



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0128781
(43) 공개일자 2014년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/05 (2006.01) A61K 36/575 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0047677

(22) 출원일자 2013년04월29일

심사청구일자 2013년04월29일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

백남인

경기도 화성시 동탄중앙로 51, 629동 901호 (반송동, 동탄나루마을한화꿈에그린아파트)

서경화

경남 통영시 산양읍 이운길 48-13, 이운

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 대아

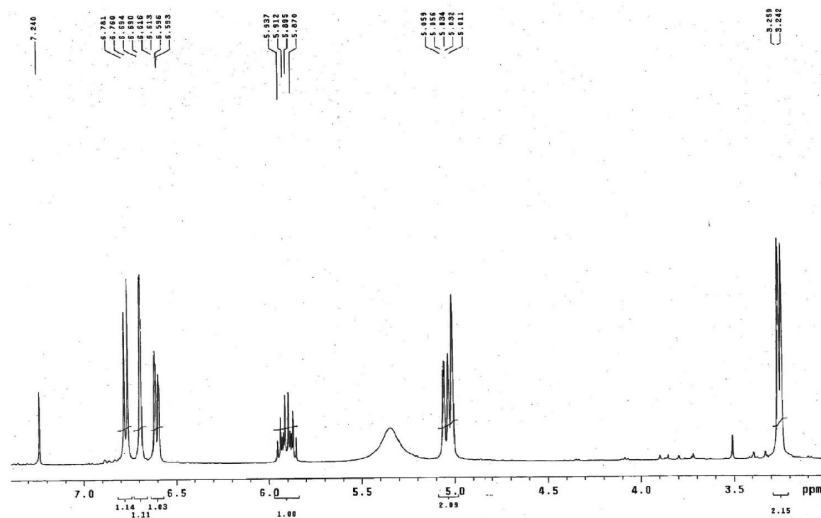
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 황목련 유래 신규 네오리그난 및 이를 포함하는 뇌세포 보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 뇌세포 보호용 조성물에 대한 것이다. 또한 본 발명은 황목련으로부터 분리한 신규 화합물들 및 이들을 포함하는 뇌세포 보호용 조성물에 대한 것이다.

대표도



(72) 발명자

이대영

경기 수원시 영통구 봉영로 1620, 102동 705호 (영
통동, 대우월드마크)

김윤철

대전 서구 둔산로 155, 118동 402호 (둔산동, 크로
바아파트)

이동성

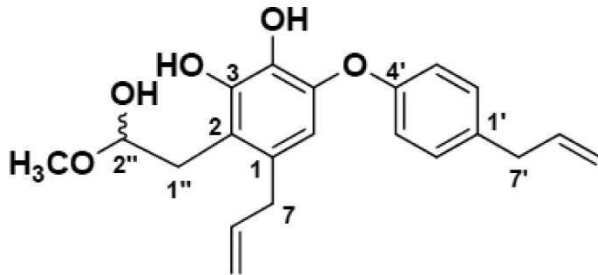
전북 전주시 완산구 강변로 306, 102동 702호 (중
화산동2가, 광진햇빛찬아파트)

특허청구의 범위

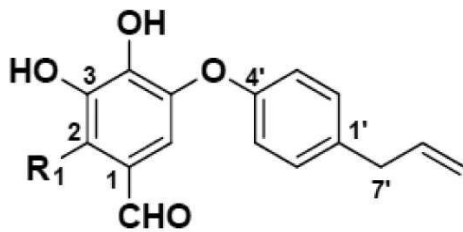
청구항 1

하기 화학식 (I) 내지 (VI) 중 어느 하나의 화학식에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 너세포 보호용 조성물:

<화학식 (I)>

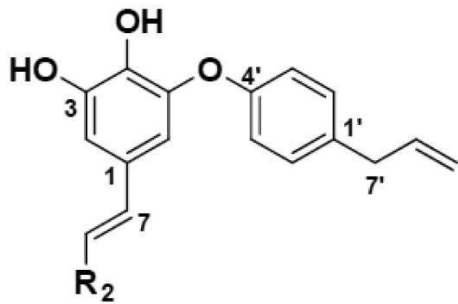


<화학식 (II)>



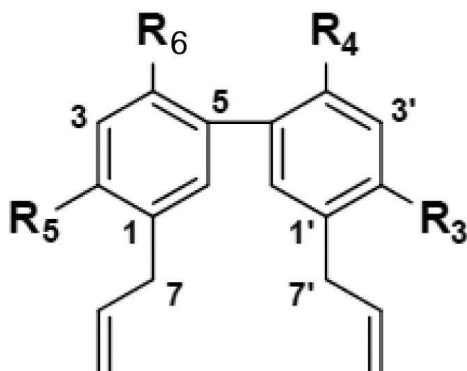
(이 때, R1은 H 또는 OH이다)

<화학식 (III)>



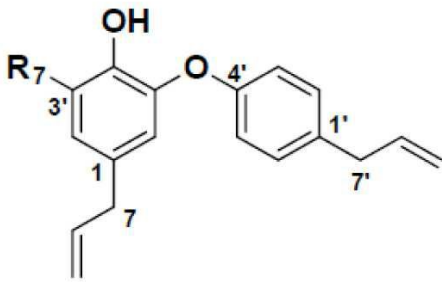
(이 때, R2는 H, OH, COH, COOH, OCH3 및 CH2OCH3로 구성되는 군으로부터 선택된다)

<화학식 (IV)>



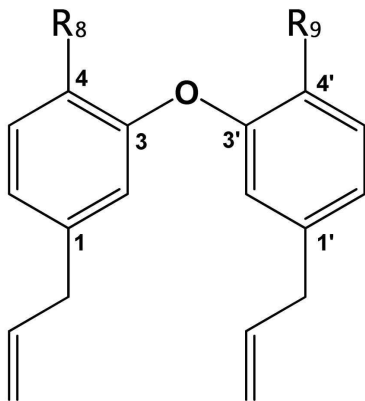
(이 때, R3, R4, R5 및 R6는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

<화학식 (V)>



(이 때, R7은 H 또는 OH이다).

<화학식 (VI)>



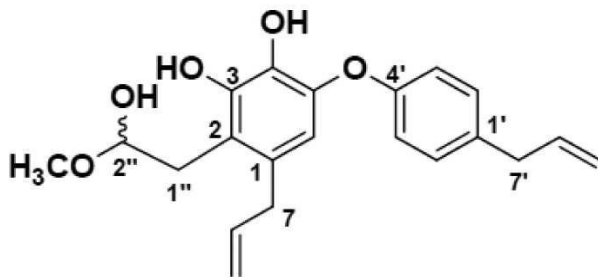
(이 때, R8 및 R9는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

청구항 2

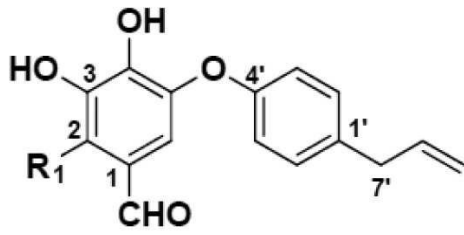
제 1항에 있어서,

하기 화학식 (I) 내지 (III) 및 (VI) 중 어느 하나의 화학식에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 뇌세포 보호용 조성물:

<화학식 (I)>

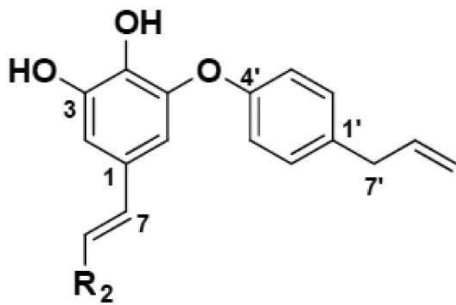


<화학식 (II)>



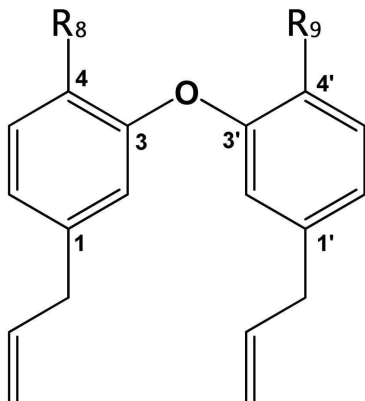
(이 때, R1은 OH이다)

<화학식 (III)>



(이 때, R2는 CH2OCH3이다)

< 화학식 (VI)>



(이 때, R8 및 R9는 모두 OH이다)

청구항 3

제 1항에 있어서,

뇌세포의 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌세포 보호용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

뇌세포 손상과 관련된 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물인 것을 특징으로 하는 뇌세포 보호용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 뇌질환은 독성 물질에 의하여 야기되는 뇌세포 손상을 수반하는 것을 특징으로 하는 뇌세포 보호용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

뇌세포 손상과 관련된 뇌질환의 예방 및 개선용 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 뇌세포 보호용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 뇌질환은 독성 물질에 의하여 야기되는 뇌세포 손상을 수반하는 것을 특징으로 하는 뇌세포 보호용 조성물.

청구항 8

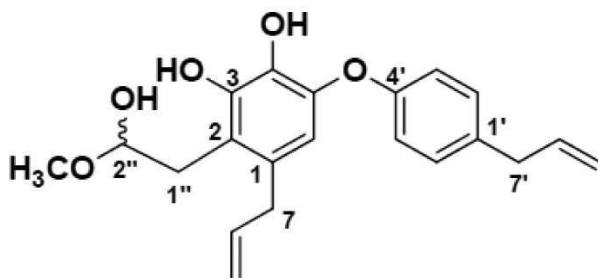
제 1항에 있어서,

상기 화합물은 황목련으로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 뇌세포 보호용 조성물.

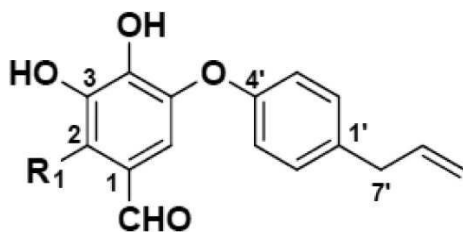
청구항 9

하기 화학식 (I) 내지 (VI) 중 어느 하나의 화학식에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 분리 또는 합성하는 단계를 포함하는 뇌세포 보호용 조성물의 제조 방법:

<화학식 (I)>

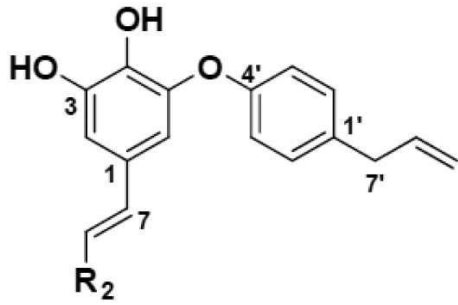


<화학식 (II)>



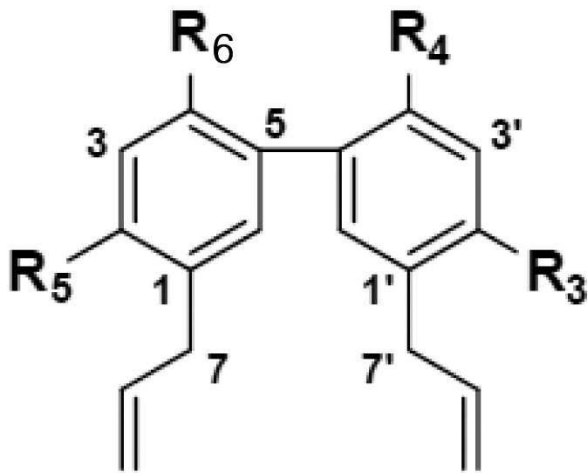
(이 때, R1은 H 또는 OH이다)

<화학식 (Ⅲ)>



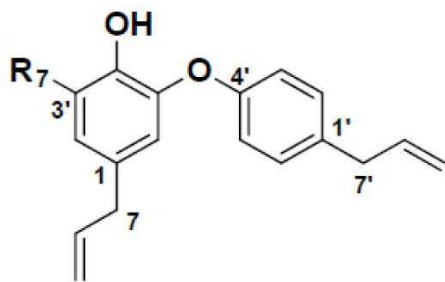
(이 때, R₂는 H, OH, COH, COOH, OCH₃ 및 CH₂OCH₃로 구성되는 군으로부터 선택된다)

<화학식 (Ⅳ)>



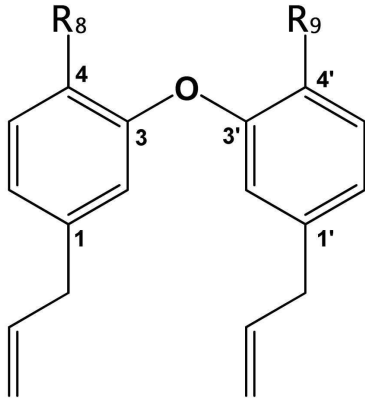
(이 때, R₃, R₄, R₅ 및 R₆는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

<화학식 (Ⅴ)>



(이 때, R₇은 H 또는 OH이다).

<화학식 (VI)>



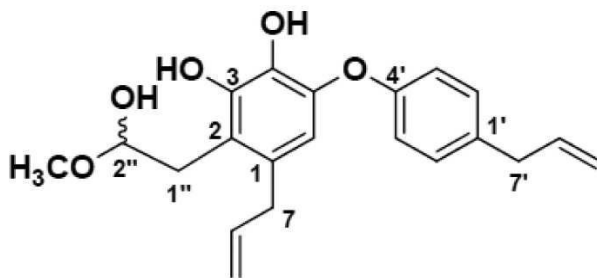
(이 때, R8 및 R9는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다).

청구항 10

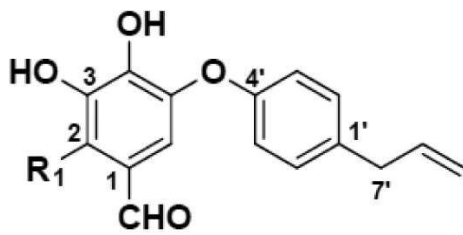
제 9항에 있어서,

상기 뇌세포 보호용 조성물은 하기 화학식 (I) 내지 (III) 및 (VI) 중 어느 하나의 화학식에 따른 화합물, 또는
이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 제조 방법:

<화학식 (I)>

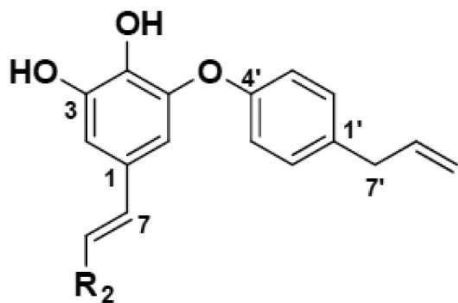


<화학식 (II)>



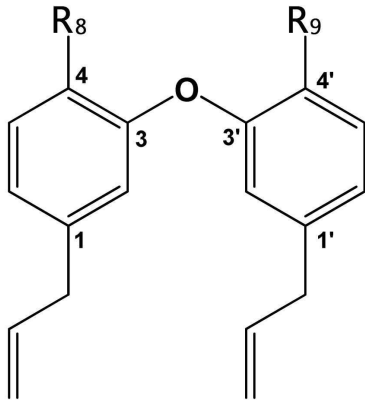
(이 때, R1은 OH이다)

<화학식 (III)>



(이 때, R₂는 CH₂OCH₃이다)

< 화학식 (VI)>



(이 때, R₈ 및 R₉는 모두 OH이다)

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 뇌세포 보호용 조성물은 뇌세포의 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 12

제 9항에 있어서,

상기 뇌세포 보호용 조성물은 뇌세포 손상과 관련된 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 뇌질환은 독성 물질에 의하여 야기되는 뇌세포 손상을 수반하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 14

제 9항에 있어서,

상기 뇌세포 보호용 조성물은 뇌세포 손상과 관련된 뇌질환의 예방 및 개선용 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 뇌질환은 독성 물질에 의하여 야기되는 뇌세포 손상을 수반하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 16

제 9항에 있어서,

상기 화합물은 황목련으로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 황목련 유래의 신규 네오리그난 및 이를 포함하는 뇌세포 보호용 조성물에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 황목련은 한국, 중국 및 일본에 걸쳐 발견되는 낙엽수로, 15 m까지 자라며, 길고 폭이 좁으며 계란형 잎을 갖고 있다. 황목련(*Magnolia obovata* Thunb)은 미국에서는 “일본 오이나무(Japanese cucumber tree)” 또는 “일본 큰 잎 목련(Japanese big leaved magnolia)”로 알려져 있고, 일본에서는 “호노키(Honoki)”라 불린다. 황목련의 꽃은 흰색 또는 주황색으로, 길이는 14-20 cm에 달한다. 또한 황목련의 열매는 밝은 주홍색(pinkish red)으로 12-20 cm 길이 및 6 cm 너비의 사각기둥형상(oblong-cylinder)의 골돌(follicle)로, 각각의 골돌은 다홍색 코팅이 된 하나 또는 두 개의 검은 씨앗들을 갖는다. 이 씨앗들은 9월 내지 10월에 익는다(Kim TW. The woody plants of Korea in color. Korea: Kyo-Hak Publishing Co., Ltd; 1996: 107).

[0003] 황목련(*Magnolia obovata* Thunb)의 줄기는 인기가 많은 한약재이며 소화불량의 치료 및 가래를 억제하는데 널리 사용된다(Shin MK, Chung BS. In ‘Hyang Yak Dae Sa Jun’, 3rd edition. Korea: Young Lim Sa; 1990: 458, 469-471). 한약재인 후박은 3가지 서로 다른 식물 종으로부터 제조되는데, 그것은 한후박으로 알려진 *Machilus thunbergii*, 당후박으로 알려진 *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae), 및 한국에서 황목련, 화후박 또는 일본 목련으로 알려진 *Magnolia obovata* Thunb. (Magnoliaceae)이다.

[0004] 황목련은 열, 두통, 설사, 불안의 치료 및 천식 완화를 위하여 한국에서 널리 사용되고 있다. 그러나 황목련 열매의 피토케미컬 및 약리학적 연구는 아직 수행된 바 없다.

[0005] 한편, 체내 활성산소종(ROS)이 많이 생성되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되어 활성 산소종의 생성과 제거 사이의 균형이 파괴되면 생체는 활성산소종에 의해 산화적 스트레스(oxidative stress)를 받게 된다. 식생활 수준의 향상과 의학의 발달과 더불어 개인의 평균 수명이 증가 되었으나 급격한 노령화로 인해 노화에 따른 각종 퇴행성 질환 발생이 증가하고 있다. 최근 연구에 따르면, 체내의 산화와 항산화의 부조화로 인하여 생기는 산화적 스트레스가 Alzheimer’s, Huntington’s, Parkinson’s 와 같은 중추신경계의 퇴행성 뇌질환의 중요한 요인으로 밝혀졌다.

[0006] 예컨대, 글루타메이트는 체내에서 시스테인/글루타메이트 운반체 시스템 Xc-을 통하여 시스테인 섭취를 억제함으로써 글루타티온 수준(glutathione level)을 저하시키고 최종적으로 세포는 산화적 스트레스로 인한 손상을 받게 된다.

[0007] 본 발명자들은 황목련의 열매로부터 유용한 화합물들을 분리, 확인하던 중 황목련으로부터 신규 네오리그난들을 분리하고, 이들이 뇌세포를 보호하는 활성을 갖는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 뇌세포 보호용 조성물 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.

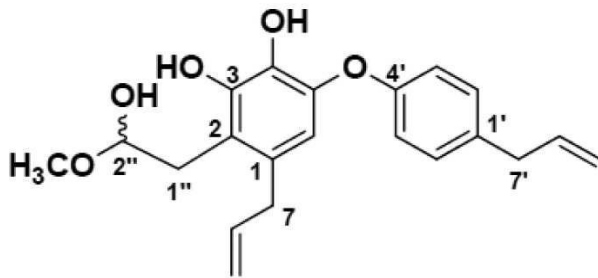
[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 신규 화합물 및 그 염을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 목적은 상기 신규 화합물 또는 그 염을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

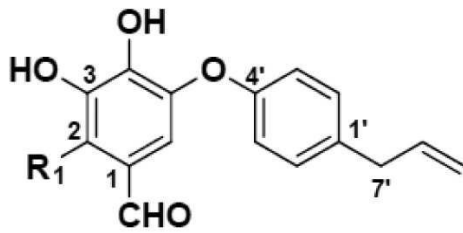
[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 (I) 내지 (VI) 중 어느 하나의 화학식에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 뇌세포 보호용 조성물을 제공한다:

[0012] <화학식 (I)>



[0013]

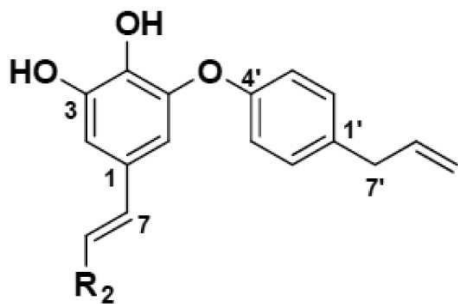
[0014] <화학식 (II)>



[0015]

[0016] (이 때, R1은 H 또는 OH이다)

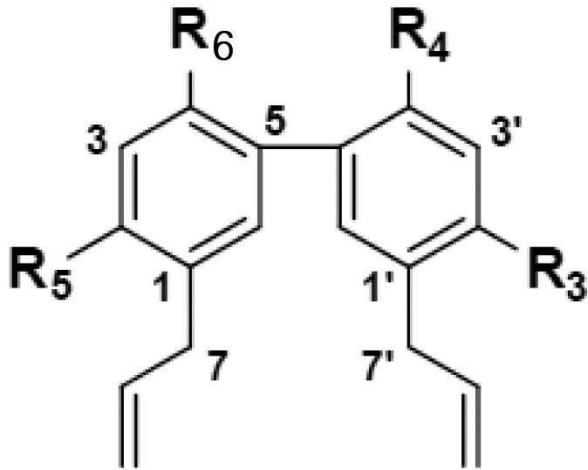
[0017] <화학식 (III)>



[0018]

[0019] (이 때, R2는 H, OH, COH, COOH, OCH3 및 CH2OCH3로 구성되는 군으로부터 선택된다)

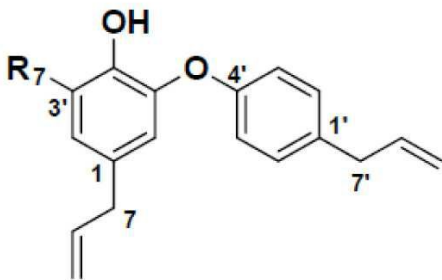
[0020] <화학식 (IV)>



[0021]

[0022] (이 때, R3, R4, R5 및 R6는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

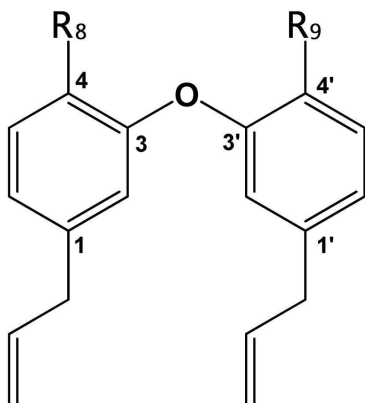
[0023] <화학식 (V)>



[0024]

[0025] (이 때, R7은 H 또는 OH이다).

[0026] <화학식 (VI)>

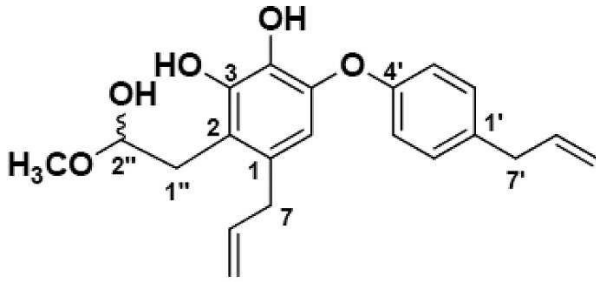


[0027]

[0028] (이 때, R8 및 R9는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

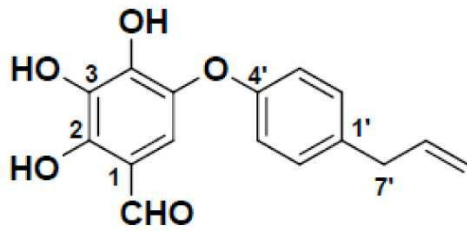
[0029] 또한 본 발명은 하기 화학식 (1), (3), (5) 및 (8)로 구성되는 군으로부터 선택되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 화합물 또는 상기 염을 포함하는 식품 조성물을 제공한다:

[0030] <화학식 (1)>



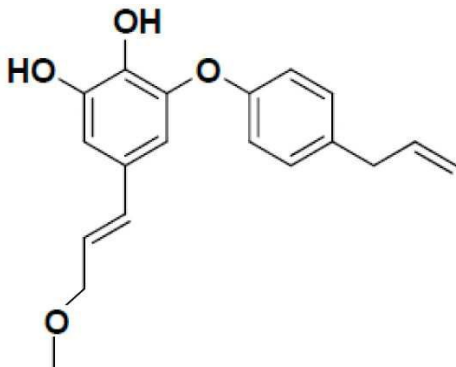
[0031]

[0032] <화학식 (3)>



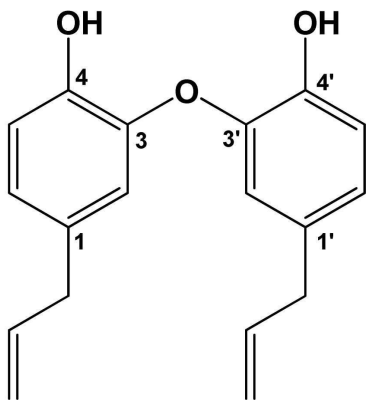
[0033]

[0034] <화학식 (5)>



[0035]

[0036] <화학식 (8)>

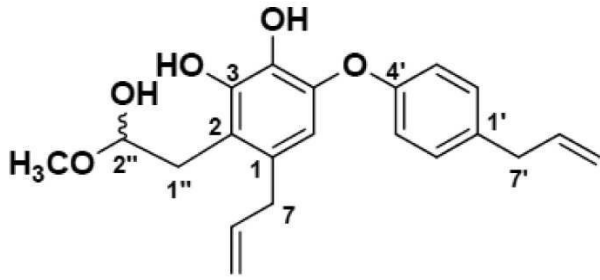


[0037]

[0038] 또한 본 발명은,

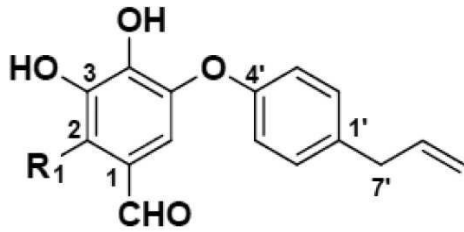
[0039] 하기 화학식 (I) 내지 (VI) 중 어느 하나의 화학식에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 분리 또는 합성하는 단계를 포함하는 뇌세포 보호용 조성물의 제조 방법을 제공한다:

[0040] <화학식 (I)>



[0041]

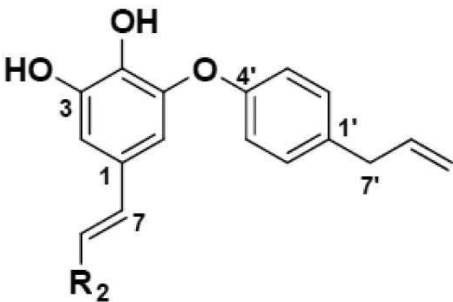
[0042] <화학식 (II)>



[0043]

[0044] (이 때, R1은 H 또는 OH이다)

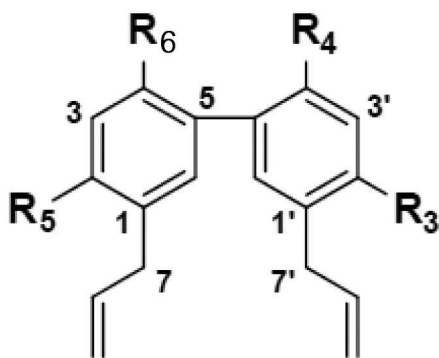
[0045] <화학식 (III)>



[0046]

[0047] (이 때, R2는 H, OH, COH, COOH, OCH3 및 CH2OCH3로 구성되는 군으로부터 선택된다)

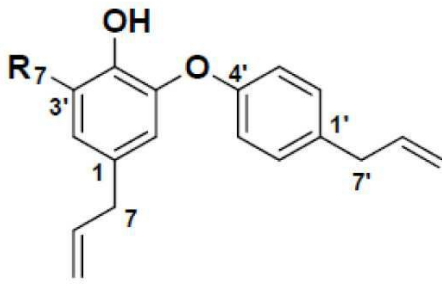
[0048] <화학식 (IV)>



[0049]

[0050] (이 때, R3, R4, R5 및 R6는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

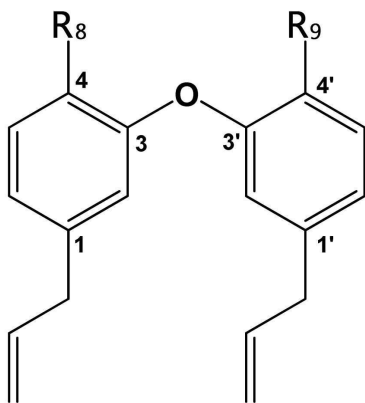
[0051] <화학식 (V)>



[0052]

[0053] (이 때, R7은 H 또는 OH이다).

[0054] <화학식 (VI)>



[0055]

[0056] (이 때, R8 및 R9는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다).

발명의 효과

[0057] 본 발명의 화합물들 및 뇌세포 보호용 조성물은 글루타메이트에 의한 뇌 세포 손상을 예방 및 억제한다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 화학식 8의 화합물의 ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 2는 화학식 8의 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 3은 화학식 8의 화합물의 HREIMS 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 4는 화학식 5의 화합물의 ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 5는 화학식 5의 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 6은 화학식 5의 화합물의 gHMBC 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 7은 화학식 5의 화합물의 HREIMS 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 8은 화학식 1의 화합물의 ^1H - ^1H COSY 및 gHMBC 간의 관련성을 나타낸다.
- 도 9는 화학식 1의 화합물의 ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 10은 화학식 1의 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸다.

도 11은 화학식 1의 화합물의 gHMBC 스펙트럼을 나타낸다.

도 12은 화학식 1의 화합물의 HREIMS 스펙트럼을 나타낸다.

도 13은 화학식 3의 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 나타낸다.

도 14은 화학식 3의 화합물의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 나타낸다.

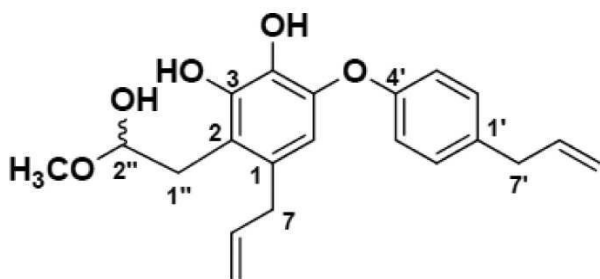
도 15은 화학식 3의 화합물의 gHMBC 스펙트럼을 나타낸다.

도 16은 화학식 3의 화합물의 HREIMS 스펙트럼을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

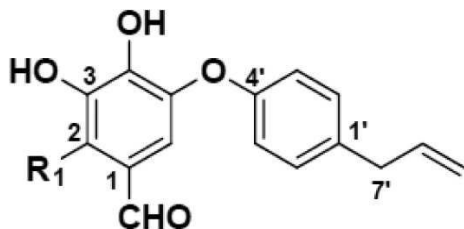
[0059] 본 발명은 하기 화학식 (I) 내지 (VI) 중 어느 하나의 화학식에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 뇌세포 보호용 조성물에 대한 것이다:

[0060] <화학식 (I)>



[0061]

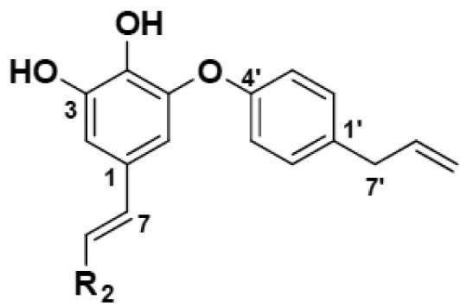
[0062] <화학식 (II)>



[0063]

[0064] (이 때, R1은 H 또는 OH이다)

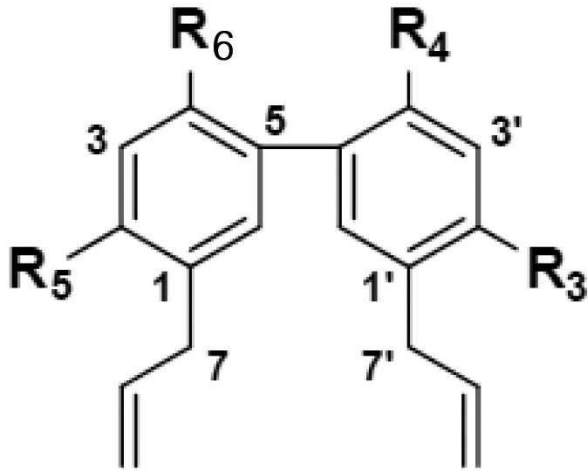
[0065] <화학식 (III)>



[0066]

[0067] (이 때, R2는 H, OH, COH, COOH, OCH3 및 CH2OCH3로 구성되는 군으로부터 선택된다)

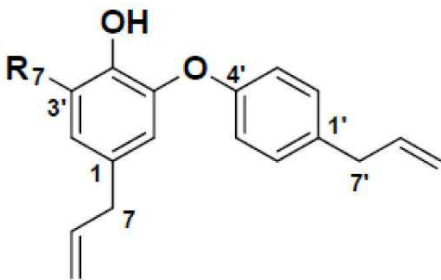
[0068] <화학식 (IV)>



[0069]

[0070] (이 때, R3, R4, R5 및 R6는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

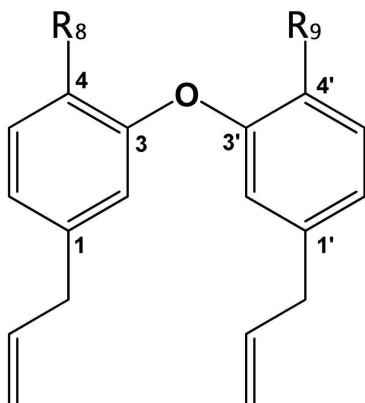
[0071] <화학식 (V)>



[0072]

[0073] (이 때, R7은 H 또는 OH이다).

[0074] <화학식 (VI)>

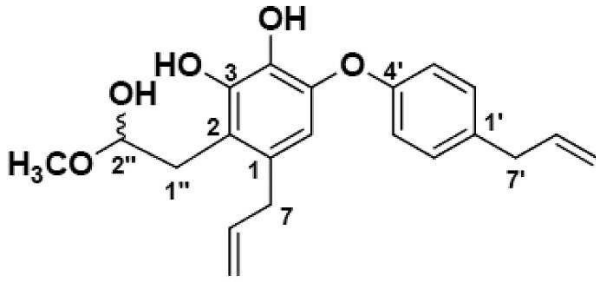


[0075]

[0076] (이 때, R8 및 R9는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

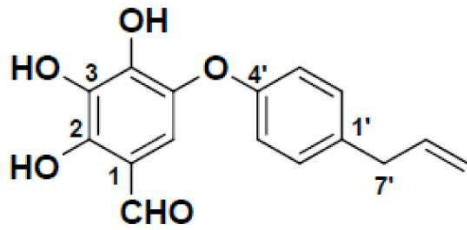
[0077] 또한 본 발명은 하기 화학식 (1), (3), (5) 및 (8)로 구성되는 군으로부터 선택되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 대한 것이다:

[0078] <화학식 (1)>



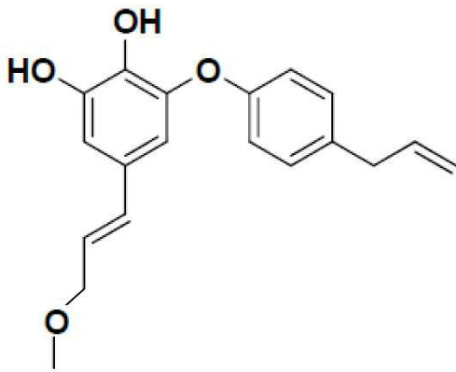
[0079]

[0080] <화학식 (3)>



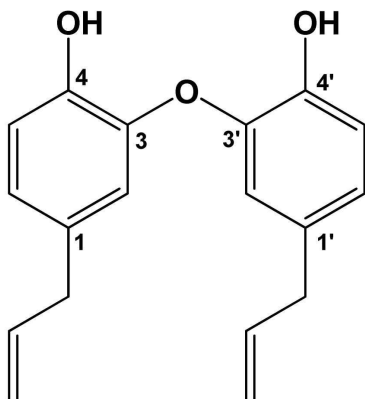
[0081]

[0082] <화학식 (5)>



[0083]

[0084] <화학식 (8)>



[0085]

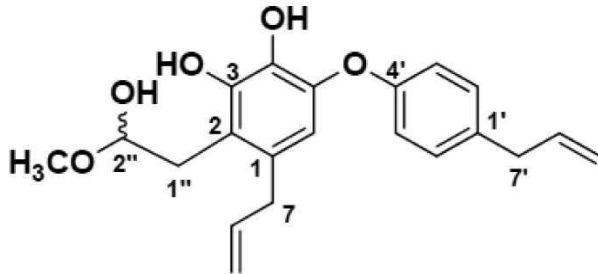
[0086] 또한 본 발명은 상기 화합물 또는 그 염을 포함하는 식품 조성물에 대한 것이다.

[0087] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0088] 뇌세포 보호용 조성물

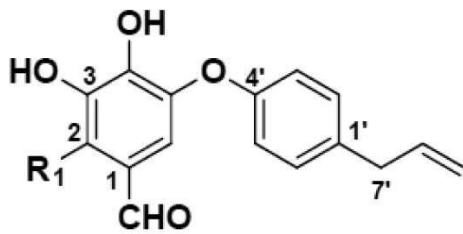
[0089] 본 발명의 뇌세포 보호용 조성물은 화학식 (I) 내지 (VI) 중 어느 하나의 화학식에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다:

[0090] <화학식 (I)>



[0091]

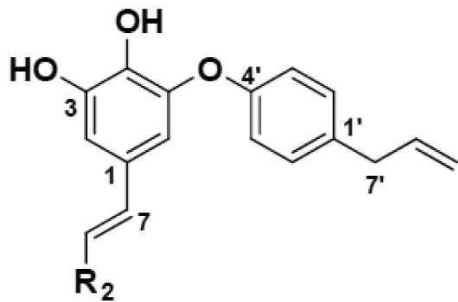
[0092] <화학식 (II)>



[0093]

[0094] (이 때, R1은 H 또는 OH이다)

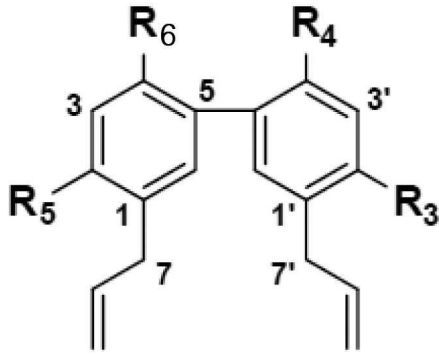
[0095] <화학식 (III)>



[0096]

[0097] (이 때, R2는 H, OH, COH, COOH, OCH3 및 CH2OCH3로 구성되는 군으로부터 선택된다)

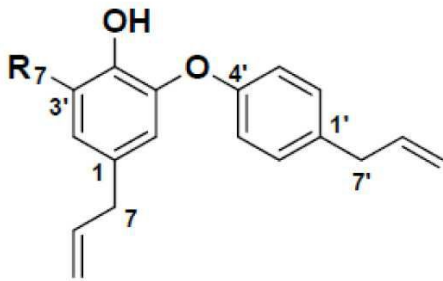
[0098] <화학식 (IV)>



[0099]

[0100] (이 때, R3, R4, R5 및 R6는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

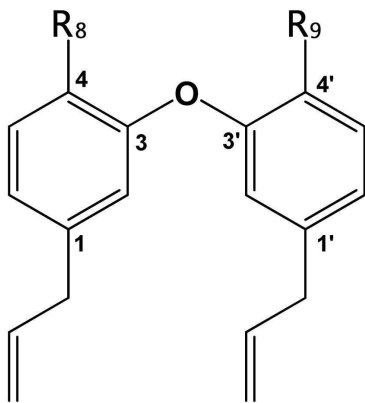
[0101] <화학식 (V)>



[0102]

[0103] (이 때, R7은 H 또는 OH이다).

[0104] <화학식 (VI)>



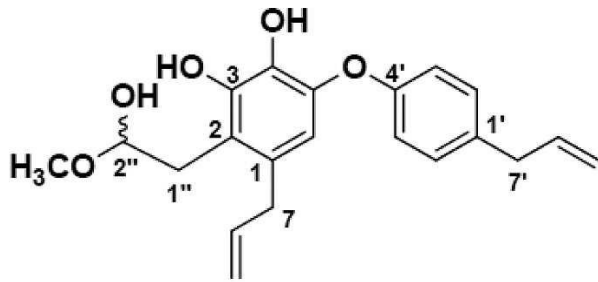
[0105]

[0106] (이 때, R8 및 R9는 각각 독립적으로 H 또는 OH이다)

[0107] 더욱 바람직하게는, 본 발명의 뇌세포 보호용 조성물은 화학식 (1) 내지 (10)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 뇌세포 보호용 조성물은 화학식 (1), (3), (5) 및 (8)로 구성되는 군으로부터 선택되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

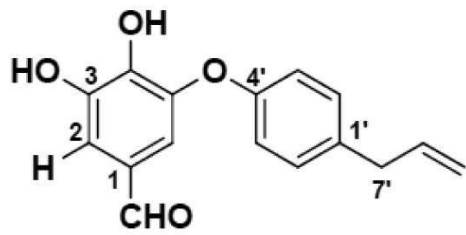
[0108] 상기 화합물들은 황목련을 포함하는 천연물로부터 분리한 것일 수도 있고, 합성한 것일 수도 있다. 바람직하게는 상기 화합물들은 천연물로부터 분리한 것이며, 더욱 바람직하게는 황목련으로부터 분리한 것이다.

[0109] <화학식 (1)>



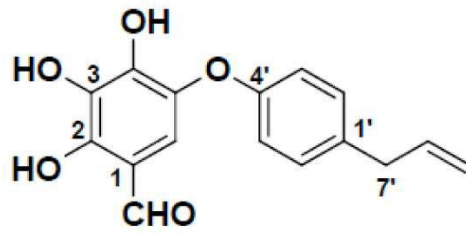
[0110]

[0111] <화학식 (2)>



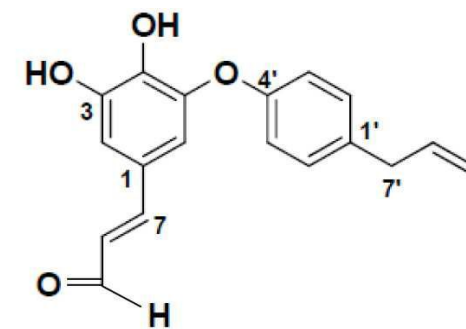
[0112]

[0113] <화학식 (3)>



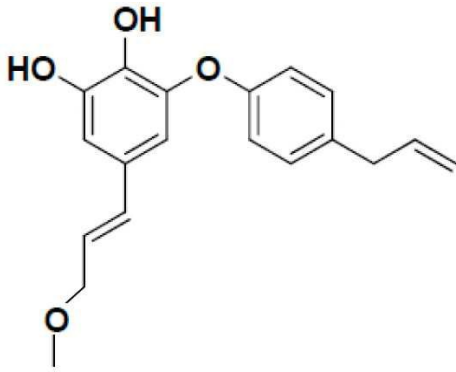
[0114]

[0115] <화학식 (4)>



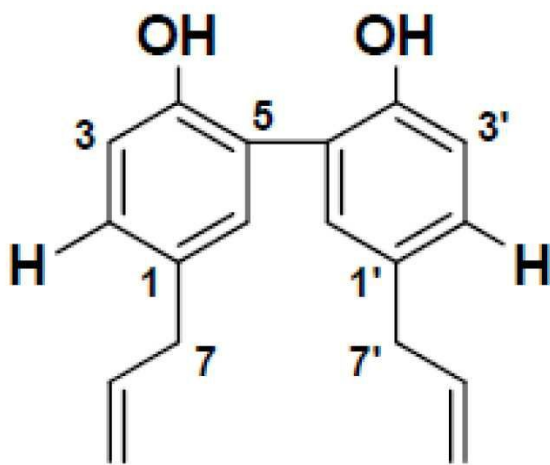
[0116]

[0117] <화학식 (5)>



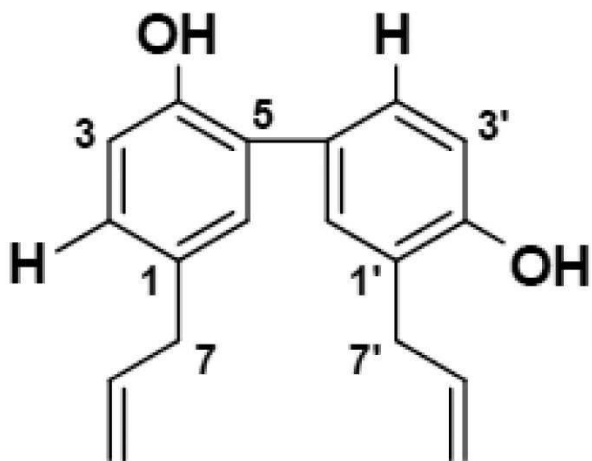
[0118]

[0119] <화학식 (6)>



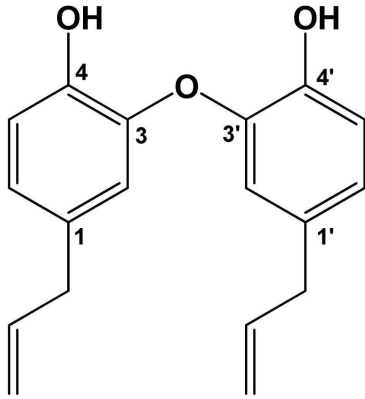
[0120]

[0121] <화학식 (7)>



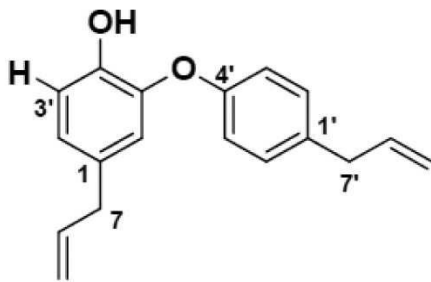
[0122]

[0123] <화학식 (8)>



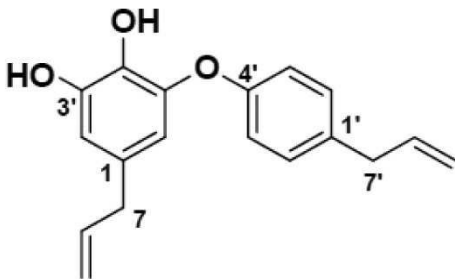
[0124]

[0125] <화학식 (9)>



[0126]

[0127] <화학식 (10)>



[0128]

[0129] 본 발명의 뇌세포 보호용 조성물은 글루타메이트에 의한 뇌세포의 손상을 억제한다. 이로써 본 발명의 뇌세포 보호용 조성물은 뇌질환을 예방 및 치료, 개선하게 된다.

[0130] 본 발명의 뇌세포 보호용 조성물은 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물, 뇌 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물일 수 있다.

[0131] 약학적 조성물

[0132] 본 발명의 뇌세포 보호용 조성물은 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물일 수 있다. 상기 뇌질환은 내인성 또는 외인성 독성물질에 의하여 야기되는 뇌세포 손상과 관련된 질환일 수 있으며, 상기 뇌세포 손상이 수반된 질환일 수 있고, 퇴행성 뇌질환일 수 있다. 상기 독성물질은 베타 아밀로이드 플라크, 글루타메이트 등이 될 수 있다. 상기 뇌질환은 뇌졸중, 알츠하이머, 헌팅턴병, 파킨슨병, 치매, 중풍, 근위축성측색경화증, 치매(루이소 체 치매, 전두측두엽성 치매, 진행성핵상마비), 크로이츠펬트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 길랑-바레 증후군 (Guillain-Barre syndrome) 등일 수 있다.

- [0133] 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 100 중량부에 대하여 본 발명의 상기 화합물 또는 이를 포함하는 뇌세포 보호용 조성물을 0.01 내지 99.99 중량부 포함할 수 있으며, 바람직하게는 60 내지 98 중량부 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 100 중량부에 대하여 본 발명의 화합물을 90 내지 95 중량부 포함할 수 있다. 그러나 이는 투약자의 필요에 따라 증감할 수 있으며, 식생활, 영양 상태, 병의 진행 정도, 뇌손상의 정도 등 상황에 따라 적절히 증감할 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 화합물을 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. ‘약학적으로 허용되는’이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.
- [0134] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제는 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제가 있으며 이들 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.
- [0135] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 성별 및 합병증 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있지만 일반적으로는 성인 1kg 당 0.1mg 내지 10g, 바람직하게는 10 mg 내지 5g의 용량으로 투여될 수 있다. 또, 단위 제형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0136] 식품 조성물
- [0137] 본 발명의 식품은 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 환자식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 화합물을 첨가하는 것도 포함된다.
- [0138] 본 발명의 식품 조성물은, 상기 본 발명의 화합물 또는 이를 포함하는 뇌세포 보호용 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 뇌세포 보호용 조성물 또는 화합물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량부에 대하여 0.1 내지 70 중량부, 바람직하게는 2 내지 50 중량부 첨가될 수 있다. 상기 화합물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0139] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.
- [0140] 상기 화합물 또는 본 발명의 뇌세포 보호용 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

[0141] 화학식 (1) 내지 (10)의 화합물

[0142] 본 발명은 화학식 (1) 내지 (10)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 대한 것이며, 더욱 바람직하게는 화학식 (1), (3), (5) 및 (8)로 구성되는 군으로부터 선택되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 대한 것이다. 상기 화합물들은 독성물질, 특히 글루타메이트로부터 뇌세포의 손상을 예방, 억제하는 활성을 갖는다. 상기 화합물들은 황목련을 포함하는 천연물로부터 분리한 것일 수도 있고, 합성한 것일 수도 있다. 바람직하게는 상기 화합물들은 천연물로부터 분리한 것이며, 더욱 바람직하게는 황목련으로부터 분리한 것이다.

[0143] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0144] 재료 및 방법

[0145] 시약 및 기기

[0146] 컬럼 크로마토그래피(c.c.)에 사용하는 수지로는 Kiesel gel 60 (63-200 μm , Merck) 및 LiChroprep RP-18 (40-60 μm , Merck)을 사용하였다. 박막 크로마토그래피(Thin layer chromatography (TLC)) 분석은 Kiesel gel 60 F254 및 a RP-18 F254S plates (Merck)를 이용하여 수행하였으며, TLC 상의 스팟은 UV 램프 스펙트로라인 모델 ENF-240 C/F (UV lamp Spectroline Model ENF-240 C/F (Spectronics Corporation))를 이용하여 검출하고, 10% 황산 용액으로 스프레이한 후 가열하여 확인하였다. 핵자기공명(nuclear magnetic resonance (NMR))을 위한 중수소 용제 측정기기들은 Merck Co. Ltd 및 Sigma Aldrich Co. Ltd로부터 구입하였다. RPMI medium 1640, Dulbecco's modified Eagle's medium 및 페니실린 및 스트렙토마이신은 GIBCO로부터 구입하였다. FBS는 Hyclone로부터 수득하고, MTT 및 DMSO는 Sigma Aldrich Co. Ltd.로부터 구입하였다. NMR 스펙트럼은 400 MHz FT-NMR 스펙트로메터(Varian) 상에 기록되었다. IR 스펙트럼은 Perkin Elmer Spectrum One FT-IR 스펙트로메터로부터 수득하였다. EIMS는 JMSAX-700 (JEOL) 상에 기록되었다. 선광(Optical rotations)들은 JASCO P-1010 디지털 편광계(JSACO)를 이용하여 측정하였다.

[0147] DMEM 배지 및 트립신-에틸렌디아민-테트라아세트산(trypsin-ethylenediamine-tetraacetic acid)(EDTA)는 Gibco Laboratories사에서 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone Laboratories사에서 구입하였다. L-글루타메이트(glutamate), Trolox와 3'-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사에서 구입하였다. 96-웰 조직 배양 플레이트(tissue culture plates) 및 기타 조직 배양 디쉬들은 Nunc사 제품을 이용하였다. 흡광도는 BioRad사의 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다.

[0148] 식물

[0149] 마그놀리아 오보바타(Magnolia obovata Thunb)의 열매들을 2010년 9월 대한민국의 경희대학교(용인)에서 세절된 후 수집하였으며, 이는 경희대학교 원예생명공학과 이승우 교수가 확인하였다. 루스 베르니치플루라(Rhus verniciflura)로부터 분리된 설파레틴(sulfuretin) ($\geq 95\%$ pure)을 양성 대조군으로 사용하였다(Lee DS, Jeong GS, Li B, Park H, Kim YC. Anti-inflammatory effects of sulfuretin from Rhus verniciflua Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages. Int Immunopharmacol 2010; 10: 850-8).

[0150] 통계 분석

[0151] 시험 결과들은 3회의 독립적 시험에 따른 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. 각각의 실험군 및 처리 농도를 비교하기 위하여 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하고, Newman-Keuls post hoc test를 하였다. 통계 분석은 GraphPad Prism software version 3.03 (GraphPad Software Inc)을 이용하여 수행하였다.

- [0152] <실험예 1> 황목련으로부터 화합물의 분리
- [0153] 황목련의 열매(건과) 11kg을 절단하고 80% 메탄올 40 L로 실온에서 24시간 4회 반복 추출하여, 여과하고, 진공 농축하였다. 수득한 메탄올 추출물 740 g을 H₂O (3.5 L), 에틸아세테이트(EtOAc) (3.5 L × 4), 및 n-부탄올 (3 L × 3)로 성공적으로 분획하였다. 농축된 에틸아세테이트 분획(MOE, 238 g)을 SiO₂ c.c. (12 cm × 15 cm)에 적용하고, TLC로 모니터링하면서 n-헥산-에틸아세테이트(각각5:1 → 2:1 → 1:2, 2.8 L) → CHCl₃-메탄올(각각 10:1 → 8:1 → 6:1, 2.8 L) → CHCl₃-메탄올-H₂O (6:4:1, 3L)로 용출시켜, 15개 분획(MOE-1 내지 MOE-15)을 공급하였다. 분획 MOE-2 [77 g, 용출 부피/총 부피(elution volume/total volume)(Ve/Vt) 0.023-0.043]을 SiO₂ c.c. (11 cm × 14.5 cm)에 넣고, n-헥산-에틸아세테이트 (각각 6:1 → 4:1, 7 L)로 용출시켜, 11개 분획들(MOE-2-1 내지 MOE-2-11)을 얻었다. 분획 MOE-2-1 (287 mg, Ve/Vt 0.000-0.078)를 SiO₂ c.c. (3 cm × 15 cm)에 넣고, n-헥산-에틸아세테이트(80:1, 2.0 L)로 용출시켜, 14개 분획들(MOE-2-1-1 내지 MOE-2-1-14) 및 궁극적으로 화학식 9의 화합물[MOE-2-1-12, 14.4 mg, Ve/Vt 0.528-0.921, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.66, 메탄올-H₂O (14:1)]를 얻었다.
- [0154] 분획 MOE-2-4 [148 mg, Ve/Vt 0.234-0.277]를 옥타데실 실리카겔(octadecyl silicagel)(ODS) c.c. (3.5 cm × 5 cm)에 넣고, 메탄올-H₂O (3:1, 1.2 L)로 용출시켜, 12개 분획(MOE-2-4-1 내지 MOE-2-4-12) 및 궁극적으로 생산된 화학식 10의 화합물[MOE-2-4-4, 29.6 mg, Ve/Vt 0.142-0.158, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.56, 메탄올-H₂O (7:1)] 및 화학식 6의 화합물[MOE-2-4-9, 6.6 mg, Ve/Vt 0.226-0.258, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.48, 메탄올-H₂O (7:1)]을 얻었다.
- [0155] 분획 MOE-2-8 [1.02 g, Ve/Vt 0.433-0.543]을 ODS c.c. (4 cm × 5 cm)에 넣고, 아세톤-H₂O (각각 3:2 → 3:1, 1.2 L)으로 용출시켜, 10개 분획(MOE-2-8-1 내지 MOE-2-8-10)을 얻었다. 분획 MOE-2-8-1 [460 mg, Ve/Vt 0.000-0.042]를 ODS c.c. (3.5 cm × 5 cm)에 넣고, 아세톤-메탄올-H₂O (1:1:1, 0.6 L)로 용출시켜, 10 개의 분획(MOE-2-8-1 내지 MOE-2-8-10)을 얻고, 궁극적으로 화학식 7의 화합물[MOE-2-8-1-5, 69.5 mg, Ve/Vt 0.108-0.127, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.39, acetone-MeOH-H₂O (2:1:1)]를 얻었다.
- [0156] 분획 MOE-3 [8.0 g, Ve/Vt 0.057-0.073]를 SiO₂ c.c. (5.5 cm × 15 cm)에 넣고, n-헥산-에틸아세테이트 (11:1, 8.4 L)로 용출시켜 14개 분획(MOE-3-1 내지 MOE-3-14)를 얻었다. 분획MOE-3-12 [232 mg, Ve/Vt 0.716-0.905]을 ODS c.c. (3 cm × 5 cm)에 넣고, 메탄올-H₂O (1:1, 1.6 L)로 용출시켜, 20개 분획(MOE-3-12-1 내지 MOE-3-12-20)을 얻고, 궁극적으로 화학식 8의 화합물[MOE-3-12-6, 12.7 mg, Ve/Vt 0.033-0.047, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.74, MeOH-H₂O (5:1)]을 얻었다.
- [0157] 분획 MOE-5 [5.3 g, Ve/Vt 0.195-0.286]을 SiO₂ c.c. (5 cm × 13.5 cm)에 넣고 CHCl₃-메탄올 (40:1, 4.1 L)로 용출시켜, 7개 분획(MOE-5-1 내지 MOE-5-7)을 얻었다. 분획 MOE-5-2 [1.3 g, Ve/Vt 0.066-0.105]를 ODS c.c. (4.5 cm × 6 cm)에 넣고, 아세톤-H₂O (각각 3:2 → 2:1 → 5:2, 2.9 L)로 용출시켜, 23개 분획 (MOE-5-2-1 to MOE-5-2-23)을 얻었다. 분획 MOE-5-2-3 [73 mg, Ve/Vt 0.039-0.045]을 ODS c.c. (2.5 cm × 6 cm)에 넣고, 메탄올-H₂O (5:2, 0.7 L)로 용출시켜, 8개 분획(MOE-5-2-3-1 내지 MOE-5-2-3-8)을 얻었다. 분획 MOE-5-2-3-5 [31 mg, Ve/Vt 0.175-0.219]을 SiO₂ c.c. (2 cm × 13 cm)에 넣고, n-헥산- CHCl₃-메탄올(20:10:1, 0.6 L)로 용출시켜, 8개 분획(MOE-5-2-3-5-1 to MOE-5-2-3-5-8)을 얻고, 궁극적으로 화학식 5의 화합물[MOE-5-2-3-5-2, 15 mg, Ve/Vt 0.115-0.128, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.60, 메탄올-H₂O (8:1)]을 얻었다.
- [0158] 분획 MOE-5-3 [3.6 g, Ve/Vt 0.105-0.297]을 SiO₂ c.c. (5 cm × 14 cm)에 넣고, n-헥산-에틸아세테이트(5:1, 21 L)로 용출시켜, 16개 분획(MOE-5-3-1 내지 MOE-5-3-16)을 얻고, 궁극적으로 화학식 1의 화합물[MOE-5-3-8, 23.6 mg, Ve/Vt 0.088-0.115, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.47, MeOH-H₂O (8:1)]을 생산했다.
- [0159] 분획 MOE-5-3-12 [220 mg, Ve/Vt 0.214-0.257]를 ODS c.c. (3 cm × 5 cm)에 넣고 메탄올-H₂O (3:2, 5 L)로 용출시켜, 29개 분획(MOE-5-3-12-1 내지 MOE-5-3-12-29)을 얻고, 궁극적으로 화학식 3의 화합물[MOE-5-3-12-4, 7.8 mg, Ve/Vt 0.214-0.257, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.64, MeOH-H₂O (7:1)]을 얻었다.
- [0160] 분획 MOE-6 [7.6 g, Ve/Vt 0.287-0.450]을 SiO₂ c.c. (6 cm × 13 cm)에 넣고, n-헥산- CHCl₃-메탄올 (40:10:1, 21.8 L)로 용출시켜, 8개 분획(MOE-6-1 to MOE-6-8)을 얻었다. 분획 MOE-6-5 [665 mg, Ve/Vt 0.242-0.432]을 ODS c.c. (4 cm × 5 cm)에 넣고 메탄올-H₂O (각각 1:1 → 2:1 → 4:1, 1.7)으로 용출시켜, 29개 분획(MOE-6-5-1 to MOE-6-5-29)을 얻고, 궁극적으로 화학식 2의 화합물[MOE-6-5-11, 14 mg, Ve/Vt 0.320-0.362, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.58, MeOH-H₂O (4:1)]를 얻었다.
- [0161] 분획 MOE-6-5-7 [81 mg, Ve/Vt 0.267-0.307]을 ODS c.c. (2.5 cm × 6.5 cm)에 넣고 아세톤-메탄올-H₂O

(1:1:2, 0.8 L)로 용출시켜, 12개 분획(MOE-6-5-7-1 내지 MOE-6-5-7-12)을 얻고, 궁극적으로 화학식 4의 화합물[MOE-6-5-7-5, 24.7 mg, Ve/Vt 0.323-0.386, TLC (RP-18 F254s) Rf 0.36, acetone-MeOH-H₂O (2:1:1)]를 얻었다.

[0162] <실험예 2> 화합물의 분석

[0163] 상기 실험예 1에서 수득한 화학식 1 내지 10의 화합물들에 대하여 NMR, MS 등을 이용하여 스펙트럼 분석을 수행하였다.

[0164] <2-1> 이소오보바틀

[0165] 화학식 8의 화합물은 무색 오일로 분리되며, 3368 and 1605 cm⁻¹에서 IR 흡수도를 보이는데, 이는 하이드록시기 및 올레핀기의 존재를 나타낸다. 분자량 및 분자식은, HREIMS 내 m/z 282.1254에서 분자 이온 피크 [M]⁺ (C₁₈H₁₈O₃, 282.1256으로 계산됨) 으로부터, 각각 282 및 C₁₈H₁₈O₃으로 확인되었다. 화합물 3의 ¹H-NMR 스펙트럼은 1,2,4-삼치환된(trisubstituted) 벤젠 고리 양성자 신호(δ H 6.78, 2H, d, J=8.4 Hz, H-5, 5'; δ H 6.69, 2H, d, J=1.2 Hz, H-2, 2', 및 δ H 6.61, 2H, dd, J=8.4, 1.2 Hz, H-6, 6'), 올레핀 메틴(methine) 양성자 신호(δ H 5.93, 2H, m, H-8, 8') 및 엑소메틸렌(exomethylene) 양성자 신호(δ H 5.05, 2H, d, J=10.8, 1.2 Hz, H-9a, 9a'; δ H 5.03, 2H, d, J=9.2, 1.2 Hz, H-9b, 9b') 및 알릴 메틸렌(allyl methylene) 양성자 신호(δ H 3.25, 4H, d, J=6.8 Hz, H-7, 7')이다. 상기 기재된 NMR 데이터들 및 분자 이온 피크(m/z 282)는 화학식 8의 화합물이 대칭인 리그난이며, 2 개의 동일한 페닐프로판노이드 모이어티로 이루어졌다는 것을 나타낸다. ¹³C-NMR 스펙트럼은 18개의 탄소 신호를 보여주는데, 이는 4 개의 산소화된 올레핀 4개 기로 된(quaternary) 탄소 신호(δ c 143.4, C-4, 4'; δ c 141.6, C-3, 3'), 2 개 올레핀 2개 기로 된 탄소 신호(δ c 133.2, C-1, 1') 및 8개 올레핀 메틴(methine) 탄소 신호(δ c 137.5, C-8, 8'; δ c 120.9, C-6, 6'; δ c 115.7, C-2, 2'; δ c 115.3, C-5, 5'), 2 개의 엑소메틸렌 탄소 신호(δ c 115.5, C-9, 9'), 및 2 개의 알릴 메틸렌 탄소 신호(δ c 39.4, C-7, 7')다. 이들 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 분광 특징들은, 하이드록실기의 위치에 예외는 있으나 목련과(Magnoliacea family)의 식물의 주된 화합물인 마그놀롤(화학식 6) 및 호노키올(화학식 7)의 그것들과 유사하다. gradient heteronuclear multiple bonding connectivity(gHMBC) 스펙트럼으로부터, 산소화된 올레핀 2 개 기로 된 탄소 신호 (δ c 143.4, C-4, 4')는 올레핀 메틴 양성자 신호 (δ H 6.78, 2H, d, J=8.4 Hz, H-5, 5'; δ H 6.69, 2H, d, J=1.2 Hz, H-2, 2')과 크로스 피크를 보였고, (δ c 141.6, C-3, 3')은 올레핀 메틴 양성자 신호 (δ H 6.78, 2H, d, J=8.4 Hz, H-5, 5'; δ H 6.61, 2H, dd, J=8.4, 1.2 Hz, H-6, 6')과의 크로스 피크를 보였는데, 이는 하이드록실기가 C-4 및 C-4'에 위치하고 있고, 페닐프로판노이드 2 분자가 ether 결합하고 있음을 나타낸다

[0166] 무색 오일; IR (CHCl₃) ν max 3368, 3077, 2924, 2900, 1605, 1516, 1444 cm⁻¹; HREIMS m/z: 282.1254266.1311 [M]⁺ (calcd. for C₁₈H₁₈O₃ 282.1256); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ H) 및 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ C)(표 1).

표 1

[0167]

위치	δ c	δ H
1	133.2	-
2	115.7	6.69, d, 1.2
3	141.6	
4	143.4	
5	115.3	6.78, d, 8.4
6	120.9	6.61, dd, 8.4, 1.2
7	39.4	3.25, d, 6.8
8	137.5	5.93, m
9	115.5	5.05, m
1'	133.2	-
2'	115.7	6.69, d, 1.2

3'	141.6	
4'	143.4	
5'	115.3	6.78, d, 8.4
6'	120.9	6.61, dd, 8.4, 1.2
7'	39.4	3.25, d, 6.8
8'	137.5	5.93, m
9'	115.5	5.05, m
1''	-	-
2''	-	-
-OCH ₃	-	-
CHO	-	-

[0168] <2-2> 9-메톡시오보바톨

[0169] 화학식 5의 화합물은 진한 갈색 오일로 분리되며, 3323 및 1599 cm⁻¹에서 흡수도를 보이는데, 이는 디하이드록실 및 올레핀기의 존재를 나타낸다. HREIMS 내 m/z 312.1350 (C₁₉H₂₀O₄, 312.1350로 계산되었다)에서 이온 피크 [M]⁺으로부터 분자식은 C₁₉H₂₀O₄로 결정되었다. 화학식 5의 화합물의 NMR 데이터들은 메톡시기(δ_H 3.32, δ_C 57.8) 및 화학식 4의 화합물의 알데하이드 신호 대신 산소화된 메틸렌 신호(δ_H 3.99, δ_C 73.0)를 제외하면 오보바탈(obovatal)(화학식 4)의 그것들과 매우 유사했다. 두 개의 올레핀 메틴 양성자 신호들(δ_H 6.36, 1H, d, J=16.0 Hz, H-7; δ_H 6.01, 1H, dt, J=16.0, 6.4 Hz, H-8) 사이의 큰 결합 상수(coupling constant)는 이중결합의 트랜스-배열(trans-configuration)을 가리킨다. gHMBC 스펙트럼으로부터 산소화된 메틸렌 양성자 신호(δ_H 3.99, H-9)는 올레핀 메틴 탄소 신호(δ_C 137.3, C-8'; δ_C 132.1, C-7) 및 메톡시 탄소 신호(δ_C 57.8)와 상관성이 있는데, 이는 산소화된 메틸렌 탄소가 C-9이라는 결론이 된다. 결국, 화학식 5의 화합물의 구조는 5-(3-메톡시-1-프로펜-1-일)-3-[4-(2-프로판-1-일)페녹시]-1,2-벤젠디올(5-(3-methoxy-1-propen-1-yl)-3-[4-(2-propen-1-yl)phenoxy]-1,2-benzenediol)로 확인되었으며, 이는 9-메톡시오보바톨(9-methoxyobovatal)로 명명하였다(도 4 내지 도 7).

[0170] 진한갈색 오일; IR (CHCl₃) ν_{max} 3323, 3066, 2925, 2819, 1599, 1505, 1447, 1326, 1217 cm⁻¹; HREIMS m/z: 312.1350 [M]⁺ (calcd. for C₁₉H₂₀O₄ 312.1350); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 및 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) (표 2).

표 2

[0171]

위치	δ _C	δ _H
1	135.4	-
2	108.7	6.44, d, 1.6
3	144.1	-
4	134.5	-
5	144.9	-
6	108.8	6.74, d, 1.2
7	132.1	6.36, d, 16.0
8	124.3	6.01, dt, 16.0, 6.4
9	73.0	3.99, dd, 6.4, 1.2
1'	129.2	-
2'	118.2	6.93, d, 8.4
3'	129.9	7.13, d, 8.8
4'	154.7	-
5'	129.9	7.13, d, 8.8
6'	118.2	6.93, d, 8.4
7'	39.4	3.35, d, 6.4
8'	137.3	5.93, m

9'	115.9	5.09, m
1''	-	-
2''	-	-
-OCH ₃	57.8	3.32, s
CHO	-	-

[0172] <2-3> 마그노보바톨

[0173] 화학식 1의 화합물은 갈색 오일로 분리되며, 3391 및 1601 cm⁻¹의 IR 흡수도 밴드를 보이는데, 이는 하이드록실 및 올레핀기의 존재를 의미한다. 선광은 우회전성 특성(dextrorotatory characteristics) [α]_D +7.40° 을 보였다. 분자식은 HREIMS의 m/z 356.1621 (C₂₁H₂₄O₅, 356.1624로 계산된다)에서 이온 피크 [M]⁺으로부터 C₂₁H₂₄O₅로 확인되었다. 1H-NMR 스펙트럼은, 파라-이치환된(para-disubstituted) 벤젠 고리로 인한 4개의 올레핀 메틴 양성자 신호(δ H 7.07, 2H, d, J=8.0 Hz, H-2',6'; δ H 6.79, 2H, d, J=8.0 Hz, H-3',5') 및 1,2,3,4,5-오치환된(1,2,3,4,5-pentasubstituted) 벤젠 고리로 인한 δ H 6.67에서의 하나의 방향족 양성자 신호(s, 1H, H-6)를 보였다. 또한 2개의 중첩된 올레핀 메틴 양성자 신호들(δ H 5.96, 2H, m, H-8,8')도 관찰되었다. 2 개의 엑소메틸렌 양성자 신호들(δ H 5.05, 4H, m, H-9,9'), 하나의 헤미아세탈 양성자 신호(δ H 4.38, 1H, t, J=4.8 Hz, H-2'') 및 하나의 메톡시 양성자 신호(δ H 3.21, 3H, s)들이 관찰되었다. 고자기장에서, 3 개의 알릴 메틸렌 양성자 신호들(δ H 3.38, 2H, d, J=4.8 Hz, H-7; δ H 3.31, 2H, d, J=6.8 Hz, H-7'; δ H 2.70, 2H, d, J=4.8 Hz, H-1'')이 관찰되었다. 이를 종합하면, 상기 데이터들은 화학식 1의 화합물이 측쇄를 갖는 네오리그난이라는 것을 가리킨다. 13C-NMR 스펙트럼은 하나의 메톡시기(δ c 54.1, -OCH₃)를 포함하여 21개 탄소 신호들을 보였다. 저자기장에서, 4 개의 산소화된 올레핀 4 기로 된 탄소 신호들(δ c 155.5, C-4'; δ c 143.3, C-5; δ c 140.4, C-3; δ c 134.5, C-4), 3 개의 올레핀 4 요소로 된 탄소 신호들(δ c 134.1, C-1'; δ c 132.3, C-2; δ c 120.8, C-1), 7 개의 올레핀 메틴 탄소 신호들(δ c 137.4, C-8'; δ c 137.2, C-8; δ c 129.9, C-2',6'; δ c 114.6, C-3',5'; δ c 113.7, C-6) 및 두 개의 엑소메틸렌 탄소 신호들(δ c 115.7, C-9'; δ c 115.6, C-9)이 관찰되었다. 헤미아세탈 탄소 신호(δ c 105.4, C-2'') 및 3 개의 메틸렌 탄소 신호(δ c 39.2, C-7'; δ c 36.8, C-7; δ c 30.7, C-1'')가 관찰되었다. 따라서 화학식 1의 화합물은 1-메톡시에탄올 모이머티를 갖는 네오리그난으로 확인되었다. 작용기의 위치를 확인하기 위하여, gCOSY, gHSQC, 및 gHMBC와 같은 2D NMR 실험을 수행하였다. C-1'' 및 C-2'' 간 연결은 gCOSY 교차 피크(cross-peak)들로부터 증명되었다(도 8). gHMBC 스펙트럼에서, 메틸렌 양성자 신호(δ H 2.70, H-1'')는 산소화된 올레핀 4기로 된 탄소 신호(δ c 140.4, C-3) 및 2 개의 올레핀 4기로 된 탄소 신호(δ c 132.3, C-2; δ c 120.8, C-1)와 함께 교차 피크를 보이는데, 이는 메틸렌 탄소 신호(C-1'')가 C-2 자리에서 링크된다는 것을 가리킨다. 추가적인 헤미아세탈 양성자(δ H 4.38, H-2'')는 메톡시 탄소 신호(δ c 54.1, -OCH₃)와 관련성이 있는데, 이는 메톡시기가 C-2'' 자리에 있다는 것을 가리킨다. 결국, 화학식 1의 화합물은 2-(2-메톡시에탄올)-1-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-3,4-벤젠디올(2-(2-methoxyethanol)-1-(2-propen-1-yl)-5-[4-(2-propen-1-yl)phenoxy]-3,4-benzenediol)로 확인되었으며, 마그노보바톨(magnobovatol)로 명명되었다(도 9 내지 도 12).

[0174] 갈색 오일; [α]_D +7.40° (c=0.060, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν _{max} 3391, 3080, 2927, 1601, 1505 cm⁻¹; HREIMS m/z: 356.1621 [M]⁺ (calcd. for C₂₁H₂₄O₅ 356.1624); 1H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ H) 및 13C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ C)(표 3).

표 3

[0175]

위치	δ c	δ H
1	120.8	-
2	132.3	-
3	140.4	-
4	134.5	-
5	143.3	-
6	113.7	6.67, s
7	36.8	3.38, d, 4.8

8	137.2	5.96, m
9	115.6	5.05, m
1'	134.1	-
2'	129.9	7.07, d, 8.0
3'	114.6	6.79, d, 8.0
4'	155.5	-
5'	114.6	6.79, d, 8.0
6'	129.9	7.07, d, 8.0
7'	39.2	3.31, d, 6.8
8'	137.4	5.96, m
9'	115.7	5.05, m
1''	30.7	2.70, d, 4.8
2''	105.4	4.38, t, 4.8
-OCH ₃	54.1	3.21, s
CHO	-	-

[0176] <2-4> 2-하이드록시오보바알데하이드

[0177] 화학식 3의 화합물은 갈색 오일로 분리되며, 3289, 1671, 및 1596 cm⁻¹에서 IR 흡수도 밴드를 보이는데, 이는 하이드록실, 컨쥬게이트된 카보닐 및 올레핀기들의 존재를 가리킨다. 분자식은 HREIMS에서 at m/z 286.0851 (C₁₉H₂₀O₄, 286.0841로 계산된다)에서 분자 이온 피크 [M]⁺로부터 결정되었으며, 그것은 오보바알데사이드 (obovaaldehyde)(화학식 2)의 것보다 큰 16 유닛으로, 이는 화학식 3의 화합물이 화학식 2의 화합물과 비교하여 하나의 추가적인 하이드록실기를 갖는다는 것을 가리킨다. 화학식 3의 화합물의 NMR 신호들은 화학식 2의 화합물의 1,2,3,5-사치환된(tetrasubstituted) 벤젠 고리 대신 1,2,3,4,5-오치환된(pentasubstituted) 벤젠 고리의 존재를 제외하면, 화학식 2의 화합물과 유사하다. gHMBC 스펙트럼에서, 알데하이드 탄소(δ_c 190.6)는 올레핀 메틴 양성자 신호(δ_H 6.92, s, H-6)와 상관성을 보였는데, 이는 알데하이드가 C-1 자리에 있다는 것을 나타낸다. H-6의 올레핀 메틴 양성자 신호는 산소화된 올레핀 4기로 된 탄소 신호(δ_c 145.1 C-2,4)와 상관이 있다. 화학식 3의 화합물의 구조는 결국 비스노르네오리그난(bisnorneolignan)인, 1-메탄올-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-2,3,4-벤젠트리올(1-methanol-5-[4-(2-propen-1-yl)phenoxy]-2,3,4-benzenetriol)으로 확인되었으며, 2-하이드록시오보바알데하이드(2-hydroxyobovaaldehyde)로 명명하였다(도 13 내지 도 16).

[0178] 진한 갈색 오일; IR (CHCl₃) ν_{max} 3289, 3075, 2890, 2725, 1671, 1596, 1505 cm⁻¹; HREIMS m/z: 286.0851 [M]⁺ (calcd. for C₁₆H₁₄O₅ 286.0841); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 및 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) (표 4).

표 4

[0179]

위치	δ_c	δ_H
1	111.2	-
2	145.1	-
3	129.1	-
4	145.1	-
5	140.1	-
6	110.7	6.92, s
7	-	-
8	-	-
9	-	-
1'	136.5	-
2'	130.1	6.97, d, 8.0
3'	118.9	7.18, d, 8.0
4'	153.7	-

5'	118.9	7.18, d, 8.0
6'	130.1	6.97, d, 8.0
7'	39.4	3.38, d, 6.8
8'	137.0	5.99, m
9'	116.1	5.10, m
1''	-	-
2''	-	-
-OCH ₃	-	-
CHO	190.6	9.66, s

[0180] <2-5>

[0181] NMR 및 MS 데이터들을 비교한 결과, 화학식 2의 화합물은 오보바알데하이드(obovaaldehyde)로 확인되었으며, 화학식 4의 화합물은 오보바탈(obovatal)로 확인되었다. 또한 화학식 6의 화합물은 마그놀 (magnolol)로 확인되었고, 화학식 7의 화합물은 호노키올(honokiol)로 확인되었으며, 화학식 9의 화합물은 이소마그놀롤(isomagnolol)로 확인되었고, 화학식 10의 화합물은 오보바탈(obovatal)로 확인되었다.

[0182] <실험예 3> 세포 생존율 및 세포 독성

[0183] RAW 264.7 대식세포들 (1×10⁴ 세포/웰)을 96-웰 플레이트에서 12-18시간 동안 배양하고, 무혈청(serum-free) 배지에 희석된 다양한 농도의 네오리그난들(화학식 1 내지 10의 화합물들)의 존재 또는 부재 하 24시간 동안 LPS (1 μg/mL)로 처리하였다. 그 후 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) 시약 (Sigma-Aldrich Co.)을 웰에 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 세포 펠렛 내 형성된 포르마잔(formazan)을 DMSO (Sigma-Aldrich Co.) 100 μL를 첨가하여 용해시키고, 흡수도를 550 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 하기 식 1에 의하여 생육가능한 세포의 퍼센트로 계산하였다.

[0184] <식 1>

[0185] 세포 생존율(%)= [{OD (화합물) - OD (Blank)} / {OD (대조군) - OD (Blank)}] × 100

[0186] 화학식 1 내지 10의 화합물들의 세포독성도 MTT 시험으로 평가하였는데, 5-30 μM 범위에서 RAW 264.7 대식세포에 대한 세포독성 활성은 발견되지 않았다. 이 때, 양성 대조군으로는 설푸레틴(Sultifuretin) 40 μM 투여군을 이용하였다.

[0187] <실험예 4> 뇌세포 보호 활성 평가

[0188] 글루타메이트(glutamate)는 아미노산으로, 중추신경계에서 주요한 흥분성 신경전달물질이다. 과도한 글루타메이트의 농도는 N-아세틸 시스테인(N-acetyl cystein)의 흡수를 억제하여 산화적 스트레스를 유발시킨다. 생쥐의 해마 유래 세포주인 HT22 세포주는 글루타메이트 수용체가 없는 세포주로서 글루타메이트로 처리 시 신경흥분 독성이 아닌 산화적 스트레스로 인하여 세포가 손상을 받으며, 산화적 스트레스로 인한 퇴행성 뇌질환 연구에 있어서 유용한 실험 모델 중의 하나로 알려져 있다.

[0189] 글루타메이트로 독성을 유발한 세포주에 대한 보호 활성을 측정하기 위하여 생쥐 해마 세포 유래의 HT22 세포 (2 × 10⁵ cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, 페니실린 G (100 IU/ml)와 스트렙토마이신 (100 μg/ml)을 함유한 DMEM 배지에 분주하고 5% CO₂ 배양기 내에서 37 °C에서 24시간 배양한 다음, 화학식 1 내지 10의 화합물들을 각각 포함하는 시료 용액 (10, 20, 40 μM)과 5 mM 글루타메이트를 처리하였다. 그리고 12시간 동안 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 세포생존율은 MTT법을 활용하여 측정하였다. 이 때, 양성대조 약물로는 Trolox (50 μM)를 사용하였다. 또한, 모든 실험 결과는 대조군인 Trolox 처리군에 대한 세포보호율을 평균값으로 표시

하였으며, 이는 각각 3회 반복 실험한 결과값을 이용하여 계산하였다.

[0190] 그 결과, 9 종의 화합물들에서 50% 이상의 세포 보호율을 나타내는 것으로 확인되었다. 그러므로 이들은 글루타메이트로 인한 손상으로부터 뇌세포를 보호하는 것으로 확인되었다. 그러나 화학식 9의 화합물은 실험 농도에서 유의한 수준으로 뇌세포 보호능이 보이지 않았다(표 5).

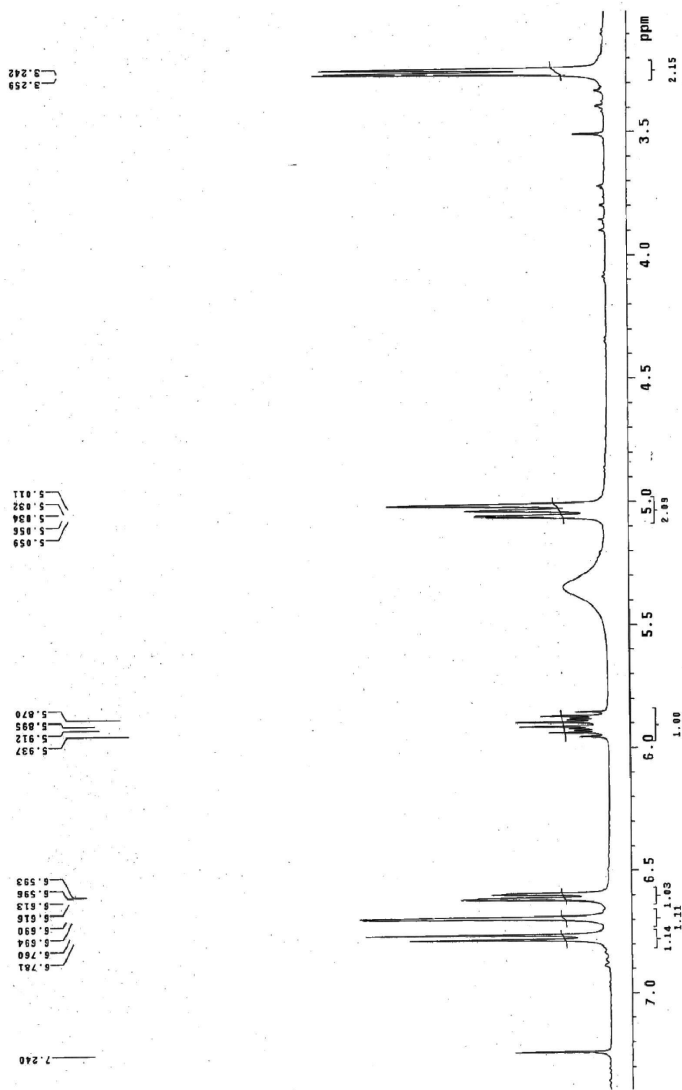
표 5

[0191]

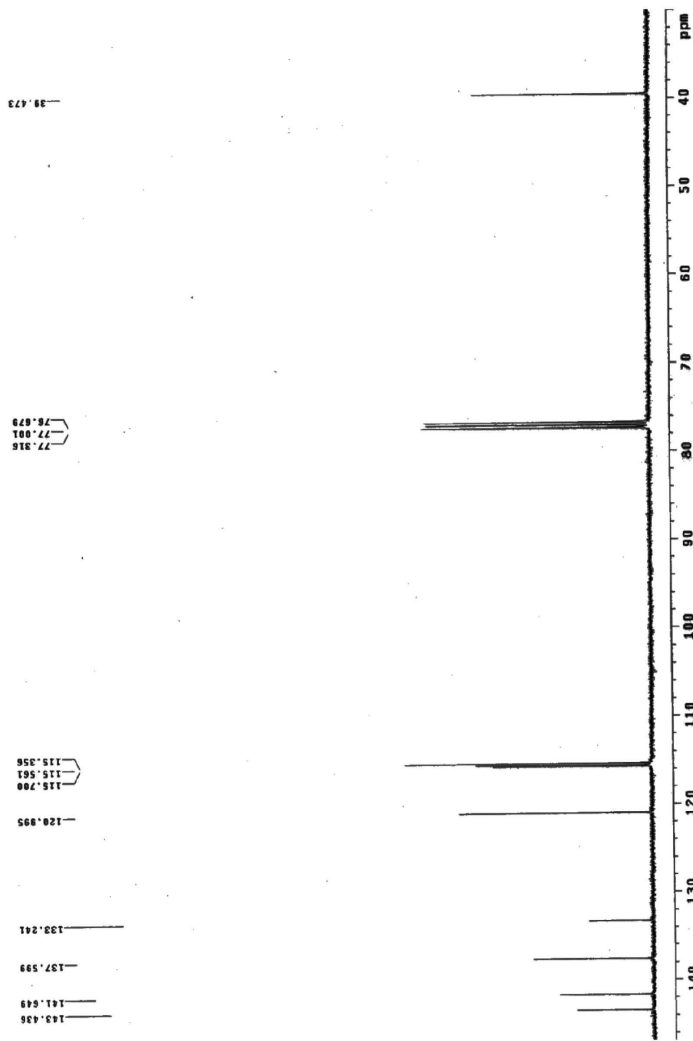
화합물	EC ₅₀ (uM)
Trolox	79.32 ± 0.78
화학식 1	9.856 ± 1.02
화학식 2	4.877 ± 0.65
화학식 3	36.2 ± 0.45
화학식 4	16.22 ± 0.92
화학식 5	17.17 ± 1.32
화학식 6	19.01 ± 0.88
화학식 7	7.408 ± 0.76
화학식 8	13.6 ± 0.21
화학식 9	-
화학식 10	11.61 ± 0.49

도면

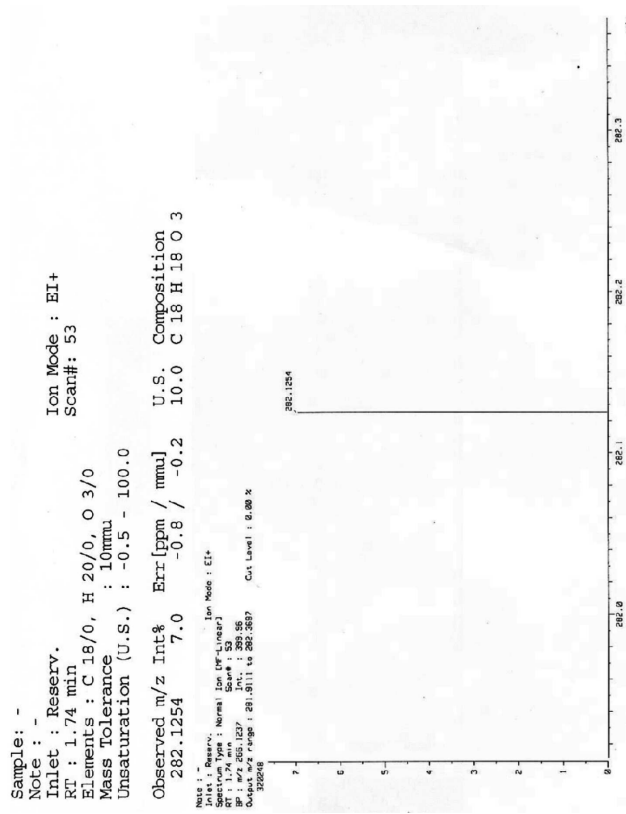
도면1



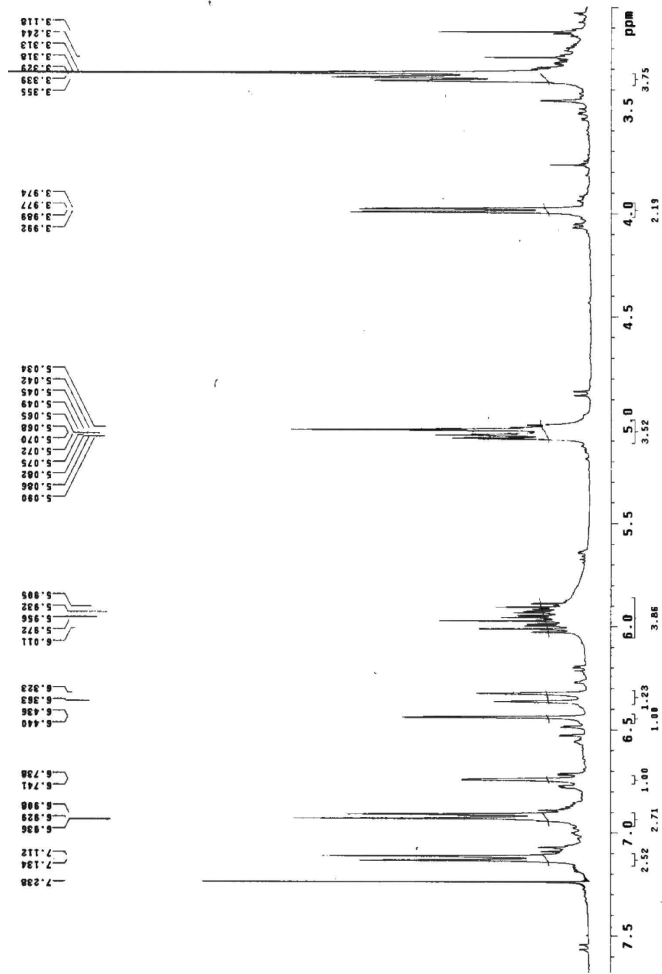
도면2



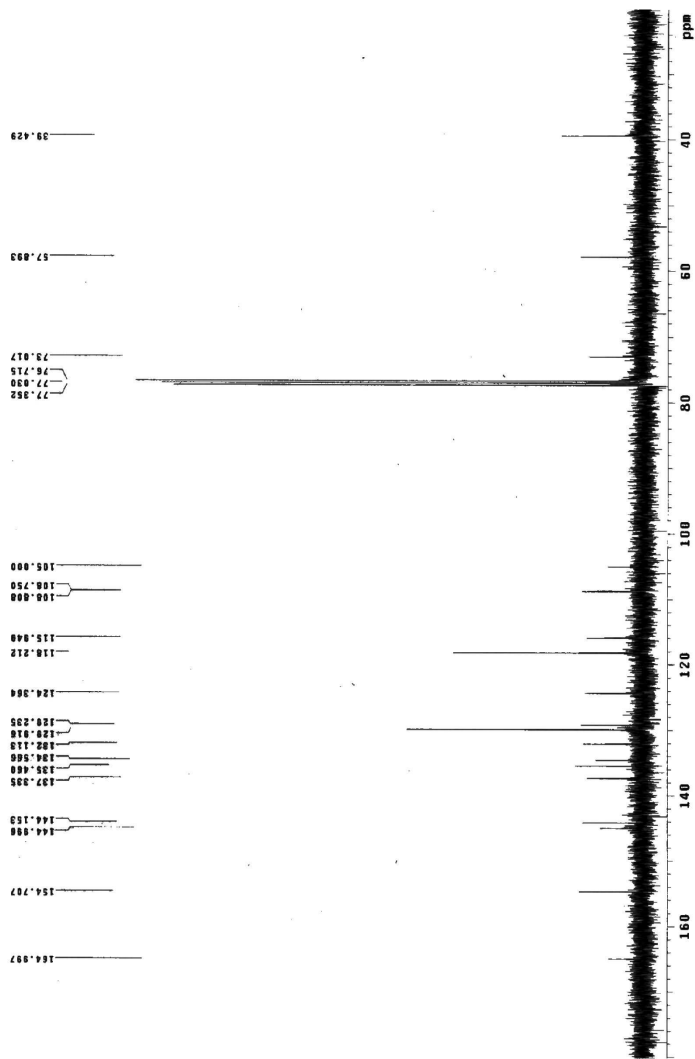
도면3



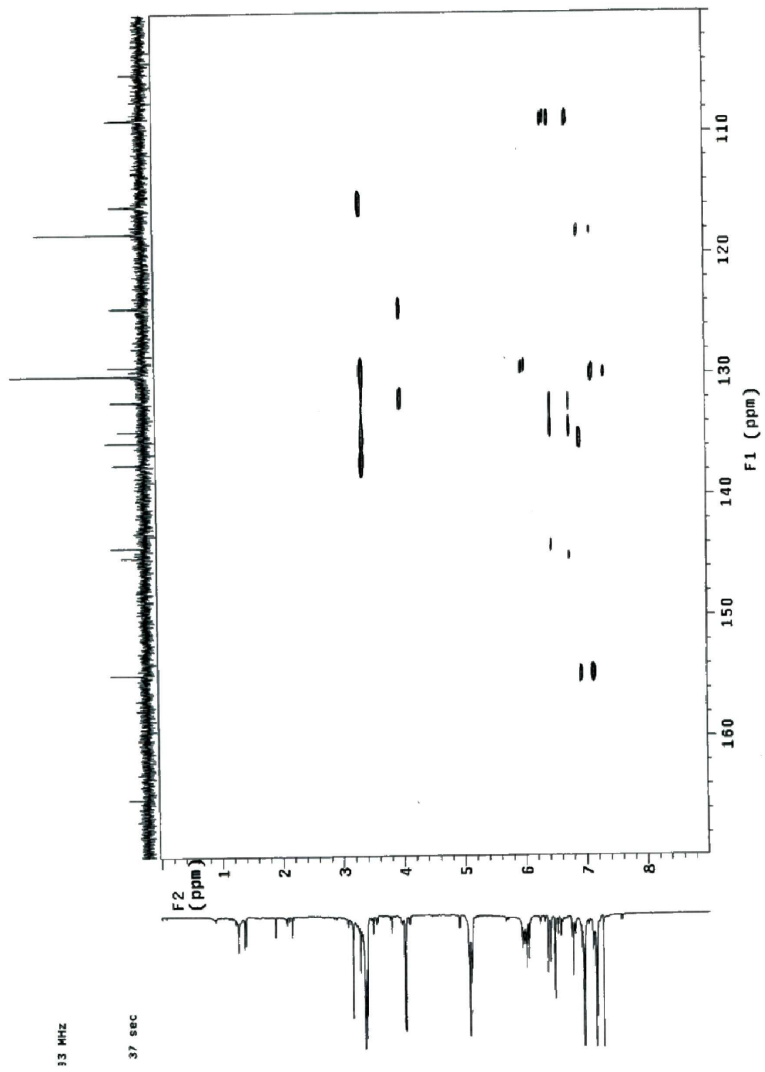
도면4



도면5



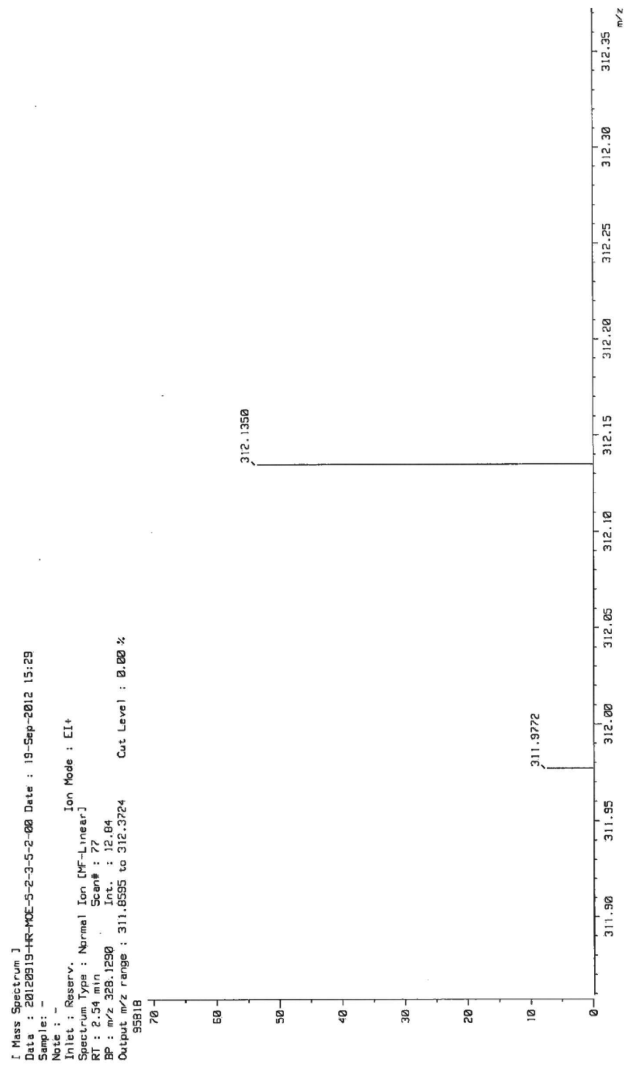
도면6



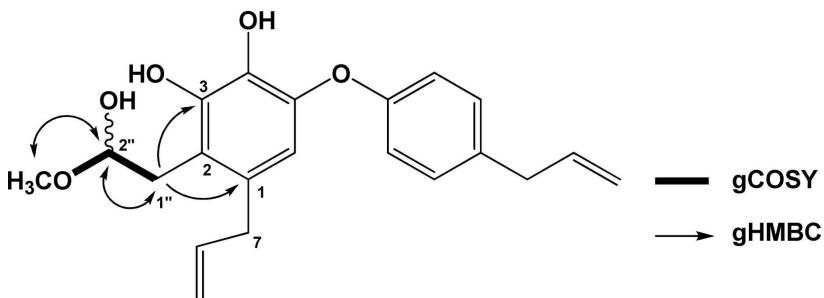
도면7

Page: 1

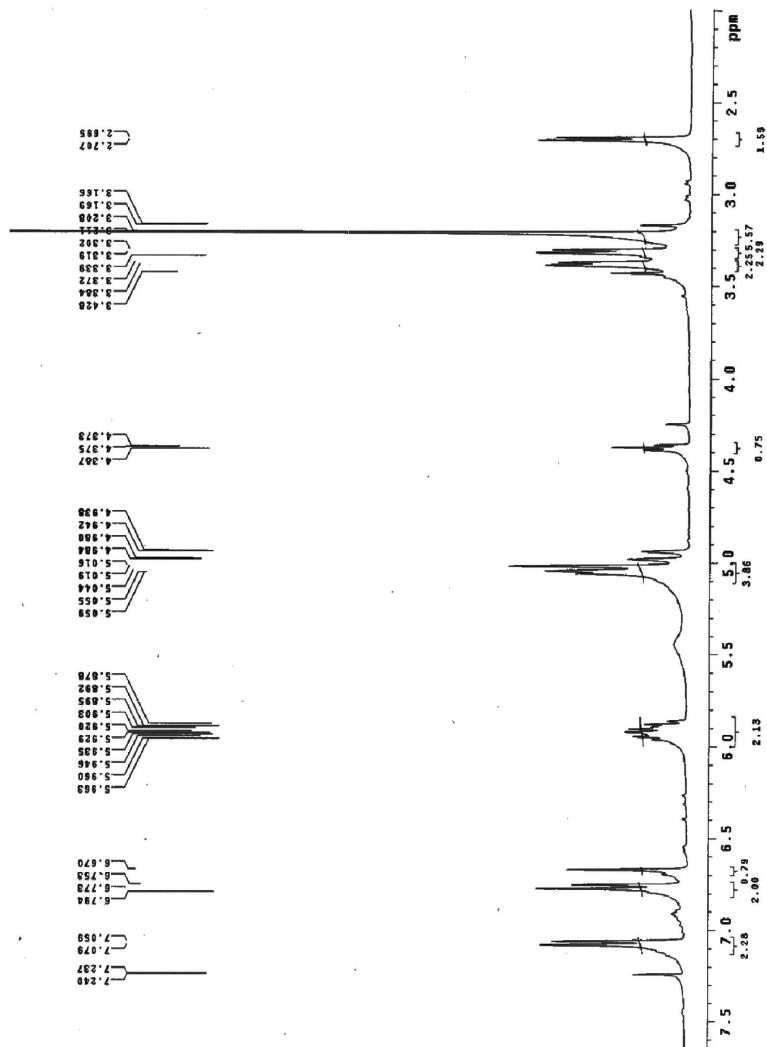
[Elemental Composition]
 Data : 20120919-HR-MOE-5-2-3-5-2-00 Date : 19-Sep-2012 15:29
 Sample : -
 Note : -
 Inlet : Reserv. Ion Mode : EI+
 RT : 2.54 min Scan#: 77
 Elements : C 19/O, H 20/O, O 4/O
 Mass Tolerance : 1000ppm, 20mmu if m/z < 20, 50mmu if m/z > 50
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 50.0
 Observed m/z Int% Err(ppm / mmu) U.S. Composition
 312.1350 53.4 -3.6 / -1.1 10.0 C 19 H 20 O 4



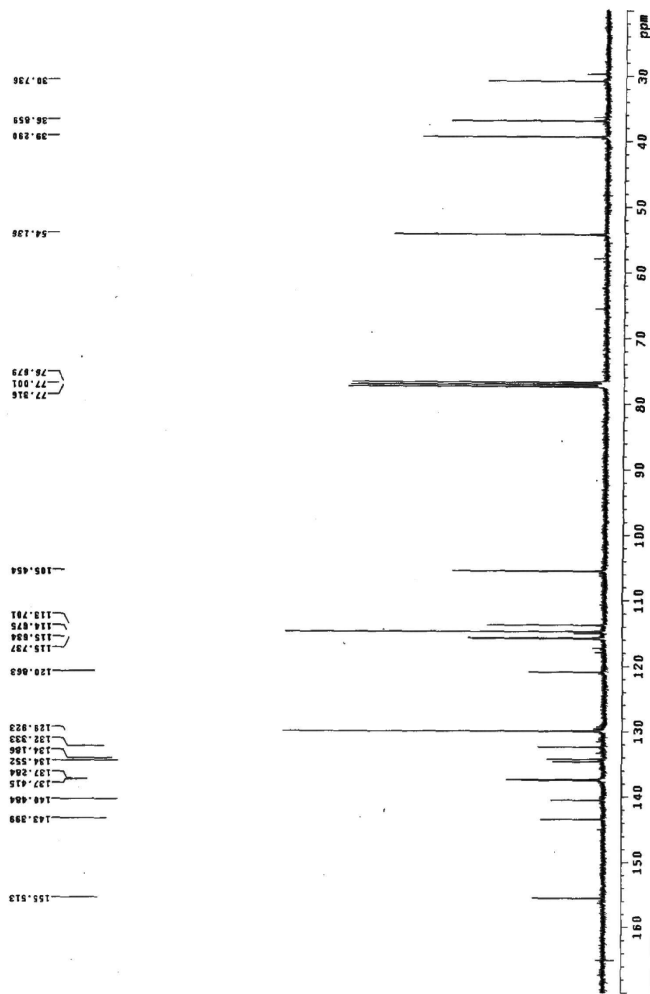
도면8



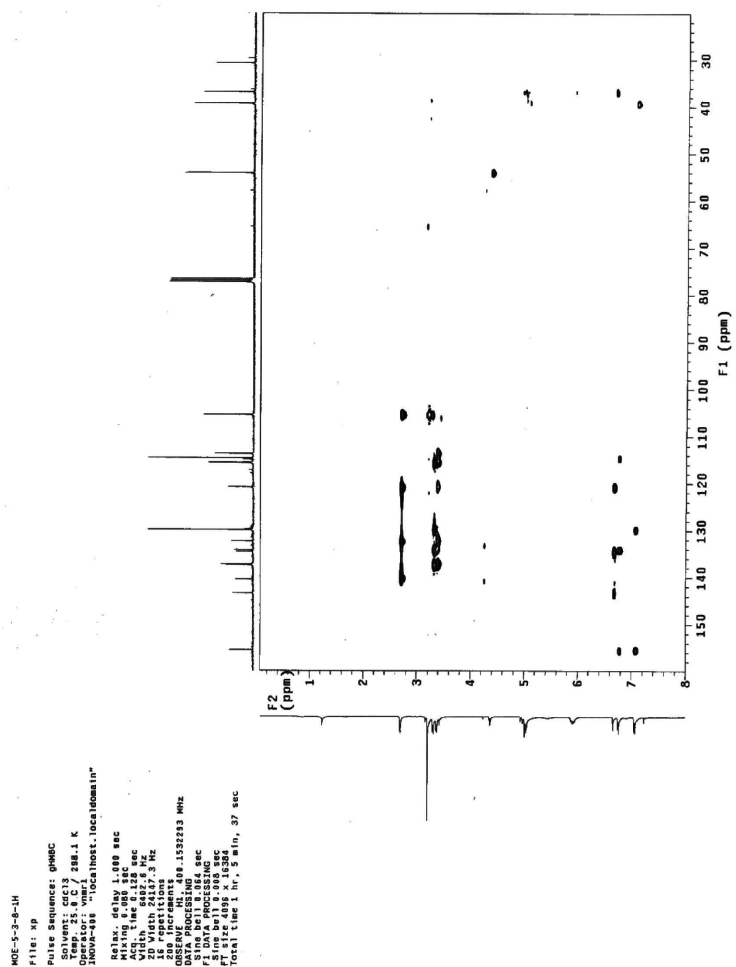
도면9



도면10



도면11

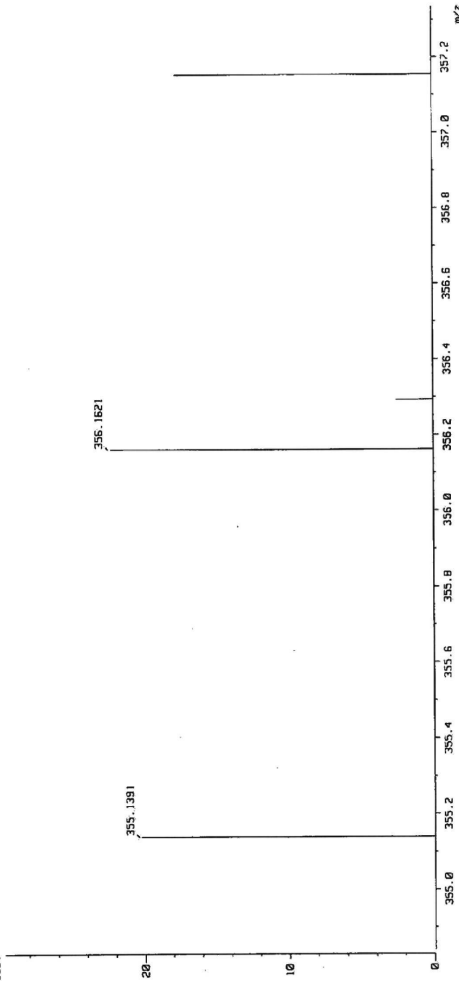


도면12

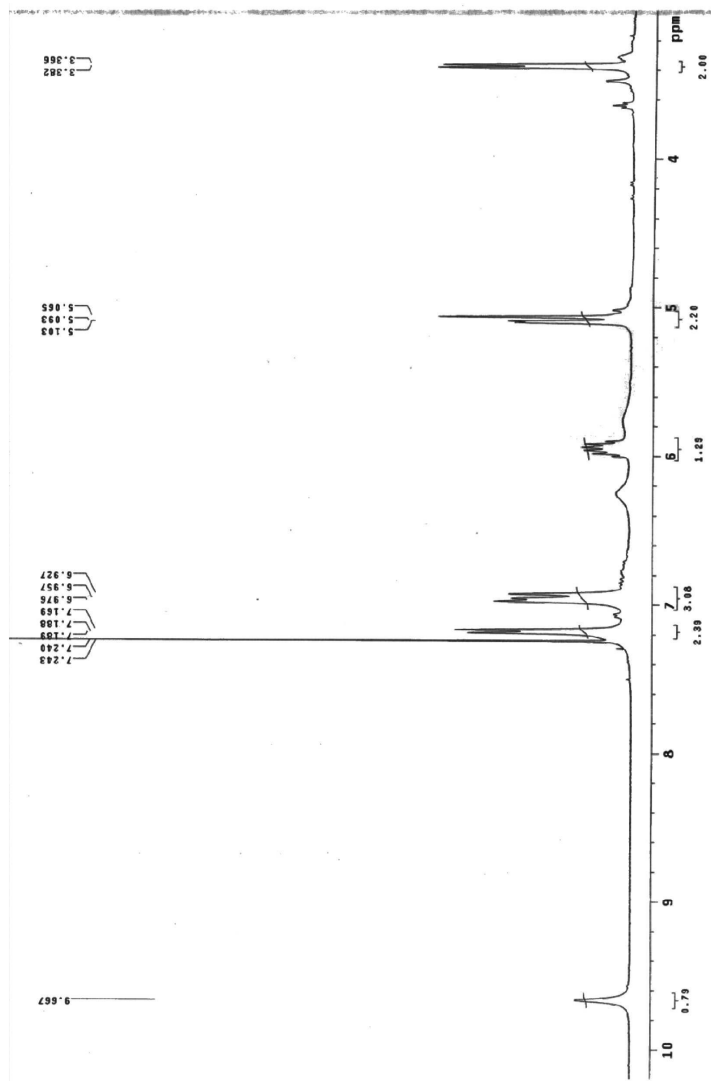
Page: 1

[Elemental Composition]
 Date : 20120424-MOE-5-3-8-009 Date : 25-Apr-2012 16:04
 Sample: -
 Note : -
 Inlet : Reserv. Ion Mode : EI+
 RT : 3.67 min Scan#: 111
 Elements : C 21/0, H 24/0, O 5/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 30mmu if m/z < 30, 50mmu if m/z > 50
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 50.0
 Observed m/z Int% Err [ppm / mmu] U.S. Composition
 356.1621 22.2 -0.8 / -0.3 10.0 C 21 H 24 O 5

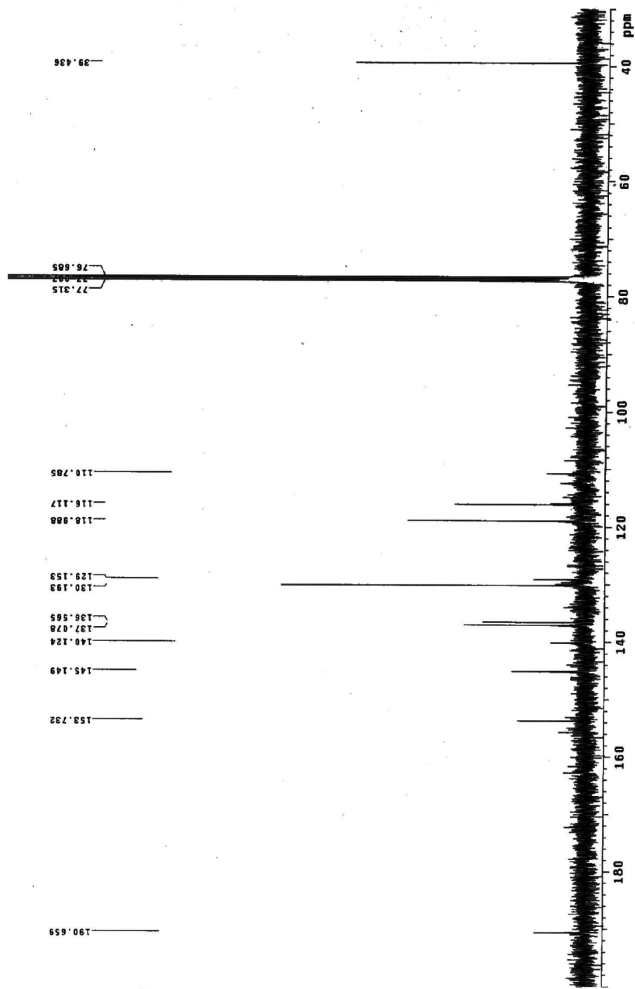
[Mass Spectrum]
 Date : 20120424-MOE-5-3-8-009 Date : 25-Apr-2012 16:04
 Sample: -
 Note : -
 Inlet : Reserv. Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (W-Linear)
 RT : 3.67 min Scan#: 111
 BP : m/z 232.1895 Int. : 7.65
 Output m/z range : 354.8004 to 357.3367 Cut Level : 0.00 %
 23821



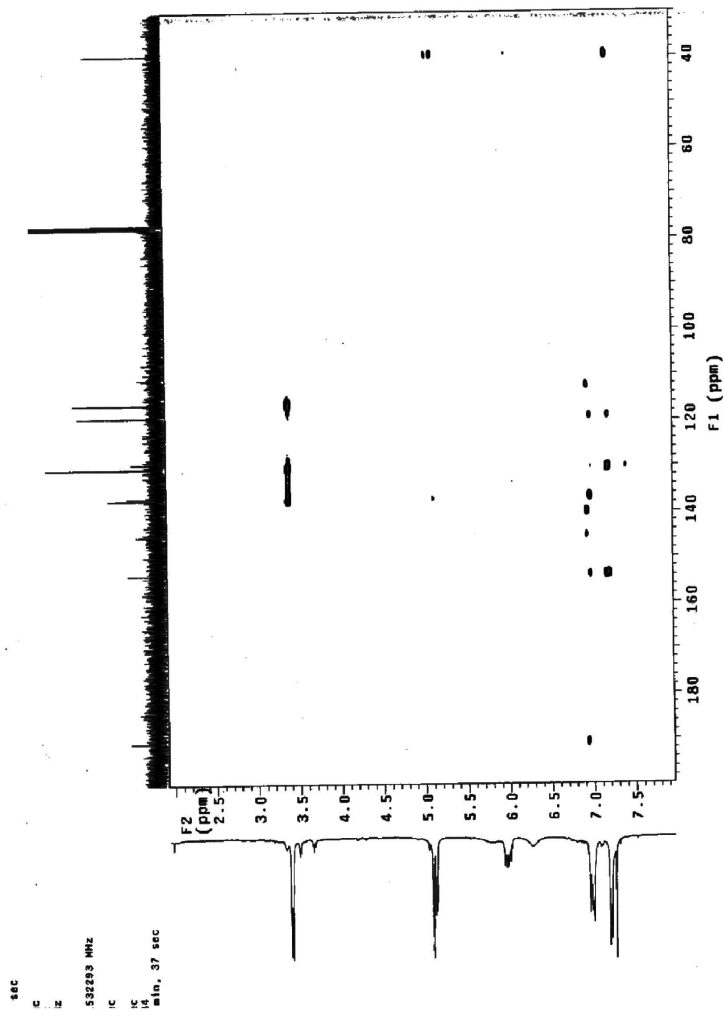
도면13



도면14



도면15



도면16

Page: 1

[Elemental Composition]
 Data : 20120503-HR-MOE-5-3-12-4 Date : 03-May-2012 15:47
 Sample: -
 Note : -
 Inlet : Reserv. Ion Mode: EI+
 RT : 2.60 min Scan#: 79
 Elements : C 16/0, H 14/0, O 5/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 30mmu if m/z < 30, 50mmu if m/z > 50
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 50.0
 Observed m/z Int% Err [ppm / mmu] U.S. Composition
 286.0851 1.9 +3.6 / +1.0 10.0 C 16 H 14 O 5

