



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0014595
(43) 공개일자 2017년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/752 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/752 (2013.01)

A61K 31/7048 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0108242

(22) 출원일자 2015년07월30일

심사청구일자 2015년07월30일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

김곤섭

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 101동 1402호
(평거동, 들말대경아파트)

허정두

경상남도 진주시 진주대로 1317, 109동 901호 (이현동, 이현하이클래스웰가아파트)

이상준

경상남도 진주시 호탄길34번길 17, 301호 (호탄동)

(74) 대리인

박지호, 문경혜

전체 청구항 수 : 총 8 항

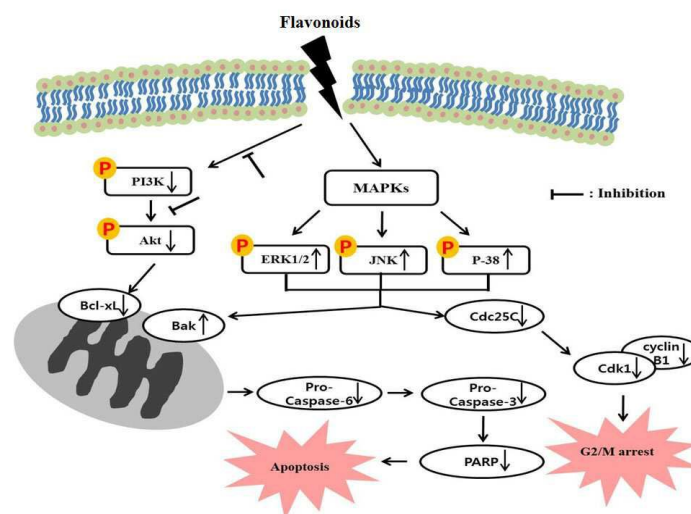
(54) 발명의 명칭 감귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 감귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 감귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하여 간암 세포의 세포활성(cell viability)을 억제하고, 세포 주기(cell cycle)에 영향을 미치며, 세포자살(apoptosis)을 유도함으로써 효과적으로 간암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 특히 간암세포의 Bak 단백질의 발현 증가, Bcl-xL 단백질의 발현 억제, Caspase 패밀리 단백질의 발현 억제, PARP 단백질의 발현 억제, Akt 단백질의 인산화 억제, P38 MAPK 단백질의 인산화 증가, JNK 단백질의 인산화 증가 및 ERK 단백질의 인산화 증가를 통해 세포자가사멸(apoptosis)을 유도할 수 있다.

대 표 도 - 도18



(52) CPC특허분류
A61K 2236/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

감귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 플라보노이드계 화합물은

- (a) 감귤 진피를 냉동건조 및 분말화하는 단계;
- (b) 상기 (a)에서 수득한 감귤 진피 분말에 50 내지 90%(v/v) 메탄올을 첨가하여 추출하는 단계;
- (c) 상기 (b)에서 수득한 추출물을 여과하는 단계;
- (d) 상기 (c)에서 수득한 여과액의 용매를 제거하는 단계;
- (e) 상기 (d)에서 수득한 잔사를 메탄올에 용해하는 단계;
- (f) 상기 (e)에서 수득한 용액을 실리카 칼럼에 통과시키는 단계;
- (g) 상기 (f)단계 이후 헥산으로 상기 칼럼을 세척하는 단계;
- (h) 상기 (g)단계 이후 상기 칼럼에 에틸아세테이트를 통과시켜 용출하는 단계;
- (i) 상기 (h)에서 수득한 용출액의 용매를 제거하는 단계;
- (j) 상기 (i)에서 수득한 잔사를 메탄올에 용해하는 단계; 및
- (k) 상기 (j)에서 수득한 용액으로 C₁₈ 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함하는 방법으로 제조된 것임을 특징으로 하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 감귤은 하귤(*Citrus natsudaoidai* Hayata)인 것을 특징으로 하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 플라보노이드계 화합물은

나린진(naringin), 헤스페리딘(hesperidin), 폰시린(poncirin), 아이소메란진(isomeranzin), 시넨세틴(sinensetin), 테트라메틸-0-아이소스쿠텔라레인(tetramethyl-0-isoscutellarein), 노빌레틴(nobiletin), 헵타메톡시플라본(heptamethoxyflavone), 트리메톡시플라본(trimethoxyflavone) 및 탄제레틴(tangeretin)을 포함하는 것을 특징으로 하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 조성물은 간암세포의 BaK 단백질의 발현 증가, Bcl-xL 단백질의 발현 억제, Caspase 패밀리 단백질의 발현 억제, PARP 단백질의 발현 억제, Akt 단백질의 인산화 억제 또는 P38 MAPK 단백질의 인산화 증가를 통해 세포자사멸(apoptosis)을 유도하는 것을 특징으로 하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제 2항에 있어서,

상기 감귤은 병귤(*Citrus platyamma* Hort. et Tanaka)인 것을 특징으로 하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 플라보노이드계 화합물은

네오에리오시트린(Neoeriocitrin), 나린진(naringin), 헤스페리딘(hesperidin), 아이소시넨세틴(isosinensetin), 시넨세틴(sinensetin), 테트라메틸-0-아이소스쿠텔라레인(tetramethyl-0-isoscutellarein), 노빌레틴(nobiletin), 테트라메톡시플라본(tetramethoxyflavone), 헵타메톡시플라본(heptamethoxyflavone), 탄제레틴(tangeretin) 및 하이드록시펜타메톡시플라본(hydroxypentamethoxyflavone)을 포함하는 것을 특징으로 하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 조성물은 간암세포의 Caspase 패밀리 단백질의 발현 억제, Bcl-xL 단백질의 발현 억제, P38 MAPK 단백질의 인산화 증가, JNK 단백질의 인산화 증가 또는 ERK 단백질의 인산화 증가를 통해 세포자가사멸(apoptosis)을 유도하는 것을 특징으로 하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 감귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 감귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하여 간암 세포의 세포활성(cell viability)을 억제하고, 세포 주기(cell cycle)에 영향을 미치며, 세포자살(apoptosis)을 유도함으로써 효과적으로 간암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 진피란 감귤류(*Citrus* spp.)의 성숙한 과피를 말하며, 예로부터 소화기능향진, 이뇨작용, 항균작용, 항알러지 작용 등을 나타내는 것으로 알려져 왔다. 진피는 특히 과육을 사용하고 나서 버려지는 부위로써 연간 확보할 수 있는 재료의 양이 무궁무진하다는 장점이 있다. 따라서 이러한 진피를 잘 이용하면 값싼 재료로부터 매우 유용한 물질을 확보할 수 있다.

[0003] 만약 진피로부터 생리활성이 우수한 물질을 추출할 수 있다면 의약, 식품 또는 화장품 등 다양한 용도로 사용할 수 있으며, 그동안 진피가 인체에 부작용을 일으키지 않았기 때문에 추출된 물질 또한 기존의 다른 합성의약품 등에 비해 부작용이 적을 것이다. 이와 같은 여러 가지 가능성과 장점으로 인해 진피와 관련된 다양한 연구가 진행되고 있으며, 대한민국 등록특허 제10-1187310호 등과 같은 진피의 활용 기술이 알려진 바 있다.

[0004] 한편, 2011년 현재 보건복지부와 국가암등록센터가 발표한 2009년 통계자료에 따르면 간암은 한해 약 16,000명의 환자가 발생하여 한해 암 발생률의 순위에서 5위를 기록하고 있다. 특히 남성에서의 간암은 여성보다 발병률이 높아 4번째로 빈번히 발생하는 암중에 하나이다. 간암의 특징은 간 내의 전이확률이 높아 수술적 제거를 통해 암을 없앴다고 하더라도 재발의 확률이 높아 5년간의 환자 생존률이 매우 낮아지는 현상을 보이는 것이다. 이 때문에 간암세포의 증식억제와 사멸을 효과적으로 유도할 수 있는 의약의 개발이 필요하다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 감귤 진피의 활용 가능성과 장점을 바탕으로 보다 유용하게 활용할 수 있는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 시도하였다. 특히, 암에 대한 효과를 집중적으로 연구한 결과, 감귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 간암 세포의 세포활성(cell viability)을 억제하고, 세포 주기(cell cycle)에 영향을 미

치며, 세포자살(apoptosis)을 유도함으로써 효과적으로 간암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1187310호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 주된 목적은 간암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 감귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 간암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 플라보노이드계 화합물은 (a) 감귤 진피를 냉동건조 및 분말화하는 단계; (b) 상기 (a)에서 수득한 감귤 진피 분말에 50 내지 90%(v/v) 메탄올을 첨가하여 추출하는 단계; (c) 상기 (b)에서 수득한 추출물을 여과하는 단계; (d) 상기 (c)에서 수득한 여과액의 용매를 제거하는 단계; (e) 상기 (d)에서 수득한 잔사를 메탄올에 용해하는 단계; (f) 상기 (e)에서 수득한 용액을 실리카 칼럼에 통과시키는 단계; (g) 상기 (f)단계 이후 헥산으로 상기 칼럼을 세척하는 단계; (h) 상기 (g)단계 이후 상기 칼럼에 에틸아세테이트를 통과시켜 용출하는 단계; (i) 상기 (h)에서 수득한 용출액의 용매를 제거하는 단계; (j) 상기 (i)에서 수득한 잔사를 메탄올에 용해하는 단계; 및 (k) 상기 (j)에서 수득한 용액으로 C₁₈ 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함하는 방법으로 제조된 것이 바람직하다.

[0010] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 (b)단계는 감귤 진피 분말 100중량부에 50 내지 90%(v/v) 메탄올 200 내지 1000중량부를 첨가하고, 초음파 추출법을 이용하여 추출하는 것이 바람직하다.

[0011] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 감귤은 하귤(*Citrus natsudaidai* Hayata) 또는 병귤(*Citrus platymamma* Hort. et Tanaka)인 것이 바람직하다.

[0012] 하귤의 진피를 사용하여 상기 방법에 따라 플라보노이드계 화합물을 제조할 경우, 나린진(naringin), 헤스페리딘(hesperidin), 폰시린(poncirin), 아이소메란진(isomeranzin), 시넨세틴(sinensetin), 테트라메틸-0-아이소스쿠텔라레인(tetramethyl-0-isoscutellarein), 노빌레틴(nobiletin), 헵타메톡시플라본(heptamethoxyflavone), 트리메톡시플라본(trimethoxyflavone) 및 탄제레틴(tangeretin)을 포함하는 플라보노이드계 화합물의 혼합물을 제조할 수 있다. 특히, 이때 사용된 하귤 진피 1kg을 기준으로 나린진 5010.0±4.5mg, 헤스페리딘 4121.2±0.9mg, 폰시린 82.2±0.2mg, 아이소메란진 2.6±0.1mg, 시넨세틴 0.6±0.1mg, 테트라메틸-0-아이소스쿠텔라레인 0.9±0.1mg, 노빌레틴 3.9±0.1mg, 헵타메톡시플라본 0.9±0.1mg, 트리메톡시플라본 2.3±0.1mg, 탄제레틴 5.1±0.1mg이 함유된 혼합물을 제조할 수 있다.

[0013] 상기 하귤의 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물의 혼합물은 간암세포의 세포생존(cell viability)을 감소시키고, 세포주기(cell cycle)에서 G1기(G1 phase)를 감소시키며, 세포자멸사(apoptosis)를 유도함으로써 효과적으로 간암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다. 특히 간암세포의 BaK 단백질의 발현 증가, Bcl-xL 단백질의 발현 억제, Caspase 패밀리 단백질의 발현 억제, PARP 단백질의 발현 억제, Akt 단백질의 인산화 억제 또는 P38 MAPK 단백질의 인산화 증가를 통해 세포자가사멸(apoptosis)을 유도할 수 있다.

[0014] 병귤의 진피를 사용하여 상기 방법에 따라 플라보노이드계 화합물을 제조할 경우, 네오에리오시트린(Neoeriocitrin), 나린진(naringin), 헤스페리딘(hesperidin), 아이소시넨세틴(isosinensetin), 시넨세틴(sinensetin), 테트라메틸-0-아이소스쿠텔라레인(tetramethyl-0-isoscutellarein), 노빌레틴(nobiletin), 테트라메톡시플라본(tetramethoxyflavone), 헵타메톡시플라본(heptamethoxyflavone), 탄제레틴(tangeretin) 및 하이드록시헵타메톡시플라본(hydroxypentamethoxyflavone)을 포함하는 플라보노이드계 화합물의 혼합물을 제조할

수 있다.

- [0015] 상기 병균의 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물의 혼합물은 간암세포의 세포생존(cell viability)을 감소시키고, 세포주기(cell cycle)에서 G1기(G1 phase)를 감소시키며, 세포자멸사(apoptosis)를 유도함으로써 효과적으로 간암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다. 특히 간암세포의 Caspase 패밀리의 단백질 발현 억제, Bcl-xL 단백질 발현 억제, P38 MAPK 단백질의 인산화 증가, JNK 단백질의 인산화 증가 또는 ERK 단백질의 인산화 증가를 통해 세포자멸사(apoptosis)를 유도할 수 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 C₁₈ 칼럼 크로마토그래피는 0.05 내지 0.2% 폼산 수용액(A용액)과 메탄올 및 아세트나이트릴을 1:0.5 내지 1:2의 비율(부피 기준)로 혼합한 용액(B용액)을 이동상으로 사용하되, 처음 5 내지 15분간은 B용액의 비율을 0%(v/v)에서부터 20 내지 30%(v/v)(나머지 A용액)로 점차 상승시키고, 이후 5 내지 15분간에 걸쳐 B용액을 60 내지 80%(v/v)(나머지 A용액)로 증가시키며, 다음 20 내지 40분 동안 B용액을 40 내지 60%(v/v)(나머지 A용액)로 하여 용리한 다음, B용액을 3 내지 7분 동안에 걸쳐 20 내지 30%(v/v)(나머지 A용액)로 감소시킨 다음 5 내지 15분 동안 B용액을 40 내지 60%(v/v)(나머지 A용액)로 하여 용리하는 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 흘림속도는 0.3 내지 0.7ml/min, 컬럼 온도는 30 내지 40℃로 하는 것이 바람직하다.
- [0017] 보다 바람직하게는 0.1% 폼산 수용액(A용액)과 메탄올 및 아세트나이트릴을 1:1의 비율(부피 기준)로 혼합한 용액(B용액)을 이동상으로 사용하되, 처음 10분간은 B용액의 비율을 0%(v/v)에서부터 25%(v/v)(나머지 A용액)로 점차 상승시키고, 이후 10분간에 걸쳐 B용액을 70%(v/v)(나머지 A용액)로 증가시키며, 다음 30분 동안 등용매로 용리한 다음, B용액을 5분 동안에 걸쳐 25%(v/v)(나머지 A용액)로 감소시킨 다음 10분 동안 등용매로 용리하는 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 흘림속도는 0.5ml/min, 컬럼 온도는 35℃로 하는 것이 좋다.
- [0018] 하술 진피를 사용한 경우 이러한 C₁₈ 칼럼 크로마토그래피 조건에서 retention time(머무름 시간)에 따라 각각의 플라보노이드계 화합물이 고농도로 함유된 분획을 수득할 수 있는데, retention time 16 내지 17분은 나린진, 18 내지 19분은 헤스페리딘, 30 내지 31분은 폰시린, 39 내지 40분은 아이소메란진, 41.5 내지 42.3분은 시넨세틴, 42.4 내지 43.5분은 테트라메틸-0-아이소스쿠텔라레인, 46 내지 47분은 노빌레틴, 47.5 내지 48.5분은 헵타메톡시플라본, 49.5 내지 50.1분은 트리메톡시플라본, 50.2 내지 51분은 탄제레틴에 해당된다.
- [0019] 병균 진피를 사용한 경우 이러한 C₁₈ 칼럼 크로마토그래피 조건에서 retention time(머무름 시간)에 따라 각각의 플라보노이드계 화합물이 고농도로 함유된 분획을 수득할 수 있는데, retention time 13.5 내지 14.5분은 네오에리오시트린, 16 내지 17분은 나린진, 18 내지 19분은 헤스페리딘, 40.5 내지 41.5분은 아이소시넨세틴, 42.5 내지 43.5분은 시넨세틴, 44.5 내지 45.5분은 테트라메틸-0-아이소스쿠텔라레인, 46 내지 46.5분은 노빌레틴, 46.6 내지 47.1분은 테트라메톡시플라본, 47.2 내지 48분은 헵타메톡시플라본, 50 내지 51분은 탄제레틴 및 51.1 내지 52분은 하이드록시펜타메톡시플라본에 해당된다.
- [0020] 본 발명의 조성물은 의약품 및 식품 등의 용도로 사용할 수 있다.
- [0021] 이때, 본 발명에 따른 플라보노이드계 화합물은 식품의약품안전청(KFDA)의 통상적인 약제학적 제제로의 제형화 기준 또는 건강보조식품의 제형 기준에 의거하여 제형화할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 통상적인 방법으로, 투여방법, 투여형태 및 치료목적에 따라 상기 유효성분을 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 혼합하여 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시킬 수 있다.
- [0023] 상기 담체가 희석제로 사용되는 경우에는 염수, 완충제, 텍스트로즈, 물, 글리세롤, 링거액, 락토즈, 수크로즈, 칼슘 실리케이트, 메틸 셀룰로오스 및 에탄올로 이루어진 군에서 선택된 적어도 1종 이상의 담체를 사용한 경우 투여와 비경구투여용으로 분말, 과립, 주사액, 시럽, 용액제, 정제, 좌약, 페사리(pessaries), 연고, 크림 또는 에어로졸 등과 같은 제형으로 제조할 수 있다. 다만, 본 발명의 담체가 상기의 담체로 한정되는 것은 아니다. 이때, 비경구 투여는 경구 이외에 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강, 흡입 등을 통한 유효성분의 투여를 의미한다.
- [0024] 상기 제형에 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함하여 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 제형화 할 수 있다. 그리고 본 발명의 투여량은 환자의 상태, 투여 경로 및 투여 형태에 따라 조절될 수 있어 한정되지 않으며 증상에 따라 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 자명하게 다양한 범위 내에서 사용할 수 있으나, 통상적으로 본 발명에서는 실험적인 유효량으로 상기 플라보노이드계 화합물의 혼합물을 체중 1kg 당 0.1 내지 10mg을 하루에 연속적 또는

간헐적으로 투여가 가능할 것으로 판단된다.

[0025] 상기 플라보노이드계 화합물의 유효량을 기준으로, 본 발명은 플라보노이드계 화합물 그 자체 또는 식품학적으로 허용된 담체를 혼합한 조성물을 기본식이소재(其本食餌素材)로 포함하는 식품을 제공하는데, 상기 식품은 식육가공품, 어육제품, 두부, 목, 족, 라면이나 국수 등의 면류, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등의 조미식품, 소스, 과자, 발효유나 치즈 등의 유가공품, 김치나 장아찌 등의 절임식품, 과실, 채소, 두유, 발효음료 등의 음료수의 식품에 포함하여 사용할 수 있다. 이는 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 자명한 사항으로 이의 구체적인 조리 방법이나 생산 방법의 기재는 생략하기로 한다. 또한 식품학적으로 허용된 담체는 상술한 약제학적으로 허용된 담체도 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 조성물은 간암 세포의 세포활성(cell viability)을 억제하고, 세포 주기(cell cycle)에 영향을 미치며, Bak 단백질의 발현 증가, Bcl-xL 단백질의 발현 억제, Caspase 패밀리의 단백질 발현 억제, PARP 단백질 발현 억제, Akt 단백질의 인산화 억제, P38 MAPK 단백질의 인산화 증가, JNK 단백질의 인산화 증가 또는 ERK 단백질의 인산화 증가를 통해 세포자가사멸(apoptosis)을 유도함으로써 효과적으로 간암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 하굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 HPLC 분석 결과이다.
 도 2는 하굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물들의 구조를 나타낸 것이다.
 도 3은 플라보노이드 글리코사이드에서 각 부분의 명명법을 나타낸 것이다.
 도 4는 병굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 HPLC 분석 결과이다.
 도 5는 하굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포생존에 미치는 영향을 실험한 결과이다.
 도 6은 하굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포주기에 미치는 영향을 실험한 결과이다.
 도 7은 하굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포자멸사(apoptosis)에 미치는 영향을 실험한 결과이다.
 도 8은 하굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포자멸사에 미치는 영향을 실험한 TUNEL assay 결과이다.
 도 9는 하굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포자멸사 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 실험한 결과이다.
 도 10은 하굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포자멸사 관련 단백질의 인산화(활성화)에 미치는 영향을 실험한 결과이다.
 도 11은 병굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포생존에 미치는 영향을 실험한 결과이다.
 도 12는 병굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포주기에 미치는 영향을 실험한 결과이다.
 도 13은 병굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포자멸사에 미치는 영향을 실험한 결과이다.
 도 14는 병굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포자멸사에 미치는 영향을 실험한 double stain 실험 결과이다.
 도 15는 병굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포자멸사 관련 단백질(caspase3 및 caspase9)의 발현에 미치는 영향을 실험한 결과이다.
 도 16은 병굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포자멸사 관련 단백질(Bcl-xL 및

Bax)의 발현에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

도 17은 병균 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 HepG2 간암세포의 세포자멸사 관련 단백질(p38, JNK 및 ERK)의 인산화(활성화)에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

도 18은 감귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 간암 세포자멸사 관련 인자들에 미치는 영향을 도식화한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0029] **실시예 1. 감귤 진피를 사용한 플라보노이드계 화합물 제조**

[0030] 하귤 진피와 병귤 진피를 사용하여 각각의 플라보노이드계 화합물을 제조하였다.

[0031] 감귤 진피(100g)을 냉동건조(lyophilizer, PVTED50A, Ilsin Bio Base Co. Ltd, Yangju, Republic of Korea)한 다음 미세한 분말로 갈았다. 감귤 진피 분말(5g)에 70% 메탄올(30ml)을 첨가하여 2분 동안 균질화(PT-MR 2100, Kinematica, Lucerne, Switzerland)하였다. 균질화 혼합물을 vortex mixer(G560E, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)로 2분간 혼합한 후, 초음파 육조(Bransonic 3510R-DTH, Branson Ultrasonics Co., Banbury, USA)에서 10분간 추출하였다. 2회 반복 추출한 다음 시료를 혼합하고 여과지를 사용하여 여과한 후 3200×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 200ml 플라스크에 넣고 회전식 증발기(Eyela NVC-2100, Tokyo Rikakikai Co. Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 하에서 용매를 제거하였다. 잔사를 1ml 메탄올에 녹이고 실험실에서 제작한 실리카 카트리지(1.7×2cm)에 적재하였다. 5ml의 헥산으로 카트리지를 씻은 다음 5ml의 에틸아세테이트로 용리하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 잔사를 1ml의 메탄올에 재용해하여 0.45μm 셀룰로스 멤브레인에 통과시키고 실리콘 병에 옮긴 다음 분석실험을 할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0032] **실험예 1. 하귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 정제 및 구조 확인**

[0033] 상기 실시예 1에서 하귤 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물의 성분을 확인하였다.

[0034] C₁₈ 컬럼이 장착된 RP-HPLC, 양이온 모드로 작동하는 ESI-MS/MS 데이터와 보고되어 있는 데이터와의 비교를 통하여 분리된 플라보노이드 성분을 동정하였다.

[0035] HPLC 분석은 G1322A degasser, G1312A pump, G1313 autosampler 및 G1316A oven이 장착된 1100 series chromatography system(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 크로마토그래피 상의 분리는 Zorbax Stable Bond Analytical SB-C18 컬럼(4.6×250mm, 5μm, Agilent Technologies, MD, USA)으로 수행하였다. 이동상 용매 시스템은 0.1% 폼산 수용액(A)와 메탄올/아세트나이트릴(1:1)(B)로 이루어졌으며 처음 10분간 0 ~ 25% B, 10분간에 걸쳐 B를 70%로 증가시켰으며 다음 30분 동안 등용매로 용리한 다음 B를 5분 동안에 걸쳐 25%로 감소시킨 다음 10분 동안 등용매로 용리하였다. 흘림속도는 0.5ml/min, 컬럼 온도는 35℃, 각 실험에서 주입량은 10μl로 하였다. 크로마토그래피 데이터는 ChemStation, Rev.B.0301 프로그램을 사용하여 수집하였다. 전체 실험에서 250 ~ 600nm의 데이터를 2nm의 분해능으로 수집하였으며 플라보노이드의 정량은 280nm에서 크로마토그램을 추출함으로써 이루어졌다. 플라바논 화합물들의 정량은 모두 hesperetin의 외부 검량곡선을 사용하였으며, 폴리메톡시플라본 화합물들은 nobiletin의 검량곡선을 사용하여 정량하였다.

[0036] MS/MS 실험은 Turbo V™ source와 Turbo Ion Spray probe가 장착된 3200 QTRAP LC/MS/MS system(Applied Biosystems, Foster, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 질량 스펙트럼은 positive ion과 SIM 모드로 수행하였다. 긴강한 감귤의 총 14 MS/MS 전이와 병든 감귤의 16 MS/MS 전이가 모니터링 되었다. BioAnalyst™ 버전 1.4.2와 소프트웨어 버전 1.4.2를 기구조작과 데이터 수집에 각각 사용하였다. 질소를 안개 및 건조기체로 사용하였다. 두 기체의 압력은 45psi이었다. 전자분무 전압은 5.5 kV이었으며 소스 온도는 500℃이었다. 첫 번째 사중극자와 이온 트랩의 분해능은 0.6 및 0.8 사이였다(단위 분해능). 질량분석 스펙트럼은 0.05amu의 스텝사이즈로 m/z 50 ~ 800 사이에서 기록되었다.

[0037] 280nm 검출과장에서 기록된 각 추출물의 10 ~ 60분까지 부분 크로마토그램을 도시하면 도 1과 같다. 동정된 성분들의 MS/MS 데이터와 구조를 종합하면 표 1 및 도 2와 같다. MS/MS를 이용하면 아글리콘 골격, 탄수화물의 형태 또는 여러 가지 치환체의 존재, 글리칸(glycan)의 순서, 배당체들의 연결 및 아글리콘과 치환체의 결합위치에 관한 정보를 얻을 수 있다. 플라바논 글루코사이드의 생성이온을 설명하는 데는 Domon과 Costello에 의해 제

안된 glycoconjugate 명명법(Domon & Costello, 1988)이 이용되며 아글리콘으로부터 생성되는 이온들은 Ma와 Li에 의해 제안된 명명법이 이용된다(Ma *et al.*, 1997). 이들을 도시하면 도 3과 같다. $^{k,l}X_j$, Y_j and Z_j 은 아글리콘을 포함하고 있는 이온들을 나타내는데 여기서 j 는 아글리콘으로부터 계산했을 때 깨어지는 배당체간 결합의 수를 나타내고 k 와 l 은 탄수화물 고리 사이의 결합분해를 나타낸다. 글리칸 부분과 아글리콘 사이의 배당체 결합은 0으로 표시된다. 하전이 탄화수소 부분에 있을 때 생성이온들은 $^{k,l}A_i$ 와 B_i ,로 표시되는 데 여기서 $I(\geq 1)$ 는 환원되지 않는 말단으로부터 계산했을 때 분해되는 배당체 결합의 수를 나타낸다. $^{i,j}A_0^+$ 와 $^{i,j}B_0^+$ 는 손상되지 않은 A- 및 B-고리를 포함하고 있는 생성이온을 나타낸다. 여기서 어깨글자 i 와 j 는 분해되는 C-고리의 결합을 나타낸다. A 와 B의 오른쪽에 있는 무릎글자 0는 말단 당 단위를 포함하는 탄수화물 토막을 나타내는데 사용되는데 A_i^+ 와 $B_j^+(i \geq 1)$ 표지와 혼동하지 않도록 하기 위해 사용되고 있다.

표 1

[0038]

NO.	Compound	r . t (min)	[M+H] ⁺	Fragment (m/z)
1	Naringin	16.5	581	603[M+Na] ⁺ , 563[M+H-H ₂ O] ⁺ , 545[M+H-2H ₂ O] ⁺ , 527[M+H-3H ₂ O] ⁺ , 435[Y1+H] ⁺ , 419[Z1+H] ⁺ , 401[Z1+H-H ₂ O] ⁺ , 383[Z1+H-2H ₂ O] ⁺ , 365[Z1+H-3H ₂ O] ⁺ , 273[Y0+H] ⁺ , 149[1,4B0+H] ⁺ , 147[1,4B0+H-H ₂] ⁺ , 121[1,3B0+H] ⁺
2	Hesperidin	18.5	611	633[M+Na] ⁺ , 593[M+H-H ₂ O] ⁺ , 575[M+H-2H ₂ O] ⁺ , 557[M+H-3H ₂ O] ⁺ , 465[Y1+H] ⁺ , 449[Z1+H] ⁺ , 431[Z1+H-H ₂ O] ⁺ , 413[Z1+H-2H ₂ O] ⁺ , 395[Z1+H-3H ₂ O] ⁺ , 303[Y0+H] ⁺ , 179[1,4B+H] ⁺ , 177[1,4B0+H-H ₂] ⁺ , 151[1,3B0+H] ⁺
3	Poncirin	30.5	595	617[M+Na] ⁺ , 449[Y1+H] ⁺ , 433[Z1+H] ⁺ , 415[Z1+H-H ₂ O] ⁺ , 397[Z1+H-2H ₂ O] ⁺ , 379[Z1+H-3H ₂ O] ⁺ , 287[Y0+H] ⁺ , 179[0,4B0+H] ⁺ , 135[1,3B0+H] ⁺ , 113[1,2B0+H] ⁺
4	Isomeranzin	39.6	261	243, 201, 189, 177, 161, 159, 145, 131, 128, 115, 103
5	Sinensetin	42.2	373	358[M+H-CH ₃] ⁺ , 343[M+H-2CH ₃] ⁺ , 340[M+H-CH ₃ -H ₂ O] ⁺ , 329[M+H-CO ₂] ⁺ , 211[1,3A0+H] ⁺ , 162[1,3B0] ⁺ , 147[1,2B0-H ₂] ⁺
6	Tetramethyl-O-isoscutelarein	42.6	343	328[M+H-CH ₃] ⁺ , 313[M+H-2CH ₃] ⁺ , 299[M+H-CO ₂] ⁺ , 285[M+H-2CH ₃ -CO] ⁺ , 211[1,3A0+H] ⁺ , 181[1,3A0+H-2CH ₃] ⁺ , 135[0,2B0] ⁺ , 133[1,3B0+H] ⁺
7	Nobiletin	46.4	403	388[M+H-CH ₃] ⁺ , 373[M+H-OCH ₃] ⁺ , 355[M+H-H ₂ O-2CH ₃] ⁺ , 327[M+H-CH ₄ -2OCH ₃] ⁺ , 241[1,3A0+H] ⁺ , 211[1,3A0+H-OCH ₃] ⁺ , 181[1,3A0+H-2OCH ₃] ⁺ , 165[0,2B0] ⁺ , 151[1,3A0+H-3OCH ₃] ⁺
8	Heptamethoxyflavone	48.1	433	403[M+H-2CH ₃] ⁺ , 385[M+H-2CH ₃ -H ₂ O] ⁺ , 241[1,3A0+H] ⁺ , 211[1,3A0+H-2CH ₃] ⁺ , 193[1,3B0+H] ⁺ , 165[0,2B0] ⁺ , 149[1,2B0] ⁺
9	Trimethoxyflavone	49.8	313	298, 269, 255, 181
10	Tangeretin	50.7	373	358[M+H-CH ₃] ⁺ , 343[M+H-2CH ₃] ⁺ , 325[M+H-OCH ₃ -H ₂ O] ⁺ , 297[M+H-2CH ₃ -H ₂ O-CO] ⁺ , 241[1,3A0+H] ⁺ , 211[1,3A0-2CH ₃] ⁺ , 135[0,2B0] ⁺

[0039]

실험예 2. 병글 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 정제 및 구조 확인

[0040]

상기 실험예 1과 동일한 방법을 사용하여 상기 실시예 1에서 병글 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물의 성분을 확인하였다.

[0041]

280nm 검출과장에서 기록된 각 추출물의 10 ~ 60분까지 부분 크로마토그램을 도시하면 도 4와 같다. 동정된 성분들의 MS/MS 데이터와 구조를 종합하면 표 2 및 도 5와 같다.

표 2

[0042]

NO.	Compound	RT (min)	[M+H] ⁺ /[M-H] ⁻	MS/MS
1	Neeriocitrin	13.85	-/595	459, 329, 311, 287, 151, 135, 107

2	Naringin	16.78	-/579	459, 313, 271, 193, 151
3	Hesperidin	18.43	-/609	608, 325, 301
4				
5				
6				
7				
8	Isosinensetin	41.07	373	358, 357, 343, 329, 181, 165
9	Sinensetin	43.09	373	358, 357, 343, 340, 329, 312, 162
10	Tetramethyl-o-isoscutellarein	45.19	343	328, 313, 299, 285, 240, 152, 133
11	Nobiletin	46.30	403	388, 373, 355, 327, 241, 211, 165
12	Tetramethoxyflavone	46.95	343	327, 313, 282, 150
13	Heptamethoxyflavone	47.50	433	418, 403, 385, 211, 165
14	Tangeretin	50.43	373	358, 343, 325, 297
15	Hydroxypentamethoxyflavone	51.59	389	374, 359, 341, 165

실험예 3. 하귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 정량

9개 플라보노이드 성분들과 1개 쿠마린 유도체는 280nm에서 기록된 HPLC-UV 크로마토그램 상의 피크면적으로부터 정량하였다. 이들은 같은 그룹의 대표적인 플라보노이드 표준물질을 기초로 유효화하였다. 즉, 플라바논, 플라본 및 쿠마린 유도체들은 각각 hesperetin, nobiletin 및 coumarin을 사용하여 유효화하였다. 검량곡선은 각 표준물질의 회기분석을 통해 작성하였다. 회기방정식은 $y = ax + b$ 을 사용하였는데 여기서 y와 x는 각각 각 화합물의 피크면적과 농도를 나타낸다. 상관계수(r^2)는 hesperetin, nobiletin 및 coumarin에 대해 각각 0.9994, 0.9970 및 0.9981으로서 높은 값을 보여주었다. 검출한계(LOD)는 hesperetin, nobiletin 및 coumarin에 대해 각각 0.01, 0.10 및 0.02mg/ℓ 이었다. 정량한계(LOQ)는 hesperetin, nobiletin 및 coumarin에 대해 각각 0.05, 0.30 및 0.06mg/ℓ 이었다.

껍질에 있는 각 화합물의 양을 종합하면 표 3과 같다. 플라보노이드의 총량은 9229.7 ± 0.5 mg/kg이었다. 플라바논, 플라본 및 쿠마린 유도체의 화합물의 총량은 각각 9213 ± 0.3 , 13.7 ± 0.1 그리고 2.6 ± 0.1 mg/kg 이었다. Naringin의 양이 5010.0 ± 4.5 mg/kg으로 가장 많았으며 sinensetin의 양이 0.6 ± 0.1 mg/kg으로 가장 적었다.

표 3

NO.	Compound	Mean ^a ± SD ^b
1	Naringin	5010.0 ± 4.5
2	Hesperidin	4121.2 ± 0.9
3	Poncirin	82.2 ± 0.2
4	Isomeranzin	2.6 ± 0.1
5	Sinensetin	0.6 ± 0.1
6	Tetramethyl-O-isoscutellarein	0.9 ± 0.1
7	Nobiletin	3.9 ± 0.1
8	Heptamethoxyflavone	0.9 ± 0.1
9	Trimethoxyflavone	2.3 ± 0.1
10	Tangeretin	5.1 ± 0.1
Total		9229.7 ± 0.5

*^a mg/kg fresh peel weight.

*^b Standard deviation.

실험예 4. 하귤 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 암세포에 대한 활성

4-1. HepG2 세포의 viability에 미치는 영향

상기 실시예 1에서 하귤 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 HepG2의 viability에 미치는 영향을

조사하기 위하여 MTT 방법으로 24시간과 48시간 동안 다양한 농도의 플라보노이드계 화합물을 처리한 결과 cell viability가 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 그중 48시간 처리한 실험에서 더욱 뚜렷하게 cell viability가 감소하는 것을 확인 하였다(도 5 참조).

[0052] 4-2. HepG2 세포의 cell cycle에 미치는 영향

[0053] 상기 실시예 1에서 하굴 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 HepG2의 cell cycle에 미치는 영향을 알아보기 위하여 flow-cytometry를 이용하여 cell cycle phase를 분석하였다. 플라보노이드계 화합물을 처리하였을 때 유의한 subG1 phase의 증가를 확인하였고 이와 비례하여 G1 phase의 감소를 확인할 수 있었다(도 6 참조).

[0054] 4-3. HepG2 세포의 apoptosis에 미치는 영향

[0055] 상기 실시예 1에서 하굴 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용하여 cell stage를 확인하였다. 48시간 플라보노이드계 화합물을 처리한 결과, subG1 phase의 증가를 확인하였다. 이를 증명하기 위하여 Hoechst stain methods를 이용하여 핵 염색을 한 결과 뚜렷한 핵의 조각짐 현상을 확인하였다. 또한 subG1 phase의 증가를 확인하기 위하여 PI/annexin V 염색을 실시한 결과 apoptosis의 증가를 확인할 수 있었다(도 7 참조).

[0056] 4-4. HepG2 세포의 세포사멸에 미치는 영향

[0057] 상기 실시예 1에서 하굴 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 HepG2 cell 의 세포 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여 nuclear의 변화를 관찰하였다. TUNEL assay를 실시한 결과 플라보노이드계 화합물을 처리하였을 때 높은 수준의 DNA 손상을 확인하였다(도 8 참조).

[0058] Translation level에서의 apoptosis를 확인하기 위하여 western blot 실험을 통하여 관련 protein의 발현 패턴을 분석하였다. 그 결과, Bak 단백질의 증가 및 Bcl-xL 단백질의 감소를 통하여 mitochondria dependent pathway인 것을 확인하였으며, casapase family 및 PARP 단백질의 발현 감소를 통하여 apoptosis 최종 산물을 확인하였다. 또한 Mitochondrial membrane poteintial을 측정한 결과 플라보노이드계 화합물 처리군에서 비정상적인 mitocondira function이 확인되었다(도 9 참조).

[0059] 4-5. HepG2 세포의 apoptosis 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

[0060] Apoptosis를 일으키는 상위 신호전달 기전을 확인하기 위하여 MAPKs family 단백질인 P38 단백질을 각각 total form과 phosphorylation form으로 확인하였다. 또한 Akt/Pi3k 단백질의 발현정도를 확인하였다. Akt는 인산화 정도가 감소하여 activity를 감소시키는 것으로 확인하였고, MAPKs family protein의 경우 P38의 인산화 정도를 증가시키는 것으로 확인하였다(도 10 참조).

[0061] **실험예 5. 병굴 진피로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 암세포에 대한 활성**

[0062] 5-1. HepG2 세포의 viability에 미치는 영향

[0063] 상기 실시예 1에서 병굴 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 HepG2 의 viability에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTT 방법으로 24시간과 48시간 동안 다양한 농도의 플라보노이드계 화합물을 처리한 결과 cell viability가 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 그중 48시간 처리한 실험에서 더욱 뚜렷하게 cell viability가 감소하는 것을 확인 하였다(도 11 참조).

[0064] 5-2. HepG2 세포의 cell cycle에 미치는 영향

[0065] 상기 실시예 1에서 병굴 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 HepG2의 cell cycle에 미치는 영향을 알아보기 위하여 flow-cytometry를 이용하여 cell cycle phase를 분석하였다. 플라보노이드계 화합물을 처리하였을 때 유의한 subG1 phase의 증가를 확인하였고 이와 비례하여 G1 phase의 감소를 확인할 수 있었다(도 12 참조).

[0066] 5-3. HepG2 세포의 apoptosis에 미치는 영향

[0067] 상기 실시예 1에서 병굴 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용하여 cell stage를 확인하였다. 24시간 플라보노이드계 화합물을 처리한 결과, 핵응축 및 chromosome의 분해를 확인할 수 있었다. 이를 증명하기 위하여 Hoechst stain methods를 이용하여 핵 염색을 한 결과 뚜렷한 핵의 조각짐 현상을 확인하였다. 또한 chromosome의 분해를 확인하기 위

하여 ladder assay를 실시한 결과 apoptosis의 증가를 확인할 수 있었다(도 13 참조).

[0068] 5-4. HepG2 세포의 세포사멸에 미치는 영향

[0069] 상기 실시예 1에서 병균 진피를 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 HepG2 cell 의 세포 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여 nuclear의 변화를 관찰하였다. Double stain을 실시한 결과 플라보노이드계 화합물을 처리하였을 때 높은 수준의 apoptosis를 확인하였다(도 14 참조).

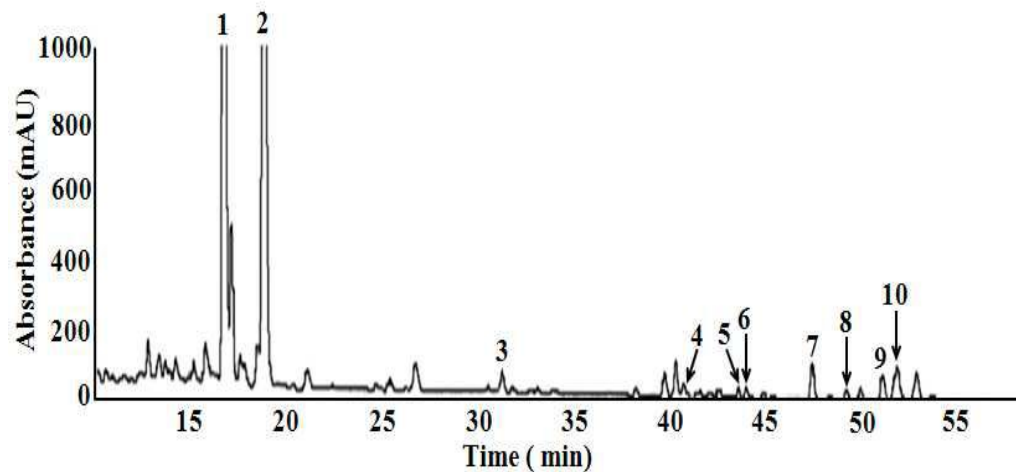
[0070] Translation level에서의 apoptosis를 확인하기 위하여 western blot 실험을 통하여 관련 protein의 발현 패턴을 분석하였다. 그 결과, Bcl-xL 단백질의 감소를 통하여 mitochondria dependent pathway인 것을 확인하였으며, casapase family 단백질의 발현 감소를 통하여 apoptosis 최종 산물을 확인하였다. 또한 Mitochondrial membrane poteintial을 측정한 결과 플라보노이드계 화합물 처리군에서 비정상적인 mitochondria function이 확인되었다(도 15 및 16 참조).

[0071] 5-5. HepG2 세포의 apoptosis 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

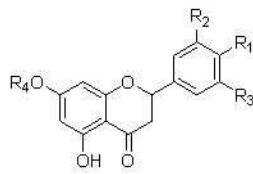
[0072] Apoptosis를 일으키는 상위 신호전달 기전을 확인하기 위하여 관련 단백질인 P38, JNK 및 ERK 단백질을 각각 total form과 phosphorylation form으로 확인하였다. 이의 결과 P38, JNK 및 ERK 단백질의 인산화 정도를 증가시키는 것으로 확인하였다(도 17 참조).

도면

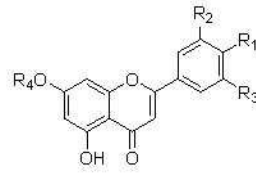
도면1



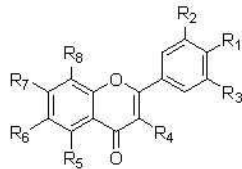
도면2



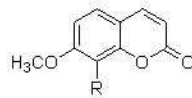
- 1: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{neohesperidosyl}$
 2: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_4 = \text{rutinosyl}$



- 3: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{neohesperidosyl}$

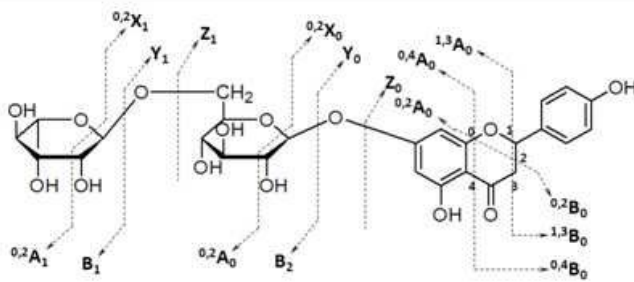


- 5: $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OCH}_3$, $R_3 = R_7 = R_8 = \text{H}$
 6: $R_1 = R_4 = R_6 = R_7 = \text{OCH}_3$, $R_2 = R_3 = R_8 = \text{H}$
 7: $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{OCH}_3$, $R_3 = R_8 = \text{H}$
 8: $R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_5 + R_6 + R_7 + R_8 = 7\text{CH}_3\text{O} + \text{H}$
 9: $R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + R_5 + R_6 + R_7 + R_8 = 3\text{CH}_3\text{O} + 5\text{H}$
 10: $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{OCH}_3$, $R_2 = R_3 = R_8 = \text{H}$

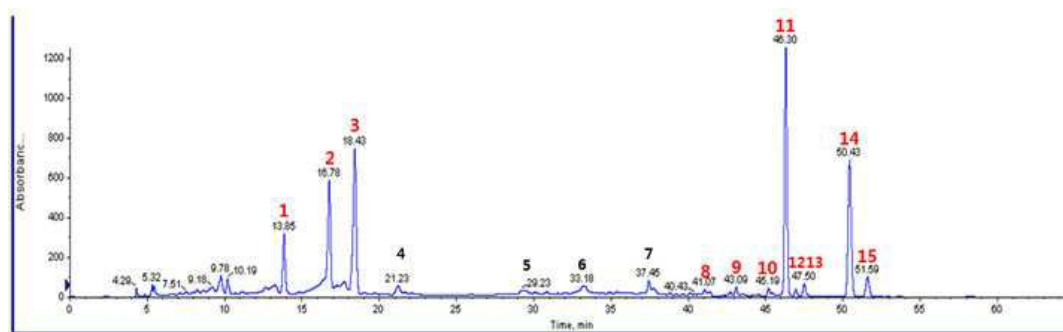


- 4: $\text{CH}_2\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$

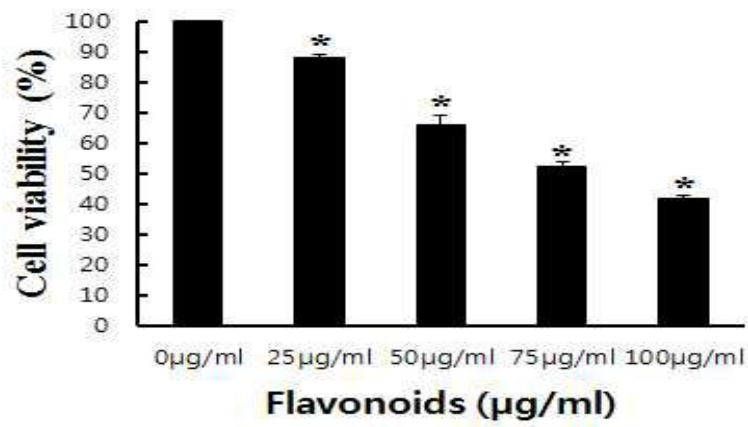
도면3



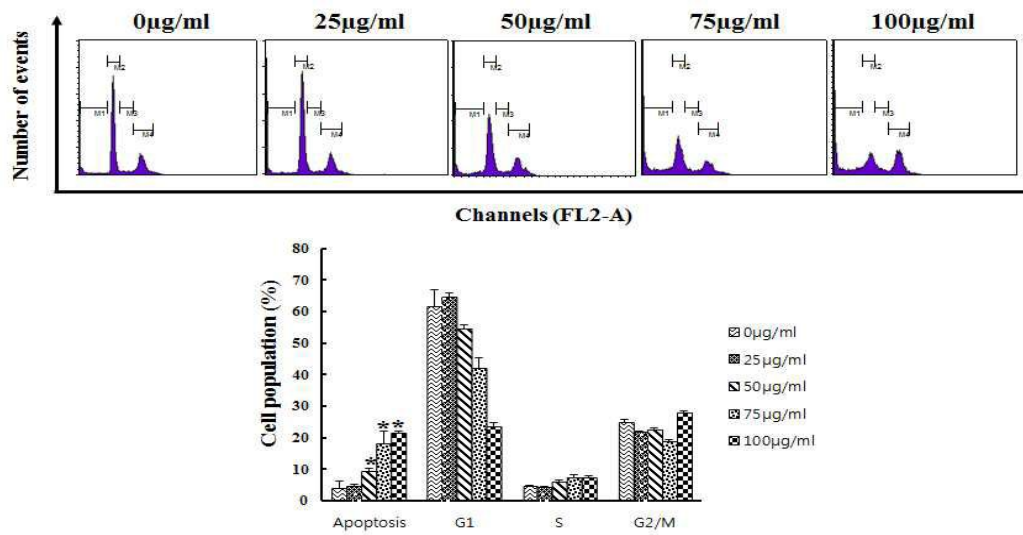
도면4



도면5

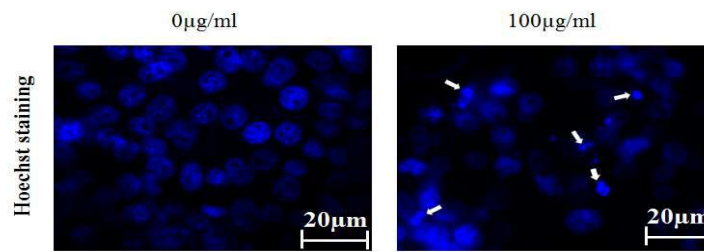


도면6

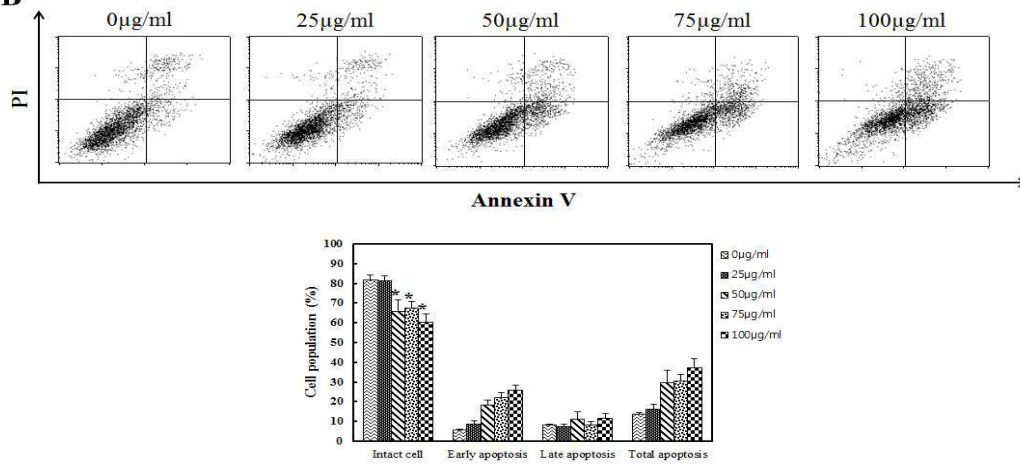


도면7

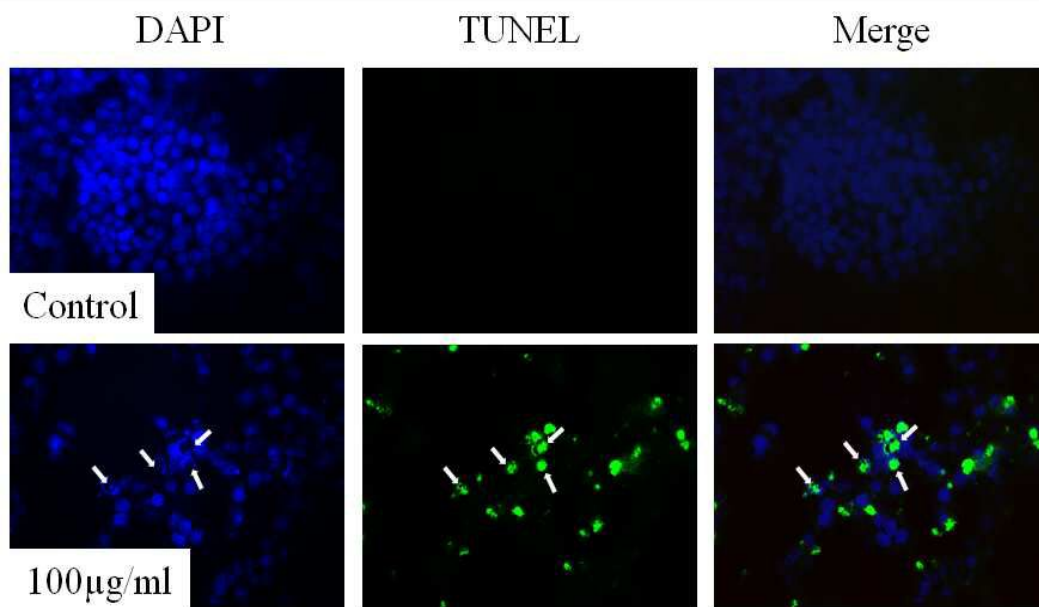
A



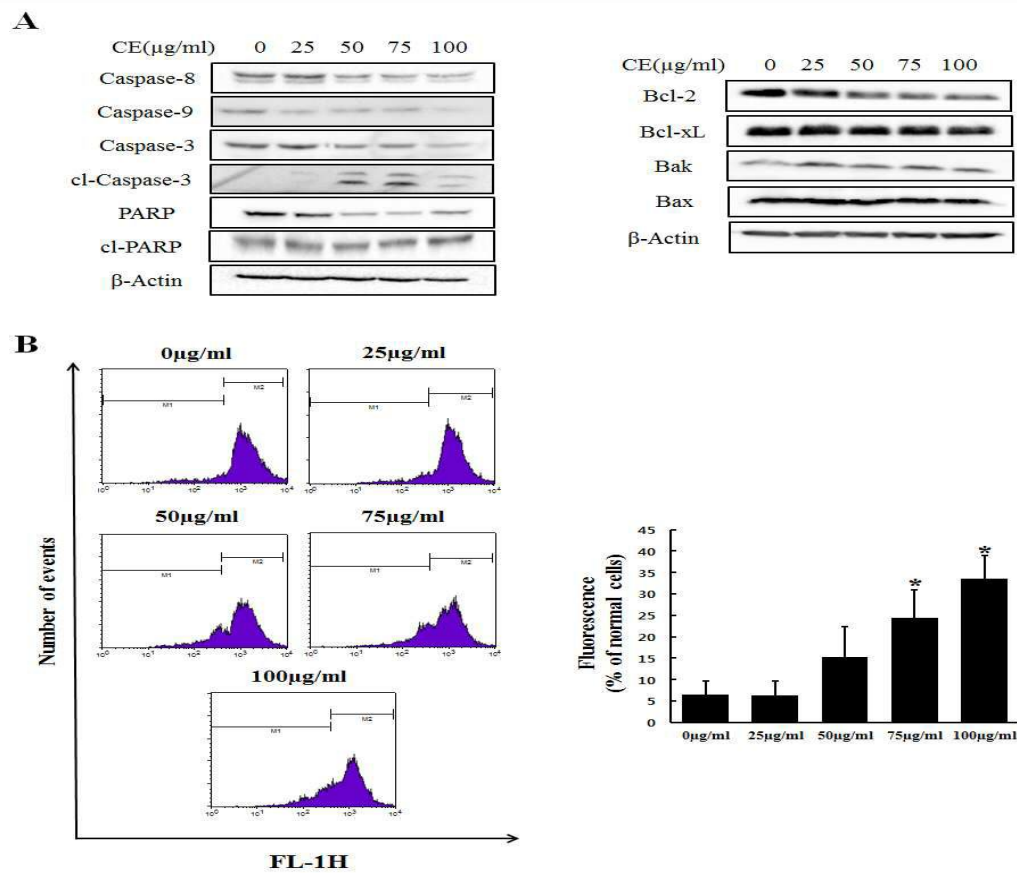
B



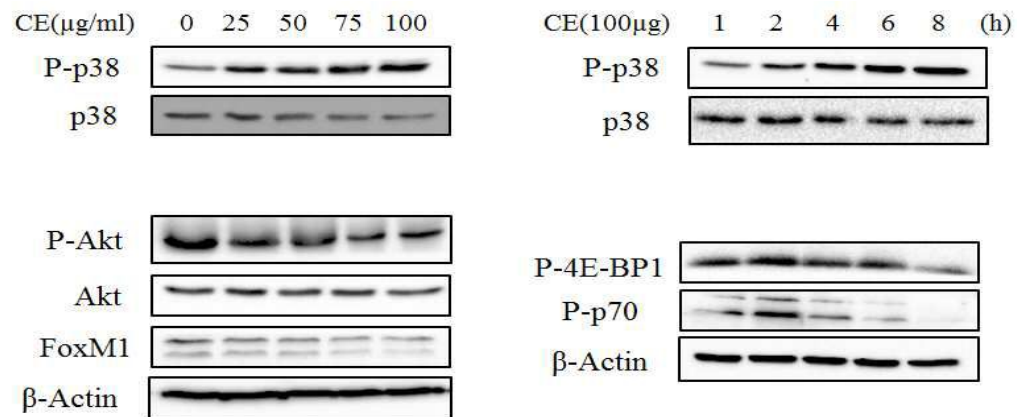
도면8



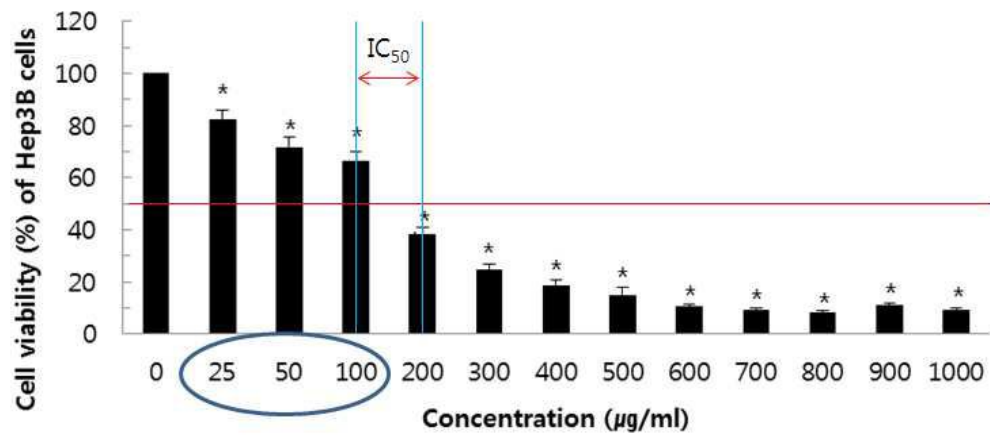
도면9



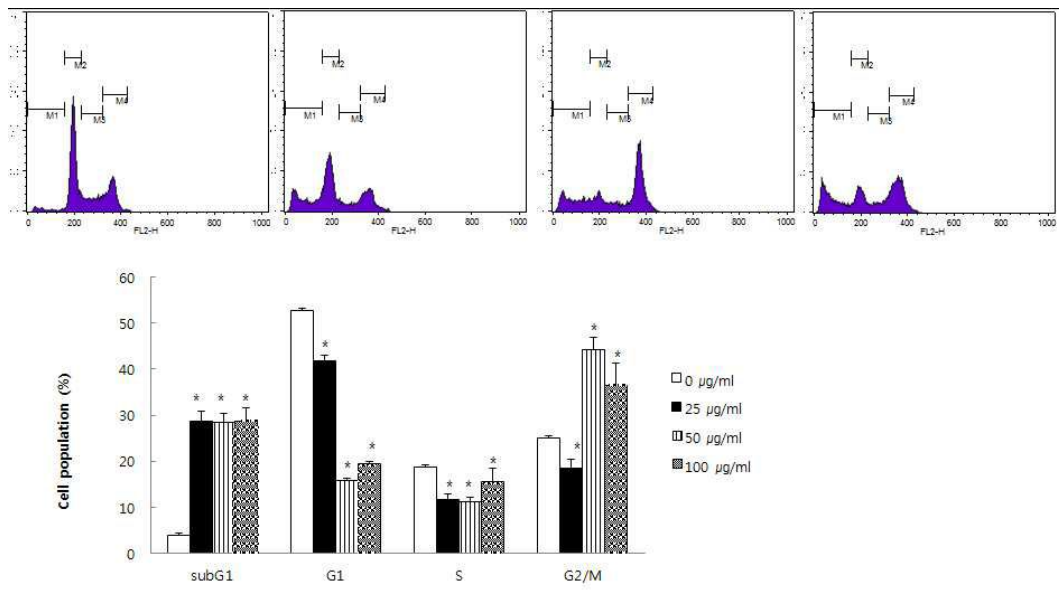
도면10



도면11



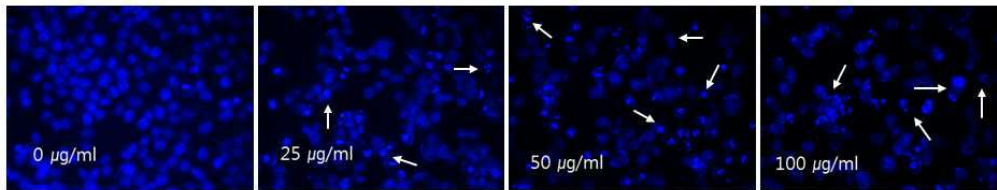
도면12



도면13

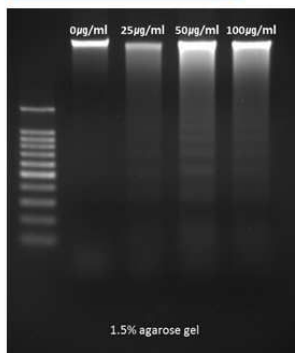
A Nuclear morphology

Fluorescence microscopic observation; Cells were stained with DAPI fluorescent dye.

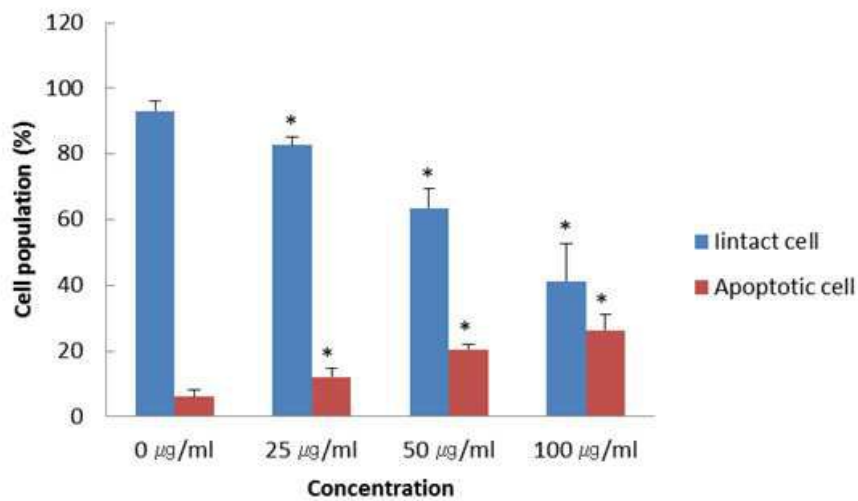


Arrows indicate chromatin condensation and nuclear fragmentation.

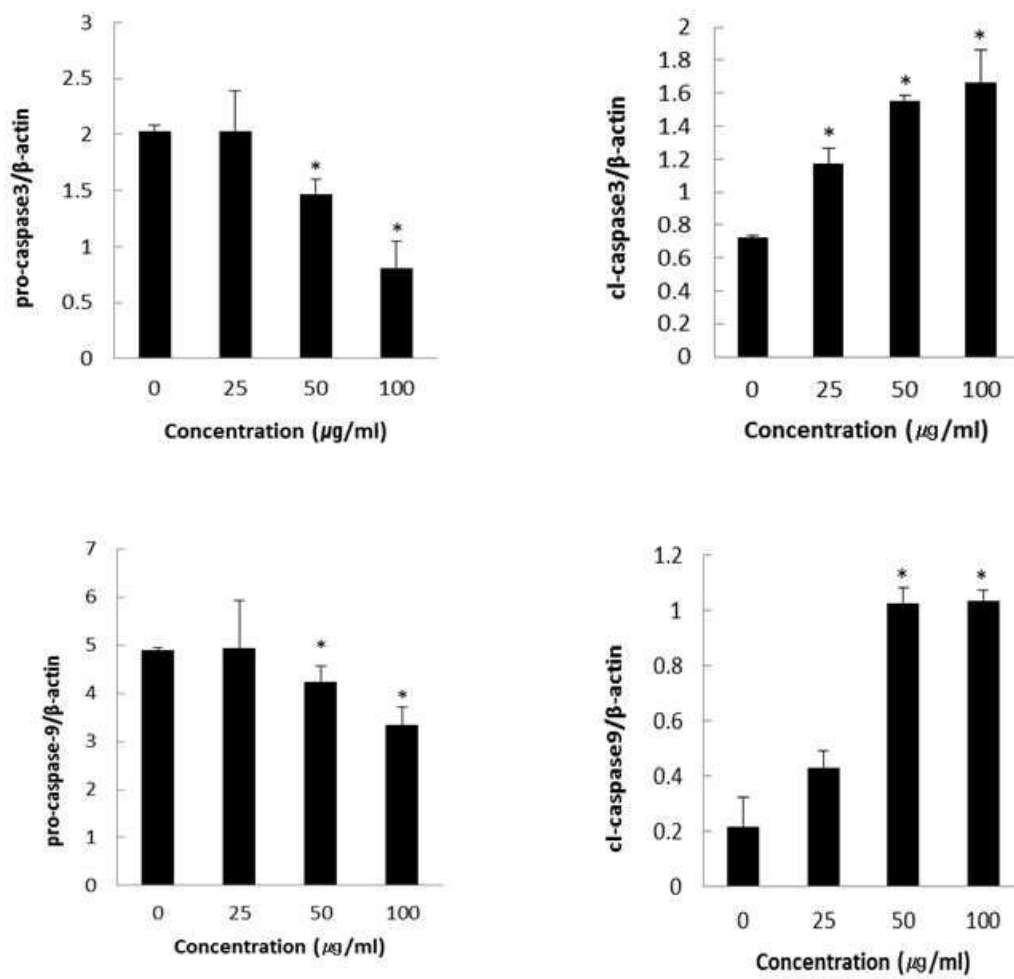
B DNA ladder assay



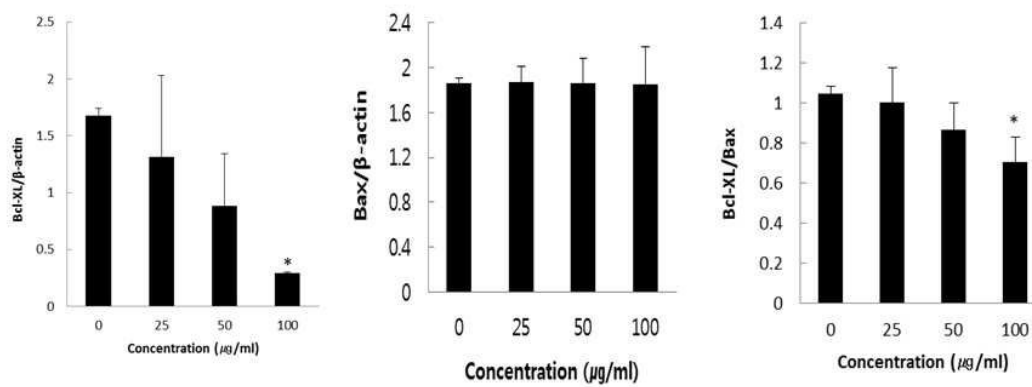
도면14



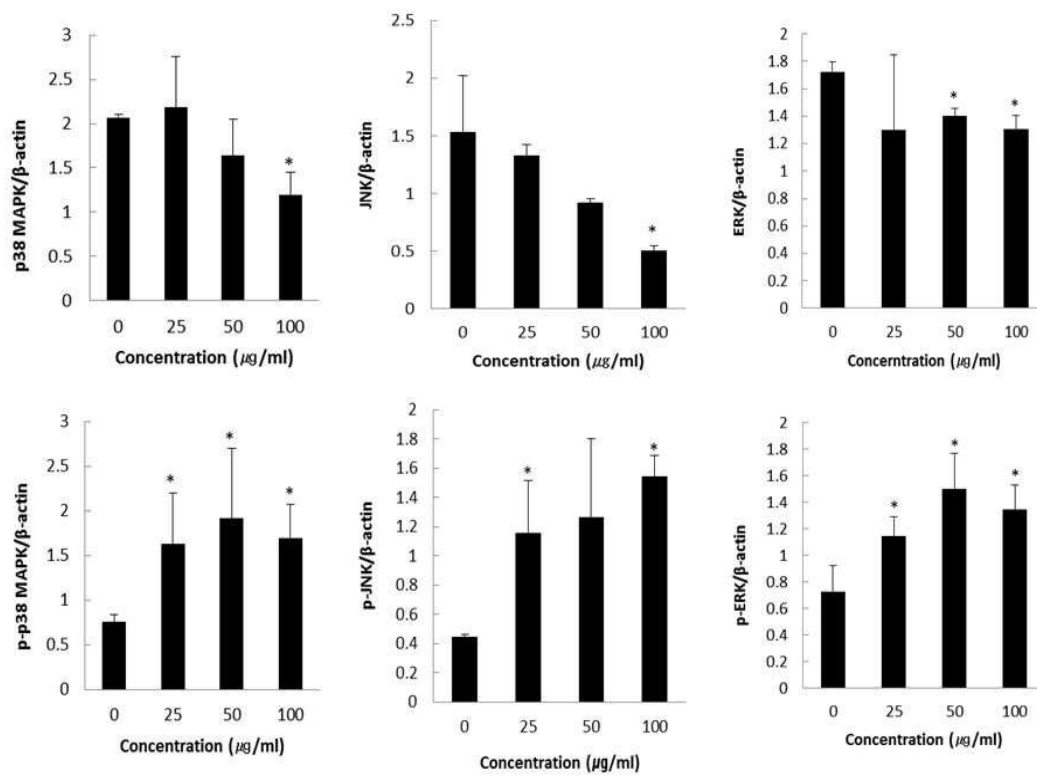
도면15



도면16



도면17



도면18

