

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0034458 (43) 공개일자 2013년04월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/899 (2006.01) A61K 31/7016 (2006.01) A61K 31/7032 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)	
(21) 출원번호 10-2011-0098474	(72) 발명자 백남인 경기도 수원시 영통구 망포동 쌍용1차아파트 104동 2001호	
(22) 출원일자 2011년09월28일 심사청구일자 2011년09월28일	정락훈 경기도 이천시 부발읍 신원2리 416 (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 특허법인 대아	

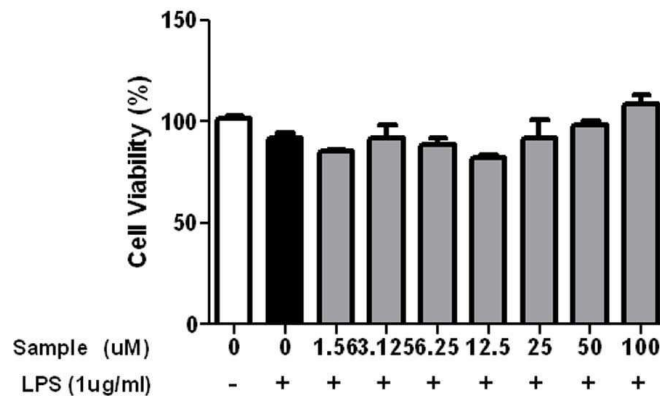
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **벼 지상부 추출물, 벼 지상부 분획물, 이로부터 분리된 리그난 글리코사이드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 벼 지상부 추출물로부터 분획된 벼 지상부 분획물로부터 분리된 리그난 글리코사이드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물은 염증유발물질 중 하나인 NO(Nitric Oxide)에 대해 생성 억제 활성을 가짐으로써 종래의 염증성 질환 치료제에 비해 부작용을 현저히 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이대영

경기도 수원시 영통구 영통1동 대우월드마크 102동 705호

조진경

경기도 수원시 영통구 매영로415번길 43, 303호 (영통동)

김지영

서울특별시 서초구 잠원동 한신8차아파트 306동 1204호

강희철

경기도 수원시 영통구 덕영대로1556번길 16, 디지털엠패이어 B동 604호 (영통동)

서우덕

경상남도 밀양시 내이동 1085번지 국립식량과학원 기능성작물부 신소재개발과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110701-305-656-001-02-00

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대 바이오그린 21

연구과제명 벼 지상부 배당체 분획으로부터 flavonolignan 배당체의 분리 동정 및 활성 고분획물 제조 시스템 구축

주관기관 경희대학교

연구기간 2011.05.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

며 지상부 추출물로부터 분획된 벼 지상부 분획물로부터 분리된 리그난 글리코시드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 베타 지상물 분획물은 베타 지상부 생체를 80% 메탄올 수용액으로 추출하여 얻어진 베타 지상부 추출물을 *n*-헥산과 H₂O로 분배 추출하고 H₂O층을 에틸 아세테이트로 분배 추출한 후, H₂O층을 *n*-부탄올로 분배추출하여 수득되는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제2항에 있어서,

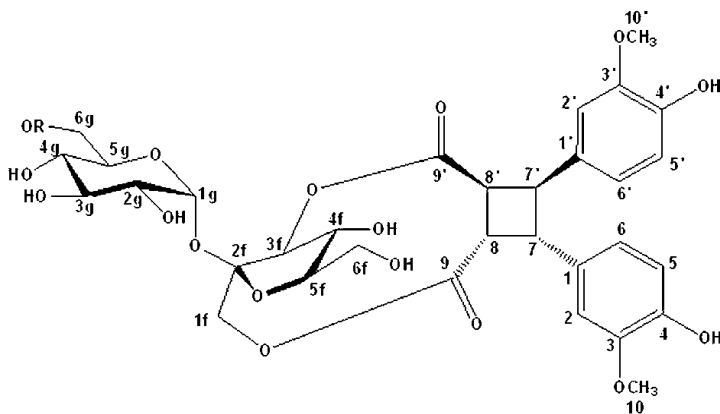
상기 리그난 글리코시드 화합물은 벼 지상부 추출물을 *n*-헥산과 H₂O로 분배 추출하고 H₂O층을 에틸 아세테이트로 분배 추출하여 수득된 에틸 아세테이트 분획물로부터 분리된 것임을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 리그난 글리코시드 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 오리자노시드 B(oryzanoside B)인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



여기서, R은 아세틸 임.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 오리자노시드 B 화합물은 100 μM 의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 비염, 기관지염, 관절염, 패혈증, 치주염, 위궤양, 궤장염, 염증성 피부질환 또는 염증성 장질환인 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

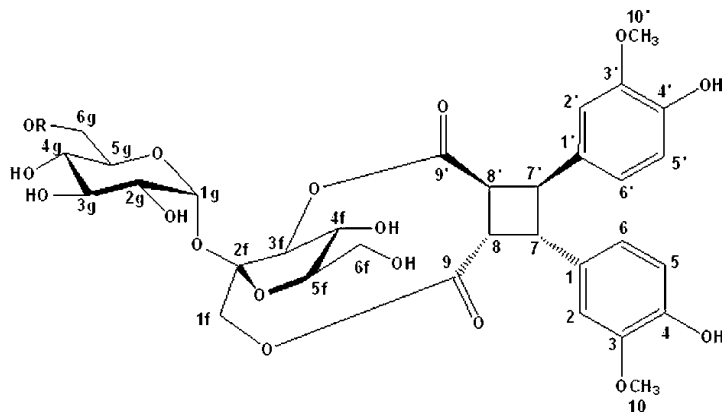
제1항 또는 제4항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 세포로부터의 NO 생성 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

며 지상부 추출물을 *m*-헥산과 H_2O 로 분배 추출하고 H_2O 층을 에틸 아세테이트로 분배 추출하여 수득된 에틸 아세테이트 분획물로부터 분리된 하기 화학식 1로 표시되는 오리자노시드 B(oryzanoside B) 화합물:

[화학식 1]



여기서, R은 아세틸 임.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 며 지상부 추출물, 며 지상부 분획물, 이로부터 분리된 리그난 글리코시드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명은 며 지상부 추출물로부터 분획된 며 지상부 분획물로부터 분리된 리그난 글리코시드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증반응(inflammation)은 비염(rhinitis), 기관지염(bronchitis), 간염(hepatitis), 관절염(arthritis) 등 다

양한 질환의 원인이 되므로, 평생 한·두가지 염증 질환을 앓아보지 않은 사람이 없을 정도로 우리 건강과 밀접한 관련을 가지고 있다. 특히 평균수명의 연장으로 인구의 노령화로 그 문제가 심각한 퇴행성 질환의 경우, 그 병태생리가 염증·면역 반응과 밀접한 관계가 있다는 연구 보고들이 증가하면서 염증 반응의 기전 및 역할에 대한 관심이 급격히 증가하고 있다.

- [0003] 염증유발물질 중 하나인 NO(Nitric Oxide)는 정상상태에서는 내피세포나 대식세포에서 생산되며 세포살상과 살균작용 이외에도 다양한 생리활성을 나타내는데, 특히, 혈관 내피세포의 이완작용에 있어서 혈압의 항상성(homeostasis)을 유지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. LPS, 염증유발인자 및 방사선조사 등의 자극은 특히, 유도형 산화질소 합성효소인 iNOS(inducible nitric oxide synthetase)의 발현을 유도하여 많은 양의 NO를 4 내지 6시간 동안 계속적으로 생성시키는데 이와 같이 생성된 과도한 양의 NO는 상기와 같은 질환들을 유발한다.
- [0004] 따라서, iNOS 활성 억제제의 개발은 상기 질병의 치료제로서 개발 가능성이 높으며, 또한 이러한 관점에서 iNOS에 의한 NO 생성을 억제하는 화합물은 인체의 다양한 염증질환의 치료제로 사용될 수 있다. 또 다른 염증유발물질인 PGE₂, PGF_{2a} 그리고 PGI₂와 같은 프로스타글란딘은 아라키돈산(arachidonic acid)에서 유래한 일종의 호르몬으로 다양한 생리활성에 관여하고 상기 호르몬의 유효효소인 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase, COX)에 의해 발현이 조절된다. COX의 활성을 저해하여 프로스타글란딘의 합성을 저해하는 아스피린 인도메타신 같은 비스테로이드성 소염진통제는 관절염에 우수한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- [0005] 마지막으로 TNF- α 는 BCG, LPS 및 염증유발인자에 의해 활성화된 대식세포와 섬유아세포 등에서 생산되어 세포살상 효과, 프로스타글란딘 및 IL-1, IL-6와 같은 사이토카인(cytokine)의 생산을 유도한다. 종양괴사인자로 발견된 TNF- α 는 류마티스 관절염, 장기이식거부반응 등의 자가면역질환, 천식, 아토피성피부염 등의 알러지성 염증질환 및 폐혈증, 급성간질환 등의 급성면역질환 등에 대한 관련성이 보고되면서 TNF- α 의 합성을 억제하는 화합물에 대한 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- [0006] 한편, 쌀은 세계적으로 옥수수, 밀, 콩과 더불어 매우 중요한 식량작물이다. 아시아 지역, 특히 우리나라에서는 가장 소비량과 생산량이 많은 작물이다. 그러나 이렇게 중요한 우리의 쌀 산업이 위기에 빠져 있다. 식생활의 서구화로 인해 쌀 소비가 급격히 줄어, 쌀의 중요성이 매년 낮아지고 있으나, 그럼에도 불구하고 쌀 농업은 포기할 수 없는 산업이다. 계속해서 유입되는 값싼 외국농산물은 우리 농업의 기반을 잠식하고 있고, 농가경제의 악화로 인해 농민들의 부채는 늘어가고 있다. 우리나라 농업과 농촌이 이러한 위기에 처하게 된 근본적인 원인은 근래 들어 가속화되고 있는 농업의 세계화에서 찾을 수 있다. 물론 농업에서 세계화가 시작된 것은 오래 전의 일이지만, 근래 들어 가속화 되고 있으며, 그 정도도 심화되고 있다. 따라서, 국가적으로 벼농사를 계속해야 할 돌파구가 마련되어야 할 시점이다.
- [0007] 한편, 벼(*Oryza sativa* L.)는 벼과(Gramineae)에 속하는 1년생 초본식물로 아시아 전역에 널리 분포하고 있다. 높이는 50~100 cm이며 뿌리에 가까운 곳에서 가지를 쳐서 포기를 형성하여 자란다. 꽃이 필 때는 곧추 서지만 익을 때는 밀으로 처지며 많은 소수가 달리고 소수는 가지에 호생하며 짧은 대가 있고 1개의 꽃으로 된다. 꽃은 7~8월경에 피며 자가수분에 의하여 결실한다.
- [0008] 벼에 대한 연구는 농업 재배적 측면에서 육종개발에 의한 생산성 향상과 병충해 질병에 대한 저항성 증대와 관련된 연구가 주로 이루어져 왔다. 쌀로부터 수종의 스테로이드(steroid), 테르페노이드(terpenoid)와 알칼로이드(alkaloid)가 분리 보고되어 있으며, 그 중 에르고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide)와 7-옥소-스티그마스테롤(7-oxo-stigmasterol)은 식물독성 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 쌀의 껍질인 왕겨에서의 추출물은 대표적으로 1-테트라트리아콘탄올(1-tetatriacontanol), β -시토스테롤(β -sitosterol), 모미락톤 A(momilactone A), 모미락톤 B(momilactone B), 트리신(tricin)이 보고된 바 있으며, 모미락톤 A는 체초제 활성이 모미락톤 B는 항암 활성이 보고된 바 있다. 하지만 벼의 지상부에 관한 성분 연구는 거의 이루어지지 않아 플라본(flavones)인 위고닌(wogonin), 리나린(linarin) 및 펙토리나린(pectolinarin)을 분리 보고한 연구가 전부이다.
- [0009] 이에 본 발명자들은 벼 지상부로부터 기능성을 갖는 활성 성분을 분리, 동정하고 이들에 대한 활성을 검정하기 위하여 예의 연구를 거듭하였고, 그 결과 벼 지상부 추출물로부터 분획된 벼 지상부 분획물로부터 분리된 리그난 글리코시드 화합물들이 NO 생성 억제 활성을 가짐을 확인하였고, 이들의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도를 밝힘으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 벼 지상부 추출물로부터 분획된 벼 지상부 분획물로부터 분리된 리그난 글리코시드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 벼 지상부 추출물로부터의 벼 지상부 분획물로부터 분리된 리그난 글리코시드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 같은 천연성분 물질을 함유하여 부작용을 감소시킬 수 있는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 전술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼 지상부 추출물로부터 분획된 벼 지상부 분획물로부터 분리된 리그난 글리코시드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 벼 지상부 분획물은 벼 지상부 생체를 80% 메탄올 수용액으로 추출하여 얻어진 벼 지상부 추출물을 *n*-헥산과 H₂O로 분배 추출하고 H₂O층을 에틸 아세테이트로 분배 추출한 후, H₂O층을 *n*-부탄올로 분배추출하여 수득될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 리그난 글리코시드 화합물은 벼 지상부 생체를 알코올 수용액으로 추출하여 벼 지상부 추출물을 수득하는 단계; 상기 벼 지상부 추출물을 벼 지상부 추출물을 *n*-헥산과 H₂O로 분배 추출하고 H₂O층을 에틸 아세테이트로 분배 추출한 후, H₂O층을 *n*-부탄올로 분배추출하여 벼 지상부 분획물을 수득하는 단계 및 상기 H₂O층을 에틸 아세테이트로 분배 추출하여 수득된 에틸 아세테이트 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 화합물을 분리하고 정제하는 단계를 수행하여 수득될 수 있다.
- [0015] 상기 염증성 질환은 비염, 기관지염, 관절염, 폐혈증, 치주염, 위궤양, 궤장염, 염증성 피부질환, 염증성 장질환 등일 수 있다.
- [0016] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 염증유발물질 중 하나인 NO(Nitric Oxide)에 대해 생성 억제 활성을 가진다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 벼 지상부 추출물로부터 분획된 벼 지상부 분획물로부터 분리된 리그난 글리코시드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물은 염증유발물질 중 하나인 NO(Nitric Oxide)에 대해 생성 억제 활성을 가짐으로써 종래의 염증성 질환 치료제에 비해 부작용을 현저히 감소시킬 수 있다.

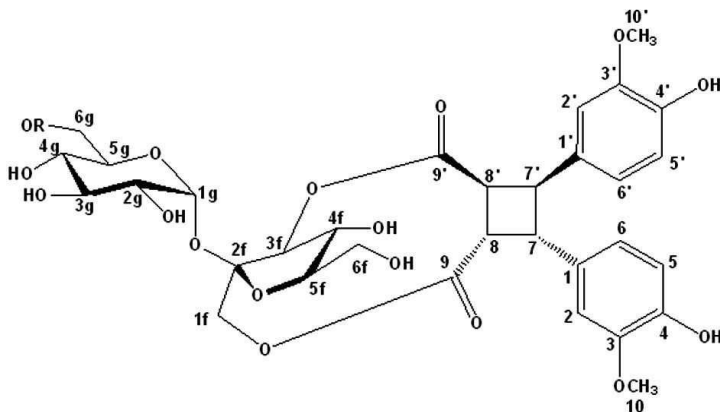
도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명의 실험예 2에서 오리자노시드 B를 처리한 세포 배양액에 대해 세포독성실험을 하여 측정한 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 실험예 2에서 오리자노시드 B를 처리한 세포 배양액에 대해 일산화질소 억제 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0020] 본 발명은 벼 지상부 추출물로부터 분획된 벼 지상부 분획물로부터 분리된 리그난 글리코시드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0021] 상기 벼 지상부 추출물은 벼 지상부 생체를 80% 메탄올 수용액 등과 같은 알코올 수용액으로 추출하여 수득될 수 있으며, 벼 지상부 생체는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 벼 지상부 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 여과법, 환류추출법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 벼 지상부 추출물은 벼 지상부 생체를 80% 메탄올 수용액에 넣고 추출물을 수득한 후 여과하고 감압 농축하여 얻을 수 있다.
- [0023] 상기 벼 지상부 분획물은 상술한 바에 따라 수득한 벼 지상부 추출물을 *n*-헥산과 H₂O로 분배 추출하고 H₂O층을 에틸 아세테이트(EtOA)로 분배 추출한 후, H₂O층을 *n*-부탄올로 분배추출함으로써 *n*-헥산 분획물, 에틸 아세테이트 분획물, *n*-부탄올 분획물 및 H₂O 분획물을 얻을 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 리그난 글리코시드 화합물은 에틸 아세테이트 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 화합물을 분리하고 정제하여 얻어질 수 있다.
- [0025] 상기 리그난 글리코시드 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 오리자노시드 B(oryzanoside B)이다.
- [0026] [화학식 1]



트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0032] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1로 표시되는 리그난 글리코시드 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면, 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.

[0033] 동량의 상기 화학식 1로 표시되는 리그난 글리코시드 화합물에 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 염을 제조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0034] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산염)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0035] 상기 조성물은 약학적 조성물로 사용할 수 있으며, 경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다.

[0036] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 리그난 글리코시드 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등에 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 등을 사용할 경우 잘 혼합되지 않기 때문에 경구투여를 위한 액상제제로는 부적합하다. 그러나, 벼 지상부 추출물 또는 벼 지상부 분획물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 액상제제로 조제될 수 있다.

[0037] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실시예

[0039] (1) 벼 지상부 추출물의 제조

[0040] 벼 지상부 생체로는 경기도 이천시 부발읍에서 채집된 추정벼를 사용하였으며, 상기 벼 지상부 생체 26.7 kg을 80% MeOH 수용액(18 ℓ)에 24시간 실온에서 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과하고, 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과하여 모두 합치고, 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다.

[0041] (2) 벼 지상부 분획물의 제조

[0042] 상기 MeOH 추출물을 *n*-헥산(3 ℓ × 3)와 H₂O(3 ℓ)로 분배 추출하였고, H₂O층을 에틸 아세테이트(EtOAc, 3 ℓ × 3)로 분배 추출하였다. 다시 H₂O층을 *n*-부탄올(*n*-BuOH, 3 ℓ × 3)로 분배하여 얻었으며, 각 층을 감압 농축하여, *n*-헥산 분획물(135 g, OSH), 에틸 아세테이트 분획물(47 g, OSE), *n*-부탄올 분획물(90 g, OSB) 및 H₂O 분획물을 얻었다.

[0043] (3) 벼 지상부 분획물로부터 리그난 글리코시드 화합물의 분리

[0044] 실시예 2에서 얻은 에틸 아세테이트 분획물로부터 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(c.c.)(φ 12 × 20 cm, *n*-헥산-EtOAc-MeOH = 25:3:1→23:3:1→CHCl₃-MeOH = 20:1→18:1→16:1→13:1→7:1→5:1→3:1→1:1)를 실시하여 70 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 SiO₂ TLC로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 17개의 분획물(OSE-1~OSE-17)을 얻었다. OSE-14 분획(1.4 g, Ve/Vt 0.642~0.784)에 대하여 ODS c.c.(φ 4 × 6 cm, MeOH-

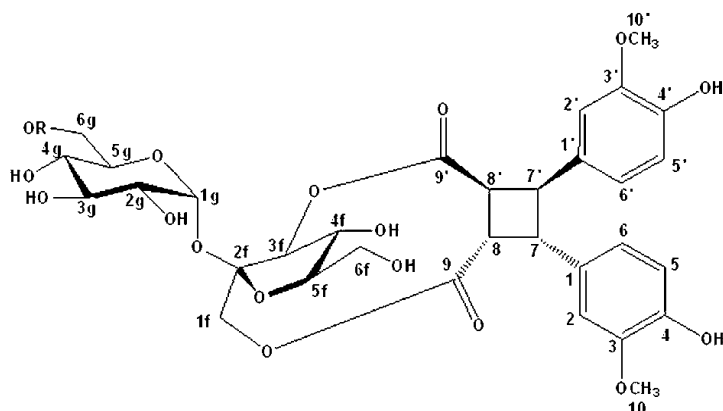
H₂O= 3:2)를 실시하여 17개의 분획(OSE-14-1~OSE-14-17)을 얻었다. 그 중 OSE-14-9 분획(226 mg, Ve/Vt 0.41~0.47)을 ODS c.c.(φ 3.5 × 6 cm, MeOH-H₂O = 2:3)를 실시하여 8개의 분획(OSE-14-9-1~OSE-14-9-8)으로 나누었다. OSE-14-9-3에 대하여 ODSc.c. (φ 3 × 6 cm, MeOH-H₂O = 2:3)를 실시하여 11개의 분획(OSE-14-9-3-1~OSE-14-9-3-11)으로 나누었고, 화합물 1(오리자노시드 B)[OSE-14-9-3-6, 12 mg, Ve/Vt 0.21~0.31, TLC(RP-18 F₂₅₄S) R_f 0.5, MeOH-H₂O = 3:2]를 분리하였다.

[0045] 실험예 1: 리그난 글리코시드 화합물의 구조 분석

[0046] 상기 실시예에서 수득된 화학식 1로 표시되는 리그난 글리코시드 화합물에 대해 IR 스펙트럼은 Perkin model 599B(Buckinghamshire, England)를 사용하여 측정하였고, NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 400 MHz FT-NMR 스펙트로미터(Varian Inova AS 400, Palo Alto, CA)로 측정하였고, 빠른 원자충격법 매스 스펙트럼(Fast atom bombardment mass spectrum)은 JMSAX 700(JEOL)을 사용하여 측정하였고, UV 램프(UV lamp)는 spectroline(Spectronics Corporation, Westbury, NY)을 사용하였으며, 비선광도는 polarimeter P-1020(JASCO, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였고, 융점은 Fisher-John's Melting Point Apparatus(Fisher Scientific, Miami, FL, USA)를 사용하여 측정함으로써 구조 분석을 하였고 그 결과는 하기와 같다.

[0047] (1) 오리자노시드 B(oryzanoside B)

[0048] [화학식 1]



[0049] 여기서, R은 아세틸 임.

[0051] 1) 비결정성 분말 (MeOH); $[\alpha]_D^{20}$ -20.75° (c=0.15, MeOH); negative FAB/MS m/z : 735 [M-H]⁻; IR (CaF₂ window, MeOH, cm⁻¹) 3406, 1652, 1615, 1496, 1456, 1360, 1251, 1123; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD); ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD) (하기 표 1 참조).

[0052] 2) 분석 결과

[0053] 실시예에서 분리된 화합물 1(오리자노시드 B)를 TLC에 전개시켜 관찰한 결과, UV 흡수가 있었고, 10% 황산으로 분무하고 가열하면 진한남색으로 발색되었다. Negative FAB-MS에서 m/z 735[M-H]⁻의 피크가 관찰되어 분자량은 736으로 결정하였다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 6개의 방향족 프로톤[δ_H 6.44 (d, J=2.0 Hz, H-2), 6.59 (d, J=8.0 Hz, H-5), 6.53 (br d, J=8.0, 2.0 Hz, H-6), 6.40 (d, J=2.0 Hz, H-2'), 6.57 (d, J= 8.0 Hz, H-5'), 6.71 (dd, J=8.0, 2.0 Hz, H-6')]을 확인하였고, 각 시그널의 커플링 패턴으로부터 1,3,4-3치환 벤젠환이 2개가 존재함을 예상할 수 있었다. 산소가 치환된 영역에서 2 개의 싱글렛 메톡시 프로톤 시그널(δ_H 3.61, 3.73)이 관측되었다. δ_H 4.22에서 δ 6.18 사이에서 헤미아세탈 프로톤[δ_H 5.48 (H-1g, d, J=3.6)]을 비롯하여 다수의 산화 메틴 및 메틸렌 시그널들을 관측할 수 있었으며, 이로 미루어 당이 존재함을 예상하였다. 방향족 프로톤(δ_H 6.18)의 결합 상수값이 3.2 Hz로 관측됨에 따라 α 형태로 결합하였음을 확인하였다. 지방족 영역에서는 메틴

프로톤 시그널들이 δ_H 4.80 (H-7'), 4.57 (H-7), 4.49 (H-8), 4.37 (H-8')에서 관측되어 시클로부탄이 존재함을 예상하였고, 고자장 영역에서 아세틸 메틸 프로톤(δ_H 1.89) 시그널이 관측되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 모두 34개의 시그널이 관측되었으며, DEPT 실험을 통하여 각 탄소의 다중도를 결정하였다. 저자장 영역에서 2개의 카보닐 시그널이 δ_C 172.7 (C-9') 및 175.2 (C-9)에서 관측되었으며, 방향족 영역에서는 6개의 메틴 탄소[δ_C 113.2 (C-2), 113.0 (C-2'), 115.3 (C-5'), 115.6 (C-5), 121.6 (C-6'), 6)] 과 2 개의 4차 탄소[δ_C 131.4 (C-1'), 131.7 (C-1)] 및 4개의 산화된 4차 탄소[δ_C 145.8 (C-4'), 145.8 (C-4), 148.2 (C-3'), 148.4 (C-3)] 시그널이 관측됨에 따라 프로톤 데이터와 마찬가지로 1,3,4-3치환 벤젠이 2개가 존재함을 확인하였다. 산소가 치환된 영역에서는 당의 시그널로 예상되는 12개의 산화된 탄소 시그널들이 두 개의 아노머릭 탄소[δ_C 94.2 (C-1g), 109.6 (C-2f)]을 포함하여, δ_C 63.3 에서 δ_C 109.6 부근에서 관측되었다. 화학적 이동을 문헌 값과 비교해 본 결과, 결합한 당은 수크로오스로 동정할 수가 있었다. 지방족 영역에서는 4개의 메틴 탄소[δ_C 44.5 (C-8), 45.0 (C-8'), 45.4 (C-7') 46.1 (C-7)] 시그널이 관측되었고, 고자장 영역에서 아세틸 메틸 탄소[δ_C 20.7 (C-6g'')] 시그널을 관측할 수 있었다. 따라서 화합물 1은 카르복실기와 1개의 메톡시기를 가진 페닐프로파노이드 2개가 축합한, 시클로부탄 구조를 갖는 리그난 화합물에 수크로오스가 결합한 것으로 확인되었다. 각 부분 구조의 연결고리는 2D 기법인 gHMBC 실험으로 확인하였다. 두 개의 카르보닐 탄소 시그널[δ_C 175.2 (C-9), 172.7 (C-9')]이 각각 프락토피라노실의 산화된 메틴 프로톤[δ_H 5.26 (H-1f), 4.89 (H-3f)] 시그널과의 크로스 피크가 확인됨에 따라 연결 부위를 결정하였으며, 이 사실은 에스테르화 효과가 작용함에 따라 시그널들이 저자장으로 이동한 사실로부터 확인하였다. 아세틸 카르보닐 시그널은 산화된 메틸렌 프로톤 시그널[δ_H 4.93 (H-6g)]과 크로스 피크를 보여 글루코피라노스 6번 수산기에 아세틸화되어 있는 것을 확인하였으며, 프로톤 NMR 스펙트럼에서 이를 위의 데이터와 종합하여 구조를 동정한 결과, 6-아세틸-1-[1,3-(4,4'-히드록시-3,3'-디메톡시- μ -트룩시닐)- β -D-프락토푸라노실]- α -D-글루코피라노사이드 (6-acetyl-1-[1,3-(4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy- μ -truxinyl)- β -D-fructofuranosyl]- α -D-glucopyranoside)로 동정하였다. 이 화합물의 스펙트럼 데이터를 문헌과 비교한 결과, 백모근에서 분리한 리그날 글리코사이드와 골격이 유사하였다. 하지만 시클로부탄의 화학적 이동과 결합 패턴이 다르게 나타나 입체구조가 다른 것으로 추정하였으며, 7, 8, 7' 및 8'의 입체구조가 7S, 8S, 7'S 및 8'S로 결정되었다. 따라서 화합물 1은 천연물에서 처음 분리된 신규 화합물로 판명되어 오리지나이드 B로 명명하였다.

[0054] [표 1]

Aglycone moiety				Sucrose moiety			
No.	δ_c (multiplicity)	δ_H (coupling pattern, J in Hz)	HMBC (H to C)	No.	δ_c (multiplicity)	δ_H (coupling pattern, J in Hz)	HMBC (H to C)
1	131.7 (C)	-		1g	94.2 (CH)	5.48 (d, 3.6)	C-2g, C-3g, C-2f
2	113.2 (CH)	6.44 (d, 2.0)	C-1, C-3	2g	73.5 (CH)	3.49 (dd, 3.6, 9.6)	C-3g, C-4g
3	148.4 (C)	-		3g	75.5 (CH)	4.78 (dd, 8.8, 8.4)	C-2g, C-4g
4	145.8 (C)	-		4g	71.9 (CH)	4.28 (dd, 8.4, 8.8)	C-3g, C-5g
5	115.6 (CH)	6.59 (d, 8.0)	C-4, C-6	5g	71.4 (CH)	5.24 (ddd, 8.8, 3.2, 4.4)	C-3g, C-4g, C-6g
6	121.6 (CH)	6.53 (dd, 8.0, 2.0)	C-5, C-1	6g	65.1 (CH ₂)	4.93 (dd, 4.4, 12.0) 5.26 (dd, 3.2, 12.0)	C-5g, C-6g
7	46.1 (CH)	3.83 (dd, 5.6, 9.6)	C-1, C-8, C-7'	1f	65.4 (CH ₂)	5.26 (d, 12.0) 4.33 (d, 12.0)	C-4f, C-9
8	44.5 (CH)	4.11 (dd, 5.6, 9.6)	C-7, C-8', C-9	2f	109.6 (C)	-	
9	175.2 (C)	-		3f	79.4 (CH)	4.89 (s)	C-2f, C-4f, C-5f, C-9'
10	56.3 (CH ₃)	3.62 (3H, s)	C-3	4f	89.1 (CH)	4.16 (br s)	C-2f, C-3f, C-5f, C-1f
1'	131.4 (C)	-		5f	75.0 (CH)	5.13 (dd, 3.8, 5.6)	C-2f, C-4f, C-6f
2'	113.0 (CH)	6.40 (d, 2.0)	C-1', C-3'	6f	63.5 (CH ₂)	4.47 (dd, 3.8, 12.4) 4.50 (dd, 4.4, 12.4)	C-4f, C-5f
3'	148.2 (C)	-		6g'	172.6 (C)	-	
4'	145.8 (C)	-		6g''	20.7 (CH ₃)	1.89 (3H, s)	C-6g'
5'	115.3 (CH)	6.57 (d, 8.0)	C-4', C-6'				
6'	121.6 (CH)	6.52 (dd, 2.0, 8.0)	C-5', C-1'				
7'	45.4 (CH)	4.36 (dd, 5.6, 10.6)	C-7, C-8', C-1'				
8'	45.0 (CH)	4.31 (dd, 5.6, 10.4)	C-7', C-8, C-9'				
9'	172.7 (C)	-					
10'	56.3 (CH ₃)	3.60 (3H, s)	C-3'				

[0055]

[0056] 실험예 2: 리그난 글리코사이드 화합물의 항염증 활성 측정

[0057] (1) 세포 배양

[0058] RAW 264.7 세포(한국세포주은행, Korean Cell Line Bank; KCLB)는 10% FBS 및 페니실린(100 μ g/mL), 스트렙토마이신(streptomycin)(100 U/mL)이 포함된 DMEM 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. RAW 264.7 세포에 상기 화학식 1로 표시되는 리그난 글리코사이드 화합물이 포함된 시료용액의 여러 농도(0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ M) 또는 양성 대조군을 1시간 전처리한 후 LPS(1 μ g/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다.

[0059] (2) 세포독성 시험

[0060] 96-웰 플레이트(96-well plate)에 1×10^5 셀/웰로 세포를 동일하게 분주하고 24시간 동안 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 두 군으로 나누어 배지에 희석하여 첨가하였다. 1시간 후 한 군에만 LPS(1 μ g/mL)를 처리하였다. 24시간이 지난 후 MTT 시약을 넣고 4시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하고 형성된 포르마잔(formazan)을 DMSO 100 μ L를 첨가하여 녹였다. 30분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존률은 하기 수학적 식 1에 따라 상기 화학식 1로 표시되는 리그난 글리코사이드 화합물을 처리한 그룹과 아무것도 처리하지 않은 대조군 그룹 내에 있는 생존세포의 비율로써 측정하였고, 그 결과를 각각 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0061] [수학식 1]

[0062] 세포 생존률(%) = [OD (화합물처리 세포수) - OD (백지세포수) / OD (대조군 세포수) - OD (백지세포수)] × 100

[0063] (3) 일산화질소(Nitric Oxide, NO) 양의 측정

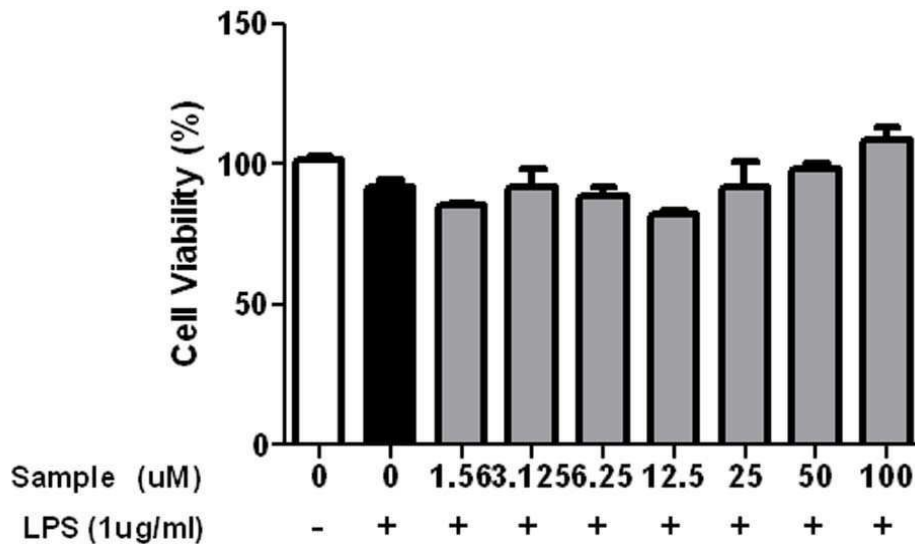
[0064] RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로써 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100 μL 와 Griess시약 [5% (v/v) 인산 중의 1% (w/v) 술폰닐아미드와 0.1% (w/v) 나프틸에틸렌디아민-HCl] 100 μL 를 혼합하여 96-웰 플레이트에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포배양 상등액으로는 RAW 264.7 세포에 상기 화학식 1로 표시되는 리그난 글리코시드 화합물이 포함된 치료용액의 여러 농도(0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM)로 처리한 것으로 2 종류의 세포배양 상등액에 대해 일산화질소 양을 측정하였고, 그 결과를 각각 도 3 내지 4에 나타내었다.

[0065] (4) 결과

[0066] 상기 화학식 1로 표시되는 오리자노시드 B의 경우, 농도 의존적으로 염증 저해 활성을 보였으며, 100 μM 의 농도에서는 세포독성 효과도 보이지 않으면서 80% 정도의 NO 생성 억제 활성을 확인하였다.

도면

도면1



도면2

