 갈락토피라노실-2-O-스테아로일-3-O-리놀레노일 글리세라이드((2S)-1-O-(6-O- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl-2-Ostearyl-3-O-linolenoyl glyceride)임을 확인하였다.
- [0210] 화합물 13을 분석한 결과는 다음과 같다.
- [0211] - 옅은 황색 왁스
- [0212] - $[\alpha]_D^{+36.6^\circ}$ (c 0.10, MeOH)
- [0213] - IR (KBr, m) 3389, 1722, 1615 cm^{-1}
- [0214] - Negative FAB-MS m/z 935 $[\text{M}-\text{H}]^-$
- [0215] - GC-MS t_R = 13.76분 (linolenic acid methyl ester), 14.58분 (linolenic acid)
- [0217] 분석 결과, 화합물 13은 (2S)-1-O-(6-O- α -D-갈락토피라노실)- β -D-갈락토피라노실-2,3-다이-O-리놀레노일-글리세라이드((2S)-1-O-(6-O- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranosyl-2,3-di-O-linolenoyl-glyceride)임을 확인하였다.
- [0219] **실시예 4: 글리세롤 글리세라이드 내 지방산의 GC-MS 분석**
- [0220] 각각의 화합물(1.0mg)을 20% 수산화칼륨(KOH)/메탄올(MeOH) 2ml에 용해시키고 80℃의 워터 배스(water bath)에서 60분 동안 가열하였다. 상온에서 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 TLC 플레이트(n-hexane-EtOAc = 1:1) 상에서 출발 물질이 사라지는 것을 평가하였고, 이어서 산성 양이온-교환 수지(Dowex 50W, H^+ 형태)를 첨가하여 중화시키고 여과하였다. 각각의 여과액을 진공에서 증발시키고, 에틸아세테이트(EtOAc, 3ml) 및 물(3ml) 분획물로 분획하였다. 이어서 에틸아세테이트 분획물을 진공에서 증발시키고, 200 μl 의 에틸아세테이트에 용해시킨 후, 주사기 필터(0.2 μm , 13mm)를 통해 여과하였다. GC-MS 분석때까지 여과액을 -4℃에서 보관하였다.
- [0221] GC-MS 실험을 위해 DB-5 컬럼(0.25 μm 필름 두께 $\times$ 0.25mm 직경, 30m 길이)을 사용하였다. 헬륨 가스를 24.2ml/분의 유속에서 캐리어 가스로 사용하였다. 오븐 온도는 160℃에서 320℃까지 4℃/분의 속도로 증가되도록 프로그래밍하였고, 15분 동안 유지하였다. 인젝터 및 검출기 온도는 각각 280℃ 및 280℃로 설정하였다. 샘플 용액(1 μl)을 1:1의 분할비로 GC 컬럼에 주입하였다. 검출은 전자 이온화 (70 eV) 및 4극 질량 분석에 의해 수행하였다. 지방산은 머무른 시간(retention time)과 실제 지방산 및 질량 스펙트럼을 라이브러리와 비교하여 확인하였다(Wiley Library, version 2008, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA).
- [0223] **실시예 5: 아욱 분획물 및 화합물 1 내지 13의 항암 효과 분석**
- [0224] **5-1: 세포 배양**

[0225] HepG2(인간 간암 세포), AGS(인간 위암 세포), HCT-15(인간 대장암 세포) 및 A549(인간 폐암 세포) 세포주는 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 얻었고, 10% 열-불활성화 된 소 태아 혈청 및 1 % 페니실린트랩토 마이신이 보충된 DMEM 및 RPMI 1640에서 37℃, 5% CO₂ 대기 하에서 배양하였다.

[0227] 5-2: 세포 생존 분석 - 암세포에 대한 세포사멸 효과 확인

[0228] 실시예 2 및 3에서 제조한 아욱 분획물 및 화합물 1 내지 13의 다양한 암 세포에 대한 세포독성을 확인하기 위해, HepG2, AGS, HCT-15 및 A549 세포주에 각각의 분획물 및 분리된 화합물 1 내지 13을 상이한 농도로 처리하고, MTT 분석을 수행하였다.

[0229] 각 암세포 주를 96-웰 세포 배양 플레이트에 100μl에 5×10³ 세포/웰로 접종하였다. 24 시간 후, 세포를 다양한 농도의 분획물 및 화합물로 처리하고 37℃에서 5% CO₂ 대기하에 24시간 동안 배양하였다. 분석은 5mg/mL의 MTT 시약 10μl를 세포에 첨가한 후 37℃에서 3시간 동안 배양하여 수행하였다. 이어서, 배양 배지의 상등액을 제거하고, 100ml의 DMSO를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 5분 동안 진탕하였다. 550 nm에서의 흡광도를 멀티 모드 마이크로 플레이트 리더(Tecan, 서울, 대한민국)를 사용하여 측정하였다. 그 결과, 아래 표 2로부터 알 수 있듯이, 모든 분획물과 화합물에서 4종류의 세포주의 생존율을 현저히 감소시킴을 확인하였다.

[표 2]

Inhibitory effects of fractions and compounds 1-13 on the growth of HepG2, AGS, HCT-15, and A549 cells (IC₅₀ ± SD (μg/ml or μM)).

Fractions and compounds	Cell line			
	HepG2	AGS	HCT-15	A549
MVE ^a (μg/ml)	83.7 ± 3.98	79.0 ± 1.47	80.9 ± 1.56	87.0 ± 0.98
MVB ^b (μg/ml)	11.3 ± 0.30	8.2 ± 0.14	7.4 ± 0.26	52.2 ± 4.32
MVW ^c (μg/ml)	86.0 ± 1.66	90.0 ± 0.14	91.5 ± 2.76	96.3 ± 2.24
1 (μM)	63.7 ± 2.43	33.7 ± 0.64	49.6 ± 0.24	81.8 ± 2.19
2 (μM)	34.7 ± 2.26	11.1 ± 0.07	49.2 ± 5.16	76.0 ± 2.62
3 (μM)	83.4 ± 0.55	86.7 ± 2.02	>100	96.1 ± 2.23
4 (μM)	71.1 ± 2.04	77.7 ± 6.22	>100	87.5 ± 3.98
5 (μM)	77.3 ± 1.76	89.5 ± 0.88	>100	91.5 ± 1.76
6 (μM)	74.9 ± 1.89	89.3 ± 1.21	91.8 ± 2.43	89.9 ± 1.61
7 (μM)	83.1 ± 0.48	90.6 ± 1.00	98.9 ± 3.11	87.9 ± 2.69
8 (μM)	76.3 ± 1.23	64.8 ± 2.24	77.5 ± 4.64	>100
9 (μM)	74.4 ± 0.78	70.6 ± 1.00	85.9 ± 3.33	87.8 ± 4.53
10 (μM)	79.3 ± 1.46	85.4 ± 1.74	91.3 ± 3.28	98.3 ± 0.67
11 (μM)	10.0 ± 0.45	10.6 ± 0.10	15.3 ± 1.12	7.1 ± 0.12
12 (μM)	72.8 ± 2.41	88.2 ± 1.59	97.1 ± 5.18	>100
13 (μM)	71.3 ± 0.46	66.3 ± 1.96	74.6 ± 1.93	83.1 ± 3.66

^a IC₅₀: drug concentration required to inhibit cell viability by 50%, results are means ± standard errors of at least three independent experiments.

^b MVE: the EtOAc fraction of *Melaleuca verticillata* aerial parts.

^c MVB: the n-BuOH fraction of *M. verticillata* aerial parts.

^d MVW: the H₂O fraction of *M. verticillata* aerial parts.

[0231]

[0233] 특히, n-부탄올 분획물, 화합물 1, 2 및 11은 AGS(인간 위암 세포)에 대해 현저한 세포독성을 나타내었으며, 각각의 IC₅₀ 값은 8.2±0.14 μg/ml, 33.7±0.64 μM, 11.1±0.07 μM, 및 10.6±0.10 μM이었다. 이로부터 아욱 추출물, 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리된 화합물, 구체적으로 아욱 지상부의 n-부탄올 분획물, 상기 화합물 1, 2 및 11은 AGS를 비롯한 다양한 암세포에 대해 세포독성을 나타내는 바, 암의 예방 또는 치료 효과를 갖는 것을 알 수 있었다.

[0234]

[0235] 5-3: 세포사멸의 계측 분석 - 세포사멸 유도 효과 확인

[0236] 실시예 2 및 3에서 제조한 아욱 분획물(n-부탄올 분획물) 및 화합물 1, 2 및 11의 AGS에 대한 세포사멸 유도 효과를 확인하기 위해, 아넥신(annexin) V 결합 분석 및 요오드화 프로피듐(PI) 염색을 사용하여 조사하였다.

[0237] AGS 세포를 6-웰 세포 배양 플레이트 상에 1×10⁵ 세포/웰 2 mL로 도말하고 37℃에서 5% CO₂ 대기에서 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포 샘플을 다양한 농도의 n-부탄올 분획 및 화합물 1, 2 및 11로 처리하였다. 24시간 동안 처리 한 후, 세포를 수확하고 제조자의 지시에 따라 Tali 세포사멸 분석 키트를 사용하여 분석하였다.

[0238] 그 결과, 사멸 세포(apoptotic cell)의 수는 n-부탄올 분획물, 화합물 1, 2 및 11의 농도가 증가됨에 따라 증가 되는 것을 확인하였다(도 2). 즉, 아욱 지상부의 n-부탄올 분획물, 상기 화합물 1, 2 및 11은 AGS를 비롯한 암 세포에 대해 세포독성을 나타내는 것뿐만 아니라, 암 세포의 세포사멸을 유도하는 효과를 나타내는바, 암의 예방 또는 치료 효과를 갖는 것을 알 수 있었다.

[0240] **5-4: 웨스턴 블로팅 - 세포사멸 관련 단백질의 수준 분석**

[0241] 실시예 2 및 3에서 제조한 아옥 분획물(n-부탄올 분획물) 및 화합물 1, 2 및 11이 세포사멸과 관련된 단백질(PARP, caspase-3, Bax 및 Bcl-2)의 발현 여부를 조절하는지를 분석하였다. 구체적으로, PARP(poly (ADP-ribose) polymerase)는 세포사멸 단계에서 절단된 caspase의 단백질 분해 기질로, PARP의 분해는 caspase-3의 활성화에 의해 유도되며, 이는 세포사멸로 이어진다. 또한, pro-apoptosis 유전자인 Bax 및 anti-apoptosis 유전자인 Bcl2의 비율(Bax/Bcl2)은 세포 사멸의 단계를 결정하는 중요한 요인에 해당한다.

[0242] AGS 세포를 100φ 세포 배양 접시(6mL에 1×10^6 세포/접시)에 넣고 37℃에서 5% CO₂ 대기에서 배양하였다. 24 시간 후, 세포를 다양한 농도의 화합물로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 수확하고 단백질 추출 키트(iNtRON Biotechnology, 서울, 대한민국)를 사용하여 단백질 추출물을 제조하였다. 단백질 추출물(30 μg/μl)을 12% SDS-PAGE로 분리 하였다. 이후 단백질을 300mA에서 140분 동안 니트로 셀룰로오스(NC) 막으로 옮겼다. 전달된 막은 0.05% Tween 20(TBS-T)을 포함하는 TBS에서 탈지유로 2시간 동안 차단하고 세척하였다. 이어서, 멤브레인을 4℃에서 밤새 특이 항체(PARP, caspase-3, Bax, Bcl-2 및 β-actin, 1 : 1000)와 함께 배양하고 세척한 후, 실온에서 2차 항체와 함께 배양 하였다. 제조사의 지침에 따라, EZ-Western Lumi Pico 시약으로 표적 단백질 밴드를 시각화 하였다.

[0243] 그 결과, PARP는 n-부탄올 분획물, 화합물 1, 2 및 11의 용량 의존적으로 분해되었으며, 이에 따라 caspase-3의 발현이 감소되고 AGS 세포에서 caspase-3가 분해되었다. 한편, Bax는 n-부탄올 분획물, 화합물 2 및 11에 영향을 받지 않았으나 화합물 1의 처리에 따라 발현이 증가하였으며, Bcl-2는 n-부탄올 분획물, 화합물 1, 2 및 11의 처리에 따라 발현이 감소하였다(도 3).

[0244] 결과적으로, n-부탄올 분획물, 화합물 1, 2 및 11의 처리는 Bax/Bcl-2 비율을 증가시켜 세포사멸을 유도하였으며, 이에 따라 AGS 세포의 성장을 저해함을 확인하였다. 아울러, 설포퀴노보실 글리세라이드(sulfoquinovosyl glyceride) 화합물인 화합물 1 및 2는 다른 갈락토글리코실 글리세라이드 화합물(화합물 3 내지 10, 12 및 13)보다 HepG2, AGS, HCT-15, 및 A549 세포에 대해 높은 항암 효과를 갖는다는 것을 확인하였다. 이로부터, 아옥 지상부의 n-부탄올 분획물, 상기 화합물 1, 2 및 11은 AGS를 비롯한 다양한 암세포의 세포사멸을 유도하여 암의 예방 또는 치료 효과를 갖는 것을 알 수 있었다.

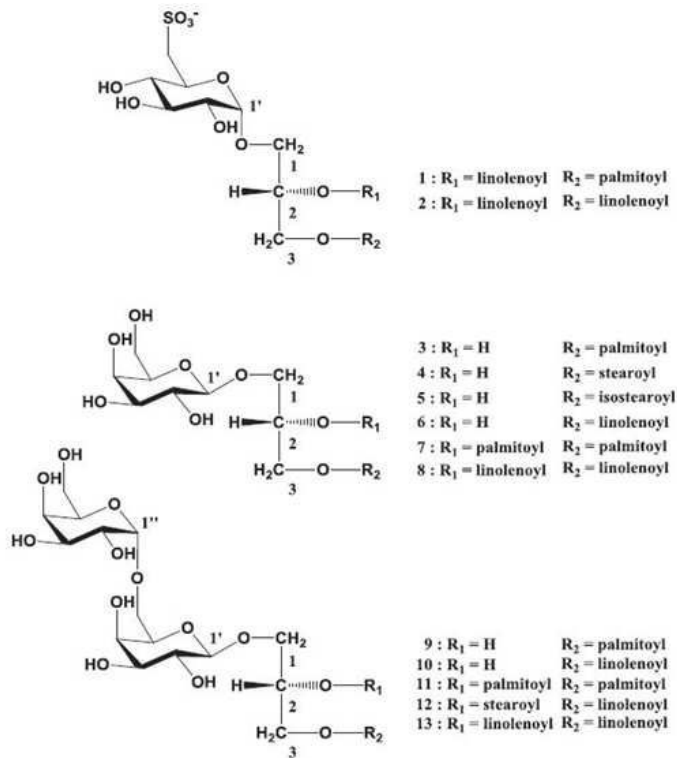
[0246] **5-5: 통계 분석**

[0247] 각 실험은 적어도 세 번씩 수행하였다. 결과는 평균의 평균±표준 오차 (S.E.M.)로 표현된다. 편도 일원 분산 분석(one-way ANOVA)을 사용하여 *p < 0.05, **p < 0.01 및 ***p < 0.001의 유의 수준으로 데이터를 평가하였다.

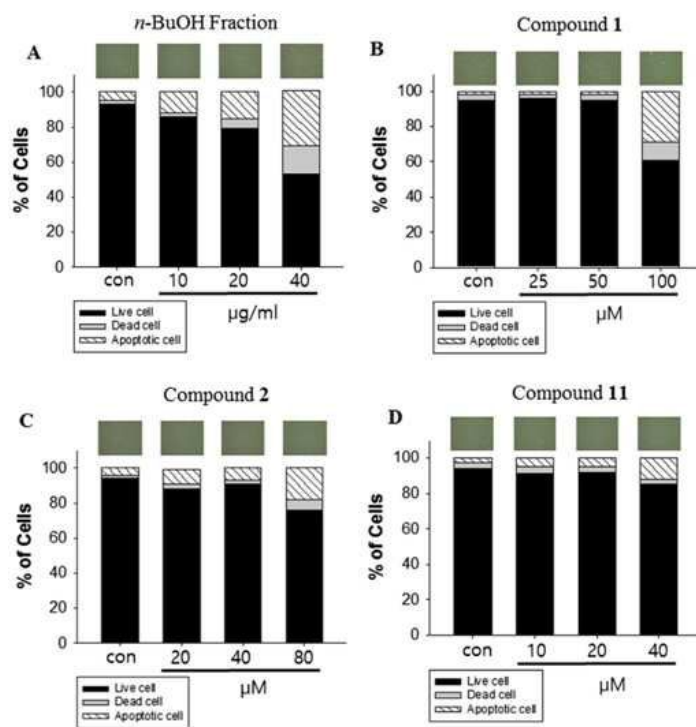
[0249] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

