



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0075481
(43) 공개일자 2009년07월08일

(51) Int. Cl.

A61K 31/35 (2006.01) A61K 36/484 (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0001352

(22) 출원일자 2008년01월04일

심사청구일자 2008년01월04일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39

(72) 발명자

임순성

강원도 춘천시 퇴계동 916-1 현진아파트 102동 805호

강영희

강원도 춘천시 우두동 동부아파트 103동 1102호

(뒷면에 계속)

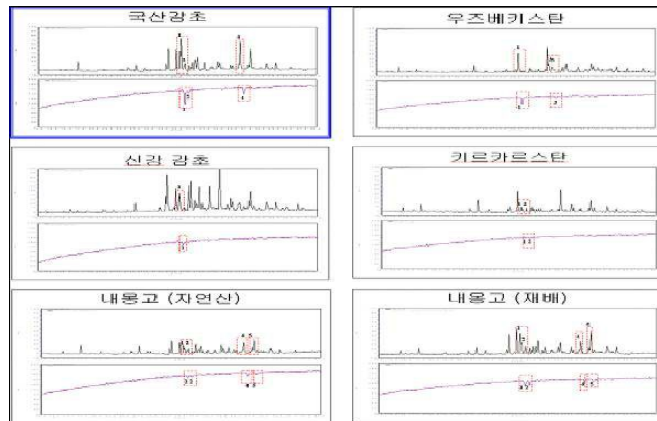
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 감초 추출물을 포함하는 항산화 조성물

(57) 요약

본 발명은 항산화능이 우수한 감초 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물 및 항산화능이 증강된 감초 추출물의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명은 항산화능을 가진 화합물의 함량을 증강시킨 감초 추출물을 제공하여, 항산화능이 우수할 뿐만 아니라 천연 추출물이므로 안전성과 선호도가 우수하여 다양한 용도로 응용될 수 있는 항산화 조성물을 제공한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

정주영

대전 유성구 지족동 열매마을아파트 412동 1903호

이연실

강원도 춘천시 교동 135-2 302호

김정은

강원 춘천시 퇴계동 한진아파트 101동 1101호

최세진

강원 춘천시 교동 85-2 201호

신현경

서울 성북구 안암동1가 361, 24-4 래미안 안암아파트 104동 602호

특허청구의 범위

청구항 1

국산 감초에 대해 탄소수 1 내지 5의 알코올, 헥산, 디클로로메탄, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 에틸에테르로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 하여 추출한 추출물을 유효성분으로 포함하는 향산화 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출용매는 메틸렌 클로라이드 또는 노르말 헥산과 에탄올을 8:1 내지 10:1(노르말 헥산:에탄올)로 혼합한 혼합용매인 향산화 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 감초는 *Glycyrrhiza glabra*인 향산화 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추출물은 감초 추출물 100 중량부를 기준으로 0.4 내지 0.6 중량부의 7-O-메틸루테온(7-O-methyl luteone)과 0.2 내지 0.4 중량부의 디하이드로글리아스페린 C(Dehydroglyasperin C)를 포함하는 것인 향산화 조성물.

청구항 5

국산 감초에 대해 메틸렌 클로라이드 또는 노르말 헥산과 에탄올을 8:1 내지 10:1(노르말 헥산:에탄올)로 혼합한 혼합용매를 추출용매로 하여 추출한 추출물을 유효성분으로 포함하는 향산화 식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 추출물은 감초 추출물 100 중량부를 기준으로 0.4 내지 0.6 중량부의 7-O-메틸루테온(7-O-methyl luteone)과 0.2 내지 0.4 중량부의 디하이드로글리아스페린 C(Dehydroglyasperin C)를 포함하는 것인 향산화 식품 조성물.

청구항 7

7-O-메틸루테온(7-O-methyl luteone)을 유효성분으로 포함하는 향산화 조성물.

청구항 8

7-O-메틸루테온(7-O-methyl luteone)을 유효성분으로 포함하는 향산화 식품 조성물.

청구항 9

국산 감초(*Glycyrrhiza glabra*)에 메틸렌 클로라이드 또는 노르말 헥산과 에탄올을 부피비 기준으로 8:1 내지 10:1(노르말 헥산:에탄올)로 혼합한 혼합용매를 첨가하고 추출하여 추출물을 제조하는 단계;

상기 추출물용매에 대해 n-헥산과 에틸아세테이트를 부피비 기준으로 6:4 내지 7:3으로 혼합한 용매를 이용하여 감압액체크로마토그래피(vacuum liquid chromatography, VLC)를 수행하여 분획물을 제조하는 단계; 및

상기 분획물에 대해 메탄올 수용액의 농도를 45%에서 60%로 농도구배를 주면서 중압액체크로마토그래피(middle pressure liquid chromatography, MPLC)를 수행하는 단계를 포함하는

감초로부터 7-O-메틸루테온(7-O-methyl luteone)을 정제하는 방법.

청구항 10

국산 감초(*Glycyrrhiza glabra*)에 메틸렌 클로라이드 또는 노르말 헥산과 에탄올을 부피비 기준으로 8:1 내지 10:1(노르말 헥산:에탄올)로 혼합한 혼합용매를 첨가하고 추출하여 추출물을 제조하는 단계 및

상기 추출물에 대해 70%에서 100%로 메탄올 수용액의 농도구배를 주면서 중압액체크로마토그래피(middle pressure liquid chromatography, MPLC)를 수행하는 단계를 포함하는

감초로부터 디하이드로글리아스페린 C(Dehydroglyasperin C)를 정제하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 항산화능이 우수한 감초 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물 및 항산화능이 증강된 감초 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 대부분의 생물은 병원, 해충 또는 바이러스 등의 생물학적 스트레스나 지구 환경 악화에 따라 생기는 각종 환경 스트레스를 받고 있다. 생물에 이러한 각종 스트레스가 가해지는 경우, 생명 유지에 필수적으로 요구되는 산소는 반응성이 높아 심각한 생리적 장애 등을 유발하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 된다. 상기 활성산소종은 노화를 촉진하는 원인이 되는 것으로 인식되고 있으며, 다양한 질병의 원인이 되는 것으로 보고되어 있다.
- <3> 구체적으로, 상기 활성산소종 또는 자유라디칼은 세포를 파괴하거나 피부 진피층의 결합조직을 절단하거나 교차 결합을 일으키므로 주름형성, 아토피성 피부염, 여드름 또는 피부암과 같은 피부 관련 이상현상 뿐만 아니라 심근경색증(myocardial infarction), 뇌졸중(stroke), 죽상동맥경화증(atherosclerosis) 등을 포함하는 심혈관계 질환, 근위축측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis)이나 파킨슨씨 병(Parkinson's disease, PD)과 같은 퇴행성 신경질환(chronic neurodegenerative disease), 류마티스성 관절염 등의 여러 질병의 원인이 되는 것으로 보고되어 있다.
- <4> 또한, 활성산소종은 인체 내에서 지질을 과산화시켜 과산화지질이라고 하는 해로운 물질을 생성할 수 있으며, 상기 과산화지질은 혈관에 작용하여 동맥경화나 혈정과 같은 각종 성인병의 원인이 되는 것으로 보고 되어 있다.
- <5> 생체 내에는 이러한 활성산소종을 제거하는 시스템으로 슈퍼 옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase, SOD, EC 1. 15. 1. 1), 퍼옥시다제(oxidase, POD), 카탈라제(catalase, CAT) 등의 고분자 항산화 효소와 비타민 C, 비타민 E 또는 글루타치온(glutathione) 등의 항산화 물질 등이 존재한다.
- <6> 그러나, 공해나 자외선 또는 상기 생물학적 스트레스를 포함하는 여러 원인 및 노화에 의해서 점차적으로 인체의 항산화체계는 정상 작동을 하지 못하게 되며, 이러한 경우 항산화 물질을 섭취함으로써 방어할 수 있도록, 활성산소종을 제거할 수 있는 물질 즉, 항산화제의 체내 공급이 요구되고 있다.
- <7> 종래에 뛰어난 항산화력을 지닌 합성 항산화제로는 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene) 또는 TBHQ(tertiary butylhydroquinone) 등이 보고 되어 있다.
- <8> 그러나, 상기 합성 항산화제는 체내 흡수 물질의 일부가 독성을 지니고 있어, 기형발생인자 및 발암 물질화 될 수 있고(Ito, *et. al.*, 1983), 간 비대증을 유발하거나 간장 중 마이크로소말 효소활성(microsomal enzyme activity)을 증가시킬 수 있고, 폐나 신장 등의 장기 조직의 병리적인 해를 유발시키는(Branen, 1975) 등의 안전성 문제가 제기되고 있다.
- <9> 따라서, 근래에는 보다 인체에 안전하고, 항산화력이 뛰어난 항산화제를 개발하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구의 일환으로 천연 항산화제에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 보다 상세하게, 현대인들의 안전에 대한 의식과 건강에 대한 욕구의 증가와 함께 천연 항산화제를 포함한 식품의 섭취가 활성산소종에 의한 질병의 발병률을 저하시킬 수 있다는 연구보고가 축적되면서, 천연 항산화제에 대한 관심이 고조되고 있다.

- <10> 천연 식물을 대상으로 항산화 효과를 탐색하는 등의 지속적인 천연 항산화제에 대한 연구 결과, 많은 천연 항산화 성분들이 보고되어 있다.
- <11> 현재까지 보고된 천연 항산화성분들로는 천연 항산화제로서 토코페놀, 플라보노(flavone) 유도체, sesamol, gossypol등이 있고, 이소플라보노(isoflavone), 페놀릭산(phenolic acids), 토코페롤, 부티산(phytic acid), 사포닌(saponin), 트립신 저해제(trypsin inhibitor) 등이 항산화 물질로 보고 되었다(Hayes *et. al.*, 1977).
- <12> 이러한 연구 결과와 함께, 활성산소종에 의한 질병의 예방 및 노화 방지를 위하여, 항산화 성분이 다량 포함되어 있거나 항산화능이 우수한 것으로 보고되어 있고, 식품으로 이용할 수 있거나 식품에 포함될 수 있는 천연 추출물에 대한 연구 또는 개발의 요구가 증가 되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <13> 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 항산화능이 우수한 감초 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <14> 또한, 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 7-O-메틸루테온(7-O-methyluteone)을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <15> 또한, 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위하여, 감초로부터 7-O-메틸루테온(7-O-methyluteone) 또는 디하이드로글리아스페린 C(Dehydroglyasperin C)을 정제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- <16> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항산화능이 우수한 감초 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 바람직하게는 식품 조성물일 수 있다. 본 발명의 식품 조성물의 예로는 건강기능식품, 식품첨가제 또는 음료를 들 수 있다.
- <17> 또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여 항산화능이 우수한 7-O-메틸루테온(7-O-methyluteone)을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공한다.
- <18> 또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여 감초로부터 7-O-메틸루테온 또는 디하이드로글리아스페린 C(Dehydroglyasperin C)을 정제하는 방법을 제공한다.
- <19> 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- <20> 본 발명자들은 원산지가 다양한 감초들 중에서 재배지가 대한민국인 감초, 즉 국산 감초를 메틸렌 클로라이드 또는 노르말 헥산과 에탄올(9:1)을 혼합한 혼합용매를 이용하여 추출하는 경우, 상기 추출물 내에 1,1-디페닐-2-피크릴하이드라질(1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)를 이용하여 DPPH 소거능을 측정하는 방법으로 항산화 활성이 우수한 것으로 확인된 7-O-메틸루테온(7-O-methyluteone), 디하이드로글리아스페린 C(Dehydroglyasperin C) 및 디하이드로글리아스페린 D(Dehydroglyasperin D)의 함량이 현저하게 상승되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하여, 이를 토대로 본 발명을 완성하게 되었다.
- <21> 본 발명은 항산화능이 우수한 감초 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물에 관한 것이다.
- <22> 상기 감초는 장미목 콩과에 속하는 여러해살이풀이고, 천연 생약으로 이용되는 식물 중에서 그 생산지가 상이한 종류를 혼용하고 있는 대표적 식물이다. 상기 감초는 바람직하게는 에스파냐산 감초(*Glycyrrhiza glabra*)일 수 있다. 본 발명에서 상기 에스파냐산 감초는 이의 근연식물인 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 또는 시베리아산 감초(*Glycyrrhiza glabra* var. *glandifera*)에 비하여 항산화활성이 우수한 것으로 확인되었다. 또한, 상기 감초는 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택된 어느 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 뿌리 및 줄기로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- <23> 또한, 상기 감초는 바람직하게는 국산 감초일 수 있다. 본 발명에 있어서, 국산감초란 감초의 산지 즉, 감초의 재배지 또는 채취지가 대한민국인 감초를 의미한다. 본 발명에서 종이 동일한 경우에도 재배지가 상이한 경우에는 감초 추출물의 구성성분이 상이하고, 특히 항산화능과 관련된 구성성분이 현저하게 상이한 것으로 확인되었으며, 특히 국산 감초가 중국이나 러시아 근방에서 생산된 감초 등에 비하여 항산화 활성이 현저하게 우수하고, 국산 감초의 경우 DPPH 소거능을 측정하는 방법으로 항산화 활성이 우수한 것으로 밝혀진 화합물인 7-O-

methylluteone, Dehydroglyasperin C 및 Dehydroglyasperin D의 함량이 다른 국가에서 재배되는 감초에 비하여 현저하게 높은 것으로 확인되었다.

- <24> 본 발명의 감초 추출물은 추출용매를 이용하여 통상의 식물 추출방법으로 제조할 수 있다.
- <25> 상기 추출용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 헥산, 디클로로메탄, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 에틸아세테이트, 에틸에테르 또는 이들의 혼합용매일 수 있고, 바람직하게는 메틸렌 클로라이드 또는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매일 수 있다. 상기 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매의 함량비는 부피비 기준으로 바람직하게는 8:1 내지 10:1(노르말헥산: 에탄올)일 수 있다. 상기 항산화활성을 나타내는 주요성분을 고수율로 수득하기 위하여, 항산화활성을 나타내는 물질의 성질과 추출물의 추출 수율을 고려하면, 메틸렌 클로라이드 또는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매의 함량비가 부피비 기준으로 8:1 내지 10:1(노르말헥산: 에탄올)인 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매가 바람직하다.
- <26> 본 발명의 감초 추출물을 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 바람직하게는 가압추출법 또는 초음파 분쇄 추출법, 더욱 바람직하게는 가압추출법일 수 있다.
- <27> 상기 가압추출법은 기기를 이용한 기기추출법일 수 있다. 상기 가압추출법은 40 내지 60℃ 및 1400 psi 내지 1600 psi 조건에서 수행할 수 있고, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 1450 psi 내지 1550 psi 조건에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 가압추출법은 5분 내지 10시간, 바람직하게는 10분 내지 1시간동안 수행할 수 있다.
- <28> 상기 초음파 분쇄 추출법은 40 내지 60℃, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 5 내지 100 kHz, 바람직하게는 10 내지 75 kHz, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 kHz의 조건에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 가압추출법은 1일 내지 48일, 바람직하게는 10일 내지 30일, 더욱 바람직하게는 14일 내지 21일 동안 수행할 수 있다.
- <29> 상기 추출법의 추출조건 및 추출시간은 추출물을 고수율로 수득하고, 추출물 내에 항산화활성을 가진 유효성분의 함량을 높이기 위하여 결정된 범위이다.
- <30> 또한, 상기한 바와 같이 제조된 추출물, 구체적으로 추출액은 이후 감압 여과과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다.
- <31> 구체적으로, 상기 감초 추출물은 유수로 세척한 감초를 마쇄기로 분쇄하고, 추출용매, 메틸렌 클로라이드 또는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매, 바람직하게는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매, 더욱 바람직하게는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매의 함량비가 8:1 내지 10:1(노르말헥산: 에탄올)인 노르말헥산과 에탄올 혼합용매를 가한 후에, 추출기기를 이용하여 가압추출을 수행하거나 초음파 분쇄 추출기를 이용하여 초음파 분쇄 추출을 수행할 수 있다. 상기 추출물은 수득된 추출액에 대해 여과과정을 수행하거나 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 제조할 수 있다. 상기 여과과정을 수행하여 에탄올 추출액에 남아 있는 잔사 등을 제거할 수 있으며, 상기 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 수분을 제거할 수 있다.
- <32> 일례로, 상기 가압추출은 감초 즉, 분쇄시료 30 g당 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매의 함량비가 8:1 내지 10:1(노르말헥산: 에탄올)인 노르말헥산과 에탄올 혼합용매 50 mL 내지 500 mL, 바람직하게는 100 mL 내지 300 mL를 가한 후, 40 내지 60℃ 및 1400 psi 내지 1600 psi의 조건, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 1450 psi 내지 1550 psi 조건에서 5분 내지 1시간, 바람직하게는 10분 내지 30분 동안 수행할 수 있다. 가압추출하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 추출은 3회 반복하여 추출할 수 있으며, 상기 3회 반복하여 추출된 추출액을 함께 감압 조건에서 농축하여 감초 추출물을 수득할 수 있다.
- <33> 다른 일 예로, 상기 초음파 분쇄 추출은 감초 즉, 분쇄시료 100 g당 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매의 함량비가 8:1 내지 10:1(노르말헥산: 에탄올)인 노르말헥산과 에탄올 혼합용매 100 mL 내지 2 L, 바람직하게는 500 mL 내지 1500 mL를 가한 후, 40 내지 60℃, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 5 내지 100 kHz, 바람직하게는 10 내지 75 kHz, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 kHz의 조건에서 10일 내지 30일, 바람직하게는 14일 내지 21일동안 초음파 분쇄 추출법으로 수행할 수 있다. 상기 추출은 3회 반복하여 추출할 수 있으며, 상기 3회 반복하여 추출된 추출액을 함께 감압조건에서 농축하여 감초 추출물을 수득할 수 있다.
- <34> 상기 감초 추출물은 감초 추출물 100 중량부를 기준으로 0.4 내지 0.6 중량부, 바람직하게는 0.45 내지 0.55 중량부, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 0.55 중량부의 7-O-메틸루테온과 0.2 내지 0.4 중량부, 바람직하게는 0.25 내지 0.35 중량부, 더욱 바람직하게는 0.275 내지 0.325 중량부의 디하이드로글리아스페린 C를 포함하는 것일 수 있다.
- <35> 본 발명에 따른 감초 추출물은 항산화 활성이 있으므로, 활성산소종과 관련된 다양한 질환을 개선 또는 예방할

수 있는 효과를 가진다.

- <36> 본 발명은 또한 7-O-메틸루테온을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물에 관한 것이다.
- <37> 상기 7-O-메틸루테온은 1,1-디페닐-2-피크릴하이드라질(1,1 '-dephenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)를 이용하여 DPPH 소거능을 측정하는 방법으로 항산화 활성을 측정한 결과, 기존에 항산화 활성이 있는 것으로 확인된 디하이드로글리아스퍼린 C 및 디하이드로글리아스퍼린 D(Dehydroglyasperin D)에 비하여 현저하게 우수한 항산화 활성이 있는 것으로 확인되었다.
- <38> 상기 7-O-메틸루테온을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물은 상기 7-O-메틸루테온이 갖는 항산화능의 범위 내에서 항산화활성을 가질 수 있다. 상기 7-O-메틸루테온을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물은 상기 유효성분인 7-O-메틸루테온의 항산화활성을 유지하는 범위 내에서, 항산화활성이 있는 것으로 알려진 물질, 일 예로 디하이드로글리아스퍼린 C 및/또는 디하이드로글리아스퍼린 D 등을 추가로 포함할 수 있다.
- <39> 상기 본 발명의 항산화 조성물은 유효성분인 감초 추출물 또는 7-O-메틸루테온 외에 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 항산화 조성물에는 상기 성분들이 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다. 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 감초 추출물 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위 또는 7-O-메틸루테온 100 중량부 당 100 내지 10,000,000 중량부 범위에서 추가할 수 있다.
- <40> 본 발명은 또한 감초 추출물 또는 7-O-메틸루테온을 유효성분으로 포함하는 항산화 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 식품 조성물의 예로는 건강기능식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제를 들 수 있다.
- <41> 상기 감초 추출물 또는 7-O-메틸루테온을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- <42> 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의도이다.
- <43> 본 발명의 유효성분을 포함할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일,채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 음료, 식품첨가제 또는 음료첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- <44> 본 발명에서 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.
- <45> 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- <46> 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 감초 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- <47> 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르트암 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- <48> 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g

이다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

- <49> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제는 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부, 바람직하게는 0.00001 내지 15 중량부 또는 7-O-메틸루테온 100 중량부 당 0 내지 100,000 중량부, 바람직하게는 10 내지 10,000 중량부일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <50> 본 발명에서 건강기능음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 제조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.
- <51> 상기 건강기능음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 감초 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 중량부 내지 20 중량부, 바람직하게는 1 중량부 내지 18 중량부, 더욱 바람직하게는 5 중량부 내지 12 중량부 포함될 수 있다.
- <52> 또한, 향산화 식품 조성물에 있어서, 상기 감초 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 7-O-메틸루테온의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 5 중량%로 포함될 수 있고, 상기 식품 조성물이 음료인 경우에는 감초 추출물의 양은 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함되거나 상기 7-O-메틸루테온의 양은 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.000001 g 내지 0.5 g, 바람직하게는 0.0001 g 내지 0.1 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <53> 본 발명의 향산화 조성물은 국산 감초를 메틸렌 클로라이드 또는 노르말 헥산과 에탄올을 8:1 내지 10:1(노르말 헥산:에탄올)로 혼합한 혼합용매로 추출한 추출물의 경우, 다른 곳에서 재배 또는 채취된 감초에 대한 추출물 또는 다른 용매로 추출한 추출물에 비하여 향산화활성이 우수하고, 추출물 내에 향산화 활성이 우수한 것으로 확인된 7-O-methyluteone, Dehydroglyasperin C 및 Dehydroglyasperin D의 함량이 현저하게 높다는 것과 7-O-methyluteone이 현저하게 우수한 향산화 활성이 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- <54> 보다 구체적으로는, 국산 감초는 우리나라가 아닌 다른 곳에서 재배 또는 채취된 감초 중, 가장 함량이 높은 내몽고에서 재배된 감초에 비하여 7-O-methyluteone과 Dehydroglyasperin C가 각각 약 3배의 함량을 포함하고 있는 것으로 확인되어, 향산화활성이 매우 우수한 것으로 확인되었다.
- <55> 또한, 본 발명은 향산화능이 증강된 감초 추출물의 제조방법에 관한 것이다.
- <56> 상기 향산화능이 증강된 감초 추출물 제조방법은 국산 감초를 세척하고 분쇄하여 감초 분쇄물을 수득하는 단계 및 상기 감초 분쇄물에 유기용매를 첨가하여 추출물을 제조하는 단계를 포함하는 감초 추출물 제조방법일 수 있다.
- <57> 상기 국산 감초는 *Glycyrrhiza glabra*일 수 있다.
- <58> 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 헥산, 디클로로메탄, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 에틸아세테이트, 에틸에테르 또는 이들의 혼합용매일 수 있고, 바람직하게는 메틸렌 클로라이드 또는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매일 수 있다. 상기 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매의 함량비는 부피비 기준으로 바람직하게는 8:1 내지 10:1(노르말헥산: 에탄올)일 수 있다.
- <59> 상기 추출물을 제조하는 단계는 가압추출법 또는 초음파 분쇄 추출법, 바람직하게는 가압추출법으로 수행할 수 있다. 상기 가압추출법은 기기를 이용한 기기추출법일 수 있다.
- <60> 상기 가압추출법은 40 내지 60℃ 및 1400 psi 내지 1600 psi 조건에서 수행할 수 있고, 바람직하게는 45 내지

55℃ 및 1450 psi 내지 1550 psi 조건에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 가압추출법은 5분 내지 10시간, 바람직하게는 10분 내지 1시간동안 수행할 수 있다. 또한, 상기 초음파 분쇄 추출법은 40 내지 60℃, 바람직하게는 45 내지 55℃ 및 5 내지 100 kHz, 바람직하게는 10 내지 75 kHz, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 kHz의 조건에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 가압추출법은 1일 내지 48일, 바람직하게는 10일 내지 30일, 더욱 바람직하게는 14일 내지 21일동안 수행할 수 있다.

<61> 상기 제조방법에 의해 제조된 감초 추출물은 감초 추출물 100 중량부를 기준으로 0.4 내지 0.6 중량부, 바람직하게는 0.45 내지 0.55 중량부, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 0.55 중량부의 7-O-메틸루테온과 0.2 내지 0.4 중량부, 바람직하게는 0.25 내지 0.35 중량부, 더욱 바람직하게는 0.275 내지 0.325 중량부의 디하이드로글리시페린 C를 포함하는 것일 수 있다.

<62> 상기 감초 추출물 제조방법은 추가로 크로마토그래피를 수행하는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 상기 크로마토그래피법은 중압액체크로마토그래피법일 수 있다.

<63> 또한, 본 발명은 감초로부터 7-O-메틸루테온 또는 디하이드로글리시페린 C를 정제하는 방법에 관한 것이다.

<64> 본 발명자는 국산 감초의 추출물 바람직하게는 비극성 용매로 추출한 국산 감초의 추출물에 항산화능이 우수한 것으로 확인된 7-O-메틸루테온 또는 디하이드로글리시페린 C이 우리나라를 제외한 다른 곳, 일 예로 중국이나 러시아 근방에서 재배한 감초에 비하여 현저하게 많이 포함되어 있는 것을 확인하고, 국산 감초로부터 상기 7-O-메틸루테온 또는 디하이드로글리시페린 C를 정제할 수 있는 최적의 조건을 선택하여 본 발명을 완성하였다.

<65> 감초로부터 7-O-메틸루테온 또는 디하이드로글리시페린 C를 정제하는 방법은 국산 감초(*Glycyrrhiza glabra*)에 유기용매를 첨가하고 추출하여 추출물을 제조하는 단계; 및 상기 추출물을 크로마토그래피법으로 정제하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

<66> 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 헥산, 디클로로메탄, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 에틸아세테이트, 에틸에테르 또는 이들의 혼합용매일 수 있고, 바람직하게는 메틸렌 클로라이드 또는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매일 수 있다. 상기 노르말헥산과 에탄올의 혼합용매의 함량비는 부피비 기준으로 5:1 내지 15:1, 바람직하게는 8:1 내지 10:1(노르말 헥산:에탄올)일 수 있다.

<67> 상기 크로마토그래피법은 컬럼크로마토그래피법일 수 있으며, 수율 및 순도를 고려하여 1회 내지 5회 수행할 수 있다. 상기 컬럼크로마토그래피법은 바람직하게는 감압액체크로마토그래피법, 중압액체크로마토그래피법 및 고성능액체크로마토그래피법(high performance liquid chromatography, HPLC)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 감압액체크로마토그래피법 및 중압액체크로마토그래피법으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

<68> 상기 감압액체크로마토그래피에 사용되는 용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 헥산 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 헥산 및 에틸아세테이트의 혼합용매일 수 있다. 상기 헥산은 바람직하게는 노르말 헥산(n-헥산)일 수 있다. 상기 헥산 및 에틸아세테이트의 함량은 부피비 기준으로 75:35 내지 55:45(노르말 헥산:에틸아세테이트), 바람직하게는 70:30 내지 60:40일 수 있다. 상기 헥산과 에틸아세테이트의 함량 범위는 정제대상 물질의 수율 및 순도와 정제대상 물질의 특성을 고려하여, 높은 순도의 정제대상물질을 높은 수율로 얻기 위하여 용매의 극성을 조절한 것이다.

<69> 상기 중압액체크로마토그래피(middle pressure liquid chromatography, MPLC)에 사용되는 용매는 물 및 탄소수 1 내지 5의 알코올로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 탄소수 1 내지 5의 알코올 수용액일 수 있고, 더욱 바람직하게는 메탄올 수용액 또는 에탄올 수용액일 수 있다. 상기 알코올 수용액의 농도 즉, 알코올 함량은 정제대상 화합물의 종류에 따라서 상이할 수 있으며, 크로마토그래피를 실시하면서 농도구배가 주어지도록 변경될 수 있다.

<70> 상기 정제방법의 최종 결과물 즉, 정제대상이 상기 7-O-메틸루테온인 경우에는 알코올 수용액의 농도구배는 30% 내지 90%, 바람직하게는 35% 내지 80%, 더욱 바람직하게는 40% 내지 70%일 수 있고, 정제대상이 상기 디하이드로글리시페린 C인 경우에는 알코올 수용액의 농도구배는 30% 내지 100%, 바람직하게는 45% 내지 100%, 바람직하게는 60% 내지 100%일 수 있다. 상기 알코올 수용액의 농도구배 범위는 정제대상 물질의 수율 및 순도를 고려하여, 95% 이상의 순도의 정제대상 물질을 고수율로 수득하기 위하여 정제대상 물질의 특성 및 용매의 극성을

조절한 범위이다.

- <71> 상기 감초로부터 7-O-메틸루테온을 정제하는 방법은 바람직하게는 감압액체크로마토그래피를 수행하여 분획물을 제조하는 단계 및 상기 분획물에 대하여 중압액체크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- <72> 바람직하게는 상기 감초로부터 7-O-메틸루테온을 정제하는 방법은 국산 감초(*Glycyrrhiza glabra*)에 메틸렌 클로라이드 또는 노르말 헥산과 에탄올을 부피비 기준으로 8:1 내지 10:1(노르말 헥산:에탄올)로 혼합한 혼합용매를 첨가하고 추출하여 추출물을 제조하는 단계; 상기 추출물용매에 대해 n-헥산과 에틸아세테이트를 부피비 기준으로 6:4 내지 7:3으로 혼합한 용매를 이용하여 감압액체크로마토그래피를 수행하여 분획물을 제조하는 단계; 및 상기 분획물에 대해 메탄올 수용액의 농도를 45%에서 60%로 농도구배를 주면서 중압액체크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- <73> 상기 감초로부터 디하이드로글리아스페린 C를 정제하는 방법은 바람직하게는 상기 추출물에 대하여 중압액체크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- <74> 바람직하게는 상기 감초로부터 디하이드로글리아스페린 C를 정제하는 방법은 국산 감초(*Glycyrrhiza glabra*)에 메틸렌 클로라이드 또는 노르말 헥산과 에탄올을 부피비 기준으로 8:1 내지 10:1(노르말 헥산:에탄올)로 혼합한 혼합용매를 첨가하고 추출하여 추출물을 제조하는 단계 및 상기 추출물에 대해 70%에서 100%로 메탄올 수용액의 농도구배를 주면서 중압액체크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 알코올 수용액의 농도구배 범위는 정제대상 물질의 수율 및 순도를 고려하여, 95% 이상의 순도의 정제대상 물질을 고수율로 수득하기 위하여 정제대상 물질의 특성 및 용매의 극성을 조절한 범위이다.
- <75> 상기 국산 감초는 우리나라를 제외한 다른 나라에서 재배된 감초에 비하여 7-O-메틸루테온 및 디하이드로글리아스페린 C의 함량이 현저하게 높으며, 상기 추출물 제조 방법이 각각의 크로마토그래피 방법의 조건에 의할 경우, 다른 용매를 사용하거나 다른 조건에 의할 경우에 비하여 현저하게 높은 수율로 상기 7-O-메틸루테온 또는 디하이드로글리아스페린 C를 수득할 수 있으며, 상기 감초로부터 수득한 7-O-메틸루테온 또는 디하이드로글리아스페린 C는 천연물로부터 수득한 것이므로 화학적으로 합성한 것에 비하여 선폭도 및 안정성도 뛰어날 것이므로, 상기 정제방법은 그 산업적 효과가 매우 크다는 것이다.

효 과

- <76> 본 발명의 국산 감초를 메틸렌 클로라이드 또는 노르말 헥산과 에탄올을 8:1 내지 10:1(노르말 헥산:에탄올)로 혼합한 혼합용매로 추출한 추출물은 현저하게 우수한 항산화능이 인정될 뿐만 아니라 천연물을 이용한 것이므로, 기존의 화학적으로 합성된 항산화제에 비하여 부작용이나 안정성 면에서 우수한 효과가 인정되고, 국산 감초의 경우, 7-O-methylfluteone 및 Dehydroglyasperin C의 함량이 다른 재배지에서 재배된 감초에 비하여 현저하게 높으므로 우리나라에서 값싸고 쉽게 구할 수 있는 천연물인 국산 감초를 이용하여 7-O-methylfluteone 및 Dehydroglyasperin C를 제조하는 경우, 경제성과 안정성이란 측면에서 그 산업적 효과가 매우 크다는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <77> 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 기재한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 일 실시예일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <78> **실시예 1: 감초 추출물의 제조**
- <79> 실시예 1-1. 시료의 준비
- <80> 감초 추출물에 사용될 시료인 감초 건조분쇄물은 감초 1 kg을 유수에서 세척한 후, 실온에서 건조시키고 마쇄기를 이용하여 분쇄하여 제조하였다. 상기 감초는 재배 및 채취지역이 다른 11종의 감초, 구체적으로는 대한민국(영주), 중국 신강, 중국 요녕 길림성, 내몽고, 우즈베키스탄 및 키르카르스탄에서 재배 또는 채취된 감초이다. 상기 대한민국, 우즈베키스탄 및 키르카르스탄에서 재배 또는 채취된 감초는 *Glycyrrhiza glabra*이고, 상기 중국 신강에서 재배 또는 채취된 감초는 *Glycyrrhiza inflata*이며, 상기 내몽고에서 재배 또는 채취된 감초는 *Glycyrrhiza uralensis*이었으며, 중국 요녕 길림성 산 감초는 *Glycyrrhiza inflata*와 *Glycyrrhiza uralensis*을 혼합한 것이었으며, 상기 감초는 모두 대광약품사(춘천, 대한민국)에서 구매하여 사용하였다.
- <81> 감초 추출물 및 크로마토그래피에 사용되는 메탄올, 에탄올, 메틸렌클로라이드 및 n-헥산은 HPLC급으로 Burdick & Jackson(USA)에서 구입하여 사용하였으며, DPPH(1,1 '-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Sigma-Aldrich Korea

(대한민국)에서 구입하여 사용하였다.

<82> 실시예 1-2. 감초 추출물의 준비

<83> 실시예1-1의 감초 건조분쇄물 30 g에 추출용매 200 ml를 첨가하고 50℃ 및 1500 psi의 조건에서 추출기기(ASE 300 Accelerated Solvent Extractor)를 이용하여 20분 동안 수행하였다. 상기 추출을 수행한 후, 추출된 시료는 Biotron Korea(대한민국)의 Modul spin 40을 이용하여 45℃에서 감압 농축을 수행하였다.

<84> 상기 추출용매는 각각 물, 에탄올, 메틸렌 클로라이드 및 에탄올:노르말헥산(9:1, 부피비)을 이용하여 추출하였다. 추출 시 기기 추출(ASE300 ACCELERATED SOLVENT EXTRACOR)과 초음파분쇄 추출(BRANSON Ultrasonics corporation)방법을 병행하였다. 기기 추출 시 분쇄시료 30 g당 추출용매 200 mL을 첨가하여 50℃에서 1500 psi 압력으로 20분 동안 추출하였고, 초음파 분쇄 추출시에는 분쇄시료 100g당 1L의 95% 에탄올을 첨가하여 50℃에서 2-3주간 추출하였다. 추출된 시료는 Biotron corporation, Modul spin 40을 이용하여 45℃에서 감압 농축하였다.

<85> **실시예 2: 재배지 또는 채취지별 감초 추출물 성분의 분석**

<86> 상기 실시예 1에서 수득한 11종의 감초 에탄올 추출물에 대하여, 항산화활성 및 성분분석을 위해서, HPLC와 도 1에 기재된 on-line bioassay system(on-line dereplication, DPPH)을 이용한 분석을 각각 수행하였다.

<87> 상기 HPLC는 Phenomenex Luna 5 m C18(250×4.6mm)을 사용하고, Solvent A는 2% 아세트산(acetic acid)를 사용하였고, Solvent B는 아세토니트릴을 0 내지 5분 동안은 20%의 농도로, 5 내지 55분 동안은 20 내지 90%로 농도 구배를 주면서 사용하였으며, 검출파장(Detection wavelength)은 254 nm이었으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<88> 상기 도 1에 나타낸 바와 같이, on-line bioassay는 HPLC를 통하여 분리되어 나오는 물질에 또 다른 펌프(Pinnacle post addition pump)를 이용하여 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 주입하고, free radical로서 안정한 화합물인 DPPH가 HPLC를 통과하여 나오는 항산화물질과 반응하여 free radical을 가질때 띄고 있는 보라색 색깔(517nm 흡광)을 어느 정도 잃게 되는지 여부를 측정하고 이를 negative peak로 나타내어 각 성분 별 항산화 활성 즉, DPPH의 free radical이 소거되는 정도와 negative peak의 위치를 파악하여, 항산화물질의 존재와 항산화 활성을 측정할 수 있는 것이다.

<89> 상기 크로마토그래피에서 컬럼은 YMC J'Sphere ODS-H80(250×4.6mm, 4μm)을 사용하였고, 그 결과는 도 3에 나타내었다. 상기 도 3에 나타낸 각 추출물 내 포함된 화합물을 확인하기 위한 HPLC와 관련된 positive peak는 추출물내의 구성 화합물이 시간별로 컬럼에서 분리되어져 나오는 형태를 254 nm에서 흡광도를 분석한 결과로 나타낸 것이고, 항산화활성을 확인한 negative peak는 517 nm에서 흡광도가 낮아진 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

<90> 상기 도 2에 나타낸 바와 같이, 각 감초 추출물의 구성 성분은 retention time이 0에서 20분까지의 극성물질들의 구성은 유사한 형태로 나타났으나, retention time이 30분 이상인 비극성 물질군에 있어서는 각 감초 추출물마다 그 양상이 차이가 남을 확인하였으며, 재배지 또는 채취지의 차이에 따른 추출물의 활성 차이가 비극성 물질군에 의한 것으로 예측되었다.

<91> 또한, 상기 도 3에 나타낸 바와 같이, 6가지 감초 추출물 모두에서 항산화 물질이 검출되었으나, 각 감초의 종류에 따라 그 성분의 농도와 종류에 있어 차이가 나타나는 것으로 확인되었다. 상기 도 3에서 확인되는 바와 같이, 국산감초의 경우 다른 지역인 우즈베키스탄, 내몽고, 키르카르스탄 및 중국 신강에서 재배 또는 채취된 감초에 비하여 우수한 항산화 활성을 갖는 것으로 확인되었고, 이러한 항산화 활성은 HPLC에서 retention time이 30분 이상인 비극성 화합물이 갖는 것으로 확인되었다.

<92> 보다 구체적으로, 상기 도 3에 나타낸 바와 같이 항산화 활성이 나타나는 물질은 총 5개로 확인되었다. 국산감초와 내몽고에서 채취된 감초(자연산) 또는 재배된 감초에서 4가지 항산화 물질이 같이 나타났으나, 상기 국산감초와 종이 같은 우즈베키스탄 및 키르카르스탄의 감초의 경우 국산 감초와 구성물질 및 항산화 물질의 종류가 상이한 것으로 확인되었다. 즉, 항산화물질과 관련된 성분은 감초의 종(species)의 종류에 따라서 결정되기 보다는 감초가 성장한 곳 즉, 재배지나 채취지에 의해 결정되는 것으로 확인되었다.

<93> 한편, 상기 항산화활성을 나타내는 물질 중에서는 Retention time이 35.4분인 1번 물질(YJ-7)이 가장 우수한 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

<94> 상기 도 3에 나타난 결과와 관련하여, 항산화활성을 나타내는 화합물의 함량을 분석하여 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다. 상기 표 1은 항산화 활성과 관련된 도 3에 나타난 각 peak의 넓이를 측정한 값이며, 상기 표 2는 이를 기준으로 하여 추출물 100g 당 포함된 각 성분의 함량(mg)을 나타내었다.

표 1

Origins	Area of negative peak (activities of antioxidant)					
	Peak No. (Rt)	1(YJ-7) (35.4 min)	2 (36.3 min)	3 (42.0 min)	4(YJ-19) (46.3 min)	5(YJ-20) (48.1 min)
대한민국 (<i>G. glabra</i>)		846,476	97,889		466,338	182,491
우즈베키스탄 (<i>G. glabra</i>)		376,785		195,292		
신강 (<i>G. inflata</i>)		187,899				
키르기스스탄 (<i>G. glabra</i>)		53,951	71,566			
내몽고(자연산) (<i>G. uralensis</i>)		118,157	53,764		167,506	183,397
내몽고(재배) (<i>G. uralensis</i>)		367,004	194,317		208,577	148,652

<95>

표 2

	1(YJ-7)	2	3	4 (YJ-19)	5 (YJ-19)
대한민국 (<i>G. glabra</i>)	527.6	65.3		298.2	114.8
우즈베키스탄 (<i>G. glabra</i>)	289.5		125.9		
신강 (<i>G. inflata</i>)	137.2				
키르기스스탄 (<i>G. glabra</i>)	35.9	67.4			
내몽고(자연산) (<i>G. uralensis</i>)	77.8	35.6		120.1	115.3
내몽고(재배) (<i>G. uralensis</i>)	228.2	127.9		133.5	96.8

<96>

<97> 상기 표 1 및 표 2에 나타난 바와 같이, 국산 감초의 경우, 다른 감초에 비하여 항산화활성이 현저하게 우수한 것으로 확인되었고, 항산화활성이 가장 우수한 것으로 확인된 YJ-7의 함량이 국산 감초의 경우 다른 감초에 비하여 약 2.5 배 내지 18배이고, 국산 감초를 제외한 감초 중에서 가장 함량이 많은 내몽고에서 재배된 감초에 비하여 약 2.5배 함량을 나타내는 것으로 확인되었으며, 항산화활성이 우수한 것으로 확인된 YJ-19의 함량이 국산 감초의 경우 다른 감초에 비하여 약 2.5 배 내지 3배이고, 국산 감초를 제외한 감초 중에서 가장 함량이 많은 내몽고에서 재배된 감초에 비하여 약 2.5배 함량을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, YJ-20도 YJ-19와 동일한 활성 경향을 보였고, 그 함량에서도 유사한 것으로 확인되었다.

<98> 따라서, 상기한 결과로부터 국산 감초의 경우 우리나라를 제외한 다른 지역에서 재배 또는 채취된 감초에 비하여 항산화활성이 매우 우수한 것으로 확인되었다.

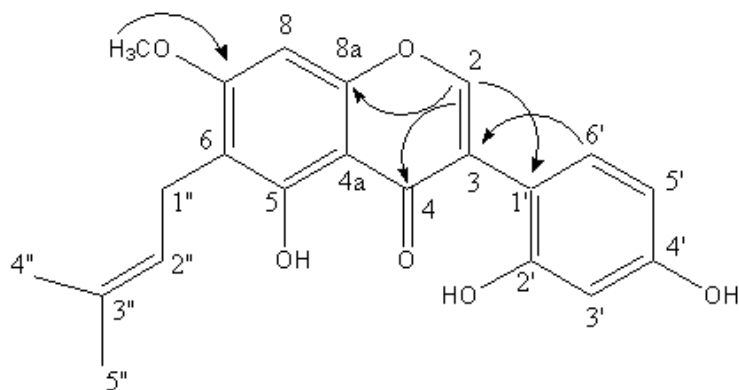
<99> 실시예 3: 추출용매에 따른 감초 추출물 성분의 분석

<100> 상기 실시예 2에서 항산화능이 가장 우수한 것으로 확인된 국산 감초 추출물의 추출용매에 따른 항산화활성을 측정하기 위하여, 상기 실시예 1에서 제조한 물, 에탄올, 메틸렌 클로라이드 및 에탄올:노르말헥산(9:1,

부피비)을 이용하여 추출한 감초 추출물에 대하여, HPLC 분석을 상기 실시예 2의 조건으로 수행하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

- <101> 상기 도 4에 나타낸 바와 같이, 추출용매를 물, 에탄올, 메틸렌 클로라이드 및 에탄올:노르말헥산(9:1, 부피비)은 용매의 극성에 따라 추출되어지는 물질의 형태가 다르게 나타난 것으로 확인되었다.
- <102> 구체적으로, 물 추출물은 다른 용매에 비하여 비극성물질은 거의 추출되지 않고, 극성물질 (R_t , 30min 이하)만 추출되었고, 에탄올 추출물은 극성물질과 비극성물질 모두 추출되었다. 한편, 비극성용매인 메틸렌 클로라이드와 에탄올:노르말헥산(9:1, 부피비)는 거의 유사한 형태의 물질이 추출되는 것으로 확인되었다.
- <103> 또한, 상기 비극성용매인 메틸렌 클로라이드와 에탄올:노르말헥산(9:1, 부피비)의 추출물이 항산화 활성이 가장 우수한 것으로 확인되어 추출물을 제조하기 위한 바람직한 용매는 메틸렌 클로라이드 및 에탄올과 노르말헥산의 혼합용매로 확인되었으며, 이후 항산화활성을 가진 물질에 대한 연구는 국산 감초 추출물의 비극성물질에 대하여 수행되어야 하는 것으로 결정되었다.
- <104> **실시예 4: 국산 감초 추출물로부터 7-O-methylfluteone, Dehydroglyasperin C 및 Dehydroglyasperin D의 생산조건 확립**
- <105> 4-1. 국산 감초 추출물의 주요 성분 확인
- <106> 상기 실시예 3에서 항산화활성이 가장 우수한 것으로 확인된 에탄올:노르말헥산(9:1, 부피비)의 추출물에 포함된 물질을 상기 실시예 2의 조건, 구체적으로는 컬럼으로 Phenomenex Luna 5 m C18(250×4.6mm)을 사용하고, Solvent A는 2% 아세트산(acetic acid)를 사용하며, Solvent B는 아세토니트릴을 0 내지 5분 동안은 20%의 농도로, 5 내지 55분 동안은 20 내지 90%로 농도구배를 주면서 사용하고, 검출파장(Detection wavelength)은 254 nm로 결정하여, HPLC를 수행하였고, 상기 수행한 결과를 도 5a에 나타내었다.
- <107> 상기 도 5a에서 확인된 화합물에 번호를 추가하였고, 상기 항산화활성이 우수하고, 국산 감초 추출물에 다량 포함되어 있는 것으로 확인된 YJ-7(도 5a의 7번) 및 YJ-19(도 5a의 19번)와 YJ-20(도 5a의 20번)을 화합물별로 수득하기 위하여, 20% 내지 100%의 메탄올 수용액으로 농도구배를 주면서 MPLC(middle pressure liquid chromatography)를 수행하였고, 그 결과를 도 5 b에 나타내었다.
- <108> 상기 도 5b에 나타낸 바와 같이, MPLC의 용매의 농도구배를 이용하여 상기 도 5a의 화합물에 대해 각각 구분하여 수득할 수 있음을 확인하였다.
- <109> 항산화활성이 우수한 것으로 확인된 YJ-7 및 YJ-19와 YJ-20의 구조를 결정하기 위하여, 각 화합물에 1H -, ^{13}C -NMR, 1H - 1H COSY, DEPT, HMQC 및 HMBC spectroscopic를 수행하여 하기와 같은 결과를 확인하였고, 이를 근거로 구조를 결정하였다.
- <110> 각각의 결과는 하기와 같다.
- <111> YJ-7의 경우 하기 결과에 의하여 하기 화학식 1을 가진 7-O-methylfluteone로 결정되었다.
- <112> 2',4',5-Trihydroxy-7-methoxy-6-prenylisoflavone, Molecular formula : $C_{21}H_{20}O_6$, EI-MS 368, 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ : 1.62 (3H, s, H-5"), 1.73 (3H, s, H-4"), 3.26 (2H, d, $J=6.87$ Hz, H-1"), 3.90 (3H, s, 7-OCH₃), 5.14 (1H, t-like, H-2"), 6.30 (1H, dd, $J=8.24, 2.3$, H-5'), 6.40 (1H, s, $J=2.3$, H-3'), 6.69 (1H, s, H-8), 7.00 (1H, d, $J=8.22$, H-6'), 8.24 (1H, s, H-2), 9.33 (1H, s, 2'-OH), 9.41 (1H, s, 4'-OH), ^{13}C -NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ : 18.06 (C-4"), 21.44 (C-1"), 25.90 (C-5"), 56.75 (-OCH₃), 90.51 (C-8), 103.15 (C-3'), 105.77 (C-4a), 106.72 (C-5'), 109.09 (C-1'), 112.04 (C-6), 121.17 (C-3), 122.40 (C-2"), 131.40 (C-3"), 132.62 (C-6'), 155.89 (C-2), 156.36 (C-8a), 156.86 (C-2'), 158.18 (C-5), 159.09 (C-4'), 163.19 (C-7), 181.08 (C-4)

화학식 1

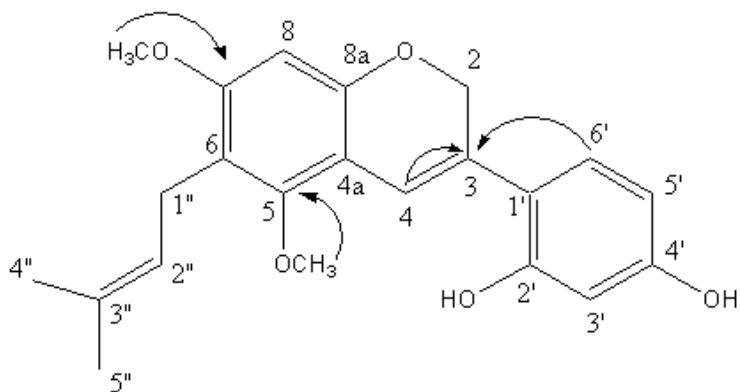


<113>

<114> YJ-19의 경우 하기 결과에 의하여 하기 화학식 2을 가진 Dehydroglyasperin C로 결정되었다.

<115> Molecular formula : $C_{21}H_{22}O_5$, EI-MS 354, 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ : 1.62 (3H, s, H-5''), 1.7 (3H, s, H-4''), 3.14 (2H, d, $J=6.54$, H-1''), 3.67 (3H, s, 5-OCH₃), 4.83 (2H, s, 2-CH₂), 5.13 (1H, t-like, H-2''), 6.14 (1H, s, H-8), 6.25 (1H, dd, $J=8.3$, 2.4, H-5'), 6.32 (1H, s, $J=2.4$, H-3'), 6.64 (1H, s, H-4), 7.04 (1H, d, $J=8.3$, H-6'), 9.39 (1H, s, 4-OH), 9.54 (1H, s, 7-OH), 9.60 (1H, s, 2'-OH), ^{13}C -NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ : 18.12 (C-4''), 22.61 (C-1''), 25.94 (C-5''), 62.10 (C-5-OCH₃), 67.73 (C-2CH₂), 98.89 (C-8), 103.18 (C-3'), 107.30 (C-5'), 109.21 (C-4a), 114.36 (C-6), 115.06 (C-4), 117.02 (C-1'), 124.37 (C-2''), 127.97 (C-3), 129.12 (C-6'), 129.95 (C-3''), 152.74 (C-8a), 155.38 (C-5), 156.24 (C-7), 156.57 (C-2'), 158.46 (C-4')

화학식 2

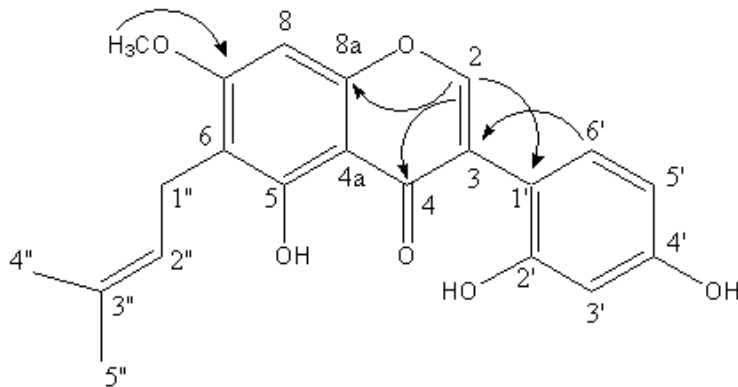


<116>

<117> YJ-20의 경우 하기 결과에 의하여 하기 화학식 2을 가진 Dehydroglyasperin D로 결정되었다.

<118> Molecular formula : $C_{22}H_{24}O_5$, EI-MS 368, 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ : 1.68 (3H, s, H-5''), 1.76 (3H, s, H-4''), 3.23 (2H, d, $J=6.85$, H-1''), 3.73 (3H, s, 5-OCH₃), 3.8 (3H, s, 7-OCH₃), 4.95 (1H, s, 2-CH₂), 5.14 (1H, t-like, H-2''), 6.31 (1H, dd, $J=8.37$, 2.4, H-5'), 6.38 (1H, s, H-8), 6.4 (1H, s, $J=2.4$, H-3'), 6.74 (1H, s, H-4), 7.12 (1H, d, $J=8.37$, H-6'), 9.47 (1H, s, H-4'-OH), 9.69 (1H, s, H-2'-OH), ^{13}C -NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ : 18.08 (C-4''), 22.53 (C-1''), 25.94 (C-5''), 56.19 (C-7-OCH₃), 62.22 (C-5-OCH₃), 67.80 (C-2CH₂), 95.75 (C-8), 103.25 (C-3'), 107.36 (C-5'), 114.67 (C-4), 115.53 (C-6), 116.71 (C-1'), 124.00 (C-2''), 128.71 (C-3), 129.20 (C-6'), 130.40 (C-3''), 153.16 (C-8a), 154.88 (C-5), 156.53 (C-2'), 157.99 (C-7), 158.45 (C-4')

화학식 3



<119>

<120> 상기 Dehydroglyasperin C로 확인된 물질인 YJ-19와 Dehydroglyasperin D로 확인된 YJ-20은 항산화능이 우수한 것으로 보고된 물질이었으나, 7-O-methylginsenoside로 확인된 YJ-7의 항산화능은 본 실험에서 최초로 확인되었다.

<121> 4-2. 7-O-methylginsenoside, Dehydroglyasperin C 및 Dehydroglyasperin D의 대량 생산 조건 확립

<122> 상기 7-O-메틸루테온의 MPLC 결과, 상기 7-O-methylginsenoside의 순도와 수율을 높이기 위하여 추가적인 크로마토그래피의 수행이 필요함을 확인하였다.

<123> 상기 추가적인 크로마토그래피에 적합한 방법으로 감압액체크로마토그래피 (VLC)를 결정하였으며, 이의 용매로 노르말헥산과 에틸아세테이트의 혼합물을 이용하는 것으로 결정되었다.

<124> 상기 노르말헥산과 에틸아세테이트의 최적 혼합비율을 확인하기 위하여, 상기 혼합비율을 변화하면서, 감압액체크로마토그래피를 실시하였으며, 크로마토그래피의 수행 결과물과 7-O-메틸루테온을 박막크로마토그래피(TLC)로 비교하였다.

<125> 상기 비교 결과를 도 6 a에 나타내었으며, 노르말 헥산과 에틸아세테이트를 (65:35, 부피비)로 혼합한 용매에서 7-O-메틸루테온과 거의 유사한 밴드가 확인되어 가장 적합한 것으로 결정되었다. 또한, 상기 박막크로마토그래피를 수행한 결과물에 대해 MPLC의 최적조건을 수행한 결과, 상기 MPLC의 용매를 메탄올 수용액의 농도를 45%에서 60%로 농도구배를 주면서 이용하는 것이 가장 우수한 수율 및 순도를 얻는 것으로 확인되었다.

<126> 이러한 실험을 근거로, 7-O-메틸루테온은 국산 감초 추출물을 노르말 헥산과 에틸아세테이트를 (65:35, 부피비)로 혼합한 용매를 이용하여 감압액체크로마토그래피를 수행하여 분획물을 제조하고, 상기 분획물을 메탄올 수용액의 농도를 45%에서 60%로 농도구배를 주면서 MPLC를 수행하는 방법으로 정제하였다.

<127> 한편, 디하이드로글리아스페린 C는 국산 감초 추출물에 대해 MPLC의 최적조건을 수행한 결과, 상기 MPLC의 용매를 메탄올 수용액의 농도를 70%에서 100%로 농도구배를 주면서 이용하는 것이 가장 우수한 수율 및 순도를 얻는 것으로 확인되었다. 상기 메탄올 수용액의 농도를 70%에서 100%로 농도구배를 주면서 수행한 MPLC의 결과를 도 6b에 나타내었고, 상기 도 6b에 나타낸 바와 같이, 동일한 화합물을 수득할 수 있는 구간이 디하이드로글리아스페린 C에 해당하는 YJ-19 및 디하이드로글리아스페린 D에 해당하는 YJ-20의 경우, 넓은 구간으로 확인되어 상기 70%에서 100%로 농도구배 조건이 가장 바람직한 조건으로 확인되었다.

<128> 상기 조건으로 정제를 수행한 결과, 약 98%의 순도로 화합물들을 정제할 수 있었으며, 상기 7-O-메틸루테온을 정제하는 방법의 경우, 7-O-메틸루테온의 수율은 0.3%로 확인되었고, 상기 디하이드로글리아스페린 C를 정제하는 방법의 경우, 디하이드로글리아스페린 C의 수율은 약 0.15%로 확인되었으며, 상기 디하이드로글리아스페린 C의 정제방법과 동일한 방법으로 정제한 경우, 디하이드로글리아스페린 D의 수율은 약 0.05%로 확인되었다.

<129> 실시예 5: 국산 감초 추출물을 포함하는 건강기능식품의 제조

<130> 감초 추출물을 포함하는 건강식품은 하기 표 3의 원료를 혼합하여 제조할 수 있다.

표 3

<131>

성분	함량
감초 추출물 분말	1000 mg
비타민 혼합물	적량
비타민 A 아세테이트	70 μ g
비타민 E	1.0 mg
비타민 B1	0.13 mg
비타민 B2	0.15 mg
비타민 B6	0.5 mg
비타민 B12	0.2 μ g
비타민 C	10 mg
비오틴	10 μ g
니코틴산아미드	1.7 mg
엽산	50 μ g
판토텐산 칼슘	0.5 mg
무기질 혼합물	적량
황산제1철	1.75 mg
산화아연	0.82 mg
탄산마그네슘	25.3 mg
제1인산칼륨	15 mg
제2인산칼슘	55 mg
구연산칼륨	90 mg
탄산칼슘	100 mg
염화마그네슘	24.8 mg

<132>

상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<133>

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, On-line bioassay를 수행하는 과정을 나타내는 모식도이다.

<134>

도 2은 본 발명의 일 실시예에 따른, 기원별 감초 에탄올 추출물의 HPLC 결과를 나타내는 도표이다.

<135>

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 기원별 감초 에탄올 추출물의 HPLC 결과와 DPPH를 이용한 항산화능을 가진 성분을 확인한 On-line DPPH-HPLC bioassay를 수행결과를 나타낸 도표이다.

<136>

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 추출용매에 따른 감초 추출물의 HPLC 결과를 나타내는 도표이다.

<137>

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 한국산 감초 추출물의 HPLC 결과를 나타내는 도표이다.

<138>

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 독립된 분획별 한국산 감초 추출물의 HPLC 결과를 나타내는 도표이다.

<139>

도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따른, YJ-7의 분획 조건을 확인하기 위한 감압액체크로마토그래피 용매 별 박막 크로마토그래피(TLC) 결과를 나타내는 도표이다.

<140>

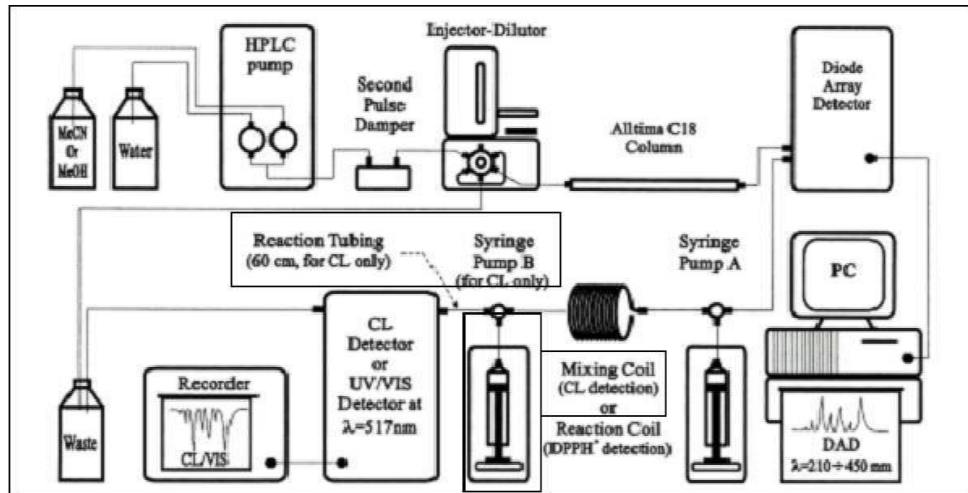
도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른, YJ-19 및 YJ-20에 대한 MPLC 결과를 나타내는 도표이다.

<141>

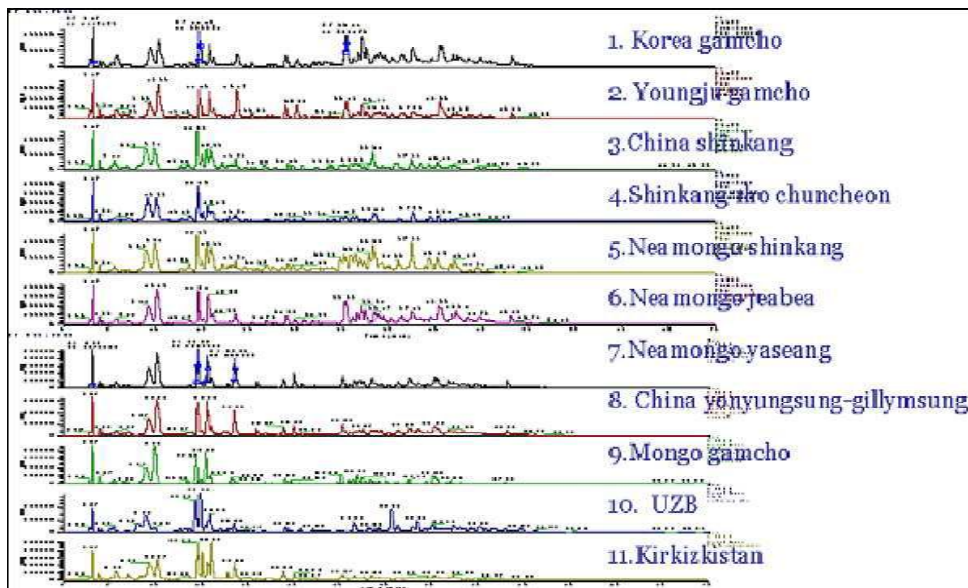
도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 디하이드로글리아스페린 C의 화학구조를 나타낸 도면이다.

도면

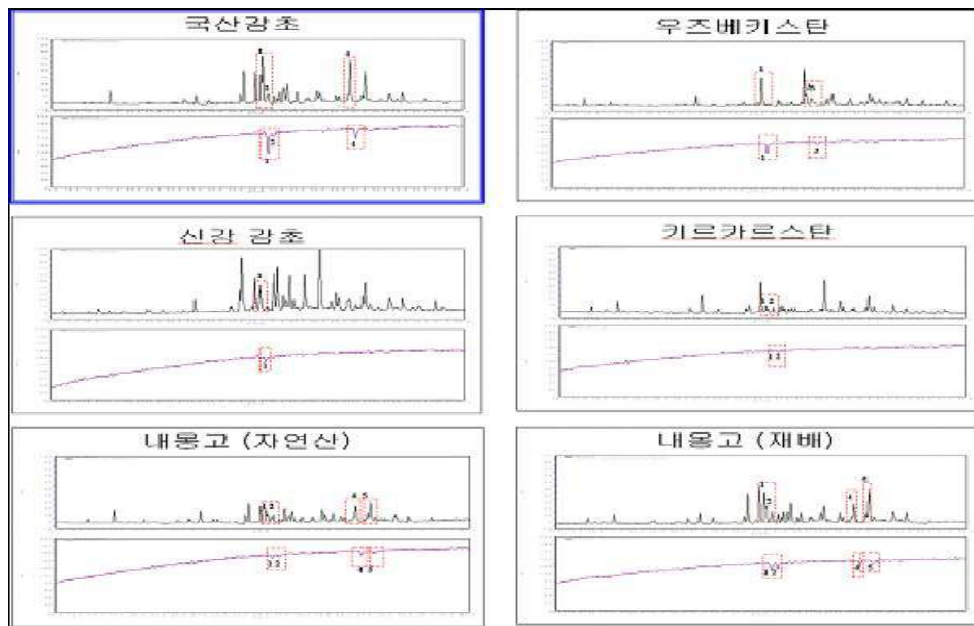
도면1



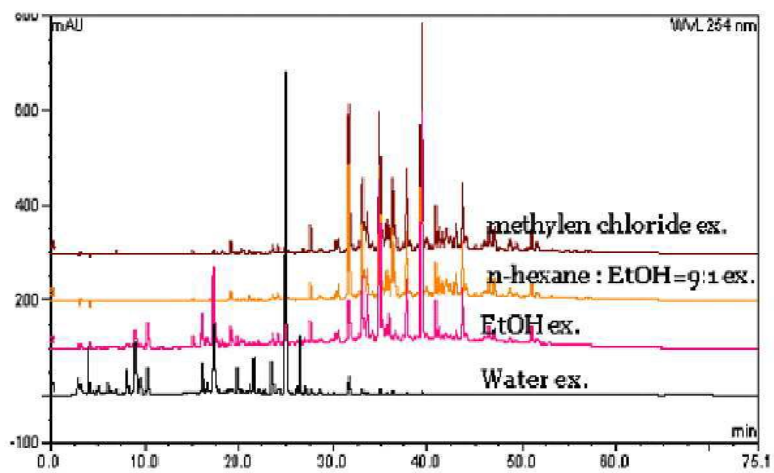
도면2



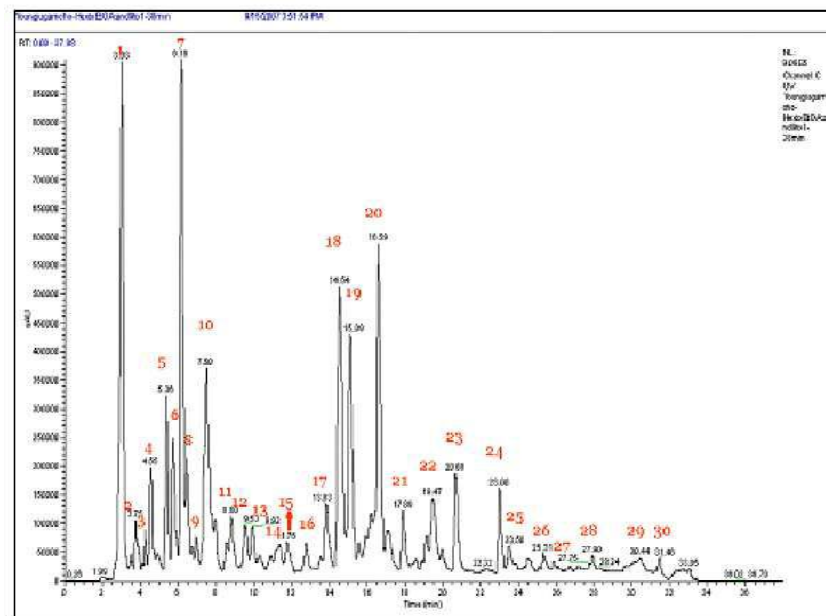
도면3



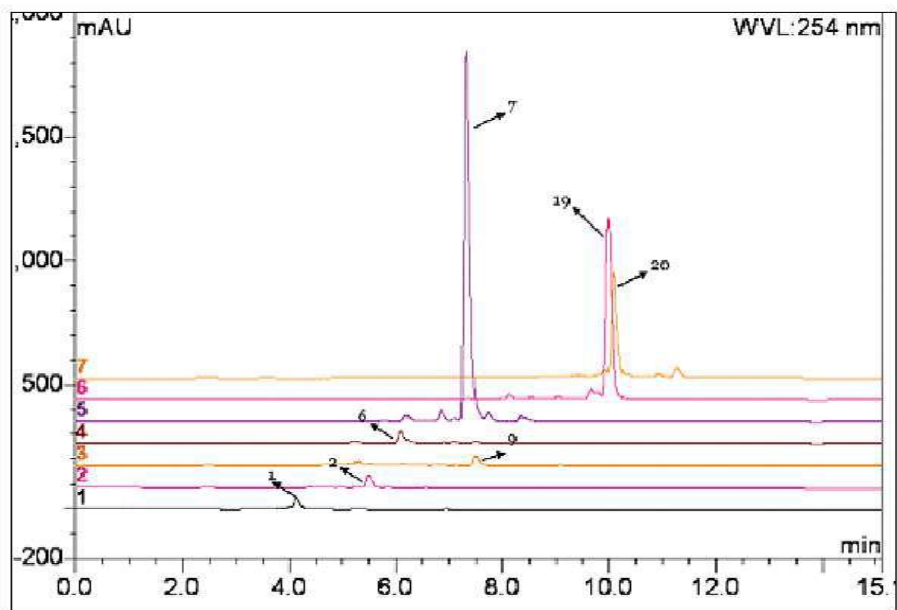
도면4



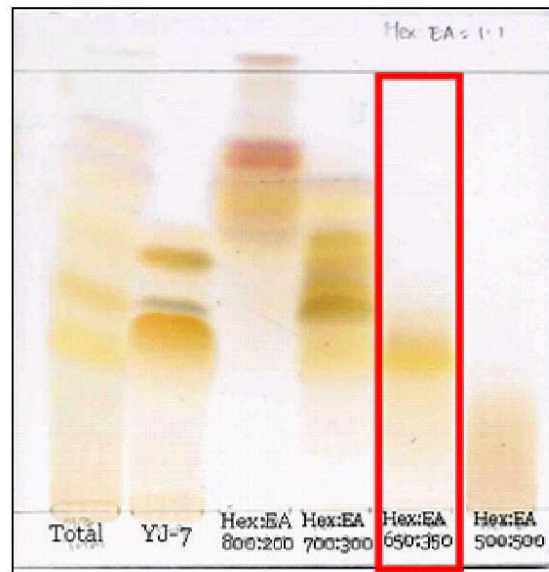
도면5a



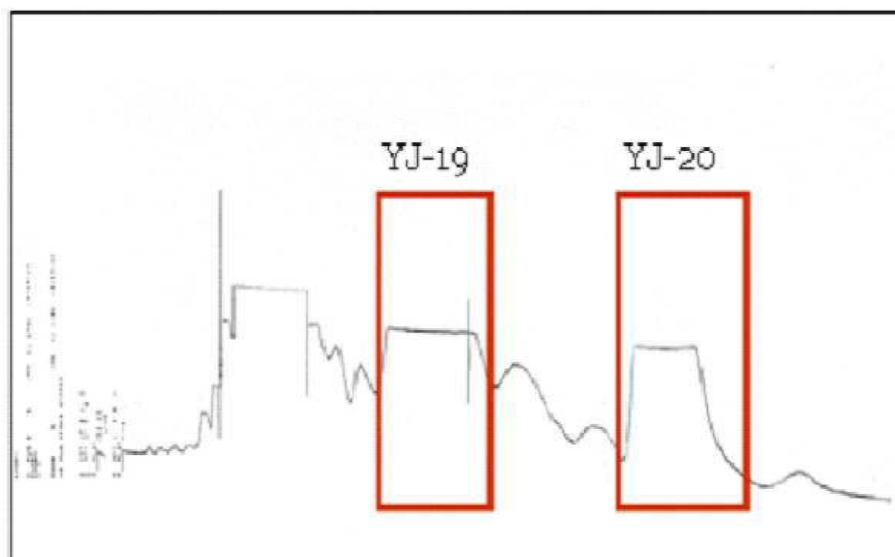
도면5b



도면6a



도면6b



도면7

