(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0092618
(43) 공개일자 2025년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/8969 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/352 (2006.01) *A61K 31/366* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/8969 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0182972
(22) 출원일자 2023년12월15일
심사청구일자 2023년12월15일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김형근
경기도 수원시 영통구 반달로35번길 30 1635호 (영통역아이파크)
백남인
경기도 화성시 동탄순환대로21길 53 1306동 403호(청계동, 롯데캐슬 알바트로스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지담

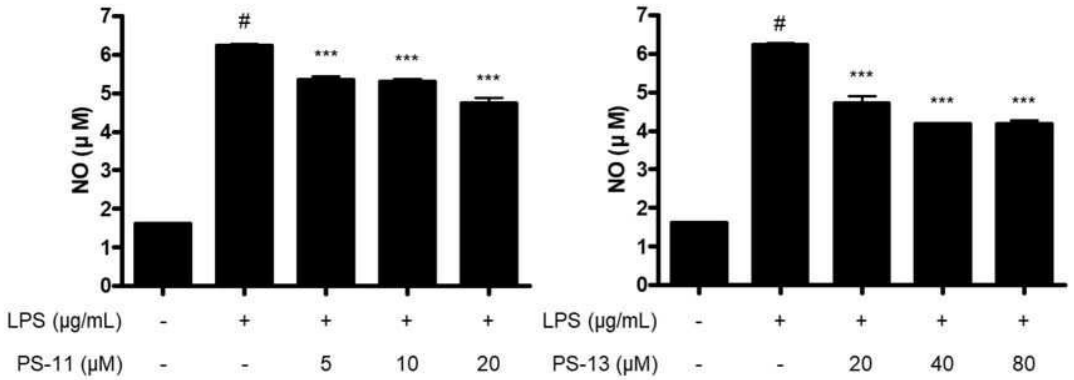
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **황정 유래 추출물을 포함하는 뇌염증반응 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 황정 유래 화합물을 유효성분으로 포함하는 뇌염증반응 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 뇌염증반응으로 인한 뇌 질환, 인지기능장애 개선 또는 치료의 용도로 활용될 수 있다. 본 발명에 따른 황정 유래 화합물은 염증반응이 유도된 마우스 미세아교세포에서, NO 생성을 억제하는 것을 확인하여, 뇌염증반응으로 인한 뇌질환, 인지기능장애 개선 또는 치료 효과가 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2023.05)
A61K 31/366 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자
방면호
경기도 수원시 장안구 경수대로976번길 22 한일타운 149동 302호(조원동, 수원 한일타운)

강동호
서울특별시 마포구 광성로6길 16 .(신수동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395064621
과제번호	PJ014204032020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	작물유용성분증진핵심기술개발(R&D)
연구과제명	특용작물 대사체 분리동정 및 스펙트럼 데이터 확보
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

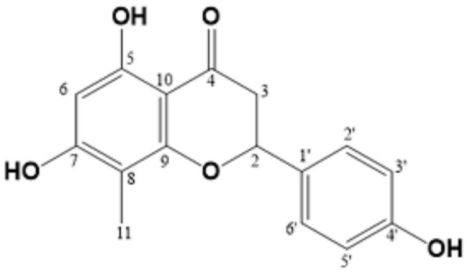
황정 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

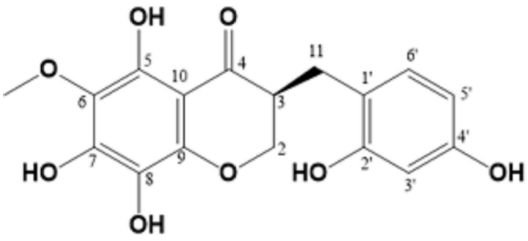
제 1항에 있어서,

상기 추출물은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것인, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식1]



[화학식2]



청구항 3

상기 추출물은 물, C1~C4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 뇌염증을 억제시키는 것인, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 미세아교세포에서 NO (nitric oxide) 생성을 억제하는 활성을 갖는 것인, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 뇌질환은 치매, 알츠하이머 질환, 뇌졸중, 뇌경색, 머리외상, 뇌동맥 경화증 및 파킨슨 질환으로 구성된 군에서 선택되는 것인, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

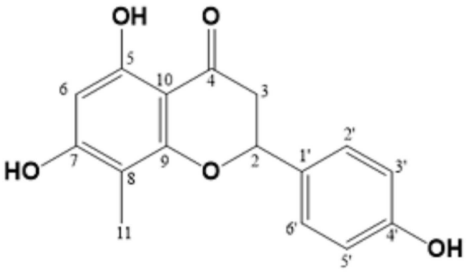
황정 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

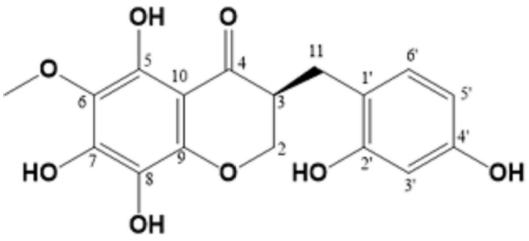
제 6항에 있어서,

상기 추출물은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것인, 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식1]



[화학식2]



청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 추출물은 물, C1~C4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인, 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제 6항에 있어서,

상기 조성물은 뇌염증을 억제시키는 것인, 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 11

제 6항에 있어서,

상기 조성물은 미세아교세포에서 NO (nitric oxide) 생성을 억제하는 활성을 갖는 것인, 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 12

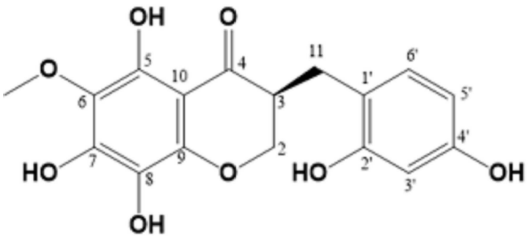
제 6항에 있어서,

상기 뇌질환은 치매, 알츠하이머 질환, 뇌졸중, 뇌경색, 머리외상, 뇌동맥 경화증 및 파킨슨 질환으로 구성된 군에서 선택되는 것인, 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 13

하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물 또는 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 2]



청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 화합물은 황정으로부터 분리된 것인, 화합물, 이의 입체이성질체, 용매화물 또는 약학적으로 허용가능한 염.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 황정 유래 화합물을 유효성분으로 포함하는 뇌염증반응 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 뇌염증반응으로 인한 뇌 질환, 인지기능장애 개선 또는 치료의 용도로 활용될 수 있다.

배 경 기 술

[0003] 빠른 의학기술의 발달로 인간의 수명이 연장되고, 고령화 사회로 접어들면서 퇴행성 뇌질환은 사회적 문제로 대두 되고 있다. 노령화 과정에서 발생하는 뇌 질환의 장애는 지속적으로 증가하며, 경제적, 사회적 부담을 증가시키고 있다. 이러한 이유로 뇌질환치료제의 약물개발은 매우 중요하다. 퇴행성 뇌질환은 나이가 들어감에 따라 발생하는 퇴행성 질환 중에서도 뇌에서 발생하는 질환을 뜻하며, 주요증상과 침범되는 뇌부위를 고려해 구분할

수 있는데, 대표적으로 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease)이나 파킨슨 질환 등이 포함된다. 퇴행성 뇌질환은 노화에 따른 신경퇴화와 유전적 및 환경적 요인들로 인해 단백질이 응집돼 신경세포의 사멸로 야기되는 것으로 알려져 있다. 또한, 퇴행성 뇌질환은 특정 뇌세포의 사멸 또는 퇴화가 일시적 또는 오랜 기간에 걸쳐 진행하는 것이 있는데, 한번 죽은 뇌세포는 재생이 되지 않기 때문에 결국 치명적인 뇌기능의 손실로 이어져 발생하는 것으로 알려져 있고, 특히, 인지기능, 감각기능, 운동기능, 전신기능의 진행성 저하를 수반하는 뇌기능 부전은 결국 성격과 행동의 변화를 가져오고, 환자들이 스스로 자신을 돌볼 수 없는 지경에 이르게 한다.

[0004] 미세아교세포(Microglia)는 신경계 퇴행성질환의 신경염증에 영향을 주는 주요세포로서 시냅스 리모델링, 다양한 신경성장인자의 분비, 뇌에 축적되는 다양한 찌꺼기(debris)를 제거하여 뇌의 신경세포 보존(neuronal integrity)과 사멸에 관여함으로써 생체 항상성 유지에 중요한 역할을 하고 있다. 최근 논문에 따르면 정상적인 환경에서는 이러한 미세아교세포의 기능이 잘 조절되지만, 신경계 퇴행성질환에서는 다양한 비접힘 또는 응집 단백질에 의해 미세아교세포가 활성화되며, 더불어 수적 변화와 기능 이상이 염증반응의 자극제로 작용하여 신경염증을 유발하여 신경계 퇴행성질환의 발생 및 질병 진행 정도에 영향을 준다고 밝혀지면서 신경계 퇴행성질환에서 미세아교세포의 손실 또는 기능 이상 현상이 강조되고 있다.

[0005] 황정은 백합과의 여러해살이풀 황정(Polygonatum sibiricum Redoute ex Redoute), 진황정(Polygonatum falcatum A. Gray), 층층둥굴레(Polygonatum stenophyllum maximowicz)의 뿌리줄기로, 관상동맥의 혈류량을 증가시키고 혈압을 내리며, 콜레스테롤 수치를 내려주고, 혈당의 상승작용을 억제시키는 한약재로 알려져 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 황정 추출물로부터 화합물을 분리, 동정하여 PS-11 및 PS-13의 호모이소플라바논 화합물이 염증반응이 유도된 마우스 미세아교세포에서 NO 생성을 억제하는 것을 확인하고, 황정 추출물 및 이로부터 동정한 화합물을 포함하는 뇌염증반응으로 인한 질환 치료용 조성물을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-1878460 B

발명의 내용

해결하려는 과제

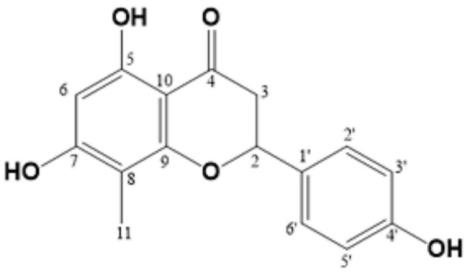
[0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 황정 추출물에서 분리한 호모이소플라바논 화합물을 포함하는 뇌염증을 억제시키는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 황정 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 호모이소플라바논 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

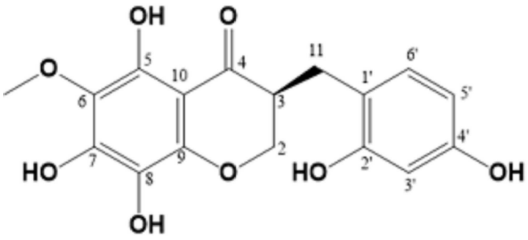
[0012] 본 발명에서 상기 추출물은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다:

[0014] [화학식1]



[0015]

[0016] [화학식2]



[0017]

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 물, C1~C4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 뇌염증을 억제시키고, 미세아교세포에서 NO (nitric oxide) 생성을 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0020] 본 발명에서 상기 뇌질환은 치매, 알츠하이머 질환, 뇌졸중, 뇌경색, 머리외상, 뇌동맥 경화증 및 파킨슨 질환으로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명은 또 다른 실시예에서 황정 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하며, 상기 조성물은 호모이소플라바논 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 황정 유래 화합물은 염증반응이 유도된 마우스 미세아교세포에서, NO 생성을 억제하는 것을 확인하여, 뇌염증반응으로 인한 뇌질환, 인지기능장애 개선 또는 치료 효과가 있다.

[0024] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 본 발명으로부터 기대할 수 있는 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명에 따른 황정 유래 호모이소플라바논(homoisoflavanone) 화합물 두 가지, 6-methoxy-8-hydroxy disporosin (PS-13) 및 8-methylnaringenin (PS-11) 를 나타낸다.

도 2는 PS-11 및 PS-13에 의한 마우스 미세아교세포의 세포생존율 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 PS-11 및 PS-13에 의한 마우스 미세아교세포에서의 항염증 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 여러가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 않는다.

[0028] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도

가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 발명의 명세서에서 어떤 구성요소를 '포함' 한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0029] 본 발명에서는 황정 유래 호모이소플라바논 화합물들 중 신규화합물 6-methoxy-8-hydroxy disporosin (PS-13)과 8-methylnaringenin (PS-11)의 뇌염증반응 회복 효과를 확인하고자, 마우스 미세아교세포의 MTT assay 를 통해 먼저 5, 10, 20, 40, 80 μM 의 농도로 세포생존율을 측정하여 PS-11의 경우 20 μM 이하의 농도에서, PS-13 의 경우 모든 농도에서 독성이 없음을 확인하였다.

[0030] 또한, LPS로 염증반응이 유도된 마우스 미세아교세포에서 NO 생성 억제능을 확인한 결과, PS-11의 경우 5 μM 이상의 농도에서 농도의존적인 생성억제능이 나타났으며, PS-13의 경우 20μM 이상의 농도에서 농도의존적인 생성억제능을 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과를 통해서 황정 유래 호모이소플라바논 화합물들이 뇌염증반응으로 인한 뇌질환, 인지기능장애의 개선 또는 치료에 효과가 있음이 알 수 있었다.

[0031] 본 발명에서 상기 "예방"이란, 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 뇌염증으로 인한 뇌질환 관련 증상을 차단하거나, 진행을 억제 또는 지연시킬 수 있는 모든 행위라면 제한없이 포함될 수 있고, 상기 "치료"란, 목적하는 질병의 완화 및 개선을 위해 수행되는 일련의 활동을 의미한다.

[0032] 본 발명의 "약학적 조성물"은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함할 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한다. 또한, 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다. 경구용 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구용 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 비경구용 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함한다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구, 피부, 피하, 근육, 정맥내, 복강내, 직장내, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사, 국소적 투여에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 정제, 캅셀제, 수성액제 또는 현탁제 등의 다양한 형태로 제제화될 수 있다. 경구용 정제의 경우 락토즈, 옥수수 전분 등의 담체 및 마그네슘 스테아레이트와 같은 활택제가 통상 가해질 수 있다. 경구투여용 캅셀제의 경우, 락토즈 및/또는 건조 옥수수 전분이 희석제로서 사용될 수 있다. 경구용 수성현탁제가 필요할 경우, 활성성분을 유화제 및/또는 현탁화제와 결합시킬 수 있다. 필요할 경우, 특정 감미제 및/또는 향미제를 가할 수 있다. 근육내, 복강내, 피하 및 정맥내 투여의 경우, 활성성분의 멸균 용액이 통상 제조되며, 용액의 pH를 적합하게 조절하고 완충시켜야 한다. 정맥내 투여의 경우, 용질의 총 농도는 제제에 등장성이 부여되도록 조절되어야 한다. 본 발명에 따른 조성물은 pH가 7.4인 염수와 같은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 수용액제의 형태일 수 있다. 상기 용액은 국소 주사로 환자의 근육내 혈류에 도입될 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물에 함유되는 유효성분의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 유효성분 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르며, 환자에 따라 적절하게 조절될 수 있다. 예를 들면, 상기 유효성분은 1일 0.0001 내지 300 mg/kg으로, 바람직하게는 50 내지 300 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 두번에 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.001 내지 90 % 중량 백분율로 포함할 수 있다.

[0035] 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0036] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에서 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규 격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면 류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0037] 본 발명의 건강기능식품은 뇌질환을 예방 또는 개선하는 것을 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여 화합물을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백 분율로 포함할 수 있다. 또한, 뇌질환을 예방 또는 개선하는 것을 목적으로, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명의 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[0040] **황정 추출물로부터 화합물 PS-11 및 PS-13의 분리**

[0041] 황정 (Polygonatum Sibiricum roots) 10.0 Kg을 80% MeOH 로 3번 반복 추출하여 MeOH 추출물 3.3 Kg을 얻었다. 얻은 추출물을 물 (8.2 L) 과 EtOAc (8.2 L X 3) 로 분배 추출하여 27 g 의 EtOAc 분획물 (PSE) 을 얻었다. 분획 후의 물층과 *n*-BuOH (6.6 L X 3) 로 분배 추출하여 194 g 의 *n*-BuOH 분획물 (PSB) 을 얻었다.

[0042] PSE 27g 을 SiO_2 Column Chromatography (Φ10 X 16 cm, *n*-hexane-EtOAc=15:1 → 10:1 → 5:1 → $CHCl_3$-MeOH=20:1) 을 실시하여 25개의 분획 (PSE-1~PSE-23) 을 얻었다. PSE-7 [1.01 g, Ve/Vt=0.116-0.172] 을 SiO_2 c.c (Φ 5 X 16 cm, $CHCl_3$-MeOH=40:1) 을 실시하여, 총 6개의 분획을 얻었다. PSE-7-4 [131.8 mg, Ve/Vt=0.233-0.373] 을 ODS c.c (Φ 3.5 X 6 cm, MeOH-H_2O=1:2) 을 실시하여, 총 7개의 분획을 얻었다. PSE-7-4-2 [48 mg, Ve/Vt=0.09-0.14] 을 ODS c.c (Φ 1.5 X 6 cm, acetone-H_2O=1:1) 을 실시하여, 총 14개의 분획을 얻었고, 이 중 PS-11 (8-methylnaringenin; PSE_7-4-2-11 , 4 mg , SiO_2 TLC R_f 0.5 , $CHCl_3$-MeOH=10-1 , ODS TLC R_f 0.425, acetone-H_2O=3-2) 을 분리하였다.

[0043] PSE-10 [719.6 mg, Ve/Vt=0.228-0.265]을 SiO_2 c.c (Φ 4.5 X 16 cm, $CHCl_3$-MeOH=20:1)을 실시하여, 총 9개의 분획을 얻었다. PSE-10-9 [201.3 mg, Ve/Vt=0.764-1.000] 를 ODS c.c. (Φ 3.5 × 6 cm, MeOH-H_2O=1:2) 을 실시하여, 총 8개의 분획을 얻었다. PSE-10-9-3 [66.6 mg, Ve/Vt=0.133-0.216] 을 ODS c.c. (Φ 3 × 6 cm, MeOH-H_2O=1:1) 을 실시하여, 총 10개의 분획을 얻었고, 이 중 PS-13 (6-methoxy-8-hydroxy disporosin; PSE-10-9-3-5, 8.4 mg , SiO_2 TLC R_f 0.575, $CHCl_3$-MeOH-H_2O=15-3-1, ODS TLC R_f 0.5, MeOH-H_2O=2-1) 을 분리하였다.

[0045] **화합물 PS-11 및 PS-13의 분리 확인 및 구조 분석**

[0046] PS-11은 ^{1}H-NMR (600 MHz, Methanol-d_4, δ_H) spectrum 관측시 네 개의 olefin methine proton signal δ_H 7.33 (2H, d, *J*=9.0 Hz, H-2′ , 6′), δ_H 6.84 (2H, d, *J*=9.0 Hz, H-3′ , 5′) 을 통해 *para*-2치환 벤젠 구조를, 하나의 olefin methine proton signal δ_H 5.95 (1H, s, H-6)를 통해 1,2,3,4,5-5치환 벤젠 구조가 존재함을 예상하였다. 또한 하나의 oxygenated methine δ_H 5.33 (1H, dd, *J*=12.8, 3.0 Hz, H-2), 하나의 methylene δ_H 3.12 (1H, dd, *J*=16.6, 12.8 Hz, H-3a)/ 2.71 (1H, dd, *J*=16.6, 3.0 Hz, H-3b)을 관측하였고, 이를 통해 이 화합물이 flavanone 화합물임을 예상하였다. 하나의 methyl δ_H 1.97 (3H, s, H-11) 역시 관측하였다. ^{13}C-NMR (150 MHz, Methanol-d_4, δ_C) spectrum에서 탄소수가 16개임을 확인하였고, 이를 통해 flavanone임을 확인하였다. δ_C 196.34 (C-4; ketone), δ_C 165.18, 161.19, 161.02, 157.59, (C-7, 5, 9, 4′ ; oxygenated olefin

quaternaries), δ_C 129.89, 103.96, 101.62 (C-1′ , 8, 10; olefin quaternaries), δ_C 127.59 (x2), 114.90 (x2), 93.97 (C-2′ , 6′ , 3′ , 5′ , 6; olefin methines), δ_C 79.03 (C-2; oxygenated methine), δ_C 42.78 (C-3; methylene), δ_C 5.56 (C-11; methyl)를 확인하였다. 이 데이터들을 종합하여 PS-11을 8-methylnaringenin 으로 구조 동정 하였다.

[0047] PS-13은 ^{1}H-NMR (600 MHz, Methanol-d_4, δ_H) spectrum 관측시 세 개의 olefin methine proton signal δ_H 6.90 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5′), δ_H 6.32 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-2′), δ_H 6.26 (1H, dd, *J*=8.4, 2.4 Hz, H-6′) 을 통해 1,2,4-3치환 벤젠 구조가 존재함을 예상하였다. 또한 하나의 oxygenated methylene δ_H 4.33 (1H, d, *J*=11.4 Hz, H-2a)/ 4.20 (1H, d, *J*=11.4 Hz, H-2b), 하나의 methine δ_H 2.98 (1H, m, H-3), 하나의 methylene δ_H 3.16 (1H, d, *J*=13.8 Hz, H-11a)/ 2.61 (1H, d, *J*=13.8 Hz, H-11b)을 관측하였고, 하나의 methoxy δ_H 3.74 (3H, s, OCH_3-6) 역시 관측하였다. ^{13}C-NMR (150 MHz, Methanol-d_4, δ_C) spectrum에서 탄소수가 17개임을 확인하였다. δ_C 198.69 (C-4; ketone), δ_C 156.96, 156.21, 154.33, 145.50, 140.69, 129.34, 128.35 (C-4′ , 2′ , 5, 9, 7, 6, 8; oxygenated olefin quaternaries), δ_C 115.36, 101.28 (C-1′ , 10; olefin quaternaries), δ_C 131.20, 106.06, 102.11 (C-6′ , 5′ , 3′ ; olefin methines), δ_C 69.49 (C-2; oxygenated methylene), δ_C 60.03 (OCH_3-6; methoxy), δ_C 45.11 (C-3; methine), δ_C 26.81 (C-11; methylene) 을 확인하였다. 이 데이터들을 종합하여 PS-13을 신규화합물인 6-methoxy-8-hydroxy disporosin 으로 구조 동정 하였다.

[0049] **세포 독성 분석**

[0050] 마우스 미세아교세포의 MTT assay 를 통해 먼저 5, 10, 20, 40, 80 μM 의 농도로 세포생존율을 측정하여 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, PS-11의 경우 20 μM 이하의 농도에서 독성을 나타내지 않았으며 PS-13 의 경우 모든 농도에서 독성이 없음을 확인하였다.

[0052] **염증반응이 유도된 미세아교세포에서의 항염증 효과 확인**

[0053] BV2 세포주에서 배지로 분비된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 측정하였으며, BV2 세포를 24-well plate에 2×10^5cell/mL의 농도로 접종한 후, 분리 화합물을 각각 3시간 동안 처리하였다. 그 후 LPS(1 μg/mL)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 배양 배지 100 μL와 동량의 Griess 시약 (SigmaAlderich, St. Louis, MO)을 15분간 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더기(microplate reader)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 아질산나트륨(sodium nitrite) 의 standard curve를 기준으로 하여 측정하였다. 대조군으로는 무처리 대조군인 Control 군과, LPS를 단독 처리한 LPS 군을 이용하였다.

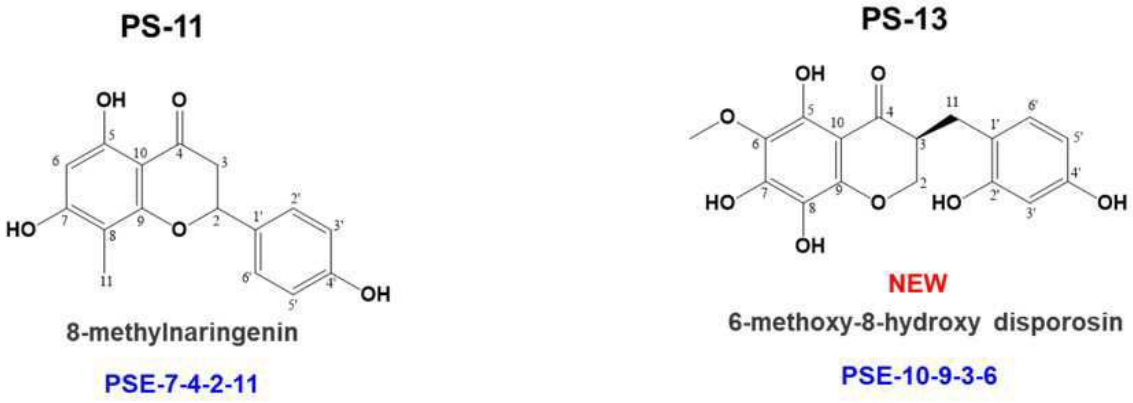
[0054] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, PS-11의 경우 5 μM 이상의 농도에서 농도의존적인 생성억제능을 나타내었고, PS-13의 경우 20μM 이상의 농도에서 농도의존적인 생성억제능을 나타냄을 확인하였다.

[0055] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

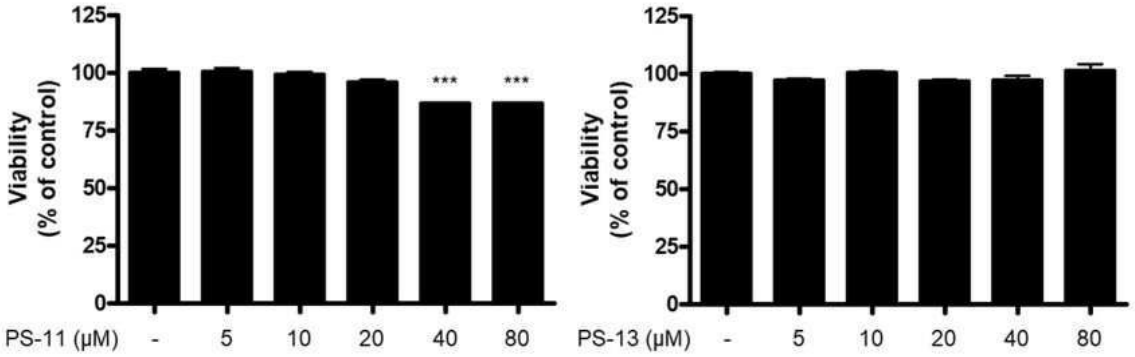
[0056] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

