(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0021266
(43) 공개일자 2010년02월24일

(51) Int. Cl.
A61K 36/03 (2006.01) *A61P 17/18* (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 17/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0080100
(22) 출원일자 2008년08월14일
심사청구일자 2008년08월14일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
전유진
제주 제주시 아라2동 1138번지 프로빌아파트 105-101
허수진
제주특별자치도 북제주군 연동 문송1로 30호
이정석
경남 창원시 남양동 17번지 우성아파트 105동 1502호
(74) 대리인
김일성

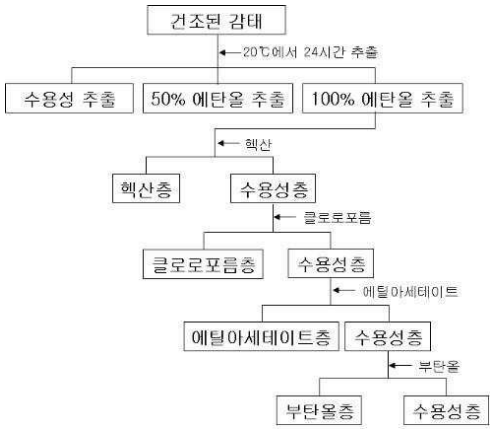
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 자외선 차단효능을 가진 디에콜을 함유한 감태 추출물

(57) 요 약

본 발명은 자외선 차단효능을 가진 디에콜을 함유한 감태 추출물 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 해조류 중의 하나인 감태(*Ecklonia cava*)로부터 추출한 수용성 추출물과 에탄올 추출물의 디에콜 (Dieckol)을 포함하는 감태 추출물이 인체에 유해한 자외선(Ultra violet B) B에 대한 보호효과를 갖는지를 인간 피부세포에 자외선 B의 조사에 의해 나타나는 세포손상의 억제효과와 에탄올 추출물을 분획 및 분리하여 얻은 물질인 디에콜 (dieckol)이 인간피부세포 및 동물실험에서 쥐의 피부에 디에콜을 도포하고 자외선 B를 조사하였을 때 피부홍반의 억제효과를 나타내는 것을 특징으로 하여 디에콜 (dieckol)의 효과적인 분리 및 천연 자외선 차단소재의 개발을 위한 자외선 (Ultra violet B) B의 보호효능을 가진 감태 (*Ecklonia cava*)로부터 디에콜 (Dieckol)을 포함하는 추출물 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

제주연안의 감태를 선별하여 수회 반복하여 수세 하였고, 동결 건조시켜 시료를 50 메쉬 이하로 분말화 한 감태의 분말단계(1)와, 분말화 한 감태 50g을 각각 5L의 용량으로 준비된 세 가지 용매인 물, 50% 에탄올, 100% 에탄올의 용매에 넣고, 반응시간을 24시간으로 하여 20℃에서 추출하는 추출단계(2)와, 추출단계(2) 후, 잔사를 제거하고 필터링을 거쳐 감태의 수용성(물) 추출물과 50% 에탄올 추출물과 100% 에탄올 추출물을 얻는 것을 특징으로 하는 감태로부터 자외선B 차단효과는 갖는 감태 추출물의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 감태의 수용성(물) 추출물, 50% 에탄올 추출물, 100% 에탄올 추출물이 자외선 B에 의해 생성되는 세포내 활성산소종 억제 효능을 가진 것을 특징으로 하는 감태 추출물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 감태의 수용성(물) 추출물, 50% 에탄올 추출물, 100% 에탄올 추출물이 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포의 생존율을 높여주는 것을 특징으로 하는 감태 추출물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 감태의 수용성(물) 추출물, 50% 에탄올 추출물, 100% 에탄올 추출물이 자외선B에 의해 손상을 입은 DNA의 손상을 억제시켜주는 것을 특징으로 하는 감태 추출물.

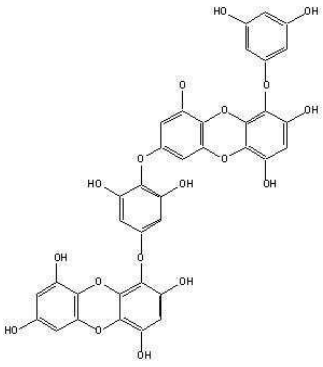
청구항 5

제 1항에 있어서, 감태의 100% 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 1차 분획하는 단계와, 상기 1차 분획을 거친 활성분획을 디에틸에테르를 사용하여 셀라이트에서 2차 분획하는 단계와, 상기 2차 분획을 거친 활성분획을 클로로포름:메탄올(2:1)을 사용하여 세파덱스에서 3차 분획하는 단계와, 상기 3차 분획을 거친 활성분획을 35% 메탄올을 사용하여 고속액체크로마토그래피를 통해 활성성분을 정제하는 방법을 포함하는 것을 특징으로 하는 감태 추출물의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 감태 추출물의 정제방법을 통해 분리한 디에콜을 함유한 감태 추출물은 하기 화학식 (1)을 포함하고 있는 자외선 B 차단효과를 갖는 감태 추출물.

[화학식 1]



청구항 7

제 6항에 있어서, 디에콜을 함유한 감태 추출물이 자외선 B에 의해 생성되는 세포내 활성산소종 억제 효능을 가진 것을 특징으로 하는 감태 추출물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 디에콜을 함유한 감태 추출물이 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포의 생존율을 향상시켜

주는 것을 특징으로 하는 감태 추출물.

청구항 9

제 6항에 있어서, 디에콜을 함유한 감태 추출물이 자외선 B에 의해 손상을 입은 DNA의 손상을 억제시켜주는 것을 특징으로 하는 감태 추출물.

청구항 10

제 6항에 있어서, 디에콜을 함유한 감태 추출물이 자외선 B의 280-320 nm 영역에서 높은 흡수파장을 갖는다는 것을 특징으로 하는 감태 추출물.

청구항 11

제 6항에 있어서, 디에콜을 함유한 감태 추출물이 자외선 B에 의해 유도 되는 피부의 홍반생성을 억제시켜주는 것을 특징으로 하는 감태 추출물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[0014] 본 발명은 자외선 차단효능을 가진 디에콜을 함유한 감태 추출물 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 해조류 중의 하나인 감태(*Ecklonia cava*)로부터 추출한 수용성 추출물과 에탄올 추출물의 디에콜 (Dieckol)을 포함하는 감태 추출물이 인체에 유해한 자외선 (Ultra violet B) B에 대한 보호효과를 갖는지를 인간 피부세포에 자외선 B의 조사에 의해 나타나는 세포손상의 억제효과와 에탄올 추출물을 분획 및 분리하여 얻은 물질인 디에콜 (dieckol)이 인간피부세포 및 동물실험에서 쥐의 피부에 디에콜을 도포하고 자외선 B를 조사하였을 때 피부홍반의 억제효과를 나타내는 것을 특징으로 하여 디에콜 (dieckol)의 효과적인 분리 및 천연 자외선 차단소재의 개발을 위한 자외선 (Ultra violet B) B의 보호효능을 가진 감태 (*Ecklonia cava*)로부터 디에콜 (Dieckol)을 포함하는 추출물 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

[0015] 자외선은 파장별로 자외선A (320-400 nm), 자외선B (280-320 nm), 자외선C (200-280 nm)로 나눌 수 있으며, 자외선C는 지구에 도달하기 전 오존층에 의해 흡수되는 것으로 알려져 있으나, 자외선 A와 자외선 B는 오존층에 흡수되지 않고 도달하여 인간 피부에 손상을 입히는 것으로 알려져 있다.

[0016] 그 중에서 자외선B의 피부에 대한 직접적인 노출은 인간 피부의 노화, 피부 홍반, 과색소 형성 등을 유도하여 피부암에 이르게 하는 것으로 알려져 있으며, 또한 자외선 B는 활성산소종 (Reactive Oxygen Species)을 생성시켜 피부에 손상을 준다. 이러한 활성산소종을 제거하기 위해 체내 방어 효소인 Superoxide dismutase, Catalase, Thioredoxin reductase와 Glutathione peroxidase의 분비가 늘어나고, 천연물질로는 Tocopherol과 Ascorbic acid 등이 알려져 있다 (Tomaino A, Cristani M, Cimino F, Speciale A, Trombetta D, Bonina F, Saija A. (2006) In vitro protective effect of a Jacquez grapes wine extract on UVB-induced skin damage. *Toxicol in Vitro* 20: 1395-1402).

[0017] 다양한 천연물질들이 자외선 B에 의한 보호 효과 있다고 알려져 있으며, 이는 항산화 효과와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다 (CariniM, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Facino RM. (2000) Protects Human HaCaT Keratinocytes and Mouse Skin Against UVB-Mediated Oxidative Stress and Apoptosis. *J Invest Dermatol* 127: 222-232).

[0018] 해양생물은 육상생물에 없는 특유의 대사과정과 독특한 환경으로 인하여 항산화, 항암, 항응고 항균 활성 등 다양한 신규 생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있다. 또한, 육상생물은 이미 많은 연구가 진행되었으나 해양생물은 아직 제한된 연구로 인하여 미지의 천연물질의 개발에 대한 기대가 높이 평가되고 있다. 따라서 미이용 해양 자원을 이용한 산업적 이용은 고갈되어가는 육상자원을 대체할 만한 새로운 천연자원으로의 활용될 만한 가치가 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

[0019] 따라서 본 발명은 해양생물자원으로부터 자외선B에 대한 보호효과가 있는 성분을 분리해 내기 위한 것으로, 해조류인 감태로부터 수용성 추출물과 에탄올 추출물을 제조하여, 디에콜(dieckol)을 함유한 감태 추출물 효과적인 분리 및 이 추출물들이 갖는 자외선B에 대한 보호효과를 검정하고, 이러한 자외선 B 차단효과를 갖는 물질을 정제하여 감태 유래의 천연 자외선차단제 및 이를 함유하는 감태추출물을 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

[0020] 본 발명은 자외선 차단효능을 가진 디에콜을 함유한 감태 추출물 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 해조류 중의 하나인 감태(*Ecklonia cava*)로부터 추출한 수용성 추출물과 에탄올 추출물의 디에콜 (Dieckol)을 포함하는 감태 추출물이 인체에 유해한 자외선 (Ultra violet B) B에 대한 보호효과를 갖는지를 인간 피부세포에 자외선 B의 조사에 의해 나타나는 세포손상의 억제효과와 에탄올 추출물을 분획 및 분리하여 얻은 물질인 디에콜 (dieckol)이 인간피부세포 및 동물실험에서 쥐의 피부에 디에콜을 도포하고 자외선 B를 조사하였을 때 피부홍반의 억제효과를 나타내는 것을 특징으로 하여 디에콜 (dieckol)의 효과적인 분리 및 천연 자외선 차단소재의 개발을 위한 자외선 (Ultra violet B) B의 보호효능을 가진 감태 (*Ecklonia cava*)로부터 디에콜 (Dieckol)을 포함하는 추출물 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

[0021]

[0022] 이하, 본 발명의 구성에 대하여 아래 실시예 및 실험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다.

[0023]

[0024] **[실시 예 1] 재료의 준비**

[0025]

[0026] 시험에 사용한 해조류인 감태(*Ecklonia cava*)는 제주연안에서 직접 채취하여 물로 깨끗이 여러 번 씻어 이물질을 제거한 후 심온동결기 (-70℃)에 보관하였다. 동결된 시료는 동결건조를 시켜 분쇄하였고 50 메쉬 (Mesh) 이하의 크기로 분말화하여 사용하였다.

[0027] **[실시 예 2] 감태 유래 자외선B 차단 효과를 갖는 조추출물의 제조**

[0028] 제주연안에서 직접 채취한 해조류를 대상으로 품질이 좋은 감태를 선별하여 수회 반복하여 수세하였고, 동결건조시켜 시료를 50 메쉬 이하로 분말화(1) 하였다. 분말화한 감태 50g을 각각 5L의 용량으로 준비된 물, 50% 에탄올, 100% 에탄올에 각각 넣고 반응시간을 24시간으로 하여 20℃에서 추출(2)하였고, 저온에서 원심분리 하여 잔사를 제거하였으며, 상층액을 와트만 필터 종이(Whatman No.4)를 이용하여 여과하였다. 에탄올 추출물은 에탄올을 완전 휘발 시킨 후 0.01%미만으로 제조한 디메틸 설폭사이드 (Dimethylsulfoxide, DMSO)로 녹여서 사용하였고, 4℃에서 보관하면서 추출물이 갖는 자외선B 차단 효과를 검정하였다.

[0029] **[실시 예 3] 감태 100% 에탄올 추출물의 유기용매 분획공정**

[0030] 감태의 100% 에탄올 추출물을 완전 휘발시켜 물에 녹인 후, 헥산을 혼합하여 헥산층과 수용성층을 분획한다. 같은 방법으로 수용성층에 연속적으로 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 위 과정을 반복하여 분획물들을 분획한다. 이 분획물들은 용매를 모두 휘발 시킨 후 0.01%미만으로 제조한 디메틸 설폭사이드 (Dimethylsulfoxide, DMSO)로 녹여서 사용하였고, 4℃에서 보관하면서 추출물이 갖는 자외선B 차단 효과를 검정하였다.

[0031] 상기의 재료를 이용한 여러 가지 실험들의 실험예를 통하여 설명하면 다음과 같다,

[0032] **[실험 예 1] 감태 추출물의 수율 측정**

[0033]

[0034] 감태의 수용성 및 에탄올 추출물로부터 수율 측정은 표 1과 같다.

[0035] 먼저, 감태의 수용성 추출물, 50% 에탄올 추출물, 100% 에탄올 추출물에 대한 수율은 감태로부터 유효성분을 제조방법에 따라 획득한 다음 양을 백분율(%)로 계산하였다.

표. 1 감태 추출물의 수율 측정 (%)

물	50% 에탄올	100% 에탄올
28.4±0.2	26.5±0.1	11±0.2

[0036]

[0037] **[실험 예 2] 감태 추출물의 폴리페놀 및 당량 측정**

[0038]

[0039] 감태의 수용성 추출물, 50% 에탄올 추출물, 100% 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량 측정은 Shetty 등에 준하여 수행하였으며, 각 추출물 1 mL에 95% 에탄올 용액 1 mL와 증류수 5 ml를 넣어 혼합한 후, 50% 폴린-씨오칼테우 시약(Folin-Ciocalteu reagent, Sigma Chemical, St. Louis, MO) 0.5 mL 를 넣고 5분간 반응시켰다. 여기에 5% 탄산나트륨 (Na_2CO_3)용액 1 mL를 가한 후, 어두운 상태에서 1시간 동안 반응시키고 725 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준검량곡선은 gallic acid를 표준물질로 사용하여 동일한 방법으로 작성된 표준 곡선으로부터 총 폴리페놀 함량으로 환산하였다.

[0040] 감태의 수용성 추출물, 50% 에탄올 추출물, 100% 에탄올 추출물의 당 함량은 AOAC(1990)에 따라 phenol sulfuric acid 법으로 측정하였다.

표 2. 감태 추출물의 폴리페놀 및 당 함량 측정 (mg/g)

	물	50% 에탄올	100% 에탄올
폴리페놀	192.1±0.2	242.1±0.3	445±0.1
당	180.7±0.2	158.3±0.2	105.5±0.2

[0041]

[0042] 표 2에서 보는 것과 같이, 감태추출물의 폴리페놀 함량은 수용성추출물에서 192.1(mg/g), 50% 에탄올 추출물에서 242.1(mg/g), 100% 에탄올 추출물에서 445(mg/g)으로 나타났으며, 당함량에서는 역으로 수용성 추출물에서 180.7(mg/g), 50% 에탄올 추출물에서 158.3(mg/g), 100% 에탄올 추출물에서 105.5(mg/g)으로 나타났다.

[0043] **[실험 예 3] 자외선 B에 의해 생성된 세포내 활성산소종에 대한 감태 추출물의 소거능 측정**

[0044] 자외선 B에 의해 생성되는 세포내 활성산소종 (Reactive Oxygen Species) 저해 활성 측정은 HaCaT 세포들을 웰(Well)당 1×10^5 cells/mL로 하여 96-웰 플레이트(Well plate)에 각각 접종한 후, 16시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양한다. 그리고 난 후, 배지를 제거하여 50 mJ/cm^2 의 세기로 312 nm 파장의 자외선 B를 조사한 후, 배지를 채워 넣고, 추출물을 처리 한 후, 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 24시간 후, 배양기에서 웰(Well)을 꺼내어 디시에프에이치-디에이 (DCFH-DA)를 20 μL씩 가한 후, Spectrofluormeter (Excitation 485 nm, Emission 535 nm)로 측정한다. 추출물을 처리하지 않고 자외선 B만을 조사한 것을 대조군으로, 추출물과 자외선 B 모두를 처리하지 않은 것을 컨드롤로 정하였고, 컨트롤을 100% 기준으로 하여 활성산소종 생성율을 측정하였다.

[0045] 도 2는 자외선B에 의해 생성된 세포내 활성산소종에 대한 20℃에서 추출한 감태의 수용성, 50% 에탄올, 100% 에탄올 추출물의 소거능 측정 그래프로 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 자외선 B만을 처리한 세포에서는 자외선 B를 처리하지 않은 컨트롤에 비해 약 1.6배가 높은 163.2%의 활성산소종 생성율을 나타내었다. 반면에 자외선 B를 처리하고 감태 추출물을 처리한 세포에서는 활성산소종의 생성율이 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었는데, 수용성 추출물을 처리했을 때는 107.8%, 50% 에탄올 추출물을 처리했을 때는 91.5%, 그리고 100% 에탄올 추출물을 처리했을 때는 74.6%의 활성산소종 생성율을 나타내었다. 이 결과로부터 감태 추출물의 처리에 의해 자외선 B에 의해 유도된 활성산소종의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 100% 에탄올 추출물을 처리했을 때가 가장 우수한 활성산소종 억제효과를 갖는다는 것을 확인하였다.

[0046] **[실험 예 4] 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포에 대한 감태 추출물의 세포 생존율 측정**

[0047] 자외선 B에 의해 사멸되는 세포의 생존율 측정은 HaCaT 세포들을 웰(Well)당 1×10^5 cells/mL로 하여 96-웰 플레이트(Well plate)에 각각 접종한 후 16시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양한다. 그리고 난 후, 배지를 제거하여 50 mJ/cm^2 의 세기로 312 nm 파장의 자외선 B를 조사한 후, 배지를 채워 넣고, 추출물

을 처리 한 후 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 24시간 후 배양기에서 웰(Well)을 꺼내어 MTT 시약 (농도 2 mg/mL)을 50 μL씩 가한 후 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 4시간 동안 배양하여 800 × g 으로 5분 동안 원심분리 시키고 상등액을 조심스럽게 버린 후, DMSO를 150 μL씩 가하여 잘 섞고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정한다. 추출물을 처리하지 않고 자외선 B만을 조사한 것을 대조군으로, 추출물과 자외선 B 모두를 처리하지 않은 것을 컨드롤로 정하였고, 컨트롤을 100% 기준으로 하여 세포 생존율을 측정하였다.

[0048] 도 3은 자외선B에 의해 손상을 입은 세포에 대한 20℃에서 추출한 감태의 수용성, 50% 에탄올, 100% 에탄올 추출물의 세포 생존율 측정 그래프로 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 자외선 B에 의해 손상을 입지 않은 컨트롤을 100% 생존율로 했을 때, 자외선 B만 처리한 세포는 44.5%의 세포 생존율을 보인 반면 자외선 B를 처리하고 감태의 수용성 추출물을 처리한 세포에서는 56.1%, 50% 에탄올 추출물을 처리한 세포에서는 66.3%, 그리고 100% 에탄올 추출물을 처리한 세포에서는 77.2%의 세포 생존율을 각각 나타내었다. 이 결과로부터 감태 추출물이 자외선 B에 의해 손상된 세포의 생존율을 높여준다는 것을 확인할 수 있었고, 100% 에탄올 추출물을 처리했을 때가 가장 우수한 세포 생존율을 갖는다는 것을 확인하였다.

[0049] **[실험 예 5] 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포에 감태추출물을 처리했을 때 나타나는 세포의 형태적 관찰**

[0050] 자외선B에 의해 유도되는 세포의 형태적 관찰은 HaCaT 세포들을 웰(Well)당 1×10^5 cells/mL로 하여 96-웰 플레이트(Well plate)에 각각 접종한 후 16시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양한다. 그리고 난 후, 배지를 제거하여 50 mJ/cm^2 의 세기로 312 nm 파장의 자외선 B를 조사한 후, 배지를 채워 넣고, 추출물을 처리 한 후 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 배양기에서 웰(Well)을 꺼낸 후, 회치스트 33342 형광 시약을 가하고 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 10분 동안 배양한 후 프로피디움 아이오다이드 (PI)를 처리하고 10분 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양한 후, 두 가지 형광시약에 의해 염색된 세포들을 형광현미경(Olympus Optical, JP/BX60)으로 관찰하였다.

[0051] 도 4는 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포에 20℃에서 추출한 감태의 수용성, 50% 에탄올, 100% 에탄올 추출물을 처리했을 때 나타나는 세포의 형태적 관찰 사진으로 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포는 회치스트 33342 및 프로피디움 아이오다이드로 염색을 하여 핵의 손상정도를 형광현미경으로 관찰하였다. 자외선 B에 의해 손상을 입지 않은 컨트롤은 정상적인 세포의 형태를 보여주고 있지만, 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포는 푸른 형광색으로 보이는 아팝토시스와 붉은 색을 보이는 네크로시스가 동시에 유발되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 감태의 추출물을 처리했을 때는 세포의 손상정도가 줄어드는 것을 확인할 수 있었고, 100% 에탄올 추출물을 처리했을 때가 가장 우수한 세포보호효과를 보이는 것을 형태적으로 관찰할 수 있었다.

[0052] **[실험 예 6] 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포에 대한 감태의 100% 에탄올 추출물을 분획한 분획물들의 세포 생존율 측정**

[0053] 자외선 B에 의해 사멸되는 세포의 생존율 측정은 HaCaT 세포들을 웰(Well)당 1×10^5 cells/mL로 하여 96-웰 플레이트(Well plate)에 각각 접종한 후 16시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양한다. 그리고 난 후, 배지를 제거하여 50 mJ/cm^2 의 세기로 312 nm 파장의 자외선 B를 조사한 후, 배지를 채워 넣고, 추출물을 처리 한 후, 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 24시간 후, 배양기에서 웰(Well)을 꺼내어 MTT 시약 (농도 2 mg/mL)을 50 μL씩 가한 후, 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 4시간 동안 배양하여 800 × g 으로 5분 동안 원심분리 시키고 상등액을 조심스럽게 버린 후, DMSO를 150 μL씩 가하여 잘 섞고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정한다. 추출물을 처리하지 않고 자외선 B만을 조사한 것을 대조군으로, 추출물과 자외선 B 모두를 처리하지 않은 것을 컨드롤로 정하였고, 컨트롤을 100% 기준으로 하여 세포 생존율을 측정하였다.

[0054] 도 5는 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포에 대한 20℃에서 추출한 감태의 100% 에탄올 추출물을 분획한 분획물들의 세포 생존율 측정 그래프로 상기의 실험결과를 나타낸 것으로서, 자외선 B에 의해 손상을 입지 않은 컨트롤을 100% 생존율로 했을 때, 자외선 B만 처리한 세포는 44.5%의 세포 생존율을 보인 반면 자외선 B를 처리하고 감태의 수용성 추출물을 처리한 세포에서는 56.1%, 50% 에탄올 추출물을 처리한 세포에서는 66.3%, 그리고

100% 에탄올 추출물을 처리한 세포에서는 77.2%의 세포 생존율을 각각 나타내었다. 이 결과로부터 감태 추출물이 자외선 B에 의해 손상된 세포의 생존율을 높여준다는 것을 확인할 수 있었고, 100% 에탄올 추출물을 처리했을 때가 가장 우수한 세포 생존율을 갖는다는 것을 확인하였다.

[0055] **[실험 예 7] 감태의 100% 에탄올 추출물로부터 자외선 B에 대한 보호효과를 갖는 활성물질의 분리과정 흐름도**

[0056] 도 6은 20℃에서 추출한 감태의 100% 에탄올 추출물로부터 자외선 B에 대한 보호효과를 갖는 활성물질의 분리과정 흐름도를 나타내는 것으로서, 이를 상세히 설명하면, 자외선 B에 대해 보호효과가 가장 우수했던 감태의 100% 에탄올 추출물로부터 활성물질을 분리하기 위한 분리공정으로,

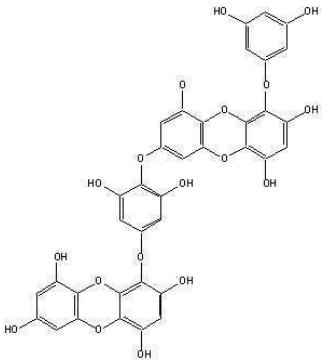
[0057] 먼저, 감태의 100% 에탄올 추출물을 75~150㎛ 직경의 셀라이트에 흡착시키고 55×400mm의 유리관에 충진시켜 디에틸에테르를 용리시켜 활성성분을 얻었다.

[0058] 상기 활성성분을 25×300mm의 유리관에 25~100㎛ 직경의 세파덱스 LH-20 충진제를 충진한 컬럼에 다시 얹어 클로로포름:메탄올을 2:1에서 0:1 비율로 용리시켜 활성성분 얻었다.

[0059] 상기 활성성분은 다시 고성능 액체크로마토그래피 (메탄올:물 = 35:65, 유속 = 1.0 ml/min, 10×250mm C-18 컬럼)를 이용하여 자외선 B에 대해 보호효과가 우수한 활성을 나타내는 물질을 얻었다.

[0060] 이 물질 디에콜 (dieckol)에 대한 자외선 - 가시광선 스펙트럼의 측정값은 UV (EtOH) λ_{max} nm = 225, 적외선 스펙트럼의 측정값은 IR (KBr) ν_{max} 3250, 1605 cm^{-1}, 그리고 질량분석 스펙트럼의 측정값은 FABMS m/z 742 $[M]^+$ ($C_{36}H_{22}O_{18}$) 이었다. 또한, ^{1}H-NMR (400 MHz, methanol-d_4)을 이용하여 분석한 결과 δ ^{1}H (mult, J = Hz)는 6.15 (1H, s), 6.13 (1H, s), 6.09 (1H, d, 2.9 Hz), 6.06 (1H, d, 2.9), 6.05 (1H, d, 2.9), 5.98 (1H, d, 2.8), 5.95 (1H, d, 2.8), 5.92 (3H, m), ^{13}C-NMR (100 MHz, methanol-d_4)을 이용하여 분석한 결과 δ ^{13}C는 δ 161.8, 160.1, 157.8, 155.9, 154.5, 152.4, 147.3, 147.2, 147.1, 146.9, 144.3, 144.1, 143.4, 143.3, 138.6, 138.5, 126.5, 126.2, 125.6, 125.5, 124.9, 124.6, 124.5, 99.9, 99.7, 99.5, 99.4, 97.6, 96.2, 95.8, 95.7, 95.3 이었으며, 상기 분석결과로부터 상기물질의 구조가 하기 [화학식 1]임을 확인하였다.

[0061] [화학식 1]

[0062] 

[0063] **[실험 예 8] 자외선 B에 의해 생성된 세포내 활성산소종에 대한 디에콜의 소거능 측정**

[0064] 자외선 B에 의해 생성되는 세포내 활성산소종(Reactive Oxygen Species) 저해 활성 측정은 HaCaT 세포들을 웰(Well)당 1×10^5 cells/mL로 하여 96-웰 플레이트(Well plate)에 각각 접종한 후, 16시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양한다. 그리고 난 후, 배지를 제거하여 50 mJ/cm^2 의 세기로 312 nm 파장의 자외선B를 조사한 후, 배지를 채워 넣고, 디에콜을 처리 한 후, 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 24시간 후, 배양기에서 웰(Well)을 꺼내어 디시에프에이치-디에이 (DCFH-DA)를 20 ㎕씩 가한 후, Spectrofluormeter (Excitation 485 nm, Emission 535 nm)로 측정한다. 디에콜을 처리하지 않고 자외선 B만을 조사한 것을 대조군으로, 디에콜과 자외선 B 모두를 처리하지 않은 것을 컨드롤로 정하였고, 컨트롤을 100% 기준으로 하여 활성산소종 생성율을 측정하였다.

[0065] 도 7은 자외선 B에 의해 생성된 세포내 활성산소종에 대한 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜의 소거능 측정 그래프로 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 자외선 B만을 처리한 세포에서는 자외선 B를 처리하지 않은 컨

트롤에 비해 약 2.3배가 높은 234.1%의 활성산소종 생성율을 나타내었다. 반면에 자외선 B를 처리하고 디에콜을 처리한 세포에서는 활성산소종의 생성율이 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었는데, 디에콜을 5, 50, 250 μM의 농도로 처리했을 때 각각 189.6, 161.9, 100.73%의 활성산소종 생성율을 나타내었고, 디에콜의 농도를 증가시켜줌에 따라 자외선 B에 의해 생성되는 활성산소종 생성율이 점차 줄어드는 것을 확인함으로서 디에콜의 효과를 확인하였다.

[0066] **[실험 예 9] 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포에 대한 디에콜의 세포 생존율 측정**

[0067] 자외선 B에 의해 사멸되는 세포의 생존율 측정은 HaCaT 세포들을 웰(Well)당 1×10^5 cells/mL로 하여 96-웰 플레이트(Well plate)에 각각 접종한 후, 16시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양한다. 그리고 난 후, 배지를 제거하여 50 mJ/cm^2 의 세기로 312 nm 파장의 자외선 B를 조사한 후, 배지를 채워 넣고, 디에콜을 처리 한 후, 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 24시간 후, 배양기에서 웰(Well)을 꺼내어 MTT 시약 (농도 2 mg/mL)을 50 μL씩 가한 후, 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 4시간 동안 배양하여 800 × g 으로 5분 동안 원심분리 시키고 상등액을 조심스럽게 버린 후, DMSO를 150 μL씩 가하여 잘 섞고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정한다.

[0068] 디에콜을 처리하지 않고 자외선 B만을 조사한 것을 대조군으로, 디에콜과 자외선 B 모두를 처리하지 않은 것을 컨드롤로 정하였고, 컨트롤을 100% 기준으로 하여 세포 생존율을 측정하였다.

[0069] 도 8은 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포에 대한 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜의 세포 생존율 측정 그래프로 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 자외선 B에 의해 손상을 입지 않은 컨트롤을 100% 생존율로 했을 때, 자외선 B만 처리한 세포는 42.2%의 세포 생존율을 보인 반면 자외선 B를 처리하고 디에콜을 5, 50, 100 μM의 농도로 처리했을 때 각각 50.5, 61.5, 77.4%의 세포 생존율을 나타내었다. 이 결과로부터 디에콜이 자외선B에 의해 손상된 세포의 생존율을 높여준다는 것을 확인할 수 있었고, 농도를 증가시켜줌에 따라 세포 생존율이 높아지는 것을 확인하였다.

[0070] **[실험 예 10] 자외선 B에 의해 손상을 입은 DNA에서 디에콜의 농도별 손상억제효과 측정**

[0071] DNA 손상 억제효과는 코멧 측정법으로 수행하였다. 세포는 75 μL의 0.5% 녹는점이 낮은 아가로즈 (LMA)와 섞은 후, 1% 녹는점이 보통인 아가로즈 (NMA)가 전코팅 (precoting)된 슬라이드에 분산시켰다. 겔이 굳으면 그 위에 다시 0.5% 녹는점이 낮은 아가로즈 75 μL를 슬라이드 위에 떨어뜨린 후, 커버를 덮고, 용해버퍼 (2.5 M 염화나트륨, 100 mM 이디티에이, 10 mM 트리스, 1% 나트륨 라우릴라사코신 (sodium laurylasarcosine); 1% 트리톤 X-100 10% 디엠에스오)에 슬라이드를 담가 4℃에서 1시간동안 침지시켜준다. 건조 후에 슬라이드는 300 mM 수산화나트륨과 10 mM 나트륨이 함유된 이디티에이 (pH 13.0)가 들어있는 전기영동 탱크에 배열하고 40분 동안 DNA 가닥을 풀었다. DNA 전기영동은 25 V/300 mA의 전압으로 20분 동안 실시하였다. 슬라이드는 중화버퍼 (0.4 M 트리스, pH 7.5)에 5분씩 담궈 3회 반복 세척해주었고 에탄올로 5분간 세척하고 20 μg/mL 농도의 에티듐브로마이드 50 μL로 염색하였다.

[0072] 측정은 이미지 분석기 (kinetic Imaging Komet 5.0, UK)와 형광현미경 (LEICA DMLB, Germany)로 수행하였고, 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA파편의 거리 또는 테일 길이에 테일 내 함유된 DNA%를 곱해준 테일 값을 측정하여 나타내었으며 각 샘플 당 2개의 슬라이드를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

[0073] 도 9 및 도 10은 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 자외선 B로 손상을 가하지 않은 대조군의 경우에는 파괴된 DNA가 1.6%로 거의 손상을 입지 않은 반면에 디에콜을 처리하지 않고 자외선 B로 손상을 가한 세포에서는 51.5%의 손상된 DNA파편의 형광을 확인할 수 있었다.

[0074] 자외선 B를 처리하고 디에콜을 0.5, 5, 50 μM의 농도로 처리했을 때는 45.7, 35.5, 22.3%의 손상된 DNA파편의 형광을 확인할 수 있었고, 디에콜이 갖는 세포손상 억제효과는 디에콜을 0.5, 5, 50 μM의 농도로 처리했을 때 각각 11.3, 31.2, 56.8%의 활성을 나타내었으며, 농도가 증가할수록 세포손상 억제효과가 증가하는 경향을 나타내었다. 도 10은 서로 다른 농도의 디에콜을 처리 했을 때 나타나는 DNA 파편의 이동정도를 나타낸 현미경사진을 보여주고 있다. 자외선 B만 처리한 세포에서는 DNA가 완전히 손상입은 것을 볼 수 있지만, 자외선 B와 디에콜을 같이 첨가시켜주었을 때는 자외선 B로부터 유도되는 손상이 줄어드는 것을 볼 수 있다. 샘플들을 0 에서 50 μM의 다른 농도로 처리했을 때는 DNA의 이동정도가 농도의 증가에 따라 변화하였다. 이 결과는 디에콜이

갖는 세포보호효과를 잘 보여주는 그림이라고 할 수 있다.

[0075] **[실험 예 11] 자외선 B에 의해 손상된 세포의 형태적 관찰**

[0076] 자외선 B에 의해 유도되는 세포의 형태적 관찰은 HaCaT 세포들을 웰(Well)당 1×10^5 cells/mL로 하여 96-웰 플레이트(Well plate)에 각각 접종한 후, 16시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양한다. 그리고 난 후, 배지를 제거하여 50 mJ/cm^2 의 세기로 312 nm 파장의 자외선 B를 조사한 후, 배지를 채워 넣고, 추출물을 처리 한 후, 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 배양기에서 웰(Well)을 꺼낸 후, 회치스트 33342 형광 시약을 가하고 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 10분 동안 배양한 후, 프로피디움 아이오다이드 (PI)를 처리하고 10분 동안 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 배양기에서 배양한 후, 두 가지 형광시약에 의해 염색된 세포들을 형광현미경(Olympus Optical, JP/BX60)으로 관찰하였다.

[0077]

[0078] 도 11은 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포에 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜을 처리했을 때 나타나는 세포의 형태적 관찰사진으로 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포는 회치스트 33342 및 프로피디움 아이오다이드로 염색을 하여 핵의 손상정도를 형광현미경으로 관찰하였다. 자외선 B에 의해 손상을 입지 않은 컨트롤은 정상적인 세포의 형태를 보여주고 있지만, 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포는 푸른 형광색으로 보이는 아팝토시스와 붉은 색을 보이는 네크로시스가 동시에 유발되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 디에콜을 0 에서 50 μM의 다른 농도로 처리했을 때에는 농도가 증가함에 따라 자외선 B에 의해 손상을 입은 세포가 줄어드는 것으로 보아 디에콜이 갖는 세포손상 억제효과를 확인할 수 있었다.

[0079]

[0080] **[실험 예 12] 디에콜의 자외선 흡수파장 측정**

[0081] 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜은 메탄올에 녹여 100 μg/mL의 농도로 제조하고 쿼타즈 큐벳에 넣는다. 디에콜이 갖는 흡수 스펙트럼은 스펙트로포토메터 (U-2800, Hitachi)를 이용하여 280에서 420 nm사이의 파장을 측정하였다.

[0082] 도 12는 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜로부터 자외선 흡수파장을 측정한 그레프로 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 디에콜은 자외선 B의 영역인 280-320 nm에서 높은 흡수파장을 보이는 것을 확인하였다.

[0083] **[실험 예 13] 디에콜이 갖는 자외선B 보호효과에 대한 동물실험**

[0084] 실험에 사용된 동물은 일본 SLC사에서 구입한 8주령의 누드마우스를 사용하였다. 누드마우스는 19~25℃의 온도와 40~60%의 습도, 12시간을 주기로 명암을 주었으며, 빛의 세기는 150~300 Lux를 기준으로 하였다. 누드마우스는 폴리탄산에스테르 케이지 (260W×420L×180H)에서 사육시켰고, 먹이와 물은 최상품을 사용하였다. 누드마우스의 등에 왼쪽 면에는 디에콜을 3 mg/cm_2 농도로 도포하고, 오른쪽 면에는 도포를 하지 않았으며, 80 mJ/cm_2 의 세기로 자외선 B를 조사하였고 48시간 후에 자외선B에 의해 유도되는 홍반의 정도를 관찰하였다.

[0085] 도 13은 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜을 쥐의 피부에 도포하고 자외선 B를 조사했을 때 나타나는 피부의 홍반 억제효과 측정 사진으로 상기 실험의 결과를 나타낸 것으로서, 디에콜을 도포하지 않은 오른쪽 면에는 자외선 B에 의해 손상을 입은 결과물인 홍반이 부풀어 오르는 것이 관찰되었으며, 디에콜을 도포한 누드마우스의 왼쪽 면에는 홍반이 나타나지 않은 것으로 보아 디에콜이 갖는 자외선B에 대한 보호효과를 확인할 수 있었다.

[0086] 이상에서와 같이 본 발명은 비록 상기의 실시 예에 한하여 설명하였지만 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다.

발명의 효과

[0087] 전술한 구성 및 작용에 의한 효과를 상세하게 설명하면 다음과 같다. 본 발명에 따른 감태 추출물 및 디에콜은 자외선 B에 의해 유도되는 세포 내 활성 산소종에 대해 우수한 억제효과를 나타내고, 손상을 입은 세포의 생존율을 높여줄 뿐만 아니라, 자외선B에 의해 손상을 입은 세포의 보호효과 또한 뛰어난 장점을 가지고 있고, 동물실험을 통해 확인해본 결과에서도 자외선B에 의해 유도되는 홍반을 치유하는 탁월한 효능을 가지고 있다. 따라서 해양천연물 유래의 새로운 자외선 차단제로의 이용가능성이 충분히 있고, 현재 식용하지 않는 해양자원을 이

용함에 따라 미이용자원의 개발과 천연소재라는 점, 그리고 지역경제의 활성화 등의 부가효과를 제공할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0001] 도 1은 감태로부터 자외선B에 대한 보호효과를 갖는 조추출물 조제과정 및 유기용매 분획과정 흐름도

[0002] 도 2는 자외선B에 의해 생성된 세포내 활성산소종에 대한 20℃에서 추출한 감태의 수용성, 50% 에탄올, 100% 에탄올 추출물의 소거능 측정 그래프

[0003] 도 3은 자외선B에 의해 손상을 입은 세포에 대한 20℃에서 추출한 감태의 수용성, 50% 에탄올, 100% 에탄올 추출물의 세포 생존율 측정 그래프

[0004] 도 4는 자외선B에 의해 손상을 입은 세포에 20℃에서 추출한 감태의 수용성, 50% 에탄올, 100% 에탄올 추출물을 처리했을 때 나타나는 세포의 형태적 관찰 사진

[0005] 도 5는 자외선B에 의해 손상을 입은 세포에 대한 20℃에서 추출한 감태의 100% 에탄올 추출물을 분획한 분획물들의 세포 생존율 측정 그래프

[0006] 도 6은 20℃에서 추출한 감태의 100% 에탄올 추출물로부터 자외선B에 대한 보호효과를 갖는 활성물질의 분리과정 흐름도

[0007] 도 7은 자외선B에 의해 생성된 세포내 활성산소종에 대한 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜의 소거능 측정 그래프

[0008] 도 8은 자외선B에 의해 손상을 입은 세포에 대한 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜의 세포 생존율 측정 그래프

[0009] 도 9는 자외선B에 의해 손상을 입은 DNA에서 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜의 농도별 손상억제효과 측정 그래프

[0010] 도 10은 자외선B에 의해 손상을 입은 DNA에서 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜의 농도별 손상억제효과의 형광현미경 사진

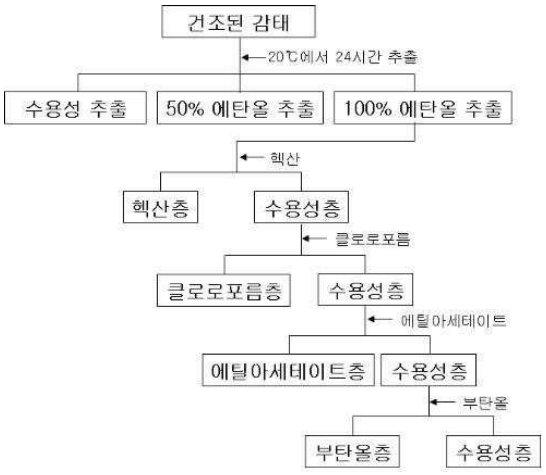
[0011] 도 11은 자외선B에 의해 손상을 입은 세포에 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜을 처리했을 때 나타나는 세포의 형태적 관찰사진

[0012] 도 12는 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜로부터 자외선 흡수파장을 측정한 그레프

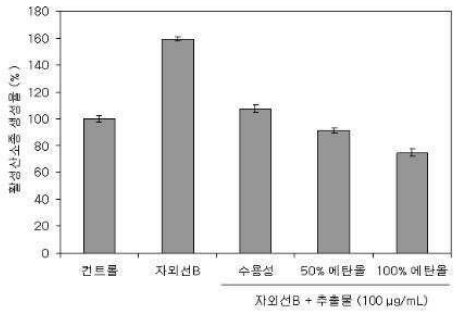
[0013] 도 13은 도 6의 분석결과에서 얻은 디에콜을 쥐의 피부에 도포하고 자외선B를 조사했을 때 나타나는 피부의 홍반 억제효과 측정 사진

도면

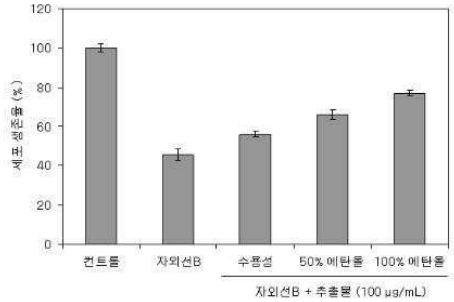
도면1



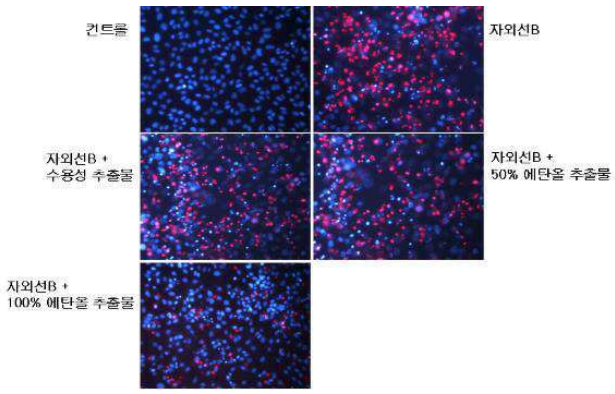
도면2


180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
활성산소종 생성율 (%)
컨트롤
자외선B
수용성
50% 에탄올
100% 에탄올
자외선B + 추출물 (100 μg/mL)

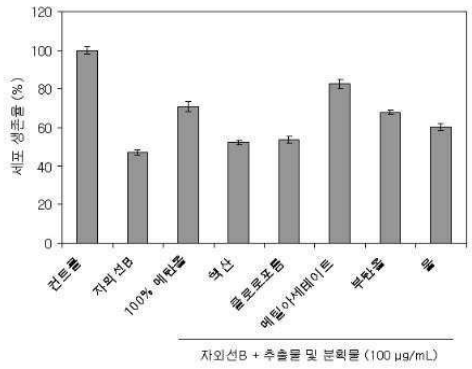
도면3


120
100
80
60
40
20
0
세포 생존율 (%)
컨트롤
자외선B
수용성
50% 에탄올
100% 에탄올
자외선B + 추출물 (100 μg/mL)

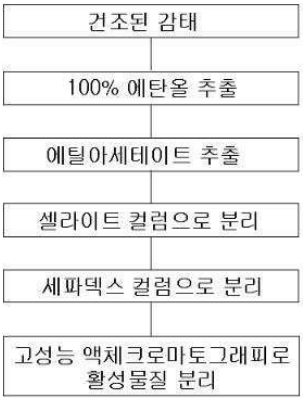
도면4


컨트롤
자외선B
자외선B +
수용성 추출물
자외선B +
50% 에탄올 추출물
자외선B +
100% 에탄올 추출물

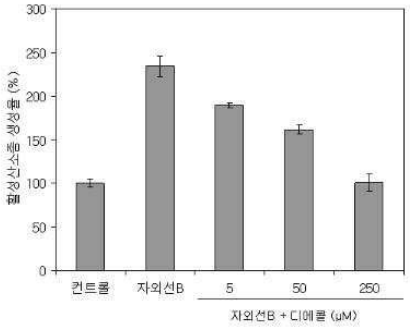
도면5


세포 생존율 (%)
120
100
80
60
40
20
0
컨트롤
자외선B
100% 에탄올
헥산
클로로포름
에틸아세테이트
부탄올
물
자외선B + 추출물 및 분획물 (100 μg/mL)

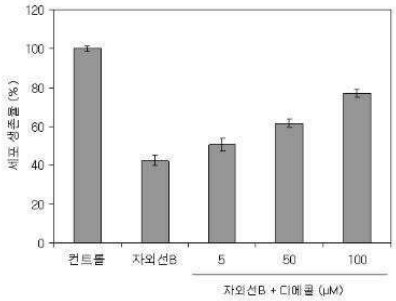
도면6


건조된 감태
100% 에탄올 추출
에틸아세테이트 추출
셀라이트 컬럼으로 분리
세파덱스 컬럼으로 분리
고성능 액체크로마토그래피로
활성물질 분리

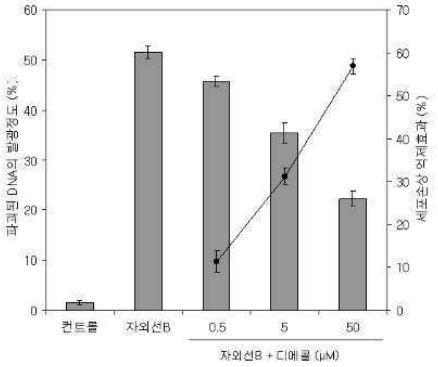
도면7


활성산소종 생성율 (%)
300
250
200
150
100
50
0
컨트롤
자외선B
5
50
250
자외선B + 디에몰 (μM)

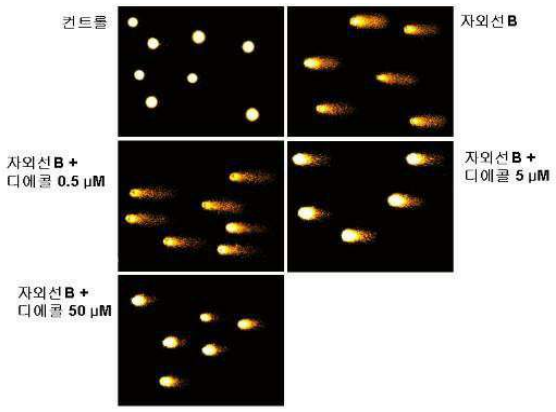
도면8


120
100
80
60
40
20
0
세포생존율 (%)
컨트롤
자외선B
5
50
100
자외선B + 디에콜 (μM)

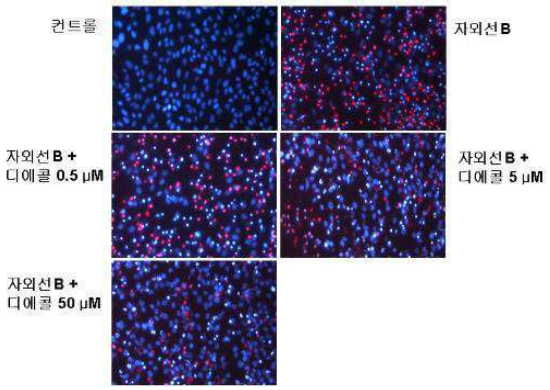
도면9


60
50
40
30
20
10
0
꼬리부분 DNA의 퍼센트 (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
세포생존율 (%)
컨트롤
자외선B
0.5
5
50
자외선B + 디에콜 (μM)

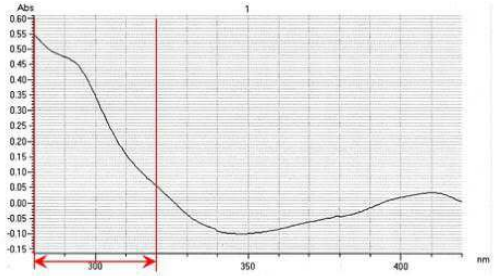
도면10


컨트롤
자외선B
자외선B +
디에콜 0.5 μM
자외선B +
디에콜 5 μM
자외선B +
디에콜 50 μM

도면11



도면12



자외선B 범위

도면13

