



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0070895
(43) 공개일자 2009년07월01일

(51) Int. Cl.

A61K 31/352 (2006.01) A61K 36/03 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0139054

(22) 출원일자 2007년12월27일

심사청구일자 2007년12월27일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

전유진

제주 제주시 아라2동 1138번지 프로빌아파트
105-101

허수진

제주 제주시 연동 문송1로 30호

(74) 대리인

김일성

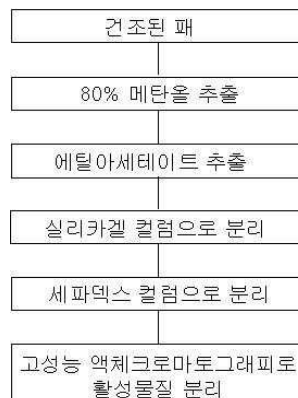
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 패 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물 및그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 갈조류에 속하는 패(*Ishige okamurae*)로부터 항산화 활성을 나타내는 물질인 디플로레소하이드록시카르말롤을 포함하는 추출물이 라디칼 소거활성 및 세포손상 억제활성 등의 우수한 항산화 활성을 나타내고 있는 것으로, 이 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 제조하여, 현재 사용되어지고 있는 항산화제들을 대체할 만한 천연 항산화 소재의 개발에 관한 것을 특징으로 하는 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

해양식물성 갈조류에 속하는 패(*Ishige okamurae*)에 있어서, 건조된 패(*Ishige okamurae*)시료를 분말의 형태로 분쇄 한 후, 분쇄된 분말 500g에 80% 메탄올 5 ℓ를 이용하여, 12시간동안 추출 시킨 후, 이러한 추출 과정을 수회 반복하여, 총 12ℓ의 80% 메탄올을 사용하여 추출하였고, 추출되어진 메탄올 추출물을 원심분리하여 잔사를 제거하였고 회전 증발농축기를 이용하여 농축하고, 농축된 추출물은 분획여두를 이용하여 물에 용해시킨 후, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 용액으로 분획을 실시하였고, 분획된 에틸아세테이트 층을 감압 건조하여 분획물을 얻어, 실리카겔 충전제를 충전한 컬럼에 분획물을 얻고, 클로로포름 : 메탄올을 50 : 1에서 0 : 1 비율로 용리시켜 활성성분을 회수하고, 회수된 활성성분을 세파텍스 LH-20 충전제를 충전한 컬럼에 다시 얻어 70% 아세톤으로 용리시켜 활성성분 2g을 얻었으며, 상기 아세톤으로 용리시켜 얻은 활성성분은 아세토니트릴:물 = 15:85 비율로 사용하여 고성능 액체크로마토그래피를 이용하여 항산화 활성을 나타내는 디플로레소하이드록시카르말롤(diphlorethohydroxycarmalol)을 포함하는 추출물이 제조되는 것을 특징으로 하는 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물의 제조방법.

청구항 2

제 1항의 제조방법에 의하여 제조되는 항산화 활성을 나타내는 디플로레소하이드록시카르말롤(diphlorethohydroxycarmalol)을 포함하는 추출물이 제조되는 것을 특징으로 하는 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물은, 라디칼 소거활성, 과산화수소 소거활성, 세포 생존율, 세포 손상 억제효능, 활성 라디칼의 억제효능이 있는 것을 특징으로 하는 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물은, 의약적 약품, 기능성 식품소재 또는 건강식품으로 이용 가능한 것을 특징으로 하는 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<11> 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 갈조류에 속하는 패(*Ishige okamurae*)로부터 항산화 활성을 나타내는 물질인 디플로레소하이드록시카르말롤을 포함하는 추출물이 라디칼 소거활성 및 세포손상 억제활성 등의 우수한 항산화 활성을 나타내고 있는 것으로, 이 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 제조하여, 의학적 약품 및 기능성 식품소재나 건강식품 등의 천연 항산화용 조성물을 제공함으로써, 활성 산소종(Hydrogen peroxide, Superoxide, Hydroxyl radical)과 프리 라디칼(Nitric oxide와 Nitrogen dioxide)에 의한 인체의 세포나 조직 및 식품의 산화적인 손상을 억제할 뿐만아니라, 종래에 항산화를 위하여 사용되던 합성 항산화제의 간 손상과 면역력 감소, 심장병, 암유발 등의 부작용을 방지할 수 있는 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 유효성분으로 하는 천연 항산화용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

<12> 산소는 인체 내 소화 및 에너지 생성 등 여러 대사과정에 관여하고 생물의 생존에 가장 필수적인 물질이지만, 반응성이 매우 큰 활성산소로 전화되면 생체에 큰 영향을 미친다. 활성산소의 종류로는 일반적으로 초과산화 라디칼 (O_2^-) 및 하이드록실 라디칼 (OH)과 같은 자유 라디칼 뿐만 아니라 비라디칼인 일중항 산소

($^1\text{O}_2$)와 과산화수소 (H_2O_2)를 포함한다. 이러한 활성산소 생성의 생체 내적 요인으로서는 세포 대사 작용, 산화 효소, 박테리아 작용 등을, 생체 외적 요인으로서는 오염된 공기, 대사를 증가, 흡연, 발암물질, 특정 항생제, 자외선, 열, 인스턴트 음식의 과량섭취 등을 들 수 있다. 이들 활성산소들은 단백질, 불포화 지방산 등과 결합하여 과산화 지질을 생성하고, DNA, RNA등에 손상을 일으키며, 생체막의 손상, 면역능력의 약화와 함께 성인병 및 각종 질병과 노화를 유발시키게 된다. 따라서 이러한 활성산소들을 효과적으로 제어시키는 천연물의 생리활성물질에 대한 연구가 자연스럽게 증가하게 되었다.

<13> 해조류는 양적으로 매우 풍부하게 먹을 수 있는 식품으로써 건강에 필수적인 여러 가지 무기염류들을 다량 함유하고 있으며, 동시에 단백질 같은 체구성 영양소도 함유하고 있다. 그리고 식물성 섬유인 알긴산과 칼슘이온(Ca^{++}), 요오드 성분이 많이 포함되어 있어서 대장의 연동운동을 도와주고 골다공증을 예방해 주며, 갑상선 부종을 억제시키는 역할을 하기도 한다. 또한 해조류의 어떤 성분들은 항균, 항암, 항산화 등 많은 생리활성을 갖고 있다고 알려져 있다. 이러한 분야들 중 항산화활성에 관심을 갖는 이유는, 국민소득이 증대됨에 따라 식생활이 서구화되면서 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 비만 등 각종 성인병이 유발되고, 사회가 점차 고도화됨에 따라 고령화 인구가 늘어나게 되면서 건강문제에 대한 인식이 바뀌게 되었기 때문이다.

<14> 천연 항산화제는 지금까지 여러 종류가 분리되었다고 보고하고 있지만 토코페롤 이외에는 인체독성, 양적, 경제적인 문제로 인해 거의 사용되지 않는 실정이다. 따라서 강력하면서도 인체에 해가 되지 않는 천연 항산화제의 개발에 관한 연구가 요구되고 있는 실정이다.

<15> 현재까지 연구되어진 천연 항산화제로는 인삼, 녹용, 구기자, 버섯 등의 생약제나 식생활에 많이 이용되고 있는 콩, 녹차 등 육상식물들을 이용한 연구가 가장 많이 이루어져 있다. 해조류에서는 육상식물들에 비해 그다지 많은 연구가 이루어지지는 않았지만 해조류를 많이 섭취하는 일본과 유럽의 일부에서 많이 연구되어져있다. Kaneda와 Ando(18)는 20여종의 해조류 중 김에서 항산화 활성을 나타내는 인지질 (phospholipids)를 분리하는데 성공한 바가 있고 (Kaneda T, Ando H. 1971. Component lipids of purple laver and their antioxigenic activity. *Proc Int Seaweed Symp* 7: 553-557), Yan 등은 갈조류인 *Sargassum kjellmanianum*로부터 분리한 플로로탄닌 (phlorotannins) 성분이 우수한 지질과산화 억제효과를 보인다고 밝힌 바 있다 (Yan XJ, Li XC, Zhou CX, Fan X. 1996. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *J Appl Phycol* 8: 201-203). 또한 Yan 등은 톳의 아세톤 추출물에서 우수한 항산화 효과를 나타내어 이것을 분석한 결과 후코잔틴 (fucoxanthin) 이라는 것을 밝혀내었고 (Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hizikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 605-607), Estrada 등은 남조류인 *Spirulina platensis*의 피코시아닌 (phycocyanin) 성분이 우수한 하이드록실 라디칼 소거활성을 나타내었다고 보고하였다 (Estrada JEP, BescPB, Fresno AMV. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco* 56: 497-500).

<16> 우리나라에서도 우리가 일상에서 많이 접할 수 있는 해조류들에 대한 연구는 상당수 이루어져 있는데, 박 등은 김, 미역 그리고 다시마 등에서 부틸레이티드 하이드록시 아니솔 (BHA) 보다 우수한 항산화 물질을 얻었다고 보고한 바 있다 (Park JH, Kang KC, Baek SB, Lee YH, Rhee KS. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Kor J Food Sci Technol* 23: 256-261). 또한 Siriwardhana 등은 갈조류인 톳에서 항산화 활성을 검색한 결과 여러 가지 용매 희분에서 활성 산소종 소거활성과 지질과산화 억제활성을 보인다고 보고하였다 (Siriwardhana N, Lee KW, Kim SH, Ha JW, Jeon YJ. 2003. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci Tech Int* 9: 339-346). 하지만 대부분이 추출량 및 독성문제로 인해 상업화에 성공한 예는 극히 드물다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<17> 따라서 본 발명은 해조류로부터 유용한 항산화 성분을 분리해 내기 위하여 다양한 스크리닝 방법을 통해 선별된 패를 대상으로 라디칼 소거활성, 과산화수소 소거활성, DNA 및 세포손상 억제효과를 검정하였고, 이러한 항산화효과를 갖는 물질을 정제하여 기존 항산화제들을 대체할만한 우수한 천연항산화제를 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

<18> 본 발명은 패로부터 분리된 물질의 항산화 활성 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게

설명하면, 갈조류에 속하는 패로부터 분리한 물질이 라디칼 소거활성 및 세포손상 억제활성 등의 우수한 항산화 활성을 나타내고 있음을 증명하고, 이 물질을 제조하는 것을 특징으로 하여, 현재 사용되어지고 있는 항산화제들을 대체할 만한 천연 항산화 소재의 개발에 관한 것이다.

<19> 본 발명의 구성을 실시예 및 실험예를 통해 설명하면 다음과 같다.

<20> [실시예 1] 재료의 준비

<21> 해양식물성 갈조류에 속하는 패(*Ishige okamurae*)는 제주 연안에서 직접 채집하였으며, 샘플은 수돗물로 여러 번 세척하여 소금, 작은 부착생물, 모래 등을 제거하고 깨끗한 물로 최종 세척한 후에 -20℃ 냉동고에 보관하였다. 동결한 샘플은 동결건조를 시켜 분쇄하였고 400 μm 이하로 분말화하여 사용하였다.

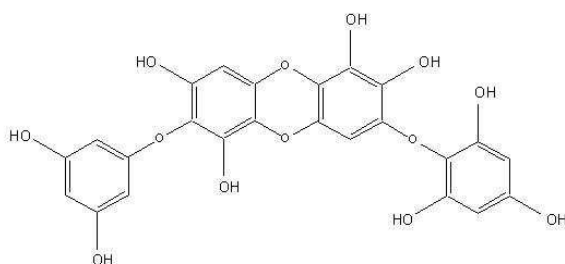
<22> [실시예 2] 패 유래 항산화 물질의 추출 및 분획 공정

<23> 채취하여 동결건조 한 뒤에 잘게 분말화 한 500g의 패를 10 L의 비이커에 넣고 실온에서 5 L의 80% 메탄올로 12시간 동안 천천히 교반하여 항산화 물질을 추출하였다. 이러한 과정을 수회 반복하였고, 총 12 L의 80% 메탄올을 사용하여 추출하였다. 그 다음 저온에서 원심분리하여 잔사를 제거하였고 회전 증발농축기를 사용하여 메탄올을 제거하였다. 농축된 추출물의 양은 약 64g 이었다. 농축하여 얻은 추출물을 물에 용해시킨 후에 에틸아세테이트로 분획을 실시하였고, 에틸아세테이트 층을 감압 건조하여 약 18g의 분획물을 얻었다.

<24> [실시예 3] 패 유래 항산화 물질의 정제 공정

<25> 55×400mm의 유리관에 75-150 μm 직경의 실리카겔 충전제를 충전한 컬럼에 상기 실시예 2에서 얻은 분획물을 얻고 클로로포름 : 메탄올을 50 : 1에서 0 : 1 비율로 용리시켜 활성성분 약 7.4g을 얻었다. 상기 활성성분을 25×300의 유리관에 25-100 μm 직경의 세파텍스 LH-20 충전제를 충전한 컬럼에 다시 얻어 70% 아세톤으로 용리시켜 활성성분 약 2g을 얻었다. 상기 활성성분은 다시 고성능 액체크로마토그래피 (아세토니트릴:물 = 15:85, 유속 = 1.0 ml/min, 10×250mm C-18 컬럼)를 이용하여 우수한 항산화 활성을 나타내는 물질을 얻었다. 이 물질 디플로레쓰하이드록시카르말롤 (diphlorethohydroxycarmalol)에 대한 자외선 - 가시광선 스펙트럼의 측정값은 UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε) = 232 (3.7), 적외선 스펙트럼의 측정값은 IR (KBr) ν_{max} 3391, 1615, 1498, 1279, 1188, 965, 818 cm⁻¹, 그리고 질량분석 스펙트럼의 측정값은 HREIMS m/z 512.0589 [M]⁺ (calcd for C₂₄H₁₆O₁₃, 512.0591) 이었다. 또한, ¹H-NMR을 이용하여 분석한 결과 δ¹H (mult, J = Hz)는 5.69(1H, s), 6.06 (1H, s), 5.87 (2H, s), 5.87 (2H, s), 5.67 (2H, d, 2), 5.78 (1H, t, 2), 5.67 (2H, d, 2)이었으며, 상기 분석결과로부터 상기물질의 구조가 하기 화학식 1임을 확인하였다.

화학식 1



<26>

<27> [실시예 4] 자유기산소 라디칼 소거능 측정

<28> 자유기산소 라디칼 소거 활성은 Nanjo 등의 방법에 따라 측정하였다. 60 μL의 샘플에 동량의 자유기산소 용액을 넣어 10초간 혼합해 준 후 테플론 (Teflon) 모세관에 옮기고, 전자스핀공명분광광도계에 넣었다. 스핀부가물 (spin adduct)은 중심부위, 3475 G; 자극빈도, 100 kHz; 자극강도, 2 G; 마이크로웨이브전압, 5 mW; 흡, 6.3

$\times 10^5$; 온도, 298 K의 조건에서 2분 후에 전자스핀공명분광광도계로 측정하였다. 도 2는 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 자유기산소는 안정한 프리라디칼로서 전자나 수소라디칼을 안정한 분자로 바꿔주고, 천연물의 항산화 활성을 평가하는 표준물질로서 종종 사용되기도 한다. 폐에서 분리된 디플로레소하이드록시카르말물은 자유기산소 라디칼 소거에 우수한 효과를 나타내었는데, 10 μ M의 농도에서 77.64%의 자유기산소 라디칼 소거활성을 나타내었고, 20 μ M의 농도에서도 93.18%의 우수한 자유기산소 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 물질의 농도를 증가시켜 줌에 따라 항산화 활성을 나타내는 물질들이 라디칼과 반응해서 생성되는 ESR 스펙트럼의 진폭이 점차 줄어드는 것을 확인함으로써 디플로레소하이드록시카르말물이 갖는 자유기산소 라디칼 소거활성을 확인하였다.

<29> [실시예 5] 알킬라디칼 소거능 측정

<30> 알킬 라디칼은 아조비스염화수소산염으로부터 생성된다. 10 mmol/L 아조비스염화수소산염과 10 mmol/L 부틸니트론 이 함유된 인산완충식염수 (PBS, pH 7.4) 혼합물과 농도별로 처리한 샘플은 37℃ 항온수조에서 30분간 반응시키고, 100 μ L 테플론 모세관에 옮겼다. 스핀부가물은 중심부위, 3475 G; 자극빈도, 100 kHz; 자극강도, 2 G; 마이크로웨이브전압, 10 mW; 흡, 6.3×10^5 ; 온도, 298 K의 조건에서 전자스핀공명분광광도계로 측정하였다. 도 3은 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 알킬 라디칼은 많은 탄화수소반응에서 중간 생성물로서 발견되어 지고 전자스핀공명을 통해 쉽게 검출할 수 있다. 알킬 라디칼 스핀 부가물 아조비스염화수소산염은 부틸니트론과 같이 37℃에서 30분간 반응 시켰을 때 나타난다. 폐에서 분리된 디플로레소하이드록시카르말물은 알킬라디칼 소거에 우수한 효과를 나타내었는데, 1, 10, 20 μ M의 농도에서 각각 37.71, 53.38, 82.89%의 알킬라디칼 소거능을 나타내었고, 물질의 농도를 증가시켜 줌에 따라 항산화 활성을 나타내는 물질들이 라디칼과 반응해서 생성되는 ESR 스펙트럼의 진폭이 점차 줄어드는 것을 확인함으로써 디플로레소하이드록시카르말물이 갖는 알킬라디칼 소거활성을 확인하였다.

<31> [실시예 6] 하이드록실 라디칼 소거능 측정

<32> 하이드록실 라디칼은 펜턴 반응에 의해 발생되고 디메틸프롤리녹사이드와 빠르게 반응하고, 결과물인 디메틸프롤리녹사이드-하이드록실 부가생성물은 전자스핀공명 분광광도계 (Electron Spin Resonance spectrophotometer)에서 측정이 가능하다. 전자스핀공명 스펙트럼 (ESR spectrum)은 인산완충용액 (pH 7.4)에 0.2 mL의 0.3 M 디메틸프롤리녹사이드, 0.2 mL의 10 mM 황화철, 0.2 mL의 10 mM 과산화수소를 혼합하여 2.5분 후에 중심부위, 3475 G; 자극빈도, 100 kHz; 자극강도, 2 G; 마이크로파 전압, 1 mW; 흡, 6.3×10^5 ; 온도, 298 K의 조건에서 전자스핀공명 분광광도계로 측정하였다. 도 4는 상기실험의 결과를 나타낸 것으로서, 펜턴 시스템 (Fenton system, $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)에서 발생하는 하이드록시 라디칼은 전자스핀공명분광광도계 사용하여 디메틸프롤리녹사이드로부터 검출되었다. 폐에서 분리된 디플로레소하이드록시카르말물은 하이드록실 라디칼 소거에 우수한 효과를 나타내었는데, 10, 50, 100 μ M의 농도에서 각각 12.54, 21.39, 81.67%의 하이드록실 라디칼 소거능을 나타내었고, 물질의 농도를 증가시켜 줌에 따라 항산화 활성을 나타내는 물질들이 라디칼과 반응해서 생성되는 ESR 스펙트럼의 진폭이 점차 줄어드는 것을 확인함으로써 디플로레소하이드록시카르말물이 갖는 하이드록실 라디칼 소거활성을 확인하였다. 또한 기존의 항산화제로 사용되는 물질과의 비교값은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1. 기존의 항산화제로 사용되는 물질과의 비교

샘플	IC50 농도 (μM)		
	자유기산소 라디칼	알킬 라디칼	하이드록실 라디칼
디플로레소하이드록시카르말롤	3.41	4.92	114.80
비타민 C	19.94	19.26	69.75

<33>

<34> 상기 값은 디플로레소하이드록시카르말롤과 현재 항산화제로 사용되어지고 있는 비타민 C와의 라디칼 소거활성에 대한 IC50농도를 비교한 것으로, 자유기산소 라디칼과 알킬라디칼에 대해서는 디플로레소하이드록시카르말롤이 비타민 C보다 훨씬 우수한 값을 나타내었으며, 하이드록실 라디칼에 대해서는 상대적으로 낮은 값을 나타내는 것을 확인하였다.

<35> [실시예 7] 과산화수소 소거능 측정

<36> 과산화수소(hydrogen peroxide) 소거활성은 Muller 등의 방법에 따라 측정하였다. 100 μL의 0.1 M 인산버퍼(phosphate buffer (pH 5.0))과 샘플을 96 홀 마이크로웰 플레이트에서 혼합시켰다. 그 후 20 μL의 과산화수소(hydrogen peroxide)를 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨다. 최종적으로 30 μL의 1.25 mM 에비비티에스(ABTS)와 과산화효소(peroxidase (1 unit/mL))를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 도 5는 상기실험의 결과를 나타낸 것으로서, 과산화수소와 같은 활성산소종은 세포막에 존재하는 지질과 결합하여 과산화물을 만듦으로 인해 산화반응이 진행되게 되는데, 이들의 연속반응에 의하여 알콜류, 알데하이드류, 케톤류 등을 생성함으로써 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발할 뿐만 아니라, 세포노화, 세포막 분해, 지방산화 등 심각한 생리적인 장애를 일으킨다. 따라서 이러한 부작용을 억제시키기 위해 폐에서 분리된 디플로레소하이드록시카르말롤의 과산화수소 소거능을 측정하였다. 그 결과, 디플로레소하이드록시카르말롤은 우수한 과산화수소 효과를 나타내었는데, 100 μM의 농도에서 81.67%의 과산화수소 소거능을 나타내었고, 농도에 의존적으로 소거능이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 기존의 항산화제로 사용되는 물질과의 비교값은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2. 기존의 항산화제로 사용되는 물질과의 비교값

	IC50 농도 (μM)
디플로레소하이드록시카르말롤	12.32
부틸레이티드하이드록시아니솔 (BHA)	73.92

<37>

<38> 상기 값은 디플로레소하이드록시카르말롤과 현재 항산화제로 사용되어지고 있는 합성 항산화제인 부틸레이티드

하이드록시아니솔 (BHA)와의 과산화수소 소거능에 대한 IC50농도를 비교한 것으로, 디플로레소하이드록시카르말롤이 부틸레이티드하이드록시아니솔보다 훨씬 우수한 과산화수소 소거활성을 나타내는 것을 확인하였다.

<39> [실시예 8] 세포내 생성된 활성산소종에 대한 디플로레소하이드록시카르말롤의 소거능 측정

<40> 세포상에서의 과산화수소 소거능은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 노말세포인 vero 세포들을 홀당 약 1.5×10^5 세포수가 되도록 96 마이크로웰에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 한다. 그리고 난 후에 물질을 여러 농도로 처리하여 같은 조건에서 30분간 재배양하고, 과산화수소를 10 μ l 가한 후 같은 조건에서 30분간 배양한다. 그 후 반응기에서 마이크로웰을 꺼내어 이염화수산화형광이초산염 (DCFH-DA)를 20 μ l 가하고 스펙트로포토메터를 이용하여 흡광정도를 측정함으로써 세포내 과산화수소의 소거능을 측정한다.

<41> 도 6은 상기실험의 결과를 나타낸 것으로서, 이염화수산화형광이초산염 (DCF-DA)을 이용하는 방법으로 항산화 활성을 측정하였는데, 이 방법은 세포 내에서 과산화수소를 측정하기 위한 형광분석법으로서 비형광 물질인 이염화수산화형광이초산염 (DCHF-DA)가 세포내에 들어가 에스테라제 (esterase)에 의해 이염화이수산화형광 (DCHF)로 변환되고 다시 세포내 과산화수소와 반응하여 이염화형광 (DCF)로 산화되면서 발색되는 형광정도를 측정함으로써 과산화수소의 소거활성을 나타내는 방법이다. 그 결과, 디플로레소하이드록시카르말롤은 세포상에서도 우수한 과산화수소 효과를 나타내었는데, 200 μ M의 농도에서 61.69%의 과산화수소 소거능을 나타내었고, 농도에 의존적으로 소거능이 증가하는 것을 확인하였다.

<42> [실시예 9] 과산화수소에 의해 손상입은 세포에 대한 디플로레소하이드록시카르말롤의 세포생존률 측정

<43> 디플로레소하이드록시카르말롤의 세포생존률 은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 노말세포인 vero 세포들을 홀당 약 1.5×10^5 세포수가 되도록 96 마이크로웰에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 한다. 그리고 난 후에 물질을 여러 농도로 처리하여 같은 조건에서 30분간 재배양하고, 과산화수소를 10 μ l 가한 후 같은 조건에서 24시간 배양한다. 그 후 반응기에서 마이크로웰을 꺼내어 엠티티 (MTT)시약을 50 μ l 가하고 같은 조건에서 4시간 배양한다. 상등액을 조심스럽게 버린 후 디엠에스 오 (DMSO)를 150 μ l 가하여 잘 섞고 스펙트로포토메터를 이용하여 540 nm에서 흡광정도를 측정함으로써 세포생존률을 구한다.

<44> 도 7은 상기실험의 결과를 나타낸 것으로서, 엠티티 방법으로 측정하였는데, 이것은 살아있는 세포의 경우 노란색의 수용성 엠티티 시약이 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 자주색으로 환원되는 정도를 흡광도를 측정함으로써 알아보는 방법이다. 그 결과, 디플로레소하이드록시카르말롤을 처리도 하지 않고 과산화수소에 의해 손상도 입지않은 대조군의 세포생존률을 100%라고 나타내었을 때, 디플로레소하이드록시카르말롤을 처리도 하지 않고 과산화수소에 의해 손상을 입은 세포는 약 40%의 세포생존률을 나타낸 반면에 디플로레소하이드록시카르말롤을 농도별로 처리해 줄수록 세포생존률이 높아지는 것을 확인할 수 있었고, 200 μ M의 농도에서는 약 80%의 세포생존률을 보이는 것을 확인하였다.

<45> [실시예 10] 과산화수소에 의해 손상입은 DNA에서 디플로레소하이드록시카르말롤의 농도별 저해효과 측정

<46> DNA손상 억제효과는 코멧 측정법으로 수행하였다. 세포는 75 μ l의 0.5% 녹는점이 낮은 아가로즈 (LMA)와 섞은 후, 1% 녹는점이 보통인 아가로즈 (NMA)가 전코팅 (precoting)된 슬라이드에 분산시켰다. 겔이 굳으면 그 위에 다시 0.5% 녹는점이 낮은 아가로즈 75 μ l를 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 커버를 덮고, 용해버퍼 (2.5 M 염화나트륨, 100 mM 이디티에이, 10 mM 트리스, and 1% 나트륨 라우릴사코신 (sodium laurylsarcosine); 1% 트리톤 X-100 and 10% 디엠에스오)에 슬라이드를 담가 4℃에서 1시간동안 침지시켜준다. 건조 후에 슬라이드는 300 mM 수산화나트륨 와 10 mM 나트륨이 함유된 이디티에이 (pH 13.0)가 들어있는 전기영동 탱크에 배열하고 40분 동안 DNA 가닥을 풀었다. DNA 전기영동은 25 V/300 mA의 전압으로 20분 동안 실시하였다. 슬라이드는 중화버퍼 (0.4 M 트리스, pH 7.5)에 5분씩 담귀 3회반복 세척해주었고 에탄올로 5분간 세척하고 20 μ g/ml 농도의 에티뮴 브로마이드 50 μ l로 염색하였다. 측정은 이미지 분석기 (kinetic Imaging Komet 5.0, UK)와 형광현미경 (LEICA DMLB, Germany)로 수행하였고, 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA파편의 거리 또는 테일 길이에 테일 내 함유된 DNA%를 곱해준 테일 순간값을 측정하여 나타내었으며 각 대상자 당 2개의 슬라이드를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

<47> 도 8 및 도 9는 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 코멧 측정법은 단일세포에서 DNA 가닥의 파괴되는 정도를 측정하는 방법으로, 임파구에 대해 아주 쉽게 적용할 수 있어서 인간 바이오-모니터링 연구에 이용이 가능하

다. 이것은 시험관 내에서나 생체 내에서 모두 산화적 DNA 손상의 측정을 위한 표준방법으로 사용된다. 코멧 측정법으로부터 패에서 분리된 디플로레소하이드록시카르말롤이 갖는 DNA손상 억제효과를 확인할 수 있었다. 그 결과, 과산화수소로 손상을 가하지 않은 대조군의 경우에는 파괴된 DNA가 거의 없는 반면에 샘플을 처리하지 않고 과산화수소로 손상을 가한 처리군에서는 약 52%의 손상된 DNA파편의 형광을 확인할 수 있었다. 디플로레소하이드록시카르말롤이 갖는 세포손상 억제효과는 250 μ M의 농도에서 약 61%의 활성을 나타내었고, 농도별로 세포손상 억제효과가 증가하는 경향을 나타내었다. 도 9는 서로 다른 농도의 디플로레소하이드록시카르말롤을 처리했을 때 나타나는 DNA 파편의 이동정도를 나타낸 현미경사진을 보여주고 있다. 과산화수소만 처리한 그룹에서는 DNA가 완전히 손상입은 것을 볼 수 있지만, 과산화수소와 디플로레소하이드록시카르말롤을 같이 첨가시켜 주었을 때는 과산화수소로부터 유도되는 손상이 줄어드는 것을 볼 수 있다. 샘플들을 0에서 250 μ M의 다른 농도로 처리했을 때는 DNA의 이동정도가 농도의 증가에 따라 변화하였다. 이 결과는 디플로레소하이드록시카르말롤이 갖는 세포보호효과를 잘 보여주는 그림이라고 할 수 있다.

<48> [실시예 11] 과산화수소에 의해 손상된 세포의 형태적 관찰

<49> 세포핵의 형태적 관찰은 세포에 침투가 가능한 DNA 염색약인 회치스트 33342를 사용함으로써 확인할 수 있다. 24 홈 마이크로웰 플레이트에 세포를 1×10^5 cell/ml의 농도로 처리하고 16시간 배양한 후에 샘플을 농도별로 처리하였다. 1시간 배양 후에 과산화수소를 처리해주고 24시간 재차 배양한 후에 회치스트 33342를 첨가시켜 10 분간 더 배양하였다. 염색된 세포들은 형광현미경 하에서 관찰하였다.

<50> 도 10은 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 디플로레소하이드록시카르말롤이 갖는 세포 보호효과를 재차 확인하기 위해 현미경적 관찰을 통해 확인해 보았다. 이것은 유해 산소 종에 의한 세포 손상 정도를 회치스트 33342 형광 염색약으로 핵을 염색하여 핵의 손상정도를 형광 현미경으로 관찰하는 방법으로써 세포에 과산화수소를 첨가시키지 않았을 때, 세포에 과산화수소로 손상을 가해주었을 때, 그리고 세포에 디플로레소하이드록시카르말롤을 50과 250 μ M 농도로 처리해 준 후 과산화수소로 손상을 가해준 네 가지의 처리 군으로 나누어 형태적 관찰을 실시하였다. 도 10B에서 보는 것처럼 세포에 과산화수소만 처리하였을 때에는 세포가 사멸되면서 생기는 죽은 세포체가 많이 형성된 것을 볼 수 있다. 반면 디플로레소하이드록시카르말롤을 50 μ M을 처리했을 때에는 죽은 세포체를 많이 줄여주는 것을 볼 수 있었고 (도 10C참조), 250 μ M을 처리했을 때(도 10D참조)는 죽은 세포체를 거의 찾아 볼 수 없이 과산화수소를 처리하지 않은 도 10A와 비슷한 결과를 보이는 것으로 보아 디플로레소하이드록시카르말롤이 갖는 세포손상 억제효과를 확인할 수 있었다.

<51> 이상에서와 같이 본 발명은 천연 항산화제의 잠재적 소재로서 패로부터 분리한 디플로레소하이드록시카르말롤을 이용하여 전자스핀공명 분광광도계에 적용시켜 그들이 갖는 라디칼 소거효과를 측정하였고, 활성산소종의 일종인 과산화수소 소거활성을 화학적세포내 실험을 통해 확인하였다. 또한 디플로레소하이드록시카르말롤이 갖는 세포생존률을 확인하였고, 인간 임파구에서 코멧 측정법을 사용하여 과산화수소 소거활성을 측정하였고 그 회치스트 33342형광시약을 이용하여 그 형태적 관찰을 수행하였다. 디플로레소하이드록시카르말롤은 자유기산소, 알킬, 하이드록실 라디칼과 같은 활성 라디칼들에 대해 우수한 억제효과를 나타내었고, 과산화수소에 대해서도 우수한 억제효과를 나타내었으며, 세포 손상 억제효과 또한 우수한 결과를 나타내었다. 따라서 패로부터 분리해 낸 디플로레소하이드록시카르말롤은 항산화가 적용되는 식품이나 제약산업에 충분히 사용될 수 있을 것으로 생각되어지며, 비록 상기의 실시예에 한하여 설명하였지만 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다.

발명의 효과

<52> 전술한 구성 및 작용에 의한 효과를 상세하게 설명하면 다음과 같다.

<53> 본 발명에 따른 디플로레소하이드록시카르말롤은 종래의 항산화제에 비하여 소거활성이 우수하고, 손상입은 세포의 생존률 높여줄 뿐만 아니라, 활성산소에 의해 손상을 입은 DNA의 보호효과 또한 뛰어난 장점을 가지고 있으므로 종래의 항산화제를 대체할 천연 항산화제로서의 효과를 제공한다. 또한 현재 이용하고 있지 않은 패를 이용하여 추출, 정제됨으로써 미이용자원의 개발과 천연 항산화소재라는 점, 그리고 지역경제의 활성화 등의 부가효과를 제공할 것이다.

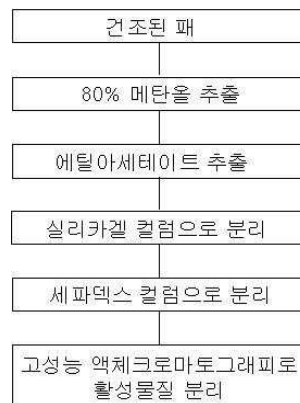
도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 패로부터 항산화 효과를 갖는 물질의 분리과정 흐름도

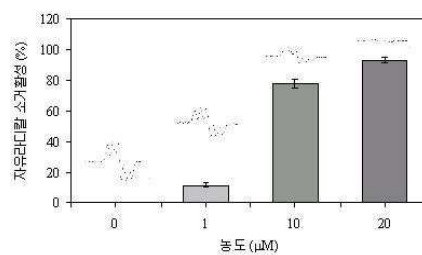
- <2> 도 2는 디플로레쏘하이드록시카르말물의 자유기산소 라디칼 소거능 측정 그래프
- <3> 도 3은 디플로레쏘하이드록시카르말물의 알킬 라디칼 소거능 측정 그래프
- <4> 도 4는 디플로레쏘하이드록시카르말물의 하이드록실 라디칼 소거능 측정 그래프
- <5> 도 5은 디플로레쏘하이드록시카르말물의 과산화수소 소거능 측정 그래프
- <6> 도 6은 세포내 생성된 활성산소종에 대한 디플로레쏘하이드록시카르말물의 소거능 측정 그래프
- <7> 도 7은 과산화수소에 의해 손상입은 세포에 대한 디플로레쏘하이드록시카르말물의 세포생존율 측정 그래프
- <8> 도 8은 과산화수소에 의해 손상입은 DNA에서 디플로레쏘하이드록시카르말물의 농도별 저해효과 측정 그래프
- <9> 도 9는 손상된 DNA 형광 현미경 사진
- <10> 도 10은 과산화수소에 의해 손상된 세포의 형태적 관찰 사진

도면

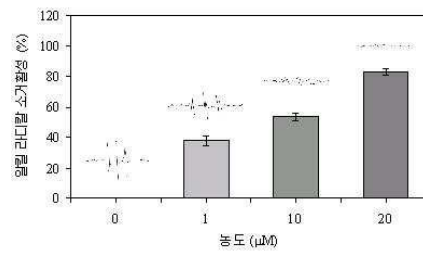
도면1



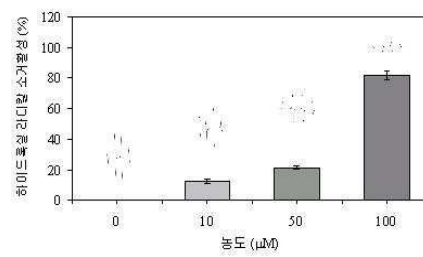
도면2



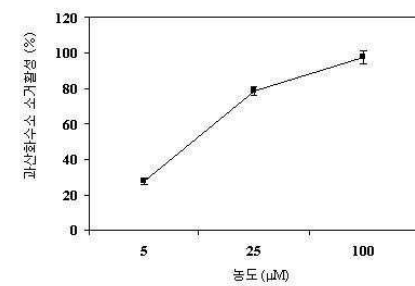
도면3



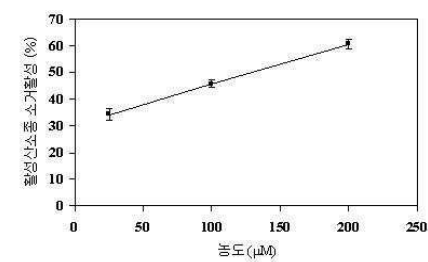
도면4



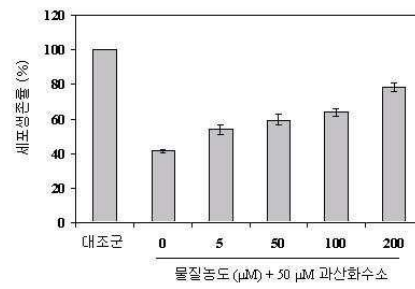
도면5



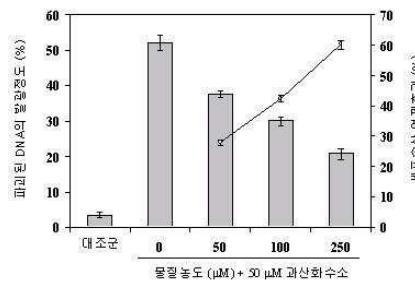
도면6



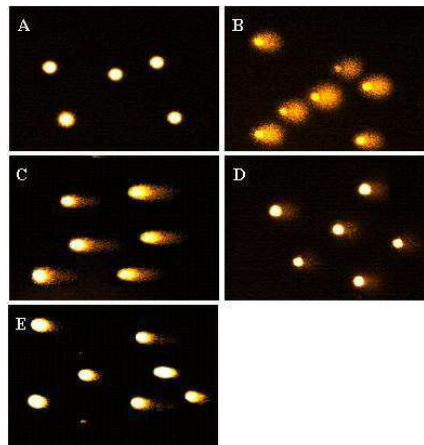
도면7



도면8



도면9



도면10

