(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0070161
(43) 공개일자 2020년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/81 (2006.01) *A61K 31/7048* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/81 (2013.01)
A61K 31/7048 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0046813(분할)
(22) 출원일자 2020년04월17일
심사청구일자 2020년04월17일
(62) 원출원 특허 10-2018-0157205
원출원일자 2018년12월07일
심사청구일자 2018년12월07일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
백남인
경기도 화성시 동탄순환대로21길 53 1306동 403호(청계동,롯데캐슬 알바트로스)
김형근
경기도 용인시 기흥구 흥덕4로16번길 10 303호(영덕동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

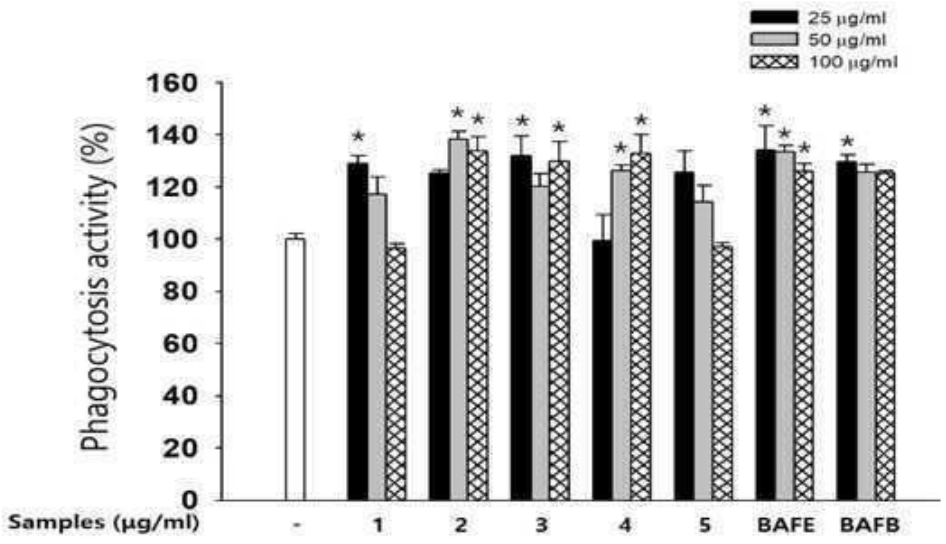
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **천사의 나팔꽃 유래 플라보노이드 화합물을 포함하는 면역 증강 또는 항염증용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*) 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이로부터 유래된 플라보노이드(flavonoid) 화합물을 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 약제학적 조성물, 면역 증강용 의약외품 조성물, 항염증용 약제학적 조성물 및 항염증용 의약외품 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 37/04 (2018.01)

(72) 발명자
강세찬
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732
국제경영대학325호(서천동)
오현지
경기도 수원시 팔달구 고화로9번길 31
베네스트빌601호(매산로2가)
오은지
경상북도 포항시 남구 청암로 77 포항공과대학 생명과학관210호

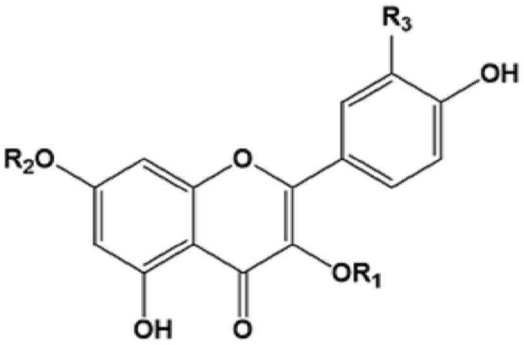
명 세 서

청구범위

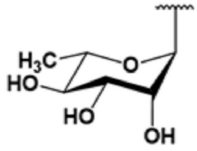
청구항 1

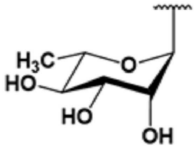
하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항염증용 약제학적 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서,





R_1은 - Rhm 이고, R_2는 - Rhm 이고, R_3는 수소이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 iNOS 또는 COX-2 사이토카인 단백질의 발현을 억제하는 것인, 항염증용 약제학적 조성물.

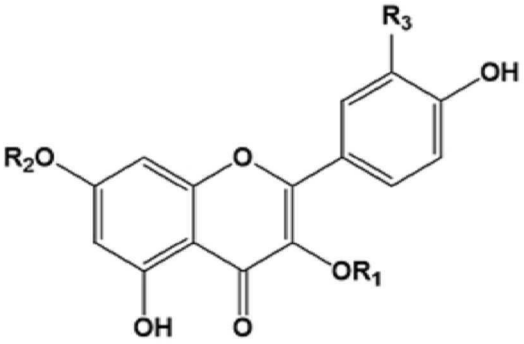
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 NO 생성을 저해하는 것인, 항염증용 약제학적 조성물.

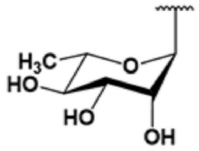
청구항 4

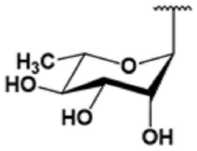
하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항염증용 의약외품 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서,





R_1은 - Rhm 이고, R_2는 - Rhm 이고, R_3는 수소이다.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*) 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이로부터 유래된 플라보노이드(flavonoid) 화합물을 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 약제학적 조성물, 면역 증강용 의약외품 조성물, 항염증용 약제학적 조성물 및 항염증용 의약외품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인체는 항상성을 유지하려고 하는 특성을 가지고 있으며, 이러한 특성은 면역계에서도 작용하게 된다. 면역(immunity)이란 생물체 내에 병원체 등의 외인성 항원이나 암세포 등의 비정상적인 세포를 인식하고, 생물체의 항상성을 유지하고 질병으로부터 보호하기 위한 일련의 생체 방어 반응을 의미한다. 상기 면역 반응은 피부, 소화관, 호흡기 등을 통해 침입한 유해 물질로부터 신체를 보호하기 위한 방어 체계로서 외부 자극 물질을 제거하는 대식세포(macrophage)의 작용에 영향을 받는다.

[0004] 상기 대식세포는 식세포작용(phagocytosis)을 하는 면역세포로서 대부분의 인체 조직에 존재하는 내재성 면역반응의 중요한 1차 방어 기능을 담당한다. 상기 식세포작용은 상기 대식세포가 세균이나 이물질을 탐색, 제거하는 작용으로 상기 대식세포는 상처부위로 모여들어 침입한 세균을 공격한다. 이에, 상처부위에 혈장이 축적되고 혈류가 증가되어 발열, 홍반, 부종, 통증 현상 등의 외적 증상이 일어나게 된다. 대식세포는 TNF-α, IL-6 등의 다양한 종류의 사이토카인(cytokine)을 분비하고 항원에 대한 면역 반응에 중추적인 역할을 한다.

[0005] 최근에 환경 오염 및 스트레스 증가에 따른 면역계 이상으로 염증 반응(inflammation)의 만성화가 진행되어 염증성 질환이 증가하고 있다. 염증 반응은 조직의 손상, 외부의 자극 또는 다양한 감염원에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나로, 혈관과 체액 내의 각종 염증 매개 인자 및 다양한 면역 세포의 유기적 상호작용으로 인한 효소 활성화, 염증매개물질의 분비, 세포 침윤 및 체액 삼출, 순환 장애, 조직의 변질 및 과증식 등 일련의 복합적인 병리 현상이다.

[0006] 염증반응의 유도 물질들 중에서 LPS(lipopolysaccharide)는 백혈구와 같은 면역세포와 상호작용을 하며, 단핵세포의 대식세포들에 있어서 iNOS 이소 형태의 활성화에 의한 산화질소 농도의 증대에 의한 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 하고 있다. NO는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에서 iNOS에 의해 생성되는 것으

로 알려져 있다. NOS는 염증, 혈관 확장, 신경전달, 종양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 NO를 생성하며, 염증 상태에서는 대식세포에서 iNOS에 의해 NO를 다량 생성하여 여러 만성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서, iNOS 활성 억제제의 개발은 상기 질환의 치료제로서 개발 가능성이 높으며, 또한 이러한 관점에서 iNOS에 의한 NO 생성을 억제하는 화합물은 인체의 다양한 염증질환의 치료제로 사용될 수 있다.

[0007] 현재 항염증제로 사용되고 있는 제제인 비스테로이드성 소염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDS)는 시클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)라고 하는 아라키돈산(arachidonic acid)로부터 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생합성에 관여하는 효소 활성을 억제함으로써, 항염증 작용을 나타내는데, 주 치료작용 외에 위장관 장애, 간장애, 신장애 등의 심각한 부작용을 야기하므로 장기간의 사용에 있어서 제약이 따르는 실정이다. 이에 생체에 안전하고, 유효 성분이 안정하며, 장기간 섭취가 용이한 장점을 지닌 천연물을 이용한 염증 치료제의 개발이 널리 요구되고 있다.

[0008] 한편, 천사의 나팔꽃(*Brugmansia Arborea*)은 가지과 독말풀속에 속하는 꽃피는 상록 관목으로, 관상용 또는 진통제, 충혈완화제, 천식치료 등을 위한 약제로 사용되고 있다. 이러한 약제학적 활성이 있음에도, 천사의 나팔꽃의 화학적 성분 및 이의 생물학적 활성에 관한 연구는 거의 없었다.

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 천연 원료 유래의 면역 증강용 제제를 찾고자 예의 노력한 결과, 천사의 나팔꽃의 분획물로부터 플라보노이드(flavonoid) 화합물 4종을 분리 및 동정하였으며, 상기 화합물이 대식세포 식세포작용을 촉진시키는 효과가 있음을 확인하였고, 또한 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase(COX-2) 사이토카인(cytokine) 단백질의 과량발현을 억제하고 NO의 생성을 저해하여 항염증 효과를 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 천사의 나팔꽃 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 천사의 나팔꽃 추출물 또는 이의 분획물로부터 유래된 플라보노이드 화합물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 천사의 나팔꽃 추출물 또는 이의 분획물로부터 유래된 플라보노이드 화합물을 포함하는 항염증용 조성물을 제공하는 것이다.

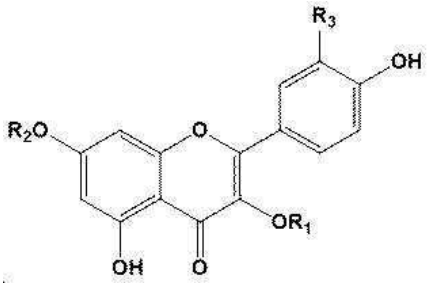
과제의 해결 수단

[0015] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

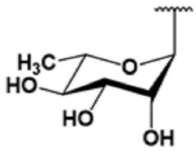
[0017] 본 발명의 하나의 양태는 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는, 면역 증강용 약제학적 조성물을 제공한다.

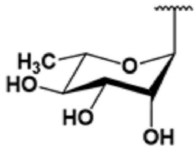
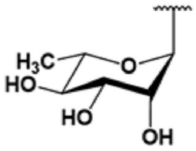
[0018] 또한, 본 발명의 다른 양태는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 면역 증강용 약제학적 조성물을 제공한다.

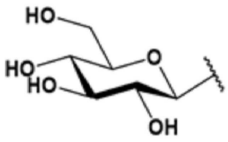
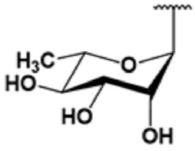
[0019] [화학식 1]

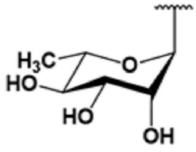
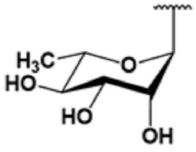
[0020] 

[0022] 상기 식에서

[0023] R_1은  - Rhm 이고, R_2는 수소이고, R_3는 수소이거나(이하, 화합물 1);

[0024] R_1은  - Rhm 이고, R_2는  - Rhm 이고, R_3는 수소이거나(이하, 화합물 2);

[0025] R_1은  - Glc 이고, R_2는  - Rhm 이고, R_3는 수소이거나(이하, 화합물 3); 또는

[0026] R_1은  - Rhm 이고, R_2는  - Rhm 이고, R_3는 히드록시기이다(이하, 화합물 4).

[0028] 또한, 본 발명의 또 다른 양태는 상기 화합물 2 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항염증용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명은 천사의 나팔꽃에서 최초로 화합물 1 내지 4를 분리 및 동정하였고, 상기 화합물 1 내지 4의 면역 증강 효과 및 화합물 2의 항염증 효능은 본 발명에서 최초로 확인하였다.

[0030] 본 발명의 천사의 나팔꽃 추출물 또는 분획물 유래의 화합물은 그밖에 다른 천연 공급원으로부터 분리된 것일 수 있고, 당업계에 공지된 방법을 통해 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질일 수 있으며, 이를 포함하여 입수 경로에 관계없이 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0032] 본 발명에서는 천사의 나팔꽃 추출물 또는 분획물 뿐만 아니라, 이로부터 분리 및 동정된 화합물 1 내지 4가 정

상 대식세포 식세포작용을 촉진시키는 면역증강 효능을 갖는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명자들은 천사의 나팔꽃 추출물 또는 분획물, 이로부터 분리 및 동정된 화합물 1 내지 4의 면역 증강효과를 최초로 규명하였다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에서, 천사의 나팔꽃의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물, 구체적으로 천사의 나팔꽃의 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물, 또는 화학식 1 내지 4를 비롯한 화합물은 대식세포의 식세포작용 촉진 효과를 확인하였는바, 상기 분획물 또는 화합물은 대식세포 식세포작용 촉진에 따른 면역 증강 효과를 가진다.

[0034] 또한, 천사의 나팔꽃의 분획물로부터 분리된 화합물 2의 iNOS(inducible nitric oxide synthase)와 COX-2(cyclooxygenase) 사이토카인 단백질의 과량발현을 억제함으로서 NO(nitric oxide)의 과량발현을 저해하여 항염증 효과를 갖는것을 확인하였다.

[0036] 본 발명에서 "천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea,* Angel Trumpet)"은 독말풀속 가지과 상록저목(Solanaceae)에 속하는 쌍떡잎식물로, 진통제, 항류머티스제, 외상치료제, 충혈완화제 또는 진정제로 사용된다고 알려져 있으나, 면역 증강 효과에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 상기 천사의 나팔꽃은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 재배된 것을 사용할 수 있다. 구체적으로 천사의 나팔꽃의 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 등을 제한없이 사용할 수 있고, 보다 구체적으로 천사의 나팔꽃의 꽃을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서 "추출물"은 상기 천사의 나팔꽃을 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0038] 본 발명에서 상기 추출물을 추출하는데 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물; 메탄올, 에탄올, 프로필알코올, 부틸알코올 등의 C1 내지 C4의 저급 알코올; 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 다가 알코올; 및 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 아세톤, 벤젠, 헥산, 디에틸에테르, 디클로로메탄 등의 탄화수소계 용매; 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 구체적으로 메탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 본 발명에서 상기 추출물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0040] 본 발명에서 "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서는 상기 천사의 나팔꽃 추출물을 용매 분획법, 한외여과 분획법, 크로마토그래피 분획법 등의 다양한 방법으로 분획한 결과물 등을 포함하며, 보다 구체적으로 상기 천사의 나팔꽃 추출물의 에틸아세테이트 분획물 또는 n-부탄올 분획물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서, 건조한 천사의 나팔꽃의 꽃을 80% 메탄올로 실온에서 추출 및 여과하고, 감압 및 증발시켜 추출물을 수득하였으며, 상기 추출물로부터 에틸아세테이트(EtOAc) 및 n-부탄올(n-BuOH) 분획물을 수득하였다.

[0042] 즉, 천사의 나팔꽃의 n-부탄올 분획물 및 에틸아세테이트 분획물은 대식세포 식세포작용에 우수한 효과를 나타내고, 이를 통해 상기 분획물은 면역 증강용 조성물로 사용 가능하다.

[0043] 이외에도, 본 발명의 천사의 나팔꽃 추출물 또는 분획물 유래의 화합물은 그밖에 다른 천연 공급원으로부터 분리된 것일 수 있고, 당업계에 공지된 방법을 통해 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질일 수 있으며, 이를 포함하여 입수 경로에 관계없이 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0045] 본 발명의 용어 "면역증강"은, 생체 내 암, 염증 등 다양한 질환에 대한 신체 방어기전을 보강하는 모든 현상을 의미하는 것으로, 구체적으로, 면역 세포의 활성 증진, 예컨대 대식세포의 식세포작용을 촉진시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0046] 상기 대식세포는 선천 면역을 담당하는 주요 세포로서 대부분 전신에 정착성으로 존재하나, 일부는 혈액 내 단핵구의 형태로 존재한다. 상기 대식세포는 식세포작용을 통해 이물질 또는 세균을 섭취하여 이를 제거한다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 천사의 나팔꽃 추출물 또는 분획물, 이로부터 분리 및 동정한 화합물 1 내지 4는 대식세포의 식세포작용을 촉진시키는 효과를 통해 면역 증강 용도에 적합하다는 것을 밝혔다(도 4).

[0049] 본 발명의 용어 "항염증"은 염증을 억제하는 작용을 의미하며, 상기 "염증"은 외부 감염원 (박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발 물질)의 침입에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 의미할 수 있다. 구체적으로 염증은 선천성 면역 반응의 일부로 외부 자극 특히 병원체 표면에 특이적으로 존재하는 패턴을 인식한다. 생체 내 염증 세포는 그런 표면의 특이적 패턴을 비자기로 인식하고, 병원체를 공격한다. 이때 병원체가 생체 내 물리적 장벽을 깨고 침입하면 염증반응이 발발한다. 염증반응 시 초기단계에 면역반응을 담당하는 백혈구들이 염증성 사이토카인을 발현한다. 따라서 세포 내 염증성 사이토카인의 발현양은 염증반응 활성화의 지표가 된다. 또한 강력한 염증 매개물인 나이트릭 옥사이드 (Nitric oxide, NO) 역시 사이토카인에 의해 많은 종류의 세포에서 발생되므로 염증반응의 추가적인 지표라 할 수 있다.

[0051] 본 발명에서 용어 "약제학적으로 허용 가능한 염"이란 개체에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1로 표시되는 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0052] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0053] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0054] 또한, 염기를 사용하여 약제학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 약제학적으로 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0055] 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 화학식 1의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약제학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약제학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 이의 약제학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 수화물 등의 용매화물 및 가능한 모든 입체 이성질체를 제한없이 포함한다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 용매화물 및 입체이성질체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 화학식 1로 표시되는 화합물로부터 제조할 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 결정 형태로 제조될 경우 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다. 본 발명에서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 화학양론적 수화물뿐만 아니라 다양한 양의 물을 함유하는 화합물이 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 용매화물은 화학양론적 용매화물 및 비화학양론적 용매화물 모두를 포함한다.

[0059] 본 발명에서 용어 "약제학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의

방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0060] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 담체를 추가로 포함하여 제조할 수 있다.

[0061] 한편, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0063] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 화합물 1 내지 화합물 4 중 어느 하나 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 면역 증강용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0064] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 화합물 2 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 항염증용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0065] 화합물 1 내지 4", "약제학적으로 허용 가능한 염", "면역 증강", "항염증", 및 "염증"은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0067] 본 발명에서 용어, "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니하며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염형 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미한다.

[0068] 본 발명의 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0069] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 패치, 가습기 충진제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제일 수 있다.

발명의 효과

[0071] 본 발명은 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*) 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이로부터 유래된 플라보노이드(flavonoid) 화합물은 대식세포의 식세포작용을 촉진시키고 NO 생성을 저해하는 효과를 보인다. 따라서, 이를 이용하여 면역증강용 약제학적 조성물 및 면역증강용 의약외품 조성물, 항염증용 약제학적 조성물 및 항염증용 의약외품 조성물 등으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 본 발명에서 천사의 나팔꽃으로부터 분리한 플라보노이드(flavonoid) 화합물 1 내지 4(켐페롤-3-O-람노피라노사이드(Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside)(화합물 1), 캠페롤-3,7-di-O-α-L-람노피라노시드(Kaempferol-3,7-di-O-α-L-rhamnopyranoside)(화합물 2), 캠페롤-3-O-β-D-글루코피라노실-7-O-α-L-람노피라노시드(Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranosyl-7-O-α-L- rhamnopyranoside)(화합물 3), 또는 퀘르세틴-3,7-di-O-α-L-람노피라노시드(Quercetin-3,7-di-O-α-L-rhamnopyranoside)(화합물 4))의 화학적 구조를 나타낸 것이다.

도 2의 A는 LPS가 처리된 RAW264.7 세포 내 천사의 나팔꽃에서 분리한 플라보노이드 화합물 1 내지 4, 에틸아세테이트 분획물 및 n-부탄올 분획물의 세포 생존능을 나타낸 것이고, B는 LPS가 처리된 RAW264.7 세포 내 천사의 나팔꽃에서 분리한 플라보노이드 화합물 1 내지 4, 에틸아세테이트 분획물 및 n-부탄올 분획물의 NO 억제 백분율(%)을 나타낸 것이다.

도 3은 RAW264.7 세포의 대식세포의 식세포작용에 있어서 천사의 나팔꽃에서 분리한 플라보노이드 화합물 1 내지 4, 에틸아세테이트 분획물 및 n-부탄올 분획물의 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 RAW264.7 세포 내 iNOS 및 COX-2의 단백질 수준에 있어서 천사의 나팔꽃에서 분리한 플라보노이드 화합물 2의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 5는 천사의 나팔꽃의 꽃으로부터 n-부탄올 분획물에 대한 UPLC-ESI/MS 크로마토그램(254nm)을 나타낸 것이다(화합물 1, RT: 11.3; 화합물 2, RT: 16.4; 화합물 3, RT: 9.5; 화합물 4, RT: 13.5).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0076] **실시예 1. 재료, 시약 및 기기**

[0078] **1-1. 식물 재료**

[0079] 본 실시예에서 사용한 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*)의 말린 꽃은 2014년 6월에 한국 포천시의 허브 농장에서 수집하였고, 표본 시료(KHU2014-0623)는 경희대학교 천연물 화학 (Natural Product Chemistry) 실험실에 보관되어 있다.

[0081] **1-2. 시약 및 기기**

[0082] 컬럼 크로마토그래피(Column chromatography (CC))용 실리카겔(silica gel (SiO_2))은 Kiesel gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany)을, 옥타데실 실리카겔(octadecyl silicagel (ODS))은 LiChroprep RP-18 (Merck)을 사용하였다. 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatograpy (TLC))는 Kieselgel 60 F_{254} 및 RP-18 $F_{254}S$ (Merck)를 사용하여 수행하였고, 화합물은 Spectroline Model ENF-240 C/F (Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA) UV 램프 및 10% H_2SO_4 용액을 사용하여 검출하였다. 핵 자기 공명(Nuclear magnetic resonance (NMR)) 스펙트럼은 400 MHz FT-NMR 스펙트로미터(Varian Inova AS 400 (Palo Alto, CA, USA))으로 측정하였고, 적외선(Infrared (IR)) 스펙트럼은 Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer (Buckinghamshire, England)로 수행하였다. 전자 이온화 질량 분석(Electronic ionization mass spectrometry (EI/MS)) 및 팹-질량분석(Fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS))은 JEOL JMS-700 (Tokyo, Japan)으로 기록하였다. 녹는점은 Fisher-John's Melting Point Apparatus (Fisher Scientific, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0084] **실시예 2. 천사의 나팔꽃 추출물 및 분획물의 제조**

[0086] 천사의 나팔꽃의 말린 꽃(900g, 건조중량)을 80% 메탄올 (MeOH, 27.0L X 3)로 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 농축된 메탄올 추출물(160g)을 물(1L)에 현탁 시킨 후, 에틸아세테이트 (EtOAc, 1L X 3) 및 n-부탄올 (n-BuOH, 0.6L X 3)로 연속하여 추출하였다.

[0087] 수득한 메탄올 추출물을 물 (1L)에 현탁시키고, 에틸아세테이트 (EtOAc, 1L X 3) 및 n-부탄올 (n-BuOH, 0.6L X 3)로 연속하여 추출하였다. 각 층을 농축시켜 에틸아세테이트 분획물 (BAFE, 12g), n-부탄올 분획물 (BAFB, 16g) 및 물 분획물 (BAFW, 132g)을 수득하였다.

[0089] **실시예 3. 천사의 나팔꽃의 에틸아세테이트 분획물 및 n-부탄올 분획물로부터 화합물의 분리 및 동정**

[0091] **3-1. 천사의 나팔꽃의 에틸아세테이트 분획물 및 n-부탄올 분획물로부터 화합물의 분리**

[0092] 상기 실시예 2의 에틸아세테이트 분획물 (BAFE, 12g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CC)(ϕ7.0cm X 15cm)에 적용시키고, n-헥산(hexane)-에틸아세테이트(EtOAc) (4 : 1 → 2 : 1 → 1 : 1, 각각 2.0L) 및 클로로포름($CHCl_3$)-메탄올(MeOH)-물(H_2O) (50 : 3 : 1 → 36 : 3 : 1 → 25 : 3 : 1 → 18 : 3 : 1 → 12 : 3 : 1 → 9 : 3 : 1 → 7 : 3 : 1 → 6 : 4 : 1, 각각 1.5L)로 용출하였다. 용출 용액을 TLC로 모니터하여, 16개의 분획물(BAFE-1 내지 BAFE-16)을 수득하였다.

[0093] n-부탄올 분획물을 실리카겔 CC(7.0cm X 13.0cm)에 적용시키고 클로로포름-메탄올-물 (12 : 3 : 1 → 9 : 3 : 1 → 6 : 4 : 1, 각각 12.0 L)로 용출시켜, 14개의 분획물(BAFB-1 내지 BAFE-14)을 수득하였다. 분획물 BAFB-12(1.8g, V_e/V_t 0.495-0.575)를 ODS CC(4.0cm X 9.0 cm)에 적용하고 MeOH-H_2O (1 : 2, 3.5 L)로 용출하여 궁극적으로 13개의 분획물(BAFB-12-1 내지 BAFB-12-13)과 함께, **화합물 4** [BAFB-12-9, 25.3 mg, V_e/V_t 0.440-0.488, TLC (SiO_2 F_{254}) R_f 0.67, $CHCl_3$-MeOH-H_2O=6:4:1]를 수득하였다.

[0094] 분획물 BAFB-14(3.0g, V_e/V_t 0.471-0.496)는 ODS CC(4.5cm X 7.0 cm)에 적용하고 MeOH-H_2O (1 : 2, 3.2 L)로 용출하여 궁극적으로 8개의 분획물(BAFB-14-1 내지 BAFB-14-8)을 수득하였다. 분획물 BAFB-14-5(240.2mg, V_e/V_t 0.070-0.206)를 실리카겔 CC (2.0cm X 15.0 cm)에 적용하고 EtOAc-*n*-BuOH-H_2O(18 : 3 : 1 → 12 : 3 : 1, 각각 5.5 L)로 용출시켜 11개의 분획물(BAFB-14-5-1 내지 BAFB-14-5-11)과 함께 **화합물 1** [BAFB-14-5-2, 16.9 mg, V_e/V_t 0.030-0.057, TLC (SiO_2 F_{254}) R_f 0.72, EtOAc-*n*-BuOH-H_2O = 4 : 5 : 1]를 수득하였다.

[0095] 분획물 BAFB-14-6(343.6 mg, V_e/V_t 0.209-0.672)을 실리카겔 CC(3.0cm X 18.0 cm)에 적용하고 EtOAc-*n*-BuOH-H_2O(16 : 3 : 1, 6.8 L)로 용출시켜 17개의 분획물(BAFB-14-6-1 내지 BAFB-14-6-17)과 함께 화합물 3[BAFB-14-6-9, 10.8 mg, V_e/V_t 0.333-0.353, TLC (SiO_2 F_{254}) R_f 0.52, EtOAc-*n*-BuOH-H_2O = 4 : 5 : 1]을 수득하였다.

[0096] 분획물 BAFB-14-7(128.2 mg, V_e/V_t 0.675-0.809)을 실리카겔 CC(2.0cm X 15.0 cm)에 적용하고 $CHCl_3$-MeOH-H_2O(9 : 3 : 1, 1.1L)로 용출시켜 12 개의 분획물(BAFB-14-7-1 내지 BAFB-14-7-12)을 수득하였다. 분획물 BAFB-14-7-6(36.1 mg, V_e/V_t 0.337-0.447)을 ODS CC(1.5cm X 6.0 cm)에 적용하고 아세톤-H_2O (1 : 3, 270 mL)로 용출하여 궁극적으로 5개의 분획물(BAFB-14-7-6-1 내지 BAFB-14-7-6-5)과 함께, **화합물 2** [BAFB-14-7-6-1, 4.7 mg, V_e/V_t 0.022-0.067, TLC (SiO_2 F_{254}) R_f 0.55, $CHCl_3$-MeOH-H_2O=65:35:10]를 수득하였다.

[0098] **3-2. 분리된 화합물 1 내지 4의 동정**

[0099] 상기 실시예 3-1에서 분리된 화합물 1 내지 4를 대상으로 각 화합물을 동정하였다.

[0101] 화합물 1을 분석한 결과는 다음과 같다.

[0102] - 황색(yellow) 무정형 분말(CH_3OH);

[0103] - m.p. 174℃;

[0104] - $[\alpha]_D^{25}$ -184° (*c*=0.10, CH_3OH);

[0105] - 양성 ESI-MS *m/z* 433 $[M + H]^+$

[0106] - IR (KBr, *ν*) 3400, 1660, 1500 cm^{-1}

[0107] ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (400 MHz 및 100 MHz, CD_3OD, δ_H 및 δ_C)의 데이터는 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[0108] 분석 결과, 화합물 1은 켐페롤-3-O-람노피라노사이드임을 확인하였다.

[0110] 화합물 2를 분석한 결과는 다음과 같다.

[0111] - 담황색(pale yellow) 분말(CH_3OH);

[0112] - m.p. 197℃;

[0113] - $[\alpha]_D^{25}$ -231.6° (*c*=0.20, CH_3OH);

[0114] - 양성 ESI-MS *m/z* 579 $[M + H]^+$

[0115] - IR (KBr, *v*) 3369, 1657, 1603, 1493 cm^{-1}

[0116] ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (400 MHz 및 100 MHz, CD_3OD, δ_H 및 δ_C)의 데이터는 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[0117] 분석 결과, 화합물 2는 캠페롤-3,7-di-O-α-L-람노피라노시드임을 확인하였다.

[0119] 화합물 3을 분석한 결과는 다음과 같다.

[0121] - 담황색 분말(CH_3OH);

[0122] - m.p. 261℃;

[0123] - $[\alpha]_D^{25}$ -40.7° (*c*=0.20, CH_3OH);

[0124] - 양성 ESI-MS *m/z* 579 $[M + H]^+$

[0125] - IR (KBr,) 3372, 1647, 1600, 1503 cm^{-1}

[0126] ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (400 MHz 및 100 MHz, CD_3OD, δ_H 및 δ_C)의 데이터는 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[0127] 분석 결과, 화합물 3은 캠페롤-3-O-β-D-글루코피라노실-7-O-α-L-람노피라노시드임을 확인하였다.

[0129] 화합물 4를 분석한 결과는 다음과 같다.

[0130] - 담황색 분말(CH_3OH);

[0131] - m.p. 186℃;

[0132] - $[\alpha]_D^{25}$ -55.3° (*c*=0.06, CH_3OH);

[0133] - 양성 ESI-MS *m/z* 595 $[M + H]^+$

[0134] - IR (KBr,) 3371, 1650, 1608, 1503 cm^{-1}

[0135] ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (400 MHz 및 100 MHz, CD_3OD, δ_H 및 δ_C)의 데이터는 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[0136] 분석 결과, 화합물 4는 퀘르세틴-3,7-di-O-α-L-람노피라노시드임을 확인하였다.

표 1

[0138] 화합물 1 내지 4의 ^{1}H-NMR 스펙트럼 데이터(CD_3OD; 400 MHz). (δ in ppm, *J* in Hz)

No.	1	2	3	4
	δ_H (*J* in Hz)	δ_H (*J* in Hz)	δ_H (*J* in Hz)	δ_H (*J* in Hz)
6	6.24, d, 2.4	6.45, br. s	6.48, d, 2.0	6.48, d, 2.0
8	6.36, d, 2.4	6.70, br. s	6.75, d, 2.0	6.67, d, 2.0
2′	7.75, d, 8.8	7.78, d, 8.8	8.01, d, 8.0	7.37, d, 2.0
3′	6.97, d, 8.8	6.92, d, 8.8	6.98, d, 8.0	-
5′	6.97, d, 8.8	6.92, d, 8.8	6.98, d, 8.0	6.84, d, 8.4
6′	7.75, d, 8.8	7.78, d, 8.8	8.01, d, 8.0	7.30, dd, 8.4, 2.0
1′′	5.34, d, 1.6	5.37, br. s	5.50, d, 8.0	5.37, br. s
2′′	4.25, dd, 3.2, 1.6	4.25, br. d, 3.2	4.25, dd, 8.0, 8.0	4.25, br. d, 3.2
3′′	3.75, dd, 9.2, 3.2	3.75, dd, 9.2, 3.2	3.78[a])	3.75, dd, 9.2, 3.2
4′′	3.34[a])	3.34[a])	3.49[a])	3.34[a])
5′′	3.34[a])	3.34[a])	3.55[a])	3.34[a])
6′′	0.98, d, 6.4	0.99, d, 6.0	4.55, br. d, 12.0 3.87, dd, 12.0, 5.0	0.99, d, 6.0
1′′′		5.53, br. s	5.51, d, 2.0	5.53, br. s
2′′′		4.30, br. d, 3.0	4.15, br. d, 3.2	4.30, br. d, 3.0
3′′′		3.90, dd, 9.0, 3.0	3.78[a])	3.90, dd, 9.0, 3.0
4′′′		3.65[a])	3.55[a])	3.65[a])
5′′′		3.65[a])	3.49[a])	3.65[a])
6′′′		1.20, d, 6.4	1.25, d, 6.0	1.20, d, 6.4

[0139] [a]) Overlapped signals, reported without designated multiplicity.

표 2

[0140] 화합물 1 내지 5 의 ^{13}C-NMR 스펙트럼 데이터(CD_3OD; 100 MHz). (δ in ppm)

No.	1	2	3	4
	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C
2	159.8	159.8	159.8	159.8
3	136.2	136.2	136.2	136.4
4	180.1	180.1	180.1	179.7
5	158.0	158.0	158.0	162.9
6	96.7	96.7	96.7	95.5
7	165.9	165.9	165.9	163.4
8	99.8	99.8	99.8	99.8
9	163.2	163.2	163.2	157.9
10	105.9	105.9	105.9	107.4
1′	122.4	122.4	122.4	122.9
2′	131.9	131.9	131.9	116.9
3′	116.5	116.5	116.5	146.4
4′	161.5	161.5	161.5	149.9
5′	116.5	116.5	116.5	116.3
6′	131.9	131.9	131.9	122.6
1′′	103.5	103.5	101.4	103.5

2′′	72.1	72.0	74.5	72.0
3′′	72.0	71.9	77.4	71.9
4′′	73.2	73.2	71.0	73.2
5′′	71.9	71.3	78.0	71.3
6′′	17.6	17.6	62.6	17.6
1′′′		101.4	103.5	100.5
2′′′		72.1	72.0	72.1
3′′′		71.9	71.9	71.9
4′′′		73.6	73.2	73.6
5′′′		71.7	71.3	71.7
6′′′		18.1	18.4	18.1

[0141] **실시예 4. 화합물 1 내지 4의 면역증강효과 및 화합물 2의 항염증 효과 분석**

[0143] **4-1. 세포 배양**

[0144] RAW264.7 세포는 10 % 태아 소 혈청(FBS)과 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 둘베코 변성 필수 배지(DMEM)에서 배양하였다. 상기 세포는 37 ℃에서 5 % CO_2 를 포함하는 대기조건의 인큐베이터에서 배양되었다.

[0146] **4-2. 세포 생존 분석 - 염증 세포에 대한 세포독성 효과 확인**

[0147] RAW264.7 세포를 4 X 10^5 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 상기 세포에 LPS 및 플라보노이드 샘플을 24시간동안 함께 처리한 후, 10 μl의 MTT(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 용액(5 mg/mL)을 첨가하고 추가로 4 시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후, 100 μl DMSO(디메틸 술폭사이드)를 첨가하여 불용성 포르마잔(formazan)을 10분 동안 용해시켰다. 흡광도(OD)는 멀티리더기(TECAN, Switzerland)로 570nm에서 측정하였다. 결과는 도 2A에 나타내었고, 각 막대는 세 번의 독립 실험의 평균±표준편차를 나타낸다. $*p$ <0.05 는 대조군과의 95 %의 유의한 차이를 나타낸다.

[0148] 분석 결과, LPS-자극된 대식세포는 다양한 농도(25, 50, 100 μg/mL)의 분획물 및 화합물로 처리하였고, 100 μg/mL보다 낮은 농도에서 RAW264.7세포에 대한 세포 독성이 없었다(도 2A).

[0150] **4-3. NO 생산의 측정 - 항염증 효과의 확인**

[0151] RAW264.7 세포를 4 X 10^5 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 상기 세포에 LPS 및 플라보노이드 샘플을 24시간 동안 함께 처리하였다. 배양 배지에 질산염(nitrate)의 축적은 NO 생성의 지표가 되었다. 100 μl의 상층액을 각 웰에 이동시키고 빈 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 이후에, 100 μl의 그리스 시약(Griess reagent, 1% sulfanilamide 및 5% phosphoric acid 내 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride; Sigma Aldrich, St Louis, MO)을 각 웰에 첨가한 후, 미소판리더기(microplate reader, TECAN, Switxerland)로 540nm에서 흡광도를 측정한다. 아질산염(nitrite) 농도는 아질사나 나트륨의 표준 곡선에 근거하여 추정하였다.

[0152] 분석 결과, LPS-처리된 그룹은 NO 생산이 증가되었다. 모든 분획물 및 화합물은 유의하게 용량-의존적으로 LPS-유도 NO 생성을 모든 농도에서 억제하였다(도 2B).

[0154] **4-4. 대식세포 식세포작용의 측정을 위한 NBT 분석 - 화합물 1 내지 4의 면역 증강 효과**

[0155] 식세포작용(phagocytosis)은 니트로 블루 테트라졸륨 분석(NBT) 환원 분석에 의해 측정되었다. RAW264.7 세포를 4 X 10^5 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 상기 세포에 플라보노이드 샘플을 24시간 동안 함께 처리하였다. 상층액에 제거된 후, 100 μl의 자이모산(zymosan)(5 X 10^6 입자/mL) 및 0.6 mg/mL NBT를 추가로 각 웰에 첨가하였다. 1시간 동안 배양 후, 상기 세포를 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PB

S)로 세척하였고, 흡광도를 미소판 리더기(TECAN, Switzerland)로 540nm에서 측정하였다.

[0156] 분석 결과, 화합물 1 내지 4 및 분획물을 자이모산에 의해 활성화된 RAW264.7 세포에서 식세포작용 증가 효과에 대해 측정하였다. 천사의 나팔꽃의 말린 꽃 추출물의 에틸아세테이트 및 n-부탄올 분획물은 25-100 μg/mL 에서 120-140 % 로 식세포작용이 증가되었다(도 3). 화합물 1은 25 μg/mL 에서 128.9 % 로 식세포작용이 크게 증가하였고, 화합물 2는 50 μg/mL에서 138.3 %, 100 μg/mL에서 133.9 %로 증가하였고, 화합물 3은 25 μg/mL에서 131.9 %, 100 μg/mL에서 129.7 %로 증가하였으며, 화합물 4는 50 μg/mL에서 126.1 %, 100 μg/mL에서 132.8 %로 증가하였다(도 3). 대식세포는 감염성 병원균, 노화된 정상 세포 및 암세포에 대한 식균작용을 유도하여 인체를 방어하기 때문에, 본 발명에서 화합물 1 내지 4는 잠재적인 면역 조절제로서 유용할 수 있음을 시사한다.

[0158] **4-5. iNOS 및 COX-2 사이토카인의 발현 억제 측정을 위한 웨스턴 블롯 분석 - 화합물 2의 항염증 효과**

[0159] RAW264.7 세포를 24시간 동안 배양하고, 저온의 PBS로 세척하고 1 X 용균 완충액(lysis buffer)으로 용해시켰다. 원심분리기(15,000rpm, 30분)를 사용하여 상층액을 수집하고, 단백질의 농도를 측정하였다. SDS-PAGE에 의해 분리한 후, 겔을 0.2 μm 니트로 셀룰로오스 막으로 옮겨 1차 및 2차 항체 ECL 기질(American Pharmacia Biotech, New York City, NY, USA)에서 배양한 후, 필름에 노출시켰다.

[0160] 분석 결과, 화합물 2는 LPS에 의해 증가된 iNOS 단백질의 발현을 유의하게 감소시키는 것을 발견하였다(도 4). 또한 LPS-유도된 COX-2 단백질 발현의 증가를 상당히 감소시켰다(도 4). 상기 결과는 화합물 2가 잠재적 항염증제로서 유용할 수 있음을 시사한다.

[0162] **4-6. 통계 분석**

[0163] 데이터는 3회 반복에 대한 평균±평균의 표준 오차(standard error of the mean; SEM)로 표현하였다. 결과는 일원 분산 분석(one-way ANOVA)를 사용하여 결정되었고, GraphPad Prism(version 5, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 통계적 유의성은 별표(*)로 표시되었다(NC 그룹과 비교하여 $^{*}P < 0.05$, LPS 그룹과 비교하여 $^{\#}P < 0.05$).

[0165] **4-7. UPLC-ESI/MS 를 이용한 플라보노이드의 정량 분석**

[0166] 액체 크로마토그래피(Waters Acquity SDS)와 결합된 Quadrupole electrospray ionization (ESI) 질량 분석기(Waters Acquity SQD, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 플라보노이드의 정량 분석을 수행하였다. UPLC 분석을 위해 C_{18} 컬럼(Kinetex 2.6 μm EVO C18 100Å LC column, 150 X 2.1 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였다. 상기 컬럼 오븐 온도는 25 ° C, 시료 주입량은 1 μL, 검출 파장은 254 nm로 설정하였다. 용매 A(H_2O: formic acid = 99.9: 0.1, v/v) 및 용매 B(acetonitrile 100%)를 이동상으로 사용하고 유속을 0.3 mL/분으로 설정하였다. 용매는 하기와 같이 등급화되었다: 용매 B는 10%에서 시작하여 20분까지 20%로 증가하고, 29분까지 90%로 증가한 후 30분까지 10%로 감소하고 35분까지 유지되었다. MS 분석은 이온 소스 온도 150° C 및 탈용매 온도 300° C에서 수행되었다. 모세관 전압을 3500V로 설정하였고, 샘플링 콘 전압을 50V로 설정하였고, 추출콘 전압을 3.0V로 설정하였다. 탈 용매 가스 유속은 600 L/시간으로 설정하였고, 콘 가스 유속은 50L/시간으로 설정하였다. 모든 구성성분은 양성 모드로 분석하였다. 탐지 시간이 근접한 피크는 선택된 이온 모니터링(SIM) 모드를 사용하여 분석하였다. n-부탄올 분획물을 갖는 천사의 나팔꽃에서 분리된 화합물 1 내지 4의 정량 분석을 위해, 각 화합물 1mg을 정밀히 달아서 MeOH에 용해시켜 1.0mg/mL의 저장 용액을 수득하였다. 보정 곡선은 5가지 농도(화합물 1-3: 500, 250, 125, 50, 25 μg/mL; 화합물 4: 250, 125, 50, 25, 12.5 μg/mL)로 각 표준에 대해 발견되었다. 또한, n-부탄올 분획물로부터 수득한 1mg을 정밀하게 칭량하여 80% 수성 MeOH에 용해시켜 1.0mg/mL의 농도를 갖는 저장 용액을 만들었다. 정량 분석은 3번 반복되었다.

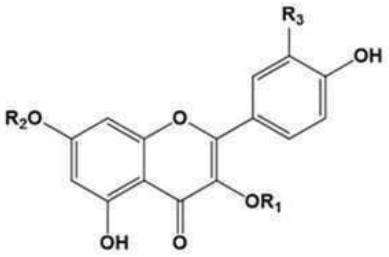
[0167] n-부탄올 분획물의 UPLC-ESI-MS 분석을 수행하여 화합물 1 내지 4의 함량을 분석하였다. Kinetex EVO C18 LC 컬럼을 사용하여 H_2O 및 아세토니트릴(acetonitrile (AcOH))을 사용한 구배 용출(gradient elution)을 수행하였다. 피크(peak)는 254nm에서 포토다이오드(photo diode)를 사용하여 검출되었고, ESI/MS 분석으로 확인되었다(도 5). 피크는 9.5, 11.3, 13.5, 및 16.4분에 나타났고 MS 분석을 통해, 화합물 3, 화합물 1, 화합물 4, 화합물 2로 동정되었다. 화합물의 회귀 곡선으로부터 외삽하는 경우, n-부탄올 분획물 중 화합물 1 내지 4의 함량의

수준은 각각 3.8±0.9%, 2.2±0.5%, 20.3±1.1%, 및 2.3±0.4%로 결정되었다.

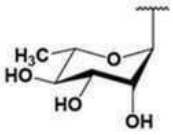
[0169] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

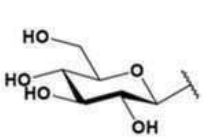
도면1



	R_1	R_2	R_3
1	- Rhm	H	H
2	- Rhm	- Rhm	H
3	- Glc	- Rhm	H
4	- Rhm	- Rhm	OH

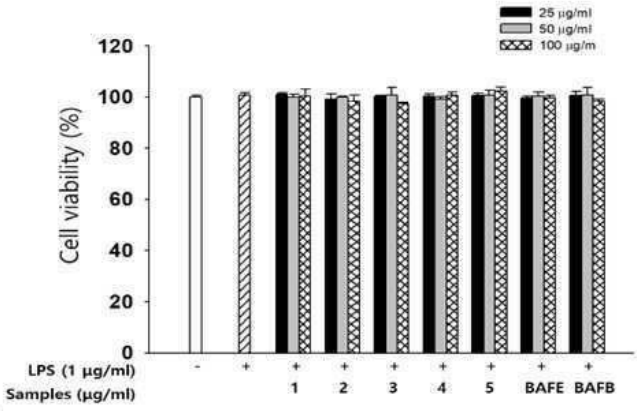


- Rhm

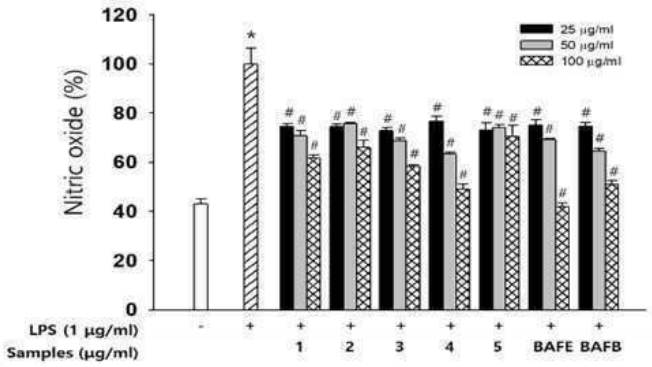


- Glc

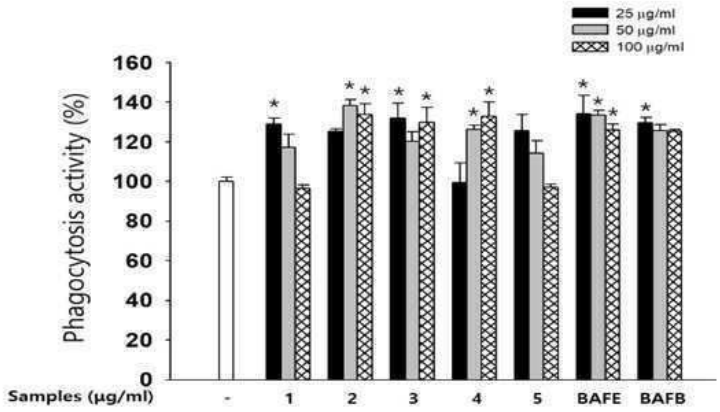
도면2a



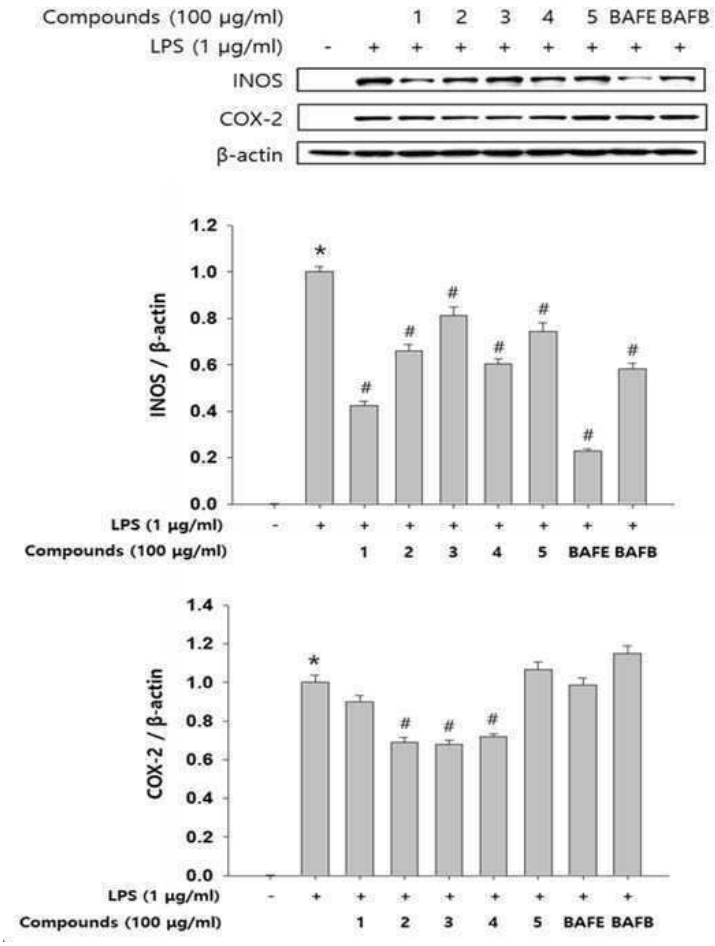
도면2b


Nitric oxide (%)
120
100
80
60
40
20
0
25 μg/ml
50 μg/ml
100 μg/ml
LPS (1 μg/ml)
Samples (μg/ml)
1
2
3
4
5
BAFE
BAFB

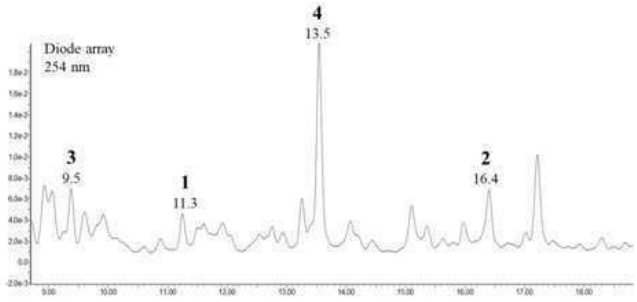
도면3


Phagocytosis activity (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
25 μg/ml
50 μg/ml
100 μg/ml
Samples (μg/ml)
1
2
3
4
5
BAFE
BAFB

도면4



도면5



Com	RT	Detected ions	Calibration curve	r^2
1	11.3	433.3 $[M+H]^+$, 287.3 $[(M+H)-146]^+$	945.271x+2856.54	0.999391
2	16.4	579.5 $[M+H]^+$, 433.4 $[(M+H)-146]^+$, 287.2 $[(M+H)-292]^+$	1515.84x+10358.4	0.998205
3	9.5	595.4 $[M+H]^+$, 449.3 $[(M+H)-146]^+$, 287.2 $[(M+H)-308]^+$	358.233x+1695.42	0.999801
4	13.5	595.5 $[M+H]^+$, 449.3 $[(M+H)-146]^+$, 303.2 $[(M+H)-292]^+$	677.618x+1704.22	0.999232