



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0042164
(43) 공개일자 2011년04월25일

(51) Int. Cl.

A23L 1/29 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 36/9068 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0034142(분할)

(22) 출원일자 2011년04월13일

심사청구일자 2011년04월13일

(62) 원출원 특허 10-2009-0052025

원출원일자 2009년06월11일

심사청구일자 2009년06월11일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이광원

경기도 성남시 분당구 이매동 이매촌삼환아파트
1104동 1901호

홍충의

부산광역시 중구 영주2동 239-50번지 1/3

(74) 대리인

구현서

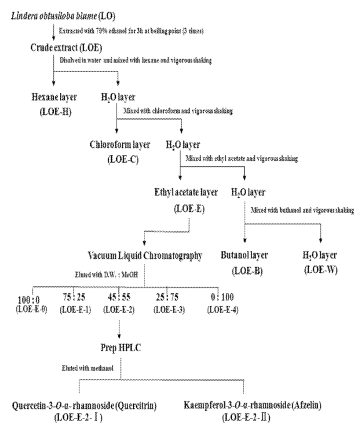
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 생강나무로부터 퀘세틴-3-O-알파-람노사이드 및 캄페롤-3-O-알파-람노사이드의 분리 방법 및 그것의
향산화 또는 간 보호 용도

(57) 요약

본 발명은 생강나무로부터 퀘세틴-3-O-알파-람노사이드 및 캄페롤-3-O-알파-람노사이드의 분리 방법 및 그것의
향산화 및 간 보호 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 106019-03-SB010

부처명 농림기술관리센터

연구관리전문기관 생명자원연구소

연구사업명 농림수산특정연구개발사업

연구과제명 자생 생강나무를 이용한 웰빙 기능성 신소재 및 식품개발

기여율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008.04.25 ~ 2009.04.24

특허청구의 범위

청구항 1

퀴세틴-3-O- α -람노사이드를 유효성분으로 함유하는 간 보호용 기능성 식품 조성물.

청구항 2

캠페롤-3-O- α -람노사이드를 유효성분으로 함유하는 간 보호용 기능성 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 생강나무로부터 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드 및 캠페롤-3-O-알파-람노사이드의 분리 방법 및 그것의 항산화 및 간 보호 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로 산화스트레스(oxidative stress)란 살아 있는 세포에서 항산화 방어기전 (antioxidant defense mechanism)에 대하여 산화 기전이 우세하여 세포 단백질, 지질, 핵산의 산화 손상을 일으키는 상태라고 정의할 수 있다. 산화스트레스는 활성산소 (reactive oxygen species)에 의해 발생되며, 산소이온, 유리 라디칼, 과산화물 등을 말한다. 활성산소는 세포전달체계에서 생성되어 축적되며 이온화방사능 등에 의해서도 생성된다. 인체에서는 산화스트레스가 흡연, 고혈압, 죽상경화증, 고지혈증, 당뇨병, 허혈-재관류, 암, 류마치스성 관절염, 베체트 질환, 신경손상성 질환 등에서 중요한 발병기전으로 추정되고 있을 뿐만 아니라 노화 과정서도 주요한 인자로 보고 있다(김정호, 산화스트레스의 진단, 2008, 13~15, 대한임상노인학회 춘계학술대회).

[0003] 활성산소에 대한 항산화물질의 작용기전을 보면 크게 다음의 3가지로 나눌 수 있다. 즉 예방적인 측면, 활성산소를 제거하는 측면 그리고 조직회복 및 신생에 관여하는 기능으로 분류할 수 있다. 이 중 식물유래 항산화 물질의 작용기전은 주로 활성산소를 제거하는 항산화 물질로서의 기능을 담당한다. 즉 반응성이 크고 유해한 활성산소와 같은 유리기와 먼저 반응하여 자기 자신은 안정성이 있는 유리기로 되어 다른 중요한 화합물이 유리기가 되는 연쇄반응을 막아준다. 생체 내에서는 예방적 항산화물질의 예를 들면 SOD와 같은 효소작용에 의해 활성산소와의 반응은 어느 정도 억제되지만, 여전히 생체 내에서는 소량의 활성산소가 생성되며 외부에서도 활성산소(대기오염, 담배연기 등)가 체내로 들어오기도 한다. 식물에서의 항산화 기능을 갖는 물질의 분류는 비타민 E, 카로티노이드(carotenoids), 비타민 C 등이 있다.

[0004] 이런 항산화와 관련하여 현재까지 생강나무의 항산화 기능은 아직 밝혀져 있지 않으며, 특히 퀴세틴-3-O- α -람노사이드 및 캠페롤-3-O- α -람노사이드의 항산화 기능에 대해서도 전무한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 발명의 목적은 천연식물인 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)로부터 퀴세틴-3-O- α -람노사이드 및 캠페롤-3-O- α -람노사이드의 추출·분리·정제 방법을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)로부터 분리된 퀴세틴-3-O- α -람노사이드 및 캠페롤-3-O- α -람노사이드의 항산화 효과를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)로부터 분리된 퀴세틴-3-O- α -람노사이드 및 캠페롤-3-O- α -람노사이드의 간 보호 효과를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a) 생강나무 (*Lindera obtusiloba* Blume)로부터 물 또는 알코올을 이용하여 조추출물을 제조하는 단계; b) 상기 조추출물을 핵산을 처리하여 수층을 얻는 단계; 및 c)상기 얻어진

수층에 에틸아세테이트를 처리하여 에틸아세테이트 층을 얻는 단계를 포함하는 퀘세틴-3-O- α -람노사이드 또는 캠페롤-3-O- α -람노사이드 추출·분리방법을 제공한다.

- [0009] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 c)단계 후 크로마토그래피 정제과정을 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0010] 또한 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 알콜은 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택된 알콜이 바람직하고, 메탄올 또는 에탄올인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0011] 또한 본 발명은 퀘세틴-3-O- α -람노사이드를 유효성분으로 함유하는 향산화 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 캠페롤-3-O- α -람노사이드를 유효성분으로 함유하는 향산화 조성물을 제공한다.
- [0013] 또 본 발명은 퀘세틴-3-O- α -람노사이드를 유효성분으로 함유하는 간 보호 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 캠페롤-3-O- α -람노사이드를 유효성분으로 함유하는 간 보호 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 향산화 효과로서의 피로, 만성질환이나 성인성질환 같이 산화스트레스로 유발 될 수 있는 고혈압, 죽상경화증, 고지혈증, 당뇨병, 허혈-재관류, 암, 류마치스성 관절염, Behcet 질환, 신경손상성 질환, 폐암 등의 예방 개선효과를 가진다.
- [0016] 본 발명의 화합물을 의약으로서 사용하는 경우, 통상, 본 발명의 화합물과 적당한 첨가제를 혼화하여 제제화한 것을 사용한다.
- [0017] 상기 첨가제로서는 일반적으로 의약에 사용되는 부형제, 결합제, 활택제, 붕괴제, 착색제, 교미 교취제, 유화제, 계면 활성제, 용해 보조제, 현탁화제, 등장화제, 완충제, 방부제, 향산화제, 안정화제, 흡수 촉진제 등을 들 수 있고, 소망에 따라 이들을 적절하게 조합하여 사용할 수도 있다.
- [0018] 상기 부형제로서는 예컨대 젓당, 백당, 포도당, 콘스타치, 만니톨, 소르비톨, 전분, α 화 전분, 텍스트린, 결정 셀룰로오스, 경질 무수 규산, 규산알루미늄, 규산칼슘, 메타규산알루미늄산마그네슘, 인산수소칼슘 등을 들 수 있고,
- [0019] 상기 결합제로서는 예컨대 폴리비닐알코올, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 아라비아 고무, 트래거캔스, 젤라틴, 셀락, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 폴리비닐피롤리돈, 매크로골 등을 들 수 있으며,
- [0020] 상기 활택제로서는 예컨대 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 푸마르산스테아릴나트륨, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 콜로이드실리카 등을 들 수 있고,
- [0021] 상기 붕괴제로서는 예컨대 결정 셀룰로오스, 한천, 젤라틴, 탄산칼슘, 탄산수소나트륨, 시트르산칼슘, 텍스트린, 펙틴, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 크로스카멜로오스나트륨, 카르복시메틸스타치, 카르복시메틸스타치나트륨 등을 들 수 있다.
- [0022] 상기 착색제로서는 예컨대 삼이산화철, 황색 삼이산화철, 카르민, 카라멜, β -카로틴, 산화티탄, 탈크, 인산리보플라빈나트륨, 황색 알루미늄레이크 등, 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것을 들 수 있고,
- [0023] 상기 교미 교취제로서는 코코아 분말, 박하뇌, 방향산, 박하유, 용뇌, 계피분말 등을 들 수 있으며,
- [0024] 상기 유화제 또는 계면 활성제로서는 예컨대 스테아릴트리에탄올아민, 라우릴황산나트륨, 라우릴아미노프로피온산, 레시틴, 모노스테아르산글리세린, 자당 지방산 에스테르, 글리세린 지방산 에스테르 등을 들 수 있고,
- [0025] 상기 용해 보조제로서는 예컨대 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 벤조산벤질, 에탄올, 콜레스테롤, 트리에탄올아민, 탄산나트륨, 시트르산나트륨, 폴리솔베이트 80, 니코틴산아미드 등을 들 수 있으며,
- [0026] 상기 현탁화제로서는 상기 계면 활성제 이외에 예컨대 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등의 친수성 고분자들을 들 수 있고,
- [0027] 상기 등장화제로서는 예컨대 포도당, 염화나트륨, 만니톨, 소르비톨 등을 들 수 있으며,
- [0028] 상기 완충제로서는 예컨대 인산염, 아세트산염, 탄산염, 시트르산염 등의 완충액을 들 수 있고,
- [0029] *상기 방부제로서는 예컨대 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로로부탄올, 벤질알코올, 페네틸알코올, 디히드로아세

트산, 소르브산 등을 들 수 있으며,

- [0030] 상기 항산화제로서는 예컨대 아황산염, 아스코르빈산, α -토코페롤 등을 들 수 있다.
- [0031] 상기 안정화제로서는 일반적으로 의약에 사용되는 것을 들 수 있다.
- [0032] 상기 흡수 촉진제로서는 일반적으로 의약에 사용되는 것을 들 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 제제로서는 예컨대 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 시럽제, 트로치제, 흡입제와 같은 경구제; 예컨대 좌제, 연고제, 안연고제, 테이프제, 점안제, 점비제, 점이제, 파프제, 로션제와 같은 외용제 또는 주사제를 들 수 있다.
- [0034] 상기 경구제는 상기 첨가제를 적절하게 조합하여 제제화한다. 또한, 필요에 따라 이들 표면을 코팅하여도 좋다.
- [0035] 상기 외용제는 상기 첨가제 중 특히 부형제, 결합제, 교미 교취제, 유화제, 계면 활성제, 용해 보조제, 현탁화제, 등장화제, 방부제, 항산화제, 안정화제 또는 흡수 촉진제를 적절하게 조합하여 제제화한다.
- [0036] 상기 주사제는 상기 첨가제 중 특히 유화제, 계면 활성제, 용해 보조제, 현탁화제, 등장화제, 완충제, 방부제, 항산화제, 안정화제 또는 흡수 촉진제를 적절하게 조합하여 제제화한다.
- [0037] 본 발명에 따른 화합물을 의약으로서 사용하는 경우, 그 사용량은 증상이나 연령에 따라 다르지만, 통상, 경구제의 경우에는, 0.1 mg 내지 10 g(바람직하게는 1 mg 내지 2 g), 외용제의 경우에는 0.01 mg 내지 10 g(바람직하게는 0.1 mg 내지 2 g), 주사제의 경우에는, 0.01 mg 내지 10 g(바람직하게는 0.1 mg 내지 2 g)를 1일 1회 투여 또는 2 내지 4회로 나누어 사용한다.
- [0038] 본 발명은 간질환의 예방 및 개선효과를 갖는 상기한 본 발명의 화합물을 유효성분으로 함유하는 간질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0039] 또한, 간질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제, 액제등의 형태를 포함한다.
- [0041] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0042] 상기 외에 본 발명의 화합물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 화합물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 화합물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0043] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0044] 본 발명은 천연식물인 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)로부터 항산화 및 간 보호 기능이 있는 추출분리정제 분획물, 퀘세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린) 및 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)의 추출분리정제방법과 추출분리정제 분획물, 퀘세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린) 및 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)의 항산화 기능과 간보호 기능이 있음을 증거로 제공하여 항산화 기능 및 간 보호 기능 추출분리정제 분획물과 단일물질로 등재하고자 함. 또한 식품 소재, 건강기능식품 및 의약품의 소재로 활용함에 있다.
- [0045] 본 발명에 사용된 천연식물인 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 알콜 추출물(LOE)이 항산화 효과가 있는지를

화합물 LOE-E-2-I 은 황색 분말로 FeCl_3 시액과 Mg-HCl 반응에 양성이며, MeOH 용액의 UV spectrum에서 351, 257 nm의 흡수대가 나타나 flavonol 유도체로 추정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 H-6'의 signal이 δ_{H} 7.41 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz)에서 관찰되었고, δ_{H} 7.01 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)은 H-6'과 *ortho* coupling을 이루고 있는 H-5'로 확인하였다. 또한 H-2'는 δ_{H} 7.52에서 $J = 2.0$ Hz인 doublet으로 추정되어 H-6' 와 *meta* coupling하고 있음을 알 수 있었고, δ_{H} 6.48과 6.28에서 flavonoid A환의 H-6 및 H-8의 전형적인 *meta* coupling이 관찰되었으며, 이상의 분광학적 데이터로 aglycone은 quercetin으로 추정할 수 있었다. 또한, δ_{H} 5.54에서 anomeric proton과 δ_{H} 0.93 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)의 signal은 rhamnose에 기인하는 signal로 확인하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 21 개의 signal을 확인하였으며, ESI-MS spectrum에서는 m/z 447 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 에서 molecular ion peak를 관찰할 수 있었다. 이상의 기기분석 결과 및 문헌과의 비교로 화합물 LOE-E-2-I 은 quercetin C-3의 hydroxy에 rhamnose가 결합되어 있는 quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside (quercitrin)로 동정하였다.

생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)로 부터 얻은 LOE-E-2-I와 LOE-E-2-II획분의 항산화 및 간 보호 기능 물질인 퀘세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린) 및 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)의 항산화 측정 결과(표 1) 두 물질 모두 높은 항산화 활성을 보였으며, 그 중 퀘세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린)가 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)보다 2배 정도 더 높은 항산화 기능을 나타내었다.

표 1

	FRAP (mole FeSO ₄ /mg DM)	DPPH-SC ₅₀ (ug DM/ml) ^a
Quercitrin	1.70 ± 0.10	60.38 ± 2.46
Afzelin	0.73 ± 0.03	162.03 ± 7.10

Each value is mean ± standard deviation of three replicate experiments

DM, dry matter.

^aAmount of sample necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50%.

[0050]

[0051]

표 1은 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)에서 높은 항산화 및 간 보호 기능성을 따라 추출·분리·정제한 단일물질인 퀼시트린(quercitrin)과 아프젤린(afzelin) 유도체의 항산화 효과 측정 결과로써 DPPH radical 소거능과 FRAP을 측정한 결과이다. 두 결과에서 퀼시트린(quercitrin)이 아프젤린(afzelin)유도체 보다 2배 정도 더 높은 항산화 활성을 가지고 있다.

표 2

Apparatus	: Varian Pro Star (model 210)
Detector	: Varian Pro Star (model 335)
Column	: YMC, S'phere ODS-H 80, 250×20mm I.D.
Mobile phase	: 23% acetonitrile(isocratic elution)
Flow rate	: 8.0 mL/min
Injection volume	: 500 µL

[0052]

[0053]

표 2는 LOE-E-2 획분을 Prep HPLC에 걸어 생강나무에서 가장 높은 항산화 및 간 보호 활성을 나타내는 단일물질인 LOE-E-2- I (퀴시트린, quercitrin)과 LOE-E-2- II(아프젤린, afzelin)를 얻기 위한 Prep HPLC 정제 조건을 보여준다.

표 3

Apparatus	: Varian Pro Star (model 210)
Detector	: Varian Pro Star (model 335)
Column	: Waters Spherisorb® 5um ODS2 (4.6×250mm, Analytical column)
Mobile phase	: 20% → 100% MeOH (linear gradient elution)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Injection volume	: 10 µL

[0054]

[0055]

표 3은 LOE-E-2 획분을 Prep HPLC에 걸어 얻은 LOE-E-2- I (퀴시트린, quercitrin)과 LOE-E-2- II(아프젤린 유도체)획분에 대하여 단일물질임을 보여주는 HPLC 분석을 위한 HPLC 분석 조건을 보여준다.

[0056]

위 결과를 토대로 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)에서 추출·분리·정제 분획물 및 단일물질인 퀼세틴-3-O-α-람노사이드(퀴시트린)와 캄페롤-3-O-α-람노사이드(아프젤린 유도체)가 높은 항산화 및 간 보호 기능을 보

임을 확인 할 수 있으며, 이 결과로 추출·분리·정제 분획물 및 단일물질인 퀘세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린)와 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)를 이용하여 피로, 만성질환이나 성인 성질환 같이 산화스트레스로 유발 될 수 있는 고혈압, 죽상경화증, 고지혈증, 당뇨병, 허혈-재관류, 암, 류마치스성 관절염, Behcet 질환, 신경손상성 질환, 또는 폐암 등과 간 질환의 예방 / 치료 효과를 높임으로써 식품소재, 건강기능 식품 소재, 의약품으로도 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0057]

이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명은 천연식물인 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)에서 추출·분리·정제 한 분획물 및 퀘세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린)와 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)를 단일물질로 추출·분리·정제 하여 얻었고, 본 발명의 추출·분리·정제 분획물 및 퀘세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린)와 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)는 무독성의 천연식물소재에서 얻음으로서 종래의 의약품보다 부작용과 독성이 없고 안전성이 보장되었다. 또한 항산화 및 간 보호 기능물질로 활용될 수 있기에 피로, 만성질환이나 성인성질환 같이 산화스트레스로 유발 될 수 있는 간 보호, 고혈압, 죽상경화증, 고지혈증, 당뇨병, 허혈-재관류, 암, 류마치스성 관절염, Behcet 질환, 신경손상성 질환, 또는 폐암 등과 간 질환의 예방 / 치료 효과를 높임으로써 식품소재, 건강기능 식품 소재, 의약품으로도 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058]

도 1은 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 70% 에탄올 추출물(LOE)에서 간세포유래 셀인 HepG2 cell에 t-BHP(*tert*-butyl hydroperoxide)로 산화적 손상을 유발 한 후, 산화적 손상을 막아주는 항산화 및 간 보호 효과가 있는 추출물(LOE), 분리정제 획분(LOE-E, LOE-E-2)과 단일물질인 퀘시트린(*quercitrin*)과 아프젤린(*afzelin*) 유도체의 추출·분리·정제 과정을 보여주는 모식도이다.

도 2는 간세포유래 셀인 HepG2 cell에 t-BHP(*tert*-butyl hydroperoxide)로 산화적 손상을 유발 한 후, 이 산화적 손상을 막아줄거라 생각하는 항산화 및 간 보호 효과가 있는 생강나무 70% 에탄올 추출물(LOE)과 극성별 유기용매 분리획분(LOE-H, LOE-C, LOE-E, LOE-B, LOE-W)들의 항산화 및 간 보호 효과를 MTT 분석(*cell viability*, 셀 생존율)을 통하여 본 실험 결과이다. 결과는 t-BHP 단독으로 처리한 세포와 비교한 평균 $\pm$ 표준편차($n=3$)로 나타내었다. ** $P < 0.01$.

생강나무 70% 에탄올 추출물이 항산화 및 간 보호 효과가 있음을 확인 하였으며, 이 물질로 부터 출발한 극성별 유기용매 분리 획분들 역시 모두 항산화 및 간 보호 효과가 있는 것을 확인 하였다. 그러나 그 중 에틸아세테이트 분리 획분인 LOE-E가 극성별 유기용매 분리 획분 중에서 항산화 및 간 보호 활성이 가장 높음을 알 수 있다. 비교는 산화적 손상만을 준 t-BHP 그룹과 비교하여 이 그룹보다 셀 생존율이 높음을 기준으로 항산화 및 간 보호 효과가 있음을 확인하였다. 이는 항산화 및 간 보호 효과가 있는 물질이 들어가면 t-BHP에 의해 발생하는 산화적 손상을 막아 주므로 상대적으로 산화적 손상을 받은 그룹에 비하여 더 많은 셀 생존율을 나타내기 때문이다.

도 3은 간세포유래 셀인 HepG2 cell에 t-BHP(*tert*-butyl hydroperoxide)로 산화적 손상을 유발 한 후, 앞선 Fig. 1에서 항산화 및 간 보호 효과가 입증된 LOE-E를 다시 컬럼정제법을 통하여 얻은 5개의 정제 획분들(LOE-E-0, LOE-E-1, LOE-E-2, LOE-E-3, LOE-E-4)의 항산화 및 간 보호 효과를 MTT 분석(*cell viability*, 셀 생존율)을 통하여 본 실험 결과이다. 정제획분들 역시 모두 항산화 및 간 보호 효과가 있는 것을 확인 하였다. 그러나 그 중 LOE-E-2가 항산화 및 간 보호 활성이 가장 높음을 알 수 있다.

비교는 산화적 손상만을 준 t-BHP 그룹과 비교하여 이 그룹보다 셀 생존율이 높음을 기준으로 항산화 및 간 보호 효과가 있음을 확인하였다. 이는 항산화 및 간 보호 효과가 있는 물질이 들어가면 t-BHP에 의해 발생하는 산화적 손상을 막아 주므로 상대적으로 산화적 손상을 받은 그룹에 비하여 더 많은 셀 생존율을 나타내기 때문이다. 결과는 t-BHP 단독으로 처리한 세포와 비교한 평균 $\pm$ 표준편차($n=3$)로 나타내었다. ** $P < 0.01$.

도 4는 LOE-E-2 획분을 Prep HPLC에 걸어 얻은 LOE-E-2-I(퀴시트린, *quercitrin*, 4a)과 LOE-E-2-II(아프젤린 유도체, 4b)획분에 대하여 HPLC 분석을 하여 단일 피크를 얻음으로써 단일물질임을 확인해주는 chromatogram을 보여준다.

도 5는 LOE-E-2-I(퀴시트린, *quercitrin*) 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 1D NMR의 ^1H -NMR 스펙

트럼의 결과를 보여준다.

도 6은 LOE-E-2-I (퀴시트린, quercitrin) 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 1D NMR의 ^{13}C -NMR 스펙트럼의 결과를 보여준다.

도 7은 LOE-E-2-II (아프젤린 유도체, afzelin) 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 1D NMR의 ^1H -NMR 스펙트럼의 결과를 보여준다.

도 8은 LOE-E-2-II (아프젤린 유도체, afzelin) 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 1D NMR의 ^{13}C -NMR 스펙트럼의 결과를 보여준다.

도 9는 LOE-E-2-I (퀴시트린, quercitrin, A)과 LOE-E-2-II (아프젤린 유도체, B) 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 1D NMR과 2D NMR의 결과를 종합하여 도출된 단일천연물질인 퀴시트린(LOE-E-2-I, quercitrin)과 아프젤린 유도체(LOE-E-2-II, afzelin)의 화학구조를 보여준다.

도 10은 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 100% 메탄올 추출물(LOE)에서 단일물질인 퀴시트린(quercitrin)과 아프젤린 유도체의 추출·분리·정제 과정을 보여주는 모식도이다.

도 11은 생강 추출물과 LOE의 배양된 간세포에서 *t*-BHP-유도된 산화적 스트레스에 대한 보호효과를 비교한 것이다. 세포는 30분 동안 여러 농도의 LOE 및 1.5 mM *t*-BHP를 처리하였다. 세포 생존률은 MTT 분석에 의하여 결정하였다. 결과는 *t*-BHP 단독으로 처리한 세포와 비교한 평균 $\pm$ 표준편차($n=3$)로 나타내었다. ** $P < 0.01$. LOE는 메탄올로 생강나무를 추출한 분획이고, 생강 추출물은 생강 분말을 메탄올로 추출한 분획이다.

도 12는 배양된 간세포에서 *t*-BHP-유도된 산화적 스트레스에 대한 LOE의 각 유기용매별 분획층의 보호 효과를 비교한 것이다. 세포는 30분 동안 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 각층과 1.5 mM *t*-BHP를 처리하였다. 세포 생존률은 MTT 분석에 의하여 결정하였다. 결과는 *t*-BHP 단독으로 처리한 세포와 비교한 평균 $\pm$ 표준편차($n=3$)로 나타내었다. ** $P < 0.01$. H, *n*-헥산 층; C, 클로로포름 층; E, EtOAc 층; B, *n*-부탄올 층; W, 수층.

도 13은 배양된 간세포에서 *t*-BHP-유도된 산화적 스트레스에 대한 LOE-E의 각 분획의 보호효과를 비교한 것이다. 세포는 30분 동안 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 각층과 1.5 mM *t*-BHP를 처리하였다. 결과는 *t*-BHP 단독으로 처리한 세포와 비교한 평균 $\pm$ 표준편차($n=3$)로 나타내었다. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

LOE-E-0, 100% EtOAc : 0% MeOH, LOE-E-10, 90% EtOAc : 10% MeOH, LOE-E-20, 80% EtOAc : 20% MeOH, LOE-E-30, 70% EtOAc : 30% MeOH, LOE-E-40, 60% EtOAc : 40% MeOH, LOE-E-50, 50% EtOAc : 50% MeOH, LOE-E-60, 40% EtOAc : 60% MeOH, LOE-E-70, 30% EtOAc : 70% MeOH, LOE-E-80, 20% EtOAc : 80% MeOH, LOE-E-90, 10% EtOAc : 90% MeOH, LOE-E-100, 0% EtOAc : 100% MeOH을 나타낸다.

도 14는 수퍼옥사이드 래디칼에 대한 소거 활성을 나타낸 그림.

수퍼옥사이드 래디칼은 NADH-페나진 메토설페이트 시스템에 의하여 생성되고, NBT의 환원에 의하여 분석되었다. 바는 평균 $\pm$ SD ($n=3$)를 나타낸다. 결과는 *t*-테스트(** $P < 0.01$)에 의하여 분석하였다.

도 15는 LOE-E-0의 실리카겔 컬럼으로부터 얻은 서브분획의 세파텍스 LH-20크로마토그램을 나타낸다.

컬럼(1.5 X 40 cm)을 50 % 메탄올로 1 ml/분으로 용출하고, 10 ml/튜브로 수집하였다.

도 16은 정제된 LOE-E-0-I 및 LOE-E-0-II의 HPLC 크로마토그램을 나타낸다.

HPLC를 Waters SymmetryPrep C18 (7 μm) 컬럼(7.8 X 30 cm)을 사용하여 수행되었다. 용출은 1 ml/분 속도로 물과 메탄올의 선형구배를 사용하였다. 그 용출액은 340 nm에서 모니터하였다.

두 개의 분획층(LOE-E-0-I, LOE-E-0-II)을 HPLC로 단일물질로 확인하였다.

LOE-E-0 획분을 Sephadex LH-20 레진 컬럼에 걸어 얻은 LOE-E-2-I (아프젤린 유도체, 16a)과 LOE-E-2-II (퀴시트린, quercitrin, 16b)획분에 대하여 HPLC 분석을 하여 단일 피크를 얻음으로써 단일물질임을 확인해주는 크로마토그램을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기

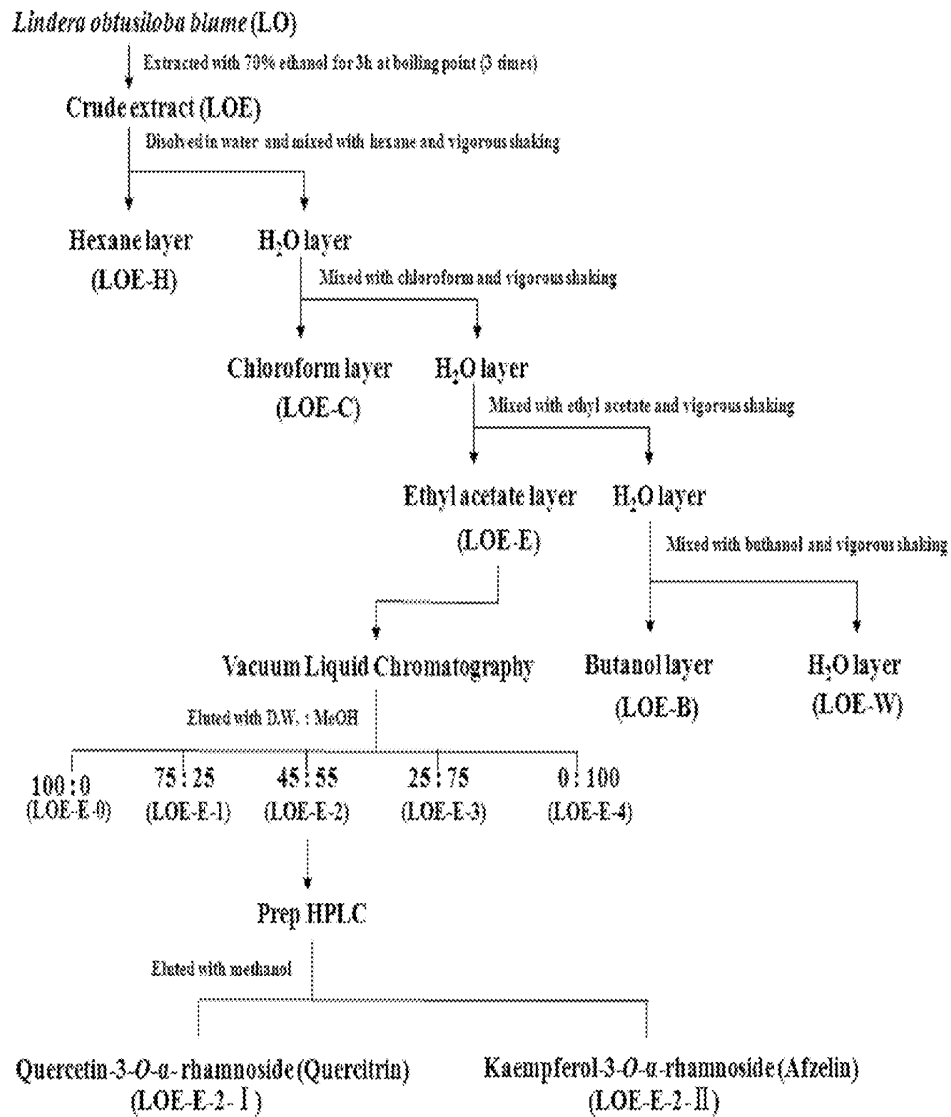
위한 목적으로 기재된 것으로, 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

- [0060] 실시예 1: 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)로부터 항산화 및 간 보호 기능물질의 추출·분리 및 정제-에탄올 용매 사용 (도 1 참고)
- [0061] 건조된 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 500g을 70% 에탄올 5 L를 이용하여 3시간 동안 환류냉각 추출하여 얻은 후 7,500 rpm, 30 min, 4℃에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 원심분리된 상등액에 남아 있을지 모르는 불용성 물질을 제거하기 위하여 재차 상등액을 whatman No. 42 여과하였다. 여과된 상등액을 감압증류한 다음 동결건조를 통하여 분말 형태의 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 70% 에탄올 추출물(LOE)을 얻었다. 이렇게 얻어진 LOE를 물에 녹인 뒤 순차적으로 유기용매의 극성도를 달리하며 hexane(LOE-H), chloroform(LOE-C), ethylacetate (LOE-E), butanol(LOE-B), water(LOE-W) 획분으로 극성에 따라 일차적 분리를 하였다. 항산화 및 간 보호 활성이 가장 높은 LOE-E를 연속적으로 vacuum liquid chromatography에 흡착 시킨 후 <D.W. : methanol> 혼합용출액의 농도를 달리하여 5개의 획분을 얻은 뒤, 역시 항산화 활성이 가장 높은 <50% D.W. : 50% methanol> 획분(LOE-E-2)을 재차 Prep HPLC를 이용하여 표 2(가변적인 조건, 용매의 종류와 유속, %함량은 바뀔 수 있음)의 조건으로 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)의 항산화 및 간 보호 기능물질인 퀴세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린)와 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)를 분리하였다. 용출된 항산화 기능물질을 Table 3의 조건으로 순도를 확인하였다.
- [0062] 실시예 2: 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)로부터 항산화 및 간 보호기능물질의 추출·분리 및 정제-메탄올 용매 사용 (도 10 참고)
- [0063] 건조된 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 500g을 100% 메탄올 5 L를 이용하여 3시간 동안 환류냉각 추출하여 얻은 후 7,500 rpm, 30 min, 4℃에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 원심분리된 상등액에 남아 있을지 모르는 불용성 물질을 제거하기 위하여 재차 상등액을 whatman No. 42 여과하였다. 여과된 상등액을 감압증류한 다음 동결건조를 통하여 분말 형태의 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 100% 메탄올 추출물(LOE)을 얻었다. 이렇게 얻어진 LOE를 물에 녹인 뒤 순차적으로 유기용매의 극성도를 달리하며 hexane(LOE-H), chloroform(LOE-C), ethylacetate (LOE-E), butanol(LOE-B), water(LOE-W) 획분으로 극성에 따라 일차적 분리를 하였다. 항산화 활성이 가장 높은 LOE-E를 연속적으로 silica gel column chromatography에 흡착 시킨 후 <ethyl acetate : methanol> 혼합용출액의 농도를 달리하여 11개의 획분을 얻은 뒤, 역시 항산화 및 간 보호 활성이 가장 높은 <100% ethyl acetate. : 0% methanol> 획분(LOE-E-0)을 재차 Sephadex LH-20 resin를 이용한 column 정제를(용매는 methanol과 D.W.를 사용)하여 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)의 항산화 기능물질인 퀴세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린, LOE-E-0-II)와 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체, LOE-E-0-I)를 분리하였다.
- [0064] 실험예 1: 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 에탄올 추출·분리·정제 단계에서의 각 획분, 퀴세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린)와 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)의 항산화 및 간 보호기능 (표 1, 도 2, 및 3 참고)
- [0065] 간세포 유래 셀인 HepG2 cell에 *t*-BHP(*tert*-butyl hydroperoxide)로 산화적 손상을 유발 한 후, 산화적 손상을 막아줄거라 생각하는 항산화 및 간 보호 효과가 있는 생강나무 70% 에탄올 추출물(LOE)과 극성별 유기용매 분리 획분(LOE-H, LOE-C, LOE-E, LOE-B, LOE-W)들의 항산화 및 간 보호 효과를 MTT 분석(cell viability, 셀 생존율)을 통하여 확인하였다. 생강나무 70% 에탄올 추출물(LOE)이 항산화 및 간 보호 효과가 있음을 확인하였으며, 이 물질로부터 출발하여 극성별 유기용매 분리한 획분들 역시 모두 항산화 및 간 보호 효과가 있는 것을 확인 하였다. 그러나 그 중 에틸아세테이트 획분인 LOE-E가 유기용매별 분리 획분 중에서 항산화 및 간 보호 활성이 가장 높음을 알 수 있다. 항산화 및 간 보호 효과가 입증된 LOE-E를 다시 컬럼정제법을 통하여 얻은 5개의 정제획분들(LOE-E-0, LOE-E-1, LOE-E-2, LOE-E-3, LOE-E-4)의 항산화 및 간 보호 효과를 MTT 분석을 통하여 측정한 결과 정제획분들 역시 모두 항산화 및 간 보호 효과가 있는 것을 확인 하였다. 그러나 그 중 LOE-E-2가 항산화 및 간 보호 활성이 가장 높음을 알 수 있다. 그리고 이 LOE-E-2 획분에서 Prep HPLC를 통하여 얻은 두 개의 단일물질인 퀴세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린, LOE-E-2-I)와 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체, LOE-E-2-II)를 항산화 측정방법의 하나인 FRAP assay와 DPPH-radical scavenging activity로 측정한 결과 두 물질 모두 항산화 및 간 보호 활성이 높음을 확인 하였다.
- [0066] 실험예 2: 퀴세틴-3-O- α -람노사이드(퀴시트린)와 캠페롤-3-O- α -람노사이드(아프젤린 유도체)의 단일물질 확인과 구조 동정 (표 3, 도 4~9 참고)

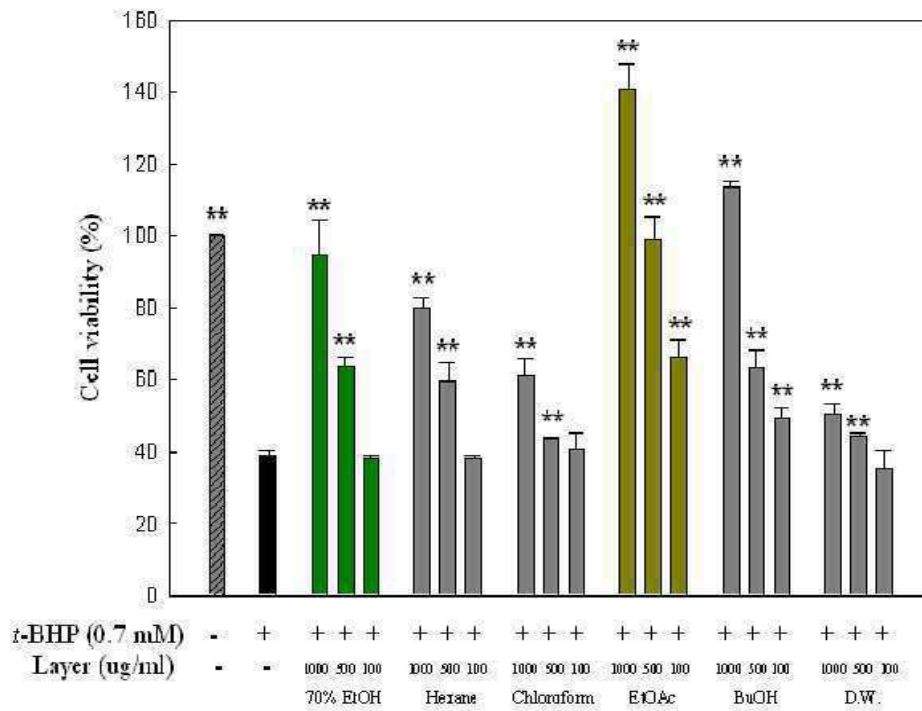
- [0067] 실시예1에서 실시한 추출·분리·정제 방법을 통하여 얻은 두 획분(LOE-E-2- I 과 LOE-E-2- II)을 우선 HPLC 분석을 통하여 단일물질임을 확인하였고, 이 물질이 정확히 어떤 물질인지를 알기위해 1D NMR의 ^1H 과 ^{13}C NMR의 spectrum 분석을 통하여 그것이 최종적으로 퀴세틴-3-*O*- α -람노사이드(퀴시트린)와 캠페롤-3-*O*- α -람노사이드(아프젤린 유도체)로 동정하였다.
- [0068] 실험예 3: 생강나무 메탄올 추출물과 생강 메탄올 추출물의 MTT assay를 통한 항산화 및 간보호 활성 비교
- [0069] Rat의 간세포(hepatocyte)를 primary culture 기술을 이용하여 분리하여 *t*-BHP(*tert*-butyl hydroperoxide)로 산화적 손상을 유발 한 후, 산화적 손상을 막아줄거라 생각하는 항산화 및 간 보호 효과가 있는 생강나무 100% 메탄올 추출물(LOE)과 비교군으로 생강 메탄올 추출물의 항산화 및 간 보호 효과를 MTT 분석(cell viability, 셀 생존율)을 통하여 확인하였다. 생강나무 100% 메탄올 추출물(LOE)이 항산화 및 간 보호 효과가 있음을 확인하였으며, 또한 이 생강나무 메탄올 추출물은 좋은 효과가 있다고 잘 알려진 생강보다 더 높은 항산화 및 간 보호 활성이 있음을 확인하였다.
- [0070] 실험예 4: 생강나무 메탄올 층에서 분획한 각각의 분획층에 대해서 MTT assay를 통한 항산화 및 간보호 활성
- [0071] Rat의 간세포(hepatocyte)를 primary culture 기술을 이용하여 분리하여 *t*-BHP(*tert*-butyl hydroperoxide)로 산화적 손상을 유발 한 후, 산화적 손상을 막아줄거라 생각하는 항산화 및 간 보호 효과가 있는 생강나무의 극성별 유기용매 분리획분(LOE-H, LOE-C, LOE-E, LOE-B, LOE-W)들의 항산화 및 간 보호 효과를 MTT 분석(cell viability, 셀 생존율)을 통하여 확인하였다. 모든 분획물에서 항산화 및 간 보호 효과가 있음을 확인하였으며, 그 중 에틸아세테이트 획분인 LOE-E가 유기용매별 분리 획분 중에서 항산화 및 간 보호 활성이 가장 높음을 알 수 있다.
- [0072] 항산화 및 간 보호 효과가 입증된 LOE-E를 다시 컬럼정제법을 통하여 얻은 11개의 정제획분들(LOE-E-0, LOE-E-1 ~ LOE-E-10)의 항산화 및 간 보호 효과를 MTT 분석을 통하여 측정한 결과 정제획분들 역시 모두 항산화 및 간 보호 효과가 있는 것을 확인 하였다. 그러나 그 중 LOE-E-0이 항산화 및 간 보호 활성이 가장 높음을 알 수 있다. 그래서 이 획분을 Sephadex LH-20 resin를 이용한 column 정제(용매는 methanol과 D.W.를 사용)를 하여 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)의 항산화 및 간 보호 기능물질인 퀴세틴-3-*O*- α -람노사이드(퀴시트린, LOE-E-0-II)와 캠페롤-3-*O*- α -람노사이드(아프젤린 유도체, LOE-E-0-I)를 분리하였다.
- [0073] 실험예 5: 생강나무 메탄올 층에서 분획한 에틸아세테이트 분획층(LOE-E)에 대해서 superoxide radical scavenging assay를 통한 항산화 및 간 보호 활성
- [0074] 항산화 실험의 하나인 superoxide radical 제거 효과를 본 결과로 항산화 물질로 잘 알려진 Vit E와 비교한 결과 Vit E보다 더 높은 superoxide radical 제거 효과가 있음을 확인하였다.
- [0075] Superoxide radical scavenging 분석은 산화로 인해 발생하는 superoxide radical을 NADH-phenazine methosulfate 시스템으로 발생하고 이에 시료를 처리하면 즉 항산화 활성이 있으면 superoxide radical을 소거하는 기능을 나타내는데 기존에 알려진 항산화 물질인 Vit E와 비교를 하였을 때 Vit E 보다 더 높은 superoxide radical 소거 기능을 보이는 것으로 보아 높은 항산화 활성이 알 수 있다.

도면

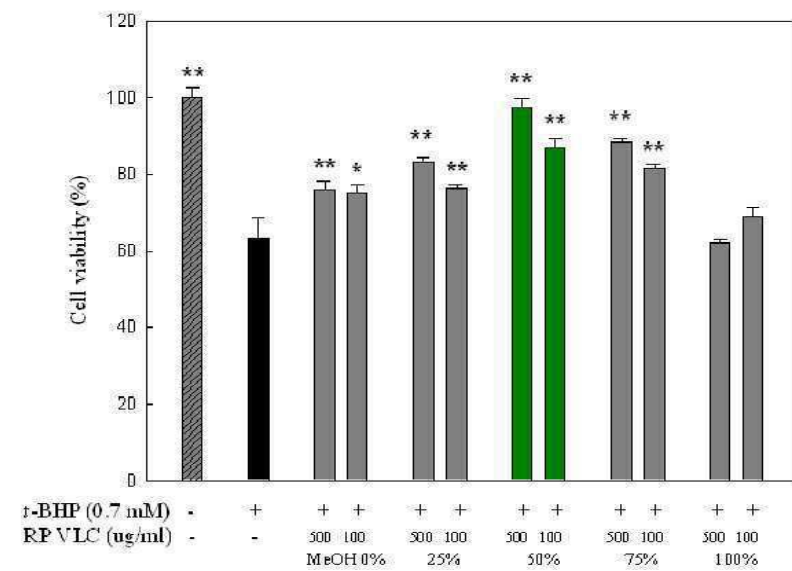
도면1



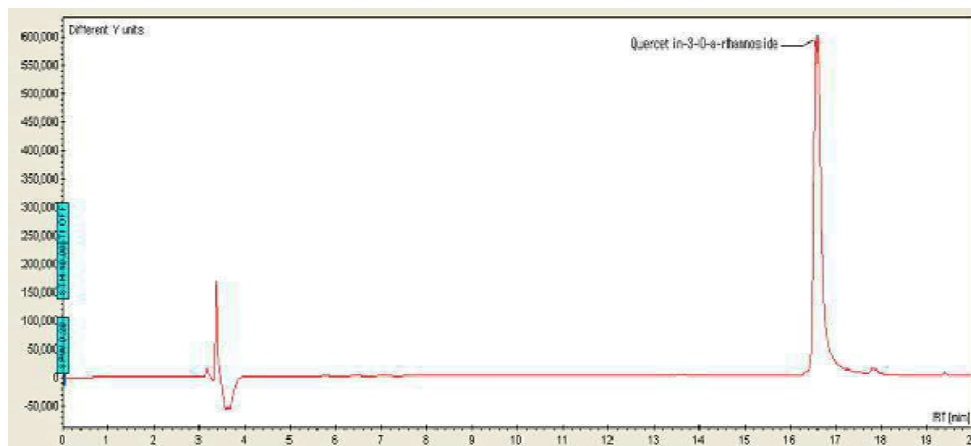
도면2



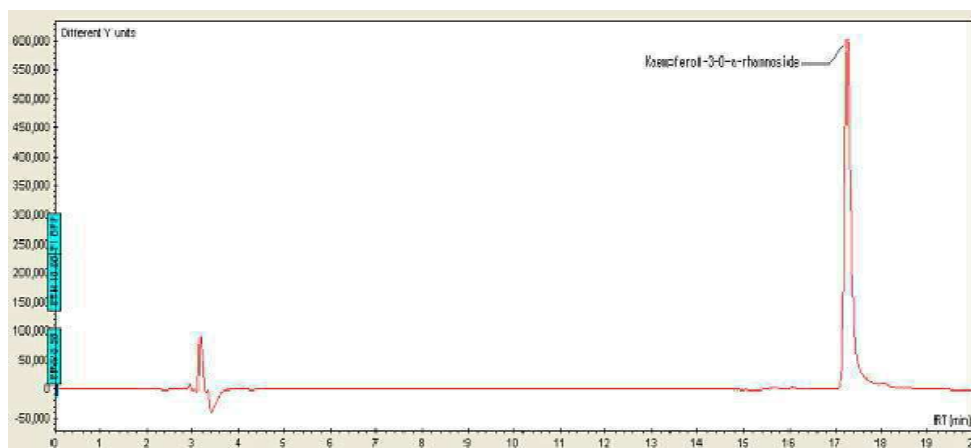
도면3



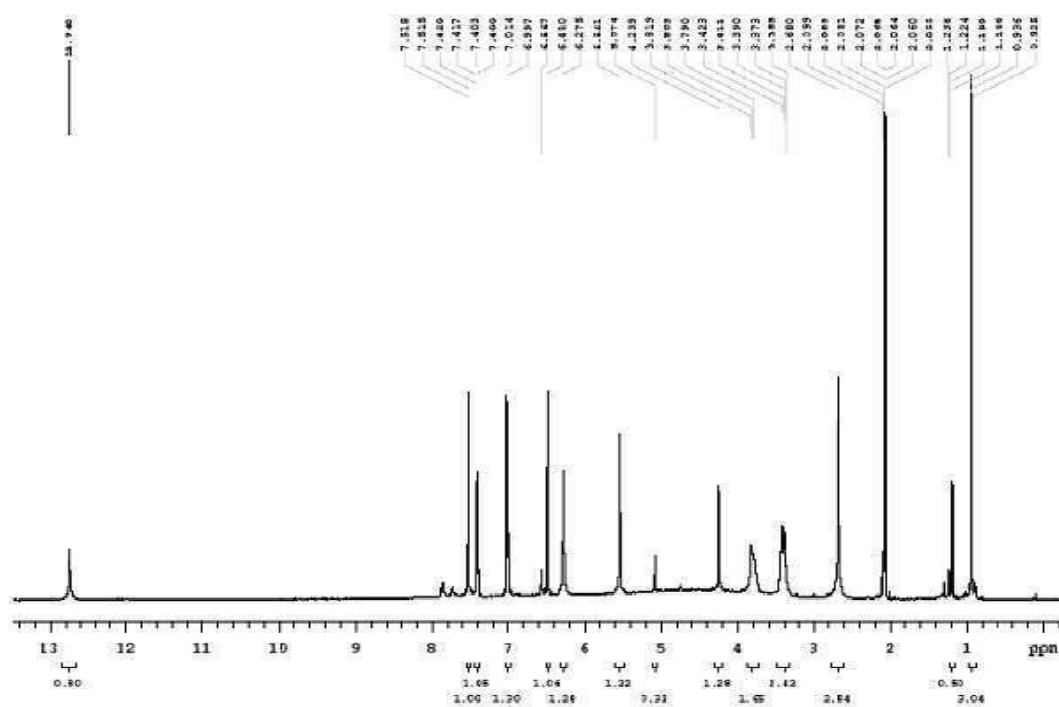
도면4a



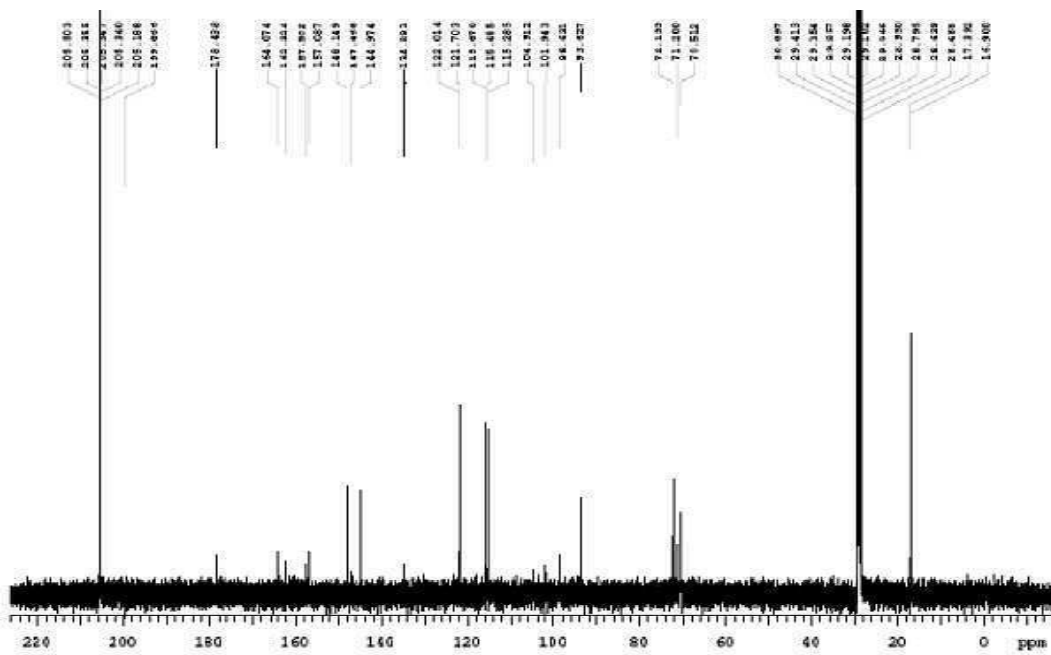
도면4b



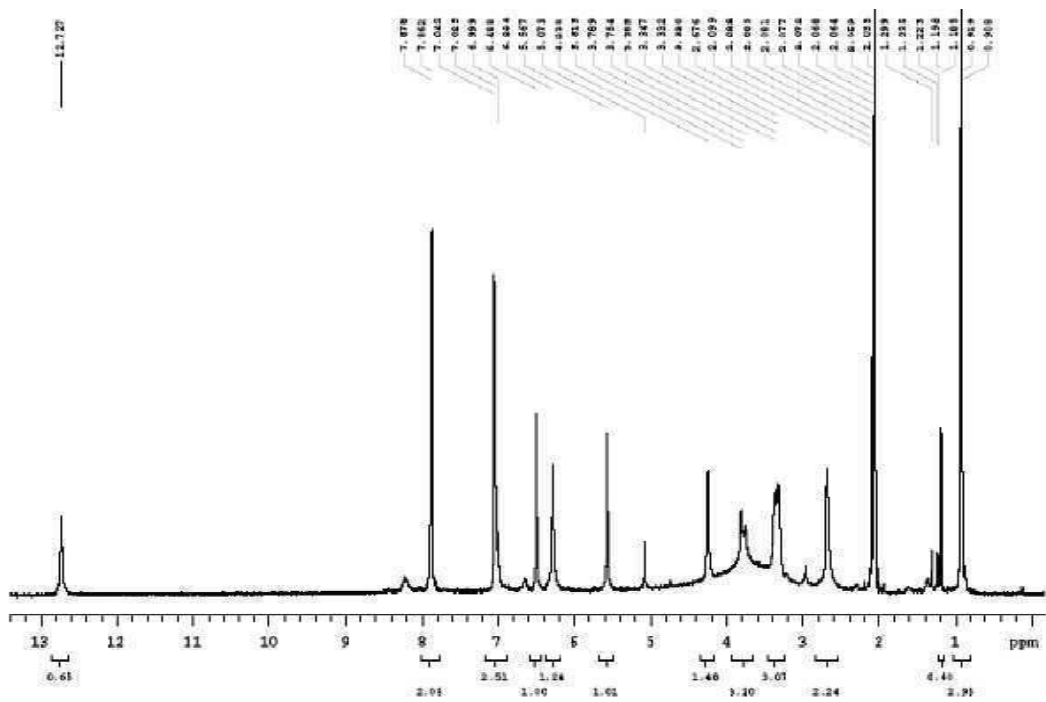
도면5



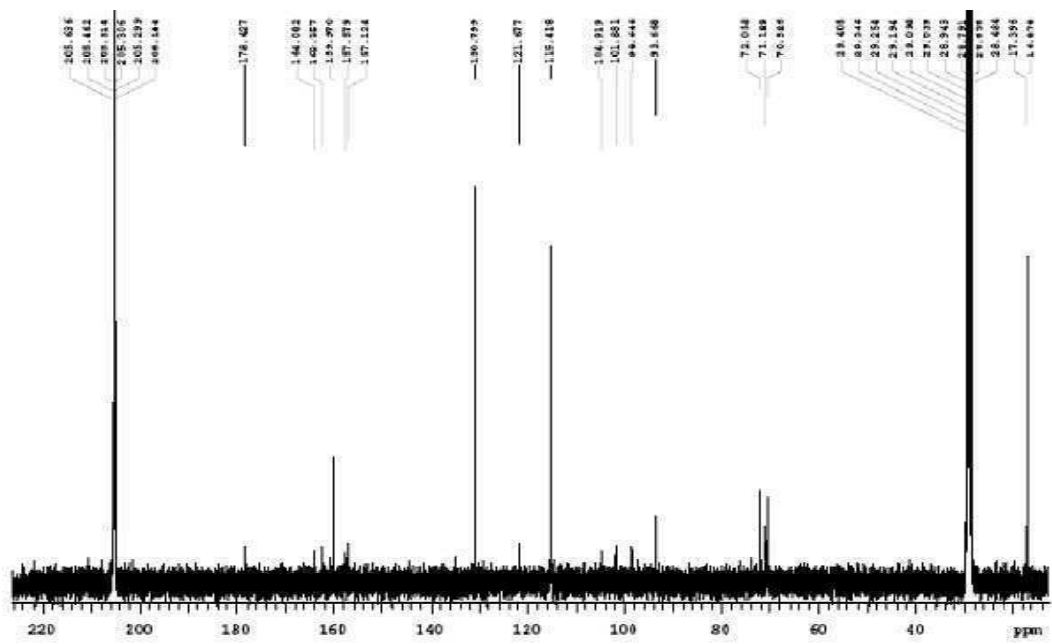
도면6



도면7

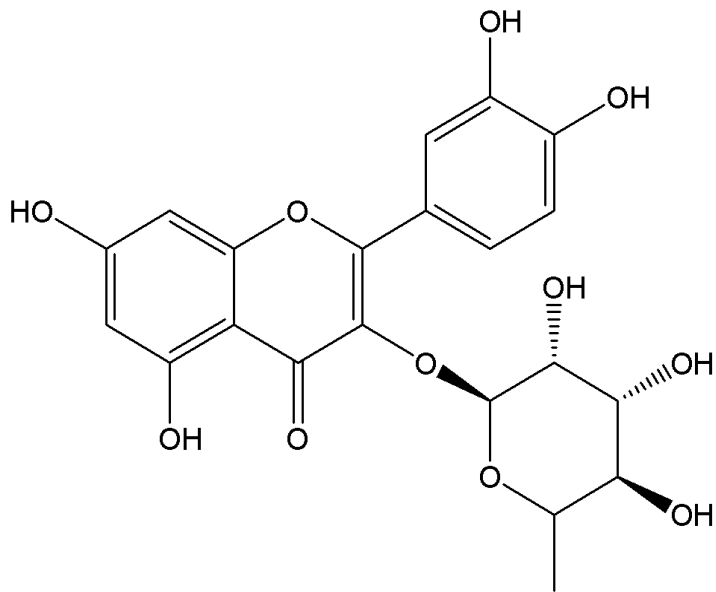


도면8

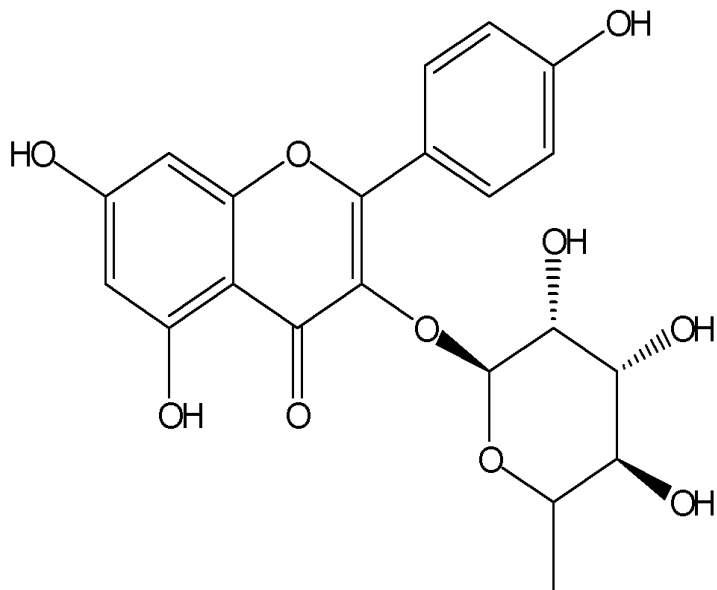


도면9

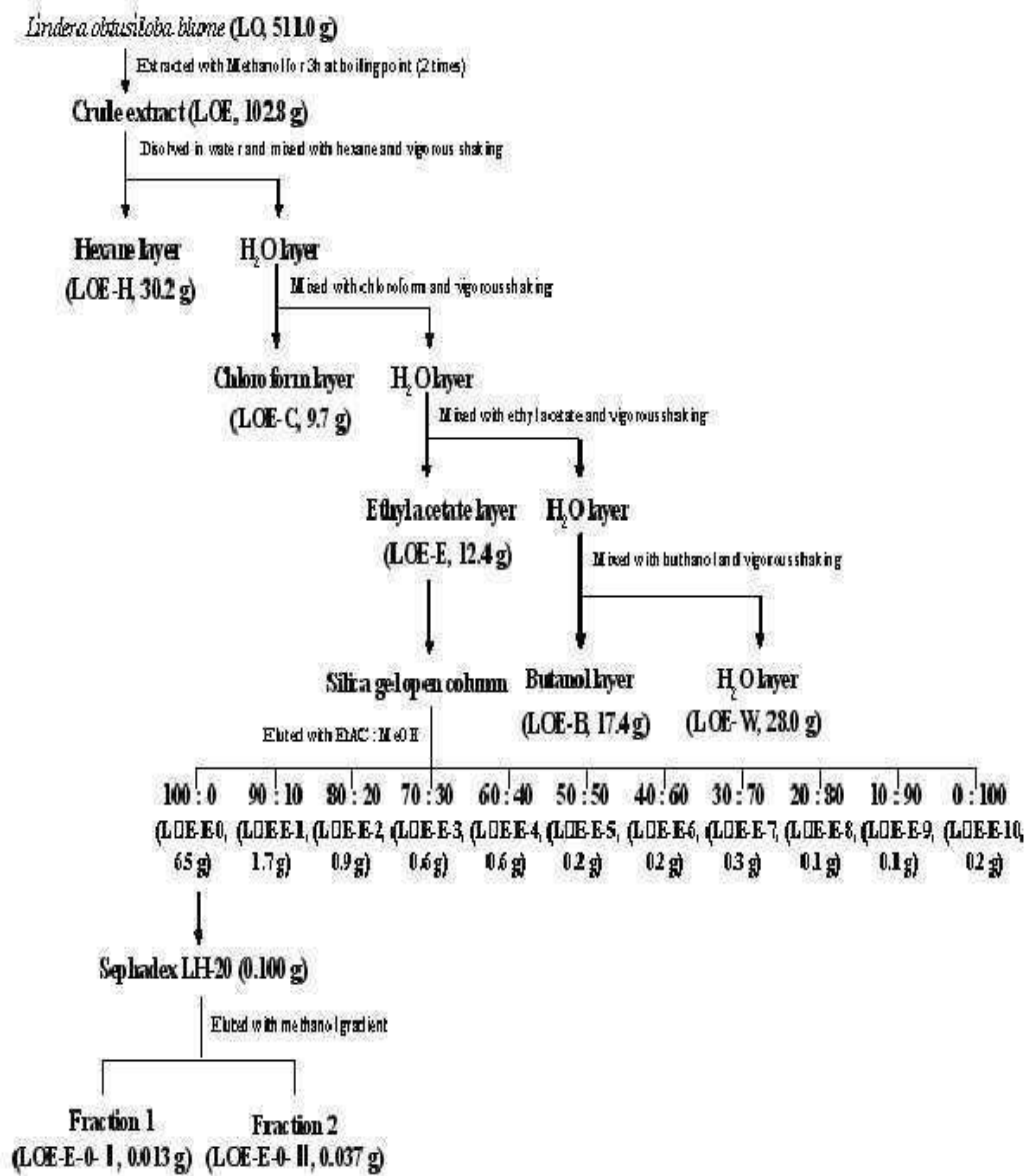
(A)



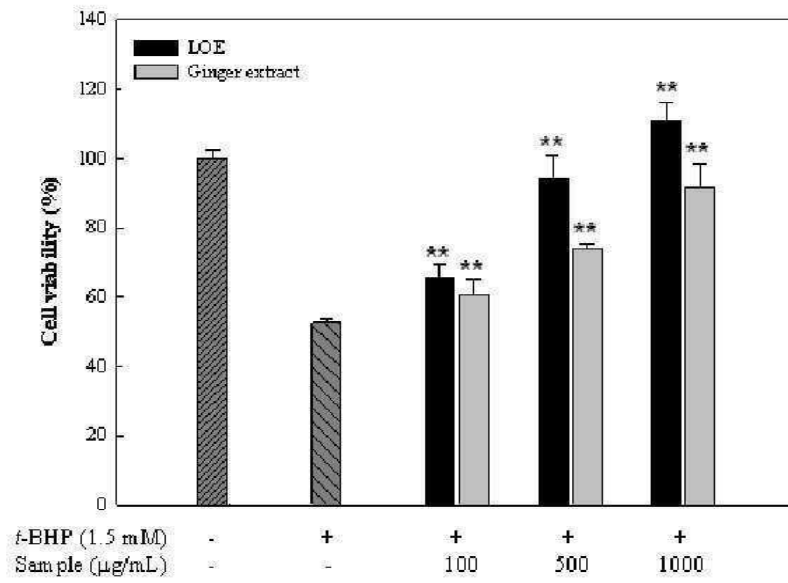
(B)



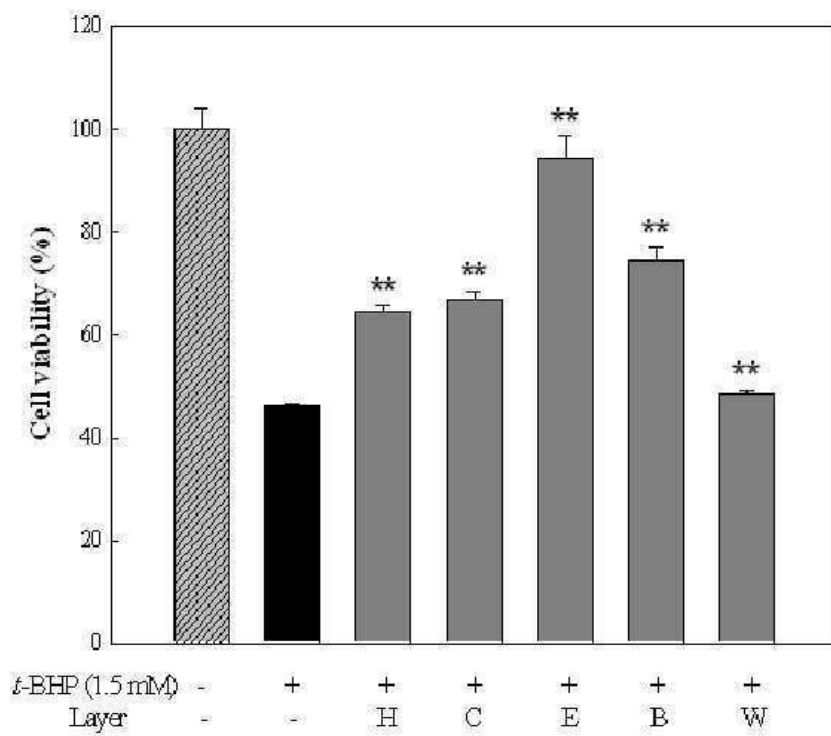
도면10



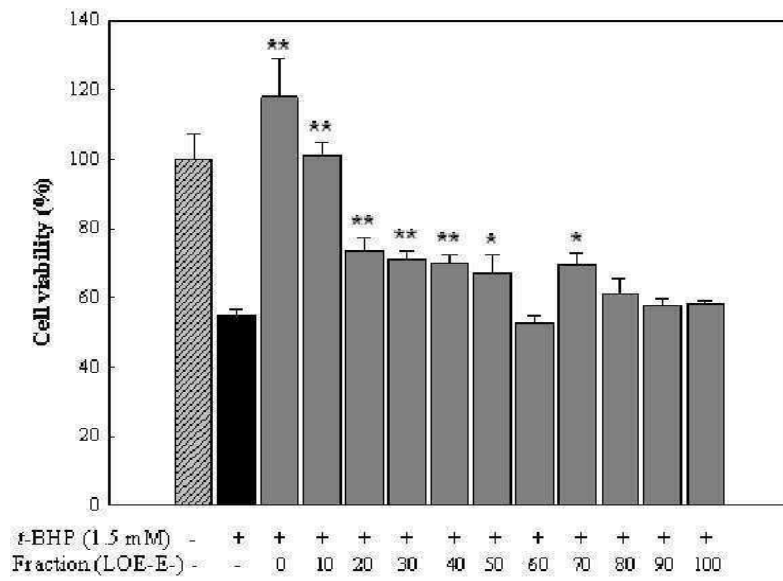
도면11



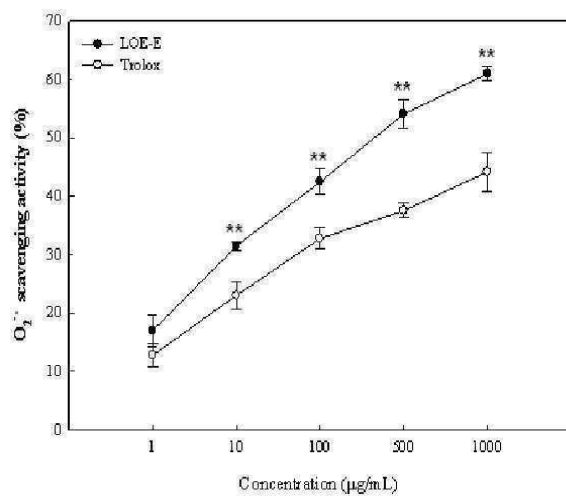
도면12



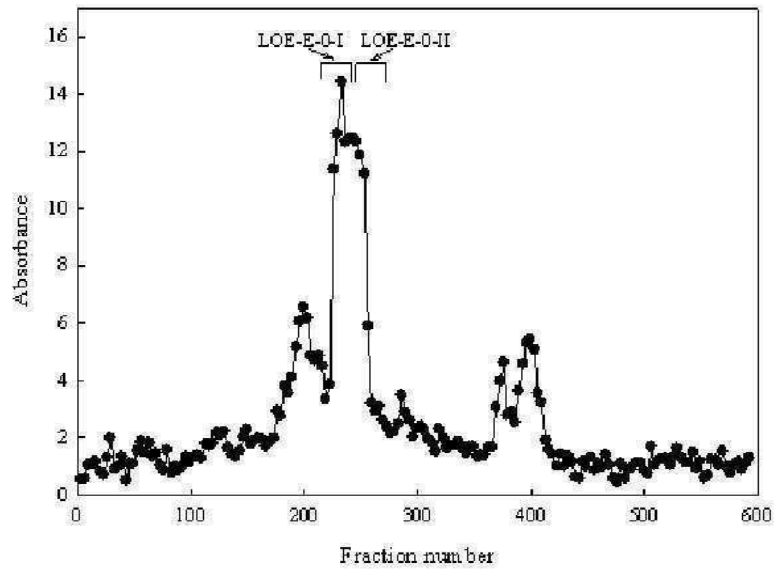
도면13



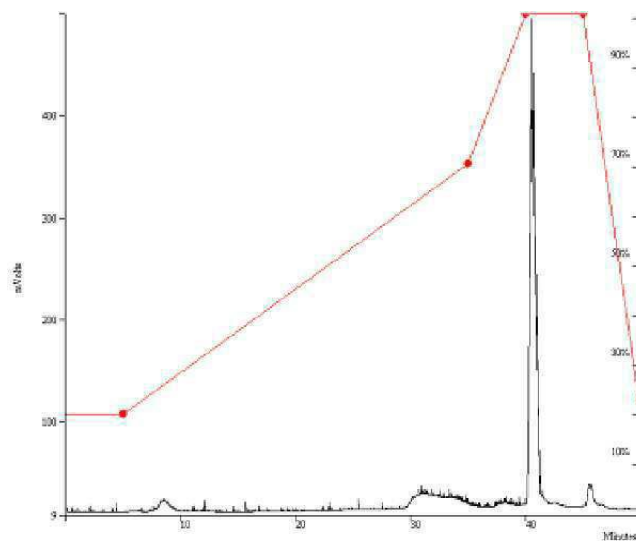
도면14



도면15



도면16a



도면16b

