



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0138565
(43) 공개일자 2015년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/03 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0065540

(22) 출원일자 2014년05월30일

심사청구일자 2014년05월30일

(71) 출원인

한밭대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)

(72) 발명자

최병욱

대전광역시 유성구 배울2로 134 대우푸르지오 10
3동 201호

이봉호

대전광역시 유성구 은구비남로 13 (지족동, SK허
브) 1104

이제성

경기 안성시 고삼면 안성맞춤대로 1984-39

(74) 대리인

특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 12 항

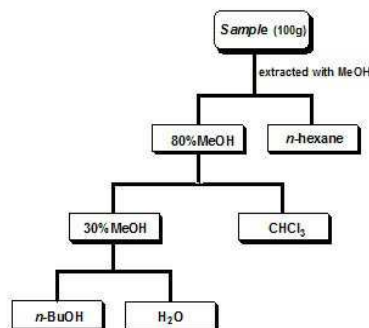
(54) 발명의 명칭 **항산화 및 항염증 효과를 갖는 큰잎모자반 용매 추출물 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 해조류에서 추출된 생리활성물질로서의 효능을 가짐을 확인하였으며, 해조류로부터 유효성분을 추출하기 위한 방법으로 2종 이상의 서로 다른 유기용매로 추출함으로써 높은 수율로 생리활성물질을 수득할 수 있는 것을 확인하였으며, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

대표도 - 도7

7]



[큰잎모자반 용매분획도]

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-01960001

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 첨단화학소재산업단지캠퍼스조성사업

연구과제명 천연물을 활용한 노화방지 생리활성 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한밭대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 큰잎모자반을 세척, 건조하여 분쇄하여 분말형태로 제조하는 단계;
 - 2) 상기 큰잎모자반 분말을 제 1 용매로 용매추출 후, 감압 건조하여 제 1 용매추출물을 수득하는 단계;
 - 3) 상기 제 1 용매추출물을 제 2 용매에 녹인 후, 제 2 용매로 용매분획하여 제 2 용매분획추출물과 수용층으로 분리하여 확보하는 단계;
 - 4) 상기 수용층을 다시 농축하여, 제 3 용매와 혼합하여 용매분획하여 제 3 용매분획추출물과 제 2 수용층으로 각각 분리하여 확보하는 단계;
 - 5) 제 2 수용층을 제 4 용매 및 증류수에 각각 혼합하여 용매분획하여 각각 제 4 용매분획추출물과 증류수 분획추출물을 분리하여 확보하는 단계;
- 를 포함하여 큰잎모자반 용매 추출물의 제조방법.

청구항 2

- 제 1항에 있어서,
상기 제 2 용매 및 제 3 용매는 제 1 용매에 유기용매를 더 포함하는 큰잎모자반 용매 추출물의 제조방법.

청구항 3

- 제 1항에 있어서,
상기 1) 단계의 제 1 용매는 C1-C3 저급 알코올인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법.

청구항 4

- 제 3항에 있어서,
상기 C1-C3 저급 알코올은 메탄올인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법.

청구항 5

- 제 1항에 있어서,
상기 3) 단계의 유기용매는 헵탄, 옥탄, 데칸, n-헥산, n-헥실 아세테이트, n-에틸헥실 아세테이트, 메틸 올리에이트, 메틸이소부틸케논, 톨루엔, 크실렌, 방향족 탄화수소, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 사염화탄소 및 아세톤으로 이루어진 군으로부터 1종 이상의 유기용매인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법.

청구항 6

- 제 1항에 있어서,

상기 제 4용매는 C4-C10 고급 알코올인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 제 2 및 제 3용매는 제 1용매에 유기용매가 1 : 0.1 ~ 5 중량비인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 C4-C10 고급 알코올은 n-부탄올인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법.

청구항 9

제 5항에 있어서,

상기 제 2용매에 포함되는 유기용매는 n-헥산이며, 제 3용매에 포함되는 유기용매는 클로로포름인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 4)단계 후 제 3 용매추출분획물을 70 ~100중량%의 메탄올수용액을 고정상으로 하여 컬럼크로마토그래피에 의해 분리하는 단계를 더 포함하는 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법.

청구항 11

제 1항 내지 10항 중 어느 한 항에 따라 제조된 큰잎모자반 용매 분획추출물.

청구항 12

제 11항에 따라 제조된 큰잎모자반 용매 분획추출물을 포함하는 항산화 및 항염증 효과를 갖는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 항산화 및 항염증 효과를 갖는 큰잎모자반 용매 추출물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

본 발명은 해조류에서 추출된 생리 활성 효과를 가진 추출물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0003]

전 세계적으로 의약품, 화장품, 기능성 식품 등을 개발하기 위한 연구는 광범위하게 실시되고 있으며, 특히, 의약품의 경우 종래의 화합물의 수가 한정되어 있기 때문에 급격하게 증가하던 신규 활성물질에 대한 개발에 한계가 드러나 의약품으로 사용가능한 신규한 화합물질 개발 성장이 감소하고 있다. 따라서, 천연자원에서 유효한 생리활성물질을 개발하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 이러한 천연자원으로부터 유효성분을 분리하고 이들

의 구조 및 효능을 규명하기 위해서는 적절한 생물활성 타겟 설정과 천연자원의 충분한 확보가 필수적이다.

- [0004] 지구상에 존재하는 생물 중 해양생물은 육상식물에 비해 수적 우세와 다양성을 가지고 있음에도 불구하고 채집에 따른 비용 등의 문제로 인하여 상대적으로 많은 연구가 이루어지지 않고 있다. 이러한 해양생물 중에 해조류에는 육상식물에서 보기 어려운 생합성 경로를 가지고 있기 때문에 신규한 생리활성물질로 이용할 수 있는 무한한 가능성을 가지고 있다.
- [0005] 해조류는 우리나라에서 채취할 수 있는 종류 중에서 크게 녹조류, 갈조류, 홍조류로 나눌 수 있다.
- [0006] 녹조류로는 청각, 참홀파래, 참깃털말, 잎파래, 잎맥말 등이 있으며, 갈조류로는 패, 톳, 큰잎모자반, 큰그물바탕말, 참그물바탕말, 참가죽그물바탕말, 짝잎모자반 등이 있을 수 있으며, 홍조류로는 참곱슬이, 참까막살, 참도박, 참지누아리, 참풀가사리, 참화살깃산호말, 털엇가지풀, 털지누아리, 흑돌잎, 애기돌가사리, 애기우뚱가사리, 엇가지풀, 여린가위손말, 연가락말, 외톨개모자반, 외호늘풀, 우뚱가사리 등이 채집된다.
- [0007] 위의 해조류에서 유래한 생리활성물질에 관한 연구(한국공개특허 제2014-0030454호, 한국공개특허 제2013-0140448호)가 활발하게 진행되어 왔다.
- [0008] 그러나, 천연물로부터 유효성분을 추출할때에 분리 정제 시 수율이 매우 낮을 뿐만 아니라, 많은 비용의 제조경비 등의 문제들이 있어 실제적으로 산업적으로 이용하는 데 어려움이 많다.
- [0009] 따라서, 본 발명은 해조류에 자연스럽게 존재하는 성분들을 그대로 포함하면서 항산화 및 항염증에 효과가 있는 성분을 높은 수득률로 제공할 수 있는 용매분획추출물로 추출물을 제공하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) KR 제 2013-0140448호
(특허문헌 0002) KR 제 2013-0097870호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 해조류에서 추출된 생리활성물질로서의 효능을 가짐을 확인하였으며, 해조류로부터 유효성분을 추출하기 위한 방법으로 2종 이상의 서로 다른 유기용매로 추출함으로써 높은 수율로 생리활성물질을 수득할 수 있는 것을 확인하였으며, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 1)큰잎모자반을 세척, 건조하여 분쇄하여 분말형태로 제조하는 단계;
- [0013] 2)상기 큰잎모자반 분말을 제 1 용매로 용매추출 후, 감압 건조하여 제 1 용매추출물을 수득하는 단계;
- [0014] 3)상기 제 1 용매추출물을 제 2 용매에 녹인 후, 제 2용매로 용매분획하여 제 2 용매분획추출물과 수용층으로 분리하여 확보하는 단계;
- [0015] 4)상기 수용층을 다시 농축하여, 제 3용매와 혼합하여 용매분획하여 제 3 용매분획추출물과 제 2수용층으로 각각 분리하여 확보하는 단계;
- [0016] 5)제 2 수용층을 제 4 용매 및 증류수에 각각 혼합하여 용매분획하여 각각 제 4 용매분획추출물과 증류수 분획추출물을 분리하여 확보하는 단계;
- [0017] 를 포함하여 큰잎모자반 용매 추출물의 제조방법을 제공한다.

- [0018] 본 발명은 제 2용매 및 제3용매는 제 1용매에 유기용매를 더 포함하는 큰잎모자반 용매 추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 1)단계의 제 1용매는 C1-C3 저급 알코올인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 C1-C3 저급 알코올은 메탄올인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 3)단계의 유기용매는 헵탄, 옥탄, 데칸, n-헥산, n-헥실 아세테이트, n-에틸헥실 아세테이트, 메틸올리에이트, 메틸이소부틸케논, 톨루엔, 크실렌, 방향족 탄화수소, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 사염화탄소 및 아세톤으로 이루어진 군으로부터 1종 이상의 유기용매인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명은 제 4용매는 C4-C10 고급 알코올인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명은 제 2 및 제 3용매는 제 1용매에 유기용매가 1 : 0.1 ~ 5 중량비인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 C4-C10 고급 알코올은 n-부탄올인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 제 2용매에 포함되는 유기용매는 n-헥산이며, 제 3용매에 포함되는 유기용매는 클로로포름인 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명은 4)단계 후 제 3 용매추출분획물을 70 ~100중량%의 메탄올수용액을 고정상으로 하여 컬럼크로마토그래피에 의해 분리하는 단계를 더 포함하는 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 본 발명에 따라 제조된 큰잎모자반 용매 분획추출물을 제공한다.
- [0028] 본 발명은 본 발명에 따라 제조된 큰잎모자반 용매 분획추출물을 포함하는 향산화 및 항염증 효과를 갖는 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명은 해조류에서 용매분획된 생리활성물질이 80% 이상의 향산화 활성을 가지고 NO 생성을 억제하는 효과를 가짐으로써 해조류에서 용매분획하여 추출한 추출물을 이용하여 향산화 및 항염증 효과를 갖는 조성물을 제공하고자 한다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 SRC 분획에 대한 ODS open column flash chromatography 분획의 무게 및 TLC 패턴을 나타낸 것이다.
- 도 2는 큰잎모자반 용매분획의 향산화 활성 (농도 100 ppm 및 10 ppm)을 나타낸 것이다.
- 도 3은 큰잎모자반 클로로포름 용매분획(SRC-1 ~SRC-6)의 DPPH라디칼 소거활성을 나타낸 것이다.
- 도 4는 큰잎모자반 용매분획의 NO 생성억제 효과 (농도 100 ppm 및 10 ppm)결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 큰잎모자반 클로로포름 용매분획(SRC-1 ~SRC-6)의 NO 생성억제효과 (10 ppm)를 나타낸 것이다.
- 도 6은 SRC 분획의 HPLC 크로마토그램의 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 큰잎모자반의 용매분획도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명은 상기의 목적을 달성하기 위해
- [0032] 1)큰잎모자반을 세척, 건조하여 분쇄하여 분말형태로 제조하는 단계;
- [0033] 2)상기 큰잎모자반 분말을 제 1 용매로 용매추출 후, 감압 건조하여 제 1 용매추출물을 수득하는 단계;
- [0034] 3)상기 제 1 용매추출물을 제 2 용매에 녹인 후, 제 2용매로 용매분획하여 제 2 용매분획물과 수용층으로 분리

하여 확보하는 단계;

- [0035] 4)상기 수용층을 다시 농축하여, 제 3용매와 혼합하여 용매분획하여 제 3 용매분획추출물과 제 2수용층으로 각각 분리하여 확보하는 단계;
- [0036] 5)제 2 수용층을 제 4 용매 및 증류수에 각각 혼합하여 용매분획하여 각각 제 4 용매분획추출물과 증류수 분획추출물을 분리하여 확보하는 단계; 를 포함하여 큰잎모자반 용매 추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0037] 이하, 본 발명의 각 단계에 대하여 보다 자세하게 설명한다.
- [0038] 해조류는 우리나라에서 채취할 수 있는 종류 중에서 크게 녹조류, 갈조류, 홍조류로 나눌 수 있다.
- [0039] 녹조류로는 청각, 참홀파래, 참깃털말, 잎파래, 잎맥말, 옥덩굴, 몽우리청각, 모란갈파래, 말청각, 떡청각, 대마디붙이, 누운청각, 넓청각, 납작파래, 그물공말, 구슬청각, 구멍갈파래, 고동옷대마디말, 갈색대마디말 등이 있으며,
- [0040] 갈조류로는 패, 툇, 큰잎모자반, 큰그물바탕말, 참그물바탕말, 참가죽그물바탕말, 짝잎모자반, 지충이, 줄의관말, 연두털말, 불레기말, 부챗말, 반주름말, 바위주름, 바위수염, 바위딱지, 바위두둑, 미역쇠, 미역, 모자반, 넓패, 긴불레기말, 그물바구니, 팽생이모자반, 고리매, 감태, 가시뼈대그물말 등이 있을 수 있으며,
- [0041] 홍조류로는 참곱슬이, 참까막살, 참도박, 참지누아리, 참풀가사리, 참화살깃산호말, 털엇가지풀, 털지누아리, 흑돌잎, 애기돌가사리, 애기우뭇가사리, 엇가지풀, 여린가위손말, 연가락말, 외톨개모자반, 외호늘풀, 우뭇가사리, 잎꼬시래기, 자루바다표고, 작은구슬산호말, 작은떨기나무붉은실, 좁은붉은잎, 진두발, 참갈고리풀, 두갈래분홍치, 두갈래사슬풀, 마디잘록이, 막우뭇가사리, 모로우붉은실, 반달타래, 벚붉은잎, 부챗살, 불등풀가사리, 붉은까막살, 붉은뼈까막살, 비단풀사촌, 석목, 쌍발이서실, 애기가시덤불, 갈래곰보, 갈래잎, 개서실, 검은서실, 고리방사털, 굵은석목, 기는거미줄, 꼬시래기, 낭과적, 넓은게발, 넓은보라색우무, 넓은사슬풀, 넓은호늘풀, 누른끈적이, 돌가사리 등이 채집된다.
- [0042] 본 발명에 따른 항산화 및 항염증 효과 갖는 생리활성물질의 유효성분인 추출물은 상기 해조류에서 추출되며, 특히 갈조류가 바람직하다. 보다 바람직하게는 갈조류 중에 큰잎모자반 등이 바람직하다.
- [0043] 이하, 항산화 및 항염증 효과를 갖는 유효성분을 제공하기 위한 큰잎모자반 용매 추출물의 제조방법을 보다 자세하게 설명하고자 한다.
- [0044] 본 발명은 1)큰잎모자반을 세척 및 건조한 후, 분쇄하여 분말형태로 제조하는 단계를 포함한다.
- [0045] 상기 단계는 특별히 제한되지 않으며 당업자가 통상적으로 사용할 수 있는 통상적인 세척, 건조 및 분쇄 과정을 거쳐 행할 수 있다.
- [0046] 본 발명은 2)상기 큰잎모자반 분말을 제 1 용매로 용매추출 후, 감압 건조하여 제 1 용매추출물을 수득하는 단계를 포함한다.
- [0047] 상기 제 1용매로는 바람직하게는 C1-C10 저급 알코올을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 메탄올일 수 있다.
- [0048] 상기 용매추출은 50 내지 100℃에서 10 내지 30시간 동안 침지 또는 교반한 후, 여과하여 제 1 용매추출물을 확보하며, 여과하고 남은 잔사를 활용하여 상기 용매 추출을 2회 더 반복한 후, 감압 건조하여 제 1 용매추출물을 확보할 수 있다.
- [0049] 다음으로 본 발명에 따른 3)단계에 대하여 설명한다.
- [0050] 본 발명에 따른 3)단계는 상기 제 1 용매추출물을 제 2 용매에 녹인 후, 제 2용매로 용매분획하여 제 2 용매분획물과 수용층으로 분리하여 확보하는 단계를 포함한다.
- [0051] 상기 제 2용매로는 제 1용매에 유기용매를 더 포함하여 제조되는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 제 1 용매와 상기 유기용매가 1 : 0.1 ~ 1 중량%로 포함되는 것일 수 있다.
- [0052] 상기 제 1용매는 바람직하게는 메탄올일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 순도 100%의 메탄올을 사용할 수 있다. 상기 유기용매는 헵탄, 옥탄, 데칸, n-헥산, n-헥실 아세테이트, n-에틸헥실 아세테이트, 메틸 올리에이트, 메틸이소부틸케논, 톨루엔, 크실렌, 방향족 탄화수소, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 사염화탄소 및 아세톤으로 이루어진 군으로부터 1종 이상의 휘발성 유기용매를 사용할 수 있으며, 특히, n-헥산을 사용하는 것이 가장 바

람직하다.

- [0053] 본 발명에 따른 일 실시예로는 감압건조하여 수득한 상기 제 1 용매추출물을 다시 순도 100% 메탄올과 상기 유기용매인 n-헥산을 포함하는 제 2용매에 녹여 혼합하여 용매분획을 3회 반복하여 실시한 후, 제 2 용매분획층의 용액과 제 2 용매분획층을 제외한 나머지 수용층의 잔사를 분리하여 각각 확보한다. 상기 제 2 용매분획층은 감압 건조하여 제 2용매분획추출물을 확보한다. 상기 수용층은 상기 제 2용매를 이용하여 용매분획하여 얻은 제 2 용매분획추출물을 제외한 남은 잔사의 수용층을 말한다.
- [0054] 본 발명의 4) 단계에 대하여 설명한다.
- [0055] 상기 4)단계는 상기 3) 단계에서 확보한 수용층을 다시 농축하여, 제 3용매와 혼합하여 용매분획하여 제 3 용매 분획추출물과 제 2수용층으로 각각 분리하여 확보하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0056] 상기 제 3용매는 제 1용매에 유기용매를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 80 중량% 메탄올용액에 클로로포름을 포함한 것일 수 있다.
- [0057] 상기 3)단계의 제 2 용매분획추출물을 제외한 남은 잔사의 수용층을 다시 농축한 후 80 중량%의 메탄올용액과 클로로포름을 1:1로 혼합한 제 3 용매를 이용하여 용매분획하여 제 3용매분획추출물과 제 2수용층으로 각각 분리하여 확보할 수 있다. 상기 제 2수용층은 상기 제 3용매를 이용하여 용매분획하여 얻은 제 3용매분획추출물을 제외한 남은 잔사의 수용층을 말한다.
- [0058] 다음은 본 발명의 5)단계에 대하여 설명한다.
- [0059] 상기 5)단계는 상기 4)단계에 확보한 상기 제 2 수용층을 제 4 용매 및 증류수에 각각 혼합하여 용매분획 하여 각각 제 4 용매분획추출물과 증류수 분획추출물을 분리하여 확보하는 단계를 포함한다.
- [0060] 상기 제 4 용매는 제 1용매에 유기용매를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 30 중량% 메탄올용액에 n-부탄올을 포함한 것일 수 있다.
- [0061] 상기 4)단계에서 확보한 상기 제 3 용매분획추출물을 제외한 남은 잔사의 수용층인 제 2수용층을 다시 농축하여 30 중량%의 메탄올용액과 n-부탄올을 혼합한 제 4용매와 증류수에 각각 분배시켜 혼합하여 각각의 용액층인 제 4 용매분획층과 증류수분획층으로 나누어 분리한 후 감압 농축하여 제 4 용매분획추출물과 증류수분획추출물을 확보한다.
- [0062] 상기 상술한 바와 같이, 본 발명은 각각의 용매분획마다 극성용매와 비극성용매를 달리 선택하여 사용할 수 있다. 상기 큰잎모자반으로부터 추출된 추출물은 용매 분획으로써 극성용매와 비극성용매를 이용하여 극성의 차이에 따라 분획하는 것을 의미하며, 본 발명의 용매분획에 따라 수득된 분획추출물은 극성용매 분획추출물 또는 비극성용매 분획추출물 일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 일 실시예에 있어서 사용되는 극성용매 또는 비극성용매는 제한되는 것은 아니며, 예를 들어, 물 및 메탄올 등의 C1-C10 다가 알코올에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 혼합용액을 사용할 수 있고, 비극성용매는 n-헥산, 시클로헥산, 클로로포름 및 클로로메탄 등에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 용매를 사용할 수 있다.
- [0064] 따라서, 본 발명은 상기 큰잎모자반을 용매분획을 통하여 분획추출물을 수득할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 양태로는 상기 큰잎모자반 용매 분획추출물을 포함하는 항산화 및 항염증 효과를 갖는 조성물을 포함한다.
- [0066] 상기 큰잎모자반 용매 분획추출물은 항산화 및 항염증 효과를 갖는 유효성분을 포함하는 생리활성물질로서 항산화 및 항염증 효능을 가진 물질로 작용할 수 있다.
- [0067] 상기 큰잎모자반 용매 분획추출물의 제조방법인 각각의 용매분획에 따라 수득된 분획추출물을 ODS 컬럼크로마토그래피를 통하여 DPPH법(항산화 효과 측정)을 이용한 항산화 활성을 확인하는 실험을 통해 본 발명에 따른 큰잎모자반 용매 분획추출물의 항산화 효과를 확인하였다. 또한, 상기 큰잎모자반 용매 분획추출물을 이용하여 NO 생성억제 효과 실험을 통해 상기 큰잎모자반 용매 분획추출물의 항염증 효과를 입증하였다.
- [0068] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의거하여 좀 더 상세히 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 한정하지는 않는다.

[0069] [실시예 1] 큰잎모자반 용매 분획추출물 제조

[0070] 큰잎모자반(제주 성산에서 채취)을 채취하여 세척 및 건조한 후, 분쇄하여 300g의 큰잎모자반 분말을 2L 메탄올(SK Chemical, 서울)에 넣고 24시간 150rpm으로 교반한 후 여과하여 메탄올추출물을 확보하고, 여과하고 남은 잔사를 활용하여 메탄올 용매 추출 2회를 더 반복하여 얻은 추출물을 모두 감압 건조하여 45g의 메탄올추출물을 얻었다.

[0071] 감압건조하여 수득한 45g은 다시 80 중량% 메탄올용액 2L에 녹인 후, n-헥산(SK Chemical, 서울) 2L를 더 포함하여 용매분획을 3회 반복하여 실시하여 n-헥산 용매분획층의 분획추출물(이하, "SRH" 라 한다) 4.2g을 확보하고, n-헥산 용매분획층의 n-헥산 분획추출물을 제외한 남은 잔사의 수용층을 분리하여 확보하였다. 상기 수용층은 다시 농축 한 후, 30 중량% 메탄올용액 2L에 녹인 후, 클로로포름 (SK Chemical, 서울)2L을 더 포함하여 용매분획을 3회 반복 실시하여 클로로포름 용매분획층의 클로로포름 분획추출물(이하, "SRC" 라 한다) 2.9을 확보하고, 클로로포름 용매분획층의 SRC를 제외한 남은 잔사의 제 2 수용층을 분리하여 확보하였다. 상기 제 2수용층을 다시 농축한 후, n-부탄올(SK Chemical, 서울) 2L 와 증류수 2L에 각각 분배시켜 용매분획하여 각각의 부탄올 분획추출물(이하 "SRB" 라 한다) 2.5g과 증류수 분획추출물(이하 "SRW" 라 한다) 33g으로 분리하여 감압 농축하여 확보하였다. 하기 표 1에 큰잎모자반의 각각의 용매분획 무게를 나타내었다.

[0072] [표 1] 큰잎모자반 용매분획의 무게

일반명	학명	무게	
		원료	300 g
큰잎모자반	<i>Sargassum ringgoldianum</i>	MeOH	45 g
		n-Hex	4.2 g
		CHCl ₃	2.9 g
		BuOH	2.5 g
		H ₂ O	33 g

[0073]

[0074] [실시예 2]

[0075] 실시예 1에 따라 제조된 용매 분획추출물 중에 클로로포름 용매분획추출물(SRC) 1.9g을 ODS 크로마토그래피를 통하여 메탄올:증류수 비율 7:1인 고정상으로 하여 총 6개의 분획으로 나누었으며(SRC-1, SRC-2, SRC-3, SRC-4, SRC-5, SRC-6) 이들의 무게와 이들의 DPPH 용액(시그마-알드리치, 미국)에 의한 TLC 패턴을 분석하여 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1-(b)에 보는 바와 같이 DPPH 용액을 분사하였을 때 발색되는 TLC 스팟은 항산화 물질로 예측 할 수 있다.

[0076] [실시예 3] 항산화 활성 측정(DPPH라디칼 소거활성)

[0077] 항산화 활성은 DPPH radical 소거 활성을 검색하는 Blois방법을 이용하여 실시하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다. 실시예 1 및 2에 따라 제조된 용매분획추출물(MeOH, SRH, SRC, SRB, SRW)과 실시예 2에 따라 분획된 클로로포름 분획물(SRC-1, SRC-2, SRC-3, SRC-4, SRC-5, SRC-6)에 우선 DPPH(시그마-알드리치, 미국)2mg에 15 mL의 에탄올(SK Chemical, 서울)을 가하여 녹인 DPPH 원액(시그마-알드리치, 미국)을 1200 μ L 취하고 DMSO 500 μ L(시그마-알드리치, 미국)와 에탄올 3000 μ L 를 혼합하여 최종으로 초기 흡광도(B)를 보기 위한 DPPH용액을 만들었다. 준비된 DPPH 용액 450 μ L를 석영 cuvette안에 넣고 518 nm에서 초기 흡광도(B)를 측정한다. 이때 초기 흡광도가 0.94~0.97의 범위에 오도록 알맞게 조절한다. 만약에 흡광도가 0.94~0.97의 범위를 벗어나게 될 경우, 즉 초기 흡광도가 0.97 이상이 되면 에탄올을 더 넣어 희석하여 측정하고, 0.94보다 낮으면 DPPH 원액을 더 넣어 초기 흡광도가 0.94에서 0.97사이의 값을 갖도록 조절한다. 초기 흡광도가 알맞게 조절되면 메탄올에 녹인 시료 50 μ L를 흡광도 값이 맞춰진 DPPH 용액이 들어있는 cuvette에 넣고 518 nm에서 10초 간격으로 10분 동안 측정한다. 이때의 항산화 활성은 reduction %로 표기하며 다음과 같은 방법으로 구한다.

[0078] 식1: 항산화 활성(ΔA) = B(초기 흡광도) - C(시료를 넣은 용액의 흡광도)

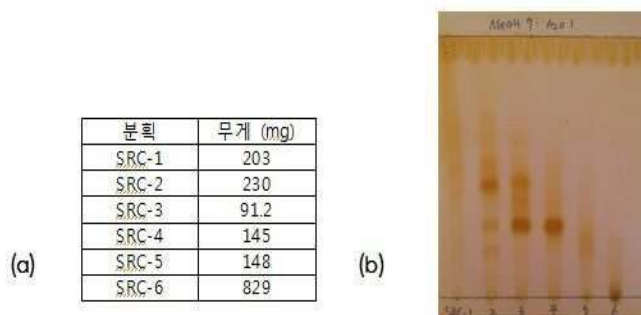
[0079] 여기서 B는 초기 흡광도인 0.94~0.97 이며, C는 10분 동안 측정한 가장 낮은 흡광도를 말한다. 이렇게 구해진 ΔA 는 다시 아래와 같은 식2에 의해 reduction(%)로 바꿔 계산한다.

[0080] 식2: Reduction (%) = ($\Delta A \div B$) $\times$ 100

- [0081] 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다. 도 2 및 도 3의 결과로 보아 항산화 활성 효과가 가장 우수한 분획추출물은 클로로포름 분획추출물인 SRC-2, SRC-3, SRC-4인 것으로 나타났다.
- [0082] [실시예 4] 큰잎모자반 용매분획추출물의 NO 생성억제 효과 실험
- [0083] NO생성 억제 활성검색은 Murine macrophage cell line, Raw264.7 세포를 이용하여 측정하였다. 이 세포는 한국 세포주 은행(대한민국, 서울)에서 구입하여 실험에 사용하였으며, DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 ug/ml streptomycin을 혼합한 배지(시그마-알드리치, 미국)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Sanyo, japan)에서 배양하였다. Raw 264.7세포는 80-90%의 confluency에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.
- [0084] Raw264.7 세포를 5×10^4 cell/well로 96 well에 분주한 다음 실시예 1 및 2에 따른 분획추출물인 검색대상 물질 (MeOH, SRH, SRC, SRB, SRW, SRC-1, SRC-2, SRC-3, SRC-4, SRC-5, SRC-6)을 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 세포에 일정한 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO₂의 환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 배양 후 각 well 당 MTT용액 (0.1 mg/ml in PBS)을 50 ul씩 넣고 4시간 배양한 후, 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 ELISA microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.
- [0085] 식3 : $\text{viability}(\% \text{ control}) = (\text{Absorbance of treated cell} / \text{absorbance of control cell}) \times 100$
- [0086] 위의 Raw264.7 세포로부터 생성된 nitric oxide(NO)는 세포 tquadidder에 Griess시약(시그마-알드리치, 미국)을 반응시킴으로써 측정하였다. 96 well plate에 세포배양 상등액 50 ul과 Griess시약 (1% sulfailamide in 5% phosphoric acid + 1% a-naphtylamide in H₂O) 50 ul을 혼합하고 10분 동안 차광 하에서 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA microplate reader로 흡광도를 측정하였다. NO 생성 억제 정도는 LPS에 비하여 제어된 정도로 표시하였다. 그 결과는 도 4 및 도 5에 나타내었다. 도 4 및 도 5의 결과로 보아 항염증 효과가 가장 우수한 분획추출물은 클로로포름 분획추출물인 SRC-2, SRC-3, SRC-4인 것으로 나타났다.
- [0087] [실시예 5]
- [0088] 상기 실시예 3 및 4에 실험에 의해 항산화 활성 및 항염증효과가 우수한 SRC-2, SRC-3, SRC-4에 대한 HPLC을 분석하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

도면

도면1



클로로포름 분획(SRC)의 QDS 크로마토그래피 분획에 대한 TLC 패턴 (고정상, QDS; 용매 MeOH : Water = 7:1, (a) I₂ chamber 이용 발색, (b) DPPH용액 spray 발색)

도면2

일반명	학명	분획	DPPH	
			100 ppm	10 ppm
큰잎모자반	<i>Sargassum ringgoldianum</i>	MeOH	63.6%	50.7%
		n-Hex (SRH)	43.7%	39.3%
		CHCl ₃ (SRC)	86.3%	56.4%
		BuOH (SRB)	56.2%	32.4%
		H ₂ O (SRW)	32.8%	20.0%

도면3

일반명	학명	분획	DPPH	
			100 ppm	10 ppm
대조군		vitamin C	93.4%	83.6%
큰잎모자반	<i>Sargassum ringgoldianum</i>	SRC-1	71.4%	19.2%
		SRC-2	88.8%	56.0%
		SRC-3	79.0%	72.0%
		SRC-4	79.7%	77.9%
		SRC-5	40.4%	43.7%
		SRC-6	34.1%	31.5%

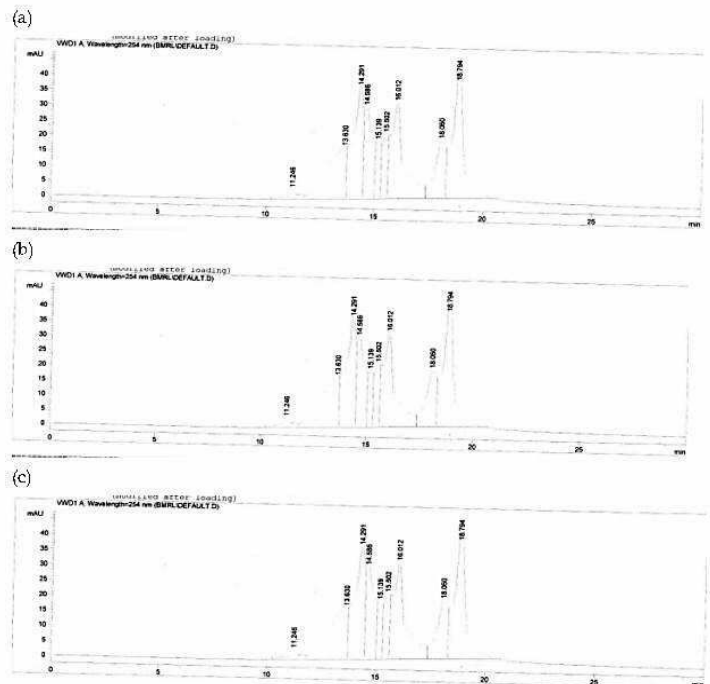
도면4

일반명	학명	분획	NO Assay	
			100 ppm	10 ppm
큰잎모자반	<i>Sargassum ringgoldianum</i>	MeOH	43.3%	22.0%
		n-Hex (SRH)	56.1%	26.5%
		CHCl ₃ (SRC)	92.8%	73.6%
		BuOH (SRB)	20.7%	4.7%
		H ₂ O (SRW)	17.1%	3.9%

도면5

일반명	학명	분획	NO Assay
			10 ppm
큰잎모자반	<i>Sargassum ringgoldianum</i>	SRC-1	7.2%
		SRC-2	67.7%
		SRC-3	86.2%
		SRC-4	79.3%
		SRC-5	31.5%
		SRC-6	19.4%

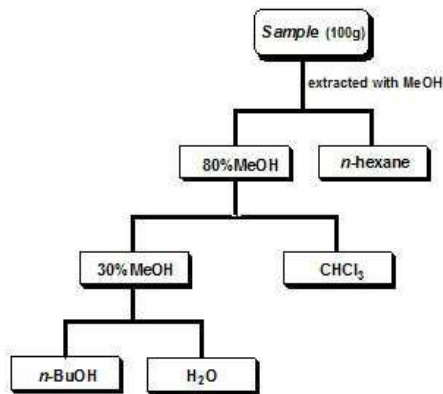
도면6



<도 6> SRC 분획의 HPLC 크로마토그램 (용매조건 90%MeOH, flow rate 1.0ml/min, C-18칼럼 4.6x250 mm), (a) SRC-2; (b) SRC-3; (c) SRC-4.

도면7

7]



[큰잎모자반 용매분획도]