

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0018671 (43) 공개일자 2011년02월24일
(51) Int. Cl. A61K 36/40 (2006.01) A61K 31/19 (2006.01) A61K 31/56 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0076256 (22) 출원일자 2009년08월18일 심사청구일자 2009년08월18일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내 (72) 발명자 백남인 경기도 수원시 영통구 망포동 망포쌍용아파트 10 4동 2001호 이대영 경기도 수원시 영통구 영통1동 대우월드마크 102 동 705호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인다울	

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 특히 산딸나무 열매로부터 분리되어진 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 천연물질로서 휴먼 아실 코에이(Human Acyl-CoA; hACAT)에 대한 억제효과를 나타내므로, 고지혈증, 관상동맥심장병, 동맥경화증, 심근경색증 등과 같은 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

(72) 발명자

정낙훈

경기도 이천시 부발읍 신원2리 416

이민호

경기도 용인시 수지구 상현동 서원마을 금호베스트
빌 509동 1701호

노영덕

경기도 용인시 수지구 죽전동 새터마을 대우푸르지
오 402동 301호

정태숙

대전광역시 서구 둔산동 957번지 과알새아파트
101-1101

이윤형

서울특별시 서초구 서초2동 1359-51 롯데캐슬주피
터 102-504

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070301034037

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 바이오그린 21사업

연구과제명 유용 형질전환체에서의 유전자 기능 분석

기여율

주관기관 경희대학교

연구기간 2007.04.01 ~ 2010.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

산딸나무 열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 산딸나무 열매 추출물은 산딸나무 열매를 알코올 수용액을 사용하여 추출한 추출물이거나 물로 증탕 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 알코올 수용액은 80% 메탄올 수용액 또는 70% 에탄올 수용액인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 2의 산딸나무 열매 추출물로부터 분획하여 얻은 산딸나무 열매 분획물을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 산딸나무 열매 분획물은 산딸나무 열매 추출물을 에틸 아세테이트와 H_2O 로 분배추출한 후, 다시 H_2O 층을 n -부탄올로 분배추출하여 수득되는 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

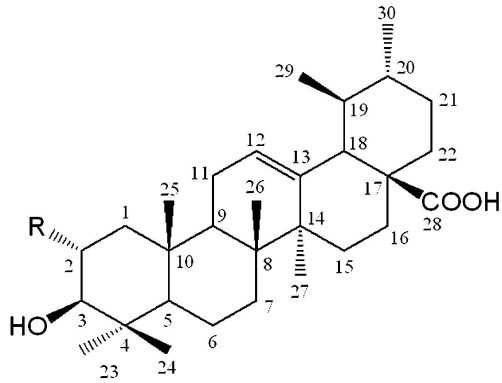
청구항 5의 산딸나무 열매 분획물로부터 분리되어 수득되는 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 트리테르펜계 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 우르솔릭산(ursolic acid)인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



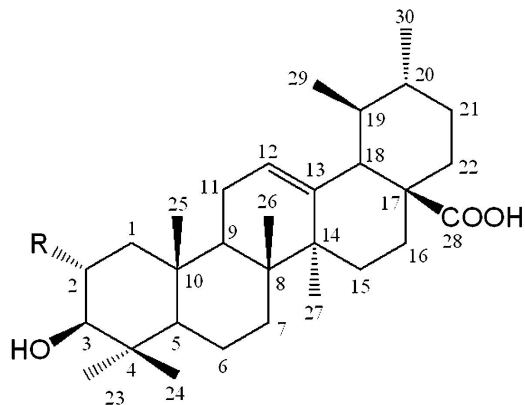
여기서, R은 H임.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 트리테르펜계 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 코로솔릭산(corosolic acid)인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 2]



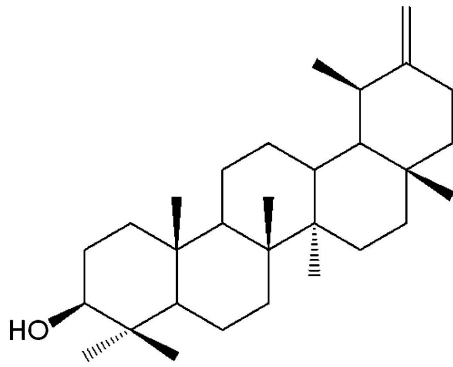
여기서, R은 OH임.

청구항 9

청구항 6에 있어서,

상기 트리테르펜계 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 타라삭스테롤(taraxasterol)인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 3]

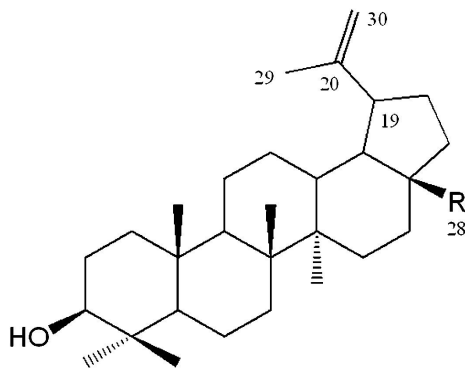


청구항 10

청구항 6에 있어서,

상기 트리테르펜계 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 베틀린산(betulinic acid)인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 4]



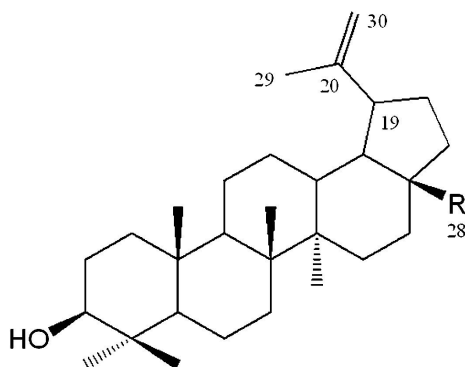
상기 R은 COOH임.

청구항 11

청구항 6에 있어서,

상기 트리테르펜계 화합물은 하기 화학식 5로 표시되는 베틀린 알데히드(betulinic aldehyde)인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 5]



상기 R은 CHO임.

청구항 12

청구항 1, 청구항 4 및 청구항 6중 어느 한 항에 있어서,

상기 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환은 고지혈증, 관상동맥심장병, 동맥경화증 또는 심근경색증인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 1, 청구항 4 및 청구항 6중 어느 한 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 휴먼 아실 코에이에 대한 억제활성을 나타내는 것임을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 보건위생의 여건이 좋아지면서 전염성 질환이 줄어들었으나, 심혈관계 질환은 현재 전세계적으로 사망률 1위를 차지하는 질병으로 각 선진국에서는 이로 인한 사망이 전체 사망의 1/3 이상을 차지하고 있으며, 그에 따른 의약품의 개발이 요구되고 있다.

[0003] 이러한 이유로 심혈관계 질환의 예방 및 치료를 목적으로 혈장내 콜레스테롤 농도를 낮출 수 있는 효과적인 약물을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 결과 인체 내에서 콜레스테롤의 생합성을 저해하는 물질들이 개발되어 상품화되고 있다. 그러나, 이러한 현 약물들로 인한 부작용들이 보고되면서 이를 개선하기 위해 연구가 집중적으로 이루어지고 있고 그 중 대표적인 것이 ACAT 억제제에 관한 것이다.

[0004] ACAT는 일반적으로 콜레스테롤을 에스테르화하는 효소로서, 그 작용 기작은 크게 체내의 세 부위(장, 간, 그리고 혈관벽 세포)에서 일어난다. 첫째, 장에서 ACAT는 섭취된 콜레스테롤을 에스테르의 형태로 바꾸어 장내로 흡수되는 것을 촉진시킨다. 둘째, 외부로부터 흡수되거나 체내에서 생합성된 콜레스테롤은 간에서 VLDL(very low density lipid)이라는 운반체 안에 축적된 후 혈관을 통해 신체 각 기관으로 공급되는데, 이때 ACAT에 의하여 콜레스테롤이 콜레스테롤 에스테르 형태로 전환됨으로써 운반체 내에 콜레스테롤 축적이 가능하게 된다, 셋째, 동맥혈관벽을 이루는 세포내에서 ACAT는 콜레스테롤을 그의 에스테르 형태로 전환시켜 세포내에 콜레스테롤이 축적되는 것을 촉진시키는데, 이는 동맥경화를 일으키는 직접적인 원인이 된다. 따라서 ACAT의 활성을 억제하는 약물은 첫째, 장내 콜레스테롤의 흡수를 억제하여 체내로 유입되는 콜레스테롤의 양을 감소시킬 수 있을 것이며, 둘째, 간에서 혈관 내로 콜레스테롤이 방출되는 것을 억제하여 혈중 콜레스테롤 농도를 떨어뜨릴 수 있고, 셋째, 혈관벽 세포에 콜레스테롤이 축적되는 것을 방지하여 직접적으로 동맥경화를 예방할 수 있을 것으로 기대된다. 더욱이 ACAT 억제제는 이미 축적된 콜레스테롤 에스테르가 콜레스테롤로 전환되는 것을 촉진시켜 동맥 경화의 직접적인 치료제로도 사용될 수 있는 가능성을 지니고 있다.

[0005] 현재까지 밝혀져 일반화된 ACAT 활성 억제제로는 유일하게 1984년 스미토모(Sumitomo)에 의해 개발되어 일본에서 상품화된 멜린아미드(melinamide)가 있으나, 낮은 활성도 및 낮은 생체이용률 등으로 인해 전혀 주목을 받지

못하였다. 그러나 최근 몇몇 ACAT 저해제들이 혈중 콜레스테롤을 낮추어 동맥경화증에 대한 예방효과 뿐만 아니라 이미 진전된 동맥경화의 치료 효과를 갖는다는 결과들이 보고되면서 이 분야에 대한 연구가 매우 활발해져 새로운 구조의 ACAT 저해 화합물들이 다수 발표되고 있다.

[0006] 한편, 산딸나무 (*Cornus kousa* Burg.)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 다년생 활엽교목으로 우리나라의 중부 이남 및 일본, 중국에서 분포하고 있다. 6월에 개화를 시작하여 과실의 껍질에 20~30 개가 모여서 꽃이 달리고 소화경이 없으며 4개의 포가 달린다. 열매는 취과(取果)로 크기가 3~5 cm 정도로 9월에 적색으로 익는다. 맛은 약간 달고 떫으며, 속에 2~5개의 씨가 있다. 한방에서는 산딸나무의 꽃과 열매를 약용으로 사용하고 소창 및 지사효과가 있다고 알려져 있고 열매 추출물에서는 면역조절기능이 있다고 보고된바 있으나, 산딸나무 열매 추출물의 휴먼 아실 코에이(Human Acyl-CoA; hACAT) 활성 억제제로의 용도는 알려진 바 없다.

[0007] 종래의 산딸나무와 관련된 특허기술을 살펴보면, 꽃포가 붉은 산딸나무(한국공개특허 제2005-0082850호), 잎이 좁고 수형이 특이한 산딸나무(한국공개특허 제2005-0082852호), 산딸나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 항노화 및 주름개선용 조성물(한국등록특허 제0888753호) 등이 있다. 하지만 산딸나무 열매 추출물의 hACAT 활성 억제제로의 용도는 알려진 바 없다.

[0008] 이에 본 발명자들은 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물에 대해 연구하던 중, 상기 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물들이 hACAT에 대한 억제활성을 가짐을 확인하여 이들의 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료 용도를 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 같은 천연성분물질을 함유하여 부작용을 감소시킬 수 있는, 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 산딸나무 열매 분획물은 산딸나무 열매 추출물을 에틸 아세테이트와 H₂O로 분배추출한 후, 다시 H₂O층을 n-부탄올로 분배추출하여 얻을 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 트리테르펜계 화합물은 산딸나무 열매를 알코올 수용액으로 추출하거나 물로 중탕 추출하여 산딸나무 열매 추출물을 얻는 단계; 상기 단계 1에서 얻은 산딸나무 열매 추출물을 에틸 아세테이트와 H₂O로 분배추출한 후, H₂O층을 n-부탄올로 분배추출하여 산딸나무 열매 분획물을 얻는 단계; 및 상기 단계 2에서 얻은 산딸나무 열매 분획물을 실리카겔 크로마토그래피로 화합물을 분리하고 정제하여 상기 화학식 1 내지 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물을 얻는 단계를 거쳐 분리될 수 있다.

[0014] 상기 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환은 고지혈증, 관상동맥심장병, 동맥경화증 또는 심근경색증일 수

있다.

[0015] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 휴먼 아실 코에이(Human Acyl-CoA; hACAT)에 대한 억제활성을 나타낸다.

효 과

[0016] 본 발명은 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 상기 본 발명의 약학적 조성물은 휴먼 아실 코에이에 대한 억제효과를 나타내는 천연성분물질들을 포함함으로써 종래의 ACAT 활성 억제제에 비해 부작용을 현저히 감소시킬 수 있는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명은 산딸나무 열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 산딸나무 열매 추출물은 산딸나무 열매를 알코올 수용액으로 추출하거나 물로 중탕 추출하여 얻은 것이 바람직하며 상기 산딸나무 열매는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 산딸나무 열매 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 여과법, 환류추출법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있다. 바람직하게는 산딸나무 열매를 80% 메탄올 수용액 또는 70% 에탄올 수용액에 넣고 1일 내지 2일 동안 상온에서 방치한 다음, 여과하여 산딸나무 열매 추출물을 얻을 수 있다. 이후 동일한 방법으로 수회 반복하여 산딸나무 열매 추출물 더 추출할 수 있다. 이때 80% 메탄올 수용액 또는 70% 에탄올 수용액은 산딸나무 열매 중량의 2 내지 5배로 사용하는 것이 바람직하다.

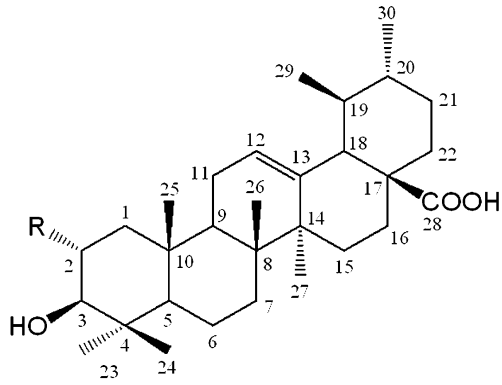
[0020] 또한, 본 발명은 산딸나무 열매 분획물을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 바람직하게는 상기 산딸나무 열매 분획물은 산딸나무 열매 추출물을 에틸 아세테이트와 H₂O를 사용하여 분배추출한 후, 다시 H₂O층을 n-부탄올로 분배추출하여 얻을 수 있다.

[0022] 또한 본 발명은 상기 산딸나무 열매 분획물로부터 분획하여 얻은 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 트리테르펜계 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 우르솔릭산(ursolic acid), 화학식 2로 표시되는 코로솔릭산(corosolic acid), 화학식 3으로 표시되는 타라삭스테롤(taraxasterol), 화학식 4로 표시되는 베틀린산(betulinic acid) 또는 화학식 5로 표시되는 베틀린 알데히드(betulinic aldehyde)일 수 있다.

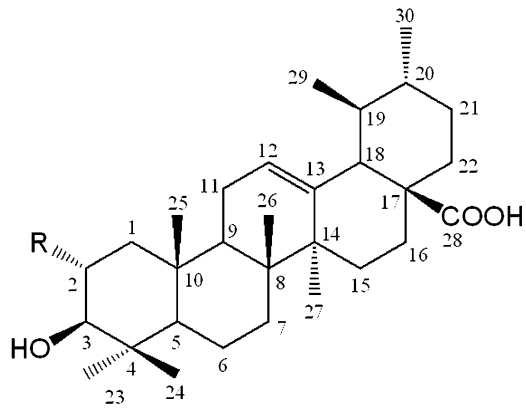
[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] 여기서, R은 H임,

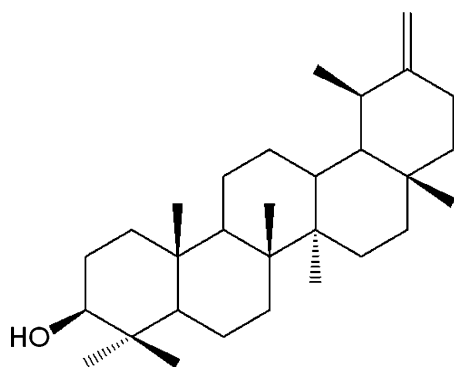
[0027] [화학식 2]



[0028]

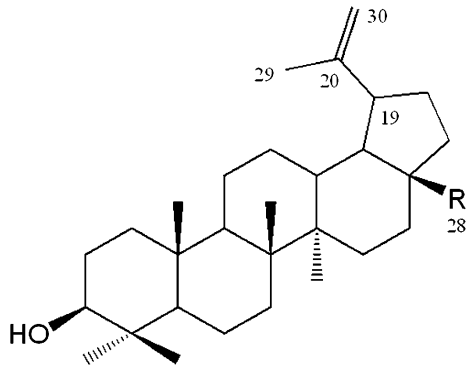
[0029] 여기서, R은 OH임,

[0030] [화학식 3]



[0031]

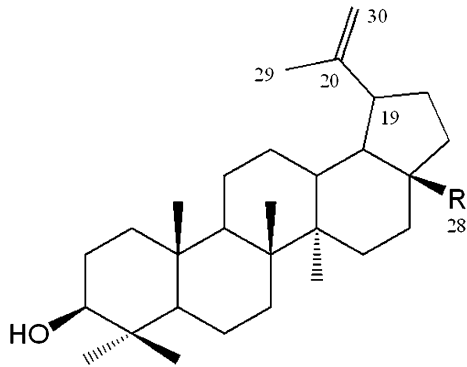
[0032] [화학식 4]



[0033]

[0034] 상기 R은 COOH임,

[0035] [화학식 5]



[0036]

[0037] 상기 R은 CHO임.

[0038] 본 발명에서 상기 화학식 1 내지 5의 트리테르펜계 화합물을 산딸나무 열매 분획물로부터 분리하기 위한 방법은 아래에서 상술하는 단계를 거쳐 수행될 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 화학식 1 내지 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물은 산딸나무 열매를 알코올 수용액으로 추출하거나 물로 중탕 추출하여 산딸나무 열매 추출물을 얻는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 얻은 산딸나무 열매 추출물을 에틸 아세테이트와 H₂O로 분배추출한 후, H₂O층을 n-부탄올로 분배추출하여 산딸나무 열매 분획물을 얻는 단계(단계 2); 및 상기 단계 2에서 얻은 산딸나무 열매 분획물을 실리카겔 크로마토그래피로 화합물을 분리하고 정제하여 상기 화학식 1 내지 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물을 얻는 단계(단계 3)를 포함하여 분리되는 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0040] 상기 단계 1은 산딸나무 열매를 알코올 수용액으로 추출하거나 물로 중탕 추출하여 산딸나무 열매 추출물을 얻는 단계이다.

[0041] 상기 산딸나무 열매는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있으며, 깨끗이 세척한 후 건조하여 사용한다. 상기 알코올 수용액으로는 80% 메탄올 수용액 또는 70% 에탄올 수용액을 사용하는 것이 바람직하다.

[0042] 본 발명에 따른 일 실시형태에 있어서, 상기 산딸나무 열매 추출물을 얻는 단계는 산딸나무 열매를 80% 메탄올 수용액 또는 70% 에탄올 수용액에 1일 내지 2일 동안 상온에서 방치한 다음, 여과하여 산딸나무 열매 추출물을 얻을 수 있다. 이후 남은 것을 동일한 방법으로 수회 반복하여 더 추출할 수 있다. 이때 80% 메탄올 수용액 또는 70% 에탄올 수용액은 산딸나무 열매 중량의 2 내지 5 배로 사용할 수 있다.

[0043] 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 얻은 산딸나무 열매 추출물을 에틸 아세테이트와 H₂O로 분배추출한 후, H₂O층을

n-부탄올로 분배추출하여 산딸나무 열매 분획물을 얻는 단계이다. 이때 통상의 분배추출방법을 이용할 수 있으며 바람직하게는 분별 깔데기를 사용하여 산딸나무 열매 분획물을 얻을 수 있다.

[0044] 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 얻은 산딸나무 열매 분획물을 실리카겔 크로마토그래피로 화합물을 분리하고 정제하여 상기 화학식 1 내지 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물을 얻는 단계이다. 이와 같이 산딸나무 열매 분획물을 실리카겔 크로마토그래피를 이용하여 화합물을 분리하고 정제하여 상기 화학식 1 내지 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물을 얻을 수 있다. 상기 산딸나무 열매 분획물을 분리하기 위해 실리카겔 크로마토그래피를 수행하는 경우, 이동상으로는 n-헥산·에탄올 혼합용매 및 CHCl_3 ·메탄올 혼합용매를 사용할 수 있다. 이때 사용되는 n-헥산·에탄올 혼합용매의 부피비는 4:1 내지 2:1인 것이 바람직하며, CHCl_3 ·메탄올 혼합용매의 부피비는 15:1 내지 10:1인 것이 바람직하다. 상기 크로마토그래피는 단일 화합물이 정제될 때까지 1회 내지 수회에 걸쳐 수행할 수 있으며, 필요에 따라 농축, 재결정을 실시할 수 있다.

[0045] 상술한 바와 같이, 본 발명은 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리한 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명에 따른 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물은 휴먼 아실 코에이에 대한 억제활성을 나타냄으로써 고지혈증, 관상동맥질환, 동맥경화증, 심근경색증 등과 같은 고콜레스테롤혈증에 기인하는 심혈관 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명에서 상기 화학식 1, 2, 4 및 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0048] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1, 2, 4 및 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물의 화합물 유도체를 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.

[0049] 동량의 상기 화학식 1, 2, 4 및 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물로 표시되는 트리테르펜계 화합물에 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 염을 제조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0050] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0051] 상기 조성물은 약학적 조성물로 사용할 수 있으며, 경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통

사용하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다.

[0052] 본 발명의 상기 화학식 1 내지 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등에 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 등을 사용할 경우 잘 혼합되지 않기 때문에 경구투여를 위한 액상제제로는 부적합하다. 그러나, 산딸나무 열매 추출물 또는 산딸나무 열매 분획물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 액상제제로 조제될 수 있다.

[0053] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1: 산딸나무 열매 추출물의 제조

[0055] 산딸나무 열매 10 kg을 먼저 80% MeOH 수용액(10 L)에 24시간 담가서 실온에서 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과하고, 남은 것은 동일한 방법으로 2회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합치고 감압 농축하여 산딸나무 열매 추출물을 얻었다.

[0056] 실시예 2: 산딸나무 열매 분획물의 제조

[0057] 상기 실시예 1에서 얻은 산딸나무 열매 추출물을 에탄올 에틸아세테이트(EtOAc, 2 L × 3)와 H₂O(2 L)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 n-부탄올 (n-BuOH, 1.8 L × 3)로 분배 추출하여 44g의 산딸나무 열매 분획물을 얻었다.

[0058] 실시예 3: 산딸나무 열매 분획물로부터 트리테르펜계 화합물의 분리

[0059] 본 실험에 사용된 산딸나무 열매는 2006년 9월 경희대학교 실험농장에서 채취한 것을 사용하였다. 채취한 산딸나무 열매 10 kg을 먼저 80% MeOH 수용액 (10 L)에 24시간 담가서 실온에서 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과하고, 남은 것은 동일한 방법으로 2회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합치고 감압 농축하여 산딸나무 열매 추출물을 얻었다. 얻은 산딸나무 열매 추출물을 에탄올 에틸아세테이트(EtOAc, 2 L × 3)와 H₂O(2 L)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 n-부탄올 (n-BuOH, 1.8 L × 3)로 분배 추출하여 44g의 산딸나무 열매 분획물을 얻었다.

[0060] 상기에서 수득한 산딸나무 열매 분획물 44 g에 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(c.c.)(φ 10 × 60 cm, n-헥산-에탄올(4:1→2:1, 각 1.5 L)→CHCl₃-메탄올(15:1→3:1→0:1, 각 1.5 L)를 실시하여 각 70 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC(n-헥산-에탄올 = 2:1, CHCl₃-MeOH = 7:1, 3:1)로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 21개의 분획물(CKFE-1~CKFE-21)을 얻었고 그 중에서 상기 화학식 1로 표시되는 트리테르펜계 화합물을 분리하였다[1.58 g, Ve/Vt (elution volume/total volume) 0.52-0.58 (CKFE-9), TLC (SiO₂ F254) R_f 0.70 CHCl₃-MeOH (7:1)].

[0061] 이후 CKFE-12(1.76 g, Ve/Vt 0.70-0.76) 분획에 대해서, SiO₂ c.c. (4 × 50 cm)와 CHCl₃-메탄올(14:1)의 용출용매를 사용하여 13개의 분획(CKFE-12-1~CKFE-12-13)을 얻었고, 이중에서 상기 화학식 2로 표시되는 트리테르펜계 화합물을 분리하였다[180 mg, Ve/Vt 0.30-0.45, TLC (SiO₂ F254) R_f 0.60 in CHCl₃-MeOH (7:1)].

[0062] 이후, CKFE6(2.40 g, Ve/Vt 0.32-0.40) 분획에 대하여, 다시 SiO₂ c.c. (4.5 × 50 cm)와 n-헥산-에탄올(7:1)의 용출용매를 사용하여 12개의 분획물을 얻었으며, 이중에서 상기 화학식 3으로 표시되는 트리테르펜계 화합물

을 분리하였다[22 mg, Ve/Vt 0.25-0.35, TLC (SiO₂ F254) R_f 0.70 *n*-hexane-EtOAc (1:1)].

[0063] 다음으로, CKFE-6-6 (478 mg, Ve/Vt 0.50-0.65)을 다시 ODS c.c. (φ 3 × 20 cm) 및 메탄올-H₂O(10:1)의 용출 용매를 사용하여, 5개의 분획 (CKFE-6-6-1~CKFE-6-6-5)을 얻었고, 이중에서 상기 화학식 4로 표시되는 트리테르펜계 화합물을 분리하였다[35 mg, Ve/Vt 0.30-0.45, TLC (RP-18 F254) R_f 0.55, MeOH-H₂O (5:1)].

[0064] 마지막으로, CKFE-6-6-3 (45 mg, Ve/Vt 0.46-0.65) 분획에 대하여, Sephadex LH-20 (2 × 40 cm, 80% MeOH, 500 ml)의 레진(regin)으로 정제를 실시하여 상기 화학식 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물을 분리하였다[33 mg, Ve/Vt 0.50-0.90, TLC (RP-18 F254) R_f 0.47, MeOH-H₂O (5:1)].

[0065] 상기에서 크로마토그래피용 실리카겔은 Kieselgel 60 (70~230 mesh)을 사용하였고, 옥타데실실리카겔 (octadecylsilica gel; ODS)은 Lichroprep RP-18(40~63 μm, Merck, Germany)을 사용하였고, TLC는 Kieselgel 60 F254와 RP-18 F254S (Merck, Germany)를 사용하였다.

[0066] 실시예 4: 트리테르펜계 화합물의 구조 분석

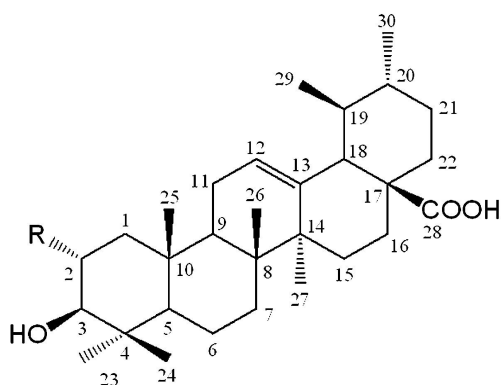
[0067] 상기 실시예 3에서 얻은 화합물에 대해 IR은 스펙트럼 원(Spectrum One), FT-IR 스펙트로포토미터(Perkin-Elmer, UK)로 측정하였고, NMR은 400 MHz, Inova AS 400, FT-NMR 스펙트로미터(Varian, USA)로 측정하여 구조 분석을 하였다.

[0068] 측정 결과는 하기에 나타내었다.

[0069] 트리테르펜계 화합물

[0070] 우르솔릭산(ursolic acid) -화합물 1

[0071] [화학식 1]



[0072] 여기서, R은 H임.

[0074] 1) 물성 : 백색 분말(m.p. 287 °C)

[0075] 2) [α]_D²⁰ = +70.0° (c=0.7, CHCl₃); EI-MS m/z : 456 [M]⁺; IR ν (CHCl₃, cm⁻¹) 3360, 1732, 1648; ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N, δH) : 5.48 (1H, br s, H-12), 3.45 (1H, dd, J=9.6, 5.4 Hz, H-3), 1.24 (3H, s, H-23), 1.23 (3H, s, H-27), 1.04 (3H, s, H-26), 1.02 (3H, s, H-24), 1.01 (3H, d, J=6.4 Hz, H-30), 0.96 (3H, d, J=6.4 Hz, H-29), 0.89 (3H, s, H-25); ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N, δC).

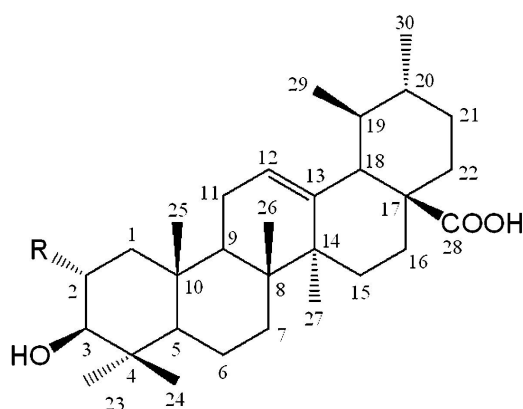
[0076] 3) 분석 결과

[0077] 상기 실시예 3에서 얻은 화학식 1의 트리테르펜계 화합물을 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 없었고, 10% 황산 발색시 진한 자주색으로 발색되었다. IR 스펙트럼에서 히드록시기(3430 cm⁻¹), 카르보닐기(1790 cm⁻¹) 및 이중결합 (1694 cm⁻¹)을 갖는 구조임을 추정하였고, EI/MS 실험을 통해 분자량은 456 [M]⁺임을 확인하였다. ¹H-NMR 스펙트럼으로부터, 고자장 영역에서 싱글렛 메틸 프로톤 시스널(singlet methyl proton signal)[δ 1.24

(H-23), 1.23 (H-27), 1.04 (H-26), 1.02 (H-24), 0.89 (H-25)] 5개와, 더블렛 메틸 프로톤 시그널(doublet methyl proton signal)[δ 1.01 (J=6.4Hz, H-30), 0.96 (J=6.4Hz, H-29)] 2개가 관측되어 우르산 골격의 트리테르펜 구조의 화합물로 추정할 수 있었다. δ 5.48 (H-12)에서 올레핀 메틴 프로톤 시그널(olefine methine proton signal)이 관측되었고, 산소가 치환된 영역에서, 산화 메틴 프로톤 시그널(oxygenated methine proton signal)(δ 3.45, dd, J=9.6, 5.4 Hz) 등이 관측되었다. 각 시그널의 결합 상수(coupling constant)로부터 수산기가 β -결합하고 있는 것을 확인하였다. ^{13}C -NMR 및 DEPT 스펙트럼에서 모두 30개의 시그널이 관측되었으며, 저자장 영역에서 카르복실 카본 시그널(carboxyl carbon signal)[δ 179.9 (C-28)]과 올레핀 쿼터리 카본 시그널(olefine quaternary carbon signal)[δ 139.2 (C-13)] 및 올레핀 메틴 카본 시그널(olefine methine carbon signal)[δ 125.5 (C-12)]이 관측되었다. 또한, 산화 메틴 프로톤 시그널[δ 78.1 (C-3)]이 산소가 치환된 영역에서 확인되었으며, 고자장 영역에서, 7개의 메틸 시그널[δ 28.4, 21.0, 18.4, 17.1, 17.5, 16.7, 15.8]을 관측할 수가 있었다. 분석 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 트리테르펜계 화합물은 우르솔릭산으로 구조 결정하였다.

[0078] 코로솔릭산(corosolic acid)-화합물 2

[0079] [화학식 2]



[0080]

[0081] 여기서, R은 OH임.

[0082] 1) 물성 : 백색 분말(m.p. 253 $^{\circ}\text{C}$)

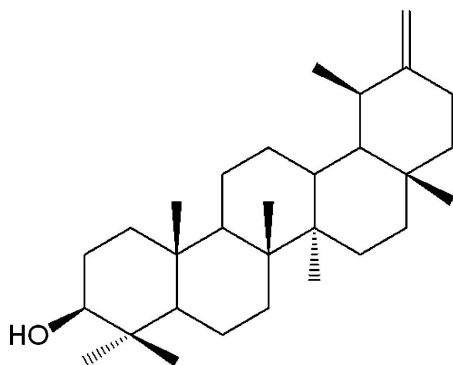
[0083] 2) $[\alpha]_D^{25} +42.2^{\circ}$ ($c=0.1$, CHCl_3); EI-MS m/z : 472 $[\text{M}]^+$; IR ν (CHCl_3 , cm^{-1}) 3404, 1911, 1700, 1685; ^1H -NMR (400MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ H) : 5.45 (1H, br s, H-12), 4.09 (1H, ddd, J=9.6, 9.6, 3.2 Hz, H-2), 3.40 (1H, d, J=9.6 Hz, H-3), 1.27 (3H, s, H-23), 1.19 (3H, s, H-27), 1.07 (3H, s, H-24), 1.02 (3H, s, H-25), 0.99 (3H, d, J=6.0 Hz, H-29), 0.97 (3H, s, H-26), 0.93 (3H, d, J=6.0 Hz, H-30); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ C).

[0084] 3) 분석 결과

[0085] 상기 실시예 3에서 얻은 화학식 2의 트리테르펜계 화합물을 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 없었고, 10% 황산 발색시 연한 남색으로 발색되었다. IR 스펙트럼에서는 상기 화학식 1의 트리테르펜계 화합물과 매우 유사한 패턴을 보였으며(3404 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} , 1685 cm^{-1}), EI/MS 측정 결과 분자량이 472 (m/z) 으로 나타났다. ^1H -NMR 스펙트럼으로부터, 상기 화학식 1의 트리테르펜계 화합물과 매우 유사한 시그널이 관측되었지만, 산소가 치환된 영역에서 산화 메틴 프로톤 시그널[4.09 (1H, ddd, J=9.6, 9.6, 3.2 Hz, H-2), 3.40 (1H, d, J=9.6 Hz, H-3)] 두 개가 관측 되었다. 각 시그널의 결합 상수로부터 2번 수산기는 α -결합을, 3번 수산기는 β -결합하고 있는 것을 확인하였다. ^{13}C -NMR 및 DEPT 스펙트럼에서 모두 30개의 시그널이 관측되었으며, 산화 메틴 카본 시그널[δ 68.1 (C-2), δ 83.2 (C-3)]이 산소가 치환된 영역에서 확인되었으며, 나머지 시그널들은 상기 화학식 1의 트리테르펜계 화합물과 매우 유사하게 관측되었다. 분석 결과, 상기 화학식 2의 트리테르펜계 화합물은 우르솔릭산의 구조에 수산기가 하나 더 결합된 코로솔릭산으로 구조 결정하였다.

[0086] 타라삭스테롤(taraxasterol)-화합물 3

[0087] [화학식 3]



[0088]

[0089] 1) 물성 : 백색 분말(m.p. 225 °C)

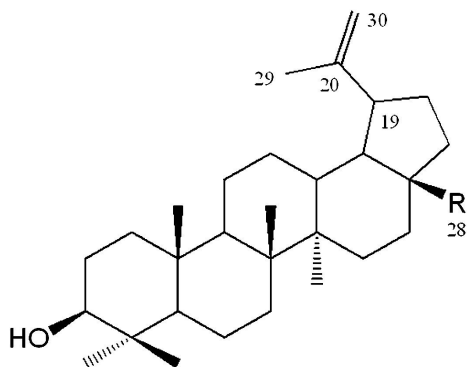
[0090] 2) $[\alpha]_D^{25} +52.2^\circ$ ($c=0.1$, CHCl_3); EI-MS m/z : 426 $[\text{M}]^+$; IR ν (CHCl_3 , cm^{-1}) 3410, 2927, 1659; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ H) 4.65 (1H, br s, H-30a), 4.54 (1H, br s, H-30b), 3.16 (1H, dd, $J=12.6$, 4.8 Hz, H-3), 2.35 (1H, d, $J=11.2$ Hz, H-19), 1.03 (3H, d, $J=6.4$, H-29), 1.00 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 0.85 (3H, s, H-25), 0.83 (3H, s, H-28), 0.78 (3H, s, H-24); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ C).

[0091] 3) 분석 결과

[0092] 상기 실시예 3에서 얻은 화학식 3의 트리테르펜계 화합물을 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 없었고, 10% 황산 발색시 분홍색으로 발색되었다. IR 스펙트럼에서 히드록시기(3410 cm^{-1}), 엑소-메틸렌(exo-methylene)(1659 cm^{-1})의 관능기를 갖는 구조임을 추정하였고, EI/MS 실험을 통해 분자량은 426 $[\text{M}]^+$ 임을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼으로부터, 고자장 영역에서 싱글렛 메틸 프로톤 시그널[δ 1.00 (H-26), 0.98 (H-23), 0.94 (H-27), 0.85 (H-25), 0.83 (H-28), 0.78 (H-24)] 6개와 더블렛 메틸 프로톤 시그널[δ 1.03 ($J=6.4$ Hz, H-29)] 1개가 관측되어 오르산 골격의 트리테르펜 구조의 화합물로 추정할 수 있었다. 산소가 치환된 영역에서, 산화 메틴 프로톤 시그널(δ 3.16, dd, $J=12.6$, 4.8 Hz)이 관측되었고, 각 시그널의 결합 상수로부터 수산기가 β -결합하고 있는 것을 확인하였다. 화학식 1 및 2로 표시되는 트리테르펜계 화합물과는 달리 δ 4.65 (H-30a)와 4.54 (H-30b) 부근에서 두 개의 엑소메틸렌 시그널이 관측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 및 DEPT 스펙트럼에서 모두 30개의 시그널이 관측되었으며, 고자장 영역에서 7개의 메틸 카본 시그널(δ 25.1, 19.3, 18.3, 16.1, 16.0, 15.4, 14.6)과 두 개의 올레핀 카본 시그널[δ 109.3 (C-30), 150.8 (C-20)] 및 산소가 치환된 영역에서 산화 메틴 카본 시그널[δ 78.9 (C-3)]이 확인되었다. 위의 데이터를 종합한 결과, 상기 화학식 3의 트리테르펜계 화합물은 타라삭스테롤로 구조 결정하였다.

[0093] 베틀린산(betulinic acid)-화합물 4

[0094] [화학식 4]



[0095]

[0096] 상기 R은 COOH임.

[0097] 1) 물성 : 비결정질 분말(m.p. 282 °C)

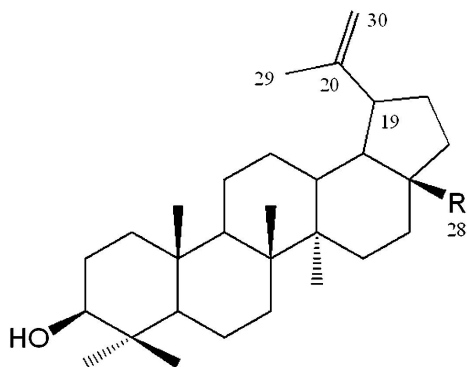
[0098] 2) $[\alpha]_D^{25} = +12.4^\circ$ ($c=0.15$, CHCl_3); IR ν (KBr, cm^{-1}) 3413, 1725, 1653; EI-MS m/z : 456 $[\text{M}]^+$, 438, 411, 248, 207, 203, 189; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ H): 4.92 (1H, br s, H-30a), 4.77 (1H, br s, H-30b), 3.57 (1H, dd, $J=11.2, 5.0$ Hz, H-3), 2.98 (1H, ddd, $J=11.2, 10.8, 4.9$ Hz, H-19), 1.80 (3H, s, H-29), 1.23 (3H, s, H-27), 1.07 (3H, s, H-23), 1.05 (3H, s, H-25), 1.02 (3H, s, H-26), 0.82 (3H, s, H-24); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ C).

[0099] 3) 분석 결과

[0100] 상기 실시예 3에서 얻은 화학식 4의 트리테르펜계 화합물을 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 없었고, 10% 황산 발색시 연한 분홍색으로 발색되었다. IR 스펙트럼에서 히드록시기(3413 cm^{-1}), 카르보닐기(1725 cm^{-1}), 엑소-메틸렌(1653 cm^{-1})의 관능기를 갖는 구조임을 추정하였고, EI/MS 실험을 통해 분자량은 456 $[\text{M}]^+$ 임을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼으로부터, 고자장 영역에서 싱글렛 메틸 프로톤 시그널[δ 1.23 (H-27), 1.07 (H-23), 1.05 (H-25), 1.02 (H-26), 0.82 (H-24)] 5개와 이소프로페닐기[δ 4.92 (H-30a), 4.77 (H-30b), 1.80 (H-29)]가 관측되어, 루판 타입(lupane type)의 트리테르펜 구조의 화합물로 추정할 수 있었다. 산소가 치환된 영역에서, 산화 메틴 프로톤 시그널(δ 3.57, dd, $J=11.2, 5.0$ Hz)이 관측되었고, 각 시그널의 결합 상수로부터 수산기가 β -결합하고 있는 것을 확인하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 모두 30개의 시그널이 관측되었으며, 6개의 메틸 카본, 10개의 메틸렌 카본, 5개의 메틴 카본, 5개의 쿼터리 카본, 1개의 산화 메틴 카본, 2개의 올레핀 카본, 그리고 카르복실 카본 시그널을 DEPT 기법을 통해 확인 할 수가 있었다. 위의 데이터를 종합한 결과, 상기 화학식 4의 트리테르펜계 화합물은 베틀린산으로 구조 결정하였다.

[0101] 베틀린 알데히드(betulinic aldehyde)-화합물 5

[0102] [화학식 5]



[0103]

[0104] 상기 R은 CHO임.

[0105] 1) 물성 : 무색 비결정질 분말(m.p. 193 °C)

[0106] 2) $[\alpha]_D^{25} = +19.5^\circ$ ($c=0.10$, CHCl_3); IR ν (KBr, cm^{-1}) 3413, 2850, 2760, 1720, 1651; EI-MS m/z : 440 $[M]^+$, 232, 220, 207, 189; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ H): 9.80 (1H, s, H-28), 4.89 (1H, br s, H-30a), 4.74 (1H, br s, H-30b), 3.45 (1H, dd, $J=11.0, 4.8$ Hz, H-3), 3.06 (1H, ddd, $J=11.0, 10.8, 4.9$ Hz, H-19), 1.71 (3H, s, H-29), 1.21 (3H, s, H-27), 1.01 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-25), 0.91 (3H, s, H-26), 0.80 (3H, s, H-24); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ C).

[0107] 3) 분석 결과

[0108] 상기 실시예 3에서 얻은 화학식 5의 트리테르펜계 화합물을 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 없었고, 10% 황산 발색시 연한 분홍색으로 발색되었다. IR 스펙트럼에서 히드록시기(3413 cm^{-1}), 알데히드기($2850, 2760\text{ cm}^{-1}$), 엑소-메틸렌(1651 cm^{-1})의 관능기를 갖는 구조임을 추정하였고, EI/MS 실험을 통해 분자량은 440 $[M]^+$ 임을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼으로부터, 상기 화학식 4의 트리테르펜계 화합물과 매우 유사한 시그널이 관측되었지만, 저자장 영역에서 알데히드 시그널(δ 9.80 (s))이 관측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 및 DEPT 스펙트럼에서 모두 30개의 시그널이 관측되었으며, 저자장 영역에서 카보닐 카본 대신에 알데히드 시그널(δ 206.4)이 관측되었다. 위의 데이터를 종합한 결과, 상기 화학식 5의 트리테르펜계 화합물은 베틀린 알데히드로 구조 결정하였다.

[0109] 하기 표 1에 화학식 1, 2, 4, 5로 표시되는 트리테르펜계 화합물($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)과 화학식 3으로 표시되는 트리테르펜계 화합물(CDCl_3)의 $^{13}\text{C-NMR}$ 데이터 결과를 나타내었다.

표 1

[0110]

No.	화합물 1	화합물 2	화합물 3	화합물 4	화합물 5
1	38.6	47.5	38.0	38.7	39.3
2	28.2	68.1	27.5	27.4	27.3
3	78.1	83.2	78.9	80.3	78.0
4	39.0	39.4	38.7	38.8	39.6
5	55.8	55.4	55.3	57.4	55.8
6	18.4	18.4	18.3	18.3	18.8
7	33.1	33.0	34.3	34.3	34.7
8	41.7	39.5	42.1	42.0	41.1
9	47.6	47.6	50.4	51.5	50.7
10	37.0	37.9	37.2	37.2	37.5
11	23.3	23.3	21.1	20.8	21.0
12	125.5	124.8	24.8	25.5	25.9
13	139.2	138.8	38.8	38.4	39.0

14	42.0	42.0	43.0	43.6	42.8
15	29.2	28.2	27.4	30.5	28.7
16	24.5	24.5	40.0	32.1	29.1
17	47.6	49.2	36.3	58.1	59.4
18	53.6	53.1	48.3	48.5	48.0
19	39.0	39.0	37.7	50.4	48.3
20	38.9	38.9	150.8	151.3	150.1
21	30.5	30.7	24.0	29.7	29.4
22	36.8	37.0	40.8	37.0	33.3
23	28.4	28.9	28.0	27.9	28.4
24	16.7	17.3	15.4	16.1	16.2
25	15.8	17.1	16.0	17.2	16.5
26	17.5	17.1	16.1	16.9	16.6
27	23.5	23.4	14.6	14.9	14.4
28	179.9	179.8	25.1	180.1	206.4
29	17.1	16.5	19.3	19.4	19.1
30	21.0	21.0	109.1	110.5	110.5

[0111] 실험예 1: 산딸나무 열매 분획물로부터 분리한 트리테르펜계 화합물의 hACAT 억제 활성 측정

[0112] 1) hACAT 단백질원 생산

[0113] hACAT1 단백질원은 인간 간(human liver) cDNA 라이브러리로부터 hACAT1과 hACAT2 cDNA를 클로닝하여, 바큘로 바이러스(baculovirus)로 표시하였다. Sf9 셀(Sf9 cell)을 이용하여 재조합 바이러스를 Hi5 셀(Hi5 cell)에 주입시켜 단백질을 얻었다. 결정된 MOI(multiplicity of infection)에 따라 재조합 바이러스를 건강하게 배양된 Hi5 세포 (500 ml, 1.5×10^6 cell/ml)에 처리하고, 27℃에서 96시간 동안 배양플라스크 (2ml spinner flask)를 80 rpm으로 교반하면서, 바이러스의 증식과 단백질의 대량생산을 유도하였다. 배양 후 원심분리(1,000 × g)를 통해 Hi5 세포주를 회수하고, 저장 버퍼용액(hypotonic buffer)(40 mM phosphate/0.1 M sucrose/50mM KCl/30 mM EDTA, pH 7.2)으로 처리하여 급속 동결과 해동의 방법으로 세포막을 부수어 단백질을 노출시키고, 1 시간 동안 초원심분리(100,000 × g)하여 얻은 마이크로솜(microsome)을 분취한 후 -80℃냉동고에 보관하면서 사용하였다.

[0114] 2) hACAT의 억제 활성 측정

[0115] ACAT 활성의 측정은 [^{14} C] oleoyl-CoA를 기질로 하여 Brecher & Chan의 방법을 아래와 같이 일부 수정하여 사용하였다(Coses S, Novak S, Zheng Y, Myers HM, Lear SR, Sande E, Welch CB, Lusi AJ, Spancer TA, Krouse BR, Erickson SK, Farese RV. ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase. J. Biol. Chem. 273: 26755-26764 (1998)).

[0116] 10 μ l 시험물질액, 4.0 μ l 미세소체 효소(microsomal enzyme), 20.0 μ l 분석 버퍼용액(assay buffer)(0.5 M KH_2PO_4 , 10mM DTT, pH 7.4), 40 mg/ml BSA (지방산이 제거된 것, Sigma A6003) 15.0 μ l, 20 mg/ml 콜레스테롤 2.0 μ l, 41.0 μ l, H_2O 를 가하여 37℃에서 15분간 예비 반응시켰다. 이 반응액에 [^{14} C] oleoyl-CoA 8 μ l (0.05 μ Ci, 최종농도 10 μ M)를 첨가하여 다시 37℃에서 15분간 예비 반응시킨 후 이소프로판올-헵탄(isopropanol-heptane)(4 : 1, v/v) 1 ml를 가하여 반응을 정지시키고, 헵탄(heptane) 0.6 ml와 5배로 희석한 분석 버퍼용액 0.4 ml를 첨가한 후 원심분리를 행하였다. 효소활성의 측정은 원심분리하여 얻은 상층액 100 μ l에 콕테일(cocktail)(Lipoluma, Lumac Co) 4 ml를 첨가한 후 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)(1450 Microbeta, Trilux Wallac Oy, Finland)를 이용하여 생성된 [^{14} C] 콜레스테롤 에스테르(cholesteryl ester)의 방사능을 측정하여 상기 화합물 1 내지 5의 hACAT-1 and hACAT-2의 억제 활성을 표 2에 나타내었다.

표 2

[0117]

화합물	농도	hACAT-1	hACAT-2
1	100 μ M	52.8 $\pm$ 0.7 %	54.1 $\pm$ 0.3 %
2	100 μ M	17.5 $\pm$ 6.0 %	13.7 $\pm$ 4.6 %
3	100 μ M	91.1 $\pm$ 0.4 %	41.5 $\pm$ 1.5 %
4	100 μ M	93.0 $\pm$ 0.7 %	81.9 $\pm$ 0.8 %
5	100 μ M	95.2 $\pm$ 0.2 %	52.2 $\pm$ 2.4 %
올레산 아닐라이드	100 nM	49 %	60 %

[0118]

* 양성대조군으로 올레산 아닐라이드를 사용하여 hACAT-1 및 hACAT-2에 대한 억제활성 실험을 수행하였다.

[0119]

분리된 각 화합물 1 내지 화합물 5에 대하여, 고지혈증과 관련된, hACAT-1 및 hACAT-2 단백질을 사용하여 Brecher & Chan의 방법과 동일한 방법으로 hACAT 억제 활성을 측정하였다.

[0120]

상기 측정 결과로부터 산딸나무 열매로부터 분리한 상기 5종의 트리테르펜계 화합물이 hACAT 활성에 미치는 영향을 살펴보면, 화합물 1, 3, 4 및 5는 100 μ M의 농도에서 hACAT-1의 활성은 각각 52.8 $\pm$ 0.7%, 91.1 $\pm$ 0.4%, 93.0 $\pm$ 0.7% 및 95.2 $\pm$ 0.2% 억제되었고, hACAT-2의 활성은 각각 54.1 $\pm$ 0.3%, 41.5 $\pm$ 1.5%, 81.9 $\pm$ 0.8% 및 52.2 $\pm$ 2.4% 억제되었다. 양성대조군으로 올레산 아닐라이드(oleic acid anilide)를 사용하여 동일한 실험조건에서 100 nM 처리했을 때 49.0 % 및 60 % 억제 효과를 나타내었다. 상기 올레산 아닐라이드와 비교하면 화합물 1, 3, 4 및 5의 저해활성이 높다고는 할 수 없으나, 천연에서 분리된 물질의 활성으로는 유의적인 수치를 갖는다고 할 수 있다. 또한 산딸나무 열매에서 분리된 트리테르펜계 화합물은 추출물에서의 함유량이 매우 높은 편이어서, 앞으로 활성물질 고 함유 분획뿐만 아니라, 추출물 그 자체로서도 활성 물질로써 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0121]

이하, 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유한 약학적 제제의 예를 설명한다.

[0122]

제제예 : 약학적 제제의 제조

[0123]

1-1. 산제의 제조

[0124]

산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 염
2g

[0125]

유당 1 g

[0126]

상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0127]

1-2. 정제의 제조

[0128]

산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 염
100 mg

[0129]

옥수수 전분 100 mg

[0130]

유당 100 mg

[0131]

스테아린산 마그네슘 2 mg

[0132] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0133] 1-3. 캡슐제의 제조

[0134] 산딸나무 열매 추출물, 산딸나무 열매 분획물, 이로부터 분리된 트리테르펜계 화합물 또는 이의 염
100 mg

[0135] 옥수수 전분 100 mg

[0136] 유당 100 mg

[0137] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0138] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.