



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0106276

(43) 공개일자 2015년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/343 (2006.01) A61K 31/015 (2006.01)

A61K 31/122 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0028609

(22) 출원일자 2014년03월11일

심사청구일자 2014년03월11일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

정락훈

경기 화성시 새강3길 3-1, 301호 (반송동)

차병주

경기 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 106호 (서천동, 경희대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 대아

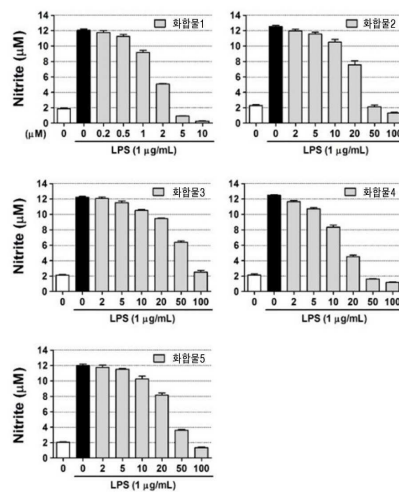
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 벼 뿌리 유래의 다이티펜 화합물을 포함하는 항염증 조성물

(57) 요약

본 발명은 다이티펜 화합물을 포함하는 염증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김지영

서울 서초구 나루터로4길 28, 306동 1204호 (잠원동, 신반포아파트)

백남인

경기도 화성시 동탄중앙로 51, 629동 901호 (반송동, 동탄나루마을한화꿈에그린아파트)

이상민

경기 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 309호 (서천동, 경희대학교)

조진경

경기 수원시 영통구 반달로 56, 205호 (영통동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009574

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린 21사업

연구과제명 벼 지상부와 뿌리 신규 폴리페놀 화합물을 이용한 미백 및 항염증 화장품 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

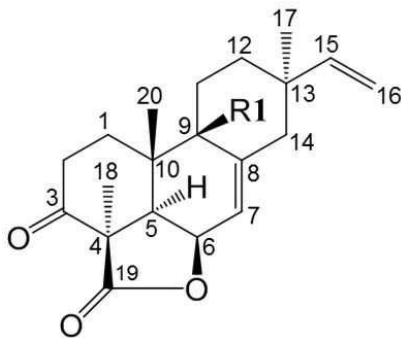
명세서

청구범위

청구항 1

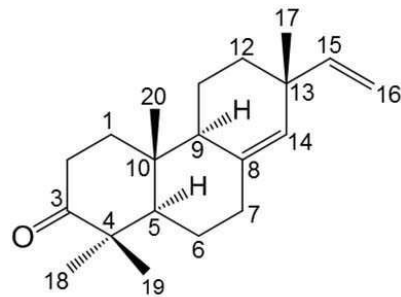
하기 화학식 1 내지 4 중 어느 하나의 화학식으로 표시되는 화합물 또는 그 허용 가능한 염을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

<화학식 1>

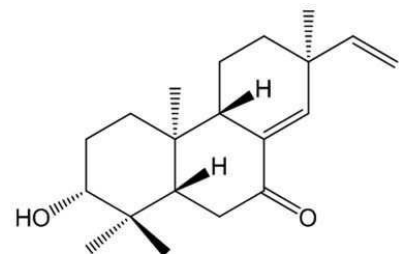


이 때, R1은 H 또는 OR2이며, 상기 R2는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

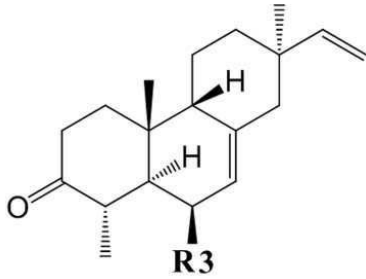
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



이 때, R3는 H 또는 OR4이며, 상기 R4는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 산화질소(NO)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

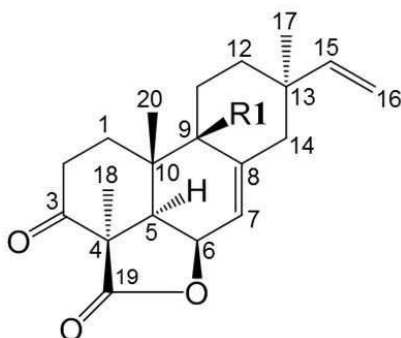
제 1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 간직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

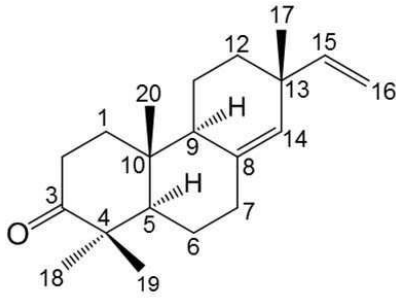
하기 화학식 1 내지 4 중 어느 하나의 화학식으로 표시되는 화합물 또는 그 허용 가능한 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

<화학식 1>

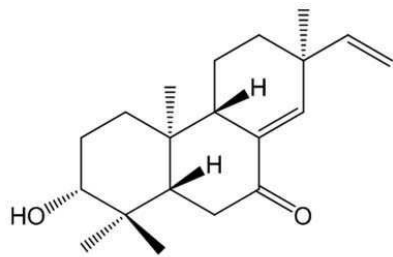


이 때, R1은 H 또는 OR2이며, 상기 R2는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

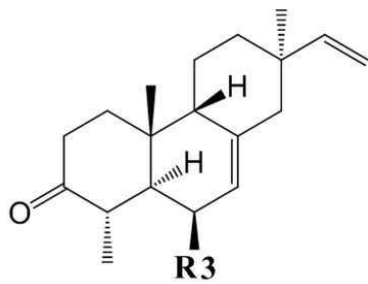
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>

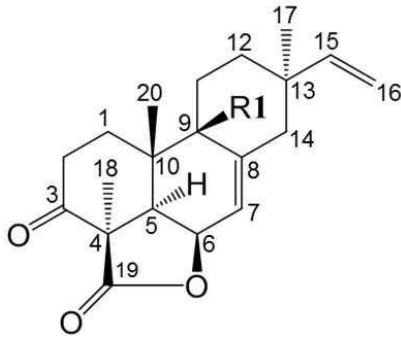


이 때, R3는 H 또는 OR4이며, 상기 R4는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

청구항 5

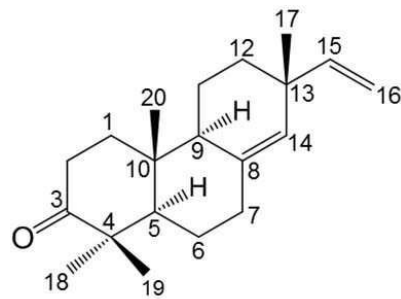
하기 화학식 1 내지 4 중 어느 하나의 화학식으로 표시되는 화합물 또는 그 허용 가능한 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 화장품 조성물:

<화학식 1>

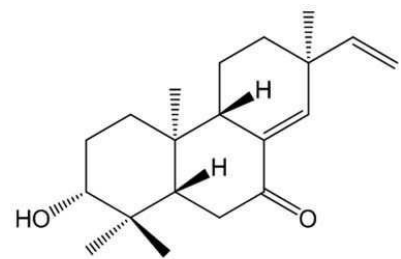


이 때, R1은 H 또는 OR2이며, 상기 R2는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

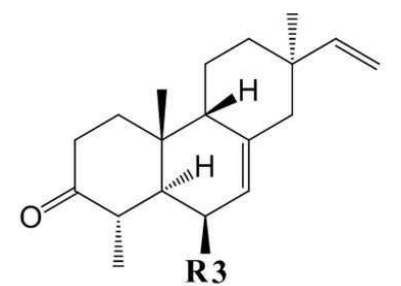
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>

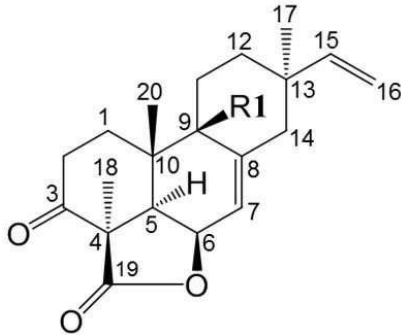


이 때, R3는 H 또는 OR4이며, 상기 R4는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그 허용가능한 염:

<화학식 1>



이 때, R1은 OR²이며, 상기 R²는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 화합물은 염증의 예방, 개선 또는 치료능을 갖는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 그 허용가능한 염.

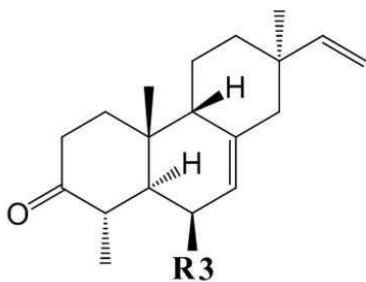
청구항 8

벼를 유기용매로 추출하는 단계를 포함하는 제 6항의 화합물의 제조 방법.

청구항 9

하기 화학식 4로 표시되는 화합물 또는 그 허용가능한 염:

<화학식 4>



이 때, R3는 H 또는 OR⁴이며, 상기 R⁴는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 화합물은 염증의 예방, 개선 또는 치료능을 갖는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 그 허용가능한 염.

청구항 11

벼를 유기용매로 추출하는 단계를 포함하는 제 9항의 화합물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항염증 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 벼(*Oryza sativa* L.)는 벼과(Gramineae)에 속하는 1년생 초본식물로 아시아 전역에 널리 분포하고 있다. 높이는 50 내지 100 cm이며 뿌리에 가까운 곳에서 가지를 쳐서 포기를 형성하여 자란다. 꽃이 필 때는 곧추 서지만 익을 때는 밑으로 처지며 많은 소수가 달리고 소수는 가지에 호생하며 짧은 대가 있고 1개의 꽃으로 된다. 꽃은 7~8 월경에 피며 자가수분에 의하여 결실한다.

[0003] 벼의 열매인 쌀은 우리나라의 주된 식량 자원으로서, 그 동안 쌀 또는 벼의 가공 방법, 개량 방법(예컨대, 한국 공개특허 제 10-2013-0141261호 등), 쌀 또는 벼의 부산물을 이용한 식품(예컨대 한국공개특허 제 10-2013-0065061호 등)과 같은 전통적인 이용에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 그러나 벼 자체에도 많은 유용한 성분들이 있다는 것이 최근 밝혀지고 있다.

[0004] 이에 본 발명자들은 벼 유래의 화합물들을 분리, 연구하던 중 벼로부터 신규 화합물들을 분리하였을 뿐 아니라, 이를 포함하는 특정 다이테펜 화합물들이 항염 효능을 갖는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 항염증 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 벼 뿌리 유래의 다이테펜 화합물 및 그 허용가능한 염을 포함하는 항염증 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0007] 본 발명의 항염증 조성물은 산화질소 생성 억제능을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 실시예 1 내지 5의 벼 뿌리 추출물 및 분획물들의 산화질소 생성 저해능을 나타낸다.

도 2는 실시예 1 내지 5의 벼 뿌리 추출물 및 분획물들의 세포 생존율을 나타낸다.

도 3은 벼 뿌리로부터 분리한 다이테펜계 화합물들인 화합물 1 내지 5의 산화질소 생성 저해능을 나타낸다.

도 4는 벼 뿌리로부터 분리한 다이테펜계 화합물들인 화합물 1 내지 5의 세포 생존율을 나타낸다.

도 5는 벼 뿌리로부터 분리한 다이테펜계 화합물들인 화합물 1 내지 5의 iNOS의 mRNA 및 단백질의 발현 억제능

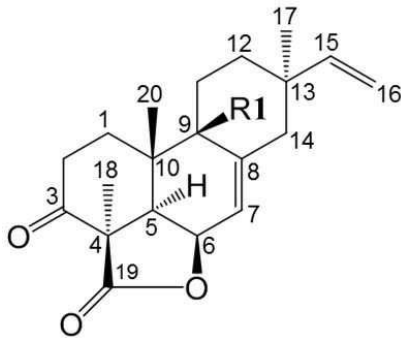
을 나타낸다(A: 역전사효소-중합효소 연쇄반응 분석 결과, B: 웨스턴 블랏 분석 결과).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은

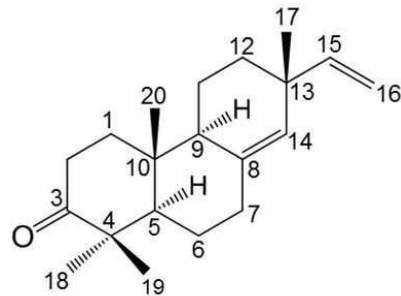
하기 화학식 1 내지 4 중 어느 하나의 화학식으로 표시되는 화합물 또는 그 허용 가능한 염을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다.

<화학식 1>

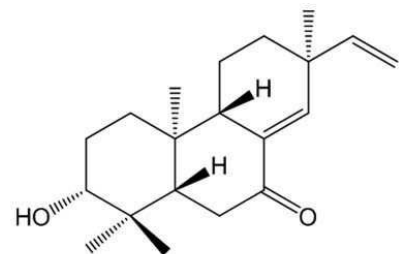


이 때, R1은 H 또는 OR2이며, 상기 R2는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

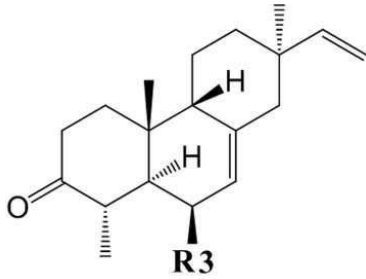
<화학식 2>



<화학식 3>



[0018] <화학식 4>



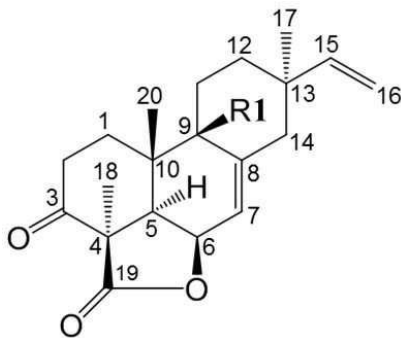
[0019]

[0020] 이 때, R3는 H 또는 OR4이며, 상기 R4는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

[0021] 또한 본 발명은,

[0022] 하기 화학식 1 내지 4 중 어느 하나의 화학식으로 표시되는 화합물 또는 그 허용 가능한 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 대한 것이다.

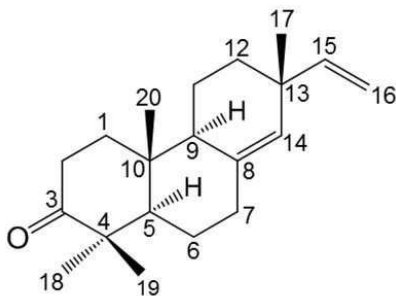
[0023] <화학식 1>



[0024]

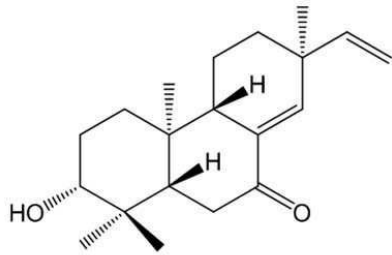
[0025] 이 때, R1은 H 또는 OR2이며, 상기 R2는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

[0026] <화학식 2>



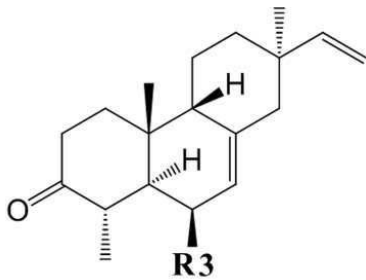
[0027]

[0028] <화학식 3>



[0029]

[0030] <화학식 4>



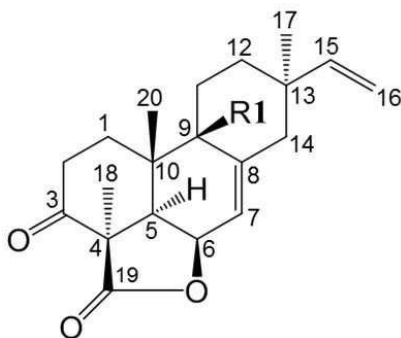
[0031]

[0032] 이 때, R3는 H 또는 OR4이며, 상기 R4는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

[0033] 또한 본 발명은,

[0034] 하기 화학식 1 내지 4 중 어느 하나의 화학식으로 표시되는 화합물 또는 그 허용 가능한 염을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 대한 것이다.

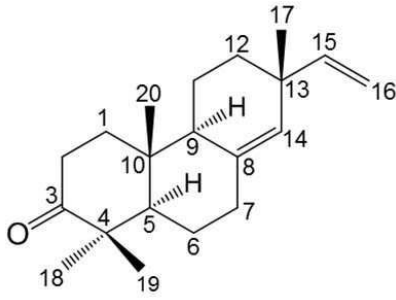
[0035] <화학식 1>



[0036]

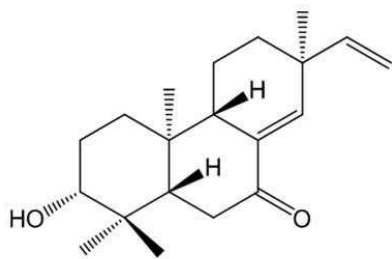
[0037] 이 때, R1은 H 또는 OR2이며, 상기 R2는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

[0038] <화학식 2>



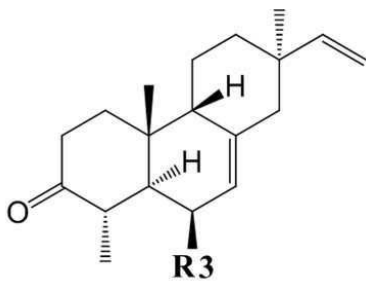
[0039]

[0040] <화학식 3>



[0041]

[0042] <화학식 4>



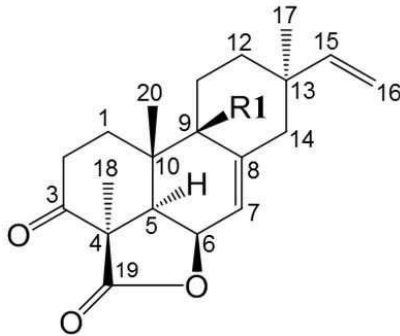
[0043]

[0044] 이 때, R3는 H 또는 OR4이며, 상기 R4는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

[0045] 또한 본 발명은

[0046] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그 허용가능한 염에 대한 것이다.

[0047] <화학식 1>



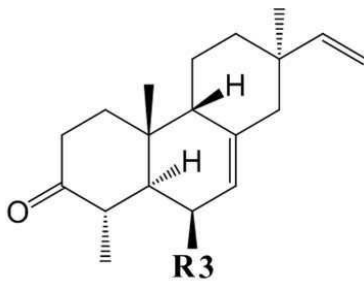
[0048]

[0049] 이 때, R1은 OR²이며, 상기 R2는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

[0050] 또한 본 발명은

[0051] 하기 화학식 4로 표시되는 화합물 또는 그 허용가능한 염에 대한 것이다.

[0052] <화학식 4>



[0053]

[0054] 이 때, R3는 H 또는 OR⁴이며, 상기 R4는 H, CH₃, CH₂CH₃ 및 CH₂CH₂CH₃로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

[0055] 또한 본 발명은 버를 유기 용매로 추출하는 단계를 포함하는 상기 화합물 또는 그 염의 제조 방법에 대한 것이다.

[0056] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0057] 약학적 조성물

[0058] 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다. 상기 약학적 조성물은 산화질소(NO)의 발현을 억제하는 특성이 있다.

[0059] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 0.01 내지 80 중량% 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.02 내지 65 중량% 포함할 수 있다. 그러나 이는 투약자의 필요에 따라 증감할 수 있

으며, 식생활, 영양 상태, 병의 진행 정도, 염증의 정도 등 상황에 따라 적절히 증감할 수 있다.

[0060] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제는 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제가 있으며 이들 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.

[0061] 본 발명의 본 발명의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 성별 및 합병증 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있지만 일반적으로는 성인 1kg 당 0.1mg 내지 10g, 바람직하게는 10 mg 내지 5g의 용량으로 투여될 수 있다. 또, 단위 제형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0062] 염증성 질환

[0063] 상기 염증성 질환은 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 간직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0064] 본 발명의 다이터펜계 화합물들

[0065] 본 발명의 화합식 1 내지 4의 화합물들, 특히 화합물 1 내지 5의 화합물은 염증의 예방, 개선 또는 치료능을 갖는다. 본 발명의 다이터펜계 화합물들은 식물로부터 분리하거나 합성을 통하여 수득할 수 있다. 상기 식물은 벼과 식물인 것이 바람직하며 더욱 바람직하게는 벼이다.

[0066] 본 발명의 다이터펜계 화합물들의 제조 방법

[0067] 본 발명은 벼를 유기용매로 추출하는 단계를 포함하는 본 발명의 다이터펜계 화합물들의 제조 방법을 제공한다. 상기 유기용매로 추출한 후에는 상기 유기용매와 동일하거나 상이한 유기용매로 분획하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 유기용매는 탄소 수 5 이하의 저가 알코올, 에틸아세테이트, 물, 클로로포름 등이 될 수 있으며, 상기 저가 알코올은 특히 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올인 것이 바람직하다.

[0068] 식품 조성물

[0069] 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 대한 것이다.

[0070] 본 발명의 식품은 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염을 첨가하는 것도 포함된다.

[0071] 본 발명의 식품 조성물은, 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 화합물 또는

그 허용가능한 염은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량%에 대하여 0.1 내지 70 중량%, 바람직하게는 2 내지 50 중량%로 첨가될 수 있다. 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0072] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 분해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.

[0073] 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

[0074] 화장료 조성물

[0075] 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염을 포함하는 화장료 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 화장료 조성물은 항염 효능이 있는바, 특히 트러블 피부, 여드름 피부, 아토피 피부 등에 사용될 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은, 당업계의 통상적으로 제조되는 어떠한 제형에도 제조될 수 있으며 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 화장료 조성물은 유연화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 또는 파우더 제형으로 제조될 수도 있다.

[0076] 본 발명의 화장료 조성물은 효과적인 경피 흡수를 위하여 피부 침투 촉진제를 포함할 수 있다. 상기 피부 침투 촉진제는 당 업계에서 화장료 조성물에 사용하는 일반적인 피부 침투 촉진제면 되고, 특별히 제한되는 것은 아니다. 예컨대 본 발명의 피부 침투 촉진제는 디메틸 설펝사이드, oleic acid 등 지방산/에스테르 화합물, 리모넨(limonene) 등이 될 수 있다.

[0077] 또한 본 발명의 화장료 조성물을 이용 시에는 충격파, 이온삼투요법, 전기침공법, 미세침요법 등 물리적 방법을 병용하여 경피 흡수를 촉진할 수도 있다.

[0078] 사료 조성물

[0079] 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염을 포함하는 사료 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 사료 조성물은 통상적인 사료와 함께 배식할 수 있으며, 본 발명의 사료 조성물을 통상적인 사료 조성물에 첨가하여 기능성 사료 조성물을 제조하여 이용할 수도 있다. 또한 본 발명의 사료 조성물은 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염 외 기능성 성분을 추가로 포함할 수도 있다. 상기 통상적인 사료 조성물과 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염이 혼합된 기능성 사료 조성물의 제조 시, 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염은 총 사료 조성물에 대하여 0.01 내지 30.00 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 20.00 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 사료 조성물의 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염의 유효용량은 상기 식품 조성물의 유효 용량에 준해서 사용할 수 있으나, 지속적인 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 필요에 따라 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0080] 본 발명의 사료 조성물은 가축 또는 가금을 대상으로 한다. 상기 가축 또는 가금은 소, 돼지, 닭, 말, 양, 당나귀, 노새, 멧돼지, 토끼, 메추라기, 집오리, 장닭, 투계용 닭, 비둘기, 칠면조, 개, 고양이, 원숭이, 햄스터, 생쥐, 래트, 구관조, 앵무새, 잉꼬, 카나리아 등이나 이들에 제한되는 것은 아니며 가정 내에서 사육 가능한 인간 이외의 포유 동물 또는 조류이면 본 발명의 사료 조성물의 대상이라 할 것이다.

[0081] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0082] 재료 및 방법

[0083] 벼 뿌리

[0084] 벼(Chucheongbyeol) 뿌리는 인천시 강화군에서 2011년 11월에 채집하였고, 농촌진흥청 조준현 박사가 동정하였다.

[0085] 도구 및 시약

[0086] Column chromatography용 silica gel(SiO₂)은 Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt, Germany), octadecyl SiO₂ (ODS)은 LiChroprep RP-18 (40-60 μm, Merck), Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 사용하였다. TLC는 Kieselgel 60 F254와 RP-18 F254S를 사용하였고, TLC 상의 물질검출에는 UV 램프 (Spectroline, Model ENF-240 C/F, Spectronics Corporation, New York, USA)로 보거나, 10% aq. H₂SO₄를 분무한 후 가열하여 발색 양상을 조사하였다. NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400 (400 MHz, Varian, Palo Alto, CA, USA)으로 측정하였고, Circular dichroism (CD)는 Chirascan Plus (Applied Photophysics Ltd., Leatherhead, UK)를 사용하였다. IR 스펙트럼은 Perkin model 599B (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였고, EI-MS는 JMS-700 (JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였으며, 매트릭스(matrix)는 글리세롤(glycerol)을 사용하였다. 녹는점은 Stanford Research System 융점측정기 (SRS, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정하였고, 비선광도는 Polarimeter P-1020 (JASCO, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

[0087] 세포 배양

[0088] 실험에 사용한 뮌린 대식세포 RAW264.7은 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank; KCLB)에서 구입하였으며 10% fetal bovine serum (FBS, WelGENE Inc., Seoul, Korea), 글루타메이트(2 mM), 페니실린 (100 U/mL) 및 스트렙토마이신 (100 μg/mL)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지 (DMEM, WelGENE)를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 다양한 농도의 벼뿌리 추출물, 분획물 및 다이티펜 화합물들이 포함된 시료를 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich Co.) (1 μg/mL)와 함께 또는 LPS 단독으로 RAW264.7 세포에 처리하고 18 내지 24 시간 동안 배양하였다.

[0089] 산화질소 측정

[0090] RAW264.7 세포를 96-웰 세포 배양 플레이트에 웰당 1×10^4 세포가 되도록 분주한 후 12 내지 18시간 동안 부착시키면서 배양하였다. 다양한 농도의 벼 뿌리 추출물, 분획물 및 다이티펜 화합물들을 LPS (1 μg/mL)와 동시에 처리하거나 또는 LPS를 단독으로 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후 세포 배양액을 획득한 다음 배양액 중에 함유된 NO의 양을 Griess Reagent System (Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 측정하였다. 새로운 96-웰 플레이트에 배양된 세포 배지 100 μL와 Griess 시약 100 μL를 혼합하여 상온에서 10분간 방치하였다. 다음으로 microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하

였다. 생성된 산화질소의 양은 sodium nitrite 표준 곡선을 이용하여 계산하였다.

[0091] 세포독성 시험

[0092] RAW264.7 세포를 96-웰 세포 배양 플레이트에 웰당 1×10^4 세포가 되도록 분주한 후 12 내지 18 시간 동안 부착 시키면서 배양하였다. 다양한 농도의 베타리 추출물, 분획물 및 다이테펜 화합물들을 혈청이 없는 배지에 녹여 24 시간 동안 처리하였다. 24시간 후 10 ug/mL 농도의 3-(4,5-dimethylnthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-thetazoliumbromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.)용액을 웰당 10 μ l씩 처리한 후 추가 배양하였다. 30 내지 60 분 후 세포배양액을 완전히 제거하고 보라색으로 형성된 포마잔 결정을 100 μ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co.)를 각 웰마다 처리하여 완전히 녹여준 뒤 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존률은 하기 식 1에 따라 시료를 처리한 그룹과 아무것도 처리하지 않은 대조군 그룹 내에 있는 생존 세포의 비율로써 측정하였다.

[0093] <식 1>

[0094] 세포 생존률 (%) = [OD (시료처리군 흡광도) - OD (백지군 흡광도) / OD (대조군 흡광도) - OD (백지군 흡광도)] $\times$ 100

[0095] 역전사효소-중합효소연쇄반응 분석

[0096] RAW264.7 세포를 6-웰 세포 배양 플레이트에 웰당 1×10^5 세포가 되도록 분주한 후 12 내지 18 시간 동안 부착 시키면서 배양하였다. 다이테펜 화합물들을 LPS (1 μ g/ml)와 동시에 처리하거나 또는 LPS를 단독으로 18시간 동안 RAW264.7 세포에 처리하였다. 18시간 후 세포의 전체 RNA를 Trizol 시약 키트 (Invitrogen, Carsbad, CA, USA)를 이용하여 추출하였고, 5 μ g의 RNA를 M-MuLV 역전사중합효소 (Fermentas Life Science)를 이용하여 역전사시켜 cDNA를 생성하였다. iNOS, GAPDH를 암호화한 cDNA를 각각 상보적인 포워드 프라이머(forward primer)와 리버스 프라이머(reverse primer)를 이용하여 Taq 중합효소를 이용하여 중합효소연쇄반응방법으로 증폭시켰다. 증폭에 사용한 primer의 서열은 하기 표 1과 같으며, GAPDH는 세포 내부 대조군으로 사용하였다.

표 1

INOS	5'-TCTTCGAAATCCACCTGAC-3' (sense)
	5'-CCATGATGGTCACATTCTGC-3' (antisense)
GAPDH	5'-CGTCTTCACCACCATGGAAGA-3' (sense)
	5'-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3' (antisense)

[0097]

[0098] 웨스턴블랏 분석

[0099] RAW264.7 세포를 6-웰 세포 배양 플레이트에 웰당 1×10^5 세포가 되도록 분주한 후 12 내지 18시간 동안 부착 시키면서 배양하였다. 다이테펜 화합물들을 LPS (1 μ g/ml)와 동시에 처리하거나 또는 LPS를 단독으로 18시간 동안 RAW264.7 세포에 처리하였다. 18시간 후 단백질을 분해효소 저해제를 포함한 RIPA 완충용액 (Biosesang Inc., Seoul, Korea)을 사용하여 세포를 용해시키고 세포내 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질은 Bradford (Biosesang Inc.) 단백질 분석 키트를 사용하여 정량하였으며 정량된 단백질 40 ug를 사용하여 8% 젤 상에서 SDS-polyacrylamide 젤 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, nitrocellulose membrane으로 분리된 단백질을 이동하였으며 항체의 비 특이적 결합을 억제시키기 위해 membrane을 5% 탈지분유액이 포함된 Tris-buffered saline-Tween (TBS-T)로 1시간 실온에서 배양하였다. 그 후 항원 특이적인 1차 항체와 12시간 동안 반응시킨 후, horseradish peroxidase를 붙인 2차 항체와 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBS-T로 6회 이상 세척한 후 ECL detection system (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 확인하였다. 실험에 사용한 전체 단백질 양이 동일함을 알 수 있도록 내부 대조군으로 GAPDH를 사용하였다.

[0100] 벼 뿌리 추출물 및 분획물의 제조

[0101] 건조한 벼 뿌리 8.35kg을 80% 메탄올(94L)로 12시간 동안 3회 반복추출하였고, 얻어진 여액을 감압농축하여 284g(ORM, 벼 뿌리 메탄올 추출물, 실시예 1)을 얻었다.

[0102] 상기 실시예 1의 벼 뿌리 메탄올 추출물을 에틸 아세테이트(ethyl acetate)(EtOAc, 4 L × 3)/H₂O (4 L)로 분배 추출하였으며, 에틸 아세테이트층을 제하고 남은 물층을 n-부탄올(butanol) (n- BuOH, 2.8 L × 3)로 다시 추출하였다. 각 층을 감압농축하여 에틸 아세테이트 분획물(ORE, 실시예 2, 38 g), n-부탄올 분획물(ORB, 실시예 3, 26 g) 및 물 분획물(ORH, 실시예 4)을 얻었다.

[0103] 벼 뿌리 분획물로부터 다이터펜 화합물들의 분리

[0104] 상기 에틸 아세테이트분획물(즉, 실시예 2) 38 g에 대하여 silica gel column chromatography (c.c.) (φ 11.5 × 13.0cm, n-hexane-에틸 아세테이트=7:1, 8 L → 5:1, 7 L → 3:1, 17 L → 1:1, 10 L → CHCl₃-MeOH=17:1, 4 L → 15:1, 7 L → 12:1, 3 L → 9:1, 7 L → 6:1, 2 L → 3:1, 4 L → 1:1, 6 L)를 실시하여, 32개의 분획물(ORE-1 내지 ORE-32)을 얻었다. ORE3 분획을 (2 g, Ve/Vt=0.01 - 0.02 ; Ve 해당 분획 용출용매의 부피; Vt 용출에 사용한 전체 용출용매의 부피) silica gel c.c. (φ 5.0 × 14.0 cm, n-hexane-에틸 아세테이트=27:1, 2 L)를 실시하여 15개의 분획물(ORE-3-1 내지 ORE-3-15)를 얻었다. 그 중, ORE-3-7분획 (130 mg, Ve/Vt 0.06 내지 0.11)에 대하여 ODS c.c. (φ 3.0 × 7.0cm, acetone-acetonitrile-H₂O=5:5:2, 1.2 L)를 실시하여 17개의 분획물 (ORE-3-7-1 내지 ORE-3-7-17)을 얻었으며, 화합물 2 [ORE-3-7-8, 10.7 mg, Ve/Vt 0.16 내지 0.37, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.20, acetone-acetonitrile-H₂O = 3:3:1]를 분리하였다. ORE-12분획 (692mg, Ve/Vt 0.19 to 0.21)에 대하여 ODS c.c. (φ 4 X 8 cm, acetone-acetonitrile-H₂O=1:1:4, 2.0 L → 1:1:2, 1.0 L)를 실시하여 25개의 분획물 (ORE-12-1 내지 ORE-12-25)을 얻었다. ORE-12-8분획 (100 mg, Ve/Vt 0.30 내지 0.34)에 대하여 Sephadex LH-20 c.c. (φ 1.5 X 56.0 cm, MeOH-H₂O=9:1, 0.8 L)를 실시하여 8개의 분획물 (ORE-12-8-1 내지 ORE-12-8-8)을 얻었고, ORE-12-8-3분획을 (2 g, Ve/Vt=0.43 내지 0.48) silica gel c.c. (φ 3.0 X 12.0 cm, CHCl₃-MeOH=40:1, 0.7 L)를 실시하여 13개의 분획물(ORE-12-8-3-1 내지 ORE-12-8-3-13)를 얻었다. ORE-12-8-3-4분획(32mg, Ve/Vt=0.15 내지 0.25)에 대하여 silica gel c.c. (φ 2.5 X 10.5 cm, n-hexane-에틸 아세테이트=8:1, 0.8 L)를 실시하여 12개의 분획물(ORE-12-8-3-4-1 내지 ORE-12-8-3-4-12)를 얻었고, 화합물 5 [ORE-12-8-3-4-2, 2.7 mg, Ve/Vt 0.06 to 0.20, TLC (SiO₂ F254) R_f 0.67, n-hexane-에틸 아세테이트 = 3:1]와 화합물 4 [ORE-12-8-3-4-10, 4.9 mg, Ve/Vt 0.63 to 0.89, TLC (SiO₂ F254) R_f 0.23, n-hexane-에틸 아세테이트 = 3:1]를 분리하였다. 또한 ORE-14 분획 (1.9 g, Ve/Vt 0.22 내지 0.27)에 대하여 ODS c.c. (φ 4.5 X 12.0 cm, acetone-acetonitrile-H₂O=1:1:4, 2.0 L → 3:3:2, 1.2 L)를 실시하여 20개의 분획물 (ORE-14-1 내지 ORE-14-20)을 얻었고, 그 중 ORE-14-6 분획(93mg, Ve/Vt 0.49 내지 0.58)을 silica gel c.c. (φ 3.0 X 17.0 cm, CHCl₃-MeOH=45:1, 1.0 L)를 실시하여 12개의 분획물(ORE-14-6-1 내지 ORE-14-6-12)를 얻었으며, 화합물 1 [ORE-14-6-3, 35 mg, Ve/Vt 0.13 내지 0.15, TLC (SiO₂ F254) R_f 0.60, CHCl₃-MeOH = 20:1]을 분리하였다. ORE-20분획 (596 mg, Ve/Vt 0.34~0.41)에 대하여 ODS c.c. (φ 3.0 X 5.0 cm, acetone-acetonitrile-H₂O=2:2:7, 1.8 L)를 실시하여 17개의 분획물 (ORE-20-1 내지 ORE-20-17)을 얻었고, 그 중 ORE-20-2 분획(127 mg, Ve/Vt 0.05~0.07)을 silica gel c.c. (φ 3.5 X 12.0 cm, CHCl₃-MeOH=35:1, 1.5 L)를 실시하여 17개의 분획물(ORE-20-2-1 내지 ORE-20-2-17)를 얻었으며, 화합물 3 [ORE-20-2-8, 4.5 mg, Ve/Vt 0.24 내지 0.33, TLC (SiO₂ F254) R_f 0.29, CHCl₃-MeOH = 19:1]을 분리하였다.

[0105] 분리된 다이터펜 화합물들의 확인

[0106] 상기 분리한 화합물들에 대하여 NMR, MS, 및 IR 을 측정하여 구조를 동정하였다. 그 결과, 화합물 1, 2, 및 4는 각각 이미 알려진 화합물인 모밀락톤(momilactone) A, 산다라코피마라디엔-3-온(sandaracopimaradien-3-one), 및 오리잘렉신(oryzalexin) A로 확인되었고, 화합물 3 및 5는 신규 화합물로 확인되었다.

[0107] 화합물 1은 IR스펙트럼에서 락톤(1770 cm⁻¹), 케톤(1700 cm⁻¹), 및 이중결합(1640 cm⁻¹)의 흡수를 확인하였다. EI/MS 스펙트럼에서 314의 이온 피크가 확인되어 분자량을 314로 결정하였다. ¹H-NMR에서 한 개의 vinyl signal[δ H5.79 (1H, dd, J = 17.6, 10.8 Hz, H-15), 4.92 (1H, dd, J = 17.6, 1.2 Hz, H-16a), 및 4.87 (1H,

dd, $J = 10.8, 1.2$ Hz, H-16b)], 한 개의 olefin methine signal [δ H 5.64 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-7)], 한 개의 oxygenated methine signal [δ H 4.79 (1H, dd, $J = 5.8, 5.2$ Hz, H-6)]을 확인하였다. 고자장 영역에서는 세 개의 methyl signal [δ H 1.49 (3H, s, H-18), 1.25 (3H, s, H-20), 및 0.83 (3H, s, H-17)]이 관측되었고, δ H 2.54 내지 1.27 부근에서 다수의 methine과 methylene signal이 관측되었다. ^{13}C -NMR에서 20개의 signal이 관측되어 다이테페노이드(diterpenoid)임을 예상하였다. 저자장 영역에서 케톤 [δ C 205.1 (C-3)], 락톤 [δ C 174.2 (C-19)], olefin quaternary [δ C 147.9 (C-8)], olefin methylene [δ C 110.0 (C-16)], oxygenated methine [δ C 73.0 (C-6)] signal이 하나씩 관측되었고, 두 개의 olefin methine [δ C 148.8 (C-15) 및 113.8 (C-7)]이 관측되었다. 고자장 영역에서는 세 개의 quaternary [δ C 53.4 (C-4), 39.9 (C-13), 및 32.3 (C-10)], 두 개의 methine [δ C 50.0 (C-9) 및 46.2 (C-5)], 다섯 개의 methylene [47.4 (C-14), 37.1 (C-12), 34.7 (C-2), 31.0 (C-1), 및 23.8 (C-11)], 세 개의 methyl [δ C 21.8 (C-17), 21.6 (C-20), 및 21.3 (C-18)] signal이 관측되었다. 이상의 결과로부터 화합물 1은 ketone 하나와 lactone 하나, 그리고 이중결합 두 쌍을 포함하는 pimarane 타입의 diterpenoid로 결정되었다.

[0108]

gCOSY에서 δ H 4.79 (H-6)의 oxygenated methine proton signal이 δ H 5.64 (H-7)의 olefin methine proton signal 및 δ H 2.29 (H-5)의 methine proton signal과 cross peak를 보였다. gHMBC에서는 ketone carbon signal C-3 (δ C 205.1)이 methyl proton signal H-18 (δ H 1.49) 및 methylene proton signal H-1 (δ H 1.85)과 cross peak를 보였고, lactone C-19 (δ C 174.2)이 H-18, methine proton signal H-5 (δ H 2.29)과 cross peak를 보였다. H-18이 quaternary carbon signal인 C-4 (δ C 53.4) 및 C-5 (δ C 46.2)와 cross peak를 보였고, methyl proton signal인 H-20 (δ H 1.25)이 C-5 및 methine carbon signal인 C-9 (δ C 50.0)과 cross peak를 보였다. 또한 methyl proton signal인 H-17 (δ H 0.83)이 methylene carbon signal인 C-12 (δ C 37.1), olefin methine carbon signal인 C-15 (δ C 148.8), 그리고 methylene carbon signal인 C-14 (δ C 47.4)과 cross peak를 보여 methyl 기들의 결합 위치를 확인하였다[C-17 (δ C 21.8), C-18 (δ C 21.3), 및 C-20 (δ C 21.6)]. H-7 (δ H 5.64)이 C-6 (δ C 73.0) 및 C-9와 cross peak를 보였으며, H-17이 C-15과 olefin methylene proton signal인 H-16 (δ H 4.92 and 4.87)은 quaternary carbon signal C-13 (δ C 39.9)과 cross peak를 보여 두 쌍의 이중결합이 C-7과 C-8, 그리고 C-15과 C-16에 위치하는 것을 확인하였다. 상기 결과들로부터 화합물 1은 모밀락톤(momilactone) A로 구조동정하였다.

[0109]

한편, 화합물 3은 IR 스펙트럼에서 수산기 (3374 cm^{-1}), lactone (1767 cm^{-1}), ketone (1699 cm^{-1}), 및 이중결합 (1647 cm^{-1})의 흡수를 보였고, EI/MS 스펙트럼에서 330의 ion peak가 관측되어 분자량을 330으로 결정하였다. 분자식은 high resolution EI/MS (calcd. 330.1832, for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$)에서 330.1833의 ion peak가 관측되어 $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$ 로 결정하였다. 화합물 3의 NMR data 양상이 화합물 1과 매우 유사하였고, δ C 74.4에서 oxygenated quaternary carbon signal이 하나 더 관측되었다. gHMBC에서 methyl proton signal인 H-18 (δ H 1.64)이 ketone carbon signal인 C-3 (δ C 204.9), quaternary carbon signal인 C-4 (δ C 54.7), methine carbon signal인 C-5 (δ C 48.4), 및 lactone carbon signal인 C-19 (δ C 174.8)과 cross peak를 보였으며, methyl proton signal인 H-20 (δ H 1.32)이 methylene carbon signal인 C-1 (δ C 27.8), C-5, oxygenated quaternary carbon signal인 C-9 (δ C 74.4), 및 quaternary carbon signal인 C-10 (δ C 38.0)과 cross peak를 보여 수산기가 C-9에 결합한 것을 확인하였다. 따라서 화합물 3은 신규 화합물인 3-옥소-9-베타-하이드록시피마라-7,15-디엔-19,6-베타-올라이드(3-oxo-9 β -hydroxypimara-7,15-dien-19,6 β -olide)로 구조동정하였고, 모밀락톤(momilactone) D로 명명하였다.

[0110]

한편 화합물 5의 IR 스펙트럼에서 hydroxyl (3620 cm^{-1}), ketone (1705 cm^{-1}), 및 이중결합 (1614 cm^{-1})의 흡수를 확인하였다. 분자식은 high resolution EI/MS (calcd. 288.2089 for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$)에서 관측된 288.2085의 ion peak로부터 $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$ 로 결정하였다. 화합물 5의 NMR data 양상이 화합물 1과 매우 유사하여 pimarane 타입임을 예상하였다. gCOSY에서 oxygenated methine proton signal인 δ H 5.48 (H-6)이 olefin methine proton signal인 at δ H 5.70 (H-7) 및 methine proton signal인 δ H 1.75 (H-5)과 cross peak를 보였고, H-5는 methine proton signal인 δ H 2.63 (H-4)과 cross peak를 보여 부분 구조를 확인하였다. gHMBC에서 methyl proton signal인 H-18 (δ H 1.10)이 ketone carbon signal인 C-3 (δ C 211.2)과, H-6 (δ H 5.48)이 olefin quaternary carbon signal인 C-8 (δ C 144.8)과 cross peak를 보여 ketone (C-3)과 수산기(C-6)의 결합 위치를

확인하였다. 또한, H-18이 C-5 (δC 46.1)와, methyl proton signal인 H-20 (δH 1.28)이 methylene carbon signal인 C-1 (δC 36.8), C-5, 및 methine carbon signal인 C-9 (δC 50.5)과 cross peak를 보였고, methyl proton signal인 H-17 (δH 0.82)이 methylene carbon signal인 C-12 (δC 37.4), olefin methine carbon signal인 C-15 (δC 149.7), 및 methylene carbon signal인 C-14 (δC 47.7)과 cross peak를 보여 methyl기의 결합 위치를 확인하였다[C-17 (δC 21.8), C-18 (δC 11.5), 및 C-20 (δC 22.3)]. H-7 (δH 5.70)이 C-5 및 C-9과, methylene proton signal인 H-14 (δH 2.05 및 1.89)이 C-7 (δC 117.2), C-9, C-12 (δC 37.4), 및 C-17과, H-17이 C-12, C-14, 및 C-15과 cross peak를 보여 이중결합의 위치를 C-7과 C-8 및 C-15과 C-16으로 결정하였다. 이 화합물의 입체 구조는 6번을 제외한 모든 chiral carbon의 chemical shift와 coupling pattern 으로부터 모밀락톤(momilactone) A (화합물 1)과 3,6-dioxo-19-nor-9 β -pimara-7,15-diene임을 확인하였다. NOESY에서 H-18인 δH 1.10이 H-5인 δH 1.75, H-6인 δH 5.48과 cross peak를 보여 C-6 수산기가 β 결합을 한 것을 확인하였다. 따라서 화합물 5는 신규 노르다이트펜(norditerpene) 화합물인 3-옥소-6 β -하이드록시-19-노르-9 β -피마라-7,15-디엔(3-oxo-6 β -hydroxy-19-nor-9 β -pimara-7,15-diene)으로 구조동정하였으며, 모밀락톤(momilactone) E로 명명하였다.

[0111]

한편, 화합물 2는 IR 스펙트럼에서 ketone (1706 cm^{-1})과 이중결합 (1633 cm^{-1})의 흡수를 확인하였다. EI/MS에서 286의 ion peak가 관측되어 분자량을 286으로 결정하였다. 1H -NMR에서 한 개의 vinyl proton signal [δH 5.84 (1H, dd, $J = 17.6, 10.8\text{ Hz}$, H-15), 4.99 (1H, dd, $J = 17.6, 1.2\text{ Hz}$, H-16a), 및 4.97 (1H, dd, $J = 10.8, 1.2\text{ Hz}$, H-16b)], 한 개의 olefin methine proton signal [δH 5.35 (1H, br s, H-14)], 그리고 네 개의 methyl proton signal [δH 1.13 (3H, s, H-19), 1.09 (3H, s, H-17), 0.99 (3H, s, H-18), 및 0.89 (3H, s, H-20)]이 관측되었다. δH 2.60 내지 0.80의 범위에서 다수의 methine과 methylene proton signal이 관측되었다. ^{13}C -NMR에서 20개의 carbon signal이 관측되어 화합물 2는 디테페노이드(diterpenoid)로 예상하였다. 저자장 영역에서 한 개의 ketone [δC 215.2 (C-3)], 한 개의 olefin quaternary [δC 136.44 (C-8)], 두 개의 olefin methane [δC 148.9 (C-15), 129.7 (C-14)], 그리고 한 개의 olefin methylene [δC 110.7 (C-16)] carbon signal이 관측되었다. 고자장 영역에서는 세 개의 quaternary [δC 47.8 (C-4), 38.2 (C-13), 및 37.8 (C-10)], 두 개의 methane [δC 55.4 (C-5) 및 49.5 (C-9)], 여섯 개의 methylene [δC 37.6 (C-1), 35.8 (C-7), 34.8 (C-2), 34.4 (C-12), 23.5 (C-6), 및 19.2 (C-11)], 그리고 네 개의 methyl [δC 26.4 (C-17), 26.1 (C-19), 22.2 (C-18), 및 14.6 (C-20)] carbon signal이 관측되었다. 이상의 결과로부터 화합물 2는 한 개의 ketone과 두쌍의 double bond를 포함하는 diterpenoid임을 확인하였다. gHMBC에서 ketone carbon signal인 C-3 (δC 215.2)이 두 개의 methyl proton signal인 H-18 (δH 0.99), H-19 (δH 1.13)과 cross peak를 보여 ketone의 결합 위치를 결정하였다. H-18과 H-19가 quaternary carbon signal인 C-4 (δC 47.8) 및 methine carbon signal인 C-5 (δC 55.4)과 cross peak를 보였고, methyl proton signal인 H-20 (δH 0.89)이 C-5, methine carbon signal인 C-9 (δC 49.5), 그리고 quaternary carbon signal인 C-10 (δC 37.8)과 cross peak를 보였으며, olefin methine proton signal인 H-14 (δH 5.35)가 methyl carbon signal인 C-17 (δC 26.4)과 cross peak를 보였고, olefin methine proton signal인 H-15 (δH 5.84)가 C-17과 cross peak를 보여 methyl기의 결합 위치를 결정하였다[C-17(δC 26.4), C-18 (δC 22.2), C-19 (δC 26.1), 및 C-20 (δC 14.6)]. 또한 H-14가 C-9, C-15 (δC 148.9), 및 C-17과 cross peak를 보였고, H-15가 C-14 (δC 129.7) 그리고 C-17과 cross peak를 보여 이중결합이 C-8과 C-14, 그리고 C-15와 C-16에 위치하는 것을 결정하였다. 화합물 2의 정확한 구조결정을 위하여 oryzalexin A와의 CD 스펙트럼을 비교하였다. 화합물 2는 positive (203 nm)와 negative (247 nm) Cotton effect를 보이는 반면에 oryzalexin A는 negative (207 nm)와 positive (255 nm) Cotton effects를 보여 화합물 2와 oryzalexin A는 정반대의 구조를 가지는 것으로 확인되었다. 상기 결과들을 종합한 결과, 화합물 2는 피마란(pimarane) 타입의 다이테페노이드(diterpenoid)인 산다라코피마라디엔-3-온(sandaracopimaradien-3-one)으로 구조동정하였다.

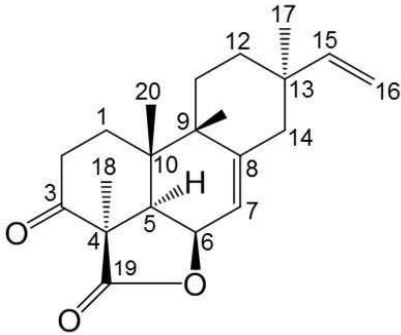
[0112]

한편, 화합물 4는 IR 스펙트럼에서 수산기(3353 cm^{-1}), conjugated ketone (1685 cm^{-1}), 그리고 이중결합 (1611 cm^{-1})의 흡수를 확인하였다. EI/MS에서 302의 ion peak가 관측되어 분자량을 302로 결정하였다. 화합물 4의 NMR 데이터 양상이 화합물 2와 매우 유사하였고, ketone(δC 207.2)과 수산기(δH 3.28, δC 80.5)의 결합 위치가 다른 것을 확인하였다. gHMBC에서 methyl proton signal인 H-18 (δH 0.85) 및 H-19 (δH 0.96)이 hydroxyl carbon signal인 C-3 (δC 80.5)과 cross peak를 보여 hydroxyl group 이 C-3에 결합하는 것을 결정하였다. 또

한 methylene proton signal인 H-6 (δ H 2.54 and 2.34)이 ketone carbon signal인 C-7 (δ C 207.2)과 cross peak를 보여 ketone이 C-7에 결합한 것을 확인하였다. 그리고, olefin methine proton signal인 H-14 (δ H 6.71)이 methine carbon signal인 C-9, methylene carbon signal인 C-12, 그리고 olefin methine carbon signal인 C-15와 cross peak를 보였고, methyl proton signal인 H-17이 C-14 그리고 C-15와 cross peak를 보였으며 olefin methylene carbon signal인 H-16 (δ H 4.98 및 4.96)이 quaternary carbon signal인 C-13 (δ C 38.7)과 cross peak를 보여 두 쌍의 이중결합이 C-8과 C-14, 그리고 C-15와 C-16에 위치하는 것을 결정하였다. 따라서 화합물 4는 오리잘렉신(oryzaalexin) A로 구조동정하였다.

[0113]

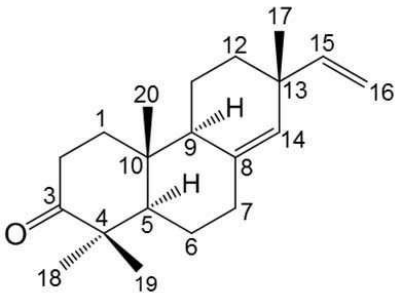
<화합물 1>



[0114]

[0115]

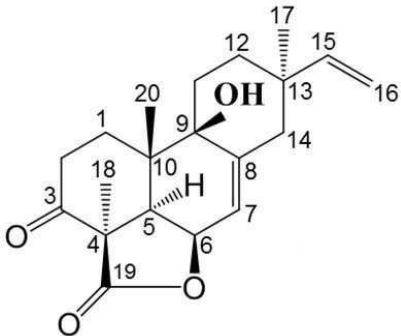
<화합물 2>



[0116]

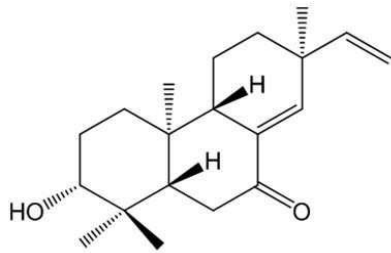
[0117]

<화합물 3>



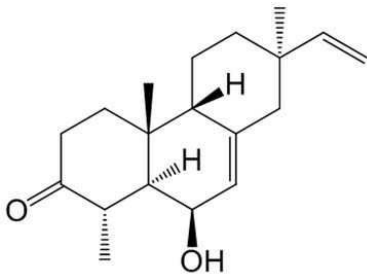
[0118]

[0119] <화합물 4>



[0120]

[0121] <화합물 5>



[0122]

[0123] 상기 화합물 1 내지 5의 분광학적 특징

[0124] 모밀락톤(momilactone A) (화합물 1)

[0125] 무색 결정(Colorless crystals)(CHCl₃); [α]_D²⁰ -275° (c 1.0, CHCl₃); EI/MS m/z 314 [M]⁺; IR (KBr, ν, cm⁻¹) 1770, 1700, 1665, 1640; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δH) 5.79 (1H, dd, J = 17.6, 10.8 Hz, H-15), 5.64 (1H, d, J = 5.8 Hz, H-7), 4.92 (1H, dd, J = 17.6, 1.2 Hz, H-16a), 4.87 (1H, dd, J = 10.8, 1.2 Hz, H-16b), 4.79 (1H, dd, J = 5.8, 5.2 Hz, H-6), 2.54 (2H, m, H-2), 2.29 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-5), 2.15 (1H, br d, J = 12.0 Hz, H-14a), 1.99 (1H, br d, J = 12.0 Hz, H-14b), 1.85 (1H, m, H-1a), 1.72 (1H, m, H-9), 1.69 (1H, m, H-11a), 1.56 (1H, m, H-1b), 1.53 (2H, m, H-12), 1.49 (3H, s, H-18), 1.27 (1H, m, H-11b), 1.25 (3H, s, H-20), 0.83 (3H, s, H-17). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δC) 205.1 (C-3), 174.2 (C-19), 148.8 (C-15), 147.9 (C-8), 113.8 (C-7), 110.0 (C-16), 73.0 (C-6), 53.4 (C-4), 50.0 (C-9), 47.4 (C-14), 46.2 (C-5), 39.9 (C-13), 37.1 (C-12), 34.7 (C-2), 32.3 (C-10), 31.0 (C-1), 23.8 (C-11), 21.8 (C-17), 21.6 (C-20), 21.3 (C-18).

[0126] 산다라코피마라디엔-3-온(sandaracopimaradien-3-one) (화합물 2)

[0127] 흰색 분말(White powder)(CHCl₃); [α]_D³² +2.4° (c 0.2, MeOH); EI/MS m/z 286 [M]⁺; IR (KBr, ν, cm⁻¹) 1706, 1633; ¹H NMR (400 MHz, C₅D₅N, δH) 5.84 (1H, dd, J = 17.6, 10.8 Hz, H-15), 5.35 (1H, br s, H-14), 4.99 (1H, dd, J = 17.6, 1.2 Hz, H-16a), 4.97 (1H, dd, J = 10.8, 1.2 Hz, H-16b), 2.60 (1H, ddd, J = 15.2, 14.0, 6.0 Hz, H-2a), 2.31 (1H, ddd, J = 15.2, 4.4, 4.4 Hz, H-2b), 1.13 (3H, s, H-19), 1.09 (3H, s, H-17), 0.99 (3H, s, H-18), 0.89 (3H, s, H-20). ¹³C NMR (100 MHz, C₅D₅N, δC) 215.2 (C-3), 148.9 (C-15), 136.44 (C-8), 129.7 (C-14), 110.7 (C-16), 55.4 (C-5), 49.5 (C-9), 47.8 (C-4), 38.2 (C-13), 37.8 (C-10), 37.6 (C-1), 35.8 (C-7), 34.8 (C-2), 34.4 (C-12), 26.4 (C-17), 26.1 (C-19), 23.5 (C-6), 22.2 (C-18), 19.2 (C-11), 14.6 (C-20).

[0128] 모밀락톤 D(momilactone D) (화합물 3)

[0129] 흰색 분말 (CHCl₃-MeOH); $[\alpha]_D^{27}$ -57.1° (c 0.46, pyridine); HREI/MS m/z 330.1833 [M]⁺ (calcd. for C₂₀H₂₆O₄, 330.1831); IR (KBr, ν, cm⁻¹) 3374, 2918, 2345, 1767, 1699, 1647, 1187; ¹H NMR (400 MHz, C₅D₅N, δH) 5.94 (1H, dd, J = 17.2, 10.4 Hz, H-15), 5.81 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-7), 5.04 (1H, dd, J = 17.2, 1.2 Hz, H-16a), 5.00 (1H, dd, J = 5.2, 5.2 Hz, H-6), 4.93 (1H, dd, J = 10.4, 1.2 Hz, H-16b), 3.18 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-14a), 2.73 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-5), 2.63 (1H, ddd, J = 10.4, 8.4, 4.0 Hz, H-2a), 2.62 (1H, br d, J = 10.4 Hz, H-2b), 2.40 (1H, ddd, J = 13.2, 5.2, 4.8 Hz, H-12a), 1.99 (1H, m, H-1a), 1.89 (1H, m, H-1b), 1.83 (1H, m, H-11a), 1.78 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-14b), 1.72 (1H, br dd, J = 13.2, 4.8 Hz, H-11b), 1.64 (3H, s, H-18), 1.37 (1H, m, H-12b), 1.32 (3H, s, H-20), 0.94 (3H, s, H-17). ¹³C NMR (100 MHz, C₅D₅N, δC) 204.9 (C-3), 174.8 (C-19), 149.7 (C-15), 149.6 (C-8), 116.9 (C-7), 110.0 (C-16), 74.4 (C-9), 72.5 (C-6), 54.7 (C-4), 48.4 (C-5), 43.1 (C-14), 40.3 (C-13), 38.0 (C-10), 35.3 (C-2), 32.8 (C-12), 30.0 (C-11), 27.8 (C-1), 21.9 (C-17), 21.2 (C-18), 17.3 (C-20).

[0130] 오리잘렉신 A(oryzalexin A)(화합물 4)

[0131] 흰색 분말 (CHCl₃); $[\alpha]_D^{25}$ +20° (c 0.13, MeOH); EI/MS m/z 302 [M]⁺, 164; IR (KBr, ν, cm⁻¹) 3353, 1685, 1611; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δH) 6.71 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-14), 5.78 (1H, dd, J = 17.6, 10.8 Hz, H-15), 4.98 (1H, dd, J = 17.6, 1.2 Hz, H-16a), 4.96 (1H, dd, J = 10.8, 1.2 Hz, H-16b), 3.28 (1H, dd, J = 11.6, 4.0 Hz, H-3), 2.54 (1H, dd, J = 18.8, 5.2 Hz, H-6a), 2.34 (1H, dd, J = 18.8, 13.2 Hz, H-6b), 1.99 (1H, m, H-9), 1.80 (1H, ddd, J = 13.2, 3.6, 3.2 Hz, H-1a), 1.72 (1H, m, H-11a), 1.68 (1H, m, H-2a), 1.63 (1H, m, H-2b), 1.59 (1H, m, H-12a), 1.49 (1H, m, H-5), 1.46 (1H, m, H-12b), 1.41 (1H, m, H-11b), 1.28 (1H, m, H-1b), 1.08 (3H, s, H-17), 0.96 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-20). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, δC) 207.2 (C-7), 146.3 (C-15), 144.5 (C-14), 134.7 (C-8), 111.8 (C-16), 80.5 (C-3), 50.6 (C-9), 49.5 (C-5), 38.9 (C-4), 38.7 (C-13), 36.8 (C-1, 6), 35.8 (C-10), 33.9 (C-12), 27.4 (C-19), 27.3 (C-2), 25.8 (C-17), 19.1 (C-11), 14.6 (C-18), 13.8 (C-20).

[0132] 모밀락톤 E(momilactone E)(화합물 5)

[0133] 노란색 무정형 분말(Yellow amorphous powder)(CHCl₃); $[\alpha]_D^{27}$ -101° (c 0.18, MeOH); HREI/MS m/z 288.2085 [M]⁺ (calcd. for C₁₉H₂₈O₂, 288.2089); IR (KBr, ν, cm⁻¹) 3620, 1705, 1614; ¹H NMR (400 MHz, C₅D₅N, δH) 5.84 (1H, dd, J = 17.6, 10.8 Hz, H-15), 5.70 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-7), 5.48 (1H, dd, J = 5.2, 5.2 Hz, H-6), 4.99 (1H, dd, J = 17.6, 1.2 Hz, H-16a), 4.95 (1H, dd, J = 10.8, 1.2 Hz, H-16b), 2.63 (1H, dq, J = 11.6, 6.8 Hz, H-4), 2.58 (1H, ddd, J = 15.2, 13.6, 5.2 Hz, H-2a), 2.38 (1H, ddd, J = 15.2, 3.6, 3.2 Hz, H-2b), 2.05 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-14a), 1.89 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-14b), 1.75 (1H, dd, J = 11.6, 5.2 Hz, H-5), 1.67 (1H, m, H-9), 1.28 (3H, s, H-20), 1.10 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-18), 0.82 (3H, s, H-17). ¹³C NMR (100 MHz, C₅D₅N, δC) 211.2 (C-3), 149.7 (C-15), 144.8 (C-8), 117.2 (C-7), 110.3 (C-16), 67.7 (C-6), 50.5 (C-9), 47.7 (C-14), 46.1 (C-5), 41.9 (C-4), 39.8 (C-13), 37.9 (C-2), 37.4 (C-12), 36.8 (C-1), 34.0 (C-10), 24.3 (C-11), 22.3 (C-20), 21.8 (C-17), 11.5 (C-18).

[0134] <실험예 1> 벼 뿌리 추출물/분획물의 산화질소 생성 및 세포 독성 평가

[0135] 상기 실시예 1 내지 5의 벼 뿌리 메탄올 추출물 및 분획물들이 LPS로 자극된 RAW264.7 세포의 산화질소 생성에 미치는 영향을 분석하였다. 이를 위하여 다양한 농도의 시료들을 준비하여 실험을 진행하였다.

[0136] 그 결과, 벼 뿌리 메탄올추출물(실시예 1)과 에틸 아세테이트 분획물(실시예 2)에서 가장 강한 산화질소 생성 저해 효과가 나타났다(도 1). 또한 실시예 1 및 실시예 2는 산화질소 생성을 강하게 저해하는 농도에서도 80% 이상의 세포 생존률을 나타내었다(도 2). 이로써, 상기 산화질소 생성 저해활성이 세포 사멸로 인한 결과가 아

니라는 것을 알 수 있었다.

[0137] <실험예 2> 벼 뿌리 유래 화합물들의 산화질소 생성 및 세포 독성 평가

[0138] 벼 뿌리로부터 분리한 다이테펜 화합물들을 다양한 농도로 처리하여 이들이 산화질소 생성에 미치는 영향을 분석하였다.

[0139] 그 결과, 다이테펜 화합물들은 농도의존적으로 산화질소 생성을 저해하였으며(도 3), IC₅₀값은 하기 표 1과 같았다. 또한 다이테펜 화합물들이 세포의 생존과 사멸에 미치는 영향을 분석한 결과, 화합물 2의 경우 약한 세포독성을 나타내었다(LD₅₀, 83.2 ± 3.0 μM). 반면, 화합물 1은 강한 세포독성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(LD₅₀, 9.6 ± 0.6 μM) (표 2, 도 4).

표 2

화합물	IC ₅₀ (μM) ^a	LD ₅₀ (μM) ^b
momilactone A (화합물 1)	1.7 ± 0.1	9.6 ± 0.6
sandaracopimaradien-3-one (화합물 2)	24.1 ± 2.0	83.2 ± 3.0
momilactone D (화합물 3)	46.5 ± 3.2	> 100
oryzaalexin (화합물 4)	15.0 ± 0.8	> 100
momilactone E (화합물 5)	30.3 ± 2.0	> 100

[0140]

[0141] ^aIC₅₀은 inhibition concentration을 의미하며, 50% 저해율을 나타내는 농도를 의미함.

[0142] ^bLD₅₀은 lethal dose를 의미하며, 50%의 생존율을 나타내는 농도를 의미함.

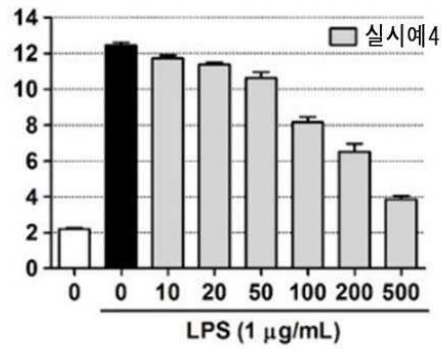
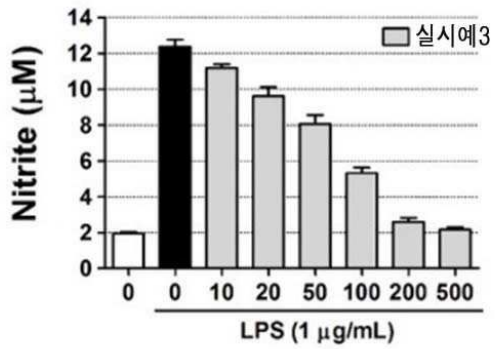
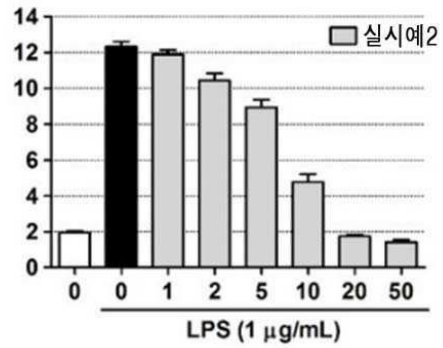
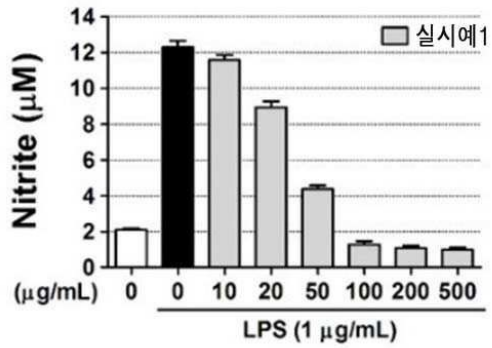
[0143] <실험예 3> 벼 뿌리 유래 화합물들의 iNOS 발현 억제능

[0144] 화합물 1 내지 5를 다양한 농도로 LPS 1 μg/mL과 함께 RAW264.7 세포에 처리하거나 또는 화합물 없이 LPS만 단독으로 처리하여 18시간동안 배양하였다. 그리고 그 결과를 역전사효소-중합효소연쇄반응 분석법과 웨스턴 블랏 분석법을 이용하여 분석하였다.

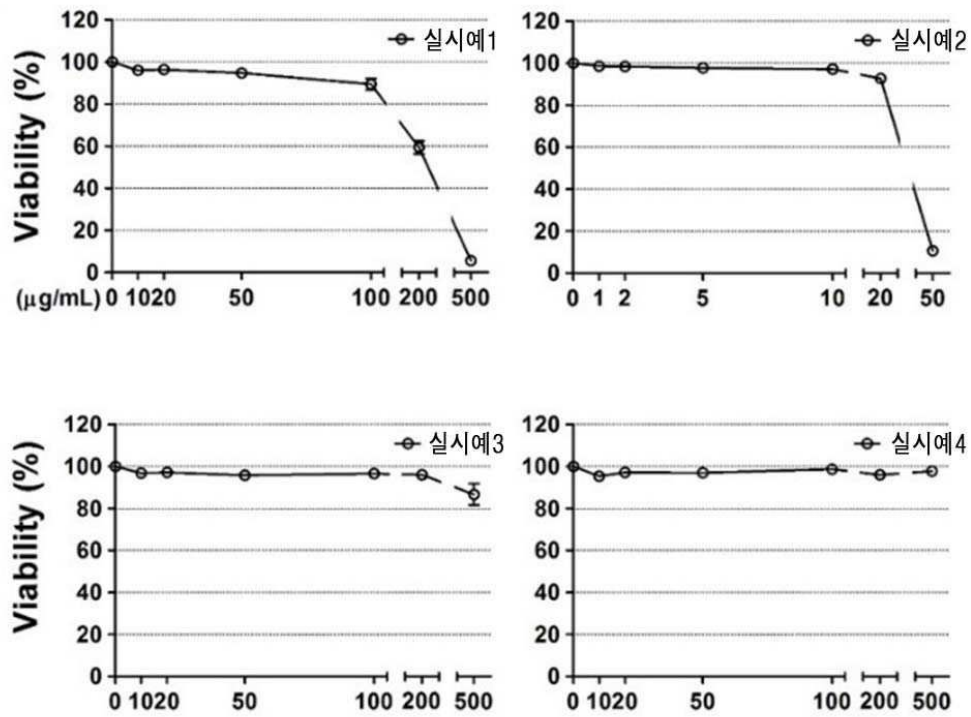
[0145] 그 결과, 역전사효소-중합효소연쇄반응 분석 결과 및 웨스턴 블랏 분석 결과 모두에서 화합물 1과 4가 iNOS의 mRNA 및 단백질의 발현을 강하게 저해하는 것으로 확인되었다(각각 도 5 A 및 B). 상기 결과를 통하여 벼 뿌리로부터 분리한 화합물 1 내지 5의 다이테펜 화합물들이 염증 반응을 약화시키는 것을 확인하였다.

도면

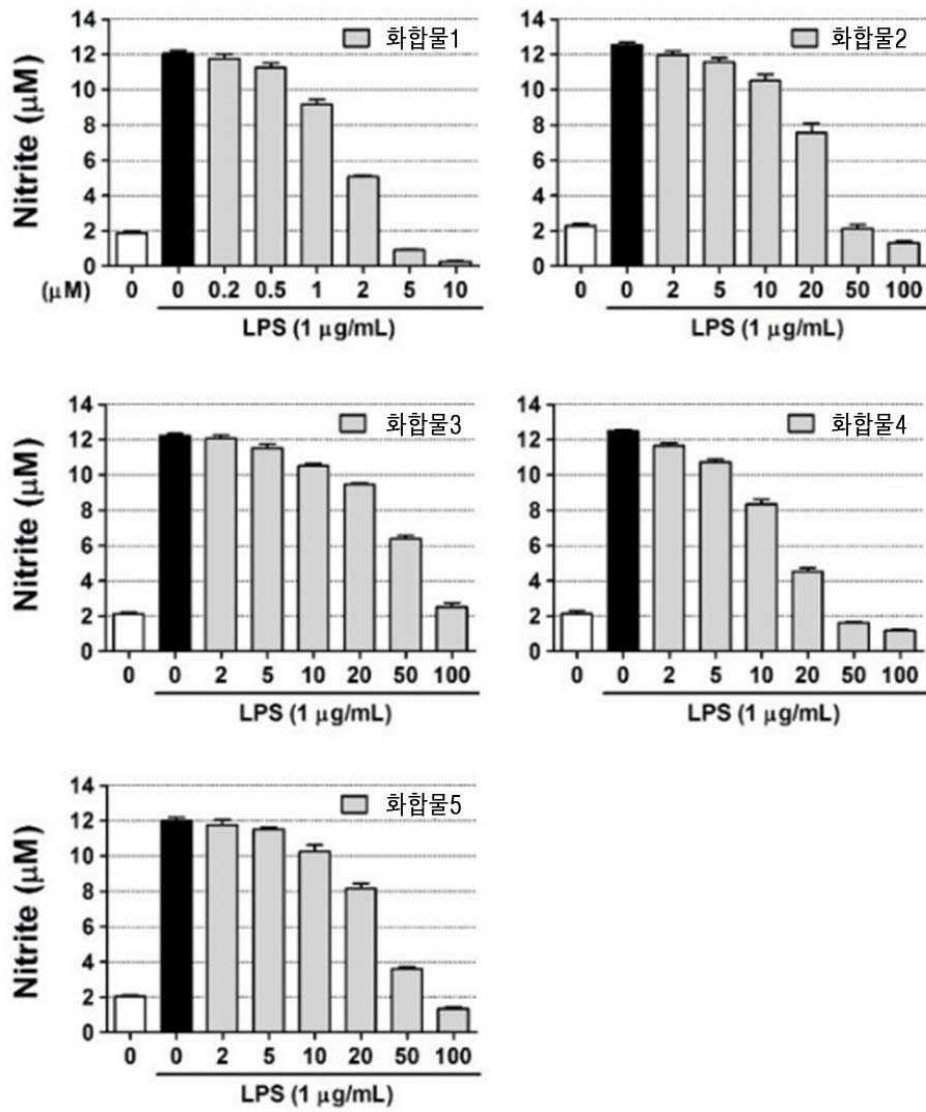
도면1



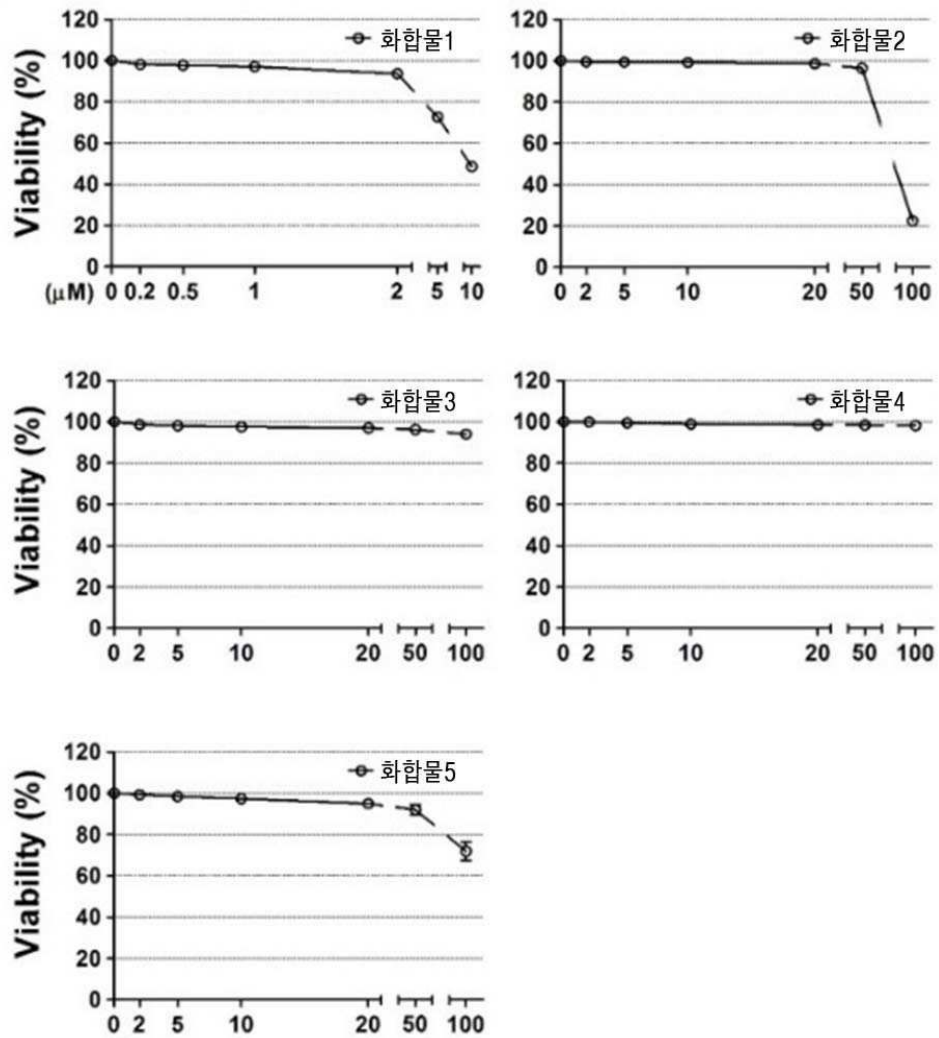
도면2



도면3



도면4



도면5

