(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0136900
(43) 공개일자 2019년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07J 17/00 (2006.01) *A23L 33/11* (2016.01)
A61K 8/63 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *C07J 53/00* (2006.01)
C07J 63/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07J 17/005 (2013.01)
A23L 33/11 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0003002
(22) 출원일자 2019년01월09일
심사청구일자 2019년01월09일
(30) 우선권주장
1020180062096 2018년05월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
양희정
강원도 춘천시 영서로2141번길 25, 202동 305호(퇴계동, 중앙하이츠빌2단지아파트)
김정환
경상남도 진주시 강남로 45, 105동 1101호(주약동, 금호석류마을)
고기원
강원도 춘천시 모수물길 60, 104동 1209호(소양로2가, 소양로현대아파트)
(74) 대리인
리앤목특허법인

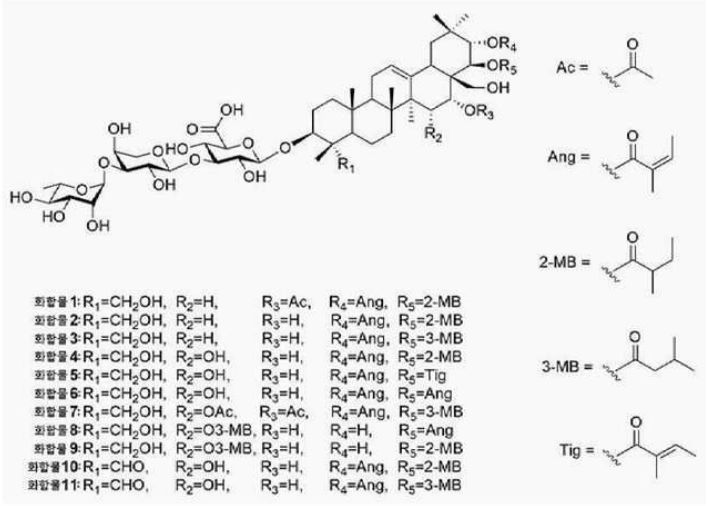
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **동백나무 뿌리 유래 화합물 및 이를 포함하는 항산화 조성물**

(57) 요 약

동백나무 뿌리 유래 신규 화합물, 상기 화합물을 포함하는 항산화 조성물, 동백나무 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항산화 조성물에 관한 것이다. 일 양상에 따른 동백나무 뿌리 유래 신규 화합물은 낮은 세포 독성을 나타내고, 항산화 활성을 가지므로, 항산화 기능성을 갖는 식품, 의약품, 화장품 등에 안전하게 사용될 수 있다. 다른 양상에 따른 항산화 조성물은 동백나무 뿌리 유래 신규 화합물이나 동백나무 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 포함함으로써 산화적 스트레스에 의한 질환을 개선하거나 피부 미용 목적으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 8/63 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
C07J 53/00 (2013.01)
C07J 63/002 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
A61K 2236/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2018R1C1B6002574
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구지원사업
연구과제명 고분해능 질량분석기 유래 거대 질량분석데이터를 활용한 천연물 이차대사 물질 연구
기 여 율 1/2
주관기관 강원대학교 산학협력단
연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1A5A2008833
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구지원사업
연구과제명 바이오항노화 의과학연구센터
기 여 율 1/2
주관기관 경상대학교 산학협력단
연구기간 2015.10.01 ~ 2022.02.28

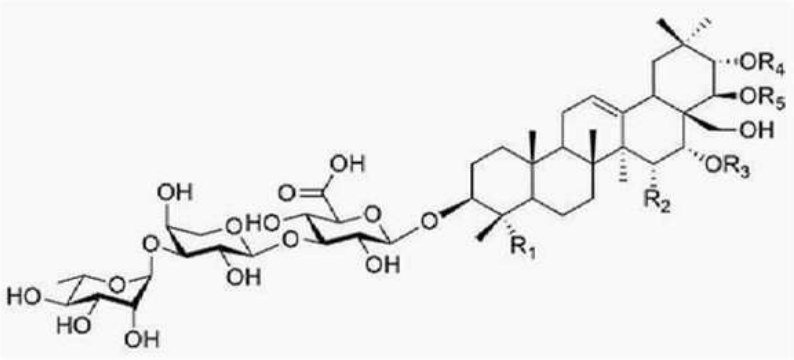
명 세 서

청구범위

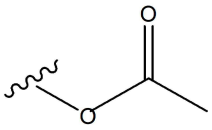
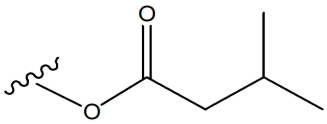
청구항 1

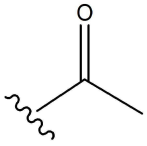
하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이의 이성질체, 또는 이의 수화물, 또는 이의 용매화물:

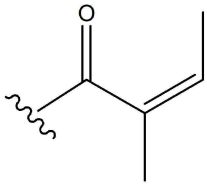
[화학식 1]

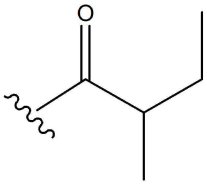
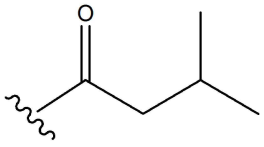
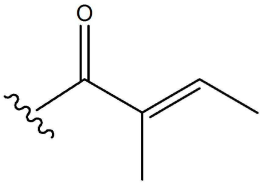
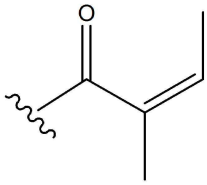


상기 식 중, R_1은 CH_2OH 또는 CHO이고;

R_2는 H, OH,  , 및  로 이루어진 군에서 선택되고;

R_3는 H 또는  이고;

R_4는 H 또는  이고;

R_5는  ,  ,  , 및  로 이루어진 군에서 선택된다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리로부터 추출된 것인 화합물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 활성화능을 갖는 것인 화합물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 항산화 활성을 갖는 것인 화합물.

청구항 5

청구항 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 산화적 스트레스에 의한 질환은 염증 질환, 패혈증, 암, 노화, 피부 노화, 근감소증, 자가 면역 질환, 천식, 만성 기관지염, 폐질환, 신장염, 만성 심부전, 신장질환, 류마티즘, 관절염, 관절질환, 알츠하이머, 파킨슨병, 기억감퇴, 우울증, 뇌졸증, 뇌질환, 백내장, 망막질환, 눈질환, 동맥경화, 고혈압, 허혈, 심근증, 심정지, 심혈관질환, 임신중독증, 자궁내성장저하, 태아이상, 및 신경 퇴행성 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 개선하기 위한 건강기능식품 조성물.

청구항 8

청구항 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 미용 개선용 화장료 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 피부 미용 개선은 피부 주름 개선 또는 항염증인 것인 조성물.

청구항 10

동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 산화적 스트레스에 의한 질환은 염증 질환, 패혈증, 암, 노화, 피부 노화, 근감소증, 자가 면역 질환, 천식, 만성 기관지염, 폐질환, 신장염, 만성 심부전, 신장질환, 류마티즘, 관절염, 관절질환, 알츠하이머, 파킨슨병, 기억감퇴, 우울증, 뇌졸증, 뇌질환, 백내장, 망막질환, 눈질환, 동맥경화, 고혈압, 허혈, 심근증, 심정지, 심혈관질환, 임신중독증, 자궁내성장저하, 태아이상, 및 신경 퇴행성 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인 조성물.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 동백나무 뿌리 추출물 또는 이의 분획물은 청구항 1의 화합물을 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 추출물은 C1-C6의 알콜, 물, 또는 이들의 혼합물의 추출물인 것인 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 C1-C6의 알콜은 에탄올, 메탄올, 부탄올, 또는 이들의 혼합물인 것인 조성물.

청구항 15

청구항 10에 있어서, 상기 분획물은 동백나무 뿌리 추출물을 부탄올, 메탄올, 아세토니트릴 및 물로 순차적으로 분획화하여 얻어진 부탄올 분획물, 메탄올 분획물, 아세토니트릴 분획물, 또는 물 분획물인 것인 조성물.

청구항 16

동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 개선하기 위한 건강기능식품 조성물.

청구항 17

동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 미용 개선용 화장료 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 피부 미용 개선은 피부 주름 개선 또는 항염증인 것인 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 동백나무 뿌리 유래 화합물, 상기 화합물을 포함하는 항산화 조성물, 동백나무 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항산화 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신체의 과도한 활성산소(Reactive oxygen species: ROS)는 산화 스트레스를 유발하고 염증 질환, 패혈증, 암, 노화, 피부 노화, 근감소증, 자가 면역 질환, 폐질환 (천식, 만성 기관지염), 신장질환 (신장염, 만성 심부전), 관절질환 (류마티즘, 관절염), 뇌질환 (알츠하이머, 파킨손병, 기억감퇴, 우울증, 뇌졸증), 눈질환 (백내장, 망막질환), 심혈관질환(동맥경화, 고혈압, 허혈, 심근증, 심정지), 태아이상 (임신중독증, 자궁내성장저하), 신경퇴행성 질환을 비롯한 수많은 질병을 촉진한다(비특허문헌 1 내지 3). ROS는 복제 오류를 일으키고 게놈 불안정성을 증가시킬 수 있는 DNA 분자를 염기 변형, 가닥 절단 또는 가교 결합시켜 종양 발달을 유도한다.

[0003] Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)는 산화 스트레스에 의해 야기되는 세포 손상을 방지하는 효과적인 세포 방어 시스템이며 그것의 표적 유전자의 프로모터 지점에서 산화 방지 반응 요소 또는 친전 반응 요소 (ARE/EpRE)와 결합한다.

[0004] Nrf2의 활성화는 세포 보호 단백질 (cytoprotective proteins)이라고 불리는 다중 효소인 MAPKs (mitogen-activated protein kinases), PKC (protein kinase C), AMPK (cAMP-activated protein kinase) 및 Akt와 같은 일부 키나아제에 의한 세린/트레오닌 잔기의 인산화를 통해 유발될 수 있다. Nrf2의 활성화는 HO-1 (heme oxygenase-1), SOD (superoxide dismutase), GPx (glutathione peroxidase), 카탈라제 (catalase) 및 GCL (γ-glutamylcysteine ligase)와 같은 항산화 효소와 NQO1 (NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1), GST (glutathione S-transferase) 및 UGT (UDP-glucuronosyltransferase)와 같은 제2상 해독 효소들의 상향 조절을 초래한다

[0005] 동백나무 (*Camellia japonica L.*)는 한국, 일본, 중국과 같은 동아시아 국가의 고유한 다년생 나무로 약초 및 화장품으로 사용되어왔다. 동백나무의 여러 부위들은 다른 목적으로 사용되고 있는데, 꽃에서는 멜라닌 생성 억제 및 돼지 유행성 설사 바이러스 (PEDV) 복제의 저해(비특허문헌 4 내지 7), 줄기에서는 항염증 및 세포 독성 활성(비특허문헌 8 및 9), 씨앗에서는 에탄올 흡수 억제 효과(비특허문헌 10 및 11), 열매에서는 항염증, 위궤양 완화 및 유방암 치료 효과가 보고된 바 있다(비특허문헌 12 및 13). 그러나, 동백나무의 뿌리에 대해서는 생리활성이나 화합물에 대한 연구가 미흡한 상태이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Schieber, M.; Chandel, N. S. Current biology 2014, 24, R453-R462.

(비특허문헌 0002) Pham-Huy, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Int. J. Biomed. Sci. 2008, 4, 89-96.

(비특허문헌 0003) Zhang, J.; Wang, X.; Vikash, V.; Ye, Q.; Wu, D.; Liu, Y.; Dong, W. Oxidative medicine and cellular longevity 2016, 2016.

(비특허문헌 0004) Nakamura, S.; Moriura, T.; Park, S.; Fujimoto, K.; Matsumoto, T.; Ohta, T.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. J. Nat. Prod. 2012, 75, 1425-1430.

(비특허문헌 0005) Nakamura, S.; Fujimoto, K.; Nakashima, S.; Matsumoto, T.; Miura, T.; Uno, K.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 2012, 60, 752-758.

(비특허문헌 0006) Fujimoto, K.; Nakamura, S.; Nakashima, S.; Matsumoto, T.; Uno, K.; Ohta, T.; Miura, T.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 2012, 60, 1188-1194.

(비특허문헌 0007) Yang, J.; Ha, T.; Dhodary, B.; Pyo, E.; Nguyen, N. H.; Cho, H.; Kim, E.; Oh, W. K. J. Med. Chem. 2015, 58, 1268-1280.

(비특허문헌 0008) Thao, N. T. P.; Hung, T. M.; Lee, M. K.; Kim, J. C.; Min, B. S.; Bae, K. Chemical and pharmaceutical bulletin 2010, 58, 121-124.

(비특허문헌 0009) Thao, N. T. P.; Hung, T. M.; Cuong, T. D.; Kim, J. C.; Kim, E. H.; Jin, S. E.; Na, M.; Lee, Y. M.; Kim, Y. H.; Choi, J. S. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010, 20, 7435-7439.

(비특허문헌 0010) YOSHIKAWA, M.; HARADA, E.; MURAKAMI, T.; MATSUDA, H.; YAMAHARA, J.; MURAKAMI, N. Chemical and pharmaceutical bulletin 1994, 42, 742-744.

(비특허문헌 0011) YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; YOSHIZUMI, S.; MURAKAMI, N.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Chemical and pharmaceutical bulletin 1996, 44, 1899-1907.

(비특허문헌 0012) Uddin, M. N.; Sharma, G.; Yang, J.; Choi, H. S.; Lim, S.; Kang, K. W.; Oh, W. K. Phytochemistry 2014, 103, 99-106.

(비특허문헌 0013) Akanda, M. R.; Park, B. Y. Biomed. Pharmacother. 2017, 95, 1139-1146.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 동백나무 뿌리로부터 추출된 11개의 신규 화합물을 제공한다.

[0008] 다른 양상은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또 다른 양상은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 개선하기 위한 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0010] 또 다른 양상은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 미용 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0011] 또 다른 양상은 동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

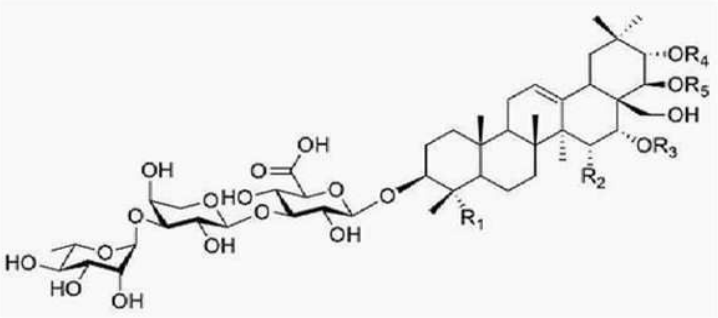
[0012] 또 다른 양상은 동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 개선하기 위한 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또 다른 양상은 동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 미용 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

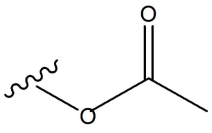
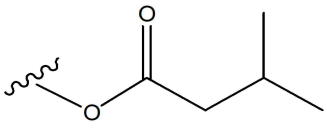
과제의 해결 수단

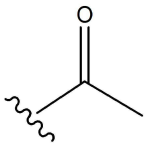
[0014] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이의 이성질체, 또는 이의 수화물, 또는 이의 용매화물을 제공한다.

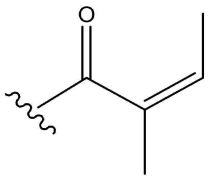
[0015] [화학식 1]

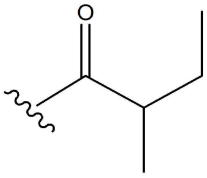
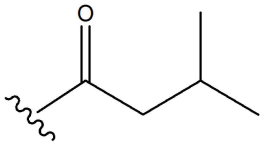
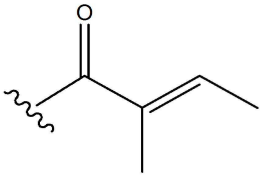
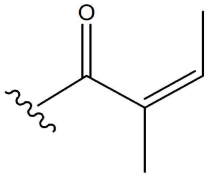
[0016] 

[0017] 상기 식 중, R_1은 CH_2OH 또는 CHO이고;

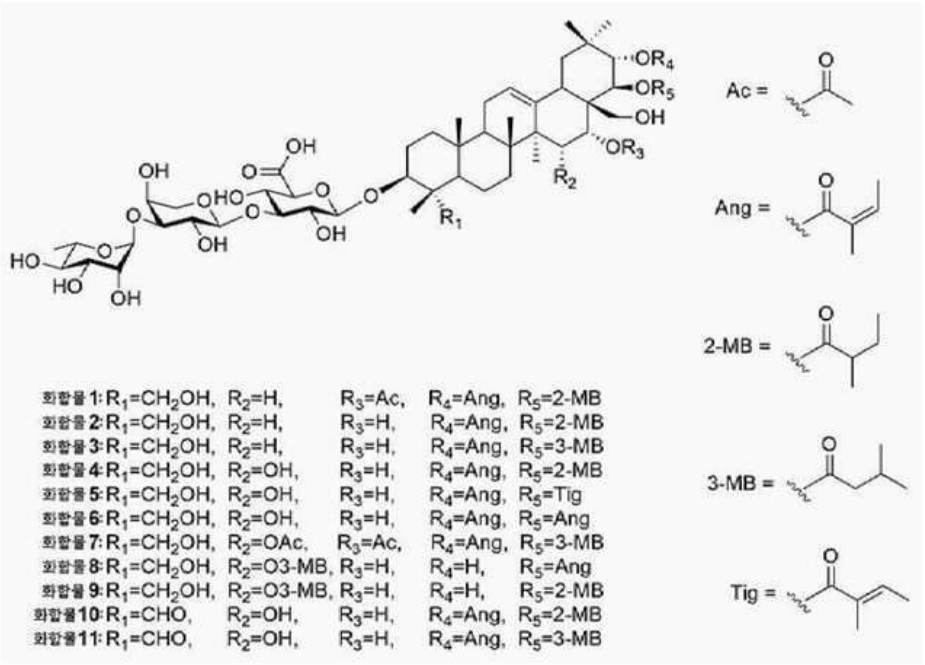
[0018] R_2는 H, OH,  , 및  로 이루어진 군에서 선택되고;

[0019] R_3는 H 또는  이고;

[0020] R_4는 H 또는  이고;

[0021] R_5는  ,  ,  , 및  로 이루어진 군에서 선택된다.

[0022] 예를 들어, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기의 화합물 1 내지 화합물 11 중 어느 하나의 화합물일 수 있다.



[0024]

[0025] 상기 화합물 1 내지 11은 모두 같은 C-3 위치에 연결된 세 개의 글리코시드(glycoside), α-L-람노피라노실-(1→3)-α-L-아라비노피라노실-(1→3)-β-D-글루쿠로노피라노실 모이어티를 가지고, 아세틸기(acetyl: Ac), 안질로일기(angeloyl: Ang), 티그로일기(tigloyl: Tig), 2-메틸부타노일기(2-methylbutanoyl: 2-MB) 및 3-메틸부타노일기(3-methylbutanoyl: 3-MB)와 같은 다른 케톤 치환체를 가지는 신규한 트리테르페노이드계 사포닌(triterpenoidal saponin)이다.

[0026] 일 구체예에서, 화합물 1은 상기 화학식 1에서 R_1이 CH_2OH이고, R_2가 H이고, R_3이 Ac이고, R_4가 Ang이고, R_5가 2-MB인 화합물이다.

[0027] 일 구체예에서, 화합물 2는 상기 화학식 1에서 R_1이 CH_2OH이고, R_2가 H이고, R_3이 H이고, R_4가 Ang이고, R_5가 2-MB인 화합물이다.

[0028] 일 구체예에서, 화합물 3은 상기 화학식 1에서 R_1이 CH_2OH이고, R_2가 H이고, R_3이 H이고, R_4가 Ang이고, R_5가 3-MB인 화합물이다.

[0029] 일 구체예에서, 화합물 4는 상기 화학식 1에서 R_1이 CH_2OH이고, R_2가 OH이고, R_3이 H이고, R_4가 Ang이고, R_5가 2-MB인 화합물이다.

[0030] 일 구체예에서, 화합물 5는 상기 화학식 1에서 R_1이 CH_2OH이고, R_2가 OH이고, R_3이 H이고, R_4가 Ang이고, R_5가 Tig인 화합물이다.

[0031] 일 구체예에서, 화합물 6은 상기 화학식 1에서 R_1이 CH_2OH이고, R_2가 OH이고, R_3이 H이고, R_4가 Ang이고, R_5가 Ang인 화합물이다.

[0032] 일 구체예에서, 화합물 7은 상기 화학식 1에서 R_1이 CH_2OH이고, R_2가 OAc이고, R_3이 Ac이고, R_4가 Ang이고, R_5가 3-MB인 화합물이다.

[0033] 일 구체예에서, 화합물 8은 상기 화학식 1에서 R_1이 CH_2OH이고, R_2가 O3-MB이고, R_3이 H이고, R_4가 H이고, R_5가 Ang인 화합물이다.

[0034] 일 구체예에서, 화합물 9는 상기 화학식 1에서 R_1이 CH_2OH이고, R_2가 O3-MB이고, R_3이 H이고, R_4가 H이고, R_5가 2-MB인 화합물이다.

[0035] 일 구체예에서, 화합물 10은 상기 화학식 1에서 R_1이 CHO이고, R_2가 OH이고, R_3이 H이고, R_4가 Ang이고, R_5가 2-MB인 화합물이다.

[0036] 일 구체예에서, 화합물 11은 상기 화학식 1에서 R_1이 CHO이고, R_2가 OH이고, R_3이 H이고, R_4가 Ang이고, R_5가 3-MB인 화합물이다.

[0037] 용어 "약학적으로 허용 가능"은 통상의 의약적 복용량으로 이용할 때 상당한 독성 효과를 피함으로써, 동물, 보다 구체적으로는 인간에게 사용할 수 있다는 정부 또는 이에 준하는 규제 기관의 승인을 받을 수 있거나 승인받거나, 또는 약전에 열거되거나 기타 일반적인 약전에 기재된 것으로 인지되는 것을 의미한다.

[0038] 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 약학적으로 허용 가능하고 모 화합물(parent compound)의 바람직한 약리활성을 갖는 염을 의미한다. 상기 염은 염산염, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염, 암모늄염 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0039] 용어 "이성질체"는 광학 이성질체(optical isomers)(예를 들면, 본래 순수한 거울상 이성질체(essentially pure enantiomers), 본래 순수한 부분 입체 이성질체(essentially pure diastereomers) 또는 이들의 혼합물)뿐만 아니라, 형태 이성질체(conformation isomers)(즉, 하나 이상의 화학 결합의 그 각도만 다른 이성질체), 위치 이성질체(position isomers)(특히, 호변이성체(tautomers)) 또는 기하 이성질체(geometric isomers)(예컨대, 시스-트랜스 이성질체)를 포함할 수 있다.

[0040] 용어 "본래 순수(essentially pure)"란, 예컨대 거울상 이성질체 또는 부분 이성질체와 관련하여 사용한 경우, 거울상 이성질체 또는 부분 이성질체를 예로 들 수 있는 구체적인 화합물이 약 90% 이상, 바람직하게는 약 95% 이상, 보다 바람직하게는 약 97% 이상 또는 약 98% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 99% 이상, 보다 더욱 더 바람직하게는 약 99.5% 이상(w/w) 존재하는 것을 의미할 수 있다.

[0041] 용어 “수화물(hydrate)”은 물이 결합되어 있는 화합물을 의미하며, 물과 화합물 사이에 화학적인 결합력이 없는 내포 화합물을 포함하는 광범위한 개념을 의미할 수 있다.

[0042] 용어 “용매화물”은 용질의 분자나 이온과 용매의 분자나 이온 사이에 생긴 고차의 화합물을 의미할 수 있다.

[0043] 상기 화합물은 동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리로부터 추출된 것일 수 있다. 상기 화합물은 동백나무 뿌리 추출물 또는 이의 분획물로부터 추출 또는 분리된 것일 수 있다.

[0044] 상기 동백나무는 한국, 대만, 일본, 중국 등 동아시아 국가에 분포하며, 잎, 꽃, 열매, 줄기, 뿌리, 수피, 가지 등 다양한 부위가 있다.

[0045] 상기 동백나무 뿌리는 원뿌리 또는 곁뿌리일 수 있다.

[0046] 상기 화합물은 유의한 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였으므로, 생체에 안전하게 사용될 수 있다.

[0047] 상기 화합물은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 활성화능을 갖는 것일 수 있다. 용어 "활성화능"이란 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 증가시키거나 유전자 또는 단백질을 활성화시키는 능력을 의미할 수 있다. 구체적으로, 상기 화합물은 Nrf2를 활성화시켜 Nrf2가 항산화 반응요소(Antioxidant Response Element: ARE)와 결합하여 항산화 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 화합물 1 내지 11은 핵에서 Nrf2의 축적을 증가시키는 것을 실험을 통해 확인하였다.

[0048] 상기 화합물은 항산화 활성을 갖는 것일 수 있다. 용어 "항산화"란 산화를 방지하는 모든 작용을 의미할 수 있다. 구체적으로, 상기 화합물은 Nrf2를 매개로 하여 항산화 활성을 가질 수 있다. 일 실시예에서, 상기 화합물 1 내지 11은 Nrf2의 수준을 유의하게 증가시켜 Nrf2가 항산화 반응 요소(ARE)와 결합하여 항산화 유전자를 발현시키는 것을 실험을 통해 확인하였다. 따라서, 상기 화합물은 항산화 활성에 의해 산화적 스트레스를 감소시킬 수 있다.

[0050] 다른 양상은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공한다. 상기 항산화 조성물은 항산화 활성이 요구되는 다양한 목적 및 용도로 사용될 수 있으며, 구체적으로는 의약품, 화장품, 식품 및 동물 사료 등 다양한 산업분야에서 적용되는 물품에 항산화 활성을 부여할 수 있는 기능성 소재로 사용할 수 있다. 또한 의약품 보존제, 화장품 보존제, 식품 보존제, 의약품 첨가제, 화장품 첨가제, 식품첨가제 및 사료첨가제 등의 소재로도 사용될 수 있다. 따라서, 상기 항산화 조성물은 화장료,

식품, 또는 약학 조성물일 수 있다.

[0052] 또 다른 양상은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0053] 상기 약학적 조성물에 있어서, 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0054] 상기 산화적 스트레스에 의한 질환은 산화적 스트레스와 질환 간의 인과관계가 알려진 질환이라면 그 종류를 한정하지 않으며, 예를 들어, 염증 질환, 패혈증, 암, 노화, 피부 노화, 근감소증, 자가 면역 질환, 폐질환 (예: 천식, 만성 기관지염), 신장질환 (예: 신장염, 만성 심부전), 관절질환 (예: 류마티즘, 관절염), 뇌질환 (예: 알츠하이머, 파킨손병, 기억감퇴, 우울증, 뇌졸증), 눈질환 (예: 백내장, 망막질환), 심혈관질환(예: 동맥경화, 고혈압, 허혈, 심근증, 심정지), 태아이상 (예: 임신중독증, 자궁내성장저하), 신경 퇴행성 질환 등을 포함할 수 있다(Schieber, M.; Chandel, N. S. *Current biology* **2014**, 24, R453-R462.; Pham-Huy, L. A.; He, H.; Pham-Huy, *C. Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, 4, 89-96.; Zhang, J.; Wang, X.; Vikash, V.; Ye, Q.; Wu, D.; Liu, Y.; Dong, W. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2016**, 2016.).

[0055] 용어, "예방"은 질병의 발생을 억제하는 것을 포함할 수 있다. 용어, "치료"는 질병의 발전의 억제, 경감, 또는 제거를 포함할 수 있다.

[0056] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 부형제는 미결정 셀룰로오즈, 유당, 저치환도 히드록시셀룰로오즈, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 붕해제는 전분글리콜산 나트륨, 무수인산일수소 칼슘, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 결합제는 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오즈, 히드록시프로필셀룰로오즈, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 활택제는 스테아린산 마그네슘, 이산화규소, 탈크, 또는 그 조합일 수 있다.

[0057] 상기 약학적 조성물은 비경구 투여 제형으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여 제형은 주사제, 또는 피부외용제일 수 있다. 피부외용제는 크림, 겔, 연고, 피부 유화제, 피부 현탁액, 경피전달성 패치, 약물 함유 붕대, 로션, 또는 그 조합일 수 있다.

[0058] 상기 피부외용제는 통상 화장품이나 의약품 등의 피부외용제에 사용되는 성분, 예를 들면 수성성분, 유성성분, 분말성분, 알코올류, 보습제, 증점제, 자외선흡수제, 미백제, 방부제, 산화방지제, 계면활성제, 향료, 색제, 각종 피부 영양제등을 필요에 따라서 적절하게 배합할 수 있다.

[0059] 상기 피부외용제는, 에데트산이나트륨, 에데트산삼나트륨, 시트르산나트륨, 폴리인산나트륨, 메타인산나트륨, 글루콘산 등의 금속봉쇄제, 카페인, 탄닌, 벨라파밀, 감초추출물, 글라블리딘, 칼린의 과실의 열수추출물, 각종 생약, 아세트산토코페롤, 글리틸리틴산, 트라넥삼산 및 그 유도체 또는 그 염등의 약제, 비타민 C, 아스코르브산인산마그네슘, 아스코르브산글루코시드, 알부틴, 코지산, 글루코스, 프룩토스, 트레할로스 등의 당류등도 적절하게 배합할 수 있다.

[0061] 또 다른 양상은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 개선하기 위한 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0062] 상기 건강기능식품 조성물에 있어서, 화합물, 산화적 스트레스에 의한 질환, 예방에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0063] 용어 “개선”은 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0064] 상기 건강기능식품 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물은 예를 들어, 산제, 과립제, 정제, 환제, 캅셀제, 현탁액, 유제, 시럽제, 침제, 액제, 엑스제 등의 일반적인 제형으로 제조될 수도 있고, 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 젤리, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜음료 및 비타민 복합제 등의 임의의 건강식품 형태로 제조될 수도 있다. 상기 건강기능식품의 제제화를 위해 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 사용할 수 있으며, 제조하고자 하는 제형의 제조에 당해 기술분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다. 상기 첨가제로서 각종 영

양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 이외에도 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 첨가제 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 첨가제의 비율은 조성물 총 중량을 기준으로 0.001 내지 5 중량%, 구체적으로 0.01 내지 3 중량%일 수 있다.

[0065] 상기 건강기능식품 조성물 중의 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 함량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 전체 식품 중량의 0.001 내지 15 중량%로 포함할 수 있으며, 음료로서 제조될 경우 100 mL를 기준으로 0.02 내지 10 g, 구체적으로 0.3 내지 1 g의 비율로 함유할 수 있다.

[0066] 상기 음료는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 다른 성분을 더 포함할 수 있으며, 통상적으로 음료에 사용되는 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 더 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 단당류(예: 포도당, 과당 등), 이당류(예: 말토즈, 수크로즈 등), 다당류(예: 덱스트린, 시클로덱스트린 등)와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 함유될 수 있다. 또한, 향미제로서 천연 향미제(예: 타우마틴, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예: 사카린, 아스파탐 등)를 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 음료 100 mL 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 구체적으로 약 5 내지 12g으로 함유될 수 있다.

[0068] 또 다른 양상은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 미용 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0069] 상기 화장료 조성물에 있어서, 화합물에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0070] 상기 피부 미용 개선은 피부 주름 개선 또는 항염증일 수 있다.

[0071] 상기 화장료 조성물은 인간 세포의 손상을 야기하여 노화를 촉진하고 산화 관련 질환을 매개하는 활성산소종(ROS)으로부터 피부를 보호할 수 있다. 이 경우, 조성물은 화장수(스킨로션), 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양 로션, 마사지크림, 영양 크림, 모이스쳐 크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양 에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 현탁액, 겔, 분말, 페이스트, 마스크팩 또는 시트 또는 에어로졸 조성물을 포함하는 제형으로 제조될 수 있다. 이러한 제형의 조성물은 당해 분야에서 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 화장료 조성물은 보존제, 안정화제, 계면활성제, 용해제, 보습제, 에몰리언트제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한제 등을 더 포함할 수 있다. 상기 보습제 등의 추가 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 조성물 전체 중량을 기준으로 0.001 내지 5 중량%, 구체적으로 0.01 내지 3 중량%일 수 있다.

[0073] 또 다른 양상은 동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공한다. 상기 항산화 조성물은 항산화 활성이 요구되는 다양한 목적 및 용도로 사용될 수 있으며, 구체적으로는 의약품, 화장품, 식품 및 동물 사료 등 다양한 산업분야에서 적용되는 물품에 항산화 활성을 부여할 수 있는 기능성 소재로 사용할 수 있다. 또한 의약품 보존제, 화장품 보존제, 식품 보존제, 의약품 첨가제, 화장품 첨가제, 식품첨가제 및 사료첨가제 등의 소재로도 사용될 수 있다. 따라서, 상기 항산화 조성물은 화장료, 식품, 또는 약학 조성물일 수 있다.

[0075] 또 다른 양상은 동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0076] 상기 약학적 조성물에 있어서, 산화적 스트레스에 의한 질환, 예방, 치료에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0077] 상기 동백나무 뿌리 추출물 또는 이의 분획물은 상기 화합물을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물 1 내지 화합물 11 중 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 화합물 1 내지 화합물 11에 대한 설명은 상술한 바와 같다.

[0078] 상기 동백나무 뿌리는 뿌리 전체 또는 그 일부분일 수 있다. 추출에 사용된 동백나무 뿌리는 전체 또는 그 일부분을 분쇄 또는 세절하거나 적당하게 건조한 것일 수 있다.

[0079] 상기 추출물은 친수성 용매 (hydrophilic solvent), 예를 들면, 알콜, 물, 또는 그 조합에 의하여 추출된 것일 수 있다. 상기 알콜은 C1 내지 C10의 하나 이상의 -OH기를 갖는 화합물일 수 있다. 상기 알콜은 C1 내지 C6의 알코올, C3 내지 C6의 다가 알콜일 수 있다. 상기 알콜은 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, n-부탄올, sec-부탄올, 이소부탄올, tert-부탄올, n-펜탄올, n-헥산올, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 용매는 예를 들면, 물과 알콜의 혼합물, 즉 알콜 수용액일 수 있다. 알콜 수용액의 알콜 농도는 1 내지 100%(w/w), 예를 들면, 1 내지 99.5%(w/w), 10 내지 100%(w/w), 20 내지 100%(w/w), 30 내지 100%(w/w), 40 내지 100%(w/w), 50 내지 100%(w/w), 60 내지 100%(w/w), 70 내지 100%(w/w), 75 내지 100%(w/w), 60 내지 90%(w/w), 70 내지 90%(w/w), 75 내지 85%(w/w), 또는 약 80%(w/w)일 수 있다. 상기 알콜 수용액은 메탄올, 에탄올, 또는 부탄올 수용액일 수 있다.

[0080] 상기 추출물은 가온 추출, 가압 추출, 초음파 추출, 열수 추출, 환류 냉각 추출, 아임계 추출, 또는 초임계 추출 등 당업 기술분야에서 통상적인 방법으로 추출된 것일 수 있다.

[0081] 상기 추출은 4℃ 내지 85℃, 예를 들면, 4℃ 내지 70℃, 4℃ 내지 60℃, 4℃ 내지 50℃, 4℃ 내지 40℃, 4℃ 내지 30℃, 10℃ 내지 85℃, 15℃ 내지 85℃, 20℃ 내지 85℃, 10℃ 내지 50℃, 10℃ 내지 40℃, 10℃ 내지 35℃, 10℃ 내지 30℃, 20℃ 내지 30℃, 또는 실온에서 수행하는 것일 수 있다.

[0082] 상기 추출 시간은 선택된 온도 및 추출 방법에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 추출 시간은 1시간 내지 3일, 1시간 내지 2일, 1시간 내지 1일, 1시간 내지 18시간, 1시간 내지 12시간, 3시간 내지 3일, 3시간 내지 2일, 3시간 내지 1일, 3시간 내지 18시간, 3시간 내지 12시간, 6시간 내지 3일, 6시간 내지 2일, 6시간 내지 1일, 6시간 내지 18시간, 6시간 내지 12시간, 또는 6시간 내지 9시간일 수 있다.

[0083] 상기 추출은 1회 이상, 예를 들면 1 내지 5회, 1 내지 4회, 1 내지 3회, 2 내지 5회, 또는 2 내지 4회 추출되는 것일 수 있고, 각 추출은 동일한 방법으로 수행되거나, 다른 방법으로 수행될 수 있다.

[0084] 상기 추출은 식물체 잔사 및 추출액을 여과 등의 알려진 방법에 의하여 분리할 수 있다. 상기 추출은 또한 얻어진 추출액으로부터 감압 농축과 같은 알려진 방법에 의하여 용매를 제거하는 것을 포함할 수 있다. 상기 추출은 또한 얻어진 추출물을 동결건조와 같은 건조에 의하여 건조 추출물을 제조하는 것을 포함할 수 있다.

[0085] 상기 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 80 중량%, 예를 들면, 0.01 중량% 내지 60 중량%, 0.01 중량% 내지 40 중량%, 0.01 중량% 내지 30 중량%, 0.01 중량% 내지 20 중량%, 0.01 중량% 내지 10 중량%, 0.01 중량% 내지 5 중량%, 0.05 중량% 내지 60 중량%, 0.05 중량% 내지 40 중량%, 0.05 중량% 내지 30 중량%, 0.05 중량% 내지 20 중량%, 0.05 중량% 내지 10 중량%, 0.05 중량% 내지 5 중량%, 0.1 중량% 내지 60 중량%, 0.1 중량% 내지 40 중량%, 0.1 중량% 내지 30 중량%, 0.1 중량% 내지 20 중량%, 0.1 중량% 내지 10 중량%, 또는 0.1 중량% 내지 5 중량%로 포함될 수 있다.

[0086] 일 구체예에 따른 조성물은 상기 동백나무 뿌리 추출물의 분획물을 유효성분으로서 포함할 수 있다.

[0087] 용어, "분획물(fraction)"은 상기 동백나무 뿌리의 추출물이 그 일부의 성분으로 나누어진 물질 즉, 분획되어진 물질을 나타낸다. 상기 분획물은 용매 분획화 (fractionation)에 의하여 얻어진 것일 수 있다. 상기 용매 분획화는 동백나무 뿌리 추출물을 용매와 혼합하고 상기 용매에 존재하는 물질을 분리하는 것일 수 있다. 상기 분획물은 동백나무 뿌리 추출물을 부탄올, 메탄올, 아세토니트릴 및 물로 순차적으로 분획화하여 얻어진 부탄올 분획물, 메탄올 분획물, 아세토니트릴 분획물 또는 물 분획물일 수 있다.

[0088] 일 구체예에서, 상기 분획물은 동백나무 뿌리의 메탄올 추출물을 부탄올 및 물의 혼합물로 분획하여 부탄올 분획물을 얻고, 부탄올 분획물을 메탄올 및 물의 혼합물로 분획하여 메탄올 분획물을 얻고, 메탄올 분획물을 아세토니트릴 및 물의 혼합물로 분획하여 얻은 아세토니트릴 분획물일 수 있다. 온도 조건, 압력 조건, 시간, 사용된 용매의 양 또는 농도, 교반 등과 같은 상기 분획화의 조건은 상기한 동백나무 뿌리 추출물을 제조하는데 사용된 추출에 대하여 설명한 바와 같을 수 있다. 상기 분획화는 1회 이상, 예를 들면, 1 내지 5회 반복될 수 있다.

[0089] 상기 분획물을 분리하는 것은 여과 등의 알려진 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 상기 분획화는 또한 얻어진 분획물으로부터 감압 농축과 같은 알려진 방법에 의하여 용매를 제거하는 것을 포함할 수 있다. 상기 분획화는 또한 얻어진 분획물을 농축 및/또는 건조하는 것을 포함할 수 있다. 상기 농축은 감압 농축일 수 있다. 상기 건조는 감압 건조, 비등 건조, 분무 건조, 상온 건조 또는 동결건조를 포함할 수 있다.

[0090] 상기 약학적 조성물은 상기 추출물 또는 이의 분획물을 유효한 양, 또는 유효 성분으로서 포함할 수 있다. 상기

유효한 양은 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강, 성별, 개체의 추출물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0091] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체에 관한 설명은 상기한 바와 같다.

[0093] 또 다른 양상은 동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방 또는 개선하기 위한 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0094] 상기 건강기능식품 조성물에 있어서, 동백나무 뿌리 추출물, 분획물, 산화적 스트레스에 의한 질환, 예방, 개선에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0096] 또 다른 양상은 동백나무(*Camellia japonica*) 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 미용 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0097] 상기 화장료 조성물에 있어서, 동백나무 뿌리 추출물, 분획물, 피부 미용 개선에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0099] 또 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 개체의 산화적 스트레스에 의한 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 약학적 조성물, 산화적 스트레스에 의한 질환, 예방, 개선, 치료에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0100] 용어 "투여하는", "도입하는" 및 "이식하는"은 상호교환적으로 사용되고 일 구체예에 따른 조성물의 원하는 부위로의 적어도 부분적 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의한 개체 내로의 일 구체예에 따른 조성물의 배치를 의미할 수 있다. 일 구체예에 따른 조성물의 화합물, 추출물, 또는 이의 분획물 성분의 적어도 일부를 생존하는 개체 내에서 원하는 위치로 전달하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0101] 투여는 당업계에 알려진 방법에 의하여 투여될 수 있다. 투여는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 경구, 경피(transdermal), 점막, 코안 (intranasal), 기관내 (intratracheal) 또는 피하 투여와 같은 경로로, 임의의 수단에 의하여 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.

[0102] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 항산화 활성 효과를 필요로 하는 개체일 수 있다.

[0103] 상기 투여는 화합물, 추출물 또는 이의 분획물을 개체당 일당 0.001 mg 내지 1,000 mg을 투여하는 것일 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1일 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개소 또는 2개소 이상에 투여할 수 있으며, 매일 또는 2 내지 5일 간격으로 총 투여 일수는 한번 치료 시 1일에서 30일까지 투여될 수 있다. 필요한 경우, 적정 시기 이후에 동일한 치료를 반복할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0104] 일 양상에 따른 동백나무 뿌리 유래 신규 화합물은 낮은 세포 독성을 나타내고, 항산화 활성을 가지므로, 항산화 기능성을 갖는 식품, 의약품, 화장품 등에 안전하게 사용될 수 있다.

[0105] 다른 양상에 따른 항산화 조성물은 동백나무 뿌리 유래 신규 화합물이나 동백나무 뿌리 추출물 또는 이의 분획물을 포함함으로써 산화적 스트레스에 의한 질환을 개선하거나 피부 미용 목적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0106] 도 1은 화합물 1 내지 11의 화학 구조를 나타낸 도면이다.

도 2는 화합물 1 내지 11의 농도에 따른 HaCaT 세포 생존력 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 HaCaT-ARE 안정 세포주에 화합물 1 내지 11을 25 μM로 6시간 동안 처리한 후, 세포주에서의 ARE-루시페라제 활성을 측정한 결과이다.

도 4는 HaCaT-ARE 안정 세포주에 화합물 1 내지 11을 25 μM로 6시간 동안 처리한 후, 핵 Nrf2 수준을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.

도 5는 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 70% 에탄올 또는 80% 메탄올로 추출한 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 웨스턴 블롯을 수행하여 염증인자의 상대적인 단백질 양을 측정한 결과이다.

도 6은 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 80% 메탄올로 추출한 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 정량적 RT-PCR을 수행하여 염증인자의 상대적인 mRNA 양을 측정한 결과이다.

도 7은 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 웨스턴 블롯을 수행하여 세포 밖으로 유리된 HMGB1의 상대적인 단백질 양을 측정한 결과이다.

도 8은 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 젤라틴 자이모그래피를 수행하여 MMP-9의 상대적인 활성을 측정한 결과이다.

도 9는 라디칼 소거 검사법을 수행하여 동백나무 뿌리 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과이다.

도 10은 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 세포 이미징을 수행하여 세포의 분화 정도를 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0107] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0109] **실시예 1 내지 11: 동백나무 뿌리로부터 화합물 1~11의 추출 및 분리**

[0110] (1) 동백나무 뿌리의 준비

[0111] 2016년 8월 전라남도 해남에서 동백나무(*C. japonica*)의 뿌리 (11.5 kg)를 채취하였다. 건조된 뿌리는 강원대학교 약학대학의 권용수 교수로부터 검증되었으며, 강원대학교 식물 표본실에 KNUP-CJ-1로 보관되었다.

[0113] (2) 동백나무 뿌리의 추출 및 화합물 1~11의 분리

[0114] 동백나무 뿌리의 80% 메탄올 추출물(476 g)을 물에 현탁시키고, n-헥산, 아세트산에틸 및 n-부탄올로 연속적으로 분획하였다. n-부탄올 분획(45 g)으로부터 컬럼 크로마토그래피 및 HPLC를 사용하여 11개의 신규 화합물인 화합물 1 내지 11을 수득하였다. 컬럼 크로마토그래피는 Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd., Japan) 및 역상 YMC ODS-A C18 (75 μm, YMC Co. Ltd., Japan)으로 수행하였다. 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography: TLC)는 미리 코팅된 실리카 겔 60 RP-18 F_{254s} 플레이트 (Merck, Germany)에서 수행하였다. 사용된 분취용 HPLC 장비는 1525 Binary HPLC Pump (Waters, USA)였다. 사용된 분석용 HPLC 장비는 Agilent 1260 Infinity Quaternary LC (Agilent, Santa, CA, USA)였다. 사용된 컬럼은 HECTOR-M C18 [250 X 21.2 mm i.d. 분취용] (RSTech, 한국) 및 YMC-Triart C18 [250 X 4.6 mm i.d. (5 μm) 분석용] (YMC Co., Japan)이었다. 구체적인 실험 과정은 다음과 같다.

[0115] 동백나무의 건조된 뿌리 11.5 kg를 초음파 추출법으로 80% 메탄올에서 3 시간 동안 두 번 반복추출 하였다. 진공농축기를 사용하여 용매를 증발시켜 80% 메탄올 추출물 476.65 g을 수득하였다. 추출물의 일부인 476 g를 n-BuOH (1 L x 4) - H_2O (1 L) 혼합물을 사용하여 분획하여 n-BuOH 가용성 분획 45.31 g 및 H_2O 가용성 분획

380.72 g을 수득하였다. n-BuOH 추출물 45 g을 Diaion HP 20 resin 컬럼을 H_2O - MeOH (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100, 0)로 용출시켜 분획물 1 내지 7을 수득하였다. 분획물 6 (7g)을 역상 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 [H_2O - MeOH (50:50 → 40:60 → 30:70 → 20:80 → 10:90 → 0:100)]로 14개의 분획물 6-1 내지 6-14를 수득하였다. 분획물 6-7 (290 mg)의 일부를 분취용 HPLC [MeOH - H_2O (60:40 → MeOH)]로 분리하여 분획물 6-7-7을 얻었다. 분획물 6-7-7 (35mg)의 일부를 분취용 HPLC [0.1% 포름산(Formic acid: FA)에 용해된 MeCN - H_2O (50:50)]로 분리하여 **화합물 8**을 얻었다. 분획물 6-8 (199.9mg)의 일부를 분취용 HPLC [MeOH - H_2O (60:40 → MeOH)]로 정제하여 분획물 6-8-3을 얻었다. 분취용 HPLC [MeOH - H_2O (75:25)]에 의해 분획물 6-8-3 (155.8 mg)의 일부를 분리하여 **화합물 9**를 얻었다. 분획물 6-10 (300 mg)의 일부를 분취용 HPLC [MeOH - H_2O (72:28 → MeOH)]로 정제하여 분획물 6-10-3을 얻었다. 분취용 HPLC [0.1% FA에 용해된 MeCN - H_2O (50:50)]로 분획물 6-10-3의 일부 (150mg)를 분리하여 **화합물 4**, **화합물 5**, **화합물 6**, **화합물 7**, **화합물 10** 및 **화합물 11**을 얻었다. 분획물 7 (11 g)을 역상 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 [H_2O - MeOH, (50:50 → 40:60 → 30:70 → 20:80 → 10:90 → MeOH)]에 가하여 25개의 분획물 7-1 내지 7-25를 얻었다. 분획물 7-18 (200mg)의 일부를 분취용 HPLC [MeCN - H_2O (70:30)]로 분리하여 4개의 분획물 7-18-1 내지 7-18-4를 수득하였다. 분획물 7-18-2 (28mg)의 일부를 분취용 HPLC [0.1% FA에 용해된 MeCN - H_2O (50:50)]로 분리하여 **화합물 1**, **화합물 2** 및 **화합물 3**을 수득하였다.

[0117] (3) 화합물 1~11의 절대 구조 확인

[0118] 상기 화합물 1~11의 구성 단당류의 절대 구조를 결정하기 위해, Tanaka 등(Tanaka, T.; Nakashima, T.; Ueda, T.; Tomii, K.; Kouno, I. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 2007, *55*, 899-901.)의 방법을 다음과 같이 약간 수정하였다. 화합물 1 내지 11 (각각 1.0 mg)을 2M HCl (H_2O/1,4-dioxane, 1:1, v/v) 1ml에 용해시키고, 각 용액을 90 ℃에서 4시간 동안 가열하였다. 잠시 동안 냉각시킨 후, 각각의 반응 혼합물을 질소로 증발시켰다. 각 용액을 물에 재용해시키고 EtOAc로 3회 추출하였다. 수용층을 질소로 증발시켰다. 잔류물을 L-시스테인 메틸 에스테르 히드로클로라이드 1mg을 함유한 피리딘 300㎕에 용해시키고, 60 ℃에서 1시간 동안 가열하였다. *o*-톨릴이소티오시아네이트(tolylisothiocyanate) 10 ㎕를 혼합물에 첨가하고, 60 ℃에서 1시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 RP-HPLC로 직접 분석 하였다. HPLC 분석은 YMC-Triart C18 (YMC Co. Ltd., Japan) 250 X 4.6 mm i.d. (5㎛) 컬럼을 사용하였고, 0.8 ml/min의 유속에서 50분 동안 0.1% H_3PO_4를 함유하는 MeCN - H_2O (75:25)의 비율로 등용매 용출하였다. 주입 부피는 10 μL였다. 컬럼 온도는 35 ℃로 설정하였다. UV 스펙트럼은 250 nm로 선택되었다. 화합물 1 내지 11 내의 단당류의 유도체는 표준 시료의 머무름 시간 (retention time), 즉, D-글루쿠론산(glucuronic acid) 22.5분, L-아라비노오스(arabinose) 24.6분, D-아라비노오스(arabinose) 26.0분, 및 L-람노오스(rhamnose) 38.1 분과 비교한 결과 D-글루쿠론산, L-아라비노오스 및 L-람노오스로 규명되었다.

[0120] (4) 화합물 1~11의 NMR 분석 및 MS 분석

[0121] 상기 화합물 1~11에 대해 NMR 분석 및 MS 분석을 수행하였다. 1D 및 2D NMR 스펙트럼은 강원대학교 공동실험실습관(춘천, 한국) 및 서울대학교 대학원 연구 시설 센터에서 피리딘-d_5를 용매로 사용하여 Bruker Avance II 600 (Bruker, Germany) 분광계에서 ^{1}H는 600 MHz, ^{13}C는 150 MHz에서 얻었다. 하기 표 1에 화합물 1 내지 6의 NMR 결과를 나타내었으며, 하기 표 2에 화합물 7 내지 11의 NMR 결과를 나타내었다.

[0122] [표 1]

position	1		2		3		4		5		6	
	δc, type	δH (J in Hz)	δc, type	δH (J in Hz)	δc, type	δH (J in Hz)	δc, type	δH (J in Hz)	δc, type	δH (J in Hz)	δc, type	δH (J in Hz)
1	39.2, CH2	0.92 m, 1.44 m	39.3, CH2	0.99 m, 1.48 m	39.3, CH2	0.98 m, 1.49 m	39.4, CH2	0.95 m, 1.46 m	39.5, CH2	0.98 m, 1.49 m	39.4, CH2	0.99 m, 1.50 m
2	26.5, CH2	1.99 m, 2.28 m	26.6, CH2	2.01 m, 2.30 m	26.5, CH2	2.00 m, 2.30 m	26.6, CH2	1.97 m, 2.25 m	26.5, CH2	2.01 m, 2.31 m	26.5, CH2	2.01 m, 2.30 m
3	81.1, CH	4.34 m	81.4, CH	4.38 m	80.8, CH	4.36 m	81.5, CH	4.34 m	79.4, CH	4.38 m	80.5, CH	4.37 m
4	43.9, C		44.0, C		44.0, C		43.9, C		43.9		43.9, C	
5	47.5, CH	1.77 m	47.9, CH	1.74 m	47.8, CH	1.74 m	47.7, CH	1.76 m	47.7, CH	1.80 m	47.7, CH	1.80 m
6	18.4, CH2	1.31 m, 1.73 m	18.6, CH2	1.38 m, 1.79 m	18.6, CH2	1.39 m, 1.80 m	19.0, CH2	1.40 m, 1.82 m	19.0, CH2	1.44 m, 1.86 m	19.0, CH2	1.44 m, 1.86 m
7	33.2, CH2	1.13m , 1.52 m	33.3, CH2	1.32m , 1.79 m	33.3, CH2	1.33m, 1.80 m	36.9, CH2	2.14 m, 2.23 m	36.8, CH2	2.16 m, 2.28 m	36.8, CH2	2.16 m, 2.28 m
8	41.5, C		42.0, C		42.0, C		42.0, C		42.0, C		42.0, C	
9	47.5, CH	1.67 m	47.6, CH	1.86 m	47.5, CH	1.87 m	47.7, CH	1.82 m	47.7, CH	1.87 m	47.7, CH	1.86 m
10	37.0, C		37.1, C		37.2, C		37.4, C		37.3, C		37.3, C	
11	24.3, CH2	1.77 m, 1.87 m	24.4, CH2	1.84 m, 1.91 m	24.4, CH2	1.86 m, 1.94 m	24.5, CH2	1.81 m, 1.90 m	24.5, CH2	1.86 m, 1.94 m	24.5, CH2	1.86 m, 1.94 m
12	125.6, CH	5.41 br s	124.4, CH	5.42 br s	124.1, CH	5.42 br s	125.9, CH	5.48 br s	125.9, CH	5.54 br s	125.9, CH	5.54 br s
13	141.5, C		143.3, C		143.4, C		144.2, C		144.2, C		144.2, C	
14	40.4, C		42.1, C		42.1, C		48.2, C		48.2, C		48.2, C	
15	31.5, CH2	1.55 m , 1.87 m	35.3, CH2	1.60 d (4.3) , 1.89 m	35.2, CH2	1.62 m, 1.90 m	68.0, CH	4.19 br s	68.0, CH	4.21 m	68.0, CH	4.25 m
16	72.0, CH	5.62 br s	68.7, CH	4.48 br s	68.7, CH	4.47 br s	73.5, CH	4.36 br s	73.7, CH	4.45 m	74.0, CH	4.45 m
17	47.4, C		48.6, C		48.6, C		48.9, C		49.1, C		48.8, C	
18	39.9, CH	3.06 m	40.5, CH	3.11 m	40.6, CH	3.10 m	41.3, CH	3.05 m	41.3, CH	3.11 m	41.4, CH	3.10 m
19	47.7, CH2	1.45 m, 2.64 m	47.5, CH2	1.40 m, 3.10 m	47.6, CH2	1.41 m, 3.10 m	47.2, CH2	1.37 m, 3.03 m	47.3, CH2	1.42 m, 3.09 m	47.3, CH2	1.42 m, 3.10 m
20	36.5, C		36.9, C		36.8, C		36.8, C		36.7, C		36.9, C	
21	78.5, CH	5.92 d	79.1, CH	6.67 d	79.3, CH	6.65 d	79.1, CH	6.63 d	79.0, CH	6.77	79.0, CH	6.73 d

[0123]

		(10.4)		(10.2)		(10.1)		(10.2)		d(10.2)		(10.2)
22	72.9, CH	6.24 d (10.4)	73.9, CH	6.29 d (10.2)	74.3, CH	6.26 d (10.2)	73.6, CH	6.25 d (10.2)	74.1, CH	6.32 d(10.2)	73.8, CH	6.36 d (10.2)
23	64.4, CH2	3.73m, 4.38 m	64.5, CH2	3.75 d(10.7), 4.38 d (10.1)	64.6, CH2	3.72 m, 4.34 m	64.7, CH2	3.71 d (10.4) , 4.31 m	64.7, CH2	3.70 m, 4.32 m	64.6, CH2	3.72 d (10.6) , 4.33 m
24	14.1, CH3	0.95 s	14.2, CH3	0.98 s	14.2, CH3	0.97 s	14.2, CH3	0.94 s	14.2, CH3	0.95 s	14.2, CH3	0.97 s
25	16.6, CH3	0.89 s	16.7, CH3	0.94 s	16.8, CH3	0.93 s	16.9, CH3	0.92 s	16.9, CH3	0.96 s	16.9, CH3	0.97 s
26	17.2, CH3	0.81 s	17.4, CH3	0.92 s	17.4, CH3	0.92 s	18.1, CH3	1.04 s	18.1, CH3	1.07 s	18.1, CH3	1.08 s
27	27.4, CH3	1.42 s	28.0, CH3	1.83 s	28.0, CH3	1.83 s	21.7, CH3	1.80 s	21.8, CH3	1.85 s	21.8, CH3	1.86 s
28	63.9, CH2	3.51 d(10.5), 3.67 m	64.0, CH2	3.43 d(10.6), 3.70 d(10.6)	64.1, CH2	3.43 d (10.5) , 3.70 m	63.4, CH2	3.46 d (10.5) , 3.76 m	63.3, CH2	3.47 d (10.2) , 3.77 m	63.5, CH2	3.53 d(10.5), 3.80 d (10.5)
29	29.8, CH3	1.06 s	29.9, CH3	1.07 s	29.9, CH3	1.08 s	29.8, CH3	1.04 s	29.9, CH3	1.09 s	29.9, CH3	1.09 s
30	20.2, CH3	1.28 s	20.8, CH3	1.32 s	20.8, CH3	1.33 s	20.7, CH3	1.28 s	20.6, CH3	1.33 s	20.7, CH3	1.34 s
21-*O*-Ang												
1'''	167.9, C		168.0, C		168.1, C		168.1, C		168.4, C		168.2	
2'''	128.6, C		129.2, C		129.3, C		129.2, C		129.6, C		129.4	
3'''	139.9, CH	6.09 m	138.9, CH	6.08 m	138.4, CH	6.06 m	139.0, CH	6.04 ddd (14.3, 7.0, 0.9)	137.1, CH	5.92 dd (7.1, 1.4)	137.9, CH	6.00 ddd (14.3, 7.1, 0.9)
4'''	16.6, CH3	2.13 dd (7.2, 1.3)	16.5, CH3	2.17 dd (7.2, 1.2)	16.5, CH3	2.17 d (7.1)	16.5, CH3	2.14 d (7.2)	16.3, CH3	2.06 d (7.1)	16.4, CH3	2.11 d (7.1)
5'''	21.5, CH3	2.02 s	21.6, CH3	2.06 s	21.6, CH3	2.06 s	21.5, CH3	2.02 s	21.4, CH3	2.00 s	21.5, CH3	2.03 s
22-*O*-2-MB												
1''''	176.4, C		177.1, C				177.0, C					
2''''	42.2, CH	2.49 m	42.1, CH	2.28 m			41.9, CH	2.03 m				
3''''	27.2, CH2	1.48 m, 1.80 m	27.4, CH2	1.36 m, 1.72 m			27.4, CH2	1.20 m, 1.57 m				
4''''	12.4, CH3	0.91 m	12.4, CH3	0.80 t (7.3)			12.3, CH3	0.64 t (7.3)				
5''''	17.3, CH3	1.19 d (7.0)	17.2, CH3	1.11 d (7.0)			17.1, CH3	0.99 d (6.9)				

[0124]

22-*O*-3-MB												
1‴‴					173.5, C							
2‴‴					44.2, CH_2	2.11 *m*						
3‴‴					26.1, CH	2.09 *m*						
4‴‴					23.0, CH_3	0.81 *d* (6)						
5‴‴					22.9, CH_3	0.85 *d* (5.9)						
22-*O*-Ang												
1‴‴											168.6, C	
2‴‴											129.6, C	
3‴‴											136.3, CH	5.81 *qh* (7.0, 6.3)
4‴‴											16.2, CH_3	1.99 *d* (7.0)
5‴‴											21.1, CH_3	1.77 *s*
22-*O*-Tig												
1‴‴									168.7, C			
2‴‴									129.4, C			
3‴‴									137.6, CH	6.81 *d* (7.1)		
4‴‴									14.4, CH_3	1.33 br *s*		
5‴‴									12.7, CH_3	1.76 *s*		
16-Ac												
1‴‴	170.3, C											
2‴‴	22.5, CH_3	2.54 *s*										
3-*O*-D-GlcA												
1′	105.6, CH	5.18 br *s*	105.8, CH	5.19 br *s*	105.6, CH	5.15 br *s*	105.6, CH	5.15 br *s*	105.6, CH	5.15 br *s*	105.1, CH	5.14 br *s*
2′	74.6, CH	4.09 *m*	74.6, CH	4.11 *m*	74.5, CH	4.07 *m*	74.7, CH	4.05 *m*	74.1, CH	4.07 *m*	74.5, CH	4.08 *m*
3′	86.5, CH	4.24 *m*	86.7, CH	4.22 *m*	86.7, CH	4.20 *m*	86.8, CH	4.17 *m*	85.9, CH	4.22 *m*	86.4, CH	4.21 *m*
4′	72.1, CH	4.40 *m*	72.0, CH	4.42 *m*	72.1, CH	4.42 *m*	71.8, CH	4.38 *m*	72.0, CH	4.38 *m*	72.1, CH	4.31 *m*
5′	77.2, CH	4.42 *m*	77.0, CH	4.45 *m*	77.2, CH	4.45 *m*	77.3, CH	4.41 *m*	77.2, CH	4.40 *m*	76.7, CH	4.32 *m*
6′	174.1, C		174.0, C		174.0, C		173.7, C		174.0, C		174.1, C	

[0125]

3′-*O*-L-Ara												
1″	106.6, CH	5.19 br *s*	106.7, CH	5.19 br *s*	106.4, CH	5.15 br *s*	106.6, CH	5.14 br *s*	106.0, CH	5.14 br *s*	106.4, CH	5.16 br *s*
2″	72.4, CH	4.69 *m*	72.5, CH	4.67 *m*	72.5, CH	4.66 *m*	72.5, CH	4.62 t (8.2)	72.0, CH	4.69 *m*	72.2, CH	4.68 *m*
3″	80.8, CH	4.29 *m*	80.9, CH	4.28 *m*	80.8, CH	4.24 *m*	80.9, CH	4.23 *m*	80.7, CH	4.25 *m*	80.8, CH	4.26 *m*
4″	69.8, CH	4.45 *m*	69.8, CH	4.44 *m*	69.8, CH	4.41 *m*	69.8, CH	4.40 *m*	69.8, CH	4.41 *m*	69.8, CH	4.43 *m*
5″	68.7, CH_2	3.81 *m*, 4.30 *m*	68.6, CH	3.80 *d* (12.0), 4.30 *m*	68.6, CH_2	3.78 *m*, 4.31 *m*	68.6, CH_2	3.76 *m*, 4.26 *m*	68.7, CH_2	3.78 *m*, 4.29 *m*	68.6, CH_2	3.79 *m*, 4.31 *m*
3″-*O*-L-Rha												
1‴	104.3, CH	6.06 br *s*	104.3, CH	6.06 br *s*	104.3, CH	6.03 br *s*	104.3, CH	6.01 br *s*	104.3, CH	6.03 br *s*	104.3, CH	6.04 br *s*
2‴	72.8, CH	4.76 *m*	72.8, CH	4.75 *m*	72.7, CH	4.73 *m*	72.7, CH	4.71 br *s*	72.7, CH	4.75 *m*	72.7, CH	4.76 *m*
3‴	73.1, CH	4.58 *m*	73.1, CH	4.58 *m*	73.0, CH	4.57 *m*	73.0, CH	4.54 *m*	73.1, CH	4.58 *m*	73.0, CH	4.59 *m*
4‴	74.6, CH	4.33 *m*	74.6, CH	4.33 *m*	74.6, CH	4.32 *m*	74.6, CH	4.28 *m*	74.6, CH	4.32 *m*	74.6, CH	4.33 *m*
5‴	70.6, CH	4.62 *m*	70.6, CH	4.62 *m*	70.6, CH	4.59 *m*	70.6, CH	4.57 *m*	70.6, CH	4.60 *m*	70.6, CH	4.61 *m*
6‴	19.1, CH_3	1.69 *d* (6.2)	19.1, CH_3	1.69 *d* (6.2)	19.1, CH_3	1.68 *d* (5.7)	19.1, CH_3	1.64 *d* (6.0)	19.1, CH_3	1.67 *d*(6.0)	19.1, CH_3	1.68 *d* (5.8)

[0126]

[0127] [표 2]

	7		8		9		10		11	
position	δ_C, type	δ_H (J in Hz)	δ_C, type	δ_H (J in Hz)	δ_C, type	δ_H (J in Hz)	δ_C, type	δ_H (J in Hz)	δ_C, type	δ_H (J in Hz)
1	39.3, CH_2	0.94 *m*, 1.47 *m*	39.4, CH_2	1.00 *m*, 1.48 *m*	39.4, CH_2	1.00 *m*, 1.50 *m*	38.8, CH_2	0.99 *m*, 1.48 *m*	38.8, CH_2	0.98 *m*, 1.48 *m*
2	26.5, CH_2	1.99 *m*, 2.30 *m*	26.6, CH_2	1.99 *m*, 2.31 *m*	26.4, CH_2	2.00 *m*, 2.30 *m*	25.6, CH_2	2.26 *m*	25.6, CH_2	2.28 *m*
3	80.7, CH	4.36 *m*	81.0, CH	4.40 *m*	81.3, CH	4.39 *m*	82.3, CH	4.21 *m*	82.2, CH	4.22 *m*
4	43.9, C		43.9, C		43.9, C		56.0, C		56.0, C	
5	47.0, CH	1.77 *m*	47.3, CH	1.81 *m*	47.2, CH	1.81 *m*	47.5, CH	1.81 *m*	47.5, CH	1.82 *m*
6	18.9, CH_2	1.31 *m*, 1.72 *m*	19.0, CH_2	1.40 *m*, 1.81 *m*	19.0, CH_2	1.40 *m*, 1.81 *m*	21.2, CH_2	1.13 *m*, 1.49 *m*	21.2, CH_2	1.14 *m*, 1.50 *m*
7	35.6, CH_2	1.32 *m*, 2.02 *m*	35.8, CH_2	1.42 *m*, 2.15 *m*	35.9, CH_2	1.42 *m*, 2.15 *m*	36.5, CH_2	2.08 *m*	36.5, CH_2	2.09 *m*
8	42.2, C		42.2, C		42.2, C		42.2, C	1.86 *m*	42.1, C	
9	47.6, CH	1.78 *m*	47.6, CH	1.87 *m*	47.6, CH	1.87 *m*	47.8, CH		47.8, CH	1.74 *m*
10	37.2, C		37.3, C		37.5, C		36.5, C		36.5, C	
11	24.3, CH_2	1.79 *m*, 1.93 *m*	24.4, CH_2	1.86 *m*, 1.95 *m*	24.4, CH_2	1.87 *m*, 1.98 *m*	24.4, CH_2	1.82 *m*, 1.92 *m*	24.4, CH_2	1.82 *m*, 1.91 *m*
12	128.1, CH	5.61 br *s*	126.7, CH	5.62br *s*	126.7, CH	5.60 br *s*	125.6, CH	5.53 br *s*	125.6, CH	5.53 br *s*
13	141.1, C		143.2, C		143.2, C		144.2, C		144.2, C	
14	47.0, C		47.6, C		47.6, C		48.3, C		48.3, C	
15	69.8, CH	5.68 *d* (3.6)	72.7, CH	5.60 br *s*	72.6, CH	5.56 br *s*	68.0, CH	4.19 br *s*	68.0, CH	4.19 *m*
16	71.6, CH	5.89 *d* (4.3)	72.0, CH	4.69 br *s*	71.7, CH	4.66 br *s*	73.5, CH	4.40 br *s*	73.3, CH	4.40 *m*
17	48.5, C		49.3, C		49.4, C		49.0, C		49.0, C	
18	40.6, CH	3.20 *m*	41.7, CH	3.24 *m*	41.6, CH	3.24 *m*	41.3, CH	3.11 *m*	41.4, CH	3.10 *m*
19	47.3, CH_2	1.51 *m*, 2.74 *m*	47.8, CH_2	1.48 *m*, 3.09 *m*	47.8, CH_2	1.46 *m*, 3.06 *m*	47.2, CH_2	1.44 *m*, 3.07 *m*	47.3, CH_2	1.44 *m*, 3.09 *m*
20	36.5, C		37.5, C		37.3, C		36.8, C		36.8, C	
21	78.6, CH	5.78 *d* (10.3)	77.0, CH	5.03 *d* (9.9)	77.0, CH	5.00 *d* (9.7)	79.1, CH	6.68 *d* (10.2)	79.2, CH	6.66 *d* (10.3)
22	72.0, CH	6.27 *d* (10.3)	76.9, CH	6.32 *d* (9.8)	76.5, CH	6.20 *d* (9.8)	73.5, CH	6.29 *d* (10.2)	73.9, CH	6.26 *d* (10.2)

[0128]

23	64.3, CH_2	3.75 *d* (10.2), 4.35 *m*	64.5, CH_2	3.73 *d* (10.6), 4.35 *m*	64.5, CH_2	3.74 *m*, 4.35 *m*	207.0, CH	9.73 *s*	207.0, CH	9.74 *s*
24	14.2, CH_3	0.94 *s*	14.1, CH_3	0.96 *s*	14.1, CH_3	0.96 *s*	10.9, CH_3	1.33 *s*	10.9, CH_3	1.33 *s*
25	16.7, CH_3	0.90 *s*	16.8, CH_3	0.93 *s*	16.8, CH_3	0.94 *s*	16.4, CH_3	0.87 *s*	16.4, CH_3	0.87 *s*
26	18.0, CH_3	1.03 *s*	18.0, CH_3	1.08 *s*	18.0, CH_3	1.09 *s*	18.0, CH_3	1.01 *s*	18.0, CH_3	1.02 *s*
27	21.4, CH_3	1.29 *s*	22.0, CH_3	2.05 *s*	22.0, CH_3	2.06 *s*	21.7, CH_3	1.87 *s*	21.6, CH_3	1.87 *s*
28	63.0, CH_2	3.75 *d*(10.2), 3.89 *d* (10.5)	63.6, CH_2	3.75 *d*(10.6), 3.95 *d* (10.4)	63.4, CH_2	3.71 *m*, 3.93 *d* (10.5)	63.4, CH_2	3.50 *d* (10.5), 3.78 *m*	63.6, CH_2	3.50 *d* (10.4), 3.76 *m*
29	29.7, CH_3	1.06 *s*	30.6, CH_3	1.27 *s*	30.6, CH_3	1.28 *s*	29.9, CH_3	1.12 *s*	29.9, CH_3	1.12 *s*
30	20.0, CH_3	1.29 *s*	19.7, CH_3	1.43 *s*	19.7, CH_3	1.41 *s*	20.7, CH_3	1.33 *s*	20.7, CH_3	1.33 *s*
15-*O*-3-MB										
1'''			173.0, C		173.0, C					
2'''			44.0, CH_2	1.88 *m*, 2.00*m*	44.0, CH_2	1.95 *m*, 2.04 *m*				
3'''			25.6, CH	2.06 *m*	25.5, CH	2.07 *m*				
4'''			22.7, CH_3	0.73 *d* (6.6)	22.7, CH_3	0.75 *d* (6.3)				
5'''			22.9, CH_3	0.85 *d* (6.5)	23.0, CH_3	0.87 br *s*				
15-Ac										
1''''	170.9, C									
2''''	21.9, CH_3	2.03 *s*								
16-Ac										
1'''''	170.4, C									
2'''''	22.2, CH_3	2.55 *s*								
21-*O*-Ang										
1''''	168.0, C						168.1, C		168.2	
2''''	128.6, C						129.1, C		129.3	
3''''	139.7, CH	6.06 *m*					139.1, CH	6.09 *ddd* (14.2, 7.1, 1.1)	138.6, CH	6.06 *m*
4''''	16.6, CH_3	2.10 *dd* (7.1, 1.1)					16.5, CH_3	2.18 *dd* (7.2, 1.3)	16.5, CH_3	2.17 *dd* (7.2, 1.3)

[0129]

5''''	21.5, CH_3	1.99 *s*					21.5, CH_3	2.06 *s*	21.5, CH_3	2.05 *s*
22-*O*-2-MB										
1'''''					178.2, C		177.1, C			
2'''''					42.4, CH	2.44 *m*	41.9, CH	2.08 *m*		
3'''''					27.7, CH_2	1.48 *m*, 1.81 *m*	27.4, CH_2	1.23 *m*, 1.60 *m*		
4'''''					12.4, CH_3	0.93 *m*	12.3, CH_3	0.68 *t* (7.4)		
5'''''					17.4, CH_3	1.16 *d* (7.0)	17.1, CH_3	1.03 *d* (7.0)		
22-*O*-3-MB										
1'''''	172.9, C								173.3, C	
2'''''	43.9, CH_2	2.23 *m*							44.0, CH_2	1.94 *m*
3'''''	26.0, CH	2.14 *m*							26.1, CH	1.97 *m*
4'''''	22.8, CH_3	0.82 *d* (6.6)							22.8, CH_3	0.78 *d*(6.3)
5'''''	22.8, CH_3	0.84 *d* (6.6)							22.9, CH_3	0.72 *d*(6.2)
22-*O*-Ang										
1'''''			168.9, C							
2'''''			130.0, C							
3'''''			136.6, CH	5.81 *dt* (7.1, 6.1)						
4'''''			16.3, CH_3	2.02 *d* (7.1)						
5'''''			21.4, CH_3	1.95 *s*						
3-*O*-D-GlcA										
1'	105.3, CH	5.14 br *s*	105.5, CH	5.16 br *s*	105.4, CH	5.17 br *s*	105.3, CH	5.17 br *s*	105.4, CH	5.16 br *s*
2'	74.5, CH	4.07 *m*	74.6, CH	4.08 *m*	74.6, CH	4.09 *m*	74.5, CH	4.09 *m*	74.6, CH	4.08 *m*
3'	86.5, CH	4.20 *m*	86.5, CH	4.19 *m*	86.4, CH	4.20 *m*	86.2, CH	4.29 *m*	86.2, CH5	4.21 *m*
4'	71.9, CH	4.31 *m*	72.0, CH	4.36 *m*	72.1, CH	4.40 *m*	71.9, CH	4.39 *m*	72.1, CH	4.36 *m*
5'	76.7, CH	4.32 *m*	77.1, CH	4.37 *m*	77.2, CH	4.45 *m*	77.2, CH	4.42 *m*	77.2, CH	4.37 *m*
6'	174.1, C		174.1, C		174.1, C		174.0, C		174.1, C	
3'-*O*-L-Ara										
1''	106.4, CH	5.17 br *s*	106.6, CH	5.17 br *s*	106.6, CH	5.17 br *s*	106.5, CH	5.20 br *s*	106.5, CH	5.20 br *s*
2''	72.4, CH	4.67 *m*	72.4, CH	4.66 *m*	72.4, CH	4.66 *m*	72.5, CH	4.66 *m*	72.5, CH	4.66 *m*
3''	80.8, CH	4.27 *m*	80.8, CH	4.27 *m*	80.8, CH	4.26 *m*	80.8, CH	4.26 *m*	80.9, CH	4.26 *m*

[0130]

4''	69.8, CH	4.43 *m*	69.8, CH	4.43 *m*	69.8, CH	4.43 *m*	69.8, CH	4.43 *m*	69.8, CH	4.42 *m*
5''	68.6, CH_2	3.80 *d* (12.2), 4.30 *m*	68.6, CH_2	3.78 *d* (12.1), 4.28 *m*	68.6, CH_2	3.79 *m*, 4.29 *m*	68.6, CH_2	3.78 *m*, 4.29 *m*	68.5, CH_2	3.79 *m*, 4.29 *m*
3''-*O*-L-Rha										
1'''	104.3, CH	6.04 br *s*	104.3, CH	6.05 br *s*	104.3, CH	6.05 br *s*	104.3, CH	6.04 br *s*	104.3, CH	6.04 br *s*
2'''	72.7, CH	4.75 br *s*	72.7, CH	4.74 *m*	72.7, CH	4.75 *m*	72.7, CH	4.74 *m*	72.7, CH	4.74 *m*
3'''	73.0, CH	4.58 *m*	73.1, CH	4.57 *m*	73.1, CH	4.58 *m*	73.0, CH	4.57 *m*	73.1, CH	4.58 *m*
4'''	74.6, CH	4.32 *m*	74.6, CH	4.32 *m*	74.6, CH	4.33 *m*	74.6, CH	4.32 *m*	74.6, CH	4.32 *m*
5'''	70.6, CH	4.61 *m*	70.6, CH	4.61 *m*	70.6, CH	4.61 *m*	70.6, CH	4.61 *m*	70.6, CH	4.61 *m*
6'''	19.1, CH_3	1.68 *d* (5.7)	19.1, CH_3	1.67 *d* (6.1)	19.1, CH_3	1.64 *d*(6.0)	19.1, CH_3	1.67 *d* (5.7)	19.1, CH_3	1.67 *d* (4.6)

[0131]

[0132] 화합물 1은 무정형 분말로서 얻어졌으며, *m/z* 1167.5956 [M-H] (calcd. for 1167.5951)에서 준-분자 이온 피크가 나타나 분자식 $C_{59}H_{92}O_{23}$로 잠재적으로 결정되었다. ^{1}H NMR 스펙트럼 데이터는 트리테르펜(triterpene) 유형의 특징적인 신호인 δ_H 0.81, 0.89, 0.95, 1.06, 1.28 및 1.42 (모두 $_s$, 3H, H-26, 25, 24, 29, 30 및 27)의 6개의 메틸기와 δ_H 5.41 (br *s*, 1H, H-12)의 올레핀기(olefin group)의 신호를 나타내었다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서의 δ_C 125.6와 141.5 (C-12와 C-13)의 특징적인 화학적 이동은 화합물 1이 올레아난(oleanane) 유형의 트리테르페노이드임을 암시했다. 흥미롭게도 HSQC 실험은 다운필드된 화학적 이동인 δ_H/δ_C 3.73 및 4.38 (모두 *m*,

2H, H-23)/64.4 (C-23)과 3.51 및 3.67 (모두 *m*, 2H, H-28)/63.9 (C-28)에서의 2개의 옥시메틸렌기 및 δ_H/δ_C 4.34 (*m*, 1H, H-3)/81.1 (C-3), 5.62 (br *s*, 1H, H-16)/72.0 (C-16), 5.92 (d, J = 10.4 Hz, 1H, H-21)/78.5 (C-21)와 6.24 (*d*, *J* = 10.4 Hz, 1H, H-22)/72.9 (C-22)에서의 4개의 옥시메틴(oxymethine)기 신호들이 나타내어, 화합물 1은 산화기가 매우 많은 트리테르페노이드 유형임을 암시했다. 또한, 각각의 δ_H 2.54 (*s*, 3H, H-2''''''')에서는 Ac 모이어티, δ_H 2.02 (*s*, 3H, H-5''''), 2.13 (*dd*, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 3H, H-4''''), 6.09 (*m*, 1H, H-3'''')에서는 Ang 모이어티, 그리고 δ_H 0.91 (*m*, 3H, H-4'''''), 1.19 (*d*, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-5'''''), 1.48 (*m*, 1H, H-3''''') 및 1.80 (*m*, 1H, H-3''''') 및 2.49 (*m*, 1H, H-2''''')에서는 2-MB 모이어티의 신호가 나타났고, 이는 세 개의 치환기가 아세틸 (acetyl: Ac), 안질로일 (angeloyl: Ang) 및 2-메틸부타노일 (2-methylbutanoyl: 2-MB)임을 암시하였다. Ac, Ang과 2-MB의 위치는 δ_H 5.62 (H-16)와 δ_C 170.3 (C-1''''''), δ_H 6.63 (H-21)와 δ_C 168.1 (C-1'''), 그리고 δ_H 6.25 (H-22)와 δ_C 177.0 (C-1'''') 사이의 HMBC 상관피크에 의해 각각 C-16, C-21와 C-22로 결정되었다. NOESY 스펙트럼은 δ_H 5.92 (H-21)과 1.06 (H-29) 사이의 상관 피크뿐만 아니라 δ_H 6.24 (H-22)와 1.28 (H-30) 사이의 상관 피크를 나타내는데, 이는 H-21과 H-22가 각각 *α*- 및 *β*- 형태로 배향된다는 것을 암시한다. 결과적으로, Ang 및 2-MB 모이어티는 C-21 및 C-22에서 각각 *β*- 및 *α*- 형태로 부착되었다. 또한 δ_H 5.62 (H-16)과 3.06 (H-18) 사이의 NOESY 상관 관계 피크는 16-OH기가 *α*-형으로 배향되었음을 시사했다. 당 사슬의 경우에서 δ_H 5.18 (br *s*, 1H, H-1'), δ_H 5.19 (br *s*, 1H, H-1'')와 6.06 (br *s*, 1H, H-1''')의 세 개의 아노머 양성자 신호가 각각 δ_C 105.6 (C-1'), 106.6 (C-1'') 그리고 104.3 (C-1''')와 붙어있는 것이 HSQC 결과에 의해 확인되어, 3 개의 당 단위의 존재를 나타냈다. δ_H 5.18 (H-1')와 δ_C 81.1 (C-3)사이와 δ_H 5.19 (H-1'') 와 δ_C 86.5 (C-3') δ_H 6.06 (H-1''')와 δ_C 80.8 (C-3'') 사이의 HMBC 상관피크들은 삼당류가 C-3에 위치하는 수산화기와 연결된 것을 보여주었다. 화합물 1의 산 가수 분해 후 톨릴티오카르바모일 티아졸리딘(tolylthiocarbamoyl thiazolidine) 유도체의 HPLC 분석에 의해 세 개의 당 잔기는 각각 D-글루쿠론산, L-아라비노오스 및 L-람노오스로 확인되었다. 글루쿠로노피라노실(glucuronopyranosyl), 아라비노피라노일(arabinopyranoyl) 및 람노피라노실(rhamnopyranosyl) 단위의 아노머 양성자의 배열은 화합물 1의 화학적 이동에 따라 각각 *β*, *α*, *α* 형태인 것으로 결정되었다. 화합물 1은 21*β*-*O*-angeloyl-22 *α*-*O*-(2-methylbutanoyl)-16 *α*-*O*-acetyloxy-23,28-dihydroxyolean-12-ene 3*β*-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-*α*-L-arabinopyranosyl-(1→3)-*β*-D-glucuronopyranoside 로 확인되었다.

[0133] 화합물 2는 무정형 분말로서 수득되었다. 그 분자식은 HRESIMS 스펙트럼 (*m/z* 1125.5859 $[M-H]^-$ calcd. for 1125.5845)에 의해 $C_{57}H_{90}O_{22}$인 것으로 결정되었다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터는 C-16에서의 치환체를 제외하고는 화합물 1과 유사하였다. C-15 (δ_C 35.3, -32.7ppm) 및 C-16(δ_C 68.7, -4.8ppm)의 화학적 이동의 유의한 변화는 C-16에 결합된 수산화기가 제거되었음을 보여주었다. δ_H 1.60 (H-15) 및 δ_C 42.1 (C-14) 사이와 68.7 (C-16) 및 28.0 (C- -27) 사이의 상관피크들은 HSQC 및 HMBC 실험에 의해 확인되었다. 따라서, 화합물 2는 21*β*-*O*-angeloyl-22 *α*-*O*-(2-metylbutanoyl)-16 *α*,23,28-trihydroxyolean-12-ene 3*β*-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-*α*-L-arabinopyranosyl-(1→3)-*β*-D-glucuronopyranoside로 확인되었다.

[0134] 화합물 3의 분자식인 $C_{57}H_{90}O_{22}$은 HRESIMS (*m/z* 1125.5856 $[M-H]^-$, calcd. for 1125.5845)에 의해 결정되었다. 화합물 3의 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터는 C-22의 치환체를 제외하고는 화합물 2와 유사하였다. C-4''''' (δ_C 23.0, +10.6ppm)와 C-5''''' (δ_C 22.9, +5.7ppm)의 화학적 이동의 유의한 변화는 C-22에 부착된 작용기가 3-MB라는 것을 나타내며, 이는 HSQC 및 HMBC 실험에 의해 확인되었다. 따라서, 화합물 3은 21*β*-*O*-angeloyl-22 *α*-*O*-(3-metylbutanoyl)-16 *α*,23,28-trihydroxyolean-12-ene 3*β*-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-*α*-L-arabinopyranosyl-(1→3)-*β*-D-glucuronopyranoside로 확인되었다.

[0135] 화합물 4은 무정형 분말로서 얻어졌으며, *m/z* 1141.5800 $[M-H]^-$ (calcd. for 1141.5795)에서 준-분자 이온 피크가 나타나 분자식 $C_{57}H_{90}O_{23}$로 잠재적으로 결정되었다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터는 C-15 및 C-16에서의 치환기를 제외하고는 화합물 3의 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터와 유사하였다. C-15 (δ_C 68.0, +32.8 ppm) 및 C-16 (δ_C 73.5, +4.8 ppm)의 화학적 이동의 유의한 변화는 C-15 및 C-16에 결합된 작용기가 OH임을 나타냈다. 상관

관계는 δ_H 4.19 (H-15)와 δ_C 42.0 (C-14), 73.5 (C-16) 및 21.7 (C-27) 사이에 HSQC 및 HMBC 실험에 의해 확인되었다. δ_H 4.19 (H-15)와 4.36 (H-16) 및 3.05 (H-18) 사이의 NOESY 상관 관계 피크는 15-OH와 16-OH 그룹이 모두 α 형태로 배향되었음을 시사한다. 따라서 화합물 4는 21β-*O*-angeloyl-22α-*O*-(2-methylbutanoyl)-15α,16α,23,28-tetrahydroxyolean-12-ene 3β-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranoside로 확인되었다.

[0136] 화합물 5의 분자식은 HRESIMS 분석 (*m/z* 1139.5658 $[M-H]^-$, calcd for 1139.5638)에 의해 $C_{57}H_{88}O_{23}$인 것으로 결정되었다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터는 C-22에서의 치환체를 제외하고는 화합물 4의 것과 유사하였다. C-2''''(δ_C 129.4, +87.5 ppm) 및 C-3'''''(δ_C 137.6, +110.2 ppm)의 화학적 이동의 유의한 변화는 C-22에 부착된 작용기가 티그로일(tigloyl: Tig)이라는 것을 나타내며, 이는 HSQC 및 HMBC 실험에 의해 확인되었다. 따라서, 화합물 5는 21β-*O*-angeloyl-22α-*O*-tigloyl-15α,16α,23,28-tetrahydroxyolean-12-ene 3β-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranoside로 확인되었다.

[0137] 화합물 6은 HRESIMS 스펙트럼 (*m/z* 1139.5660 $[M-H]^-$, calcd for 1139.5638)에 의해 결정된 분자식 $C_{57}H_{88}O_{23}$을 갖는다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터는 C-22의 치환체를 제외하고는 화합물 2의 스펙트럼 데이터와 유사하였다. C-4''''(δ_C 16.2, +1.8ppm) 및 C-5 ''''(δ_C 21.1, +8.4ppm)의 화학적 이동의 유의한 변화는 HSQC 및 HMBC 실험을 통해 C-22에 부착된 작용기가 Tig에서 Ang로 변화되었음을 보여주었다. 따라서, 화합물 6은 21β,22α-*O*-diangeloyl-15α,16α,23,28-tetrahydroxyolean-12-ene 3β-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranoside로 확인되었다.

[0138] 화합물 7은 그의 HRESIMS 분석으로부터 결정된 분자식 $C_{61}H_{100}O_{23}$를 갖는다 (m/z 1199.6528 $[M-H]^-$ calcd. for 1199.6577). 화합물 7의 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터는 C-15, C- 16 및 C-22의 치환기를 제외하고 화합물 4와 유사하였다. C-15 (δ_C 69.8, +1.8 ppm), C-16 (δ_C 71.6, -1.9 ppm), C-4''''' (δ_C 22.8, +10.5 ppm)와 C-5''''' (δ_C 22.8, +5.7 ppm)의 화학적 이동의 특징적인 변화는 C-15, C-16 및 C-22에 붙어있는 작용기가 각각 Ac(아세틸), Ac 및 3-MB인 것을 나타내며, 이는 HSQC와 HMBC 실험에 의해 규명되었다. 화합물 7의 NMR 데이터는 δ_H/δ_C 5.68 (*d*, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-15)/69.8 (C-15)와 5.89 (*d*, *J* = 4.3 Hz, 1H, H-16)/71.6 (C-16)에서 두 개의 아세틸기 신호를 나타내었다. δ_H 5.68 (H-15)와 δ_C 170.9 (C-1''''''), 21.9 (C-2'''''') 사이와, δ_H 5.89 (H-16)와 δ_C 170.4 (C-1'''''''), 22.2 (C-2''''''') 사이의 상관피크들은 HSQC와 HMBC 실험에 의해 확인되었다. 따라서, 화합물 7은 21β-*O*-angeloyl-22α-*O*-(3-metylbutanoyl)-15α,16α-*O*-diacetyloxy-23,28-dihydroxyolean-12-ene 3β-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranoside로 확인되었다.

[0139] 화합물 8의 분자식은 HRESIMS 분석 (*m/z* 1141.5800 $[M-H]^-$, calcd. 1141.5795)에 따라 $C_{57}H_{90}O_{23}$으로 결정되었다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터는 C-15, C-21 및 C-22에서의 치환체를 제외하고는 화합물 4와 유사하였다. C-15의 화학적 이동의 유의한 변화는 C-15 (δ_C 72.7, +4.7 ppm), C-21 (δ_C 77.0, -2.1 ppm), C-22 (δ_C 76.9, +3.3 ppm), C-2''''(δ_C 130.0, +4.7 ppm) 및 C-3''''(δ_C 136.6, +3.3ppm)은 C-15, C-21 및 C-22에 부착된 작용기가 각각 3-MB, OH 및 Ang임을 나타내며, 이는 HSQC 및 HMBC 실험에 의해 규명되었다. 화합물 8의 NMR 데이터는 δ_H 0.73 (*d*, *J* = 6.6Hz, 3H, H-4''''), 0.85 (*d*, *J* = 6.5Hz, 3H, H-5''''), 1.88 및 2.00 (both *m*, 2H, H-2'''') 및 2.06 (m, 1H, H-3'''')의 3-MB의 신호를 나타내었다. δ_H 5.60 (H-15)와 δ_C 173.0 (C-1'''') 사이의 상관피크는 HSQC 와 HMBC 실험에 의해 확인되었다. 따라서, 화합물 8은 15α-*O*-(3-metylbutanoyl)-22α-*O*-angeloyl-16α,21β,23,28-tetrahydroxyolean-12-ene 3β-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranoside로 확인되었다.

[0140] 화합물 9는 HRESIMS 스펙트럼 (*m/z* 1143.5934 $[M-H]^-$, calcd. for 1143.5951) 에 따라 분자식 $C_{57}H_{92}O_{23}$을 갖는다. 화합물 9의 ^1H 및 ^{13}C 스펙트럼 데이터는 C-22에서의 치환체를 제외하고는 화합물 8과 유사하였다. C-2

''''(δ_C 42.4, -87.6 ppm) 및 C-3''''(δ_C 27.7, -108.9 ppm)의 화학적 이동의 유의한 변화는 C-22에 부착된 작용기가 2-MB임을 나타내며, 이는 HSQC 및 HMBC 실험에 의해 확인되었다. 따라서 화합물 9는 15α-*O*-(3-metylbutanoyl)-22α-*O*-(2-metylbutanoyl)-16α,21β,23,28-tetrahydroxyolean-12-ene 3β-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranoside로 확인되었다.

[0141] 화합물 10는 무정형 분말이다. 분자식 $C_{57}H_{88}O_{23}$은 HRESIMS 분석 (*m/z* 1139.5679 $[M-H]^-$, calcd. for 1139.5638)에 의해 결정되었다. 화합물 10의 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터는 화합물 4의 것과 유사하였다. 화합물 4와 비교하여, 주요 차이점은 다운필드된 C-4 (δ_C 56.0, + 12.1ppm), C-23 (δ_C 207.0, + 142.3ppm)과 업필드된 C-24 (δ_C 10.9, -3.3ppm)의 신호가 관찰되었다. 화합물 10의 NMR 데이터는 δ_H/δ_C 9.73 (*s*, 1H, H-23)/207.0 (C-23)에서 알데히드기에 대한 신호를 나타냈다. C-24에서의 δ_C 10.9, C-5에서의 δ_C 56.0 와 H-23에서의 δ_H 9.73 사이의 상관피크들은 HSQC 및 HMBC 실험을 통해 확인되었다. 따라서, 화합물 10은 21β-*O*-angeloyl-22α-*O*-(2-metylbutanoyl)-15α,16α,28-trihydroxyolean-12-ene-23-al 3β-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranoside로 확인되었다.

[0142] 화합물 11의 분자식은 HRESIMS 스펙트럼 (*m/z* 1139.5687 $[M-H]^-$, calcd. for 1139.5638)에 따라 $C_{57}H_{88}O_{23}$인 것으로 결정되었다. 화합물 11의 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터는 C-22에서의 치환체를 제외하고는 화합물 10의 것과 유사하였다. C-4'''''(δ_C 22.8, +10.5 ppm)와 C-5'''''(δ_C 22.9, +5.8 ppm)의 화학적 이동은 C-22에 부착된 작용기가 3-MB임을 나타내며, 이는 HSQC 및 HMBC 실험에 의해 확인되었다. 따라서, 화합물 11는 21β-*O*-angeloyl-22α-*O*-(3-metylbutanoyl)-15α,16α,28-trihydroxyolean-12-ene-23-al 3β-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranoside로 확인되었다.

[0143] 도 1에 화합물 1 내지 11의 화학 구조를 나타내었다.

[0145] **실시예 12: 동백나무 뿌리 추출물 (*Camellia japonica* Root Total Extract; CJT)의 제조**

[0146] 2016년 8월 전라남도 해남에서 동백나무(*C. japonica*)의 뿌리 (11.5 kg)를 채취하였다. 건조된 뿌리는 강원대학교 약학대학의 권용수 교수로부터 검증되었으며, 강원대학교 식물 표본실에 KNUP-CJ-1로 보관되었다. 상기 동백나무 뿌리를 70% 에탄올 또는 80% 메탄올로 추출하여 동백나무 뿌리 추출물(CJT)을 수득하였다.

[0148] **실험 방법**

[0149] 세포 배양

[0150] HaCaT 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 얻었으며, HaCaT-ARE 안정 세포주는 동국대학교 금영삼 교수로부터 제공받았다. 세포는 10% 태아 소 혈청 및 항생제-항균제 (100 units/mL 페니실린, 100 μg/mL 스트렙토마이신, 및 0.25 μg/mL 암포테리신 B)가 보충된 RPMI 1640 배지에서 온도 37 ℃로 5 % CO_2 및 95 %의 공기를 함유한 가습된 인큐베이터에서 배양되었다.

[0152] 세포 생존력 검사법

[0153] HaCaT 세포에 대한 화합물 1 내지 11의 세포 독성 효과는 MTT 분석을 사용하여 결정하였다. 간단히, 세포를 48-웰 플레이트에서 배양하였다. 하룻밤 배양 한 후 (60~70 % confluency), 세포를 24시간 동안 다른 농도의 약물로 처리 하였다. 20 ㎕의 MTT 용액 (5 mg/ml)을 각 웰에 넣고 2시간 더 배양하였다. 세포에서 포르마잔(formazan)의 형성은 배지를 제거한 후 DMSO를 사용하여 용해시켰다. ELISA 플레이트 판독기 (Tecan instrument)를 사용하여 용해 가능한 포르마잔으로부터의 보라색을 570 nm에서 측정하였다.

[0155] ARE-루시페라제 검사법

[0156] Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega)를 사용하여 HaCaT-ARE 안정 세포주에서 화합물 1 내지 11의 ARE-루시페라제 활성을 측정하였다. 간략하게, 세포를 24-웰 플레이트에 배양하였다. 밤새 배양 (60-70% confluency) 후, 세포를 24시간 동안 상이한 농도로 화합물 1 내지 11에 처리하였다. 그런 다음, 세포를 100 ㎕의 수동 용해 완충액과 함께 15분 동안 실온에서 흔들어주면서 배양하였다. ARE-루시페라제 활성을 제조자의 지시에 따라 측정하고 총 단백질 농도로 표준화시켰다.

[0158] 웨스턴 블롯 분석

[0159] HaCaT 세포를 약물 처리 전 60-70%의 confluency가 될 때까지 60mm 디시에서 배양하였다. 세포를 약물 또는 DMSO (0.1 %)로 원하는 시간 또는 농도로 처리하였다. 얼음에서 30분간 RIPA 완충액 (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% 소듐 데옥시콜레이트, 0.1% SDS 및 프로테아제 억제제)을 사용하여 추출한 후 14,800 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 단백질 농도는 570 nm에서 BCA 시약 (Thermo Scientific)을 사용하여 측정하였다. 단백질 (25 μg)을 7.5 또는 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 전기 영동하고 20% 메탄올을 함유하는 트리스-글리신 완충액에서 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 막을 PBS-T 또는 TBS-T 완충액 (0.1 % Tween-20) 중 5% 탈지분유에서 1시간 동안 차단시켰다. Nrf2 및 Histone H3에 대한 1차 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. 막을 1차 항체와 함께 배양한 후 3회 세척하였다. 막을 1 시간 동안 horseradish peroxide가 접합된 이차 항체와 함께 배양하였다. 3 번 세척 한 후 ECL 기질 용액 (Bio-Rad)을 사용하여 영상 분석기 (Bio-Rad)에서 단백질을 시각화하였다.

[0161] 핵 및 세포질 추출물의 준비

[0162] 핵 및 세포질 단백질은 준비 과정에서 M-PER 완충액 (Thermo Scientific)을 사용하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 세포질 단백질을 방출하기 위해 얼음으로 10 분 동안 M-PER을 용해하였다. 세포질 단백질은 3,000 rpm에서 4분 동안 원심분리된 핵 단백질에서 분리되었다. 핵 단백질이 함유된 펠렛은 M-PER을 사용하여 다시 섞였다. 이들 모두를 초음파 처리하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 총 세포질 및 핵 단백질은 BCA 시약을 사용하여 측정하였다.

[0164] 통계적 분석

[0165] 데이터는 세 번의 독립적인 실험으로부터 평균 ± 표준 편차로 나타내었고 통계 분석은 t-테스트를 사용하여 수행되었다. 기준은 * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001로 대조군과 유의한 차이가 있었다.

[0167] 세포 배양

[0168] 마우스 대식세포(RAW 264.7)는 고농도의 포도당 (4.5 g/L), 10 % 열-불 활성화된 소태아혈청 (fetal bovine serum; FBS) 및 항생제/항균제 혼합물이 보충된 DMEM에서 37 ℃로 5 % CO_2 가습된 공기에서 유지되었다.

[0170] 웨스턴 블롯팅

[0171] Raw 264.7 세포를 6-웰 플레이트에서 80 % confluency가 될 때까지 배양 한 후 약물 또는 DMSO (0.1 %) 처리 전 24 시간 동안 배양하였다. 전체 세포 용해물을 RIPA 완충액 사용하여 추출하고 샘플을 14,500 g에서 10 분간 원심분리하였다. 전체 세포 용해물 또는 배지(농축된)를 10 % SDS-폴리아크릴 아미드 겔에서 분리하고, 밴드를 20 % 메탄올을 함유하는 트리스-글리신 완충액 에서 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 막을 PBS 중 5 % 탈지분유에서 1 시간 동안 차단시켰다. 막을 일차 항체와 함께 밤새 배양하였다. 막을 1 시간 동안 horseradish peroxide가 접합된 이차 항체와 함께 배양하였다. ECL 기질 용액을 사용하여 단백질을 시각화하였다.

[0173] 정량적 RT-PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction; qPCR)

[0174] 전체 RNA를 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 Raw 264.7 세포로부터 분리하였다. SuperScript Ⅱ

역전사 효소 키트(Invitrogen)를 사용하여 전체 RNA 1㎍으로부터 cDNA를 합성하였다. 모든 반응은 cDNA 25 ng, 각 프라이머 300 nM, 및 SYBER Green PCR Master Mix (Roche) 5 ㎕로 구성된 10 ㎕ 부피에서 95 ℃에서 10 분간, 및 95 ℃에서 3 초간 및 60 ℃에서 30 초간의 40 사이클로 수행되었다. mRNA의 발현 수준은 내부적인 표준인 GAPDH에 대해 표준화되었다. qPCR 용 프라이머는 qPrimerDepot (http://mouseprimerdepot.nci.nih.gov)을 사용하여 설계되었다.

[0176] 젤라틴 자이모그래피

[0177] 농축된 세포 배지를 7.5% SDS-PAGE 겔을 함유하는 0.1 % 젤라틴에서 전기영동하였다. 이어서, 겔을 세척 완충액 (2.5% 트리톤 x-100, 50 mM 트리스-HCl, 5 mM $CaCl_2$, 1 uM $ZnCl_2$, pH 7.5)으로 30 분간 두 번 세척하고 전개 완충액 (1% 트리톤 x-100, 50 mM Tris-HCl, 5 mM $CaCl_2$, 1uM $ZnCl_2$, pH 7.5)으로 37 ℃에서 밤새 배양하였다. 그런 다음 겔을 Coomassie Brilliant Blue 염료로 염색하였다.

[0179] 라디칼 소거 검사법

[0180] ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 검사법을 이용하여 동백나무 뿌리 추출물의 항산화 효능을 측정하였다. Potassium persulfate 2.4 mM과 ABTS 7 mM을 1:1 부피비로 맞추어 혼합해주고 24 시간 동안 실온에서 차광된 상태로 반응시켜주어 ABTS 자유 라디칼을 만들어주었다. 그 후 ABTS 자유 라디칼을 D.W로 희석하여 650 nm 흡광도가 0.7 부근이 되도록 ABTS working solution을 만들었다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 ABTS working solution 80 ㎕와 샘플 20 ㎕를 혼합하고, 4분 동안 차광된 상태로 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더로 650 nm의 흡광도를 측정하였다. 항산화 효능은 다음 식을 이용하여 계산하였다:

$$(1-\frac{A_{sample}-A_{sampleblank}}{A_{blank}})\times 100$$

[0181] ABTS 라디칼 소거 활성 (%) =

[0182] (Ref. Takebayashi J, Tai A, Yamamoto I. pH-dependent long-term radical scavenging activity of AA-2G and 6-Octa-AA-2G against 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation. Biol Pharm Bull. 2003 Sep;26(9):1368-70. PubMed PMID: 12951491.)

[0184] 세포 이미징

[0185] 세포 준비 이전에, 세포 이미지를 위상차 현미경으로 촬영하였다.

[0187] **실험예 1: 동백나무 뿌리 유래 화합물의 세포 독성 검사**

[0188] 실시예 1 내지 11에서 분리된 동백나무 뿌리 유래 화합물 1 내지 11에 대하여 세포 생존력 검사법에 따라 세포 독성을 평가하였다.

[0189] 도 2는 화합물 1 내지 11의 농도에 따른 HaCaT 세포 생존력 결과를 나타낸 그래프이다.

[0190] 그 결과 도 2에 나타낸 바와 같이, 화합물 1 내지 11은 HaCaT 세포에 대해 24시간 동안 3.125 내지 25 ㎛M의 농도에서 유의한 세포 독성을 나타내지 않았다. 화합물 2와 3은 높은 농도인 25 ㎛M에서 72.7%와 69.3%의 세포 생존력을 유발하였으나, 보다 낮은 농도에서는 세포 독성을 나타내지 않았다.

[0192] **실험예 2: 동백나무 뿌리 유래 화합물의 항산화 활성 확인**

[0193] 실시예 1 내지 11에서 분리된 동백나무 뿌리 유래 화합물 1 내지 11에 대하여 항산화 활성을 확인하기 위하여 ARE-루시페라제 검사법 및 핵 내 Nrf2의 축적 확인 실험을 수행하였다. ARE 루시페라제 검사법은 Nrf2가 항산화 반응 요소(ARE)와 결합하여 항산화 유전자를 발현시키는지 확인하기 위한 실험이다.

[0194] 먼저, HaCaT-ARE 안정 세포주에 화합물 1 내지 11을 25 μM로 6시간 동안 처리한 후, 세포주에서의 ARE-루시페라제 활성을 측정하였다.

[0195] 도 3은 HaCaT-ARE 안정 세포주에 화합물 1 내지 11을 25 μM로 6시간 동안 처리한 후, 세포주에서의 ARE-루시페라제 활성을 측정한 결과이다.

[0196] 그 결과 도 3에 나타낸 바와 같이, 화합물 1 내지 11은 모두 대조군과 비교하여 ARE-루시퍼라제 활성이 증가하였고, 특히 화합물 4, 5, 6, 8, 및 11의 ARE-루시페라제 활성은 25 μM에서 2 배 이상 크게 증가하였다. 화합물 4, 5, 6, 8, 및 11은 ARE 유전자의 전사의 상향 조절을 통해 Nrf2의 수준을 유의하게 증가시켰다.

[0197] 다음으로, HaCaT-ARE 안정 세포주에서 ARE-루시페라제의 활성화는 주로 프로모터 영역에서 ARE 서열과의 결합을 통해 Nrf2에 의해 조절되기 때문에, HaCaT-ARE 안정 세포주에 화합물 1 내지 11을 25 μM로 6시간 동안 처리한 후, 핵 Nrf2 수준을 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

[0198] 도 4는 HaCaT-ARE 안정 세포주에 화합물 1 내지 11을 25 μM로 6시간 동안 처리한 후, 핵 Nrf2 수준을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.

[0199] 그 결과 도 4에 나타낸 바와 같이, 화합물 1 내지 11은 6시간 동안 비히클(vehicle)에 비해 핵에서 Nrf2 축적을 증가시켰다. 따라서, 동백나무 뿌리에서 유래한 트리테르페노이드계 사포닌은 산화 스트레스로부터 보호하는 잠재적인 치료 후보 물질 중 하나로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0201] **실험예 3: 동백나무 뿌리 추출물(CJT)의 항염증 효과 확인**

[0202] 실시예 12에서 제조한 동백나무 뿌리 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위하여, 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 7시간 동안 농도별로 처리한 후, 웨스턴 블롯을 수행하여 염증인자의 상대적인 단백질 양을 측정하고, 정량적 RT-PCR을 수행하여 염증인자의 상대적인 mRNA 양을 측정하였다. 상기 동백나무 뿌리 추출물(CJT)은 70% 에탄올 또는 80% 메탄올로 추출한 후 동결 건조한 시료를 DMSO에 녹인 것을 사용하였고, LPS는 1 μg/ml를 사용하였다.

[0203] 도 5는 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 70% 에탄올 또는 80% 메탄올로 추출한 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 웨스턴 블롯을 수행하여 염증인자의 상대적인 단백질 양을 측정한 결과이다.

[0204] 도 6은 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 80% 메탄올로 추출한 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 정량적 RT-PCR을 수행하여 염증인자의 상대적인 mRNA 양을 측정한 결과이다.

[0205] 그 결과 도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 동백나무 뿌리 추출물은 LPS에 의해 유도된 COX-2 (cycloxygenase-2), p65 (NF-kB p65 subunit), IL-6 (interleukin-6), IL-1β (Interleukin-1 beta) 등과 같은 염증인자의 발현을 농도의존적으로 감소시킴을 확인하였다. 이는 동백나무 뿌리 추출물이 항염증 효과가 있어 염증 관련 질환의 치료제로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0207] **실험예 4: 동백나무 뿌리 추출물의 항패혈증 효과 확인**

[0208] 실시예 12에서 제조한 동백나무 뿌리 추출물의 항패혈증 효과를 확인하기 위하여, 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 웨스턴 블롯을 수행하여 세포 밖으로 유리된 HMGB1의 상대적인 단백질 양을 측정하였다. 구체적으로, HMGB1은 대표적인 패혈증 인자로서 핵으로부터 유리된 후 세포 밖으로 유리되어 패혈증을 유도하는 단백질로, 동백나무 뿌리 추출물이 HMGB1의 세포 밖 유리를 저해하는지 관찰하였다. 상기 동백나무 뿌리 추출물(CJT)은 80% 메탄올로 추출한 후 동결 건조한 시료를 DMSO에 녹인 것을 사용하였고, LPS는 1 μg/ml를 사용하였다.

[0209] 도 7은 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 웨스턴 블롯을 수행하여 세포 밖으로 유리된 HMGB1의 상대적인 단백질 양을 측정한 결과이다.

[0210] 그 결과 도 7에 나타낸 바와 같이, 동백나무 뿌리 추출물은 LPS에 의해 유도된 HMGB1의 세포 밖 유리를 농도의

존적으로 감소시킴을 확인하였다. 이는 동백나무 뿌리 추출물이 항패혈증 효과가 있어 패혈증 관련 질환의 치료제로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0212] **실험예 5: 동백나무 뿌리 추출물의 암 전이 억제 효과 확인**

[0213] 실시예 12에서 제조한 동백나무 뿌리 추출물의 암 전이 억제 효과를 확인하기 위하여, 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 젤라틴 자이모그래피를 수행하여 암세포 전이 인자인 MMP-9의 상대적인 활성을 측정하였다. 상기 동백나무 뿌리 추출물(CJT)은 80% 메탄올로 추출한 후 동결 건조한 시료를 DMSO에 녹인 것을 사용하였고, LPS는 1 μg/ml를 사용하였다.

[0214] 도 8은 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 젤라틴 자이모그래피를 수행하여 MMP-9의 상대적인 활성을 측정한 결과이다.

[0215] 그 결과 도 8에 나타낸 바와 같이, 동백나무 뿌리 추출물은 LPS에 의해 유도된 MMP-9의 활성을 농도의존적으로 감소시킴을 확인하였다. 이는 동백나무 뿌리 추출물이 암세포 전이 억제 효과가 있어 암 관련 질환의 치료제로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0217] **실험예 6: 동백나무 뿌리 추출물의 항산화 효과 확인**

[0218] 실시예 12에서 제조한 동백나무 뿌리 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여, 라디칼 소거 검사법을 수행하였다. 상기 동백나무 뿌리 추출물(CJT)은 80% 메탄올로 추출한 후 동결 건조한 시료를 DMSO에 녹인 것을 사용하였다.

[0219] 도 9는 라디칼 소거 검사법을 수행하여 동백나무 뿌리 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과이다.

[0220] 그 결과 도 9에 나타낸 바와 같이, 동백나무 뿌리 추출물은 자유 라디칼 소거 활성이 농도의존적으로 증가됨을 확인하였다. 이는 동백나무 뿌리 추출물이 항산화 효과가 있어 노화를 비롯한 산화적 스트레스에 의해 유발될 수 있는 각종 질병의 치료제로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0221]

[0222] **실험예 7: 동백나무 뿌리 추출물의 분화 억제 효과 확인**

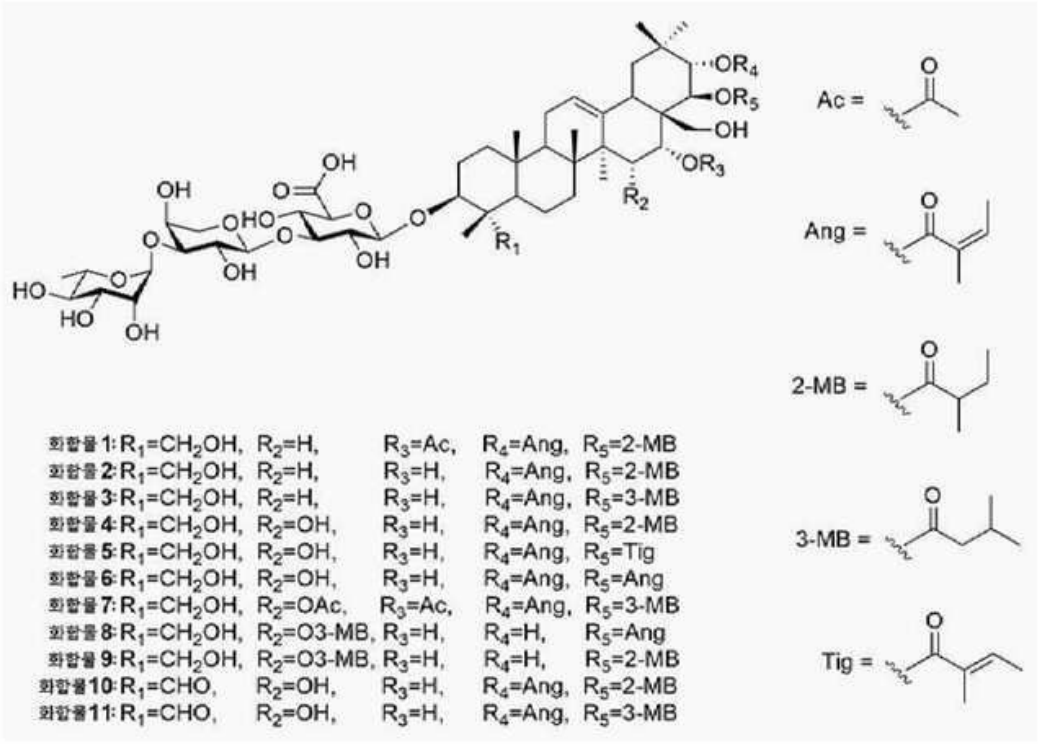
[0223] 실시예 12에서 제조한 동백나무 뿌리 추출물의 분화 억제 효과를 확인하기 위하여, 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 세포 이미징을 수행하여 세포 분화 정도를 관찰하였다. 구체적으로, RAW 264.7 세포는 LPS에 의해 분화가 유도된 후 서서히 죽어가는데, 동백나무 뿌리 추출물이 LPS로 유도된 분화를 저해하는지를 현미경으로 관찰하였다. 상기 동백나무 뿌리 추출물(CJT)은 80% 메탄올로 추출한 후 동결 건조한 시료를 DMSO에 녹인 것을 사용하였고, LPS는 1 μg/ml를 사용하였다.

[0224] 도 10은 마우스 대식세포(RAW 264.7)를 LPS (lipopolysaccharide; LPS)로 전처리한 다음 동백나무 뿌리 추출물을 농도별로 처리한 후, 세포 이미징을 수행하여 세포의 분화 정도를 관찰한 결과이다.

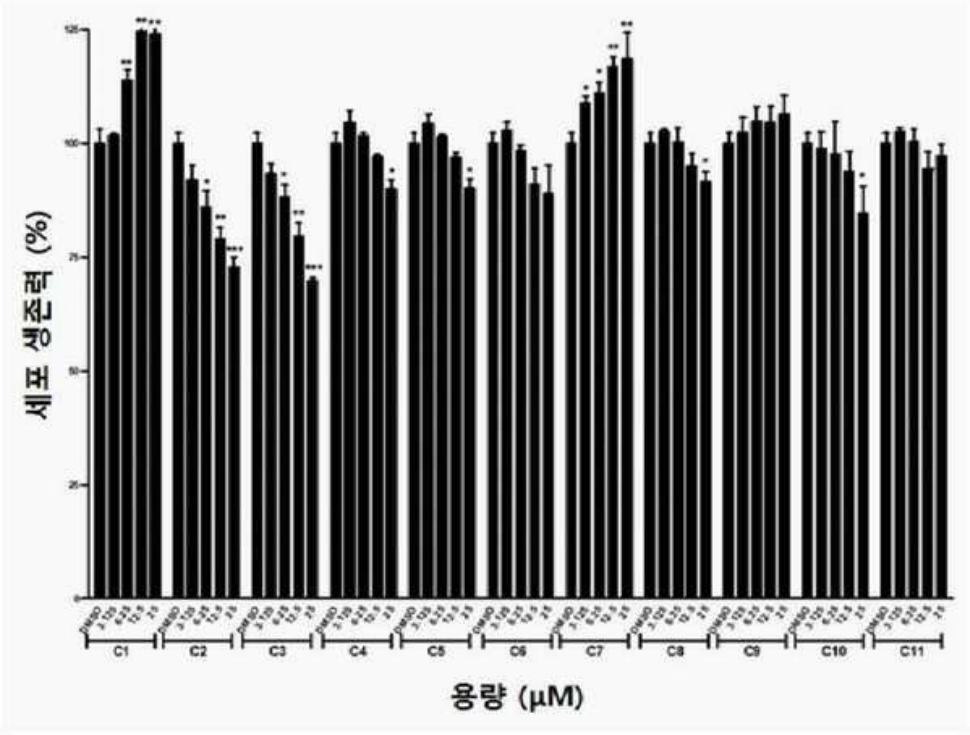
[0225] 그 결과 도 10에 나타낸 바와 같이, 동백나무 뿌리 추출물은 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포의 돌기로의 분화를 농도의존적으로 감소시킴을 확인하였다. 이는 동백나무 뿌리 추출물이 분화 억제 효과가 있어 항노화 관련 소재로 개발될 수 있음을 의미한다.

도면

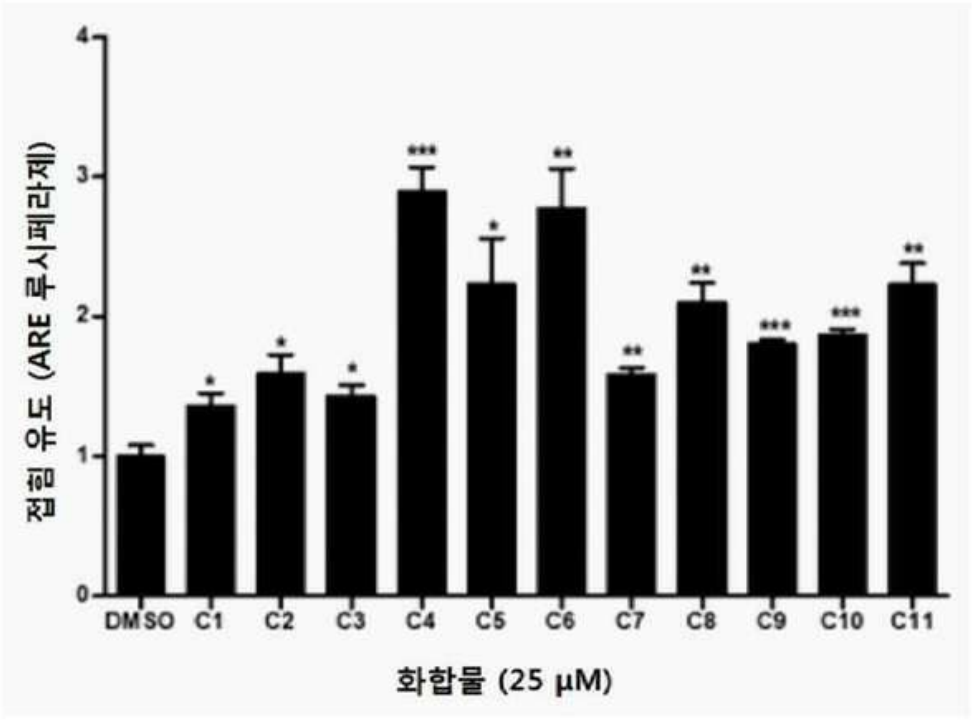
도면1


Ac =
Ang =
2-MB =
3-MB =
Tig =
화합물1: R1=CH2OH, R2=H, R3=Ac, R4=Ang, R5=2-MB
화합물2: R1=CH2OH, R2=H, R3=H, R4=Ang, R5=2-MB
화합물3: R1=CH2OH, R2=H, R3=H, R4=Ang, R5=3-MB
화합물4: R1=CH2OH, R2=OH, R3=H, R4=Ang, R5=2-MB
화합물5: R1=CH2OH, R2=OH, R3=H, R4=Ang, R5=Tig
화합물6: R1=CH2OH, R2=OH, R3=H, R4=Ang, R5=Ang
화합물7: R1=CH2OH, R2=OAc, R3=Ac, R4=Ang, R5=3-MB
화합물8: R1=CH2OH, R2=O3-MB, R3=H, R4=H, R5=Ang
화합물9: R1=CH2OH, R2=O3-MB, R3=H, R4=H, R5=2-MB
화합물10: R1=CHO, R2=OH, R3=H, R4=Ang, R5=2-MB
화합물11: R1=CHO, R2=OH, R3=H, R4=Ang, R5=3-MB

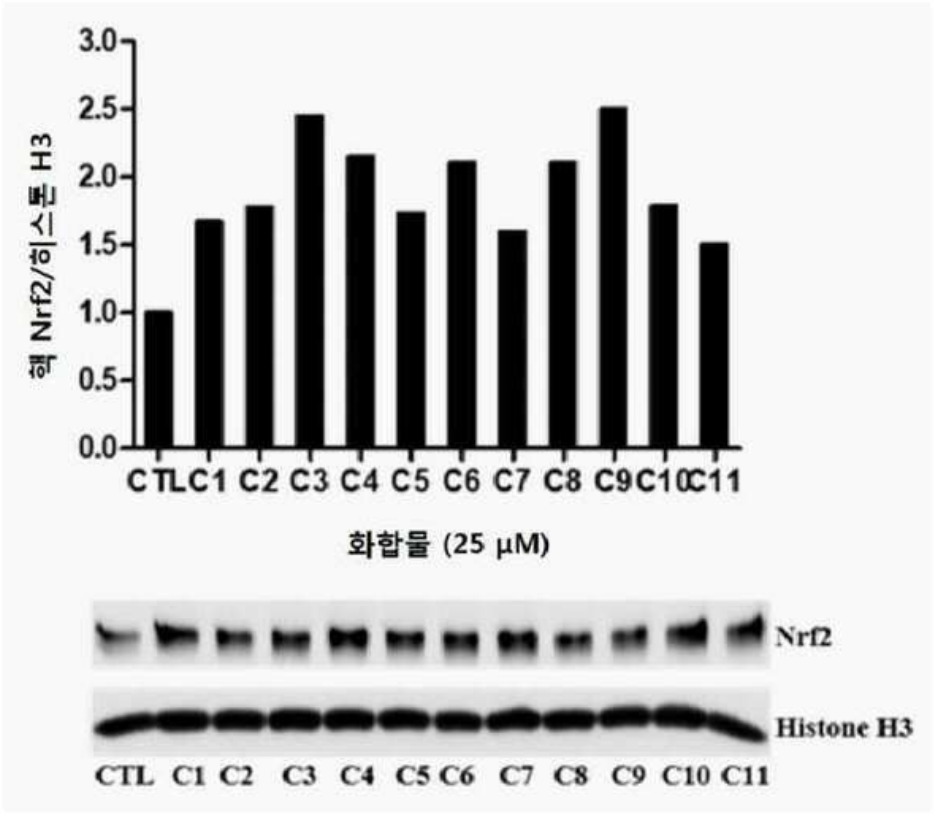
도면2


세포 생존력 (%)
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
C10
C11
용량 (μM)

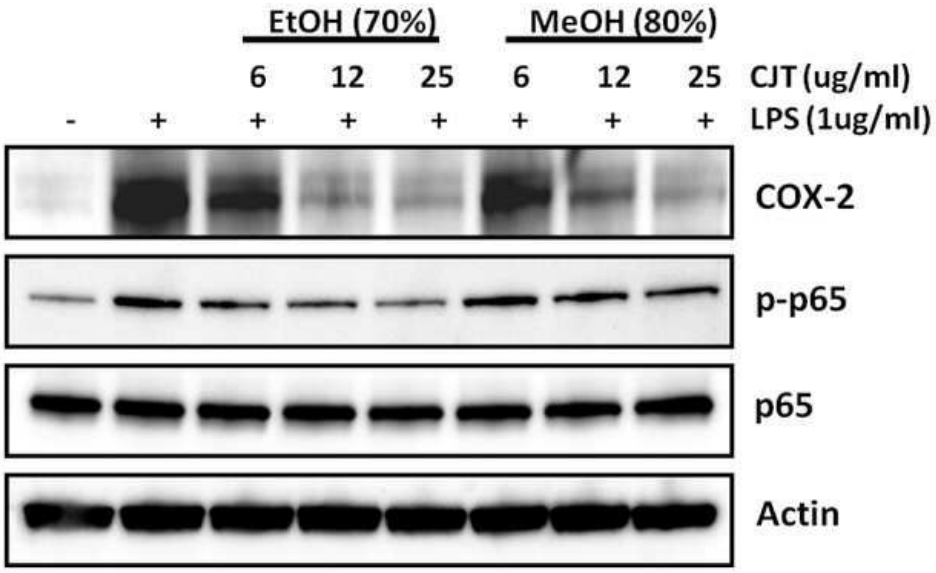
도면3


접힘 유도 (ARE 루시페라제)
0
1
2
3
4
DMSO C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11
화합물 (25 μM)

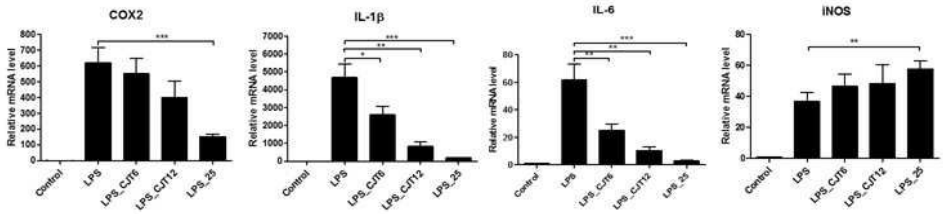
도면4


핵 Nrf2/히스톤 H3
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
CTLC1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9C10C11
화합물 (25 μM)
Nrf2
Histone H3
CTL C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11

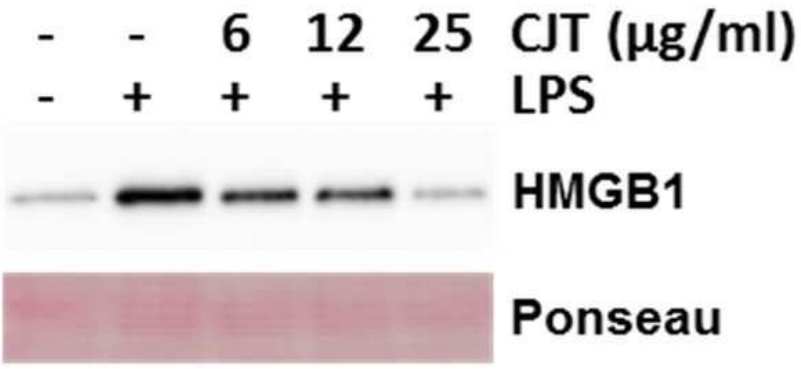
도면5


EtOH (70%)
MeOH (80%)
6 12 25 6 12 25 CJT (ug/ml)
- + + + + + + + LPS (1ug/ml)
COX-2
p-p65
p65
Actin

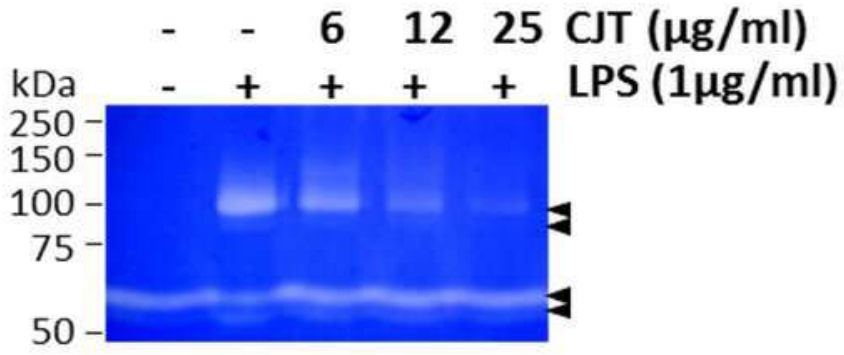
도면6


COX2
IL-1β
IL-6
iNOS
Relative mRNA level
Control
LPS
LPS_CJT6
LPS_CJT12
LPS_25

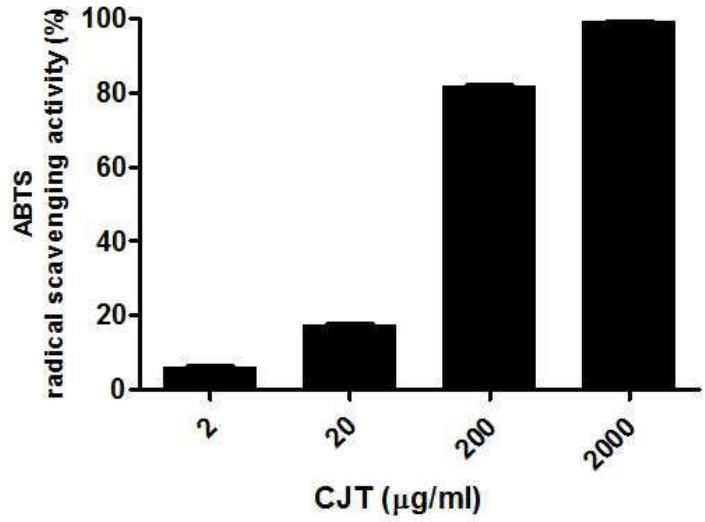
도면7


- - 6 12 25 CJT (μg/ml)
- + + + + LPS
HMGB1
Ponseau

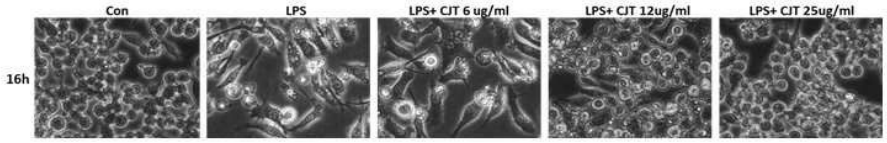
도면8


- - 6 12 25 CJT (μg/ml)
kDa - + + + + LPS (1μg/ml)
250
150
100
75
50

도면9


ABTS radical scavenging activity (%)
100
80
60
40
20
0
2
20
200
2000
CJT (μg/ml)

도면10


Con
LPS
LPS+ CJT 6 ug/ml
LPS+ CJT 12ug/ml
LPS+ CJT 25ug/ml
16h