



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월01일
(11) 등록번호 10-1424032
(24) 등록일자 2014년07월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A61K 31/192 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0040162
(22) 출원일자 2013년04월12일
심사청구일자 2013년04월12일
(56) 선행기술조사문헌
Kang, M.-S. et al. Biofactors (2009) vol.35,
no.5, pp.442-448
Gonzalez, M.A. et al. European Journal of
Medicinal Chemistry (2010) vol.45 pp.811-816
KR100882780 B1

- (73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
정현숙
광주광역시 북구 설죽로 595 롯데아파트 107동
404호
우희권
광주광역시 북구 호동로 99 우성아파트 101동 50
9호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 윤재욱

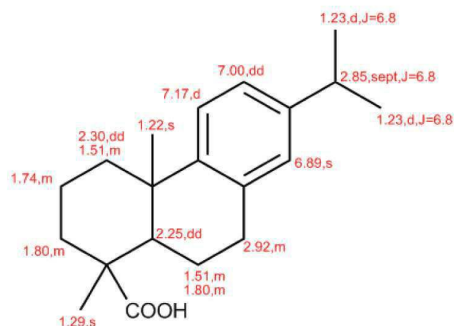
(54) 발명의 명칭 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 유효성분으로 함유하는 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강식품 조성물

(57) 요약

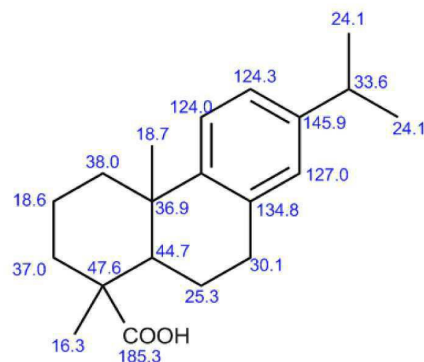
본 발명은 솔잎으로부터 안지오텐신 전환효소에 억제 활성을 가지는 분획물을 선별하고 가장 활성이 좋은 물질을 선별하여 구조를 동정하여 디하이드로아비어트산(dehydroabiestic acid) 및 코문산(communic acid)임을 확인하고, 이를 유효성분으로 함유하는 고혈압 예방 또는 개선용 식품 조성물, 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물, 안지오텐신 전환효소 억제제 및 혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 솔잎 유래의 디하이드로아비어트산 또는 코문산의 경우 안지오텐신 전환효소 억제 활성을 가지므로, 소비자들의 건강에 유익한 조성물로 제공될 뿐만 아니라, 본 발명에서 구체적인 추출·분획 방법을 제시하므로 솔잎에 다량 함유되어 있고 활성도 뛰어난 물질을 제공받아 경제적인 고기능성의 원료로 활용할 수 있을 것이다.

대표도 - 도6

A.



B.



(72) 발명자

박재영

광주광역시 남구 수박등로18번길 10-6, 201호(월산동, 광남빌라)

이범기

전라남도 광양시 공영로 39 호반리젠시빌아파트 102동 1105호

김성심

광주광역시 광산구 풍영로 63 영천마을주공9단지아파트 914동 1403호

김웅

광주광역시 동구 지산로57번길 6, 207호(지산동)

최학준

광주광역시 동구 동계로15번길 1-23 (동명동)

특허청구의 범위

청구항 1

디하이드로아비르트산(dehydroabietic acid) 또는 코문산(communic acid)을 유효성분으로 함유하는 고혈압 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 디하이드로아비르트산 또는 코문산은 솔잎 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 디하이드로아비르트산 또는 코문산은 안지오텐신 전환효소(angiotensin-converting enzyme) 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 4

디하이드로아비르트산(dehydroabietic acid), 코문산(communic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 디하이드로아비르트산 또는 코문산은 솔잎 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 디하이드로아비르트산 또는 코문산은 안지오텐신 전환효소(angiotensin-converting enzyme) 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 솔잎 유래의 생리활성물질인 디하이드로아비르트산(dehydroabietic acid) 및 코문산(communic acid)의 신규한 용도인 고혈압 예방 또는 개선용 식품 조성물, 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물, 안지오텐신 전환효소 억제제 및 혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 고혈압(hypertension)은 여러번 측정된 혈압평균치가 수축기 혈압이 140mmHg 이상, 확장기 혈압이 90mmHg 이상인 경우를 말하며, 인간의 생리적 활동 중 인공적으로 혈압이 상승하는 것으로 현대인의 건강에 중요한 문제로 대두되고 있다. 고혈압은 많은 사망의 주요 원인으로 뇌졸중, 심근경색증, 울혈심부전증, 말기 신질환 등이 관련되어 있다. 하지만, 아직까지 고혈압의 발생이유에 대해서는 정확하게 알려지지 않고 있다. 다만 한 가지 이유에 의해 발생하는 것보다는 다양한 원인에 의해 비정상적으로 혈압이 상승한다는 것이 지배적인 의견이다. 이것을 일차성 고혈압(primary hypertension) 혹은 본태성 고혈압(essential hypertension)이라 부른다. 그리고 주변 환경에 의해 고혈압이 발생하기도 하지만, 유전적인 원인에 의해 혈압이 상승하기도 하는데 이것을 이차성 고혈압(secondary hypertension)이라고 부른다.
- [0003] 안지오텐신 전환효소(angiotensin-converting enzyme: ACE)는 레닌-안지오텐신계(Renin-Angiotensin System: RAS)에서 혈압에 관여하는 효소 중 상류(upstream)에서 혈압을 조절하는 역할을 한다. RAS는 혈압조절을 위해 안지오텐시노겐(angiotensinogen)의 활성화 및 물의 균형을 조절하는 중요한 기전 중 하나이다. 생체 내에서 안지오텐신 전환효소는 10개의 펩타이드로 이루어져 있는 An I (비활성)의 7번(His)과 8번(His) 아미노산을 인식하여 아미노산 8개인 An II (활성)로 전환하고, 이 An II는 안지오텐신 II 수용기에 결합하여 알도스테론(alosterone)을 생산하여 Na^+ 의 재흡수를 통해 혈압이 상승하는 일련의 과정을 거친다.
- [0004] 고혈압과 심혈관 질환의 치료를 위해 사용되는 치료제로는 캅토프릴(captopril: D-3-mer-captopril: 2methylpropanoyl-L-proline)이 있는데, 캅토프릴은 브리스틀 마이어스 스쿼브사의 카포텐(Capoten: CAS Nu. 62571-86-2)이라는 이름으로 판매되고 있는 안지오텐신 전환효소 억제제의 하나이다. 또한, 캅토프릴은 고혈압 뿐만 아니라 심장병과 당뇨병 환자의 신장 기능의 보호와 암 치료 연구에도 이용되고 있다.
- [0005] 캅토프릴 외에 현재 사용되고 있는 다른 안지오텐신 전환효소 억제제로는 셀프하이드릴 함유 시약(조페노프릴), 디카르복시레이트 함유 시약(에날라프릴, 라미프릴, 퀴나프릴, 페렌도프릴, 리시노프릴, 베나제프릴, 이미다프릴, 조페노프릴, 트란돌라프릴)과 포스페이트 함유 시약(포시노프릴)이 있다. 그러나 캅토프릴은 경구 투여 후 70%만이 흡수되며 위장에서 생물학적 활성이 감소되며, 이용되지 않은 일부는 소변으로 방출되는 것으로 알려져 있다. 현재 시판되고 있는 안지오텐신 전환효소 억제제는 항고혈압 치료제로서 그 순기능이 있지만, 역기능으로서 부작용 또한 알려져 있다.
- [0006] 안지오텐신 전환효소 억제제의 알려진 부작용은 가려움(itching), 두통(headache), 심계 항진(tachycardia), 흉통(chest pain), 허약(weakness)과 같은 현상이 보고되고 있다. 이에 부작용이 없는 새로운 안지오텐신 전환효소 억제제들이 절실하게 요구되었고, 새로운 형태의 안지오텐신 전환효소 억제제가 보고되고 있다. 현재 사용되고 있는 안지오텐신 전환효소 억제제는 합성 화학물질이나 합성 펩타이드들인데, 합성 화학물질과 합성 펩타이드는 대량합성으로 생산이 가능하다는 점이 유용하지만, 화학적 합성으로 인한 새로운 부작용이 발생할 수 있다는 단점이 있다.
- [0007] 디하이드로아비어트산(Dehydroabietic acid: DHA, Abieta-8,11,13-trien-18-oic acid)은 식물의 생합성 과정을 통해 생산되는 이차 대사산물이다. 디하이드로아비어트산은 주요한 수지산 중 하나이며 침엽수에서 많이 발견된다. 디하이드로아비어트산 합성은 올-트랜스-제라닐-제라닐 디포스페이트(all-trans-geranyl-geranyl diphosphate)에서 시작하여 디하이드로아비어타디에날(dehydroabietadienal)까지 합성된 후 디하이드로아비어타디에날 산화효소(산소와 NADPH 소모)의 도움을 받아 디하이드로아비어트산을 생산한다.
- [0008] 디하이드로아비어트산은 기내 분석 결과 LPS에 의해 NO 생산에 대한 억제활성이 확인되었고, 쥐에서는 위장보호의 특징이 보고되었다. 또한, 항진균과 항암 활성이 있는 것으로 확인되었다. 특히, 항균 활성으로 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*)에 대해 저항성이 확인되었고, HeLa 및 Jurkat의 암세포 계통의 성장을 억제하였다.
- [0009] 코문산(Communic acid: 8(17),12,14-labdantrien-18-oic acid)은 디하이드로아비어트산처럼 식물의 생합성 과정을 통해 생산되는 이차 대사산물이며 디터펜류이다. 이러한 디터펜류는 식물의 메틸에리트리톨 포스페이트(Methylerythritol phosphate: MEP) 과정을 통해 만들어진다. 코문산은 두송(*Juniperus communis* L.)에서 분리되었으며, 이후 주로 침엽수에서 많이 발견된다. 코문산의 보고된 생리활성은 항미생물, 항암, 신경안정, 고지혈증, 테스토스테론 5 알파 억제제와 소염제와 항산화제로 보고되었다.
- [0010] 현재까지 디하이드로아비어트산과 코문산은 주로 침엽수(특히 소나무목 또는 과)에서 분리 및 확인되었고, 인

간의 생리활성과 관련된 여러 가지 활성이 확인되고 있다. 한편, 소나무는 우리나라 전국에서 자생하는 식물로서 민간에서는 보혈작용, 중풍, 동맥경화, 고혈압과 당뇨병 등을 예방하는 효능이 있다고 알려져 있다. 특히 동의보감과 본초강목에서도 솔잎은 뇌졸중과 고혈압에 좋은 것으로 알려져 있다. 이처럼 솔잎은 인간의 혈액을 맑게 해주는 주요한 성분이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0011] 한편, 한국등록특허 제0882780호에는 '솔잎 추출물을 함유하는 테스토스테론 5-알과 환원효소 저해제'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2003-0059258에는 '솔잎 및 양파를 주성분으로 하는 고혈압/고지혈증 예방용 액상추출액 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 액상추출액'이 개시되어 있다. 그러나 본 발명에서와 같이, 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 유효성분으로 함유하는 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강식품 조성물에 대해서는 개시된 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 상기한 종래 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명은 솔잎으로부터 안지오텐신 전환효소에 억제 활성이 가장 좋은 물질을 선별하고 그 구조를 동정한 결과, 디하이드로아비어트산(dehydroabietic acid) 및 코문산(communic acid)임을 확인하였다. 따라서 본 발명은 상기 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 유효성분으로 함유하는 고혈압 예방 또는 개선용 식품 조성물, 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물, 안지오텐신 전환효소 억제제 및 혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 솔잎으로부터 분리한 디하이드로아비어트산(dehydroabietic acid) 또는 코문산(communic acid)을 유효성분으로 함유하는, 안지오텐신 전환효소(angiotensin-converting enzyme) 억제 활성을 가지는 고혈압 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 디하이드로아비어트산, 코문산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 유효성분으로 함유하는 안지오텐신 전환효소 억제제를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 유효성분으로 함유하는 혈관질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 디하이드로아비어트산, 코문산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 솔잎 유래의 디하이드로아비어트산 또는 코문산의 경우 안지오텐신 전환효소 억제 활성을 가지므로, 항고혈압 및 혈행개선에 있어 소비자들의 건강에 유익한 조성물로 제공될 수 있다. 또한, 본 발명에서 구체적인 추출·분획 방법을 제시하므로 솔잎에 다량 함유되어 있고 활성도 뛰어난 물질을 제공받아 경제적인 고기능성의 원료로 활용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 솔잎으로부터 물질 분리과정을 나타낸 그림이다.

도 2는 도 1의 분획 2번(Fr.2)의 안지오텐신 전환효소 억제 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리된 분획의 안지오텐신 전환효소 억제 분석 결과를 나타내는 그래프이다. x축; 시료, y축; 안지오텐신 전환효소 억제율(%)

도 4는 도 1의 분획 2-7-1을 HPLC로 분리한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 방법에 의해 분리된 물질의 안지오텐신 전환효소 억제 분석 결과를 나타내는 그래프이다. x축; 시료, y축; 안지오텐신 전환효소 억제율(%), 1; 음성 대조구, 2; 양성 대조구, 3; 캅토프릴 3mM, 4; Fr.

2-7-1-1~4, 5; Fr. 2-7-1-5~7, 6; Fr. 2-7-1-8, 7; Fr. 2-7-1-9.

도 6은 본 발명에 의해 안지오텐신 전환효소 억제제로 분리한 디하이드로아비어트산의 동정 결과를 나타낸 화학 구조이다. A; ^1H 핵자기공명 분석 결과, B; ^{13}C 핵자기공명 분석 결과

도 7은 본 발명에 의해 안지오텐신 전환효소 억제제로 분리한 코문산의 동정 결과를 나타낸 화학구조이다. A; ^1H 핵자기공명 분석 결과, B; ^{13}C 핵자기공명 분석 결과

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 디하이드로아비어트산(dehydroabiestic acid) 또는 코문산(communic acid)을 유효성분으로 함유하는 고혈압 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식품 조성물에서, 상기 디하이드로아비어트산 또는 코문산은 물과 메탄올, 에탄올, 부탄올 등과 같은 C1 내지 C4의 저급 알콜과 이들의 혼합용매 등을 포함한 다양한 유기용매를 이용하여 솔잎 추출물로부터 분리할 수 있고, 상기 용매 추출물을 물과 부탄올, 에틸 아세테이트, 헥산, 또는 메틸렌 클로라이드 등을 포함하는 다양한 비극성 용매를 이용한 분획물로부터 분리할 수 있으며, 가장 바람직하게는 솔잎 메탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 상기 솔잎은 적송, 유송, 마미송, 해송 등의 소나무과에 속하는 솔잎을 말하며, 기타 소나무과에 속하는 솔잎에서 추출된 추출물도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0023] 또한, 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 식품 조성물은 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등이 있다.
- [0024] 상기 외에 본 발명의 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜 또는 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0025] 그밖에 본 발명의 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 디하이드로아비어트산, 코문산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 유효성분을 포함하는 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학 조성물은, 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0029] 상기 조성물은 당 업계에 알려져 있는 어떠한 투여경로, 예를 들어 경구 또는 비경구를 통해 투여될 수 있다. 경구 투여의 목적으로 본 발명의 유효성분을 정제, 캡슐제, 과립제, 추잉정, 환제, 분말, 엘릭시르, 현탁제, 에멀전, 용액 또는 시럽 등의 제제로 제형화하는 경우에는, 아라비아 고무, 옥수수 전분, 미세결정질 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 인산이칼슘 또는 락토오스와 같은 부형제, 알긴산, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 봉해제, 스테아르산 마그네슘과 같은 윤활제, 수크로오스 또는 사카린과 같은 감미제 및 페퍼민트, 메틸 살리실산염 또는 과일향과 같은 향미제가 포함될 수 있다. 단위 제형이 캡슐제인 경우에는 상기 성분 외에도 폴리에틸렌 글리콜 또는 지방유와 같은 액상 담체가 포함될 수도 있다. 또한, 비경구 투여를 위한 용액 또는 현탁액 형태의 주사제는 비경구적으로, 예를 들면 피하, 정맥 내, 근육 내 또는 복강 내로 투여될 수 있다. 일반적으로, 주사 가능한 용액 또는 현탁액은 물, 염수, 수성 텍스트로즈 및 관련된 설탕 용액제, 비휘발성 오일, 에탄올, 글리세린, 폴리에틸렌 글리콜 또는 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜류 등의 약제학적으로 허용되는 액상 담체 중에 유효량의 유효성분을 균질하게 혼합시켜 제조할 수 있다. 이외에도 필요에 따라 항세균제, 킬레이트

제, 완충제, 보존제와 같은 보조제를 포함시킬 수도 있다. 상기 약제학적으로 허용되는 담체로는 약제학적으로 순수하고, 실질적으로 무독성이며, 유효성분의 작용을 저해하지 않는 임의의 모든 보조제를 사용할 수 있다.

[0030] 한편, 혈장 중에 있는 안지오텐신이라는 펩티드는 혈압이 떨어지면 신장에서 분비되는 레닌이라는 물질에 의해 안지오텐신 I 이 되고 이것이 안지오텐신 전환효소(ACE)에 의해 안지오텐신 II로 변하게 된다. 이 물질은 동맥의 혈관벽 근육을 수축시키는 작용을 하여 혈압을 상승시킨다. 안지오텐신 II의 생성을 막기 위해서는 안지오텐신 I 전환효소의 활성을 저해시키는 물질을 제공해야 한다.

[0031] 본 발명에서는 솔잎으로부터 정제된 디하이드로아비어트산 및 코문산의 안지오텐신 전환효소 억제 실험을 한 결과 우수한 효소 억제 활성 효과를 갖는 바, 혈압조절 및 고혈압 또는 혈관질환의 예방 및 치료효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명에 따른 솔잎 유래의 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은 고혈압 예방 또는 치료 및 혈관질환 예방 또는 치료를 위한 의약품으로 유용하게 이용될 수 있다. 또한 상기 물질을 포함한 기능성 건강식품으로도 유용하게 이용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 고혈압 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 발생 원인을 불문하고 모든 고혈압의 치료 또는 예방에 사용될 수 있는데, 여기서 고혈압이란 전술한 바의 아직 원인이 규명되지 않은 본태성 고혈압과, 당뇨병, 신장질환, 약물 복용 등이 원인이 되어 이차성 고혈압을 포함하는 의미이다. 고혈압 예방 또는 개선을 위해서 혈압을 정상 수준으로 낮추는 것이 일반적으로 필요하다는 점을 고려할 때, 혈압 강하 효과를 나타내는 솔잎 유래의 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 고혈압 치료, 개선 또는 예방용 조성물은 고혈압의 치료, 개선 또는 예방을 목적으로 단독으로 또는 다른 고혈압 치료제나 예방제와 병용하여 사용될 수 있다.

[0033] 한편, 본 발명의 고혈압 치료, 개선 또는 예방용 조성물은 구체적인 양태에 있어서 약학 조성물로 파악될 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 유효성분으로 함유하는 안지오텐신 전환효소 억제제를 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 디하이드로아비어트산 또는 코문산을 유효성분으로 함유하는 혈관질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 디하이드로아비어트산, 코문산 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 혈관질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명에서 "혈관질환"이란, 동맥경화, 뇌경색, 심근경색, 말초혈액순환장애, 허혈성 뇌질환, 고지혈증 또는 관상동맥 심장병을 의미한다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 재료 및 방법

[0040] 실험재료

[0041] 솔잎은 해발 350m 이상의 청정지역에서 자란 건강한 소나무를 선택하여 영양상태가 좋은 가지 부분에서 채취한 후 싱싱하고 푸른 잎만 선별하여 사용하였으며, 채취된 솔잎은 30~40℃의 건조기에 72시간 동안 수분을 완전히 제거하였다.

[0042] 물질분리 및 정제

[0043] 건조된 솔잎은 이의 10배가 되는 메탄올을 이용하여 추출과정을 진행하였다. 상기 메탄올 솔잎 추출액은 농축기(BUCHI Rotavapor R-114)에서 농축을 진행하였다. 헥산과 물을 1:1 비율로 혼합한 후 분획 깔대기를 이용하여 헥산과 물 층을 분리시킨 후 헥산 층은 보관하였다. 물 층은 다시 에틸아세테이트와 물을 1:1 비율로 혼합한 후 에틸아세테이트 층을 분리하여 이를 농축기에서 농축하였다.

- [0044] 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 좋은 층을 분리하기 위해 에틸아세테이트 층을 가장 먼저 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(15×30cm, 입경 40~63 μ m)로 분리 정제하였으며, 농도 구배는 CH₂Cl₂:MeOH 비율을 30:1에서부터 0:1까지 구배를 조절하여 총 10개의 분획을 분리하였다. 분리된 분획 중 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 가장 높은 분획은 2번째 분획으로 확인되었다.
- [0045] 분리된 분획 2는 RP C-18 컬럼 크로마토그래피(10×30cm, 입경 40~63 μ m)를 이용하여 분리하였고, 농도구배는 CH₃CN:H₂O 비율을 1:3에서부터 1:0까지 조절하여 총 13개의 분획을 분리하였다. 분리된 분획 중 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 높은 분획은 7번째 분획으로 확인되었다.
- [0046] 분리된 분획 2-7은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(5×30cm, 입경 40~63 μ m)를 이용하여 분리하였고, 농도구배는 CH₂Cl₂:MeOH 비율을 1:0에서부터 0:1까지 조절하여 총 15개의 분획을 분리하였으며, 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 높은 분획은 1번째 분획으로 확인되었다.
- [0047] **안지오텐신 전환효소 억제 활성 측정**
- [0048] 안지오텐신 전환효소 억제 활성 측정은 안지오텐신 I의 유도체인 HHL(N-Hippuryl-His-Leu hydrate(시그마사, H1635))과 안지오텐신 전환효소(시그마사, A6778)를 사용하여 분석하였다. HHL는 50mM 붕산염 버퍼(pH 8.3, 300mM NaCl)에 녹여 사용하였다. 안지오텐신 전환효소는 토끼 폐 분말 100mg을 50mM 붕산염 버퍼 1ml에 녹인 후, 2시간 동안 4℃에서 추출하고, 4℃에서 40분 동안 6,600rpm으로 원심분리 후 상층액을 사용하였다. 사용하지 않는 안지오텐신 전환효소 용액은 -20℃에서 보관하였다.
- [0049] 안지오텐신 전환효소 억제활성 분석을 위해 총 부피는 250 μ l로 100 μ l HHL(3mM), 100 μ l 안지오텐신 전환효소와 섞인 분획 50 μ l(5mg/ml)를 사용하였다. 양성 대조군은 캅토프릴(10mg/ml, 시그마사 C4042)를 이용하였고, 음성 대조군은 동일한 부피의 메탄올을 사용하였다.
- [0050] 먼저 HHL 용액과 시료를 혼합하여 37℃에서 60분 동안 반응시킨 후 다시 안지오텐신 전환효소 용액을 첨가하여 37℃에서 30분 동안 항온수조에 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해서 HCl(또는 빙초산) 250 μ l를 첨가하였다. 에틸아세테이트를 1ml 추가한 후 실온에서 2분 동안 강하게 흔들어 주었다. 5분 동안 3,000rpm에서 원심분리시킨 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 에틸아세테이트를 증발시키고 다시 메탄올을 500 μ l를 첨가하여 흡광도 228nm에서 HPLC로 분석하였다.
- [0051] **안지오텐신 전환효소 반응 부산물인 히푸르산(Hippuric acid: HA) 분석**
- [0052] 히푸르산은 HPLC를 이용하여 분석하였으며, 컬럼은 C 18(250×4.6mm I.D., S-6 μ m, YMC)을 사용하였고, 측정은 액체크로마토그래피(LC-20AT)와 자외-가시선 분광광도계(SPD-20A)를 사용하였다. 모든 시료의 주입량은 20 μ l로 동일하며 흡광도 228nm에서 측정하였다. 안지오텐신 전환효소 저해율은 히푸르산의 확인을 통하여 측정하였으며, 그 방식은 하기와 같다:
- [0053]
$$[\text{HA (음성 대조군)} - \text{HA (시료)}] / \text{HA (음성 대조군)} \times 100$$
- [0054] **유기용매로 분리된 분획의 물질 분석**
- [0055] 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 우수한 분획을 선별하여 HPLC를 통해 물질을 검색하였다. 검색 전 HPLC에 사용할 유기용매의 농도를 확인하기 위해 박층크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography: TLC)를 수행하였으며, 박층크로마토그래피용 플레이트는 머크사의 박층크로마토그래피 실리카 겔 60 F₂₅₄를 사용하였다. 박층크로마토그래피의 농도 구배는 메탄올과 물의 비율을 10:1로 하여 박층크로마토그래피를 분석하였으며, 분석은 길슨사의 HPLC(길슨 321 펌프, PrepELSTM 검출기)를 사용하였다. 사용된 컬럼은 YMC사의 Optimapak C18(250×10mm ID)을 사용하였고, 분리에 사용된 유기용매는 HPLC용 메탄올(99.99%)을 사용하였다. 물은 HPLC 사용 전 0.1% 포믹산(formic acid)을 첨가하였고 초음파를 이용하여 기포를 제거하였다. HPLC 분리 조건은 0~60분과 70~80분에 메탄올 80%, 62~67분 메탄올 100%로 하여 분석하였다. 유속은 2ml/분으로 하였으며, 흡광도 254nm에서 측정하였고, 참고 흡광도는 204nm를 사용하였다. HPLC를 통해 획득한 분획들 중에서 항고혈압 활성이 우수한 물질을 선별하

였으며, 선별된 물질은 ^1H 핵자기공명(Nuclear Magnetic Resonance: NMR) 및 ^{13}C 핵자기공명 분석을 통해 동정하였으며, 핵자기공명 분석기(Varian Inova 500MHz 광도계)로 분석하였다. 핵자기공명 분석을 위해 사용된 CDCl_3 용매는 Cambridge Isotope Lab.(미국)에서 구매하여 사용하였다.

[0056] 실시예 1. 술잎으로부터 안지오텐신 전환효소 억제 활성을 가지는 물질 분리 및 정제

[0057] 술잎으로부터 유용물질 분리를 위하여 분리과정은 총 3회의 오픈 컬럼 크로마토그래피(Open Column Chromatography: OCC)를 진행하였고, 사용된 컬럼들은 시료의 극성과 비극성의 성질을 이용하여 분리하였다. 물질의 전체 분리과정은 도 1과 같은 과정을 수행하였다. 안지오텐신전환 효소 억제 활성을 갖는 물질은 분획 2, 2-7 및 2-7-1 순서로 분리되었다. 또한, 술잎 에틸아세테이트 분획 2의 안지오텐신 전환효소 억제 분석 결과, 히푸르산이 검출되지 않았다. HPLC에서 히푸르산의 검출시간은 19.4분대로 분획 2번을 반응시킨 결과는 높은 활성이 있는 것으로 확인되었다(도 2). 분획 2번은 조시료이지만 안지오텐신 전환효소 저해 활성이 강하여 에틸아세테이트 층에서 안지오텐신 전환효소 억제 화합물질이 분리될 수 있다는 것을 확인하였다. 분획 2번의 분리 후 2-7 및 2-7-1의 안지오텐신 전환효소 억제 분석 결과, 각각 65.6% 및 77%로 억제 활성이 지속적으로 유지되는 것을 확인하였다(도 3).

[0058] 분리과정 중 이용된 컬럼과 활성이 있는 분획의 분리 시간은 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 있는 화합물질이 비극성에 가까운 화합물질일 것으로 판단되었다. 그 이유는 에틸아세테이트층에서 첫 번째로 분리된 안지오텐신 전환효소 억제 분획과 세 번째로 분리된 분획은 비극성이 강한 화합물이었으며, 또한 RP-C18로 분리된 분획 또한 비극성이 강한 화합물이기 때문이다. 이처럼 오픈 컬럼 크로마토그래피로 분리된 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 있는 분획들은 모두 비극성 쪽으로 분리되었다. 마지막으로 분리된 2-7-1-8은 RP-C18 컬럼에서 후반부에 분리되었고, 이것은 최종적으로 분리된 화합물질이 비극성을 띄고 있다는 것을 보여주었다.

[0059] 분획 2-7-1은 HPLC를 이용하여 총 9개의 분획을 분리하였으며, 이 중 분획 2-7-1-8과 2-7-1-9가 이 분획의 주 물질로 확인되었다(도 4). 분리된 9개의 분획들은 다시 분획 2-7-1-1부터 4까지, 2-7-1-5부터 7까지, 2-7-1-8과 2-7-1-9로 총 4개의 분획으로 안지오텐신 전환효소 억제 분석을 수행하였다.

[0060] 안지오텐신 전환효소의 기질로 사용된 펩타이드는 HHL이며 HPLC로 히푸르산을 측정하였을 때, 캅토프릴(10mg/ml)이 첨가된 양성 대조군에서는 히푸르산이 확인되지 않았고, 캅토프릴을 제외한 음성 대조군에서는 히푸르산이 확인되었다. 분리된 총 4개의 HPLC 분획 중 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 가장 강한 분획은 2-7-1-8 및 2-7-1-9였으며, 각각 74.83 및 69.91%로 안지오텐신 전환효소 활성이 억제되는 것으로 확인되었다(도 5). 양성 대조군은 캅토프릴 10mg/ml(9mM)에서 100% 억제되는 것을 확인되었지만, 분획 2-7-1-1~4 및 분획 2-7-1-5~7은 각각 -129% 및 -21.81%로 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 전혀 없는 것으로 확인되었다. 최종적으로 술잎의 에틸아세테이트층에서 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 있는 화합물질은 분획 2-7-1-8과 2-7-1-9로 확인되었다(도 5).

[0061] 실시예 2. 술잎으로부터 분리된 물질의 안지오텐신 전환효소 억제 활성 활성을 가지는 물질 동정

[0062] 상기 실시예 1을 통하여 분리된 안지오텐신 전환효소 억제 활성이 강한 분획인 2-7-1-8 및 2-7-1-9의 단일 화합물 구조를 분석하기 위하여, ^1H 핵자기공명과 ^{13}C 핵자기공명 분석을 수행하였다. 분획 2-7-1-8을 정제하여 ^1H 핵자기공명(500MHz) 분석결과에서 ^1H 의 화학 이동(chemical shift)과 커플링(coupling) 패턴을 각각 확인할 수 있었다. ^1H 핵자기공명 결과에서 프로톤이 확인되지 않은 위치는 4, 8, 9, 10, 13, 18 및 20번이었으며, 두 개의 프로톤이 확인된 위치는 1, 2, 3, 6 및 7번이었고 한 개의 프로톤이 확인된 위치는 5, 11, 12, 14 및 15번에서 확인되었다(도 6A 및 표 1).

[0063] ^{13}C 핵자기공명에서 탄소 신호의 화학 이동 중 한 개의 δ_c 값 185.3은 카르복실 탄소임을 알 수 있으며, 그리고 모두 19개의 탄소가 확인되었다. 카르복실 탄소 위치 19번은 δ_c 184.4, 위치 1번은 δ_c 38.0, 2번은 δ_c 18.6, 3번은 δ_c 37.0, 4번은 δ_c 47.6, 5번은 δ_c 44.7, 6번은 δ_c 25.3, 7번은 δ_c 30.1, 8번은 δ_c 134.8, 9번은 δ_c 127.0, 10번은 δ_c 36.9, 11번은 δ_c 124.0, 12번은 δ_c 124.3, 13번은 δ_c 145.9, 14번은 δ_c 127.0, 15번은 δ_c

c 33.6, 16번은 δ_c 24.1, 17번은 δ_c 24.1, 18번은 δ_c 16.3이며, 20번은 δ_c 18.7임을 확인하였다. 또한, 16, 17, 19 및 20번은 모두 메틸기를 가지고 있으며, 위치 8번과 14번 탄소, 9번과 11번 탄소 및 12번과 13번 탄소는 이중 결합을 하고 있는 것을 확인하였다(도 6B 및 표 1).

[0064] 상기와 같은 결과를 통하여 2-7-1-8의 기본 화학식은 $C_{20}H_{28}O_2$ (분자량=300.44)로, 디하이드로아비어트산(dehydroabietic acid)이라는 것을 확인할 수 있었다.

표 1

[0065] 본 발명에 의해 분리된 2-7-1-8 물질의 1H NMR와 ^{13}C NMR 분석결과

No.	1H NMR	^{13}C NMR
1	2.30,dd 1.51,m	38.0
2	1.74,m	18.6
3	1.80,m	37.0
4		47.6
5	2.25,dd	44.7
6	1.51,m 1.80,m	25.3
7	2.92,m	30.1
8		134.8
9		127.0
10		36.9
11	7.17,d	124.0
12	7.00,dd	124.3
13		145.9
14	6.89,s	127.0
15	2.85,sept, j=6.8	33.6
16	1.23,d, j=6.8	24.1
17	1.23,d, j=6.8	24.1
18		16.3
19	1.29,s	185.3
20		18.7

[0066] 분획 2-7-1-9를 정제하여 1H 핵자기공명(500MHz) 분석결과에서 1H 의 화학 이동과 커플링 패턴을 각각 확인하였다. 1H 핵자기공명 결과에서 프로톤이 확인되지 않은 위치는 4, 8, 10 및 18번이었으며, 두 개의 프로톤이 확인된 위치는 1, 2, 3, 6, 7, 11 및 17번이었고 한 개의 프로톤이 확인된 위치는 5, 9, 12 및 14번에서 확인되었다(도 7A 및 표 2).

[0067] ^{13}C 핵자기공명에서 탄소 신호의 화학 이동 중 한 개의 δ_c 값 184.4은 카르복실 탄소임을 알 수 있으며, 그리고 모두 19개의 탄소가 확인되었다. 카르복실 탄소 위치 19번은 δ_c 184.4, 위치 1번은 δ_c 38.3, 2번은 δ_c 18.6, 3번은 δ_c 37.7, 4번은 δ_c 47.6, 5번은 δ_c 57.7, 6번은 δ_c 26.8, 7번은 δ_c 37.2, 8번은 δ_c 147.8, 9번은 δ_c 49.6, 10번은 δ_c 39.0, 11번은 δ_c 23.1, 12번은 δ_c 133.8, 13번은 δ_c 133.7, 14번은 δ_c 141.6, 15번은 δ_c 110.1, 16번은 δ_c 16.6, 17번은 δ_c 108.3, 19번은 δ_c 14.8이며, 20번은 δ_c 12.0임을 확인하였다. 또한, 16, 19 및 20번은 모두 메틸기를 가지고 있으며, 위치 8번과 17번 탄소, 12번과 13번 탄소 및 14번과 15번 탄소는 이중 결합을 하고 있는 것을 확인하였다(도 7B 및 표 2).

[0068] 상기와 같은 결과를 통하여 2-7-1-9의 기본 화학식은 $C_{20}H_{28}O_2$ (분자량=302.5)로, 코문산(communic acid)이라는 것을 확인할 수 있었다.

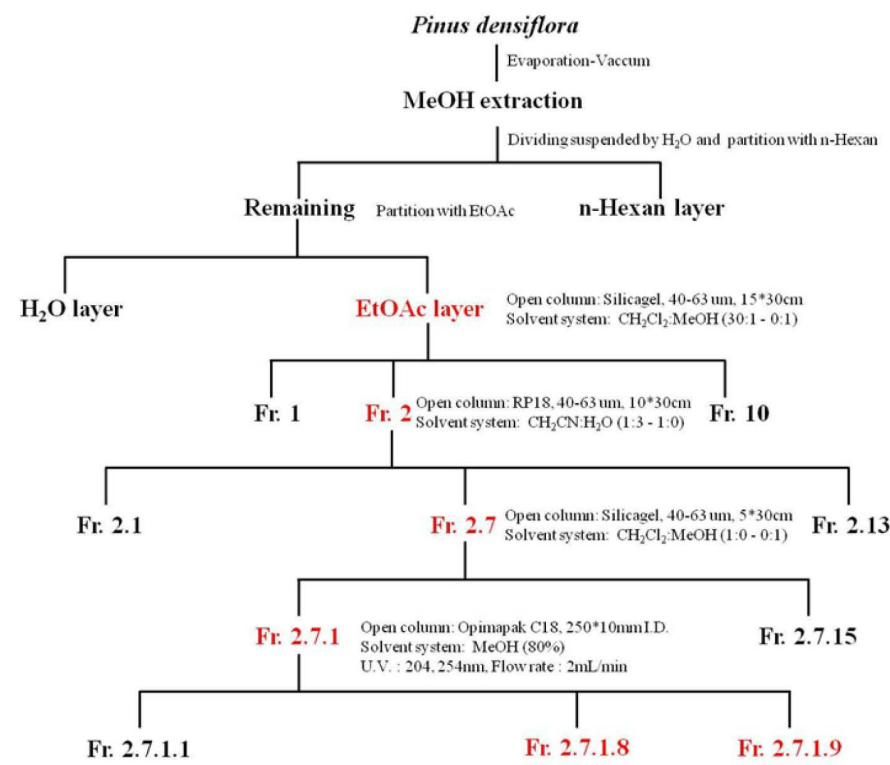
표 2

[0069] 본 발명에 의해 분리된 2-7-1-9 물질의 ¹H NMR와 ¹³C NMR 분석결과

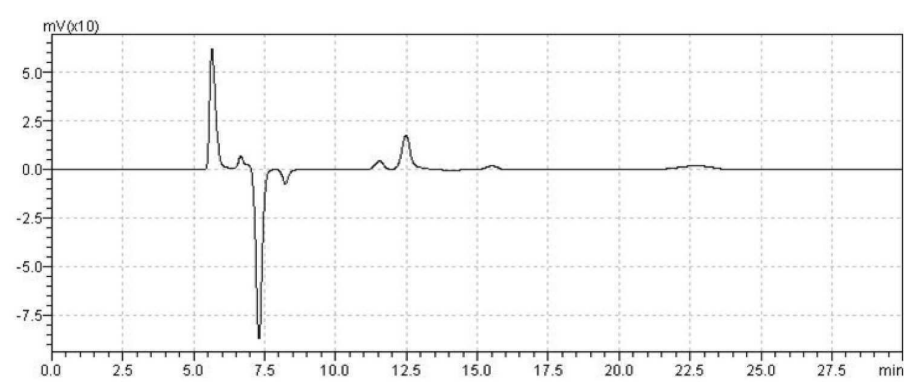
No.	¹ H NMR	¹³ C NMR
1	1.34,m 1.51,m	38.3
2	1.74,m	18.6
3	1.84,m	37.7
4		47.6
5	2.34,dd	57.7
6	1.51,m 1.84,m	26.8
7	2.20,t d	37.2
8		147.8
9	2.00,dd	49.6
10		39.0
11	1.40,m	23.1
12	5.41,t,6.4	133.8
13	6.33,dd,17.4	133.7
14	10.8	141.6
15	4.88,d,10.8 5.05,d,17.4	110.1
16	1.76,s	16.6
17	4.48,s 4.83,s	108.3
18		14.8
19	0.76,s	184.4
20	1.16,s	12.0

도면

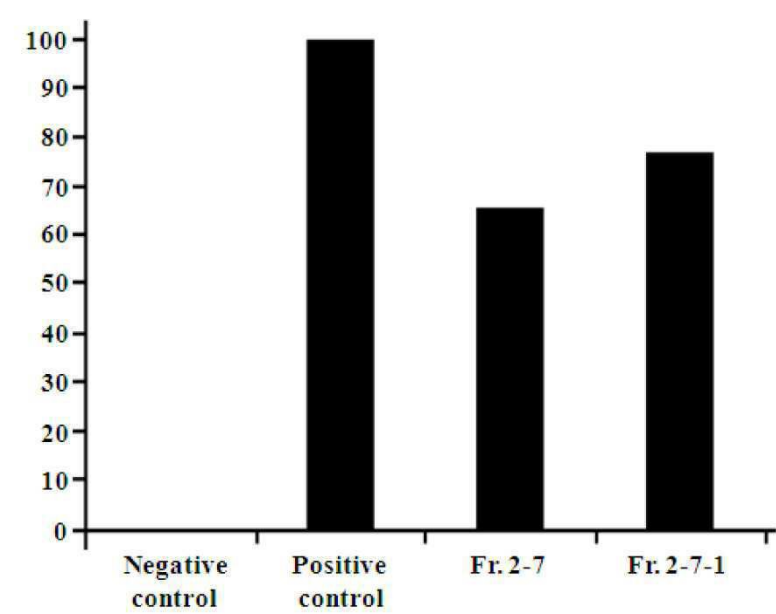
도면1



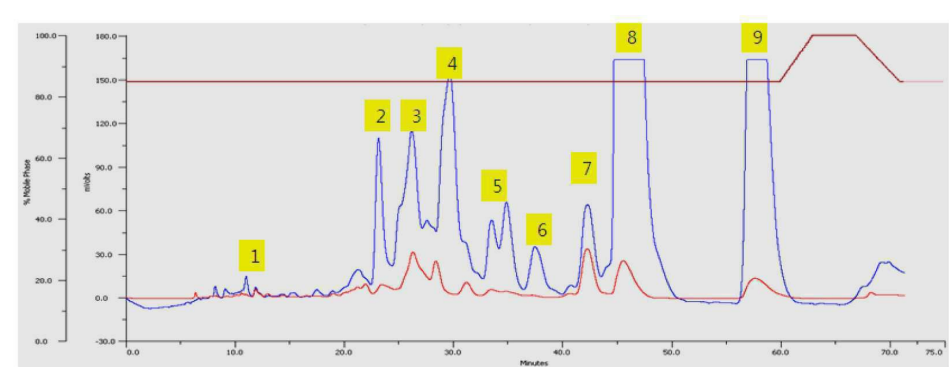
도면2



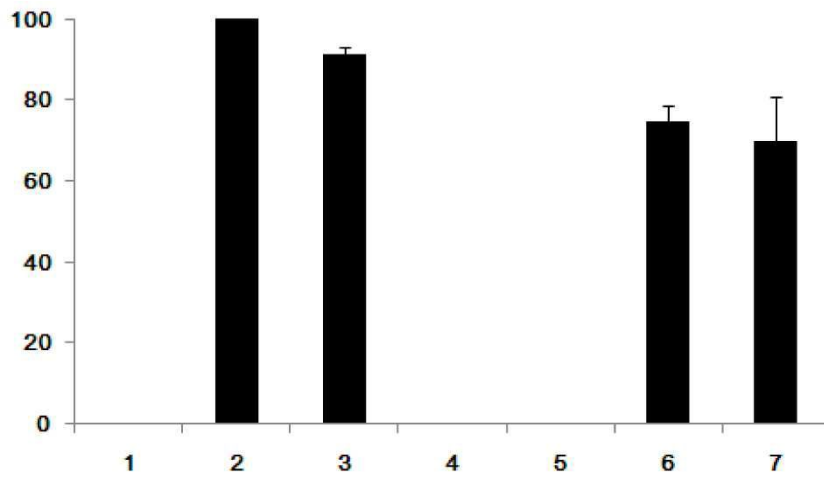
도면3



도면4

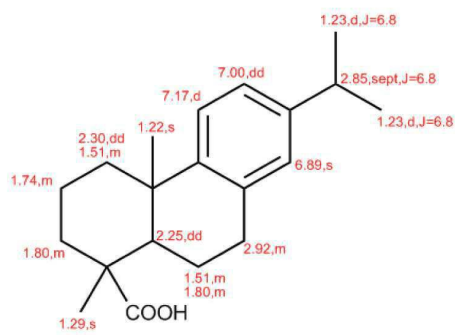


도면5

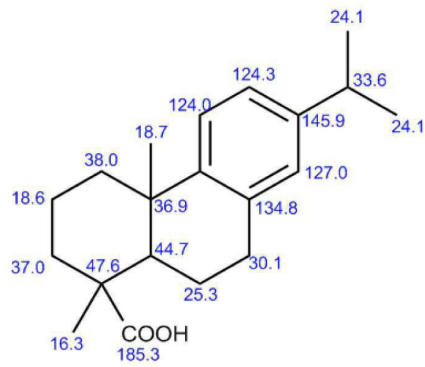


도면6

A.

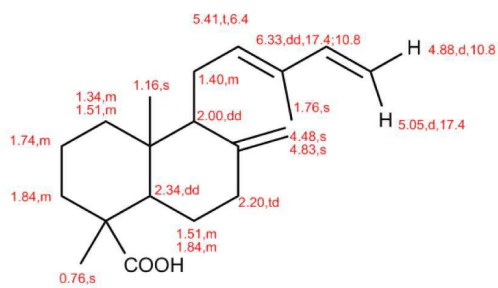


B.



도면7

A.



B.

