(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0012178
(43) 공개일자 2009년02월02일

(51) Int. Cl.[9]
C07J 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0073193
(22) 출원일자 2008년07월25일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020070074377 2007년07월25일 대한민국(KR)

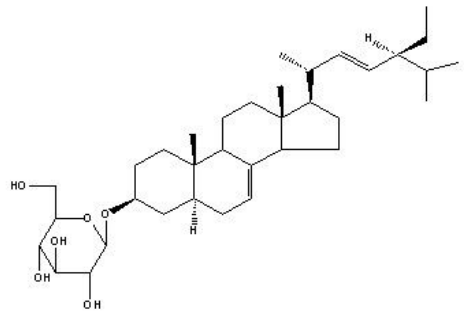
(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
김지영
서울 서초구 잠원동 신반포한신아파트 306동 1204호
이태훈
경기 수원시 영통구 망포동 벽산e빌리지 104동 302호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 신규 당 화합물

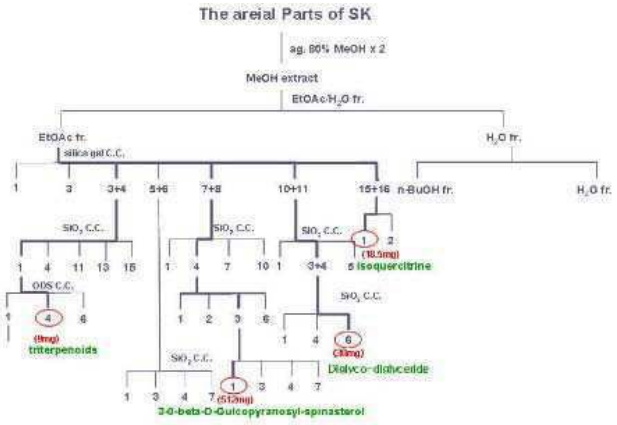
(57) 요 약

본 발명은 신규한 당 화합물인, 화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염, 이를 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용 조성물 및 이를 유효 성분으로 포함하는 콜라겐 합성 촉진용 조성물을 제공한다. 화학식 (I)의 화합물은 염증 저해 및 콜라겐 합성을 촉진하는 생리활성효과를 가지고 있어 약품, 화장료, 식품 등에 광범위하게 이용될 것으로 기대된다.



(I)

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

서진숙

경기 안성시 공도읍 용두리 주은풍림아파트 105동 1513호

정대균

경기 성남시 분당구 서현동 시범단지우성아파트 21동 1802호

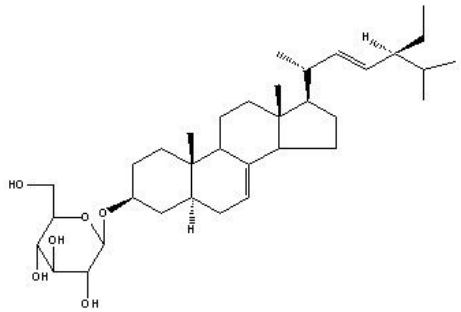
백남인

경기 수원시 영통구 망포동 쌍용아파트 104동 2001호

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염:



(I)

청구항 2

화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용 조성물.

청구항 3

화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 콜라겐 합성 촉진용 조성물.

청구항 4

화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 콜라게네이즈 발현 억제용 조성물.

청구항 5

화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용 조성물.

청구항 6

화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 주름 개선 또는 생성 억제용 조성물.

청구항 7

화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 피부 탄력 증진용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 신규한 당 화합물인, 화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염, 이를 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용 조성물, 콜라겐 합성 촉진용 조성물, 주름 개선 또는 생성 억제용 조성물, 및 피부 탄력 증진용 조성물 등에 관한 것이다.

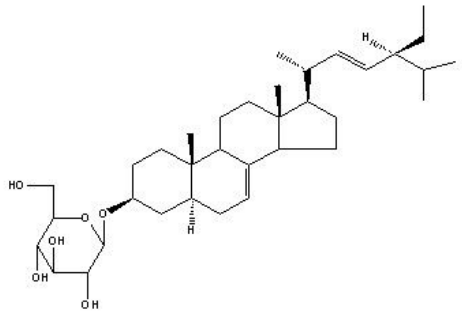
배 경 기 술

<2> 현재까지 많은 종류의 염증 억제제 및 콜라겐 합성 촉진제가 개발되었으나, 아직까지 만족할 만한 약물은 개발되지 못하였다. 본 발명자들은 새로운 염증 억제제, 콜라겐 합성 촉진제를 검색하던 중 신규한 당 화합물인 화학식 (I)의 화합물이 염증을 저해하고 콜라겐 합성을 촉진하여 주름 개선 또는 생성 억제, 및 피부 탄력 증진 효과를 나타낸다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<3> 본 발명은 신규한 당 화합물인, 화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염, 이를 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용 조성물 및 이를 유효 성분으로 포함하는 콜라겐 합성 촉진용 조성물, 콜라게네이즈 발현 억제용 조성물, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용 조성물, 주름 개선 또는 생성 억제용 조성물, 및 피부 탄력 증진용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.



<4> (I)

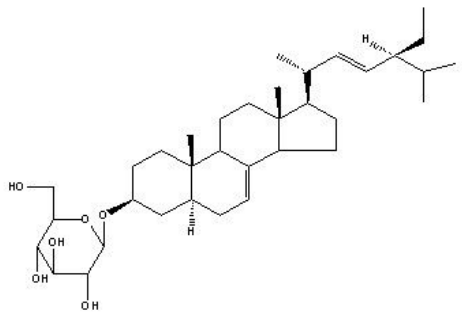
과제 해결수단

<5> 본 발명은 노각나무 추출물로부터 분리한 신규한 화합물인, 화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염, 이를 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용 조성물, 콜라겐 합성 촉진용 조성물, 콜라게네이즈 발현 억제용 조성물, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용 조성물, 주름 개선 또는 생성 억제용 조성물, 및 피부 탄력 증진용 조성물을 제공한다.

<6> 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명하고자 한다.

<7> 본 발명에서 사용하는 용어는 달리 언급하지 않는 한, 명세서 전반에 걸쳐 동일한 의미로 사용되는 것으로 간주된다.

<8> 본 발명은 화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 제공한다.



<9> (I)

<10> 화학식 (I)의 화합물은 노각나무 잎 추출물로부터 분리하거나, 당업계에 공지된 방법에 따라 합성할 수 있다.

<11> 노각나무 잎 추출물로부터 화학식 (I)의 화합물을 분리하기 위해서는, 예를 들어, 노각나무의 잎을 메탄올로 추출하여 얻어진 메탄올 추출물을 농축하여 메탄올을 제거하고, 이 메탄올추출물을 핵산 및 에틸아세테이트로 세척한 다음, 메탄올로 용해하여 메탄올 가용추출물을 얻은 후 이 메탄올 가용추출물을 실리카겔 흡착

컬럼 크로마토그라피 및 TLC을 거쳐 분리할 수 있다.

<12> 본 발명에 있어서, 화학식 (I)의 화합물의 염은 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 모든 염 형태를 포함한다. 화학식 (I)의 화합물의 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 염은 수용성, 지용성 또는 불용성 형태의 산물을 포함하며, 예컨대, 무기산 또는 유기산 또는 염기로부터 형성된 통상적인 무-독성 염 또는 4급 암모늄 염을 포함한다. 산 부가 염의 예는 아세테이트, 아디페이트, 아르기네이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 벤젠-설포네이트, 바이설페이트, 뷰티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 사이클로펜탄-프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 퓨마레이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로아이오디드, 2-하이드록시에탄설포네이트, 락테이트, 말레에이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 옥살레이트, 파모에이트, 펙티네이크, 퍼설페이트, 3-페닐- 프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 포스페이트, 프로피오네이트, 숙시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 토실레이트, 언데카노에이트 등을 포함한다. 염기 염은 암모늄 염, 소듐 염 및 포타슘 염과 같은 알칼리 금속 염, 칼슘 염 및 마그네슘 염과 같은 알칼리 토금속염, 디사이클로헥실아민 염, N-메틸-D-글루카민과 같은 유기 염기를 가진 염, 및 아르기닌, 리신과 같은 아미노산을 가진 염 등을 포함한다. 또한, 염기성 질소-함유 그룹은 메틸, 에틸, 프로필, 및 부틸 클로라이드, 브로마이드 및 아이오디드와 같은 저급 알킬 할리드; 디메틸, 디에틸, 디부틸, 및 디아밀 설페이트와 같은 디알킬 설페이트; 데실, 라우릴, 미리스틸 및 스테아릴 클로라이드, 브로마이드 및 아이오디드와 같은 장쇄 할리드; 벤질 및 펜에틸-브로마이드 등과 같은 아르알킬 할리드와 같은 제제로 4급화될 수 있다. 다른 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 염은 설페이트 염 에탄올레이트 및 설페이트 염을 포함한다.

<13> 본 발명은 화학식 (I)의 화합물의 프로드럭을 그의 범위 내에 포함한다. 일반적으로, 그러한 프로드럭은 생체 내에서 요구되는 화합물로 쉽게 전환될 수 있는 화합물의 기능적 유도체일 것이다. 따라서, 본 발명의 염증 억제 또는 콜라겐 합성 촉진 방법에 있어서, 용어 "투여하는"은 구체적으로 개시된 화합물 또는 구체적으로 개시될 수는 없으나 환자에게 투여 후 생체 내에서 구체화된 화합물로 전환되는 화합물로의 염증 억제 또는 콜라겐 합성 촉진을 포함한다. 적합한 프로드럭 유도체의 선택 및 제조를 위한 통상적인 방법은 예를 들어,"Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard,Elsevier, 1985에 기술되어 있다.

<14> 본 발명에 따른 화합물은 적어도 하나의 키랄 중심을 가지며, 본 발명의 화합물은 그에 따라 에탄티오머로서 존재할 수 있다. 화합물이 2 이상의 키랄 중심을갖는 경우, 화합물은 추가적으로 디아스테레오머로서 존재할 수 있다. 그러한 이성체 및 그의 혼합물 모두는 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다. 또한, 본 발명의 화합물, 그의 염, 또는 그의 이성질체는 결정형으로 존재할 수 있다. 또한, 일부 화합물은 물과 함께(즉, 하이드레이트) 또는 통상적인 유기 용매로 용매화합물을 형성할 수 있으며, 그러한 용매화합물은 또한 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 여겨진다.

<15> 본 발명의 화학식 (I)의 화합물은 염증 억제 효과를 갖는다. 산화질소(nitric oxide: NO)는 인체내 신경계, 면역계, 심혈관계 등에서 세포간 상호작용, 세포 독성, 세포 증식 억제성, 항상성 기전에 관여하는 전령분자(messenger molecule)로서 Larginine으로부터 산화 질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 만들어진다. 이러한 NOS에는 3가지 아형이 알려져 있다. 가장 처음으로 확인된 제 1형 NOS는 신경형 NOS (nNOS), 대식세포에서 처음 확인된 제 2형 NOS는 유도형 NOS (iNOS), 그리고 제 3형 NOS는 내피 세포형 NOS (eNOS)라 불린다. 이들은 또한 활성화 기전에 따라서 체질형(constitutive) NOS와 유도형(inducible) NOS로 구분하기도 한다. eNOS와 nNOS를 포함하는 cNOS는 칼슘 농도에 의존하여 NO를 생성하며 주로 세포에서 신호 전달에 관여한다고 알려져 있다. 반면에 사이토카인이나 내독소에 의해 유도되는 iNOS는 효소의 활성화 여부로 조절되는 cNOS와는 달리 iNOS 유전자의 전사 단계에서 발현이 조절되고 일단 합성되면 효과가 없어질 때까지 지속적으로 다량의 NO를 생성하기 때문에 주위 조직에 손상을 유발하게 된다(Expression of Nitric Oxide Synthase Isotypes in Advanced Gastric Carcinoma.,*The Korean Journal of Pathology*. 2002; 36: 374-81). 따라서 NO의 생성을 억제하게 되면 염증을 억제할 수 있게 된다.

<16> 하기 실시예에서는 화학식 (I)의 화합물이 LPS 등에 의해 유도되는 iNOS의 mRNA 및 단백질 발현을 억제함으로써 산화 질소(nitric oxide)의 생성을 저해하여염증을 억제함을 확인하였다.

<17> 따라서 본 발명은 화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용 조성물을 제공한다.

<18> 또한 본 발명의 화학식 (I)의 화합물은 콜라겐 합성 촉진 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 하기 실시예에서는 화학식 (I)의 화합물의 처리에 따른 콜라겐 단백질의 양의 변화를 조사함으로써 화학식 (I)의 화

합물의 콜라겐 합성 촉진 효과를 확인하였다.

<19> 따라서 본 발명은 화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 콜라겐 합성 촉진용 조성물을 제공한다.

<20> 본 발명은 또한, 화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 콜라게네이즈 발현 억제용 조성물 또는 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용 조성물을 제공한다.

<21> 본 발명은 또한, 콜라겐 합성 촉진, 콜라게네이즈 발현 억제, 및/또는 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진 등과 같은 효과를 통해 주름 개선 및/또는 생성 억제, 및/또는 탄력 증진 효과가 나타나는 바(Vayalil, P. K., et al., *J Invest Dermatol*. 2004. 122. 1480-1487 등), 화학식 (I)의 화합물 또는 약학적 또는 생리학적으로 허용되는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는 주름 개선 또는 생성 억제용 조성물, 또는 탄력 증진용 조성물을 제공한다.

<22> 상기 화학식 (I)의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용 조성물, 콜라겐 합성 촉진용 조성물, 콜라게네이즈 발현 억제용 조성물, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용 조성물, 주름 개선 또는 생성 억제용 조성물, 또는 피부 탄력 증진용 조성물은 약학적 조성물일 수 있다.

<23> 화학식 (I)의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용 또는 콜라겐 합성 촉진용 조성물, 콜라게네이즈 발현 억제용 조성물, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용 조성물, 주름 개선 또는 생성 억제용 조성물, 또는 피부 탄력 증진용 조성물이 약학적 조성물인 경우, 상기 약학적 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

<24> 본 발명의 화학식 (I)의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

<25> 본 발명의 화학식 (I)의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 연고제, 크림제, 겔제, 점적제, 에어로졸, 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다.

<26> 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕괴제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다.

<27> 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

<28> 본 발명은 염증 억제용, 콜라겐 합성 촉진용, 콜라게네이즈 발현 억제용, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용, 주름 개선 또는 생성 억제용, 또는 피부 탄력 증진용 의약의 제조를 위한 화학식 (I)의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 화학식 (I)의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 염증 억제용, 콜라겐 합성 촉진용, 콜라게네이즈 발현 억제용, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용, 주름 개선 또는 생성 억제용, 또는 피부 탄력 증진용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

<29> 또한 본 발명은 포유동물에게 치료상 유효량의 화학식 (I)의 화합물을 투여하는 것을 포함하는 염증의 억제 방법, 콜라겐 합성 촉진 방법, 콜라게네이즈 발현 억제 방법, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진 방법, 주름 개선 또는 생성 억제 방법, 또는 피부 탄력 증진 방법을 제공한다.

<30> 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

<31> 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 염증 억제 또는 콜라겐 합성 촉진 방법에 있어서, 성인의 경우, 화학식 (I)의 화합물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01㎎/kg~10g/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

<32> 본 발명의 염증 억제 방법, 콜라겐 합성 촉진 방법, 콜라게네이즈 발현 억제 방법, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진 방법, 주름 개선 또는 생성 억제 방법, 또는 피부 탄력 증진 방법에 있어서, 화학식 (I)의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 약학적 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 국소, 직장, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

<33> 상기 화학식 (I)의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용, 콜라겐 합성 촉진용, 콜라게네이즈 발현 억제용, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용, 주름 개선 또는 생성 억제용, 또는 피부 탄력 증진용 조성물은 또한 화장료 조성물일 수 있다.

<34> 예를 들어, 기존의 화장료에 상기 화학식 (I)의 화합물을 첨가하여 염증 억제, 콜라겐 합성 촉진, 콜라게네이즈 발현 억제, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진, 주름 개선 또는 생성 억제, 또는 피부 탄력 증진의 기능을 부여할 수 있다.

<35> 화학식 (I)의 화합물을 이용하여 화장료를 제조할 경우, 화학식 (I)의 화합물 외에 화장료에 통상적으로 이용되는 성분들, 예를 들면, 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 향료 등과 같은 통상적인 보조제와 담체 성분을 함께 사용할 수 있다.

<36> 화장료 제형에는 특별한 제한은 없으나, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 스프레이, 팩, 바디샴푸, 헤어샴푸, 헤어린스 등이 있으며, 통상의 당업자라면 제형의 종류에 따라 알맞은 담체를 용이하게 채택하여 사용할 수 있다.

<37> 콜라겐 합성 촉진용 화장료 조성물의 경우 첨가제로써 레티놀과 같은 주름 개선용 기능성 물질을 추가로 포함할 수 있다.

<38> 본 발명에 따른 화장료 조성물은 당 분야의 공지된 방법에 따라 제조될 수 있을 것이다. 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서 화학식 (I)의 화합물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있다. 예를 들어 비타민, 펩티드, 다당류, 유지성분, 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조절제, 알코올, 색소, 향료, 정제수 등을 포함할 수 있다.

<39> 유지 성분의 예는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 포함한다. 보습제의 예는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 포함한다. 에몰리언트제의 예는 장쇄 아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 포함한다. 계면 활성제의 예는 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제 등을 포함한다. 산화 방지제의 예는 부틸히드록시아니솔,갈릭산프로필, 엘리소르빈산 등을 포함한다. pH 조정제는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 포함한다. 알코올의 예는 세틸알코올 등의 고급 알코올 등을 포함한다.

<40> 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유지, 식물성유지, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크,

실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본,프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용된다. 담체 성분의 예는 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르를 포함한다. 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

<41> 상기 화학식 (I)의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 염증 억제용, 콜라겐 합성 촉진용, 콜라게네이즈 발현 억제용, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용, 주름 개선 또는 생성 억제용, 또는 피부 탄력 증진용 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있다.

<42> 예를 들어, 상기 화학식 (I)의 화합물을 각종 식품에 식품첨가제로서 첨가하여 염증 억제, 콜라겐 합성 촉진, 콜라게네이즈 발현 억제, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진, 주름 개선 또는 생성 억제, 또는 피부 탄력 증진을 위한 기능을 부여할 수 있다. 상기 '식품첨가제'는 식품을 제조, 가공 또는 보존함에 있어 식품에 첨가, 혼합, 침윤 등의 방법으로 사용되는 첨가제를 의미한다. 화학식 (I)의 화합물이 식품첨가제로 첨가될 수 있는 각종 식품의 예로는 음료, 면류, 빵류, 육류, 초코렛, 스낵류, 과자류, 아이스크림류, 비타민 복합제 등을 포함한다.

<43> 또한 본 발명에서, 상기 식품 조성물은 일반 식품은 물론 '건강보조식품' 또는 '건강기능식품'을 포함한다. 특히, '건강기능식품'은 '인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품' (대한민국 법률 제7428호인 건강기능식품에관한법률의 제3조 제1호)에 충족될 수 있는 것이다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다. 즉,건강한 사람들 또는 반 건강인의 보건 용도에 유용하게 사용될 수 있는 것을 의미한다.

<44> 화학식 (I)의 화합물이 포함된 식품을 섭취하거나, 피부에 바르는 것 만으로도 염증 억제 또는 콜라겐 합성 촉진의 효능을 얻을 수 있지만, 복용상의 편의를 위하여 정제, 당의정, 캡슐, 드링크 등의 제형을 갖는 기능성 식품으로 사용하는 것이 바람직하다.

효 과

<45> 화학식 (I)의 화합물은 염증 저해, 콜라겐 합성 촉진, 콜라게네이즈 발현 억제용 조성물, 콜라게네이즈 억제제 발현 촉진용 조성물, 주름 개선 또는 생성 억제, 또는 피부 탄력 증진하는 생리활성효과를 가지고 있어 약품, 화장료, 식품 등에 광범위하게 이용될 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<46> 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 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 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

<47> **실시예 1: 화학식 (I)의 화합물의 제조**

<48> **1. 노각나무 잎의 추출물에서 당 화합물의 분리**

<49> 노각나무(*Stewartia koreana*)의 잎 8.5kg을 80% 메탄올 (90ℓ)에 24시간 동안 침지한 후 G3 글래스 필터(G3 glass filter)로 여과하여, 여액과 잔사를 얻었고, 이 잔사를 동용매로 1회 반복(90ℓ)하여 추출 및 여과하였다. 얻어진 추출여액(180ℓ)을 35℃에서 감압농축하여 메탄올 추출물(663g)을 얻었다.

<50> 메탄올 추출물(663g)로부터 물(2ℓ)과 에칠아세테이트(2ℓ) 용매를 이용하여 층을 나누고 감압농축하여 물 분획(608g)과 에칠아세테이트 분획(52g)을 얻었다. 에칠아세테이트 분획(52g)을 클로로포름-메탄올 용매(20:1 ~ 1:1, v/v)를 이용하여 실리카겔 흡착 컬럼 크로마토그라피를 실시하였다. TLC (Thin-layer

Chromatography)에 분획을 확인한 후 극성에 차이에 따라서 황산 발색을 해보면 극성이 높은 물질과 극성이 낮은 분획들이 발색되어 많은 유효물질이 나타난다. 이 때문에 20:1 부터 1:1 까지의 비율의 각각의 클로로포름-메탄올 용액으로 크로마토그래피를 하여 용출분획을 얻었다. 그 용출액을 유리그릇에 1리터씩 18개 분획으로 수집하였다.

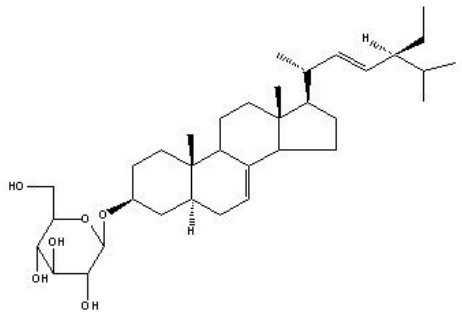
<51> 각각의 분획을 TLC로 확인하여 발색되는 색깔과 UV(280nm)로 쬐어서 흡광도가 비슷하게 나타나면 같이 나누어 서로 비슷한 성질을 가진 것들끼리 수집하였다. 각 분획중 소량(1 g)씩을 메탄올에 희석하여 280nm에서의 흡광도를 측정하였다. TLC을 할때는 실리카박층에서 클로로포름-메탄올 10:1(V/V) 용액을 전개용매로 하였다. 이 때 자외선 검출기 필터(280nm)를 통하여 순차적으로 분리되어 나오는 자외선 흡수분획 I(3-4), II(7-8), III(10-11), IV(15-16)을 모아 감압·농축하였다. 분획 I(3-4)과 분획 II(분획7-8), 분획III(10-11), 분획IV(15-16)을 10:1(V/V)부터 1:1(V/V)까지의 비율의 각각의 클로로포름-메탄올 용액으로 실리카겔 흡착 컬럼 크로마토그라피를 실시하여 용출분획을 얻었다. 그 용출액은 유리그릇에 1리터씩 16개의 분획으로 수집하였다. 도 1과 같이, 상기 자외선 흡수분획을 여러 분획으로 재분획하고 TLC상으로 황산발색을 하여 비슷한 분획이라 생각되는 것을 같이 수집하였다. 각 분획중 소량씩(1 g)을 메탄올에 희석하여 280nm에서의 흡광도를 측정하였다. TLC을 수행할때는 실리카박층에서 클로로포름-메탄올의 5:1(V/V) 용액을 전개용매로 이용하였다. 이때 자외선 검출기 필터(254/365nm)를 통하여 아질산염(Nitrite) 활성을 측정하여 활성이 있는 분획만을 분리하였다. 그 결과, 아질산염 활성에 관여하는 유효물질로서 화합물 1(512 mg)을 얻었다.

<52> **2. 기기분석에 의한 화합물 1의 구조결정**

<53> 화합물 1은 백색 분말로서, m.p.는 279-284℃이고; $[a]_D^{20}$는 -12.59° (c=0.07,C_5H_5N)며; pos. 질량분석기 FAB-MS (Jeo Ltd, JMS-HX/HX110A)의해 측정된 화합물의 1의 질량분석치는 분자이온 [M++Na]이 m/z 574.83이었다. 또한, ^{1}H-NMR (pyridine-d_5, 500MHz)의 측정값은 δ 5.17 (2H, d, J =7.5Hz, H-22), 5.06 (1H, m, H-23), 5.04 (1H, d, J = 7.5Hz, H-1'), 3.96-4.49 (5H, m, H-2', H-6'), 1.06 (3H, d,J=6.5Hz, H-21), 0.89 (3H, d, J = 6.0Hz, H-26), 0.85-0.89 (6H,m, H-27, H-29), 0.72 (3H, s, H-19), 0.58 (3H, s, H-18)였다(도 2). TLC 전개 후 10% 황산 발색 시, 암자색으로 발색되었고, m.p. 280℃의 백색분말상이며, EI/MS에서 분자량이 574임을 알 수 있었다.

<54> 1H-NMR 스펙트럼에서 δH 0.58(3H), 0.72(3H)에서 2개의 싱글렛(singlet) 메틸 그룹과 δH 0.85(6H, m), 0.89(3H, d, J = 6.0 Hz), 1.06(3H, d, J = 6.4 Hz) 3개의 메틸 그룹 시그날이 나타났고, δH 5.06(1H, dd, J = 16.0, 8.8 Hz), 5.17(1H, dd, J = 16.0, 8.8 Hz)에서 트랜스 비시널 올레피닉 프로톤(trans vicinal olefinic proton)과 δH 5.17(1H, m)에서 올레피닉 프로톤 시그널(olefinic proton signal)이 관측되었다. 또한 δH 5.04(1H, d, J = 7.2 Hz)에서 아노머릭 프로톤(anomeric proton)이 확인되어 배당체로 존재하는 것으로 추정하였다.

<55> 13C-NMR 스펙트럼에서 총 35개의 탄소를 가지는 구조임을 추정하였고, δC 102.32에서 아노머릭 카본 시그날(anomeric carbon signal)을 δC 117.89, 129.65, 138.69, 139.60에서 올레피닉 카본(olefinic carbon)을 확인하여, 천연에 다양하게 존재하는 스피나스테롤(spinasterol)임을 확인 할 수 있었다. 당은 케미컬 시프트(chemical shift)로부터 D-글루코피라노스(D-glucopyranose)임이, 아노머릭 프로톤(anomeric proton)의 커플링 상수(coupling constant) 값이 7.2 Hz인 점으로 당이 β결합하고 있음을 확인하였다. 또한 당의 결합위치는 gHSQC, gHMBC 등의 2D-NMR을 측정하여 확인하였다. 그러므로, 화합물 1은 하기 화학식 I의 구조를 갖는 당화합물인 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤(3-o-β-D-Glucopyranosyl-spinasterol)임이 확인되었다.

<56> 

(I)

<57> **실시예 2: 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 산화 질소 생성 저해 효과 확인**

<58> 본 실시예에서는 노각나무 추출물로부터 분리한 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 염증 억제 효과를 확인해 보고자 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 산화 질소(nitric oxide) 생성 저해 활성을 다음과 같이 측정하였다.

<59> RAW 264.7 뮤린 대식세포(murine macrophage cell) 1×10^6cell/웰을 배양접시의 바닥에 접종한 후 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 ㎍/mL), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 혹은 동등 이상의 성장력을 갖는 배지를 넣고 37℃를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 배양하였다. 배양된 세포에 성장 배지를 제거한 후 10% FBS 만을 제거한 동등 배지에 LPS(Lipopolysaccharide)(1 ㎍/ml) 2 ul씩 농도별로 희석한 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤 (각각 0, 3, 6, 12.5, 25, 50, 100 μM) 200 ul씩 함께 처리하고 24시간 동안 배양한 후 배양 상층액을 2 ml씩 취하여 그리이스 시약(Griess reagent)을 이용하여 각 조건에서 축적된 아질산(nitrite, NO의 최종 산화물)의 생성량을 측정하였다. 도 3 및 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, LPS에 의한 산화 질소 생성이 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다. 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 NO 생성 저해에 대한 IC_{50}(inhibition concentration)은 약 50 μM 이었다.

표 1

<60>

	3-o-β-D-Glucopyranosyl-spinasterol	Nitric oxide(μM)
(+) LPS	0	48.4130 ± 0.3074
	3.1 μM	48.4130 ± 0.1521
	6.25 μM	43.3043 ± 0.0760
	12.5 μM	38.7609 ± 0.5372
	25 μM	35.2826 ± 0.6149
	50 μM	30.7435 ± 0.2214
	100 μM	20.3850 ± 0.6859
(-) LPS	0	3.5435 ± 0.2479

<61> **실시예 3: 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 iNOS mRNA와 단백질의 발현 억제 효과 확인**

<62> RAW 264.7 뮤린(murine) 대식세포에서 LPS에 의해 유도, 생성되는 NO는 주로 iNOS의 발현에 의해 결정되어지기 때문에, 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 iNOS 발현에 어떠한 영향을 미치는지 조사해 보았다.

<63> 먼저 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 LPS에 의해 유도되는 iNOS mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, RAW 264.7 뮤린 대식세포(murine macrophage cell) 1×10^6cell/웰을 배양접시의 바닥에 접종한 후 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 ㎍/mL), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 혹은 동등 이상의 성장력을 갖는 배지를 넣고 37℃를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 배양한다. 배양된 세포에 성장 배지를 제거한 후 10% FBS 만을 제거한 동등 배지에 LPS(Lipopolysaccharide)(1 ㎍/ml) 2 ul씩 농도별로 희석한 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤 (0, 50, 250, 1000, 4000 ng/ml) 200 ul씩과 함께 처리하여 24시간 동안 키운 뒤 RNA 전체를 분리하고 iNOS에 대한 프라이머(BIONEER corporation, Korea)를 이용하여 94℃에서 5분, 50-60℃에서 2분, 72℃에서 3분의 조건으로 pre-PCR을 행한 후 94℃에서 30초에서 1분, 50-60℃에서 30초에서 1분, 72℃에서 40초에서 2분, 25-28 cycle의 조건으로 PCR을 하고 72℃에서 7분으로 반응을 하여 stop시킨 후 4℃에서 보관 후 전기영동을 수행하였다. 그 결과 도 4A에서 보는 바와 같이 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 LPS에 의해 유도된 iNOS mRNA 발현을 저해함을 관찰할 수가 있었으며 이는 NO 생성 억제 효과와 일치하였다.

<64> 나아가, 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 LPS에 의해 유도되는 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, RAW 264.7 뮤린 대식세포(murine macrophage cell) 1×10^6cell/웰을 배양접시의 바닥에 접종한 후 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 ㎍/mL), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지 혹은 동등 이상의 성장력을 갖는 배지를 넣고 37℃를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 배양한다. 배양된 세포에 성장 배지를 제거한 후 10% FBS 만을 제거

한 동등 배지에 LPS(Lipopolysaccharide)(1 ㎍/ml) 2 ul씩을 농도별로 희석한 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤 (0, 50, 250, 1000, 4000 ng/ml) 200 ul씩과 함께 처리하여 24시간동안 키운 뒤 전체 세포 분해물(total lysates) 200ul를 준비하여 웨스턴 블럿팅을 실시하였다. 그 결과 도 4B에서 보는 바와 같이 LPS에 의해 유도·생성된 iNOS 단백질의 발현은 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤에 의해 농도에 의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 NO의 생성을 억제하는 면에서 iNOS mRNA에 대한 결과와 일치한다. 따라서 상기 결과들로부터 알 수 있는 바와 같이, 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤은 산화질소의 생성을 저해함으로써 염증을 억제한다.

<65> **실시예 4: 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 콜라겐 합성 촉진 효과 확인**

<66> 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 주름 개선 효능 검증을 위하여 콜라겐 합성 촉진 효과를 확인하였다. 인간 섬유아세포(primary cell line) 또는 이와 유사한 섬유아세포(CCD-986sk, HS68, Detroit 5116 등)1×10^6cell/웰을 배양접시의 바닥에 접종한 후 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 ㎍/mL), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 FBM (Fibroblast Basal Medium) 배지 혹은 동등 이상의 성장력을 갖는 배지를 넣고 37℃를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 배양한 후 자외선(UVB, 200mJ/cm^2)을 조사하여 콜라겐을 파괴시킨 후, 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤 1 μM, 노각나무 추출물(SKE50 100 ㎍/ml, 활성 분획에 따른 중간 분획물(F10) 10 ug/ml, 트리터페노이드 5 ㎍/ml, 아이소퀴시트린 2 ㎍/ml) 및 레티놀(sigma, 10 ㎍/ml)을 24 시간 각각 처리하고, 상층액 2 ml씩을 취하여 상층액으로 분비되는 콜라겐의 양을 웨스턴 블럿방법을 통하여 콜라겐 항체 (R&D Systems, USA)를 이용하여 콜라겐의 증감여부를 확인함으로써 이들 화합물의 콜라겐 합성 능력을 비교했다. 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤은 이미 사용 중인 기능성 주름개선 소재인 레티놀의 1/10 농도에서도 레티놀과 유사한 정도의 콜라겐 합성 능력을 보여, 콜라겐 합성에 탁월한 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

<67> **실시예 5: 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 콜라게네이즈 저해 효과 확인**

<68> 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 주름 개선 효능 검증을 위하여 인간 섬유아세포(primary cell line) 또는 이와 유사한 섬유아세포(CCD-986sk, HS68, Detroit 5116 등) 1×10^6cell/웰을 배양접시의 바닥에 접종한 후 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 ㎍/mL), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 FBM (Fibroblast Basal Medium) 배지 혹은 동등 이상의 성장력을 갖는 배지를 넣고 37℃를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 배양한 후 자외선(UVB, 200mJ/cm^2)을 조사하여, 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤을 각각 0, 1.25, 2.5, 5, 10 uM의 농도로 200 ul씩을 24 시간 동안 처리하고 콜라게네이즈 효소의 발현 정도를 비교하기 위하여 RT-PCR 방법으로 RNA 전체를 분리하고 콜라게네이즈에 대한 프라이머 (BIONEER corporation, Korea)를 이용하여 94℃에서 5분, 50-60℃에서 2분, 72℃에서 3분의 조건으로 pre-PCR을 행한 후 94℃에서 30초에서 1분, 58℃에서 30초에서 1분, 72℃에서 40초에서 2분, 25-28 cycle의 조건으로 PCR을 하고 72℃에서 7분으로 반응을 하여 stop시킨 후 4℃에서 보관 후 전기영동을 수행하였으며 세포를 파쇄한 후 세포질 내에 존재하는 단백질을 회수하여 전기영동을 수행한 후 이를 나이트로셀룰로오즈 필터로 이동 시킨 후 콜라게네이즈 항체 (R&D Systems, USA)를 이용하여 웨스턴 불럿을 실시 하였으며 이 결과를 토대로 콜라게네이즈의 유전자와 단백질의 발현 정도를 비교 하였다. 도 6에서 보는 바와 같이 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤은 UVB에 의해서 과 발현 되는 콜라게네이즈의 유전자(도 6A) 및 단백질 발현양(도 6B)을 감소 시키는 것을 확인할 수 있었다.

<69> **실시예 6: 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤의 콜라게네이즈 억제제 발현 증**가 효과 확인

<70> 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 지닌 콜라게네이즈 억제제 발현 증가 활성 기작을 확인하기 위하여 인간 섬유아세포(primary cell line) 또는 이와 유사한 섬유아세포(CCD-986sk, HS68, Detroit 5116 등) 1×10^6cell/웰을 배양접시의 바닥에 접종한 후 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 ㎍/mL), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 FBM (Fibroblast Basal Medium) 배지 혹은 동등 이상의 성장력을 갖는 배지를 넣고 37℃를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기내에서 배양한 후 자외선(UVB, 200 mJ/cm^2)을 조사하여, 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤 200 ul씩을 각각 0, 1.25, 2.5, 5, 10 uM 의 농도로 24 시간 동안 처리하고 콜라게네이즈 억제제 효소의 발현 정도를 비교하기 위하여 RT-PCR 방법으로 RNA 전체를 분리하고 콜라게네이즈에 대한 프라이머 (BIONEER corporation, Korea)를 이용하여 94℃에서 5분, 50-60℃에서 2분, 72℃에서 3분의 조건으로 pre-PCR을 행한 후 94℃에서 30초에서 1분, 57℃에서 30초에서 1분, 72℃에서 40초에서 2분,

25-28 cycle의 조건으로 PCR을 하고 72℃에서 7분으로 반응을 하여 stop시킨 후 4℃에서 보관 후 전기영동을 수행 한 후 콜라게네이즈 억제제의 발현 증감을 비교해 본 결과 도 7에서 보는 바와 같이 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤은 자외선에 의해 저해 되어진 콜라게네이즈 억제제의 발현양을 증가 시키는 것을 확인 하였다.

도면의 간단한 설명

<71> 도 1은 실리카겔 흡착 컬럼 크로마토그래피를 통해 노각나무 추출물로부터 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤을 분리해 내는 과정을 보여준다.

<72> 도 2는 화합물 1(3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤)의 구조 결정을 위해 수행된 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT 결과를 보여준다.

<73> 도 3은 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 LPS에 의해 유도된 산화 질소 생성을 저해함을 보여준다.

<74> 도 4는 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 iNOS mRNA 발현(도 4A) 및 단백질 발현(도 4B)을 억제함을 보여준다.

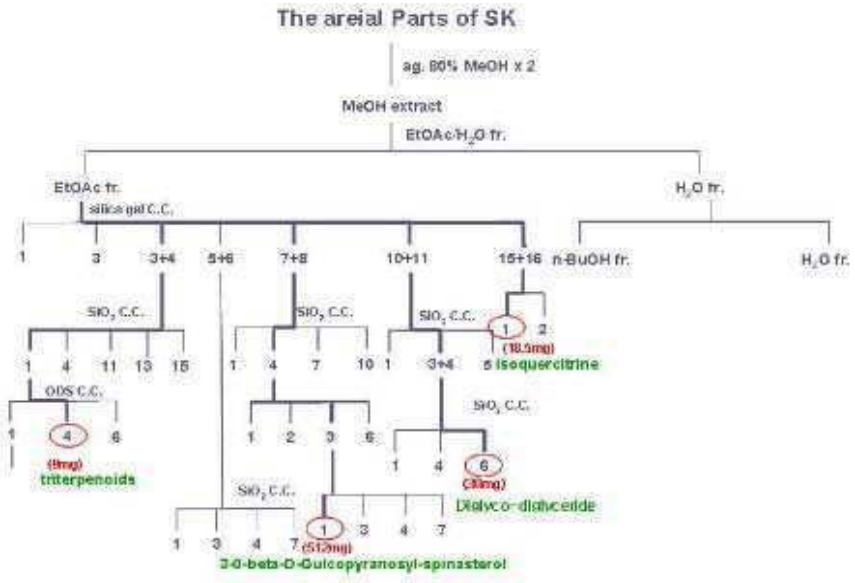
<75> 도 5는 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 콜라겐 합성을 촉진함을 보여준다.

<76> 도 6은 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 콜라게네이즈 저해 활성을 지닌 것을 보여준다.

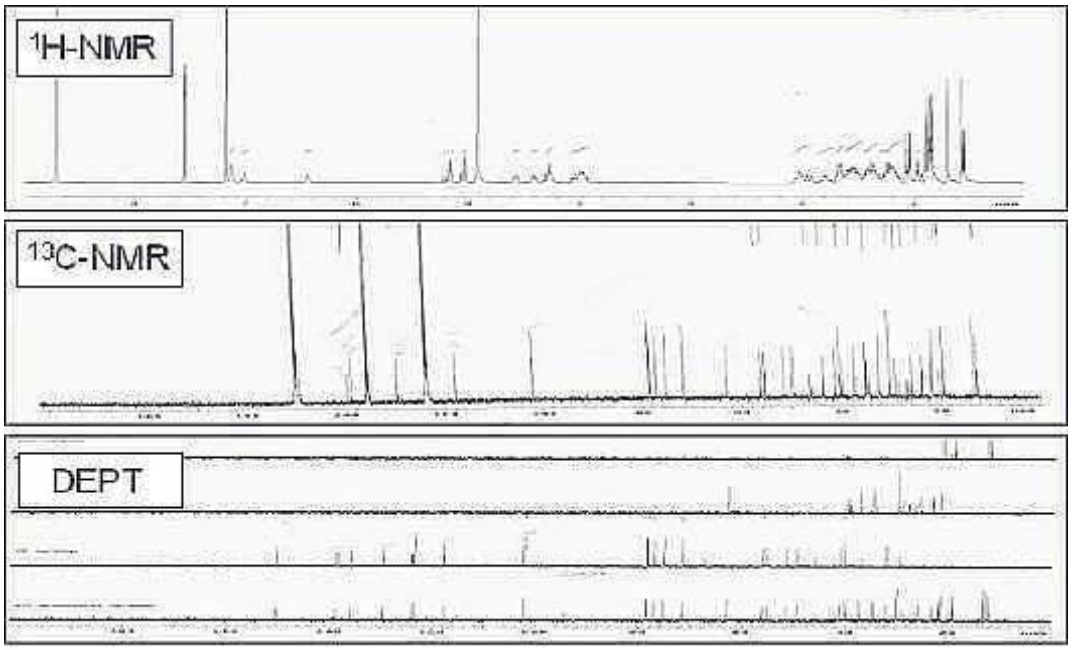
<77> 도 7은 3-o-β-D-글루코피라노실-스피나스테롤이 콜라게네이즈 억제제의 발현을 증가 시키는 것을 보여 준다.

도면

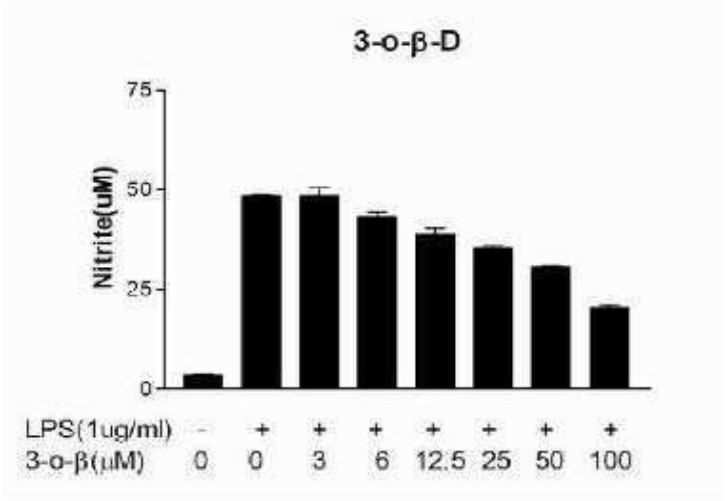
도면1



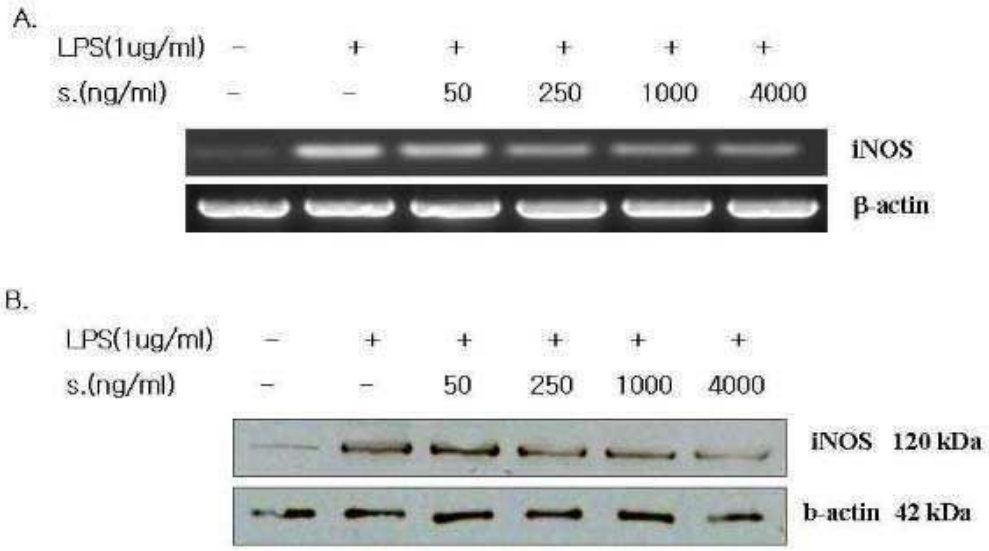
도면2


^{1}H-NMR
^{13}C-NMR
DEPT

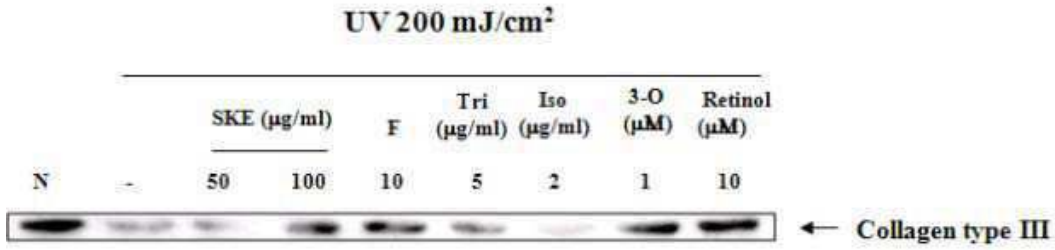
도면3


3-o-β-D
Nitrite(uM)
75
50
25
0
LPS(1ug/ml) - + + + + + + +
3-o-β(μM) 0 0 3 6 12.5 25 50 100

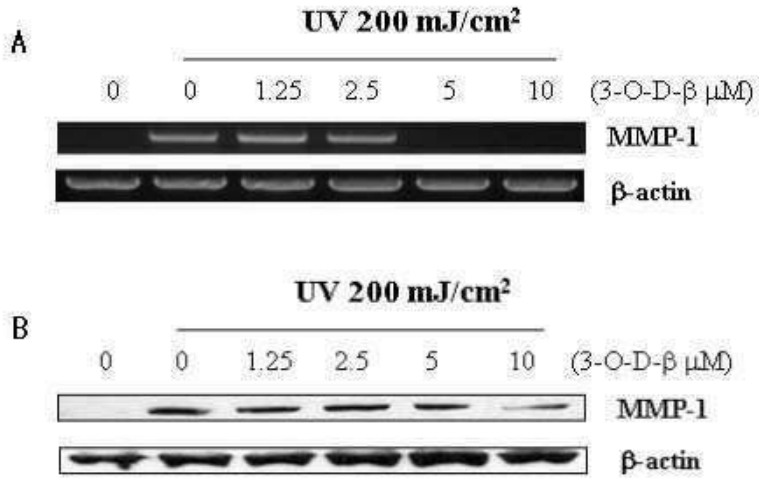
도면4


A.
LPS(1ug/ml) - + + + + +
s.(ng/ml) - - 50 250 1000 4000
iNOS
β-actin
B.
LPS(1ug/ml) - + + + + +
s.(ng/ml) - - 50 250 1000 4000
iNOS 120 kDa
b-actin 42 kDa

도면5


UV 200 mJ/cm²
SKE (μg/ml)
F
Tri (μg/ml)
Iso (μg/ml)
3-O (μM)
Retinol (μM)
N - 50 100 10 5 2 1 10
Collagen type III

도면6


A
UV 200 mJ/cm²
0 0 1.25 2.5 5 10 (3-O-D-β μM)
MMP-1
β-actin
B
UV 200 mJ/cm²
0 0 1.25 2.5 5 10 (3-O-D-β μM)
MMP-1
β-actin

도면7

