

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0142152
(43) 공개일자 2015년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 311/72 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0070352
(22) 출원일자 2014년06월10일
심사청구일자 2014년06월10일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
백남인
경기도 화성시 동탄중앙로 51, 629동 901호(반송동, 동탄나루마을한화꿈에그린아파트)
서경화
경남 통영시 산양읍 이운길 48-13
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 대아

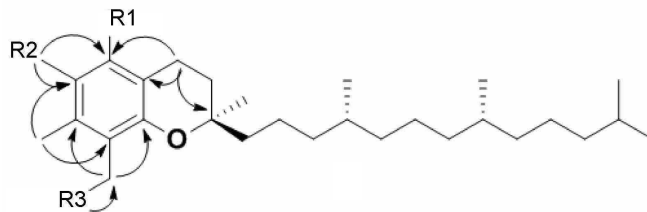
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 진피로부터 분리한 신규 토코페롤 유사체

(57) 요약

본 발명은 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염에 대한 것이다. 또한 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 및 그 허용가능한 염을 포함하는 식품 조성물, 화장품 조성물, 사료 조성물에 대한 것이다.

<화학식 1>



이 때,

R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

(72) 발명자

이대영

경기 수원시 영통구 봉영로 1620, 102동 705호 (영통동, 대우월드마크)

김대욱

경기 용인시 수지구 수지로113번길 16, 103동 203호 (성복동, 강남빌리지)

남태규

충북 청주시 상당구 상당로81번길 9-5

강희철

경기 수원시 영통구 영통로154번길 51-16, 303동 901호 (망포동, 센트럴하이츠아파트)

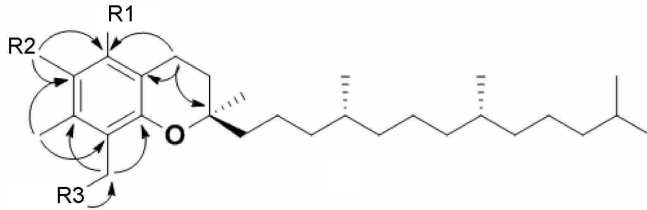
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염:

<화학식 1>



이 때,

R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 알킬은 탄소 수 5 이하의 알킬인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 알콕시는 탄소 수 5 이하의 알콕시인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 R1은 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 R1은 하이드록시인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 R2는 하이드록시 및 알킬로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 R3는 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 R3는 알콕시인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 화합물은 진피 유래인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 10

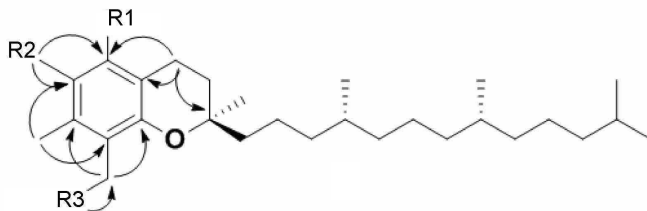
제 1항에 있어서,

ABTS 라디칼 소거능, DPPH 라디칼 소거능 및 활성산소 흡수능을 갖는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 11

화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 포함하는 식품 조성물:

<화학식 1>



이 때,

R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

청구항 12

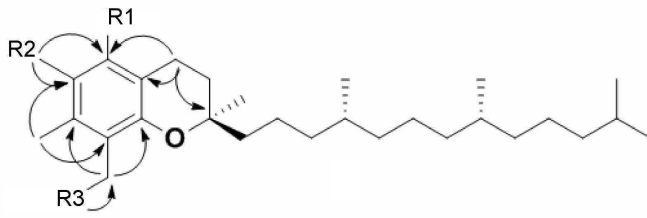
제 11항에 있어서,

상기 R3는 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 13

화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 포함하는 화장품 조성물:

<화학식 1>



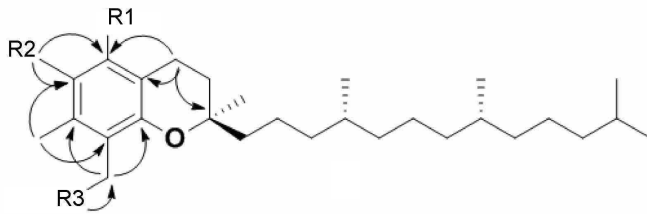
이 때,

R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

청구항 14

화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 포함하는 사료 조성물:

<화학식 1>



이 때,

R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

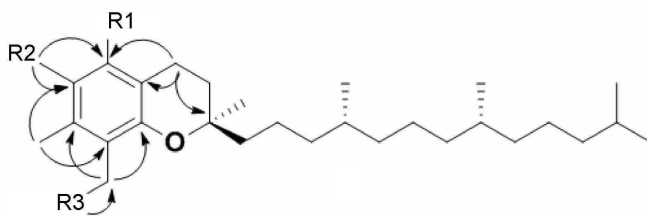
청구항 15

진피를 추출하는 단계; 및

상기 진피 추출물로부터 화학식 1, 화학식 3 또는 화학식 4의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,

항산화 물질의 제조 방법:

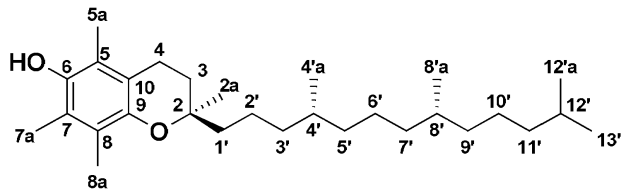
<화학식 1>



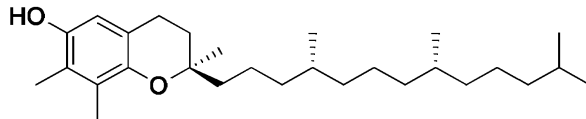
이 때,

R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

<화학식 3>



<화학식 4>



청구항 16

제 15항에 있어서,

탄소 수 3 이하의 알코올 또는 물로 진피를 추출하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 17

제 15항에 있어서,

상기 진피 추출물을 에틸아세테이트로 분획한 후 상기 에틸아세테이트 분획물로부터 화학식 1, 화학식 3 또는 화학식 4의 화합물을 분리하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진피로부터 분리한 신규 토코페롤 유사체에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 상록수이자 낙엽수인 진피(*Citrus unshiu* Marcovich (Rutaceae)는 한국, 일본, 중국에 널리 분포하고 있는 식물이다. 진피는 5m 높이로 자라며, 피침 모양의 잎(lanceolate leaves)과 흰 꽃을 가지고, 열매는 9월 내지 10월에 익는다. 진피는 많은 종류의 2차 메타볼라이트(metabolite)들을 포함하는데, 이들은 에킨대 플라보노이드들(flavonoids), 카로테노이드(carotenoids)들 및 리모노이드(limonoids) 등이다. 진피는 고지혈증(hyperlipidemic disease)(한국공개특허 10-2013-0034319호), 관절염 및 심혈관질환의 치료 및 보호용으로 사용되어 왔으며, 차(tea)로도 이용된다.

[0003] 본 발명자들은 진피 추출물 및 분획물에 대하여 연구하던 중 진피 유래 신규 디터페노이드를 발견하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

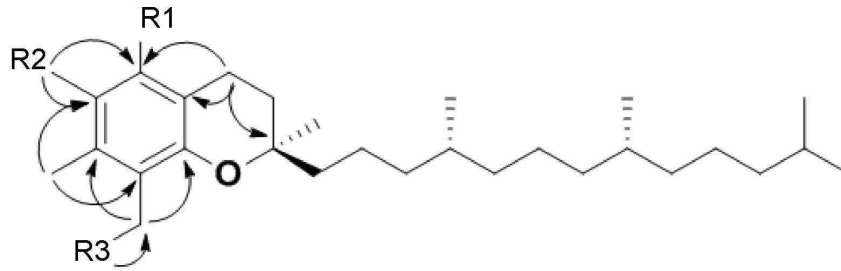
해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 진피 유래의 신규 토코페롤 유사체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 제공한다.

[0006] <화학식 1>



[0007]

[0008] 이 때,

[0009] R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

발명의 효과

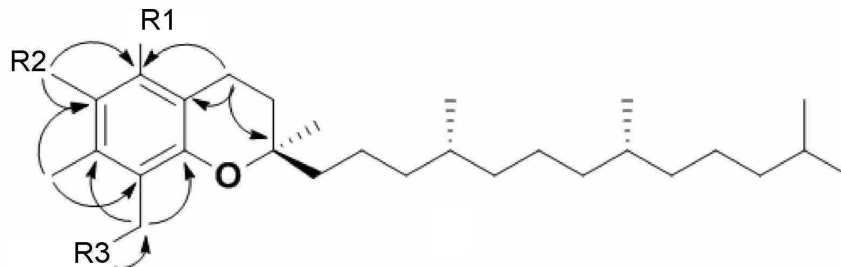
[0010] 본 발명의 신규 토코페롤 유사체는 항산화 활성을 갖는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은,

[0012] 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염에 대한 것이다.

[0013] <화학식 1>



[0014]

[0015] 이 때,

[0016] R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

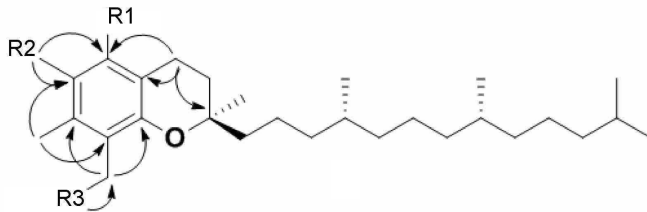
[0017] 또한 본 발명은,
 [0018] 상기 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 포함하는 식품 조성물에 대한 것이다.

[0019] 또한 본 발명은,
 [0020] 상기 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 포함하는 화장료 조성물에 대한 것이다.

[0021] 또한 본 발명은,
 [0022] 진피를 추출하는 단계; 및
 [0023] 상기 진피 추출물로부터 상기 화학식 1의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,
 [0024] 향산화 물질의 제조 방법에 대한 것이다.

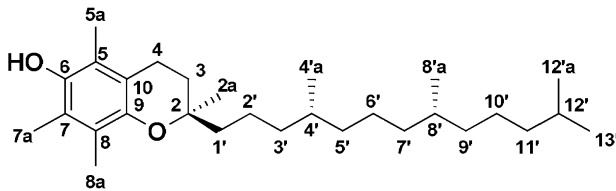
[0025] 또한 본 발명은,
 [0026] 진피를 추출하는 단계; 및
 [0027] 상기 진피 추출물로부터 화학식 1, 화학식 3 또는 화학식 4의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,
 [0028] 향산화 물질의 제조 방법에 대한 것이다.

[0029] <화학식 1>



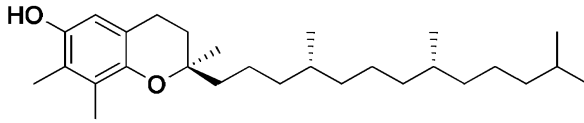
[0030]
 [0031] 이 때,
 [0032] R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

[0033] <화학식 3>



[0034]
 - 8 -

[0035] <화학식 4>



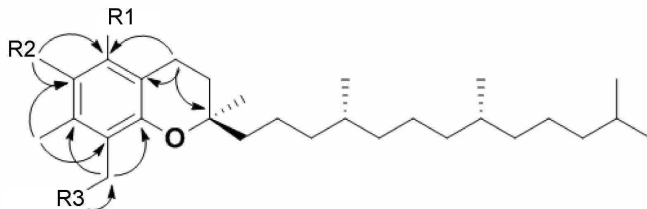
[0036]

[0037] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0038] 화학식 1의 화합물

[0039] 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염에 대한 것이다. 또한 본 발명은, 하기 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 포함하는 식품 조성물, 화장품 조성물에 대한 것이다.

[0040] <화학식 1>



[0041]

[0042] 이 때,

[0043] R1, R2 및 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

[0044] 바람직하게는, 상기 알킬은 탄소 수 5 이하의 알킬로, 예컨대 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 펜틸 등이나 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 바람직하게는 상기 알킬은 가지달린 알킬 또는 가지없는 알킬이다. 또한 상기 알콕시는 탄소 수 5 이하의 알콕시인 것이 바람직한데, 예컨대, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시 등이나 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 바람직하게는 상기 알콕시는 가지달린 알콕시 또는 가지없는 알콕시이다.

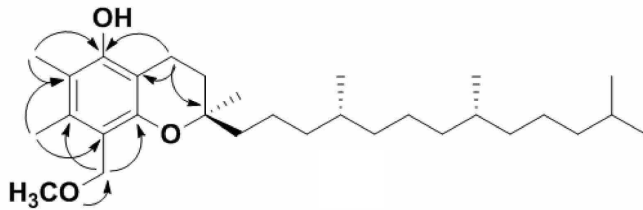
[0045] 상기 R1은 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인데, 바람직하게는 하이드록시 또는 알콕시이고, 더욱 바람직하게는 하이드록시이다.

[0046] 상기 R2는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인데, 바람직하게는 하이드록시 또는 알킬이고, 더욱 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸 등의 알킬이며, 더더욱 바람직하게는 메틸 또는 에틸이며, 가장 바람직하게는 메틸이다.

[0047] 상기 R3는 H, 알킬, 하이드록시 및 알콕시로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인데, 바람직하게는 하이드록시 또는 알콕시이며, 더욱 바람직하게는 메톡시, 에톡시 또는 프로폭시이고, 가장 바람직하게는 메톡시이다.

[0048] 가장 바람직하게는 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물이다. 이 때 화살표는 HMBC 스펙트럼 내 탄소 및 양성자 시그널 간의 연관성을 가리킨다.

[0049] <화학식 2>



[0050]

[0051] 상기 화학식 1의 화합물은 천연물로부터 분리되거나 합성되어 제조되며, 바람직하게는 진피 유래이다. 상기 화학식 1의 화합물은 항산화 활성을 갖는데, 예컨대, ABTS 라디칼 소거능, DPPH 라디칼 소거능 및 활성산소 흡수능을 갖는다. 구체적으로 상기 화학식 1의 화합물은 0.1~0.5 g VCE/g의 ABTS 라디칼 소거능을 가지며, 0.1~0.5 g VCE/g의 DPPH 라디칼 소거능을 갖고, 0.2~1.0 VCE/g의 활성산소 소거능을 가진다.

[0052] 식품 조성물

[0053] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 포함하는 식품 조성물에 대한 것이다.

[0054] 본 발명의 식품은 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 그 허용가능한 염을 첨가하는 것도 포함된다.

[0055] 본 발명의 식품 조성물은, 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 그 허용가능한 염은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량%에 대하여 0.1 내지 70 중량%, 바람직하게는 2 내지 50 중량%로 첨가될 수 있다.

[0056] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.

[0057] 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 그 허용가능한 염을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

[0058] 화장료 조성물

[0059] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 포함하는 화장료 조성물에 대한 것이다.

[0060] 본 발명의 화장료 조성물은, 당업계의 통상적으로 제조되는 어떠한 제형에도 제조될 수 있으며 용액, 현탁액,

유탕액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탕액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 화장료 조성물은 유연화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 또는 파우더 제형으로 제조될 수도 있다.

[0061] 본 발명의 화장료 조성물은 효과적인 경피 흡수를 위하여 피부 침투 촉진제를 포함할 수 있다. 상기 피부 침투 촉진제는 당 업계에서 화장료 조성물에 사용하는 일반적인 피부 침투 촉진제면 되고, 특별히 제한되는 것은 아니다. 예컨대 본 발명의 피부 침투 촉진제는 디메틸 설펝사이드, oleic acid 등 지방산/에스테르 화합물, 리모넨(limonene) 등이 될 수 있다.

[0062] 또한 본 발명의 화장료 조성물을 이용 시에는 충격파, 이온삼투요법, 전기침공법, 미세침요법 등 물리적 방법을 병용하여 경피 흡수를 촉진할 수도 있다.

[0063] 사료 조성물

[0064] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염을 포함하는 사료 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 사료 조성물은 통상적인 사료와 함께 배식할 수 있으며, 본 발명의 사료 조성물을 통상적인 사료 조성물에 첨가하여 기능성 사료 조성물을 제조하여 이용할 수도 있다. 또한 본 발명의 사료 조성물은 상기 화학식 1의 화합물 및 그 허용 가능한 염 외 기능성 성분을 추가로 포함할 수도 있다. 상기 통상적인 사료 조성물과 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 그 허용 가능한 염이 혼합된 기능성 사료 조성물의 제조 시, 본 발명의 화합물 또는 그 허용가능한 염은 총 사료 조성물에 대하여 0.01 내지 30.00 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 20.00 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 사료 조성물의 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 그 허용가능한 염의 유효용량은 상기 식품 조성물의 유효 용량에 준해서 사용할 수 있으나, 지속적인 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 필요에 따라 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 사료 조성물은 가축 또는 가금을 대상으로 한다. 상기 가축 또는 가금은 소, 돼지, 닭, 말, 양, 당나귀, 노새, 멧돼지, 토끼, 메추라기, 집오리, 장닭, 투계용 닭, 비둘기, 칠면조, 개, 고양이, 원숭이, 햄스터, 생쥐, 래트, 구관조, 앵무새, 잉꼬, 카나리아 등이나 이들에 제한되는 것은 아니며 가정 내에서 사육 가능한 인간 이외의 포유 동물 또는 조류이면 본 발명의 사료 조성물의 대상이라 할 것이다.

[0066] 항산화 물질의 제조 방법

[0067] 본 발명은 진피를 추출하는 단계; 및 상기 진피 추출물로부터 상기 화학식 1의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 항산화 물질의 제조 방법에 대한 것이다.

[0068] 상기 진피 추출 단계는 진피를 유기 용매로 추출하는 것이며, 바람직하게는 탄소 수 3 이하의 저가 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 물로 추출하고, 더욱 바람직하게는 상기 저가 알코올은 메탄올, 에탄올 또는 프로판올이다. 바람직하게는 상기 진피를 유기 용매를 이용하여 추출한 후 상기 추출물을 에틸아세테이트, 부탄올, 물 등으로 분획하고, 상기 분획물로부터 화학식 1의 화합물을 분리한다. 예컨대, 본 발명의 항산화 물질 제조 방법은 진피를 메탄올, 에탄올 등으로 추출한 후 상기 추출물을 에틸아세테이트 등으로 분획하여 화학식 1의 화합물을 분리하여 수행할 수 있다.

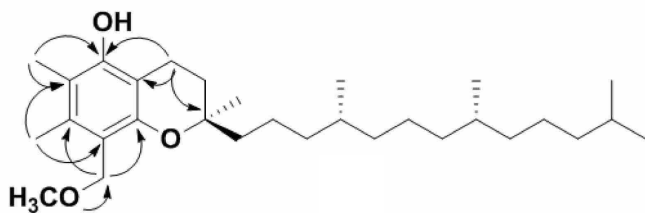
[0069] <재료 및 방법들>

[0070] 시판되는 건조된 진피 껍질을 (주) 지에프씨에서 제공받아 하기 실험에 이용하였다.

- [0071] 라디칼 소거능의 측정
- [0072] 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 및 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)의 라디칼 소거 활성은 각각 blue/green ABTS radicals (Kim DO, Lee KW, LEE HJ, and LEE CY (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J Agr Food Chem 50, 3713-3717.) 및 DPPH radical chromogens (Kim DO, Lee KW, LEE HJ, and LEE CY (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J Agr Food Chem 50, 3713-3717.)을 이용한 문헌들에 기재된 대로 측정하였다. 활성산소 흡수력(oxygen radical absorbance capacity (ORAC)의 측정은 형광 탐지기(fluorescence detector)를 이용하여 수행하였다(Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, and Prior RL (2002) High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J Arg Food Chem 50, 4437-4444.). 상기 화합물들의 항산화 활성은 비타민 C 등가 그람/시료 그람(grams of vitamin C equivalent (VCE)/grams of sample)으로 나타내었다.
- [0073] <실험예 1> 진피 분획으로부터 화합물들의 분리
- [0074] 건조된 껍질 분말들(3kg)이 80% 메탄올(20 L x 2)로 실온에서 24시간 동안 추출되고, 여과되었으며, 진공으로(in vacuo) 농축되었다.
- [0075] 상기 진피 메탄올 추출물이 실리카 겔 TLC 상에 전개되면서(develope), 스팟들은 10% H₂SO₄ 용액으로 스프레이 되고, 254 nm에서 UV 흡수와 함께 가열될 때 밝은 갈색을 띠는데, 이는 추출물 내 토코페롤들의 존재를 가리킨다. 메탄올 추출물은 용매 분별법(solvent fractionation)에 의하여 에틸아세테이트(EtOAc), n-부탄올(n-BuOH) 및 물 층으로 분별증류되었다. EtOAc 분획의 반복된 SiO₂ 및 ODS 칼럼 크로마토그래피로 3개의 토코페롤들인 화합물 1-3이 수득되었다.
- [0076] 구체적인 방법은 하기와 같다.
- [0077] 상기 진피 메탄올 추출물(1138 g)을 물(3 L)에 붓고, EtOAc (3 L x 4) 및 n-BuOH (2.5 L x 4)로 순차적으로 추출했다. 각각의 용매층은 농축되어 각각 EtOAc 추출물(CUE, 35 g), n-BuOH 추출물(CUB, 133 g), 및 물 추출물(CUH, 970 g)을 얻었다. 상기 EtOAc 분획 (CUE, 35 g)은 SiO₂ 칼럼 크로마토그래피(c.c.) (12 cm x 14 cm)에 적용되고, TLC로 모니터링되면서 n-hexane-EtOAc (3:1→2:1→1:1→1:3, 7.5 L of each) → CHCl₃-MeOH-H₂O (33:3:1→30:3:1→27:3:1→20:3:1→12:3:1→6:4:1, 각각 6.5 L)로 용리(elute)되었다.
- [0078] 분획 CUE-1 [23 g, 용리 부피/총 부피 (Ve/Vt) 0.000-0.021]를 SiO₂ c.c. (4.0 cm x 16 cm)에 적용하고, n-hexane-EtOAc (30:1, 5.5 L)으로 용리하여, 정제된 화합물 1[CUE-1-6, 26.4 mg, Ve/Vt 0.192-0.208, TLC (Kiesel gel 60 F254) R_f 0.39, n-hexane-EtOAc (20:1)]과 함께 24개 분획들을 얻었다(CUE-1-1 to CUE-1-24).
- [0079] 분획 CUE-1-4 [30.2 mg, Ve/Vt 0.150-0.158]을 ODS c.c. (2.0 cm x 5.5 cm)에 적용하고, 아세톤-물(5:1, 0.13 L)로 용리시키고, 정제된 화합물 2[CUE-1-4-8, 25.4 mg, Ve/Vt 0.607-0.727, TLC (Kiesel gel 50 F254) R_f 0.36, n-hexane-EtOAc (20:1)]와 함께 10개 분획을 얻었다(CUE-1-4-1 내지 CUE-1-4-10).
- [0080] 분획 CUE-1-8 [66.4 mg, Ve/Vt 0.251-0.292]을 ODS c.c. (2.5 cm x 5.0 cm)에 적용시키고, 아세톤-물(4:1→5:1, 각각 0.5 L)로 용리시키고, 정제된 화합물 3[CUE-1-8-6, 6.4 mg, Ve/Vt 0.319-0.344, TLC (RP-18 F254s) R_f 0.23, acetone-H₂O (7:1)]과 함께 12개 분획들을 얻었다(CUE-1-8-1 to 1-8-12).
- [0081] <실험예 2> 분리된 화합물의 확인
- [0082] 화합물 1은 노란색 오일로 분리되었으며, 3480 및 1648 cm⁻¹에서 흡수 밴드를 보였는데, 이는 하이드록실

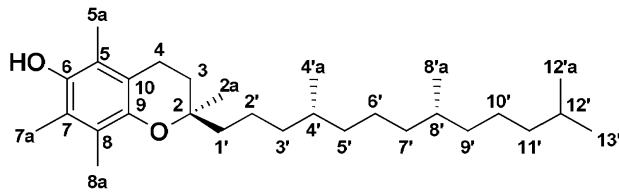
(hydroxyl) 및 올레핀(olefin)기의 존재를 의미한다. 분자식은 high-resolution electronic ionization mass spectrometry (HREIMS)에서 m/z 460.3922 (calculated for $C_{30}H_{52}O_3$ 460.3916)에서 분자 이온 피크 $[M]^+$ 로부터 $C_{30}H_{52}O_3$ 로 결정되었다. ^1H -NMR 스펙트럼은 하나의 메톡시(methoxy) 양성자(proton) 시그널 (δ H 3.42, 3H, s, $-OCH_3$) 및 하나의 산소화된 메틸렌 양성자(oxygenated methylene proton) 시그널 (δ H 4.64, 2H, s, H-8a)를 보였다. 고자장 영역에서, 두 개의 메틸렌 양성자 시그널 (δ H 2.61, 2H, H-4; δ H 1.78, 2H, H-3), 두 개의 알릴 메틸(allyl methyl) 양성자 시그널 (δ H 2.14, 3H, H-7a; δ H 2.10, 3H, H-6a), 하나의 싱글렛(singlet) 메틸(methyl) 양성자 시그널 (δ H 1.21, 2H, H-2a), 4개의 더블렛(doublet) 메틸(methyl) 양성자 시그널 (δ H 0.87, 3H, H-12'a; δ H 0.85, 3H, H-13'; δ H 0.84, 3H, H-4'a; δ H 0.84, 3H, H-8'a) 및 7개의 메틸(methine) 및 메틸렌(methylene) 양성자 시그널이 δ H 1.59-1.02에서 관찰되었다. 이들 발견들은 화합물 1이 메톡시 기를 갖는 토코페롤(tocopherol) 유사체(analogue)라는 것을 제안한다. ^{13}C -NMR은 하나의 메톡시 기(δ c 58.1)를 포함하는 30 탄소 시그널을 보였다. 저자장 영역에서, 벤젠 고리 모이어티(moiety) 때문에 두 개의 산소화된(oxygenated) 올레핀 4차 탄소 시그널 (δ c 147.4, C-9; δ c 144.8, C-5) 및 4개의 올레핀 4차 탄소 시그널 (δ c 125.8, C-8; δ c 123.1, C-6; δ c 115.9, C-7; δ c 115.4, C-10)이 관찰되었다. 하나의 산소화된 4차 탄소 시그널 (δ c 74.5, C-2), 하나의 메톡시 탄소 시그널 (δ c 58.1, $-OCH_3$), 하나의 산소화된 메틸렌 탄소 시그널 (δ c 69.8, C-8a), 7개의 메틸 탄소 시그널 (δ c 23.7, C-2a; δ c 22.7, C-12'a; δ c 22.6, C-13'; δ c 19.7, C-4'a; δ c 19.6, C-8'a; δ c 11.9, C-6a; δ c 11.7, C-7a), 3개의 메틴(methine) 탄소 시그널 (δ c 32.8, C-4'; δ c 32.7, C-8'; δ c 28.0, C-12'), 및 11개의 메틸렌(methylene) 탄소 시그널 (δ c 39.9, C-1'; δ c 39.4, C-11'; δ c 37.5, C-3'; δ c 37.5, C-5'; δ c 37.4, C-7'; δ c 37.3, C-9'; δ c 31.5, C-3; δ c 24.8, C-10'; δ c 24.5, C-6'; δ c 21.0, C-2'; δ c 20.0, C-4)이 관찰되었다. NMR 및 분자식 $C_{30}H_{52}O_3$ 로부터 5개로 계산된 불포화 정도는 구조 내 벤젠 고리와 함께 지방족 고리의 존재를 가리켰다. 따라서, 화합물 1은 메톡시 기를 갖는 토코페롤 유사체로 확인되었다. 작용기의 위치를 확인하기 위하여, gCOSY, gHSQC, 및 gHMBC 방법들을 이용하여 2D NMR 실험들이 수행되었다. gHMBC 스펙트럼(도 1)에서, 메틸렌 양성자 시그널 (δ H 2.61, H-4) 및 알릴메틸(allylmethyl) 양성자 시그널 (δ H 2.10, H-6a)는 산소화된 올레핀 4차 탄소 시그널 (δ c 144.8, C-5)와 크로스 피크를 보였는데, 이는 하이드록실(hydroxyl) 기가 C-5에 결합되었다는 것을 가리킨다. 산소화된 메틸렌 양성자 시그널 (δ H 4.64, H-8a)는 산소화된 올레핀 4차 탄소 시그널 (δ c 147.4, C-9), 메톡시 탄소 시그널 (δ c 58.1), 및 올레핀 4차 탄소 시그널 (δ c 115.9, C-7)와 크로스 피크를 보였는데, 이는 메톡시 기가 C-8a에 결합되었다는 것을 가리킨다. 화합물 1은 최종적으로 하기 화학식 2를 갖는 것으로 확인되었으며, (2R)-2,6,7-트리메틸-8-메톡시메틸-2-[(4R,8R)-4,8,12-트리메틸트리데실]-3,4-디하이드로크로멘-5-올((2R)-2,6,7-trimethyl-8-methoxymethyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydrochromen-5-ol)로 결정되었고, 메톡시토코페롤(methoxytocopherol) (화학식 2)로 명명하였다.

<화학식 2>



화합물 2는 문헌 (Jung LK, Park HJ, Cho JG, Lee DY, Wu Q, Jeong TS, Kim SY, Rho YD, and Baek NI (2009) Isolation of α -Tocopherol from the Aerial Parts of *Oryza sativa* L. Research Collection of Institute of Life Sciences & Resources 28, 68-71.)에 보고된 값들을 갖는 NMR 및 MS 데이터의 비교에 의하여, 화학식 3의 알파-토코페롤(α -tocopherol)로 확인되었다.

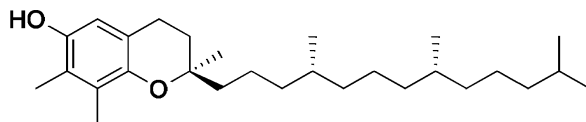
[0086] <화학식 3>



[0087]

[0088] 화합물 3은 노란색 오일로 분리되었으며, 3480 및 1640 cm^{-1} 에서 흡수 밴드를 보였는데, 이는 하이드록실 및 올레핀 기들의 존재를 가리킨다. EI/MS 스펙트럼은 m/z 416 $[M]^+$ 에서 분자 이온 피크를 만들었다. 화합물 3의 NMR 데이터는 메틸기가 부족한 것을 제외하면 알파-토코페롤(화합물 2)의 그것들과 매우 유사하였다. 올레핀 메틴 시그널 (δH 6.35, H-5; δc 112.1, C-5)가 화합물 2의 올레핀 4차 대신 관찰되었다. 화합물 3은 최종적으로 화학식 4의 감마-토코페롤(γ -tocopherol)(Han NM, May CY, Ngan MA, Hock CC, and Hashim MA (2004) Isolation of palm tocopherols using supercritical fluid chromatography. J Chromatogr Sci 42, 536-539.)로 확인되었다.

[0089] <화학식 4>



[0090]

[0091] <실험예 3> 라디칼 소거능 평가

[0092] DPPH, ABTS, 및 ORAC 방법들을 이용하여 상기 화합물 1 내지 3의 라디칼 소거능을 평가하였다.

[0093] 그 결과, 감마-토코페롤(화합물 3)은 가장 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보였다. ABTS 라디칼 소거능의 순서는 하기와 같았다: γ -토코페롤 (화합물 3, 0.45 ± 0.02 g VCE/g) > α -토코페롤 (화합물 2, 0.27 ± 0.01 g VCE/g) > 메톡시토코페롤 (화합물 1, 0.25 ± 0.02 g VCE/g).

[0094] 각각의 시료의 DPPH 라디칼 소거능 순서는 하기와 같았다: γ -토코페롤 (화합물 3, 0.30 ± 0.01 g VCE/g) > α -토코페롤 (화합물 2, 0.23 ± 0.01 g VCE/g) > 메톡시토코페롤 (화합물 1, 0.22 ± 0.01 g VCE/g).

[0095] 활성산소 흡수능(ORAC) 분석 결과, γ -토코페롤 (화합물 3)은 가장 높은 항산화 활성을 보였는데, 이는 비타민 C와 거의 동일한 정도였다. 각각의 시료의 ORAC 라디칼 소거능 순서는 하기와 같았다: γ -토코페롤 (화합물 3, 0.92 ± 0.04 g VCE/g) > α -토코페롤 (화합물 2, 0.79 ± 0.10 g VCE/g) > 메톡시토코페롤 (화합물 1, 0.73 ± 0.10 g VCE/g)(표 1).

[0096] 이를 종합하여 보면, γ -토코페롤 (화합물 3)은 메톡시토코페롤(methoxytocopherol) (화합물 1) 및 α -토코페롤 (화합물 2)에 비교할 때, 일관하여 가장 높은 ABTS, DPPH, 및 ORAC 라디칼 소거능을 보였다. 이들 토코페롤 유사체들이 유사한 화학 구조를 갖기는 하나, 이것들은 구조의 작은 차이로 인하여 서로 다른 항산화 활성을 보였다. 크로마놀(chromanol) 고리 상 하이드록실 및 메틸 기들의 수가 다른 지용성 항산화제들은 서로 다른 라디칼 소거능을 갖는다. 알파-토코페롤(화합물 2)은 하나의 하이드록실 및 3개의 메틸 기들을 갖고, 감마-토코페롤(화합물 3)은 하나의 하이드록실 및 2개의 메틸 기들을 갖고, 메톡시토코페롤(화합물 1)은 하나의 하이드록실 기, 2개의 메틸 기 및 하나의 메톡시메틸 기를 갖는다. 메틸 기들의 수의 증가는 활성의 감소를 야기하며, 이는 극성의 감소 때문일 수 있다. 선행문헌에서, 알파-토코페롤(화합물 2) 및 감마-토코페롤(화합물 3)은 각각 0.27 ± 0.03 and 0.40 ± 0.03 g VCE/g의 ABTS 라디칼 소거능을 보인 것으로 보고되었는데(Floegel A, Kim DO, Chung

SJ, Song WO, Fernandez ML, Bruno RS, Koo SI, and Chun OK (2010) Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. Int J Food SciNutr 61, 600-623.), 이는 본 발명에서 보고한 것과 거의 동일한 활성이다. 알파-토코페롤(화합물 2)은 0.25 ± 0.01 (Liu JK, Hu L, Dong ZJ, and Hu Q (2004) DPPH radical scavenging activity of ten natural p-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China. Chem Biodiversity 1, 601-605.)의 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 알파-토코페롤(화합물 2) 및 감마-토코페롤(화합물 3)은 0.22 및 $0.09 \mu\text{mol Trolox/L}$ (Wang Y, Yang M, Lee SG, Davis CG, Kenny A, Koo SI, and Chun OK (2012) Plasma total antioxidant capacity is associated with dietary intake and plasma level of antioxidant in postmenopausal women. J Nutr Biochem 23, 1725-1731.)의 ORAC 라디칼 소거능을 보였다.

표 1

시료	항산화 활성 (g VCE/g)		
	ABTS	DPPH	ORAC
메톡시토코페롤 (화합물 1)	0.25 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.73 ± 0.10
α -토코페롤 (화합물 2)	0.27 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.79 ± 0.10
γ -토코페롤 (화합물 3)	0.45 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.92 ± 0.04

모든 데이터들은 평균 $\pm$ 표준편차 (n=3)로 나타내었다.