



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년04월14일
 (11) 등록번호 10-1611851
 (24) 등록일자 2016년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7034 (2006.01) *A61K 36/28* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0121177
 (22) 출원일자 2014년09월12일
 심사청구일자 2014년09월12일
 (65) 공개번호 10-2015-0135036
 (43) 공개일자 2015년12월02일
 (30) 우선권주장
 1020140062481 2014년05월23일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020120067183 A
 KR1020140045134 A
 KR1020130044286 A
 Kor J Microbiol Biotechnol, 2010, 38,
 434-441*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 한국과학기술연구원
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
 (72) 발명자
 김형자
 서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
 진창배
 서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 한라특허법인(유한)

전체 청구항 수 : 총 5 항

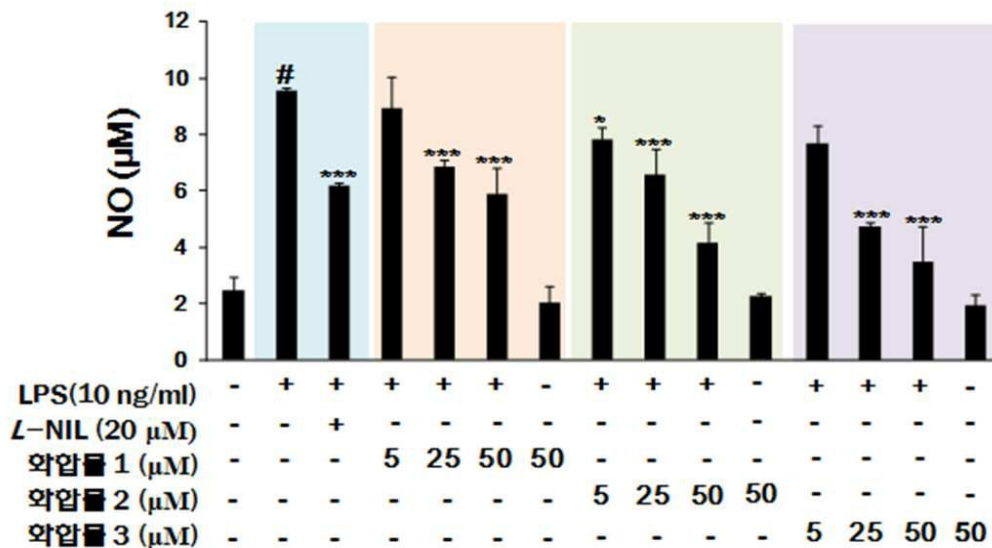
심사관 : 민경남

(54) 발명의 명칭 **항염증 활성이 우수한 섬썩부쟁이 분획물 및 이로부터 분리된 활성화합물**

(57) 요약

본 발명은 항염증 활성이 우수한 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*) 분획물 및 이로부터 분리된 화합물에 관한 것이다.
 본 발명의 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물과 상기 분획물로부터 분리된 활성화합물로서 6'-*O*-카페오일로 세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside), 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydrosyringin), 글레노
 (뒷면에 계속)

대표도 - 도5



사이드 (glehnoside)는 강력한 자유 라디칼 소거능에 의한 항산화능을 가지며, 동시에 리포폴리사카라이드 (LPS)에 의해 유도되는 염증성 대사산물인 NO (Nitric oxide)과 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂), TNF- α (tumour necrosis factor alpha), IL-6 (interleukin-6) 및 IL-1 β (interleukin-1beta) 등과 같은 염증 유발성 사이토카인 (cytokine)의 생성을 억제하므로, 염증질환의 치료, 예방 및 개선이 필요한 의약품, 화장품, 건강식품 등의 활성 성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

(72) 발명자

손민정

서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

이용섭

서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

육창수

서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

이경태

서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

이재열

서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711008930

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국과학기술연구원

연구사업명 한국과학기술연구원연구운영비지원

연구과제명 오믹스 융합 기술기반 노인성 혈관질환 진단기술개발

기여율 1/1

주관기관 한국과학기술연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

활성성분으로서 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin) 및 글레노사이드 (glehnoside) 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 화합물, 약제학적으로 허용 가능한 이의 염, 수화물, 또는 용매화물이 포함되어 있는 염증질환의 치료 및 예방용 약제 조성물.

청구항 6

활성성분으로서 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin) 및 글레노사이드 (glehnoside) 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 화합물, 약제학적으로 허용 가능한 이의 염, 수화물, 또는 용매화물이 포함되어 있는 염증질환 개선용 건강식품 조성물.

청구항 7

활성성분으로서 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin) 및 글레노사이드 (glehnoside) 로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 화합물, 약제학적으로 허용 가능한 이의 염, 수화물, 또는 용매화물이 포함되어 있는 염증질환 개선용 화장품 조성물.

청구항 8

제 5 항 내지 제 7 항 중에서 선택된 어느 한 항에 있어서,

상기 염증질환은 아토피피부염, 건선, 류마티스 관절염, 척추염, 요도염, 방광염, 신염, 혈관염, 동맥경화증, 심근염, 알러지 질환, 피부근염, 비염, 천식, 편도염, 급성통증, 만성통증, 패혈증, 치주염, 치은염, 염증성 장 질환, 위궤양 및 궤장염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

- 1) 섬쭉부쟁이 (*Aster glehni*)의 지상부 또는 지하부를 디클로로메탄, 아세톤, 아세톤 수용액, C₁₋₄알콜 및 C₁₋₄알콜 수용액으로부터 선택된 1종 이상의 추출용매로 추출하여 용매추출물을 수득하는 단계;
- 2) 상기 용매추출물을 물과 에틸아세테이트로 추출하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 단계; 및

3) 상기 에틸아세테이트 분획물을 칼럼 크로마토그래피하여, 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoilyldihydroxyryngin) 및 글레노사이드 (glehnoside)를 각각 수득하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 섬썩부쟁이로부터 항염증 활성화합물의 분리방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항염증 활성이 우수한 섬썩부쟁이 분획물 및 이로부터 분리된 화합물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증 반응은 감염이나 조직의 손상과 같은 다양한 요인에 의해 일어나는 생체방어반응으로, 감염 부위나 손상 부위에만 피해를 국한시키기 위한 초기 보호 작용을 수행한다. 감염 부위에서의 염증반응은 병원체에 대한 대식세포 (macrophage)의 반응에 의해 개시되며 활성화된 대식세포가 생성하는 반응성 활성 산소종 및 NO와 같은 활성 질소종, 프로스타글란딘 (prostaglandin), 류코트리엔 (leukotriene) 등과 같은 염증매개체, 그리고 TNF- α (tumour necrosis factor alpha), IL-6 (interleukin-6) 및 IL-1 β (interleukin-1beta) 등과 같은 염증 유발성 사이토카인 (cytokine) 등이 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0003] NO는 L-아르기닌 (L-arginine)으로부터 NOS (nitric oxide synthase)에 의해 합성되며 면역기능 조절, 혈관확장, 신경전달, 혈액응고 등과 같은 역할을 한다고 알려져 있다. 이 NO는 대식세포의 세포독성활성에 큰 영향을 미치므로 미생물이나 종양세포로부터 숙주를 방어하는 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 과도하게 생성된 NO는 염증을 악화시키므로 유해한 작용을 나타내기도 한다.

[0004] 한편 본 연구자들은 다양한 천연물로부터 항염증 치료제를 개발하고자 유효성분을 탐색하던 중 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*) 분획물이 항염증 효능을 가지고 있음을 알게 되었다. ["섬썩부쟁이 분획물의 항산화 및 항염증 활성". *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, Vol. 38, No. 4, 434-441] 이에 본 발명자들은 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 활성화합물이 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 리포폴리사카라이드 (LPS)로 유도한 NO와 PGE₂ 및 염증 유발물질인 사이토카인 (TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 생성을 억제하는 효능을 가지고 있음을 확인하여, 일련의 용매추출법과 크로마토그래피를 이용하여 활성화합물을 추적하였다. 그 결과 항염 효능을 가지는 활성 화합물을 분리하고 이의 화학구조를 밝혀냄으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) "섬썩부쟁이 분획물의 항산화 및 항염증 활성". *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, Vol. 38, No. 4, 434-441

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 항염증에 유효한 특성의 활성화합물이 포함되어 있는 섬썩부쟁이 분획물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 활성성분으로서 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)의 에틸아세테이트 분획물 또는 상기 분획물로부터 분리한 특성의 활성화합물이 포함되어 있는 염증질환의 치료, 예방 및 개선을 위하여 사용되는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)로부터 항염증에 유효한 활성화합물의 분리방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside; 화합물 1), 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin; 화합물 2) 및 글레노사이드 (glehnoside; 화합물 3)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 화합물이 포함되어 있는 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)의 에틸아세테이트 분획물을 그 특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기한 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)의 에틸아세테이트 분획물이 활성 성분으로 포함되어 있는 염증질환의 치료, 예방, 및 개선용 약제 조성물, 건강식품 조성물 또는 화장품 조성물을 그 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 활성성분으로서 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside), 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin) 및 글레노사이드 (glehnoside)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 화합물, 약제학적으로 허용 가능한 이의 염, 수화물, 또는 용매화물이 포함되어 있는 염증질환의 치료, 예방, 및 개선용 약제 조성물, 건강식품 조성물 또는 화장품 조성물을 그 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 1) 섬썩부쟁이의 지상부 또는 지하부를 디클로로메탄, 아세톤, 아세톤 수용액, C₁₋₄알콜 및 C₁₋₄알콜 수용액으로부터 선택된 1종 이상의 추출용매로 추출하여 용매추출물을 수득하는 단계; 2) 상기 용매추출물을 물과 에틸아세테이트로 추출하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 단계; 및 3) 상기 에틸아세테이트 분획물을 칼럼 크로마토그래피하여, 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside), 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin) 및 글레노사이드 (glehnoside)를 각각 수득하는 단계; 를 포함하는 섬썩부쟁이로부터 항염증 활성화합물의 분리방법을 그 특징으로 한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)의 에틸아세테이트 분획물 또는 상기 분획물로부터 분리한 특정의 활성화합물은 리포폴리사카라이드 (LPS)에 의해 유도되는 염증 반응 지표인 NO와 PGE₂ 뿐만 아니라 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등과 같은 염증 유발성 사이토카인의 생성을 억제하고 자유 라디칼 소거능과 지질과산화 저해 효능을 나타낸다.

[0014] 따라서 본 발명에 따른 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)의 에틸아세테이트 분획물 또는 상기 분획물로부터 분리한 특정의 활성화합물은 항염증 질환의 치료, 예방 및 개선을 위한 의약품, 건강식품, 화장품 등의 제조를 위한 활성 성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명에서의 염증질환은 구체적으로 아토피피부염, 건선, 류마티스 관절염, 척추염, 요도염, 방광염, 신염, 혈관염, 동맥경화증, 심근염, 알러지 질환, 피부근염, 비염, 천식, 편도염, 급성통증, 만성통증, 폐혈증, 치주염, 치은염, 염증성 장질환, 위궤양, 궤장염 등을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (화합물 1)의 ¹H NMR 스펙트럼 (A)과 ¹³C NMR 스펙트럼 (B)이다.
 도 2는 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (화합물 2)의 ¹H NMR 스펙트럼 (A)과 ¹³C NMR 스펙트럼 (B)이다.
 도 3은 글레노사이드 (화합물 3)의 ¹H NMR 스펙트럼 (A)과 ¹³C NMR 스펙트럼 (B)이다.
 도 4는 마우스 대식세포 RAW 264.7에 적용되는 항염증 활성화합물의 농도에 따른 세포 생존정도를 비교한 그래

프이다. 세포 생존정도는 MTT 분석법에 의하여 측정하였으며, 그 결과는 대조군 흡광도의 백분율 (%)로써 나타내었다.

도 5는 마우스 대식세포 RAW 264.7에서 LPS 처리 시, 항염증 활성화합물의 농도에 따른 산화질소 (NO) 생성억제 정도를 비교한 그래프이다.

도 6은 대식세포 RAW 264.7에서 LPS 처리 시, 항염증 활성화합물의 농도에 따른 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂) 생성 억제 정도를 비교한 그래프이다.

도 7은 대식세포 RAW 264.7에서 LPS 처리 시, 항염증 활성화합물의 농도에 따른 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생성 억제 정도를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

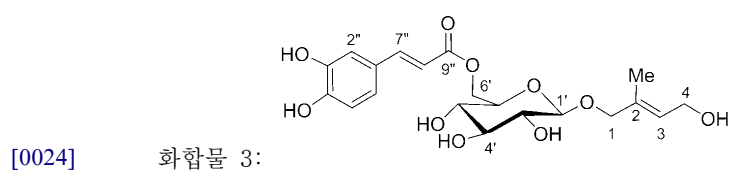
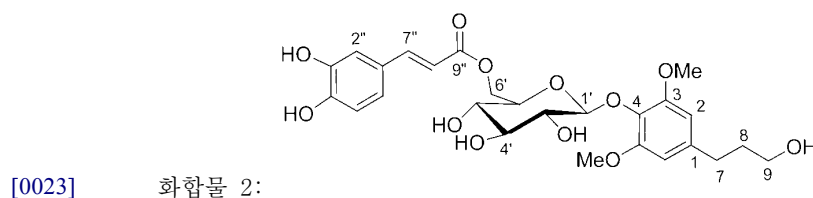
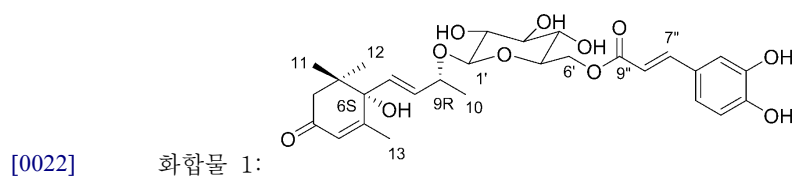
[0017] 본 발명은 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)로부터 분리한 항염증성 신규 화합물과, 상기 화합물을 포함하는 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)의 에틸아세테이트 분획물과 상기 분획물로부터 분리한 활성화합물이 포함된 염증질환의 치료, 예방 및 개선용 조성물에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에서 사용하는 식물로서 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)는 국화과 식물로, 울릉도 산지에서 자생하는 다년초이며, 취나물과 비슷한 형태이고, 높이는 1~1.5 m 정도로 자란다. 줄기에는 잔털이 있고 뿌리줄기가 옆으로 자란다. 잎은 호생하고 장타원형이며 끝이 뾰족하고 뒷면에 선점이 있으며 가장자리에 불규칙한 톱니가 있다. 꽃은 백색이며 8~9월에 피고 원줄기 끝의 산방화서에 달린다. 울릉도에서는 '부지쟁이'라고 부르며, 이른 봄 새순을 잘라 식용하면 향이 진하다.

[0019] 현재까지 보고된 바에 의하면, 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)는 항산화, 항염증, 항경련, 진정 또는 수면유도 효능을 가지고 있고, 주성분으로서 플라보노이드와 같은 페놀계 화합물과 테르펜 화합물 등이 알려져 있다.

[0020] 본 발명에서는 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)로부터 분리한 항염증 활성을 보이는 신규 화합물을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명이 섬썩부쟁이로부터 분리한 활성화합물은 6'-O-카페오일로세오사이드 (6'-O-caffeoylrosetoside), 6'-O-카페오일디히드로시린진 (6'-O-caffeoyldihydrosyringin) 및 글레노사이드 (glehnoside)의 3종 화합물이며, 이들은 모두 신규 화합물이다.



[0025] 또한, 본 발명은 섬썩부쟁이 (*Aster glehni*)로부터 상기한 활성화합물을 분리하는 방법을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명이 활성화합물을 섬썩부쟁이로부터 분리하기 위한 일련의 제조방법은,

- [0027] 1) 섬썩부쟁이의 지상부 또는 지하부를 디클로로메탄, 아세톤, 아세톤 수용액, C₁₋₄알콜 및 C₁₋₄알콜 수용액으로 부터 선택된 1종 이상의 추출용매로 추출하여 용매추출물을 수득하는 단계;
- [0028] 2) 상기 용매추출물을 물과 에틸아세테이트로 추출하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 단계; 및
- [0029] 3) 상기 에틸아세테이트 분획물을 칼럼 크로마토그래피하여, 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeylroseoside), 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeyldihydroxyringin) 및 글레노사이드 (glehnoside)를 각각 수득하는 단계; 를 포함한다.
- [0030] 상기 1)용매추출물을 수득하는 단계에서 사용되는 섬썩부쟁이는 지상부 또는 지하부의 식물 전체가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 섬썩부쟁이의 잎, 꽃 또는 줄기와 같은 지상부를 사용하는 것이 좋다. 채취한 섬썩부쟁이는 음지에서 건조하여 사용하며, 잘게 절단하거나 또는 이를 분말화하여 그대로 사용하거나 냉동 건조시킨 후에 사용할 수도 있다.
- [0031] 본 발명에서는 추출용매로서 통상의 유기용매를 사용할 수 있으며, 구체적으로는 디클로로메탄, 아세톤, 아세톤 수용액, C₁₋₄알콜 및 C₁₋₄알콜 수용액으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다. 상기 추출용매를 보다 구체적으로 예시하면 디클로로메탄, 아세톤, 메탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 또는 물이 20~80 부피% 포함 된 이의 수용액을 사용할 수 있다.
- [0032] 상기 1)용매추출물을 수득하는 단계를 구체적으로 설명하면, 섬썩부쟁이 1 kg 당 추출용매를 0.1 내지 5 l, 바람직하게는 0.5 내지 1.0 l의 양으로 가하고 상온에서 4 내지 5 일 동안 방치한다. 상기 추출은 1회 내지 5회 실시할 수 있으며, 필요에 따라 그 이상을 반복하여 수행할 수도 있다. 그리고 추출 시 온도는 10℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며, 상온인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 시간은 1일 내지 7일인 것이 바람직하고, 3일 내지 7일인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 얻어진 추출물을 여과, 감압 증발 및 건조시켜 용매추출물을 얻는다. 감압 증발은 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조, 상온건조 또는 동결 건조 등으로부터 선택하여 실시할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 상기 2)분획물을 수득하는 단계에서는 상기에서 얻은 용매추출물을 물과 에틸아세테이트로 추출하여, 에틸아세테이트 분획물을 수득한다.
- [0034] 보다 구체적으로 설명하면, 상기 용매추출물 1 kg 당 물을 1 내지 5 l, 바람직하게는 1.5 내지 2.0 l를 가한 후, 에틸아세테이트 (EA) 0.1 내지 5 l, 바람직하게는 1.0 내지 1.5 l를 가하고 충분히 추출하여 에틸아세테이트 분획물을 얻을 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명에서는 상기 유기용매를 사용한 용매추출물을 얻는 1)단계를 생략하고, 직접 섬썩부쟁이를 에틸아세테이트로 추출하여 에틸아세테이트 추출물을 수득하더라도 충분히 활성화합물을 얻을 수 있다. 하지만 보다 고순도의 활성화합물을 수득하기 위해서는 상기 용매추출물을 얻는 1)단계 이후에 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 단계를 순차적으로 수행하는 것이 좋다.
- [0036] 상기 3)활성화합물을 수득하는 단계에서는 상기에서 얻은 에틸아세테이트 분획물을 칼럼 크로마토그래피한다.
- [0037] 상기 칼럼 크로마토그래피는 실리카겔, 세파텍스, RP-18, 폴리아미드, 도요펄 (Toyopearl) 및 XAD 수지로 이루어진 그룹으로부터 선택된 충전제가 충전된 것으로, 본 발명에서는 충전제의 선택에 특별한 제한을 두지 않는다. 상기로부터 적절히 선택하여 컬럼 크로마토그래피를 수행한다. 필요에 따라 적절한 충전제를 선택하여 수차례 실시할 수 있는데, 특히, 세파텍스, RP-18 및 실리카겔을 충전제로 사용하는 칼럼크로마토그래피를 적절히 조합하여 수행하는 것이 가장 바람직하다.
- [0038] 상기의 칼럼크로마토그래피 과정을 통해 3종의 신규 화합물로서 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeylroseoside), 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeyldihydroxyringin), 글레노사이드 (glehnoside)를 각각 분리할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 활성성분으로서 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물을 포함하는 염증질환의 치료, 예방 및 개선했 약제 조성물, 건강식품 조성물 또는 화장품 조성물을 그 특징으로 한다.
- [0040] 상기한 활성화합물의 분리방법에서 수득된 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물에는 화합물 1 내지 3의 활성화

합물이 포함되어 있으므로, 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물을 활성성분으로 포함하는 조성물은 염증질환의 치료, 예방 및 개선에 있어 각별한 효능을 나타내게 된다. 따라서 본 발명은 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물이 활성성분으로 포함된 조성물에도 특징이 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리한 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside; 화합물 1), 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin; 화합물 2), 및 글레노사이드 (glehnoside; 화합물 3)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 화합물, 약제학적으로 허용 가능한 이의 염, 수화물, 또는 용매화물을 포함하는 염증질환의 치료, 예방 및 개선용 약제 조성물, 건강식품 조성물 또는 화장품 조성물을 그 특징으로 한다.

[0042] 또한, 본 발명은 통상의 유기합성 방법을 통해 합성된 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside; 화합물 1), 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin; 화합물 2), 및 글레노사이드 (glehnoside; 화합물 3)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 화합물, 약제학적으로 허용 가능한 이의 염, 수화물, 또는 용매화물을 포함하는 염증질환의 치료, 예방 및 개선용 약제 조성물, 건강식품 조성물 또는 화장품 조성물을 그 특징으로 한다.

[0043] 본 발명이 섬썩부쟁이로부터 분리한 활성화합물은 화학구조적으로 메가스티그만 글리코사이드 유도체, 헤미테르펜 글리코사이드 유도체, 페닐프로파노이드 글리코사이드 유도체로서, 통상의 유기합성 방법을 통해 쉽게 합성이 가능하다. 따라서 본 발명에서는 천연물이 아닌 합성물로서 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside; 화합물 1), 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin; 화합물 2), 및 글레노사이드 (glehnoside; 화합물 3)가 포함된 약제 조성물, 건강식품 조성물 또는 화장품 조성물에도 특징이 있다.

[0044] 본 발명에서의 약제학적으로 허용 가능한 염은 인체에 독성이 낮고 모화합물의 생물학적 활성과 물리화학적 성질에 악영향을 주지 않아야 한다. 이러한 염은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있으며, 구체적으로 염기가 부가되어 생성된 염기부가염이 포함될 수 있다. 이때 염기는 알칼리금속 수산화물 (예를 들면, 수산화나트륨, 수산화칼륨), 알칼리금속 중탄산염 (예를 들면, 중탄산나트륨, 중탄산칼륨), 알칼리금속 탄산염 (예를 들면, 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산칼슘) 등과 같은 무기염기, 또는 1차, 2차 3차 아민 아미노산과 같은 유기염기가 포함될 수 있다. 또한, 상기한 약제학적으로 허용 가능한 염 이외에도 수화물 또는 용매화물도 포함될 수 있다. 본 발명의 화합물로서 수화물 및 용매화물은 모화합물을 용매에 녹인 다음에 유리산 또는 유리염기를 가한 후에 결정화 또는 재결정화하여 제조될 수 있다. 또는 본 발명의 화합물을 분리하는 동안 또는 화합물의 흡습성으로 인해 시간이 경과함에 따라 용매화물 (특히 수화물)이 형성될 수도 있다.

[0045] 본 발명에서는 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물 또는 이로부터 분리한 활성화합물에 대하여 항염증 효능을 검증하기 위하여 대식세포 RAW 264.7에서 리포폴리사카라이드 (LPS)로 유도한 독성에 대한 보호효능을 검색하였다. 그 결과 세포독성이 없는 농도에서 농도 의존적으로 NO와 PGE₂ 뿐만 아니라 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등과 같은 염증 유발성 사이토카인의 생성을 억제하는 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

[0046] 따라서 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물 및 이로부터 분리한 활성화합물은 염증질환의 치료, 예방 및 개선을 목적으로 하는 약제 조성물, 건강식품 조성물 또는 화장품 조성물에서의 활성성분으로서 포함될 수 있다. 본 발명의 조성물에 의해 치료, 예방 또는 개선이 가능한 염증질환은 구체적으로 아토피피부염, 건선, 류마티스 관절염, 척추염, 요도염, 방광염, 신염, 혈관염, 동맥경화증, 심근염, 알러지 질환, 피부근염, 비염, 천식, 편도염, 급성통증, 만성통증, 패혈증, 치주염, 치은염, 염증성 장질환, 위궤양 또는 궤장염 등이 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 염증질환이 이에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 약제조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및/또는 희석제를 더 포함하

여 경구 또는 비경구 투여에 적합한 의약품 제제의 형태로 제조가 가능하다. 또한, 본 발명의 약제조성물을 사용하여 통상적인 방법에 따라 약학 제형을 제조할 수 있다. 제형의 제조에 있어, 활성성분을 담체와 함께 혼합하거나, 담체로 희석하거나, 캡슐, 새세이 또는 기타 용기 형태의 담체 내에 봉입시킬 수 있다. 따라서 제형은 정제, 환제, 분제, 캡슐, 새세이, 엘릭시르, 현탁제, 에멀전, 액제, 시럽제, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐제, 주사용 용액 또는 현탁액, 연고제, 크림제, 겔제 또는 로션제 등의 형태일 수 있다.

[0048] 본 발명의 약제조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 및 희석제는 예를 들면 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 제형 제조시에 통상적으로 사용되고 있는 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당 업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 약제조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다.

[0050] 본 발명의 약제조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 화합물 1 내지 3의 함량을 기준으로 할 때 환자의 몸무게 대비 0.001 mg/kg 내지 500 mg/kg 범위일 수 있고, 바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0051] 본 발명의 건강식품 조성물은 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물 및 이로부터 분리한 활성화합물을 포함하는 것으로, 그 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 선식, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 그 밖에도 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0052] 활성성분으로서 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물 및 이로부터 분리한 활성화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 함량은 사용 목적 (예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있으며, 건강식품의 전체 중량대비 0.001 내지 70 중량% 범위로 포함될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0053] 예를 들면, 건강음료로 제조하는 경우는 상기 활성성분 이외에도 음료 제조시에 통상적으로 사용되는 첨가제로서 천연 탄수화물 또는 향미제 등을 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 노노사카라이드 (예를 들어, 포도당, 과당 등), 디사카라이드 (예를 들어, 말토스, 슈크로스 등) 및 폴리사카라이드 (예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등)과 같은 통상적인 당; 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 포함될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 건강식품의 전체 중량대비 1 내지 20 중량%, 바람직하게는 5 내지 10 중량% 범위로 함유될 수 있다. 상기 향미제는 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)가 포함될 수 있다. 그 밖에도 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 풍미제 (합성 또는 천연 풍미제), 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 첨가제의 함량에 특별한 제한을 두고 있지는 않지만, 건강식품의 전체 중량대비 0.1 내지 20 중량%의 범위로 포함될 수 있다.

[0054] 본 발명의 화장품 조성물은 섬썩부쟁이의 에틸아세테이트 분획물 및 이로부터 분리한 활성화합물을 포함하는 것으로, 그 종류에는 특별한 제한은 없다.

[0055] 본 발명의 화장품 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 분획물 또는 활성화합물이 0.01 내지 50 중량%로 포함하

는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0056] 본 발명의 화장품 조성물은 수성, 수성-알콜성 또는 오일성 용액, 수중유 또는 유중수 또는 다중 에멀전, 수성 또는 오일성 겔, 액체, 페이스트성 또는 고체 무수 생성물, 소구체를 사용한 수성상에서의 오일분산물의 형태일 수 있으며 보다 바람직하게는 이온성 및/또는 비이온성 형태의 지질 소포체의 형태일 수 있다.

[0057] 본 발명의 화장품 조성물은 다소 유체일 수 있으며, 백색 또는 유색크림, 연고, 밀크로션, 유액 (serum), 에센스, 페이스트 또는 무스의 외관을 가질 수 있다. 이는 선택적으로 에어로졸 형태로 피부에 적용될 수도 있고, 고체 형태 예컨대, 스틱의 형태일 수도 있으며, 크림, 로션, 스킨, 에센스, 에멀전 비누, 폼 클렌징, 팩, 샴푸, 린스, 바디워시 등의 다양한 형태로 제형화할 수 있다. 이는 피부용 케어 제품, 메이크업 제품으로서 사용될 수도 있다. 공지된 방식으로 본 발명에 따른 화장품 조성물은 또한 화장 분야에서 통상적인 보조제로서 예를 들어 친수성 또는 친지성 겔화제, 친수성 또는 친지성 활성제, 보존제, 향산화제, 용매, 방향제, 충전제, 차단제, 안료, 흡취제 및 염료를 함유할 수 있다. 이들 다양한 보조제의 양은 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 양이며, 예컨대 화장품 조성물 총중량에 대해 0.01 내지 20 중량% 범위이다. 그 성질에 따라 이러한 보조제는 지방상, 수성상, 지질 소포체 및/또는 나노 입자에 도입될 수 있다. 어떠한 경우라도 보조제 및 그 비율은 본 발명에 따른 화장료 조성물의 바람직한 성질에 악영향을 미치지 않도록 선택될 것이다.

[0058] 이상에서 설명한 바와 같은 본 발명은 하기의 실시예 및 실험예에 의거하여 보다 구체적으로 설명하기로 한다. 다만, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시한 것일 뿐, 본 발명의 기술적 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0059] [실시예]

[0060] 실시예 1. 섬썩부쟁이 지상부의 추출물 및 분획물 제조

[0061] 울릉도에서 직접 채집한 섬썩부쟁이 지상부 (건조중량 2.7 kg)에 메탄올 12 l 을 첨가하고 상온에서 4일 동안 추출하였다. 이를 3회 반복한 후에 여과하고 40℃에서 회전 농축기로 농축 건조시켜 메탄올 추출물 394.8 g 을 수득하였다. 상기 메탄올 추출물에 물 4000 ml를 가하여 현탁시킨 후에, 디클로로메탄 (CH₂Cl₂, 4000 ml x 3)으로 추출하였다. 물층을 에틸아세테이트 (EtOAc, 4000 ml x 3)로 추출하여, 에틸아세테이트 분획물을 수득하였다. 그리고, 또다시 물층을 부탄올 (BuOH, 4000 ml x 3)로 추출하여, 부탄올 분획물을 수득하였다.

[0062] 실시예 2. 섬썩부쟁이 지하부의 추출물 및 분획물 제조

[0063] 울릉도에서 직접 채집한 섬썩부쟁이 지하부 (건조중량 1.03 kg)에 메탄올 10 l 를 첨가하고 상온에서 4일 동안 추출하였다. 이를 3회 반복한 다음 40℃에서 회전 농축기로 농축 건조시켜 메탄올 추출물 138.2 g을 수득하였다. 상기 메탄올 추출물에 물 1300 ml를 가하여 현탁시킨 후에, 디클로로메탄 (CH₂Cl₂, 1300 ml x 3)으로 추출하였다.

[0064] 물층을 에틸아세테이트 (EtOAc, 4000 ml x 3)로 추출하여, 에틸아세테이트 분획물을 수득하였다. 그리고, 또다시 물층을 부탄올 (BuOH, 4000 ml x 3)로 추출하여, 부탄올 분획물을 수득하였다.

[0065] 실시예 3. 에틸아세테이트 분획물로부터 신규 화합물의 분리

[0066] 상기 실시예 1에서 수득한 섬썩부쟁이 지상부의 에틸아세테이트 분획물 14.6 g을 세파텍스 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 칼럼 크로마토그래피 (5×45 cm)를 실시하였다. 전개용매로 메탄올을 사용하였으며, 얻어진 분획들은 순상 실리카겔 TLC (전개용매: 디클로로메탄/메탄올/물=30/10/1)로 관찰한 후, 유사한 극성을 갖는 화합물끼리 모아 9개의 소분획 (EA~EI)으로 나누었다. 소분획 EC (1.4 g)은 세파텍스 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 70% 메탄올을 전개용매로 하여 9개의 소분획 (EC1~EC9)으로 나누었다. 소분획 EC3 (385.7 mg)은 역상실리카겔을 고정상으로 이용하여 45% 메탄올을 전개용매로 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. TLC로 유사한 화합물을 모아서 20개의 소분획 (EC31~EC320)으로 나누었다. 소분획 EC34 (614.4 mg)를 역상 실리

카젤을 이용하여 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 사용한 용매는 45% 메탄올을 이용하였으며, 점차 극성을 증가시켜 마지막은 메탄올로 씻어 주었다. 분리 정도에 따라 35개의 소분획 (EC34-1~EC34-35)으로 나누었다.

[0067] 두 번째 소분획 EC34-2 (68.2 mg)는 순상 실리카젤과 분취용 역상 TLC (50% 메탄올)를 이용하여 칼럼 크로마토그래피를 실시한 결과, 글레노사이드 (glehnoside; 화합물 3) (7.1 mg)을 분리하였다.

[0068] 세 번째 소분획 EC34-3 (70.3 mg)은 순상 실리카젤과 분취용 역상 TLC (48% 메탄올)와 도요펠 HW-40 (메탄올)을 이용하여 칼럼 크로마토그래피를 실시한 결과, 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin; 화합물 2) (8.7 mg) 및 글레노사이드 (glehnoside; 화합물 3) (15.6 mg)을 분리하였다.

[0069] 네 번째 소분획 EC34-4 (54.8 mg)는 순상 실리카젤과 분취용 역상 TLC (50% 메탄올)를 이용하여 칼럼 크로마토그래피를 실시한 결과, 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringtonin; 화합물 2) (3.3 mg)을 분리하였다.

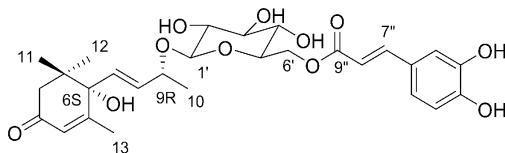
[0070] 다섯 번째 소분획 EC34-5 (112.1 mg)는 순상 실리카젤과 역상 실리카젤 (50% 메탄올)을 이용하여 칼럼 크로마토그래피를 반복 실시하고, 마지막으로 분취용 역상 TLC와 세파텍스를 이용한 컬럼크로마토그래피를 실시하여 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside; 화합물 1) (11.8 mg)을 분리하였다.

[0071] 실시예 4. 신규화합물의 구조규명

[0072] 섬쑥부쟁이 지상부 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 신규 화합물들의 선광도[α]_D는 메탄올 용액에서 측정하였고, NMR 스펙트럼은 400 MHz (¹H)와 100 MHz (¹³C)를 이용하였으며, 각 피크의 화학 시프트 (chemical shift)는 내부 표준물질인 트리메틸실란에 대한 상대값으로 나타내었다. 각각의 화합물에 대한 ¹H NMR 스펙트럼 및 ¹³C NMR 스펙트럼을 도 1 내지 도 3에 나타내었다.

[0073] (1) 화합물 1의 구조결정

[0074] 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside)



[0075]

[0076] 본 발명의 화합물 1의 화학적 특성은 다음과 같다.

[0077] - 무정형분말; [α]_D²¹ +42.8° (c 0.5, MeOH)

[0078] - HR-ESI-TOP-MS (positive-ion mode) m/z 571.2159 [M+Na]⁺

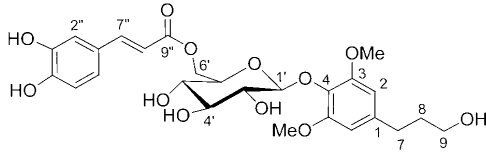
[0079] (calcd. for 571.2155, C₂₈H₃₆O₁₁Na)

[0080] - ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)와 ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): 표 1 및 도 1 참조.

[0081] 이 화합물은 문헌과 비교하여 6'-*O*-카페오일로세오사이드 (6'-*O*-caffeoylroseoside) (Otsuka et al., *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 754; Pabst et al., *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1649; Yamano and Ito *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *45*, 541; Weiss et al., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, 565)로 규명하였으며, 자연계에서 처음으로 보고하는 신규 화합물이다.

[0082] (2) 화합물 2의 구조결정

[0083] 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringin)



[0084]

[0085] 본 발명의 화합물 2의 화학적 특성은 다음과 같다.

[0086] - 무정형분말; $[\alpha]_D^{20} -51.2^\circ$ (c 0.5, MeOH)

[0087] - HR-ESI-TOP-MS (positive-ion mode) m/z 559.1793 [M+Na]⁺

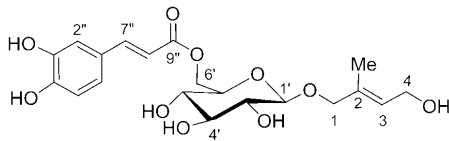
[0088] (calcd. for 559.1791, C₂₆H₃₂O₁₂Na)

[0089] - ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)와 ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): 표 1 및 도 2 참조.

[0090] 이 화합물은 문헌과 비교하여 6'-*O*-카페오일디히드로시린진 (6'-*O*-caffeoyldihydroxyringin) (Wagner et al., *Planta Med.*, **1982**, 44, 193)으로 규명하였으며, 자연계에서 처음으로 보고하는 신규 화합물이다.

[0091] (3) 화합물 3의 구조결정

[0092] 글레노사이드 (glehnoside)



[0093]

[0094] 본 발명의 화합물 3의 화학적 특성은 다음과 같다.

[0095] 무정형분말; $[\alpha]_D^{19} -26.2^\circ$ (c 0.7, MeOH)

[0096] HR-ESI-TOP-MS (positive-ion mode) m/z 449.1422 [M+Na]⁺

[0097] (calcd. for 449.1424, C₂₀H₂₆O₁₀Na)

[0098] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)와 ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): 표 1 및 도 3 참조.

[0099] 이 화합물은 문헌과 비교하여 (*E*)-2-methyl-but-2-enyl-6'-*O*-caffeoyl-β-glucopyranoside로 규명하였고, 글레노사이드 (glehnoside) (Bohlmann et al., *Org. mag. Res.*, **1975**, 7, 426; Nicoletti et al., *Planta Med.*, **1992**, 58, 472; Toyota et al., *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 508)로 명명하였다.

표 1

[0100]

NO	화합물 1		화합물 2		화합물 3	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
1		42.1		140.4	4.12, 4.00 (each d, 12.0)	75.1
2	2.06, 2.40 (each d, 16.8)	50.4	6.43 s	107.0		135.4
3		200.9		154.1	5.59 (t-like, 6.4)	128.5
4	5.78 br s	126.9		133.9	4.06 (dd, 2.4, 6.4)	59.1
5		166.8		154.1	1.63 s	14.1
6		79.7	6.43 s	107.0		

7	5.77 (d, 2.4)	131.4	2.49 (dd, 7.6, 8.0)	33.2		
8	5.77 (d, 2.4)	134.5	1.70 m	35.2		
9	4.33 (overlapped)	76.8	3.45 (overlapped)	62.1		
10	1.23 (d, 6.4)	20.9				
11	0.95 s	23.1				
12	0.93 s	24.3				
13	1.81 (d, 1.2)	19.4				
1'	4.33 (d, 8.0)	102.7	4.71 (d, 7.6)	105.3	4.24 (d, 7.6)	102.8
2'	3.14 (dd, 8.0, 9.2)	74.9	3.45 (overlapped)	75.5	3.17 (t, 8.4)	75.4
3'	3.28 m	77.6	3.67 m	77.7	3.30 m	78.0
4'	3.25 m	71.2	3.67 m	71.8	3.29 m	71.8
5'	3.41 m	75.1	3.67 m	75.5	3.43 m	75.3
6'	4.23 (dd, 5.6, 12.0) 4.38 (dd, 2.0, 12.0)	64.2	4.27 (dd, 5.2, 11.2) 4.38 (dd, 2.0, 12.4)	64.4	4.27 (dd, 6.0, 11.6) 4.42 (dd, 2.0, 11.6)	64.6
1"		127.3		127.6		127.8
2"	6.98 (d, 2.0)	114.9	6.96 (d, 2.0)	114.9	6.98 (d, 2.0)	115.1
3"		146.5		146.7		146.9
4"		149.3		149.5		149.7
5"	6.71 (d, 8.0)	116.2	6.73 (d, 8.0)	116.4	6.71 (d, 8.4)	116.5
6"	6.89 (dd, 2.0, 8.4)	122.7	6.85 (dd, 2.0, 8.4)	122.9	6.88 (dd, 2.0, 8.0)	123.0
7"	7.50 (d, 16.0)	146.9	7.42 (d, 16.0)	146.8	7.51 (d, 16.0)	147.2
8"	6.23 (d, 15.6)	114.6	6.13 (d, 16.0)	114.8	6.23 (d, 16.0)	114.9
9"		168.9		168.8		169.3
OMe			3.74	56.8		

[0101]

[0102] [실험예]

[0103] 실험예 1. 자유라디칼 소거 효과

[0104] 자유라디칼 소거 (free radical scavenging) 효능을 측정하기 위하여, 문헌 (Blois et al., *Nature*, 1958, 181, 1199)에 개시된 방법에 의해 실시하였다.

[0105] 시료는 상기 실시예 1 내지 3에서 제조한 분획물 및 활성화합물을 각각 다양한 농도로 에탄올 10 μ l에 용해시켜 준비하였다. 100 μ M 1,1-디페닐-2-피크릴 히드라질 (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH) 에탄올 용액 190 μ l에, 준비한 시료를 첨가하고 30분 동안 37°C에서 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하여 자유라디칼 소거효과를 IC₅₀ 값으로 구하였다. IC₅₀은 자유라디칼 소거 효과를 계산하여 50% 억제효과를 나타내는 농도 (IC₅₀)를 의미한다. 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

[0106] 실험예 2. 잔틴/잔틴 옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온 소거 효과

[0107] 잔틴 (xanthine)과 잔틴 옥시다제 (xanthine oxidase, XOD)의 반응으로 생성되는 슈퍼옥사이드 음이온 (superoxide anion radical, O₂⁻) 소거 효능을 측정하기 위하여, 문헌 (Toda et al., *Planta, Med.* 1991, 57, 8)에 개시된 방법에 의해 실시하였다.

[0108] 구체적으로, 1 mM 잔틴, 1 mM EDTA, 250 μ M 니트로블루 테트라졸리움 (nitroblue tetrazolium, NBT)과 0.1 M 인산완충액 (pH 7.5), 각 농도별로 희석한 실험 화합물 용액, 그리고 1.5 \times 10⁻³ 단위 XOD를 포함하여 최종부피가 200 μ l인 용액을 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 상기 반응용액에 1N HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 생성된 포마잔 (formazan)을 540 nm에서 흡광도를 측정하여 잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온 소거효과를 비교한 결과를 IC₅₀ 값으로 구하였다. IC₅₀은 잔틴/잔틴옥시다제 유도 슈퍼옥사이드 음이온

(superoxide radical, O₂⁻) 소거 효능을 계산하여 50% 억제효과를 나타내는 농도 (IC₅₀)를 의미한다. 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

[0109]

실험예 3. 지질과산화물 생성 억제 효과

[0110]

지질과산화물은 여러 산화반응에 의해 지질이 과산화되어 생성되는 물질로, 각종 반응성이 큰 활성산소와 자유라디칼 (free radical) 등이 불포화 지방산이 다량 함유된 세포막의 인지질을 산화시켜 세포막에 지질과산화물이 생성된다. 세포막에 지질과산화물이 축적되면 세포막의 유동성과 기능성이 저하되어 세포기능이 저해되고 세포구조가 변화되는 등 조직상에 국소적인 장애가 생긴다.

[0111]

자유라디칼 소거 (free radical scavenging) 효능을 측정하기 위하여, 쥐의 간 균질액을 이용하여 문헌 (Sanz et al., *Xenobiotica*, 1994, 24, 689)에 개시된 방법에 의해 실시하였다.

[0112]

구체적으로, 간 균질액 (100 μl, 16 mg protein/ml), 10 μM FeSO₄, 10 μl 실험 화합물, 0.4 mM의 아스코르빈산 (ascorbic acid), 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)를 혼합하여 총 부피가 1 ml가 되도록 하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 지질과산화 저해능력은 Buege와 Aust의 방법 (Buege et al., *Methods in Enzymology*, 1978, 52, 302)에서 제시한 바대로, 티오바비츠티릭산 기질 (thiobarbituric acid-reactive substance, TBARS)을 이용하여 측정하였다. 즉, 상기 반응용액에 티오바비츠티릭산 용액을 가하고, 95°C에서 30분 동안 반응시킨 후 냉침하고 원심분리한 상등액을 취하여 마이크로플레이트 리더 (microplate reader)로 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 하기 수학적 식 1에 대입하여 지질과산화물 생성 억제율 (A, %)을 계산하였으며, 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다. 제시되는 값은 3회 평균값이다.

[0113]

[수학적 식 1]

[0114]

$$A(\%) = \frac{\text{시료의 반응흡광도}}{\text{대조군의 반응흡광도}} \times 100$$

표 2

[0115]

시험물질		IC ₅₀ * (μg/ml)		
		DPPH 소거효능	슈퍼옥사이드 음이온 소거효능	지질과산화 저해효능
지상부의 추출물/분획물	메탄올 추출물	46.3 ± 1.5	20.7 ± 0.6	152.4 ± 13.3
	디클로로메탄 분획물	>500	>500	343.1 ± 33.8
	아세트산에틸 분획물	7.2 ± 0.3	3.3 ± 0.1	14.5 ± 0.2
	부탄올 분획물	19.7 ± 0.4	6.4 ± 0.1	53.0 ± 1.6
지하부의 분획물	디클로로메탄 분획물	234.7 ± 2.4	>500	296.2 ± 33.7
	아세트산에틸 분획물	8.8 ± 0.5	2.1 ± 0.1	12.0 ± 0.1
	부탄올 분획물	68.5 ± 1.7	27.0 ± 0.5	106.9 ± 1.0
시험물질		IC ₅₀ * (μM)		
		DPPH 소거효능	슈퍼옥사이드 음이온 소거효능	지질과산화 저해효능
활성화합물	화합물 1	16.7 ± 0.4	10.9 ± 0.3	91.1 ± 1.9
	화합물 2	17.1 ± 0.5	9.7 ± 0.1	86.7 ± 0.3
	화합물 3	14.8 ± 0.2	11.0 ± 0.1	82.9 ± 2.0
대조약물	레스베라트롤 (resveratrol)	51.8 ± 0.3	438.3 ± 20.5	48.7 ± 0.7
	콰르세틴 (quercetin)	8.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1	11.9 ± 0.8
	트롤록스(trolox)	21.2 ± 0.3	208.4 ± 2.1	105.1 ± 5.5
* 3회 실시하여 얻은 평균값임				

- [0116]
- [0117] 상기 표 2의 결과에 의하면, DPPH 소거효능에 있어 섬쭉부쟁이의 지상부 메탄올 추출물에서도 그 효능이 확인되고 있으며, 지상부 또는 지하부의 에틸아세테이트 분획물은 모두 상당히 우수한 DPPH 소거효능을 보이고 있으며 오히려 화합물에 비교하여서도 그 효능이 우수하다는 것을 확인할 수 있다. 또한, 섬쭉부쟁이로부터 분리한 3종의 화합물은 대조약물 중 콰르세틴보다는 다소 미약하나, 레스베라트롤이나 트롤록스에 비교하여서는 모두 현저히 우수한 DPPH 소거효능을 나타내고 있음을 확인할 수 있다.
- [0118] 또한, 슈퍼옥사이드 음이온 소거효능에 있어 섬쭉부쟁이의 지상부 메탄올 추출물에서도 그 효능이 확인되고 있으며, 지상부 또는 지하부의 에틸아세테이트 분획물은 모두 상당히 우수한 슈퍼옥사이드 음이온 소거효능을 보이고 있으며 오히려 활성화합물에 비교하여서도 그 효능이 우수하다는 것을 확인할 수 있다. 또한, 섬쭉부쟁이로부터 분리한 3종의 화합물은 대조약물 중 콰르세틴보다는 미약하나, 레스베라트롤이나 트롤록스에 비교하여서는 모두 현저히 우수한 소거능을 나타내고 있음을 확인할 수 있다.
- [0119] 지질과산화물 생성 억제효능에 있어, 섬쭉부쟁이의 지상부 메탄올 추출물에서는 미약한 효능을 보이고 있지만, 섬쭉부쟁이 지상부 또는 지하부의 에틸아세테이트 분획물에서 우수한 효능을 나타내고 있음을 확인할 수 있다. 또한, 섬쭉부쟁이로부터 분리한 3종의 화합물의 경우, 대조약물 중 트롤록스에 비교하여 우수한 효능을 나타내고 있음을 확인할 수 있다.
- [0120] 실험예 4. 대식세포 RAW 264.7에서의 세포생존율 측정
- [0121] 섬쭉부쟁이로부터 분리한 활성화합물 (화합물 1, 2, 3)에 의한 세포생존율을 측정하기 위하여 MTT assay 방법을 이용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (Kim JY. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, 584, 175).
- [0122] 96-웰 플레이트 (96-well plate)에 대식세포주인 RAW 264.7 세포 (한국세포주은행)를 1×10^5 cells/well 농도로 분주하였다. 실험화합물의 적정한 농도를 결정하기 위하여, 세포에 다양한 농도의 시료 및 LPS (10 ng/mL)로 24시간 처리하였다. 24시간 후에 MTT 시액을 처리한 뒤, 배지를 제거하였다. 세포만 남은 각 웰에 다이메틸설폭사이드 (DMSO)를 처리하고 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 리더기 (Perkin Elmer Cetus, Forster City, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 도 4에 첨부하였다.
- [0123] 도 4에 의하면, 대식세포에 24시간 동안 LPS (10 ng/mL)와 실험화합물 (1, 10, 50 또는 100 μ M 농도)을 처리하였을 때, 사용 농도에서 유의적인 세포의 성장이나 파괴를 유도하지 않은 농도를 설정하였다. 섬쭉부쟁이로부터 분리한 활성화합물의 억제 효과는 비특이적 세포독성에 기인할 수 없다는 것을 확인할 수 있다.
- [0124] 실험예 5. 대식세포 RAW 264.7에서의 LPS 유도 NO 생성 억제 효과
- [0125] 섬쭉부쟁이로부터 분리한 활성화합물 (화합물 1, 2, 3)이 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다 (Kim JY. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, 584, 175).
- [0126] 24-웰 플레이트 (24-well plate)에 대식세포주인 RAW 264.7 세포 (한국세포주은행)를 5×10^5 cells/well의 농도로 분주하고, 실험화합물 (5, 25, 및 50 μ M 농도)을 처리한 후, LPS 10 ng/mL을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. L-NIL (20 μ M)은 NO 생성을 억제하는 양성대조군으로 사용하였다. 배양 배지의 아질산염 (Nitrite) 레벨은 Griess 반응 분석을 이용하여 측정하였고, 기존 문헌 (Kim JY. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, 584, 175)의 NO 생성측정법을 반영하여 추정하였다.
- [0127] 간략하게, 100 μ l의 세포 배양 배지는 100 μ l의 Griess 반응액 [5%(v/v) 인산이 포함되어 있는 1%(w/v) 설파닐아마이드 (sulfanilamide) 및 동일 부피의 0.1%(w/v) 나프틸에틸렌디아민 염산염]을 넣은 후, 10분간 상온에서 반응시키고, 마이크로플레이트 리더기 (Perkin Elmer Cetus, Forster City, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험에서 블랭크 (Blank)는 배지를 사용하였으며, 아질산나트륨 (sodium nitrite)의 농도별 표준곡선을 이용하여 시료 (sample)의 아질산염 농도를 결정하였다. 그 결과는 도 5로서 첨부하였다.
- [0128] 도 5에 의하면, 섬쭉부쟁이로부터 분리한 활성화합물을 처리할 때 LPS로 유도된 NO 생성은 실험화합물의 농도

의존적으로 억제되었다. 따라서 섬썩부쟁이로부터 분리한 활성화합물은 LPS로 유도된 NO에 의한 세포손상에 대하여 보호효과를 나타내므로 염증반응을 완화시킬 수 있음을 확인할 수 있다.

- [0129] 실험예 6. 대식세포 RAW 264.7에서의 LPS 유도 PGE₂ 생성 억제 효과
- [0130] 섬썩부쟁이로부터 분리한 활성화합물 (화합물 2, 3)이 LPS로 유도된 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂) 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다 (Kim JY. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, *584*, 175).
- [0131] 24-웰 플레이트 (24-well plate)에 대식세포주인 RAW 264.7 세포 (한국세포주은행)를 세포농도 5×10⁵ cells/well로 분주하고, 실험화합물 (5, 25, 및 50 μM)을 처리한 후, LPS 10 ng/mL을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포배양액을 취하여 EIA 키트 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 세포 내의 PGE₂ 생성량을 측정하였다. NS398 (3 μM)은 양성대조군으로 사용하였다. 그 결과는 도 6에 첨부하였다.
- [0132] 도 6에 의하면, LPS를 처리한 세포는 LPS를 처리하지 않은 대조세포에 비해 PGE₂ 생성이 현저히 증가하였고, LPS로 유도된 PGE₂ 생성은 섬썩부쟁이로부터 분리한 활성화합물의 농도 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다. 따라서 섬썩부쟁이로부터 분리한 활성화합물은 LPS로 유도된 PGE₂에 의한 세포손상을 보호하는 효과를 나타내고 있으며, 이 화합물들은 염증반응을 완화시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0133] 실험예 7. 대식세포 RAW 264.7에서의 LPS 유도 TNF-α, IL-6 및 IL-1β의 생성 억제 효과
- [0134] RAW 264.7 세포에 섬썩부쟁이로부터 분리한 활성화합물 (5, 25, 및 50 μM)을 1시간 동안 전처리한 후, 24시간 동안 10 ng/mL의 LPS를 처리하였다. EIA 키트 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 배양 배지의 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 농도를 측정하였다. 그 결과는 도 7에 첨부하였다.
- [0135] 도 7에 의하면, LPS로 유도한 TNF-α, IL-6 및 IL-1β와 같은 사이토카인의 생성은 섬썩부쟁이로부터 분리한 활성화합물에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 확인할 수 있다.
- [0136] [제제예]
- [0137] 한편, 본 발명에 따른 분획물 또는 이로부터 분리된 활성화합물을 포함하는 약제조성물은 목적에 따라 여러 형태로 제조가 가능하다. 하기 제제 1 내지 4는 본 발명에 따른 분획물 또는 이로부터 분리된 활성화합물을 유효성분으로 함유하는 약제 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0138] 제제 1 : 정제 (직접 가압)
- [0139] 활성성분 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 14.1 mg, 크로스포비돈 USNF 0.8 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 mg을 혼합하고 가압하여 정제로 만들었다.
- [0140] 제제 2 : 정제 (습식 조립)
- [0141] 활성성분 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 16.0 mg과 녹말 4.0 mg을 섞었다. 폴리솔베이트 80 0.3 mg을 순수한 물에 녹인 후 이 용액의 적당량을 첨가한 다음, 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후 콜로이달 실리 콘 디옥사이드 2.7 mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 mg과 섞었다. 미립을 가압하여 정제로 만들었다.
- [0142] 제제 3 : 분말과 캡슐제
- [0143] 활성성분 5.0 mg을 체로 친 후에, 락토스 14.8 mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

와 함께 섞었다. 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

[0144] 제제 4 : 주사제

[0145] 활성성분으로서 100 mg을 함유시키고, 그 밖에도 만니톨 180 mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg 및 증류수 2974 mg를 함유시켜 주사제를 제조하였다.

[0146] 또한, 본 발명에 따른 분획물 또는 이로부터 분리된 활성화합물을 포함하는 건강식품 조성물은 목적에 따라 여러 형태로 제조가 가능하다. 하기 제제 5 내지 9는 본 발명에 따른 분획물 또는 이로부터 분리된 활성화합물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0147] 제제 5. 과립상 건강식품

[0148] 활성성분 1000 mg, 비타민 A 아세테이트 70 μg , 비타민 E 1.0 mg, 비타민 0.13 mg, 비타민 B₂ 0.15 mg, 비타민 B₆ 0.5 mg, 비타민 B₁₂ 0.2 μg , 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 μg , 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 μg , 판토텐산 칼슘 0.5 mg, 황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼륨 90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg을 혼합한 다음, 통상의 방법에 따라 과립상 건강식품을 제조하였다.

[0149] 제제 6. 건강음료

[0150] 활성성분 1000 mg, 구연산 1000 mg, 올리고당 100 g, 매실농축액 2 g, 타우린 1 g을 혼합하고, 여기에 정제수를 가하여 전체 용량을 900 ml로 조절하였다. 약 1시간 동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균하여 건강음료를 제조하였다.

[0151] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호 도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0152] 제제 7. 밀가루 식품

[0153] 활성성분 0.5 내지 5 g을 밀가루 100 g에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0154] 제제 8. 유제품

[0155] 활성성분 5 내지 10 g을 우유 100 g에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0156] 제제 9. 선식

[0157] 현미 30 g, 보리 20 g, 찹쌀 10 g, 울무 15 g을 공지의 방법으로 알파화 시켜서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시의 분말로 제조하였다. 검은콩 7 g, 검정깨 7 g, 들깨 7 g을 공지의 방법으로 쪄서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시의 분말로 제조하였다. 상기에서 제조한 곡물류 및 종실류와 본 발명의 활성성분 3 g을 혼합하여 선식을 제조하였다.

[0158] 또한, 본 발명에 따른 분획물 또는 이로부터 분리된 활성화합물을 포함하는 화장품 조성물은 목적에 따라 여러 형태로 제조가 가능하다. 하기 제제 10 내지 13은 본 발명에 따른 분획물 또는 이로부터 분리된 활성화합물

을 유효성분으로 함유하는 화장품 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0159] 제제 10: 화장용 크림
- [0160] 활성성분 0.0012 mg에 폴리에틸렌글리콜모노스테아레이트 2 mg, 자기유화형 모노스테아르산글리세린 5 mg, 스쿠알렌 6 mg, 트리2-에틸헥산글리세릴 6 mg, 스펅고당지질 1 mg, 1,3-부틸렌글리콜 7 mg을 적당량의 정제수에서 혼합하여 화장용 크림을 제조하였다.
- [0161] 제제 11: 화장용 로션
- [0162] 활성성분 0.0015 mg, L-아스코르빈산-2-인산마그네슘염 1 mg, 수용성 콜라겐 (1% 수용액) 1 mg, 시트르산나트륨 0.1 mg, 시트르산 0.05 mg, 감초 엑기스 0.2 mg, 1,3-부틸렌글리콜 3 mg을 적당량의 정제수에서 혼합하여 화장용 로션을 제조하였다.
- [0163]
- [0164] 제제 12: 화장용 스킨
- [0165] 활성성분 0.0018 mg, 히드록시에틸렌셀룰로오스 (2% 수용액) 12 mg, 크산탄검 (2% 수용액) 2 mg, 1,3-부틸렌글리콜 6 mg, 진한 글리세린 4 mg, 히알루론산나트륨 (1% 수용액) 5 mg을 적당량의 정제수에서 혼합하여 화장용 스킨을 제조하였다.
- [0166] 제제 13: 화장용 마사지 크림
- [0167] 활성성분 1 mg에 식물성 경화유 1.5 mg, 스테아린산 0.6 mg, 스테아릴 알코올 2 mg, 글리세롤 스테아레이트 1 mg, 프로필렌글리콜 1.5 mg, 아라키딜글루코사이드 1 mg, 카프릴릭 5 mg, 사이클로메디콘 4 mg, 트리에탄올아민 0.1 mg, 스쿠알란 2.5 mg을 적당량의 정제수에서 혼합하여 화장용 마사지 크림을 제조하였다.

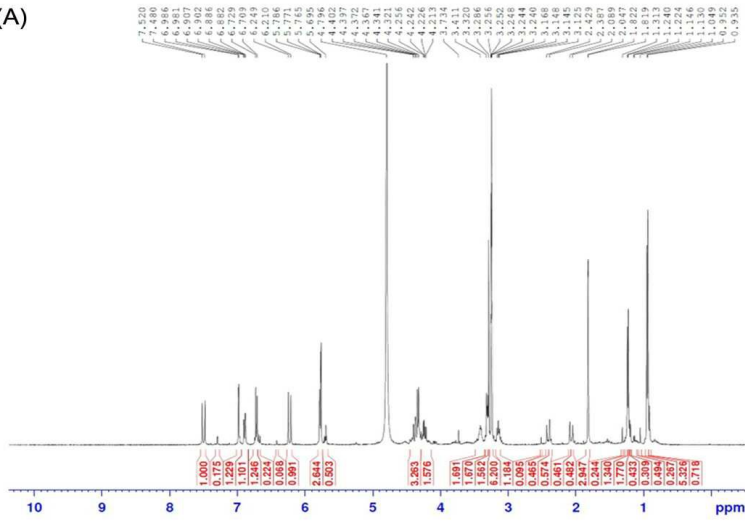
산업상 이용가능성

- [0168] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 섬쑥부쟁이 (*Aster glehni*)의 분획물 또는 이로부터 분리된 활성화합물은 리포폴리사카라이드 (LPS)에 의해 유도된 염증성 대사산물인 NO (Nitric oxide)의 생성과 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂) 생성에 있어 저해 효능이 우수함을 확인할 수 있다.
- [0169] 따라서, 섬쑥부쟁이 (*Aster glehni*)의 분획물 또는 이로부터 분리된 활성화합물은 염증질환의 치료, 예방 및 개선을 목적으로 하는 약제, 건강식품, 화장품의 유효성분으로 유용하다.

도면

도면1

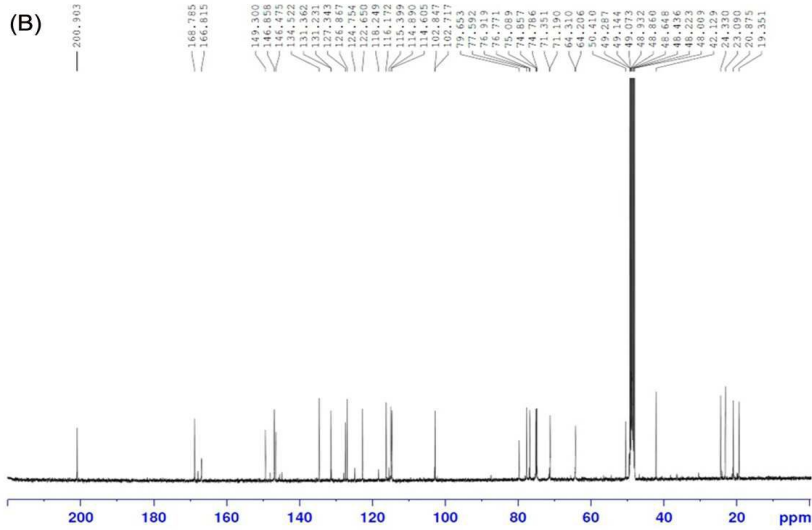
(A)



```

Current Data Parameters
NAME: 921-1282-001-0147-Co-2
EXPNO: 1
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ : 20130223
Time: 09:53
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm PABBO 500
PULPROG: zgpg30
SOLVENT: MeOD
NS: 512
DS: 4
SWH: 8223.640 Hz
FIDRES: 0.11480 Hz
AQ: 3.9046387 sec
RG: 119.4
AQ2: 60.460 sec
SFO: 400.2100000 MHz
NUC1: 13C
NUC2: 13C
NUC3: 13C
NUC4: 13C
NUC5: 13C
NUC6: 13C
NUC7: 13C
NUC8: 13C
NUC9: 13C
NUC10: 13C
NUC11: 13C
NUC12: 13C
NUC13: 13C
NUC14: 13C
NUC15: 13C
NUC16: 13C
NUC17: 13C
NUC18: 13C
NUC19: 13C
NUC20: 13C
Processing parameters
SI: 32768
SF: 400.2100000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.30 Hz
GB: 0
PC: 1.00
    
```

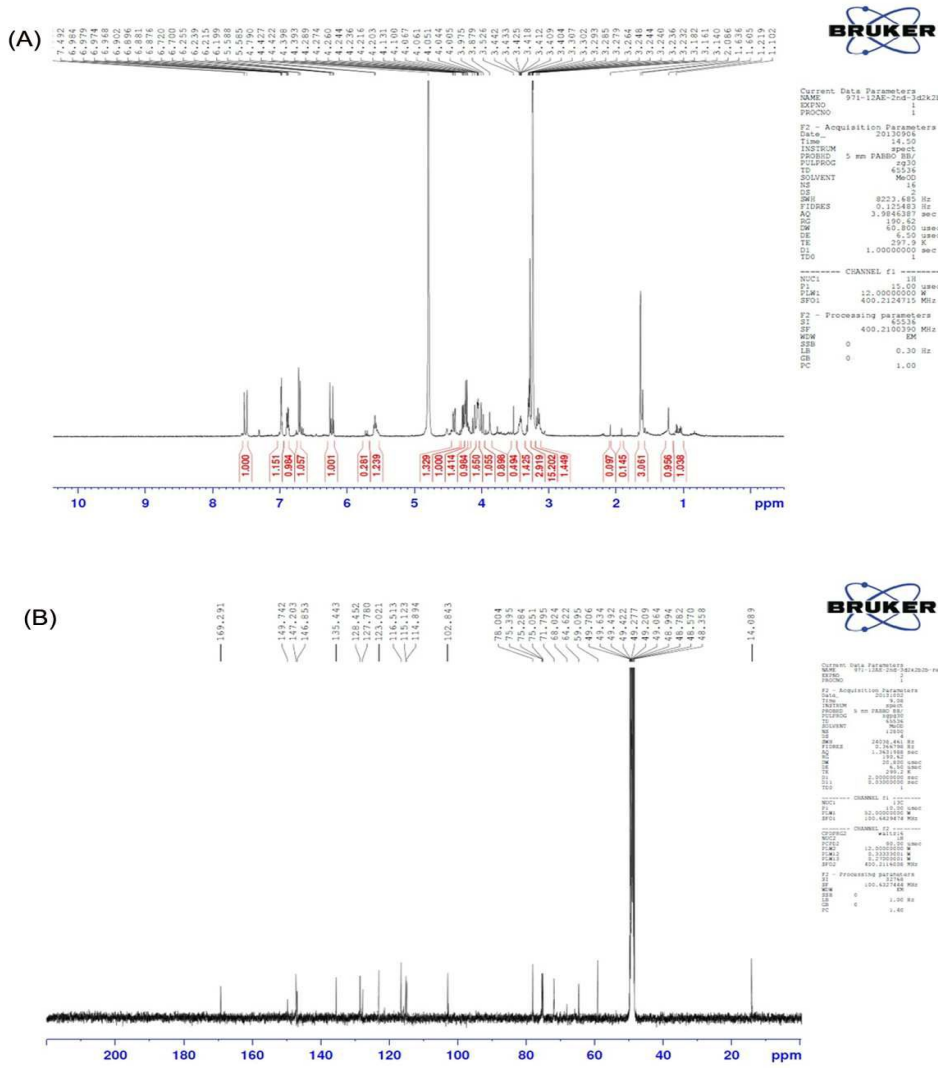
(B)



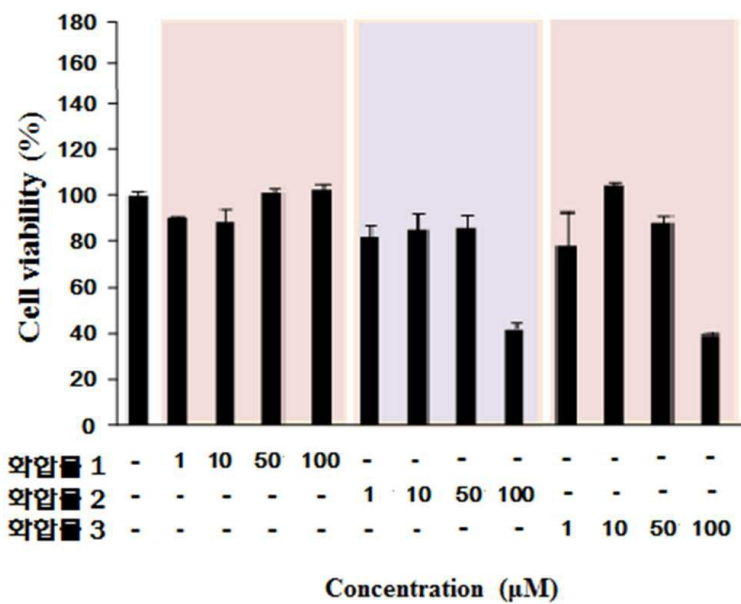
```

Current Data Parameters
NAME: 921-1282-001-0147-Co-2
EXPNO: 1
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ : 20130223
Time: 09:53
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm PABBO 500
PULPROG: zgpg30
SOLVENT: MeOD
NS: 512
DS: 4
SWH: 24018.441 Hz
FIDRES: 0.1361768 Hz
AQ: 3.9046387 sec
RG: 119.4
AQ2: 60.460 sec
SFO: 400.2100000 MHz
NUC1: 13C
NUC2: 13C
NUC3: 13C
NUC4: 13C
NUC5: 13C
NUC6: 13C
NUC7: 13C
NUC8: 13C
NUC9: 13C
NUC10: 13C
NUC11: 13C
NUC12: 13C
NUC13: 13C
NUC14: 13C
NUC15: 13C
NUC16: 13C
NUC17: 13C
NUC18: 13C
NUC19: 13C
NUC20: 13C
Processing parameters
SI: 32768
SF: 400.2100000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.30 Hz
GB: 0
PC: 1.00
    
```

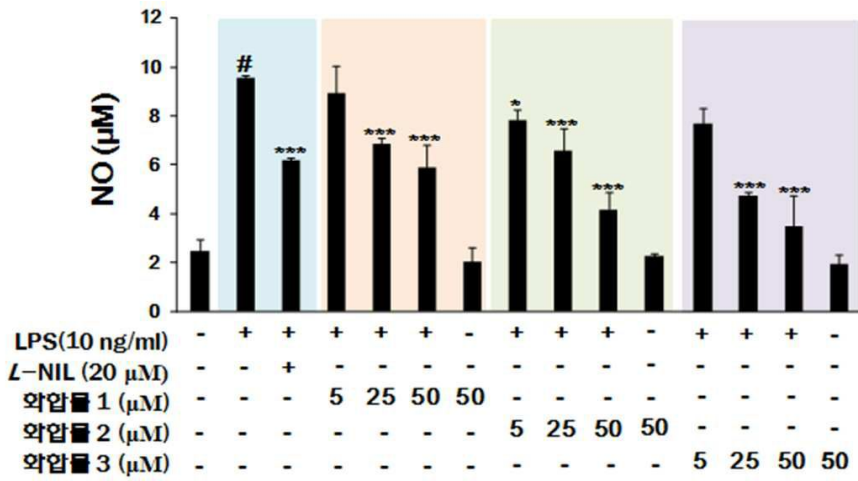

도면3



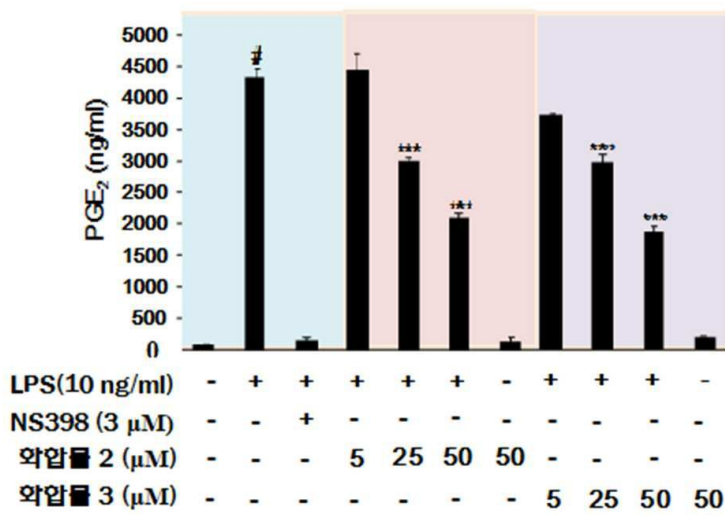
도면4



도면5



도면6



도면7

