



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월18일  
(11) 등록번호 10-1585523  
(24) 등록일자 2016년01월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 31/575** (2006.01) **A61K 31/56** (2006.01)  
**A61K 36/25** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-0069231(분할)  
(22) 출원일자 2014년06월09일  
심사청구일자 2014년06월09일  
(65) 공개번호 10-2015-0028185  
(43) 공개일자 2015년03월13일  
(62) 원출원 특허 10-2013-0106168  
원출원일자 2013년09월04일  
심사청구일자 2013년09월04일
- (56) 선행기술조사문헌  
Phytotherapy Research, 23(11), 2009.11., pp.1634-1637\*  
최용환, '황칠성분의 분리 및 분석에 관한 연구', 한밭대학교 대학원 석사학위논문, 2003.02.\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
**재단법인 전남생물산업진흥원**  
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
- (72) 발명자  
**김선오**  
광주광역시 북구 양림로 52-1, 201동 1003호(연제동, 연제2차 대주피오레)  
**최은진**  
광주광역시 남구 방림로 31, 108동 605호(방림동, 휴먼시아아파트)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**특허법인유아이피**

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 신영신

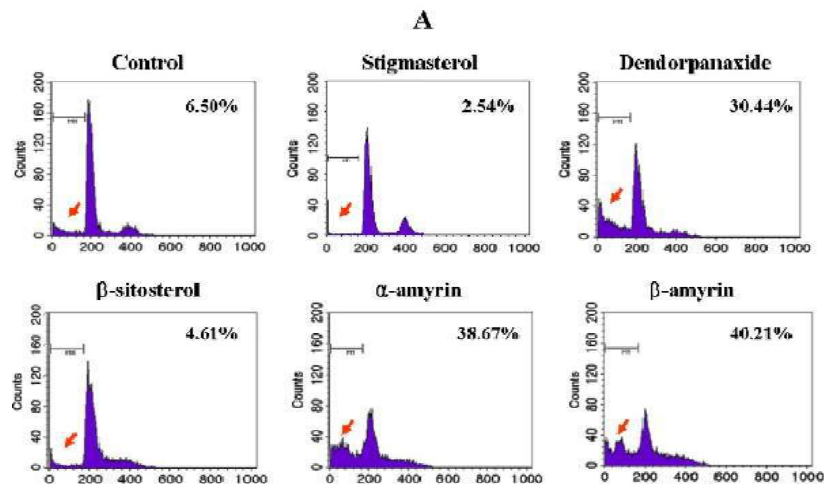
(54) 발명의 명칭 **황칠나무 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품**

(57) 요약

본 발명은 황칠나무 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 황칠나무로부터 정제수를 포함한 물, C1 내지 C4의 저급 알콜, 헥산 또는 이들의 혼합용매를 가하여 황칠나무 추출물을 제조하는 1단계; 상기 1단계에서 제조된 황칠나무 추출물에 계통분획을 실시하여 황칠나무 분획물을 제조하는 2단계; 및 상기 2단계에 제조된 황칠나무 분획물을 크로마토그래피로 분리, 정제하여 베타-아미린, 알파-아미린, 덴드로파녹사이드, 베타-시토스테롤 또는 스티그마스테롤을 제조하는 3단계를 포함하여 이루어지는 트리테르페노이드 화합물의 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도3a



(72) 발명자

**김영숙**

경남 진주시 남강로1317번길 31-1

**최철웅**

광주광역시 서구 풍암순환로 14, 105동 203호(풍암  
동, 호반중흥아파트)

**이동욱**

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39, 203호(수창아  
트빌아파트)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

황칠나무에 정제수를 포함한 물, C1 내지 C4의 저급 알콜 및 헥산으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 가하여 황칠나무 추출물을 제조하는 1단계;

상기 1단계에서 제조된 황칠나무 추출물에 계통분획을 실시하여 황칠나무 분획물을 제조하는 2단계; 및

상기 2단계에 제조된 황칠나무 분획물을 크로마토그래피로 분리, 정제하는 3단계를 포함하여 이루어지는 스티그마스테롤 화합물의 제조방법에 있어서,

상기 2단계의 계통분획은 상기 1단계에서 제조된 황칠나무 추출물을 물로 현탁한 후, n-헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 n-부탄올로 계통분획을 실시하는 것이고, 상기 3단계의 황칠나무 분획물은 황칠나무의 n-헥산 분획물이고, 상기 3단계의 크로마토그래피는 아세톤 및 헥산이 1:1 내지 100의 질량대 부피비로 혼합된 용매를 이용하는 것을 특징으로 하는 스티그마스테롤 화합물의 제조방법.

**청구항 2**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 황칠나무 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 황칠나무는 한국 특산종으로서 우리나라의 전남 해안지역과 제주도에서 자생하는 상록 활엽 교목이다. 황칠나무의 껍질에 상처를 내면 노란 액체가 흘러나오는데, 이것을 황칠(黃漆)이라고 하며 오래 전부터 가구의 도료로 사용하였다. 최근의 연구 결과에 따르면, 황칠나무가 항산화작용, 면역력 증진, 신경안정, 항균작용, 항암작용 등이 있는 것으로 보고 되고 있다.

[0003] 암을 치료하기 위한 화학요법(chemotherapy)은 암 세포의 에프토시스(apoptosis, 세포 자살)를 유도하여 암 세포를 사멸한다. 암 세포에 있어서, 일단 에프토시스가 야기되면, 암 세포는 파괴되어 에프틱 바디(apoptotic bodies)로 전환되게 된다. 이어서, 에프틱 바디는 주변의 식세포들에 의해 소거되므로 염증반응과 같은 부작용을 수반하지 않게 된다. 따라서, 암 세포의 에프토시스 유도는 항암제(chemotherapeutic drugs)에 의해 악성 종양세포를 제거하는 데 있어서 효과적인 방법이다(Hannun, 1997; Kaufman and Earnshaw, 2000).

[0004] 이에 본 발명자는 에프토시스를 유도할 수 있는 약학적으로 안전한 항암제를 개발하기 위하여, 항암 효과가 뛰어난 천연물에 대한 연구를 수행한 결과, 황칠나무에서 분리한 화합물, 특히 트리테르페노이드 화합물이 항암 효과를 보이는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 본 발명의 목적은 황칠나무 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공하기 위한 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0006] 본 발명은 황칠나무 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0007] 본 발명은 황칠나무 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.
- [0008] 본 발명에서,
- [0009] 상기 황칠나무 추출물로부터 분리한 화합물은 베타-아미린, 알파-아미린, 덴드로파녹사이드, 베타-시토스테롤 및 스티그마스테롤로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 트리테르페노이드 화합물인 것을 특징으로 하고, 상기 암은 폐암 또는 유방암인 것을 특징으로 한다.
- [0010] 본 발명은 황칠나무로부터 정제수를 포함한 물, C1 내지 C4의 저급 알콜, 헥산 또는 이들의 혼합용매를 가하여 황칠나무 추출물을 제조하는 1단계; 상기 1단계에서 제조된 황칠나무 추출물에 계통분획을 실시하여 황칠나무 분획물을 제조하는 2단계; 및 상기 2단계에 제조된 황칠나무 분획물을 크로마토그래피로 분리, 정제하여 베타-아미린, 알파-아미린, 덴드로파녹사이드, 베타-시토스테롤 또는 스티그마스테롤을 제조하는 3단계를 포함하여 이루어지는 트리테르페노이드 화합물의 제조방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명에서,
- [0012] 상기 2단계의 계통분획은 상기 1단계에서 제조된 황칠나무 추출물을 물로 현탁한 후, n-헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 n-부탄올로 계통분획을 실시하는 것을 특징으로 한다.

**발명의 효과**

- [0013] 본 발명의 황칠나무 추출물로부터 분리한 화합물, 특히 트리테르페노이드 화합물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품은 암세포의 에프토시스(apoptosis)를 유도하여 암 세포의 성장을 억제시키므로 암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

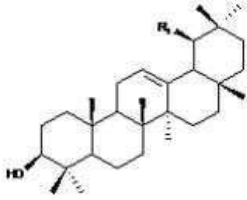
- [0014] 도 1은 황칠나무에서 분리한 트리테르페노이드 화합물 중에서 베타-아미린, 알파-아미린 및 올린-12-엔-3, 24 β-디올의 암 세포(A-549 및 MCF-7)의 성장 억제 효과를 나타낸다.
- 도 2는 황칠나무에서 분리한 트리테르페노이드 화합물 중에서 덴드로파녹사이드, 베타-시토스테롤 및 스티그마스테롤의 암 세포(A-549 및 MCF-7)의 성장 억제 효과를 나타낸다.
- 도 3은 황칠나무에서 분리한 트리테르페노이드 화합물을 처리한 암 세포(A-549 및 MCF-7)의 각 세포 주기별 DNA 함량 및 세포 수를 나타낸다.
- 도 4는 황칠나무에서 분리한 트리테르페노이드 화합물을 암 세포(A-549 및 MCF-7)에 처리한 후, 웨스턴 블랏팅을 수행하여 에프토시스를 조절하는 Bax와 Bcl-2의 발현 결과를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0015] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0016] 본 발명의 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품은 황칠나무(Dendropanax morbifera Lev.) 추출물로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유한다. 이하의 본 발명의 실시예에서는 황칠나무 추출물로부터 분리된 화합물로서, 트리테르페노이드(triterpenoid) 화합물을 예로 들어 설명하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 상기 트리테르페노이드 화합물은 암 세포의 에프토시스를 유도하여 암 세포의 성장을 억제한다. 인간 폐암 세포와 인간 유방암 세포에서 세포 주기의 진행을 정지시켜 G0/G1, S, 및 G2/M phase DNA의 함량은 감소시키고, 에프토틱(apoptotic) Sub-G1 phase DNA(에프토시스로 사멸한 암 세포의 DNA)의 함량을 증가시킨다. 이러한 암 세포의 에프토시스는 항-에프토틱(anti-apoptotic) Bcl-2 단백질의 발현을 감소시키고, 프로-에프토틱(pro-apoptotic) Bax 단백질의 발현을 증가시키는 경로를 거쳐 일어나게 된다.
- [0018] 본 발명에서, 상기 트리테르페노이드 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 베타-아미린(β-amyrin), 하기 화학식

2로 표시되는 알파-아미린( $\alpha$ -amyrin), 하기 화학식 3으로 표시되는 덴드로판옥사이드(dendropanoxide), 하기 화학식 4로 표시되는 베타-시토스테롤( $\beta$ -sitosterol) 및 하기 화학식 5로 표시되는 스티그마스테롤(stigmasterol)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이다.

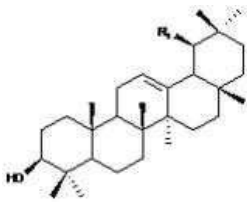
[0019] [화학식 1]



[0020]

[0021] (여기서,  $R_1$ 이 H)

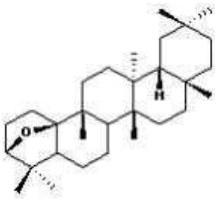
[0022] [화학식 2]



[0023]

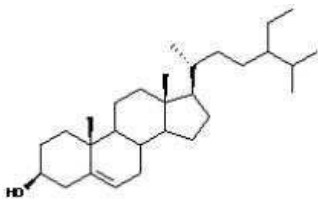
[0024] (여기서,  $R_1$ 이  $CH_3$ )

[0025] [화학식 3]



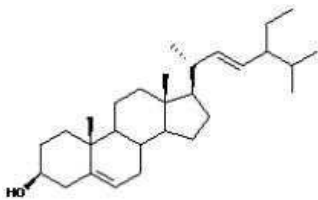
[0026]

[0027] [화학식 4]



[0028]

[0029] [화학식 5]



[0030]

[0031] 황칠나무로부터 상기 트리테르페노이드 화합물은 다음과 같은 3단계를 통해서 취득될 수 있다.

[0032] 본 발명은 황칠나무로부터 정제수를 포함한 물, C1 내지 C4의 저급 알콜, 헥산 또는 이들의 혼합용매를 가하여

황칠나무 추출물을 제조하는 1단계; 상기 1단계에서 제조된 황칠나무 추출물에 계통분획을 실시하여 황칠나무 분획물을 제조하는 2단계; 및 상기 2단계에 제조된 황칠나무 분획물을 크로마토그래피로 분리, 정제하여 베타-아미린, 알파-아미린, 텐드로파녹사이드, 베타-시토스테롤 또는 스티그마스테롤을 제조하는 3단계에 의해 수득될 수 있다.

- [0033] 상기 황칠나무로부터 황칠나무 추출물을 제조하는 1단계를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0034] a) 황칠나무 건잎 500 내지 3000g을 정확히 칭량하여, b) 정제수를 포함한 물, C1 내지 C4의 저급 알콜, 헥산 또는 이들의 혼합용매를 가하여 진탕하면서 10℃ 내지 200℃에서 1 내지 20시간 동안 추출하여 여과한 후, c) 여과된 추출액의 성분 함량을 높이기 위하여 감압 농축하여 농축액이 수득될 수 있다.
- [0035] 상기 황칠나무 추출물로부터 계통분획을 실시하여 황칠나무 분획물을 제조하는 2단계를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0036] 먼저 1단계에서 얻어진 황칠나무 농축액을 물로 충분히 현탁한 후, n-헥산을 이용하여 1차 분획을 실시하여 물층과 n-헥산층(Hexane ext.)으로 분획한다. 분획된 물층을 클로로포름을 이용하여 물층과 클로로포름층(CHCl<sub>3</sub> ext.)으로 2차 분획한다. 분획된 물층을 에틸아세테이트를 이용하여 물층과 에틸아세테이트층(EtOAc ext.)으로 3차 분획한다. 마지막으로 물층을 n-butanol(n-부탄올)을 이용하여 물층과 n-부탄올층으로 분획한다.
- [0037] 상기 황칠나무 분획물을 크로마토그래피로 분리, 정제한 후 트리테르페노이드 화합물을 제조하는 3단계를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0038] 상기 단계 2에서 얻은 n-헥산층을 실리카겔로 충전시킨 크로마토그래피에 로딩한 후, 헥산(Hexane):아세톤(Acetone)을 100:1에서 1:1(W/V)로 혼합한 용매를 사용하고 이들 용매에 의해 용출된 다수의 소분획물을 얻는다. 얻어진 다수의 소분획물을 헥산(Hexane):아세톤(Acetone)을 100:1에서 80:1(W/V) 또는 100:1에서 1:1(W/V)의 용매의 오픈 컬럼 실리카겔 크로마토그래피 또는 LiChroprep RP-18 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 상기 화합물들을 얻는다. 이렇게 얻어진 화합물은 <sup>1</sup>FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, EI-MS 스펙트럼을 측정하여 이들 물질의 분자구조를 결정할 수 있다.
- [0039] 상기 황칠나무 추출물로부터 분리한 트리테르페노이드 화합물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.
- [0040] 상기 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 봉해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 봉해제로는 전분글리콜산나트륨, 크로스포비돈, 크로스카멜로스나트륨, 알긴산, 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 카르복시 메틸셀룰로오스 나트륨, 키토산, 구아검, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴라크틸린 칼륨 등이 있다.
- [0041] 또한, 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리코디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨, 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 약학적 조성물에 대해 0.1-90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.
- [0042] 경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0043] 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0044] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 증증 정도에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 황칠나무 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강 기능 식품은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 위생)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 건강 기능 식품의 형태 및 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 건강 기능 식품의 형태는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등일 수 있고, 건강 기능 식품의 종류는 버터, 요구르트, 치즈를 포함한 유제품, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 유산균 제제, 발효유, 빵, 초코렛, 캔디류, 스펙류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있다.
- [0047] 본 발명의 건강 기능 식품은 통상의 건강 기능 식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0048] 상기한 것 외에 본 발명의 건강 기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0049] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0050] **<실시예 1> 황칠나무 추출물 제조 및 트리테르페노이드 화합물의 분리**
- [0051] **1-1. 황칠나무 메탄올 추출물 제조**
- [0052] 황칠 건잎 1.3kg을 100% MeOH을 이용하여 60 °C에서 3시간동안 용매 추출을 하였다. 상기 추출된 메탄올 추출물을 감압 농축하여 90g의 황칠나무 메탄올 농축액을 얻었다.
- [0053] **1-2. 황칠나무 분획물의 제조**
- [0054] 실시예 1-1에서 얻어진 농축액을 물로 충분히 현탁하여 2배 부피의 n-헥산(Hexane)으로 1차 용매이행을 3회 수행하여 물층과 n-헥산층(Hexane ext. 35.2g)으로 분리하였다. 물층을 다시 2배 부피의 클로로포름(chloroform, CHCl<sub>3</sub>)으로 2차 용매이행을 3회 수행하여 물층과 클로로포름층(CHCl<sub>3</sub> ext. 8.1g)을 확보하였다. 물층을 다시 2배 부피의 에틸아세테이트(ethyl acetate, EtOAc)로 3차 용매이행을 3회 수행하여 물층과 에틸아세테이트층(EtOAc ext. 810mg)을 확보하였다. 마지막으로 물층을 n-부탄올(n-butanol)로 4차 용매이행을 3회 수행하여 부탄올층(n-BuOH ext. 17.44g)을 확보하였다.
- [0055] **1-3. 황칠 헥산층에서 유효성분의 분리**
- [0056] 상기 실시예 1-2의 헥산층(Hexane ext. 35.2g)에서 6g 덜어내어 오픈 컬럼 실리카겔 크로마토그래피(open column silica gel chromatography)를 시행하여 10개의 소분획물(sub fract, H1-H10)을 얻었다. 이 때 사용된

용매는 헥산(Hexane):아세톤(Acetone)을 100:1에서 1:1(W/V)의 비율로 하였다.

[0057] 10개의 소분획물(sub fract)중 1번째 분획물인 H-1(146.0mg)을 헥산(Hexane):아세톤(Acetone)을 100:1에서 80:1(W/V)의 용매로 오픈 컬럼 실리카겔 크로마토그래피를 실시하여 베타-아미린( $\beta$ -amyrin, 10.0mg)과 올린-12-엔-3, 24  $\beta$ -디올(Olean-12-en-3, 24  $\beta$ -diol, 3.0mg)을 얻었다.

[0058] 10개의 소분획물(sub fract)중 4번째 분획물인 H-4(80.7mg)을 헥산(Hexane):아세톤(Acetone)을 100:1에서 1:1(W/V)의 용매로 오픈 컬럼 실리카겔 크로마토그래피를 실시한 후, 오픈 컬럼 실리카겔 크로마토그래피를 추가 실시하여 알파-아미린( $\alpha$ -amyrin)을 얻었다.

[0059] 10개의 소분획물(sub fract)중 6번째 분획물인 H-6(98.6mg)을 헥산(Hexane):아세톤(Acetone)을 100:1에서 1:1(W/V)의 용매로 오픈 컬럼 실리카겔 크로마토그래피를 실시한 후, 다시 헥산(Hexane):아세톤(Acetone)을 10:1의 용매로 오픈 컬럼 실리카겔 크로마토그래피를 실시하여 베타-시토스테롤( $\beta$ -sitosterol, 10mg), 스티그마스테롤(stigmasterol, 4.3mg)을 얻었다.

[0060] 10개의 소분획물(sub fract)중 7번째 분획물인 H-7(654mg)을 헥산(Hexane):아세톤(Acetone)을 100:1에서 1:1(W/V)의 용매로 오픈 컬럼 실리카겔 크로마토그래피를 실시한 후, LiChroprep RP-18 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 덴드로파녹사이드(dendropanoxide)를 얻었다.

[0061]

[0062] **1-4. NMR을 이용한 구조 동정**

[0063] 상기 실시예 1-3에서 얻어진 물질, 베타-아미린( $\beta$ -amyrin), 알파-아미린( $\alpha$ -amyrin), 올린-12-엔-3, 24  $\beta$ -디올(Olean-12-en-3, 24  $\beta$ -diol), 덴드로파녹사이드(dendropanoxide), 베타-시토스테롤( $\beta$ -sitosterol) 및 스티그마스테롤(stigmasterol)은 FT-IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , EI-MS 스펙트럼을 측정하여 이들 물질의 구조를 동정하였다.

[0064] 1) 베타-아미린( $\beta$ -amyrin)

[0065] 흰색의 비결정 분말(White amorphous powder);  $[\alpha]_D$ : +88.3° (c 0.01,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (KBr):  $V_{\max}$  3300, 2950  $\text{cm}^{-1}$ ; FAB-MS:  $m/z$  427  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

[0066] 2) 알파-아미린( $\alpha$ -amyrin)

[0067] 흰색의 비결정 분말(White amorphous powder);  $[\alpha]_D$ : +92.0° (c 0.005,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (KBr):  $V_{\max}$  3300, 2950  $\text{cm}^{-1}$ ; FAB-MS:  $m/z$  427  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

[0068] 3) 올린-12-엔-3, 24  $\beta$ -디올(Olean-12-en-3, 24  $\beta$ -diol)

[0069] 무색 침상형(Colourless needles);  $[\alpha]_D$ : +84.7° (c 0.46); IR (KBr):  $V_{\max}$  3600-3100, 1630, 1038, 1020, 810  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS:  $m/z$  442  $[\text{M}]^+$ .

[0070] 4) 덴드로파녹사이드(dendropanoxide)

[0071] 무색 침상형(Colorless needles);  $[\alpha]_D$ : +45.7° (c 0.01,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (KBr):  $V_{\max}$  2950  $\text{cm}^{-1}$ ; FAB-MS:  $m/z$  427  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 44  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

[0072] 5) 베타-시토스테롤( $\beta$ -sitosterol)



[0073] 흰색의 비결정 분말(White amorphous powder);  $[\alpha]_D$ :  $-40.7^\circ$  (c 0.05,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (KBr):  $V_{\max}$  3400, 2930  $\text{cm}^{-1}$ ; FAB-MS:  $m/z$  297  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

[0074] 6) 스티그마스테롤(stigmasterol)

[0075] 무색의 결정체(Colourless crystals);  $[\alpha]_D$ :  $-51^\circ$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (KBr):  $V_{\max}$  3494 (OH), 1053, 1020 (OH)  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS:  $m/z$  412  $[\text{M}]^+$ .

[0076] <실험예 1> 암 세포의 성장 억제 효과

[0077] 트리테르페노이드 화합물이 암 세포의 성장에 어떤 영향을 미치는지를 분석하기 위하여 A-549(인간 폐암 세포) 및 MCF-7(인간 유방암 세포)의 세포 생존율을 MTT assay법으로 조사하였다.

[0078] A-549(인간 폐암 세포) 및 MCF-7(인간 유방암 세포) 세포를  $4 \times 10^5$  cells/well 농도로 96 well plate에 분주하고 24시간 후에 각 시료(베타-아미린, 알파-아미린, 올린-12-엔-3, 24  $\beta$ -디올, 덴드로파놉사이드, 베타-시토스테롤 및 스티그마스테롤)를 다양한 농도(10, 30, 50, 100 and 200  $\mu\text{M}$ )로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, MTT 용액을 첨가하고 4시간 후 배지를 제거하여 PBS로 1회 세척하였다. DMSO를 처리하고 상온에 30분 동안 둔 후에 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0079] 그 결과, 베타-아미린, 알파-아미린은 농도 의존적으로 A-549 세포와 MCF-7 세포의 성장을 억제하였다(도 1a, 도 1b). 또한, 덴드로파놉사이드, 베타-시토스테롤 및 스티그마스테롤도 농도 의존적으로 A-549 세포와 MCF-7 세포의 성장을 억제하였다(도 2a, 도 2b). 이를 통해, 올린-12-엔-3, 24  $\beta$ -디올을 제외한 이들 5가지의 트리테르페노이드 화합물이 인간 폐암 세포와 인간 유방암 세포의 성장을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

[0080] <실험예 2> 유동세포계수 (Flow cytometry) 실험

[0081] 트리테르페노이드 화합물 중에서 암 세포의 성장 억제효과를 나타낸 베타-아미린, 알파-아미린, 덴드로파놉사이드, 베타-시토스테롤 및 스티그마스테롤을 A-549 세포와 MCF-7 세포에 처리한 후, 24시간 배양하여 에토포시스를 유도하였다. PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, RNAase A, 피로피디움 요오다이드(Propidium iodide, PI)를 포함하는 PI 용액으로 배양하였다.

[0082] 트리테르페노이드 화합물에 의한 암 세포의 에토포시스(apoptosis)를 분석하기 위하여 유동세포계수기(FACSCalibur™, Beckton Dickinson, GmbH, Heidelberg, Germany)를 이용하여, 각각의 세포 주기에 해당하는 DNA의 함량 및 세포 수를 측정하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0083] 트리테르페노이드 화합물을 처리한 A-549 세포에서 G0/G1, S, 및 G2/M phase DNA의 함량은 감소하였으나, sub-G1 phase DNA(에토포시스에 의해 사멸한 세포의 DNA)의 함량이 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 3a). 또한, 이러한 결과가 MCF-7 세포에서도 동일하게 관찰되었다(도 3b). 따라서 이들 화합물이 인간 폐암 세포와 유방암 세포에서 세포 주기의 진행을 정지시키고 에토포시스를 유도한다는 것을 알 수 있었다.

[0084] <실험예 3> 웨스턴 블랏팅(Western Blotting) 실험

[0085] A-549 세포와 MCF-7 세포에 베타-아미린, 알파-아미린, 덴드로파놉사이드, 베타-시토스테롤 및 스티그마스테롤을 처리하여 24시간 배양한 후, 웨스턴 블랏팅(Western Blotting)을 실시하였다.

[0086] 상기 세포를 세포용해용 분쇄 버퍼(lysis buffer: 50mM Tris/HCl, pH 7.4 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 10% glycerol, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 2 mM PMSF)로 용해시킨 후 원심분리하여 단백질을 추출하고, SDS PAGE에서 단백질을 분리하여 니트로셀룰로오스막으로 전이시켰다. 그 후, 에토포시스를 조절하는 Bax와 Bcl-2 단백질의 발현을 확인하기 위해, 각각의 해당 항체를 막에 부착시키고 HRP(horseradish peroxidase)가 연결된 2차 항체(secondary antibody)를 결합시킨 후 ECL시약을 사용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였으며, 그 결과를

도 4에 도시하였다.

[0087] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, Bcl-2 단백질의 발현이 A-549 세포와 MCF-7 세포에서 감소하였다(도 4a, 도 4b). 반면, Bax 단백질의 발현은 A-549 세포와 MCF-7 세포에서 증가하였음을 알 수 있다(도 4a, 도 4b). 이를 통해 이들 화합물이 Bcl-2 발현 감소와 Bax 발현 증가 경로를 통해 암 세포의 에포토시스를 유도한다는 것을 알 수 있었다.

[0088] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0089] 1-1. 산제의 제조

[0090] [화학식 1]의 화합물 200 mg

[0091] 유당 100 mg

[0092] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0093] 1-2. 정제의 제조

[0094] [화학식 1]의 화합물 100 mg

[0095] 옥수수전분 100 mg

[0096] 유당 100 mg

[0097] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0098] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0099] 1-3. 캡슐제의 제조

[0100] [화학식 1]의 화합물 100 mg

[0101] 옥수수전분 100 mg

[0102] 유당 100 mg

[0103] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0104] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0105] 1-4. 환의 제조

[0106] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 100 mg

[0107] 유당 150 mg

[0108] 글리세린 100 mg

[0109] 자일리톨 50 mg

[0110] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환당 4g이 되도록 제조하였다.

[0111] 1-5. 과립의 제조

[0112] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 150 mg

[0113] 대두 추출물 50 mg

- [0114] 포도당 200 mg
- [0115] 전분 600 mg
- [0116] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[0117] <제조예 2> 건강 기능 식품의 제조

[0118] 2-1. 밀가루 식품의 제조

[0119] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0120] 2-2. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0121] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 0.1 ~ 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 스프 및 육즙을 제조하였다.

[0122] 2-3. 그라운드 비프(ground beef)의 제조

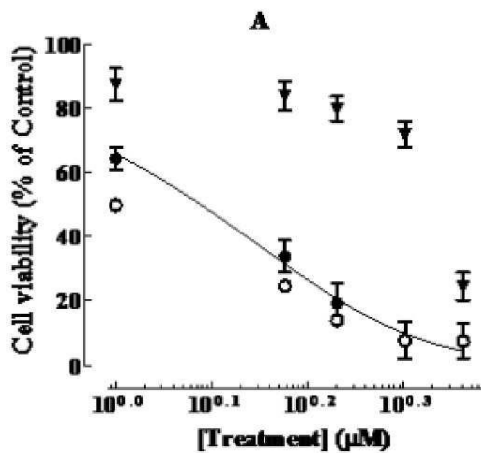
[0123] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0124] 2-4. 유제품(dairy products)의 제조

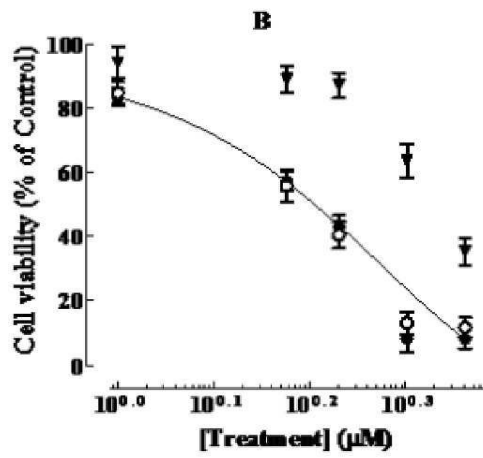
[0125] 본 발명의 [화학식 1]의 화합물 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

도면

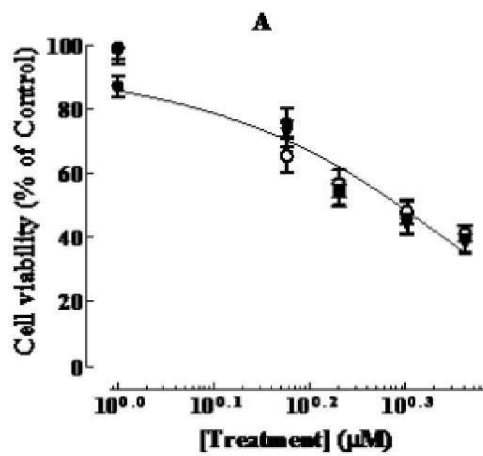
도면1a



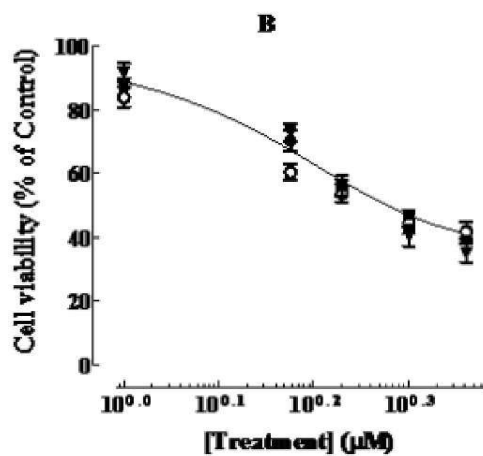
도면1b



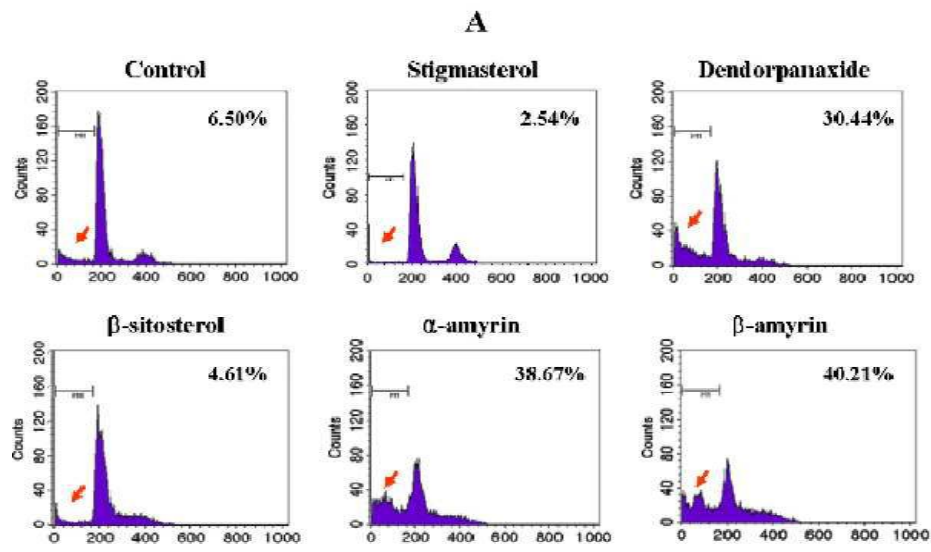
도면2a



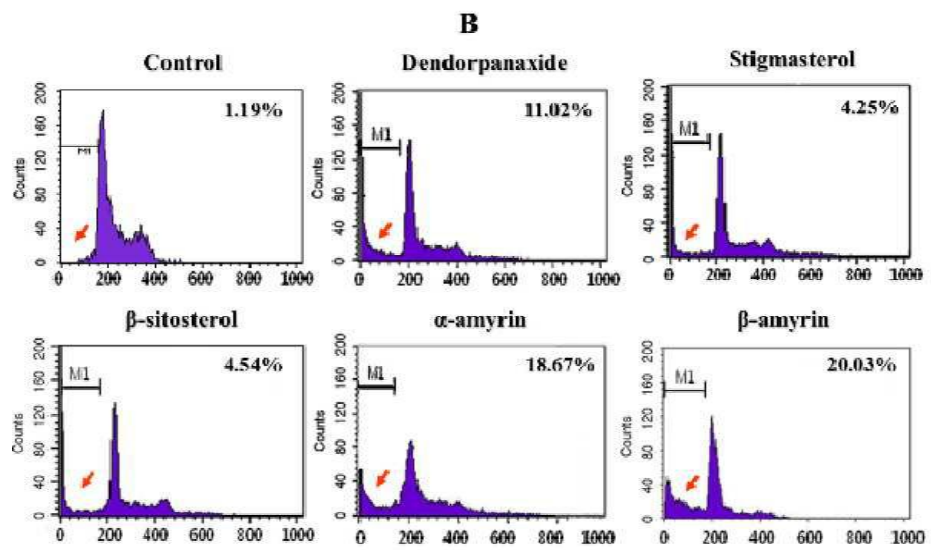
도면2b



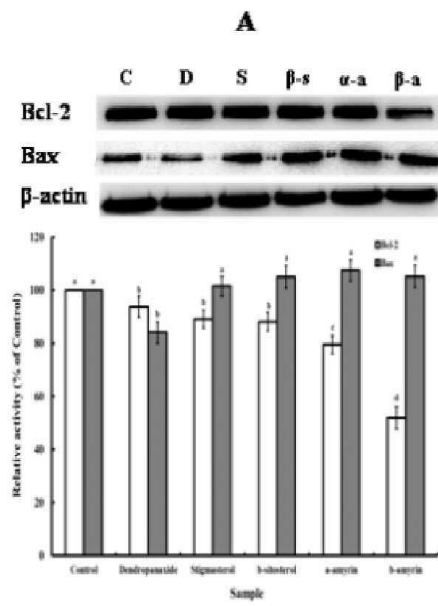
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

