(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0011603
(43) 공개일자 2009년02월02일

(51) Int. Cl.[9]
A61K 31/35 (2006.01) *A61K 36/79* (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0075353
(22) 출원일자 2007년07월27일
심사청구일자 2007년07월27일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울 광진구 군자동 98 세종대학교
(72) 발명자
유상호
서울 송파구 방이동 올림픽선수기자촌아파트 242동 302호
김설희
서울 동작구 노량진동 신동아리버파크 702동 606호
(74) 대리인
안영수, 오용주

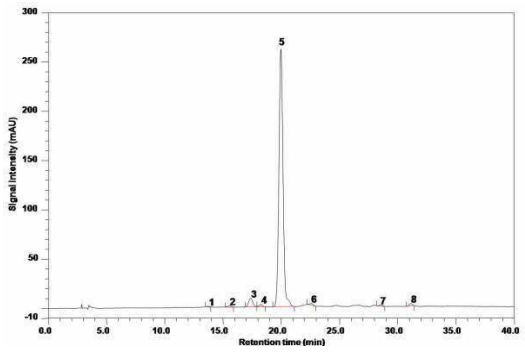
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 고농도의시아니딘-3-O-(2G-O-자일로실루티노사이드)를오미자로부터 추출하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 안토시아닌 색소인 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)가 오미자 색소 조추출물의 안토시아닌 중에서 90% 이상 차지함을 새롭게 규명하고, 그 추출원으로 오미자 과실이 될 수 있음 제시하는 것에 특징이 있는 것으로, 오미자 과실로부터 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)를 고농도로 대량 생산할 수 있으므로 매우 유용하다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10625
부처명	서울특별시
연구사업명	기술기반구축사업
연구과제명	서울 전통 반가식의 과학화 및 산업화
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2005년 12월 01일 ~ 2010년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

천연물 소재로부터 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)를 추출하는 방법에 있어서,

천연물 소재로 오미자 과실을 추출원으로 사용하는 것을 특징으로 하는 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)의 추출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 오미자 과실로부터 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)의 추출은,

오미자 과실의 착즙액을 컬럼 또는 필터에 통과시켜 오미자 조추출물을 획득하는 단계; 및,

획득된 오미자 조추출물로부터 컬럼크로마토그래피를 통해 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)를 분리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)의 추출 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 컬럼 또는 필터는,

소수성 물질을 추출할 수 있는 컬럼 또는 필터인 것을 특징으로 하는 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)의 추출 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 천연물 소재로부터 안토시아닌 색소를 추출하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 천연물 소재인 오미자 과실로부터 안토시아닌 색소의 일종인 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)를 고농도로 추출하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 오미자(Schizandra chinensis, ruprecht)는 목련과(Magnoliaceae)에 속하는 식물로서, 한방에서는 그 열매를 전신쇠약, 정신 육체적 피로, 기관지염, 기관지천식, 신경쇠약, 저혈압, 심장기능저하, 영양실조케양과 상처의 치료 및 시력 증진을 위해 사용하여 왔으며, 주로 차, 화채 및 술로 가공되어 음용되어 오고 있다.

<3> 오미자에 대한 이화학적 특성 및 약리활성에 대한 구체적인 연구는 종래부터 활발히 진행되어 오고 있는데, 이화학적 특성으로 오미자에 다량의 유기산 및 안토시안(anthocyan) 색소가 함유되어 있음이 보고되어 있고(Kim, K.I. et al., Korean J. Food Sci. Technol., 5:178-182, 1973), 약리활성으로 간장보호작용, 알콜해독작용, 항당뇨작용이 보고된바 있다(Hikino, H. et al., Planta Med.,50:213-216, 1984; Lee, J. S. et al., Korean J. Dietary culture, 5:259-262, 1990; Sheo, H. J. et al., J. Korean Soc. Food Sci. Nutri., 16:262-268, 1987).

<4> 한편, 안토시안(anthocyan)은 글라이코사이드(glycoside)인 안토시아닌(anthocyanin)과 아글리콘인 안토시아니딘(anthocyanidin)을 포함하는 개념으로, 식물계에 널리 존재하는 성분이며, 식물체에 색을 부여하는 역할을 한다.

<5> 안토시아닌에 대한 광범위한 연구는 식물체에 존재하는 안토시아니딘의 기초 구조로 여섯 개를 밝혔는데, 시아니딘(cyanidin), 델피니딘(delphinidin), 페투니딘(petunidin), 페오니딘(peonidin), 말비딘

(malvidin) 및 펠랄고니딘(pelargonidin)이 그 여섯 가지이다(Escribano-Bailon, M. T.; Santos-Buelag, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Antohcyanins in cereals). 이 여섯 개의 기초 구조는 메톡실화(methoxylation) 및 하드록실화(hydroxylation)의 정도에 따라 다양한 형태로 확장될 수도 있다.

<6> 이 중, 펠랄고니딘, 시아니딘, 델피니딘 유도체는 각각 홍색, 자홍색, 자색을 발현하며, 각각 봉선화, 장미, 포도에 많이 존재한다.

<7> 안토시아닌은 생체에서 액포 내 산성조건, 플라보노이드와의 결합, 금속과의 착염 형성 등으로 안정화되어 색상이 유지되지만, 수용액에서는 산도 변화 혹은 물과의 반응에 의해 색상변화 혹은 탈색이 일어난다. 따라서, 안토시아닌계 색소를 추출, 정제할 때는 이러한 화학적 특성을 고려하여, 색소를 최대한으로 안정화시키는 조건을 유지하여야 한다.

<8> 안토시아닌은 최근 여러 가지 생리활성이 있는 것으로 알려지고 있다. 예를 들면, 노화억제작용, 항균작용, 돌연변이 억제작용, 콜레스테롤 저하작용, 시력개선효과, 혈관보호기능, 항궤양기능, 항산화기능 등이 알려져 있고, 특히 항산화 활성면에서는 천연 항산화제인 토코페롤보다 5~7배의 강한 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나, 이러한 생리활성은 모든 종류의 안토시아닌이 기본적으로 가지는 활성이지만, 최근 각 안토시아닌의 종류에 따라 그 활성의 차이가 있는 것으로 알려지고 있다.

<9> 한편, 최근 웰빙 식생활 문화의 확산에 따라 인공 식품 첨가물에 대한 거부감이 확산되고 있다. 이와 같은 시대 상황에 따라 색소에 대한 소비자의 기호도 합성물에서 천연물로 이동하고 있다. 현재, 안토시아닌은 청량음료, 잼, 시력보호용 음료수 및 사탕 등의 가공식품과 향장공업, 염료공업 및 의약품 개발 등에 활용되고 있는데, 발암성 및 간 독성이 우려되는 합성 착색료를 대신할 수 있는 안전한 소재일 뿐만 아니라, 식품영양학적인 면과 더불어, 시각적 신선감 및 즐거움을 줄 수 있기 때문에 매우 유용한 성분으로 평가되고 있다.

<10> 그런데, 상기의 장점에도 불구하고 안토시아닌 색소들은 안정성이 약해서 식품 가공 중에 광범위하게 적용되기에는 근본적인 한계가 있으며, 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 다양한 연구들이 수행되고 있는데, 당, 유기산 등을 이용하여 안정성을 증진시키기 위한 연구도 그 한 예이다.

<11> 한편, 상기에서 살펴본 바와 같은 안토시아닌을 포함하는 천연물 유래의 색소를, 영양학적 특성을 포함하는 산업적 목적으로 활용하기 위해서는 먼저 해당 천연물의 추출액에 함유되어 있는 특정의 성분이 동정되어야 하고, 그 후 그 성분을 순수하게 고농도로 분리를 할 수 있는 기술이 개발되어야 한다.

<12> 상기에서 언급한 오미자는 특유의 밝은 빨간색으로 말미암아 그 색감을 부여하는 색소를 분리시켜 산업적으로 활용할 수 있는 방안이 널리 검토될 수 있으나, 종래에 오미자에 존재하는 안토시아닌 색소에 대한 연구는 미비하였고, 특히 오미자에 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)가 존재하는 사실에 대해서는 전혀 알려진바 없었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<13> 이에 본 발명은 오미자에 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)가 고농도로 존재함을 새롭게 규명하고, 오미자로부터 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)를 고농도로 추출할 수 있음을 제시하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

<14> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 천연물 소재로부터 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)를 추출하는 방법에 있어서, 천연물 소재로 오미자 과실을 추출원으로 사용하는 것을 특징으로 하는 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)의 추출 방법을 제공한다.

<15> 이하, 본 발명의 구성을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

<16> 본 발명은 천연물 소재인 오미자 과실에 하기의 화학식 1로 표시되는 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)가 고농도로 존재함을 최초로 규명하였고, 이에 따라 천연물 소재로부

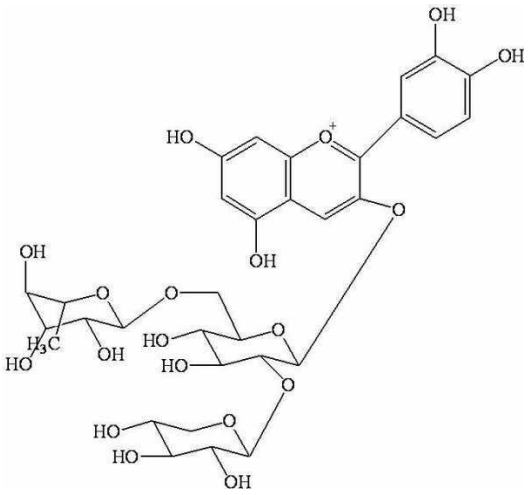
터 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)를 추출할 때, 그 대상에 있어서, 오미자 과실을 사용할 수 있음을 제시한다. 하기 본 발명의 실험 결과, 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)는 오미자 색소 조추출물 중에서 가시광선 파장 영역인 520 nm에서 흡광을 나타내는 안토시아닌 추정 물질 중의 90% 이상을 차지함이 확인되었다.

<17> 통상적으로 안토시아닌 색소는 식물체 중에 여러 종류의 안토시아닌 색소들이 혼합된 형태로 존재하며, 그 존재 비율에 있어서도 특정 성분의 안토시아닌 색소가 다른 것에 비해 현저히 많은 양을 차지하지 않는 특징이 있다. 따라서, 특정의 안토시아닌 색소만을 고순도로 분리하기에는 난점이 있어 왔고, 그 수득량 또한 추출의 경제성을 만족시킬 만큼 충분하지 못한 문제가 있어 왔다.

<18> 그런데, 본 발명에서 규명한 바에 의하면, 다른 식물체와 달리 오미자 추출물에는 여러 안토시아닌 색소 중 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)가 90%이상의 고농도로 존재하고 있음이 확인되었다. 이와 같은 사실은 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)가 단분리에 의해 오미자 과실로부터 고농도로 대량 회수될 수 있음을 의미하는 것으로, 매우 가치 있는 결과이다.

<19> 한편, 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)의 영문 명칭은 'Cyanidin-3-O-(2^{G}-O-xylosylrutinoside)'이고 그 구조식은 하기의 화학식 1과 같다.

화학식 1

<20> 

<21> 한편, 이상과 같이 안토시아닌 중에서 주된 화합물로 존재하는 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)는 오미자 과실로부터 다양한 방법에 의해 추출될 수 있는데, 그 추출방법으로는 안토시아닌 색소를 추출하기 위해 통상적으로 사용되는 다양한 방법을 사용할 수 있으며, 특별한 방법에 반드시 국한되는 것은 아니다. 다만, 바람직하게 상기 추출은 오미자 과실의 착즙액을 컬럼 또는 필터에 통과시켜 오미자 조추출물을 획득하는 단계; 및, 획득된 오미자 조추출물로부터 컬럼크로마토그래피를 통해 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)을 분리하는 단계;를 포함하여 수행되는 것이 좋고, 더욱 바람직하게 상기 컬럼 또는 필터는 소수성 물질을 추출할 수 있는 컬럼 또는 필터인 것이 좋다.

<22> 본 발명은 오미자 과실 추출액에 특정의 안토시아닌 색소(본 발명에서의 실험 결과, 그 안토시아닌 색소는 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)로 동정됨)가 주되게 존재함을 확인하고, 그 안토시아닌 색소를 동정하였다.

<23> 주된 화합물의 동정을 위하여 본 발명에서는 ① 오미자 과실로부터 조추출액을 수득하는 단계, ② 수득한 오미자 조추출액을 분석하여 성분들의 존재비율을 확인하는 단계, ③ 오미자 조추출액에 존재하는 화합물 중 주된 비중을 차지하는 화합물의 분자량(m/z 값)을 확인하는 단계, ④ 화합물의 구조분석을 위해 정제하는 단계, ⑤ 정제된 화합물의 구조를 밝혀 동정하는 단계를 순차적으로 진행하였다,

<24> 이하에서는 각 단계에 대해 세분해서 설명하고자 한다.

<25> (1) 단계 1: 오미자 과실로부터 조추출액의 수득

<26> 본 단계에서는 오미자 과실로부터 안토시아닌 색소를 함유하는 조추출액을 수득하고자 하였다. 준비된 오미자 과실에 물을 넣고 일정 시간 반응시켜 용출물을 획득하였다. 그 후, 오미자 과실의 잔사 및 용출물 중에 존재하는 불순물을 여과에 의해 제거하고, 오미자 용출물을 일차적으로 수득하였다.

<27> 여과의 방식은 특정의 방식에 반드시 국한되지 않고, 당업계에서 사용되는 통상의 방법을 사용하면 무방하나, 바람직하게 오미자 과실 잔사의 제거는 망 형태의 메쉬 체를 사용하는 것이 좋고, 용출물 중에 존재하는 불순물의 여과는 입수하기에 용이한 'Mixed Cellulose Ester Membrane Filter, Pore size 0.2 mm, Diameter 47 mm (ADVENTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)'를 사용하여 감압여과 하는 것이 좋다.

<28> 용출을 통해 용출물을 수득한 후, 오미자 용출액으로부터 바람직하게 소수성 물질을 걸러낼 수 있는 필터를 이용하여 색소를 추출하였다. 이때, 소수성 물질을 걸러낼 수 있는 필터는 당업계에서 소수성 물질을 분리할 수 있는 필터(또는, 카트리지)로 알려져 있는 것이라면 어느 것을 사용하여도 무방하나, 바람직하게는 입수가 용이한 'Sep-pak®Plus C18 카트리지 (Waters, USA)'를 사용하는 것이 좋다.

<29> 상기와 같이 소수성 물질을 카트리지를 통해 분리한 후, 그 분획을 상온에서 농축함으로써 오미자 조추출액을 최종적으로 준비하였다. 농축은 다양한 방법을 통해 수행 가능하나, 바람직하게는 'SPD1010 Intergrated SpeedVac System (Thermo Savant, USA)'를 이용하여 상온에서 농축하는 것이 좋다.

<30> (2) 단계 2: 단계 1에서 수득한 오미자 조추출액의 분석

<31> 본 단계에서는 단계 1에서 수득한 오미자 색소 조추출물의 성분들을 분석하고자 하였다. 분석을 위해 바람직하게 'High performance liquid chromatography'를 이용하였다. 본 발명에서는 'High performance liquid chromatography'의 운행 조건으로 실시예 1에 제시된 방법을 한 예로 제시하는데, 사용자의 편의 및 고려에 따라 약간의 변형은 가능하다.

<32> 실시예 1에 제시된 조건으로 분석한 결과, 특이적으로 오미자 색소 조추출물의 안토시아닌 중에서 특정 화합물이 94.1 %로 주된 비율을 차지함을 확인할 수 있었다(도 1).

<33> (3) 단계 3: 상기 단계 2에서 확인된 주된 화합물의 질량/이온(m/z)값 확인

<34> 상기 단계 2에서 확인된 오미자 색소 조추출물 중 주된 부분을 차지하는 화합물의 분자량을 확인하고자 분자량(m/z 값)을 바람직하게 'High performance liquid chromatography-Mass spectrometry'를 이용하여 분석하였다. 본 발명에서는 'High performance liquid chromatography-Mass spectrometry'의 운행 조건으로 실시예 1에 제시된 방법을 한 예로 제시하는데, 사용자의 편의 및 고려에 따라 약간의 변형은 가능하다.

<35> 실시예 1에서 제시된 조건으로 분석한 결과, 오미자 색소 조추출물의 주된 화합물은 분자량(m/z 값)이 727임을 확인할 수 있었다(도 2).

<36> (4) 단계 4: 단계 3에서 확인된 주된 화합물의 'Semi-Preparative HPLC'를 이용한 정제

<37> 오미자 색소 조추출물에서 약 94% 차지하고 분자량(m/z 값)이 727로 확인된 화합물을 바람직하게 'Semi-Preparative HPLC'를 이용하여 분석 및 정제하였다. 본 발명에서는 'Semi-Preparative HPLC'의 운행 조건으로 실시예 1에 제시된 방법을 한 예로 제시하는데, 사용자의 편의 및 고려에 따라 약간의 변형은 가능하다.

<38> 실시예 1에서 제시된 조건에 의해 'Semi-Preparative HPLC'를 이용하여 주된 화합물의 피크만을 분취하여 정제한 후(도 3), 하기 단계의 정제에 사용하였다.

<39> (5) 단계 5: 상기 단계 4에서 정제된 화합물의 동정

<40> 상기 단계 4에서 정제되어 수득된 화합물을 HPLC/MSD로 확인한 결과, 'Fragmentor voltage' 75 eV에서 m/z 727의 분자량을 확인하였고, 'Fragmentor voltage'가 커질수록 m/z 727의 피크가 작아지면서 m/z 287의 피크가 생성되는 것을 확인하였다(도 5, 도 6).

<41> 이와 같은 결과로부터, 오미자 색소 추출물에 함유되어 있는 주된 화합물의 아글리콘은 분자량(m/z 값)이 287인 시아니딘임을 확인할 수 있었다.

<42> 이어서, 산분해를 이용하여 정제된 화합물의 추가 구조를 확인하고자 하였다. 산분해물을 이용하여 HPTLC를 수행하였는데, 그 결과 시아니딘에는 람노오스, 자일로오스, 글루코오스가 각각 결합되어 있음을 확인

할 수 있었다. 이 물질들의 분자량을 시아니딘의 분자량에 모두 더한 결과, 오미자 추출물 중 주된 성분으로 함유되어 있는 화합물과 그 분자량이 일치함을 확인할 수 있었다.

<43> 이상과 같은 단계 1 내지 5의 과정을 통해, 오미자로부터 추출되어 그 추출액 중 약 90% 이상의의 고농도로 존재하는 화합물의 구조는 상기의 화학식 1에 제시된 바와 같은 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)라는 것을 확인할 수 있었다.

<44> 또한, NMR 분석을 통해 오미자로부터 추출되어 그 추출액 중 약 90% 이상의 고농도로 존재하는 화합물의 구조가 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)라는 것이 재차 확인되었다.

효 과

<45> 이상 상기에서 살펴본 바와 같이 본 발명은 안토시아닌 색소인 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)가 오미자 색소 조추출물의 안토시아닌 중에서 90% 이상의 고농도로 존재함을 새롭게 규명하고, 이와 같은 사실로부터 이 물질에 대한 새로운 추출원으로 오미자가 될 수 있고, 단분리에 의해 고농도 회수가 가능함을 제시한다.

<46> 이와 같이 오미자 과실로부터 고농도로 대량 회수가 가능한 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)은 색소체의 연구용 표준시약으로 사용될 수 있고, 생리활성물질 혹은 항산화물질로서 동물실험을 포함한 임상실험에도 활용이 가능하며, 노화방지용 식품의 소재로도 활용이 될 수 있으므로 매우 유용한 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<47> 상기 본 발명의 수단 및 효과를 하기 실시예에서 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위는 하기 실시예에만 한정되는 것이 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 이탈하지 않는 범위 내에서의 변형까지를 포함한다.

<48> **실시예 1: 오미자 과실로부터 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)의 추출 및 동정**

<49> 단계 1: 오미자 과실로부터 조추출액의 수득

<50> 본 단계에서 추출원으로 사용된 오미자는 2005년 10월 경상북도 문경에서 수확된 것으로, -20℃에서 보관하며 실험에 사용하였다.

<51> 먼저, 생오미자 과실 200 g을 1 L의 DDW에 넣어 4 ℃에서 24시간 동안 반응시켜 용출물을 획득하였다. 그 후, 오미자 과실 잔사의 제거를 위하여 100 메쉬 체를 이용하여 여과하였다. 그 후, 불순물 제거를 위하여 'Mixed Cellulose Ester Membrane Filter, Pore size 0.2 mm, Diameter 47 mm (ADVENTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)'를 사용하여 감압 여과함으로써 오미자 용출액을 일차적으로 수득하였다.

<52> 상기 오미자 용출액으로부터 색소를 함유하는 조추출물을 획득하고자, 소수성 물질을 걸러낼 수 있는 'Sep-pak® Plus C18 카트리지 (Waters, USA)'를 이용하여 안토시아닌 색소 함유 조추출액을 추출하였다. 먼저, 메탄올 10 mL로 상기의 카트리지를 활성화시켰다. 그 후, DDW 10 mL로 카트리지를 세척하였다. 이어서, 상기에서 획득한 오미자 용출액 10 mL를 카트리지에 주입시켰다. 그 후, 0.01% HCl 수용액 5 mL로 불순물 제거하고, 0.01%의 HCl 메탄올 용액 5 mL로 색소체를 추출하였다. 최종적으로 'SPD1010 Intergrated SpeedVac System (Thermo Savant, USA)'를 이용하여 상온에서 농축함으로써 오미자로부터 조추출액을 수득하였다.

<53> 단계 2: 단계 1에서 수득한 오미자 조추출액의 분석

<54> 오미자 색소 조추출물을 'High performance liquid chromatography'를 이용하여 분석하였고, 그 분석 조건은 다음과 같았다.

<55> • HPLC : Summit HPLC system (Dionex, USA)

<56> • Analytical Column : XTerra™ RP, 4.6×250 mm (Waters, Ireland)

<57> • Detector : UVD 170U/340U UV/VIS Detector (Dionex, USA)

<58> • UV-Vis wavelength : 520 nm

<59> • Analytical Eluent (A) : 0.1 % TFA

<60> • Gradient Eluent (B) : 0.1 % TFA in DDW:ACN (=1:1)

<61> • Gradient

<62>

시간	%B
0	20
18	33
30	40
40	40
42	20
50	20

<63> • Flow rate : 1.0 mL/min

<64> • Injection volume : 20 mL

<65> 이상의 조건으로 HPLC/UV-Vis 검출기를 이용해 분석한 결과, 오미자 색소 조추출물의 안토시아닌 중에서 특정 화합물이 94.1 %로 주된 비율을 차지함을 알 수 있었다(도 1).

<66> 단계 3: 상기 단계 2에서 확인된 주된 부분을 차지하는 특정 화합물의 분자량(m/z 값) 확인

<67> 오미자 색소 조추출물 중 주된 부분을 차지하는 화합물을 'High performance liquid chromatography-Mass spectrometry'를 이용하여 분석하였고 그 조건은 다음과 같았다.

<68> • HPLC/MS system : Agilent 1100 LC/MSD (Agilent, USA)

<69> • Analytical Column : XTerra™ RP, 4.6×250 mm (Waters, Ireland)

<70> • Detector : UVD (Agilent technologies, USA)

<71> • UV-Vis wavelength : 520 nm

<72> • Mass spectra : Agilent 1100 series MSD (Agilent technologies, USA)

<73> • Electrospray mode : Positive mode

<74> • Analytical Eluent (A) - 0.1 % TFA

<75> • Gradient Eluent (B) - 0.1 % TFA in DDW:ACN (=1:1)

<76> • Gradient

<77>

시간	%B
0	20
18	33
30	40
40	40
42	20
50	20

<78> • Flow rate : 0.8 mL/min

<79> • Injection volume : 20 mL

<80> 이상과 같은 조건으로 HPLC/MS를 이용해 분석한 결과, 오미자 색소 조추출물의 주된 화합물의 분자량(m/z 값)은 727임이 확인되었다(도 2).

<81> 단계 4: 단계 3에서 확인된 주된 화합물의 'Semi-Preparative HPLC'를 이용한 분취 및 정제

<82> 상기에서 확인된 분자량(m/z 값) 727인 화합물 분획을 'Semi-Preparative HPLC'를 이용하여 분취한 후 정제하였는데, 그 조건은 아래와 같았다.

<83> • System controller : SCL-10AVP (Shimadzu, Japan)

<84> • Detector : SCL-10AVP UV-Vis Detector (Shimadzu, Japan)

<85> • UV-Vis wavelength : 280 nm, 400 nm

<86> • Column : PREP-ODS (H) KIT (30×250 mm) (Shimadzu, Japan)

<87> • Analytical Eluent (A) - 0.1 % TFA

<88> • Gradient Eluent (B) - 0.1 % TFA in DDW:ACN (=1:1)

<89> • Gradient

<90>

시간	%B
0	20
40	33
45	40
65	40
70	20
100	20

<91> • Flow rate : 10 mL/min

<92> • Injection volume : 1 mL

<93> 이상과 같은 조건에 의해 'Semi-Preparative HPLC'를 이용하여 분자량(m/z 값) 727인 화합물의 피크만을 분취하여 정제하였다(도 3).

<94> 단계 5: 상기 단계 4에서 정제된 화합물의 동정

<95> 상기 단계 4에서 정제된 화합물을 HPLC/UV-Vis로 확인한 결과, 하나의 피크만이 확인되었고, 그 결과 단일 물질로 정제되었음을 확인할 수 있었다(도 4). 이 때 사용한 분석 방법은 단계 2와 동일하였다.

<96> 한편, 본 단계에서는 HPLC/MSD를 사용하여, 'Fragmentor voltage' 75 eV에서 m/z 727의 분자량을 확인하였고, 'Fragmentor voltage'가 커질수록 m/z 727의 피크가 작아지면서 m/z 287의 피크가 생성되는 것을 확인하였다(도 5, 도 6).

<97> 이와 같은 결과로부터, 주된 화합물의 아글리콘은 m/z가 287인 시아니딘임을 유추할 수 있었다. 이 때의 분석 방법은 상기의 단계 3과 동일하였다.

<98> 이 후, 산분해를 이용하여 정제된 화합물에 결합된 당의 구조를 확인하고자 하였다. 정제물의 산분해 방법은 다음과 같았다.

<99> ① 정제 농축액 1 mL을 바이얼(Vial)에 넣고 4 M TFA를 1 mL 첨가하여 상온에 1시간 동안 방치하였다.

<100> ② 120℃ 에서 2시간 동안 반응시켰다.

<101> ③ 'SPD1010 Intergrated SpeedVac System (Thermo Savant, USA)'를 이용하여 상온에서 완전히 건조시켰다.

<102> ④ 건조 후 1 mL의 DDW를 첨가하여 녹인 후 -20 ℃에서 보관하였다.

<103> 산분해 후, HPTLC를 이용하여 당의 조성을 확인하였고(도 7), 이 때 사용한 분석 방법은 다음과 같았다.

<104> ① HPTLC 플레이트는 'Si 50000 HPTLC plates, 10 H 20 cm (E. Merck, Darmstadt, Germany)'를 사용하였다.

<105> ② 전개용매로는 'n-propanol : water : Triethylamine : 30% NH_3 = 80 : 20 : 0.2 : 4'로 하는 용매를 사용하였다.

<106> ③ 발색시약으로는 'N-(1-naphtyl) ethylenediamine : Sulfuric acid : Methanol = 0.3 : 5 : 95'로 하는 용매를 사용하였다.

<107> ④ 표준물질(Standard materials)은 람노오스(Rhamnose), 글루코오스(Glucose), 갈락토오스(Galactose), 자일로오스(Xylose), 아라비노오스(Arabinose)를 사용하였다.

<108> ⑤ 표준물질과 시료(정제물, 산분해물)를 로딩하였다.

<109> ⑥ 전개용매를 이용하여 전개시킨 후, 약 1시간 동안 후드에 방치하였다.

<110> ⑦ 발색시약을 도포한 후 121 ℃에서 10 분간 발색시켰다.

<111> 이상의 조건으로 시아니딘에 붙어 있는 당 성분을 분석한 결과(도 7), 람노오스, 자일로오스, 글루코오스가 결합되어 있음을 확인할 수 있었다.

<112> 이 후, 추가적인 HPTLC를 이용하여 정제된 화합물과 산분해물의 안토시아닌 조성을 확인하였다. 그 결과, 도 8에서 보는 바와 같이 당이 가수분해되지 않고 붙어 있는 정제물은 당의 친수성 때문에 HPTLC상에서 전개가 잘 됨을 확인할 수 있었고, 당이 가수분해되고 기본 골격만 남은 산분해물은 친수성이 거의 없어져 HPTLC상에서 전개가 거의 안 됨을 확인할 수 있었다.

<113> 이상의 결과로서, 본 발명의 오미자 색소 추출물 중 주된 화합물은 시아니딘을 기본 구조로 하고, 여기에 당이 붙은 형태라는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 이때의 분석 방법은 다음과 같았다.

<114> ① HPTLC 플레이트는 'Cellulose F 25 TLC 플레이트 20×20 (Merck, Germany)'를 사용하였다.

<115> ② 전개용매는 'HOAc : HCl : DDW = 15 : 3 : 82'로 하는 용매를 사용하였다.

<116> ③ 표준물질은 시아니딘 클로라이드(Cyanidin chloride; Extrasynthase, Genay, France)를 사용하였다.

<117> ④ 표준물질과 시료(정제물, 산분해물)를 로딩하였다.

<118> ⑤ 전개용매를 이용하여 전개시킨 후 약 1시간 동안 후드에 방치하였다.

<119> 이상과 같이 단계 1 내지 5로 설명된 일련의 과정을 통해, 오미자로부터 추출된 주된 화합물의 구조가 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)라는 것을 확인할 수 있었다.

<120> **실험예 1: 상기 실시예 1에서 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)로 동정된 오미자로부터 추출된 주된 화합물의 NMR 구조 분석**

<121> 본 실험예에서는 상기 실시예 1에서 시아니딘-3-O-(2^G-O-자일로실루티노사이드)로 동정된 오미자로부터 추출된 주된 화합물의 NMR 구조 분석을 수행하였다.

<122> ^1H and ^{13}C에 대한 'NMR spectra (AC500, Bruker, Germany)'는 25℃에서 CF_3CO_2D:CD_3OD=1:19 (v/v)를 용매로 하여 500.13 MHz로 측정되었다. 그 외의 여타 측정 조건은 NMR 측정시 사용하는 통상적인 방법을 사용하였다.

<123> (1) 수소 핵 자기 공명 스펙트럼

<124> 5% TFA함유-메탄올(CF_3CO_2D:CD_3OD=1:19 (v/v), 25℃, 500.13 MHz)을 용매로 하여 측정한 수소 핵 자기

공명 스펙트럼의 결과는 다음과 같았다.

<125> ^{1}H-NMR (5% CF_3CO_2D-CD_3OD) δ = 8.85 (s, H-4), 6.68 (s, H-6), 6.89 (s, H-8), 8.01 (d, J=2.0, H-2'), 7.03 (d, J=8.5, H-5'), 8.25 (dd, J=9.0, 2.0, H-6'), 5.46 (d, J=7.5, H-1''), 3.98 (t, J=8.5, H-2''), 3.77 (m, H-3''), 3.46 (t, J=5.0, H-4''), 3.73 (dd, J=11.5, 5.5, H-5''), 4.06 (d, J=11.0, H-6''), 4.78 (d, J=8.0, H-1'''), 3.08 (t, J=11.0, H-2'''), 3.21 (t, J=9.0, H-3'''), 3.46 (m, H-4'''), 3.64 (dd, J=9.5, 3.5, H-5'''), 4.65 (s, H-1''''), 3.78 (t, J=3.5, H-2''''), 3.64 (dd, J=9.5, 3.5, H-3''''), 3.31 (d, J=1.5, H-4''''), 3.57 (d, J=6.5, H-5''''), 1.16 (d, J=6.0, H-6'''')

<126> (2) 탄소 핵 자기 공명 스펙트럼

<127> 5% TFA함유-메탄올(CF_3CO_2D:CD_3OD=1:19 (v/v), 25℃, 500.13 MHz)을 용매로 하여 측정한 탄소 핵 자기 공명 스펙트럼의 결과는 다음과 같았다.

<128> ^{13}C-NMR (5% CF_3CO_2D-CD_3OD) δ = 164.04 (C-2), 145.17 (C-3), 135.45 (C-4), 159.04 (C-5), ND (C-6), 170.45 (C-7), ND (C-8), 157.50 (C-9), 113.24 (C-10), 121.24 (C-1'), 118.63 (C-2'), 147.52 (C-3'), 155.93 (C-4'), 117.48 (C-5'), 128.74 (C-6'), 101.20 (C-1''), 81.90 (C-2''), 78.06 C-3''), 70.97 (C-4''), 77.39 (C-5''), 67.72 (C-6''), 105.93 (C-1'''), 75.82 (C-2'''), 71.88 (C-3'''), 70.97 (C-4'''), 67.30 (C-5'''), 102.16 (C-1''''), 71.88 (C-2''''), 72.50 (C-3''''), 73.98 (C-4''''), 69.83 (C-5''''), 17.88 (C-6'''')

<129> 이상의 수소 핵 자기 공명 스펙트럼 및 탄소 핵 자기 공명 스펙트럼 결과 확인된 구조는 도 9와 같았으며, 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)로 확인되었다.

도면의 간단한 설명

<130> 도 1은 HPLC/UV-Vis 검출기를 이용해 분석한 결과, 오미자 색소 조추출물의 안토시아닌 중에서 특정 화합물이 94.1 %로 주된 비율을 차지함을 나타내는 결과이고,

<131> 도 2는 HPLC/MS를 이용해 분석한 결과, 오미자 색소 조추출물의 주된 화합물의 m/z가 727임을 확인시켜 주는 결과이며,

<132> 도 3은 'Semi-Preparative HPLC'를 이용하여 주된 화합물의 피크만을 분취하는 것을 보여주는 결과이고,

<133> 도 4는 분취되어 정제된 화합물을 HPLC/UV-Vis 검출기로 확인한 결과, 하나의 피크만이 확인되어, 단일 물질로 정제됨을 확인시켜 주는 결과이며,

<134> 도 5 및 6은 HPLC/MSD로 확인 결과, 'Fragmentor voltage' 75 eV에서 m/z 727의 분자량이 확인되고, 'Fragmentor voltage'가 커질수록 m/z 727의 피크가 작아지면서 m/z 287의 피크가 생성되는 것을 확인시켜 주는 결과이고,

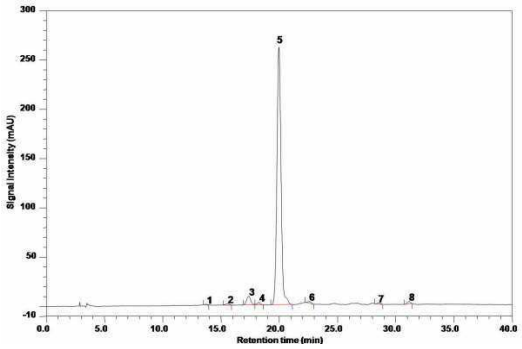
<135> 도 7은 오미자 색소 추출물의 주된 화합물에 결합된 당의 종류를 확인하기 위하여 HPTLC를 이용하여 당 조성을 확인한 결과이며,

<136> 도 8은 HPTLC를 이용하여 정제된 화합물과 산분해물의 안토시아닌 조성을 확인시켜 주는 결과이고.

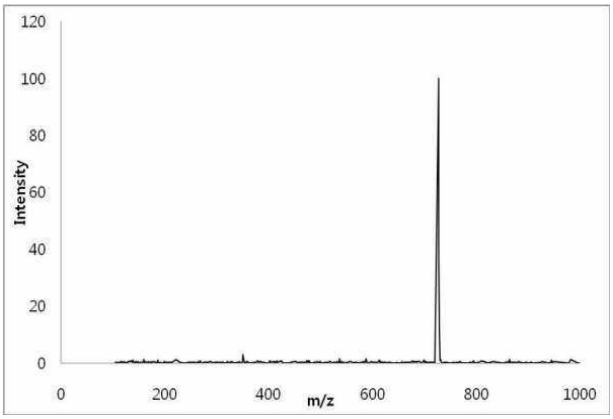
<137> 도 9는 NMR 분석을 통해 오미자 색소 추출물의 주된 화합물의 구조가 시아니딘-3-O-(2^{G}-O-자일로실루티노사이드)임을 확인시켜주는 결과이다.

도면

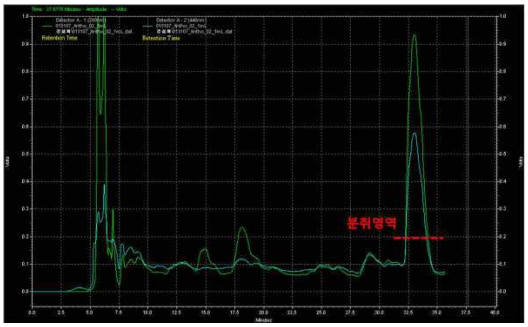
도면1



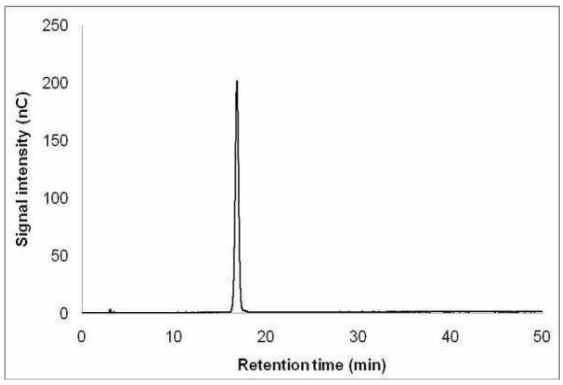
도면2



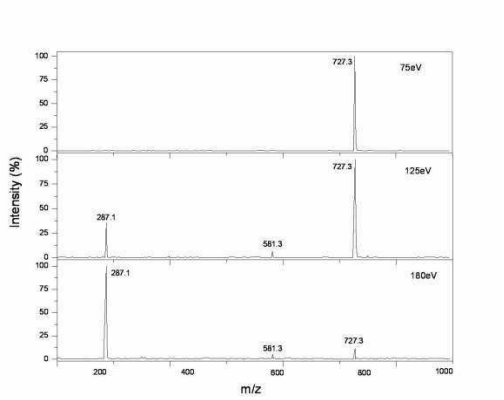
도면3



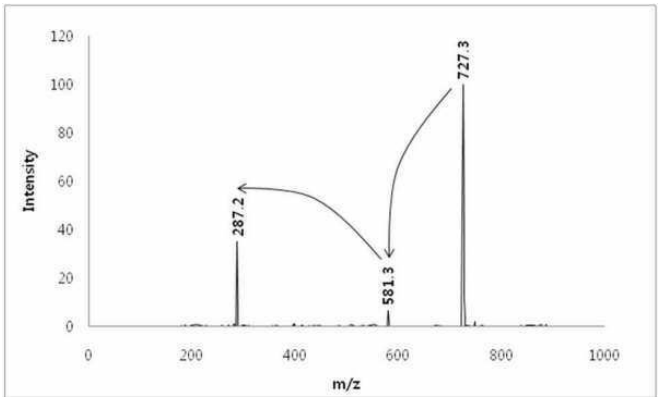
도면4


Signal intensity (nC)
Retention time (min)

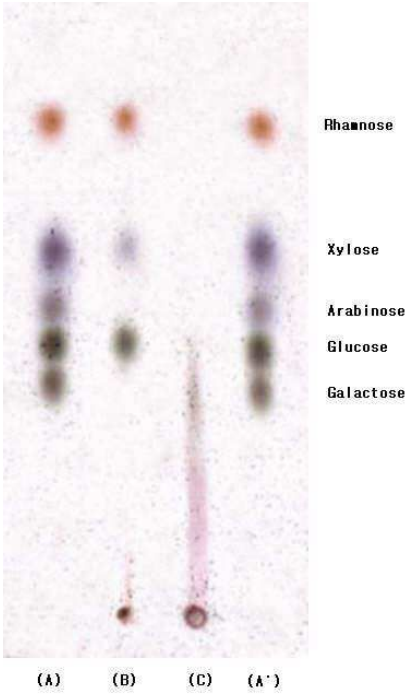
도면5


Intensity (%)
m/z
727.3
75eV
125eV
180eV
287.1
581.3

도면6

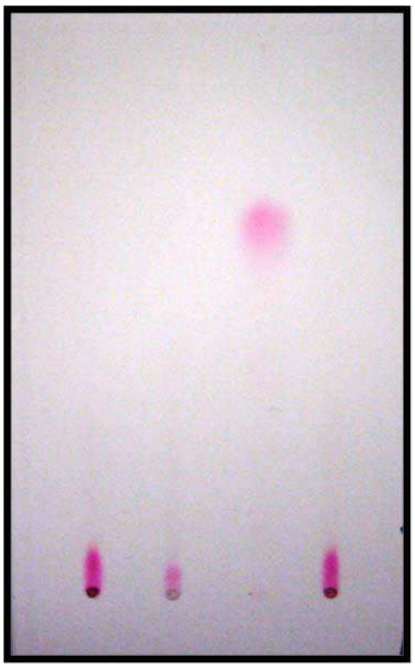

Intensity
m/z
727.3
287.2
581.3

도면7



(A) 표준물질
(B) 산분해물
(C) 점제물
(A') 표준물질

도면8



(A) 시아니딘 표준물질
(B) 산분해물
(C) 점제물
(A') 시아니딘 표준물질

도면9

