



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0121308
(43) 공개일자 2012년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/03 (2006.01) A61P 25/32 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0039212

(22) 출원일자 2011년04월26일

심사청구일자 2011년04월26일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

김형탁

부산광역시 남구 황령대로319번길 26, 104동 210
2호 (대연동, 대연경동메르빌아파트)

이민섭

부산광역시 해운대구 해운대로383번길 119-14 (우
동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김일성

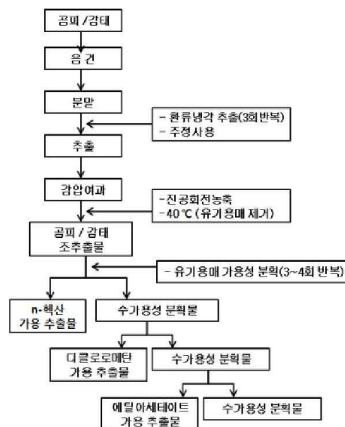
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 알콜성 간손상에 대한 간보호 활성을 지닌 곰피 또는 감태의 주정 추출물과 그로부터 분리한
플로로탄닌류를 함유하는 간보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 곰피 또는 감태 주정 추출물로부터 분리된 플로로탄닌류를 함유하는 알콜성 간손상에 대한 간보호용
조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 곰피 또는 감태 주정 추출물에 함유된 플로로탄닌류가 알콜에 의한
HepG2 간세포 손상에 대하여 간세포 사멸 억제효과를 갖는 간 보호용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

신태선

전라남도 여주시 신월로 561-8, 금호아파트 12동
502호 (신월동)

변대석

부산광역시 남구 오륙도로 85, 오륙도SKVIEW아파트
105동 3304호 (용호동)

최재수

부산광역시 해운대구 대천로 187, 화목아파트 105
동 1502호 (좌동)

특허청구의 범위

청구항 1

곰피 또는 감태의 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 알콜에 의한 간세포 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 간 보호용 약학 조성물

청구항 2

곰피 또는 감태의 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 알콜에 의한 간세포 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 간 보호용 건강식품 조성물

청구항 3

곰피 또는 감태의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리?정제된 플로로탄닌 화합물을 유효성분으로 함유하는 알콜에 의한 간세포 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 간 보호용 약학 조성물

청구항 4

제 3항에 있어서,

플로로탄닌 화합물은 에콜(eckol), 디에콜(dieckol), 디옥시노디하이드로에콜(dioxinodehydroeckol), 플로로푸코푸로에콜 에이(phlorofucofuroeckol A), 플로로푸코푸로에콜 비(phlorofucofuroeckol B)로 이루어진 화합물군으로부터 선택된 하나의 또는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 알콜에 의한 간세포 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 간 보호용 약학 조성물

청구항 5

곰피 또는 감태의 에틸아세테이트 분획물로부터 분리?정제된 플로로탄닌 화합물을 유효성분으로 함유하는 알콜에 의한 간세포 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 간 보호용 건강식품 조성물

청구항 6

제 5항에 있어서,

플로로탄닌 화합물은 에콜(eckol), 디에콜(dieckol), 디옥시노디하이드로에콜(dioxinodehydroeckol), 플로로푸코푸로에콜 에이(phlorofucofuroeckol A), 플로로푸코푸로에콜 비(phlorofucofuroeckol B)로 이루어진 화합물군으로부터 선택된 하나의 또는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 알콜에 의한 간세포 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 간 보호용 건강식품 조성물

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 곰피 (Ecklonia stolonifera) 또는 감태 (Ecklonia cava) 주정 추출물로부터 분리된 플로로탄닌류를 함유하는 알콜성 간손상에 대한 간보호용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 곰피 또는 감태 주정 추출물에 함유된 플로로탄닌류가 알콜에 의한 HepG2 간세포 손상에 대하여 간세포 사멸 억제효과를 갖는 간 보호

용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 간은 내장기관에서 중요한 대사 작용을 비롯하여 글리코겐 저장, 적혈구 분해, 혈장 단백질 합성, 해독 작용과 같은 다양한 기능을 가지고 있다. 간은 이물질 섭취에 의한 피해를 막는 1차 방어기관이기 때문에 간 기능이 떨어짐으로써 바이러스나 여러 가지 약물 등에 의해 심한 질환을 일으킬 수 있다. 간에 대하여 독성을 가지는 약물들은 간질환의 주요 원인이기도 하며 심한 간질환 중 대략 절반 정도가 약에 의해 발생하며 대부분이 만성적인 간질환으로 된다.
- [0003] 우리나라는 만성 간질환의 만연지역으로 중추 경제 인구인 30~50대의 사망원인 중 만성 간질환이 2~4위의 높은 비율로 나타나고 있는 실정이다. 특히 노령화 사회로 빠르게 진행됨으로써 에너지 대사 및 독성 물질 대사 기관인 간의 노화로 신체 기능이 급격히 저하되어 치명적인 결과를 초래한다.
- [0004] 만성적인 간 기능의 상실은 무자각성으로 인체의 방어 작용과 해독 작용을 상실하므로, 안전하고 부작용이 없는 간 보호 효과가 있는 건강기능식품 개발이 필요하다. 해조류 추출물을 대상으로 간 보호 활성을 측정한 결과 곰피와 감태 추출물은 양성대조군으로 사용된 실리마린 보다 높은 활성을 나타내었다. 따라서 우리나라 연안에 다량으로 자생하고 있는 다년생의 해조류인 곰피와 감태를 소재로 한 간 기능 개선 건강기능식품의 개발이 필요하다.
- [0005] 에탄올(ethanol)은 술의 주성분으로서 신체적, 정신적으로 인체에 미치는 영향이 매우 다양하며 광범위하여 그 대사 과정과 독성 발현 특성에 대한 연구가 진행되어 왔다. 섭취된 에탄올은 소화기관을 통해 흡수되어 섭취 후 20~120분 사이에 최고 혈중 농도에 도달한다. 흡수된 에탄올은 간을 비롯한 모든 장기들에서 대사되는데 일부 (약 10%)는 호흡을 통하여 또는 소변 및 땀으로 배설된다.
- [0006] 정상적인 상태에서 소량의 알코올을 섭취할 경우 간장내로 들어온 에탄올은 세포질 내의 알코올탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH)와 알데히드탈수소효소(aldehyde dehydrogenase, ALDH)의 작용에 의해 아세트에이트로 되어 순환계를 통해 간세포 밖으로 배설된다(Lieber, C.S.. 1984. Alcohol and th liver. Hepatology 4, 1234-1256). 급성 에탄올 투여는 일시적으로 간에서 중성지방 축적을 일으킨다. 이 중 특히 에탄올의 최초 대사산물인 아세트알데히드는 에탄올에 비해 월등히 반응성이 높고 독성이 강하여 알콜성 간 손상의 주원인 물질로 알려져 있다(Weiner, F.R. et al: Ethanol and the liver in the liver Biology and Pathology, ed. Aris, M., Jakoby, W., Popper, H., Strachter D., and Shafritz, D. A. Raven Press Ltd., New York, p1169, 1988). 아세트알데히드는 미토콘드리아 호흡을 방해하고 산화적 인산화 반응을 억제하며, 막단백질 및 콜라겐 단백질(Koskinas, J. et al; Gastroenterology103, p1860, 1992)과도 결합하여 항체를 생성하고, 면역학적으로 세포 독성을 나타내며 간세포(Zetterman, R. K. 1991. Autoimmune manifestation of alcoholic liver diseases. ed. Kravitt, K. I. and Wiesner, R. H. Raven Press, New York, p247.; Takase, S. et al; Hepatology 17, 9, 1993; Yokoyama, H. et al; Hepatology 17, p14, 1993) 분비 단백질의 방출기구를 저해하는 것으로 알려져 있다(Xu, D. S. et al; Alcohol Alcohol24, p281, 1989). 또한 아세트알데히드는 미오피브로블라스트(myofibroblast)의 콜라겐 합성을 촉진하여(Pawlica, E. Etal; Arch. Toxicol.65, p678, 1991) 간 섬유화(Friedman, S. L., Hepatoloogy12, p609, 1990)와 간세포의 변성 증대를 일으키며, 생체내 거대분자와 반응하여 어덕트(adduct)를 형성한다(Barry, R. E.: G. I. Futures Clin. Practive.4, p4, 1989; Lieber, C. S.; Biochem. Soc. Trans. 16, 241, 1988). 에탄올에 의해서 간내에 중성지방이 축적된다. 에탄올에 의한 간 중성지방축적은 간에서 지방산 합성 증가보다는 지방산 산화 억제가 중성지방축적의 중요한자라고 여겨진다(Liber, C. S.; Acta Med. Scan. Suppl.703, p11, 1985; Kim, M. H. and Kwon, O. H., Korean Biochem. J. 25, p499, 1992). 동물실험에 따르면 알콜투여로 인한 혈청중성지방의 증가는 간에서 VLDL(very low density lipoprotein) 생성증가가 원인인 것으로 여겨진다(Baraona, E. and Lieber, C. S., J. Clin. Invest.49, p769, 1970). 인체에 알코올을 경구 또는 정맥주사로 투여하면 혈청에서 중성지방을 함유한 VLDL이 급속히 증가된다(Jone, D. P., Losowsky, M. S., davidson, C. S., J. Lab. Clin. Med. 62, p675. 1963). 또한 인체에 만성적

으로 알콜을 투여해도 알콜투여량과 투여기간에 따라 혈청중성지방수준은 증가된다(Schapiro R. H. et al: J. Clin. Invest. 43, p1338. 1964). 간에서의 중성지방 축적은 간의 대사장애를 반영해 주며, 계속적인 중성지방 축적은 결국 섬유조직의 증식 및 간세포의 손상을 초래한다. 상기 알콜의 대사 결과, 지방산이 많이 만들어져 간에 지방이 축적되는데 이를 '알콜성 지방간'이라고 한다. 이 알콜성 지방간은 특히 만성 간질환으로 진행되는 경우가 많은데, 알콜성 간염이 10-35%에서, 간경변증이 8-20%에서 발생한다고 한다.

[0007] 국내의 간 기능 개선제로는 curcumin을 주성분으로 한 울금, silymarin을 주성분으로 한 엉겅퀴 과에 속하는 Milk Thistle과 Artichoke 추출물, beef leaf와 black radish는 항산화 비타민과 플라보노이드를 주성분으로 하며, 민들레 뿌리와 헛개나무 열매로 만든 제품들이 판매되고 있다. 특히, 현재 식약청에서 간 기능 개선 관련 기능성 원료는 헛개나무, 표고버섯 균사체, Milk Thistle 3 품목으로 원료의 대부분을 수입에 의존하고 있는 실정이다.

[0008] 최근 해조류의 생리활성물질에 관한 연구가 활성화되어 갈조류를 대상으로 플로로탄닌의 여러 가지 생리활성 효과에 관하여 많은 연구가 되고 있으며, 국내외적으로 진행되고 있는 해조류 플로로탄닌의 상품화는 주로 항산화성을 이용한 "Seanol" 제품이 판매되고 있다.

[0009] 곰피와 감태는 갈조식물 다시마목 미역과의 다년생 해조로서, 한국 동해안의 특산물로 무기질을 풍부히 함유하고 있으며 약간 짭은맛이 인기가 좋아 씹이나 무침 등에 많이 사용되고 있다. 곰피의 생리활성으로는 항염증 활성 (Kim et al., J Agric Food Chem, 2009, 57, 3483-3489), 항돌연변이 활성 (Lee et al., J Food Sci Nutr, 1996, 1, 64-68; Lee et al., Nat Prod Sci. 1998, 4, 105-114; Han et al., Environ Mutagen Carcinogen, 2000, 20, 104-111) 및 항산화 활성 (Kang et al., Chem Pharm Bull, 2003, 51, 1012-1014; Jang et al., Arch Pharm Res, 2004, 27, 194-198, Kim et al., J Agric Food Chem, 2009, 57, 3483-3489) 등이 보고되어 있다. 곰피와 관련하여 대한민국 등록특허 제10-0512482호 "항산화 활성을 지닌 곰피 추출물로부터 분리한 플로로탄닌류를 함유하는 조성물"에는 곰피 추출물로부터 엑크스트로놀(eckstolonol), 엑크스트로놀 펜타아세테이트(eckstolonol pentaacetate), 에콜(eckol), 플로로푸코푸로에콜 에이(phlorofucofuroeckol A) 및 디에콜(dieckol)과 같은 플로로탄닌류 화합물을 분리해 낸 후, 이들의 DPPH 라디칼 소거능을 확인함으로써 세포막 지질과산화에 의한 노화 억제용도가 개시되어 있다.

[0010] 하지만 곰피 또는 감태에서 분리된 화합물이 알콜성 간손상에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 발명자들은 상기와 같은 종래의 기술들을 바탕으로 식물 유래의 간 보호용 기능성 식품 원료를 개발하고자 예의 연구를 거듭한 결과 해조류인 다시마목의 곰피 또는 감태로부터 플로로탄닌 성분을 추출해내어 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서 본 발명은 알콜에 의한 HepG2 간세포 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 곰피 또는 감태의 주정 추출물로부터 분리된 플로로탄닌을 유효성분으로 함유하는 간 보호용 건강식품 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 상기 목적은 유기용매를 이용하여 간세포 사멸 억제 활성을 가지는 곰피 또는 감태의 주정추출물로부터 조추출물을 제조하고, 이로부터 에틸아세테이트 가용추출물을 얻고, 에틸아세테이트 가용추출물로부터 신규한 플로로탄닌류 화합물인 에콜(eckol), 디에콜(dieckol), 디옥시노디하이드로에콜(dioxinodehydroeckol), 플로로푸코푸로에콜 에이(phlorofucofuroeckol A, PFF-A)와 플로로푸코푸로에콜 비(phlorofucofuroeckol B, PFF-B)를 분리 정제한 후, 그의 알콜에 의한 간세포 사멸 억제 효과를 검증함으로써 달성하였다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 곰피 또는 감태로부터 분리된 에콜, 디에콜, 디옥시노디하이드로에콜, 플로로푸코푸로에콜 에이와 플로로푸코푸로에콜 비는 HepG2 세포에서 알콜에 의한 HepG2 세포 생존을 감소를 저해하는 효과가 있으므로 간질환 보호용 건강보조식품 조성물 또는 간질환의 예방 및 치료용 약학 조성물로 사용할 수 있는 뛰어난

효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1은 본 발명의 곰피 또는 감태 추출물의 추출과정을 나타낸 흐름도.

도 2는 곰피 주정추출물로 간세포인 Chang과 HepG2에 처리하여 세포에 미치는 영향을 확인한 그림.

도 3은 감태의 주정추출물로 간세포인 Chang과 HepG2에 처리하여 세포에 미치는 영향을 확인한 그림.

도 4는 곰피의 에틸아세테이트 가용 추출물로 간세포인 Chang과 HepG2에 처리하여 세포에 미치는 영향을 확인한 그림.

도 5는 감태의 에틸아세테이트 가용 추출물로 간세포인 Chang과 HepG2에 처리하여 세포에 미치는 영향을 확인한 그림.

도 6은 곰피의 주정추출물과 에틸아세테이트 가용 추출물을 각각 타크린(0.3 mM)과 동시에 처리하여 HepG2에 세포보호 효과를 확인한 도면.

도 7은 감태의 주정추출물과 에틸아세테이트 가용 추출물을 각각 타크린(0.3 mM)과 동시에 처리하여 HepG2에 세포보호 효과를 확인한 도면.

도 8은 실리마린을 타크린(0.3 mM)과 동시에 처리하여 HepG2에 세포보호 효과를 확인한 도면.

도 9는 곰피 또는 감태로부터 분리된 플로로탄닌류 화합물로 간세포인 HepG2와 Chang에 처리하여 세포에 미치는 영향을 확인한 그림.

도 10은 곰피 또는 감태로부터 분리된 플로로탄닌류 화합물로 간세포인 HepG2에 처리하여 1시간 배양한후, 4.5%의 에탄올을 처리하여 HepG2 세포 보호효과를 확인한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

본 발명은 곰피 또는 감태의 주정 추출물로부터 조추출물을 제조하고, 이로부터 분획된 에틸아세테이트 가용추출물을 얻고, 에틸아세테이트 가용추출물로부터 분리된 하기 구조의 신규한 플로로탄닌류 화합물인 에콜(eckol), 디에콜(dieckol), 디옥시노디하이드로에콜(dioxinodehydroeckol), 플로로푸코푸로에콜 에이(phlorofucofuroeckol A, PFF-A)와 플로로푸코푸로에콜 비(phlorofucofuroeckol B, PFF-B)를 분리 정제한 후, 그의 알콜에 의한 간세포 사멸 억제 효과를 검증함으로써 달성하였으며, 하기 구조의 신규 화합물 또는 이의 약학 조성물을 제공한다.

[0016]

상기 곰피 또는 감태 추출물은 조추출물 또는 비극성용매 가용 추출물로서, 조추출물은 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올과 같은 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 에탄올에 가용한 추출물을 포함하며, 비극성 용매 가용추출물은 n-헥산, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 에틸아세테이트로부터 선택된 비극성용매로, 바람직하게는 n-헥산 또는 에틸아세테이트로 추출한 것을 포함한다.

[0017]

이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0018]

본 발명의 곰피 또는 감태 조추출물 및 비극성용매 가용추출물로부터 분리되는 플로로탄닌류의 화합물은 하기와 같이 수득될 수 있다.

[0019]

본 발명의 곰피 또는 감태 조추출물은 곰피 또는 감태를 음지에서 자연건조 후 마쇄하여 분말화한 후, 곰피 또는 감태 건조 중량의 약 3 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올과 같은 저급 알코올 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매로, 바람직하게는 주정으로 20 내지 100, 바람직하게는 20 내지 70의 추출 온도에서 약 0.5시간 내지 2일, 바람직하게는 1시간 내지 1일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법으로 1회 내지 5회, 바람직하게는 3

회 연속 추출하여 수득한 후, 감압여과하고 여액을 진공회전농축기 20 내지 100, 바람직하게는 40 내지 70에서 감압 농축하여 물, 저급알코올 또는 이들의 혼합용매에 가용한 곰피 또는 감태 조추출물을 수득할 수 있다.

[0020] 상기 곰피 또는 감태 조추출물은 물에 현탁한 후, n-헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, n-부탄올 순으로 용매를 이용하여 추출하여 본 발명의 곰피 또는 감태 비극성용매 가용 추출물, 바람직하게는 에틸아세테이트 가용성 분획물을 수득할 수 있고, 더욱 구체적으로는 곰피 또는 감태 조추출물 즉, 곰피 또는 감태 주정 추출물에 n-헥산:물:에탄올을 일정 비율, 바람직하게는 10:9:1로 혼합하여 n-헥산 가용성 분획물 및 물 가용성 분획물을 수득할 수 있고, 다시 상기 물가용성 분획물을 디클로로메탄으로 추출하여 물가용성 분획물 및 디클로로메탄 가용성 분획물을 수득할 수 있으며, 이 물가용성 분획물에 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 가용성 분획물 및 물가용성 분획물을 수득할 수 있고, 마지막으로 상기 물가용성 분획물을 부탄올로 추출하여 부탄올가용성 분획물과 물가용성 분획물을 수득할 수 있다.

[0021] 상기 비극성 용매 가용성 분획물에 대하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (SiO₂ column chromatography)를 수행할 수 있으며, 에틸아세테이트:메탄올의 혼합 용매, 바람직하게는 에틸아세테이트:메탄올의 50:1의 혼합용매로 시간당 일정용량, 바람직하게는 시간당 1000 mL의 속도로 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 F1부터 F20까지 20개의 분획물을 수득할 수 있다.

[0022] 상기 F1 분획물은 다시 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 헥산:에틸아세테이트 1:1의 혼합용매로 분리한 후, 칼럼 크로마토그래피에서 농도기울기 용출로 20%~100% 메탄올 용액을 사용하여 분리하고, 세파텍스로 정제하여 화합물들을 분리 및 동정할 수 있다.

[0023] 본 발명은 곰피 또는 감태의 조추출물 및 비극성용매 가용추출물로부터 분리되는 플로로탄닌류의 화합물을 분리, 정제하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명은 상기 방법으로 수득된 플로로탄닌류의 화합물을 함유하는 간세포 보호 활성을 갖는 기능성 식품 또는 약학 조성물을 제공한다.

[0025] 상기에서 수득된 곰피 또는 감태의 추출물로부터 분리된 플로로탄닌류 화합물의 간독성에 대한 간세포 보호 약학 조성물로써의 효능을 조사하기 위하여, 간독성과 관련된 실험에 사용하는 세포주 중에서 아포토시스에 있어 아주 특이적인 결과를 보여주는 세포인 HepG2 세포를 사용하여 알콜로 유발된 독성반응에 대한 효과를 측정해 본 결과, 본 발명에 따른 곰피와 감태 추출물로부터 분리된 플로로탄닌류의 화합물이 HepG2 세포의 알콜성 세포손상에 대한 억제 효과가 우수함을 확인하였다.

[0026] 본 발명의 곰피 또는 감태 추출물 또는 그로부터 분리된 플로로탄닌류 화합물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 곰피 또는 감태 추출물로부터 분리된 플로로탄닌류의 화합물을 함유하는, 간세포 보호에 대한 기능성 식품 또는 약학 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.5%~50% 중량으로 포함한다.

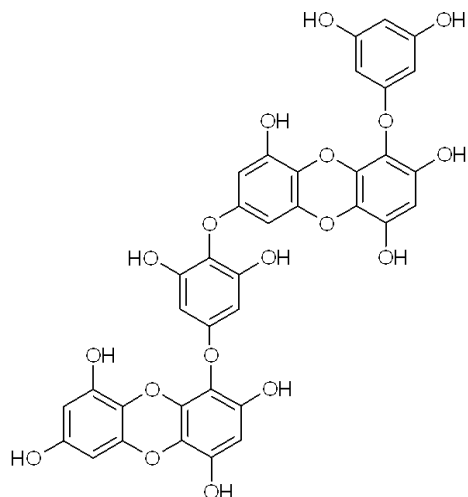
[0028]

[0029] 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

- [0030] 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0031] 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 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로즈 또는 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. 비 경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 클리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명하기로 한다. 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범주가 이들 실시예 및 실험예에 국한되는 것은 아니다.
- [0033] **[실시예 1] 곰피 또는 감태 추출물의 제조방법**
- [0034] 본 발명에 사용한 곰피 또는 감태는 부산시 기장군 대변연안 앞 바다에서 채집하여 사용하였다. 곰피 또는 감태는 음지 또는 저온건조기로 건조 후 마쇄하여 얻은 분말 3 kg을 주정 1 L에 넣고 50에서 일정시간으로 3회 반복하여 환류냉각 추출한 후 여의로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 35에서 주정을 제거한 후 추출된 잔사로서 곰피 또는 감태 조추출물 700 g을 수득하였으며 (도 1), 이 중 2 g을 취하여 세포독성에 대한 활성검색을 위한 시료로 사용하였다.
- [0035] 상기에서 얻은 곰피 또는 감태 조추출물 700 g에 n-헥산:물:에탄올=10:9:1의 혼합용매 4 L를 가하여 혼합한 후, 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 L 및 헥산가용성 분획물 2L를 수득하였다.
- [0036] 상기에서 얻은 수가용성 분획물 2L에 디클로로메탄 2 L를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 L 및 디클로로메탄 가용성 분획물 2 L를 수득하였다.
- [0037] 상기에서 얻은 수가용성 분획물 2 L에 에틸아세테이트 2 L를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 L 및 에틸아세테이트 가용성 분획물 2 L를 얻은 후, 이 에틸아세테이트 분획물을 건조하여 에틸아세테이트 가용 추출물 24.99 g을 수득하여 시료로 사용하였다.
- [0038] **[실시예 2] 플로로탄닌류 화합물의 분리**
- [0039] 상기 [실시예 1]의 곰피 또는 감태 에틸아세테이트 가용 추출물 24.99 g을 메탄올에 녹여 대형 실리카 컬럼 (100 x 10 cm)에서 디클로로메탄과 메탄올 혼합용액으로(6:1, 5:2, 4:3, 3:4, 2:5, 1:6, v/v, 1.2 L) 시간당 1000 mL씩 분획을 수행하여 10개의 하부 분획물로 나눈 후, 분리된 획분의 항산화 또는 간보호 활성을 측정하여 활성이 높은 획분을 분리하였다. 활성이 높은 획분을 recycling HPLC system에 장착된 Asahipak GS-310 칼럼 (500 x 20 mm, Showa Denko, Japan)으로 겔여과 하여 유사한 분자량의 물질들을 모은다.
- [0040] 각각의 획분들에 대한 생리활성을 측정하여, Shim-pack PREP-ODS (5 μ m, 100Å, 250 mm x 20 mm, Shimadzu Co., Tokyo, Japan) 칼럼으로 순수하게 분리하였다. 화합물을 핵자기공명 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

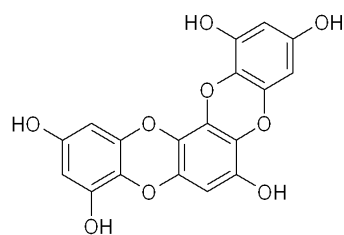
기기 및 질량분석기 (Mass Spectrometer, MS) 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기와 같다.

1) 화합물 1 : 디에콜 (Dieckol : C₃₆H₂₂O₁₈, MW=742).



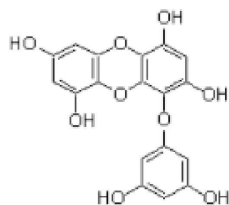
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.15(1H, s, H-3"), 6.13 (1H, s, H-3), 6.09 (2H, s, H-2", 6"), 6.06 (1H, d, J=2.9Hz, H-8), 6.05 (1H, d, J=2.9Hz, H-6"), 5.98 (1H, d, J=2.8Hz, H-6), 5.95 (1H, d, J=2.8Hz, H-6'), 5.92 (3H, s, H-2', 4', 6'). ¹³C-NMR (100MHz, CD₃OD) δ: 162.7 (C-1'), 161.0 (C-3', 5'), 158.6 (C-1'''), 156.8 (C-7), 155.3 (C-7"), 153.2 (C-3''', 5'''), 148.1 (C-2"), 148.01 (C-2), 147.9 (C-9"), 147.7 (C-9), 145.1 (C-5a"), 145.0 (C-5a), 144.2 (C-4"), 144.1 (C-4'''), 139.4 (C-10a), 139.3 (C-10a"), 127.3 (C-4'''), 127.0 (C-9a), 126.5 (C-1), 126.4 (C-1"), 125.7 (C-9a"), 125.5 (C-4a"), 125.4 (C-4a), 100.7 (C-8"), 100.6 (C-8), 100.3 (C-3), 100.2 (C-3"), 98.5 (C-4'), 97.0 (C-2''', 6'''), 96.7 (C-6"), 96.6 (C-6'), 96.2 (C-2', 6').

2) 화합물 2 : 디옥시노디하이드로에콜(Dioxinodehydroeckol: C₁₈H₁₀O₉, MW=370).



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.77 (1-OH), 9.64 (9-OH), 9.60 (6-OH), 9.27 (3-OH), 9.26 (11-OH), 6.10 (1H, s, H-7), 6.04 (1H, d, J=2.7Hz, H-2), 6.01 (1H, d, J=2.7Hz, H-10), 5.84 (1H, d, J=2.7Hz, H-4), 5.82 (1H, d, J=2.7Hz, H-12). ¹³C-NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ: 153.3 (C-3), 153.0 (C-11), 146.1 (C-1), 146.0 (C-9), 142.1 (C-4a), 141.7 (C-12a), 140.1 (C-6), 137.2 (C-7a), 131.6 (C-13b), 125.9 (C-5a), 122.7 (C-8a), 122.5 (C-13a), 122.3 (C-14a), 98.8 (C-2, 10), 97.6 (C-7), 93.9 (C-4, 12).

3) 화합물 3 : 에콜 (Eckol: C₁₈H₁₂O₉, MW=372).



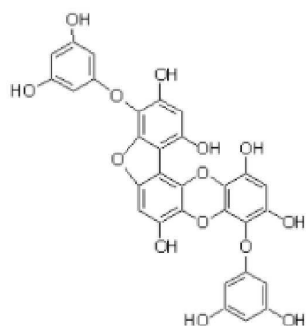
[0048]

[0049]

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.93 (3H, s), 5.94 (2H, s), 6.13 (1H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 162.4, 160.7, 160.7, 150.0, 147.7, 147.6, 144.7, 143.8, 139.0, 126.1, 125.3, 125.1, 100.3, 99.9, 98.2, 96.3, 95.9, 96.9.

[0050]

4) 화합물 4 : 플로로푸코푸로에콜 에이 (Phlorofucofuroeckol A : $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{14}$, MW=602).



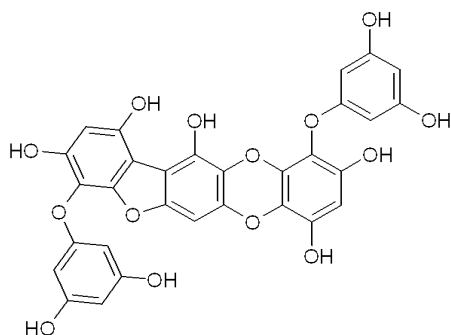
[0051]

[0052]

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.63 (1H, s, H-7), 6.40 (1H, s, H-11), 6.26 (1H, s, H-2), 5.97 (2H, d, $J=2.1\text{Hz}$, H-2'', 6''), 5.94 (1H, t, $J=1.9\text{Hz}$, H-4'), 5.92 (1H, t, $J=2.0\text{Hz}$, H-4''), 5.88 (2H, d, $J=2.1\text{Hz}$, H-2', 6'). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 162.7 (C-1''), 162.6 (C-1'), 161.0 (C-3', 5'), 161.0 (C-3'', 5''), 154.0 (C-7a), 152.5 (C-10), 152.0 (C-8a), 149.1 (C-3), 149.0 (C-12), 146.7 (C-6), 144.7 (C-1), 139.2 (C-4a), 136.2 (C-12c), 128.9 (C-5a), 125.9 (C-13a), 125.6 (C-4), 123.2 (C-9), 106.2 (C-12a), 106.1 (C-12b), 100.8 (C-11), 100.2 (C-2), 98.6 (C-4'), 98.5 (C-4''), 97.0 (C-7), 96.2 (C-2'', 6''), 96.2 (C-2' 6').

[0053]

5) 화합물 5 : 플로로푸코푸로에콜 비 (Phlorofucofuroeckol-B : $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{14}$ (MW=602)).



[0054]

[0055]

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 6.75 (H-6), 6.48 (H-10), 6.19 (H-3), 5.82 (H-4'), 5.82 (H-4''), 5.76 (H-2', 6'), 5.71 (H-2'', 6''). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 160.3 (C-1'), 159.9 (C-1''), 159.0 (C-3'', 5''), 158.9 (C-3', 5'), 150.4 (C-9), 150.3 (C-6a), 149.2 (C-7a), 146.3 (C-2), 145.5 (C-11), 142.0 (C-4), 141.4 (C-5a), 137.2 (C-14), 136.7 (C-15a), 125.8 (C-14a), 123.0 (C-4a), 122.2 (C-1), 120.4 (C-8),

108.0 (C-13), 104.9 (C-12), 98.6 (C-3), 98.6 (C-10), 96.5 (C-4'), 96.3 (C-4''), 93.7 (C-2', 6'), 93.5 (C-2'', 6''), 91.5 (C-6).

[0056] < 실험예 1> 곰피 또는 감태의 주정추출물과 에틸아세테이트 분획물의 간세포의 사멸에 대한 간세포 보호 효과에 대한 실험

[0057] 간세포 사멸에 대한 세포 보호 효과는 세포의 생존율을 측정하여 확인하였으며, 세포의 생존율은 엠티에스 (MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-H-tetrazolium) 분석 방법을 이용하였다 (Kim et al., J Agric Food Chem, 2009, 57, 3483-3489). 즉, 세포를 일정 시간 배양한 후, MTS 시약을 처리하여 1시간 동안 반응시켜 생성된 보라색 불용성의 포르마잔 (formazan)을 분광광도계 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) reader로 490 nm의 파장 하에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

[0058] 곰피 또는 감태의 주정추출물이 간세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해서 Chang과 HepG2 간세포주에 10-200 $\mu\text{g/ml}$ 의 곰피 또는 감태 주정추출물을 처리한 후, 24시간 배양하여 세포의 생존율을 측정하였으며, 도 2와 3에 나타난 바와 같이, 10-200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 곰피 또는 감태 주정추출물은 Chang과 HepG2 간세포주에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0059] 곰피 또는 감태 주정추출물의 에틸아세테이트 분획물이 간세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해서 Chang과 HepG2 간세포주에 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 에틸아세테이트 분획물을 처리한 후, 24시간 배양하여 세포의 생존율을 측정하였으며, 그 결과는 도 4와 5에 나타난 바와 같이, 0-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 에틸아세테이트 분획물은 Chang 간세포주에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며 0-50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 에틸아세테이트 분획물은 HepG2 간세포주에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0060] 곰피 또는 감태 주정추출물의 간 보호 효과를 확인하기 위하여, 10-100 mg/ml 의 곰피 또는 감태 주정추출물을 0.3 mM의 타크린과 함께 HepG2 세포에 처리한 후, 24시간 동안 배양하여 세포의 생존율을 측정하였다. 또한, 곰피 또는 감태 주정추출물의 에틸아세테이트 분획물의 간 보호 효과를 확인하기 위하여 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 의 에틸아세테이트 분획물을 0.3 mM의 타크린과 함께 HepG2 세포에 처리한 후, 24시간 동안 배양하여 세포의 생존율을 측정하였으며, 그 결과는 도 6과 7에 나타난 바와 같이, 곰피 또는 감태 주정추출물과 에틸아세테이트 분획물은 타크린에 의한 간세포 생존율 저하를 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다.

[0061] 도 8에 나타난 바와 같이, 타크린의 HepG2 간세포 독성에 대한 곰피 또는 감태 주정추출물과 에틸아세테이트 분획물의 EC_{50} (The half maximal effective concentration) 수치는 각각 19.5 $\mu\text{g/ml}$ 와 12.0 $\mu\text{g/ml}$, 20.2 $\mu\text{g/ml}$, 10.8 $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었으며 이는 양성대조군으로 사용된 실리마린 (silymarin, $\text{EC}_{50}=16.7 \mu\text{g/ml}$)과 유사한 효과를 가지는 것으로 확인되었다.

[0062] [실험예 2] 곰피 또는 감태로부터 분리된 플로로탄닌류 화합물이 간세포의 사멸에 대한 간세포 보호 효과에 대한 실험

[0063] 간세포 사멸에 대한 세포 보호 효과는 세포의 생존율을 측정하여 확인하였으며, 세포의 생존율은 엠티에스 (MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-H-tetrazolium) 분석 방법을 이용하였다 (Kim et al., J Agric Food Chem, 2009, 57, 3483-3489).

[0064] 먼저, 곰피 또는 감태로부터 분리된 플로로탄닌류 화합물이 간세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해서 Chang과 HepG2 간세포주에 에콜 (eckol) 10-100 μM ,

[0065] 디에콜(dieckol) 10-100 μ M, 디옥시노디하이드로에콜(dioxinodehydroeckol) 10-100 μ M, 플로로푸코푸로에콜 에이(phlorofucofuroeckol A) 10-50 μ M 그리고 플로로푸코푸로에콜 비(phlorofucofuroeckol B) 10-50 μ M을 각각 처리하고 24시간 배양하여 MTS 분석을 통하여 세포 생존율을 비교하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, 각각의 화합물은 HepG2 세포와 Chang 세포의 생존율에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

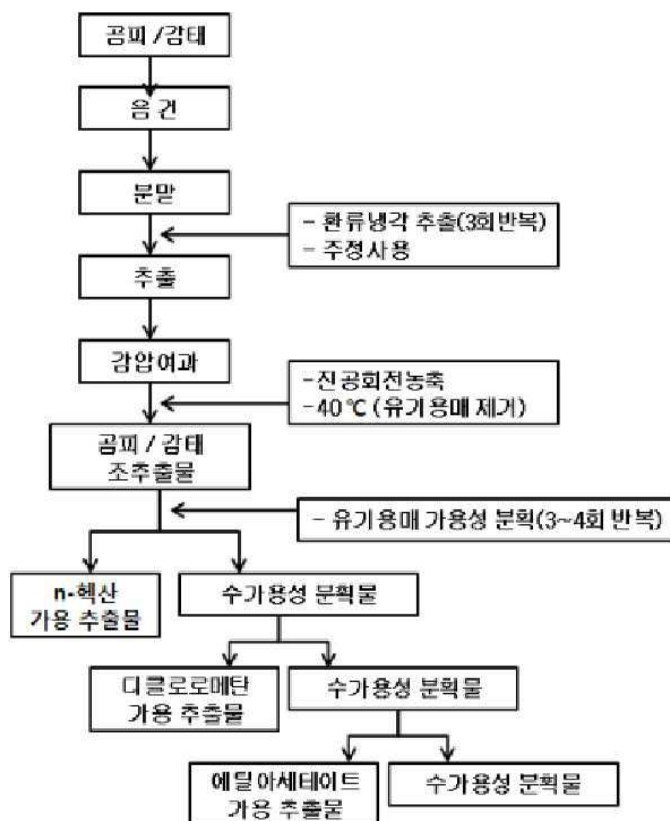
[0066] 곰피 또는 감태로부터 분리된 플로로탄닌류 화합물의 간 보호 활성을 알아보기 위하여 HepG2 세포에 에콜(eckol) 10-100 μ M,

[0067] 디에콜(dieckol) 10-100 μ M, 디옥시노디하이드로에콜(dioxinodehydroeckol) 10-100 μ M, 플로로푸코푸로에콜 에이(phlorofucofuroeckol A) 10-50 μ M 그리고 플로로푸코푸로에콜 비(phlorofucofuroeckol B) 10-50 μ M 각각 처리하고 1 시간 배양한 후, 4.5%의 에탄올을 처리하여 24 시간 뒤 HepG2 세포의 생존율을 MTS 반응을 통하여 확인하였다.

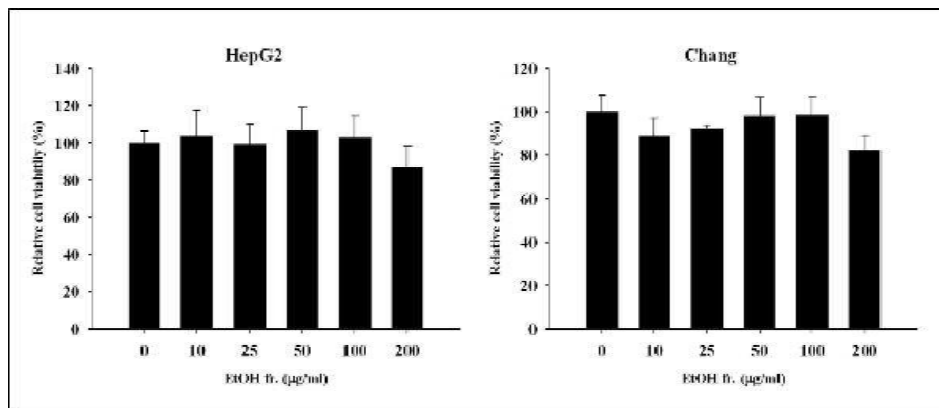
[0068] 도 10에 나타난 바와 같이 각각의 화합물은 에탄올에 의한 HepG2 세포의 사멸을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 또한, 양성 대조군인 실리마린(silymarin, 6-25 μ g/ml, EC_{50} =10.4 μ g/ml)에 비하여 플로로푸코푸로에콜 에이는 그 효과가 2.1배 높은 것으로 나타났으며 (EC_{50} =4.9 μ g/ml), 에콜(EC_{50} =13.1 μ g/ml)과 플로로푸코푸로에콜 비(EC_{50} =14.0 μ g/ml)는 비슷한 효과를 나타내었다. 이는 곰피 또는 감태로부터 분리된 플로로탄닌류 화합물이 알콜성 간세포 손상으로부터 보호 효과를 지닌다는 것을 의미하며, 현재 개별 인정형 기능성 소재로 인정받아 시판되고 있는 실리마린과 비교하였을 때에도 효과가 뛰어나거나 비슷하다는 것을 나타낸다.

도면

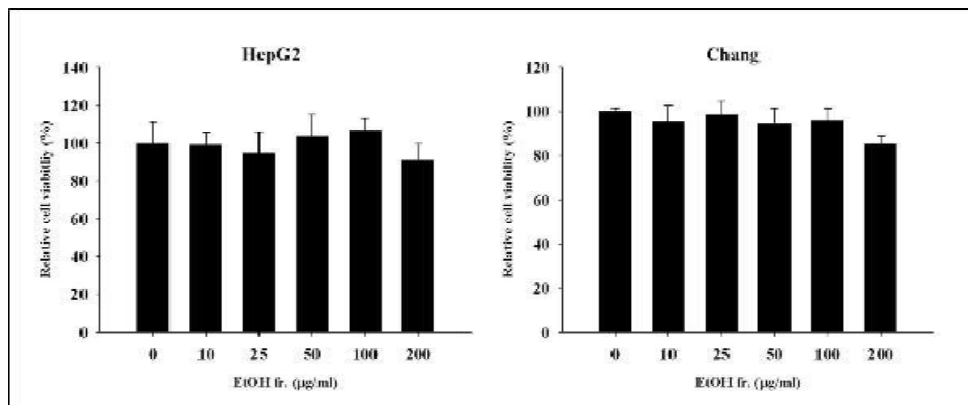
도면1



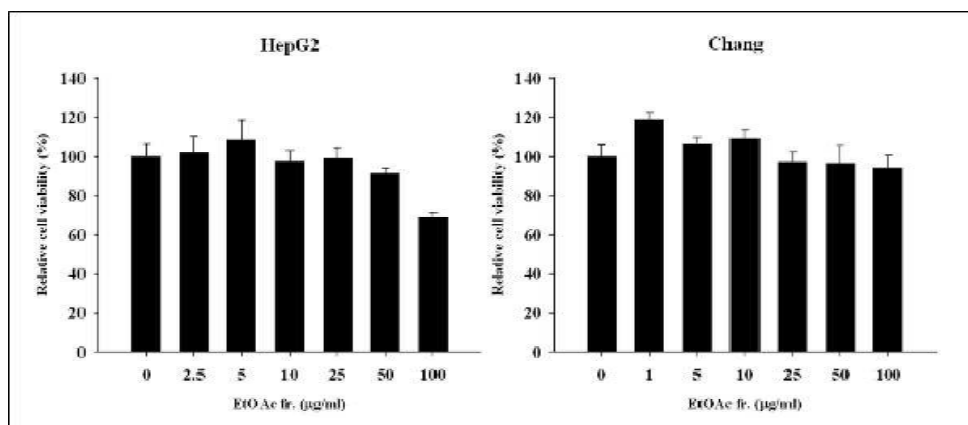
도면2



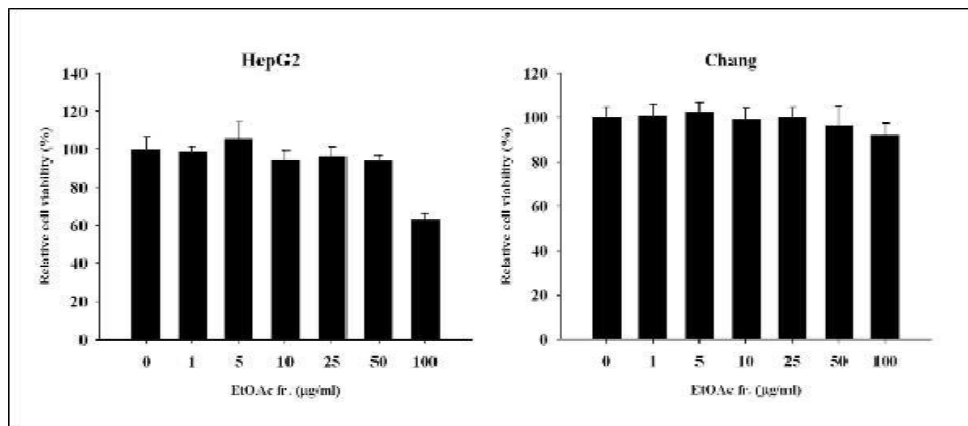
도면3



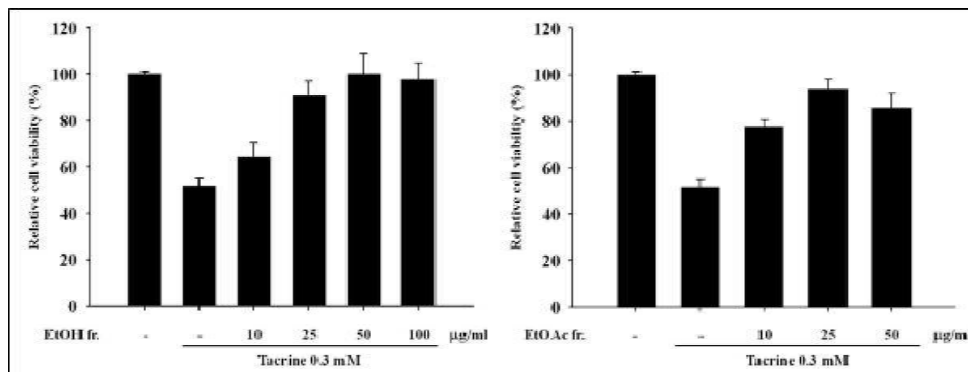
도면4



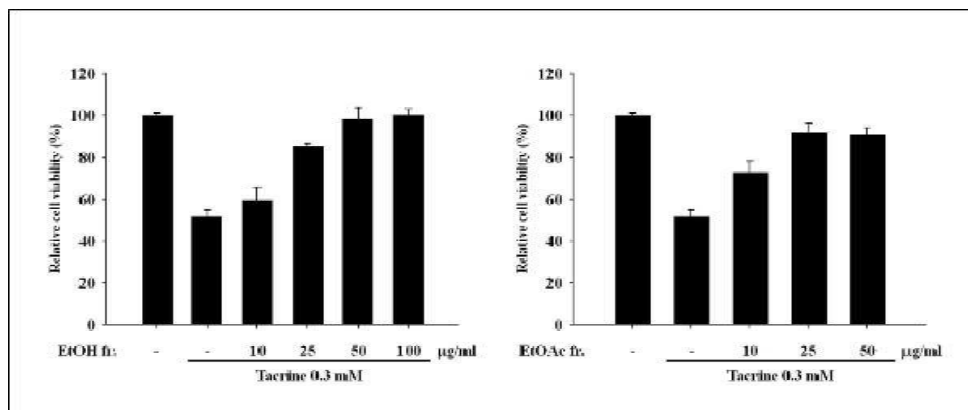
도면5



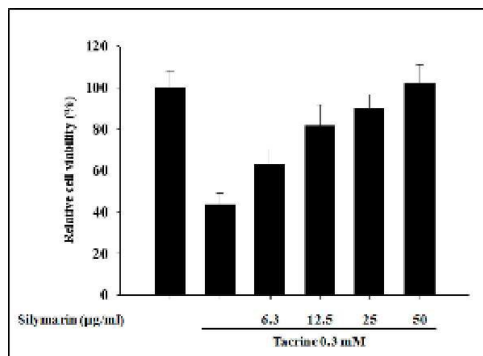
도면6



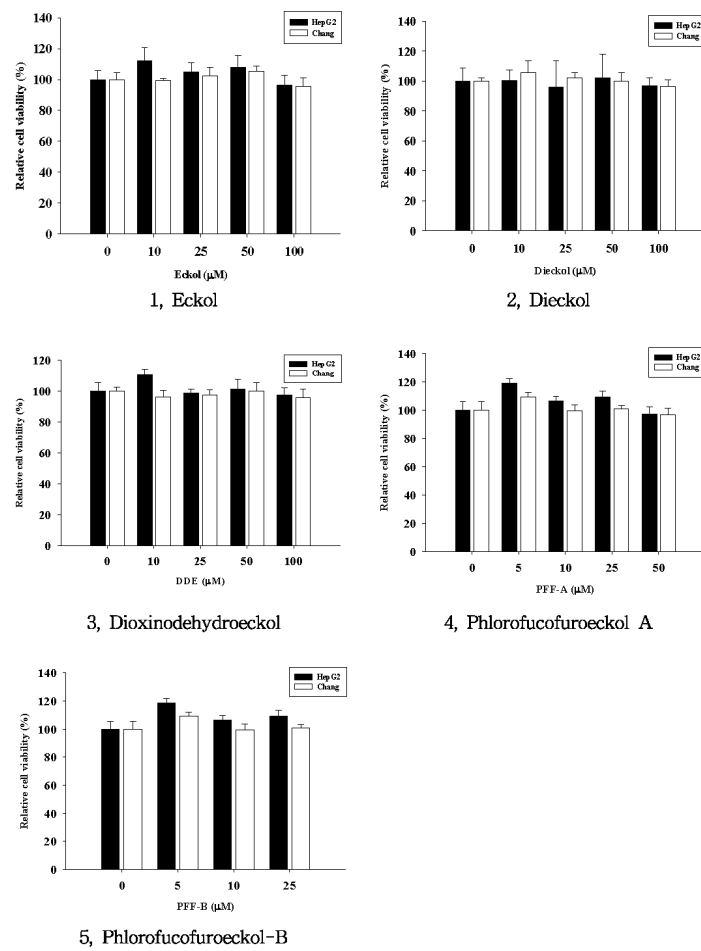
도면7



도면8



도면9



도면10

