



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0053407  
(43) 공개일자 2017년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/535 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)  
A61K 31/202 (2006.01) A61K 8/36 (2006.01)  
A61K 8/97 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
A61K 36/535 (2013.01)  
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0155873  
(22) 출원일자 2015년11월06일  
심사청구일자 없음

(71) 출원인  
부산대학교 산학협력단  
부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)

(72) 발명자  
조은주  
부산광역시 금정구 중앙대로1929번길 48-1, 102동 2002호(구서동, 신동아아파트)

이아영  
부산광역시 사하구 다대로 473, 108동 205호(다대동, 현대아파트)

이상현  
경기도 안성시 대덕면 서동대로 4726 중앙대학교 905관 9124호

(74) 대리인  
김순용

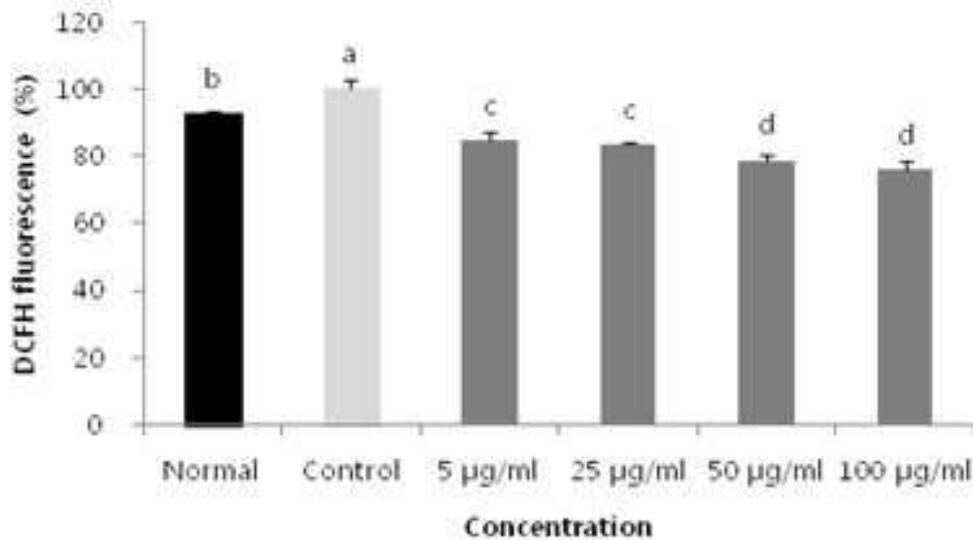
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 들깨유 유래 α-리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 들깨유 유래 α-리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 오메가-3 불포화지방산인 α-리놀렌산을 들깨유로부터 고순도로 다량 분리 정제하고, 이렇게 분리 정제된 α-리놀렌산을 유효성분으로 포함하여 항산화, 항염증, 항암, 신경세포보호 효과를 가지는 약학, 식품, 화장품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

- A61K 31/202 (2013.01)
- A61K 8/361 (2013.01)
- A61K 8/97 (2013.01)
- A61Q 19/00 (2013.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/30 (2013.01)
- A23V 2200/308 (2013.01)
- A23V 2250/1874 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ01015603
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	공동연구사업_농축산물 부가가치 향상 기술개발
연구과제명	(AROMI)들깨 리놀렌산의 인지능 개선 in vitro 및 in vivo실험 및 작용 메카니즘 연구
기여율	1/1
주관기관	부산대학교 산학협력단
연구기간	2015.01.01 ~ 2015.12.31

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

들깨유 유래 α-리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 향산화, 항염증, 항암 또는 신경세포보호용 약학 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 들깨유 유래 α-리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 들깨유로부터 고순도로 다량 분리 정제된 α-리놀렌산을 유효성분으로 포함하여 향산화, 항염증, 항암, 신경세포보호 효과를 가지는 약학, 식품, 화장품 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 들깨(*Perilla frutescens* var. *japonica*)는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 여러해살이풀로 한국과 일본을 포함한 아시아가 원산지이며, 식용, 약용으로 다양하게 이용되어져 왔다. 들깨는 잎을 식용하거나, 종자를 생으로 또는 볶아서 여러 음식을 만드는데 사용하기도 하고, 압착하여 들깨유를 얻기도 한다. 또한 지방질, 단백질, 탄수화물 등 3대 영양소를 고루 갖고 있다. 특히, 들깨는 오메가-3 지방산의 일종인 α-리놀렌산(ALA, C18:3)이 전체 지방산의 60% 이상을 차지하고 있으며, 어유에 비해 상대적으로 ALA가 3배 정도 함유되어 있을 뿐만 아니라 혈액 내 지방과 혈압의 강하로 혈압 저하, 혈전증 개선에 대한 효과가 밝혀진 바 있다. 이렇듯 포화지방산의 함량이 낮은 반면 불포화 지방산인의 함량이 매우 높아 동물성 지방질의 섭취로 문제가 되는 동맥 경화, 고혈압 등의 질병을 감소시키고 치료할 수 있다고 보고되고 있다.

[0003] ALA, 에이코사펜타에노산(eicosapentaenoic acid, EPA, C20:5), 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, DHA, C22:6)은 오메가-3계의 고도불포화지방산으로 EPA, DHA는 어유에 특징적으로 많이 들어 있으며, ALA는 들깨유, 아마씨유와 같은 식물성 유지에 많이 들어있다. 오메가-3 지방산은 동맥경화, 암세포 증식 억제 등의 생리적 효과가 있어 건강기능식품으로 널리 이용되고 있다.

[0004] 들깨유의 주성분인 ALA는 체내에서 합성되지 않기 때문에 반드시 음식으로부터 섭취해야하는 필수지방산이며, EPA와 DHA로 전환되는 전구물질로, 부족할 경우 두뇌와 망막에 필요한 DHA가 부족해 학습능력과 시각능력이 떨어지게 된다는 보고가 있다. 그러나 ALA 그 자체로서의 생리효능에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 게다가, 오메가-3 고도불포화지방산의 생리활성에 대한 종래 기술은 어유로부터 분리한 EPA와 DHA에 초점이 맞춰져 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0005] (특허문헌 0001) 국내특허출원 제10-2000-0003540호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자, 본 발명은 들깨유로부터 고순도로 분리정제된 α-리놀렌산을 유효성분으로 포함하여 향산화, 항염증, 항암, 신경세포보호용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 들깨유 유래 α-리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 향산화, 항염증, 항암 또는 신경세포보호용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 들깨유 유래  $\alpha$ -리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 향산화, 항염증, 항암 또는 신경세포보호용 식품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 들깨유 유래  $\alpha$ -리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 향산화 또는 항염증용 화장품 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0010] 본 발명에 따르면 들깨유로부터  $\alpha$ -리놀렌산을 고순도로 다량 분리 정제하여, 이를 이용한 향산화, 항염증, 항암, 신경세포보호 효과를 가지는 약학, 식품, 화장품 조성물을 제공할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0011] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따라 들깨유로부터 분리한 시료의 GC-FID 성분분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 들깨유로부터 분리한 시료를 이용하여 피로갈들을 처리한 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서의 세포 생존율을 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 들깨유로부터 분리한 시료를 이용하여 SIN-1을 처리하여 산화적 스트레스가 유도된 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서의 세포 생존율을 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 들깨유로부터 분리한 시료를 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 산화적 스트레스가 유발된 C6 골세포에서의 세포 생존율을 나타낸 도이다.
- 도 5는 본 발명의 일실시예에 따라 들깨유로부터 분리한 시료를 이용하여 시간에 따른 C6 골세포에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 ROS 생성 억제 효과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 본 발명의 일실시예에 따라 들깨유로부터 분리한 시료를 이용하여 C6 골세포에서의 ROS 생성 억제율을 나타낸 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0012] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0013] 본 발명은 들깨유로부터  $\alpha$ -리놀렌산을 고순도로 다량 분리 정제하고, 이렇게 분리 정제된  $\alpha$ -리놀렌산의 향산화, 항염증, 항암 및 신경세포보호 활성을 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 들깨유는 통상 들깨로부터 지방유를 추출하는 방법, 예를 들어 용제법, 압착법 SFE-CO<sub>2</sub>법 등의 방법으로 추출하여 사용할 수도 있고, 시판하는 제품을 구매하여 사용할 수도 있다.
- [0015] 들깨유로부터  $\alpha$ -리놀렌산을 분리 정제하는 방법 또한 통상의 방법으로 수행될 수 있으나, 특히 본 발명에서는 다음과 같은 방법으로  $\alpha$ -리놀렌산을 분리 정제하여 고순도의  $\alpha$ -리놀렌산을 다량 분리하고자 한다.
- [0016] 먼저, 들깨유를 MPLC를 이용하여 n-헥산으로 용출한 뒤 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 용출한 다음, 상기 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 정유만을 모아 농축하고, 이 농축액에 MeOH, KOH를 첨가하여 반응시킨다. 이어서, MeOH에 요소에 가하여 충분히 용해시킨 뒤, 상기 반응액을 첨가하여 냉장 온도에서 약 24시간 동안 유지시킨다. 24시간 후, 침전물을 걸러내고, pH가 2~3이 될 때까지 염산을 첨가한다. 그 다음 지방산 첨가를 위해 n-헥산, 에틸에테르를 첨가하여 충분히시킨 후 상층은 걸러내고, 남은 반응물로부터 불순물 및 용매를 제거하여 수득할 수 있다.
- [0017] 이렇게 분리 정제된 들깨유 유래  $\alpha$ -리놀렌산은 기존의 들깨유로부터  $\alpha$ -리놀렌산을 분리하던 방법들과 대비하여 고순도의  $\alpha$ -리놀렌산을 다량으로 분리해낼 수 있다.
- [0018] 상기 들깨유 유래  $\alpha$ -리놀렌산은 향산화, 항염증, 항암, 신경세포보호 활성을 가진다.
- [0019] 이에 본 발명은 들깨유 유래  $\alpha$ -리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 향산화, 항염증, 항암 또는 신경세포보호용 약학 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제

제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명은 약학 조성물은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학 조성물은 1~10,000mg/kg/day, 바람직하게는 1~200mg/kg/day의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다.
- [0023] 본 발명의 약학 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0024] 또한 본 발명의 조성물은 항산화, 항염증, 항암 또는 신경세포보호를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 또는 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명은 들깨유 유래  $\alpha$ -리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 항산화, 항염증, 항암 또는 신경세포보호용 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 감국 추출물 또는 분획물이 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 들깨유 유래  $\alpha$ -리놀렌산을 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0026] 또한 상기 유효성분인 들깨유 유래  $\alpha$ -리놀렌산의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 변경될 수 있음은 물론이다.
- [0027] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 감국 추출물 또는 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0028] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린 등의 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다.
- [0029] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음

료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지는 않는다.

- [0030] 또한 본 발명은 들깨유 유래  $\alpha$ -리놀렌산을 유효성분으로 포함하는 항산화 또는 항염증용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 유효성분 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 사용되는 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 향료 등과 같은 통상적인 보조제 및 담체가 더 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 화장료 조성물에는 글리세린, 부틸렌 글라이콜, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 토크페릴 아세테이트, 시트릭산, 판테놀, 스쿠알란, 소듐 시트레이트, 알란토인 등의 보조성분이 추가로 더 포함될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 화장료 조성물은 기본적으로 피부에 도포되는 것이므로, 당업계의 화장료 조성물을 참조하여 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 마스크팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 등이 포함될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트, 폴리아미드 파우더 등이 포함될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄, 디메틸 에테르 등의 추진체를 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로 용매, 용해화제, 유탁화제 등이 포함될 수 있고, 구체적으로 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 등이 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로 물, 에탄올, 프로필렌글리콜 등의 액상 희석제; 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 등의 현탁제; 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록사이드, 벤토나이트, 아가, 트라칸트 등이 포함될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린유도체, 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 포함될 수 있다.
- [0038] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세하게 설명할 것이나, 이들 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것으로 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0039] 실시예 1. 들깨유로부터  $\alpha$ -리놀렌산의 분리정제
- [0040] 정유된 들깨유를 MPLC를 이용하여 *n*-Hexane 100%조건으로 용출한 뒤, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%조건으로 용출하였다. 상기 용출한 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%의 정유만을 모두 합쳐 농축하여 정유를 얻었다. 상기 농축한 정유 20g에 MeOH 10mL, KOH 2g을 첨가하여, 항온 수조에서 65~70°C의 온도로 약 1시간 동안 반응시켰다. 요소 2g에 MeOH 10mL을 첨가하여 충분히 용해시킨 뒤, 상기 반응시킨 정유 2g을 첨가하여 냉장고에 약 24시간 동안 유지하였다. 24시간 후 침전물을 여과지를 이용하여 걸러낸 뒤 pH 2~3가 될 때까지 염산(HCl)을 첨가하였다. 그 다음, 지방산을 첨가하기 위하여 *n*-Hexane 10mL 및 에틸에테르 5mL를 첨가하였다. 층분리 후 상층을 걸러내고 무수황산나트륨(anhydrous sodium sulfate)을 이용하여 10~15분간 유지하여 불순물을 제거하였다. 이어서 무수황산나트륨을 제거하고, 질소를 이용하여 용매를 제거하였다.
- [0041] 상기 들깨유로부터 분리된 시료 3~5mg, 수산화나트륨 비드(Sodium hydroxide beads) 20mg, 아이오딘화메틸(iodomethane) 0.1mL 및 DMSO 0.5mL를 30분간 반응시킨 뒤 증류수와 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 이용하여 분획하였다. 1시간 뒤

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층을 E-튜브에 담아 질소를 이용하여 용매를 증발시킨 시료를 분석하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0042] 도 1에 나타낸 바와 같이, α-리놀렌산의 함량이 79.892%로 γ-리놀렌산과 대비하여 현저히 많음을 확인할 수 있었다.

[0043] 실시예 2. 항산화 효과(DPPH 소거능)

[0044] 상기 실시예 1에서 분리된 시료 100 μL와 60 μM DPPH 용액 100 μL을 96 웰 플레이트에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Concentration (μg/ml)	Scavenging activity (%)
125	9.57 ± 2.74 <sup>a</sup>
250	15.72 ± 2.79 <sup>b</sup>
500	21.87 ± 3.74 <sup>a</sup>
L-Ascorbic acid <sup>1)</sup>	
IC <sub>50</sub> (μM)	0.37 ± 0.05

<sup>1)</sup>Values are mean ± SD

<sup>a,b)</sup>Means with different letters are significantly different (P < 0.05) by Duncan's multiple range test.

[0045]

[0046] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 들깨유에서 분리 정제된 α-리놀렌산의 DPPH 라디칼 소거 활성은 농도가 증가할수록 증가하였으며, 500 μg/mL의 농도로 처리 시 21.87%의 소거능을 나타내어 본 발명의 들깨유 유래 α-리놀렌산이 DPPH 라디칼에 대한 보호 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0047] 실시예 2. 항산화 효과(·OH 소거능)

[0048] Fenton 반응에 따라 10mM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O-EDTA에 10mM의 2-데옥시리보스(deoxyribose) 용액과 상기 실시예 1에서 분리한 시료를 혼합한 다음, 10mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이 혼합액에 트리클로로아세트산 2.8중량%와 트리바르비톨산 용액 1중량%를 각각 첨가하여 10분간 가열한 후 냉각시켜 540nm에서 흡광도를 측정하고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Concentration (μg/mL)	Scavenging activity (%)
5	51.45 ± 0.19 <sup>a</sup>
10	73.73 ± 0.09 <sup>b</sup>
25	80.70 ± 0.03 <sup>a</sup>

<sup>a,b)</sup>Values are mean ± SD

<sup>a,b)</sup>Means with different letters are significantly different (P < 0.05) by Duncan's multiple range test.

[0049]

[0050] 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 들깨유에서 분리 정제된 α-리놀렌산의 ·OH 소거능은 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 25 μg/mL의 낮은 농도에서 80.70%를 나타내어 본 발명의 들깨유 유래 α-리놀렌산은 ·OH radical 소거 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[0051] 실시예 3. LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서 피로갈롤에 대한 산화적 스트레스 개선 효과

[0052] LLC-PK<sub>1</sub> 돼지 콩팥 상피 세포(porcine renal epithelial cell)를 DMEM(Dulbecco's modified eagle's media)에 5% FBS 및 10,000units/mL PS(penicillin-streptomycin)을 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

[0053] 상기 배양된 세포는 96 웰 플레이트에 분주하여 세포를 부착시킨 뒤 세포에서 NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup>의 자유라디칼을 유발하는 제너레이터인 소듐 니트로프루사이드(sodium nitriprusside) 500 μM, 피로갈롤(pyrogallol) 250 μM, 3-모폴리노사이드논이민(morpholinostydonimine) 1mM을 각각 처리하고, 24시간 뒤 상기 실시예 1에서 분리한 시

료를 처리한 후 MTT 분석법에 의해 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0054] 피로갈롤을 처리한 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서 α-리놀렌산의 산화적 스트레스 개선 효과를 세포 생존율로 나타낸 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 피로갈롤만을 처리한 대조군의 경우 51.55%의 세포 생존율을 보였으나, 실시예 1의 α-리놀렌산을 처리하였을 때 세포 생존율이 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 5 μg/mL의 낮은 농도에서 58.49%의 세포 생존율을 보여 본 발명에 따른 α-리놀렌산은 피로갈롤에 의한 LLC-PK<sub>1</sub> 세포의 산화적 스트레스 개선 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0055] 실시예 4. LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서 SIN-1에 대한 산화적 스트레스 개선 효과

[0056] 상기 실시예 3에서 배양된 LLC-PK<sub>1</sub> 세포에 SIN-1을 처리하여 산화적 스트레스를 유발시킨 후 이에 대한 α-리놀렌산의 보호 효과를 세포 생존율을 통해 살펴보았다.

[0057] 그 결과는 도 3에 나타낸 바와 같이, SIN-1만을 처리한 대조군에서는 세포 손상으로 생존율이 79.89%로 감소한 반면, 실시예 1의 α-리놀렌산을 100 μg/mL 농도로 처리한 경우 81.02%의 세포 생존율을 보여 산화적 스트레스 개선 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0058] 실시예 5. 항염증 효과

[0059] RAW264.7 마우스 대식세포를 DMEM에 10% FBS와 1% PS를 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 상기 배양된 세포를 24 웰 플레이트에 분주한 후 세포에 상기 실시예 1에서 분리한 시료를 처리하고, 24시간 후 1 μg/mL의 LPS와 10ng/mL의 IFN-γ를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하여 세포 내 독소를 유도하였다. 상기 세포의 상층액을 취하여 그리스 시약과 1:1로 반응시켜 세포의 NO생성 억제율을 측정하고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

Concentration (μg/ml)	NO generation (%)
5	99.53 ± 1.11 <sup>a</sup>
25	96.92 ± 1.52 <sup>b</sup>
50	84.33 ± 2.30 <sup>c</sup>
100	82.85 ± 1.59 <sup>c</sup>
AMT <sup>D</sup>	58.60 ± 0.99
Control	100.00 ± 0.55 <sup>a</sup>
Normal	64.10 ± 1.15 <sup>d</sup>

Values are mean ± SD

<sup>a-d</sup>Means with different letters are significantly different (*P* < 0.05) by Duncan's multiple range test.

[0060]

[0061] LPS 자극에 의해 NO가 과량 발생하게 되면 세포 독성뿐만 아니라, 염증반응 및 종양 발생 등에도 관여한다. 이에 RAW 264.7 대식세포에 내독소인 LPS를 처리하여 α-리놀렌산의 항염증 효과를 알아보았다. 그 결과, 상기 표 3에 나타낸 바와 같이 LPS 처리로 유발된 NO 생성량에 대한 α-리놀렌산의 효과를 살펴보면 대조군을 100%로 보았을 때 normal군은 64.10%를 나타내었으며, 본 발명의 α-리놀렌산은 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소함을 확인할 수 있었다. 특히, α-리놀렌산을 50, 100 μg/ml의 농도를 처리한 군에서 각각 84.33%, 82.85%를 나타내어, 본 발명의 α-리놀렌산이 LPS-자극유도된 RAW264.7 대식세포에서 NO생성을 감소시켜 항염증 효과를 나타낼 것임을 알 수 있었다.

[0062] 실시예 6. 항암 효과

[0063] AGS 인체 위암 세포(human gastric adenocarcinoma cell)를 10% FBS와 1% PS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포를 96 웰 플레이트에 분주하고 세포 부착 후, 상기 실시예 1에서 분리한 시료를 일정 농도로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 그 다음 5mg/mL의 MTT 용액 200 μL를 첨가하여 4시간 후 생성된 포르마잔 결정을 DMSO에 녹여서 540nm에서 흡광도를 측정하고, 그 결과를 하기 표 4에 나

타내었다.

표 4

Concentration (μg/ml)	Growth inhibition rate (%)
5	1.14 ± 5.13 <sup>a</sup>
25	30.97 ± 2.97 <sup>d</sup>
50	12.88 ± 3.61 <sup>b</sup>
100	17.97 ± 2.54 <sup>c</sup>
5-FU <sup>1)</sup>	32.82 ± 3.32

Values are mean ± SD

<sup>a-d</sup>Means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

[0064]

[0065]

AGS 인체 위암세포 성장 억제율을 측정한 결과, 상기 표 4에 나타낸 바와 같이 α-리놀렌산을 처리하였을 때 위암세포의 세포 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 25 μg/mL의 농도에서 normal 100% 대비 30.97%의 위암세포 성장 억제율을 나타내어 본 발명의 α-리놀렌산은 항암 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0066]

실시예 7. 신경세포 보호효과

[0067]

7-1. C6 교세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 세포 생존율

[0068]

C6 교세포(glia cell)를 10% FBS와 1% PS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 상기 배양된 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well로 96 웰 플레이트에 분주하고 안정화된 후, 상기 실시예 1에서 분리한 시료를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 25 μM Aβ를 처리하여 산화적스트레스로 인한 신경세포 손상을 유도하였다. 이어서, 상기 세포에 5mg/mL의 MTT 용액 200 μL를 첨가하여 4시간 후 생성된 포르마잔 결정을 DMSO에 녹여서 540nm에서 흡광도를 측정하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0069]

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 산화적 스트레스가 유발된 C6 글세포에 대한 α-리놀렌산의 보호효과를 측정한 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 normal군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 대조군에서는 14.38%를 나타내어 산화적 스트레스가 유발된 것을 확인할 수 있었다. 반면 본 발명의 α-리놀렌산을 처리한 군은 농도가 증가할수록 세포 생존율이 증가하였으며, 특히 100 μg/mL의 농도에서 57.95%의 가장 높은 세포 생존율을 보여 본 발명의 α-리놀렌산이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포 손상에 대하여 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0070]

7-2. C6 글세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 ROS 생성 억제율

[0071]

상기 7-1에서 신경세포 손상을 유도한 세포의 자유라디칼 생성을 DCFDA 법을 통하여 측정하였다. 먼저, 80 μM의 DCFDA 용액을 각 웰에 주입하여 37°C에서 30분 동안 배양한 후 형광조건에서 ex.480nm, em.535nm로 측정하고, 그 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.

[0072]

세포 내 과산화수소를 측정하는 대표적 물질인 DCF-DA는 세포막을 통과하여 세포 내 에스테라아제에 의해 비형광성 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소종인 과산화수소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF가 된다. 이러한 원리를 이용하여 α-리놀렌산의 세포 내 활성산소종 억제 효과를 알아보았다.

[0073]

그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 시간이 지남에 따라 모든 군에서 ROS 생성량이 증가하는 것을 보였으며, 이를 통해 산화적 스트레스가 유발됨을 알 수 있었다. 또한 도 6은 60분 기준으로 ROS 생성 억제 효과를 나타낸 것으로, 대조군을 100%로 하였을 때 α-리놀렌산을 농도별로 처리한 결과 농도 의존적으로 ROS 생성율을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 100 μg/mL의 농도에서 76.30%의 ROS 생성율을 나타내어, 본 발명의 α-리놀렌산은 신경세포사멸 보호 효과 및 세포 내 ROS 소거능과 상관관계가 있으며, 이러한 활성이 ROS에 의해 야기되는 세포 사멸에 대한 보호 작용의 역할을 할 것임을 확인할 수 있었다.

[0074]

제제예 1. 약학 제제의 제조

[0075]

산제 제조

[0076]

들깨유 유래 α-리놀렌산 20mg, 유당 100mg 및 탈트 10mg을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

- [0077] 정제 제조
- [0078] 들깨유 유래 α-리놀렌산 10mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0079] 캡슐제 제조
- [0080] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 들깨유 유래 α-리놀렌산 10mg, 결정성 셀룰로오스 3mg, 락토오스 14.8mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.2mg을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0081] 주사제 제조
- [0082] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1앰플당(2mL) 들깨유 유래 α-리놀렌산 10mg, 만니톨 180mg, 주사용 멸균 증류수 2,974mg 및 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 26mg으로 제조하였다.
- [0083] 액제 제조
- [0084] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 들깨유 유래 α-리놀렌산 20mg, 이성화당 10g 및 만니톨 5g을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합하였다. 그 다음 정제수를 더 가하여 전체 100mL로 조절한 후 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.
- [0085] 제제예 2. 식품 제제의 제조
- [0086] 건강식품 제조
- [0087] 들깨유 유래 α-리놀렌산 100mg, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3mg, 제1인산칼슘 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼슘 90mg, 탄산칼슘 100mg 및 염화마그네슘 24.8mg을 혼합한 다음, 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다. 이때, 상기 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.
- [0088] 건강음료 제조
- [0089] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 들깨유 유래 α-리놀렌산 100mg, 비타민 C 15g, 비타민 E(분말) 100g, 젖산철 19.75g, 산화아연 3.5g, 니코틴산아미드 3.5g, 비타민 A 0.2g, 비타민 B1 0.25g, 비타민 B2 0.3g 및 정량의 물을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하여 건강음료를 제조하였다. 이때, 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.
- [0090] 제조예 1. 화장품 제제 제조
- [0091] 유연화장수 제조
- [0092] 들깨유 유래 α-리놀렌산을 이용하여 하기 표 5에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 유연화장수를 제조하였다.

표 5

성분	함량(중량%)
들깨유 유래 α-리놀렌산	0.5
1,3-부틸렌글리콜	5.2
올레일알코올	15
에탄올	3.2
폴리솔베이트 20	3.2
벤조페논-9	2.0
카르복실비닐폴리머	1.0
글리세린	3.5
향	미량

방부제	미량
정제수	잔량
계	100

[0094] 제조예 2. 밀크로션 제조

[0095] 들깨유 유래 α-리놀렌산을 이용하여 하기 표 6에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 밀크로션을 제조하였다.

표 6

[0096]

성분	함량(중량%)
들깨유 유래 α-리놀렌산	0.6
글리세린	5.1
프로필렌글리콜	4.2
토코페릴아세테이트	3.0
유동과라핀	4.6
트리에탄올아민	1.0
스쿠알란	3.1
마카다미아너트오일	2.5
폴리솔베이트 60	1.6
솔비탄세스퀴올레이트	1.6
프로필파라벤	0.6
카르복실비닐폴리머	1.5
향	미량
방부제	미량
정제수	잔량
계	100

[0097] 제조예 3. 영양크림 제조

[0098] 들깨유 유래 α-리놀렌산을 이용하여 하기 표 7에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 영양크림을 제조하였다.

표 7

[0099]

성분	함량(중량%)
들깨유 유래 α-리놀렌산	1.0
글리세린	4.0
바셀린	3.5
트리에탄올아민	2.1
유동과라핀	53
스쿠알란	3.0
밀납	2.6
토코페릴아세테이트	5.4
폴리솔베이트 60	3.2
카르복실비닐폴리머	1.0
솔비탄세스퀴올레이트	3.1
향	미량
방부제	미량
정제수	잔량
합계	100

[0100] 제조예 4. 마사지크림 제조

[0101] 들깨유 유래 α-리놀렌산을 이용하여 하기 표 8에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 마사지크림을 제조하였다.

표 8

[0102]

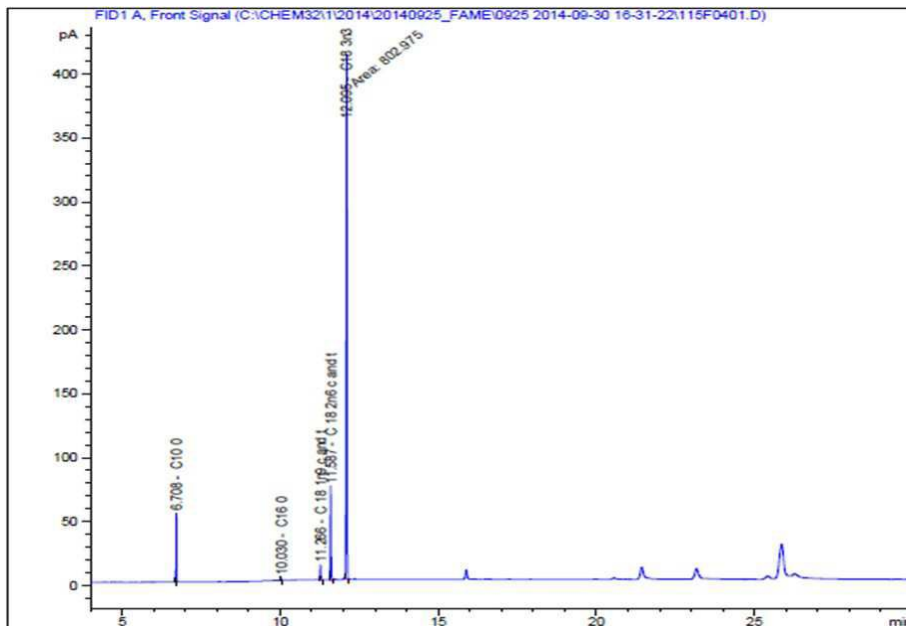
성분	함량(중량%)
들깨유 유래 $\alpha$ -리놀렌산	0.5
글리세린	4.0
바셀린	3.5
트리에탄올아민	0.5
유동과라핀	24.0
스쿠알란	3.0
밀납	2.1
토코페릴아세테이트	0.1
폴리솔베이트 60	2.4
카르복실비닐폴리머	1.0
솔비탄세스퀴올레이트	2.3
향	미량
방부제	미량
정제수	잔량
계	100

[0103]

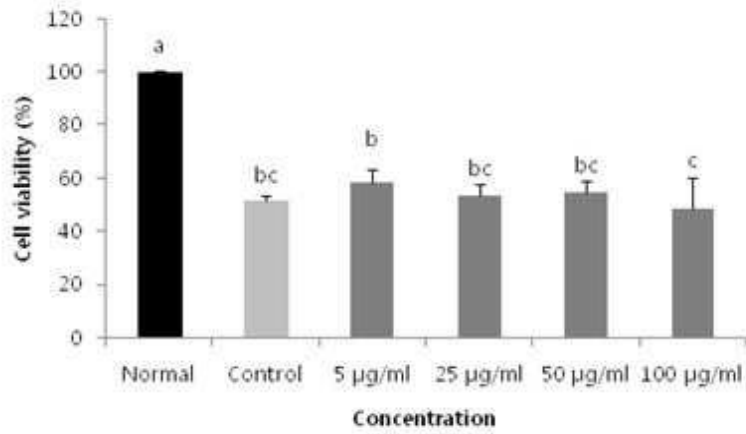
비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

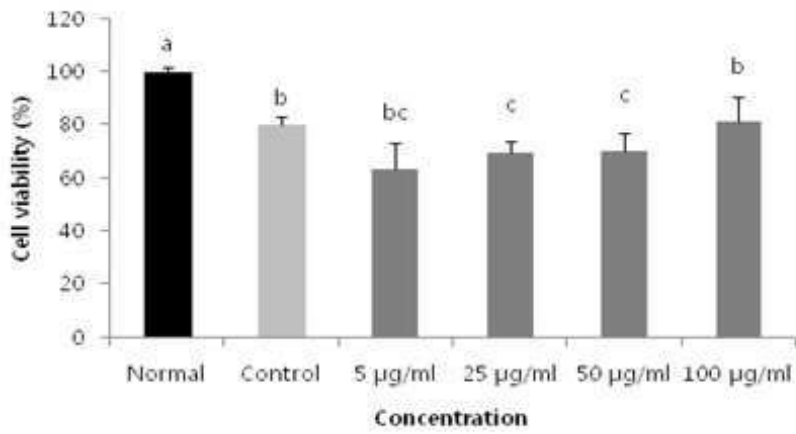
도면1



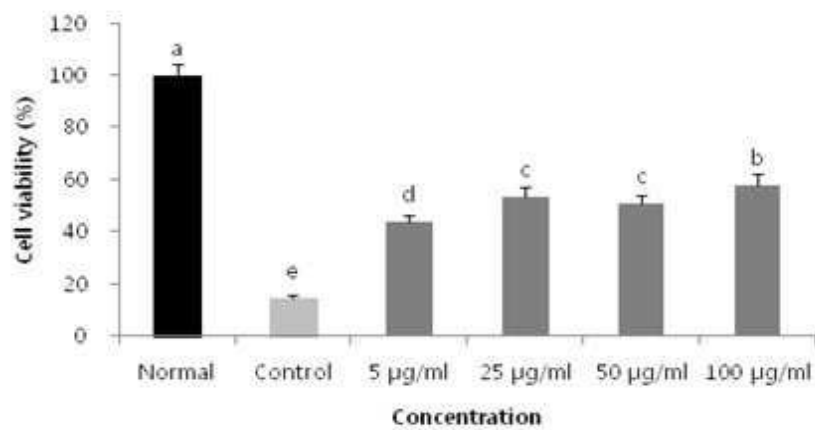
도면2



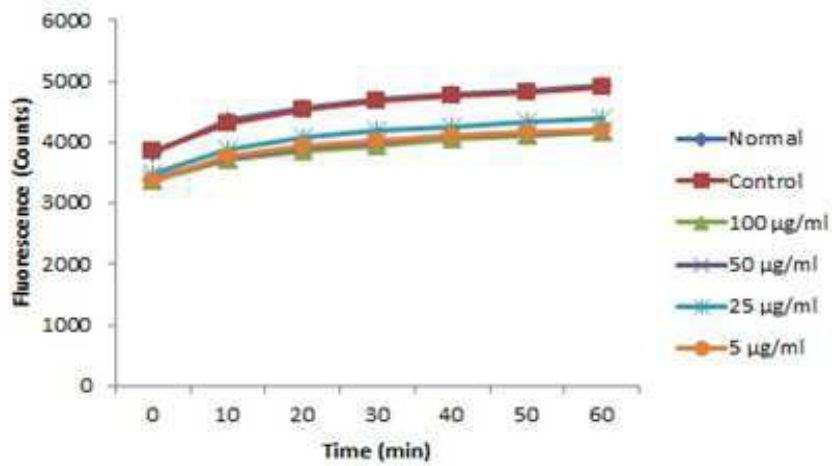
도면3



도면4



도면5



도면6

