



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0050779
(43) 공개일자 2011년05월17일

(51) Int. Cl.

B01D 15/00 (2006.01) *G01N 30/02* (2006.01)

A61K 36/484 (2006.01) *A61P 17/18* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0107300

(22) 출원일자 2009년11월09일

심사청구일자 2009년11월09일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

(72) 발명자

임순성

강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102동 401호

이연실

강원도 춘천시 후평2동 포스코더샵아파트 103동 805호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 천지

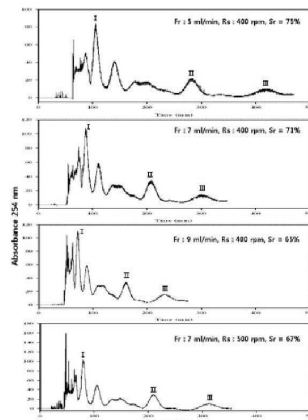
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 감초로부터 항산화 물질의 분리방법

(57) 요약

본 발명은 감초로부터 항산화능이 뛰어난 여러 물질을 동시에 분리하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 고속항류크로마토그래피를 이용하여 감초로부터 항산화능이 뛰어난 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 동시에 분리하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 감초로부터 동시에 항산화능을 가진 여러 화합물을 높은 순도와 수율로 분리할 수 있으므로, 항산화물질이 이용되는 의료산업, 식품산업 및 화장품산업을 포함한 다양한 산업에 응용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

김선하

강원도 평창군 대관령면 황계 9/1 320-13

김진규

강원도 춘천시 퇴계동 퇴계뜨란채아파트 1005동 1103호

신현경

서울 성북구 안암동 1가 361번지 래미안 안암아파트 104동 602호

윤정환

강원도 춘천시 후평1동 846-1 현대맨손 101동 101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070301034039

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 바이오그린 21

연구과제명 감초 및 국화과 국내 농산자원의 암예방 효능평가 및 식·의약 신소재화 연구(국내 농산
자원의 활성물질 분리/구조 규명 및 기능성 소재개발)

기여율

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2009년 01월 01일 ~ 2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

고속항류크로마토그래피 장치의 컬럼에 고정상 용매를 충전하는 단계;

상기 고정상 용매가 충전된 컬럼을 회전시키면서 상기 컬럼에 이동상 용매를 주입하는 단계;

상기 고정상과 이동상이 유체학적 평형을 이루는 시점에 감초 추출물을 시료 투입구를 통해 주입하는 단계 및 용출액으로부터 항산화물질을 분리하는 단계를 포함하고,

상기 고정상 용매 및 이동상 용매는 n-헥산, 에틸아세트산, 메탄올 및 물이 부피비(v/v)를 기준으로 6 내지 6.5 : 5 내지 5.5 : 5.7 내지 6.3 : 3.7 내지 4.3(n-헥산 : 에틸아세트산 : 메탄올 : 물)로 혼합한 혼합용매를 상온에서 정치시킨 후, 생성된 두 개 층 중 상층이 고정상 용매이고, 하층이 이동상 용매인

고속항류크로마토그래피를 이용하여 감초로부터 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A을 동시에 분리하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 감초 추출물은 탄소수 1 내지 5의 알코올, 헥산, 디클로로메탄, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 에틸아세테이트, 에틸에테르 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 용매로 이용하여 수득한 것인 감초로부터 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A을 동시에 분리하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 이동상 용매를 주입하는 단계는 이동상 용매를 6 ml/min 내지 8 ml/min의 유속으로 주입시키는 것을 특징으로 하는 감초로부터 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A을 동시에 분리하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 이동상 용매를 주입하는 단계에서 컬럼의 회전은 350 rpm 내지 550 rpm으로 회전시키는 것을 특징으로 하는 감초로부터 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A을 동시에 분리하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항산화능을 포함한 다양한 기능성을 가진 3종의 항산화 물질을 감초로부터 동시에 분리할 수 있는 분리방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 감초(*Glycyrrhiza* sp)의 뿌리와 뿌리줄기(지하경)는 전세계적으로 오랫동안 약초와 천연 감미료로서 사용되었다. 감초 뿌리는 소화성 궤양(peptic ulcer), C형 간염(hepatitis C), 폐병(pulmonary diseases) 및 피부병(skin diseases)을 치료하는 전통적 약제로 주로 사용되었다. 약리학적 연구에 의해 그들은 항산화제, 항바이러스제, 항염증제, 항암제, 면역조절(immunomodulatory), 간보호(hepatoprotective) 및 심장보호(cardioprotective)와 같은 생물학적 활성을 가지고 있음이 보고되어 있다. 또한, 감초로부터 트리테펜 사포닌

(triterpene saponins), 플라보노이드(flavonoids), 아이소플라보노이드(isoflavonoids) 또는 칼콘(chalcone s)과 같은 다수의 기능성 물질들이 분리되었다. 이 중에서 다양한 플라보노이드(flavonoids)가 주요 생물활성을 지닌 성분으로 알려져 있다.

[0003] 특히, 디하이드로그리아스페린 C(dehyroglyasperin C), 디하이드로그리아스페린 D(dehyroglyasperin D) 및 아이소안구스톤 A(isoangustone A)는 최근 보고된 결과에 의하면, quinone reductase나 glutathione S-transferase와 같은 독소제거 효소(detoxifying enzymes)를 유도하고, PPAR-감마 리간드와 결합 활성(PPAR-gamma ligand-binding activity)이 상당하며, 높은 항염증 활성이 있는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 한편, 액체 크로마토그래피 분리 후의 라디칼 소거 화합물을 검출하기 위해 2,2'-diphenyl-picrylhydrazyl radical (DPPH·)과 2,2'-axinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate radical cation (ABTS+·)를 활용하는 많은 논문들이 발표되었는데, 이는 이들이 높은 민감성을 가지며 다루기 쉽기 때문이다. 또한, 온라인상의 HPLC 바이오어세이법(on-line HPLC bioassay method)은 간단한 조작법으로 혼합매트릭스(complex matrixes)에서 개개의 항산화제(antioxidant)를 민감하게 확인할 수 있다는 이점이 있다. 따라서, ABTS+· - HPLC 온라인 기술을 적용하면, 감초에 있는 라디칼 소거 성분을 빠르게 확인할 수 있다. 이러한 기술은 기존의 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)나 고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography)(HPLC)와 같은 전통적인 방법을 사용하여 자연산물로부터의 생물활성 성분을 분리 및 정제하는 방법에 비하여 신속하고 간편하다는 장점이 있다.

[0005] 고속역류크로마토그래피(High-speed countercurrent chromatography, HSCCC)는 Ito에 의해 처음에 발명되었는데, 이는 어떤 흡착제(sorbent)도 없이 액체-액체 분획 크로마토그래피(liquidliquid partition chromatography)의 일종으로, 전통적인 컬럼 크로마토그래피에 있는 고체 지지체위에서 샘플의 비가역적 흡수를 없앤다. 이 기술은 뛰어난 샘플 회수와 HPLC와 비교시 더 넓은 범위의 용매시스템을 선택하는 최대치의 능력을 가지고 있다.

[0006] 이러한 고속역류크로마토그래피를 이용하여 물질을 분리하는 경우에는 시료 및 물질의 화학적 특성에 따라 고정상 및 이동상을 구성하게 될 용매시스템 즉, 혼합용매의 종류 및 조성을 조절하여야 하고, 또한 선택된 용매시스템을 이용하여 고속역류크로마토그래피를 수행함에 있어서, 분리된 물질의 순도, 분리효율 및 시간을 향상시키기 위한 조건을 설정하여야 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 감초로부터 항산화능이 우수한 여러 물질을 동시에 분리하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 보다 구체적으로, 본 발명은 종래 기술의 문제점을 해결한 고속항류크로마토그래피법을 이용하여 감초로부터 항산화능이 우수한 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 동시에 분리하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감초로부터 항산화능이 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 동시에 분리하는 방법을 제공한다.

[0010] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0011] 본 발명자들은 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)로부터 항산화 물질을 분리하는 방법을 연구하던 중, 다양한 기능성을 가진 항산화 물질인 디하이드로그리아스페린 C(dehyroglyasperin C), 디하이드로그리아스페린 D(dehyroglyasperin D) 및 아이소안구스톤 A(isoangustone A)를 보다 간편한 방법으로 동시에 분리하기 위하여 고속항류크로마토그래피(high-speed counter current chromatography)법으로 분리과정을 수행하던 중, 특정 용매 시스템을 이용하여 특정 조건에서 고속항류크로마토그래피를 수행하는 경우, 고순도의 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 효과적으로 분리할 수 있다는 것을 확인하여, 이를 토대로 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 본 발명은 감초로부터 항산화능이 우수한 물질을 분리하는 방법에 관한 것이다.

- [0013] 본 발명에 있어서, 감초는 장미목 콩과에 속하는 여러해살이풀이고, 천연 생약으로 이용되는 식물 중에서 그 생 산지가 상이한 종류를 혼용하고 있는 대표적 식물을 의미한다. 상기 감초는 일 예로 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)일 수 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 고속역류크로마토그래피(High-speed countercurrent chromatography, HSCCC)란 어떤 흡착제 (sorbent)도 없이 액체-액체 분획 크로마토그래피(liquidliquid partition chromatography)의 일종으로, 2상계 용매시스템 또는 2상 용매의 상층상 또는 상층과 하층상 또는 하층 중 어느 한 층을 고정상으로 이용하여, 코일 상 튜브 컬럼 내에 충전시킨 후, 상기 컬럼 내에서 고정상을 원심력으로 유지시키면서, 다른 한 층을 이동상으로 주입하고 배출시켜 특정 성분을 분리하는 액체-액체 분획 크로마토그래피를 의미한다.
- [0015] 본 발명은 감초로부터 고속항류크로마토그래피법을 이용하여 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 동시에 분리하는 방법에 관한 것이다.
- [0016] 구체적으로 본 발명은 고속항류크로마토그래피 장치의 컬럼에 고정상 용매를 충전하는 단계; 상기 고정상 용매가 충전된 컬럼을 회전시키면서 상기 컬럼에 이동상 용매를 주입하는 단계; 상기 고정상과 이동상이 유체학적 평형을 이루는 시점에 감초 추출물을 시료 투입구를 통해 주입하는 단계 및 용출액으로부터 향산화물질을 분리하는 단계를 포함하는 고속항류크로마토그래피를 이용하여 감초로부터 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 동시에 분리하는 방법에 관한 것이다.
- [0017] 상기 고속항류크로마토그래피 장치의 컬럼에 고정상 용매를 충전하는 단계는 고속항류크로마토그래피 장치의 컬럼, 일 예로 다층의 코일 컬럼(multilayer coil column)에 고정상 용매를 충전할 수 있으며, 상기 고정상 용매의 충전 속도는 일 예로 10 내지 20 ml/min 또는 10 내지 15 ml/min일 수 있다.
- [0018] 상기 고정상 용매가 충전된 컬럼을 회전시키면서 상기 컬럼에 이동상 용매를 주입하는 단계는 상기 고정상 용매가 충전된 컬럼을 일정 속도로 회전시키면서, 이동상 용매를 주입하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 컬럼의 회전 속도는 컬럼 효율성 및 피크 분리능과 관련된 고정상의 체류(Sr)를 고려하여 결정될 수 있다.
- [0019] 상기 고정상의 체류가 높을수록 피크 분리능이 좋아지고, 상기 컬럼의 회전 속도가 너무 낮은 경우 컬럼 내 머 무는 정지상의 양이 감소하여 분리효율이 떨어질 수 있으며, 상기 컬럼의 회전 속도가 너무 높은 경우에는 상승 된 압력에 의해 컬럼 내 violent pulsation이 발생하고, 이로 인해 분리되는 시료의 band가 너무 넓어지는 (broadening) 경향이 있으므로, 상기 컬럼의 회전 속도는 바람직하게는 컬럼 효율성 및 피크 분리능이 우수한 회전 속도인 350 rpm 내지 550rpm, 바람직하게는 375 rpm 내지 525 rpm, 더욱 바람직하게는 375 rpm 내지 425 rpm일 수 있다.
- [0020] 상기 이동상 용매의 주입속도가 너무 낮은 경우에는 용출시간이 길어져 공정상의 문제점이 있고, 상기 주입속도가 너무 높은 경우에는 고정상의 체류가 낮아 컬럼 효율성 및 피크 분리능이란 점에서 문제점이 있으므로, 상기 이동상 용매의 주입속도는 6 ml/min 내지 8 ml/min, 더욱 바람직하게는 6.5 ml/min 내지 7.5 ml/min일 수 있다.
- [0021] 상기 고정상 용매 및 이동상 용매는 2상계(two-phase) 용매시스템의 상층상(upper phase)와 하층상(lower phase)일 수 있다.
- [0022] 상기 2상계 용매시스템은 n-헥산, 에틸아세트산, 메탄올 및 물의 혼합 용매일 수 있다. 상기 혼합 용매의 혼합 비는 분배계수(K)와 정착시간을 고려하여 결정될 수 있으며, 분리대상 첫 번째 물질이 너무 분리 피크의 전진선 가까이에서 용출될 경우 만족스런 분리를 얻을 수 없고, 분리대상 물질 간의 분배계수 값의 차가 균등하지 않는 경우에는 특정 물질에 대한 분리가 원활하게 이루어지지 아니할 수 있다. 또한, 분리대상 물질인 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 고려하면, 상기 분배계수는 0.3 내지 2.5 사이의 값에서 각 물질에 대한 분배계수의 값의 차가 균등한 것이 가장 바람직하다.
- [0023] 이러한 측면에서, 상기 n-헥산, 에틸아세트산, 메탄올 및 물의 혼합비(v/v)는 부피비를 기준으로 바람직하게는 6 내지 6.7 : 5 내지 5.7 : 5.7 내지 6.3 : 3.7 내지 4.3(n-헥산 : 에틸아세트산 : 메탄올 : 물), 더욱 바람직하게는 6.3 내지 6.7 : 5.3 내지 5.5 : 5.8 내지 6.2 : 3.8 내지 4.2(n-헥산 : 에틸아세트산 : 메탄올 : 물)일 수 있다.
- [0024] 상기 고정상과 이동상과 관련하여, 상기 용매시스템 즉, n-헥산, 에틸아세트산, 메탄올 및 물을 본 발명의 혼합 비로 혼합하고 상온에서 정치시킨 후, 생성된 두 개 층중에서 상층상 또는 상층이 고정상 용매이고, 하층상 또는 하층이 이동상 용매로 사용된다.

- [0025] 상기 시료를 주입하는 단계는 상기 고정상과 이동상이 유체학적 평형을 이루는 시점에 시료 주입구를 통하여 시료를 투입하는 방법으로 수행할 수 있고, 상기 시료는 감초 추출물일 수 있다.
- [0026] 상기 감초 추출물은 감초를 통상의 식물 추출법으로 추출하여 수득한 것일 수 있다. 상기 감초는 일 예로, 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 또는 시베리아산 감초(*Glycyrrhiza glabra* var. *glandifera*)일 수 있으며, 바람직하게는 항산화능이 우수한 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)일 수 있다. 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 있고, 더욱 바람직하게는 뿌리일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 감초 추출물은 추출용매를 이용하여 통상의 식물 추출방법으로 제조할 수 있으며, 일 예로 용매 추출법 또는 초음파 추출법, 바람직하게는 초음파 추출법을 이용할 수 있다.
- [0028] 상기 추출용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 헥산, 디클로로메탄, 염화 메틸렌(메틸렌 클로라이드), 클로로포름, 에틸아세테이트, 에틸에테르 또는 이들의 혼합용매일 수 있고, 바람직하게는 염화 메틸렌일 수 있다.
- [0029] 상기 초음파 추출법은 초음파 분쇄 추출법일 수 있고, 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 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. 또한, 상기 방법에 의해 제조된 추출물은 감압 여과과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다.
- [0030] 구체적으로, 상기 감초 추출물은 유수로 세척한 감초 뿌리를 마쇄기로 분쇄하고, 메틸렌 클로라이드를 가한 후에, 초음파 분쇄 추출기를 이용하여 초음파 분쇄 추출을 수행하는 방법으로 제조할 수 있다. 상기 추출물은 수득된 추출액에 대해 여과과정을 수행하거나 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 제조할 수 있다. 상기 여과과정을 수행하여 추출액에 남아 있는 잔사 등을 제거할 수 있으며, 상기 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 수분을 제거할 수 있다.
- [0031] 상기 고정상과 이동상이 유체학적 평형을 이루는 시점은 상기 주입된 이동상 용매가 컬럼의 배출구에서 방출되는 시점일 수 있다. 상기 감초 추출물의 주입은 일 예로, 상기 감초 추출물을 시료 투입구를 통해 분리컬럼에 주입하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0032] 상기 용출액으로부터 항산화물질을 분리하는 단계는 UV 검출기, IR 검출기, 다이오드 어레이(Diode array), 또는 형광 검출기를 이용하여 모니터링하거나 HPLC 법 등을 이용하여 모니터링할 수 있으며, 각 피크 분획에 해당하는 물질을 각각 수집하는 방법으로 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 항산화물질을 분리하는 단계는 상기 이동상의 주입속도와 동일한 속도로 분리 밸브를 통해 배출되는 용출액을 수집하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0033] 상기 항산화 물질은 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A일 수 있으며, 상기 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A의 구조식은 도 5에 기재되어 있는 것과 같다.
- [0034] 상기 용출액의 수집은 일 예로, 상기 이동상의 주입속도인 유속이 7 ml/min이고, 회전속도가 400 rpm을 기준으로, 상기 디하이드로그리아스페린 C의 경우 용출액이 배출된 시점으로부터 75분 내지 88분이 경과된 시점의 용출액을 수집하는 방법으로 분리할 수 있고, 상기 디하이드로그리아스페린 D는 용출액이 배출된 시점으로부터 189분 내지 221분이 경과된 시점의 용출액을 수집하는 방법으로 분리할 수 있으며, 상기 아이소안구스톤 A는 용출액이 배출된 시점으로부터 284분 내지 333분이 경과된 시점의 용출액을 수집하는 방법으로 분리할 수 있다. 상기 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A는 그 분리시점인 용출액이 배출된 시점으로부터 경과된 시점의 시간상 간격이 구분되어, 각 물질을 높은 순도로 분리할 수 있을 뿐만 아니라, 한번의 고속항류크로마토그래피를 수행하여 세가지 물질을 동시에 분리할 수 있다는 점에서 본 발명의 용매 시스템 및 고속항류크로마토그래피 작동 조건은 유리한 효과를 갖는다.
- [0035] 상기 분리된 용출액에 대해 감압 증류법을 수행하여 용매를 제거함으로써, 해당 물질을 수득할 수 있다.
- [0036] 상기 방법에 의해 감초 추출물 700 mg으로부터 수득된 각 물질은 디하이드로그리아스페린 C의 경우 72.3 mg이고, 순도는 95.1%이며, 디하이드로그리아스페린 D의 경우 73 mg이고, 순도가 96.2%이며, 아이소안구스톤 A는 47.1 mg이고, 순도가 99.5 %이었다.

효 과

- [0037] 본 발명의 분리 방법에 의하면, 감초로부터 항산화능이 뛰어난 물질인 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 하나의 분리과정에서 고순도 및 높은 효율로 동시에 분리할 수 있으므로, 우리나라에서 값싸고 쉽게 구할 수 있는 천연물인 국산 감초를 이용하여 고부가가치를 갖는 항산화물질인 디하이드로그리아스페린 C, 디하이드로그리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 손쉽게 경제적으로 분리할 수 있고, 항산화물질이 사용되는 의료산업, 식품산업 또는 화장품 업계 등과 관련된 다양한 산업에 이용될 수 있으므로, 그 산업적 효과가 매우 크다 할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0038] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 기재한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 일 실시예일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0039] 실시예 1: 시료의 준비

[0040] 실시예 1-1. 시료

- [0041] 본 발명의 실시, 구체적으로 감초 추출물의 제조와 고속항류크로마토그래피(high-speed counter-current chromatography, HSCCC)에 사용된 n-헥산(n-Hexane), 에틸아세트산(ethylacetate), 아세토니트릴(acetonitrile) 및 메탄올(methanol)은 Fisher Scientific(USA)로부터 구입하였다.

- [0042] 감초 추출물의 제조를 위한 감초(*G. uralensis*)의 뿌리는 대한민국 춘천의 약제사에서 구입하였다. 상기 구입한 감초는 추출 전에 분쇄하여 사용하였다.

- [0043] NMR spectra의 기록을 위해서 내부표준물질로 tetramethylsilane를 사용하였고, 600 MHz 스펙트로미터(Bruker)를 사용하였다.

[0044] 실시예 1-2. 감초추출물의 제조

- [0045] 감초(*G. uralensis*)의 뿌리 0.5kg을 3L의 염화메틸렌(methylene chloride)을 용매로 하고, Power SONIC 420 ultrasonic cleaner(Hwashin Instrument Co., 대한민국)를 사용하여 1시간 동안 초음파 추출하였다. 상기 방법에 의해 제조된 추출물을 EYELA N-1000 rotary evaporator(Tokyo Rikakikai Co., Japan)을 이용하여 감압농축함으로써, 고속항류크로마토그래피(High-speed countercurrent chromatography, HSCCC) 분리를 위한 조추출물 125g을 제조하였다.

[0046] 실시예 2: 감초 추출물에 포함된 항산화물질의 분석

- [0047] 감초 내에 포함된 항산화 물질을 분석하기 위하여, 온라인 HPLC-ABTS+ 분석법을 이용하여 라디칼 소거 활성을 측정하였다.

- [0048] 상기 온라인 HPLC-ABTS+ 분석법은 3.5mM 황산칼륨(potassium persulphate)을 함유하는 2mM ABTS+ · 저장용액(stock solution)을 실온 및 암실의 조건에서 밤샘 배양(overnight-incubation)하여 라디칼을 안정화시켰다. 상기 ABTS+시약(reagent)은 물을 이용하여 저장용액(stock solution)을 30배 희석함으로 제조하였다.

- [0049] 항산화 물질의 분리는 2000 Gradient Pump(Thermo Separation Products, USA), AS3000-021 thermostatted autosampler 및 Agilent Zorbax Extend C18 guard column(10mm × 4.6mm i.d., 5 μm)과 연결된 Agilent Zorbax SB-C18 reversed phase column(150 mm × 4.6 mm, i.d., 5 μm)를 지닌 SCM 1000-022 기체제거장치를 이용하여 항온 HPLC 분석법(analytic Thermo HPLC)으로 수행하였다.

- [0050] 이동상(mobile phase)은 0.03% TFA 수용액(A)과 acetonitrile(B)으로 제조하였다. 본 발명의 HPLC의 수행조건(gradient program)은 254nm파장에서 Thermo 6000 LP검출기를 사용하여 0.8 ml/min 유속(flow rate)으로 상기 B를 0 내지 5분에서 30%, 5 내지 13분에서 30%에서 40%로, 13 내지 48분에서 40%에서 65%로, 48 내지 53분에서 65%로 및 53 내지 58분에서 65% 내지 100%이었다. HPLC로 분리된 분석물은 ABTS+를 지닌 post-column과 반응

시켰다. ABTS시약은 지속적으로 Pinnacle PCX(Pickering Lab, 독일)를 통해 0.3 ml/min으로 주입하였다. 상기 분석물에 의한 상기 ABTS 시약의 탈색(bleaching)은 Thermo 2000LP 검출기(Thermo-Electron Corp., Waltham, MA)에 의해 734nm에서 광도를 측정하는 방법으로 검출하였으며, 이는 도 1에 negative peak로 표시되었다.

[0051] 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 734nm에서의 광도 측정시 네거티브 피크를 확인한 결과 감초 추출물에서 높은 라디칼 소거 화합물의 존재를 확인할 수 있었으며, 상기 결과로부터 체류시간(retention time)이 25.47분, 39.48분 및 43.85분을 지닌 세 개의 피크가 이후, HSCCC 분리의 대상으로 특정되었다.

[0052] 실시예 3: 고속항류크로마토그래피(high-speed counter current chromatography, HSCCC)

[0053] 본 발명의 실시를 위한 HSCCC는 세개의 다층 코일컬럼(coil column)이 일련하여 연결되어 있고, 50ml 샘플루프(sample loop)를 지닌 TBE-1000A HSCCC(Tauto Biotechnology Company, China)를 이용하였다. 상기 기기의 PTFE(polytetrafluoroethylene) 튜브 컬럼의 내부 직경은 1.8mm이고 전체부피 수용량(전체 용량)은 1000ml이다. 상기 컬럼의 β 값은 내층에서 0.42고, 외층에서 0.63으로 다양하였다. 본 발명의 HSCCC 기기에는 Merck-Hitachi L-6200 인텔리전트 펌프(Hitach, Japan), 254 nm 에서 작동하는 TOPAZ dual UV 모니터 및 ECOMAC-ECOM Acquisition and control(Version 0.97)을 장착되었다. 본 발명의 HSCCC 기기에서 본 발명의 용매는 펌프를 통하여 컬럼, 구체적으로 PTFE 컬럼으로 이송되며, 상기 용매 중 이동상에 의해 분리되는 항산화물질은 계속 모니터링되었다.

[0054] 또한, HPLC 분석은 G1322A 가스 제거제, G1311A 4차 펌프(G1311A quaternary pump), G1313A 자동 샘플 주입기와 G1315B 포토다이오드 배열 분석기(photodiode array detector) 및 Chemstation RA 10.02 소프트웨어를 지닌 Agilent technologies 1100에 의해 수행되었다.

[0055] 실시예 4: 최적 용매시스템의 구현

[0056] 본 발명의 실시에 있어서, 3가지의 항산화활성을 가진 대상 물질을 동시에 HSCCC법을 통해 분리하기 위한 최적의 용매시스템을 구현하기 위하여, 혼합 용매간의 용매부피를 변화시키면서 2상계(two-phase) 용매시스템을 위한 용매 혼합비를 구하였다. 최적의 용매시스템은 분리 대상 물질에 대한 다양한면서도 이상적인 범위의 분배계수(K)와 짧은 정착시간에 의해 정하여진다.

[0057] 상기 2상계 용매시스템 중 상층상(upper phase)과 하층상(lower phase)을 HPLC에 의해 분석하는 방법으로 측정하였고, 상기 측정값으로부터 상기 분배계수와 정착시간을 구하였다. 보다 구체적으로, 상기 K값은 하층상(lower phase)에 의해 분리된 타겟 화합물의 피크 면적값과 상층상(upper phase)에 의해 분리된 타겟 화합물의 피크 면적값의 비로 나타낸다. 또한, 상기 정착시간(settling time)은 고정상의 컬럼 내 머무름과 관련된 값으로, 2상계 용매시스템의 각 층을 섞었을 때, 두 가지 상 사이에 분명한 층이 형성되어, 2상으로 구분되는 시간으로부터 구하였다.

[0058] 상기 용매시스템에 사용된 용매는 용매의 혼합비를 조절하여 용매시스템에 다양한 소수성(hydrophobicity)을 부여할 수 있는 n-헥산, 에틸아세트산, 메탄올 및 물을 이용하였고, 상기 용매의 혼합비는 최적 용매시스템의 판단 기준인 분배계수와 정착시간에 의해 결정되었다. 세 가지 물질이 동시 즉, 한번의 HSCCC를 통하여 분리될 수 있기 위해서는 상기 분배계수가 각 성분에 대해 0.3 내지 2.5 사이의 값에서 각 성분의 분배계수 값의 차이가 일정한 것으로 결정하였고, 정착시간은 15초 이내로 충분리가 신속히 이루어지며, 가능한 짧은 시간이 되도록 조절하였다.

[0059] 감초 추출물로부터 항산화활성이 있는 상기 대상 물질의 분배계수의 측정은 상층상(upper phase)과 하층상(lower phase)을 HPLC에 의해 분석한 결과를 분석하는 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 상기 분배계수는 상기 도 1에 기재된 항산화활성을 가진 대상 물질 I, II 및 III에 대해 각각 하기 표 1에 기재하였다.

[표 1]

No	Solvent system	혼합비 (v/v)	분배계수(K)			정착 시간(s)
			I	II	III	

1	n-Heptane : ethylacetate : methanol : water	6:4:6:4	0.18	0.64	0.84	11
2	n-Heptane : ethylacetate : methanol : water	6.5:3.5:6:4	0.18	0.71	0.92	15
3	n-Hexane : ethylacetate : methanol : water	8:3:6:4	0.14	0.78	1.42	15
4	n-Hexane : ethylacetate : methanol : water	7:4:6:4	0.24	1.04	1.89	17
5	n-Hexane : ethylacetate : methanol : water	7:3:6:4	0.12	0.74	1.35	17
6	n-Hexane : ethylacetate : methanol : water	7:3:5:4	0.28	1.51	3.28	16
7	n-Hexane : ethylacetate : methanol : water	6.5:5.5:6:4	0.42	1.19	2.00	13
8	n-Hexane : ethylacetate : methanol : water	6:5:5:6:4	0.37	1.25	2.13	13
9	n-Hexane : ethylacetate : methanol : water : isopropanol	6:5:4:4:2	0.62	1.62	2.89	15
10	n-Hexane : ethylacetate : methanol : water : isopropanol	6:5:5:4:1	0.47	1.36	2.36	15

[0062] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, n-헵탄-에틸아세트산-메탄올-물(n-heptaneethylacetatemethanolwater) 혼합용매의 혼합비가 6:4:6:4 (v/v)인 경우에는 이동상이 강한 극성을 가지고, 첫 번째 활성물질인 I이 전전선 가까이에서 용출되어 만족스런 분리를 얻을 수 없었으며, 두 번째 활성물질인 II와 세 번째 활성물질인 III의 분배계수가 가까워, 피크가 겹쳐, 분리효율이 떨어질 우려가 있어 바람직하지 않은 것으로 확인되었다. 또한, n-헵탄-에틸아세트산-메탄올-물-이소프로판올(n-heptaneethylacetatemethanolwater-isopropanol, HEMWiP) 혼합용매의 경우 첫 번째 활성물질인 I의 분배계수값은 향상되었지만, 세 번째 활성물질인 III의 분배계수 값이 높게 나와 바람직하지 않은 것으로 확인되었다.

[0063] 상기 결과를 기초로 에틸아세트산(ethyl acetate)의 부피비율을 증가시키고 n-헥산(n-hexane)의 부피비율을 감소시켜 조절된 n-헵탄-에틸아세트산-메탄올-물(HEMW) 혼합용매의 혼합비인 6.5:5.5:6:4 부피비율에서는 각 활성물질의 분배계수가 0.3 내지 2.5 사이의 값을 가졌고, 각 성분의 분배계수 값의 차이가 일정할 뿐만 아니라, 정작시간도 짧고 컬럼내 머무름 비율도 높아 바람직한 것으로 확인되었다.

[0064] 실시예 5: 최적 HSCCC 작동조건의 확인

[0065] HSCCC에서 고정상의 체류 (Sr)는 컬럼 효율성(column efficiency), 피크 분리능(peak resolution) 및 용질 체류(solute retention)의 유도(derivation) 등과 관련된 중요한 파라미터이다. 보다 구체적으로, HSCCC에서의 대상 물질의 성공적 분리는 컬럼 내에 체류되어 있는 고정상 즉, 고정상(stationary phase)의 체류(retention)에 의해 결정되며, 일반적으로 고정상이 더 높게 체류될수록 피크 분리능은 더 좋아진다.

[0066] 따라서, 최적 HSCCC 작동 조건을 확인하기 위하여 고정상의 유속과 회전속도를 달리하면서 Sr을 측정하고, 상기 측정된 Sr과 고정상의 유속에 따른 용출시간을 고려하여 최적 작동 조건을 구하였다. 상기, HSCCC 작동 조건에 대한 실험에서 용매시스템은 실시예 4에서 최적 용매시스템으로 확인된 n-헥산-에틸아세트산-메탄올-물(HEMW)의 혼합비가 부피비를 기준으로 6.5 : 5.5 : 6 : 4인 시스템을 이용하였고, 샘플과 관련하여 상기 용매시스템 50 ml에 실시예 1에서 제조된 감조 추출물 700 mg을 용해시켜 상기 실험을 수행하였다. 보다 구체적으로, 우선 다층의 코일 컬럼(multilayer coil column)에 상층상(고정상)을 채운 후, 일정 회전속도로 회전하면서, 하층상(이동상)을 펌프를 이용하여 컬럼으로 주입하였다. 이동상 용매가 컬럼의 배출구에서 방출되는 시점을 유체역학적 평형이 확립된 것으로 판단하고, 시료 주입구를 이용하여 샘플용액을 분리컬럼(separation column)내로 주입하였다. 상기 분리컬럼으로부터의 방출물은 254nm에서의 UV검출기를 이용하여 지속적으로 모니터링하였다. 상기 각 피크 분획들은 따로 모아, HPLC를 통하여 분리된 화합물을 확인하였고, 고정상의 체류(Sr)를 측정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0067] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, 동일한 유속인 7 ml/min에서 측정한 결과, 회전속도가 500 rpm인 경우에 비하여 회전속도가 400 rpm인 경우 Sr이 약 4%가 더 높은 71%인 것으로 확인되어, 더 바람직한 것으로 확인되었다. 또한, 동일한 회전속도인 400 rpm일 때, 고정상의 유속을 5 ml/min에서 9 ml/min으로 변화시킨 경우, Sr은 유속이 증가함에 따라 75%에서 65%로 감소되었다. 특히, 5 ml/min에서 7 ml/min으로 유속이 높아진 경우 Sr이 4% 감소한 반면, 7 ml/min에서 9 ml/min으로 유속이 높아진 경우에는 Sr이 6% 감소하여 동일한 유속의 증가 정도에 비하여 Sr의 감소 정도가 현저한 것으로 확인되었다.

[0068] 상기 결과와 유속이 낮은 경우 용출시간이 길어진다는 문제점을 고려하면, Sr, 용출시간 및 피크 분리능에서 가

장 적합한 조건으로 회전속도 400 rpm 및 유속 7 ml/min인 조건이 확인되었다.

[0069] 실시예 6: 활성물질의 확인

[0070] 상기 실시예 5에서 분리된 각 피크의 분석은 HPLC를 통하여 분석되었다. 보다 구체적으로, 상기 HPLC는 상기 실시예 2와 같이, Agilent Zorbax Extend C18 guard column(10mm × 4.6mm i.d., 5 μm)과 연결된 Agilent Zorbax SB-C18 reversed phase column(150 mm × 4.6 mm, i.d., 5 μm)을 사용하여 수행하였다. 이동상은 0.1% 물에서의 트리플로오르아세트산(TFA, A)와 아세토니트릴(acetonitrile, B)로 구성되었고, HPLC의 수행조건 (gradient program)은 254nm파장에서 Thermo 6000 LP검출기를 사용하여 0.8 ml/min 유속(flow rate)으로 상기 B를 0 내지 10분에서 42%, 10 내지 12분에서 42%에서 55%로, 12 내지 17분에서 55%에서 60%로, 17 내지 25분에서 60, 25분 내지 28분에서 60%에서 100%이었다. 상기 주입량은 10 mL이었고, 분석은 실온에서 수행되었으며, 상기 피크 분석의 동정은 ESI-Mass, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR에 의해 수행되었고, 그 결과를 도 3 내지 도 5에 나타내었다.

[0071] 상기 도 3에 나타낸 바와 같이, 시료인 감초 추출물 700mg으로부터 간단한 정제를 통해 얻어진 항산화 활성물질 I은 75분 내지 88분 동안 72.3 mg이 얻어졌고, 활성물질 II는 189 내지 221분 동안 73 mg이 얻어졌으며, 활성물질 III은 284 내지 333분 동안 47.1 mg이 얻어졌다. 상기 물질의 순도는 HPLC에 의해 결정한 바에 따르면, 각각 활성물질 I이 95.1%이었고, 활성물질 II가 96.2%였으며, 활성물질 III은 99.5%이었다.

[0072] 상기 HPLC에서 분석된 피크분석을 ESI-Mass 및 ¹H-NMR와 ¹³C-NMR를 이용하여 NMR을 수행하여 동정한 결과는 상기 도 4에 표시되었다. 상기 도 4에 나타낸 바를 요약하면, 각각 하기와 같으며, 상기 동정결과로부터 피크 I에 해당하는 활성물질 I은 디하이드로글리아스페린 C(dehydroglyasperin C)이고, 피크 II에 해당하는 활성물질 II는 디하이드로글리아스페린 D(dehydroglyasperin D)이며, 피크 III에 해당하는 활성물질 III은 아이소안구스톤 A(isoangustone A)인 것으로 확인되었다.

[0073] Peak I: IR (KBr) 3351, 2967, 1699, 1616, 1514, 1167, 839 cm⁻¹; UV max 289, 329 nm; ESI-MS, C₂₁H₂₂O₅, 355[M]⁺, 354[M⁺ + H]⁺.

[0074] Peak II: IR (KBr) 3375, 2929, 1613, 1516, 1458, 1308, 1198, 1164, 978, 837 cm⁻¹; UV max 243, 330 nm; ESI-MS, C₂₂H₂₄O₅, 368[M]⁺, 369[M⁺ + H]⁺.

[0075] Peak III: IR (KBr) 3315, 2918, 1687, 1515, 1169, 831 cm⁻¹; UV max 225, 264, 306 nm; ESI-MS, C₂₅H₂₆O₆, 422[M]⁺, 423[M⁺ + H]⁺.

[0076] 상기 활성물질 I 내지 활성물질 III으로 확인된 디하이드로글리아스페린 C, 디하이드로글리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 하기 도 5에 나타내었다.

[0077] 본 발명에 의하면 *G. uralensis*로부터 추출한 감초 추출물에 포함된 항산화물질인 디하이드로글리아스페린 C, 디하이드로글리아스페린 D 및 아이소안구스톤 A를 HSCCC를 이용하여 한번의 분리과정에서 분리해낼 수 있으며, 특히 본 발명에서 확립된 특정 용매시스템 및 특정 HSCCC 작동 조건을 이용하는 경우 700 mg의 조추출물로부터 순도 95.1%의 디하이드로글리아스페린 C 72.3 mg(약 10.3%), 순도 96.2%의 디하이드로글리아스페린 D 73.0 mg(약 10.4%) 및 순도 99.5%의 아이소안구스톤 A 47.1 mg(약 6.8%)를 분리, 수득할 수 있는 것으로 확인되어, 천연소재로부터 특정 활성물질 특히, 감초로부터 항산화물질을 분리하는 효과적인 방법임이 확인되었고, 상기 방법에 의할 경우 천연물로부터 항산화물질의 분리가 용이해져 항산화물질이 이용되는 의료산업, 식품산업 및 화장품산업을 포함한 다양한 산업에 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 감초 추출물로부터 On-line HPLC-ABTS⁺ 라디칼 소거 크로마토그래피를 수행하여 얻은 결과를 나타내는 그래프로, 윗 부분(positive trace)은 254 nm에서 HPLC(gradient reverse phase

HPLC)에 의해 감초 추출물이 분석된 결과이고, 아랫 부분(negative trace)은 734 nm에서 $ABTS^+$ 라디칼을 이용하여 항산화 활성을 분석한 결과이다.

[0079] 도 2은 본 발명의 일 실시예에 따른, 이동상의 유속(flow rate) 및 회전속도(revolution speeds)에 따른 감초 추출물의 분리 결과를 254 nm에서 측정한 그래프로, Fr은 유속을 의미하고, Rs는 회전속도를 의미하며, Sr(stationary phase retention in the coil) 고정상의 체류를 의미한다.

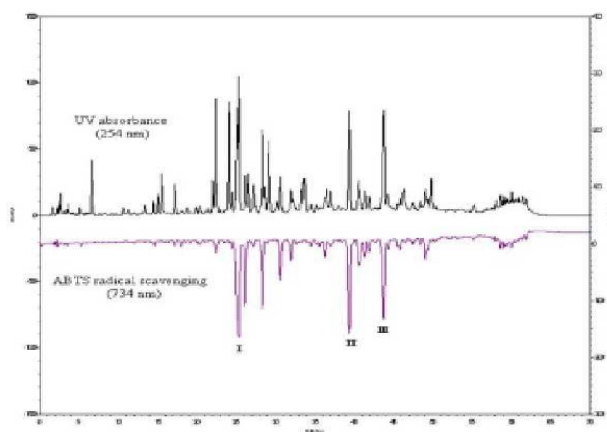
[0080] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, HSCCC 분리 결과를 HPLC를 이용하여 분석한 그래프(chromatograms)으로, 도 3a는 감초 추출물의 HPLC 분석결과이고, 도 3b는 HSCCC 분리 후, 코일에 남아 있는 잔여 샘플(residual sample)의 HPLC 분석결과이며, 도 3c는 첫 번째 피크의 HPLC 결과이고, 도 3d는 두 번째 피크의 HPLC 결과이며, 도 3e는 세 번째 피크의 HPLC 결과이다.

[0081] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 첫 번째 피크, 두 번째 피크 및 세 번째 피크에 해당하는 용출물에 포함된 화합물의 NMR 분석결과(NMR chemical shift)를 나타낸 도표이다.

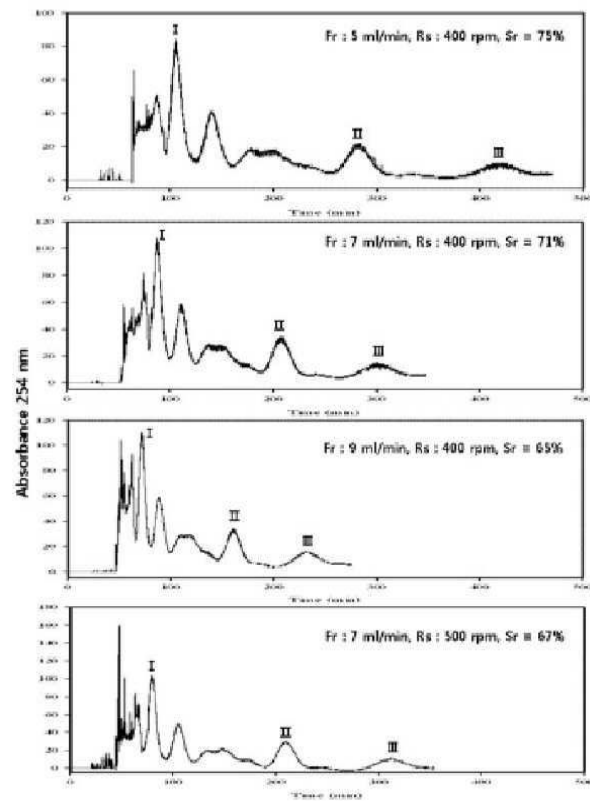
[0082] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 각 피크에 해당하는 용출물에 포함된 화합물의 구조식을 나타낸 것으로, 도 5a는 첫 번째 피크에 해당하는 디하이드로그리아스페린 C의 화학 구조식이고, 도 5b는 두 번째 피크에 해당하는 디하이드로그리아스페린 D의 화학 구조식이며, 도 5c는 세 번째 피크에 해당하는 아이소안구스톤 A의 화학 구조식이다.

도면

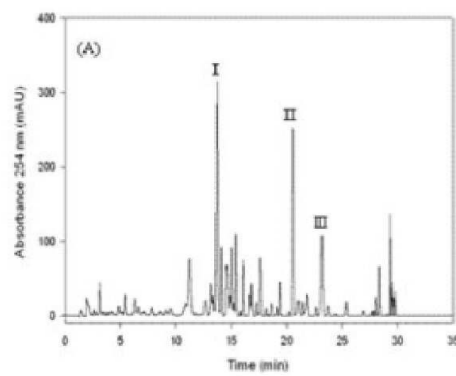
도면1



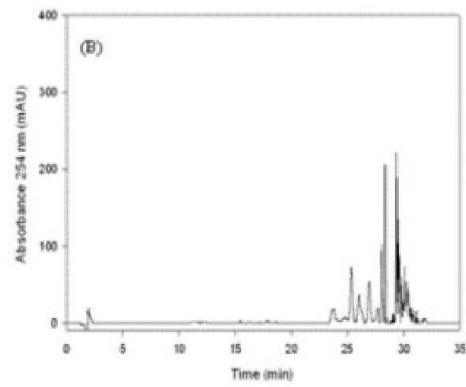
도면2



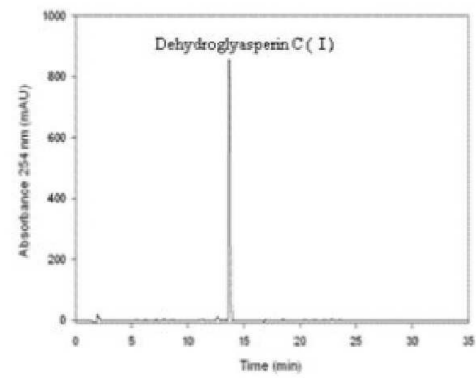
도면3a



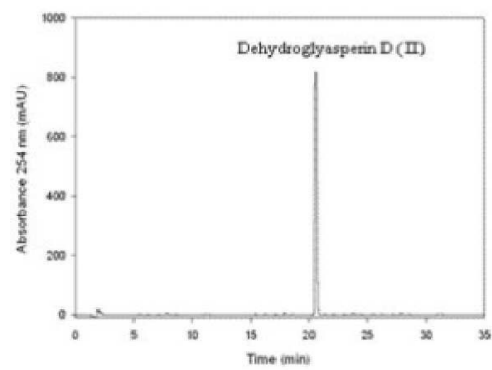
도면3b



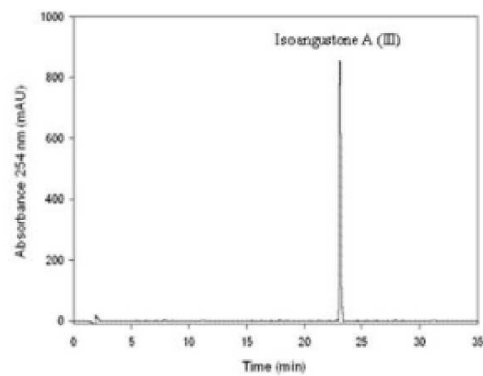
도면3c



도면3d



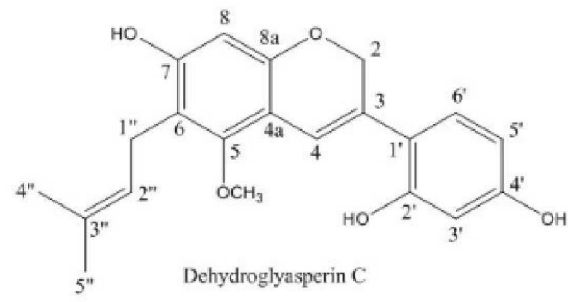
도면3e



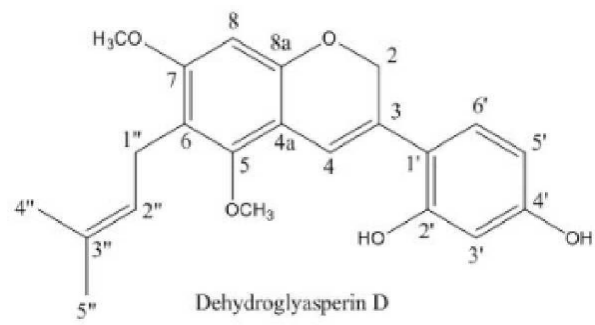
도면4

Position	I ^a (dehydroylasperin C)		II ^a (dehydroylasperin D)		III ^a (isoangustone A)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
2	67.73	4.83	67.80	4.95	154.11	8.26
3	127.97		128.71		122.55	
4	115.06	6.64	114.67	6.74	180.77	
4a	109.21		110.31		104.72	
5	155.38		154.88		159.27	
6	114.36		115.53		111.42	
7	156.24		157.99		162.38	
8	98.89	6.14	95.75	6.38	93.31	6.44
3a	152.74		153.16		155.75	
1'	117.02		116.71		122.99	
2'	156.57		156.53		114.46	6.88
3'	103.18	6.32	103.25	6.40	144.94	
4'	158.46		158.45		143.58	
5'	107.30	6.25	107.36	6.31	128.41	
6'	129.12	7.04	129.20	7.12	120.91	6.66
1''	22.61	3.14	22.53	3.23	28.75	3.23
2''	124.37	5.13	124.00	5.14	122.63	5.28
3''	129.95		130.40		131.15	
4''	18.12	1.70	18.08	1.76	18.16	1.72
5''	25.94	1.62	25.94	1.68	25.95	1.62
1'''					21.50	3.26
2'''					123.50	5.17
3'''					131.37	
4'''					18.16	1.69
5'''					26.01	1.69
5-OCH ₃	62.10	3.67	62.22	3.73		
7-OCH ₃			56.19	3.80		

도면5a



도면5b



도면5c

