



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0069726
(43) 공개일자 2018년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07J 17/00 (2006.01) A23L 19/10 (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
C07J 17/005 (2013.01)
A23L 19/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0172040
(22) 출원일자 2017년12월14일
심사청구일자 2017년12월14일
(30) 우선권주장
1020160171985 2016년12월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이광원
서울특별시 송파구 송파대로 111, 파크하비오104동 401호(문정동, 파크하비오)
이영석
울산광역시 북구 동대11길 36, 202동 102호(호계동, 호계2단지주공아파트)
전수현
경기도 광주시 오포읍 수레안길41번길 48-2
(74) 대리인
김순웅

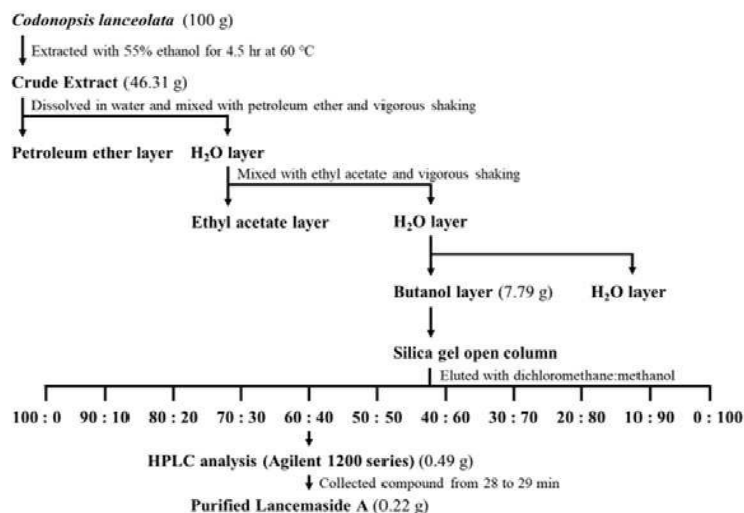
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 더덕에서 유래한 란세마사이드 A의 추출 방법

(57) 요약

본 발명은 더덕 분말을 가열 환류 조건에서 알코올로 추출하는 단계, 상기 단계에서 얻은 알코올 추출액으로부터 알코올을 제거하고 동결 건조시켜 고형 추출물을 얻는 단계, 상기 단계에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 유기 용매로 추출하여 유기 층을 제거하는 단계, 상기 단계에서 남은 수층을 알코올로 추출하여 알코올 추출액을 수득하는 단계, 및 상기 단계에서 얻은 추출액을 디클로로메탄과 메탄올로 추출하는 단계를 포함하는 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법에 관한 것이다. 상기 추출 방법은 단 시간 내에 효율적으로 란세마사이드 A를 추출 및 정제할 수 있어, 본 발명의 추출 방법은 란세마사이드 A를 이용하는 식품 산업 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2250/21 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

A23V 2300/18 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1405003150

부처명 산림청

연구관리전문기관 한국임업진흥원

연구사업명 융복합기반임산업의신산업화기술개발

연구과제명 더덕추출물의 지표성분 분석을 통한 제품의 표준화 확립

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2016.03.30 ~ 2019.03.29

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 더덕 분말을 가열 환류 조건에서 알코올로 추출하는 단계;
 - (2) 상기 단계 (1)에서 얻은 알코올 추출액으로부터 알코올을 제거하고 동결 건조시켜 고형 추출물을 얻는 단계;
 - (3) 상기 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 유기 용매로 추출하여 유기 층을 제거하는 단계;
 - (4) 상기 단계 (3)에서 남은 수층을 알코올로 추출하여 알코올 추출액을 수득하는 단계; 및
 - (5) 상기 단계 (4)에서 얻은 알코올 추출액을 디클로로메탄과 메탄올로 용출시켜 란세마사이드 A 함유 분획을 수득하는 단계;
- 를 포함하는 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (1) 단계는 알코올의 끓는점에서 4시간 내지 5시간 동안 추출하는 것인, 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

- (3) 단계는 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 제1 유기용매 및 제2 유기용매의 순서로 추출하여 유기 층을 제거하는 것인, 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

- 상기 제1 유기용매는 석유 에테르, 이소옥탄, 시클로펜탄, 헥산 및 헵탄으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

- 상기 제2 유기용매는 에틸아세테이트, 메틸프로필케톤 및 메틸에틸케톤으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

- (3) 단계는 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 유기 용매로 2회 이상 추출하여 유기 층을 제거하는 것인, 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

- (5) 단계는 단계 (4)에서 얻은 알코올 추출액을 디클로로메탄과 메탄올을 100:0 내지 0:100의 농도 구배로 용출시키고, 디클로로메탄과 메탄올이 80:20 내지 40:60의 농도 구배를 갖는 범위의 용출액으로부터 란세마사이드 A

함유 분획을 수득하는 것인, 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 더덕에서 유래한 란세마사이드 A의 추출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 국민의 소득 수준 향상 및 평균 수명이 연장되면서 웰빙(well-being)에 대한 인식 증가로 건강관리의 수요가 증대되고 있다. 이로 인해 건강기능식품에 대한 관심이 증대되고 있고, 세계 건강식품 시장에서 천연식품에 대한 수요가 증가하는 추세를 보이며, 유용한 활성이 있는 물질들을 식물에서 탐색하기 위한 노력들이 경주되고 있다.

[0003] 더덕 (*Condonopsis lanceolata*)은 숲에서 자라는 다년생 식물로서, 백삼이라고도 부르며, 뿌리를 말린 것은 사삼이라고도 부른다. 뿌리는 도라지처럼 굵고 식물체를 자르면 흰색의 즙액이 나온다. 잎은 어긋나고 짧은 가지 끝에서는 긴 타원형인 4개의 잎이 서로 접근하여 마주난다. 잎 가장자리는 밋밋하고 앞면은 녹색, 뒷면은 흰색이다. 8~9월에 종 모양의 자주색 꽃이 달린다. 꽃받침은 끝이 뿔죽하게 5개로 갈라지며 녹색이고, 열매는 9월에 익는다. 봄에 어린 잎을, 가을에 뿌리를 식용한다. 더덕은 찜, 구이 및 김치 등 다양한 요리의 주재료로 활용되어 이에 대한 인지도는 높으나 더덕에 대한 대표적인 효능에 대해서는 크게 알려져 있지 않다. 동의보감에서도 더덕을 사삼으로 칭하고, 한방에서는 사삼이 치열, 거담 및 폐열에 효과가 있다고 하여 더덕에 포함된 유효 물질을 추출 및 정제하여 추가적인 연구가 필요한 실정이다.

[0004] 종래, 각종 식물이 고유하게 지닌 유효성분과, 그와 같은 유효성분의 작용, 효과를 밝히기 위해 식물로부터 원하는 유효성분을 추출 및 정제하기 위해 많은 방법들이 연구, 제안되었다. 예를 들어, 대한민국 특허 공개공보 특2001-0016877호에서는 홍화씨에 함유된 천연 항산화물질인 N-페룰로일세로토닌의 분리 정제 방법홍화씨에 함유되어 있는 천연 항산화물질인 N-페룰로일세로토닌을 분리 추출하기 위해 홍화씨를 분쇄하여 메탄올 용액으로 항산화물질을 추출하는 단계와, 상기 추출물을 에틸아세테이트, 노르말 부탄올 및 물로 순차분획하는 단계와, 상기 분획물 중 용매를 제거한 에틸아세테이트 분획물을 유기용매에 용해시킨 후 칼럼 크로마토그래피를 통과시켜 일정량씩 분취하는 단계와, 상기 분취된 각 분획물을 박층 크로마토그래피(TLC)를 통과시켜 전개된 물질의 높이가 같은 분획물끼리 합하여 유사물질끼리 분취하는 단계와, 상기 분취된 각 유사물질들의 DPPH 라디칼 활성을 측정하여 항산화물질을 추적 분리하는 단계를 포함하는 방법을 제안하였다. 또한, 대한민국 특허 공개공보 특1999-007635호에서는 황연 뿌리로부터 베르베린을 추출 정제하는 방법으로, 황연 뿌리를 열수추출하여 얻은 활성성분이 함유된 추출물을 다이아이온(Diaion) HP-20 컬럼크로마토그래피를 행하여 활성성분을 모으고, 활성성분을 셀룰로스 칼럼크로마토그래피를 행하여 활성성분을 모은 후, 활성성분을 세파덱스(Sephadex) G-10컬럼크로마토그래피를 행하되 염화나트륨 용액으로 용출하여 활성성분을 모은 다음, 동결건조하여 분말상태의 베르베린을 얻고 메틸알코올을 가하여 용해시킨 후 4℃ 정도의 냉실에 방치하여 결정화시키는 것을 포함하는 방법을 제안하였다.

[0005] 그러나, 상기와 같은 종래의 추출 정제방법들은 많은 분획 단계와 칼럼 정제를 거치고 있어, 과정이 복잡적이고, 어려울 뿐만 아니라, 많은 시간이 소요된다는 문제점이 있었다. 많은 분획 단계와 칼럼 정제를 거치는 것은 곧 많은 비용이 소요된다는 것을 의미한다. 결정적으로 상기 추출 정제방법들은 더덕에서 란세마사이드 A를 추출하는 데에는 사용할 수 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 칼럼의 용량 및 추출 시간을 절약할 수 있고, 유기 용매를 적게 사용하는, 더덕으로부터 란세마사이드 A를 효율적으로 추출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 과제를 달성하기 위해, 본 발명은 더덕 분말을 가열 환류 조건에서 알코올로 추출하는 단계, 상기 단계에서 얻은 알코올 추출액으로부터 알코올을 제거하고 동결 건조시켜 고형 추출물을 얻는 단계, 상기 단계에

서 얻은 고형 추출물의 수용액을 유기 용매로 추출하여 유기 층을 제거하는 단계, 상기 단계에서 남은 수층을 알코올로 추출하여 알코올 추출액을 수득하는 단계, 및 상기 단계에서 얻은 추출액을 디클로로메탄과 메탄올로 용출시켜 란세마사이드 A 함유 분획을 수득하는 단계를 포함하는, 더덕으로부터 란세마사이드 A를 효율적으로 추출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 란세마사이드 A의 추출 방법은 단시간 내에 효율적으로 란세마사이드 A를 추출할 수 있고, 작은 용량의 컬럼에서도 수행할 수 있어서 식품 산업 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

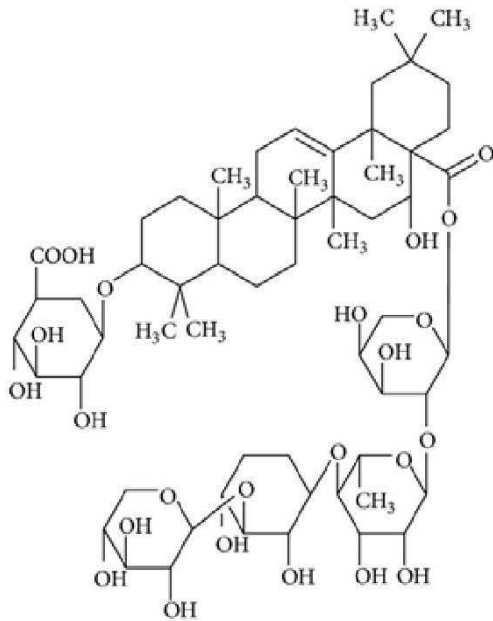
[0009] 도 1은 본 발명에 따라 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출 및 정제하는 과정을 보여주는 개념도이다.
 도 2는 HPLC 및 분획 분취기 (Fraction collector)를 이용하여 28~29분에서 분획한 분획물에 대한 박층 크로마토그래피를 통해 란세마사이드 A의 존재를 확인한 결과이다.
 도 3은 부탄올 층에 대한 박층 크로마토그래피를 통하여 란세마사이드 A의 존재를 확인한 결과이다.
 도 4는 실리카겔 오픈 컬럼에서 디클로로메탄과 메탄올의 농도 구배에 따른 분획물 중 5번째 분획물에 대한 박층 크로마토그래피를 통해 란세마사이드 A의 존재를 확인한 결과이다.
 도 5는 LC-MS를 이용하여 란세마사이드 A를 확인한 결과이다.
 도 6는 LC-MSMS를 이용하여 란세마사이드 A를 확인한 결과이다.
 도 7는 ¹³C-NMR를 이용하여 란세마사이드 A를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 (1) 더덕 분말 을 가열 환류 조건에서 알코올로 추출하는 단계, (2) 상기 단계 (1)에서 얻은 알코올 추출액으로부터 알코올을 제거하고 동결 건조시켜 고형 추출물을 얻는 단계, (3) 상기 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 유기 용매로 추출하여 유기 층을 제거하는 단계, (4) 상기 단계 (3)에서 남은 수층을 알코올로 추출하여 알코올 추출액을 수득하는 단계, 및 (5) 상기 단계 (4)에서 얻은 알코올 추출액을 디클로로메탄과 메탄올로 용출시켜 란세마사이드 A 함유 분획을 수득하는 단계를 포함하는 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명에 있어서, 란세마사이드 A는 더덕에 포함된 유효 성분으로서, 대표적인 트리테르페노이드 (triterpenoid)계의 사포닌의 종류 중 하나이고, 면역력 증진 효능, 항노화, 항비만 및 항암 등 다양한 생리활성이 존재한다. 란세마사이드 A의 구조는 다음과 같다.

[0012] [화학식]



[0013]

[0015] (1) 더덕 분말을 가열 환류 조건에서 알코올로 추출하는 단계

[0016] 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법은 더덕 분말을 가열 환류 조건에서 알코올로 추출하는 단계를 포함한다. 여기서 더덕 분말은 더덕을 건조 또는 동결 건조시켜 얻은 것일 수 있고, 동결 건조된 더덕을 분쇄하여 얻은 것일 수 있다. 더덕 분말을 유기 용매에 용해시켜 얻은 더덕 분말 용액을 가열 환류 조건에서 알코올로 추출하는 것일 수 있다. 여기서, 알코올은 에탄올 또는 메탄올일 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 (1) 단계는 알코올의 끓는점에서 4시간 내지 5시간 동안 추출하는 것일 수 있다. 가열 환류 조건에서 추출하기 위해 (1) 단계에서 사용하는 알코올의 끓는점 이상의 온도에서 추출하는 것일 수 있다. 가열 환류 조건에서 4시간 보다 짧게 추출하거나, 5시간 보다 오래 추출하면 란세마사이드 A의 수율이 현저하게 떨어지는 문제가 발생한다. 바람직하게는, 상기 (1) 단계는 알코올의 끓는점에서 4시간 30분 동안 추출하는 것일 수 있다.

[0018] (2) 단계 (1)에서 얻은 알코올 추출액으로부터 알코올을 제거하고 동결 건조시켜 고형 추출물을 얻는 단계

[0019] 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법은 상기 단계 (1)에서 얻은 알코올 추출액으로부터 알코올을 제거하고 동결 건조시켜 고형 추출물을 얻는 단계를 포함한다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 (1) 단계에 따른 알코올 추출액은 여과될 수 있다. 여과에는 여과지가 사용될 수 있으며, 감압 여과되는 것일 수 있다. 여기서, 추출물은 감압 농축되어 추출 용매인 알코올이 완전히 제거된 것일 수 있고, 용매가 제거된 추출물은 동결 건조되어 고형으로 수득될 수 있다.

[0021] (3) 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 유기 용매로 추출하여 유기 층을 제거하는 단계

[0022] 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법은 상기 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 유기 용매로 추출하여 유기 층을 제거하는 단계를 포함한다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 (3) 단계는 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 제1 유기용매 및 제2 유기용매의 순서로 추출하여 유기 층을 제거하는 것일 수 있다. 여기서, 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 제1 유기용매로 추출하고 유기 층을 제거한 뒤, 제2 유기용매로 추출하고 유기 층을 제거하는 것일 수 있다.

[0024] 여기서 제1 유기용매는 석유 에테르 (petroleum ether), 이소옥탄 (isooctane), 시클로헥탄, 헥산 및 헵탄으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 제1 유기용매는 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물 수용액에 포함된 비극성 물질을 제거하기 위해 사용되는 것이므로, 상기 예시한 것과 극성이 유사한 것이면 어떤 것을 사용해도 무방하다. 상기 제2 유기용매는 에틸아세테이트, 메틸프로필케톤 및 메틸에틸케톤으로

이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이들 용매는 상기 제1 유기 용매에 비해 상대적으로 약한 극성을 가지고 있어 추출물 수용액에 포함된 약한 극성 물질을 제거하기 위해 사용되는 것이므로, 이와 유사한 정도의 극성을 가지는 것이면 어떤 것을 사용해도 무방하다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 (3) 단계는 단계 (2)에서 얻은 고형 추출물의 수용액을 유기용매로 2회 이상 추출하여 유기 층을 제거하는 것일 수 있다. 이때 동일한 종류의 용매로 2회 이상 추출할 수도 있고, 제1 유기용매 및/또는 제2 유기용매로 2회 이상 추출할 수도 있다. 유기용매로 추출하고, 제거되는 유기 층이 투명해질 때까지 반복 추출하는 것일 수 있다.

[0026] (4) 단계 (3)에서 남은 수층을 알코올로 추출하여 알코올 추출액을 수득하는 단계

[0027] 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법은 상기 단계 (3)에서 남은 수층을 알코올로 추출하여 알코올 추출액을 수득하는 단계를 포함한다. 상기 알코올은 부탄올, 이소프로필알콜 또는 이와 동등한 정도로 비교적 강한 극성을 가지고 있는 다른 알코올일 수 있다. 이와 같이 극성이 강한 알코올을 이용하면 추출물 수용액 중에서 상대적으로 극성 물질에 해당하는 란세마사이드 A를 추출하는 것이 가능하다.

[0028] (5) 단계 (4)에서 얻은 알코올 추출액을 디클로로메탄과 메탄올로 용출시켜 란세마사이드 A 함유 분획을 수득하는 단계

[0029] 더덕으로부터 란세마사이드 A를 추출하는 방법은 상기 단계 (4)에서 얻은 알코올 추출액을 디클로로메탄과 메탄올로 용출시켜 란세마사이드 A 함유 분획을 수득하는 단계를 포함한다.

[0030] 본 발명에 있어서, (5) 단계는 단계 (4)에서 얻은 알코올 추출액을 디클로로메탄과 메탄올을 100:0 내지 0:100의 농도 구배로 용출시키고, 란세마사이드 A 함유 분획을 수득하는 것일 수 있다. 여기서, 디클로로메탄과 메탄올이 80:20 내지 40:60의 농도 구배를 갖는 범위의 용출액으로부터 란세마사이드 A 함유 분획을 수득하는 것일 수 있다. 바람직하게는 디클로로메탄과 메탄올을 60:40의 비율로 사용하여 용출시킨 용출액으로부터 란세마사이드 A를 수득하는 것일 수 있다.

[0032] 실시예 및 실험예

[0033] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0035] 실시예. 더덕의 유효성분인 란세마사이드 A의 추출

[0036] 더덕을 동결 건조시켜 얻은 분말 200g을 3L의 70% 주정 에탄올에 녹인 후, 4시간 동안 끓는점에서 추출하였다. 상기 추출물을 whatman filter paper grade. 2 여과지를 사용하여, 감압 여과하였다. 상기에서 수득한 여과물을 감압농축하여 추출 용매를 완전히 제거한 후, 동결건조하여 추출물 92.62g을 얻었다.

[0037] 상기 추출물을 100mL의 물에 녹인 후, 추출물의 수용액을 3L 분별 깔때기에 넣고 석유에테르 2L를 넣어 20분 동안 심하게 셰이킹하였다. 상기 분리 깔때기를 6시간 정치시켜 층 분리가 확실하게 일어나면 수층을 분리하고, 이 수층을 가지고 석유에테르 층의 색이 투명해질 때까지 다시 상기 과정을 반복하였다. 상기 수층에 에틸아세테이트 2L를 넣고 다시 상기 과정을 반복하여 수층을 얻었다.

[0038] 상기 수층을 3L 분별 깔때기에 넣고 부탄올 2L를 넣어 20분 동안 심하게 셰이킹하였다. 상기 분리 깔때기를 6시간 정치시켜 층 분리가 확실하게 일어나면 부탄올 층을 분리하였다. 수득한 부탄올 추출액을 감압 농축하여 추출 용매인 부탄올을 완전히 제거한 후, 동결건조하여 분획물 15.57g을 얻었다.

[0039] 상기 분획물을 실리카겔이 충전된 오픈 칼럼에 1g/mL 농도로 5mL 로딩하고, 디클로로메탄과 메탄올을 11개의 비율 (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)로 첨가하여 추출하고, 각 분획을 모았다. 상기 분획물을 TLC 분석을 통해 란세마사이드 A의 순도가 높은 분획을 수득하였다. 이 때 사용한 디클로로메탄과 메탄올의 비율은 80:20 내지 40:60였다.

[0041] HPLC 및 분획 분취기 분석

[0042] 실시예에서 얻은 분획물에 대하여 HPLC를 수행하였다. 디클로로메탄과 메탄올 비율이 60:40으로 추출한 분획물을 이용하여 HPLC를 진행하였다. 칼럼은 YMC triart C18을 사용하였고, 이동상은 ACN와 0.05 TFA를 사용하였다. 상기 이동상은 0% ACN in water를 100% ACN in water로 농도 구배를 주었으며, 1mL/min의 속도로 60분간 흘러주었다. 60분의 가동시간 동안 1분 간격으로 분획 분취기를 이용하여 분획하였다. 그 결과, 28~29번째 분획물에서 ransemaside A를 발견하였고, 이를 모아 감압 농축과 동결 건조를 통해 0.22%의 수율로 ransemaside A 0.44g을 얻었고, 이는 TLC 분석을 통해 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0044] 박층크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC) 분석

[0045] 실시예에서 추출한 더덕 유래의 ransemaside A는 UV에서 관찰이 어려우므로 TLC 분석으로 관찰하였다. 클로로포름:메탄올:물(65:35:10)을 분리 깔때기에 넣어 심하게 웨이킹한 후, 하루 간 정치시켜 분리된 층 중 아래층을 전개 용매로 사용하였다. TLC 분석은 고정상인 TLC 실리카겔 플레이트에 분획물 2 μ L를 점적한 후, 건조하기를 반복하여 총 10 μ L를 점적하였다. 점적한 TLC 플레이트를 상기 제조된 전개 용액에 이용하여 전개시켰다. 전개가 끝난 후, TLC 플레이트를 건조시키고, 10% 황산용액을 골고루 뿌려 Hot plate 상에 110°C에서 발색시켰다. 그 결과를 도 3 및 4에 나타내었다.

[0047] LC-MS 분석 & MSMS 분석

[0048] 실시예에서 얻은 ransemaside A를 LC-MS & MSMS 분석을 수행하였다. 칼럼은 ACQUITY BEH C18를 사용하였고, 이동상은 ACN와 0.1% Formic acid in water를 사용하였다. 상기 이동상은 초기 0.1% Formic acid in water와 ACN를 8:2에서 5분까지 ACN을 100%로 농도구배를 주어 7분까지 흘러주었다. 그 후, 7.1분에 0.1% 포름산 용액과 ACN를 8:2로 10분까지 흘러주며, 유속은 0.3mL/min으로 흘러주었다. LC-MS & MSMS는 ESI negative mode ($[M-H]^-$)로 측정하였다.

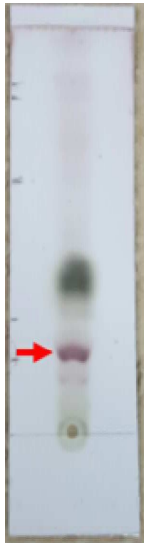
[0049] 그 결과, LC-MS의 m/z 값은 1189, LC-MSMS의 m/z 값은 647.5로 나타났고, 이는 유효성분인 ransemaside A의 m/z 값으로, ransemaside A가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0051] ^{13}C -NMR 분석

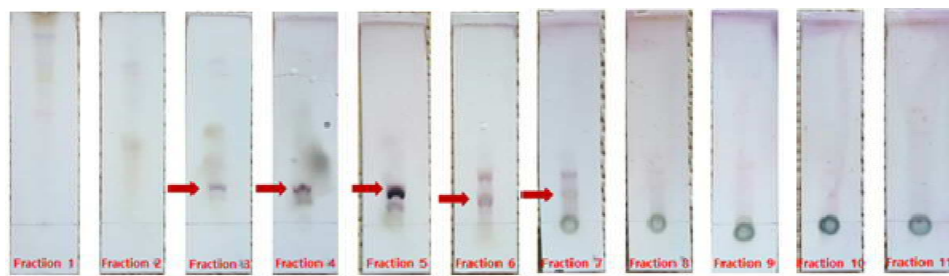
[0052] 실시예에서 얻은 ransemaside A에 대해 ^{13}C -NMR 분석을 수행하였다(Liquid-phase cryoporometry NMR system, 600 MHz). ransemaside A의 스펙트럴 패턴을 확인하기 위해, 내부 표준물질로 피리딘- d_5 을 사용하였다. 그 결과, δ 값 (ppm)은 39.3, 27.2, 89.6, 40.1, 56.6, 18.9, 34.0, 40.5, 47.6, 37.5, 24.3, 123.3, 144.9, 42.6, 36.7, 74.6, 50.0, 41.7, 47.6, 31.5, 36.5, 32.6, 28.7, 17.5, 16.2, 18.1, 27.7, 176.5, 33.8, 25.3으로 나타났다. 그 결과, ransemaside A의 chemical shift를 δ value (ppm)으로 나타내어 ransemaside A를 확인하였다 (도 7).

[0055] 이상과 같이 실시예를 통하여 본 발명을 설명하였다. 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 상술한 실시예들은 모든 면에 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해되어야 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

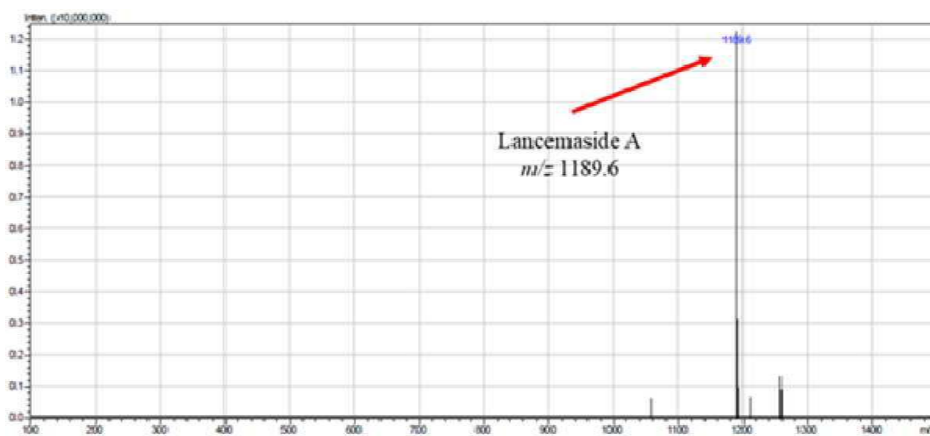
도면3



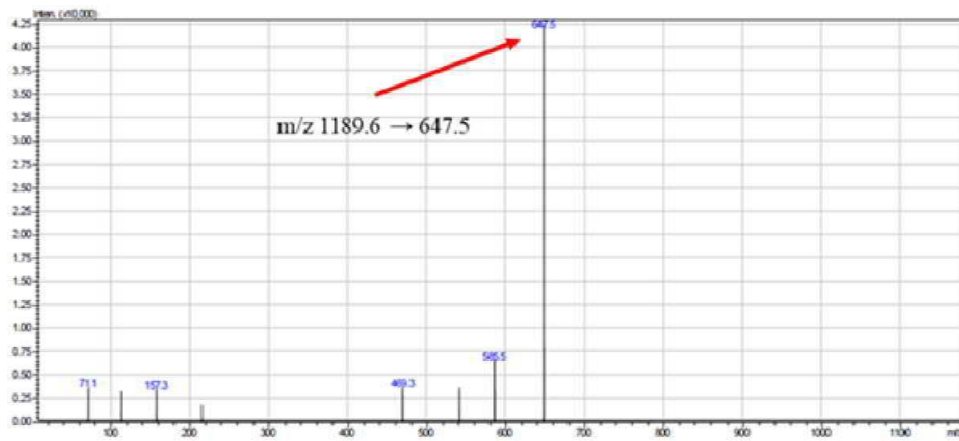
도면4



도면5



도면6



도면7

