



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0046482

(43) 공개일자 2015년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/287 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/353 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0125744

(22) 출원일자 2013년10월22일
심사청구일자 없음

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신전로 365 (용당동,
부경대학교)

전북대학교 산학협력단

전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1
가)

(72) 발명자

최재수

부산광역시 남구 오륙도로 85, 109동 204호(용호
동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)

정현아

전라북도 전주시 덕진구 소리로 179, 212동 1604
호(호성동1가, 호성주공2단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김태선

전체 청구항 수 : 총 9 항

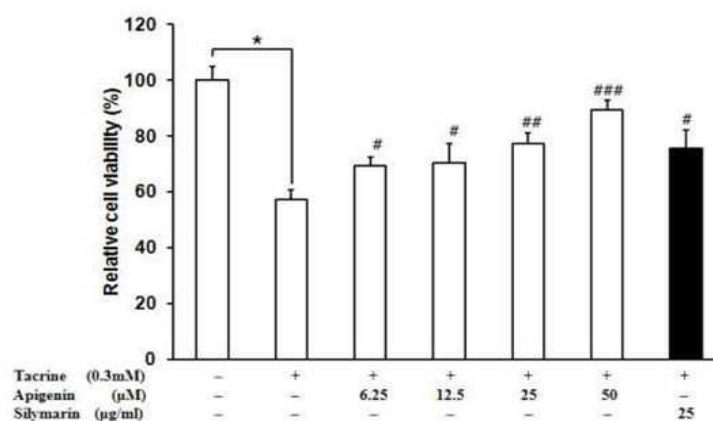
(54) 발명의 명칭 마키 엉겅퀴 추출물을 유효 성분으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 조성물

(57) 요약

본 발명은 마키 엉겅퀴 추출물을 유효 성분으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 의한 마키 엉겅퀴 추출물을 유효 성분으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 조성물은 기존 엉겅퀴 재료와는 전혀 새로운 마키 엉겅퀴를 사용하여 이로부터 간 독성 물질에 의한 HepG2 세포의 세포 독성에 대한 간보호 활성, ROS 생성 감소 활성, 및 글루타치온 농도를 증가시키는 활성을 나타낸다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김형락

부산광역시 남구 황령대로 319번길 26, 경동메르빌
아파트 104동 2102호

이민섭

부산광역시 해운대구 해운대로 469번가길 38, B동
203호

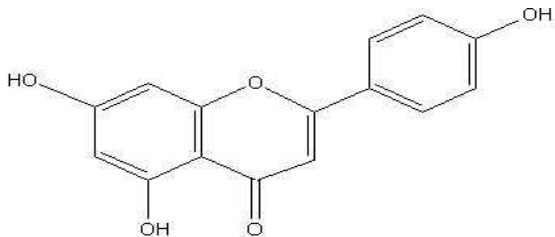
명세서

청구범위

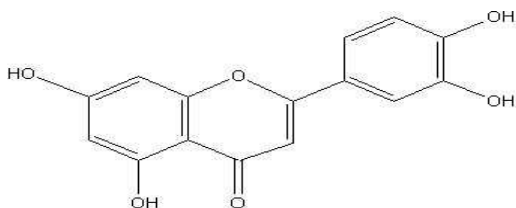
청구항 1

- (1) 마키 엉겅퀴(*Cirsium mackkii*)를 건조하고 마쇄하여 분말화하는 단계;
- (2) 상기 (1)단계에 의해 제조된 엉겅퀴 분말에 70 % 에탄올을 가하고, 70 ℃의 온도에서 3 회 환류냉각 추출한 후, 감압여과한 다음, 40 ℃에서 감압농축하여 에탄올 조추출물을 수득하는 단계;
- (3) 상기 (2)단계에 의해 수득한 에탄올 조추출물을 증류수에 용해시키고, 디클로로메탄을 혼합하여 이상간 분배를 3 번 반복하고, 감압농축 및 건조하여 디클로로메탄을 추출물을 수득하는 단계;
- (4) 상기 (3)단계에 의해 수득한 디클로로메탄을 추출물을 증류수에 용해시키고, 에틸아세테이트를 혼합하여 이상간 분배를 3 번 반복하고, 감압농축 및 건조하여 에틸아세테이트 추출물을 수득하는 단계;
- (5) 상기 (4)단계에 의해 수득한 에틸아세테이트 추출물을 증류수에 용해시키고, *n*-부탄올을 혼합하여 이상간 분배를 3 번 반복하고, 감압농축 및 건조하여 *n*-부탄올 추출물을 수득하는 단계;
- (6) 상기 (5)단계에 의해 수득된 추출물에 대해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하고, 분획물을 수득하여 재결정하는 단계; 및
- (7) 상기 (6)단계에 의해 수득된 분획물의 재결정에 메탄올을 가하고 여과한 다음 역상 HPLC(reverse phase HPLC)를 실시하여 하기 화학식 1 내지 4 로 표시되는 활성물질을 분취하는 단계;를 포함하여 제조되는 생리활성 물질을 함유하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법.

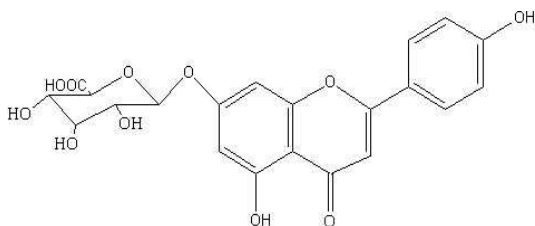
[화학식 1]



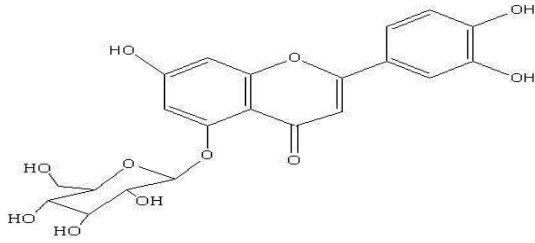
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 (1) 마키 엉겅퀴(*Cirsium mackkii*)를 건조하고 마쇄하여 분말화하는 단계에서는 수분 함량이 10% 이하가 되도록 건조 시킨후, 건조 상태에서 0.1 μm 내지 1 mm의 평균 입경을 갖도록 마키 엉겅퀴(*Cirsium mackkii*)를 건조하고 마쇄하여 분말화하는 것을 특징으로 하는 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 간독성 물질은 알코올, 사염화탄소(CCl_4), 아세트아미노펜 (acetaminophen), 티오아세트아마이드 (thioacetamide), 타크린(tacrine), 터셔리-부틸하이드로퍼옥사이드 (t-butylhydroperoxide), 루브라톡신 B(rubratoxin B) 및 과산화수소(H_2O_2)로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 하나의 제조 방법에 의해 제조된 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 조성물은 간 독성 물질에 의한 Hep G2 세포의 세포 독성에 대한 간보호 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 조성물은 간 독성 물질에 의한 Hep G2 세포의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 감소시키는 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

청구항 7

제 4 항에 있어서,

상기 조성물은 간 독성 물질에 의한 Hep G2 세포의 글루타치온(glutathione) 농도를 증가시키는 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

청구항 8

제 4 항에 있어서,

상기 조성물은 약학 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량% 로 상기 제 1 항의 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

청구항 9

제 4 항에 있어서,

상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 마키 엉퀴 추출물을 유효 성분으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

간보호 활성에 관한 연구는 주로 두 가지 경로에 초점을 맞추고 있다. 그 중 한 가지는 사염화탄소(CCl_4), 아세트아미노펜(acetaminophen), 티오아세트아마이드(thioacetamide), 타크린(tacrine), 그리고 루브라톡신 B(rubratoxin B)와 과산화수소(H_2O_2)와 같은 독성 간 독성 물질의 해독 반응뿐만 아니라, 슈퍼옥사이드 디스무타아제(superoxide dismutase), 카탈라아제(catalase), 그리고 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase)와 같은 신체 항산화 방어계를 함께 평가하는 것이고, 다른 하나는 간 손상에 의해 방출된 혈청 글루타메이트 피루베이트 아미노기전이효소(serum glutamate pyruvate transaminase, GPT)와 혈청 글루타메이트 옥살로아세테이트 아미노기 전이 효소(serum glutamate oxaloacetate transaminase, GOT)를 포함하는 혈청조절 효소의 수준과 활성을 평가하는 것이다. 시토크롬 P450(cytochrome p450) 시스템과 관련된 사염화탄소(CCl_4) 물질대사인 트리클로로메틸 프리 라디칼(trichloromethyl free radical, $\text{CCl}_3\cdot$)과 트리클로로메틸 퍼옥시 라디칼(trichloromethyl peroxy radicals, $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$) 같은 자유 라디칼(free radicals)에 대한 소거, 및/또는 억제활성은 산화 방지에 대한 세포기관과 세포막에서의 간 보호 활성과 연관지을 수 있을 것이다(Hsiao et al., J.Agric. Food Chem., 51, pp3302-3308, 2003 ; Song et al., J. Agric. Food Chem., 51, pp1571-1577, 2003).

[0003]

타크린(tacrine, 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine hydrochloride)은 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase, AChE)의 억제자이며, 신경전달 매개체로 중요한 역할을 한다. 또한 알츠하이머 질환, 중증근무력증, 녹내장, 그리고 약리 분야에서 신경제로 인한 부작용 회복 치료를 위해 사용되고 있다(Doucet-Personeni et al., J. Med. Chem., 44, pp3203-3215, 2001).

[0004]

타크린(tacrine)이 알츠하이머 질환 치료를 위해 미국에서 처음으로 승인된 약물이기는 하지만, 장기간 치료 용량으로 약물을 복용하면 환자의 30~50 % 가 변형 혈청 글루타메이트 피루베이트 트랜스아미나아제(glutamate pyruvate transaminase, GPT) 활성과 함께 가역적인 간독성을 나타내었다(Pan et al., Planta Med., 68, pp217-220, 2002). 또한, 타크린에 의한 간독성은 HepG2 세포, 즉, 인간 간암 세포주에서 활성산소종(ROS)의 생성에 관여한다고 알려져 있다(Osseni et al., Toxicol. in Vitro, 13, pp683-688, 1999).

[0005]

많은 연구에서, 세스퀴테르펜(sesquiterpenes), 쿠마린(coumarins), 디아릴헵타노이드(diarylheptanoids), 페

놀성 화합물 등이 타크린(tacrine) 유도에 의한 HepG2 세포의 세포독성에 관한 간보호 활성을 나타낸다고 보고되고 있다(Song et al., Phytother. Res., 17, pp563-565, 2003; Oh et al., Planta Med., 68, pp748-749, 2002a; Planta Med., 68, pp463-464, 2002b; Cho et al., Planta Med., 67, pp750-751, 2001).

[0006]

영경귀는 이미 2천년이 넘는 세월동안 주로 간과 담낭의 질환을 치료하는데 사용되어왔고, 영경귀 추출물은 오래전부터 건강식품으로 개발되어 판매되고 있다. 영경귀는 국화과에 속하는 여러해살이풀로, 서식하는 지역에 따라 한국, 일본, 중국 북동부에 분포하는 영경귀(*Cirsium japonicum*), 유럽에서 주로 서식하는 큰영경귀(Milk thistle) 등의 여러 종자가 포함된다. 국화과 영경귀속에 속하는 식물들은 다음과 같다.

▣ 영경귀속(*Cirsium*)

- ▶ 가시영경귀<*Cirsium japonicum* var. *spinossimum* Kitam.>
 - ▷ 흰가시영경귀<*Cirsium japonicum* var. *spinosissimum* for. *alba* T.B.Lee>
- ▶ 고려영경귀<*Cirsium setidens* (Dunn) Nakai>
 - ▷ 흰고려영경귀<*Cirsium setidens* for. *alba* T.B.Lee>
 - ▷ 흰잎고려영경귀<*Cirsium setidens* var. *niveoaraneum* Kitam.>
- ▶ 도깨비영경귀<*Cirsium schantarense* Trautv. & Mey.>
 - ▷ 흰도깨비영경귀<*Cirsium schantarense* for. *albiflorum* Y.N.Lee>
- ▶ 동래영경귀<*Cirsium toraiense* Nakai ex Kitam.>
- ▶ 물영경귀<*Cirsium nipponicum* (Maxim.) Makino>
- ▶ 바늘영경귀<*Cirsium rhinoceros* (H.Lev. & Vaniot) Nakai>
 - ▷ 흰바늘영경귀<*Cirsium rhinoceros* for. *albiflorum* Sakata>
- ▶ 버들잎영경귀<*Cirsium lineare* (Thunb.) Sch.Bip.>
- ▶ 서양가시영경귀<*Cirsium vulgare* (Savi) Ten.>
- ▶ 영경귀<*Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum.>
- ▶ 점봉산영경귀<*Cirsium zenii* Nakai>
- ▶ 정영영경귀<*Cirsium chanroenicum* (L.) Nakai>
 - ▷ 가는정영영경귀<*Cirsium chanroenicum* var. *lanceolata* Kitam.>
- ▶ 좁은잎영경귀<*Cirsium japonicum* for. *nakaianum* (H.Lev. & Vaniot) W.T.Lee>
- ▶ 캐나다영경귀<*Cirsium arvense* Scop.>
- ▶ 큰영경귀<*Cirsium pendulum* Fisch. ex DC.>
- ▶ 흰잎영경귀<*Cirsium vlassovianum* Fisch. ex DC.>
 - ▷ 민흰잎영경귀<*Cirsium vlassovianum* var. *album* Nakai>
 - ▷ 흰꽃잎영경귀<*Cirsium vlassovianum* for. *leucanthum* Kitam.>

[0007]

[0008]

이중 종래 간 보호를 위해 많이 이용되었던 영경귀는 큰영경귀로서, 큰영경귀(Milk thistle)의 종자는 2000년 이상 전부터 유럽에서 민간약으로 간장, 담낭, 소화관, 비장 등의 질환 등에 폭넓게 이용되어 왔던 약용 식물이고, 독일에서는 상기 큰영경귀 추출물을 포함하는 레가론(Legalon) 등이 중독에 의한 간장해의 치료약과 만성간염 및 간경변의 보조적 치료약으로써 인가되어 있으며, 미국, 일본 등에서도 그의 간기능 개선 효과로 인하여 상기 큰영경귀 종자 이용 상품이 다수 발매되고 있다. 큰영경귀는 남유럽, 소아시아, 북아프리카 원산의 국화과 식물로 북남미, 호주남부, 중앙유럽, 중앙 및 동아시아 등지에도 분포되어 있다. 큰영경귀는 1-2년생 초본식물로서 성장하면 높이가 1m 전후가 된다. 학명은 *Silybum marianum*(L.)Gaertn이며, 영문명은 Milk Thistle, Mary Thistle, Lady's Thistle, Holly Thistle 등으로 불리운다.

[0009]

지금까지 영경귀 추출물로서 밝혀진 성분으로는 정유와 트리테르펜(triterpene) 화합물이 주로 함유되어 있는데, 정유로서 아플로탁센(aplotaxene), 디하이드로아플로탁센(dihydroaplotaxene), 테트라하이드로아플로탁센(tetrahydroaplotaxene), 헥사하이드로아플로탁센(hexahydroaplotaxene), 시페렌(cyperene), 카리오필렌(caryophyllene), 쑥잡센(thujopsene), 알파-히마칼렌(α -himachalene) 등이 분리되어 있고, 트리테르펜

(triterpene) 화합물로서 알파-아미린(α -amyrin) 및 베타-아미린(β -amyrin) 등이 분리되어 있으며 (Sung, 1996), 또한 최근에 폴리아세틸렌(polyacetylene) 화합물이 분리되어 있다(Yamazaki et al., 2001). 엉겅퀴로부터 분리된 혹은 확인된 화합물로서 플라보노이드(flavonoids), 페놀산(phenolic acids), 리그난(lignans), 폴리아세틸렌(polyacetylenes), 아세틸렌(acetylenes), 스테롤(sterols), 트리테르펜(triterpenes), 세스퀴테르펜 락톤(sesquiterpene lactones), 그리고 알칼로이드(alkaloids)(Jordon-Thaden and Louda, 2001; Lee, et al., 1994; Yim et al., 2003; Chung et al., 2002)가 있으며 이들이 여러 가지 생리활성에 관련될 것으로 여겨진다. 특히 자생하는 엉겅퀴에서는 항산화에 관련하는 다양한 플라보노이드(flavonoid)가 상당량 포함되어 있음이 보고되었다(Jeong et al., 2008).

[0010]

큰엉겅퀴의 종자 추출물의 유효성분은 이성질체인 실리빈(Silybin), 실리디아닌(Silydianin), 실리크리스틴(Silychristin) 등의 플라보노리그난 (Flavonolignan)으로서, 이러한 플라보노리그난은 통상 실리마린(Silymarin)으로 통칭되는데, 실리마린 중에서도 실리빈이 가장 생체 활성이 높은 성분으로 알려져 있으며, 실리마린은 큰엉겅퀴 종자 중에 1.5 내지 3% 의 함량으로 함유되어 있다. 실리마린은 실리비닌(Silibinins), 이소실리빈(Isosilybin), 실리디아닌(Silydianin)과 실리크리스틴(Silicristin)의 혼합물로서, 분자 혼합된 이성체 혼합물[일반식C₂₅H₂₂O₁₀]이다. 실리비닌, 이소실리빈, 실리디아닌 및 실리크리스틴은 택시폴린(Taxifolin)이 코니페릴 알코올(Coniferyl alcohol)과 결합하고 있는 플라보리그난(Flavolignans)이다. 실리마린은 실험적으로 사염화탄소 또는 브로모벤젠 등으로 유발시킨 간세포 독성을 억제한다고 알려져 있다. 또한 실리마린은 그 안정성이 대단히 넓어서 매우 안전한 약물이기도 하다. 큰엉겅퀴(Milk thistle) 종자 추출물은 큰엉겅퀴 종자로부터 통상의 방법으로 추출한 것을 사용하거나, 상기 종자 추출물을 농축, 정제, 건조시켜 종자 추출물의 유효 성분인 실리마린 Silymarin) 함량을 70% 정도까지 높은 정제 건조 추출물, 예를 들어 독일의 마다우스사의 의약품 레가론(Legalon) 등의 원료를 사용할 수 있다.

[0011]

지금까지 엉겅퀴 추출물은 큰엉겅퀴의 종자 추출물인 실리마린만이 간세포 독성을 억제하는 것으로 알려져 있을 뿐, 새로운 엉겅퀴 종자인 마키 엉겅퀴(Cirsium maackii) 및 이로부터 분리된 지표 화합물이 타크린 유도에 의한 HepG2 세포의 세포독성에 관한 간보호 활성을 나타낸다는 점과 그 활성 성분에 대한 연구는 밝혀지지 않고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012]

본 발명은 새로운 엉겅퀴 종자인 마키 엉겅퀴(Cirsium maackii) 추출물을 유효 성분으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013]

본 발명은 또한, 본 발명에 의해 제조된 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014]

본 발명은 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여

[0015]

(1) 마키 엉겅퀴(Cirsium mackkii)를 건조하고 마쇄하여 분말화하는 단계;

[0016]

(2) 상기 (1)단계에 의해 제조된 엉겅퀴 분말에 70 % 에탄올을 가하고, 70 ℃의 온도에서 3 회 환류냉각 추출한 후, 감압여과한 다음, 40 ℃에서 감압농축하여 에탄올 조추출물을 수득하는 단계;

[0017]

(3) 상기 (2)단계에 의해 수득한 에탄올 조추출물을 증류수에 용해시키고, 디클로로메탄을 혼합하여 이상간 분배를 3 번 반복하고, 감압농축 및 건조하여 디클로로메탄을 추출물을 수득하는 단계;

[0018]

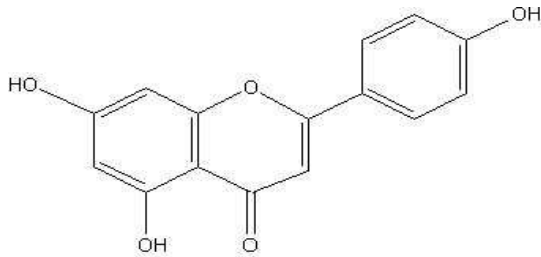
(4) 상기 (3)단계에 의해 수득한 디클로로메탄을 추출물을 증류수에 용해시키고, 에틸아세테이트를 혼합하여 이상간 분배를 3 번 반복하고, 감압농축 및 건조하여 에틸아세테이트 추출물을 수득하는 단계;

[0019] (5) 상기 (4)단계에 의해 수득한 에틸아세테이트 추출물을 증류수에 용해시키고, *n*-부탄올을 혼합하여 이상간 분배를 3 번 반복하고, 감압농축 및 건조하여 *n*-부탄올 추출물을 수득하는 단계;

[0020] (6) 상기 (5)단계에 의해 수득된 추출물에 대해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하고, 분획물을 수득하여 재결정하는 단계; 및

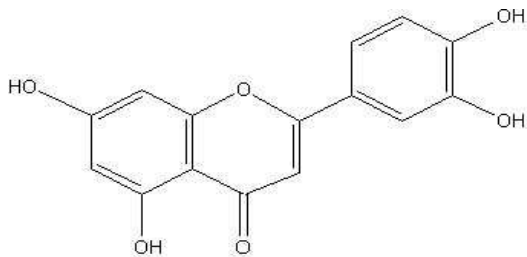
[0021] (7) 상기 (6)단계에 의해 수득된 분획물의 재결정에 메탄올을 가하고 여과한 다음 역상 HPLC(reverse phase HPLC)를 실시하여 하기 화학식 1 내지 4 로 표시되는 활성물질을 분취하는 단계;를 포함하여 제조되는 생리활성 물질을 함유하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0022] [화학식 1]



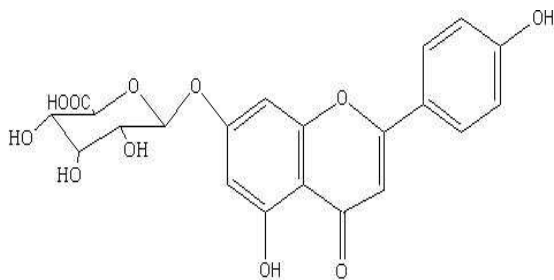
[0023]

[0024] [화학식 2]



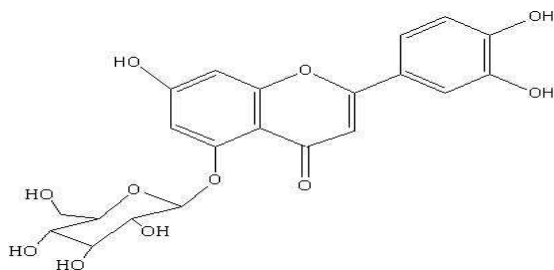
[0025]

[0026] [화학식 3]



[0027]

[0028] [화학식 4]



[0029]

[0030] 본 발명에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 마키 엉겅퀴(*Cirsium maackii*)는 국화과 엉겅퀴속에 속하며, 학명은 *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) Matsum이다.

[0031] 본 발명에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 (1) 마키 엉겅퀴(*Cirsium mackii*)를 건조하고 마쇄하여 분말화하는 단계에서는 마키 엉겅퀴(*Cirsium mackii*)의 수분 함량이

10% 이하가 되도록 건조시킨후, 건조 상태에서 0.1 μm 내지 1 mm의 평균 입경을 갖도록 마쇄하여 분말화하는 것을 특징으로 한다.

[0032] 마키 엉겅퀴의 수분 함량이 10% 이상이 되면 생리활성 물질의 추출 효율이 감소하며, 10% 미만인 경우 작업성이 감소하게 된다. 또한, 본 발명에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법에 있어서, 건조 상태에서 0.1 μm 내지 1 mm의 평균 입경을 갖도록 함으로써 생리 활성 물질의 추출 효율을 높일 수 있다.

[0033] 본 발명에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 간독성 물질은 알코올, 사염화탄소(CCl_4), 아세트아미노펜 (acetaminophen), 티오아세트아마이드(thioacetamide), 타크린(tacrine), 터서리-부틸하이드로퍼옥사이드(t-butylhydroperoxide), 루브라톡신 B(rubratoxin B) 및 과산화수소(H_2O_2)로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0034] 본 발명은 또한, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명에 의한 조성물은 간 독성 물질에 의한 HepG2 세포의 세포 독성에 대한 간보호 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0036] 본 발명에 의한 조성물은 간 독성 물질에 의한 HepG2 세포의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 감소시키는 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명에 의한 조성물은 간 독성 물질에 의한 HepG2 세포의 글루타치온(glutathione) 농도를 증가시키는 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0038] 본 발명에 의한 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물은 약학 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량% 로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0039] 본 발명에 의한 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0040] 본 발명에 의한 마키 엉겅퀴 추출물을 유효 성분으로 하는 간 독성 물질에 의한 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 조성물은 기존 엉겅퀴 재료와는 전혀 새로운 마키 엉겅퀴를 사용하여 이로부터 간 독성 물질에 의한 HepG2 세포의 세포 독성에 대한 간보호 활성, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 감소 활성, 및 글루타치온(glutathione) 농도를 증가시키는 활성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 HepG2 세포에서 타크린으로 유도된 간 세포 독성에 대한 아피게닌(apigenin)의 효과를 나타낸다.
 도 2는 HepG2 세포에서 타크린으로 유도된 간 세포 독성에 대한 루테올린(luteolin)의 효과를 나타낸다.
 도 3은 HepG2 세포에서 타크린으로 유도된 간 세포 독성에 대한 아피게닌 7-O-글루쿠로니드(apigenin 7-O-glucuronide)의 효과를 나타낸다.
 도 4는 HepG2 세포에서 타크린으로 유도된 간 세포 독성에 대한 루테올린 5-글루코시드(luteolin 5-glucoside)의 효과를 나타낸다.
 도 5는 HepG2 세포에서 타크린으로 유도된 ROS 생성에 대한 아피게닌(apigenin)의 효과를 나타낸다.
 도 6는 HepG2 세포에서 타크린으로 유도된 ROS 생성에 대한 루테올린 5-글루코시드(luteolin 5-glucoside)의 효과를 나타낸다.
 도 7은 타크린이 처리된 HepG2 세포에서 글루타치온(glutathione) 수준에 대한 아피게닌(apigenin)의 효과를 나

타낸다.

도 8은 타크린이 처리된 HepG2 세포에서 글루타치온(glutathione) 수준에 대한 루테올린 5-글루코시드(luteolin 5-glucoside)의 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0043] <실시예 1. 영경귀 전초 추출물의 제조>

[0044] 본 발명에 사용한 마키 영경귀 전초는 경북 울산 간절곶에서 채집하여, 일본 츠쿠바 자연 과학 대학의 식물, 식물학과 Y.Kadota 교수로부터 마키 영경귀임을 확인 받아 사용하였으며, 기타 영경귀류는 한국 생명공학연구원 자생식물사업단에서 분양 받아서 실험에 사용하였다.

[0045] 마키 영경귀 전초는 햇빛이 없는 곳에서 건조하였으며, 마쇄하였다. 마쇄한 영경귀 전초의 분말 2.0 kg을 에탄올 2.5 l를 넣고 70 °C에서 일정시간 간격(12h, 6h, 3h)으로 3회 반복하여 환류냉각 추출한 후 여지(와트만사, 미국)로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 40 °C에서 에탄올을 제거한 후 추출된 잔사로서 마키 영경귀 에탄올 조추출물 450.0 g을 수득하였다.

[0046] <실시예 2. 디클로로메탄 추출물의 제조>

[0047] 상기 실시예 1에서 얻은 마키 영경귀 전초의 수가용성 분획물 2 l에 디클로로메탄 2 l를 가하여 혼합한 후 3~4 차례 분획하여 수가용성 분획물 2 l 및 디클로로메탄 가용성 분획물 2 l를 얻은 후, 이 디클로로메탄 가용성 분획물을 건조하여 마키 영경귀의 디클로로메탄 가용 추출물 125.0 g을 수득하여 시료로 사용하였다.

[0048] <실시예 3. 에틸아세테이트 추출물의 제조>

[0049] 상기 실시예 2에서 얻은 마키 영경귀 전초의 수가용성 분획물 2 l에 에틸아세테이트 2 l를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 l 및 에틸아세테이트 가용성 분획물 2 l를 얻은 후, 이 에틸아세테이트 분획물을 건조하여 마키 영경귀의 에틸아세테이트 가용 추출물 72.0 g을 수득하였다.

[0050] <실시예 4. n-부탄올 추출물의 제조>

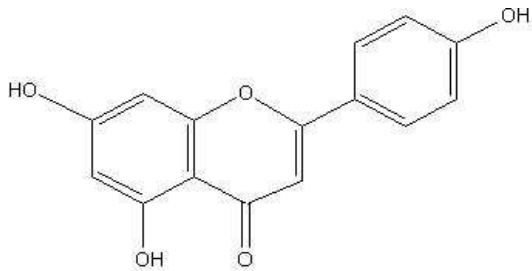
[0051] 상기 실시예 3에서 얻은 마키 영경귀 전초의 에틸아세테이트 수가용성 분획물 2 l에 부탄올 2 l를 가하여 혼합한 후 3~4 차례 분획하여 수가용성 분획물 2 l 및 부탄올 가용성 분획물 2 l를 얻은 후, 수가용성 분획물 및 n-부탄올 가용성 분획물을 건조하여 수가용성 추출물 및 n-부탄올 가용 추출물 58.5 g을 수득하였다.

[0052] <실시예 5. 에틸아세테이트 추출물로부터 화합물의 분리>

[0053] 상기 실시예 3의 마키 영경귀 전초의 에틸 아세테이트 가용 추출물 71.0 g을 전개용매로서 디클로로메탄 : 메탄올의 20:1 → 1:1의 혼합용매를 사용하여 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피와 재결정법을 수행하여 4종 화합물을 분리하고, 각각의 화합물에 대해서 NMR 및 MS 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기와 같다.

[0054] (1) 화합물 1 : 아피게닌(apigenin)

[0055] [화합식 1]



[0056]

[0057] 물질의性状: 회백색의 분말 (분자량 270)

[0058] 물질의 분자식: $C_{15}H_{10}O_5$

[0059] Pale yellow powder; m.p. 343-344 °C;

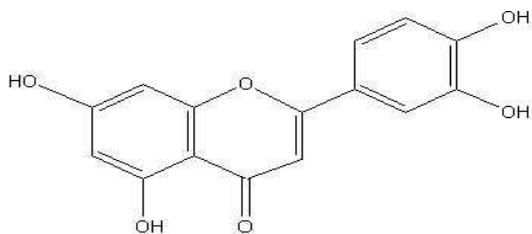
[0060] IR (KBr): 3600, 1655, 1600, 1436, 900, 820 cm^{-1} ;

[0061] 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 13.0 (1H, s, 5-OH), 7.92 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2' /H-6'), 6.92 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3' /H-5'), 6.77 (1H, s, H-3), 6.48 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.19 (1H, $J = 2.1$ Hz, H-6);

[0062] ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 181.7 (C-4), 164.2 (C-2), 163.7 (C-7), 161.5 (C-5), 161.2 (C-4'), 157.3 (C-9), 128.5 (C-2' /C-6'), 121.2 (C-1'), 116.0 (C-3' /C-5'), 103.7 (C-10), 102.8 (C-3), 98.8 (C-6), 94.0 (C-8).

[0063] (2) 화합물 2 : 루테오린(luteolin)

[0064] [화합식 2]



[0065]

[0066] 물질의性状: 노란색의 분말 (분자량286)

[0067] 물질의 분자식: $C_{15}H_{10}O_6$

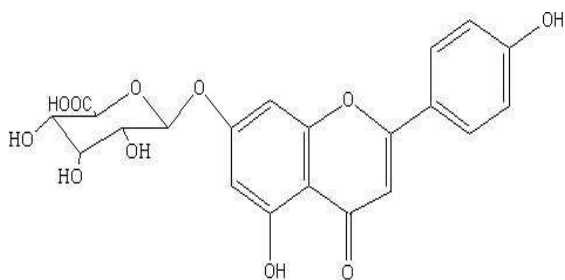
[0068] Yellow powder; mp 328-330 °C; IR λ_{max} : 3423, 2920, 1654, 1611,1500, 1367, 1267, 1164, 1032, 839 cm^{-1} ;

[0069] 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 12.97 (5-OH), 10.82, 9.92, 9.41 (aromatic OH), 7.41 (1H, dd, $J = 9.4, 2.2$ Hz, H-6'), 7.39 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-5'), 6.66 (1H, s, H-3), 6.44 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6);

[0070] ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 181.6 (C-4), 164.1 (C-2), 163.9 (C-7), 161.5 (C-5), 157.3 (C-9), 149.7 (C-4'), 145.7 (C-3'), 121.5 (C-6'), 119.0 (C-1'), 116.0 (C-5'), 113.4 (C-2'), 103.7 (C-10), 102.9 (C-3), 98.8 (C-6), 93.8 (C-8).

(3) 화합물 3 : 아피게닌 7-글루쿠로니드(apigenin 7-glucuronide)

[화합식 3]



물질의 성상: 회백색 분말 (분자량 446)

물질의 분자식: $C_{21}H_{18}O_{11}$

White amorphous powder; m.p. 172-174 °C;

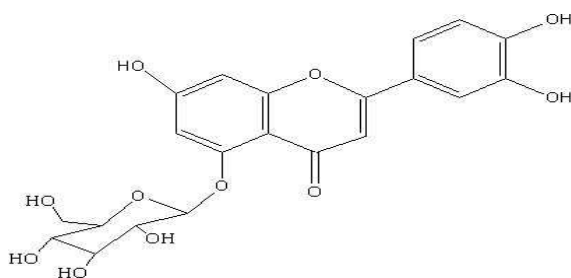
UV, λ_{max} (MeOH) 266, 337 nm;

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 7.84 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2' /H-6'), 6.87 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3' /H-5'), 6.85 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.76 (1H, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.40 (1H, s, H-3), 5.08 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1');

^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 181.9 (C-4), 172.3 (C-6'), 164.3 (C-2), 162.9 (C-7), 161.8 (C-5), 160.9 (C-4'), 156.9 (C-9), 128.3 (C-2' /C-6'), 120.4 (C-1'), 115.9 (C-3' /C-5'), 105.2 (C-10), 102.7 (C-3), 99.6 (C-1' /C-6), 94.6 (C-8), 76.4 (C-5'), 73.8 (C-3'), 72.9 (C-2'), 71.9 (C-4').

(4) 화합물 4 : 루테올린 5-글루코시드(luteolin 5-glucoside)

[화합식 4]



물질의 성상: 노란색의 분말 (분자량 448)

물질의 분자식: $C_{21}H_{20}O_{11}$

Brownish yellow powder; mp 279-281 °C;

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 10.97, 9.83, 9.39 (aromatic OH), 7.38 (1H, dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, H-6'), 7.36 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.79 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.70 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 6.55 (1H, s, H-3), 4.71 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'), 3.76 (1H, dd, $J = 13.0, 2.1$ Hz, H-6a'), 3.55 (1H, m, H-5'), 3.54 (1H, m, H-6b'), 3.49 (1H, s, H-3'), 3.30 (1H, s, H-4'), 3.20 (1H, s, H-2');

^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 177.0 (C-4), 162.6 (C-2), 161.4 (C-7), 158.7 (C-5), 158.3 (C-9), 149.3

(C-4'), 145.7 (C-3'), 121.5 (C-6'), 118.6 (C-1'), 116.0 (C-5'), 113.1 (C-2'), 108.3 (C-10), 105.7 (C-3), 104.5 (C-1'), 104.3 (C-6), 98.2 (C-8), 77.6 (C-3'), 75.6 (C-5'), 73.7 (C-2'), 69.7 (C-4'), 60.9 (C-6').

<실험예 1. 영경귀 조추출물 및 각 용매 분획물의 타크린 유도에 의한 인간 간암 세포 HepG2 에 대한 세포 독성 억제 및 간보호 활성 측정>

상기 실시예 1 내지 4에서 제조된 영경귀 조추출물 및 각 용매 분획물의 타크린(tacrine) 유도에 의한 HepG2 세포의 세포 독성 및 간보호 활성 실험은 Benoit (Benoit GG et al., Biochem Pharmacol., 7(53), pp423-427, 1997) 등의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.

먼저 인간 간암 세포 Hep G2(American Type Culture Collection)를 10% heat-inactivated FBS, 페니실린 (penicillin) G 100 IU/ml, 스트렙토마이신 (streptomycin) 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 RPMI에서 배양 (37 $^{\circ}\text{C}$, 50% CO_2)한 후 세포 수를 세어 2×10^5 세포수/웰(well) 이 되도록 희석하였다. 각 웰에 2×10^5 세포수/웰 농도로 100 μl 씩 접종하고 세포 독성을 평가하기 위해 기존 배지를 1 mM 타크린 (tacrine)을 넣은 배지로 교체하고, 비교예로 타크린을 넣지 않은 기존배지(control)을 넣어 3시간 배양 (37 $^{\circ}\text{C}$, 50% CO_2)하였다. 인간 간암 세포 HepG2 를 배양한 플레이트 (plate)에 실시예 1에서 수득한 영경귀 조추출물 (에탄올 추출물) 및 실시예 2 내지 5에서 수득한 각 용매 분획물을 농도별 (1, 10, 50, 100, 및 200 $\mu\text{g/ml}$)로 넣어 배양한 후, 흡광도 (550 nm)를 측정하였다.

간 보호 활성은 인간 간암 세포 HepG2 에 대한 세포 독성, 즉 % 저해율(relative cell viability)로 하기의 수학적 식 1로 구하고, 선회귀방정식을 사용하여 통계처리 하였다.

<수학적 식 1>

$$\% \text{ 저해율} = 1 - (\text{시료의 흡광도} - \text{대조군 흡광도}) / \text{표준 흡광도} \times 100$$

표 1에 타크린(tacrine) 유도에 의한 인간 간암 세포 HepG2 에 대한 세포 독성을 측정하여 본 발명에 의한 여러 가지 농도의 마키 영경귀 에탄올 추출물($\text{IC}_{50} = 85.5 \mu\text{g/ml}$) 및 각 용매 분획물들의 간보호 활성을 나타내었다.

표 1

시료	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g/ml})$
에탄올 추출물	95.5
디클로메탄 분획물	> 200
에틸아세테이트 분획물	34.2
부탄올 분획물	122.2
물 분획물	> 200

상기 표 1에서 보는 바와 같이 에탄올 추출물에서 용매 분획한 분획물에서는 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물이 IC_{50} 가 34.2 $\mu\text{g/ml}$ 로서 인간 간암 세포 HepG2 에 대해 다른 분획물에 비하여 가장 높은 억제활성을 나타내었으며 *n*-부탄올 분획물은 IC_{50} 가 122.2 $\mu\text{g/ml}$ 로서 다음으로 약한 활성을 나타내었다. 디클로로메탄과 물 분획물은 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서도 활성을 나타내지 않았다.

<비교예> 기타 영경귀의 간보호 활성 효과

본 발명에 의한 마키 영경귀 외에 기타 다른 영경귀 추출물을 사용하여 타크린(tacrine) 유도에 의한 HepG2 세포의 세포독성에 대한 간보호 활성을 상기 실험예 1의 방법을 이용하여 측정하고 그 결과를 하기 표 2에 나타내

었다.

표 2

[0099]

시료	IC ₅₀ (μg/ml)
지느러미 엉겅퀴 (<i>Carduus crispus</i>) 전초	195.5
고려 엉겅퀴 (<i>Cirsium setidens</i>) 전초	> 200
버들 잎 엉겅퀴 (<i>Cirsium lineare</i>) 전초	> 200
물 엉겅퀴 (<i>Cirsium nipponicum</i>) 전초	> 200
정영 엉겅퀴 (<i>Cirsium chanroenicum</i>) 전초	> 200
큰 엉겅퀴 (<i>Cirsium pendulum</i>) 전초	> 200
엉겅퀴 (<i>Cirsium maackii</i>) 전초	85.5

[0100]

상기 표 2에서 알 수 있는 것처럼, 여러가지 엉겅퀴 중에서 본 발명에 의한 마키 엉겅퀴 (*Cirsium maackii*)의 IC₅₀는 85.5 μg/ml로서 타크린(tacrine) 유도에 의한 HepG2 세포에 대한 세포 독성을 억제하여 탁월한 간보호 활성 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

[0101]

<실험예 2. 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 타크린 유도에 의한 인간 간암 세포 HepG2 에 대한 세포 독성 억제 및 간보호 활성 측정>

[0102]

상기 실시예 3에서 얻어진 마키 엉겅퀴의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 화합물에 대해 상기 실험예 1 과 동일하게 타크린 유도에 의한 인간 간암 세포 HepG2 의 세포 독성 억제 및 간보호 활성 측정을 측정하고 그 결과를 도 1 내지 도 4에 나타내었다. 종래 간 보호 효과가 있다고 알려져 있는 큰엉겅퀴(Milk thistle) 추출물인 실리마린을 양성대조군으로 사용하였다.

[0103]

도 1 내지 도 4에서 보는 바와 같이 0.3 mM 타크린(tacrine)에 의해 유도된 인간 간암 세포 HepG2 세포 독성에 대하여 아피게닌 7-글루쿠로니드(apigenin 7-glucuronide)의 경우 200 μM의 농도에서 최대 간 세포의 세포 독성을 보호 효과를 나타내고, 종래 간 보호 효과가 탁월하다고 알려진 실리마린의 경우에도 25 μM 의 농도에서 타크린에 의한 간 세포의 세포 독성을 보호 효과를 나타내는데 비해(도 3), 아피게닌과 루테오린 5-글루코시드는 6.25 μM 농도에서부터 농도 의존적으로 타크린에 의한 간 세포의 세포 독성을 보호하는 효과를 나타내는 것을 알 수 있다(도 4).

[0104]

<실험예 3. 타크린(tacrine) 유도에 의한 인간 간암 세포 HepG2 의 ROS 생성 억제 활성 측정>

[0105]

상기 실시예 3에서 얻어진 마키 엉겅퀴의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 화합물에 대해 타크린 유도에 의한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 억제하는지 여부를 측정하고 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0106]

도 5 및 도 6에서 보는 바와 같이 아피게닌과 루테오린 5-글루코시드는 0.3 mM 타크린(tacrine) 유도에 의한 HepG2 세포의 ROS 생성을 농도의존적으로 감소시켰다.

[0107]

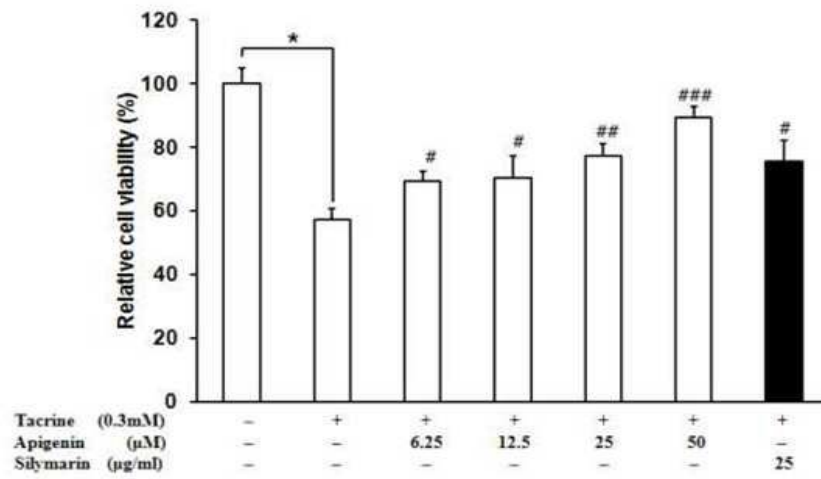
<실험예 4. 타크린(tacrine) 유도에 의한 인간 간암 세포 HepG2 내의 글루타치온 증가 활성 측정>

[0108]

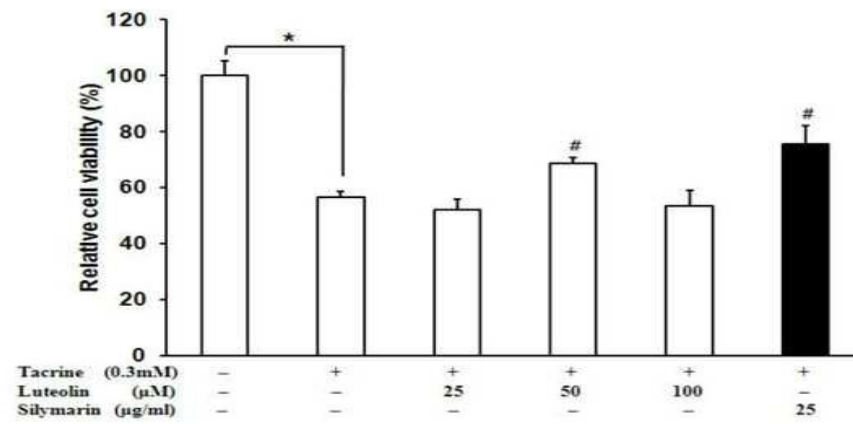
상기 실시예 3에서 얻어진 마키 엉겅퀴의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 화합물에 대해 타크린(tacrine) 유도에 의한 인간 간암 세포 HepG2 세포내의 감소된 글루타치온(glutathione) 농도를 증가시키는지 여부를 측정하고 그 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다. 도 7 및 도 8 에서 보듯이 HepG2 세포내의 감소된 글루타치온(glutathione) 농도를 농도의존적으로 증가시킬 수 있었다. 따라서 이들 화합물들의 타크린(tacrine) 유도에 의한 HepG2 세포에서의 간보호효과는 ROS 생성을 억제하여 감소된 글루타치온 농도를 증가시킨다고 할 수 있다.

도면

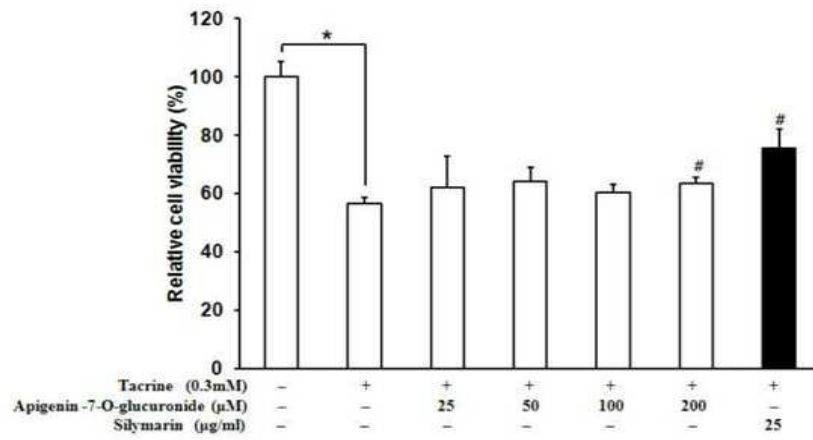
도면1



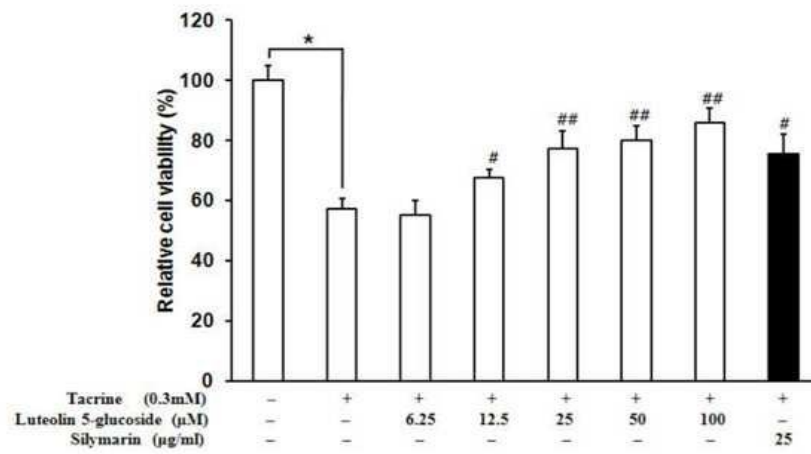
도면2



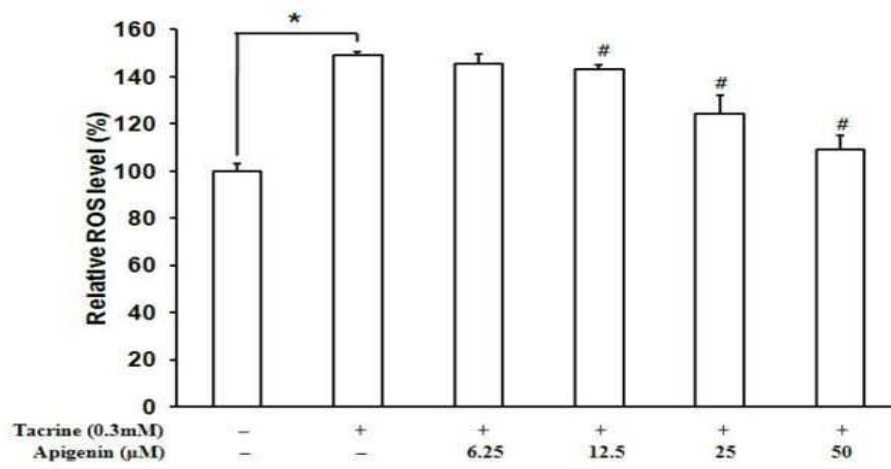
도면3



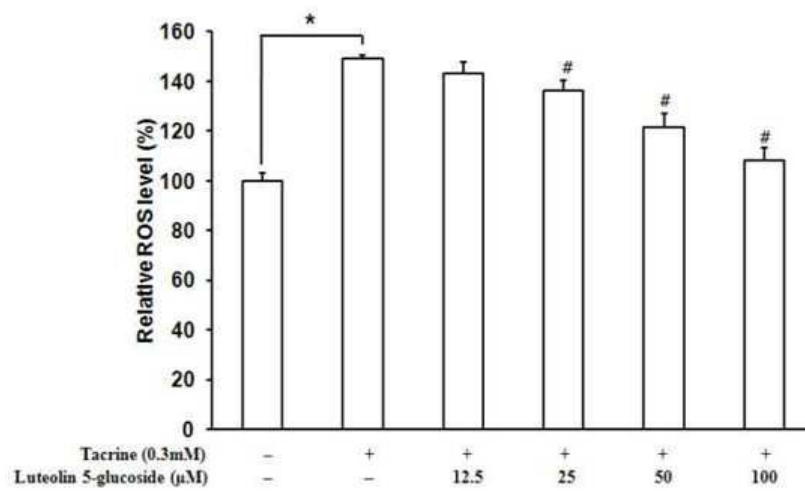
도면4



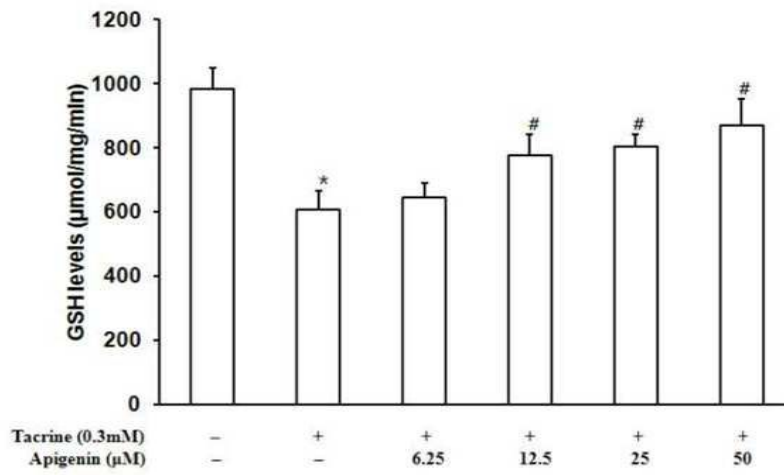
도면5



도면6



도면7



도면8

