



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0094177
(43) 공개일자 2014년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/28 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0006580

(22) 출원일자 2013년01월21일

심사청구일자 2013년01월21일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

농업회사법인 다하누㈜

강원도 영월군 주천면 주천시장길 22

(72) 발명자

임순성

강원 춘천시 춘주로 174, 102동 805호 (퇴계동, 그린타운아파트)

최면

강원도 춘천시 동면 만천로 107 102동 502호(한일 유엔아이아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장한중

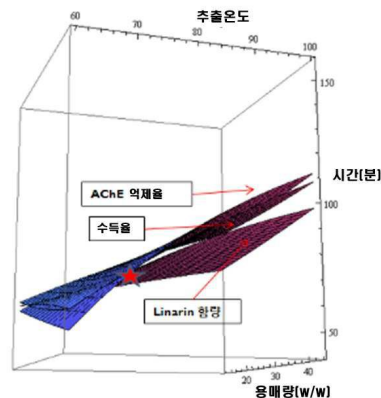
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법

(57) 요약

본 발명은 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법에 관한 것이고, 감국에 대한 추출물의 수득률(%), 감국에 대한 추출된 리나린의 함량(g/100g) 및 상기 추출물의 AchE에 대한 억제율(%)을 향상시키기 위한 최적의 추출조건을 제공하며, 주정을 용매로 사용할 경우에는 용매량 22.17(w/w) 내지 36.60(w/w), 추출온도 47.5℃ 내지 84.5℃, 추출시간 99.2분 내지 128.2분, 주정비율 23.8% 내지 78.0%로 하고; 물을 용매로 사용할 경우에는 용매량 12.31(w/w) 내지 33.88(w/w), 추출온도 60.36℃ 내지 93.4℃, 추출시간 68.41분 내지 122.78분으로 하여, 감국으로부터 리나린을 추출하는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이수경

강원도 춘천시 서부대성로 327 102동 601호(
후평동, 동아아파트)

백지훈

대구광역시 남구 효성중앙길 18-8 202호(봉덕동,
주우빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B0008864

부처명 지식경제부

연구사업명 지역혁신센터조성사업(RIC)

연구과제명 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

용매인 주정에 감국 분말을 혼합 및 침지하여 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법에 있어서,

감국에 대한 추출물의 수득률(%), 감국에 대한 추출된 리나린의 함량(g/100g) 및 상기 추출물의 AchE에 대한 억제율(%)을 향상시키기 위해, 감국에 대한 주정 사용량인 용매량은 22.17(w/w) 내지 36.60(w/w)이고, 추출온도는 47.5℃ 내지 84.5℃이고, 추출시간 99.2분 내지 128.2분이며, 주정비율은 23.8% 내지 78.0%인 것을 특징으로 하는, 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법.

청구항 2

용매인 물에 감국 분말을 혼합 및 침지하여 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법에 있어서,

감국에 대한 추출물의 수득률(%), 감국에 대한 추출된 리나린의 함량(g/100g) 및 상기 추출물의 AchE에 대한 억제율(%)을 향상시키기 위해, 감국에 대한 물 사용량인 용매량은 12.31(w/w) 내지 33.88(w/w)이고, 추출온도는 60.36℃ 내지 93.4℃이며, 추출시간은 68.41분 내지 122.78분인 것을 특징으로 하는, 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법에 관한 것이며, 보다 상세하게는 추출물 수득률, 리나린 함량 및 아세틸콜린 에스테라제에 대한 억제율(%)을 향상시킬 수 있는, 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 감국(甘菊: Chrysanthemum indicum Linne)은 한국을 포함한 일본 중국 등의 산간 지역에 널리 분포하고, 줄기의 높이가 30~60cm 정도 이며, 9~10월에 2.5cm 크기의 황색 꽃이 줄기와 가지 끝에서 피는 국화과의 다년생초본이다.

[0003] 감국은 한의학에서 해열, 소염 및 혈압저하 작용이 있고, 두통과 각종 바이러스에 대한 억제효과 등의 효능이 있다고 알려져 있다. 또한 감국을 장기간 복용 하면 혈기에 좋고 몸을 가볍게 하며 위장을 편안케 하고 오장을 도우며 사지를 고르게 하고 그 외에 감기, 두통, 현기증에 유효하다고 알려져 있다.

[0004] 현대적인 연구 결과에 의하면, 감국으로부터 추출되는 성분으로는 플라보노이드 화합물인 리나린(linarin), 루테로린(luteolin), 아피게닌(apigenin) 및 아카세틴(acacetin), 크리산테민(chrysanthemin), 쿠마린(cumarin) 등이 알려져 있다.

[0005] 신경전달물질의 하나인 아세틸콜린(acetylcholine: ACh)은 신경세포의 시냅스 크냅의 세포질에서 합성되어 교감 또는 부교감 신경계의 시냅스전 섬유 및 시냅스후 섬유에서 분비되고, 부교감 신경섬유의 신경절후(postganglion)에 존재하는 무스카린 수용체(muscarin receptor)에 자극신호를 반응시키는 것으로 알려져 있다.

[0006] ACh의 기능저하가 치매의 원인으로 작용하는 것으로 보고되어 있다. ACh은 아세틸콜린에스테라제((Acetylcholine esterase: AchE)에 의하여 분해되고, choline과 acetyl coenzyme A에서 합성되며 이때 choline acetyltransferase(ChAT)라고 하는 효소가 관계된다. 지금까지의 연구 결과에 의하면 알츠하이머를 앓는 환자의 뇌에서 여러 신경전달물질의 감소가 관찰되었는데, 특히 ACh의 함량이 크게 감소하였다.

[0007] Choline 흡수가 낮아지면 ACh 합성시 신경세포 구성물질 중의 하나인 phosphatidyl choline(PC)을 choline으로 사용하게 된다. 이 경우 콜린성 뉴런이 파괴되어 알츠하이머와 같은 퇴행성 질병을 일으키게 된다. 따라서, ACh을 생성하는 세포의 퇴행과 ACh을 분해하는 효소인 AchE 효소를 억제해야 한다.

[0008] 이와 같은 배경에 따라 AchE 억제물질을 사용하여 치매를 예방 또는 치료할 수 있을 것으로 생각되고 있고, 각

중 약용 식물로부터 AChE 저해 활성을 찾는 연구가 계속되고 있으며, 감국의 추출물인 리나린(acacetin-7-O-b-D-rutinoside)도 AChE의 활성을 억제시킴으로써 기억력 개선에 효과가 있는 것으로 보고되었다.

[0009] 그러나 지금까지는 추출물 수득률, 리나린 함량 및 AchE 억제율을 통합적으로 향상시킬 수 있는, 감국으로부터 리나린을 최적의 상태로 추출할 수 있는 방법이 제시되고 있지 아니하며, 특히 종래의 추출방법은 상대적으로 추출에 소요되는 시간이 오래 소요되어 비용측면에서 바람직하지 아니하였다.

[0010] 감국으로부터 리나린을 포함한 유용물질을 추출하는 것에 관련된 종래기술로서는, 대한민국 등록특허 제10-0554343호(2006. 02. 24. 공고)의 "감국 추출물 및 이로부터 유래한 화합물을 포함하는 아세틸콜린에스터라제 저해용 조성물", 대한민국 등록특허 제10-0665313호(2007. 01. 09. 공고)의 "항산화 및 항바이러스 활성을 가지는 화합물 및 이를 포함하는 감국 추출물", 및 대한민국 등록특허 제10-1207781호(2012. 12. 05. 공고)의 "감국 추출물로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 신경안정 및 뇌신경계 관련 불안증의 예방 및 치료용 조성물" 등이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은, 기억력 개선에 효과가 있는 리나린을 감국으로부터 추출함에 있어서, 추출물 수득률, 리나린 함량 및 AchE 억제율을 통합적으로 향상시킬 수 있는, 최적의 추출조건을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명에 따라, 용매로서의 주정 또는 물에 감국 분말을 혼합 및 침지하여 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명에 따른 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법은, 감국에 대한 추출물의 수득률(%), 감국에 대한 추출된 리나린의 함량(g/100g) 및 상기 추출물의 AchE에 대한 억제율(%)을 향상시키기 위해, 감국에 대한 주정 사용량인 용매량은 22.17(w/w) 내지 36.60(w/w)이고, 추출온도는 47.5℃ 내지 84.5℃이고, 추출시간 99.2분 내지 128.2분이며, 주정비율은 23.8% 내지 78.0%인 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명에 따른 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법은, 상기 추출물 수득률(%), 상기 리나린 함량(g/100g) 및 상기 AchE 억제율(%)을 향상시키기 위해, 감국에 대한 물 사용량인 용매량은 12.31(w/w) 내지 33.88(w/w)이고, 추출온도는 60.36℃ 내지 93.4℃이며, 추출시간은 68.41분 내지 122.78분인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출하는 방법에 의하면, 주정 또는 물을 용매로 하여 감국으로부터 기억력을 개선하는 리나린을 추출함에 있어서, 추출물 수득률, 리나린 함량 및 AchE 억제율을 통합적으로 향상시키는 추출방법을 제공할 수 있고, 결과적으로 감국으로부터 유효성분인 리나린을 보다 저렴하게 획득할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도1은 표1의 추출조건에 따른 추출에서 추출물 수득률에 관한 4차원 그래프,

도2는 표1의 추출조건에 따른 추출에서 리나린 함량에 관한 4차원 그래프,

도3은 표1의 추출조건에 따른 추출에서 AchE 억제율에 관한 4차원 그래프,

도4는 표6의 추출조건에 따른 추출에서 추출물 수득률, 리나린 함량 및 AchE 억제율에 관한 4차원 그래프,

도5는 표6의 추출조건에 따른 추출에서 최적화된 추출조건에 관한 4차원 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 구체적인 실시예와 첨부도면을 참조하여 본 발명에 따른 감국으로부터의 리나린 추출방법을 보다 구체적으로 설명한다. 이하의 구체예는 본 발명을 예시적으로 설명하는 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아

니다.

1: 제1 구체예(주정을 용매로 사용한 감국으로부터의 리나린 추출)

(1). 설계

본 제1 구체예에 있어서, 감국으로부터 리나린을 추출하는 용매로서는 주정(에탄올)을 사용하였다. 즉, 감국의 꽃과 잎의 분말을 주정에 혼합 및 침지시킴으로써 감국으로부터 리나린이 주정에 추출되도록 하였다. 제1 구체예에는 중심합성계획(central composite design)에 따라 설계하였고, 추출조건의 최적화를 위하여 반응표면분석법을 사용하였다.

표1(주정에 의한 추출의 최적 조건 결정을 위한 반응표면분석 조건)에 기재된 바와 같이, 중심합성계획에 따라, 감국 대비 주정(용매)의 질량비인 용매량(w/w)(X1), 추출온도(℃)(X2), 추출시간(분)(X3) 및 주정의 농도인 주정비율(%) (X4)을 독립 (조건)변수로 하되, -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하였고, 30개 구간으로 설정하여 상기 4개의 추출조건을 적용하였다.

추출조건에 종속되는 반응변수로서는, 사용한 감국의 질량에 대한 추출된 추출물의 질량비인 추출물 수득률(yield)(%), 사용한 감국에 대한 추출된 리나린의 양인 리나린 함량(g/100g) 및 감국에서 추출한 추출물의 AchE에 대한 억제(inhibition) 정도인 AchE 억제율(%)을 각각 측정하였으며, 모든 실시예에는 3번 반복 측정하여 평균값을 회귀분석에 사용하였다.

회귀분석에 의한 최적 추출조건의 결정은, Statistical Analysis System(SAS version 9.1) 프로그램을 이용하였고, 각 조건별 4차원 반응표면을 그리기 위해 Mathematica Program을 사용하였다.

표 1

실시예	부호화한 변수			
	X1	X2	X3	X4
	용매량(w/w)	추출온도(℃)	추출시간(분)	주정비율(%)
1	36(+1)	75(+1)	80(-1)	60(+1)
2	28(0)	60(0)	120(0)	80(+2)
3	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)
4	36(+1)	45(-1)	80(-1)	60(+1)
5	20(-1)	75(+1)	80(-1)	60(+1)
6	36(+1)	75(+1)	80(-1)	20(-1)
7	36(+1)	75(+1)	160(+1)	20(-1)
8	36(+1)	75(+1)	160(+1)	60(+1)
9	20(-1)	45(-1)	160(+1)	20(-1)
10	20(-1)	45(-1)	80(-1)	20(-1)
11	36(+1)	45(-1)	80(-1)	20(-1)
12	20(-1)	75(+1)	160(+1)	60(+1)
13	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)
14	28(0)	60(0)	120(0)	0(-2)
15	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)
16	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)
17	36(+1)	45(-1)	160(+1)	20(-1)
18	12(-2)	60(0)	120(0)	40(0)
19	28(0)	60(0)	40(-2)	40(0)
20	28(0)	30(-2)	120(0)	40(0)
21	20(-1)	75(+1)	80(-1)	20(-1)
22	44(+2)	60(0)	120(0)	40(0)
23	28(0)	90(+2)	120(0)	40(0)
24	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)
25	20(-1)	75(+1)	160(+1)	20(-1)
26	28(0)	60(0)	200(+2)	40(0)
27	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)
28	36(+1)	45(-1)	160(+1)	60(+1)
29	20(-1)	45(-1)	80(-1)	60(+1)

30	20(-1)	45(-1)	160(+1)	60(+1)
----	--------	--------	---------	--------

[0025] (2). 수득물의 측정

[0026] 표1의 실시예에 따라 감국 1g를 해당 용량의 주정(용매)에 혼합 및 침지하고, 추출온도, 추출시간 및 주정비율을 표1의 조건으로 하여 추출하여 추출물을 획득하였고, 사용한 감국의 질량에 대한 추출물의 질량으로 하여 수득률(%)을 계산하였다.

[0027] (3) 리나린 함량의 측정

[0028] 리나린(ChromaDex사, 12241-912) 1mg을 10ul의 DMSO용액에 녹인 후, 90ul의 MeOH를 넣어 초음파분해(20분, 20℃)를 하였다. 다음에, 원심분리하여 상층부를 얻은 후, 각 농도별로 MeOH를 넣어, 리나린 1mg, 0.5mg, 0.1mg, 0.05mg, 0.01mg로 희석하여 기준함량의 리나린을 제조하였다. 5개 기준함량의 농도별 리나린과 표1의 조건으로 추출한 감국의 추출물(시료)을 각각 HPLC(고성능액체크로마토그래피)의 바이알에 옮긴 후, agilent 1200 HPLC를 이용하여 리나린의 정량을 실시하였다.

[0029] 사용된 칼럼은 agilent eclipse XDB C-18 5um(4.6×150mm)이며, A는 0.1% TFA(트리플루오로아세트산), B는 AcCN(Acetonitrile)으로 하였으며, 주입은 10ul, 흘림 속도(flow)는 0.8ml/분으로 하였다. 그리고, 파장은 280nm로 설정하였으며, 분석의 조건은 아래의 표2와 같이 설정하였다. 사용한 감국 100g에 대한 추출물에서 정량된 리나린의 양(g)의 비율로 리나린의 함량(g/100g)을 계산하였다.

표 2

[0030]

Time	A - 0.1% TFA	B - AcCN	flow (ml/분)
0	80	20	0.8
10	15	85	0.8
12	0	100	0.8
14	0	100	0.8
17	80	20	0.8
22	80	20	0.8

[0031] (4) AchE 억제율 평가

[0032] 효소조제는 AchE(Sigma, C-3389, 500unit)에 소혈청알부민 BSA(0.1%)를 0.1M tris-HCl 버퍼(pH 7.8)에 녹여서 사용하였다. 0.1M 인산나트륨(sodium phosphate) 버퍼(pH 8.0) 70μL에 감국을 표1의 추출조건으로 처리하여 얻은 감국의 추출물(시료) 5μL를 넣고, 1 mM acetylthiocholine 60μL, 2 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitro benzoic acid) 60μL를 첨가한 후 405nm에서 10분 동안 1분 간격으로 흡광도를 측정함으로써, AchE 억제율(%)을 평가하였다.

[0033] 이때 AchE 억제율(%)은 $\frac{\{(A-B)-(C-D)\}}{(A-B)} \times 100$ 로 계산하였으며, 여기에서 A는 AchE만 존재할 때의 흡광도, B는 AchE와 시료 모두가 부재할 때의 흡광도, C는 AchE와 시료 모두가 존재할 때의 흡광도, D는 시료만 존재할 때의 흡광도이다.

[0034] (5) 통계 분석

[0035] 최적의 추출조건 결정은, 추출물 수득률(%), 리나린 함량(g/100g), AchE억제율(%)에 대해 등고선지도 슈퍼임포징(contour map superimposing) 하였을 때 중복되는 부분의 범위로 예측하였다.

[0036] (6). 결과

[0037] 주정을 용매로 한 표1에 따른 용매량(w/w), 추출온도(℃), 추출시간(분), 및 주정비율(%)을 추출조건으로 감국에서 리나린을 추출한 결과, 추출물 수득률(%), 리나린 함량(g/100g) 및 AchE 억제율(%)은 표3과 같다.

표 3

[0038]

실험 번호	부호화한 변수				결과		
	X1	X2	X3	X4	Y1	Y2	Y3
	용매량 (w/w)	추출온도 (℃)	추출시간 (분)	주정비율 (%)	추출물 수득률(%)	리나린 함량(g/100g)	AChE 억제율(%)
1	36(+1)	75(+1)	80(-1)	60(+1)	20.94	1.480	27.71
2	28(0)	60(0)	120(0)	80(+2)	10.245	2.635	39.28
3	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)	25.895	0.695	31.99
4	36(+1)	45(-1)	80(-1)	60(+1)	15.220	1.905	41.59
5	20(-1)	75(+1)	80(-1)	60(+1)	16.300	1.166	42.37
6	36(+1)	75(+1)	80(-1)	20(-1)	30.800	0.455	25.77
7	36(+1)	75(+1)	160(+1)	20(-1)	28.145	1.172	28.56
8	36(+1)	75(+1)	160(+1)	60(+1)	18.880	1.271	43.16
9	20(-1)	45(-1)	160(+1)	20(-1)	15.520	1.095	28.51
10	20(-1)	45(-1)	80(-1)	20(-1)	19.105	0.995	32.18
11	36(+1)	45(-1)	80(-1)	20(-1)	25.505	0.823	26.04
12	20(-1)	75(+1)	160(+1)	60(+1)	15.370	0.846	33.17
13	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)	28.815	0.694	30.36
14	28(0)	60(0)	120(0)	0(-2)	25.535	0.940	28.44
15	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)	28.330	0.918	26.15
16	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)	25.725	1.166	32.11
17	36(+1)	45(-1)	160(+1)	20(-1)	26.185	0.726	29.95
18	12(-2)	60(0)	120(0)	40(0)	15.585	2.695	27.44
19	28(0)	60(0)	40(-2)	40(0)	26.455	0.907	35.42
20	28(0)	30(-2)	120(0)	40(0)	26.575	0.941	30.96
21	20(-1)	75(+1)	80(-1)	20(-1)	24.595	0.691	33.37
22	44(+2)	60(0)	120(0)	40(0)	27.015	0.629	31.02
23	28(0)	90(+2)	120(0)	40(0)	30.135	0.730	26.94
24	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)	24.515	1.224	39.64
25	20(-1)	75(+1)	160(+1)	20(-1)	22.120	1.447	28.56
26	28(0)	60(0)	200(+2)	40(0)	25.685	1.402	31.49
27	28(0)	60(0)	120(0)	40(0)	25.495	0.745	32.37
28	36(+1)	45(-1)	160(+1)	60(+1)	16.905	1.715	38.57
29	20(-1)	45(-1)	80(-1)	60(+1)	13.035	2.301	40.28
30	20(-1)	45(-1)	160(+1)	60(+1)	12.540	2.711	38.33

[0039]

표4(주정을 용매로 한 리나린의 추출의 반응표면모델식)를 참조하면, 추출조건에 영향을 받는 종속변수인 추출물 수득률(Y1)의 값은 반응표면모델식(response surface model equation)으로 표현했을 때의 R^2 가 0.9106인 반응모형이 적합한 것으로 나타났고, 리나린 함량(Y2)의 값은 반응표면모델식으로 표현했을 때의 R^2 가 0.8232인 반응모형이 적합한 것으로 나타났고, AChE 억제율(Y3)의 값은 반응표면모델식으로 표현했을 때의 R^2 가 0.7664인 반응모형이 적합한 것으로 나타났다.

표 4

[0040]

종속변수	식	R^2
수득률	$Y1 = -32.479258 + 2.172051X_1 + 0.329101X_2 + 0.078608X_3 + 0.515763X_4 - 0.028840X_1^2 - 0.001685X_1X_2 - 0.000365X_2^2 - 0.001003X_1X_3 - 0.000667X_2X_3 - 0.000498X_3^2 - 0.00570X_1X_4^2 - 0.001157X_2X_4 - 0.000487X_3X_4 + 0.006746X_4^2$	0.9106

리나린 함량	$Y2=3.916044-0.243590X_1-0.003944X_2-$ $0.000499X_3+0.039824X_4+0.002793X_1^2+0.001126X_1X_2-0.000124X_2^2-$ $0.000142X_1X_3+0.00007510X_2X_3+0.000032428X_3^2-0.000156X_1X_4^2-0.000832X_2X_4-$ $0.000139X_3X_4+0.000525X_4^2$	0.8232
AchE 억제율	$Y3=55.966354-0.597344X_1+0.229556X_2-0.408240X_3+0.032906X_4-0.003796X_1^2-$ $0.004750X_1X_2-$ $0.001391X_2^2+0.007570X_1X_3+0.000933X_2X_3+0.000508X_3^2+0.00586X_1X_4^2-$ $0.002487X_2X_4+0.000239X_3X_4+0.002286X_4^2$	0.7664

[0041] 주정을 용매로 한 감국으로부터의 리나린 추출에서, 도1은 표1 및 표3의 추출조건에 따른 추출물 수득률(%)에 관한 4차원 그래프이며, 최대로 얻을 수 있는 추출물 수득률의 예측된 정상점은 안장점이고, 용매량 33.07(w/w), 추출온도 84.53℃, 추출시간 99.22분 및 주정비율 23.82%의 추출조건일 경우에, 32.57%의 최대 추출물 수득률을 얻을 수 있다는 결과를 얻었다(표5 참조).

[0042] 주정을 용매로 한 감국으로부터의 리나린 추출에서, 도2는 표1 및 표3의 추출조건에 따른 리나린 함량(g/100g)에 관한 4차원 그래프이며, 최대로 얻을 수 있는 리나린 함량의 예측된 정상점은 안장점이고, 용매량 22.17(w/w), 추출온도 47.54℃, 추출시간 114.08분 및 주정비율 73.21%의 추출조건일 때 2.94(g/100g)의 최대 리나린 함량을 얻을 수 있다는 결과를 얻었다(표 5 참조).

[0043] 주정을 용매로 한 감국으로부터의 리나린 추출에서, 도3은 표1 및 표3의 추출조건에 따른 AchE 억제율(%)에 관한 4차원 그래프이며, 최대로 얻을 수 있는 AchE 억제율의 예측된 정상점은 안장점이고, 용매량 36.60(w/w), 추출온도 52.67℃, 추출시간 128.23분 및 주정비율 78.01%의 추출조건일 때, 43.94%의 최대 AchE 억제율을 얻을 수 있다는 결과를 얻었다(표 5 참조).

[0044] 반응표면분석을 통한 주정을 사용한 추출조건에서 최대로 얻을 수 있는 추출물 수득률, 리나린 함량 및 AchE 억제율은 표5로 정리하였다.

표 5

[0045]

종속변수	용매량 X_1	추출온도 X_2	추출시간 X_3	주정비율 X_4	최대값	형태
수득률(%)	33.07	84.53	99.22	23.82	32.57	안정점
리나린 함량 (g/100g)	22.17	47.54	114.08	73.21	2.94	안정점
AchE 억제율(%)	36.60	52.67	128.23	78.01	43.94	안정점

[0046] 이상의 제1 구체예로부터 얻어진 주정을 용매로 한 감국의 리나린 추출에 있어서, 용매량(w/w), 추출온도(℃), 추출시간(분) 및 주정비율(%)에 관한 최적의 추출조건은, 종속변수인 추출물 수득률(%), 리나린 함량(g/100g) 및 AchE 억제율(%)의 모두에 대해 등고선지도(contour map)를 슈퍼임포징(superimposing) 하여, 종속변수의 특성을 모두 만족시켜주는 추출조건 범위의 중복되는 부분인 것으로 예측하였으며, 주정을 용매로 한 감국의 리나린 추출의 최적 조건은, 용매량(w/w) 22.17-36.6, 추출온도(℃) 47.5-84.5, 추출시간(분) 99.2-128.2, 및 주정비율(%) 23.8-78.0 이라는 결과를 얻었다.

[0047] 2: 제2 구체예(물을 용매로 사용한 감국으로부터의 리나린 추출)

[0048] (1). 설계, 측정 및 분석

[0049] 본 제2 구체예에 있어서, 감국으로부터 리나린을 추출하는 용매로 물을 사용하였다. 즉, 감국의 꽃과 잎의 분말

을 물에 혼합 및 침지시킴으로써 물에 리나린이 추출되도록 하였다. 제2 구체에도 제1 구체예와 마찬가지로 중심합성계획(central composite design)에 따라 설계하였고, 추출조건의 최적화를 위하여 반응표면분석법을 사용하였다.

[0050] 아래의 표6(물에 의한 추출의 최적 조건 결정을 위한 반응표면분석 조건)에 기재된 바와 같이, 중심합성계획에 따라, 감국 대비 물(용매)의 질량비인 용매량(w/w)(X1), 추출온도(℃)(X2), 및 추출시간(분)(X3)을 독립(조건) 변수로 하되, -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하였고, 20구간으로 설정하여 상기 3개의 추출조건을 적용하였다.

[0051]추출조건에 종속되는 반응변수로서는, 상기한 추출물 수득률(%), 리나린 함량(g/100g) 및 AchE 억제율(%)을 측정하였으며, 모든 실험은 3번 반복 측정하여 평균값을 회귀분석에 사용하였다.

[0052]회귀분석에 의한 최적 추출조건의 결정 등은 제1 구체예와 실질적으로 동일하다.

표 6

[0053]

실험 번호	부호화한 변수		
	X1	X2	X3
	용매량(w/w)	추출온도(℃)	추출시간(분)
1	20(-1)	70(-1)	80(-1)
2	36(+1)	70(-1)	80(-1)
3	20(-1)	90(+1)	80(-1)
4	36(+1)	90(+1)	80(-1)
5	20(-1)	70(-1)	160(+1)
6	36(+1)	70(-1)	160(+1)
7	20(-1)	90(+1)	160(+1)
8	36(+1)	90(+1)	160(+1)
9	12(-2)	80(0)	120(0)
10	44(+2)	80(0)	120(0)
11	28(0)	60(-2)	120(0)
12	28(0)	100(+2)	120(0)
13	28(0)	80(0)	40(-2)
14	28(0)	80(0)	200(2)
15	28(0)	80(0)	120(0)
16	28(0)	80(0)	120(0)
17	28(0)	80(0)	120(0)
18	28(0)	80(0)	120(0)
19	28(0)	80(0)	120(0)
20	28(0)	80(0)	120(0)

[0054] (2). 결과

[0055]물에 의한 감국으로부터의 리나린 추출에 있어서, 추출물 수득률, 리나린 함량 및 AchE 억제율 평가는 제1 구체예와 실질적으로 동일하게 실행하였으며, 표6에 따라 감국 1g를 해당 용량의 물(용매)에 혼합 및 침지하고, 표6의 추출조건으로 리나린을 추출하였으며, 제1 구체예와 실질적으로 동일한 방법으로 추출물 수득률, 리나린의 함량 및 AchE 억제율을 측정하였고, 최적의 추출조건의 결정은, 추출물의 수득률(%), 리나린 함량(g/100g), AchE억제율(%)에 대해 등고선지도 슈퍼임포징(contour map superimposing) 하였을 때 중복되는 부분의 범위에서 예측하였다.

[0056]물을 용매로 한 리나린의 추출조건 및 그에 따른 추출물 수득률(%), 리나린 함량(g/100g) 및 AchE 억제율(%)의 결과는 표7과 같다.

표 7

[0057]

실험 번호	부호화한 변수			결과		
	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3
	용매량(w/w)	추출온도(℃)	추출시간(분)	추출물 수득률(%)	리나린 함량 (g/100g)	AChE 억제율(%)

1	20(-1)	70(-1)	80(-1)	22.715	0.969	24.56
2	36(+1)	70(-1)	80(-1)	22.390	0.938	28.24
3	20(-1)	90(+1)	80(-1)	19.475	0.668	24.67
4	36(+1)	90(+1)	80(-1)	37.905	0.501	28.53
5	20(-1)	70(-1)	160(+1)	24.630	1.015	27.53
6	36(+1)	70(-1)	160(+1)	31.090	0.450	28.46
7	20(-1)	90(+1)	160(+1)	29.005	0.586	27.03
8	36(+1)	90(+1)	160(+1)	18.860	0.954	25.44
9	12(-2)	80(0)	120(0)	07.835	2.425	22.74
10	44(+2)	80(0)	120(0)	26.060	0.806	27.86
11	28(0)	60(-2)	120(0)	32.065	0.686	36.53
12	28(0)	100(+2)	120(0)	29.895	0.702	28.05
13	28(0)	80(0)	40(-2)	28.355	0.705	31.65
14	28(0)	80(0)	200(2)	26.855	0.968	27.01
15	28(0)	80(0)	120(0)	21.760	1.241	31.33
16	28(0)	80(0)	120(0)	24.805	1.330	23.56
17	28(0)	80(0)	120(0)	26.320	0.988	29.43
18	28(0)	80(0)	120(0)	21.140	1.041	26.43
19	28(0)	80(0)	120(0)	25.670	0.896	27.69
20	28(0)	80(0)	120(0)	27.595	1.015	25.39

[0058] 표8(물을 용매로 한 리나린의 추출의 반응표면모델식)을 참조하면, 추출조건의 변수에 영향을 받는 종속변수인 추출물 수득률(Y1)의 값은 반응표면모델식으로 표현했을 때 R^2 가 0.7126인 반응모형이 적합한 것으로 나타났고, 리나린 함량(Y2)의 값은 반응표면모델식으로 표현했을 때 R^2 가 0.6294인 반응모형이 적합한 것으로 나타났고, AchE 억제율(Y3)의 값은 반응표면모델식으로 표현했을 때 R^2 가 0.5954인 반응모형이 적합한 것으로 나타났다.

표 8

종속변수	식	R^2
수득률	$Y1 = -10.598500 + 3.131151X_1 - 1.329154X_2 + 0.678566X_3 - 0.035376X_1^1 + 0.003359X_2^1 + 0.012440X_2X_3 - 0.008512X_1X_3 - 0.006291X_2X_3 + 0.000250X_3^3$	0.7126
리나린 함량	$Y2 = -0.21573 - 0.22038X_1 + 0.130464X_2 - 0.006241X_3 - 0.001649X_1^1 + 0.001245X_2^1 - 0.001249X_2X_3 + 0.000000391X_1X_3 + 0.000254X_2X_3 - 0.00055767X_3^3$	0.6294
AchE 억제율	$Y3 = 68.471420 + 1.388324X_1 - 1.615761X_2 + 0.124940X_3 - 0.010316X_1^1 - 0.003656X_2^1 + 0.010873X_2X_3 - 0.003203X_1X_3 - 0.001225X_2X_3 + 0.000217X_3^3$	0.5954

[0060] 물을 용매로 한 감국으로부터의 리나린 추출에서, 도4는 표6 및 도7의 추출조건에 따른 추출물 수득률(%), 리나린 함량(g/100g) 및 AchE 억제율(%)에 관한 4차원 그래프이다.

[0061] 도시된 바와 같이, 최대로 얻을 수 있는 추출물 수득률의 예측된 정상점은 안장점이고, 용매량 33.88(w/w), 추출온도 93.4℃, 추출시간은 68.41분의 추출조건일 경우에, 37.77%의 최대 추출물 수득률을 얻을 수 있다는 결과를 얻었다(표9 참조).

[0062] 도시된 바와 같이, 최대로 얻을 수 있는 리나린 함량의 예측된 정상점은 안장점이고, 용매량 12.31(w/w), 추출온도 76.02℃, 추출시간은 119.07분의 추출조건일 경우에, 1.95%의 최대 리나린 함량을 얻을 수 있다는 결과를 얻었다(표9 참조).

[0063] 도시된 바와 같이, 최대로 얻을 수 있는 AchE 억제율(%)의 예측된 정상점은 안장점이고, 용매량 30.99(w/w), 추출온도 60.36℃, 추출시간은 122.78분의 추출조건일 경우에, 34.17%의 최대 AchE 억제율(%)을 얻을 수 있다는

결과를 얻었다(표 9 참조).

[0064] 반응표면분석을 통한 물에 의한 추출조건에서 감국으로부터 최대로 얻을 수 있는 추출물 수득률, 리나린 함량 및 AchE 억제율은 표9로 정리하였다.

표 9

[0065]

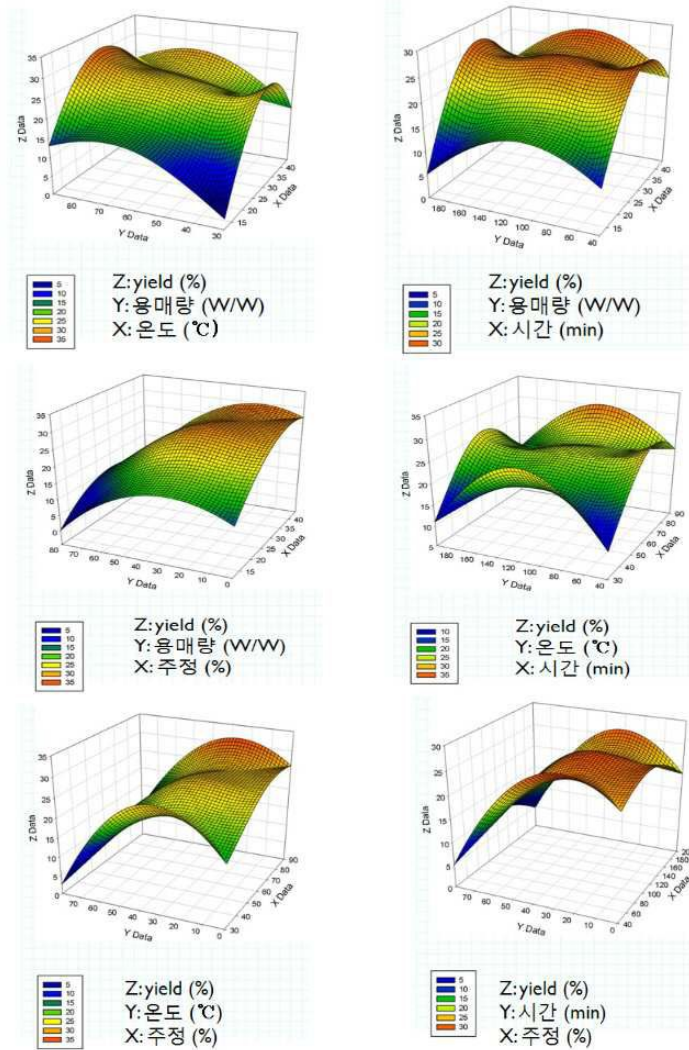
종속변수	용매량(w/w) X_1	추출온도(℃) X_2	추출시간(분) X_3	최대값	형태
yield (%)	33.88	93.4	68.41	37.77	안정점
Linarin 함량 (g/100g)	12.31	76.02	119.07	1.95	안정점
AchE 억제율(%)	30.99	60.36	122.78	34.17	안정점

[0066]

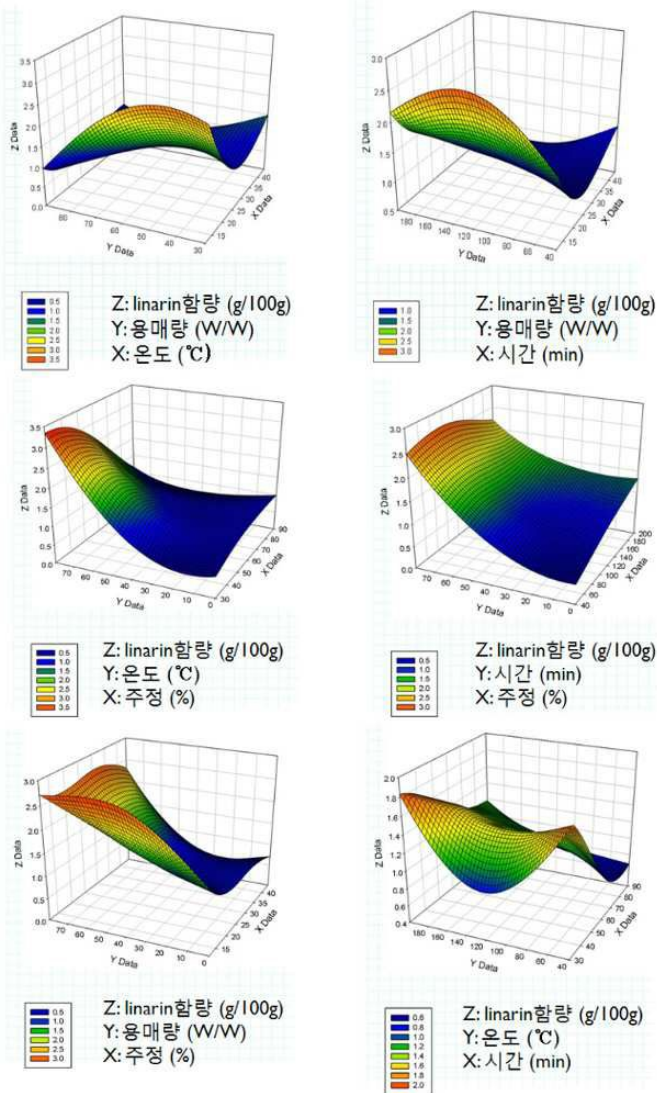
이상의 제2 구체예로부터 얻어진 물을 용매로 한 감국의 리나린 추출에 대한 용매량 (w/w), 추출온도(℃), 추출 시간 (분)의 최적 추출조건은, 종속변수인 추출물 수득률(%), 리나린 함량(g/100g) 및 AchE 억제율(%)의 모두에 대해 등고선지도를 슈퍼임포징하여, 종속변수의 특성을 모두 만족시켜주는 추출조건 범위의 중복되는 부분인 것으로 예측하였으며, 물을 용매로 한 감국의 리나린 추출의 최적 조건은, 용매량(w/w) 12.31-33.88, 추출온도(℃) 60.36-93.4, 및 추출시간(분) 68.41-122.78이라는 결과를 얻었다. 이런 제2 구체예의 최적화된 추출조건은 도5의 별표로 나타낸 조건이다.

도면

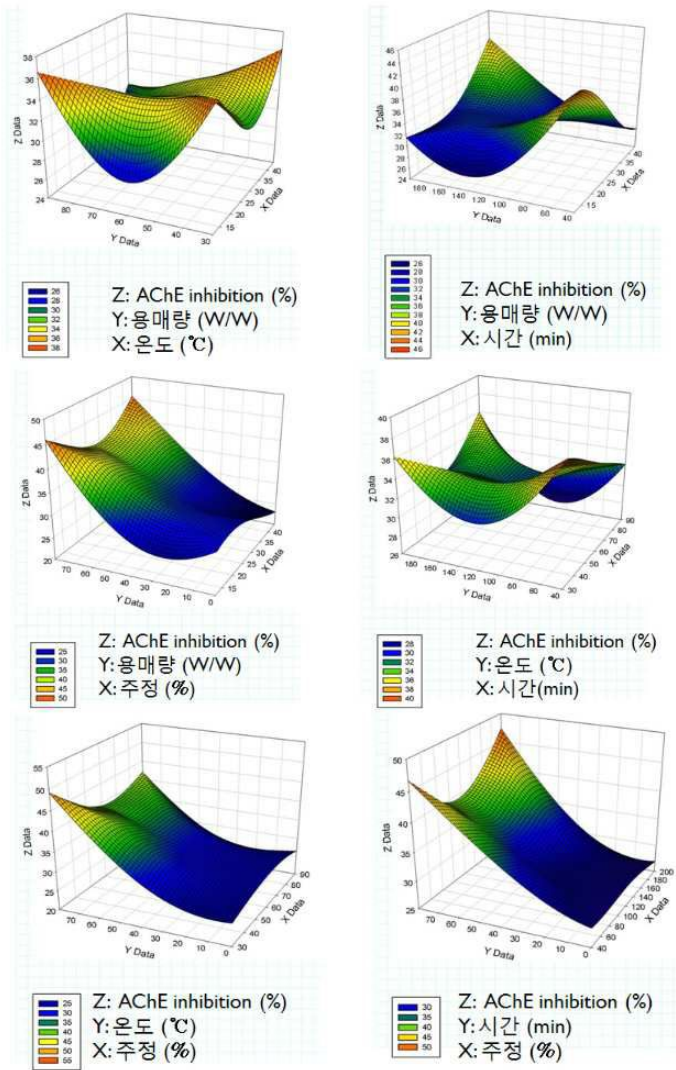
도면1



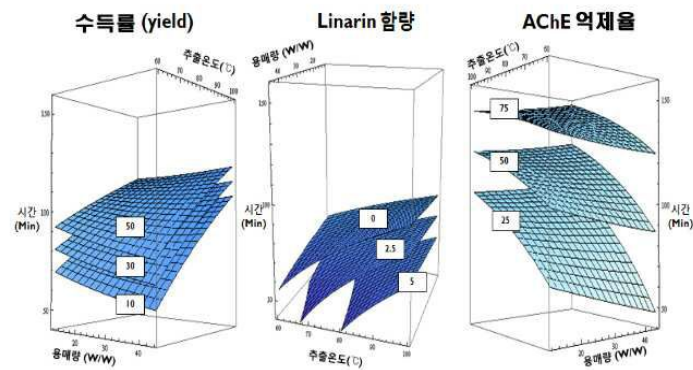
도면2



도면3



도면4



도면5

