



- (51) 국제특허분류:
A61K 36/03 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) A23K 1/14 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003975
- (22) 국제출원일: 2016년 4월 18일 (18.04.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0182907 2015년 12월 21일 (21.12.2015) KR
- (71) 출원인: 부경대학교 산학협력단 (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 48547 부산시 남구 신선로 365, Busan (KR).
- (72) 발명자: 김형락 (KIM, Hyeung-Rak); 48428 부산시 남구 황령대로 319 번길 26 104-2102 호, Busan (KR). 임수진 (LIM, Su-Jin); 49316 부산시 사하구 승학로 19 번길 15, 2-109 호, Busan (KR). 권미성 (KWON, Mi-Sung); 48308 부산시 수영구 남천동로 22 번길 19, Busan (KR). 이민섭 (LEE, Min-Sup); 46068 부산시 기장군 기장읍 차성남로 1-1, A-502 호, Busan (KR). 멩하오진 (MING-HAO, Jin); 70112 루이지애나주 뉴올리언스 2020 그라 비어 스트리트 스위트 D. LSU 헬스 사이언스 센터 스퀘 오브 메디슨, 디팔트먼트 오브 아프셀탈러지 엔드 뉴로사이언스 센터, Louisiana (US).

(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울시 강남구 테헤란로 33 길 7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17 에 의한 선언서:

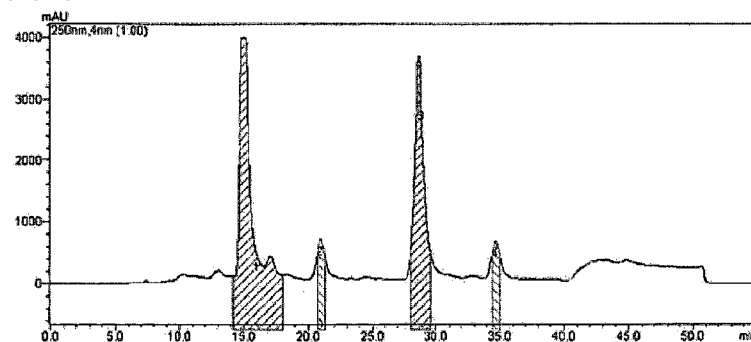
— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTIOXIDANT COMPOSITION COMPRISING *SARGASSUM SERRATIFOLIUM* EXTRACT OR FRACTION THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to an antioxidant composition and, more specifically, to an antioxidant composition comprising a *Sargassum serratifolium* extract or a fraction thereof as an active ingredient, wherein the antioxidant composition is a useful material (substance) that can be added to medicines, cosmetics, foods, animal feeds, and the like. The present invention also relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating eye diseases, a food composition for alleviating eye diseases, and a health functional food, each of which comprises a *Sargassum serratifolium* extract or a compound separated therefrom as an active ingredient.

(57) 요약서: 본 발명은 항산화 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 유효성분으로서 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항산화 조성물로 의약품, 화장품, 식품, 동물사료 등에 첨가하여 사용될 수 있는 유용한 소재(물질)에 관한 것이다. 또한 본 발명은, 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 안질환 개선용 식품 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 항산화 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 유효성분으로서 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항산화 조성물로 의약품, 화장품, 식품, 동물사료 등에 첨가하여 사용될 수 있는 유용한 소재(물질)에 관한 것이다. 또한 본 발명은, 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 안질환 개선용 식품 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 항산화(anti-oxidation)는 체내에서 일어나는 여러 산화작용을 방지하는 것을 말하며, 생체막이나 지단백질로서 존재하는 지질은 체내에서 발생하는 자유 라디칼(free radical)의 공격을 받아 여러 종류의 과산화물을 형성하는데, 과산화물들과 분해산물 등은 반응성이 높아 주변의 생체분자들의 구조와 기능을 변환시켜 노화 현상 및 여러 가지 만성질환을 초래한다.
- [3] 생체 내에는 이러한 자유 라디칼(free radical)을 중화시키고 몸을 보호할 수 있는 여러 항산화 방어기구가 있다. 인간의 질병 및 노화는 체내 대사과정 중 발생하는 O_2^- (superoxide), NO(nitric oxide), NO_2 (nitrogen dioxide), OH(hydroxyl), ROO(proxy), RO(alkoxyl), HO_2 (hydroperoxyl) 라디칼(radical) 등의 산화반응에 기인하며 생체 내에서는 이런 유해한 라디칼인 유리기로부터 생체를 방어하기 위한 수단으로써, 항산화 효소인 슈퍼옥시드 디스무타제(SOD, superoxide dismutase)는 슈퍼옥시드 라디칼(superoxide radical)을 환원시켜 H_2O_2 로 전환시키며 이때 생성된 H_2O_2 등은 카탈라제(CAT; catalase), 글루타치온 퍼옥시다제(GSH-px; glutathione-peroxidase) 등의 항산화 효소나 비타민 C, 비타민 E, 글루타치온 등의 항산화 물질이 존재하여 유리기를 제거함으로써 생체를 산화적 손상으로부터 보호한다.
- [4] 그러나 이러한 항산화 방어계가 유리기 생성을 조절할 수 없을 정도로 저하될 때 조직의 산화적 스트레스와 손상이 촉진되며 체내에서 생성된 과잉의 유리기와 지질 과산화물은 단백질의 산화, DNA 손상과 같은 산화적 스트레스에 의한 상해를 증가시킨다. 현재 보고된 바에 의하면 2003년 한국인의 주요 사망요인은 암, 뇌혈관질환, 심혈관질환, 당뇨병 순으로 나타났다(Korea National Statistical Office : The cause of death Statistics 2003; Annual Report of on the Cause of Death Statistics. Korea National Statistical Office, 2004). 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 심혈관질환, 당뇨병, 암, 퇴행성 신경병, 노화 등 만성퇴행성질환을 유발하는 주요 요인이 될 수 있으며, 항산화물질은

활성산소종을 제거함으로써 만성퇴행성 질환의 예방에 도움을 줄 수 있다고 알려져 있다.

- [5] 인체 생리과정 중 발생하는 활성산소(O_2 , H_2O_2 , OH 및 1O_2)는 반응성이 매우 강하여 이들에 의하여 야기되는 프리라디칼 반응은 지질을 포함한 주요 거대분자의 파괴효과를 나타낸다(Davies, KJA and Goldberg, AL., J. Biol. Chem., 262, pp.8220-8226, 1987). 이들은 정상적인 대사과정, 광증감반응, 약물대사과정 및 기타 세포대사의 이상을 초래하는 여러 요인에 의해 그 생성이 증가하며, 생체는 이들에 의하여 일어나는 자유 라디칼 반응의 유해효과에 항상 노출되어 있다고 볼 수 있다.
- [6] 특히 세포가 나이가 들어감에 따라 이들의 유해 라디칼에 의한 유해 작용이 계속적으로 누적될 경우 발암, 동맥경화, 심장질환, 피부노화 및 안과질환 등 연령증가에 따른 여러 성인병과 관련된 질환은 물론 전반적인 세포의 노화를 야기하여 인간의 질병발생과 노화의 원인으로 제시되고 있다.
- [7] 한편, 눈은 생체의 자외선, 방사선, 흡연, 환경 오염 등에 의한 산화스트레스, 또는 생체 내 혈액 중의 이물질 등에 의한 전신적인 산화적 스트레스에 영향을 받는다. 안 조직에서 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)는 미토콘드리아에서의 호흡, 산화환원효소, 광화학 반응 등에 의해 생성된다. 세포 내 미토콘드리아 전자전달계에서는 NADH나 숙시네이트(succinate)로부터 받은 전자가 각 전자전달복합체를 따라 단계별로 전달되어 결국 O_2 를 환원시켜 물로 된다. 그러나 전자전달계의 중간단계에서 전자가 이탈되어 바로 산소로 전달되면 비효소적으로 슈퍼옥사이드(superoxide, O_2^-)를 형성하게 된다. 일산화질소 합성효소(NOS)가 L-arginine L-시트룰린으로 변환하며 이때 일산화질소가 생성된다. 이 일산화질소는 슈퍼옥사이드(superoxide)와 반응하여 반응성이 높은 퍼옥시니트리트(peroxynitrite: ONOOK)가 생성된다. 또한, 리보플라빈 등의 광증감 물질들은 광화학 반응에 의해 슈퍼옥사이드(superoxide), 히드록실 라디칼(hydroxyl radical), 과산화수소(H_2O_2) 등이 생성된다.
- [8] 안조직에는 구리(Cu), 아연(Zn)과 망간(Mn)을 포함하는 슈퍼옥사이드 디스뮤테이즈(SOD), 카탈레이즈, 셀레늄(Se)을 함유하는 글루타치온퍼 옥시데이즈 등의 항산화 효소와 토코페롤, 카로티노이드 등 지용성 항산화 화합물과 아스코르빈산, 환원형 글루타치온 등의 수용성 항산화 물질이 존재하여 활성산소 제거에 관여하고 있다. 그리고 산화형 글루타치온의 환원에 관여하는 글루타치온 환원효소, 티오에톡신환원효소, 아스코르빈산 프리라디칼을 제거하는 아스코르빈산 자유라디칼효소 등이 존재한다.
- [9] 이러한 활성산소의 생성계와 소거계의 균형이 깨어짐으로써 받는 산화적스트레스가 안조직과 안질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 눈의 망막은 인체에서 대사속도가 빠른 조직이어서 엄청난 양의 산화적 스트레스가 일어난다. 더구나 눈이 에너지가 높은 자외선에 노출될 경우

반응성이 높은 활성산소가 다량 생성되므로 황반변성과 같은 치명적인 손상을 초래하게 된다.

- [10] 눈의 질병 중 가장 연구가 활발한 부분은 연령-관련 황반변성(age-related macular degeneration: 이하 간략하게 ‘AMD’로 명칭함)인데 미국에서만 현재 8백만명 이상이 이 질병의 한 형태인 건성 황반변성(dry AMD)을 가진 것으로 보고되었고, 매년 3백만명 이상이 이 질병으로 시력을 잃고 있다. 이 질병은 과다한 산소 사용으로 인한 반응성 강한 산소 유도체의 생성, 리포푸신(lipofuscin)-레티노이드 유도체의 축적 (bisretinylethanolamine ; A2E), 빛에 의한 산화 등 여러 원인이 있으나 구체적인 메카니즘과 치료 방법은 아직 알려지지 않았다 (Zarbin, 2004, Arch Ophthalmol 122, 598-614); Kasahara et al., 2005, Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 3426-3434).
- [11] 눈에서 받아들이는 빛 에너지 정보는 G-protein coupled receptor (GPCR)신호전달과정을 거쳐 cGMP가 관여하는 양이온 채널을 닫아 시각 세포가 전기적인 극성을 띄게 되어 전기에너지의 형태로 뇌에 전달된다. 빛에 의해 11-cis 구조에서 all-trans 로 바뀐 레티날(retinal)은 여러 단백질과 효소반응에 의해 다시 11-cis형태로 재생산된다. 이처럼 레티날은 빛과 반응하고 효소에 의해 재활용 되는 일련의 반응들을 눈의 시각 싸이클(visual cycle) 또는 레티노이드 싸이클 (retinoid cycle) 이라고 한다. 시각 세포에서 빛과 반응한 레티날은 가수분해되어 망막색소상피(retinal pigment epithelium)로 보내져 이러한 일련의 반응의 기질이 된다. 눈에서의 레티날의 재활용은 척추동물이 연속적으로 보기 위한 필수적인 요소이다.
- [12] 망막(retina) 내 광수용체 세포(photoreceptor cells)는 빛의 자극을 수용하여 전기적 신호로 전환하는 중요한 시신경 세포이다. 광수용체 세포에 있는 로돕신(rhodopsin)은 옵신과 11-시스레티날(11-cis-retinal: 이하 하기에서는 간략하게 ‘11cRAL’로 약칭함)로 이루어져 있다. 11cRAL은 빛수용체간 기질(interphotoreceptor matrix)을 통과한 후 광수용체 세포로 운반되어, 옵신(opsin) 단백질과 결합하여 시홍(로돕신, rhodopsin)이라는 시색소(visual purple)를 형성한다. 로돕신을 함유한 광수용체 세포는 아주 적은 양의 빛도 포착할 수 있으므로, 어두운 곳에서의 시력에 중요하다. 로돕신 내에 11cRAL이 광활성화에 의해 전트란스레티날(all-trans-retinal: 이하 하기에서는 간략하게 ‘atRAL’로 약칭함)과 옵신(opsin)으로 분해되는데, 이때 생성되는 atRAL은 광수용체 세포와 망막색소상피 세포 (retinal pigment epithelium)에서 일어나는 시각회로 (visual cycle)에 의하여 단계적으로 다시 11cRAL로 환원되며 11cRAL은 다시 옵신과 결합하여 로돕신을 재합성한다 (Jin M, et al., Cell, 2005).
- [13] 시각 회로의 중간 대사산물인 atRAL과 11cRAL은 알데하이드 (aldehyde) 형태의 화합물로 세포내 과도한 산화적스트레스를 유발할 수 있기 때문에 시각 회로의 각 단계는 여러 효소들에 의하여 엄격하게 조절되고 있다. 시각 회로를 책임지고 있는 효소들의 돌연변이나 기능 저하, 또는 빛에 과도하게 노출되는

경우 *atRAL*이 과도하게 생성되어 광수용체 세포 내 축적되고 이는 광수용체 세포의 사멸을 유도하게 된다. 시각장애 환자들에게서 *atRAL*을 전트란스레티놀(all-trans-retinol: 이하 하기에서는 간략하게 '*atROL*'로 약칭함)로 환원시키는 *atROL* 탈수소효소(dehydrogenase), 또는 광수용체 세포와 망막 색소 상피세포 사이의 레티놀 이동을 돕는 ATP-binding cassette sub-family A member 4 (*Abca4*), interphotoreceptor retinoid binding protein (*IRBP*)등 시각 회로에서 중요한 역할을 하는 효소의 유전자 돌연변이가 발견되었으며 이로 인하여 망막내 광수용체 세포가 퇴화되고 있는 것으로 보고 되었다 (Busskamp V, et al., Science, 2010; Allikmets R, et al. Science, 1997; Jin M, et al., Cell, 2005; Jin M, et al. The Journal of neuroscience, 2009; Maeda A, et al. The Journal of biological chemistry, 2009).

- [14] 뿐만 아니라, 마우스 동물 실험모델을 통하여 각각 효소들의 유전적 결함이 망막 내 *atRAL*의 생성을 증가시킴이 확인되었고 따라서 시신경 조직 내에서 *atRAL*의 조절은 매우 중요한 것으로 여겨진다. 661W 세포는 마우스 유래 광수용체 세포로 시신경의 퇴화, 시신경 보호 등을 연구하는데 많이 사용되고 있다 (Tan E, et al. Investigative ophthalmology & visual science, 2004). 특히 자외선의 자극, 과산화수소 등의 산화적스트레스에 대한 반응 등에 대하여 주로 연구되어 왔으며, 여러 가지 화합물의 시신경 보호 효과에 대하여도 연구되고 있다 (Kanan Y, et al., Cell Mol Neurobiol, 2015; Krishnamoorthy RR, et al. The Journal of biological chemistry, 1999).
- [15] 따라서 반응성 산소 대사물에 의해 생체 내 자유라디칼 반응을 억제시키거나 인체에 누적되어 있는 유해 활성산소를 제거함으로써, 산화적 손상에 의해 야기되는 다양한 질환 치료에 유용할 것으로 예상되는 후보물질을 찾고자 하는 연구들이 계속되어 왔다.
- [16] 전 세계적으로 천연물로부터 항산화 활성을 가지는 성분을 분리하여 안전하고 강력한 항산화제를 만들려는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 쿡(Duh et al., 1997)이나 유지 종자(Deiana et al., 1999), 허브(Kitts et al., 2000), 차(Roedig-Penman and Gordon, 1997), 딸기류의 과실(Wang and Jiao, 2000), 은행잎(Gohil et al., 2000), 인삼 추출물(Keum et al., 2000), 과일이나 야채(Cao et al., 1996; Wang et al., 1996; Brown and Rice-Evans, 1998) 등의 다양한 천연 항산화 물질에 대한 연구와 보고가 이어지고 있다. 또한 포도 껍질에 다량 함유된 레즈베라트롤(resveratrol)은 활성 산소종에 의해 유도된 rat pheochromocytoma(PC12) 세포의 사멸을 감소시킴으로써 항산화 작용을 한다고 보고되었다(M.V. Clement et al., 1998).
- [17] 그러나 자연계에는 아직 동정되지 않은 많은 항산화 물질들이 존재하고 있으며, 이러한 신소재를 발굴하는 경우 식품, 의약품, 화장품 등의 유용한 소재로 활용될 수 있을 것이다.
- [18] 이에 본 발명자들은 생체에 부작용이 없으면서 항산화 활성이 우수한

천연물질을 찾고자 모색하던 중, 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)에 주목하여 그것의 항산화 효과를 실험한 결과, 톱니모자반 추출물 및 이의 분획물이 세포 내 산화질소 및 활성산소종 소거능이 우수하고, DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 양이온 소거 활성 및 히드록시 라디칼(OH) 소거 활성 등이 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [19] 또한, 본 발명자들은 톱니모자반 추출물 및 이로부터 분리된 화합물을 이용하여 마우스 유래 661W 광수용체 세포 보호 효과를 실험한 결과, atRAL(산화 스트레스 유발 물질)와 더불어 본 발명의 상기 톱니모자반 추출물과 이로부터 분리된 화합물을 함께 처리한 실험군에서 atRAL을 단독으로 처리한 실험군 대비 세포 생존률을 두드러지게 증대시키고; atRAL로 처리된 661W 광수용체 세포에서 본 발명의 톱니모자반 추출물 및 이로부터 분리된 화합물에 의한 활성산소종(ROS) 생성 억제 효과 및 말론디알데하이드(malondialdehyde: 이하 하기에서는 간략하게 'MDA'로 약칭함) 과산화물 단백질의 생성 억제 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[20]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [21] 본 발명의 목적은 천연 해조류의 추출물을 이용하여 장기간 사용에도 인체에 안정하면서 항산화 활성이 우수한 조성물을 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 다른 목적은 연 해조류의 추출물을 이용하여 장기간 사용에도 인체에 안정하면서 항산화 활성이 우수한 식품과 사료 첨가제 조성물을 제공하는 것이다.
- [23] 본 발명의 다른 목적은 천연 해조류의 추출물을 이용하여 장기간 사용에도 인체에 안정하면서 항산화 활성이 우수한 화장료 조성물을 제공하는 것이다.
- [24] 본 발명의 또 다른 목적은 천연 해조류의 추출물을 이용하여 장기간 사용에도 인체에 안정하면서 안 질환 예방 또는 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [25] 본 발명의 또 다른 목적은 천연 해조류의 추출물을 이용하여 장기간 사용에도 인체에 안정하면서 안 질환 예방 또는 개선에 유용한 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [26] 본 발명의 또 다른 목적은 천연 해조류의 추출물을 이용하여 장기간 사용에도 인체에 안정하면서 안 질환 예방 또는 개선에 유용한 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[27]

과제 해결 수단

- [28] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,
- [29] 본 발명은 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는

항산화 조성물을 제공한다.

- [30] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 물 및 헥산으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출될 수 있다.
- [31] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 에탄올일 수 있다.
- [32] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 분획물은 톱니모자반 추출물의 헥산 분획물일 수 있다.
- [33] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물은 조성물에 0.1 내지 1000 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [34] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물, 화장품 조성물, 식품 조성물 또는 사료 조성물일 수 있다.
- [35] 또한, 본 발명은 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항산화 또는 항노화 화장품 조성물을 제공한다.
- [36] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 에탄올 용매 추출물일 수 있다.
- [37] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 분획물은 톱니모자반 추출물의 헥산 분획물일 수 있다.
- [38] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화장품 조성물은 유연 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 수중유 형 에멀전, 유중수 형 에멀전, 페이스크림, 무수 생성물, 고체 무수 생성물, 소구체를 사용한 수성 상에서의 오일 분산물, 이온성 지질 소포체, 비이온성 지질 소포체, 연고, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 보디오일, 수중유 형 메이크업베이스, 유중수 형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도우, 마스크라, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종의 제형일 수 있다.
- [39] 또한, 본 발명은 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [40] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 에탄올 용매 추출물일 수 있다.
- [41] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화합물은 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinoic acid), 사가퀴노익산(sagaquinoic acid) 또는 사가크로메놀(sagachromenol)일 수 있다.
- [42] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 안 질환은 연령-관련 황반 변성, 녹내장, 당뇨병 망막병증, 망막색소변성증, 맥락막 신생혈관막, 포도막염, 근시 변성, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 피부홍조, 안구 혈관신생, 중심 장액 망막병증, 안구 건조증, 중심 망막 동맥 폐쇄 및 낭포 황반 부종으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [43] 또한, 본 발명은 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

- [44] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 톱니모자반 주정추출물이며, 상기 화합물은 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinic acid), 사가퀴노익산(sagaquinic acid) 또는 사가크로메놀(sagachromenol)일 수 있다.
- [45] 또한, 본 발명은 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [46] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 톱니모자반 주정추출물이며, 상기 화합물은 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinic acid), 사가퀴노익산(sagaquinic acid) 또는 사가크로메놀(sagachromenol)일 수 있다.
- [47] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초콜렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [48] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물은 항산화 활성을 통해 광수용체 세포(photoreceptor cell)를 보호하는 효과를 가질 수 있다.

[49]

발명의 효과

- [50] 본 발명에 따른 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 추출물 또는 이의 분획물은 세포 내 산화질소 및 활성산소종 소거능과 더불어, DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 양이온 소거 활성 및 히드록시 라디칼(-OH) 소거 활성이 우수하므로, 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 항산화 활성을 갖는 조성물로서 의약품, 화장품, 식품 및 동물사료 등의 기능성 첨가제 소재로 유용하게 사용될 수 있다.
- [51] 또한, 본 발명에 따른 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 추출물 또는 이로부터 유래된 화합물은 눈의 망막에 존재하는 광수용체 세포(photoreceptor cell) 보호 효과가 우수하므로, 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 안 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로서 의약품 및 건강기능식품 등의 소재로 유용하게 사용될 수 있다.
- [52] 특히 톱니모자반은 천연물질로서 식용 가능하므로 이로부터 유래한 추출물, 이로부터 유래한 분획물 또는 화합물을 포함하는 본 발명의 조성물은 장기간 사용에도 안전한 이점을 가진다.

[53]

도면의 간단한 설명

- [54] 도 1은 톱니모자반 n-헥산 분획물에서 얻은 4개의 획분 크로마토그램이다.
- [55] 도 2는 톱니모자반 n-헥산 분획물에서 얻은 4개의 획분 중 1번 분획물의 2차 획분 크로마토그램이다.
- [56] 도 3은 톱니모자반 n-헥산 분획물에서 얻은 4개의 획분 중 1번 분획물을 2차분획한 획분을 정제하여 NMR로 분석하여 규명한 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinic acid)의 크로마토그램이다.

- [57] 도 4는 톱니모자반 n-헥산 분획물에서 얻은 4개의 획분 중 2번 분획물의 2차 획분 크로마토그램으로 3개의 피크를 확인한 결과이다.
- [58] 도 5는 톱니모자반 n-헥산 분획물에서 얻은 4개의 획분 중 2번 분획물의 2차 획분에서 2번 피크를 정제한 뒤, NMR로 분석하여 규명한 사가크로메놀(sagachromenol)의 크로마토그램이다.
- [59] 도 6은 톱니모자반 n-헥산 분획물에서 얻은 4개의 획분 중 3번 분획물의 2차 획분 크로마토그램으로 4개의 피크를 확인한 결과이다.
- [60] 도 7은 톱니모자반 n-헥산 분획물에서 얻은 4개의 획분 중 2번 분획물의 2차 획분에서 4번 피크를 정제한 뒤, NMR로 분석하여 규명한 사가퀴노익산(sagaquinoic acid)의 크로마토그램이다.
- [61] 도 8은 본 발명의 톱니모자반 주정추출물과 이의 헥산 분획물의 처리 농도에 따른 대식세포(RAW 264.7)에 대한 세포독성을 측정한 결과이다.
- [62] 도 9는 본 발명의 톱니모자반 주정추출물과 이의 헥산 분획물의 처리 농도에 따른 대식세포 내 LPS 유도된 산화질소 생성량을 측정한 결과이다.
- [63] 도 10은 본 발명의 톱니모자반 주정추출물과 이의 헥산 분획물의 처리 농도에 따른 대식세포 내 LPS 유도된 활성산소종(ROS : Reactive Oxygen Species) 생성량을 측정한 결과이다.
- [64] 도 11은 본 발명의 톱니모자반 주정추출물(Sargassum serratifolium ethanol extract, 이하 간략하게 'SSE'로 약칭함)의 광수용체 세포 661W에 처리에 따른 세포독성을 측정한 결과이다.
- [65] 도 12는 SSE로부터 분리한 화합물(사가하이드로퀴노익산[sagahydroquinoic acid, 이하 간략하게 'SHQ'로 약칭함], 사가퀴노익산[sagaquinoic acid, 이하 간략하게 'SQA'으로 약칭함] 또는 사가크로메놀[sagachromenol, 이하 간략하게 'SCM'로 약칭함])의 광수용체 세포 661W에 처리에 따른 세포독성을 측정한 결과이다.
- [66] 도 13은 마우스 유래 661W 광수용체 세포에 산화적 스트레스 유발 물질인 atRAL 화합물과 본 발명의 톱니모자반 주정추출물(SSE) 및 이로부터 분리된 화합물(SHQ, SCM, SQA) 각각의 병용 처리에 따른 661W 세포 생존율을 측정한 결과이다. * $P < 0.05$ 는 비처리구에 대한 유의성이 있음. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 및 ### $P < 0.001$ 는 atRAL 처리구에 대한 유의성이 있음.
- [67] 도 14는 마우스 유래 661W 광수용체 세포에 산화적 스트레스 유발 물질인 atRAL 화합물과 본 발명의 톱니모자반 주정추출물(SSE) 및 이로부터 분리된 화합물(SHQ, SCM, SQA) 각각의 병용 처리에 따른 활성산소종 생성 억제 정도를 측정한 결과이다.
- [68] 도 15는 마우스 유래 661W 광수용체 세포에 산화적 스트레스 유발 물질인 atRAL 화합물과 본 발명의 톱니모자반 주정추출물(SSE) 및 이로부터 분리된 화합물(SHQ, SCM, SQA) 각각의 병용 처리에 따른 세포 내 말론디알데하이드(MDA) 단백질 양을 단백질 면역분석법을 통해 분석한

결과이다.

[69]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[70] <실험예 1>

[71] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이의 n-헥산 분획물의 세포독성 평가

[72] RAW 264.7세포 (5×10^4 cells/well)를 DMEM 배지에 상기 실시예 1을 통해 제조한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산 분획물을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 96 웰 플레이트에 배지 95 μ L와 MTS 용액 5 μ L를 넣고 3시간 정도 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 3회 반복하여 실험의 평균값으로 나타내었다.

[73] 그 결과 도 8에서 나타낸 바와 같이, 대식세포주(RAW 264.7 세포)에 대한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 이의 헥산 분획물의 세포 독성은 8 μ g/mL의 농도까지 나타나지 않았다.

[74]

[75] <실험예 2>

[76] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이의 n-헥산 분획물의 항산화 활성

[77] 본 실험에서는 상기 실시예 1을 통해 제조한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물의 항산화 활성을 평가하기 위하여, 이들 시료 처리에 따른 산화질소 측정, 세포내 활성산소종(ROS) 측정, DPPH법에 의한 항산화 활성 측정, ABTs 항산화 측정, 히드록시라디칼 측정을 실시하였다.

[78]

[79] <2-1> 산화질소(Nitric oxide) 측정

[80] RAW 264.7세포 (7×10^4 cells/well)를 DMEM배지를 이용하여 96 웰 플레이트에 접종하고, 시료(상기 실시예 1을 통해 제조한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산 분획물)과 LPS (1 μ g/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재 하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ L와 Griess시약 [1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl ethylenediamine in 5 % phosphoric acid] 100 μ L를 혼합하여 96 웰 플레이트에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA 리더를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 아질산나트륨(sodium nitrite: NaNO₂)을 연속희석(serial dilution)하여 얻었다.

[81] 그 결과 도 9에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물을 대식세포에 각각 처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 리포폴리사카라이드(LPS)로 유도된 산화질소(NO)의 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 주정추출물과 헥산분획물의 EC₅₀은 각각 1.72와 1.51 μ g/mL로 나타났다.

[82]

[83] <2-2> 세포내 활성산소종 측정

[84] RAW 264.7세포에 톱니모자반 추출물의 활성산소 생성 억제효과를 알아보기 위하여 DCFH-DA를 이용하여 활성산소 양을 측정하였다. 시료(상기 실시예 1을 통해 제조한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산 분획물)과 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 2시간 배양한 후 20 μ M의 DCFH-DA를 처리하여 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포배양 상등액을 걷어 spectrofluorometry를 사용하여 여기 파장은 485nm, 방사 파장은 523nm에서 측정하였다.

[85] 그 결과 도 10에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물을 대식세포에 각각 처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 리포폴리사카라이드(LPS)로 유도된 활성산소종의 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 주정추출물과 헥산분획물의 IC₅₀ 값은 각각 0.92 $\pm$ 0.09과 0.88 $\pm$ 0.08 μ g/mL를 나타내었다.

[86]

[87] <2-3> DPPH 법에 의한 항산화 활성 측정

[88] 톱니 모자반의 시험관내(In vitro) 항산화 효과 측정을 위해 DPPH법 (Blois, M. S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical, Nature, 26, 1199-1200, 1958)을 이용하였다. DPPH (1,1-diphenyl picrylhydrazyl)법은 토코페롤 (tocopherol), 아스코베이트 (ascorbate), 플라보노이드 (flavonoid) 화합물, 방향족 아민류, 마일라드 (Maillard) 형 갈변 생성 물질, 펩티드 등의 항산화활성을 나타내는 생리 활성 물질에 의해 환원됨으로써 짙은 자색이 탈색되는 정도에 따라 항산화 효과를 수소 공여능으로 측정하는 방법이다. 측정방법은 200 μ M 농도의 DPPH 100 μ l와 시료 100 μ l를 96 well plate 에서 섞고 약 30분간 상온에서 반응시켜 준 뒤 517nm에서 microplate reader기를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 이때 사용한 positive control로는 BHT를 이용하였으며 농도는 sample 과 같은 농도에서 비교 실험을 진행하였다.

[89] DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

[90]

[91] 라디칼 소거능 (%) = $(A_{DPPH} - A_{sample}) / A_{DPPH} \times 100$

[92]

[93] 그 결과 하기 표 1에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물의 IC₅₀ 값이 각각 11.17 $\pm$ 0.42, 9.05 $\pm$ 0.21 μ g/mL을 나타내었으며, 이러한 값은 양성대조구로 사용한 BHT보다 낮게 나타났다 (표 1).

[94]

[95] <2-4> ABTs assay

[96] ABTs 항산화 측정법은 DPPH assay 와 유사하지만 화학반응을 통하여 자유라디칼을 발생시켜 항산화 활성을 측정한다는 점이 다르다. ABTs 에 과황화칼륨(potassium persulfate)이 반응하여 ABTs 음이온 라디칼(anion

radical)이 생성되며 이때 생성된 라디칼은 페놀성 화합물과 같은 수소공여체(H-donor)와 반응하여 무색의 ABTs로 변환된다. 따라서 항산화 활성은 페놀성 화합물을 함유한 시료와 반응하여 소비된 ABTS의 양을 측정함으로써 항산화 활성의 정도를 알 수 있다.

[97] ABTs 항산화 활성 측정은 ABTs 라디칼 특유의 녹색이 항산화 물질에 의해 탈색되는 것을 이용하여 Van den Berg (1999) 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다.

[98] 7mM ABTS solution에 과황화칼륨(potassium persulfate)을 최종농도가 2.4mM 이 되도록 섞어 ABTS+ 양이온이 생성하도록 어두운 곳에 12~16시간 R/T에서 반응시켜두었다가 생성된 ABTs 양이온은 흡광 값이 0.7 ± 0.02 가 되도록 희석하여 사용하였다. ABTs+ working solution 190 μ L 에 10 μ L 의 시료를 처리하여 96 웰 플레이트에서 6분간 반응시키고 732nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 결과는 다음과 같이 라디칼 소거능을 계산하였으며, 양성대조군으로는 BHT를 사용하였다. 시료(sample)의 항산화능은 ABTS의 50%가 환원되는 IC₅₀ 값으로 알 수 있다.

[99]

[100] Percentage inhibiting activity I (%) = $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$

[101] A_{control} : Control (blank sample)

[102] A_{control} : 시료 측정값

[103]

[104] 그 결과 하기 표 1에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 hexan 분획물의 IC₅₀ 값이 각각 17.44 ± 3.1 , $14.69 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$ 을 나타내었으며, 대조구로 사용된 BHT보다는 다소 높게 나타났다 (표 1).

[105]

[106] <2-5> 히드록시 라디칼 소거능(Hydroxy radical scavenging)

[107] 히드록시 라디칼(-OH)은 산소 라디칼(oxygen radical) 중에서 가장 반응성이 높은 라디칼로 인체 내에서 호기성 대사 시 발생하며, 이 라디칼이 주변세포에 손상을 주어 부수적인 생체분자를 만든다. 히드록시 라디칼을 소거하는 능력을 측정하기 위하여 디옥시리보오스 테스트(deoxyribose test)를 이용하였다. 히드록시 라디칼은 디옥시리보오스(deoxyribose)를 공격하여 작은 파편을 만들고 이중 일부는 산성의 pH 환경 하에서 TBA(thiobarbituric acid)를 첨가하고 가열하면 핑크색을 나타내므로 흡광도 532nm에서 히드록시 라디칼에 의해 손상된 정도를 측정할 수 있다.

[108] 실험법은 Chandini, Ganesan, and Bhaskar (Chandini, S. K., Ganesan, p., and Bhaskar, N. (2008) In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chemistry, 107, 707-713)의 실험법을 변형하여 진행하였다. 이 반응은 20 mM 인산버퍼 (pH 7.4)를 사용하였고, 이 버퍼 1ml에 Ferric chloride (FeCl₃)와 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 가 각각 1mM 이 되도록 녹이고

반응기질인 디옥시리보오스를 2.8mM 이 되도록 섞어 working solution을 준비한다. 측정할 시료 1ml 을 working solution 과 섞어주고, 아스코르브산(1mM)을 0.1 ml 넣어 염화제이철(FeCl_3)과 EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid) 가 산화된 형태인 Fe^{2+} -EDTA혼합물을 형성하면 20mM 고산화수소(H_2O_2)를 0.5ml 첨가하여 Fe^{3+} -EDTA와 HO 라디칼 형태가 되게 하여 37°C에서 1시간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에 2.8% TCA(Trichloroacetic acid) 와 1% TBA 를 각각 1ml 씩 첨가하여 100°C 끓는 물에 30분간 끓여준 뒤 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 BHT(2~25ug/ml)를 사용하였다.

[109]

[110] $\text{히드록시 라디칼 소거능 (\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$ [111] A_{control} : Control (blank sample)[112] A_{control} : 시료 측정값

[113]

[114] 그 결과 하기 표 1에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 핵산 분획물의 IC_{50} 값이 각각 1.12 ± 0.15 , $1.08 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ 을 나타내었으며, 이러한 수치는 양성대조구로 사용한 BHT보다 훨씬 낮은 농도에서 항산화 활성을 나타냈다 (표 1).

[115]

[116] <표 1>

톱니모자반 주정추출물과 이의 핵산분획물의 항산화활성

	DPPH (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	ABTs (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	OH radical (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)
톱니모자반 주정추출물	11.17 ± 0.42	17.44 ± 3.1	1.12 ± 0.15
톱니모자반 주정추출물의 핵산 분획물	9.05 ± 0.21	14.69 ± 3.4	1.08 ± 0.19
BHT(대조구)	11.18 ± 0.15	7.77 ± 0.74	1.675 ± 0.21

[117]

[118] <실험예 3>

[119] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물(사가하이드로 퀴노익산[SHQ], 사가크로메놀[SCM], 사가퀴노익산[SQA])의 661W 광수용체 세포에 대한 세포독성 평가

[120] 본 실험에서는 상기 실시예 1 및 2를 통해 제조된 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물들의 661W 광수용체 세포에 대한 독성을 확인하였다. 661W 광수용체 세포는 Dr. Al-Ubaidi에 의하여 확립된 세포주로 Dr. Al-Ubaidi로부터 제공받아 실험하였다.

- [121] 661W 광수용체 세포를 3×10^3 cells/well의 농도로 96-well에 배양한 후 톱니모자반 주정추출물 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 또는 이로부터 분리된 화합물(사가하이드로퀴노익산[SHQ], 사가크로메놀[SCM], 사가퀴노익산[SQA])은 $1.0 \mu\text{M}$ 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 MTS 시약이 들어있는 배지로 교체하여 1시간 배양한 후 490 nm 에서 흡광도를 측정하여 비교함으로써 세포 생존율을 측정하였다. 세포생존율은 Celltiter[®] Aqueous One solution assay kit (Promega)로 분석하였다.
- [122] 그 결과 도 11 및 도 12에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 ($1 \mu\text{g/ml}$) 및 그로부터 분리된 화합물 ($1 \mu\text{M}$) 모두 661W 광수용체 세포에 독성이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 참고로, 톱니모자반 주정추출물은 $2 \mu\text{g/ml}$ 의 농도까지, 주정추출물로부터 분리된 사가하이드로퀴노익산은 $2.5 \mu\text{M}$, 사가크로메놀은 $2.5 \mu\text{M}$, 사가퀴노익산은 $1.0 \mu\text{M}$ 농도까지 661W 광수용체 세포에 독성이 나타나지 않았다.
- [123]
- [124] <실험예 4>
- [125] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물(사가하이드로퀴노익산[SHQ], 사가크로메놀[SCM], 사가퀴노익산[SQA])의 산화적 스트레스로부터 661W 광수용체 세포 보호 효과
- [126]
- [127] <4-1> 산화적 스트레스를 받은 661W 세포의 생존률에 미치는 영향
- [128] 본 실험에서는 상기 실시예 1 및 2로부터 제조된 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물의 661W 광수용체 세포 보호 효과를 실험하기 위하여, *atRAL*로 처리된 661W 광수용체 세포의 사멸에 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물이 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보았다.
- [129] 즉, *atRAL*는 시각 회로의 중간 대사산물이며 알데하이드(aldehyde) 형태의 화합물에 해당하여 세포내 과도한 산화적 스트레스를 유발할 수 있는바, 661W 광수용체 세포에 *atRAL* 화합물 처리에 따른 산화적 스트레스 유발 시 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물의 병용 처리에 따른 661W 광수용체 세포 보호 효과를 실험하였다.
- [130] 자세하게는, 661W 광수용체 세포를 3×10^3 cells/well의 농도로 96-well에 배양한 후 $1.8 \mu\text{M}$ 농도의 *atRAL* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 24시간 동안 처리하였다. 그 후 MTS 시약이 들어있는 배지로 교체하여 1시간 배양한 후 490 nm 에서 흡광도를 측정하여 비교함으로써 세포 생존률을 측정하였다. 세포생존율을 Celltiter[®] Aqueous One solution assay kit (Promega)로 측정하였다.
- [131] 그 결과 도 13에서 나타낸 바와 같이, *atRAL*만을 처리한 군에서는 661W 광수용체 세포의 생존률이 약 55% 감소하는 것으로 나타난 반면, *atRAL*과 톱니모자반 주정추출물 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 을 처리한 실험군의 경우 *atRAL*만을 처리한

실험군에 비하여 세포 생존률이 약 25% 증가하는 것으로 나타났다.

[132] 또한, atRAL과 함께 사가하이드로퀴노익산[SHQ], 사가크로메놀[SCM], 사가퀴노익산[SQA]) 각각을 0.5 μ M의 농도로 처리한 실험군에서는 661W 광수용체 세포의 생존률이 90% 이상으로 나타나, atRAL을 처리하지 않은 무처리군과 유의적인 차이가 나타나지 않는 것은 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 통해 본 발명의 톱니모자반 유래 화합물들이 661W 광수용체 세포의 보호 효과가 매우 뛰어난 것을 알 수 있었다.

[133] 결론적으로, 본 발명의 톱니모자반 주정추출물과 이로부터 분리된 화합물들은 세포 독성이 나타나지 않는 범위내에서 광수용체 세포를 보호하는 효과를 지닌 것으로 판단되었다.

[134]

[135] <4-2> 산화적 스트레스를 받은 661W 세포 내 활성산소종 억제 효과

[136] 본 실험에서는 상기 실시예 1 및 2로부터 제조된 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물이 산화적 스트레스를 받은 661W 광수용체 세포 내에서 항산화 활성을 나타내는지 알아보기 위하여, atRAL로 처리된 661W 광수용체 세포 내에서 활성산소종 억제 효과를 살펴보았다.

[137] 참고로, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 세포 내에서 산화적 스트레스와 반응하여 형광을 발현하는 DCF로 전환된다. 따라서 세포 내 DCF의 발현은 산화적 스트레스 정도를 나타내는 지표로 사용되고 있다.

[138] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 DCFH-DA (20 μ M)가 혼합된 배지에 atRAL (1.8 μ M)과 톱니모자반 주정추출물 (0.5 μ g/mL) 또는 sargachromenol (0.5 μ M) 또는 sargahydroquinoic acid (0.5 μ M) 또는 sargaquinoic acid (1.0 μ M)을 혼합하여 광수용체 세포에 처리한 후 30분간 배양하였다. 그 후 PBS로 세포를 세척하고 세포를 회수하여 유세포계수기(flow cytometry)를 사용하여 형광이 발현되는 세포를 측정하였다.

[139] 그 결과 도 14에 나타낸 바와 같이, atRAL만 처리된 세포는 대조군에 비하여 형광발현 양이 약 80% 높은 것으로 확인되었다. atRAL과 톱니모자반 주정추출물 0.5 μ g/mL을 처리한 군에서는 atRAL만을 처리한 실험군에 비하여 형광발현량이 약 75% 감소하였으며, atRAL과 sargachromenol (0.5 μ M) 또는 sargahydroquinoic acid (0.5 μ M), 또는 sargaquinoic acid (1.0 μ M)를 처리한 군에서는 형광 발현량이 각각 76%, 77%, 73% 정도 감소하여 atRAL을 처리하지 않은 대조군과 차이가 나타나지 않았다.

[140] 따라서 톱니모자반 주정추출물과 이로부터 분리된 화합물들은 atRAL이 유발하는 산화적 스트레스를 효과적으로 억제시킴으로써 광세포수용체를 보호하는 것으로 판단되었다.

[141]

[142] <4-3> 산화적 스트레스를 받은 661W 세포 내 말론디알데하이드 억제 효과

- [143] 본 실험에서는 상기 실시예 1 및 2로부터 제조된 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물이 산화적 스트레스를 받은 661W 광수용체 세포 내에서 항산화 활성을 나타내는지를 알아보기 위하여, *atRAL*로 처리된 661W 광수용체 세포 내에서 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA) 생산 억제 정도를 살펴보았다. 참고로, 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA)는 세포내 과도한 산화적 스트레스에 따른 지질과산화의 결과물로서, 세포의 MDA 양은 산화적 스트레스 정도를 측정할 수 있는 지표가 된다.
- [144] 자세하게는, 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리한 화합물 각각의 시료를 일정량의 *atRAL* (1.8 μ M)와 톱니모자반 주정추출물 (0.5 μ g/mL) 또는 sargachromenol (0.5 μ M) 또는 sargahydroquinoic acid (0.5 μ M) 또는 sargaquinoic acid (1.0 μ M)을 혼합하여 광수용체 세포에 처리한 후 2시간 배양하였다. 그 후 PBS로 세포를 세척하고 세포 내 단백질을 회수하여 세포내 지질과산화물에 의하여 변성된 단백질의 양을 MDA immunoblot kit (Cell biolabs)을 사용하여 단백질 면역분석법을 통하여 분석하였다.
- [145] 그 결과 도 15에서 나타낸 바와 같이, *atRAL*만 처리된 세포는 대조군에 비하여 MDA에 의해 변성된 단백질의 발현량이 증가하는 반면, *atRAL*과 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 0.5 μ g/mL을 처리한 실험군에서는 *atRAL*만을 처리한 실험군에 비하여 MDA 과산화물 단백질의 발현량이 감소하는 것으로 나타났으며, 또한 *atRAL*과 톱니모자반 주정추출물로부터 분리된 화합물들을 각각 처리한 실험군에서도 마찬가지로 MDA 과산화물 단백질의 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [146] 따라서 톱니모자반 주정추출물과 이로부터 분리된 화합물들은 *atRAL*이 유발하는 산화적 스트레스를 효과적으로 억제시킴으로써 세포막 지질성분의 과산화 억제를 통해 광세포수용체를 보호하는 것으로 판단되었다.
- [147] **발명의 실시를 위한 형태**
- [148] 본 발명은 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.
- [149] 본 발명의 ‘톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)’은 갈조식물문 모자반과의 해조류로서 국내에서 남해안과 제주지역에 분포하며 식물체는 1~4m이며, 뿌리 지름은 4~5cm로 원뿔상이고 고무와도 같으며 나이테가 있다.
- [150] 이러한 톱니모자반은 현재까지 항산화 활성과 관련된 연구에 대해서는 전혀 보고된 바 없다.
- [151] 본 발명자들은 의약품, 식품 및 화장품 조성물의 소재로 모자반목에 속하는 모자반을 선정하고 추출물을 제조하였으며, 다양한 종류의 모자반 중 톱니모자반이 월등히 우수한 항산화 활성을 나타낸다는 사실을 확인하였다.
- [152] 자세하게는, 본 발명자는 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 핵산

분획물에 대하여 항산화 활성을 평가하기 위하여 하기 실험예<2-1>에서 산화질소 생성량을 측정하였으며, 그 결과 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물을 대식세포에 각각 처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 리포폴리사카라이드(LPS)로 유도된 산화질소(NO)의 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 주정추출물과 헥산분획물의 EC₅₀은 각각 0.72와 0.68 µg/mL로 나타났다(도 9 참조).

- [153] 또한, 하기 실험예 <2-2>에서는 세포내 활성산소종을 측정하였으며, 그 결과 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물을 대식세포에 각각 처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 리포폴리사카라이드(LPS)로 유도된 활성산소종의 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 주정추출물과 헥산분획물의 IC₅₀ 값은 각각 1.4±0.11과 1.3±0.12 µg/mL를 나타냈다(도 10 참조).
- [154] 또한, 하기 실험예 <2-3> 내지 <2-5>에서는 DPPH 라디칼 소거 활성, ABTs 양이온 소거 활성 및 히드록시 라디칼(OH) 소거 활성을 각각 측정하였으며, 그 결과 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물이 1~20µg/ml의 농도 범위에서 50% 소거 활성(IC₅₀)을 보여주었다. 이러한 수치는 양성대조군에 해당하는 BHT와 비교하여 더욱 높은 항산화 활성을 나타낸다(표 1 참조).
- [155] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 톱니모자반 추출물 및 이의 분획물이 우수한 항산화 활성을 보이는 것을 실험을 통해 객관적으로 입증하였다.
- [156] 그러므로 톱니모자반 추출물 및 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 항산화 활성을 나타내는 기능성 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [157] 본 발명에 따른 톱니모자반 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 '추출물'은 적절한 용매를 이용하여 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 톱니모자반의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.
- [158] 상기 톱니모자반으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 에탄올(주정)을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 95% 에탄올을 사용하는 것이 좋다.
- [159] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를

선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 톱니모자반 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.

- [160] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 톱니모자반 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.
- [161] 따라서 본 발명에 있어서 톱니모자반 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [162] 본 발명의 일실시예에 따른 톱니모자반 추출물을 제조하는 방법을 조금 더 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.
- [163] 건조한 톱니모자반을 분말화한 뒤, 톱니모자반 건조분말에 95% 에탄올을 추출용매로 사용하여 환류냉각 추출하고, 여과 및 농축하여 추출할 수 있다.
- [164] 이러한 톱니모자반 주정추출물은 n-헥산(n-hexane) 용매를 이용하여 추가적으로 분획과정을 더 거칠 수 있다. 예를 들어, 톱니모자반 주정추출물을 물:에탄올이 9:1의 부피비로 혼합된 혼합용매로 녹인 후, 동량의 n-헥산을 가하여 혼합한 다음 평형화시키고, 이후 위층의 n-헥산 가용부를 여과 농축함으로써 톱니모자반 주정추출물의 헥산 분획물을 제조할 수 있다.
- [165] 이에 본 발명의 조성물은 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물에 해당한다.
- [166] 본 발명에 있어서, ‘항산화 조성물’이란 산소가 불안정한 상태에 있는 활성산소를 억제 또는 제거하는 작용을 통해 산화를 방지하는 물질을 의미한다.
- [167] 본 발명의 상기 항산화 조성물은 항산화 활성이 요구되는 다양한 목적 및 용도로 사용될 수 있으며, 구체적으로는 의약품, 화장품, 식품 및 동물 사료 등 다양한 산업분야에서 적용되는 물품에 항산화 활성을 부여할 수 있는 기능성 소재로 사용할 수 있으며, 또한 의약품 보존제, 화장품 보존제, 식품 보존제, 의약품 첨가제, 화장품 첨가제, 식품첨가제 및 사료첨가제 등의 소재로도 사용될 수 있다.
- [168]
- [169] 아래에서는 본 발명의 항산화 조성물이 적용될 수 있는 의약품, 화장품, 식품, 동물사료 형태로 자세히 살펴보았다.
- [170]
- [171] 본 발명의 항산화 조성물은 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을

유효성분으로 포함하는 산화관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다.

[172] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤회제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[173] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[174] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤회제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤회제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[175] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001 ~ 40 중량%로 포함될 수 있다.

[176] 본 발명의 다른 일실시예에 있어서, 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물은 조성물에 대해 0.1 내지 1000O μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[177] 본 발명의 약제학적 조성물이 치료효과를 나타낼 수 있는 산화관련 질환으로는, 비염, 천식, 급성통증, 만성통증, 치주염, 치은염, 염증성 장질환, 통풍, 심근경색, 동맥경화, 울혈성 심부전, 고혈압, 협심증, 위궤양, 알츠하이머병, 뇌경색, 다운증후군, 다발성 경화증, 비만, 당뇨, 치매, 우울증,

정신분열증, 결핵, 수면장애, 폐혈증, 화상, 체장염 또는 안과질환 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.

[178]

[179] 본 발명의 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[180] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[181] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[182] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[183] 이러한 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물은 천연물질로서 화학약품과 같은 부작용은 거의 없으므로 항산화 기능성 부여를 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[184]

[185] 본 발명은 또한 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 산화관련 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품일 수 있다.

[186] 본 발명의 건강기능식품은 산화관련 질환 예방 또는 개선용을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[187] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[188] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품

첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[189] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[190] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[191] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[192] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[193] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[194] 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 하기 실시예에서도 확인한 바와 같이 우수한 항산화 효과를 실험적으로 입증하였는바, 산화관련 질환의 예방 또는 개선에 효과적이다.

[195] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[196]

[197] 또한 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물 또는 식품 조성물 외에 화장료 조성물일 수 있다.

[198] 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물은 산화질소 소거활성 뿐만 아니라 활성산소종 중 가장 높은 반응성을 가진 히드록시 라디칼에 대한

소거능이 우수하여 항산화활성이 탁월함으로, 이러한 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 인간 세포의 손상을 야기하여 노화를 촉진하고 산화 관련 질환을 매개하는 활성산소종(ROS)으로부터 피부보호 및 피부치료에도 효과적이므로 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

- [199] 본 발명의 조성물이 화장품 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 조성물은 상술한 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물 뿐만 아니라, 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [200] 또한, 본 발명의 조성물은 상술한 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물 이외에, 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물과 반응하여 피부보호 효과를 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어오던 항산화제를 혼합하여 사용할 수도 있다.
- [201] 본 발명의 화장품 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.
- [202] 본 발명의 화장품 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 립스틱, 메이컵 베이스, 파운데이션, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.
- [203] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001-40중량%이며, 바람직하게는 0.1-20%이며, 보다 바람직하게는 1.0-20중량%이다. 상기 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물의 함량이 0.00001중량% 미만이면 상기 추출물 및 이의 분획물에 의한 항산화 효과가 크게 감소되고, 40중량%를 초과하는 경우에는 피부 자극을 초래할 수 있으며, 제형상의 문제점이 발생할 수 있다.
- [204] 한편, 본 발명에 따른 상기 화장품 조성물은 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 나노리포좀 내부에 함유시켜 안정화하여 제형화할 수도 있다. 상기 추출물(또는 이의 분획물)을 나노리포좀 내부에 함유시키면, 추출물(또는 이의 분획물)의 성분이 안정화되어 제형화시 침전형성, 변색, 변취 등의 문제점을 해결할 수 있으며, 성분의 용해도 및 경피흡수율을 높일 수 있어 상기 추출물(또는 이의 분획물)로부터 기대되는 효능을 최대로 발현시킬 수 있다.
- [205] 본 발명에서 나노리포좀은 통상적인 리포좀의 형태를 갖는 것으로서 평균 입자 지름이 10~500nm인 리포좀을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 나노리포좀의 평균 입자 지름은 50~300nm이다. 나노리포좀의 평균 입자 지름이 300nm를 초과하는 경우에는 본 발명에서 달성하고자 하는 기술적 효과 중

피부침투의 개선 및 제형 안정성의 개선이 매우 미약하다.

- [206] 본 발명에 따라 상기 추출물(또는 이의 분획물)을 안정화하는데 사용되는 나노리포솜은 폴리올, 유성성분, 계면활성제, 인지질, 지방산 및 물을 포함하는 혼합물에 의해 제조될 수 있다.
- [207] 본 발명의 나노리포솜에 이용되는 폴리올은 특히 제한되지 않으며, 바람직하게는 프로필렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 메틸프로판디올, 이소프로필렌글리콜, 펜틸렌글리콜, 에리스리톨, 자일리톨, 솔비톨 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다. 그 사용량은 나노리포솜 총 중량에 대하여 10~80중량%, 바람직하게는 30~70중량%이다.
- [208] 본 발명의 나노리포솜의 제조에 이용되는 유성(oil) 성분은 당업계에 공지된 다양한 오일이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 헥사데칸 및 파라핀 오일과 같은 하이드로카본계 오일, 에스테르계의 합성오일, 디메치콘 및 사이크로메치콘계와 같은 실리콘 오일, 해바라기유, 옥수수유, 대두유, 아보카도유, 참깨유 및 어유와 같은 동식물성 오일, 에톡시레이티드 알킬에테르계오일, 프로폭시레이티드 알킬에테르계오일, 피토스핑고신, 스펡고신 및 스펡가닌과 같은 스펡고노이드 지질, 세레브로사이드 콜레스테롤, 시토스테롤 콜레스테릴설페이트, 시토스테릴설페이트, C₁₀₋₄₀ 지방알콜 및 이의 혼합물이다. 그 사용량은 나노리포솜 총 중량에 대하여 1.0~30.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 3.0~20.0중량%이다.
- [209] 본 발명의 나노리포솜의 제조에 이용되는 계면활성제는 당업계에 공지된 어떠한 것도 사용할 수 있다. 예를 들어, 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용될 수 있다. 바람직하게는 음이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제이다. 음이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알킬아실글루타메이트, 알킬포스페이트, 알킬락틸레이트, 디알킬포스페이트 및 트리알킬포스페이트를 포함한다. 비이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알콕시레이티드 알킬에테르, 알콕시레이티드 알킬에스테르, 알킬폴리글리코사이드, 폴리글리세릴에스테르 및 슈가에스테르를 포함한다. 특히 바람직한 계면활성제는 비이온성 계면활성제에 속하는 폴리솔베이트류이다. 그 사용량은 나노리포솜 총 중량에 대하여 0.1~10중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.5~5.0중량%이다.
- [210] 본 발명의 나노리포솜의 제조에 이용되는 또 다른 성분인 인지질은 양쪽친화성 지질이 이용되며, 천연 인지질(예를 들어, 난황 레시틴 또는 대두 레시틴, 스펡고마이엘린) 및 합성 인지질(예를 들어, 디팔미토일포스파티딜콜린 또는 수첨 레시틴)을 포함하며, 바람직하게는 레시틴이다. 특히, 대두 또는 난황에서 추출한 천연 유래의 불포화 레시틴 또는 포화 레시틴이 바람직하다. 통상적으로 천연 유래의 레시틴은 포스파티딜콜린의 양이 23~95%, 그리고 포스파티딜에탄올아민의 양이 20% 이하이다. 본 발명의 나노리포솜의 제조에 있어서, 인지질의 사용량은 나노리포솜 총 중량에 대하여 0.5~20.0중량%이며,

바람직하게는 2.0~8.0중량%이다.

- [211] 본 발명의 나노리포좀 제조에 이용되는 지방산은 고급 지방산으로서, 바람직하게는 C_{12-22} 알킬 체인의 포화 또는 불포화 지방산으로서, 예컨대, 라우린산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아린산, 올레산 및 리놀레산을 포함한다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.05~3.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.1~1.0중량%이다.
- [212] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 물은 일반적으로 탈이온화된 증류수이며, 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 5.0~40중량%일 수 있다.
- [213] 나노리포좀의 제조는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으나, 가장 바람직하게는 상기 성분들을 포함하는 혼합물을 고압 호모게나이저에 적용하여 제조된다. 고압 호모게나이저에 의한 나노리포좀의 제조는 소망하는 입자 크기에 따라 다양한 조건(예: 압력, 횟수 등)으로 실시할 수 있으며, 바람직하게는 600~1200bar의 압력 하에서 1~5회 고압 호모게나이저를 통과하도록 하여 나노리포좀을 제조할 수 있다.
- [214] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상기 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 나노리포좀 총 중량 기준으로 0.1~20.0중량%, 제형 안정화를 위하여 보다 바람직하게 1.0~10.0중량%로 함유할 수 있다.
- [215] 본 발명의 일 구체예에서 상기 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물은 화장료 조성물에 0.1 μ g/ml 내지 10000 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [216]
- [217] 또한, 본 발명의 조성물은 항산화 기능성을 부여할 수 있는 사료용 조성물 또는 사료첨가제일 수 있다.
- [218] 본 발명에 따른 사료 조성물은 상기 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 조성물 총 중량 기준으로 0.1~50중량%, 보다 바람직하게는 1~20중량%로 포함할 수 있으나, 특별히 이러한 범위를 한정하는 것은 아니다. 한편, 사료첨가제로 사용되는 경우 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 사료 조성물에 배합하여 사용할 수 있다.
- [219]
- [220] 또한, 본 발명은 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 항산화 또는 항노화 방법을 제공한다.
- [221] 본 발명의 항산화 또는 항노화 방법은 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 치료적 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함한다. 특정 개체에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 개체의 연령, 체중, 일반건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 조성물의 유효량은

전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.

- [222] 상기 개체는 임의의 포유동물에 적용가능하며, 상기 포유동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.
- [223]
- [224] 본 발명은 또한, 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.
- [225] 톱니모자반은 현재까지 안 질환의 예방/개선/치료 효과에 대해서는 전혀 보고된 바 없다.
- [226] 본 발명자들은 다양한 종류의 모자반 중 톱니모자반이 월등히 우수한 항산화 활성을 통해 산화적 스트레스와 관련된 안 질환의 예방/개선/치료에 효과적이라는 사실을 실험을 통해 확인하였다.
- [227] 자세하게는, 본 발명자는 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물(SHQ, SCM, SQA)에 대하여 안 질환 예방, 개선 또는 치료 효과를 평가하기 위하여, 하기 실험예<4-1>에서 산화적 스트레스를 받은 661W 세포(마우스 유래 광수용체 세포)의 생존률에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 산화적 스트레스 유발 물질인 *at*RAL 단독 처리군에서는 661W 광수용체 세포의 생존률이 약 55% 감소하는 것으로 나타난 반면, *at*RAL과 톱니모자반 주정추출물을 함께 처리한 실험군의 경우 *at*RAL단독 처리군 대비 세포 생존률이 약 25% 증가하는 것으로 나타났으며, 또한 *at*RAL과 함께 SHQ, SCM, SQA 각각을 처리한 실험군에서는 661W 광수용체 세포의 생존률이 90% 이상으로 나타나, *at*RAL을 처리하지 않은 무처리군과 유의적인 차이가 나타나지 않는 것은 확인할 수 있었다. 따라서, 이러한 결과를 통해 본 발명의 톱니모자반 주정추출물과 이로부터 분리된 화합물(SHQ, SCM, SQA)은 세포독성이 나타나지 않는 범위내에서 661W 광수용체 세포의 보호 효과가 매우 뛰어난 것을 알 수 있었다(도 13 참조).
- [228] 또한, 하기 실험예 <4-2>에서는 산화적 스트레스 유발 물질인 *at*RAL로 처리된 661W 광수용체 세포 내에서 활성산소종 억제 효과를 살펴보았으며, 그 결과 *at*RAL과 톱니모자반 주정추출물을 함께 처리한 실험군에서는 *at*RAL만을 단독 처리한 실험군에 비하여 형광발현량이 약 75% 감소하는 것으로 나타났으며, *at*RAL과 함께 SHQ, SCM, SQA 각각을 처리한 실험군에서는 형광 발현량이 각각 76%, 77%, 73% 정도 감소하여 *at*RAL을 처리하지 않은 무처리군과 차이가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 톱니모자반 주정추출물과 이로부터 분리된 화합물들은 *at*RAL이 유발하는 산화적 스트레스를 효과적으로 억제시킴으로써 광수용체 세포를 보호할 수 있는 것을 알 수 있었다(도 14 참조).
- [229] 또한, 하기 실험예 <4-3>에서는 산화적 스트레스를 받은 661W 세포 내 말론디알데하이드(MDA) 억제 효과 측정하였으며, 그 결과 *at*RAL를 단독 처리한 세포에서는 MDA에 의해 변성된 단백질의 발현량이 증가하는 반면, *at*

RAL과 본 발명의 톱니모자반 주정추출물을 함께 처리한 실험군에서는 arRAL 단독 처리군 대비 MDA 과산화물 단백질의 발현량이 감소하는 것으로 나타났으며, 또한 arRAL과 함께 SHQ, SCM, SQA 을 각각 처리한 실험군에서도 MDA 과산화물 단백질의 발현량이 효과적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 톱니모자반 주정추출물과 이로부터 분리된 화합물들은 산화적 스트레스를 효과적으로 억제시킴으로써 세포막 지질성분의 과산화 억제를 통해 광수용체 세포를 보호하는 것으로 판단되었다(도 15 참조).

[230] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 톱니모자반 추출물 및 이로부터 분리된 화합물(SHQ, SCM, SQA)이 산화 스트레스와 관련된 안 질환의 예방/개선/치료에 효과적임을 실험을 통해 객관적으로 입증하였다.

[231] 그러므로 톱니모자반 추출물 및 이로부터 분리된 화합물(SHQ, SCM, SQA)을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 안 질환의 예방/개선/치료를 위한 기능성 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

[232] 본 발명에 따른 톱니모자반 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 '추출물'은 적절한 용매를 이용하여 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 톱니모자반의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.

[233] 상기 톱니모자반으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 에탄올(주정)을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 95% 에탄올을 사용하는 것이 좋다.

[234] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 톱니모자반 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.

[235] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 톱니모자반 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column

chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.

- [236] 따라서 본 발명에 있어서 톱니모자반 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [237] 본 발명의 일실시예에 따른 톱니모자반 추출물을 제조하는 방법을 조금 더 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.
- [238] 건조한 톱니모자반을 분말화한 뒤, 톱니모자반 건조분말에 95% 에탄올을 추출용매로 사용하여 환류냉각 추출하고, 여과 및 농축하여 추출할 수 있다.
- [239] 또한, 본 발명의 톱니모자반 주정추출물로부터 단계적 과정을 거쳐 SHQ, SCM, SQA 화합물을 각각 분리할 수 있다(실시예 2 참조).
- [240] 이에 본 발명의 조성물은 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 해당한다.
- [241] 본 발명의 일구체예에 있어서, 상기 톱니모자반 추출물은 에탄올 용매를 이용하여 추출한 톱니모자반 주정추출물일 수 있으며, 상기 화합물은 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinic acid, SHQ), 사가퀴노익산(sagaquinic acid, SQA) 또는 사가크로메놀(sagachromenol, SCM)일 수 있다.
- [242] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [243] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [244] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액,

덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

- [245] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001 ~ 40 중량%로 포함될 수 있다.
- [246] 본 발명의 다른 일실시예에 있어서, 본 발명의 톱니모자반 추출물은 조성물에 대해 0.1 내지 10000 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 톱니모자반 추출물로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)은 조성물에 0.1 내지 10000 μ M의 농도로 포함될 수 있다.
- [247] 본 발명의 약제학적 조성물이 치료 효과를 나타낼 수 있는 안 질환으로는, 연령-관련 황반 변성, 녹내장, 당뇨병 망막병증, 망막색소변성증, 맥락막 신생혈관막, 포도막염, 근시 변성, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 피부홍조, 안구 혈관신생, 중심 장액 망막병증, 안구 건조증, 중심 망막 동맥 폐쇄 및 낭포 황반 부종 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [248] 특히, 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)은 우수한 항산화 활성을 통해 광수용체 세포(photoreceptor cell)를 보호하는 효과를 갖는바, 안 질환 중에서도 산화적 스트레스와 관련된 안 질환 치료에 더욱 효과적일 수 있다.
- [249] 참고로, 산화적 스트레스가 안 조직과 안 질환에서 중요한 역할을 한다. 눈의 망막은 인체에서 대사속도가 가장 빠른 조직이어서 엄청난 양의 산화적 스트레스를 생산한다. 더구나 눈이 에너지가 높은 자외선에 노출될 경우 반응성이 높은 활성산소가 다량 생성되므로 치명적인 눈 손상을 초래하게 된다.
- [250] 눈의 질병 중 가장 연구가 활발한 부분은 연령-관련 황반변성(age-related macular degeneration, AMD)으로, 이 질병은 과다한 산소 사용으로 인한 반응성 강한 산소 유도체의 생성, 리포푸신(lipofuscin)-레티노이드 유도체의 축적(bisretinylethanolamine ; A2E), 빛에 의한 산화 등 여러 원인이 있으나 구체적인 메카니즘과 치료 방법은 아직 알려지지 않았다 (Zarbin, 2004, Arch Ophthalmol 122, 598-614); Kasahara et al., 2005, Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 3426-3434).
- [251] 또한, 최근 한국 성모병원 안과에서 진행된 연구에 따르면 몸 안에서의 과산화수소(H_2O_2)가 망막 안료 상피의 파괴를 유도하면서 이로 인한 황반변성을 유발하는 것으로 알려졌다.
- [252] 따라서, 안 조직 및 세포 내부의 산화적 스트레스를 억제 또는 완화시킬 수 있는

소재의 경우, 산화적 스트레스에 기인하는 다양한 안 질환(특히, 황반변성)을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

- [253] 이에 본 발명의 조성물은 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)을 유효성분으로 포함하며, 상기 유효성분은 항산화 활성을 통한 광수용체 세포 보호 효과가 우수한바, 산화적 스트레스에 기인하는 안 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [254]
- [255] 또한, 본 발명은 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 안 질환의 치료방법을 제공한다.
- [256] 본 발명의 안 질환의 치료는 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 치료적 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함한다. 특정 개체에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 개체의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.
- [257] 상기 개체는 임의의 포유동물에 적용가능하며, 상기 포유동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.
- [258]
- [259] 본 발명은 또한 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [260] 본 발명의 일구체예에 있어서, 상기 톱니모자반 추출물은 에탄올 용매를 이용하여 추출한 톱니모자반 주정추출물일 수 있으며, 상기 화합물은 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinoic acid, SHQ), 사가퀴노익산(sagaquinoic acid, SQA) 또는 사가크로메놀(sagachromenol, SCM)일 수 있다.
- [261] 이러한 식품 조성물은 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [262] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [263] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물은

첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[264] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA) 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[265] 본 발명의 식품 조성물이 개선효과를 나타낼 수 있는 안 질환은 산화적 스트레스와 관련된 안 질환일 수 있으며, 예를 들어, 연령-관련 황반 변성, 녹내장, 당뇨병 망막병증, 망막색소변성증, 맥락막 신생혈관막, 포도막염, 근시 변성, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 피부홍조, 안구 혈관신생, 중심 장액 망막병증, 안구 건조증, 중심 망막 동맥 폐쇄 및 낭포 황반 부종 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.

[266] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)은 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.00001 ~ 40 중량%로 포함될 수 있다.

[267] 본 발명의 다른 일실시예에 있어서, 본 발명의 톱니모자반 추출물은 식품 조성물에 대해 0.1 내지 10000 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 톱니모자반 추출물로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)은 식품 조성물에 0.1 내지 10000 μ M의 농도로 포함될 수 있다.

[268] 이러한 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)은 천연물질로부터 유래된 것으로 화학약품과 같은 부작용은 거의 없으므로 산화적 스트레스와 관련된 안 질환 예방 또는 개선의 기능성 부여를 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[269]

[270] 본 발명은 또한 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품일 수 있다.

[271] 본 발명의 일구체예에 있어서, 상기 톱니모자반 추출물은 에탄올 용매를 이용하여 추출한 톱니모자반 주정추출물일 수 있으며, 상기 화합물은 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinoic acid, SHQ), 사가퀴노익산(sagaquinoic acid, SQA) 또는 사가크로메놀(sagachromenol, SCM)일 수 있다.

[272] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 안 질환은 산화적 스트레스와 관련된 안 질환일 수 있으며, 예를 들어, 연령-관련 황반 변성, 녹내장, 당뇨병 망막병증, 망막색소변성증, 맥락막 신생혈관막, 포도막염, 근시 변성, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 피부홍조, 안구 혈관신생, 중심 장액 망막병증, 안구 건조증, 중심

- 망막 동맥 폐쇄 및 낭포 황반 부종 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [273] 본 발명의 건강기능식품은 안 질환 예방 또는 개선을 위한 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [274] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [275] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [276] 상기 “식품 첨가물 공전”에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [277] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [278] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 상기 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [279] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [280] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM, SQA)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [281] 본 발명의 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물(SHQ, SCM,

SQA)을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 하기 실시예에서도 확인한 바와 같이, 항산화 활성을 통해 광수용체 세포(photoreceptor cell)를 보호 하는 효과를 실험적으로 입증하였는바, 산화적 스트레스와 관련된 안 질환의 예방 또는 개선에 효과적이다.

[282] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 동일 수 있다.

[283]

[284] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[285]

[286] <실시예 1>

[287] 툽니모자반 추출물의 제조

[288]

[289] <1-1> 툽니모자반 주정 추출물의 제조

[290] 본 발명에 사용한 툽니모자반은 부산시 기장군과 경남 통영시에서 자생하는 천연산을 스쿠버를 동원하여 채취하였고, 기장산의 종확인은 부경대학교 생태공학과 최창근 교수, 통영산의 종확인은 경상대학교 해양생명과학과의 김남길 교수가 수행하였다. 툽니모자반을 음지 또는 양지에서 자연건조 후, 마쇄하여 얻은 분말 2kg을 주정(95% 에탄올) 8L에 넣고 70°C에서 3시간 3회 반복하여 환류냉각 추출한 후, 한외여과기(니또덴꼬, 일본)로 이물질을 제거하였다. 여과 추출물은 진공회전농축기로 40°C에서 주정을 제거한 후, 추출된 잔사로서 조추출물 200±25g을 수득하였다. 이렇게 수득한 툽니모자반 주정추출물은 4°C온도에서 냉장보관하면서 하기 실험의 시료로 사용하였다.

[291] 참고로, 한외여과(Ultrafiltration)는 액체 중에 용해되거나 분산된 물질을 입자크기나 분자량 크기별로 분리할 수 있는 공정으로 압력차를 추진력으로 하며 미세여과와 역삼투의 중간 영역의 입자를 분리한다. 한외여과막은 대략 10 - 500Å범위의 세공 크기를 가지며 입자의 크기가 1nm - 0.1μm 정도인 당류, 단백질, 생체물질, 고분자 물질의 분리에 주로 사용된다. 미세여과와 기본원리는 동일하나 미세여과의 막구조는 대칭형(symmetric)의 세공구조이나 한외여과막은 비대칭형(asymmetric)구조의 치밀한 층구조로 되어있어 미세여과보다 더 작은 입자를 분리해 낼수 있다. 본 실험에서 한외여과는 실험실 규모의 새한 한외여과 시스템(UF system, 세한텍크, 대한민국)을 사용하여 수행하였으며, 새한 한외여과 시스템은 20ℓ용량의 공급액조, 공급액 펌프, 미세여과 카트리지, 한외여과카트리지 및 공급액과 농축액에 대한 압력 게이지로 구성되어 있고, 외경 50mm, 길이 600mm, 면적 1m²의 중공사막(MWCO= 50kDa)을 사용하였다. 본 발명에서 한외여과는 연속 콘센트레이션

모드에 따라 실시하였다. 시료 용액은 펌프를 사용하여 막 모듈로 공급되었고, 23°C에서 0.1 L m/sec의 유속 및 0.2 ~ 2.0 bar의 TMP(transmembrane pressure drop)에서 수행되었다. 본 실험에서 MWCO = 50kDa의 관형 막을 사용하여 주정추출물 중의 미세한 오염물, 세균과편, 바이러스까지도 제거하는 효과를 얻을 수 있다.

[292]

[293] <1-2> 톱니모자반의 주정추출물로부터 n-헥산 가용분획물의 제조

[294] 상기 실시예<1-1>에서 제조한 톱니모자반 주정 추출물 50g을 물:에탄올 (9:1, v/v)의 혼합용매 1L로 녹인 후, 분액깔때기에 부어, 동량의 n-헥산 1L을 넣어 분액깔때기를 흔든 다음 평형화시켰다. 이후 위층의 n-헥산 가용부를 모아 무수 황산나트륨 (sodium sulfate, anhydrous)으로 처리한 다음 여과하여 농축하였다. 이와 같은 방법으로 5회 더 반복하여 42g의 n-헥산 분획물을 얻었다.

[295] 이렇게 수득한 각각의 분획물은 4°C에서 냉장보관하면서 하기 실험의 시료로 사용하였다.

[296]

[297] <실시예 2>

[298] 톱니모자반 주정추출물로부터 사가하이드로퀴노익산, 사가크로메놀 및 사가퀴노익산의 분리

[299]

[300] <2-1> 사가하이드로퀴노익산의 분리

[301] 상기 실시예 <1-1>을 통해 제조된 톱니모자반 주정추출물 15 g을 물:에탄올 (9:1, v/v)의 혼합용매 1 리터에 녹인 후 분액깔때기에 넣고 동량의 n-헥산을 넣어 평형화시킨 후 위층의 n-헥산 가용부를 모아 무수황산나트륨으로 탈수한 다음 농축하여 n-헥산 분획물을 분리하였다. 분리된 n-헥산 분획물 12.2g을 120 mL 메탄올에 녹여 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과 후 200uL을 주입하여 Phenomenex C18(2) (15μm, 21.2 mm × 250 mm) 칼럼이 장착된 HPLC로 4개의 획분으로 분리하였다(도 1 참조). 크로마토그래피의 이동상으로는 메탄올 (A)과 물 (B)의 혼합용매를 사용하였으며 유속은 7mL로 설정하였다. 크로마토그래피 조건은 처음 A/B(90/10) ~ A/B(94/6) 농도로 33분간, A/B(94/6) ~ A/B(100/0) 농도로 2분간, A/B(100/0)로 10 분간 씻어준 후에 A/B(90:10) 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 크로마토그래피는 Autosampler로 자동으로 시료를 주입하는 방식으로 50-100회 실시하여 대량의 1번 분획물의 1차 획분을 얻었다.

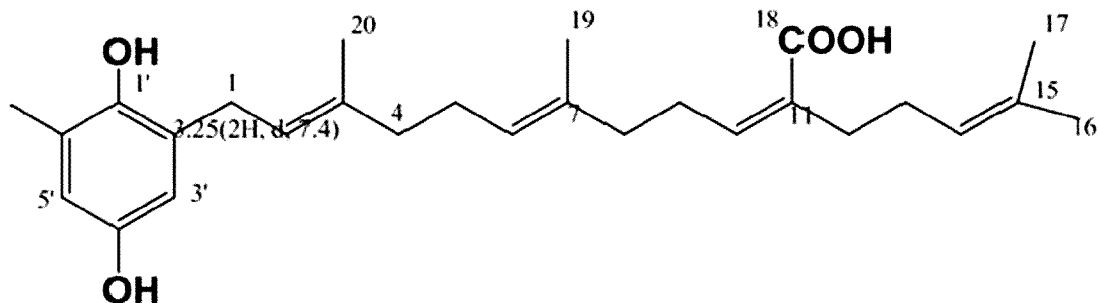
[302] 대량으로 얻은 1차 획분의 순도를 높이기 위하여 동일한 기기와 칼럼을 사용하였다. 크로마토그래피 조건은 처음 A/B(85/15) ~ A/B(87/13) 농도로 26분간, A/B(87/13) ~ A/B(100/0) 농도로 2 분간, A/B(100/0)로 6 분간 씻어준 후에 A/B(87:13) 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 크로마토그래피는 Autosampler로 자동으로 시료를 주입하는 방식으로 실시하여 보다 순도가 높은 1번 분획물의 2차 획분을 얻었다(도 2 참조).

[303] 1번 분획물의 2차 획분중 1번을 동일한 조건으로 재크로마토그래피하여 정제하였으며 (523 mg), 분석용칼럼 (Phenomenex C18(2), 3 μ m, 3 mm $\times$ 150 mm)으로 분석한 결과 단일물질로 판명되었으며, 이를 NMR로 분석한 결과 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinoic acid, 이하 “SHQ”)로 판명되었다(도 3 참조).

[304]

[305] <화학식 1> 사가하이드로퀴노익산 (sagahydroquinoic acid)

[306]



[307]

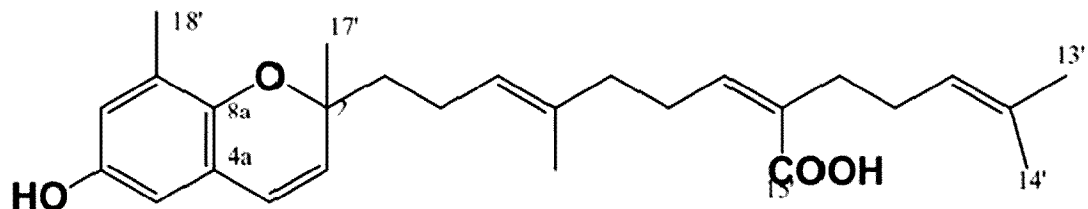
[308] <2-2> 사가크로메놀의 분리

[309] 도 1의 2번 분획물을 실시예 <2-1>의 1번 분획물과 동일한 HPLC 장치와 칼럼을 사용하여 재크로마토그래피하였다. 크로마토그래피 조건은 처음 A/B(91.5/8.5) ~ A/B(92.2/7.8) 농도로 26분간, A/B(92.2/7.8) ~ A/B(100/0) 농도로 2분간, A/B(100/0)로 6 분간 씻어준 후에 A/B(91.5:8.5) 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 크로마토그래피는 Autosampler로 자동으로 시료를 주입하는 방식으로 50-100회 실시하여 대량의 2번 분획물의 2차 획분을 얻었다(도 4 참조). 도 4에 나타난 바와 같이 2번 분획물은 3개의 피크를 나타내었으며, 이중 2번 피크 (Frc2-2)를 다시 정제하여 도 5와 같은 크로마토그램을 얻었다 (126 mg). 분리물을 NMR로 분석한 결과 사가크로메놀(sargachromenol, 이하 SCA)로 판명되었다(도 5 참조).

[310]

[311] <화학식 2> 사가크로메놀 (sagachromenol)

[312]



[313]

[314] <2-3> 사가퀴노익산의 분리

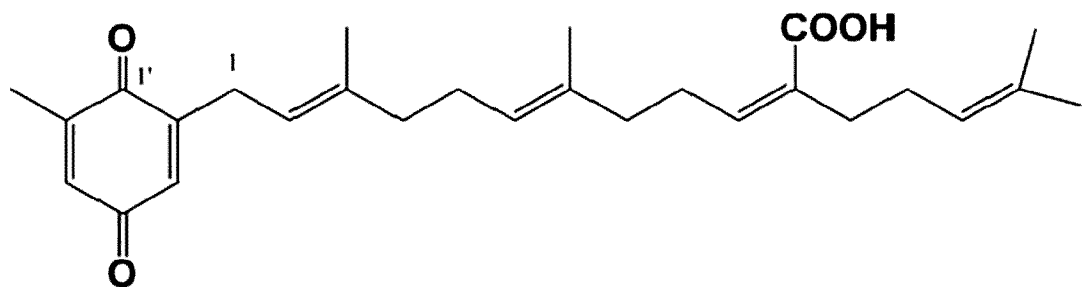
[315] 도 1의 3번 분획물을 실시예 2-1의 1번 분획물과 동일한 HPLC 장치와 칼럼을 사용하여 재크로마토그래피하였다. 크로마토그래피 조건은 처음 A/B(93.4/6.6)

~ A/B(93.8/6.2) 농도로 20분간, A/B(93.8/6.2) ~ A/B(100/0) 농도로 2분간, A/B(100/0)로 6 분간 씻어준 후에 A/B(93.8/6.2) 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 크로마토그래피는 Autosampler로 자동으로 시료를 주입하는 방식으로 50-100회 실시하여 대량의 3번 분획물의 2차 획분을 얻었다(도 6 참조). 도 6에 나타난바와 같이 3번 분획물은 4개의 피크를 나타내었으며, 이중 4번 피크 (Frc3-4)를 다시 정제하여 도 7와 같은 크로마토그램을 얻었다 (171 mg). 분리물을 NMR로 분석한 결과 사가퀴노익산(sargaquinoic acid, 이하 SQA)로 판명되었다(도 7 참조).

[316]

[317] <화학식 3> 사가퀴노익산 (sargaquinoic acid)

[318]



[319]

[320] <실험 예 1>

[321] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이의 n-헥산 분획물의 세포독성 평가

[322] RAW 264.7세포 (5×10^4 cells/well)를 DMEM 배지에 상기 실시예 1을 통해 제조한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산 분획물을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 96 웰 플레이트에 배지 95 μ L와 MTS 용액 5 μ L를 넣고 3시간 정도 반응 시킨 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 3회 반복하여 실험의 평균값으로 나타내었다.

[323] 그 결과 도 8에서 나타낸 바와 같이, 대식세포주(RAW 264.7 세포)에 대한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 이의 헥산 분획물의 세포 독성은 8 μ g/mL의 농도까지 나타나지 않았다.

[324]

[325] <실험 예 2>

[326] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이의 n-헥산 분획물의 항산화 활성

[327] 본 실험에서는 상기 실시예 1을 통해 제조한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물의 항산화 활성을 평가하기 위하여, 이들 시료 처리에 따른 산화질소 측정, 세포내 활성산소종(ROS) 측정, DPPH법에 의한 항산화 활성 측정, ABTs 항산화 측정, 히드록시라디칼 측정을 실시하였다.

[328]

[329] <2-1> 산화질소(Nitric oxide) 측정

[330] RAW 264.7세포 (7×10^4 cells/well)를 DMEM배지를 이용하여 96 웰 플레이트에 접종하고, 시료(상기 실시예 1을 통해 제조한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산 분획물)과 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재 하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 $100 \mu\text{L}$ 와 Griess시약 [1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl ethylenediamine in 5 % phosphoric acid] $100 \mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 웰 플레이트에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA 리더를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 아질산나트륨(sodium nitrite: NaNO_2)을 연속희석(serial dilution)하여 얻었다.

[331] 그 결과 도 9에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물을 대식세포에 각각 처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 리포폴리사카라이드(LPS)로 유도된 산화질소(NO)의 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 주정추출물과 헥산분획물의 EC_{50} 은 각각 1.72 와 $1.51 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

[332]

[333] <2-2> 세포내 활성산소종 측정

[334] RAW 264.7세포에 톱니모자반 추출물의 활성산소 생성 억제효과를 알아보기 위하여 DCFH-DA를 이용하여 활성산소 양을 측정하였다. 시료(상기 실시예 1을 통해 제조한 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산 분획물)과 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 동시 처리하여 2시간 배양한 후 $20 \mu\text{M}$ 의 DCFH-DA를 처리하여 30분 동안 배양하였다. 그 후 세포배양 상등액을 걷어 spectrofluorometry를 사용하여 여기 파장은 485nm , 방사 파장은 523nm 에서 측정하였다.

[335] 그 결과 도 10에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물을 대식세포에 각각 처리한 실험군에서 처리 농도에 의존적으로 리포폴리사카라이드(LPS)로 유도된 활성산소종의 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 주정추출물과 헥산분획물의 IC_{50} 값은 각각 0.92 ± 0.09 과 $0.88 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ 를 나타내었다.

[336]

[337] <2-3> DPPH 법에 의한 항산화 활성 측정

[338] 톱니 모자반의 시험관내(In vitro) 항산화 효과 측정을 위해 DPPH법 (Blois, M. S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical, Nature, 26, 1199-1200, 1958)을 이용하였다. DPPH (1,1-diphenyl picrylhydrazyl)법은 토코페롤 (tocopherol), 아스코베이트 (ascorbate), 플라보노이드 (flavonoid) 화합물, 방향족 아민류, 마일라드 (Maillard) 형 갈변 생성 물질, 펩티드 등의 항산화활성을 나타내는 생리 활성 물질에 의해 환원됨으로써 짙은 자색이 탈색되는 정도에 따라 항산화 효과를 수소 공여능으로 측정하는 방법이다. 측정방법은 $200 \mu\text{M}$ 농도의 DPPH $100 \mu\text{L}$ 와 시료 $100 \mu\text{L}$ 를 96 well plate 에서 섞고 약 30분간 상온에서 반응시켜 준 뒤 517nm 에서 microplate reader기를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

이때 사용한 positive control로는 BHT를 이용하였으며 농도는 sample 과 같은 농도에서 비교 실험을 진행하였다.

[339] DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

[340]

[341] 라디칼 소거능 (%) = $(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{DPPH}} \times 100$

[342]

[343] 그 결과 하기 표 1에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 hexan 분획물의 IC₅₀ 값이 각각 11.17±0.42, 9.05±0.21µg/mL을 나타내었으며, 이러한 값은 양성대조군으로 사용한 BHT보다 낮게 나타났다 (표 1).

[344]

[345] <2-4> ABTs assay

[346] ABTs 항산화 측정법은 DPPH assay 와 유사하지만 화학반응을 통하여 자유라디칼을 발생시켜 항산화 활성을 측정한다는 점이 다르다. ABTs 에 과황화칼륨(potassium persulfate)이 반응하여 ABTs 음이온 라디칼(anion radical)이 생성되며 이때 생성된 라디칼은 페놀성 화합물과 같은 수소공여체(H-donor)와 반응하여 무색의 ABTs로 변환된다. 따라서 항산화 활성은 페놀성 화합물을 함유한 시료와 반응하여 소비된 ABTS의 양을 측정함으로써 항산화 활성의 정도를 알 수 있다.

[347] ABTs 항산화 활성 측정은 ABTs 라디칼 특유의 녹색이 항산화 물질에 의해 탈색되는 것을 이용하여 Van den Berg (1999) 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다.

[348] 7mM ABTS solution에 과황화칼륨(potassium persulfate)을 최종농도가 2.4mM 이 되도록 섞어 ABTS+ 양이온이 생성하도록 어두운 곳에 12~16시간 R/T에서 반응시켜두었다가 생성된 ABTs 양이온은 흡광 값이 0.7±0.02 가 되도록 희석하여 사용하였다. ABTs+ working solution 190µL 에 10µL 의 시료를 처리하여 96 웰 플레이트에서 6분간 반응시키고 732nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 결과는 다음과 같이 라디칼 소거능을 계산하였으며, 양성대조군으로는 BHT를 사용하였다. 시료(sample)의 항산화능은 ABTS의 50%가 환원되는 IC₅₀ 값으로 알 수 있다.

[349]

[350] Percentage inhibiting activity I (%) = $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$

[351] A_{control} : Control (blank sample)

[352] A_{control} : 시료 측정값

[353]

[354] 그 결과 하기 표 1에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 hexan 분획물의 IC₅₀ 값이 각각 17.44±3.1, 14.69±3.4µg/mL을 나타내었으며, 대조군으로 사용된 BHT보다는 다소 높게 나타났다 (표 1).

[355]

[356] <2-5> 히드록시 라디칼 소거능(Hydroxy radical scavenging)

[357] 히드록시 라디칼(-OH)은 산소 라디칼(oxygen radical) 중에서 가장 반응성이 높은 라디칼로 인체 내에서 호기성 대사 시 발생하며, 이 라디칼이 주변세포에 손상을 주어 부수적인 생체분자를 만든다. 히드록시 라디칼을 소거하는 능력을 측정하기 위하여 디옥시리보오스 테스트(deoxyribose test)를 이용하였다. 히드록시 라디칼은 디옥시리보오스(deoxyribose)를 공격하여 작은 파편을 만들고 이중 일부는 산성의 pH 환경 하에서 TBA(thiobarbituric acid)를 첨가하고 가열하면 핑크색을 나타내므로 흡광도 532nm에서 히드록시 라디칼에 의해 손상된 정도를 측정할 수 있다.

[358] 실험법은 Chandini, Ganesan, and Bhaskar (Chandini, S. K., Ganesan, p., and Bhaskar, N. (2008) In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chemistry, 107, 707-713)의 실험법을 변형하여 진행하였다. 이 반응은 20 mM 인산버퍼 (pH 7.4)를 사용하였고, 이 버퍼 1ml에 Ferric chloride (FeCl_3)와 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 가 각각 1mM 이 되도록 녹이고 반응기질인 디옥시리보오스를 2.8mM 이 되도록 섞어 working solution을 준비한다. 측정할 시료 1ml 을 working solution 과 섞어주고, 아스코르브산(1mM)을 0.1 ml 넣어 염화제이철(FeCl_3)과 EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid) 가 산화된 형태인 Fe^{2+} -EDTA혼합물을 형성하면 20mM 고산화수소(H_2O_2)를 0.5ml 첨가하여 Fe^{3+} -EDTA와 HO 라디칼 형태가 되게 하여 37°C에서 1시간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에 2.8% TCA(Trichoroacetic acid) 와 1% TBA 를 각각 1ml 씩 첨가하여 100°C 끓는 물에 30분간 끓여준 뒤 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 BHT(2~25ug/ml)를 사용하였다.

[359]

[360] 히드록시 라디칼 소거능 (%) = $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$

[361] A_{control} : Control (blank sample)

[362] A_{control} : 시료 측정값

[363]

[364] 그 결과 하기 표 1에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 및 이의 헥산 분획물의 IC_{50} 값이 각각 1.12 ± 0.15 , $1.08 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ 을 나타내었으며, 이러한 수치는 양성대조구로 사용한 BHT보다 훨씬 낮은 농도에서 항산화 활성을 나타냈다 (표 1).

[365]

[366] [Table 1]

톱니모자반 주정추출물과 이의 헥산분획물의 항산화활성

	DPPH (IC ₅₀ , ug/ml)	ABTs(IC ₅₀ , ug/ml)	OH radical(IC ₅₀ , ug/ml)
톱니모자반 주정추출물	11.17 ± 0.42	17.44 ± 3.1	1.12 ± 0.15
톱니모자반 주정추출물의 헥산 분획물	9.05 ± 0.21	14.69 ± 3.4	1.08 ± 0.19
BHT(대조구)	11.18 ± 0.15	7.77 ± 0.74	1.675 ± 0.21

[367]

[368] <실험예 3>

[369] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물(사가하이드로
 퀴노익산[SHQ], 사가크로메놀[SCM], 사가퀴노익산[SQA])의 661W 광수용체
 세포에 대한 세포독성 평가

[370] 본 실험에서는 상기 실시예 1 및 2를 통해 제조된 톱니모자반 주정추출물 및
 이로부터 분리된 화합물들의 661W 광수용체 세포에 대한 독성을 확인하였다.
 661W 광수용체 세포는 Dr. Al-Ubaidi에 의하여 확립된 세포주로 Dr.
 Al-Ubaidi로부터 제공받아 실험하였다.

[371] 661W 광수용체 세포를 3×10³ cells/well의 농도로 96-well에 배양한 후
 톱니모자반 주정추출물 1.0 µg/ml 또는 이로부터 분리된
 화합물(사가하이드로퀴노익산[SHQ], 사가크로메놀[SCM],
 사가퀴노익산[SQA])은 1.0µM 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 MTS
 시약이 들어있는 배지로 교체하여 1시간 배양한 후 490 nm에서 흡광도를
 측정하여 비교함으로써 세포 생존율을 측정하였다. 세포생존율은 Celltiter⁹⁶
 Aqueous One solution assay kit (Promega)로 분석하였다.

[372] 그 결과 도 11 및 도 12에서 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물 (1µg/ml)
 및 그로부터 분리된 화합물 (1µM) 모두 661W 광수용체 세포에 독성이 나타나지
 않는 것을 확인할 수 있었다. 참고로, 톱니모자반 주정추출물은 2µg/ml의
 농도까지, 주정추출물로부터 분리된 사가하이드로퀴노익산은 2.5µM,
 사가크로메놀은 2.5µM, 사가퀴노익산은 1.0µM 농도까지 661W 광수용체 세포에
 독성이 나타나지 않았다.

[373]

[374] <실험예 4>

[375] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물(사가하이드로
 퀴노익산[SHQ], 사가크로메놀[SCM], 사가퀴노익산[SQA])의 산화적
 스트레스로부터 661W 광수용체 세포 보호 효과

[376]

- [377] <4-1> 산화적 스트레스를 받은 661W 세포의 생존률에 미치는 영향
- [378] 본 실험에서는 상기 실시예 1 및 2로부터 제조된 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물의 661W 광수용체 세포 보호 효과를 실험하기 위하여, *at*RAL로 처리된 661W 광수용체 세포의 사멸에 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물이 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보았다.
- [379] 즉, *at*RAL는 시각 회로의 중간 대사산물이며 알데하이드(aldehyde) 형태의 화합물에 해당하여 세포내 과도한 산화적 스트레스를 유발할 수 있는바, 661W 광수용체 세포에 *at*RAL 화합물 처리에 따른 산화적 스트레스 유발 시 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물의 병용 처리에 따른 661W 광수용체 세포 보호 효과를 실험하였다.
- [380] 자세하게는, 661W 광수용체 세포를 3×10^3 cells/well의 농도로 96-well에 배양한 후 $1.8 \mu\text{M}$ 농도의 *at*RAL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 24시간 동안 처리하였다. 그 후 MTS 시약이 들어있는 배지로 교체하여 1시간 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 비교함으로써 세포 생존률을 측정하였다. 세포생존율을 Celltiter⁹⁶ Aqueous One solution assay kit (Promega)로 측정하였다.
- [381] 그 결과 도 13에서 나타낸 바와 같이, *at*RAL만을 처리한 군에서는 661W 광수용체 세포의 생존률이 약 55% 감소하는 것으로 나타난 반면, *at*RAL과 톱니모자반 주정추출물 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 을 처리한 실험군의 경우 *at*RAL만을 처리한 실험군에 비하여 세포 생존률이 약 25% 증가하는 것으로 나타났다.
- [382] 또한, *at*RAL과 함께 사가하이드로퀴노익산[SHQ], 사가크로메놀[SCM], 사가퀴노익산[SQA]) 각각을 $0.5 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리한 실험군에서는 661W 광수용체 세포의 생존률이 90% 이상으로 나타나, *at*RAL을 처리하지 않은 무처리군과 유의적인 차이가 나타나지 않는 것은 확인할 수 있었으며, 이러한 결과를 통해 본 발명의 톱니모자반 유래 화합물들이 661W 광수용체 세포의 보호 효과가 매우 뛰어난 것을 알 수 있었다.
- [383] 결론적으로, 본 발명의 톱니모자반 주정추출물과 이로부터 분리된 화합물들은 세포 독성이 나타나지 않는 범위내에서 광수용체 세포를 보호하는 효과를 지닌 것으로 판단되었다.
- [384]
- [385] <4-2> 산화적 스트레스를 받은 661W 세포 내 활성산소종 억제 효과
- [386] 본 실험에서는 상기 실시예 1 및 2로부터 제조된 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물이 산화적 스트레스를 받은 661W 광수용체 세포 내에서 항산화 활성을 나타내는지를 알아보기 위하여, *at*RAL로 처리된 661W 광수용체 세포 내에서 활성산소종 억제 효과를 살펴보았다.
- [387] 참고로, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 세포 내에서 산화적 스트레스와 반응하여 형광을 발현하는 DCF로 전환된다. 따라서 세포 내 DCF의 발현은 산화적 스트레스 정도를 나타내는 지표로 사용되고 있다.

- [388] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물의 항산화 효과를 확인하기 위하여 DCFH-DA (20 μ M)가 혼합된 배지에 atRAL (1.8 μ M)과 톱니모자반 주정추출물 (0.5 μ g/mL) 또는 sargachromenol (0.5 μ M) 또는 sargahydroquinoic acid (0.5 μ M) 또는 sargaquinoic acid (1.0 μ M)을 혼합하여 광수용체 세포에 처리한 후 30분간 배양하였다. 그 후 PBS로 세포를 세척하고 세포를 회수하여 유세포계수기(flow cytometry)를 사용하여 형광이 발현되는 세포를 측정하였다.
- [389] 그 결과 도 14에 나타낸 바와 같이, atRAL만 처리된 세포는 대조군에 비하여 형광발현 양이 약 80% 높은 것으로 확인되었다. atRAL과 톱니모자반 주정추출물 0.5 μ g/mL을 처리한 군에서는 atRAL만을 처리한 실험군에 비하여 형광발현량이 약 75% 감소하였으며, atRAL과 sargachromenol (0.5 μ M) 또는 sargahydroquinoic acid (0.5 μ M), 또는 sargaquinoic acid (1.0 μ M)를 처리한 군에서는 형광 발현량이 각각 76%, 77%, 73% 정도 감소하여 atRAL을 처리하지 않은 대조군과 차이가 나타나지 않았다.
- [390] 따라서 톱니모자반 주정추출물과 이로부터 분리된 화합물들은 atRAL이 유발하는 산화적 스트레스를 효과적으로 억제시킴으로써 광세포수용체를 보호하는 것으로 판단되었다.
- [391]
- [392] <4.3> 산화적 스트레스를 받은 661W 세포 내 말론디알데하이드 억제 효과
- [393] 본 실험에서는 상기 실시예 1 및 2로부터 제조된 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리된 화합물이 산화적 스트레스를 받은 661W 광수용체 세포 내에서 항산화 활성을 나타내는지를 알아보기 위하여, atRAL로 처리된 661W 광수용체 세포 내에서 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA) 생산 억제 정도를 살펴보았다. 참고로, 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA)는 세포내 과도한 산화적 스트레스에 따른 지질과산화의 결과물로서, 세포의 MDA 양은 산화적 스트레스 정도를 측정할 수 있는 지표가 된다.
- [394] 자세하게는, 톱니모자반 주정추출물 및 이로부터 분리한 화합물 각각의 시료를 일정량의 atRAL (1.8 μ M)와 톱니모자반 주정추출물 (0.5 μ g/mL) 또는 sargachromenol (0.5 μ M) 또는 sargahydroquinoic acid (0.5 μ M) 또는 sargaquinoic acid (1.0 μ M)을 혼합하여 광수용체 세포에 처리한 후 2시간 배양하였다. 그 후 PBS로 세포를 세척하고 세포 내 단백질을 회수하여 세포내 지질과산화물에 의하여 변성된 단백질의 양을 MDA immunoblot kit (Cell biolabs)을 사용하여 단백질 면역분석법을 통하여 분석하였다.
- [395] 그 결과 도 15에서 나타낸 바와 같이, atRAL만 처리된 세포는 대조군에 비하여 MDA에 의해 변성된 단백질의 발현량이 증가하는 반면, atRAL과 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 0.5 μ g/mL을 처리한 실험군에서는 atRAL만을 처리한 실험군에 비하여 MDA 과산화물 단백질의 발현량이 감소하는 것으로 나타났으며, 또한 atRAL과 톱니모자반 주정추출물로부터 분리된 화합물들을

각각 처리한 실험군에서도 마찬가지로 MDA 과산화물 단백질의 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[396] 따라서 톱니모자반 주정추출물과 이로부터 분리된 화합물들은 atRAL이 유발하는 산화적 스트레스를 효과적으로 억제시킴으로써 세포막 지질성분의 과산화 억제를 통해 광세포수용체를 보호하는 것으로 판단되었다.

[397]

[398] <제조예 1>

[399] 본 발명의 항산화 활성을 갖는 기능성 화장품 조성물 제조

[400]

[401] <1-1> 유연화장수(skin)

[402] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물을 함유한 유연화장수(skin)를 아래의 성분비로 통상적인 방법으로 제조하였다.

[403]

[404] [Table 2]

본 발명의 유연화장수 제형예

성분	함량(중량%)
톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물	1~3
글리세린	5.0
1,3-부틸렌글리콜	3.0
REG 1500	1.0
알란토인	0.1
DL-판테놀	0.3
EDTA-2Na	0.02
벤조페논-9	0.04
소듐 히아루로네이트	5.0
에탄올	10.0
옥틸도데세스-16	0.2
폴리솔베이트 20	0.2
유니사이드-유 13	0.01
향	미량
증류수	잔량
합계	100

[405]

[406] <1-2> 영양화장수(lotion)

[407] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물을 함유한 영양화장수(lotion)를 아래의 성분비로 통상적인 방법으로 제조하였다.

[408]

[409] [Table 3]

본 발명의 영양화장수 제형예

성분	함량(중량%)
톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물	1~3
글리세릴 스테아레이트 SE	1.5
세테아릴알콜	1.5
라놀린	1.5
폴리솔베이트 60	1.3
솔비타스테아레이트	0.5
경화식물유	4.0
광물유	5.0
트리옥타노인	2.0
디메치콘	0.8
초산 토크페롤	0.5
카르복시비닐 폴리머	0.12
글리세린	5.0
1,3-부틸렌글리콜	3.0
소듐히아루로네이트	5.0
트리에탄올아민	0.12
유니사이드-유 13	0.02
향	미량
증류수	잔량
합계	100

[410]

[411] <1-3> 영양크림

[412] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물을 함유한 영양크림을 아래의 성분비로 통상적인 방법으로 제조하였다.

[413]

[414] [Table 4]

본 발명의 영양크림 제형예

성분	함량(중량%)
톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물	1~10
친유형 모노스테아린산 글리세린	1.5
세테아릴알콜	1.5
스테아린산	1.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비타스테아레이트	0.6
이소스테아릴 이소스테레이트	5.0
스쿠알란	5.0
광물유	35.0
디메치콘	0.5
히드록시에틸 셀룰로오스	0.12
글리세린	6.0
트리에탄올아민	0.7
유니사이드-유13	0.02
향	미량
증류수	잔량
합계	100

[415]

[416] <1-4> 마사지크림

[417] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물을 함유한 마사지크림을 아래의 성분비로 통상적인 방법으로 제조하였다.

[418]

[419] [Table 5]

본 발명의 마사지크림 제형예

성분	함량(중량%)
톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물	1~3
프로필렌글리콜	6
글리세린	4.0
트리에탄올아민	0.5
밀납	2.0
토코페릴아세테이트	0.1
폴리솔베이트 60	3.0
솔비탄세스퀴올레이트	2.5
세테아릴알코올	2.0
유동파라핀	30.0
카르복시비닐폴리머	0.5
향	미량
증류수	잔량
합계	100

[420]

[421] <1-5> 팩

[422] 본 발명의 톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물을 함유한 팩을 아래의 성분비로 통상적인 방법으로 제조하였다.

[423]

[424] [Table 6]

본 발명의 팩 제형예

성분	함량(중량%)
톱니모자반 주정추출물 또는 헥산분획물	1~3
글리세린	10.0
베타인	5.0
REG 1500	2.0
알란토인	0.1
DL-판테놀	0.3
EDTA-2Na	0.02
벤조페논-9	0.04
히드록시에틸 셀룰로오스	0.1
소듐 히아루로네이트	80.
카르복시비닐폴리머	0.2
트리에탄올아민	0.18
옥틸도데칸올	0.3
옥틸도데세스-16	0.4
에탄올	6.0
유니사이드-유13	0.01
향	미량
증류수	잔량
합계	100

[425]

[426] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[427]

청구범위

- [청구항 1] 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 향산화 활성을 갖는 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 추출물은 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 물 및 헥산으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 향산화 활성을 갖는 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 에탄올인 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 분획물은 톱니모자반 추출물의 헥산 분획물인 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물은 조성물에 0.1 내지 1000 μ g/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조성물은 약제학적 조성물, 화장품 조성물, 식품 조성물 또는 사료 조성물인 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 조성물.
- [청구항 7] 톱니모자반 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 향산화 또는 항노화 화장료 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 추출물은 에탄올 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 분획물은 톱니모자반 추출물의 헥산 분획물인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 10] 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 화장료 조성물은 유연 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 수중유 형 에멀전, 유중수 형 에멀전, 페이스크림 무수 생성물, 고체 무수 생성물, 소구체를 사용한 수성 상에서의 오일 분산물, 이온성 지질 소포체, 비이온성 지질 소포체, 연고, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 보디오일, 수중유 형 메이크업베이스, 유중수 형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도우, 마스카라, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류로 이루어진

- 군 중에서 선택되는 1종의 제형인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.
- [청구항 11] 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 추출물은 에탄올 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 화합물은 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinonic acid), 사가퀴노익산(sagaquinonic acid) 또는 사가크로메놀(sagachromenol)인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 14] 제11항에 있어서,
상기 안 질환은 연령-관련 황반 변성, 녹내장, 당뇨성 망막병증, 망막색소변성증, 맥락막 신생혈관막, 포도막염, 근시 변성, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 피부홍조, 안구 혈관신생, 중심 장액 망막병증, 안구 건조증, 중심 망막 동맥 폐쇄 및 낭포 황반 부종으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 15] 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 추출물은 톱니모자반 주정추출물이며, 상기 화합물은 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinonic acid), 사가퀴노익산(sagaquinonic acid) 또는 사가크로메놀(sagachromenol)인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.
- [청구항 17] 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 안 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 추출물은 톱니모자반 주정추출물이며, 상기 화합물은 사가하이드로퀴노익산(sagahydroquinonic acid), 사가퀴노익산(sagaquinonic acid) 또는 사가크로메놀(sagachromenol)인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.
- [청구항 19] 제17항에 있어서,
상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을

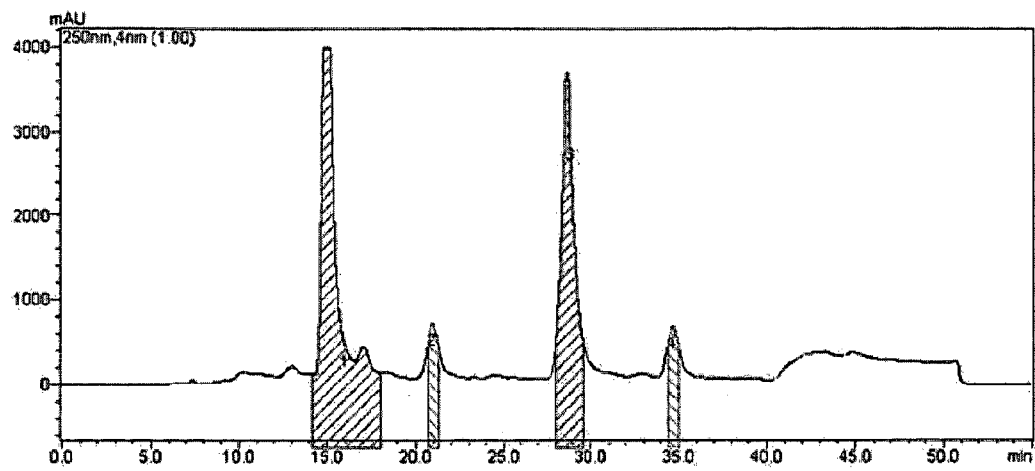
[청구항 20]

특징으로 하는 건강기능식품.

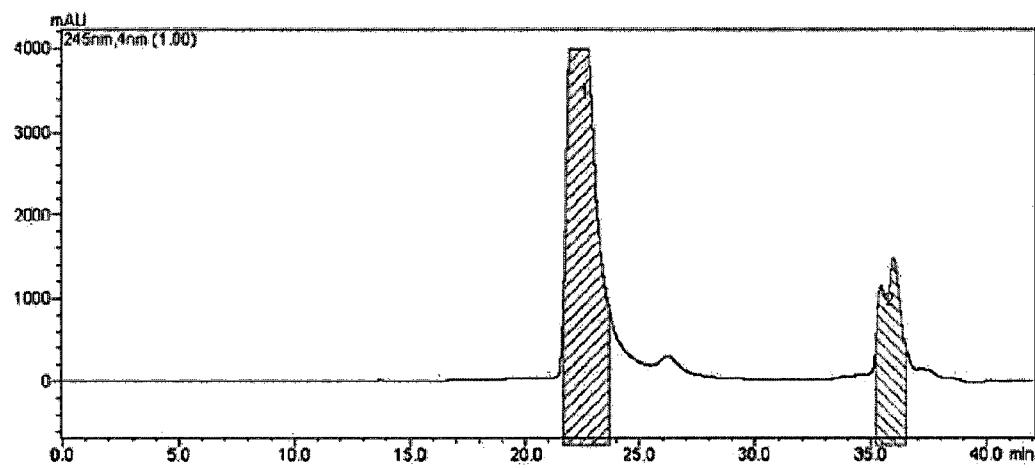
제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 톱니모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물은 항산화 활성을 통해 광수용체 세포(photoreceptor cell)를 보호하는 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

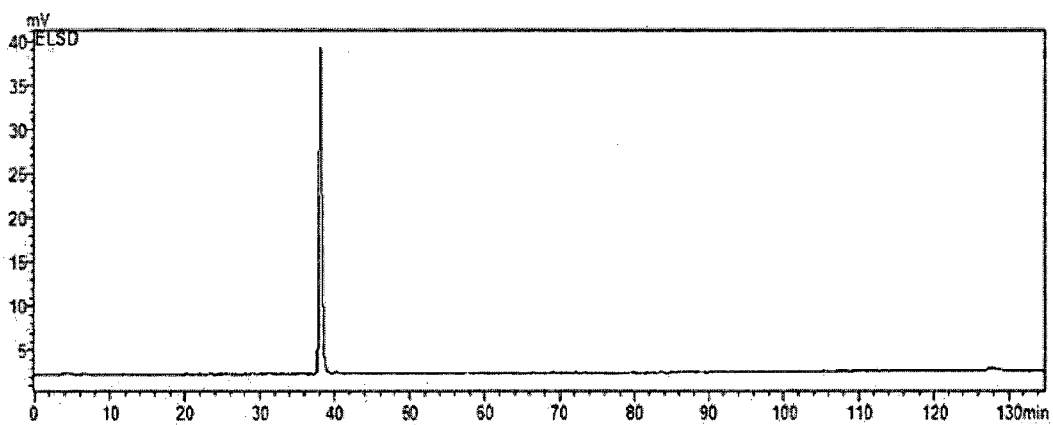
[Fig. 1]



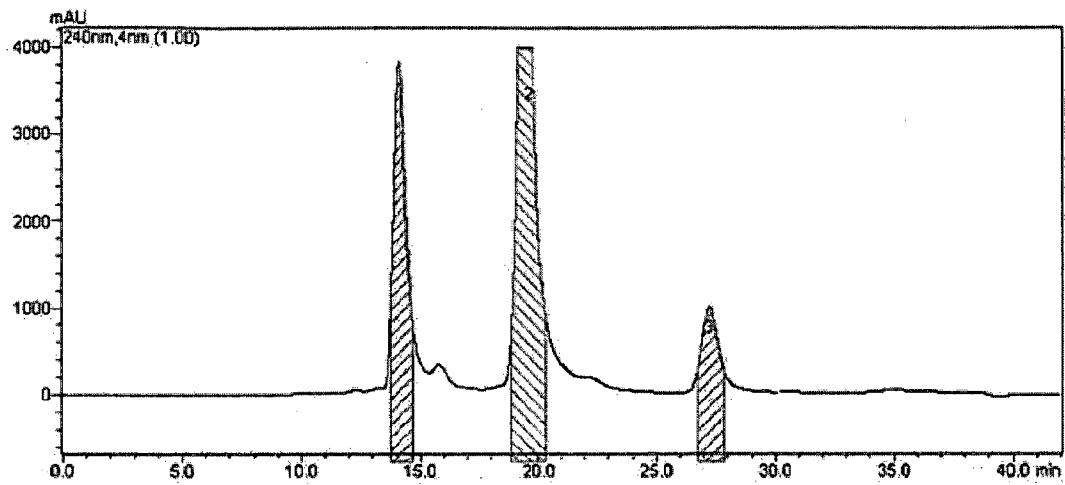
[Fig. 2]



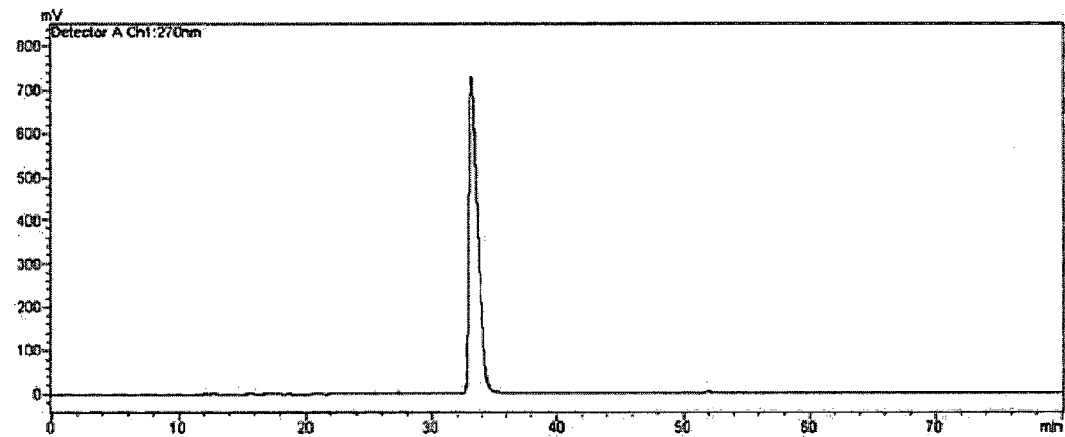
[Fig. 3]



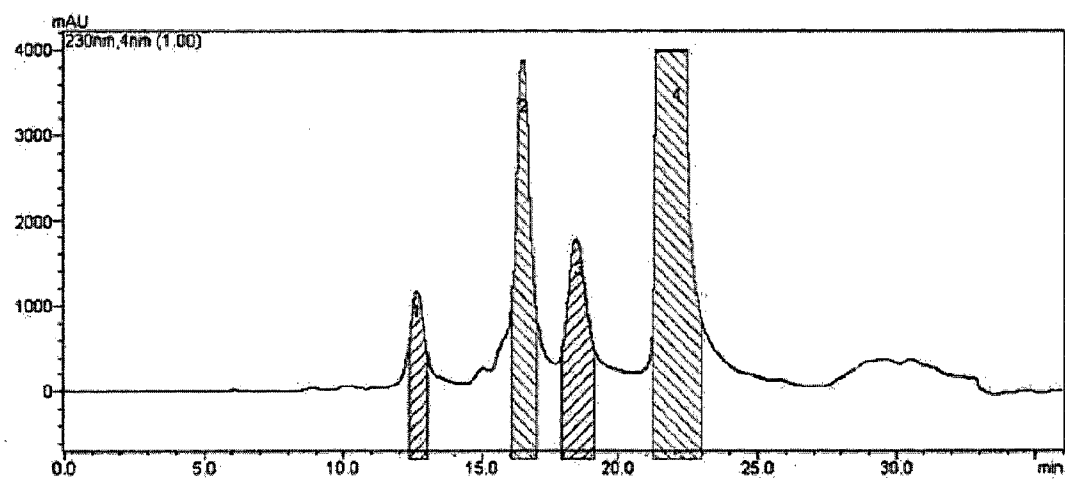
[Fig. 4]



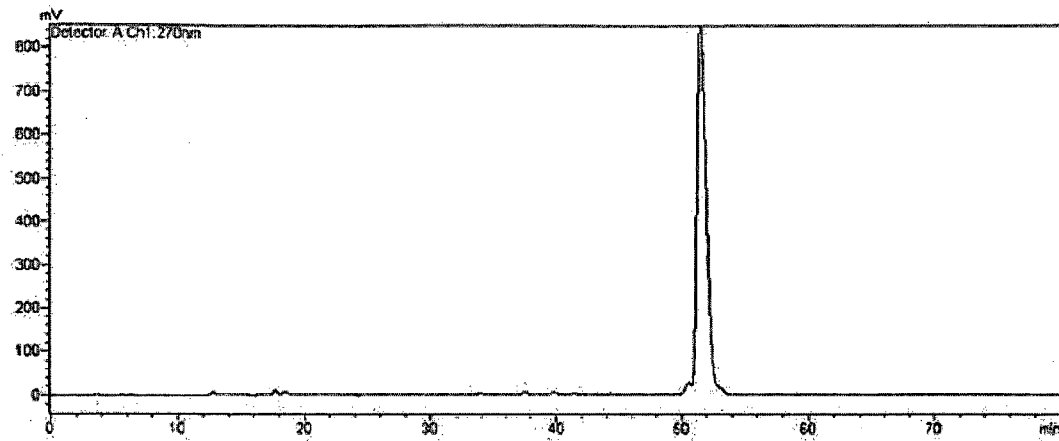
[Fig. 5]



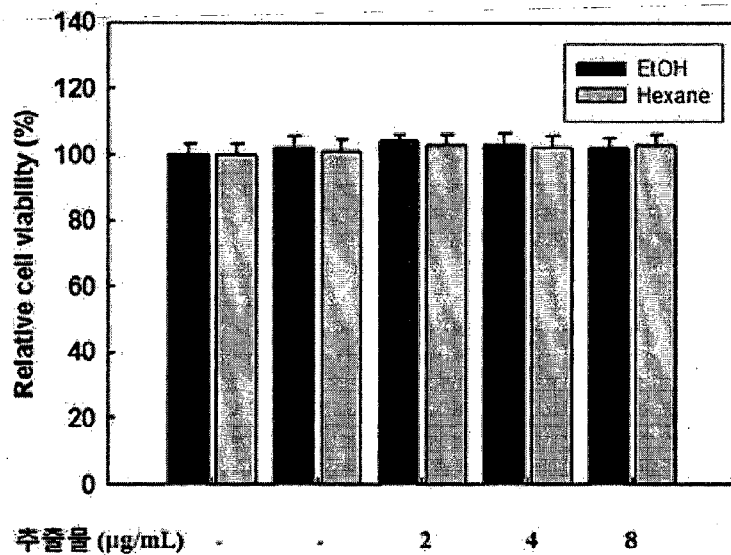
[Fig. 6]



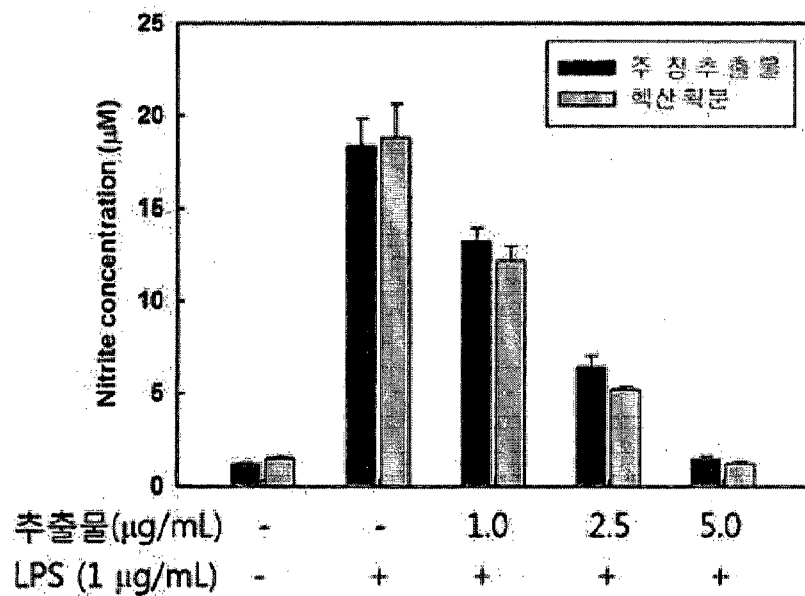
[Fig. 7]



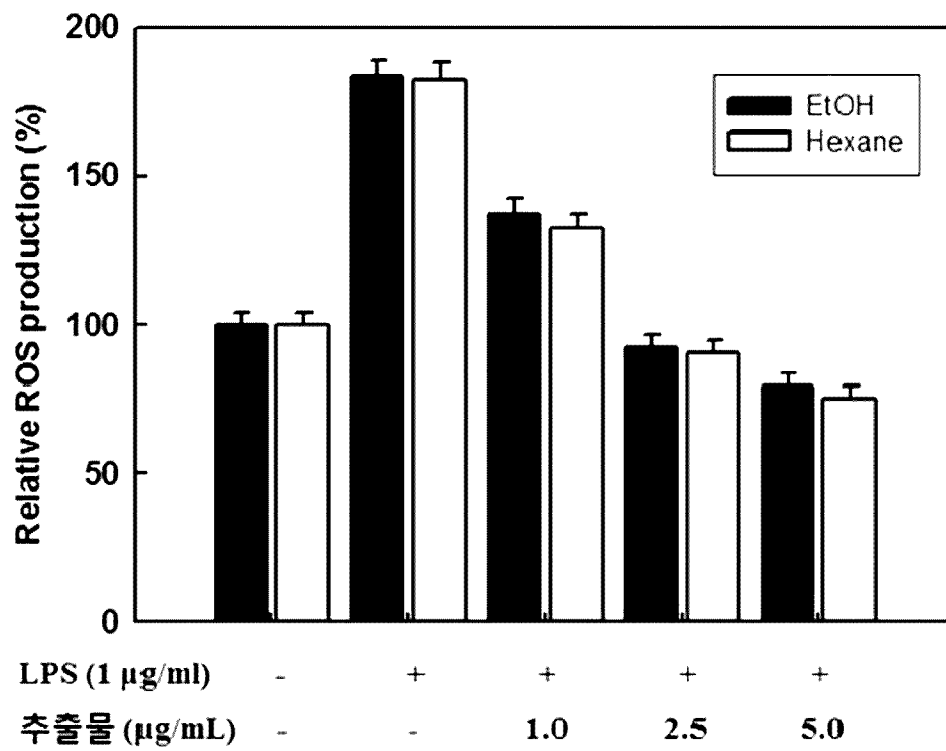
[Fig. 8]



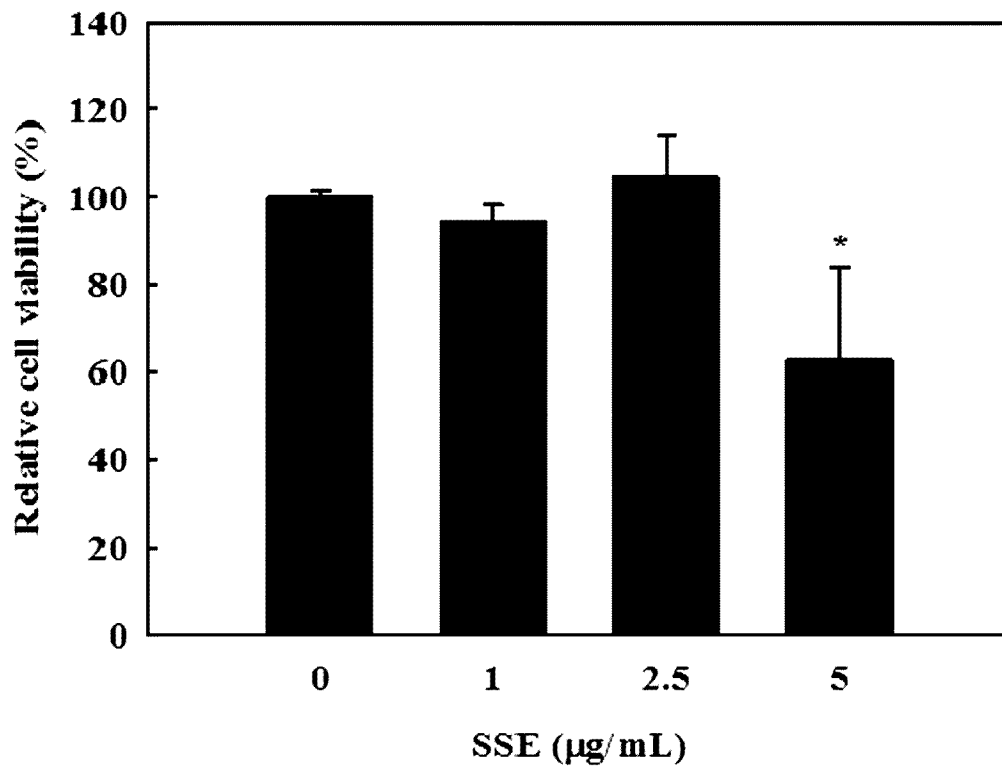
[Fig. 9]



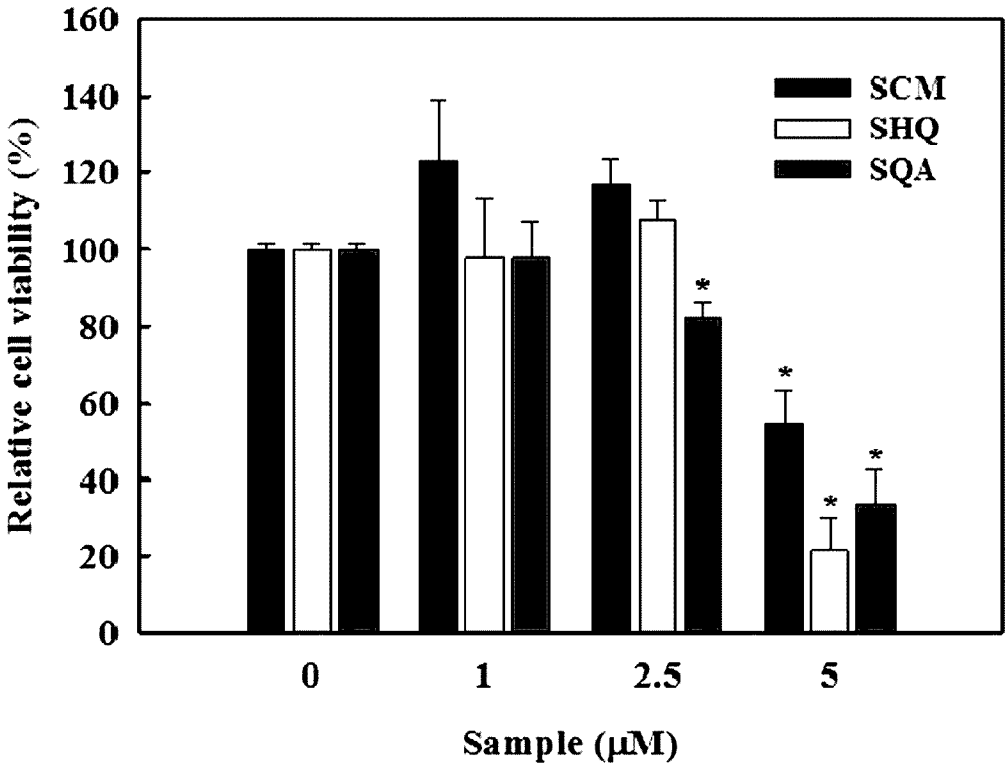
[Fig. 10]



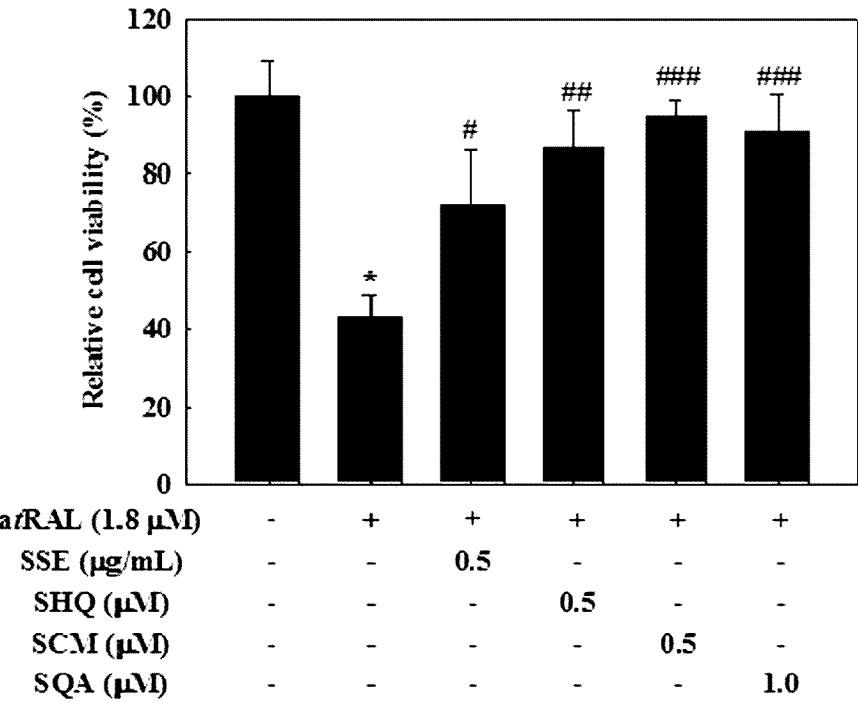
[Fig. 11]



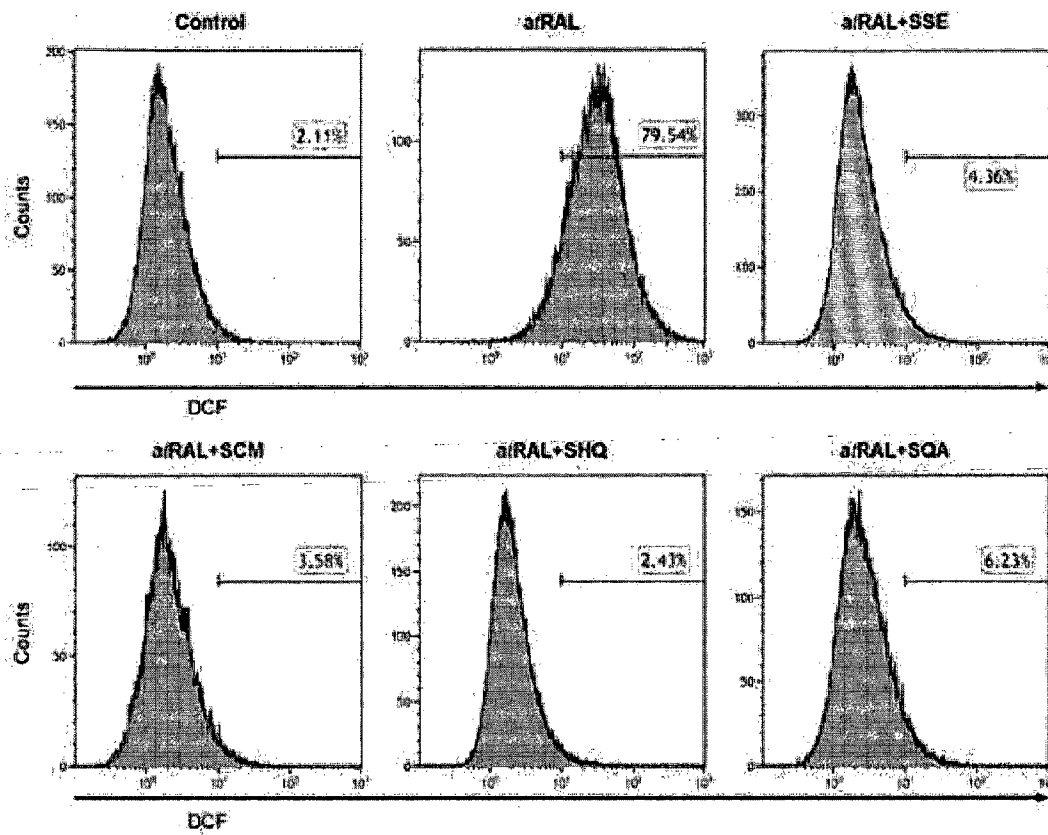
[Fig. 12]



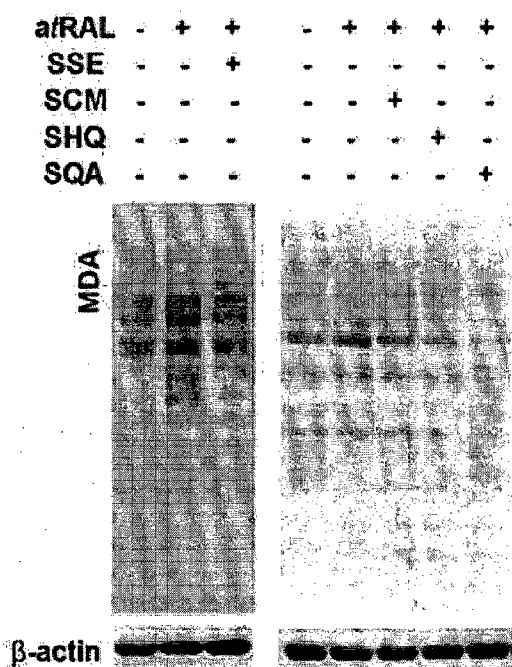
[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/003975**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 36/03(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i, A23K 1/14(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/03; A61P 29/00; A61K 31/353; A61Q 19/08; A61K 8/97; A61K 31/045; A23L 1/30; A61Q 19/00; A23K 1/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Sargassum serratifolium, extraction, antioxidation, anti-aging, cosmetic composition, drug, food

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GWON, W. -G. et al., "Sargaquinoic Acid Inhibits TNF- α -Induced NF- κ B Signaling, Thereby Contributing to Decreased Monocyte Adhesion to Human Umbilical Vein Endothelial Cells (UVECs)", J. Agric. Food Chem., 05 October 2015, vol. 63, no. 1, pages 9053-9061 See abstract; page 9053, right column; page 9054, left column; page 9057, right column; and page 9060, left column.	1-20
A	KR 10-2013-0142424 A (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 30 December 2013 See abstract; paragraphs [0023]-[0033]; and claim 1.	1-20
A	KR 10-2011-0006444 A (HANBUL COSMETICS CO., LTD.) 20 January 2011 See abstract; paragraph [0023]; and claim 1.	1-20
A	KR 10-2012-0074498 A (GYEONGGI INSTITUTE OF SCIENCE & TECHNOLOGY PROMOTION et al.) 06 July 2012 See abstract; and paragraphs [0058]-[0062].	1-20
A	KR 10-2010-0131809 A (JEJU TECHNOPARK) 16 December 2010 See abstract; and claims 1-3.	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 DECEMBER 2016 (21.12.2016)

Date of mailing of the international search report

02 JANUARY 2017 (02.01.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/003975

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	※ The below document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant. LIM, S. et al., "Isolation and Identification of Anti Oxidant Compounds from the n-hexane Fraction of Sargassum Serratifolium Ethanolic Extract", KOFFST International Conference 2015, 30 October 2015 [E-pub.: 27 October 2015], pages 1-516 See page 254, PU-56.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/003975

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0142424 A	30/12/2013	US 2013-0338221 A1	19/12/2013
KR 10-2011-0006444 A	20/01/2011	KR 10-1035858 B1	19/05/2011
KR 10-2012-0074498 A	06/07/2012	KR 10-1302739 B1	08/10/2013
		KR 10-1486315 B1	28/01/2015
		KR 10-2013-0041861 A	25/04/2013
KR 10-2010-0131809 A	16/12/2010	KR 10-1110064 B1	14/03/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/03(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i, A23K 1/14(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/03; A61P 29/00; A61K 31/353; A61Q 19/08; A61K 8/97; A61K 31/045; A23L 1/30; A61Q 19/00; A23K 1/14

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 톱니모자반, 추출, 향산화, 향노화, 화장품, 약물, 식품

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	GWON, W.-G. 등, "Sargaquinoic Acid Inhibits TNF- α -Induced NF- κ B Signaling, Thereby Contributing to Decreased Monocyte Adhesion to Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)", J. Agric. Food Chem., 2015.10.05, 제63권, 제1호, 페이지 9053-9061 초록; 페이지 9053, 오른쪽 컬럼; 페이지 9054, 왼쪽 컬럼; 페이지 9057, 오른쪽 컬럼; 및 페이지 9060, 왼쪽 컬럼 참조.	1-20
A	KR 10-2013-0142424 A (부경대학교 산학협력단) 2013.12.30 요약; 단락 [0023]-[0033]; 및 청구항 1 참조.	1-20
A	KR 10-2011-0006444 A (한불화장품주식회사) 2011.01.20 요약; 단락 [0023]; 및 청구항 1 참조.	1-20
A	KR 10-2012-0074498 A (재단법인 경기과학기술진흥원 등) 2012.07.06 요약; 및 단락 [0058]-[0062] 참조.	1-20
A	KR 10-2010-0131809 A (재단법인 제주테크노파크) 2010.12.16 요약; 및 청구항 1-3 참조.	1-20

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 12월 21일 (21.12.2016)

국제조사보고서 발송일

2017년 01월 02일 (02.01.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	※ 하기 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임 LIM, S. 등, “Isolation and identification of antioxidant compounds from the n-hexane fraction of Sargassum serratifolium ethanolic extract”, KOFFST International Conference 2015, 2015.10.30 [전자공개: 2015.10.27], 페이지 1-516 페이지 254, PU-56 참조.	1-20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0142424 A	2013/12/30	US 2013-0338221 A1	2013/12/19
KR 10-2011-0006444 A	2011/01/20	KR 10-1035858 B1	2011/05/19
KR 10-2012-0074498 A	2012/07/06	KR 10-1302739 B1	2013/10/08
		KR 10-1486315 B1	2015/01/28
		KR 10-2013-0041861 A	2013/04/25
KR 10-2010-0131809 A	2010/12/16	KR 10-1110064 B1	2012/03/14