



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0146788
(43) 공개일자 2023년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 311/40 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
(52) CPC특허분류
C07D 311/40 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0045618
(22) 출원일자 2022년04월13일
심사청구일자 2022년04월13일

(71) 출원인
(주)뉴메드
서울특별시 동대문구 이문로 88(이문동, 민족통일
대통령 빌딩)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
우석대학교 산학협력단
전라북도 완주군 삼례읍 삼례로 443 (우석대학교)
(72) 발명자
김호철
서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 204동
1103호
윤준
서울특별시 성북구 화랑로24길 22-7, 203호
김영식
경기도 성남시 수정구 복정로158번길 19, 402호
(74) 대리인
김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법

(57) 요약

본 발명은 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법은 현치사포도로부터 고품
량의 암페롭신을 높은 효율로 추출할 수 있으며, 일련의 단순한 공정을 통해 단시간에 저렴한 비용으로 암페롭신
을 대량으로 분리할 수 있는 장점이 있다.

(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 현치사포도에 추출 용매를 첨가하여 현치사포도 추출물을 제조하는 단계;
(b) 상기 추출물을 침전시키는 단계; 및
(c) 상기 침전물을 고액분리하는 단계를 포함하는,
현치사포도 (*Ampelopsis grossedentata*)로부터 암페롭신 (ampelopsin)을 분리하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 추출물의 제조는 환류 추출법으로 수행되는 것인, 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 추출 용매는 물, C₁ 내지 C₅의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매인, 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 추출 용매는 현치사포도의 중량을 기준으로 10 내지 20배로 첨가되는 것인, 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 추출 온도는 50 내지 100 °C인, 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계 이후에 추출물을 농축 또는 건조하는 단계를 더 포함하는, 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 침전 온도는 4 내지 25 °C인, 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 침전 시간은 1 내지 12시간인, 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 고액분리는 원심분리, 회전탈수, 원심여과, 흡인여과 및 가압여과로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행되는 것인, 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 가압여과는 필터프레스 (filter press)를 이용하여 수행되는 것인, 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항의 어느 한 항의 방법으로 추출된 현치사포도 추출물 또는 이로부터 정제된 암페롭신을 포함하는 식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물은 간기능 개선용 건강기능식품 형태인, 식품조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 현치사포도로부터 높은 효율로 고함량의 암페롭신을 분리하는 방법 및 이로부터 분리된 암페롭신을 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현치사포도 (*Ampelopsis grossedentata*)는 포도과 (Vitaceae)의 식물 종으로서, 일반적으로 '모예암 (moyeam)'으로 불리며 'Vine tea', 'Teng Cha', 'Tocha', 'Rattan tea', 'Duan Wu Cha', 'Mao Yan Mei' 등으로도 불린다. 현치사포도는 주로 해발 400 ~ 1,300 미터의 산 관목, 숲, 바위, 도랑에 서식하며, 중국 중부와 남부 (남동부 윈난, 광시, 광둥, 푸젠, 장시, 후난, 구이저우, 후베이 서부)에 분포되어 있고, 연간 생산량의 88.5%가 호남성 (후남성) 및 호북성에서 생산된다. 예로부터 민간에서 현치사포도 잎을 우려 차로 활용했으며, 구황본초 (救本草), 중화본초 (中華本草) 등 중국 약초 관련 문서에 따르면 동속식물인 사포도 잎은 구황목적으로 식용하거나 부종 등 질병의 치료약으로 사용되었다고 보고되었다. 중국에서는 중약으로 주로 청열이습 (淸熱利濕), 평간강압 (平肝降壓) 등의 효능으로 사용되었고, 최근에는 현치사포도에 다량 함유되어 있는 암페롭신 (ampelopsin) 성분의 숙취해소, 알코올성 간손상 개선 효과가 주목받고 있으며, 특히 외국에서는 약 300 ~ 600 mg을 일일 복용량으로 하여 숙취 예방 식품으로 판매되고 있다.

[0003] 국내 숙취해소제 시장의 규모는 2014년 1,304 억원에서 2019년 2,400 억원으로 연평균 20%의 높은 성장세를 나타내고 있다. 숙취해소제의 주원료로 헛개나무 열매를 사용하는 '컨디션', '상쾌환' 등이 있으며, 쌀눈, 대두발효 추출물과 타우린을 주원료로 하는 '모닝케어', 헛개나무 열매와 커큐민을 사용하는 '레디큐', 밀크씨슬을 사용하는 '숙취엔굿' 및 헛개나무 추출물과 녹차, 감태 등 복합물이 함유된 '깨수깡' 등 다양한 제품이 판매되고 있다. 이처럼 다양한 원료가 숙취해소제에 사용되고 있지만, 현치사포도 또는 이의 주요성분인 암페롭신을 주원료로 사용하는 제품은 국내에서 아직까지 존재하지 않는다. 다만, 해외에선 숙취해소제의 주원료로서 암페롭신을 많이 사용하고 있으며, 이와 관련된 제품 또한 지속적으로 출시되고 있다.

[0004] 현치사포도로부터 암페롭신을 분리하는 방법으로 기존에는 컬럼을 이용하거나, 비극성이 높은 유기용매를 이용하여 분획하거나, 재결정 방법 등이 보고되어 있다. 그러나 기존의 방법들은 제조공정상 설비 부하가 과대하거나 최종 제품의 유기용매 잔류 등 문제가 있으며, 순도가 낮아 대량 제조 공정에서 효율성이 낮다는 문제점이 있다.

[0005] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 현치사포도로부터 고함량 및 고순도의 암페롭신을 높은 효율로 분리하는 방법을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 현치사포도로부터 고품질의 암페롭신을 효율적으로 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 추출된 암페롭신을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 현치사포도 (*Ampelopsis grossedentata*)로부터 암페롭신 (ampelopsin)을 분리하는 방법을 제공한다.

[0011] 구체적으로, 본 발명은 (a) 현치사포도에 추출 용매를 첨가하여 현치사포도 추출물을 제조하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 추출물을 침전시키는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 침전물을 고액분리하는 단계를 포함하는, 현치사포도 (*Ampelopsis grossedentata*)로부터 암페롭신 (ampelopsin)을 분리하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 암페롭신 분리방법은 (a) 현치사포도에 추출 용매를 첨가하여 현치사포도 추출물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0014] 본 발명에서 “현치사포도 (*Ampelopsis grossedentata*)”는 포도과 (Vitaceae)에 속하는 다년생 초본으로, 자연에서 자생하는 것, 구입하거나 재배한 것을 모두 제한 없이 사용할 수 있으며, 이의 전초, 지상부, 잎, 뿌리, 줄기, 꽃, 종자 등의 모든 부위를 제한 없이 포함하나, 구체적으로 현치사포도의 잎을 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명에서 용어 “추출물”은 천연물로부터 분리된 활성 성분 즉, 목적하는 활성을 보이는 물질을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서 현치사포도 추출물이란 현치사포도로부터 분리하여 얻은 물질을 의미하는 것으로, 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하는 추출과정으로 획득할 수 있으며, 현치사포도로부터 분리한 추출액, 조추출물, 이의 건조 분말, 농축물 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함한다. 또한, 상기 추출물에는 상기 추출과정을 거친 추출액을 분획하거나, 통상적인 정제과정을 거친 추출물도 포함하며, 감압 증류 및 동결건조, 분무건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로도 제조될 수 있다.

[0016] 본 발명에서 (a) 단계의 추출물의 제조는 천연물 추출물의 통상적인 제조방법을 사용할 수 있으며, 예컨대, 침지(냉침, 온침) 추출법, 초음파 추출법, 초임계 추출법, 환류 추출법 또는 열수 추출법 등을 사용하여 공지의 방법에 의해 제조될 수 있고, 본 발명의 일 구현예에 따르면 환류 추출법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 추출물은 물 또는 유기용매의 추출 용매로 추출된 것일 수 있고, 구체적으로 물, 알코올, 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 아세톤, 벤젠, 헥산, 디에틸에테르 및 디클로로메탄으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 보다 구체적으로 물 또는 C₁ 내지 C₅의 저급 알코올, 보다 더 구체적으로 물, 에탄올, 메탄올 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것일 수 있으며, 본 발명의 일 구현예에 따르면 추출 용매는 물 또는 에탄올일 수 있다.

[0018] 본 발명의 추출 용매는 현치사포도의 중량을 기준으로 1 내지 50배를 사용할 수 있으며, 구체적으로 5 내지 30 배, 보다 구체적으로 10 내지 20배를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명에서 현치사포도는 자연에서 자생하는 것, 직접 재배한 것 또는 시판되는 것을 제한 없이 사용할 수 있으며, 자연 상태 그대로인 것뿐만 아니라 반건조, 건조, 발효 또는 증숙 등의 가공 처리된 것을 포함한다.

[0020] 본 발명의 추출물의 추출 온도는 30 내지 100 °C, 구체적으로 50 내지 100 °C 일 수 있고, 추출 시간은 1 내지 24 시간, 구체적으로 1 내지 5 시간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 추출물의 추출 횟수는 1 내지 5회, 구체적으로 1회 또는 2회일 수 있다.

[0021] 상기 추출과정을 거친 추출액은 이후, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 이들

의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 개별적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하여 각 용매의 분획물을 제조할 수 있다.

- [0022] 본 발명은 상기 (a) 현치사포도 추출물의 제조단계 이후에 (a) 단계의 추출과정을 거친 추출액을 농축 또는 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 농축은 감압 농축기, 예를 들어, 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있고, 상기 건조는 예를 들어, 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조법으로 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 건조된 추출물은 분말형태로 사용하거나 분말을 증류수 또는 통상의 용매에 녹여 사용할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 암페롭신 분리방법은 (b) 현치사포도 추출물을 침전시키는 단계를 포함한다.
- [0025] 본 발명은 상기 (b) 침전 단계를 통해 현치사포도 추출물로부터 분리되는 암페롭신의 함량을 증가시킬 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 현치사포도 추출물을 침전처리 함으로써 암페롭신의 함량이 4배 이상 현저히 향상됨을 확인하였다.
- [0026] 본 발명에서 침전 방법은 (a) 단계에서 제조된 현치사포도 추출물을 그대로 정치하거나, 침전 용매를 첨가하여 침전시킬 수 있다. 본 발명에 있어 침전 용매는 현치사포도 추출액의 침전 속도, 침전 수율, 침전물의 순도 등을 고려하여 첨가 여부 및 이의 양을 적절히 결정할 수 있으며, 침전 용매의 예시로는 물 또는 C₁ 내지 C₅의 저급 알코올, 보다 더 구체적으로 물, 에탄올, 메탄올 또는 이들의 혼합 용매일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 상기 (b) 침전단계의 침전 온도는 0 내지 30 ℃, 구체적으로 2 내지 28 ℃, 보다 더 구체적으로 4 내지 25 ℃일 수 있고, 본 발명의 일 실시예에 따르면 4 또는 25 ℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 상기 (b) 침전단계의 침전 시간은 1 시간 이상, 구체적으로 1 내지 24 시간, 보다 구체적으로 1 내지 12 시간일 수 있으며, 침전 속도 등에 따라 적절히 결정될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 암페롭신 분리방법은 (c) 상기 (b) 단계의 침전물을 고액분리하는 단계를 포함한다.
- [0031] 상기 (c) 단계의 침전물은 현치사포도 추출물을 침전시켜 상층액을 제거한 하층물을 의미할 수 있다.
- [0032] 상기 (c) 단계의 고액분리는 원심분리, 회전탈수, 원심여과, 흡인여과 및 가압여과에 의해 수행될 수 있고, 구체적으로 원심분리 또는 가압여과일 수 있다.
- [0033] 본 발명은 상기 (c) 고액분리 단계를 통해 현치사포도 추출물로부터 분리되는 암페롭신의 함량 및 수율을 더욱 증가시킬 수 있으며, 고액분리를 통해 수득한 고형분에는 암페롭신이 다량 함유되어 있다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 현치사포도 침전물을 고액분리 방법을 통해 회수함으로써 암페롭신의 함량이 더욱 향상됨을 확인하였다.
- [0035] 상기 (c) 단계의 고액분리 공정을 가압여과에 의해 수행할 경우, 필터프레스 (filter press) 또는 벨트프레스 (belt press)를 이용할 수 있다.
- [0036] 상기 (c) 단계의 고액분리 공정은 1회 또는 수회 수행할 수 있으며, 수회 수행할 경우 이전 공정을 통해 회수한 고형분에 물을 가하고 교반한 후 다시 고액분리 공정을 반복할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 방법을 통해 분리된 암페롭신의 함량은 70 중량% 이상, 구체적으로 80 중량% 이상, 보다 구체적으로 87 중량% 이상일 수 있다.
- [0039] 상기 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 추출된 현치사포도 추출물 또는 이로부터 정제된 암페롭신을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0040] 상기 현치사포도, 암페롭신 및 추출물은 앞서 기재한 바와 같다.
- [0041] 본 발명을 통해 추출된 현치사포도 추출물은 고순도 및 고함량의 암페롭신을 포함하고 있어 숙취해소, 알코올성

간손상 개선 등을 위한 식품에 유용하게 활용될 수 있다.

- [0042] 본 발명의 식품 조성물은 현치사포도 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 식품 조성물은 암페롭신 또는 현치사포도 추출물을 유효성분으로 포함하며, 유효성분의 함량은 사용 목적 (예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 현치사포도 추출물은 식품의 총 중량에 대하여 0.0001 내지 100 중량%로 첨가할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 구체적으로, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 목적에 따라 기능성 식품일 수 있으며, 구체적으로 건강기능식품, 보다 구체적으로 숙취해소 또는 간기능 개선용 건강기능식품일 수 있다.
- [0046] 상기 기능성 식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가가치를 부여한 식품을 의미한다. 이러한 기능성 식품의 성분은 생체 방어와 신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다.
- [0047] 본 발명에 따른 건강기능식품에 있어서 현치사포도 추출물의 첨가량은 대상인 건강기능식품의 종류에 따라 달라질 수 있지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가될 수 있으며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 구체적으로 0.1 내지 20 중량%의 범위일 수 있다. 또한, 환제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태의 건강기능식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량%, 구체적으로 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 추출물을 식품에 첨가할 경우, 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 등의 보조성분과 함께 첨가될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 추출물을 음료에 첨가할 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 감미제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 타우마린, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있고, 상기 천연 탄수화물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 단당류(예를 들어, 포도당, 과당 등), 이당류(예를 들어, 말토오스, 수크로오스 등), 다당류(예를 들어, 텍스트린, 사이클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예를 들어, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등) 등을 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0050] 본 발명은 현치사포도로부터 고함량의 암페롭신을 높은 효율로 추출할 수 있으며, 일련의 단순한 공정을 통해 단시간에 저렴한 비용으로 암페롭신을 대량으로 분리할 수 있는 장점이 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0053] **실시예 1. 추출 용매에 따른 현치사포도 추출물의 암페롭신 함량 비교**
- [0054] 현치사포도 추출물의 제조를 위한 추출 용매의 종류에 따른 암페롭신 함량을 비교하였다.
- [0055] 구체적으로, 현치사포도 잎 20 g에 0%, 30%, 50%, 70% 또는 94% 에탄올을 각각 200 mL 첨가하고 80 ~ 100 °C에서 3 시간동안 환류 추출 후 추출액을 동결건조의 방법으로 건조하였다. 건조된 추출물 5 mg을 취하여 50% 메탄

을 15 mL에 녹인 다음 0.45 μm 필터(PVDF, HYUNDAI MICRO, KOREA)로 여과하고 HPLC를 이용하여 암페롭신 함량을 측정하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[표 1]

추출 용매 (% EtOH)	암페롭신 함량 (mg/g)	추출물 수율 (%)
0%	150.06 $\pm$ 0.75	18.0
30%	163.20 $\pm$ 1.32	18.0
50%	180.86 $\pm$ 3.13	22.8
70%	181.53 $\pm$ 0.00	28.5
94%	190.74 $\pm$ 2.34	28.0

상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 에탄올의 비율이 높을수록 암페롭신의 함량과 수율이 증가함을 확인하였다.

실시예 2. 현치사포도의 추출액의 침전 여부에 따른 암페롭신 함량 비교

현치사포도 추출액의 제조 후 이의 침전 여부에 따른 암페롭신 함량을 비교하였다.

구체적으로, 현치사포도 잎 20 g에 200 mL의 물을 첨가하고 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간동안 환류 추출 후 추출액을 회전 농축의 방법으로 농축하였다. 그 다음 상기 농축액을 자연 침전방법으로 12 시간 동안 침전시킨 후 침전물을 건조하거나, 침전시키지 않고 상기 농축액을 건조하였다. 건조된 추출물을 각각 5 mg을 취하여 50% 메탄올 15 mL에 녹인 다음 0.45 μm 필터(PVDF, HYUNDAI MICRO, KOREA)로 여과하고 HPLC를 이용하여 암페롭신 함량을 측정하였으며, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[표 2]

침전법 적용	암페롭신 함량 (mg/g)	추출물 수율 (%)
-	150.06 $\pm$ 0.75	18.0
침전	694.42 $\pm$ 54.67	10.0

상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 현치사포도 추출물을 침전처리 함으로써 침전시키지 않은 경우와 비교하여 암페롭신 함량이 약 4.6배 이상 현저히 향상됨을 확인하였다.

실시예 3. 추출 용매의 배수에 따른 현치사포도 추출물의 암페롭신 함량 비교

현치사포도 추출물의 제조를 위한 추출 용매의 배수에 따른 현치사포도 침전물의 암페롭신 함량을 비교하였다.

구체적으로, 현치사포도 잎 20 g에 10, 15 또는 20배수의 물을 첨가하고 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간동안 환류추출 후 추출액을 회전농축의 방법으로 농축하고 이를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12 시간 정치하여 침전시켰다. 그 다음 동결건조의 방법으로 건조한 추출물 5 mg을 취하여 50% 메탄올 15 mL에 녹인 다음 0.45 μm 필터(PVDF, HYUNDAI MICRO, KOREA)로 여과하고 HPLC를 이용하여 암페롭신 함량을 측정하였으며, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

[표 3]

용매 배수	암페롭신 함량 (mg/g)	추출물 수율 (%)
10	694.42 $\pm$ 54.67	10.0
15	736.10 $\pm$ 10.76	11.5
20	651.22 $\pm$ 26.57	12.5

상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 현치사포도의 추출 용매로서 물을 15배수로 사용한 경우 암페롭신 함량이 가장 높은 것을 확인하였다.

실시예 4. 고액분리 방법에 따른 현치사포도 추출물의 암페롭신 함량 비교

현치사포도 침전물의 고액분리 방법에 따른 현치사포도 추출물의 암페롭신 함량을 비교하였다.

구체적으로, 현치사포도 잎 20 g에 15배수의 물을 첨가하고 100 ℃에서 1 시간동안 환류추출 후 추출액을 회전 농축의 방법으로 농축하고 이를 4 ℃에서 12 시간 정치하여 침전시켰다. 그 다음 원심분리 기기를 이용하여 3000 rpm으로 10분 동안 원심분리하거나, 필터프레스 기기(KFP-200MM, 한국필터, KOREA)를 이용하여 30 MPa 압력으로 펌프 압착하여 침전물을 고액분리하고 이를 회수하였다. 회수한 침전물을 동결건조 방법으로 건조한 추출물 5 mg을 취하여 50% 메탄올 15 mL에 녹인 후 0.45 μm 필터(PVDF, HYUNDAI MICRO, KOREA)를 사용하여 여과하고 HPLC를 이용하여 암페롭신 함량을 측정하였으며, 그 결과를 표 4에 나타내었다.

[표 4]

고액분리 방법	암페롭신 함량 (mg/g)	추출물 수율 (%)
원심분리	721.68±28.74	10.14
필터프레스	875.85±54.24	28.35

상기 표 4에 나타난 바와 같이, 원심분리 또는 필터프레스를 통해 침전물을 고액분리한 경우 암페롭신 함량 및 수율이 모두 증가하였으며, 특히 필터프레스를 통해 침전물을 분리하여 회수한 경우 암페롭신 함량 및 수율이 현저히 상승됨을 확인하였다.

실시예 5. 침전 온도에 따른 현치사포도 추출물의 암페롭신 함량 비교

현치사포도 추출액의 침전 온도에 따른 현치사포도 추출물의 암페롭신 함량을 비교하였다.

구체적으로, 현치사포도 잎 20 g에 15배수의 물을 첨가하고 100 ℃에서 1 시간동안 환류추출 후 추출액을 회전 농축의 방법으로 농축하였다. 그 다음 상기 농축액을 4 ℃ 또는 25 ℃에서 1 시간 정치하여 침전시킨 후 필터프레스 기기(KFP-200MM, 한국필터, KOREA)를 이용하여 30 MPa 압력으로 펌프 압착하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물을 동결건조 방법으로 건조한 추출물 5 mg을 취하여 50% 메탄올 15 mL에 녹인 후 0.45 μm 필터(PVDF, HYUNDAI MICRO, KOREA)를 사용하여 여과하고 HPLC를 이용하여 암페롭신 함량을 측정하였으며, 그 결과를 표 5에 나타내었다.

[표 5]

침전온도	암페롭신 함량 (mg/g)	추출물 수율 (%)
25 ℃	966.23±187.47	31.3
4 ℃	899.76±73.47	28.8

상기 표 5에 나타난 바와 같이, 실온 또는 저온에서 현치사포도 추출액을 침전시킨 경우, 암페롭신 함량 및 수율 모두 유사한 수준으로 나타남을 확인하였다.

실시예 6. 침전 시간에 따른 현치사포도 추출물의 암페롭신 함량 비교

현치사포도 추출액의 침전 시간에 따른 현치사포도 추출물의 암페롭신 함량을 비교하였다.

구체적으로, 현치사포도 잎 20 g에 15배수의 물을 첨가하고 100 ℃에서 1 시간동안 환류추출 후 추출액을 회전 농축의 방법으로 농축하였다. 그 다음 상기 농축액을 1시간, 3시간 또는 12시간 동안 각각 4 ℃에서 정치하여 침전시킨 후 필터프레스 기기(KFP-200MM, 한국필터, KOREA)를 이용하여 30 MPa 압력으로 펌프 압착하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물을 동결건조 방법으로 건조한 추출물 5 mg을 취하여 50% 메탄올 15 mL에 녹인 후 0.45 μm 필터(PVDF, HYUNDAI MICRO, KOREA)를 사용하여 여과하고 HPLC를 이용하여 암페롭신 함량을 측정하였으며, 그 결과를 표 6에 나타내었다.

[0091] [표 6]

침전시간	암페로핀 함량 (mg/g)	추출물 수율 (%)
1h	899.76±73.47	28.8
3h	875.85±67.80	29.8
12h	955.76±7.14	33.0

[0092]

[0093] 상기 표 6에 나타낸 바와 같이, 현치사포도 추출액의 침전 시간에 따른 암페로핀 함량 및 수율 모두 유사한 수준으로 나타남을 확인하였다.