(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0014596
(43) 공개일자 2017년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/539 (2006.01) *A61K 31/35* (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/539 (2013.01)
A61K 31/35 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0108243
(22) 출원일자 2015년07월30일
심사청구일자 2015년07월30일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김곤섭
경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 101동 1402호 (평거동, 들말대경아파트)
(74) 대리인
박지호, 문경혜

전체 청구항 수 : 총 4 항

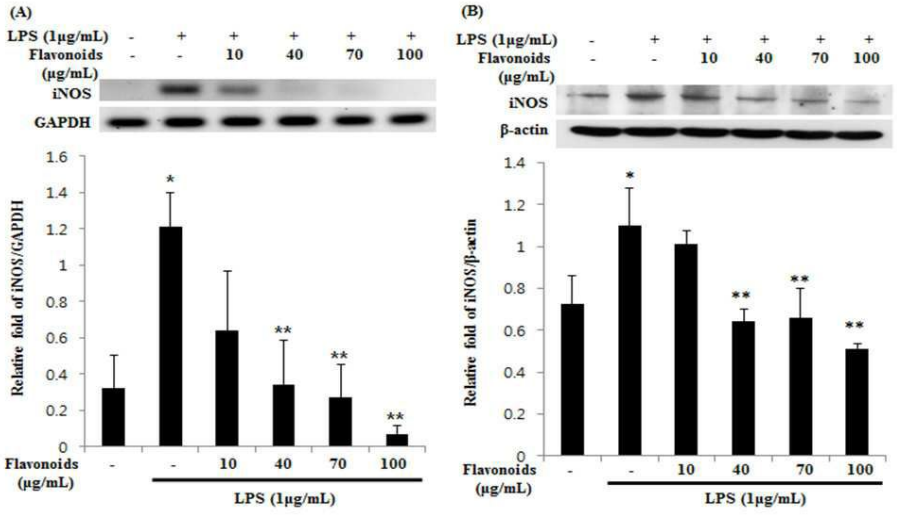
(54) 발명의 명칭 **황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하여 세포의 생존률에는 영향을 미치지 않으면서 항산화력을 나타내고 염증반응에 관여하는 여러 단백질의 작용을 저해함으로써 우수한 항염증 활성을 나타내는 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 염증반응에 의한 ERK, JNK, p38 단백질의 인산화(활성화) 저해, 염증반응에 의한 I-κB 단백질의 인산화(활성화) 저해 및 분해 저해, 염증반응에 의한 NF-κB p65 단백질의 핵(nucleus)내 전이 저해, 염증반응에 의한 COX-2 단백질의 발현 저해, 염증반응에 의한 iNOS 단백질의 발현 저해, 또는 염증반응에 의한 사이토카인(TNF-α, IL-6)의 발현 저해를 통해 효과적으로 염증성 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61K 31/353 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 플라보노이드계 화합물은

(a) 황금을 냉동건조 및 분말화하는 단계;

(b) 상기 (a)에서 수득한 황금 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 C_{18} 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함하는 방법으로 제조된 것임을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 플라보노이드계 화합물은

펜타하이드록시플라바논(pentahydroxyflavanone), 비사이둘린 I-O-디글루코시드(viscidulin I-O-diglucoside), 펜타하이드록시플라본(pentahydroxyflavone), 테트라하이드록시플라본(tetrahydroxyflavone), 이리딘(iridin), 에리오딕티올(4'-하이드록시나린제닌)(eriodictyol(4'-hydroxynaringenin)), 푸에라린(puerarin), 바이칼린(baicalin), 스쿠텔라레인(scutellarein) 및 아이소스쿠텔라레인(isoscutellarein)을 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 조성물은 ERK 단백질의 인산화 저해, P38 MAPK 단백질의 인산화 저해, JNK 단백질의 인산화 저해, I-κB 단백질의 인산화 및 분해 저해, NF-κB p65 단백질의 핵(nucleus)내 전이 저해, COX-2 단백질의 발현 저해, iNOS 단백질의 발현 저해 또는 사이토카인(TNF-α, IL-6)의 발현 저해를 통해 염증반응을 저해하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하여 세포의 생존률에는 영향을 미치지 않으면서 항산화력을 나타내고 염증반응에 관여하는 여러 단백질의 작용을 저해함으로써 우수한 항염증 활성을 나타내는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물에는 다양한 2차 대사산물들이 존재하고, 이중에는 우수한 생리활성을 갖고 있어 여러 가지 용도로 개발될 수 있는 물질들이 다수 존재한다. 이렇게 식물에서 유래한 화합물들은 대부분 인공적으로 합성된 화합물에 비해 부작용이 적기 때문에 인체에 안전하게 적용할 수 있다는 장점을 갖고 있다. 이에 따라 식물로부터 유용한 화합물을 추출, 정제하여 의약 등의 용도로 개발되는 경우가 많다. 최근 전세계적으로 식물 추출 약물 시장이 증가하는 추세에 있고, 식물로부터 유래한 화합물을 대상으로 하여 새로운 효능을 밝히기 위한 다양한 연구가 진행되고 있지만, 아직까지도 식물 유래 성분의 개발 가능성은 무궁무진하다.

[0003] 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)은 쌍떡잎식물 통화식물목 꿀풀과의 여러해살이풀로 중국이 원산지이며, 약용식물도 도입되어 전국에서 재배되고 있다. 이러한 황금에도 다양한 성분들이 포함되어 있어 많은 연구가 진행되고 있으며, 대한민국 등록특허 제10-0971374호 등과 같은 활용 기술이 알려진 바 있다.

[0004] 한편, 염증은 병원균 같은 유해성분이 조직에 침입하였을 때 이에 대응하여 면역체계에 의해 발생한다. 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증 매개물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종 발열 통증 등 외적 증상을 나타낸다. 이러한 염증반응이 지속적으로 일어나거나 과도하게 일어나면 오히려 질환의 주요 병리현상으로 진행되며, 심각한 문제를 초래하게 된다. 최근 들어 산업화의 발달, 환경오염 문제 등으로 인해 알레르기 비염, 아토피 피부염 등과 같은 각종 염증성 질환을 겪는 사람들이 많아지고 있으나, 대부분 합성의약품에 의존하고 있어 식물로부터 유래한 성분을 바탕으로 한 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 다양한 식물 유래 성분들의 활용 가능성과 장점을 바탕으로 보다 유용하게 활용할 수 있는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 시도하였다. 특히, 암 또는 염증성 질환에 대한 효과를 집중적으로 연구한 결과, 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 세포의 생존률에는 영향을 미치지 않으면서 항산화력을 나타내고 염증반응에 관여하는 여러 단백질의 작용을 저해함으로써 우수한 항염증 활성을 나타낸다는 사실을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0971374호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 주된 목적은 식물 유래 성분이 함유되어 부작용이 적으며, 염증성 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 플라보노이드계 화합물은 (a) 황금을 냉동건조 및 분말화하는 단계; (b) 상기 (a)에서 수득한 황금 분말에 50 내지 90%(v/v) 메탄올을 첨가하여 추출하는 단계; (c) 상기 (b)에서 수득한 추

출물을 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 C_{18} 칼럼 크로마토그래피를 수행하는 단계;를 포함하는 방법으로 제조된 것이 바람직하다. 이때 황금은 꽃, 잎, 뿌리, 줄기 또는 전초를 사용할 수 있다.

[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] 상기 방법에 따라 플라보노이드계 화합물을 제조할 경우, 펜타하이드록시플라바논(pentahydroxyflavanone), 비사이둘린 I-O-디글루코시드(viscidulin Ⅰ-O-diglucoside), 펜타하이드록시플라본(pentahydroxyflavone), 테트라하이드록시플라본(tetrahydroxyflavone), 이리딘(iridin), 에리오딕티올(4'-하이드록시나린제닌)(eriodictyol(4'-hydroxynaringenin)), 푸에라린(puerarin), 바이칼린(baicalin), 스쿠텔라레인(scutellarein) 및 아이소스쿠텔라레인(isoscutellarein)을 포함하는 플라보노이드계 화합물의 혼합물을 제조할 수 있다. 특히 사용된 황금 1kg을 기준으로 펜타하이드록시플라바논 유도체 174.844±4.017mg, 펜타하이드록시플라바논 14.833±0.167mg, 비사이둘린 I-O-디글루코시드 23.500±0.388mg, 펜타하이드록시플라본 14.448±0.059mg 및 16.108±0.541(isomer), 테트라하이드록시플라본 50.577±0.158mg, 이리딘 16.639±0.075mg, 에리오딕티올(4'-하이드록시나린제닌) 23.509±0.244mg, 푸에라린 6.665±0.045mg, 바이칼린 1.998±0.004mg, 스쿠텔라레인 25.741±0.119mg 및 아이소스쿠텔라레인 7.143±0.025mg이 함유된 혼합물을 제조할 수 있다. 본 발명에 따르면 이러한 플라보노이드계 화합물들을 함유하는 혼합물이 세포의 생존률에는 영향을 미치지 않으며, 항산화력이 우수하고, 염증반응에 의한 ERK, JNK, p38 단백질의 인산화(활성화) 저해, 염증반응에 의한 I-κB 단백질의 인산화(활성화) 저해 및 분해 저해, 염증반응에 의한 NF-κB p65 단백질의 핵(nucleus)내 전이 저해, 염증반응에 의한 COX-2 단백질의 발현 저해, 염증반응에 의한 iNOS 단백질의 발현 저해, 또는 염증반응에 의한 사이토카인(TNF-α, IL-6)의 발현 저해를 통해 효과적으로 염증성 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0012] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 C_{18} 칼럼 크로마토그래피는 0.05 내지 0.2% 폼산 수용액(A용액)과 메탄올 및 아세토나이트릴을 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)에서 부터 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 0.7㎖/min, 컬럼 온도는 30 내지 40℃로 하는 것이 바람직하다.

[0013] 보다 바람직하게는 0.1% 폼산 수용액(A용액)과 메탄올 및 아세토나이트릴을 1:1의 비율(부피 기준)로 혼합한 용액(B용액)을 이동상으로 사용하되, 처음 10분간은 B용액의 비율을 0%(v/v)에서 부터 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 0.5㎖/min, 컬럼 온도는 35℃로 하는 것이 좋다.

[0014] 본 발명의 조성물은 의약품 및 식품 등의 용도로 사용할 수 있다.

[0015] 이때, 본 발명에 따른 플라보노이드계 화합물은 식품의약안정청(KFDA)의 통상적인 약제학제 제제로의 제형화 기준 또는 건강보조식품의 제형 기준에 의거하여 제형화할 수 있다.

[0016] 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.

[0017] 상기 담체가 희석제로 사용되는 경우에는 염수, 완충제, 덱스트로스, 물, 글리세롤, 링거액, 락토즈, 수크로즈, 칼슘 실리케이트, 메틸 셀룰로오즈 및 에탄올로 이루어진 군에서 선택된 적어도 1종 이상의 담체를 사용한 경구투여와 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.

[0018] 상기 제형에 충진제, 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.

[0019] 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, 묵, 죽, 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

[0020] 본 발명의 조성물은 세포의 생존률에는 영향을 미치지 않으며, 항산화력이 우수하고, 염증반응에 의한 ERK, JNK, p38 단백질의 인산화(활성화) 저해, 염증반응에 의한 I-κB 단백질의 인산화(활성화) 저해 및 분해 저해, 염증반응에 의한 NF-κB p65 단백질의 핵(nucleus)내 전이 저해, 염증반응에 의한 COX-2 단백질의 발현 저해, 염증반응에 의한 iNOS 단백질의 발현 저해, 또는 염증반응에 의한 사이토카인(TNF-α, IL-6)의 발현 저해를 통해 효과적으로 염증성 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 HPLC 분석 결과이다.

도 2는 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 RAW 264.7 대식세포주의 세포생존에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

도 3은 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 항산화능력을 실험한 결과이다.

도 4는 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포주의 형태적 변화에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

도 5는 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포주에서 pro-inflammatory mediator에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

도 6은 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포주에서 I-κB 단백질의 인산화와 분해에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

도 7은 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포주에서 NF-κB p65의 핵내 전이에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

도 8은 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포주에서 COX-2의 발현에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

도 9는 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포주에서 iNOS의 발현에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

도 10은 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포주에서 염증성 사이토카인(TNF-α와 IL-6)의 발현에 미치는 영향을 실험한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 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.

[0023] **실시예 1. 황금을 사용한 플라보노이드계 화합물 제조**

[0024] 황금(100g)을 냉동건조(lyophilizer, PVTED50A, Ilsin Bio Base Co. Ltd, Yangju, Republic of Korea)한 다음 미세한 분말로 갈았다. 황금 분말(5g)에 70% 메탄올(30㎖)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 욕조(Bransonic 3510R-DTH, Branson Ultrasonics Co., Banbury, USA)에서 10분간 추출하였다. 2회 반복 추출한 다음 시료를 혼합하고 여과지를 사용하여 여과한 후 3200×*g*에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 200㎖ 플라스크에 넣고 회전식 증발기(Eyela NVC-2100, Tokyo Rikakikai Co. Ltd. Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 하에서 용매를 제거하였다. 잔사를 1㎖ 메탄올에 녹이고 실험실에서 제작한 실리카 카트리지(1.7×2cm)에 적재하였다. 5㎖의 헥산으로 카트리지를 씻은 다음 5㎖의 에틸아세테이트로 용리하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였다. 잔사를 1㎖의 메탄올에 재용해하여 0.45㎛ 셀룰로스 멤브레인에 통과시키고 실리콘 병에 옮긴 다음 분석실험을 할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0025] **실험예 1. 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 정제 및 구조 확인**

[0026] 상기 실시예 1에서 황금을 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물의 성분을 확인하였다.

[0027] C_{18} 컬럼이 장착된 RP-HPLC, 양이온 모드로 작용하는 ESI-MS/MS 데이터와 보고되어 있는 데이터와의 비교를 통하여 분리된 플라보노이드 성분을 동정하였다.

[0028] 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. 크로마토그래피상의 분리는 Zorbax Stable Bond Analytical SB-C18 컬럼(4.6×250㎜, 5㎛, Agilent Technologies, MD, USA)으로 수행하였다. 이동상 용매 시스템은 0.1% 폼산 수용액(A)와 메탄올/아세토나이트릴(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 0.5㎖/min, 컬럼 온도는 35℃, 각 실험에서 주입량은 10㎕로 하였다. 크로마토그래피 데이터는 ChemStation, Rev.B.0301 프로그램을 사용하여 수집하였다. 전체 실험에서 250 ~ 600㎚의 데이터를 2㎚의 분해능으로 수집하였으며 플라보노이드의 정량은 280㎚에서 크로마토그램을 추출함으로써 이루어졌다.

[0029] MS/MS 실험은 Turbo V™ source와 Turbo Ion Spray probe가 장착된 3200 QTRAP LC/MS/MS system(Applied Biosystems, Forster, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 질량 스펙트럼은 positive ion과 SIM 모드로 수행하였다. 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.

[0030] 280㎚ 검출파장에서 기록된 각 추출물의 10 ~ 70분까지 부분 크로마토그램을 도시하면 도 1과 같다. 동정된 성분들의 MS/MS 데이터와 구조를 종합하면 표 1과 같다.

표 1

[0031]

NO.	Compound	RT (min)	MS [M-H]-	MS/MS
1	Pentahydroxyflavanone derivative	20.64	629	303, 285, 275, 217, 201, 177, 149, 125
2	Pentahydroxyflavanone	23.49	303	303, 285, 275, 259, 217, 193, 177, 149, 125, 109
3	Viscidulin I -O-diglucoside	25.98	625	301, 283, 273, 258, 229, 185, 151, 125
4	Pentahydroxyflavone	29.31	301	301, 283, 269, 259, 240, 191, 179, 161, 139, 124, 121, 109
5	Unidentified	34.65	647(+)	647, 501, 467, 347, 321, 303, 285,
6	ViscidulinⅢ -O-glucoside	35.22	507	345,330, 315
7	Tetrahydroxyflavone	37.69	285	285, 268, 241, 217, 199, 177, 151, 133, 107
8	Iridin	40.20	521	383, 359, 344, 329, 313, 300, 285, 212
9	Eriodictyol(4'-hydroxynaringenin)	42.25	289(+)	289, 271, 247, 179, 163, 153, 147
10	Puerarin	43.24	415	415, 295, 267, 253, 223

11	Viscidulin Ⅲ	43.88	347(+)	347, 332, 317, 314, 289, 286, 183, 169, 150, 142
12	Pentahydroxyflavone	45.11	301	301, 283, 269, 241, 225, 197, 179, 165, 161, 139, 133, 124, 107
13	Unidentified	52.55	675	675, 529, 481, 361, 335, 317, 285
14	Baicalin	53.67	447(+)	447, 343, 271, 253, 225, 169, 149, 123, 105
15	Scutellarein	56.25	285	285, 267, 257, 239, 213, 195, 185, 167, 165, 137, 119, 117
16	isoscutellarein	57.35	285	285, 267, 257, 241, 239, 229, 213, 185, 167, 165, 137, 119, 117

[0032] * 4번 및 12번: isomer.

[0033] **실험예 2. 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 정량**

[0034] 플라보노이드 성분들을 280nm에서 기록된 HPLC-UV 크로마토그램 상의 피크면적으로부터 정량하였다. 이들은 같은 그룹의 대표적인 플라보노이드 표준물질을 기초로 유효화하였다. 검량곡선은 각 표준물질의 회기분석을 통해 작성하였다. 회기방정식은 y = ax + b을 사용하였는데 여기서 y와 x는 각각 각 화합물의 피크면적과 농도를 나타낸다. 함유된 각 화합물의 양을 종합하면 표 2와 같다.

표 2

[0035]

NO.	Compound	Mean[a] ± SD[b]
1	Pentahydroxyflavanone derivative	174.844±4.017
2	Pentahydroxyflavanone	14.833±0.167
3	Viscidulin Ⅰ-O-diglucoside	23.500±0.388
4	Pentahydroxyflavone	14.448±0.059
5	Unidentified	-
6	Viscidulin Ⅲ-O-glucoside	-
7	Tetrahydroxyflavone	50.577±0.158
8	Iridin	16.639±0.075
9	Eriodictyol(4'-hydroxynaringenin)	23.509±0.244
10	Puerarin	6.665±0.045
11	Viscidulin Ⅲ	-
12	Pentahydroxyflavone	16.108±0.541
13	Unidentified	-
14	Baicalin	1.998±0.004
15	Scutellarein	25.741±0.119
16	isoscutellarein	7.143±0.025

[0036] * [a]mg/kg 황금 중량.

[0037] * [b]Standard deviation.

[0038] * 4번 및 12번: isomer.

[0039] **실험예 3. 황금으로부터 추출된 플라보노이드계 화합물의 항염증 효과**

[0040] <u>3-1. RAW 264.7 세포의 세포생존율에 미치는 영향</u>

[0041] 상기 실시예 1에서 황금을 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 추출물을 각각 10, 40, 70, 100㎍/㎖의 농도로 처리하여 배양한 후 MTT-assay를 수행한 결과 모든 농도에서 RAW 264.7 세포의 세포생존율에 영향을 미치지 않았다. 또한 화합물과 1㎍/㎖의 LPS를 동시에 처리했을 때에도 모든 농도에서 세포생존율에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(도 2 참조).

[0042] <u>3-2. 항산화능력 측정</u>

[0043] 상기 실시예 1에서 황금을 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물의 항산화효과를 측정하기 위하여 DPPH 라디컬 소거율을 측정한 결과 10, 40, 70 및 100㎍/㎖의 농도에서 화합물에 의해 제거되고 남은 DPPH 라디컬은 각각

47.1%, 9.6%, 12.1% 및 12.1%였다. 양성 대조군으로 사용한 Vitamin C의 100㎍/㎖ 농도에서는 6.8%의 DPPH 라디컬 잔존율을 보였다(도 3 참조).

[0044] 3-3. LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

[0045] 상기 실시예 1에서 황금을 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향을 보기위해 광학현미경을 통해 400의 배율로 관찰하였다. RAW 264.7 세포에 1시간 동안 100㎍/㎖ 농도의 화합물을 전처리한 후, LPS(1㎍/㎖)를 처리하고 24시간 배양하여 관찰한 결과 가장자리가 매끈하며 둥근 일정한 형태의 RAW 264.7 세포가 LPS의 자극을 받은 후 세포 가장 자리가 거칠고 불규칙한 형태를 갖는 세포가 증가하였고, 위족이 형성된 것을 관찰하였다. LPS와 동시에 화합물을 처리하였을 때, 가장자리가 거칠고 불규칙적인 모양과 위족을 형성한 RAW 264.7 세포가 감소하여 대조군과 유의한 수준으로 세포가 변한 것을 관찰할 수 있었다(도 4 참조).

[0046] 3-4. LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 pro-inflammatory mediator에 미치는 영향

[0047] 상기 실시예 1에서 황금을 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 MAPKs의 phosphorylation에 미치는 영향, 그리고 RAW 264.7 세포내에서의 ERK, JNK, p38의 변화를 관찰하여 화합물이 MAPKs의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. Vehicle만을 처리한 대조군에 비해 LPS 처리군에서는 ERK, JNK, p38의 활성화 증가를 보였고, ERK, JNK, p38의 활성화는 화합물의 처리에 의해 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였다(도 5 참조).

[0048] 3-5. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 I-κB의 phosphorylation과 degradation에 미치는 영향

[0049] RAW 264.7 세포 내에서 I-κB의 phosphorylation과 degradation을 조사하기 위해 western blot을 수행하였다. LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서 I-κB의 phosphorylation은 현격히 증가하고, total I-κB는 현격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 화합물의 처리에 의해서 I-κB의 phosphorylation은 100㎍/㎖의 농도에서 유의적으로 감소되었고, total I-κB는 농도 의존적으로 증가하였다(도 6 참조).

[0050] 3-6. RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NF-κB의 핵내로 전이에 미치는 영향

[0051] RAW 264.7 세포의 세포질과 핵을 분리하여 western blot 수행을 통해 NF-κB p65의 핵내 유입을 관찰하였다. RAW 264.7 세포의 세포질 내에서의 p65의 발현은 LPS 처리에 의해 감소하고 핵내에서는 증가하였다. 그러나 화합물을 처리했을 때 세포질 내의 p65 발현은 플라보노이드의 농도 의존적으로 증가하고, 핵 내에서는 p65의 발현이 감소하였다(도 7 참조).

[0052] 3-7. LPS로 유도된 RAW 264.7 세포내의 COX-2의 mRNA와 단백질 발현에 미치는 영향

[0053] LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포 내에서 염증유발 물질 Prostaglandin E2(PGE2)를 생성하는 효소인 COX-2의 mRNA와 단백질 발현에 미치는 화합물의 영향을 조사하기 위해 Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)과 western blot을 수행한 결과 LPS에 의해 발현이 유도된 COX-2의 mRNA(도 8 A 참조)와 단백질 발현(도 8 B 참조)은 화합물의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다.

[0054] 3-8. RAW 264.7 세포내에서 LPS로 유도된 iNOS의 mRNA와 단백질 발현에 미치는 영향

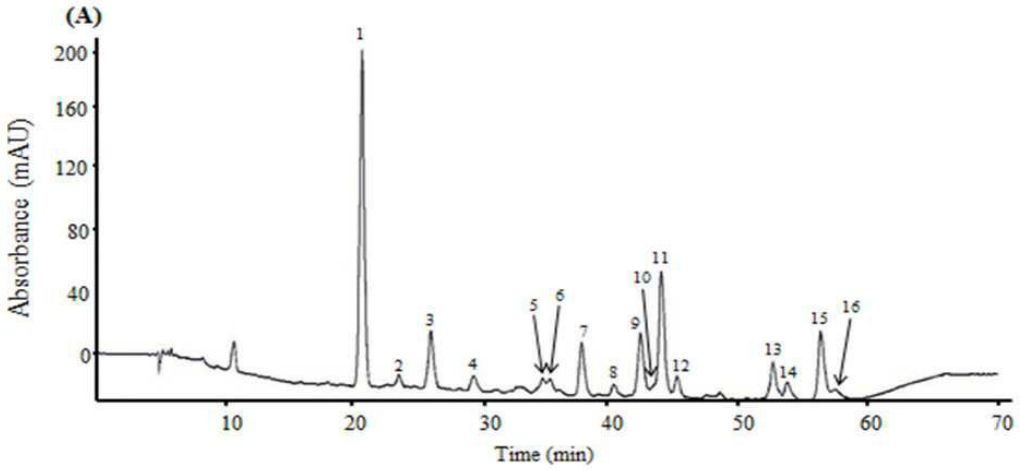
[0055] 염증에서 화학적 매개체의 역할을 하는 NO의 합성 효소인 iNOS의 발현에 화합물이 미치는 영향을 조사하기 위해 RT-PCR과 westerm blot analysis를 수행하여 LPS에 유도된 RAW 264.7 세포 내에서의 iNOS의 mRNA와 단백질 발현 변화를 관찰하였다. LPS로 인해 유도된 iNOS 유전자 발현은 화합물에 의해 농도 의존적으로 감소하였고, iNOS의 단백질 발현 역시 화합물에 의해 감소되는 경향을 보였다(도 9 참조).

[0056] 3-9. LPS로 유도된 RAW 264.7 세포내에서 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향

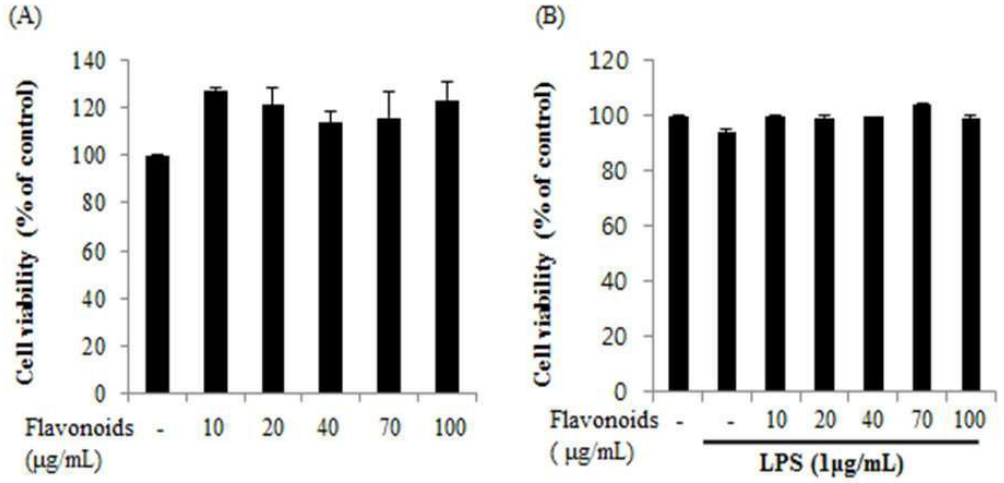
[0057] 상기 실시예 1에서 황금을 사용하여 제조한 플라보노이드계 화합물에 의한 염증성 사이토카인인 TNF-α와 IL-6의 발현변화를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 LPS에 의해 TNF-α와 IL-6의 발현은 증가하였고, 화합물의 처리에 의해서 사이토카인의 발현은 농도 의존적으로 감소하였다(도 9 참조).

도면

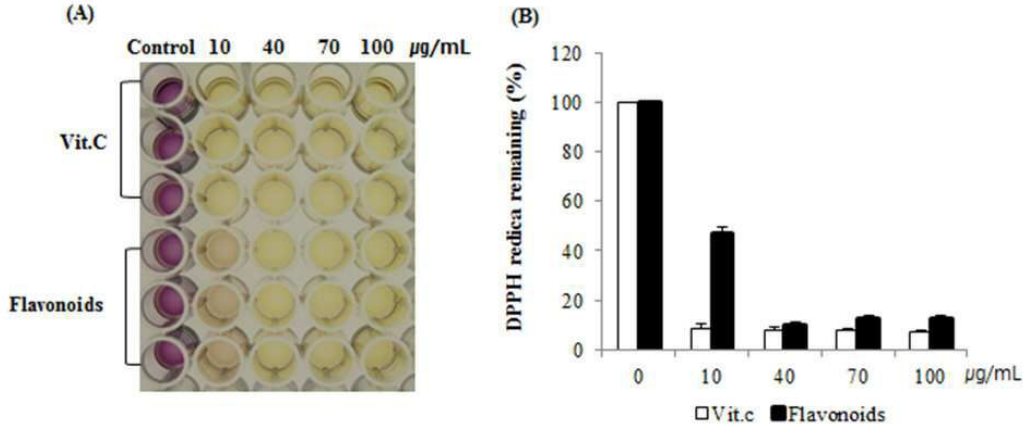
도면1



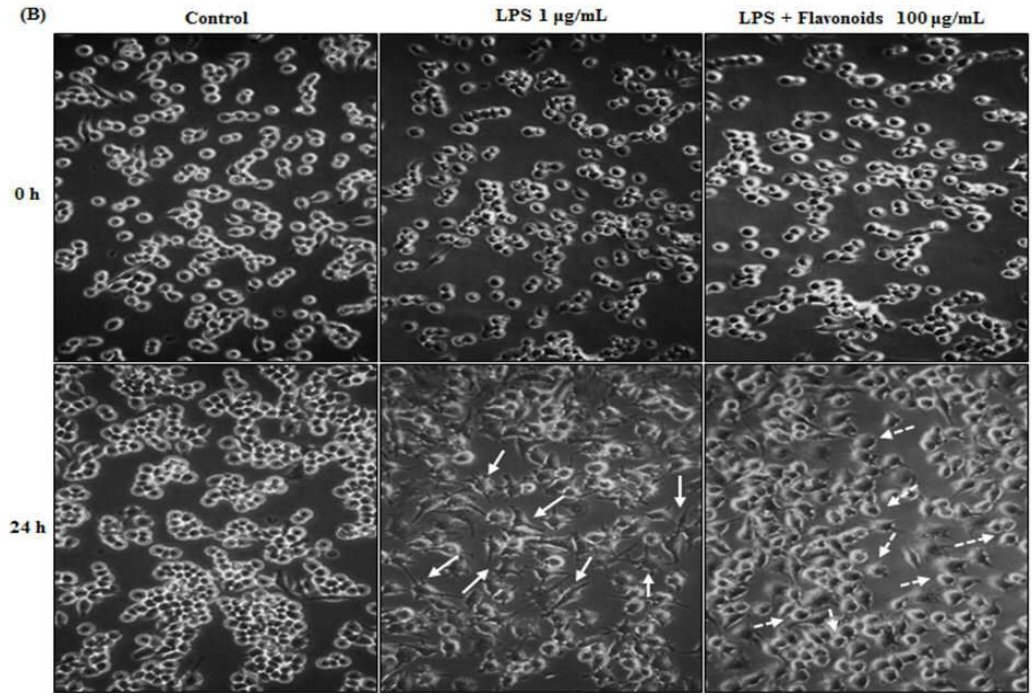
도면2



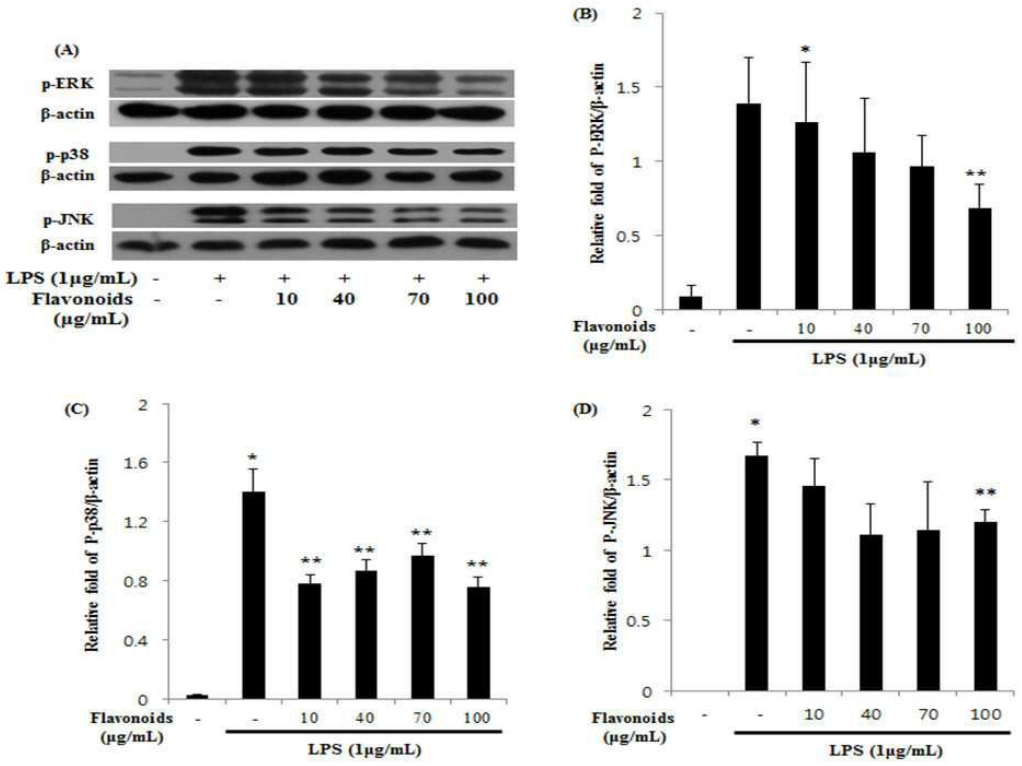
도면3



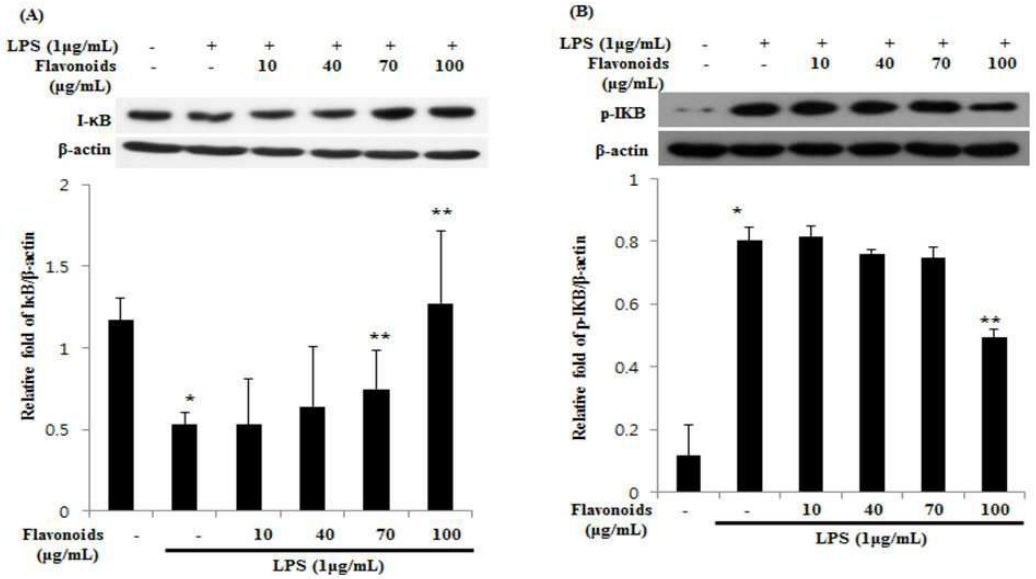
도면4


(B)
Control
LPS 1 μg/mL
LPS + Flavonoids 100 μg/mL
0 h
24 h

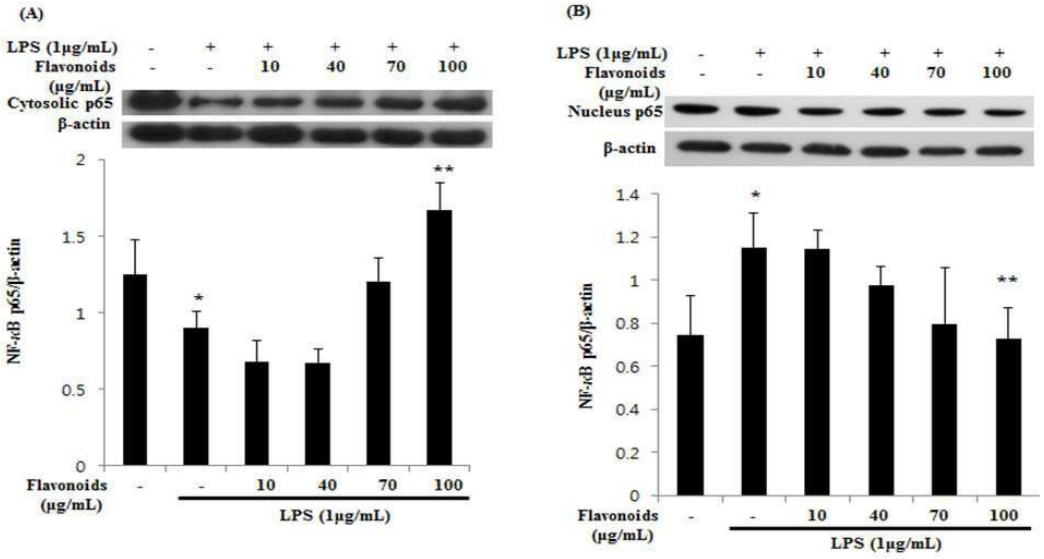
도면5


(A)
p-ERK
β-actin
p-p38
β-actin
p-JNK
β-actin
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
(B)
Relative fold of P-ERK/β-actin
Flavonoids (μg/mL)
LPS (1μg/mL)
(C)
Relative fold of P-p38/β-actin
Flavonoids (μg/mL)
LPS (1μg/mL)
(D)
Relative fold of P-JNK/β-actin
Flavonoids (μg/mL)
LPS (1μg/mL)

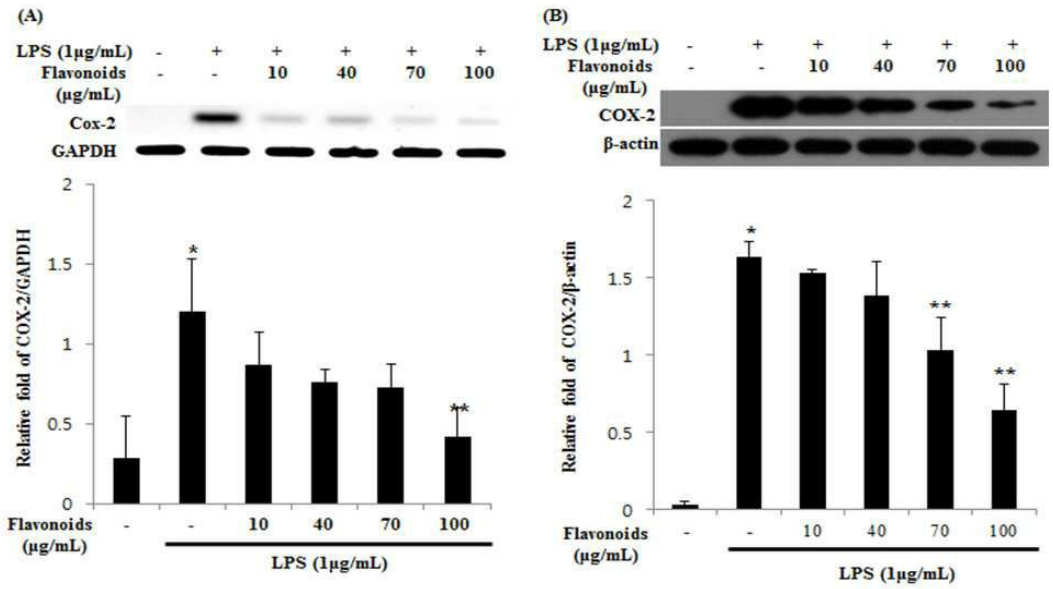
도면6


(A)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
I-κB
β-actin
Relative fold of IκB/β-actin
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)
(B)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
p-IKB
β-actin
Relative fold of p-IKB/β-actin
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)

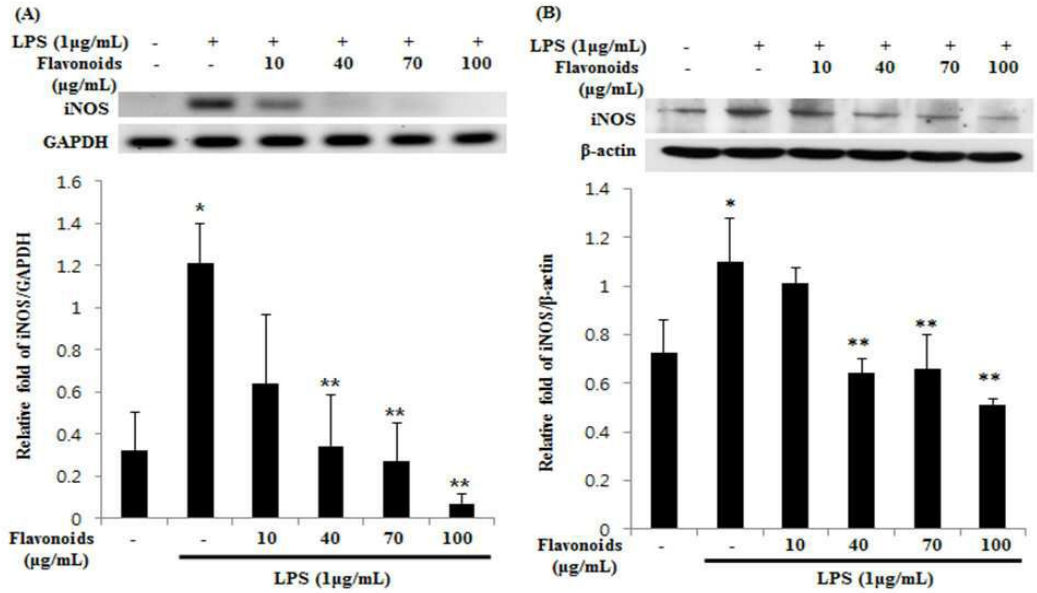
도면7


(A)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
Cytosolic p65
β-actin
NF-κB p65/β-actin
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)
(B)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
Nucleus p65
β-actin
NF-κB p65/β-actin
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)

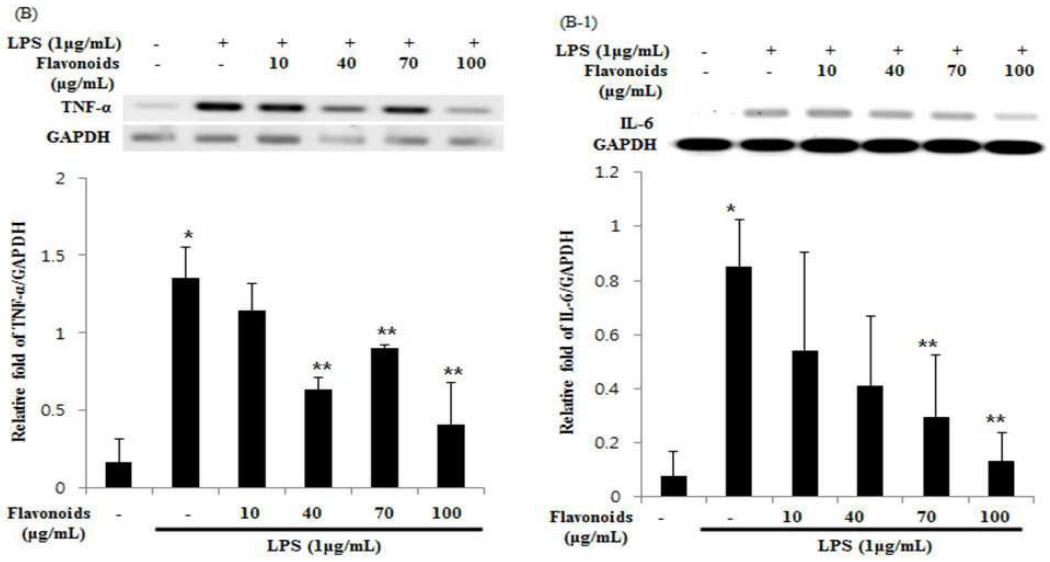
도면8


(A)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
Cox-2
GAPDH
Relative fold of COX-2/GAPDH
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)
(B)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
COX-2
β-actin
Relative fold of COX-2/β-actin
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)

도면9


(A)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
iNOS
GAPDH
Relative fold of iNOS/GAPDH
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)
(B)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
iNOS
β-actin
Relative fold of iNOS/β-actin
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)

도면10


(B)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
TNF-α
GAPDH
Relative fold of TNF-α/GAPDH
2
1.5
1
0.5
0
*
**
**
**
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)
(B-1)
LPS (1μg/mL) - + + + + +
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
IL-6
GAPDH
Relative fold of IL-6/GAPDH
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
**
**
Flavonoids (μg/mL) - - 10 40 70 100
LPS (1μg/mL)