



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0096231
(43) 공개일자 2011년08월30일

(51) Int. Cl.

A61K 35/56 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0015563

(22) 출원일자 2010년02월22일

심사청구일자 2010년02월22일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

박시향

경상남도 통영시 인평동 174-11 302호

(72) 발명자

최병대

경남 통영시 미수2동 동신아파트 106-1203

박시향

경상남도 통영시 인평동 174-11 302호

팔모스 그레이스 누네스

경남 통영시 인평동 445 경상대학교 해양과학대학 생활관

(74) 대리인

이현수, 김종선, 김태현, 정홍식

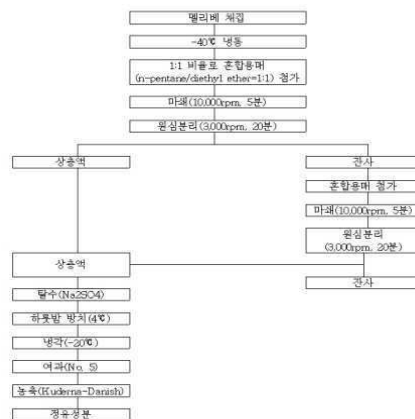
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 항산화 및 항염증 효능을 가진 멜리베 정유성분 추출물

(57) 요약

본 발명은 해양무척추동물인 멜리베에서 추출한 정유를 유효성분으로 함유하는 항산화 및 염증 질환 예방 효과를 갖는 화장품 및 의약품 원료 제제에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 진주조개 및 굴 양식어장에 공생하고 있는 멜리베로부터 정유 성분을 추출정제하여 항산화 활성과 항염증 효과를 측정한 결과 낮은 농도에서도 높은 항염증 억제효과를 나타내었을 뿐만 아니라 항산화효과를 나타내어 결과적으로는 기능성 화장품 및 의약품의 원료로도 적용가능하다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

해양무척추동물 중 멜리베를 호모게나이저에 넣은 후 시료의 1~5배에 해당하는 n-pentane과 diethyl ether 혼합용매(1:1, v/v)를 동량으로 넣고 5,000~15,000 rpm에서 3~5분간 마쇄하여 추출한 것을 특징으로 하는 지질 추출물

청구항 2

제 1항에 있어서 상기 추출용매는 유지를 추출할 수 있는 헥산, 에탄올, 메탄올, 클로로포름 등의 선택된 하나 또는 둘 이상의 용매인 것을 특징으로 하는 멜리베 지질 추출물

청구항 3

해양무척추동물 중 멜리베를 초임계추출법에 의해 추출한 멜리베 지질 추출물

청구항 4

청구항 1,2를 거쳐 얻어진 멜리베 정유성분 추출물을 0.000001% 내지 90% 를 포함하는 화장품 조성물

청구항 5

상기 화장품 조성물은 유액, 화장수, 로션, 크림, 에센스 또는 유허형 화운데이션 등 화장품의 모든 제형을 모두 포함한다.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 멜리베로부터 추출한 휘발성 정유를 유효성분으로 하는 항염증 및 항산화 효과를 나타내는 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 상기 정유 성분에 의하여 DPPH 라디칼 소거 활성과 RAW264.7 세포주를 이용한 NO 생성을 억제함을 특징으로 하는 염증질환 예방 또는 항산화활성을 나타내었다. 정유 성분은 의약품의 개발 또는 화장품의 기능성 원료 및 기능성을 함유한 천연향료로서의 활용이 가능할 것으로 기대되므로, 남해안 진주조개 및 굴 양식장에서 다량 채취가 가능한 멜리베에서 추출한 정유 성분은 우수한 소재가 될 수 있다.

[0002] 멜리베(*Melibe viridis*)는 우리나라의 남해안 진주조개 및 굴 양식장의 패류에 공생하며 사는 갯민숭 달팽이과에 속하는 해양무척추동물의 일종이다. 길이는 120 mm 이상으로 성장하며, 그들의 특이한 먹이 포획법 외에는 거의 알려진 것이 없다. 갯민숭달팽이는 화려하고 아름다운 외관으로 인해 최근 관상용으로 판매가 되고 있으나, 그것의 활용에 관한 연구는 거의 전무하다. 그러나 본 연구자들이 실시한 실험결과에 의하면 멜리베에서 추출한 정유성분에서 과일 향과 같은 상큼한 향을 확인할 수 있었고, 기능성 효능 실험에서는 이것의 높은 항산화능과 항염증 효과를 검정할 수 있었다.

[0003] 최근 급성장하고 있는 기능성 화장품의 미백 및 항주름 효능 성분은 식품의약품안전청(KFDA)에서 기능성 성분으로 인정하고 있는 성분이나, 이러한 성분은 100%가 수입에 의존하는 원료이므로 기능성 효능을 갖는 원료의 국산화 및 국내 신소재 개발이 필요한 시점이다. 기능성 화장품의 원료로는 주로 육상 식물성 자원에서 추출 및 분리되어 왔으며, 대부분 식물을 이용한 연구가 진행되어 왔다고 해도 과언이 아닐 정도로 많은 연구가 진행되어 있다.

[0004] 한 때 황금알을 낳는 사업으로까지 인식되었던 수산업은 어느 틈엔가 사양 산업의 하나로 인식되고 있으며, 외부로부터의 신규투자는 거의 이루어지지 않은 채 축적된 어업자본 조차 타 산업으로 유출되는 경향이 있다. 이렇게 사양화되어 가는 해양수산업에 국가적인 차원의 지원으로 어민의 수산업에 대한 자긍심과 희망을 고취시켜야 할 때이다. 따라서 해양산업에서 한 차원 높은 기술의 개발을 통하여 고부가가치적인 품목의 생산과 가공기술의 개발에 공격적인 연구와 투자가 필요한 시점이다. 이를 개선하기 위하여 독창적인 기술개발을 통해 식품, 의약품 및 화장품 소재 개발 및 화장품 제조와 같은 고부가가치 사업을 창출함으로써 어민의 생활향상도 도모할 수 있다.

배경 기술

[0005] (문헌1) The Sea Slug Forum-Melibe viridis(on line)2008.10.31(검색일 2009. 10.19) 멜리베의 사진 및 알려진 종의 특성에 관한 소개

[0006] (문헌1) 류코트리엔 생성 저해활성을 가지는 정유 성분 (대한민국 특허등록 10-0372562-0000)

[0007] 본 발명은 정유 (精油; essential oil)를 유효성분으로 함유하는 류코트리엔 생성 저해제용 약학적 조성물에 관한 것으로 류코트리엔과 관련된 질환의 예방, 치료 및 치료보조제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0008] (문헌3)산국의 정유 추출물을 함유하는 향균 및 항진균 조성물 및약제학적 제제와 그 용도(대한민국 특허출원 10-2002-0023335)

[0009] 국화과 (Compositae)의 다년생 초본인 산국 (Chrysanthemum boreale)으로부터 병원성 그람양성세균, 그람음성세균 및 진균의 생장을 저해할 수 있는 휘발성 추출물과 이를 효율적으로 추출, 정제하는 방법 그리고 그 추출물에 유효성분을 함유하는 향균 및 항진균용 조성물에 관한 것이다.

[0010] (문헌4)해양생물-유래 추출물을 포함하는 피부 보호용 화장품조성물(특허등록;10-0616252-0000)

[0011] 본 발명의 화장품 조성물은 각질층에 NMF 성분을 공급하고, 피부 장벽을 강화시키며, 피부 수화 기능 (피부 자체의 보습 기능)을 향상시켜, 피부 보습 효과를 극대화할 뿐만 아니라, 주름개선 효과 및 피부탄력개선 효과도 우수하고, 더불어 피부에 대한 안전성이 우수하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) [0003](문헌1)식물정유성분을유효성분으로함유하는식물병원성뿌리혹선충방제용조성물(대한민국 특허출원번호10-2008-0113554)

(특허문헌 0002) [0004](문헌2)해조류로부터추출발효액및발효분말을제조하는방법(대한민국특허10-0893350)

(특허문헌 0003) [0005](문헌3)복합생약추출물을유효성분으로함유하는조성물및이의제조방법(대한민국특허출원 10-2008-0034907)

(특허문헌 0004) [0006](문헌4)홍게자숙액을이용한게맛살용천연게향액기스제조방법(대한민국특허10-0725752)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] [0007] 최근에는 향산화 능력이 뛰어난 해조류 같은 해양자원을 이용한 기능성 원료가 개발되고 있으나, 몇 가

지 제품에만 적용되고 있어 폭넓은 기능성 소재로서의 산업화는 아직 미미한 편이다. 이러한 문제를 보완하기 위해서 해양자원 유래의 소재시장을 다양화 할 필요성이 제기되고 있다.

[0014] [0008] 세계적으로는 기능성 화장품 원료인 소재기술 개발에 성공한 기업이 화장품 시장을 점유하고 있는 실정이다. 미백, 기미 관련 소재 및 제품 개발현황으로는 멜라닌 합성에 기여하는 tyrosinase의 활성을 억제하는 물질, tyrosinase의 발현을 억제하는 물질, 멜라닌 합성을 차단기작을 하는 비타민 및 그 유도체, 생성된 멜라노솜이 각질 형성세포로 이동되는 것을 차단하는 물질을 탐색하고 있다. 기능성 노화방지 화장품 소재 개발동향으로는 피부노화와 외적인 스트레스로부터 피부노화 지연물질, 세포간 지질에 의한 보습효과를 증진시키는 물질, 유해산소와 같은 프리 라디칼을 효과적으로 제거하는 물질, 피부 면역기능을 높여주는 물질을 탐색하고 있으며, 기능성 자외선 차단용 화장품 소재 개발동향으로는 분자 내 공역 이중결합을 갖는 물질로 자외선을 흡수하는 물질, 자외선을 산란시켜 자외선이 피부에 직접적으로 닿지 않도록 하는 소재, 피막 상 도포막이 형성되어 자외선 차단효과를 나타내는 소재 등을 자연소재로부터 얻기 위한 노력이 이루어지고 있다. 이에 해양생물로부터 위와 같은 기능성 물질을 얻고자 하였다.

과제의 해결 수단

[0015] [0009] 그래서 본 발명자는 남해안 굴 및 진주조개 양식장에 대량으로 공생하고 있는 해양무척추동물인 멜리베에 관심을 갖게 되었고 이들로부터 정유성분을 추출하였다.

[0016] [0010] 본 발명의 목적은 해양무척추동물인 멜리베에서 추출한 정유성분의 새로운 용도를 제공하는 것이다.

[0017] [0011] 다른 면으로, 본 발명의 목적은 산화안정성을 파악하여 기능성 식품, 화장품 및 의약품의 소재로 제공하는 것이다.

[0018] [0012] 다른 면으로, 본 발명의 목적은 항염증활성을 파악하여 기능성 식품, 화장품 및 의약품의 소재로 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0019] [0013] 상기한 바와 같이 본 발명에 의하여 추출된 멜리베 정유성분은 오일이 주성분임에도 불구하고 IC50(생성된 라디칼을 50% 제거하는 농도) 378.4 ug/ml 로 높은 항산화활성을 나타내었으며, 10 uL의 저 농도에서도 57.2%의 NO 생성을 저해하여, 항산화능 및 항염증 효과를 이용한 기능성 식품, 화장품 및 의약품의 원료로 사용할 수 있는 물질이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 멜리베로부터 기능성 정유성분을 추출여과하는 과정을 예시한 것으로, 정유성분 추출에 사용된 멜리베는 2008년 11월 남해안 진주 및 굴 양식장에서 채집하여 이를 -40℃의 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 마쇄한 시료 100 g에 재증류한 n-pentane과 diethyl ether 혼합용매(1:1, v/v) 100 mL를 사용하여 상온에서 추출하였으며, 추출은 3회 반복하여 수행하였다. 이 추출액에 무수 Na₂SO₄를 가하여 4에서 하룻밤 방치시켜 탈수시키고, -20℃로 냉각하여 침전물을 제거하였다. 유기용매 층은 Kuderna-Danish 농축기를 사용하여 용매를 완전히 제거한 후 정유성분 시료로 사용하였다.

도 2는 초임계 추출법에 의한 휘발성 향기성분의 추출을 위한 초임계 유체 추출장치(SFT-100XW, Supercritical Fluid Technologies, Inc., Newark, DE, USA)이다. 생시료는 냉동 보관된 시료를 해동하여 그대로 추출용기에 넣어 사용하였다. 멜리베 시료를 추출조에 500~1.0 kg 넣어 반응기의 온도 55, 압력 450 bar, S/F ratio(supercritical fluid kg/feed kg) 25~35까지의 조건으로 추출하였다. 또한 보조용매는 재증류한 n-pentane과 diethyl ether 혼합용매(1:1, v/v) 500~700 mL를 이용하여 회수된 추출물은 Kuderna-Danishi 농축기(ARS Inc., Gainesville, FL, USA)를 사용하여 약 0.5 mL까지 농축하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] [0014] 본 발명은 멜리베로부터 정유성분을 추출여과한 다음 기능성 식품, 화장품 및 의약품의 조성물로 활용하

고자 한다. 상기 “정유성분”이란, 휘발성 향기 성분 및 유지성분을 포함한 물질을 의미한다. “유지성분”이란 유기용매에 의하여 추출되는 중성지질, 콜레스테롤 및 카로테노이드 등 지용성 성분으로 이루어진 물질이다.

[0022] [0015] 상기 멜리베로부터 추출여과한 정유성분은 총 중량에 대하여 0.000001 내지 10%를 포함할 수 있다. 상기 정유성분이 총 중량의 0.000001% 이하면 항산화효과를 나타내지 않아 기능성 식품, 화장품 및 의약품의 제조에 활용할 수 없는 문제점이 발생할 수 있다. 10% 이상의 경우에는 피부 세포에 독성을 나타내어 적합하지 않을 수 있다.

[0023] [0016] 상기 멜리베로부터 추출여과한 정유성분은 이 농도에서 제조되는 어떠한 형태의 제형으로도 제조될 수 있다. 예를 들면, 유연화장수, 수렴 화장수, 영양화장수, 영양크림, 아이크림, 마사지크림, 에센스, 파우더 및 팩으로 이루어진 피부 외용제형 기초 화장품으로 구성되는 모든 군으로부터 그 제형을 선택할 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] [0017] 남해안의 진주조개 및 굴 양식장으로부터 채취한 멜리베는 즉시 -20℃ 이하에서 동결하였다. 이 시료 약 100 g을 들어내어 약 1~5배에 해당하는 n-pentane과 diethyl ether 혼합용매(1:1, v/v)를 동량으로 넣고 5,000~15,000 rpm에서 3~5분간 마쇄(Ace Homogenizer AM-7, Nissei Co., Tokyo, Japan)하는 조작을 3회 반복하여 수행하였다. 이 추출액에 무수 Na₂SO₄를 가하여 4에서 하룻밤 방치시켜 탈수시키고, -20℃로 냉각하여 침전물을 제거하였다. 유기용매 층은 Kuderna-Danish 농축기(ARS Inc., Gainesville, FL, USA)를 사용하여 용매를 완전히 제거한 후 정유성분으로 하였다. 이러한 과정을 통하여 얻어진 정유성분의 수율은 0.67% 였다.

[0025] [0018] (시험예 1)

[0027] [0019] 시료의 항산화능 측정

[0028] [0020] 항산화능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 이용한 라디칼 소거능으로 측정하였다. 시험관에 농도를 달리한 시료 용액 500 μl를 넣고, 500 μl의 ethanol과 250 μl의 0.5 mM DPPH/ethanol 용액을 첨가하여 25의 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 500 μl의 탈이온수를 사용하였으며, 공시험은 DPPH와 증류수 대신 750 μl의 ethanol을 사용하였다. 라디칼 소거 활성은 다음의 식에 따라 계산하였다.

[0029] 라디칼 소거 활성(%) = 100 × (1 - 시료의 흡광도/대조구의 흡광도)

[0030] 측정된 결과 생성한 라디칼을 50% 제거하는 시료의 농도(IC 50)를 측정해 본 결과는 표 1에 나타내었다. 항산화제인 아스코르브산에 비교해 보면, 정유성분임에도 불구하고 멜리베에 강력한 항산화 물질이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

표 1

[0031] 멜리베에서 추출한 정유성분의 항산화능

시료	라디칼 소거능(IC 50)
Melibe	374.8 ug/mL
Ascorbic acid	19.5 ug/mL

[0032] [0022] (실시예 2)

[0033] [0023] 시료의 독성시험

[0034] [0024] 멜리베에서 추출한 오일의 세포독성을 확인하기 위하여 대식세포주인 RAW264.7 cell에 시료를 세포에 처리하였다. 세포 배양은 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 하였다. 배양된 RAW 264.7 세포주는 4000 cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하였고, 24시간동안 35, 95% humidity, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 새로운 배지에 시료의 농도가 1, 10, 20 μg/mL이 되도록 조제하여 세포주에 처리한 후 위의 조건에서 배양하였다. 24시간동안 배양한 후 MTS [3-(4,5- dimethyl-thiazol-2-yl)-5-(carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-

sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Promega Co., Madison, WI, USA] 시약을 1시간 동안 처리한 후 microplate reader(Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter VICTOR3 Waltham, MA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. MTS assay는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 tetrazolium salts을 청자색을 띠는 비수용성의 formazan으로 환원시키는 능력을 이용하는 검사법으로 이 과정에서 측정된 흡광도는 살아있는 세포의 농도를 반영한다. 세포의 생존율은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 나타내었다. 그 결과는 측정된 모든 농도 내에서의 세포에 대한 독성은 나타나지 않았다.

[0035]

[0025] (실시예 3)

[0036]

[0026] 항염증 효능의 측정

[0037]

[0027] 항염증 효능은 마우스의 monocyte 기원의 RAW 264.7 세포주를 이용하여 NO 생성에 미치는 영향을 조사해 보았다. RAW264.7 세포주를 96 well에 분주한 후 약 70-80% 정도 세포가 집합 될 때까지 배양하였다. 대조군으로는 시료 미 처리군을, 양성 대조군과 시험군에는 염증을 유발시키기 위하여 염증을 유발시키는 lipopolysacchride(LPS, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 1 ug/mL 의 농도로 배지에 혼합하였다. 시험군에는 LPS와 함께 멜리베 오일 추출물을 최종농도가 0.1, 1, 10 및 20 ug/mL가 되도록 조제하였다. LPS와 시료를 함유한 배지로 24시간 동안 배양하였다. 배양한 후 배지 상등액을 취해 NO 생성량을 측정하였고, NO 생성량은 Griess Reagent로 측정하였다. Griess 시약은 5%의 질산용액에 1% sulfanilamide를 넣고 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride를 섞어 만들었다. 세포 배양 상등액 50 μ l를 취하고 Griess Reagent 50 μ l를 가해 15분 동안 실온에서 반응시킨 후 microplate reader(Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter VICTOR3, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량의 변화는 LPS와 무시료 처리군의 생성량을 대비하여, LPS 와 시료처리군의 NO 생성량으로 나타내었다. 표 2에 나타난 결과와 같이 멜리베에서 추출한 정유성분의 항염증 효과는 낮은 농도에서도 매우 높게 나타났다. 멜리베 오일 10 ug/mL의 농도에서 무려 NO 생성량은 57.2%의 생성 저해능을 보여 주었다. 이처럼 멜리베 정유는 저 농도에서도 매우 높은 항염증 효능을 보여주었다.

표 2

[0038]

멜리베에서 추출한 정유성분의 NO 생성량 측정에 따른 항염증 효능

시료명		NO formation(%)
대조군	LPS 1 ug/mL	100.0 $\times$ 3.1
Melibe	LPS 1 ug/mL + 0.1 ug/mL	91.6 $\times$ 3.9
	LPS 1 ug/mL + 1 ug/mL	86.3 $\times$ 10.5
	LPS 1 ug/mL + 10 ug/mL	42.8 $\times$ 6.0
	LPS 1ug/mL + 20 ug/mL	33.0 $\times$ 5.3

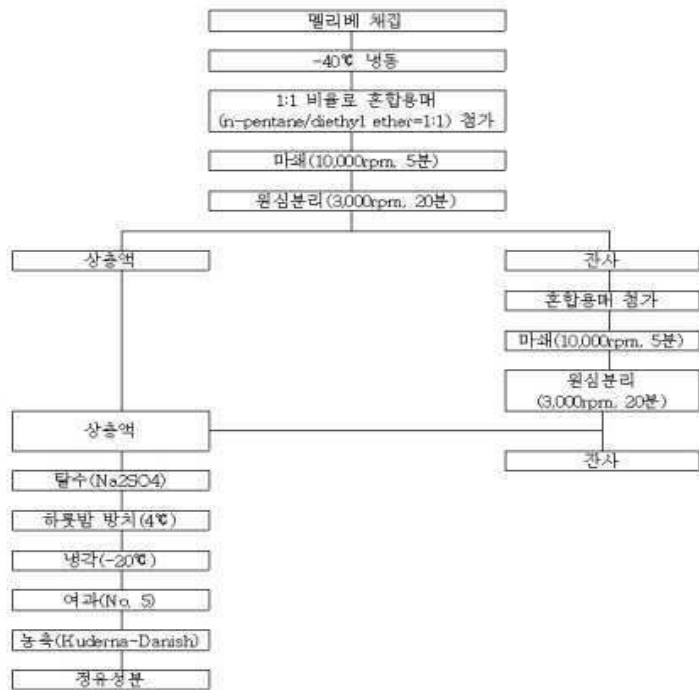
부호의 설명

[0039]

해당사항 없음

도면

도면1



도면2

