

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0082377 (43) 공개일자 2012년07월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 35/64 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0044155(분할) (22) 출원일자 2012년04월26일 심사청구일자 2012년04월26일 (62) 원출원 특허 10-2010-0073657 원출원일자 2010년07월29일 심사청구일자 2010년07월29일	(71) 출원인 대한민국(관리부서:농촌진흥청장) 경기 수원시 권선구 서둔동 250 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 백남인 경기도 수원시 영통구 망포동 쌍용1차아파트 104동 2001호 박지해 전라북도 순창군 풍산면 한내리 187 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인다울

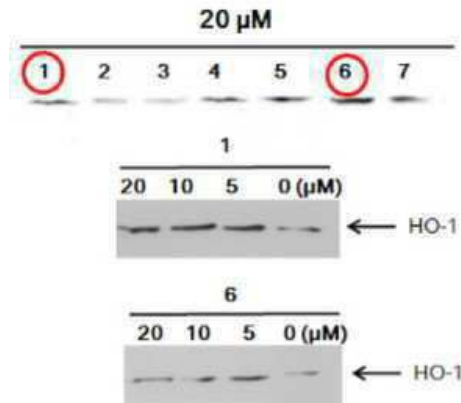
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **항염증 효과를 갖는 잠분 추출물 및 이를 포함하는 피부 외용제 조성물**

(57) 요약

본 발명은 항염증 효과를 갖는 잠분 추출물 및 이를 포함하는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게 상기 잠분 추출물은 헴 옥시게나제- 1과 시르투인1의 발현을 증대시켜 항염증 효과를 갖는다.

대 표 도 - 도8



(72) 발명자

이도경

경상남도 마산시 구산면 수정리 589-2번지

이대영

경기도 수원시 영통구 영통1동 대우월드마크 102동 705호

조진경

경기도 수원시 영통구 영통동 1013-11 303호

김용순

경기도 수원시 영통구 영통동 964-5 신나무실 주공아파트 512동 401호

손봉희

경기도 수원시 장안구 율전동 밤꽃마을뜨란채아파트 109동 1603호

강필돈

경기도 수원시 권선구 권선동 1270 벽산아파트 401동 1306호

이광길

경기도 수원시 권선구 탑동 우방아파트 105동 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20071390610000010

부처명 농촌진흥청

연구사업명 농업과학연구사업

연구과제명 양잠산물의 기능성 탐색 및 활성화 연구

주관기관 국립농업과학원

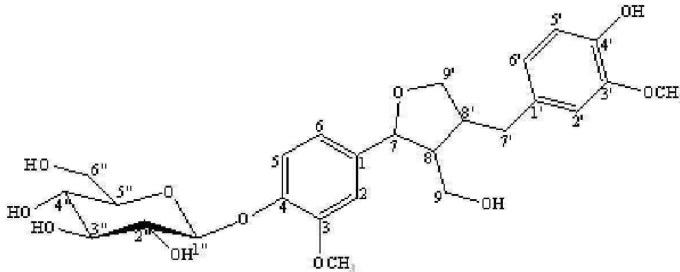
연구기간 2007.01.01 ~ 2008.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 구조식을 갖는 화합물 7을 포함하는, 항염증 효과를 갖는 잠분 추출물:

[화합물 7]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 헵 옥시게나제-1 또는 시르투인1(SIRT1)의 발현을 증대시켜, 항염증 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 잠분 추출물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물 7은 헴 옥시게나제-1의 발현을 증대시키는 것을 특징으로 하는 잠분 추출물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화합물 7은 상기 추출물 총량에 대하여 각각 0.01 내지 1 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 잠분 추출물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 추출물을 유효성분으로 함유하며, 항염증 효과를 갖는 의약품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 조성물은 연고 겔, 크림, 패취 및 분무제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 의약품 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 추출물은 상기 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 30 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 의약품 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

피부 외용제 조성물인 것을 특징으로 하는 의약품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 항염증 효과를 갖는 잠분 추출물 및 이를 포함하는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 잠분은 누에(*Bombyx mori* L.)의 배설물을 말하며, 이는 잠사, 원잠사, 원잠시 등으로도 불린다. 누에는 주로 뽕잎(*Morus alba* L.)을 섭취하여 성장하는데 뽕잎 속에 들어있는 단백질의 40% 정도만 소화하고 대부분은 그대로 배설한다. 따라서 잠분에는 뽕잎 자체의 성분이나 누에 효소에 의해 변형된 성분이 포함되어 있다.

[0003] 누에가 섭취하는 뽕나무(桑: mulberry)는 뽕나무과(*Moraceae*)에 속하는 활엽 낙엽성 교목으로, 한국을 비롯하여 중국 및 일본 등지에 서식하고 있다. 뽕나무의 잎이 누에의 사료로 이용되고 있을 뿐만 아니라 한방에서는 각 기관을 상엽, 상백피, 상심자, 상지라는 이름의 약재로 사용하고 있다. 상엽은 뽕나무 잎을 소재로 한 약재로서, '신농본초경'에 의하면 소갈증, 이뇨, 완하, 진해 및 거담제 등의 효능이 있다고 수록되어 있으나 생약의 범주에는 들어있지 않다.

[0004] 하지만 최근 연구 보고에 따르면, 상엽은 콜레스테롤 흡수 저해 작용, 항당뇨, 항고지혈증, 항산화작용 및 혈당강화작용 등 여러 가지 활성이 있다. 상엽에서 분리된 성분으로는 루틴(rutin), 케르세틴(quercetin), 퀘르시트린(quercitrin), 이소퀘르시트린(isoquercitrin)과 같은 플라보노이드(flavonoid) 외에 스테로이드(steroid) 및 트리테르페노이드(triterpenoid) 등이 보고되어 있다.(Katai, K. Trace components in mulberry leaves. *J. Chem. Soc. Jpn.* **18**, 379-383 (1942))

[0005] 상백피(桑白皮)는 뽕나무의 수피로서 한방에서 이뇨제, 소염제, 진해제로 쓰이며, 추출물로부터 미백작용 외에도 높은 항균력이 있다(Yoo, J. Y. et al. A clinical study on the effect of a cream containing *Ramulus Mori* extract and tea tree oil on acne vulgaris and aerobic skin flora. *Korean J. Dermatol.* **43**, 1136-1141 (2003)).

[0006] 상백피에서 분리된 성분으로는 모루신(morusin), 사이클로(cyclomorusin), 구와논 C(kuwanon C) 등의 플라노이드(flavonoid)와 클로로필(chlorophyll) 유도체 등이 있고, 아이소프렌화된 플라노이드(isoprenylated-flavonoid) 계열인 구와논은 혈압강화 작용을 나타낸다.

[0007] 뽕나무의 열매인 오디(桑核子)는 상심, 상실, 흑심 등으로도 불리며, 뽕나무의 열매가 자홍색을 나타낼 때 채취하여 식용하거나 건조한 후 한약재로 사용된다. 또한, 열매로부터 각종 비타민류, 유기산류, 당류 등의 성분이 있으며, 오디에 함유된 안토시아닌(anthocyanin) 색소는 노화억제, 망막장애의 치료, 시력개선 효과 및 항산화 작용이 있다고 밝혀졌다. 그리고, 주요 성분으로는 안토시아닌(anthocyanin), 시아니딘-3-O-β-D-글루코피라노사이드(cyanidin-3-O-β-D-glucopyranoside) 등이 보고된 바 있다.(Wang, H., Cao, G., and Prior, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agr. Food. Chem.* **45**, 304-309 (1997)).

[0008] 그리고 상지(桑枝)는 뽕나무 가지로서 최근 그 추출물이 일부 화장품의 미백제로 사용되고 있으며 그 활성 성분이 상지(mulberrin)로 밝혀졌으며, 상엽이나 상백피 보다 생리활성이 높은 것으로 보고되어 있다.(Koca, I., Ustun, N. S., and Koca, A. F. Chemical composition, antioxidant activity and anthosyanin profiles of purple mulberry(*Morus rubra*) fruits. *J. Food Agr. Environ.* **6**, 39-42 (2008))

[0009] 이와 같이, 뽕나무와 그 양잠 산물에는 다양한 유효성분이 함유되어 있다. 따라서 뽕잎을 주식으로 하는 누에의 배설물인 잠분에도 다양한 유효성분이 함유되어 있을 것이며, 이에 따라 식용 또는 약용으로써 이용가치를 높일 수 있다. 그리고 상기 언급한 바와 같이, 누에는 뽕잎 속에 들어있는 단백질의 40% 정도만 소화하고 대부분은 그대로 배설하기에, 누에 체내에서 미생물 또는 효소에 의해 변형된 성분이 다양한 형태의 이차대사산물로 잠분에 포함되어 있을 것으로 예상된다.

[0010] 이에 본 발명자들은 잠분을 연구하던 중, 잠분 추출물이 항염증 효과가 있고, 이를 피부 외용제 조성물로 사용할 수 있음을 알게 되어 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 항염증 효과를 갖는 잠분 추출물을 제공하기 위한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 항염증 효과를 갖는 잠분 추출물을 포함하는 피부 외용제 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0013]

과제의 해결 수단

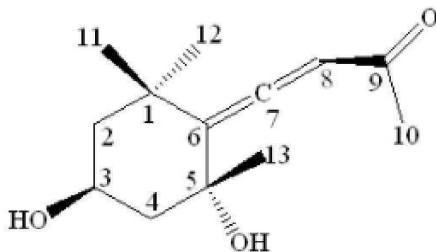
[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항비스-노르세스퀴테르펜계 화합물, 플라벤계 화합물 및 리그난계 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물 중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 항염증 효과를 갖는 잠분 추출물을 제공한다.

[0015] 상기 추출물은 헵 옥시게나제-1 또는 시르투인1(SIRT1)의 발현을 증대시켜, 항염증 효과를 갖는다.

[0016] 이하 잠기 추출물에 포함된 항염증 효과를 갖는 화합물에 대해 구체적으로 설명한다.

[0017] 상기 비스-노르세스퀴테르펜계 화합물은 하기 구조식을 갖는 화합물 1 내지 5를 가지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함한다:

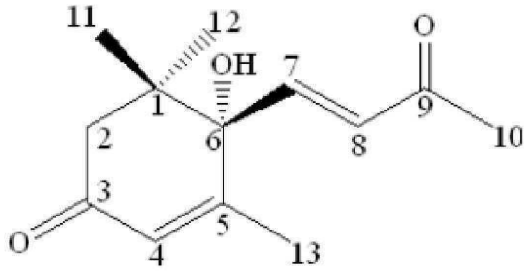
[0018] [화합물 1]



[0019]

[0020] ((3S,5R,8R)-3,5-dihydroxymegastigma-6,7-dien-9-one);

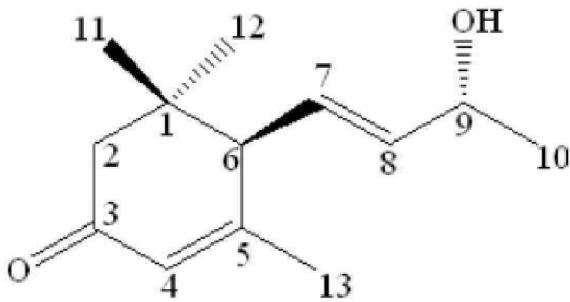
[0021] [화합물 2]



[0022]

[0023] ((+)-dehydrovomifoliol);

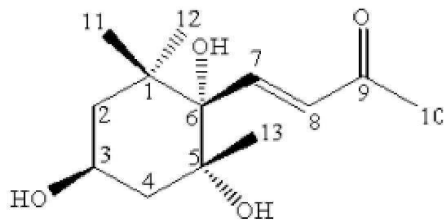
[0024] [화합물 3]



[0025]

[0026] ((6*R*,7*E*,9*R*)-9-hydroxy-4,7-megastigadien-3-one);

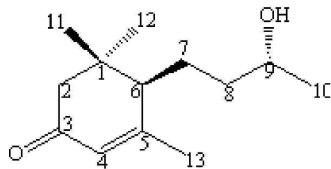
[0027] [화합물 4]



[0028]

[0029] ((3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one); 및

[0030] [화합물 5]



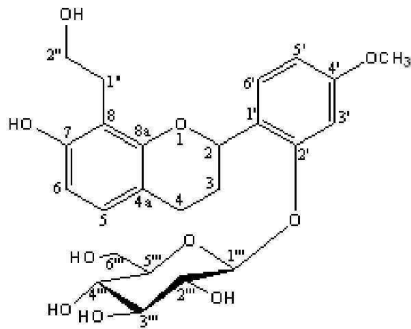
[0031]

[0032] ((6*R*,9*R*)-9-hydroxy-4-megastigmen-3-one).

[0033] 상기 플라벤계 화합물은 하기 구조식을 갖는 화합물 6을 포함한다. 아울러 화합물 6은 잠분으로부터 처음 분리된 신규 화합물이다:

[0034]

[0035] [화합물 6]

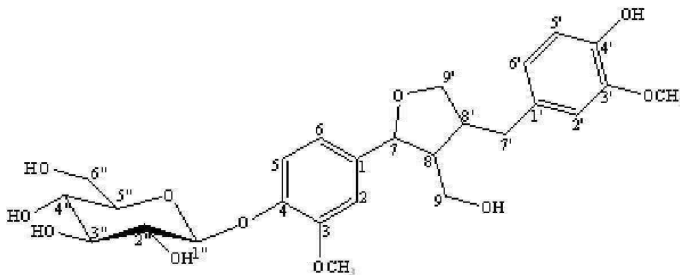


[0036]

[0037] (7-hydroxy-8-ethanol-4'-methoxy-2'-O-β-D-glucopyranosylflavane)

[0038] 상기 리그난계 화합물 화합물은 하기 구조식을 갖는 화합물 7을 포함한다:

[0039] [화합물 7]



[0040]

[0041] (lariciresinol-4-O-β-D-glucopyranoside)

[0042] 상기 추출물은 헴 옥시게나제-1 또는 시르투인1(SIRT1)의 발현을 증대시켜, 항염증 효과를 나타낸다. 이하, 헴 옥시게나제-1 및 시르투인1이 갖는 특성을 설명한다.

[0043] 먼저 헴 옥시게나제-1(heme oxygenase, HO-1)의 특성은 다음과 같다. 헴 옥시게나제-1은 헴(heme)을 분해하는 효소로 담록소(biliverdin), 일산화탄소(carbon monoxide) 및 철(iron)을 생성한다. 이와 같은 헴 옥시게나제-1에 의한 헴의 분해는 다양한 약리 작용을 한다. 그 중 헴의 철 및 담록소로의 분해는 세포 보호 작용과 항산화 작용을 통하여 DNA의 산화적 손상을 예방한다. 따라서 발암의 개시를 막고, 산화적 혹은 염증 유발성의 세포나 조직 손상과 연관된 암의 촉진과정을 억제하며 보호하는 역할을 한다. 따라서 헴 옥시게나제-1의 유도는 화학적 암 예방 연구에 중요한 부분을 차지하게 된다. 또한 헴의 일산화탄소로의 분해는 염증 반응에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 최근 연구에서 류마티스 관절염의 조직에서 헴 옥시게나제-1의 발현이 현저하게 증가되어 나타났으며, 이는 퇴행성 관절염의 조직과 비교해 보았을 때도 유의성 있게 증가하여 염증성 관절염에 헴 옥시게나제-1의 역할이 중요함을 밝혀내었다.(Jang, S. J. et al. The effects of heme oxygenase-1 on collagen induced arthritis model. *The Korean J. Anat.* **39**, 393-399 (2006))

[0044] 다음은 시르투인1의 특성에 관한 것이다. 시르투인1은 노화 억제에서 중요하게 나타나는 효소인 Sir2의 상동 유전자이다. 포유류에서 "시르투인1"이라는 유전자는 몸 속에 존재하며, 이 시르투인1은 히스톤과 비히스톤 단백질을 탈아세틸화하여 항염증, 항노화 작용을 한다고 알려져 있다.(Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the 시르투인1 deacetylase. *Science* **202**, 2011-2015 (2004)). 그리고 식이제한(Calories Restriction, CR)은 노화를 지연시키고 수명을 연장시킬 뿐만 아니라, 노화와 관련된 질환의 발병을 감소시키는 것으로서, 이 식이제한 상태에서 시르투인1은 활성화된다. 이렇게 인간의 노화를 지연시키는 시르투인1은 스트레스로부터 유도되는 세포의 세포사를 예방하고, 생존을 연장시키는 효과가 있다. 또한, 시르투인1 유전자를 과발현시킨 마우스에 고지방식으로 식사를 제공할 경우, 보통 마우스보다 지방으로 인한 염증을 감소시키며 당 내성(glucose tolerance)도 증가시키면서 지방간의 생성도 막아주는 것으로 나타났다(Denu, J. M. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD (+)-dependent deacetylases. *Trends Biochem Sci.* **28**, 41-48 (2003)). 그리고 시르투인1은 알레르기 염증 및 과민성에서 특

별한 역할을 수행한다. 이와 같이 시르투인1의 발현 증가 활성으로부터 염증과 관련된 질병을 치료한다는 것을 확인할 수 있다.

- [0045] 본 발명에서 상기 화합물 1 내지 7은 헵 옥시게나제-1의 발현을 증대시키고, 화합물 1 내지 5는 시르투인1의 발현도 증대시켜, 본 발명에 따른 잠분 추출물이 항염증 효과를 나타내는 것이다.
- [0046] 상기 비스-노르세스퀴테르펜계 화합물, 플라벤계 화합물 및 리그난계 화합물은 상기 추출물 총량에 대하여 각각 0.01 내지 1 중량%로 포함될 수 있다.
- [0047] 또한 본 발명은, 항염증 효과를 가지는 상기 화합물 6 또는 그 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다.
- [0048] 한편 본 발명은, 잠분 추출물을 유효성분으로 함유하는 항염증 효과를 갖는 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0049] 상기 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스 및 바디 세정제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형을 가지는 화장료 조성물로 이용될 수 있다.
- [0050] 또한 상기 조성물은 연고 젤, 크림, 패취 및 분무제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제형을 가지는 의약품 조성물로 이용될 수 있다.
- [0051] 상기 화장료 조성물로 사용시, 화장료의 제형에 맞게 물질을 더 첨가할 수 있다. 예를 들어, 정제수, 보습제, 유분, 계면활성제, 고급 알코올, 중저점제, 킬레이트제, 색소, 지방산, 산화방지제, 방부제, 왁스, pH조절제, 향료 등이 첨가될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물로 제조되는 화장료의 제형은 화장수, 에센스, 로션, 젤, 크림 등 특별히 제한을 받지 않는다.
- [0052] 그리고 상기 추출물은 상기 피부외용제 조성물 총 중량에 대하여 0.05 내지 30 중량%로 포함될 수 있다. 상기 추출물이 0.001 중량% 미만인 경우 항염증 효과가 충분히 나타나지 않을 수 있고, 30 중량%를 초과하는 경우 항염증 효율이 더 이상 증가하지 않을 수 있다.
- [0053] 상기 항염증 효과를 가지는 피부 외용제는 아토피 치료용 피부 외용제로 사용될 수 있다. 나아가 항염증 효과를 갖는 잠분 추출물은 각종 기능성 제품에 활용될 수 있다.

발명의 효과

- [0054] 본 발명은 항염증 효과를 갖는 잠분 추출물 및 이를 포함하는 피부 외용제 조성물을 제공하는 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

- [0055] 도 1은 화합물 1의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 화합물 2의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 화합물 3의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 화합물 4의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 화합물 5의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 화합물 6의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 화합물 7의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 잠분에서 분리한 화합물 1 내지 7의 SDS-폴리아실아마이드 겔 전기영동의 결과로, 화합물 1 내지 7의 헵 옥시게나제-1에 대한 활성을 측정한 것이다.
- 도 9는 잠분에서 분리한 화합물 1 내지 7의 SDS-폴리아실아마이드 겔 전기영동의 결과로, 화합물 1 내지 7의

시르투인1에 대한 활성을 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하에서는, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0057] 실시예 1: 잠분의 용매 추출 및 분획

[0058] 건조, 분쇄한 잠분 10 kg을 80% 메탄올(MeOH) 수용액(36 L × 3)으로 실온에서 진탕 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과하고 감압 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 얻어진 메탄올 추출물을 에틸 아세테이트(ethyl acetate, EtOAc, 3000 mL × 5)와 3000 mL의 물(H₂O)로 분배 추출하였고, 다시 물층을 n-부탄올(*n*-butanol, 2800 mL × 3)로 분배 추출하였다.

[0059] 각 층을 감압 농축하여, 에틸아세테이트 분획(61 g, SDE), n-부탄올 분획(30 g, SDB) 및 물 분획(136 g, SDH)을 얻었다. EtOAc 분획으로부터 실리카 겔 및 ODS 컬럼 크로마토그래피를 반복하여 5 종의 비스-노르세스퀴테르펜계 화합물(화합물 1~5), 1종의 신규 플라벤 화합물(화합물 6) 및 1 종의 리그난 화합물(화합물 7)을 분리하였다.

[0060] 실시예 2: 비스-노르세스퀴테르펜(bis-norsesquiterpene)의 분리 및 동정

[0061] 2-1: 비스-노르세스퀴테르펜 분리

[0062] 에틸아세테이트 분획, 60 g으로부터 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(SiO₂ column chromatography)(φ 8 × 15 cm, *n*-hexane-EtOAc = 5:1 → 3:1 → 1:1 → 1:3 → CHCl₃-MeOH = 10:1 → 7:1 → 5:1 → 3:1)를 실시하여 180 mL씩 분취하였다. 각 취액을 얇은막 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)(*n*-hexane-EtOAc = 1:1, CHCl₃-MeOH = 10:1, 4:1)로 확인하여 유사한 부분들을 함께 모으고 농축하여 23개의 분획물(SDE-1~SDE-23)을 얻었다. 얻어진 분획 SDE-11+12 분획[1.6 g, Ve/Vt(elution volume/total volume) 0.47-0.61]에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(φ 5.5 × 6 cm, *n*-hexane-EtOAc = 1:1 → CHCl₃-MeOH = 10:1 → 7:1 → 5:1)를 실시하여 12개의 분획(SDE-11+12-1~SDE-11+12-12)을 얻었고, 이 중에서 SDE-11+12-8 분획(530 mg, Ve/Vt 0.58-0.62)에 대하여 다시 ODS 컬럼 크로마토그래피(φ 4 × 4.5 cm, MeOH-H₂O = 1:2 → 1:1)를 실시하여 18개의 분획(SDE-11+12-8-1~SDE-11+12-8-18)으로 나누었다.

[0063] 그 결과, 화합물 1[SDE-11+12-8-3, 60 mg, Ve/Vt 0.03-0.05, TLC(ODS F_{254S}) R_f 0.7, MeOH-H₂O = 3:2]과 화합물 2[SDE-11+12-8-6, 38 mg, Ve/Vt 0.09-0.13, TLC(ODS F_{254S}) R_f 0.6, MeOH-H₂O = 3:2]를 분리하였다. 또한, SDE-8 분획[3.3 g, Ve/Vt 0.24-0.35]에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(φ 4.5 × 12 cm, *n*-hexane-EtOAc = 3:1 → 1:1)를 실시하여 17개의 분획(SDE-8-1~SDE-8-17)을 얻었고, 이 중에서 SDE-8-13 분획(1.47 g, Ve/Vt 0.40-0.65)에 대하여 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(φ 5.5 × 12 cm, CHCl₃-H₂O-MeOH = 7:3:1 → 3:3:1)를 실시하여 20개의 분획(SDE-8-13-1~SDE-8-13-20)을 얻었다. 얻어진 분획 SDE-8-13-6(372 mg, Ve/Vt 0.14-0.18)에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(φ 4 × 13 cm, *n*-hexane-EtOAc = 2:1)를 실시하여 26개의 분획물(SDE-8-13-6-1~SDE-8-13-6-26)을 얻었고, 그 중 SDE-8-13-6-15 분획(148 mg, Ve/Vt 0.39-0.47)에 대하여 ODS 컬럼 크로마토그래피(φ 3 × 6 cm, MeOH-H₂O = 1:2)를 실시하여 12개의 분획(SDE-8-13-6-15-1~SDE-8-13-6-15-12)으로 나눈 결과, 화합물 2[SDE-8-13-6-15-2, 15 mg, Ve/Vt 0.03-0.18, TLC(ODS F_{254S}) R_f 0.5, MeOH-H₂O = 2:1]와 화합물 3[SDE-8-13-6-15-9, 33 mg, Ve/Vt 0.42-0.85, TLC(ODS F_{254S}) R_f 0.3, MeOH-H₂O = 2:1]을 분리하였다. 얻어진 분획 중 SDE-8-13-6-17(54 mg, Ve/Vt 0.50-0.52)로부터 ODS 컬럼 크로마토그래피(2.5 × 5 cm, MeOH-H₂O = 1:2)를 실시하였고, 화합물 4[SDE-8-13-6-17-4, 16 mg, Ve/Vt 0.17-0.28, TLC(ODS F_{254S}) R_f 0.4, MeOH-H₂O = 2:1]와 화합물 5[SDE-8-13-6-17-8, 7mg, Ve/Vt 0.53-0.80, TLC(ODS F_{254S}) R_f 0.2, MeOH-H₂O = 2:1]를 정제하였다.

[0064] 2-1-1. 화합물 1[(3*S*,5*R*,8*R*)-3,5-dihydroxymegastigma-6,7-dien-9-one]

[0065] 비정형 파우더(CHCl_3); m.p. 134-136 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -37° ($c=0.2$, CHCl_3); EI/MS m/z : 224[M]⁺; IR(KBr, cm^{-1}): 3234, 2928, 1938, 1668, 1243, 1159, 1075; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): (표 1, 도 1); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): (표 1, 도 1)

[0066] 2-1-2. 화합물 2[(+)-dehydrovomifoliol]

[0067] 무색 오일(CHCl_3); $[\alpha]_D^{20}$ +219° ($c=0.1$, CHCl_3); EI/MS m/z : 222[M]⁺; IR(KBr, cm^{-1}): 3441, 1667, 1127, 987; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): (표 2, 도 2); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): (표 2, 도 2)

[0068] 2-1-3. 화합물 3[(6*R*,7*E*,9*R*)-9-hydroxy-4,7-megastigmadien-3-one]

[0069] 비정형 파우더(CHCl_3); m.p. 74-75 °C; $[\alpha]_D^{25}$ +292° ($c=0.4$, CH_2Cl_2); EI/MS m/z : 208[M]⁺; IR(KBr, cm^{-1}): 3400, 1657, 976; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): (표 3, 도 3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): (표 3, 도 3)

[0070] 2-1-4. 화합물 4[(3*S*,5*R*,6*S*,7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one]

[0071] 백색 크리스탈; m.p. 151-152 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -200° ($c=0.1$, CHCl_3); EI/MS m/z : 242[M]⁺; IR(KBr, cm^{-1}): 3410, 2928, 1674, 1363, 1252, 1043; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): (표 4, 도 4); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): (표 4, 도 4)

[0072] 2-1-5. 화합물 5[(6*R*,9*R*)-9-hydroxy-4-megastigmen-3-one]

[0073] 무색 오일; $[\alpha]_D^{25}$ -233° ($c=0.1$, CHCl_3); EI/MS m/z : 210[M]⁺; IR(KBr, cm^{-1}): 3410, 2929, 1680, 1440, 1219; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): (표 5, 도 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): (표 5, 도 5)

[0074] 2-2: 화합물 1의 구조 동정

[0075] 화합물 1, 노란 빛깔의 오일(yellowish oil, CHCl_3)은 얇은 막 크로마토그래피(TLC)에 전개하고, 10% 황산을 분무하고 가열했을 때, 노란색으로 발색되었다. EI/MS 스펙트럼에서의 분자이온 피크(m/z 224, [M]⁺)로부터 분자량이 224로 결정되었다. 적외선(IR) 스펙트럼에서 수산기(3234 cm^{-1})와 알렌 구조(1938 cm^{-1}) 및 컨쥬게이티드-케톤(1668 cm^{-1})을 확인하였고, 부분 구조를 예상할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 스펙트럼의 저자장 영역에서는 1개의 올레핀 메타인 프로톤(olefine methine proton)(δ 5.82, 1H, s) 신호가, 산소 치환 영역에서는 1개의 옥시제네이티드-메타인 프로톤(oxygenated-methine proton)(δ 4.20, 1H, m) 신호가 관측되었다. 또한, 고자장 영역인 δ 1.35~2.20에서는 이중 커플링(geminal coupling)(J)하는 2개의 메틸렌 프로톤(methylene proton)(δ 2.20, 1H, ddd, $J=13.6$, 4.0, 2.0 Hz; 1.92 1H, ddd, $J=12.4$, 4.0, 2.0 Hz; 1.41, dd, $J=13.6$, overlapped; 1.35, 1H, dd, $J=12.4$, overlapped) 신호가 관측되었고, δ 1.15~2.18에서는 4개의 일중항 메틸 프로톤(singlet methyl proton)(δ 2.18, 3H, s; δ 1.37, 6H, s; δ 1.15, 3H, s) 신호가 관측되었는데, 그 중 1개(δ 2.18)는 화학이동도(chemical shift) 값으로부터 알릴(allyl) 위치에 나타나는 것으로 판명되었다. 따라서 화합물 1은 이중결합과 수산기 및 메틸기 4개를 포함하는 화합물로 판단되었다.

[0076] ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD) 스펙트럼에서 13개의 신호가 관측되었다. 저자장 영역에서 케톤(δ 200.56) 1개와 이보다 저자장으로 이동(shift)된 알렌(allene) 카본(δ 211.25) 1개가 관측되었다. 올레핀 영역에서 올레핀 4급 카본(olefine quaternary carbon)(δ 119.79)과 올레핀 메타인 카본(olefine methine carbon)(δ 101.04) 신호가 관측되었고, 산소치환 영역에서는 옥시제네이티드-쿼터너리 카본(oxygenated-quaternary carbon)(δ 72.37)과 옥시제네이티드-메타인 카본(oxygenated-methine carbon)(δ 64.33) 신호가 각각 1개씩 관측되었다. 또한, 고자장 영역에서는 1개의 쿼터너리 카본(quaternary carbon)(δ 36.98), 2개의 메틸렌 카본(methylene carbon)(δ 49.90, 49.70) 그리고 4개의 메틸 카본(methyl carbon)(δ 32.30, 29.36, 26.59, 16.24) 신호가 관측되었다.

[0077] 이와 같은 결과를 종합하여, 화합물 1은 메틸기가 4개와 수산기 2개를 포함하는 메가스티그멘(megastigmane) 골격의 노르세스퀴테르펜(norsesquiterpene) 화합물로 동정하였다. 수산기 및 메틸기의 결합 위치를 확인하기 위하여 gCOSY, gHSQC 및 gHMBC 등의 2D-NMR을 측정하였다. gCOSY 스펙트럼에서 옥시제네이티드- α 메타인 프로톤(ygenated-methine proton)(δ 4.20, H-3) 신호가 2개의 메틸렌 프로톤(methylene proton)[(δ 1.92, H-2a; 1.41, H-2b), (δ 2.20, H-4a; 1.35, H-4b)] 신호와 연관(correlation)되어 있다는 점으로부터 C-3의 수산기는 2개의 메틸렌(methylene) 사이에 위치하고 있음이 확인되었다. 다른 한 개의 수산기와 이중결합의 위치 및 C-10에서 C-13의 4개의 메틸기(methyl)기의 화학이동도(chemical shift)는 gHMBC 실험으로 확인하였다. 즉, gHMBC 스펙트럼에서 올레핀 메타인 프로톤(olefine methine proton) 신호(δ 5.82, H-8)가 알렌 카본(allene carbon)(δ 211.2, C-7)과 컨쥬게이티드-케톤(conjugated-ketone)(δ 200.56, C-9)의 신호 사이에 크로스 피크(cross peak)를 보인 점으로부터 C-8은 알렌(allene)(C-7)과 컨쥬게이티드-케톤(conjugated-ketone)(C-9) 사이에 있는 것을 알 수 있었다. 또한, C-9(δ 200.56)은 메틸 프로톤 신호(δ 2.18, H-10)와의 연관(correlation)이 확인되어 C-10의 화학 이동도를 동정하였다. 쿼터너리 카본(Quaternary carbon) 신호(δ 36.98, C-1)와 두 개의 메틸 프로톤(methyl proton) 신호(δ 1.37, H-12; δ 1.15, H-11) 사이에서 크로스 피크(cross peak)가 관측되었고, 옥시제네이티드-쿼터너리 카본(oxygenated-quaternary carbon) 신호(δ 72.37, C-5)와 메틸 프로톤(methyl proton) 신호(δ 1.37, H-13) 사이에서 크로스 피크(cross peak)가 관측됨에 따라, 모든 메틸(methyl)기의 화학 이동도 값을 동정하였다. 또한, 메틸렌 프로톤(methylene proton) 신호(δ 1.92, H-2a; δ 1.41, H-2b)과 쿼터너리 카본(quaternary carbon) 신호(δ 36.98, C-1) 사이에서 크로스 피크(cross peak)가 관측되어 C-1의 위치를 결정하였고, 메틸렌 프로톤(methylene proton) 신호(δ 2.20, H-4a; δ 1.35, H-4b)와 옥시제네이티드-쿼터너리 카본(oxygenated-quaternary carbon) 신호(δ 72.37, C-5) 사이에서 크로스 피크가 관측되어 C-5의 위치를 결정하였다. 남은 올레핀 쿼터너리 카본(olefine quaternary carbon) 신호(δ 119.79, C-6)는 H-2와 H-4 사이에서 크로스 피크(cross peak)가 관측되어 위치를 결정할 수 있었고, 모든 탄소 신호의 화학이동도(chemical shift) 값을 동정하였다. 따라서 이 화합물은 그래스하퍼 케톤(grasshopper ketone)과 같은 골격을 갖는 (3*S*,5*R*,8*R*)-3,5-다이하이드록시메가스티그마-6,7-다이엔-9온(3,5-dihydroxymegastigma-6,7-dien-9-one)으로 구조를 결정하였다. 이 화합물의 $[\alpha]_D$ 값을 측정 한 결과, -37° ($c=0.21$, CHCl_3)로 확인되었다. 또한, 입체구조 결정을 위해 화학 이동도 값을 문헌(Kuang, H. X., Yang, B. Y., Xia, Y. G., and Fengl, W. X. Chemical constituents from the Flower of *Datura metel* L. Arch. Pharm. Res. **31**, 1094-1097)에 나타난 값과 비교한 결과 3번, 5번 그리고 8번 외에도 모든 신호의 화학 이동도 값이 (3*S*,5*R*,8*R*)-3,5-다이하이드록시메가스티그마-6,7-다이엔-9온 화합물과 유사하였으므로, 3번 위치에 *S*, 5번 위치에 *R*, 8번 위치에 *R*의 입체구조를 갖는 그래스하퍼 케톤(grasshopper ketone)으로 구조 동정하였다.

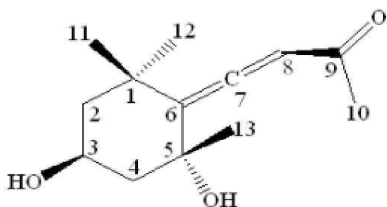
[0078] 하기 표 1은 화합물 1의 ^1H -NMR(400 MHz, CD_3OD) 및 ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD)스펙트럼의 결과를 나타낸 표이다. 그리고 도 1은 화합물 1의 ^1H -NMR (400 MHz) 및 ^{13}C -NMR (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[0079] [표 1]

No.	δ_c	δ_H (coupling pattern, J in Hz)
1	36.98	
2(eq) 2(ax)	49.90	1.92 (ddd, $J=12.4$, 4.0, 2.0 Hz) 1.35 (dd, $J=12.4$, overlapped)
3	64.33	4.20 (m)
4(eq) 4(ax)	49.70	2.20 (ddd, $J=13.6$, 4.0, 2.0 Hz) 1.41 (dd, $J=13.6$, overlapped)
5	72.37	
6	119.79	
7	211.25	
8	101.04	5.82 (s)
9	200.56	
10	26.59	2.18 (s)
11	29.36	1.15 (s)
12	32.30	1.37 (s)
13	16.24	1.37 (s)

[0080]

[0081] [화합물 1]



[0082]

[0083] 2-3: 화합물 2의 구조 동정

[0084] 화합물 2, 노란 빛깔의 오일(yellowish oil, CHCl_3)은 얇은 막 크로마토그래피(TLC)에 전개시키고, 10% 황산을 분무하고 가열했을 때, 노란색으로 발색되었다. EI/MS 스펙트럼에서의 분자이온 피크(m/z 222, $[\text{M}]^+$)로부터 분자량이 222로 결정되었다. 적외선(IR) 스펙트럼에서 수산기(3441 cm^{-1})와 켄주게이트드 케톤(conjugated ketone)(1667 cm^{-1})을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 스펙트럼의 올레핀 영역에서 3개의 메타인 프로톤(methine proton)(δ 6.98, 1H, d; δ 6.43, 1H, d; δ 5.93, 1H, s) 신호가 관측되었다. 그 중 J 값이 15.6 Hz로 나타나는 δ 6.98과 δ 6.43은 알리파틱 체인에서 이중결합이 엔트게겐(*Entgegen*)으로 존재하는 것으로 예상하였다. 고자장 영역에서 1개의 메틸렌 프로톤(methylene proton)(δ 2.59, 1H, d; δ 2.27, 1H, d) 신호가 관측되었고, 4개의 메틸렌 프로톤(methyl proton)(δ 2.30, 3H, s; δ 1.89, 3H, d, $J=1.2 \text{ Hz}$; δ 1.05, 3H, s; δ 1.01, 3H, s) 신호가 관측되었다. 그 중 2개(δ 2.30; δ 1.89)는 화학이동도 값으로부터 알릴 메틸(allyl methyl)임을 알 수 있었다. 따라서 화합물 2는 이중결합 및 메틸기 4개를 포함하는 화합물로 판단되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) 스펙트럼에서 13개의 신호가 관측되었다. δ 200.43과 δ 200.12에서 케톤 신호가 관측되었고, 올레핀 영역에서는 1개의 올레핀 쿼터너리 카본(olefine quaternary carbon)(δ 164.45)과 3개의 올레핀 메타인 카본(olefine methine carbon)(δ 148.18, δ 131.60, δ 127.92) 신호가 관측되었다. 또한 δ 79.92에서 옥시제네이트드-쿼터너리 카본(oxygenated-quaternary carbon), δ 50.52에서 메틸렌 카본(methylene carbon) 그리고 δ 42.65에서 쿼터너리 카본(quaternary carbon) 신호가 관측되었다. 고자장 영역에서는 4개의 메틸 카본(methyl carbon)(δ 27.67, δ 24.78, δ 23.55, δ 19.21) 신호가 관측되었다. 이와 같은 결과를 종합하여, 화합물 2는 메틸기 4개, 수산기 1개 및 이중결합 2개를 포함하고 케톤 신호 2개를 갖는 탄소 수 13개의 노르세스퀴테르펜(norsesquiterpene) 화합물로 추정되었다. 케톤, 이중결합 및 메틸기의 위치를 결정하기 위하여 gHSQC 그리고 gHMBC 등의 2D-NMR을 측정하였다. gHMBC 스펙트럼에서 메틸 프로톤 신호[(δ 1.05, H-11); (δ 1.01, H-12)]는 서로의 메틸 카본 신호[(δ 23.55, C-11); (δ 24.78, C-12)]과 연

관(correlation)되는 동시에 쿼터너리 카본(quaternary carbon)(δ 42.65, C-1), 메틸렌 카본(methylene carbon)(δ 50.52, C-2) 그리고 옥시제네이티드-쿼터너리 카본(oxygenated-quaternary carbon)(δ 79.92, C-6) 신호 사이에서 크로스 피크가 관측되어 C-11과 C-12은 C-1에 위치하는 것으로 판명되었다. 또한, 메틸 프로톤(methyl proton) 신호(δ 1.89, H-13)는 올레핀 메타인 카본(olefine methine carbon)(δ 127.92, C-4), 올레핀 쿼터너리 카본(olefine quaternary carbon)(δ 164.45, C-5) 및 옥시제네이티드-쿼터너리 카본(oxygenated-quaternary carbon)(δ 79.92, C-6) 신호 사이에서 크로스 피크(cross peak)가 관측되어 C-13은 C-5에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 또한, 케톤(δ 200.12, C-9) 신호와 메틸 프로톤(methyl proton)(δ 2.30, H-10) 신호 사이에서 크로스 피크가 관측되어 모든 메틸기 위치를 결정하였다. 케톤 신호인 C-3(δ 200.43)은 올레핀 메타인(olefine methine) 신호(δ 127.92, C-4)와 연관(correlation)되고 다른 케톤 신호(δ 200.12, C-9)는 올레핀 메타인 카본(olefien methine carbon) 신호(δ 6.98, H-7; δ 6.43, H-8)와 연관(correlation)되어 각각의 케톤기 위치를 결정하였다. 따라서 디하이드로보미폴리올(dehydrovomifoliol)로 구조 동정하였다. 입체구조를 결정하기 위해 $[\alpha]_D$ 를 측정한 결과 $+219^\circ$ ($c=0.10$, CHCl_3)로 확인되었으며, 문헌 (Serra, S., Barakat, A., and Fuganti, C., Chemoenzymatic resolution of cis- and trans-3,6-dihydroxy-a-ionone. *Synthesis of the enantiomeric forms of dehydrovomifoliol and 8,9-dehydrotheaspirone. Tetrahedron lett.* **18**, 2573-2580 (2007))에 나타난 값과 비교하여 (S)-디하이드로보미폴리올((S)-dehydrovomifoliol)로 구조 동정하였다. 그리고 화합물 2는 잠분에서는 처음으로 분리, 동정한 화합물이다.

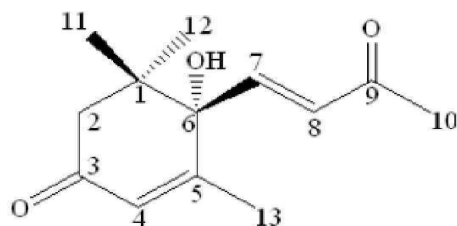
[0085] 하기 표 2은 화합물 2의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD)스펙트럼의 결과를 나타낸 표이다. 그리고 도 2는 화합물 2의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[0086] [표 2]

No.	δ_{C}	δ_{H} (coupling pattern, J in Hz)
1	36.98	
2(eq) 2(ax)	49.90	1.92 (ddd, $J=12.4$, 4.0, 2.0 Hz) 1.35 (dd, $J=12.4$, overlapped)
3	64.33	4.20 (m)
4(eq) 4(ax)	49.70	2.20 (ddd, $J=13.6$, 4.0, 2.0 Hz) 1.41 (dd, $J=13.6$, overlapped)
5	72.37	
6	119.79	
7	211.25	
8	101.04	5.82 (s)
9	200.56	
10	26.59	2.18 (s)
11	29.36	1.15 (s)
12	32.30	1.37 (s)
13	16.24	1.37 (s)

[0087]

[0088] [화합물 2]



[0089]

[0090] 2-4: 화합물 3의 구조 동정

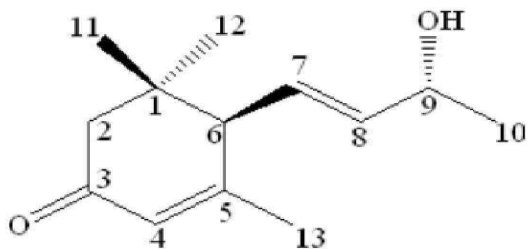
[0091] 화합물 3, 노란 빛깔의 오일(yellowish oil, CHCl_3)은 얇은 막 크로마토그래피(TLC)에 전개시킨 후, 10% 황산을 분무하고 가열하였을 때, 오렌지색으로 발색되었다. EI/MS 스펙트럼에서의 분자이온 피크(m/z 208, $[\text{M}]^+$)로부터 분자량이 208로 결정되었다. 적외선(IR) 스펙트럼에서 수산기(3400 cm^{-1})와 켄쥬게이티드 케톤(conjugated ketone)(1657 cm^{-1}) 및 다이메틸기(976 cm^{-1})을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 스펙트럼의 양상이 화합물 2와 거의 비슷했으며, 다른 점은 옥시제네이티드-메타인 프로톤(oxygenated methine proton) (δ 4.27, 1H, m)과 메타인 프로톤(methine proton) (δ 2.66, 1H, d, $J=9.2\text{ Hz}$) 신호가 관측 된 점이다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) 스펙트럼에서 13개의 신호가 관측되었다. 화합물 2에서 관측된 δ 200.12(C-9)과 δ 79.92(C-6) 신호 대신 옥시제네이티드-메타인 카본(oxygenated-methine carbon) (δ 68.70) 신호와 메타인 카본(methine carbon) (δ 56.62) 신호가 관측됨에 따라서 화합물 2의 6번과 9번 위치에서 환원반응이 일어난 구조임을 예상하였다. 수산기와 이중결합의 위치를 결정하기 위하여 gHSQC와 gHMBC 등의 2D-NMR 스펙트럼을 측정하였다. gHMBC 스펙트럼에서 메타인 프로톤(methine proton) (δ 2.66, H-6) 신호와 올레핀 메타인 쿼터너리 카본(olefine methine quaternary carbon) (δ 165.77, C-5) 신호 사이에서 크로스 피크가 관측되었고, 옥시제네이티드-메타인 카본(oxygenated-methine carbon) (δ 68.70, C-9) 신호와 메틸 프로톤(methyl proton) (δ 1.23, H-10) 신호 사이에서 크로스 피크가 관측되어 이중결합과 수산기의 위치를 하기 구조식과 같이 결정할 수 있었다. $[\alpha]_D$ 측정결과에서 $+152^\circ$ ($c=0.15$, CHCl_3)로 확인되었고, 문헌(Arne, J. A., Bjarne K. L., and Curt, R. E. Absolute configuration of (9*R*)-9-hydroxy-4,7*E*-megastigmadien-3-one (3-oxo- α -ionol). *Acta chemica scandinavica* **27**, 2107-2114 (1973)에 나타난 값과 비교한 결과 6번과 9번의 입체구조를 결정지을 수 있었다. 따라서, 화합물 3은 (6*R*,7*E*,9*R*)-9-하이드록시-4,7-메가스티그마다이엔-3-온((6*R*,7*E*,9*R*)-9-hydroxy-4,7-megastigmadien-3-one)으로 구조 동정하였으며, 잠분에서는 처음으로 분리된 화합물이다.

[0092] 하기 표 3은 화합물 3의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD)스펙트럼의 결과를 나타낸 표이다. 그리고 도 3은 화합물 3의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[표 3]

No.	δ_C	δ_H (coupling pattern, J in Hz)
1	37.13	
2	48.36	2.04 (d, $J=16.8\text{ Hz}$) 2.39 (d, $J=16.8\text{ Hz}$)
3	201.72	
4	126.00	5.87 (s)
5	165.77	
6	56.62	2.66 (d, $J=9.2\text{ Hz}$)
7	127.02	5.57 (dd, $J=15.2, 9.2\text{ Hz}$)
8	140.07	5.69 (dd, $J=15.2, 6.0\text{ Hz}$)
9	68.70	4.27 (dt, $J=6.4, 6.0\text{ Hz}$)
10	23.82	1.23 (s)
11	27.33	0.99 (s)
12	28.09	1.02 (s)
13	23.75	1.93 (s)

[0094] [화합물 3]



[0096]

[0097]

2-5: 화합물 4의 구조 동정

[0098]

화합물 4, 노란 빛깔의 오일(yellowish oil, CHCl_3)은 얇은 막 크로마토그래피(TLC)에 전개시킨 후, 10% 황산을 분무하고 가열했을 때 갈색으로 발색되었다. EI/MS에서의 분자이온 피크(m/z 242, $[\text{M}]^+$)로부터 분자량이 242로 결정되었다. 적외선(IR) 스펙트럼에서 수산기(3410 cm^{-1})와 켄주게이트드-케톤(conjugated-ketone)(1674 cm^{-1}) 및 이중결합(1650 cm^{-1})을 확인하였다. 화합물 4는 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 신호가 화합물 2와 매우 유사하다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 스펙트럼에서 화합물 2와 다른 점은 옥시제네이티드-메타인 프로톤(oxygenated-methine proton)(δ 3.75, 1H, m) 신호와 메틸렌 프로톤(methylene proton)(δ 1.57, ddd, $J=12.8, 3.6, 2.0$ Hz; δ 1.26, dd, $J=12.8, 10.8$ Hz) 신호가 새로이 관측되어진 점이다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) 스펙트럼에서 13개의 신호가 관측되었는데, 저자장 영역을 제외하면 전체적인 신호의 양상이 화합물 2와 비슷하게 나타났다. 올레핀 탄소 신호 대신 δ 41.43에서 methylene carbon 신호와 δ 68.74에서 옥시제네이티드-쿼터너리 카본(oxygenated-quaternary carbon) 신호가 새로이 관측되어, 화합물 2의 4번과 5번 위치에서 수화반응이 일어난 것을 예상하였다. 또한 δ 64.34에서 관측된 옥시제네이티드 메타인 카본(oxygenated methine carbon) 신호는 화합물 2의 3번 위치에서 반응이 일어나 케톤에서 수산기로 변환된 것으로 추측하였다. 수산기 두 개의 결합 위치를 확인하기 위해 gCOSY, gHSQC 및 gHMBC 등의 2D-NMR을 측정하였다. gCOSY 스펙트럼에서 옥시제네이티드-메타인 프로톤(oxygenated-methine proton)(δ 3.75, H-3) 신호와 메틸렌 프로톤(methylene proton)[(δ 1.57, H-2a; 1.26, H-2b), (δ 2.31, H-4a; 1.65, H-4b)] 신호 사이에서 크로스 피크가 관측되어 C-3은 C-2와 C-4사이에 위치하는 것을 알 수 있었다. 또한, gHMBC 스펙트럼으로부터 옥시제네이티드-쿼터너리 카본(oxygenated-quaternary carbon)(δ 68.74, C-5)과 메틸렌 프로톤(methylene proton)(δ 2.31, H-4a; δ 1.65, H-4b) 신호 사이에서 크로스 피크가 관측되어 C-5에 수산기가 위치하는 것을 결정하였다. 또한, 입체구조를 결정하기 위해 $[\alpha]_D$ 값을 측정하였고, 문헌(Susan, J. B., Richard, M. E., and Alistair, L. W. Synthesis of ($\pm$)-E-4-(1,2,4-Trihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexyl)-but-3-en-2-one: A novel degraded carotenoid isolated from New Zealand Thyme (*Thymus vulgaris*) Honey. *Tetrahedron Letters* **33**, 3197-3200 (1992))에 나타난 값과 비교해 보았다. 그 결과 $[\alpha]_D^{-200^\circ}$ ($c=0.075$, CHCl_3)로 확인되었고, 화학이동도 값과 커플링 패턴을 비교한 결과로부터 화합물 4는 (3S,5R,6S,7E)-3,5,6-트리하이드록시-7-메가스티그멘-9-온((3S,5R,6S,7E)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one)으로 구조 동정 동정하였으며, 잠분에서는 처음으로 분리된 화합물이다.

[0099]

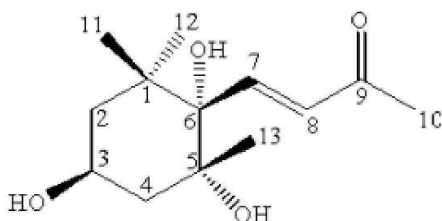
하기 표 4는 화합물 4의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD)스펙트럼의 결과를 나타낸 표이다. 그리고 도 4는 화합물 4의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[0100] [표 4]

No.	δ_c	δ_H (coupling pattern, J in Hz)
1	36.10	
2(eq) 2(ax)	47.64	1.57 (ddd, $J=12.8, 3.6, 2.0$ Hz) 1.26 (dd, $J=12.8, 10.8$ Hz)
3	64.34	3.75 (m)
4(eq) 4(ax)	41.33	2.31 (ddd, $J=14.4, 5.2, 1.6$ Hz) 1.65 (dd, $J=14.4, 9.2$ Hz)
5	68.74	
6	70.82	
7	145.22	7.16 (d, $J=15.6$ Hz)
8	133.68	6.17 (d, $J=15.6$ Hz)
9	199.99	
10	27.45	2.28 (s)
11	29.78	1.18 (s)
12	25.18	0.95 (s)
13	20.09	1.17 (s)

[0101]

[0102] [화합물 4]



[0103]

[0104] 2-6: 화합물 5의 구조 동정

[0105] 화합물 5, 노란 빛깔의 오일(yellowish oil, CHCl_3)은 얇은 막 크로마토그래피(TLC)에 전개하고, 10% 황산을 분무하고 가열했을 때 노란색으로 발색되었다. EI/MS에서의 분자이온 피크(m/z 210, $[M]^+$)로부터 분자량이 210으로 결정되었다. IR 스펙트럼에서 수산기(3410 cm^{-1})와 켄쥬게이티드 케톤(conjugated ketone)(1680 cm^{-1}) 및 쿼터너리 메틸(quaternary methyl)(976 cm^{-1})을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 스펙트럼에서 전체적인 양상이 화합물 2와 비슷하나 다른 점은 산화된 영역에서 메타인 프로톤(methine proton)(δ 3.69, 1H, m) 신호가 관측되었고, 고자장 영역에서는 메타인 프로톤(methine proton)(δ 1.97, 1H, t, $J=5.6$ Hz)과 메틸렌 프로톤(methylene proton)(δ 1.52, 2H, m; δ 1.43, 2H, m) 신호가 관측된 점이다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) 스펙트럼에서도 탄소 신호가 화합물 2와 비슷한 양상으로 나타났으나, 전체적으로 고자장 부근에 신호가 집중되어 나타났다. δ 27.3과 δ 39.7에서 메틸렌 카본(methylene carbon) 신호, δ 52.3에서 메타인 카본(methine carbon) 신호, δ 68.5에서 옥시제네이티드-메타인 카본(oxygenated-methine carbon) 신호가 관측되었다. 따라서, 화합물 5는 화합물 2의 사이드 체인에서 수소화 및 환원반응이 일어나 생성된 것으로 예상할 수 있었다. 이들의 부분구조를 결정짓기 위해 gCOSY 스펙트럼을 측정하였다. 그 결과 메틸 프로톤(methyl proton)(δ 1.16, H-10)과 옥시제네이티드-메타인 프로톤(oxygenated-methine proton)(δ 3.69, H-9) 신호 사이에서 크로스 피크가 관측되었고, H-9와 메틸렌 프로톤(methylene proton)(δ 1.52, H-8) 신호 사이에서 크로스 피크가 관측되어 8번, 9번 그리고 10번 프로톤(proton)의 위치를 결정할 수 있었다. 또한, H-8은 메틸렌 프로톤(methylene proton)(δ 1.43, H-7) 신호와 연관성을 보이고 H-7은 메타인 프로톤(methine proton)(δ 1.97, H-6) 신호 사이에서 크로스 피크를 보여 사이드 체인의 부분구조를 결정할 수 있었다. $[\alpha]_D^{25}$ 측정결과 -233° ($c=0.1$, CHCl_3)으로 확인되어 문헌(Bina, S. S., Fluzia, A. S., Ismail, T. G and Sabira, B. H. Isolation and structure determination of a benzofuran and a bis-nor-isoprenoid from aspergillus niger grown of the water soluble fraction of *Morinda Citrifolia* Linn. leaves. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **17**,

355-360 (2003))에 나타난 값과 비교하였고, NMR의 화학이동도와 커플링 패턴을 비교한 결과 화합물 5는 (6*R*,9*R*)-9-하이드록시-2-메가스티그멘-3-온((6*R*,9*R*)-9-hydroxy-4-megastigmen-3-one)으로 구조 동정하였으며, 잠분에서는 처음으로 분리되었다.

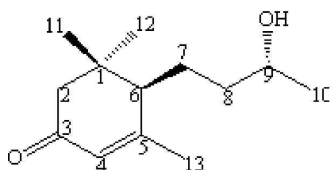
[0106] 하기 표 5는 화합물 5의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD)스펙트럼의 결과를 나타낸 표이다. 그리고 도 5는 화합물 5의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[0107] [표 5]

No.	δ_{C}	δ_{H} (coupling pattern, J in Hz)
1	37.32	
2	47.99	2.44 (d, $J=17.6$ Hz) 1.98 (d, $J=17.6$ Hz)
3	202.00	
4	125.27	5.88 (s)
5	169.57	
6	52.31	1.97 (t, $J=5.2$ Hz)
7	27.29	1.43 (m)
8	39.70	1.52 (m)
9	68.50	3.69 (tq, $J=6.0, 6.4$ Hz)
10	23.60	1.16 (d, $J=6.4$ Hz)
11	27.48	1.09 (s)
12	29.04	1.01 (s)
13	24.86	2.03 (s)

[0108]

[0109] [화합물 5]



[0110]

[0111] 실시예 3: 플라벤(flavane)계의 분리 및 동정

[0112] 3-1: 플라벤계의 분리

[0113] SDE-18(985 mg, Ve/Vt 0.24-0.35) 분획에 대해 실리카 겔 크로마토그래피(ϕ 4.5 × 14 cm, CHCl_3 -MeOH = 10:1)를 실시하여 각 20 ml씩 분취하였다. 각 분취액에 대해 얇은 막 크로마토그래피(CHCl_3 -MeOH = 6:1)로 확인하여 유사한 분획을 모으고 농축한 후 8개의 분획물(SDE-18-1~SDE-18-8)을 얻었고, 이 중 SDE-18-2(156 mg, Ve/Vt 0.62-0.74) 분획을 ODS 컬럼 크로마토그래피(ϕ 2.5 × 5.5 cm, MeOH- H_2O = 3:4)로 정제하여 9개의 분획물(SDE-18-6-1~18-6-9)을 얻었다. 이 중에서 화합물 6[SDE-18-6-2, 11 mg, Ve/Vt 0.12-0.17, TLC(ODS F₂₅₄S) MeOH- H_2O = 2:1, R_f 0.70]을 분리하였다.

[0114] 3-1-1: 화합물 6(7-hydroxy-8-ethanol-4'-methoxy-2'-*O*- β -D-glucopyranosylflavane)

[0115] 무색 오일(CD_3OD); $[\alpha]_{\text{D}}^{25.8}$ -54.6($c=0.3$, methanol); negative FAB-MS m/z : 477[M-1]⁺; IR(window, cm^{-1}): 3364, 2915, 1609, 1075; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): (표 6, 도 6); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): (표 6, 도 6)

[0116] 3-2: 화합물 6의 구조 동정

[0117] 화합물 6, 노란 빛깔 오일(yellowish oil)은 얇은 막 크로마토그래피에 전개하였을 때, UV(254 nm)에서 강한 흡수를 보였으며, 10% 황산을 분무하고 가열하면 보라색으로 발색되었다. 네거티브 FAB-MS 측정 결과 분자이온피크 $[M-1]^+$ 가 m/z 477로 측정되어 분자량이 478임을 확인하였다. 적외선(IR) 스펙트럼으로부터 수산기(3364 cm^{-1})와 벤젠고리(1609 cm^{-1})가 존재하는 것을 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 스펙트럼의 올레핀 영역에서 5개의 메타인 프로톤(methine proton)(δ 7.33, 1H, d, $J=8.8\text{ Hz}$; 6.83, 1H, d, $J=2.1\text{ Hz}$; 6.75, 1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$; 6.62, 1H, dd, $J=8.8, 2.1\text{ Hz}$; 6.32, 1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$) 신호가 관측되었다. 이 중에서 J 값이 8.8 Hz인 δ 7.33, 6.62 그리고 8.0 Hz인 δ 6.75, 6.32는 서로 간에 인접 커플링(vicinal coupling)하고, J 값이 2.1 Hz인 δ 6.83과 δ 6.62는 롱 레인지 커플링(long range coupling)하는 것을 알 수 있었다. 따라서 1,2,3,4-치환 벤젠고리와 1,2,4-3치환 벤젠고리가 각각 한 개씩 존재할 것으로 추정하였다. 수산기 치환영역에서는 옥시제네이티드-메타인 프로톤(oxygenated-methine proton)(δ 5.49, 1H, dd, $J=9.6, 1.0\text{ Hz}$), oxygenated-methylene proton(δ 3.67, m) 그리고 메톡시 프로톤(methoxy proton)(δ 3.78, 3H, s) 신호가 각각 한 개씩 관측되었다. 또한, 3개의 메틸렌 프로톤(methylene proton)(δ 2.88, 2H, m; 2.60, 2H, m; 2.13, 1H, m; 1.82, 1H, m) 신호가 관측됨에 따라 두 개의 메틸렌(methylene)으로부터 플라벤(flavane) 골격을 예상하였고, 나머지 메틸렌과 옥시제네이티드-메틸렌(oxygenated-methylene)으로부터 에탄올 한 분자를 예상하였다. δ 4.89에서 헤미아세탈 프로톤(hemiacetal proton) 신호가 1개 관측되었는데, 커플링 상수(coupling constant) 값이 7.2 Hz인 점과 4개의 옥시제네이티드 메타인 프로톤(oxygenated methine proton)(δ 3.45, 3.44, 3.43, 3.38) 그리고 1개의 옥시제네이티드 메틸렌 프로톤(oxygenated methylene proton)(δ 3.91; 3.70) 신호가 관측된 점으로부터 당 한분자가 β 결합하는 것을 알 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 24개의 탄소 신호가 관측되었다. 에틸 알콜(ethyl alcohol)로부터 유래된 옥시제네이티드-메틸렌 카본(oxygenated-methylene carbon)(δ 62.64), 메틸렌 카본(methylene carbon)(δ 27.67) 신호와 메톡시(methoxy) 한 분자에서 유래된 메톡시 카본(methoxy carbon)(δ 55.83) 신호가 관측되었다. 또한, 아노머 카본(anomer carbon)(δ 102.92) 신호와 산소치환 영역에서 관측되는 4개의 옥시제네이티드 메타인 카본(oxygenated methine carbon)(δ 78.24, 78.19, 74.93, 71.40) 신호 및 1개의 옥시제네이티드 메틸렌 카본(oxygenated methylene carbon)(δ 62.57) 신호의 화학이동도 값을 문헌(Bina, S. S., Fluzia, A. S., Ismail, T. G and Sabira, B. H. Isolation and structure determination of a benzofuran and a bis-nor-isoprenoid from aspergillus niger grown of the water soluble fraction of *Morinda Citrifolia* Linn. leaves. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **17**, 355-360 (2003))에 나타난 값과 비교하여 β -D-글루코피라노오스(β -D-glucopyranose)로 구조 결정하였다. 총 24개의 탄소 수에서 에탄올 1분자, 메톡시 1분자, 당 1분자의 탄소 수를 제외하면 15개이므로 플라보노이드(flavonoid) 골격을 예상하였다. 올레핀 영역에서 4개의 옥시제네이티드-올레핀 쿼터너리 카본(oxygenated-olefine quaternary carbon)(δ 161.31, 156.13, 155.47, 155.17), 3개의 올레핀 쿼터너리 카본(olefine quaternary carbon)(δ 125.38, 114.43, 113.38) 그리고 5개의 올레핀 메타인 카본(olefine methine carbon)(δ 128.23, 127.90, 108.84, 108.40, 103.10) 신호가 관측되어, 벤젠 고리 두 개가 존재하는 것을 알 수 있었다. 이밖에 1개의 옥시제네이티드-메타인 카본(oxygenated-methine carbon)(δ 73.55)과 2개의 메틸렌 카본(methylene carbon)(δ 30.36, 25.77) 신호가 관측된 점으로 미루어 보아, 플라벤(flavane) 화합물로 추측하였다. 위의 내용을 종합해 볼 때, 플라벤 골격에 에틸 알콜(ethyl alcohol), 메톡시(methoxy) 그리고 글루코오스(glucose)가 한 분자씩 결합된 것을 알 수 있었다. C-2의 입체구조를 결정하기 위해 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 화학이동도 값과 $^1\text{H-NMR}$ 의 커플링 상수(coupling constant)값을 문헌(Kikuchi, H., Takahashi, N. and Oshima, Y. Novel aromatics bearing 4-*O*-methylglucose unit isolated from the oriental crude drug *Bombyx Batryticatus*. *Tetrahedron Lett.* **45**, 367-370 (2004))에 나타난 값과 비교한 결과, δ 73.55(C-2)와 $J=9.6, 1.0\text{ Hz}$ (H-2)로 문헌과 유사한 값을 나타내어, 2번 위치에서 α -결합된 화합물로 결정하였다. 또한, gHMBC 실험을 통해 에틸알콜과 글루코오스의 결합위치를 결정하였다. 2개의 메틸렌 프로톤(methylene proton) 신호(δ 2.88, H-1"; 2.13, Ha-4; 1.82, Hb-4)와 올레핀 쿼터너리 카본(olefine quaternary carbon) 신호(δ 155.17, C-8a) 사이에서 크로스 피크가 관측되어, 에틸 알콜(ethyl alcohol)은 C-8 위치에 결합된 것을 알 수 있었다. 아노머 프로톤(anomer proton)인 δ 4.89(H-1''')는 옥시제네이티드-올레핀 쿼터너리 카본(oxygenated-olefine quaternary carbon) 신호(δ 156.13, C-2')와의 연관(correlation)이 확인되어 C-2' 위치에 글루코오스(glucose)가 결합된 것으로 결정하였다. 화합물 6은 7-하이드록시-8에탄올-4'-메톡시-2'-*O*- β -

D-글루코피라노실프라벤(7-hydroxy-8-ethanol-4'-methoxy-2'-O-β-D-glucopyranosylflavane)으로 구조 결정하였고, 잠분으로부터 처음 분리된 신규 화합물이다.

[0118] 하기 표 6은 화합물 6의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD)스펙트럼의 결과를 나타낸 표이다.

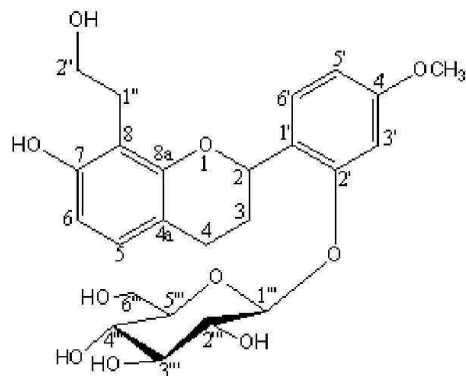
그리고 도 6은 화합물 6의 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[0119] [표 6]

No.	δ_{C}	δ_{H} (coupling pattern, J in Hz)
2	73.55	5.49 (dd, $J=9.6, 1.0$ Hz)
3	30.36	2.60 (m)
4	25.77	2.13 (m) 1.82 (m)
5	128.23	6.75 (d, $J=8.0$ Hz)
6	108.40	6.32 (d, $J=8.0$ Hz)
7	155.47	
8	113.38	
1'	125.38	
2'	156.13	
3'	103.10	6.83 (d, $J=2.1$ Hz)
4'	161.31	
5'	108.84	6.62 (dd, $J=8.8, 2.1$ Hz)
6'	127.90	7.33 (d, $J=8.8$ Hz)
4a	114.43	
8a	155.17	
4'-OMe	55.83	3.78 (s)
1''	27.67	2.88 (m)
2''	62.64	3.67 (m)
1'''	102.92	4.89 (d, $J=7.2$ Hz)
2'''	71.40	3.44 (m)
3'''	78.19	3.45 (m)
4'''	78.24	3.43 (m)
5'''	74.93	3.38 (m)
6'''	62.57	3.91 (dd, $J=12.0, 2.0$ Hz) 3.70 (dd, $J=12.0, 6.0$ Hz)

[0120]

[0121] [화합물 6]



[0122]

[0123] 실시예 4: 리그난(lignan)계의 분리 및 동정

[0124] 4-1: 리그난계의 분리

[0125] *n*-BuOH 분획(26 g)으로부터 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(ϕ 7×15 cm, CHCl₃-MeOH = 3:1)를 실시하여 각 25 mL씩 분취하였다. 각 분취액에 대해 얇은 막 크로마토그래피(CHCl₃-MeOH = 2:1)로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 11개의 분획물(SDB-1~SDB-11)을 얻었다. 그 중 SDB-3 분획[2.6 g, Ve/Vt 0.17-0.22]에 대하여 실리카겔 크로마토그래피(ϕ 4.5 × 15 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O = 15:3:1)를 실시하여 9개의 분획(SDB-3-1~SDB-3-9)을 얻었다. SDB-3-6 분획(703 mg, Ve/Vt 0.58-0.78)에 대하여 다시 Sephadex LH-20 c.c.(ϕ 2.5 × 40 cm, 30% MeOH)를 실시하여 10개의 분획(SDB-3-6-1~SDB-3-6-10)으로 나누었고 그 결과, 화합물 7[SDB-3-6-7, 9 mg, Ve/Vt 0.44-0.50, TLC(ODS F_{254s}) R_f 0.5, MeOH-H₂O = 2:3]을 분리하였다.

[0126] **4-1-1: 화합물 7(lariciresinol-4-O- β -D-glucopyranoside)**

[0127] 비정형 파우더(MeOH); $[\alpha]_D^{19}$ -18.2° ($c=1.1$, ethanol); 네거티브 FAB-MS m/z : 521[M-1]⁺; IR(KBr, cm⁻¹): 3400, 2920, 1650, 1500, 1440, 1355, 1265, 1150, 1070, 1025, 820; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD): (표 7, 도 7); ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD): (표 7, 도 7)

[0128] **4-2: 화합물 7의 구조 동정**

[0129] 화합물 7, 노란 빛깔 오일(yellowish oil)은 얇은 막 크로마토그래피에 전개하였을 때, UV(254 nm)에서 강한 흡수를 보였으며, 10% 황산을 분무하고 가열하면 남색으로 발색되었다. 네거티브 FAB-MS 측정 결과를 통해 분자이온피크 [M-1]⁺가 m/z 521로 측정되어 분자량이 522임을 확인하였다. IR 측정 결과 수산기(3400 cm⁻¹)와 벤젠고리(1500 cm⁻¹)가 존재하는 것을 알 수 있었다. ¹H-NMR 스펙트럼의 올레핀(olefine) 영역에서 관측되는 6개의 메타인 프로톤(methine proton)(δ 7.14, 1H, d, $J=8.4$ Hz; 6.98, 1H, d, $J=1.6$ Hz; 6.88, 1H, dd, $J=8.4$, 1.6 Hz; 6.78, 1H, d, $J=2.0$ Hz; 6.73, 1H, d, $J=8.0$ Hz; 6.64, 1H, dd, $J=8.0$, 2.0 Hz) 신호로부터 두 개의 1,2,4-3치환 벤젠고리가 존재하는 것을 예측하였다. 한 개의 옥시제네이티드-메타인 프로톤(oxygenated-methine proton)(δ 4.83, 1H, d, $J=6.4$ Hz)과 두 개의 옥시제네이티드-메틸렌 프로톤(oxygenated-methylene proton)(δ 3.99, 1H, dd, $J=8.0$, 6.4 Hz; 3.78, 1H, overlapped; 3.73, 1H, dd, $J=8.4$, 6.4 Hz; 3.64, 1H, dd, $J=11.2$, 6.8 Hz) 신호가 관측되었다. 이 중에서 이중(geminal)(J^2) 커플링하는 δ 3.99와 δ 3.73 신호의 커플링 상수값(coupling constant)이 8.4 Hz로 확인되어 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran)의 고리에서 기인하는 옥시제네이티드-메틸렌 프로톤(oxygenated-methylene proton)임을 예상하였고, δ 3.78와 δ 3.64의 커플링 상수(coupling constant) 값이 11.2 Hz로 나타나는 것으로부터 체인에서 기인하는 옥시제네이티드-메틸렌 프로톤(oxygenated-methylene proton)임을 예상하였다. δ 4.87에서 한 개의 헤미아세탈 프로톤(hemiacetal proton) 신호가 7.6 Hz로 관측되었고, 옥시제네이티드-메타인 프로톤(oxygenated-methine proton)(δ 3.47, 1H, m; 3.45, 1H, m; 3.39, 1H, m; 3.38, 1H, m; 3.38, 1H, m) 신호와 옥시제네이티드-메틸렌 프로톤(oxygenated-methylene proton)(δ 3.87, 1H, $J=14.0$, 7.2 Hz; 3.67, 1H, $J=14.0$, 7.2 Hz) 신호가 관측된 점으로부터 당 한 분자가 β -결합하고 있는 것을 알 수 있었다. 또한, δ 3.82과 δ 3.85에서는 methoxy proton 신호가 관측되었다. 고자장 영역에서는 2개의 메타인 프로톤(methine proton)(δ 2.73, 1H, m; 2.35, 1H, m)과 1개의 메틸렌 프로톤(methylene proton)(δ 2.92, 1H, dd, $J=13.2$, 4.8 Hz; 2.52, 1H, dd, $J=13.2$, 11.2 Hz) 신호가 관측되어 리그난(lignan)화합물로 추정하였다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 26개의 탄소 신호가 관측되었다. 아노머 탄소(anomer carbon)를 포함하여 당부에서 유래된 6개의 신호와 2개의 메톡시 카본(methoxy carbon) 신호를 제외하면 탄소 수 18개로 화합물 7은 리그난 배당체 화합물로 추정되었다. 저자장 영역인 δ 150.67, 148.85, 145.70 그리고 δ 139.37에서 옥시제네이티드-올레핀 쿼터너리 카본(oxygenated-olefine quaternary carbon)이 관측되었고, δ 133.36과 δ 122.01에서는 올레핀 쿼터너리 카본(olefine quaternary carbon) 신호가 관측되었다. 또한, δ 122.01, 119.44, 117.79, 116.09, 113.27 및 δ 111.22에서 올레핀 메타인 카본(olefine methine carbon) 신호가 관측되어 올레핀 영역에서 총 12개의 탄소 신호가 확인 된 점으로부터 벤젠고리 두 개가 존재하는 것을 예측하였다. 1개의 옥시제네이티드-메타인 카본(oxygenated-methine carbon)(δ 83.77, C-7) 신호와 2개의 옥시제네이티드-메틸렌 카본(oxygenated-methylene carbon)(δ 73.62, C-9'; 60.47, C-9) 신호가 관측되었고, 고자장 영역에서는 2개의 methine

carbon(δ 54.12, C-8; 43.81, C-8') 신호와 1개의 메틸렌 카본(methylene carbon) 신호(δ 33.63, C-7')가 관측되었다. 아노머 탄소 신호(δ 02.79, C-1")와 산소치환 영역에서 관측되는 당부에서 유래한 신호(δ 78.15, 77.80, 74.88, 71.31, 62.49)의 화학이동도 값을 문헌과 비교하여 β -D-글루코피라노스(β -D-glucopyranose)로 결정하였다. 또한, δ 56.70과 δ 56.38에서는 두 개의 메톡시 탄소 신호가 관측되었다. 탄소의 다중도는 gHSQC와 DEPT 기법으로 확인하였고, 관능기나 치환기의 결합위치는 gHMBC와 gCOSY 스펙트럼으로부터 결정하였다. gCOSY 스펙트럼에서 메타인 프로톤(methine proton) 신호(δ 2.35, H-8)는 옥시제네이티드-메틸렌 프로톤(oxygenated-methylene proton) 신호(δ 3.78, H-9a; 3.64 H-9b) 및 메타인 프로톤(methine proton) 신호(δ 2.73, H-8') 사이에서 연광성(correlation)을 보여주었고, 메타인 프로톤(methine proton) 신호(δ 2.73, H-8')는 옥시제네이티드-메틸렌 프로톤(oxygenated-methylene proton) 신호(δ 3.99, H-9'a; 3.73, H-9'b)와 메틸렌 프로톤(methylene proton) 신호(δ 2.92, H-7'b; 2.52, H-7'a) 사이에서 크로스 피크를 보여주었다. 따라서, 두 프로판의 부분 구조를 예상하였으며 H-8과 H-8' 사이에서 연관(correlation)을 확인하여 페닐프로판노이드(phenylpropanoid) 간의 축합 연결고리 위치를 결정할 수 있었다. gHMBC 스펙트럼에서 메톡시 프로톤(methoxy proton) 신호인 δ 3.85과 δ 3.82는 옥시제네이티드 메타인 카본(oxygenated methine carbon) 신호(δ 150.67, C-3; 148.85, C-3')와의 연관(correlation)을 보여주어 각각의 메톡시(methoxy)기 결합 위치를 결정하였다. 아노머 프로톤(anomer proton) 신호(δ 4.87, H-1")와 옥시제네이티드 올레핀 쿼터너리 카본(oxygenated olefine quaternary carbon) 신호(δ 147.11, C-4) 사이에서 크로스 피크(cross peak)가 관측되어 당의 결합 위치를 결정하였다. 이와 같은 결과를 종합하여 라리시레시놀(lariciresinol)의 4번 수산기에 글루코피라노오스(glucopyranose) 한분자가 β -결합한 라리시레시놀-4-O- β -D-글루코피라노사이드(lariciresinol 4-O- β -D-glucopyranoside)로 동정하였다. 이 화합물은 잠분에서는 처음 분리 동정된 화합물이다.

[0130]

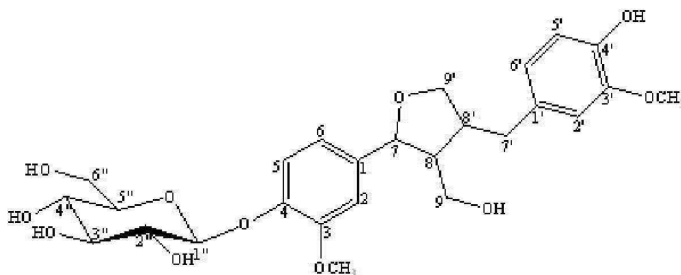
하기 표 7은 화합물 7의 H-NMR(400 MHz, CD₃OD) 및 ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD)스펙트럼의 결과를 나타낸 표이다. 그리고 도 7은 화합물 7의 ¹H-NMR (400 MHz) 및 ¹³C-NMR (100 MHz) 스펙트럼의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[0131] [표 7]

No.	δ_c	δ_H (coupling pattern, J in Hz)
1	139.37	
2	111.22	6.98 (d, $J=1.6$ Hz)
3	150.67	
4	147.11	
5	117.79	7.14 (d, $J=8.4$ Hz)
6	119.44	6.88 (dd, $J=8.4, 1.6$ Hz)
7	83.77	4.83 (d, $J=6.4$ Hz)
8	54.12	2.35 (m)
9	60.47	3.78 (dd, $J=11.2, 2.4$ Hz) 3.64 (dd, $J=11.2, 6.8$ Hz)
1'	133.36	
2'	113.27	6.78 (d, $J=2.0$ Hz)
3'	148.85	
4'	145.70	
5'	116.09	6.73 (d, $J=8.0$ Hz)
6'	122.01	6.64 (dd, $J=8.0, 2.0$ Hz)
7'	33.63	2.92 (dd, $J=13.2, 4.8$ Hz) 2.52 (dd, $J=13.2, 11.2$ Hz)
8'	43.81	2.73 (m)
9'	73.62	3.99 (dd, $J=8.4, 6.4$ Hz), 3.73 (dd, $J=8.4, 6.4$ Hz)
3-OCH ₃	56.38	3.85 (s)
3'-OCH ₃	56.70	3.82 (s)
1''	102.79	4.87 (d, $J=7.6$ Hz)
2''	74.88	3.45 (m)
3''	77.80	3.47 (m)
4''	78.15	3.39 (m)
5''	71.31	3.38 (m)
6''	62.49	3.87 (dd, $J=14.0, 7.2$ Hz) 3.67 (dd, $J=14.0, 4.2$ Hz)

[0132]

[0133] [화합물 7]



[0134]

[0135] 시험예 1: 험 옥시게나제- 1의 발현 증가 활성 측정

[0136] HepG2 세포(Korean cell line bank)를 1×10^6 cells/well 농도로 하여 6웰 플레이트(well plate) 위에서 37 °C로 배양하였다. 24 시간 후에 상기 실시예에서 언급한 화합물 1 내지 7을 처리하고 16 시간 동안 배양하였다. 1×10^6 농도로 셀을 두 번 씻고 PBS를 1 ml 넣어 14,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 가라앉은 셀을 50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% 트리톤 X-100, 프로테아제 저해제 콕테일(protease inhibitor cocktail)과 소듐 바나듐산염(sodium vanadate)로 구성된 TEN 버퍼 100 μ l로 용해시켰다. 12 % SDS-폴리아실아마이드 겔(SDS-polyacrylamide gel)에 용해물인 단백질을 로딩시키고 전기영동으로 분리하였다. 겔에서 단백질은 0.2 μ m PVDF 멤브레인(Millipore, MA, USA)을 이용하여 이동시켰다. 항체의 희석율을 1:1000으로 하여 anti-HO-1을 프라이머리 항체(Stressgene, MI, USA)와 함께 인큐베이션 안에 밤새 넣어 두었다. 바운드 항체는 HRP(horseradish peroxidase)에 연결된 2차 항체를(Amersham Pharmacia Biotech,

Uppsala, Sweden)를 사용하여 검출하였다.

[0137] 도 8은 잠분으로부터 분리된 화합물 1 내지 7의 헵 옥시게나제- 1 발현 활성을 SDS-폴리아실아마이드 겔 전기영동을 이용하여 조사한 결과를 나타낸 것이다. 그 결과 화합물 1 내지 7은 20 μ M로 처리시 활성을 나타냈으며, 그 중 화합물 1과 화합물 6은 5 μ M의 농도에서 헵 옥시게나제- 1의 발현을 더욱 증가시키는 것으로 나타났다. 이것은 잠분에서 분리된 단일 물질에 의해 항염증과 관련된 헵 옥시게나제-1의 발현이 증가됨에 따라서, 잠분의 추출물이 염증을 억제하는 효과 및 아토피 증상을 치료하는 효과가 있음을 나타낸다.

[0138] 시험예 2: 시르투인1 발현 증가 활성 측정

[0139] 인간의 정상적인 신장 세포인 HEK293 cell을 1×10^6 cells/well 농도로 하여 6-웰 플레이트(well plate) 위에서 37 $^{\circ}$ C로 배양하였다. 시르투인1을 타겟으로 발현양이 증가하도록, 상기 실시예에서 언급한 화합물 1 내지 7을 처리하여 16 시간 동안 배양하였다. 그 후 PBS 1 ml을 넣어 14,000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 가라앉은 셀을 50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% 트리톤 X-100, 프로테아제 저해제 콕테일(protease inhibitor cocktail)과 소듐 바나듐산염(sodium vanadate)로 구성된 TEN 버퍼 100 μ l로 용해시켰다. 8 % SDS-폴리아실아마이드 겔(SDS-polyacrylamide gel)에 용해물인 단백질을 로딩시키고 전기영동으로 분리하였다. 겔에서 단백질은 0.2 μ m PVDF 멤브레인(Millipore, MA, USA)을 이용하여 이동시켰다. 항체의 희석율을 1:1000으로 하여 안티-시르투인1을 프라이머리 항체(Millipore, MA, USA)와 함께 인큐베이션 안에서 밤새 넣어 두었다. 바운드 항체는 HRP(horseradish peroxidase)에 연결된 2차 항체를(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 사용하여 검출하였다.

[0140] 도 9는 잠분으로부터 분리된 화합물 1 내지 7의 시르투인1의 발현 활성을 SDS-폴리아실아마이드 겔 전기영동을 이용하여 조사한 결과를 나타낸 것이다. 그 결과 화합물 1 내지 5은 20 μ M로 처리시 증가 활성을 나타냈으며, 그 중 화합물 5는 낮은 농도의 처리에서도 시르투인1 발현에 대해 증가 활성을 나타냈다. 이를 통해 화합물 5는 염증을 치료함으로써 아토피 증상을 개선시키는 데에 효과가 있음을 알 수 있다.

[0141] 제조예: 잠분 추출물을 포함하는 피부 외용제 조성물 제조

[0142] A: 잠분 추출물을 함유한 크림

[0143] 잠분 추출물을 함유한 크림의 제조예는 하기 표 8에 나타난 바와 같다. 수상인 정제수, 트리에탄올아민, 글리콜(1,3-Propanediol)을 70 $^{\circ}$ C로 가열하고 용해시키고, 여기에 유상인 지방산, 유성성분, 유화제 및 방부제를 70 $^{\circ}$ C로 가열하여 용해한 액을 첨가하여 유화시킨다. 유화가 완료된 후 상기 용액을 45 $^{\circ}$ C로 냉각시키고 실시예 1에서 얻은 잠분 추출물과 향을 첨가하고 분산시킨 다음 30 $^{\circ}$ C로 냉각한다.

[0144] [표 8]

성분	함량 (중량%)
잠분 추출물	5.10
호호바 오일	5.00
유동파라핀	7.00
세틸아릴 알코올	2.00
폴리글리세릴-3 메칠 글루코스 디스테아레이	2.00
글리세릴스테아레이트	0.50
스쿠알란	3.00
프로필렌글리콜	4.00
글리세린	5.00
트리에탄올 아민	0.30
카르복시 비닐폴리머	0.30
토코페릴 아세테이트	0.20
프로필파라벤 및 인공향료 및 황색 4호	0.10
정제수	65.5
합계	100

[0145]

[0146] B: 잠분 추출물을 함유한 겔

[0147] 잠분 추출물을 함유한 겔의 제조예는 하기 표 9에 나타난 바와 같다.

[0148] [표 9]

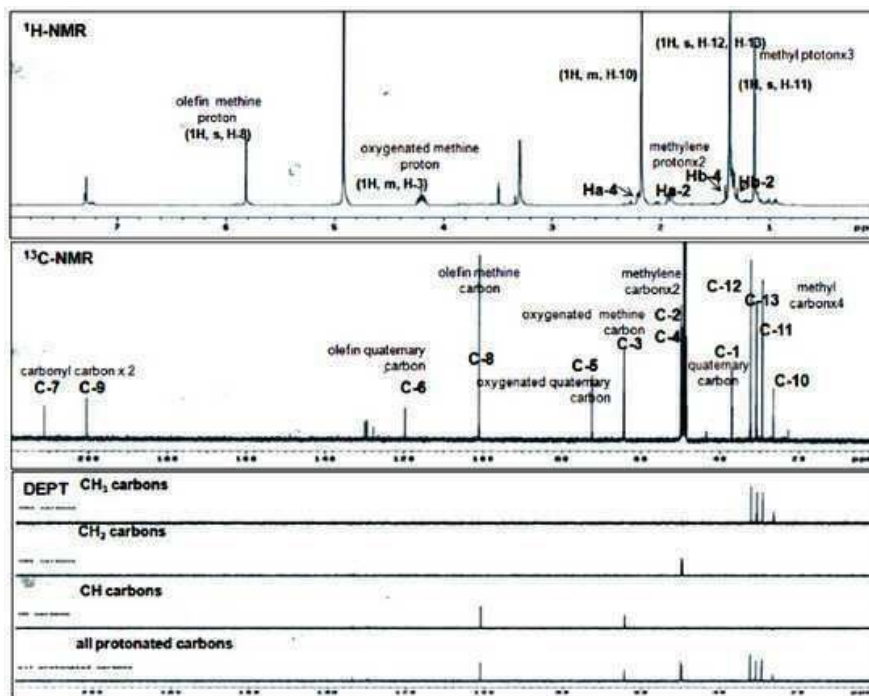
성분	함량 (중량%)
잠분 추출물	5.10
글리세린	5.00
카보머	0.60
EDTA	0.02
1,3 부틸렌 글라이콜	4.00
하이드록시에틸 셀룰로오스	0.15
트리에탄올 아민	0.50
트리클로산	0.20
에탄올	5.00
폴리옥시 에틸렌 하이드로제네이티드 캐스터오일	4.00
프로필파라벤 및 인공향료 및 황색 4호	0.10
정제수	75.33
합계	100

[0149]

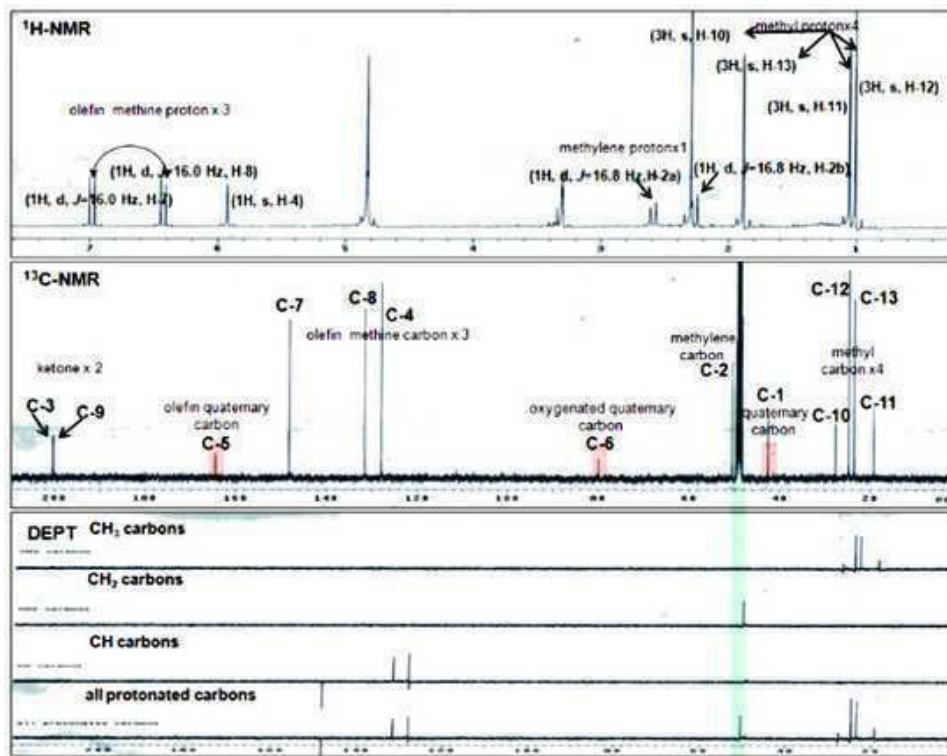
[0150] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

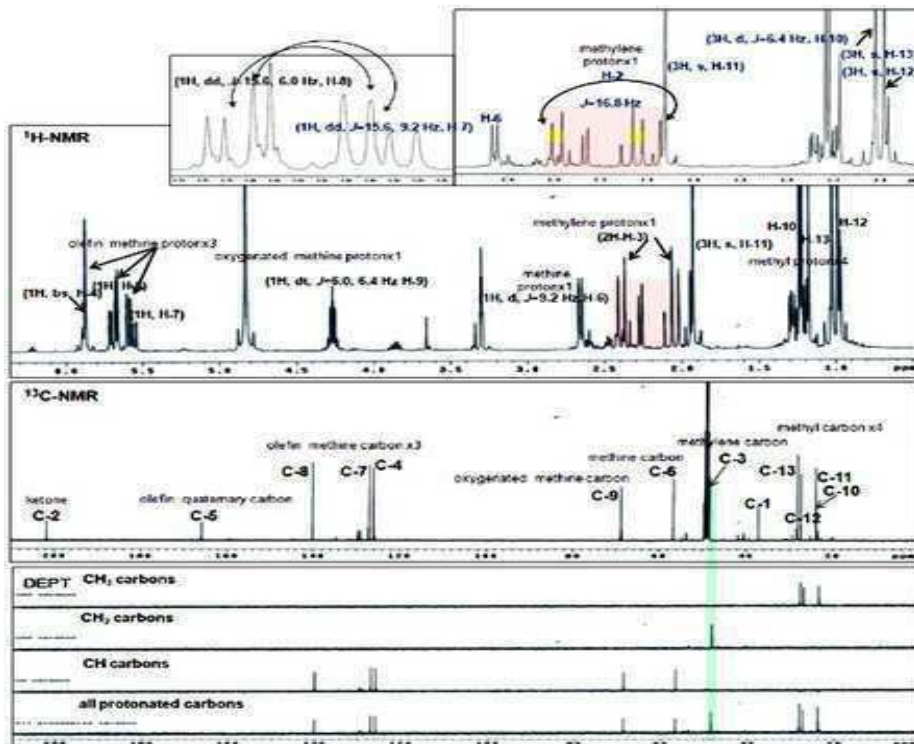
도면1



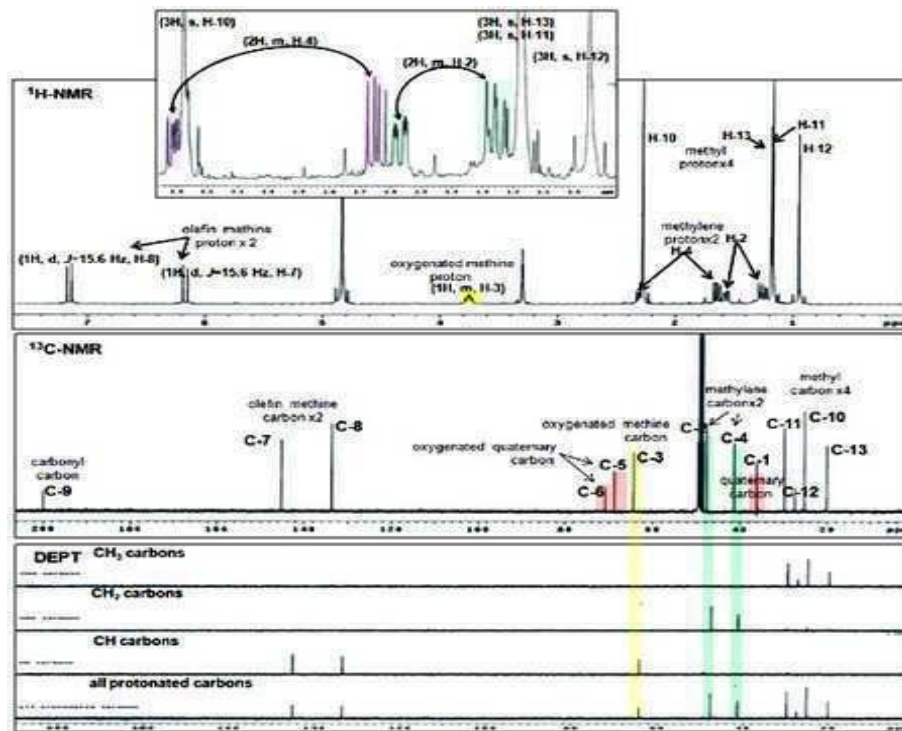
도면2



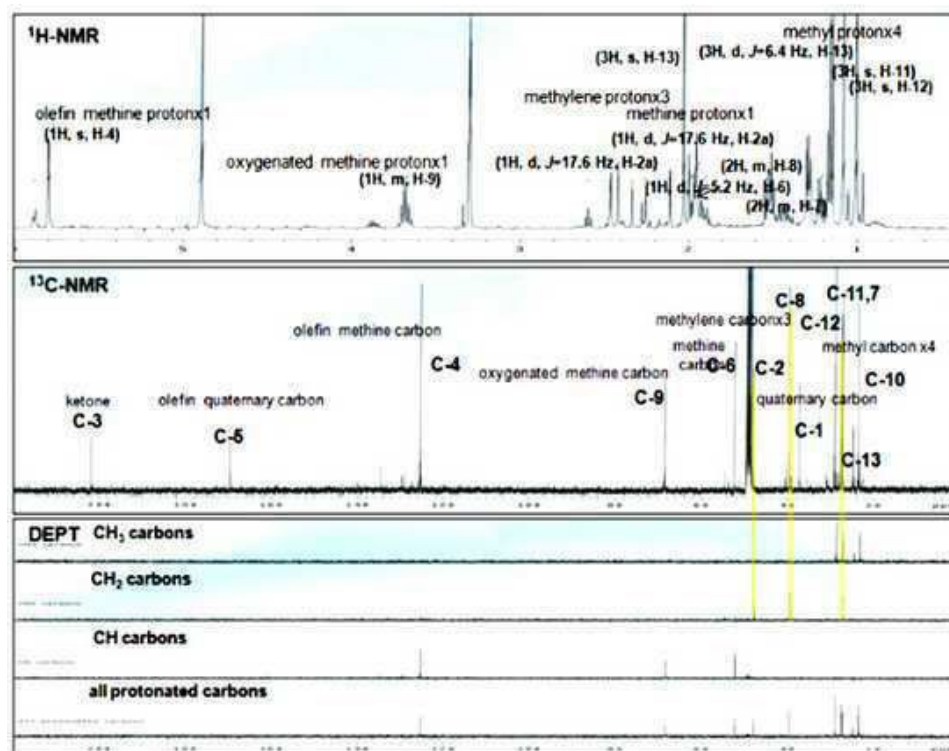
도면3



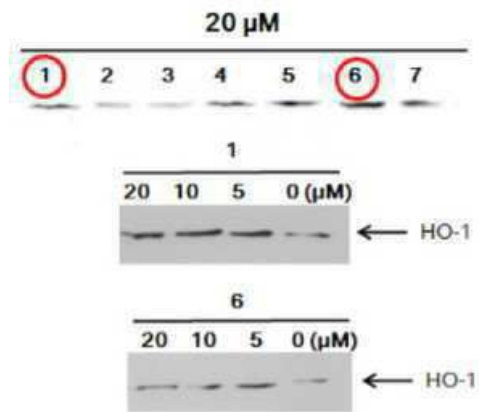
도면4



도면5



도면8



도면9

