(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0000399
(43) 공개일자 2018년01월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/88 (2006.01) *G01N 30/02* (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01) *G01N 33/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/88 (2013.01)
G01N 33/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0078260
(22) 출원일자 2016년06월22일
심사청구일자 2016년06월22일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(72) 발명자
권기성
충청북도 청주시 흥덕구 대농로 17, 106동 905호 (복대동, 지웰시티1차아파트)
최장덕
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 연제만수길 17 703동 1501호 (연제리,오송대원칸타빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이재량

전체 청구항 수 : 총 9 항

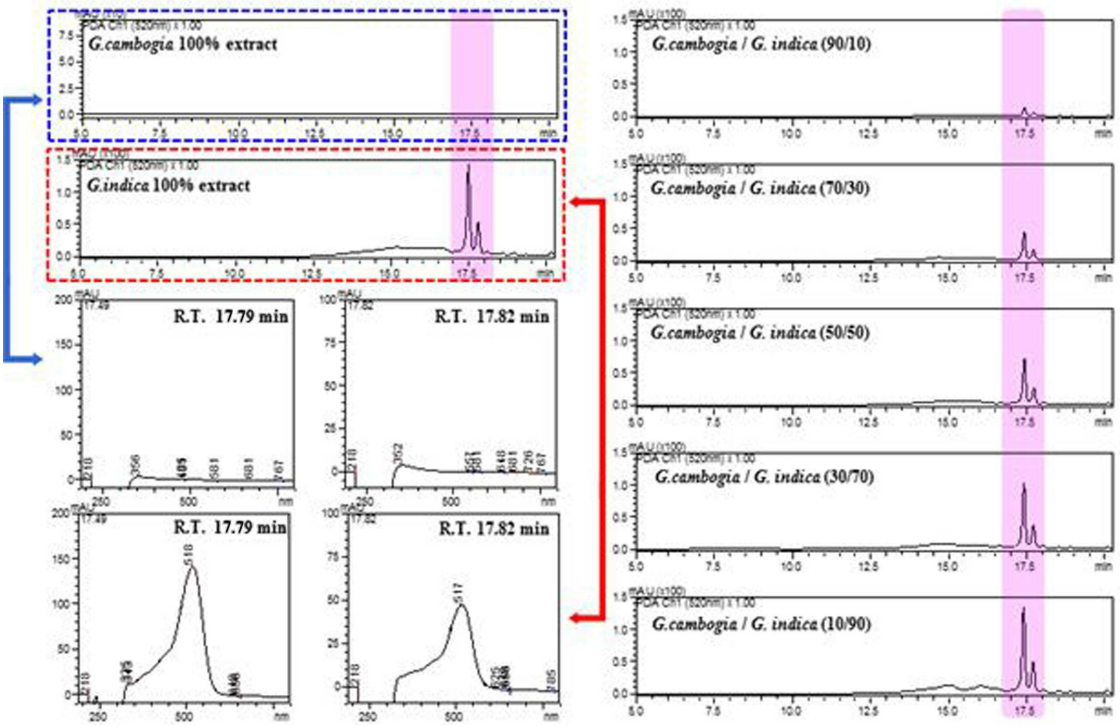
(54) 발명의 명칭 **가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법**

(57) 요 약

본 발명은 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 허용되지 않은 원료인 가르시니아 인디카의 혼입여부를 판별하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 가르시니아 캄보지아와 종이 동일하여 혼용되기 쉬우며 혼용시 구별이 어려운 가르시니아 인디카가 시중에서 판매되고 있는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 혼입되었는지 여부를

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2



정성 및 정량적으로 정확하게 판별할 수 있는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법은 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카를 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 상기 가르시니아 인디카의 표지성분을 검출하는 표지성분검출단계와, 판별하고자 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품으로부터 시험용액을 조제하는 조제단계와, 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석하는 분석단계와, 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과로부터 상기 표지성분이 상기 시험용액 중에 함유되어 있는지를 판별하는 판별단계를 포함한다.

(52) CPC특허분류
G01N 2030/027 (2013.01)
G01N 2030/062 (2013.01)
G01N 2030/8836 (2013.01)

(72) 발명자
조천호
세종특별자치시 도움1로 가재마을 5단지 520동 2101호
김경수
광주광역시 남구 서문대로654번길 24 진월삼익세라믹아파트2차 201-1505호
최지연
전라북도 부안군 변산면 지서로 86
노은영
광주광역시 북구 서하로 120 6동 1401호
박유민
서울시 서대문구 성산로17길 302호
이가현
광주광역시 서구 화운로 106동 303호
이청미
광주광역시 북구 부남길15번길 6-7 981-5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1475009258
부처명 식품의약품안전처
연구관리전문기관 식품의약품안전처
연구사업명 식품 등 안전관리 (조사분석사업명 : 식품등안전관리)
연구과제명 불량식품 근절을 위한 분석법 개발 연구
기 여 율 1/1
주관기관 조선대학교산학협력단
연구기간 2016.01.01 ~ 2016.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

가르시니아 캄보지아(*Garcinia cambogia*)와 가르시니아 인디카(*Garcinia indica*)를 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 상기 가르시니아 인디카의 표지성분을 검출하는 표지성분검출단계와;

판별하고자 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품으로부터 시험용액을 조제하는 조제단계와;

상기 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석하는 분석단계와;

상기 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과로부터 상기 표지성분이 상기 시험용액 중에 함유되어 있는지를 판별하는 판별단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 판별단계는 상기 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과와 상기 표지성분의 머무름시간을 비교하여 상기 시험용액 중 상기 표지성분의 함유 여부를 판별하는 것을 특징으로 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 표지성분검출단계에서 상기 가르시니아 캄보지아와 상기 가르시니아 인디카는 열매의 껍질을 사용하는 것을 특징으로 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 표지성분은 상기 가르시니아 인디카에 함유된 시아니딘-3-삼부비오사이드(cyanidin-3-sambubioside) 또는 시아니딘-3-글루코사이드(cyanidin-3-glucoside)인 것을 특징으로 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조제단계에서 상기 가르시니아 캄보지아 건강기능식품은 분말 및 알약 형태 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 조제단계에서 상기 시험용액은 상기 분말형태의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 에탄올을 가해 환류추출한 후 여과하여 수득한 것을 특징으로 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 조제단계에서 상기 시험용액은 상기 알약 형태의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품을 분말화하여 에탄올을 가해 환류추출한 후 여과하여 수득한 것을 특징으로 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 판별단계는 상기 표지성분을 농도별로 액체 크로마토그래피로 분석하여 작성한 검량선을 근거로 상기 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중에 혼입된 상기 가르시니아 인디카의 혼입을 정성 및 정량적으로 판별하는 것을 특징으로 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방

법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 표지성분검출단계는 a)가르시니아 캄보지아의 액체크로마토그래피 분석결과와 가르시니아 인디카의 액체크로마토그래피 분석결과를 비교하여 상기 표지성분의 피크(peak)를 탐색하는 단계와, b)상기 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카를 혼합한 혼합물을 액체크로마토그래피로 분석하여 가르시니아 인디카 원료의 혼합농도에 따른 상기 표지성분의 피크 변화를 관찰하는 단계와, c)상기 표지성분의 화합물을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 허용되지 않은 원료인 가르시니아 인디카의 혼입여부를 판별하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 가르시니아 캄보지아와 종이 동일하여 혼용되기 쉬우며 혼용시 구별이 어려운 가르시니아 인디카가 시중에서 판매되고 있는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 혼입되었는지 여부를 정성 및 정량적으로 정확하게 판별할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 웰빙의 바람을 타고 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라 건강 보조 기능 식품의 수요가 증가하고 있다. 특히, 비만 등 성인병 및 젊은 층의 다이어트를 위하여 체중조절 건강기능식품의 소비량이 급증하고 있다.

[0003] 체중조절을 목적으로 하는 기능성 식품소재 중 가르시니아 캄보지아를 이용한 건강기능식품의 판매량 및 소비량이 급증하고 있다. 가르시니아 캄보지아 추출물을 기능성 식품의 원료로 사용하는 기술로서, 대한민국 등록특허 제10-1367741호, 대한민국 등록특허 제10-1211067호, 대한민국 공개특허 제10-2015-0139074호 등 다수가 개시되어 있다.

[0004] 가르시니아 캄보지아(*Garcinia cambogia*)는 클루시아과(Clusiaceae)의 식물로서 열매의 껍질 부위를 사용하며, 껍질에는 한국인의 식습관에 가장 알맞은 탄수화물이 지방으로 저장되는 것을 억제하는 기능이 있는 하이드록시 시트르산(Hydroxycitric acid, HCA)이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 식품 의약품안전처에 따르면, 가르시니아 캄보지아 추출물을 기능성분인 HCA의 함량 기준으로 하루 750~2,800㎎을 섭취하면 탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방 감소에 도움을 주는 등 그 기능성을 인정받고 있다.

[0005] 한편, 식용으로 사용할 수 없는 가르시니아 인디카(*Garcinia indica*)는 가르시니아 캄보지아와 목, 과, 속이 동일하여 가르시니아속(Garcinia species)으로 분류할 수 있다. 가르시니아 캄보지아의 산지는 인도네시아, 인도, 네팔, 말레이시아, 중국 등이고 가르시니아 인디카는 인도의 서가츠 산맥에서 재배되고 있다.

[0006] 가르시니아 캄보지아 추출물의 주 수입국은 인도이나, 인도 등지에서는 가르시니아 인디카를 가르지니아 캄보지아라고 불리어 판매되고 있는 실정이다. 국내에 유통되는 모든 가르시니아 캄보지아 추출물은 수입되어 사용되어지므로 이를 악용하여 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카를 혼용된 추출물을 사용할 경우 판별할 수 있는 분석법이 아직까지 존재하지 않는다.

[0007] 따라서 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 가르시니아 인디카가 혼입되었는지 여부를 확인할 수 있는 방법의 마련이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-1367741호: 가르시니아캄보지아추출물을 함유하는 젤리 조성물 및 이의 제조 방법

(특허문헌 0002) 2. 대한민국 등록특허 제10-1211067호: 가르시니아캄보지아껍질추출물을 함유하는 안정한 다이

어트용 젤리 조성물 및 그 제조방법

(특허문헌 0003) 3. 대한민국 공개특허 제10-2015-0139074호: 귀리 식이섬유 및 가르시니아캄보지아 추출물을 포함하는 성인병 예방용 식품

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 문제점을 개선하고자 창출된 것으로서, 대한민국에서 허용되지 않은 원료를 사용하거나 표기사항을 허위로 표기하는 방법과 같은 사례로서 시중에 판매되고 있는 가르시니아 캄보지아 함유 제품 중 가르시니아 인디카가 혼입되어 있는지를 가르시니아 인디카의 표지성분 분석을 통하여 정확하게 판별할 수 있는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법은 가르시니아 캄보지아(*Garcinia cambogia*)와 가르시니아 인디카(*Garcinia indica*)를 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 상기 가르시니아 인디카의 표지성분을 검출하는 표지성분검출단계와; 판별하고자 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품으로부터 시험용액을 조제하는 조제단계와; 상기 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석하는 분석단계와; 상기 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과로부터 상기 표지성분이 상기 시험용액 중에 함유되어 있는지를 판별하는 판별단계;를 포함한다.

[0011] 상기 판별단계는 상기 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과와 상기 표지성분의 머무름시간을 비교하여 상기 시험용액 중 상기 표지성분의 함유 여부를 판별한다.

[0012] 상기 표지성분검출단계에서 상기 가르시니아 캄보지아와 상기 가르시니아 인디카는 열매의 껍질을 사용하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 표지성분은 상기 가르시니아 인디카에 함유된 시아니딘-3-삼부비오사이드(cyanidin-3-sambubioside) 또는 시아니딘-3-글루코사이드(cyanidin-3-glucoside)인 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 조제단계에서 상기 가르시니아 캄보지아 건강기능식품은 분말 및 알약 형태 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 조제단계에서 상기 시험용액은 상기 분말형태의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 에탄올을 가해 환류추출한 후 여과하여 수득한다.

[0016] 상기 조제단계에서 상기 시험용액은 상기 알약 형태의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품을 분말화하여 에탄올을 가해 환류추출한 후 여과하여 수득한다.

[0017] 상기 판별단계는 상기 표지성분을 농도별로 액체 크로마토그래피로 분석하여 작성한 검량선을 근거로 상기 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중에 혼입된 상기 가르시니아 인디카의 혼입을 정성 및 정량적으로 판별한다.

[0018] 상기 표지성분검출단계는 a)가르시니아 캄보지아의 액체크로마토그래피 분석결과와 가르시니아 인디카의 액체크로마토그래피 분석결과를 비교하여 상기 표지성분의 피크(peak)를 탐색하는 단계와, b)상기 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카를 혼합한 혼합물을 액체크로마토그래피로 분석하여 가르시니아 인디카 원료의 혼합농도에 따른 상기 표지성분의 피크 변화를 관찰하는 단계와, c)상기 표지성분의 화합물을 확인하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[0019] 상술한 바와 같이 본 발명은 분말, 알약 형태의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품을 액체크로마토그래피로 분석하여 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중에 함유되어 있는 가르시니아 인디카의 표지성분을 정성 및 정량적으로 분석함으로써 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 가르시니아 인디카가 혼입되었는지 여부를 정확하게 판별할 수 있다.

[0020] 이러한 판별방법에 의해 시중에서 유통 및 판매되고 있는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 국내에 허용되지

않은 가르시니아 인디카를 사용하거나 표기사항을 허위로 표기하는 것을 용이하게 단속할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 가르시니아 인디카의 표지성분인 시아니딘-3-삼부비오사이드와 시아니딘-3-글루코사이드의 표준용액(농도 50ppm)의 크로마토그램과 UV spectrum을 나타낸 도면이고,

도 2는 가르시니아 캄보지아 시험용액, 가르시니아 인디카 시험용액, 가르시니아 캄보지아/가르시니아 인디카 혼합 시험용액의 크로마토그램과 UV spectrum을 나타낸 도면이고,

도 3은 가르시니아 인디카의 표지성분인 시아니딘-3-삼부비오사이드와 시아니딘-3-글루코사이드를 확인하기 위한 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS/MS) 결과이고,

도 4는 가르시니아 캄보지아에 가르시니아 인디카를 비율별로 혼입하여 제조한 캄보지아/가르시니아 인디카 혼합 시험용액의 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0023] 본 발명은 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중에 가르시니아 인디카의 혼입여부를 정확하게 판별할 수 있는 방법이다. 본 발명은 국내에 식품원료로 허용되지 않은 가르시니아 인디카의 표지성분이 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 함유되었는지 여부를 통해 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 가르시니아 캄보지아 외 가르시니아 인디카의 혼입여부를 판별한다.

[0024] 본 발명에서 가르시니아 캄보지아 건강기능식품은 가르시니아 캄보지아(*Garcinia cambogia*) 열매 껍질로부터 추출한 가르시니아 캄보지아 추출물을 함유한 식품을 의미한다. 가령, 가르시니아 캄보지아 추출물은 물 또는 주정(물, 주정 혼합물 포함)으로 추출하여 칼슘, 칼륨, 나트륨의 염을 단독 또는 복합으로 결합하여 충분히 중화시켜 식용에 적합하도록 만든 추출물일 수 있다.

[0025] 또한, 가르시니아 캄보지아 건강기능식품은 기능성분(또는 지표성분)으로써 hydroxycitric acid가 600mg/g 이상 함유되어 식품의약품안전처로부터 인증받은 건강기능식품을 의미할 수 있다.

[0026] 가르시니아 캄보지아 건강기능식품은 분말, 알약 등과 같이 다양한 형태로 가공될 수 있다. 분말이나 알약 외에도 환, 정제, 캡슐, 음료 등과 같은 형태로 가공될 수 있음은 물론이다.

[0027] 그리고 가르시니아 인디카(*Garcinia indica*)는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 사용될 수 없는 원료로서 국내에 허용되지 않은 식품원료이다.

[0028] 본 발명은 가르시니아 캄보지아 건강기능식품을 액체크로마토그래피로 분석하여 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중에 함유되어 있는 가르시니아 인디카의 표지성분을 정성 및 정량적으로 분석함으로써 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 가르시니아 인디카가 혼입되었는지 여부와 혼입농도를 판별할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시 예에 따른 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중 가르시니아 인디카의 혼입여부 판별방법은 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카를 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 가르시니아 인디카의 표지성분을 검출하는 표지성분검출단계와, 판별하고자 하는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품으로부터 시험용액을 조제하는 조제단계와, 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석하는 분석단계와, 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과로부터 표지성분이 시험용액 중에 함유되어 있는지를 판별하는 판별단계를 포함한다.

[0030] 이하, 각 단계별로 상세하게 살펴본다.

[0031] 1. 표지성분검출단계

[0032] 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카를 액체크로마토그래피로 각각 분석하여 가르시니아 인디카의 표지성분을 검출한다.

[0033] 가르시니아 캄보지아의 액체크로마토그래피 분석결과와 가르시니아 인디카의 액체크로마토그래피 분석결과를 비교하여 가르시니아 캄보지아에는 함유되어 있지 않으면서 가르시니아 인디카에 유일하게 함유된 표지성분(indicator)을 탐색하여 특정 표지성분을 검출하고, 검출된 표지성분의 화합물을 확인하다.

[0034] 먼저, 표지성분의 검출을 위해 가르시니아 캄보지아의 액체크로마토그래피 분석결과와 국내에 허용되지 않은 식품원료인 가르시니아 인디카의 액체크로마토그래피 분석결과를 비교하여 표지성분의 피크(peak)를 탐색한다.

[0035] 이를 위해 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카로부터 각각 추출한 추출물로부터 시험물질을 조제한다. 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카는 건조시킨 열매의 껍질을 사용한다.

[0036] 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카의 열매 껍질을 각각 분말화하여 추출용매인 주정을 가해 환류추출하여 추출물을 얻는다. 그리고 추출물을 여과지로 여과한 후 여액을 동일 양으로 정용하여 시험물질을 조제할 수 있다.

[0037] 조제된 시험물질을 멤브레인 필터를 이용하여 재여과하여 시험용액을 수득한다. 수득한 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석한다. 액체크로마토그래피로 고성능액체크로마토그래피(HPLC: high performance liquid chromatography)를 이용할 수 있다.

[0038] 액체크로마토그래피 분석결과를 토대로 가르시니아 캄보지아에서 관찰할 수 없는 피크(peak)들 중 가르시니아 인디카에서만 관찰되는 피크들을 탐색하여 특정 머무름시간(RT:retention time)에 나타난 특정의 피크를 선정한다.

[0039] 다음으로, 선정된 특정의 피크에 해당하는 물질이 표지성분으로 이용될 수 있을지 여부를 확인한다. 이를 위해 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카를 비율별로 혼합한 혼합물을 액체크로마토그래피로 분석하여 가르시니아 인디카의 혼합농도에 따른 피크 변화를 관찰한다.

[0040] 혼합물 중의 가르시니아 인디카의 혼합농도를 0.5~95중량%로 달리하여 피크의 변화를 관찰할 수 있다. 가르시니아 인디카의 혼합농도를 달리한 여러 종류의 혼합물을 액체크로마토그래피로 분석하여 혼합농도를 달리한 여러 종류의 혼합물에 나타나는 특정성분의 피크 변화를 관찰한다. 가르시니아 인디카의 혼합 농도 증대에 따라 피크 강도가 증가하는 결과를 얻게 되면 이 피크에 해당하는 물질이 표지성분으로 이용될 수 있음을 의미한다.

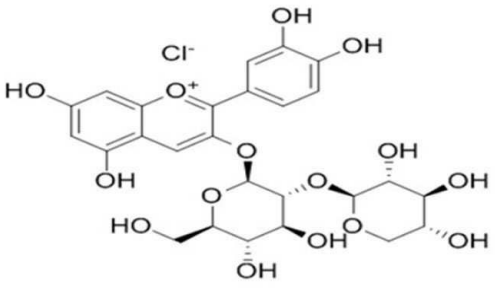
[0041] 다음으로, 표지성분의 화합물을 확인한다.

[0042] 특정 머무름시간(R.T.)에 나타나는 피크에 해당하는 표지성분은 질량분석기 (liquid chroamtography-mass spectrometer, LC-MS)를 통해 확인할 수 있다.

[0043] 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카는 같은 말피기목(Malpighiales) 클루시아과(Clusiaceae)의 가르시니아속(Garcinia)으로 구분되므로 표지성분 분석에 어려움이 있을 수 있다.

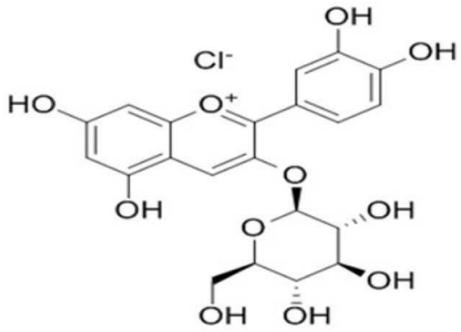
[0044] 가르시니아 인디카의 표지성분으로 하기의 화학식 1로 표현되는 시아니딘-3-삼부비오사이드(cyanidin-3-sambubioside, $C_{26}H_{29}O_{15}^{+}$)일 수 있다.

화학식 1

[0045] 

[0046] 그리고 가르시니아 인디카의 또 다른 표지성분으로 하기의 화학식 2로 표현되는 시아니딘-3-글루코사이드(cyanidin-3-glucoside, $C_{21}H_{21}O_{11}^{+}$)일 수 있다.

화학식 2

[0047] 

[0048] 설명의 편의상, 시아니딘-3-삼부비오사이드를 제 1표지성분으로, 시아니딘-3-글루코사이드를 제 2표지성분으로 표기할 수 있다.

[0049] 2. 조제단계

[0050] 가르시니아 인디카의 표지성분을 선정한 후 가르시니아 인디카가 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 혼입되었는지 여부를 확인하기 위해 시중에서 유통, 판매되고 있는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품으로부터 시험용액을 조제한다.

[0051] 시중에서 유통, 판매되고 있는 가르시니아 캄보지아 건강기능식품은 주로 분말, 알약의 형태로 가공되어 있다.

[0052] 분말 형태의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품의 경우 분말에 에탄올을 가해 환류추출한 후 여과한 여액을 필터로 여과하여 시험용액을 조제할 수 있다. 가령, 분말 10g을 250mL 환류용 플라스크(flask)에 넣고 에탄올(ethanol) 20mL를 넣고 80℃ 수욕조에서 60분 동안 환류추출(reflux extract)하고 방냉한 후, 구멍지름 20 ~ 25㎛인 여과지(whatman filter, No. 41)를 이용하여 여과한 후, 회수된 여액을 20mL 부피플라스크에 옮긴 후 정용한 용액을 멤브레인 필터(membrane filter, nylon, 0.45㎛)로 여과하여 시험용액을 제조할 수 있다.

[0053] 그리고 알약 형태의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품의 경우 알약을 분말화하여 상기 과정과 동일한 과정을 통하여 시험용액을 조제할 수 있다.

[0054] 3. 분석단계

[0055] 시험용액이 준비되면 액체크로마토그래피로 분석한다.

[0056] 액체크로마토그래피로 상술한 바와 같이 고성능액체크로마토그래피(HPLC: high-performance liquid chromatography)를 이용할 수 있다.

[0057] 4. 판별단계

[0058] 액체크로마토그래피 분석결과로부터 표지성분이 가르시니아 캄보지아 건강기능식품의 시험용액 중에 함유되어 있는지를 판별한다. 가령, 2종류의 표지성분 중 어느 하나의 표지성분이 시험용액 중에 함유되어 있는지로 판별할 수 있다. 이와 달리 2종류의 표지성분 모두가 시험용액 중에 함유되어 있는지로 판별할 수 있음은 물론이다.

[0059] 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과에서 표지성분의 머무름시간과 동일한 머무름시간에 피크의 형성여부로 시험용액 중에 표지성분이 함유되었는지 판별할 수 있다. 이를 통해 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 가르시니아 인디카의 혼입여부를 확인할 수 있다.

[0060] 또한, 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 시험용액의 액체크로마토그래피 분석결과에서 표지성분의 머무름시간과 동일한 머무름시간에 형성된 피크의 강도와 면적을 계산하여 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 혼입된 가르시니아 인디카의 혼입량을 정량적으로 확인할 수 있다. 이는 표지성분을 농도별로 달리하여 조제한 표준용액을 액체 크로마토그래프로 분석하여 작성한 검량선을 근거로 계산될 수 있다.

[0061] 상술한 바와 같이 본 발명은 분말, 알약 형태의 가르시니아 캄보지아 건강기능식품 중에 함유되어 있는 가르시니아 인디카의 표지성분을 분석함으로써 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 가르시니아 인디카가 혼입되었는지 여부를 정성 및 정량적으로 정확하게 판별할 수 있다.

[0062] 이하, 본 발명을 하기 실험예를 통하여 구체적으로 설명한다. 이는 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리 범위를 하기의 실험 예로 한정하는 것은 아니다.

[0063] <실험예>

[0064] 1. 실험재료 및 방법

[0065] (1)실험재료

[0066] 실험에서 사용한 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카는 모두 인도산으로, 인도의 Mangalore spice라는 회사로부터 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카 열매의 껍질을 건조된 상태로 구매하여 준비하였다.

[0067] 그리고 가르시니아 인디카의 제 1표지성분으로서 시아니딘-3-삼부비오사이드(Extra synthese, Lyon, France)를 사용하였고, 제 2표지성분으로서 시아니딘-3-글루코사이드(TRC, Toronto, Canada)을 사용하였다. 그리고 에탄올(ethanol), 아세토나이트릴(acetonitrile)과 물(water)은 HPLC grade(Fisher, USA)를 사용하였다. 아세트산(acetic acid)과 인산(phosphoric acid)는 HPLC grade(Sigma aldrich, USA)를 사용하였다.

[0068] (2)표준용액의 조제

[0069] 표지성분인 시아니딘-3-삼부비오사이드(cyanidin-3-sambubioside)와 시아니딘-3-글루코사이드(cyanidin-3-glucoside)의 크로마토그램을 확인하고 검량선을 작성하기 위해 각각의 표지성분을 에탄올에 녹여 농도 2, 5, 10, 25, 50ppm의 표준용액을 조제하였다.

[0070] (3)시험물질의 제조

[0071] 준비한 건조 가르시니아 캄보지아 열매 껍질과 가르시니아 인디카의 열매 껍질은 증류수로 세척 후 50℃ 온도로 농산물 건조기(GN-012,한일, (주)한일지엔코, 한국)를 이용하여 재건조시켰다. 건조 후 분쇄한 분말 500g에 주정(에탄올) 1000ml를 추출용매로하여 80℃에서 2시간 환류 추출 후 여과지(whatman filter, No. 41)로 여과한 다음 정용하여 가르시니아 캄보지아 시험물질과 가르시니아 인디카 시험물질을 각각 조제하였다.

[0072] 이와 함께 가르시니아 캄보지아 시험물질에 가르시니아 인디카 시험물질을 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95중량%로 혼합하여 가르시니아 인디카/가르시니아 캄보지아 혼합 시험물질을 조제하였다.

[0073] (4)HPLC 분석용 시험용액의 조제

[0074] 각 시험물질을 멤브레인 필터(Nylon, 0.45㎛)로 여과하여 시험용액을 제조하였다. 제조한 각 시험용액은 표지성분의 검출을 위한 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 분석용으로 사용하였다.

[0075] 가르시니아 캄보지아 시험물질로 조제한 것을 가르시니아 캄보지아 시험용액, 가르시니아 인디카 시험물질로 조제한 것을 가르시니아 인디카 시험용액, 가르시니아 인디카/가르시니아 캄보지아 혼합 시험물질로 조제한 것을 혼합 시험용액이라고 한다.

[0076] (6)시험 조작

[0077] a. 고성능액체크로마토그래피(HPLC)의 시험조작

[0078] 고성능액체크로마토그래피의 측정조건은 안토시아닌 정량분석법을 응용하였다. 시험용액의 표지성분을 분석하기 위해 HPLC system(Shimadzu, Kyoto, JPN)에 diode array(PDA 또는 DAD) 검출기(Shimadzu, Kyoto, JPN)가 장착된 액체크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 분석용 컬럼은 5C18-PAQ(4.6 mm I.D. × 250 mm L., Shiseido, JPN)컬럼, 컬럼 온도는 상온, 이동상으로는 첫 번째 용매 아세토나이트릴(Acetonitrile)과 두 번째 용매로서 총 용량의 1% 아세트산(Acetic acid), 5% 아세토나이트릴(Acetonitrile), 3% 인산(phosphoric acid)을 물에 혼합한 혼합용매를 기울기용리(gradient elution) 방법으로 하기 표1의 용매 이동상 혼합 비율 조건으로 분석하였으며, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 50 uL로 하여 520 nm에서 측정하였다.

표 1

<table>
<tr><td>칼럼</td><td>C18 칼럼 (ODS와 동등 이상의 것)
사용칼럼 : 5C18-PAQ, 4.6mm I.D. × 250mm L., Shiseido, JPN</td></tr>
<tr><td>유량</td><td>1.0ml/min</td></tr>
<tr><td>검출기</td><td>DAD (520nm)</td></tr>
<tr><td>시료주입량</td><td>50uL</td></tr>
<tr><td>용매 이동상</td><td>Gradient system
<table>
<tr><th>시간(분)</th><th>Acetonitrile(%)</th><th>3%acetic acid, 5% acetonitrile, 1% phosphoric acid in water(%)</th></tr>
<tr><td>0</td><td>0</td><td>100</td></tr>
<tr><td>2</td><td>0</td><td>100</td></tr>
<tr><td>20</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>25</td><td>40</td><td>60</td></tr>
<tr><td>30</td><td>0</td><td>100</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

[0079]

[0080] b. LC-MS-MS의 시험조작

[0081] UPLC가 결합된 ESI-HR-MS(LCMS-IT-TOF), Shimadzu, JPN)을 이용하여 수행하였다. 컬럼은 Capcell core C18(2.1 mm I.D. × 150mm L., 2.7㎛, Shiseido, JPN)을 사용하고 이동상으로는 0.5% 트리플루오르 아세트산(Trifluoroacetic acid) (A)과 0.5% 트리플루오르 아세트산을 포함한 아세토니트릴(Acetonitrile)(B)을 사용하였다. 총 분석시간은 30분으로 B 용매의 비율을 20분간 5~20%로 올려준 후 1분간 유지하고, 25분까지 95%까지 올려주었고 30분까지 초기 조건인 5% 흘려 초기 조건으로 안정화시켰다. 유속은 0.2 mL/min, 주입량은 5.0uL, 컬럼온도는 35℃를 유지하였다.

[0082] 표지성분의 질량 분석은 하이브리드형 질량분석기인 비행유도형 결합 이온트랩 질량분석기(Ion trap coupled Time of flight, LCMS-IT-TOF, Shimadzu, JPN)를 사용해 포지티브 모드(positive mode)에서 각각 가르시니아 캄보지아와 가르시니아 인디카의 표지성분 분석을 위한 최적의 조건을 확립하여 하기 표 2와 같이 나타내었다.

표 2

[0083]

칼럼	Capcell core C18, 2.1 mm I.D. × 150 mm L., 2.7 ㎛, Shiseido, JPN
Mass 유형	Ion trap coupled TOF(Time-of flight)
유량	0.2 mL/min
이온화	ESI(positive mode)/ interface voltage 4.5 kw
Nebulizing gas flow	N2, 1.5 L/min
CDL temp.	200℃
시료주입량	5.0 ㎕

[0084] (7)검량선의 작성

[0085] 시아니딘-3-삼부비오사이드(cyanidin-3-sambubioside)와 시아니딘-3-글루코사이드(cyanidin-3-glucoside) 각각의 표준용액을 일정량 취하여 액체크로마토그래피에 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크(peak) 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하였다. 도 1에 농도 50ppm의 시아니딘-3-삼부비오사이드 표준용액과 농도 50ppm의 시아니딘-3-글루코사이드 표준용액의 크로마토그램과 UV spectrum을 나타내었다.

[0086] 표준용액으로 작성된 검량선을 근거로 피크높이법 또는 피크면적법에 따라서 정량하였다.

[0087] 2. 실험 결과

[0088] (1)HPLC 분석을 통한 표지성분의 검출

[0089] 각 시험용액을 액체크로마토그래피로 분석한 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2는 가르시니아 캄보지아 시험용액,

가르시니아 인디카 각각의 시험용액 및 가르시니아 인디카/가르시니아 캄보지아의 혼합 시험용액의 결과이다.

[0090] 도 2를 참조하면, 가르시니아 캄보지아에는 없는 가르시니아 인디카에서 발견된 피크 중 제 1표지성분(RT:17.49분), 제 2 표지성분 피크(RT:17.82분)를 확인하였다. 동일시간대에 화합물이 검출됨과 동시에 UV spectrum을 확인하여 동일한 화합물인지를 확인한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0091] 그리고 가르시니아 인디카가 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95중량%로 혼합된 가르시니아 인디카/가르시니아 캄보지아 혼합 시험용액을 위의 실험과 동일한 분석방법으로 실험한 결과, 혼합 비율 농도의 증대에 따라 동일 시간대의 피크 강도 또는 면적이 증가하는 결과를 얻었다.

[0092] 이를 통해 가르시니아 인디카는 크로마토그램 상에서 머무름 시간 17.49, 17.82분에 나타난 피크에 해당하는 물질이 표지성분임을 알 수 있었다. 후술하는 표지성분의 확인에서 알 수 있는 바와 같이 RT:17.49분에 나타난 피크에 해당하는 물질은 제 1표지성분인 시아니딘-3-삼부비오사이드이고, RT:17.82분에 나타난 피크에 해당하는 물질은 제 2표지성분인 시아니딘-3-글루코사이드이다.

[0093] (2)LC-MS/MS 분석을 통한 표지성분의 확인

[0094] 위에서 검출된 가르시니아 인디카의 표지성분의 LC-MS/MS 분석결과를 표 3 및 도 3에 나타내었다.

표 3

[0095]

Compound	RT (min)	λmax (nm)	Ion	Meas.Mass (m/z)	Theor.Mass (m/z)	Formula	Comment
Cyanidin-3-O-sambubioside	15.55	516	[M]+	581.1503	581.1501	$C_{26}H_{29}O_{15}$	Product ion
			[M-$C_{11}H_{18}O_9$]+	287.0600	287.0609	$C_{15}H_{11}O_6$	Fragment ion, Cyanidin
Cyanidin-3-O-glucoside	16.13	514	[M]+	449.1026	449.1020	$C_{21}H_{21}O_{11}$	Product ion
			[M-$C_6H_{10}O_5$]+	287.0609	287.0609	$C_{15}H_{11}O_6$	Fragment ion, Cyanidin

[0096] 가르시니아 인디카의 표지성분인 시아니딘-3-삼부비오사이드와 시아니딘-3-글루코사이드는 가르시니아 인디카에서만 확인되었다. 또한 시아니딘-3-삼부비오사이드와 시아니딘-3-글루코사이드 표준용액의 액체크로마토그래피 분석결과 및 Chetan A. Nayak의 논문(Chetan A. Nayak, P. Srinivas, Navin K. Rastogi, Characterisation of anthocyanins from Garcinia indica Choisy, 2010, J. Food Chemistry)과 비교하였을 때에 UV spectrum, LC-MS 결과 등이 모두 일치하여 시아니딘-3-삼부비오사이드와 시아니딘-3-글루코사이드를 가르시니아 인디카의 표지성분으로 확인하였다.

[0097] (3)혼입비율에 따른 정량 분석

[0098] LC-MS/MS 분석을 통하여 확립한 가르시니아 인디카의 표지성분인 시아니딘-3-삼부비오사이드와 시아니딘-3-글루코사이드의 표준물질을 구입하여 표준물질이 분석되는 시간대, UV spectrum 및 문헌 등을 비교하여 각각의 표지성분임을 확신하였다.

[0099] 가르시니아 캄보지아 건강기능식품에 혼합된 가르시니아 인디카의 양을 정량적으로 분석하기 위해 각 농도별로 조제된 가르시니아 인디카/가르시니아 캄보지아 혼합 시험용액을 HPLC로 정량분석 하여 그 결과를 하기 표 4 및 도 4에 나타내었다.

표 4

[0100]

가르시니아 인디카 농도 (wt%)	시아니딘-3-삼부비오사이드 (mg/kg)	시아니딘-3-글루코사이드 (mg/kg)
0	ND(Not detected)	ND(Not detected)
0.5	3.17	1.05
1	5.08	1.69
2	10.35	3.47
5	25.29	9.06
10	47.50	16.58
20	98.28	34.62

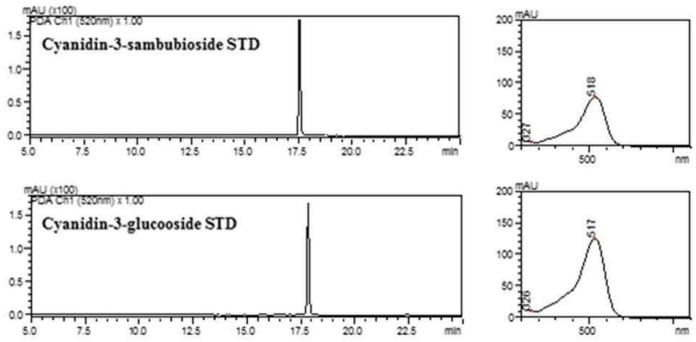
30	152.52	53.80
40	216.40	61.51
50	282.66	107.06
60	332.40	127.78
70	360.40	131.69
80	449.37	167.56
90	516.32	195.29
95	547.75	203.08
100	569.53	218.09

[0101] 실험 결과, 가르시니아 인디카의 혼합농도가 증가할수록 표지성분의 함량 증가의 직선성을 확인하였으며, 표지성분이 확실함을 증명하였다.

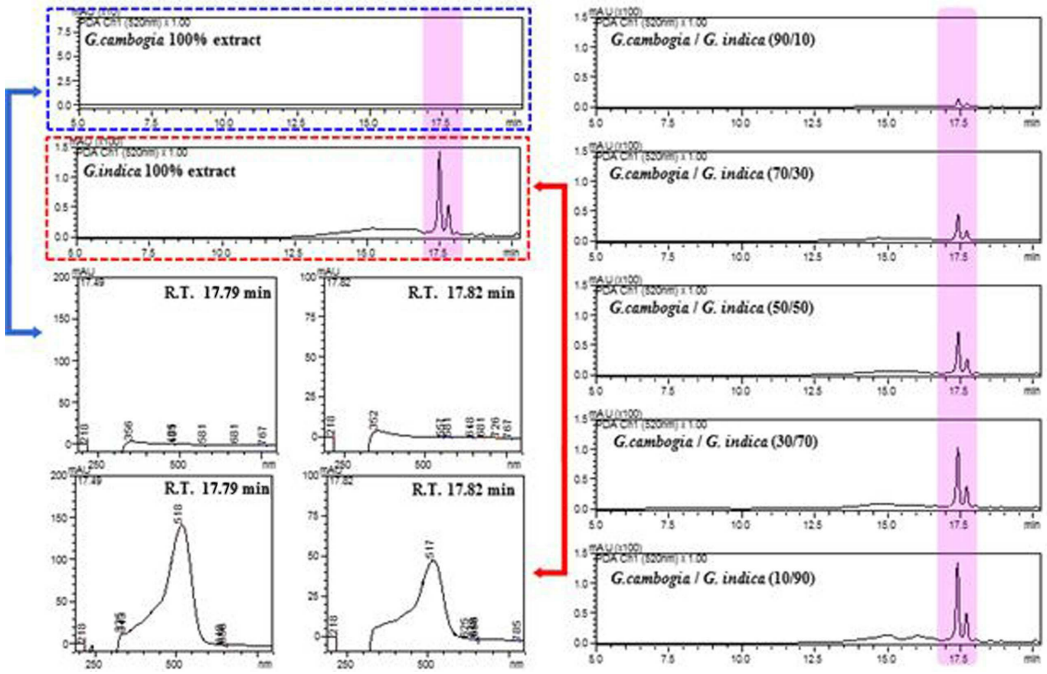
[0102] 이상, 본 발명은 일 실시 예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 실시 예가 가능하다는 점을 이해할 것이다.

도면

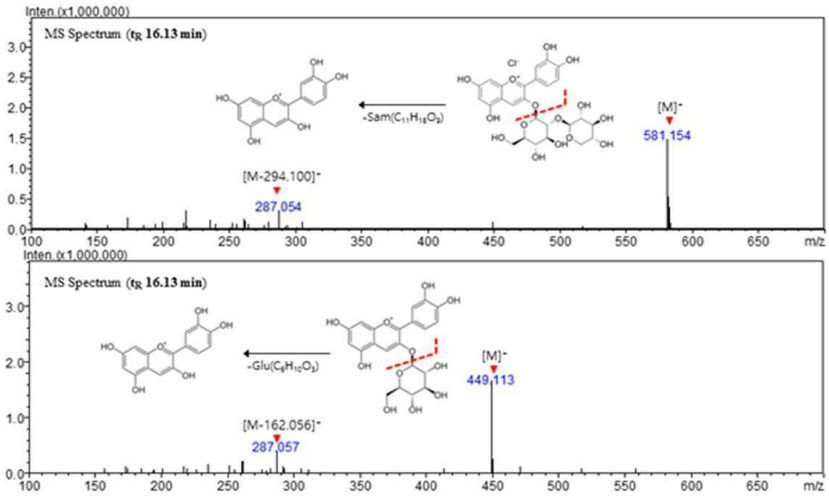
도면1



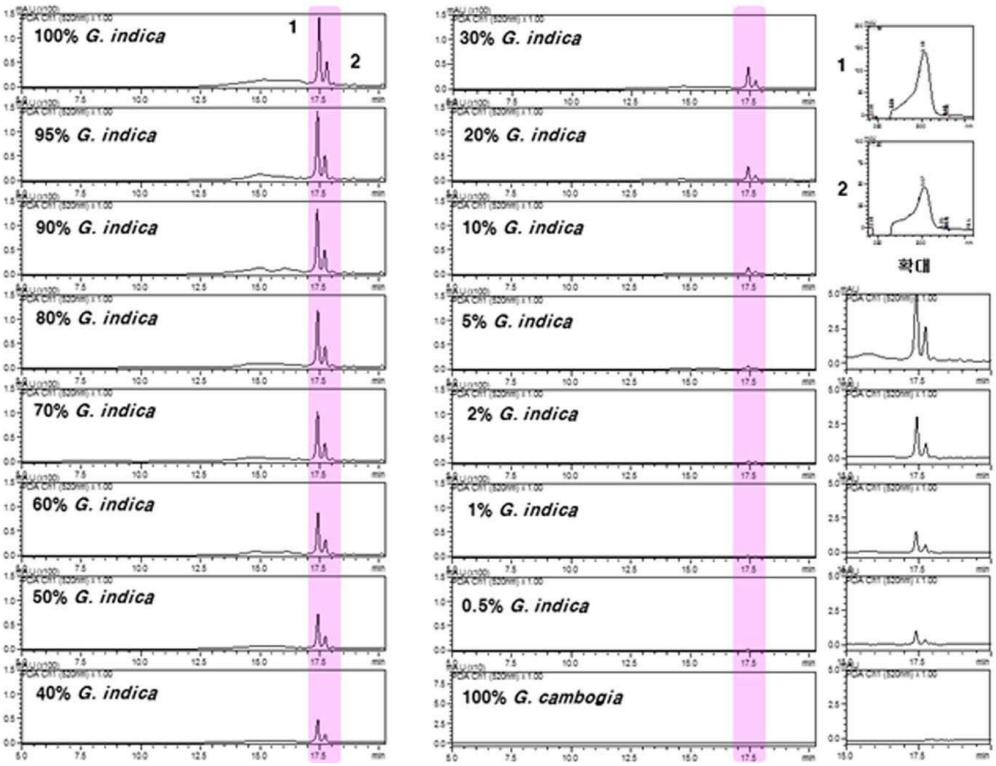
도면2



도면3


Inten.(x1,000,000)
MS Spectrum (tR 16.13 min)
-Sam(C11H18O5)
[M]-
581.154
[M-294.100]-
287.054
Inten.(x1,000,000)
MS Spectrum (tR 16.13 min)
-Glu(C6H10O5)
[M]-
449.113
[M-162.056]-
287.057
m/z

도면4


100% G. indica
95% G. indica
90% G. indica
80% G. indica
70% G. indica
60% G. indica
50% G. indica
40% G. indica
30% G. indica
20% G. indica
10% G. indica
5% G. indica
2% G. indica
1% G. indica
0.5% G. indica
100% G. cambogia
확대