



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년04월09일
A23L 1/29 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0704303
A23L 1/30 (2006.01)	(24) 등록일자	2007년03월30일

(21) 출원번호	10-2007-0002744(분할)	(65) 공개번호	
(22) 출원일자	2007년01월10일	(43) 공개일자	
심사청구일자	2007년01월10일		
(62) 원출원	특허10-2005-0130601		
	원출원일자 : 2005년12월27일	심사청구일자	2005년12월27일

(73) 특허권자 한국화학연구원
 대전 유성구 장동 100번지

(72) 발명자 고우석
 대전 유성구 신성동 대림아파트 103동 1002호

이성학
대전 유성구 신성동 하나아파트 10동 805호

최우혁
서울 은평구 역촌동 64번지 14호

김영섭
대전 유성구 송강동 그린아파트 310동 502호

유시용
대전 유성구 노은동 536-8번지

연규환
대전 유성구 어은동 한빛아파트 110동 1004호

유미영
대전 유성구 신성동 162-4번지 수복빌라 202호

서지희
대전 동구 용전동 새피앙아파트 101동 1202호

권대영
경기도 용인시 구성읍 중리 90-7번지

(74) 대리인 이현실
 장성구

(56) 선행기술조사문헌	
三百草 藥鍼이 실험적 알레르기 반응에 미치는 영향 [KR100551464 B1
KR100542871 B1	KR100446089 B1
KR100530274 B1	KR100248942 B1

* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 김태산

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 삼백초 추출물 또는 이로부터 분리된 활성성분을 포함하는건강증진용 식품

(57) 요약

본 발명은 삼백초(*Saururus chinensis*) 추출물, 또는 이로부터 분리된 (-)-소서네올[(-)-saucerneol], 소서네올 C (saucerneol C), 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 함유하는 건강증진용 식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 식품은 비정상적인 B 세포 및 T 세포의 증식을 효과적으로 억제하여 우수한 면역억제효과를 나타내므로 장기이식거부반응, 자가면역질환, 알러지, 아토피 등과 같은 면역과민반응으로 야기되는 질환의 예방을 위한 건강증진용 식품으로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

(-)-소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A, 마나산틴 B 및 이들의 혼합물로 구성된 균으로부터 선택된 활성성분 또는 이를 포함하는 삼백초 추출물을 함유하는, 면역과민반응을 억제하는 건강 증진용 식품.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

상기 식품이 음료의 형태인 것을 특징으로 하는 건강 증진용 식품.

청구항 3.

제 1항에 있어서,

삼백초 추출물이 삼백초 또는 이의 건조물을 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 구성된 균으로부터 선택된 유기용매로 추출한 것임을 특징으로 하는 건강 증진용 식품.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 삼백초(*Saururus chinensis*) 추출물, (-)-소서네올[(-)-saucerneol], 소서네올 C(saucerneol C), 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 함유하는 건강증진용 식품에 관한 것이다.

전 세계적으로 면역과민반응으로 인한 질환이 증가하고 있지만, 이러한 질환들의 발생에 대한 근본적인 원인 규명이 충분히 이루어지지 않은 상태이다. 현재 시행되고 있는 면역질환의 치료방법으로는 2가지 이상의 면역억제제를 병용 투여함으로써 상기 질환에 의해 야기되는 각종 증상을 완화 내지 감소시키는 것이다. 여기서, 면역억제제란 항원의 작용에 대하여 숙주가 항체를 만드는 능력(체액성 면역반응) 또는 세포성 면역반응을 일으키는 능력을 저하시키거나 차단하기 위해 사용되는 다양한 물질들을 말한다.

현재 사이클로스포린 A와 FK506 등이 면역억제제로 주로 사용되고 있는데, 이들은 복잡한 화학구조를 가진 천연물 유래의 화합물로서 원료 수급의 측면에서 고비용으로 인해 비경제적이고 장기투여로 인해 각종 부작용이 야기될 수 있다는 위험성을 내포하고 있다. 따라서, 낮은 독성, 면역관용 유도와 함께 경제적인 생산이 가능한 새로운 면역억제제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 이러한 면역억제제는 장기기식분야 뿐만 아니라 루푸스, 류마티스 관절염 등과 같은 자가면역질환과 아토피, 알러지 등의 피부과민 반응에도 유용하게 사용될 수 있다.

삼백초(*Saururus chinensis*)는 삼백초과(Saururaceae) 삼백초속(Saururus)에 속하는 다년생 초본으로서, 중국에서 오래 전부터 민간약으로 사용되어 온 약초이다. 중약대사전에는 삼백초가 청리습열, 소종해독 작용이 있어, 수종, 각기, 황달, 임탁, 대하, 용종, 정독에 효과가 있음이 기재되어 있다. 민간에서는 전초 또는 뿌리, 잎이 풍독, 이노, 수종, 임질, 간염, 폐렴, 변독, 고혈압 등의 치료에 사용되어 왔다.

삼백초의 성분에 대한 연구는 그동안 플라보노이드류(flavonoids), 알칼로이드류(alkaloids), 아미노산류(amino acids), 지방산류(fatty acids), 퀴논류(quinone) 및 정유 성분에 대해 진행되어 왔다. 전초의 주성분은 메틸-n-노닐 케톤(methyl n-nonyl ketone)이고, 줄기에는 가수분해성 탄닌이 함유되어 있으며, 잎에는 퀘르세틴(querctetin), 이소퀘르세트린(isoquerctetrin), 아비쿨라린(avicularin), 하이페린(hyperin), 루틴(rutin) 및 가수분해성 탄닌이 함유되어 있음이 보고되었다.

한편, 북미대륙의 습지에 널리 분포하는 동속 식물인 미국 삼백초(*Saururus cernuus*)의 추출물에 세스퀴테르펜(sesquiterpene)계 화합물이 존재하고 있음이 알려져 있다. 라오 등(Rao et al., *Tetrahedron Lett.* 24(45): 4947-4950, 1983)은 미국 삼백초의 추출물로부터 SC-8, SC-9, 마나산틴 A, 마나산틴 B 및 소서네올이라는 화합물들을 분리하여 이들의 구조를 규명하였고, 이중 마나산틴 A가 신경중추억제 효과가 있음을 확인하였다. 국내에서도 다이메틸 테레프탈레이트와 퀘르세틴을 분리·동정하여 약리작용 및 항균작용을 확인하였다(곽재욱, 경희대학교 박사학위논문, 1988). 또한, 최근에는 삼백초의 항암활성(대한민국 특허 제10-0248942호) 및 항염증활성(대한민국 특허공개 제10-2004-0075135호)에 대한 특허가 출원된 바 있다.

그러나, 아직까지 삼백초 추출물의 면역억제능에 대해서는 보고된 바 없다. 이에, 본 발명자들은 그동안 규명되지 않았던 삼백초 추출물의 면역억제능을 규명하고, 삼백초 추출물에서 면역억제 효능을 갖는 5개의 단일물질들을 분리하여 이들이 면역과민반응에 의해 야기되는 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 면역과민반응으로 인해 야기되는 질환의 예방 및 치료에 유용한 삼백초 추출물을 유효성분으로 하는 면역억제용 조성물을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은 삼백초 추출물을 유효성분으로 하는 면역억제효과를 갖는 식품을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유효성분으로서 유효량의 삼백초 추출물, (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, 면역억제효과를 나타내는 조성물을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명에 따른 조성물은 면역억제효과를 나타내는 삼백초 추출물, 이로부터 분리·정제된 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.

먼저, 본 발명에 따른 삼백초 추출물은 삼백초 또는 이의 건조물을 용매 추출함으로써 제조할 수 있다.

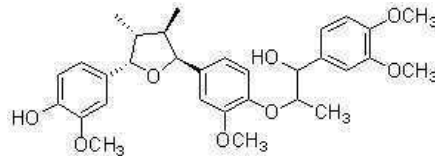
본 발명의 삼백초 추출물은 음건하여 세절한 삼백초의 부피에 대하여 2 내지 200배, 바람직하게는 10 내지 30배의 유기용매를 가하고, 10 내지 30℃에서 1 내지 20일간, 바람직하게는 3 내지 7일간 추출하고 냉각 및 여과한 후 감압 농축하는 단계에 의해 제조될 수 있다. 이때, 추출용매로는 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있으며, 80 내지 100% 메탄올 수용액이 바람직하다. 상기에서 메탄올로 추출한 삼백초 추출물은 부탄올, 다이클로로메탄 또는 에틸아세테이트와 같은 용매로 재추출할 수 있다. 바람직하게는 에틸아세테이트로 재추출한다.

구체적으로, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 삼백초 또는 이의 건조물을 100% 메탄올 수용액을 사용하여 7일간 냉침시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 메탄올 추출물을 얻고, 이 메탄올 추출물을 증류수에 현탁한 후 동량의 다이클로로메탄으로 추출하여 분리한 물층을 동량의 에틸아세테이트로 추출하고 감압 농축함으로써 삼백초 분획물을 얻는다. 상기 삼백초 메탄올 추출물 중 다이클로로메탄 및 에틸아세테이트 분획물이 면역억제효과를 나타내며, 그 중 삼백초의 다이클로로메탄 분획물의 면역억제 효과가 가장 우수하다(표 1 참조).

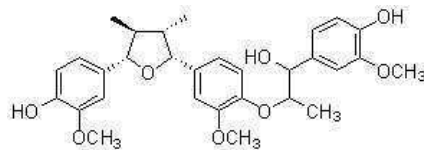
본 발명에서는 면역억제효과를 나타내는 삼백초의 다이클로로메탄 분획물로부터 활성성분을 분리·정제하기 위하여 크로마토그래피를 수행한다. 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼을 이용하여 1 내지 2회 수행하는 것이 바람직하다. 이동상으로는 다이클로로메탄과 메탄올의 혼합용액을 사용할 수 있다. 이때, 메탄올 농도를 0, 20, 40, 60, 80 및 100%로 순차적으로 올려주는 농도구배 용출방식(gradient elution)으로 용출 분획하며, 수집된 분획의 면역억제효과를 측정하여 활성분획을 수득할 수 있다.

면역억제효과를 나타낸 활성분획을 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 하기 화학식 1의 (-)소서네올, 화학식 2의 소서네올 C, 화학식 3의 마나산틴 A 및 화학식 4의 마나산틴 B를 수득한다.

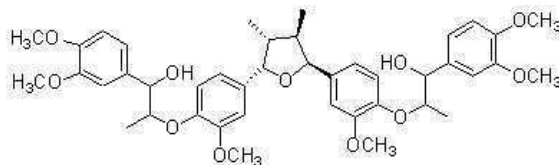
화학식 1



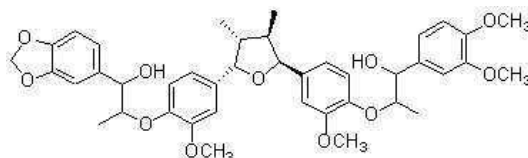
화학식 2



화학식 3



화학식 4



상기 화합물들의 면역억제효과를 확인하기 위하여, LPS 또는 Con A에 의해 B 세포 또는 T 세포의 비정상적인 세포증식이 유도된 배양액에 삼백초 추출물로부터 분리·정제한 사우치논, 소서네올 C, 마나산틴 A, 마나산틴 B 또는 (-)-소서네올을 농도별로 처리한 결과, 사우치논을 제외한 4가지 화합물들이 처리된 실험군에서 B 세포 또는 T 세포의 증식이 농도의 존적으로 억제됨을 확인하였다(도 1 및 2, 표 2 및 3 참조). 또한, 마우스 혼합백혈구 반응을 통한 마우스 비장세포의 증식에 대해서도 사우치논을 제외한 소서네올 C, 마나산틴 A, 마나산틴 B 및 (-)-소서네올 화합물들은 세포증식을 효과적으로 억제하였다(도 3 및 표 4 참조). 사우치논은 삼백초 추출물에 많이 포함되어 있는 주된 유효성분으로서 면역반응에 중요한 NF- κ B의 활성을 억제한다고 보고된 바 있으나(Hwang et al., *Plant Med.* 69: 1096-1101, 2003), 본 발명에서는 사우치논보다는 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 및 마나산틴 B과 같은 다른 성분들이 면역억제 효능의 유효성분으로 작용함을 알 수 있다.

본 발명에 따른 삼백초 추출물, 이로부터 분리·정제된 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 함유하는 면역억제용 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.

본 발명의 약학 조성물에 포함되는 삼백초 추출물은 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제된 것이 바람직하나, 단순히 용매 추출법에 의해 수득된 추출물도 포함될 수 있다. 또한, 상기 화학식 1 내지 4로 표시되는 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 및 마나산틴 B는 삼백초 추출물로부터 분리·정제하거나 화학적으로 합성할 수 있다.

본 발명에 따른 약학 조성물은 면역과민반응으로 인해 야기되는 질환의 예방 또는 치료에 사용됨을 특징으로 한다. 면역과민반응으로 야기되는 질환이란 면역기능이 비정상적으로 활성화되어 병적인 상태에 이른 것을 말하며, 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만, 장기이식시의 거부반응; 루푸스, 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환; 비염, 천식, 아토피와 같은 알러지성 질환 등의 피부 과민반응이 포함된다. 이 외에도, 본 발명에 따른 약학 조성물은 개별적으로 또는 다른 종류의 면역억제제와 혼합하여 투여할 수 있다.

삼백초 추출물, 이로부터 분리·정제된 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B는 통상적인 방법에 따라 약제학적으로 허용되는 적절한 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 상기한 기능을 갖는 약학 조성물을 제조할 수 있다. 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 상기 약학 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 제형은 정제, 알약, 분말, 새세이(sachet), 엘릭서(elixir), 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다.

본 발명의 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 유효성분을 기준으로 할 때 삼백초 추출물은 0.1 내지 500 mg/kg 체중, 바람직하게는 10 내지 100 mg/kg 체중의 범위이고, (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 및 마나산틴 B 각각은 0.1 내지 500 mg/kg 체중, 바람직하게는 5 내지 100 mg/kg 체중의 범위이며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 활성성분의 실제 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

또한, 본 발명에서는 유효량의 삼백초 추출물, 이로부터 분리·정제된 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 포함하는, 면역과민반응으로 야기되는 질환을 예방하거나 완화시킬 수 있는 건강 증진용 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 삼백초 추출물, 이로부터 분리·정제된 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들면 각종 식품류, 음료수, 스낵류, 과자류, 껌류, 아이스크림류, 티백차, 인스턴트차, 과일, 향료, 비타민 복합제, 및 그 밖의 건강보조식품류 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 삼백초 추출물, 이로부터 분리·정제된 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 식품 제조시 원료 물질에 첨가하거나 조리된 식품에 적절히 혼합하여 상기한 건강 증진용 식품 또는 음료를 제조할 수 있으며, 이 경우 최종적으로 제조된 식품 또는 음료 중에 삼백초 추출물, 이로부터 분리·정제된 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 함량은 각각 0.01 내지 30 중량% 범위이다.

본 발명의 약학 조성물 또는 건강 증진용 식품 또는 음료는 목적하는 효과를 상승시키거나 보완하기 위해 약학적으로 허용되는 다른 생약제 또는 이의 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

이하, 하기 제조에 및 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다.

하기 제조에 및 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 삼백초 추출물의 제조 및 활성성분의 분리·정제

건조된 삼백초 15 kg을 200 l의 메탄올로 일주일간 냉침시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 메탄올 추출물 1.7 kg을 얻었다. 상기 메탄올 추출물을 증류수 20 l에 현탁시킨 후 동량의 다이클로로메탄(dichloromethane, CH₂Cl₂)으로 추출하고 추출액을 감압 농축하여 다이클로로메탄 추출물 922 g을 얻었다. 남은 수층을 다시 동량의 에틸아세테이트(ethylacetate, EtOAc)로 추출하였고, 이로부터 얻은 추출액을 감압 농축하여 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물 18 g을 얻었으며, 남은 수층은 동결 건조하였다.

상기 다이클로로메탄(CH₂Cl₂) 분획물 430 g을 다이클로로메탄/메탄올(100:1) 혼합용액을 이동상으로 사용하고 유속 3 ml/분으로 흘려주면서 메탄올의 농도를 0%에서부터 100%까지 순차적으로 올려주는 농도구배 용출방식(gradient elution)의 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)로 분석하였다. 이로부터 총 4개의 분획(분획 1 내지 분획 4)을 수득하였다. 이들 중 면역억제효과를 나타내는 분획 2를 헥산/에틸아세테이트(10:1 내지 1:1) 혼합용액을 이동상으로서 유속 3 ml/분으로 흘려주는 농도구배 용출방식의 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분석하여 총 5개의 분획(분획 21 내지 분획 25)을 수득하였다. 이들 중 면역억제효과를 나타내는 분획 25를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(이동상: 헥산/에틸아세테이트=10:1 내지 1:1)의 반복 실시에 의해 정제한 결과, 1.5 g의 (-)-소서네올, 28 mg의 소서네올 C, 202 mg의 마나산틴 A, 630 mg의 마나산틴 B를 분리하였다. 한편, 분획 23은 헥산(Hx)/에틸아세테이트(EA)(8:1)를 이용하여 결정화하여 4.0 g의 사우치논을 얻었다.

삼백초 추출물 및 이로부터 분리된 분획물들의 면역억제효과를 마우스 비장세포 증식에 대한 억제효과로 측정하여 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

추출물(10 µg/ml)	마우스 비장세포 증식 억제효과(대조군 %)	
	LPS(10 µg/ml) 유도	Con A(1 µg/ml) 유도
메탄올 추출물	18.2	6.2
다이클로로메탄 분획물	5.6	7.0
에틸아세테이트 분획물	8.7	94.3
물 분획물	51.1	114.7

(-)-소서네올

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.00-6.77 (9H, H-2',2'',5,2,6',6,6'',5',5''), 5.46 (2H, d, J=7.0 Hz, H-7,7'), 4.72 (1H, d, J=6.3 Hz, H-7''), 4.42 (1H, d, J=6.6 Hz, H-8''), 3.89 (3H, s, -OCH₃), 3.86 (3H, s, -OCH₃), 3.82 (3H, s, -OCH₃), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 2.30 (2H, m, H-8,8'), 1.10 (3H, d, J=6.2 Hz, H-9''), 0.69 (6H, d, J=6.3Hz, H-9,9')

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 151.5, 150.3, 150.1, 148.7, 147.8, 146.7, 136.8, 135.2, 134.1, 120.9, 120.2, 120.1, 117.8, 115.8, 112.5, 112.1, 111.3, 85.7, 85.4, 81.6,77.9, 56.6, 56.5, 56.4, 44.7, 44.6, 16.5, 14.8, 14.7

소서네올 C

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.07 (1H, d, J=1.7 Hz, H-2'), 7.00 (1H, d, J=1.8Hz, H-2''), 6.99 (1H, d, J=8.1 Hz, H-5), 6.98 (1H, d, J=1.7 Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, J=1.7, 8.1Hz, H-6'), 6.88 (1H, dd, J=1.7, 8.1 Hz, H-6), 6.84 (1H, dd, J=1.8, 8.3 Hz, H-6''), 6.83 (1H, d, J=8.1 Hz, H-5'), 6.76 (1H, d, J=8.3 Hz, H-5''), 5.11 (1H, d, J=8.3 Hz, H-7), 4.64 (1H, d, J=6.6 Hz, H-7''), 4.42 (1H, q, J=6.6Hz, H-8''), 4.36 (1H, d, J=9.5 Hz, H-7'), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 3.83 (3H, s, -OCH₃), 3.84 (3H, s, -OCH₃), 2.25 (1H, m, H-8), 1.79 (1H, m, H-8'), 1.07 (3H, d, J=6.1 Hz, H-9''), 1.01 (3H, d, J=6.6 Hz, H-9'), 0.65 (3H, d, J=6.8 Hz, H-9)

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 151.4(C-3), 149.1(C-3'), 148.3(C-3''), 147.9(C-4), 147.6(C-4'), 147.3(C-4''), 136.3(C-1), 133.7(C-1''), 132.9(C-1'), 121.4(C-6''), 120.9(C-6), 120.7(C-6'), 117.7(C-5), 116.2(C-5'), 115.8(C-5''), 112.7(C-2), 111.8(C-2''), 111.7(C-2'), 89.1(C-7'), 84.4(C-7), 81.7(C-8''), 78.3(C-7''), 56.6(-OCH₃), 56.4(-OCH₃), 56.3(-OCH₃), 49.5(C-8'), 47.0(C-8), 16.5(C-9''), 15.2(C-9), 14.8(C-9')

마나산틴 A

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.99 (1H, d, J=8.1 Hz, H-2'), 6.94 (2H, d, J=8.1 Hz, H-2,3'), 6.92 (1H, s, H-6'), 6.84 (1H, d, J=8.1 Hz, H-3), 6.84 (1H, s, H-6), 5.47 (2H, d, J=5.8 Hz, H-7',7''), 4.65 (1H, d, J=8.3 Hz, H-7), 4.15 (1H, m, H-8), 3.89 (6 x -OCH₃), 2.31 (2H, m, H-8',8''), 1.17 (3H, d, J=6.2 Hz, H-9), 0.73 (6H, d, J=6.3Hz, H-9',9'')

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 150.6 (C-5'), 148.9 (C-5), 148.8 (C-4), 146.5 (C-4'), 136.5 (C-1'), 132.5 (C-1), 120.0 (C-3'), 118.7 (C-2'), 118.7 (C-6), 110.8 (C-3), 110.1 (C-6'), 109.9 (C-2), 84.1 (C-8), 83.4 (C-7',7''), 78.4 (C-7), 55.9 (6x-OCH₃), 44.2 (C-8,8''), 17.1 (C-9), 14.9 (C-9',9'')

마나산틴 B

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.02-6.79 (12H, H-6'',6',5,6,5',5'',6''',2''',2,2',2'',5'''), 5.95 (2H, s, -OCH₂O-), 5.46 (2H, d, J=5.7 Hz, H-7',7''), 4.67 (1H, d, J=8.2 Hz, H-7), 4.63 (1H, d, J=8.2 Hz, H-7'''), 4.12 (1H, m, H-8), 4.12 (1H, m, H-8'''), 3.90 (4 x -OCH₃), 2.32 (2H, m, H-8',8''), 1.20 (3H, d, J=4.6 Hz, H-9'''), 1.18 (3H, d, J=4.6 Hz, H-9), 0.73 (6H, d, J=5.7 Hz, H-9',9'')

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 150.6 (C-4',C-4''), 149.0 (C-3'''), 148.8 (C-4'''), 147.8 (C-3), 147.4 (C-3''), 146.5 (C-3'), 146.3 (C-4), 136.6 (C-1''), 136.5 (C-1'), 134.0 (C-1'''), 132.6 (C-1), 121.1 (C-6), 120.0 (C-6'''), 118.9 (C-5'), 118.7 (C-6'',C-5'',C-6'), 118.7 (C-5), 110.8 (C-2''), 110.1 (C-2'), 110.0 (C-2), 108.1 (C-5'''), 107.6 (C-2'''), 101.0 (-OCH₂O-), 84.1 (C-8'''), 84.0 (C-8), 83.4 (C-7',C-7''), 78.4 (C-7'''), 78.4 (C-7), 56.0 (-OCH₃), 44.2 (C-8',C-8''), 17.1 (C-9'''), 17.0 (C-9), 15.0 (C-9',C-9'')

사우치논

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.38 (1H, s, H-3), 6.82 (1H, s, H-6), 3.03 (1H,d, J=5.4, H-7), 2.44 (1H, m, H-8), 1.22 (3H, d, J=7.3, H-9), 2.52 (1H, td, J=11.9, 3.5, H-1'), 5.57 (1H, s, H-3'), 2.48 (1H, d, J=5.4, H-6'), 1.74 (1H, m, H-7'eq), 1.92 (1H, m, H-7'ax), 1.88(1H, m, H-8'), 0.71 (3H, d, J=7.4, H-9'), 5.90, 5.87, 5.65, 5.60 (4H, s, OCH₂O)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 115.73 (C-1), 145.70 (C-2), 99.50 (C-3), 143.26 (C-4), 146.72 (C-5), 105.54 (C-6), 35.06 (C-7), 34.82 (C-8), 21.29 (C-9), 37.55 (C-1'), 194.69 (C-2'), 101.34 (C-3'), 168.66 (C-4'), 100.42 (C-5'), 37.60 (C-6'), 25.27 (C-7'eq,ax), 33.45 (C-8'), 20.92 (C-9'), 101.24 (OCH₂O), 98.19 (OCH₂O)

실시예 2: LPS 혹은 Con A에 의해 유도된 마우스 비장세포의 증식에 대한 삼백초 추출물의 억제효과

본 발명에 따른 삼백초 추출물, 이로부터 분리·정제된 사우치논, (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 및 마나산틴 B의 면역억제효과를 하기와 같이 조사하였다.

무처리 BALB/c 마우스((주)오리엔트바이오사)로부터 70% 아이소프로필 알콜로 소독하여 무균적으로 비장을 적출한 후 EBSS(Earl's Balanced Salt Solution, Sigma사)에 담가두었다. 주사기 플런저(plunger)를 사용하여 비장을 으깨어 단일 세포(single cell)로 만든 후 15 ml 튜브에 담고 5분간 실온에 방치하였다. 찌꺼기가 가라앉으면 파스퇴르 파이펫을 이용해 상층부만을 새 튜브로 옮겨 담았다. 이를 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층부는 버리고 비장세포 펠렛(pellet)만을 분리하였고, 이를 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 단위/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지에 현탁하였다. 이때, 상기 세포 현탁액의 농도는 ml당 1×10⁶개의 세포가 되도록 하였다.

상기 세포 현탁액을 96-웰 편평 바닥 마이크로플레이트(Falcon)에 웰당 100 µl씩 분주한 후 돌연변이원(mitogen)으로 Con A 또는 LPS(lipopolysaccharide)를 각각 최종 농도가 1 µg/ml 또는 20 µg/ml이 되도록 처리하였다. 시험하고자 하는 시험물질을 0, 0.1, 1 및 10 µg/ml의 농도로 희석하여 각 웰에 첨가한 후 웰 내의 전체 배양액 부피를 200 µl로 맞추었다. 각 웰에 구성물질을 모두 첨가한 후 마이크로플레이트를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양하였다.

72시간 경과 후, 비장세포의 증식능을 확인하기 위해 세포 계수 키트(Cell Counting Kit, DOJIDO Laboratories) 내 시약을 각 웰당 20 µl씩 첨가하고 2 내지 4시간 더 배양하였다. 96-웰 마이크로플레이트에서 시약이 발색하는 정도를 확인하고 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하였다.

시험물질을 처리한 웰들의 흡광도 값에서 세포없이 배양액에 시험물질만이 첨가된 웰의 바탕값(Blank)을 제한 후, 시험물질 대신 동량의 배지를 넣어준 대조군의 흡광도 값과 비교하여 퍼센트 값으로 하기 **수학식 1**에 따라 환산하였다. 또한, 각각의 농도에서 측정된 검체군의 세포 증식율을 바탕으로 시그마플롯(SigmaPlot) 프로그램의 데이터 회귀분석(data regression)을 이용하여 검체가 면역세포의 증식을 50% 저해하는 농도(ED₅₀)를 계산하였다.

수학식 1

$$[(T-Tz)/(C-Cz)] \times 100$$

상기 식에서, T는 시험물질이 처리된 세포배양액의 흡광도이고; Tz는 세포없이 시험물질이 첨가된 배양액의 흡광도이고; C는 시험물질이 처리되지 않은 세포 배양액의 흡광도이고; Cz는 시험물질과 세포가 모두 첨가되지 않은 배양액의 흡광도이다.

상기와 같이, 20 µg/ml의 LPS를 전처리한 마우스 비장세포 배양액에 삼백초 추출물로부터 분리·정제한 사우치논, 소서네올 C, 마나산틴 A, 마나산틴 B 및 (-)소서네올을 농도별로 각각 처리한 결과, **도 1**에 나타난 바와 같이 사우치논을 제외한 4가지 화합물을 처리한 실험군에서 B 세포의 증식이 농도의존적으로 억제되었다. 하기 **표 2**는 시료 화합물의 50% 세포증식 억제농도(ED₅₀)를 나타낸 것으로, 사우치논은 10 µg/ml 이상의 ED₅₀ 값을 나타낸 반면, 소서네올 C, 마나산틴 A, 마나산틴 B 및 (-)소서네올은 매우 낮은 ED₅₀ 값을 나타내어 면역억제효과가 우수함을 확인하였다.

[표 2]

화합물	ED ₅₀ (µg/ml)
사우치논	>10
소서네올 C	1.218
마나산틴 A	0.001
마나산틴 B	<0.001
(-)소서네올	0.220

또한, T세포 증식유도물질인 Con A가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리된 마우스 비장세포 배양액에 삼백초 추출물로부터 분리·정제한 사우치논, 소서네올 C, 마나산틴 A, 마나산틴 B 및 (-)-소서네올 각각을 농도별로 처리한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 사우치논을 제외한 4가지 화합물을 처리한 실험군에서 T 세포의 증식이 현저하게 억제되었다. 또한, 각 시료 화합물의 50% 세포증식 억제농도(ED_{50})를 하기 표 3에 나타내었는데, 소서네올 C, 마나산틴 A, 마나산틴 B 및 (-)-소서네올의 ED_{50} 값이 매우 낮음을 알 수 있다.

[표 3]

화합물	$\text{ED}_{50}(\mu\text{g}/\text{ml})$
사우치논	>10
소서네올 C	1.177
마나산틴 A	0.021
마나산틴 B	0.0002
(-)-소서네올	0.301

실시예 3: 혼합백혈구 반응을 통한 마우스 비장세포의 증식에 대한 삼백초 추출물의 억제효과

유전적으로 동일하지 않은 DBA 마우스와 Balb/C 마우스로부터 추출된 세포에서 삼백초 추출물로부터 분리·정제한 화합물들이 세포성 면역능력에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 혼합백혈구 반응을 하기와 같이 수행하였다. 이때, DBA 마우스에서 추출한 세포는 마이토마이신 C를 처리하여 DNA 합성을 정지시키고, Balb/C 유래의 비장세포만 증식이 가능하게 하였다.

*구체적으로, 무처리 DBA 마우스((주)오리엔트바이오사)로부터 70% 이소프로필 알콜로 소독하여 무균적으로 적출한 비장을 EBSS에 담가두었다. 주사기 플런저를 사용하여 비장을 으깨어 단일세포로 만든 후, 세포가 든 튜브에 마이토마이신 C(Mitomycin C)를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가하고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 45분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 EBSS로 3회 세척한 후 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 단위/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지에 현탁하였다. 이때, 세포 현탁액의 농도는 ml 당 4×10^6 개의 세포가 되도록 하였다.

한편, 무처리 BALB/c 마우스로부터 상기와 동일하게 준비한 단일세포 형태의 비장세포를 15 ml 튜브에 담고 5분간 실온에 방치하였다. 찌꺼기가 가라앉으면 파스퇴르 파이펫을 이용해 상층부만을 새 튜브로 옮겨 담았다. 이를 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층부는 버리고 비장세포 펠렛만을 분리하여 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 100 단위/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지에 현탁하였다. 이때, 상기 세포 현탁액의 농도는 ml 당 1×10^6 개의 세포가 되도록 하였다.

상기에서 준비한 두 종류의 세포 현탁액을 96-웰 U형 바닥 마이크로플레이트(Falcon)에 각 웰당 90 μl 씩 첨가한 후 각각의 시험물질을 0, 1, 10 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 희석하여 각 웰에 20 μl 씩 첨가하였다. 각 웰에 구성물질을 모두 첨가한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 5일간 배양하였다.

배양이 끝난 후, 비장세포의 증식능을 확인하기 위해 세포 계수 키트(Cell Counting Kit, DOJIDO Laboratories) 내 시약을 각 웰당 20 μl 씩 첨가하고 2 내지 4시간 더 배양하였다. 96-웰 마이크로플레이트에서 시약이 발색하는 정도를 확인하고 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

시험물질을 처리한 웰들의 흡광도 값에서 세포없이 배양액에 시험물질만이 첨가된 웰의 바탕값(Blank)을 제한 후, 시험물질 대신 동량의 배지를 넣어준 대조군의 흡광도 값과 비교하여 퍼센트 값으로 상기 수학적 식 1에 따라 환산하였다. 각각의 농도에서 측정된 검체군의 세포 증식율을 바탕으로 시그마플롯 프로그램의 데이터 회귀분석을 이용하여 검체가 면역세포의 증식을 50% 저해하는 농도(ED_{50})를 계산하였다.

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 사우치논을 제외한 소서네올 C, 마나산틴 A, 마나산틴 B 및 (-)-소서네올이 B 세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내었으며, 각 화합물의 마우스 혼합백혈구 반응에 대한 억제효과의 ED₅₀는 하기 표 4와 같이 산출되었다.

[표 4]

화합물	ED ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
사우치논	>10
소서네올 C	1.060
마나산틴 A	1.001
마나산틴 B	≈ 10
(-)-소서네올	3.513

본 발명의 삼백초 추출물 또는 이로부터 분리·정제된 활성성분은 단독 또는 약제학적으로 사용되는 부형제들과 함께 약제학적으로 통상적으로 사용되는 방법에 따라 산제, 정제, 캡슐제, 주사제, 액제 등과 같은 제제형태로 제제화하여 사용될 수 있다.

하기에 제제 실시예를 예시한다.

<제조예 1> 산제

삼백초 건조 추출물 또는 이로부터 분리·정제된 활성성분 2 g

유당 1 g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

<제조예 2> 정제

삼백초 건조 추출물 또는 이로부터 분리·정제된 활성성분 100 mg

옥수수전분 100 mg

유 당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분을 혼합한 후 통상의 정제 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<제조예 3> 캡슐제

삼백초 건조 추출물 또는 이로부터 분리·정제된 활성성분 100 mg

옥수수전분 100 mg

유 당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<제조예 4> 주사제

삼백초 건조 추출물 또는 이로부터 분리·정제된 활성성분 100 mg

주사용 증류수 적량

pH 조절제 적량

통상의 주사제 제조방법에 따라 활성성분을 주사용 증류수에 용해하고 pH를 약 7.5로 조절한 다음 전체를 주사용 증류수로 2 ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균시켜서 주사제를 제조한다.

또한 하기와 같은 방법으로 건강 식품과 주류를 제조한다.

<제조예 5> 선식

현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알과화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 만들었다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 만들었다.

본 발명의 삼백초 추출물을 진공 농축기에서 감압, 농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60메쉬로 분쇄하여 추출물 건조분말을 얻었다.

상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 삼백초 추출물의 건조 분말을 다음의 비율로 배합하여 과립을 만들었다.

곡물류 : 현미 30 중량%, 율무 15 중량%, 보리 20 중량%, 찹쌀 9 중량%,

*종실류 : 들깨 7 중량%, 검정콩 8 중량%, 검정깨 7 중량%,

삼백초 추출물 건조 분말 3 중량%, 영지 0.5 중량%, 지황 0.5중량%

<제조예 6> 츄잉껌

껌 베이스 20 중량%, 설탕 76.9 중량%, 향료 1 중량% 및 물 2 중량%와 본 발명의 삼백초 추출물 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

<제조예 7> 캔디

*설탕 60 중량%, 물엿 39.8 중량% 및 향료 0.1 중량%와 본 발명의 삼백초 추출물 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 캔디를 제조하였다.

<제조예 8> 비스킷

박력 1급 25.59 중량%, 중력 1급 22.22 중량%, 정백당 4.80 중량%, 식염 0.73 중량%, 포도당 0.78 중량%, 팜쇼트닝 11.78 중량%, 암모니움 1.54 중량%, 중조 0.17 중량%, 중아황산나트륨 0.16 중량%, 쌀가루 1.45 중량%, 비타민 B₁ 0.0001 중량%, 비타민 B₂ 0.0001 중량%, 밀크향 0.04 중량%, 물 20.6998 중량%, 전지분유 1.16 중량%, 대용분유 0.29 중량%, 제일인산칼슘 0.03 중량%, 살포염 0.29 중량% 및 분무유 7.27 중량%와 본 발명의 삼백초 추출물 1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 비스킷을 제조하였다.

<제조예 9> 건강 음료

꿀 0.26 중량%, 치옥토산아미드 0.0002 중량%, 니코틴산아미드 0.0004 중량%, 염산리보플라빈나트륨 0.0001 중량%, 염산피리독신 0.0001 중량%, 이노시톨 0.001 중량%, 오르트산 0.002 중량% 및 물 98.7362 중량%와 본 발명의 삼백초 추출물 1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 건강 음료를 제조하였다.

<제조예 10> 건강보조식품

스피루리나 55 중량%, 구아김효소 분해물 10 중량%, 비타민 B₁ 염산염 0.01중량%, 비타민 B6 염산염 0.01 중량%, DL-메티오닌 0.23 중량%, 스테아린산 마그네슘 0.7 중량%, 유당 22.2 중량% 및 옥수수전분 1.85 중량%와 본 발명의 삼백초 추출물 10 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 정제형 건강보조식품을 제조하였다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 삼백초 추출물, 이로부터 분리·정제된 (-)소서네올, 소서네올 C, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 함유하는 조성물은 B 세포 및 T 세포의 비정상적인 증식을 효과적으로 억제하여 우수한 면역억제효과를 나타내므로, 면역과민반응으로 야기되는 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

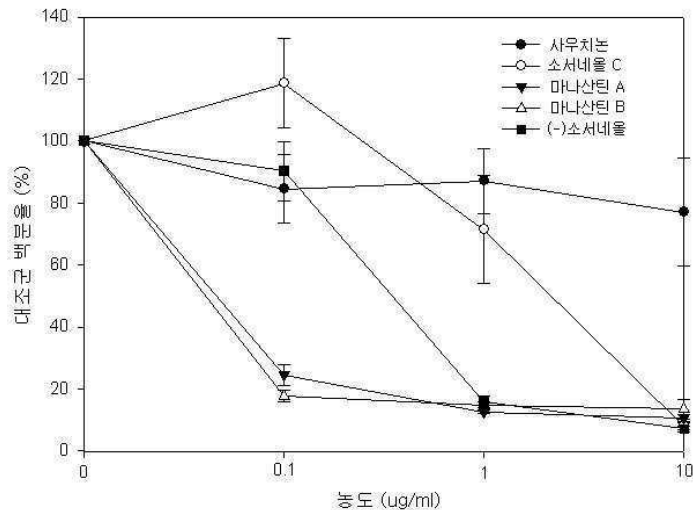
도 1은 본 발명에 따라 삼백초 추출물로부터 분리·정제된 화합물들의 LPS(lipopolysaccharide) 유도성 B 세포증식에 대한 억제효과를 나타낸 것이고,

도 2는 본 발명에 따라 삼백초 추출물로부터 분리·정제된 화합물들의 Con A 유도성 T 세포증식에 대한 억제효과를 나타낸 것이고,

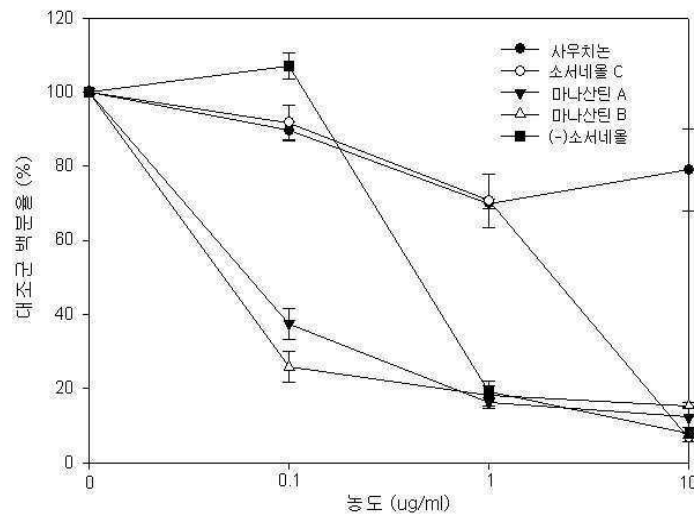
도 3은 본 발명에 따라 삼백초 추출물로부터 분리·정제된 화합물들의 혼합백혈구 반응에 대한 억제효과를 나타낸 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

