(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C07C 51/42 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년09월20일
(11) 등록번호 10-0625469
(24) 등록일자 2006년09월12일

(21) 출원번호 10-2005-0051286
(22) 출원일자 2005년06월15일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자 양재경
경남 진주시 호탄동 대동아파트 101동 102호

최명석
경남 진주시 금산면 장사리 현대아이파크 107동 1301호

김선원
경남 사천시 정동면 고읍리 청구타운아파트 101동 1303호

서원택
경남 진주시 칠암동 150 진주산업대학교 식품과학과

한상우
경남 진주시 주약동 360번지 주약 현대아파트 107동 1202호

정강원
경남 진주시 신안동 20번지 신안현대아파트 106동 503호

박지현
경북 경주시 강동면 유금4리 1062-4번지

(74) 대리인 진천웅
정종옥
조현동

(56) 선행기술조사문헌
JP63283552 A
US20050053677 A1
논문
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 김용

(54) 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법

요약

본 발명은 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법에 관한 것으로, 특히, 고구마 줄기 시료를 준비하는 단계; 상기 시료와 황산용액을 반응시킨 후 유리필터로 여과하여 여과액을 수집하는 단계; 상기 여과액을 농축시킨뒤 상기 농축된 여과액보다 3배 많은 에탄올과 반응시킨후 원심분리하고, 상기 원심분리 상층부에 있는 에탄올 가용부를 수집하여 농축시킴으로써 페놀성 화합물을 분리하는 단계; 상기 분리된 페놀성 화합물을 헥산, 아세트산에틸, 포름산으로 이루어진 혼합용제에 녹인후, 용제 가용부를 실리카겔 컬럼을 이용하여 페루릭산(ferulic acid)이 포함된 분류물로 분취하는 단계;를 거치어 페루릭산을 추출하는 경우, 종래의 곡류외피 또는 전곡립 또는 발아된 곡류를 압출해서 가수분해로 페루릭산을 추출하는 것보다 현저하게 많은 양을 용이하게 얻을 수 있는 효과가 있으며, 현재 고구마 줄기는 고구마 수확 후 폐기 되는 자원으로서 그 원료적 측면에서 경제성이 대단히 높은 것이다.

대표도

도 1

색인어

고구마, 페루릭산, 페놀성 화합물

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 페놀성 화합물로부터 분취된 각 화합물의 UV 흡광도 측정 결과를 나타내는 그래프이고,

도 2는 종래의 일반적인 바닐린, 바닐린산, 페루릭산 및 시나믹산의 혼합물질에 대한 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 고구마 줄기로부터 페루릭산을 용이하고 효과적으로 추출하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 산성용액에 원료를 반응시키고, 이를 여과하여 농축시킨뒤 유기용매와 반응시키며, 원심분리후 상층부에 존재하는 용매 가용부만을 다시 농축시켜 페루릭산 혼합물을 분리하는 방법에 관한 것이다.

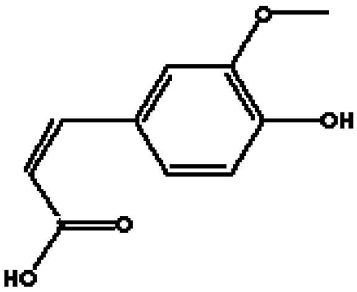
고구마는 감서·단고구마라고도 하는 것으로, 한국 전역에서 널리 재배되는 식용작물이다. 길이 약 3m이고, 잎은 어긋나고 잎몸은 심장 모양으로 얕게 갈라지며 잎과 줄기를 자르면 즙이 나오며, 줄기 밑쪽의 잎자루 기부에서 뿌리를 내는데, 그 일부는 땅속에서 커져 덩이뿌리인 고구마가 되는 것이다. 모양은 양쪽이 뾰족한 원기둥꼴에서 공 모양까지 여러 가지이고 빛깔도 흰색·노란색·연한 붉은색·붉은색·연한 자주색으로 다양하다. 특히, 줄기는 길게 땅바닥을 따라 벋으면서 뿌리를 내린다. 고구마 줄기는 둥글고 털이 거의 없는 것으로보터 많은 것까지 있으며 선단은 기부에 컬이 많고 담색이며 생육습성에 따라 직립성과 도복형으로 구분된다.

고구마의 성분은 수분 68.5%, 탄수화물 26.4%, 단백질 1.8%, 지방0.6%이고, 프로비타민 A인 카로틴을 많이 함유하고 있으며, 그 밖에 비타민B1, B2, C, 니아신 등을 함유하고 있다. 특히 탄수화물이 다량 함유되어 주식대용이 가능하며 예로부터 구황작물로 재배되어 왔다. 날고구마를 썰어 말린 것을 <절간(切干) 고구마>라고 하며, 저장에 편리하고 알코올의 원료로 쓰인다. 저장중에 수분이 감소하고 녹말이 효소의 작용으로 당화하여 매우 달다. 고구마는 녹말과 당분이 주성분이고, 단백질과 지방이 적어, 찌기, 굽기, 튀기등으로 조리해서 먹고, 녹말, 물엿, 과자, 술, 알코올, 각종 화학약품 등의 재료나 사료로도 쓰인다. 잎과 줄기는 사료, 녹비로도 쓰인다.

고구마는 알칼리성 식품이여 각종 비타민과 무기질 및 양질의 식이섬유가 함유되어 있어 농약을 사용하지 않아도 재배 가능한 저공해 건강식품임은 잘 알려진 사실이다. 근래에는 고구마의 항암작용과 황산화 작용 및 혈중 콜레스테롤 수치의 강화작용등 약리적인 효과가 속속 발표되고 있어 성인병 예방 자연식품으로 크게 각광받고 있다. 그러나, 상기한 보고들은 한방치료적인 측면에서 고구마가 항암작용 및 콜레스테롤 수치 강화에 효과가 있다는 사실을 규명했을뿐 고구마의 어떤 부분이, 또는 구체적으로 고구마의 어떤 성분이 이러한 약리적 효과와 직접적인 관련을 가지는지에 대해서는 지금까지 연구된 바가 없다.

이에 본 발명자는 페루릭산이 유방암, 대장암 및 폐암 발생 억제에 효과가 있다는 사실을 알고, 식물의 종자나 잎에 주로 함유되어 있는 페루릭산을 추출하기 위하여 수십가지의 천연 약재를 대상으로 실험을 하던 중 많은 양의 페루릭산을 고구마 줄기로부터 용이하게 추출할 수 있는 방법을 알게 되었다.

한편, 페루릭산(ferulic acid)은 하기의 구조식으로 나타낸 바와 같이 분자식은 $C_{10}H_{10}O_4$ 로 표기되는 애시드(acid)이다.



이러한 페루릭산은 시금치나 올리브 등의 식물에 흔하게 존재하는 페놀 계통 화합물의 하나로서, 페닐알라닌, 타이로신의 대사로 생성되어 자체로서 또는 세포벽의 목질소(lignin)나 생체 고분자에 붙어 존재하는데, 매우 다양한 생리활성-항산화제 활성, 강력한 항암작용, 항에이즈바이러스 활성, 항염작용, 항알러지 작용 등을 나타내는 것으로 알려져 있다.

페루릭산은 바이오바닐린의 생합성의 주 원료가 되는 유기산으로 수요성이며, 인체 흡수가 빠르다. 최근에는 인간의 면역시스템에 상당한 도움을 줄 수 있는 화합물로 알려져 있다. 특히, 영국약리학회 공식 학술지인 영국약리학저널(British Jornal of Pharmacology)에 의하면 페루릭산은 뇌 속 치매 유발물질을 효과적으로 차단하는 기능이 있다는 내용을 소개한바 있다. 또한 페루릭산은 유방암, 대장암, 폐암 발생 억제 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 페루릭산은 식물의 종자나 식물의 잎에서 주로 함유되어 있으며, 밀, 쌀과 같은 곡류의 껍질에도 많이 함유되어 있다.

종래의 곡류외피 또는 전곡립 또는 발아된 곡류로부터 페루릭산을 추출하는 경우, 일반적으로 곡류의 가공공정으로서 사용되고 있는 건조, 분쇄공정 등은 공정특성상 곡류내에 강하게 결합된 형태의 페루릭산, 폴리페놀류, 아라비노키실란 등의 기능성 생리활성 물질을 다른 세포벽 구성성분으로부터 분리하는 것이 실질적으로 매우 어렵다는 문제점이 있다. 또한, 이러한 원료들의 대부분은 수확계절이나 생산량, 구입단가, 구입경로 및 보관 등에 있어서, 많은 문제점을 가지고 있다. 지금까지 곡류의 외피 또는 전곡립 자체가 아니라 식용작물의 줄기로부터 페루릭산과 같은 생리활성 성분을 분리하는 시도는 이루어진 바가 없다. 본 발명자들은 이러한 원료들의 대체원료로서 국내에 널리 있으면서 수확 후 폐기되고 있는 고구마 줄기를 사용하여 페루릭산의 생산을 시도하게 된 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 고구마 줄기 시료를 준비하는 단계; 상기 시료와 황산용액을 반응시킨 후 유리필터로 여과하여 여과액을 수집하는 단계; 상기 여과액을 농축시킨뒤 상기 농축된 여과액보다 3배 많은 에탄올과 반응시킨후 원심분리하고, 상기 원심분리 상층부에 있는 에탄올 가용부를 수집하여 농축시킴으로써 페놀성 화합물을 분리하는 단계; 상기 분리된 페놀성 화합물을 헥산, 아세트산에틸, 포름산으로 이루어진 혼합용제에 녹인 후, 용제 가용부를 실리카겔 컬럼을 이용하여 페루릭산(ferulic acid)이 포함된 분류물로 분취하는 단계;를 포함하는 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법을 제공하고자 한 것이다.

이와 같은 본 발명에 따라 현재 전량 폐기되고 있는 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 경우, 종래의 페루릭산 추출방법, 특히 곡류외피 또는 전곡립 또는 발아된 곡류를 압출해서 가수분해로 페루릭산을 추출하는 것보다 현저하게 많은 양의 페루릭산을 용이하게 얻고자 하는 것을 본 발명의 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법에 관한 것으로, 특히, 고구마 줄기 시료를 준비하는 단계; 상기 시료와 황산용액을 반응시킨 후 유리필터로 여과하여 여과액을 수집하는 단계; 상기 여과액을 농축시킨뒤 상기 농축된 여과액보다 3배 많은 에탄올과 반응시킨후 원심분리하고, 상기 원심분리 상층부에 있는 에탄올 가용부를 수집하여 농축시킴으로써 페놀성 화합물을 분리하는 단계; 상기 분리된 페놀성 화합물을 헥산, 아세트산에틸, 포름산으로 이루어진 혼합용제에 녹인후, 용제 가용부를 실리카겔 컬럼을 이용하여 페루릭산(ferulic acid)이 포함된 분류물로 분취하는 단계;를 거치어 페루릭산을 추출하는 방법이다.

고구마 줄기로부터 효율적으로 페루릭산을 추출, 분리하는 본 발명은 전체적으로 3가지 단계로 구분될 수 있다. 1단계 공정으로 시료를 준비하고 전처리 과정을 거치는 것과, 2단계 공정으로 페놀성 화합물을 분리하는 공정, 3단계 공정으로는 페놀성 화합물로부터 페루릭산을 추출하는 공정이다. 보다 상세하게는 1단계 공정에서 고구마 줄기를 준비한 뒤 산성용액에 원료를 반응시키고, 2단계 공정에서는 이를 여과하여 농축시킨뒤 유기용매와 반응시키며, 원심분리후 상층부에 존재하는 용매 가용부만을 다시 농축시켜 페루릭산 혼합물을 분리하는 과정을 거친다. 3단계 공정에서는 분리된 페루릭산 혼합물로부터 실리카겔 컬럼, TLC(Thin layer chromatography) 또는 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 최종적인 페루릭산을 확인하고 추출하는 것이다.

먼저, 본 발명은 고구마 줄기에서 페루릭산을 추출하는 방법에 관한 것이므로, 기본적으로 고구마 줄기로부터 시료를 준비하는 과정이 포함된다. 구체적으로 상기 고구마 줄기 시료를 준비하는 단계는 고구마 줄기를 20~25℃에서 건조한 후, 20~60 메쉬(mesh) 크기로 분쇄하여 시료를 준비하는 것이 가능하다. 고구마 줄기 자체로는 유기용매와 반응시켜 원하는 특정 성분을 분리하는 것이 부적합하므로, 건조후에 미세한 크기로 분리시키는 것이다. 대상의 변형을 최소한으로 유지 시키기 위하여 특별히 저온이나 고온보다는 실온에서 건조시키는 것이 바람직하고, 이후 전처리 과정에서 반응하는 유기용매와의 접촉을 위해 크기는 20~60 메쉬(mesh) 크기로 일정한 것만을 선별하였다.

이어서, 상기 시료와 황산용액을 반응시킨 후 유리필터로 여과하여 여과액을 수집하는 단계를 거친다. 시료를 황산용액과 같은 유기용매와 반응시키는 것은 고구마 줄기내부에 강하게 결합되어 있는 페루릭산을 포함하는 페놀성 화합물들을 용이하게 분리시키기 위한 것으로, 본 발명에서는 황산용액을 사용하였지만 여기에 제한되지 않고 초산이나 수산화나트륨 용액과 같은 다른 산이나 알칼리 의 사용도 가능하다. 바람직하게는 상기 시료 2g(전건중량)에 0.05N 황산용액을 50 ml 비율로 첨가하여 반응시키는 것이 적절하다.

이러한 시료와 황산용액의 반응은 120℃의 오토클레이브에서 30분간 수행하는 것이 황산용액으로 하여금 고구마 줄기 내부에 있는 페놀성 화합물을 분리시키는데 유리하다. 이렇게 상기 시료와 황산용액을 반응시킨 후에는 페놀성 화합물을 분리시키기 위한 다음 공정에 들어가기 전에 불순물을 제거하는 과정이 필요하다. 종래와 같이 원심분리기를 이용하여 불순물을 제거하는 것도 본 발명에 의해 제한되는 것은 아니나, 본 발명에서는 불순물을 제거하기 위해 특별히 유리필터(glass filter)를 사용하였으며, 구체적으로는 상기 반응후 2G3 유리필터로 여과해서 여과된 액을 수집하는 단계를 거치었다.

다음으로, 상기 여과액을 농축시킨뒤 상기 농축된 여과액보다 3배 많은 에탄올과 반응시킨후 원심분리하고, 상기 원심분리 상층부에 있는 에탄올 가용부를 수집하여 농축시킴으로써 페놀성 화합물을 분리하는 단계를 거친다. 본 발명에서 에탄올과 반응시킨후 원심분리를 하는 것은 고구마 줄기 내부에 포함된 수십가지의 화학성분 중에서도 페루릭산을 비롯한 페놀성 화합물만을 분리하고, 특히 페루릭산과 성질이 유사한 몇가지 성분만을 선별하여 간추리기 위한 것이다.

본 발명에서는 이전 단계에서 수집된 여과액을 특별히 에탄올과 반응시키기 전에 농축시키는 과정을 선행하여 수행하였고, 에탄올과 반응시킨 뒤에도 원심분리를 한번 거친후 재차 농축시키는 과정을 수행하였다. 본 발명에 따른 상기 페놀성 화합물을 분리하는 단계에 있어서, 상기 농축하는 방법은 40~45℃의 온욕조에서 회전진공농축기(Rotary evaporator)를 이용하는 것이 바람직하고, 상기 수집된 여과액을 에탄올과 반응시킨 이후에 농축하는 과정에 있어서는 원심분리 후 상층부에 존재하는 에탄올 가용부만을 선택적으로 농축한 것을 본 발명의 다른 특징으로 하는 것이다.

본 발명에서는 농축된 여과액을 에탄올과 반응시키었지만 여기에 제한되지 않고 알코올류를 비롯한 다른 유기용매를 사용하는 것도 본 발명의 범주에 속할 수 있음은 자명하다. 또한, 상기 농축된 여과액이 반응하는 에탄올의 양은 상기 여과액의 양보다 많은 2배 내지 5배가 바람직하고, 상기 농축된 여과액의 3배로 첨가하는 것이 가장 바람직하다. 이와 같이, 수집된 여과액을 에탄올과 반응시키기 전, 후로 농축하는 것은 페루릭산을 비롯한 페놀성 화합물만을 순도높게 정제시켜 분리하

고자 하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따라 상기 여과액을 농축시킨뒤 상기 농축된 여과액보다 3배 많은 에탄올과 반응시킨후 원심분리하고, 상기 원심분리 상층부에 있는 에탄올 가용부를 수집하여 농축시키는 경우, 페놀성 화합물 중에서도 페루릭산과 성질이 유사한 몇가지 성분만을 선별하여 분리할 수 있는 것이다.

이렇게 페놀성 화합물을 분리하는 단계를 거친 이후에는 상기 분리된 페놀성 화합물을 헥산, 아세트산에틸, 포름산으로 이루어진 혼합용제에 녹인후, 용제 가용부를 실리카겔 컬럼을 이용하여 페루릭산(ferulic acid)이 포함된 분류물로 분취하는 단계를 수행한다. 이렇게 분리된 페놀성 화합물을 혼합용제에 녹이고, 실리카겔 컬럼을 이용하여 분취하는 단계는 페놀성 화합물로부터 구체적으로 페루릭산이 포함된 분류물을 구분하기 위함이다. 상기 실리카겔 컬럼으로 일정한 양의 분류물을 분취함으로써 분리된 페놀성 화합물로부터 페루릭산이 포함된 분류물을 선별할 수 있는 것이다.

또한, 본 발명은 상기 분류물 분취 단계에 있어서 분류물로 분취하기 전에 상기 분리된 페놀성 화합물을 헥산, 아세트산에틸, 포름산으로 이루어진 혼합용제에 녹이는 과정을 거친다. 이렇게 혼합용제에 녹인후, 상기 혼합용제에 녹은 용제 가용부만을 분리하여 분류물로 분취하는 것은 본 발명의 또 다른 특징일 수 있다. 상기 혼합용제는 헥산, 아세트산에틸, 포름산의 부피비가 100:50:0.5인 것이 바람직하고, 이는 실리카겔 컬럼을 이용하여 대량으로 분취시키기는데 적절하다. 이와 같이, 상기 분리된 페놀성 화합물을 혼합용제에 녹인후, 용제 가용부만을 실리카겔 컬럼을 이용하여 분류물로 분취하는 단계를 거침으로써, 페놀성 화합물에 포함된 페루릭산을 더욱 정확하게 많은 양을 추출해 낼 수 있는 것이다.

본 발명은 이상에서 서술한 바와 같이, 고구마 줄기 시료를 준비하는 단계; 여과액을 수집하는 단계; 페놀성 화합물을 분리하는 단계; 페루릭산이 포함된 분류물로 분취하는 단계를 필수적 구성요소로 하지만, 여기에는 UV 흡광도 또는 Rf값을 이용하여 페루릭산을 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 페루릭산이 포함된 분류물(fraction)을 분취하는 단계 이후에 UV 흡광도 또는 Rf값을 이용하여 페루릭산을 확인하는 단계는 분취된 분류물 중 페루릭산이 포함된 분류물을 UV 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 UV 흡광도를 측정하거나 박층크로마토그래피(TLC)를 이용하여 Rf값을 측정함으로써 페루릭산이 포함된 분류물을 확인할 수 있는 것이다.

이하에서는 본 발명의 바람직한 하나의 실시형태를 첨부된 도면을 참조하여 상세하게 설명하기로 한다. 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 더 잘 이해 될 수 있으며, 하기의 실시예는 본 발명의 예시 목적을 위한 것이며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 한정되는 보호범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

본 발명은 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 페루릭산 추출 단계를 거치기 전에, 실제로 고구마 줄기에 페루릭산이 포함되어 있는지 여부를 확인하기 위하여 전처리한 고구마 줄기와 고구마 줄기 추출물에 존재하는 페놀성 화합물 및 페루릭산 등을 대상으로 수율을 확인하였다.

실험예 1: 고구마 줄기 전처리 후 추출물 수율 확인

고구마 줄기에 황산 또는 초산을 각각 첨가하여 120℃에서 15분, 30분, 60분 반응시켰을 때, 추출물 수율을 아래 표 1에 나타냈다. 황산 첨가반응에서는 황산농도와 추출물 수율 간에는 유의성이 나타나지 않았으며, 처리시간이 증가할수록 추출물 수율은 증가되는 경향을 나타냈다. 또한 추출물 수율은 황산농도 0.1 N, 60분 반응에서 가장 높은 341 mg의 수율을 나타냈다. 초산 첨가반응에서는 초산농도와 추출물 수율 간에는 유의성이 나타나지 않았으며, 초산농도가 높아질수록 추출물 수율은 낮아지는 경향을 보였다. 초산농도 0.0125 N, 반응시간 15분의 반응 조건에서 288 mg의 추출물 수율을 나타냈다. 결과적으로 추출물 수율을 높이기 위해서는 황산 첨가반응의 경우 장시간, 고농도 반응이 유리하며, 초산 첨가반응에서는 단시간, 저농도 반응이 유리하다고 판단되었다.

표 1. 120 ℃에서 고구마줄기 전처리 후 추출물 수율

화학성분	농도, N	추출물[1], mg g^{-1}		
		반응시간, min		
		15	30	60
황산	0.0125	244.70b[2]	280.25bc	311.19b
	0.025	221.94c	267.84c	272.53c
	0.05	233.27bc	287.12ab	301.71b
	0.1	269.51a	295.86a	340.97a
초산	0.0125	287.91a	257.02a	252.04a
	0.025	271.23b	248.10a	245.59ab
	0.05	260.83bc	232.67b	236.11bc
	0.1	250.19c	228.81b	225.75c

[1] 고구마 줄기의 전건중량(oven dry weight)을 기준으로 함.
[2] 같은 컬럼 및 같은 산 내에 있는 같은 문자에 의한 평균은 던컨의 MRT(the Duncan's New Multiple-Range Test)에 따라 현저히 다른 것은 아님.

실험예 2: 고구마 줄기 추출물에 존재하는 페놀성 화합물 함량

고구마 줄기를 황산 또는 초산을 사용하여 실험예 1과 동일한 조건으로 반응 시켰을때의 페놀성 화합물 수율을 아래 표 2에 나타냈다. 황산과 초산 첨가반응 각각에서 산 농도와 페놀성 화합물 수율 사이에서는 유의성이 나타났으며, 산의 농도 증가와 페놀성 화합물 함량은 비례적인 관계를 나타냈다. 황산 첨가반응에서 반응시간이 길어질수록 페놀성 화합물 함량은 증가하는 경향을 나타냈으며, 황산농도 0.1 N, 반응시간 60분의 조건에서 27 mg의 페놀성 화합물 함량을 나타냈다. 초산 첨가 반응에서는 반응시간에 따른 페놀성 화합물 함량은 큰 변화가 없었으며, 초산 농도 0.1 N, 반응시간 60분에서 가장 높은 페놀성 화합물 함량, 27 mg을 나타냈다. 표 1과 표 2의 결과에서 나타났듯이 황산 첨가반응에서는 추출물 수율과 페놀성 화합물 수율이 함께 거동한다는 것을 확인 할 수 있었고, 초산 첨가 반응에서는 추출물 수율과 페놀성 화합물 수율간에 명확한 연관 관계가 나타나지 않았다. 최종적으로 페놀성 화합물 생산 수율을 최대로 얻기 위해서 황산과 초산 중 어느 것을 선택하여도 큰 차이가 없다는 사실을 알 수 있다.

표 2. 고구마 줄기 추출물에 존재하는 페놀성 화합물 함량

화학성분	농도, N	페놀성 화합물[1], mg g^{-1}		
		반응시간, min		
		15	30	60
황산	0.0125	12.73b[2]	12.37c	14.37b
	0.025	10.36c	11.32c	11.08c
	0.05	13.02b	19.51b	16.63b
	0.1	22.32a	24.03a	26.53a
초산	0.0125	16.77d	16.82d	16.72c
	0.025	19.94c	18.45c	19.61bc
	0.05	21.48b	21.58b	21.91ab
	0.1	25.76a	26.19a	26.91a

[1] 고구마 줄기의 전건중량(oven dry weight)을 기준으로 함.
[2] 같은 컬럼 및 같은 산 내에 있는 같은 문자에 의한 평균은 던컨의 MRT(the Duncan's New Multiple-Range Test)에 따라 현저히 다른($P<0.05$) 것은 아님..

실험예 3: 고구마 줄기 추출물에 존재하는 페루릭산 등의 함량

고구마 줄기를 산 첨가하여 전처리 하고 추출물을 회수한 다음, 추출물 중에 함유된 페놀성 화합물의 함량을 측정함과 동시에 최종적으로 본 발명에서 필요로 하는 페놀성 화합물 중에 존재하는 페루릭산의 양을 정량하는 것이 중요하다. 아래 표 3은 실험예 1과 동일한 반응조건으로 고구마 줄기를 전처리했을 때, 추출물 중의 페루릭산 함량을 나타낸 표이다. 또한

반응시간과 페루릭산 함량에서도 일정한 경향은 없었고, 황산 농도 0.05N, 반응시간 30분의 조건에서 페루릭산 최대 함량(0.3 mg)을 나타냈으며, 초산 첨가 반응에서는 초산농도 0.1N, 반응시간 15분의 조건에서 0.2 mg의 페루릭산 함량을 나타냈다.

표 3. 고구마 줄기 추출물에 존재하는 바닐린, 바닐린산, 페루릭산, 시나믹산의 함량

화학성분	Conc., N	물질[1], mg g^{-1}											
		반응시간, min											
		15				30				60			
		Vanillin	Vanillic acid	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillin	Vanillic acid	Ferulic acid	Cinnamic acid	Vanillin	Vanillic acid	Ferulic acid	Cinnamic acid
황산	0.0125	-[2]	0.167b[3]	0.112c	0.265a	0.306c	0.122c	0.143c	0.248c	0.217a	0.133c	0.115b	0.165a
	0.025	-	0.182a	-	-	0.400a	0.252b	0.177b	0.257b	0.225a	0.127c	0.114b	0.145b
	0.05	-	0.111c	0.125b	0.237b	0.382b	0.381a	0.320a	0.384a	0.179b	0.215b	0.130a	0.168a
	0.1	0.168	0.118c	0.154a	0.206c	0.199d	0.112d	0.098d	0.144d	-	0.227a	0.120b	0.161a
초산	0.0125	0.179ab	0.110b	0.096c	0.205a	0.212a	0.119b	0.106ab	0.179a	-	0.123b	0.103b	0.142ab
	0.025	0.174b	0.117ab	0.104c	0.173c	0.223a	0.124b	0.109a	0.144b	-	0.123b	0.101b	0.147a
	0.05	0.187a	0.120a	0.118b	0.195b	0.178b	0.097c	0.101ab	0.106d	0.238	0.132a	0.110a	0.128c
	0.1	0.105c	0.122a	0.207a	0.159d	0.109c	0.155a	0.098b	0.122c	-	0.132a	0.102b	0.135bc

1) 고구마 줄기의 전건중량(oven dry weight)을 기준으로 함.
2) 발견되지 않음
3) 같은 컬럼 및 같은 산 내에 있는 같은 문자에 의한 평균은 던컨의 MRT(the Duncan's New Multiple-Range Test)에 따라 현저히 다른($P<0.05$) 것은 아님.

상기와 같은 실험예 1 내지 실험예 3에서 알 수 있는 바와 같이, 전처리한 고구마 줄기와 고구마 줄기 추출물에는 페루릭산을 포함하는 페놀성 화합물이 존재함을 확인하였다. 이에 본 발명은 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하기 위한 여러가지 방안을 강구하였으며, 그 결과로써 이하 실시예와 같은 본 발명을 완성하게 된 것이다.

실시예 1: 고구마 줄기 시료를 준비하는 단계

먼저, 고구마 줄기로부터 시료를 준비하였다. 고구마를 수확한 밭에서 고구마 줄기만을 수집한 다음, 20-25℃ 실온에서 실내건조 하였다. 건조된 시료는 분쇄기로 분쇄한 다음, 20 - 60 메쉬(mesh) 크기의 시료만을 수집하였다.

실시예 2: 여과액을 수집하는 단계

이어서, 실시예 1에서 수집된 고구마 줄기 시료와 황산용액을 반응시킨 후 유리필터로 여과하여 여과된 액을 수집하였다. 즉, 시료 2g(전건중량기준)을 250 mL 플라스크에 투입하고 0.05N 황산용액을 50 mL 첨가하여 120℃의 오토클레이브(autoclave)에서 30분간 반응시키고, 반응 후 2G3 유리필터(glass filter)로 여과 한 다음, 여과된 액을 수집하였다.

실시예 3: 페놀성 화합물을 분리하는 단계

이렇게 수집된 여과액을 농축시키고 에탄올과 반응시킴으로써 페놀성 화합물을 분리한다. 실시예 2에서 획득된 여과액은 40℃의 온욕조에서 회전진공농축기(rotary evaporator)를 이용하여 여과액 총액이 5 mL 될때 까지 농축한다. 농축된 시료를 분액여두에 투입하고 여기에 15 mL(시료의 약 3배 양)의 에탄올을 첨가한후, 충분히 흔들어주고(shaking), 이를 원심분리 튜브에 옮긴 다음, 원심분리를 실시하였다. 이때 원심분리기의 운전조건은 5000 rpm, 25분 이었다. 원심분리 후 상층부(에탄올 가용부)를 수집하고 40℃의 온욕조에서 회전진공농축기를 이용하여 겔(gel) 상이 될 때 까지 농축하여 페놀성 화합물을 획득하였다.

실시예 4: 페루릭산이 포함된 분류물을 분취하는 단계

다음으로, 실시예 3에서 획득된 페놀성 화합물은 혼합용제에 녹여진 후 페루릭산이 포함된 분류물을 분취하는 단계를 거친다. 획득된 페놀성 화합물 시료를 5 mL의 노르말-헥산/아세트산에틸/포름산(n-hexane/ethyl acetate/formic acid)이 100/50/0.5 부피비로 혼합된 용제에 녹인 다음, 용제 가용부를 분리하여 길이 21cm × 직경 3cm의 실리카겔(silica gel 60, Merck) 컬럼에 로딩하여 동일용제를 사용하여 분취하였다. 이때 분취량은 20 mL로 하였다. 분취 후 각 분류물

(fraction) 시료는 UV 회전진공농축기(specterophotometer)(U-3000, Hitachi, 일본)를 사용하여 흡광도를 구하였으며, 이때 비색파장은 280nm 및 325 nm로 고정하였다. 분취된 각 분류물의 UV 흡수 특성은 도 1에 나타난 바와 같다. 도 1은 본 발명에 따른 페놀성 화합물의 UV 흡광도 측정 결과를 나타내는 그래프이다. 도시된 바와 같이, 46개 분류물은 크게 4가지 분류물 집단으로 구분되는 UV 흡광 특성을 나타낸다. 이러한 분류물 집단은 그래프 앞에서 시작되는 순서대로 분류물 집단 I 내지 분류물 집단 IV로 나타내기로 한다.

이와 동시에 분류물의 일부를 채취하여 40℃ 이하에서 농축한 다음, TLC(Thin layer chromatography)를 실시하여 표준물질과의 Rf값을 산출하였다. 이때 사용된 플레이트(plate)는 가로 2 cm × 세로 4 cm 크기의 실리카겔 (F254 ,Merck, 독일) TLC 플레이트를 사용하였으며, 전개 용매로는 노르말-헥산/아세트산에틸/포름산(n-hexane/ethyl acetate/formic acid)이 100/50/0.5 부피비로 혼합된 용매를 사용하였다. 물질 전개 후 플레이트는 UV 방출기를 사용하여 365nm에서 물질을 확인하고 Rf값을 산출하였다.

이때 확인된 페놀성 화합물(바닐린, 바닐린산, 페루릭산, 시나믹산) 표준품의 Rf 값은 하기의 표 4에 나타난 바와 같다.

[표 4: 페놀성 화합물의 Rf값]

Compound	R_f
바닐린(Vanillin)	0.43
시나믹산(Cinnamic acid)	0.39
바닐리산(Vanillic acid)	0.31
페루릭산(Ferulic acid)	0.27

상술한 바와 같은 UV 흡광도 측정에 의해 구분된 분류물 집단 I 내지 분류물 집단 IV에 대해서 TLC(Thin Layer Chromatography)를 실시하였고, 최종적으로 UV 흡광도와 Rf값을 기초로 하여 페루릭산이 함유된 분류물을 분리 확인하였다.

실시예 5: 페루릭산 분류물 확인

페루릭산이 함유된 분류물을 분리한 후에는 페루릭산의 정확한 분리 및 순수 확인을 위하여 HPLC(고속액체크로마토그래피)를 사용하여 페루릭산 분류물을 분석하였다. HPLC 시스템은 Gilson사의 operating system, UV 3000검출기 및 unipoine software를 사용하였다. 분석컬럼은 TSK gel ODS-80 (4.6 mm × 250 mm, Tosho)을 사용하였다. 분석시료는 시료주입기를 이용하여 10㎕를 주입하였다. 이동상은 acetic acid/water(5/95, v/v) 혼합액을 이동상 A, 메탄올을 이동상 B로 사용하여 유속 0.8 ㎖/min로 하였으며, 검출기의 파장은 280 nm로 하였다.

도 2는 종래의 일반적인 바닐린, 바닐린산, 페루릭산 및 시나믹산의 혼합물질에 대한 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph) 분석 결과를 나타내는 그래프이다. 여기서, "1"은 바닐린, "2"는 바닐린산, "3"은 페루릭산, "4"는 시나믹산의 HPLC 분석 모델이다. 바닐린, 바닐린산, 페루릭산 및 시나믹산의 혼합물질에 대한 HPLC 분석의 경우 바닐린(vanillin)은 20.59분, 바닐린산(vanillic acid)은 22.37분, 페루릭산(ferulic acid)은 24.32분, 시나믹산(cinnamic acid)은 28.93분에 나타났으며, 본 발명에 따른 페놀성 화합물에 대해서도 이와 동일성 있는 결과를 나타내었음을 확인하였다.

도 1에 제시된 각 분류물 집단은 각 성분의 동정 및 정량 분석을 위해 HPLC로 분석하였으며, 그 분석결과는 하기 표 5에 나타내었다.

표 5. 각 분류물의 HPLC 분석

분류물 No.	분리된 페놀릭 애시드(phenolic acid), mg g^{-1a}			
	Vanillin	Cinnamic acid	Vanillic acid	Ferulic acid
I	0.083	-[b]	-	-
II	-	0.023	0.195	-
III	-	-	-	0.217
IV	-	-	-	-

[a] 고구마 줄기 그램 당 페놀릭 애시드 마이크로그램.
[b] 발견되지 않음.

표 5의 결과로부터 분류물 집단 III은 페루릭산만이 존재하는 분류물 임을 확인할 수 있다. 또한, 고구마 줄기 1g 으로부터 본 발명에 따른 추출방법으로 분리, 정제 할 수 있는 페루릭산은 0.217mg 인 것으로 확인되었다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명은 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하기 위하여, 고구마 줄기 시료를 준비하는 단계; 상기 시료와 황산용액을 반응시킨 후 유리필터로 여과하여 여과액을 수집하는 단계; 상기 여과액을 농축시킨뒤 상기 농축된 여과액보다 3배 많은 에탄올과 반응시킨후 원심분리하고, 상기 원심분리 상층부에 있는 에탄올 가용부를 수집하여 농축시킴으로써 페놀성 화합물을 분리하는 단계; 상기 분리된 페놀성 화합물을 헥산, 아세트산에틸, 포름산으로 이루어진 혼합용제에 녹인후, 용제 가용부를 실리카겔 컬럼을 이용하여 페루릭산(ferulic acid)이 포함된 분류물로 분취하는 단계;를 포함하는 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법을 제공하였다. 이와 같은 본 발명에 따라 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 경우, 종래의 페루릭산 추출방법, 특히 곡류외피 또는 전곡립 또는 발아된 곡류를 압출해서 가수분해로 페루릭산을 추출하는 것보다 현저하게 많은 양의 페루릭산을 용이하게 얻을 수 있는 효과가 있는 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

고구마 줄기 시료를 준비하는 단계;

상기 시료와 황산용액을 반응시킨 후 유리필터로 여과하여 여과액을 수집하는 단계;

상기 여과액을 농축시킨뒤 상기 농축된 여과액보다 3배 많은 에탄올과 반응시킨후 원심분리하고, 상기 원심분리 상층부에 있는 에탄올 가용부를 수집하여 농축시킴으로써 페놀성 화합물을 분리하는 단계;

상기 분리된 페놀성 화합물을 헥산, 아세트산에틸, 포름산으로 이루어진 혼합용제에 녹인후, 용제 가용부를 실리카겔 컬럼을 이용하여 페루릭산(ferulic acid)이 포함된 분류물로 분취하는 단계;를 포함하는 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 고구마 줄기 시료를 준비하는 단계는 고구마 줄기를 20~25℃에서 건조한 후, 20~60 메쉬(mesh) 크기로 분쇄하여 시료를 준비하는 것을 특징으로 하는 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 여과액을 수집하는 단계는 상기 시료 2g(전건중량)에 0,05N 황산용액을 50 ml 비율로 반응시키는 것을 특징으로 하는 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 페놀성 화합물을 분리하는 단계는 상기 농축하는 방법이 40~45℃의 온욕조에서 회전진공농축기(Rotary evaporator)를 이용하는 것을 특징으로 하는 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법.

청구항 5.

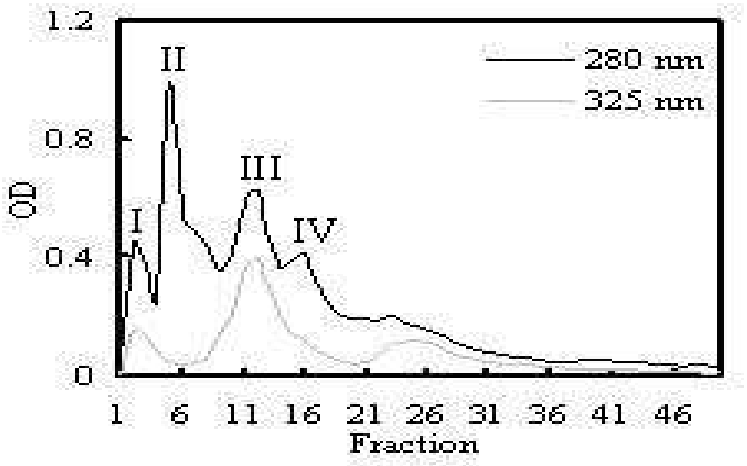
제1항에 있어서, 상기 페루릭산이 포함된 분류물을 분취하는 단계는 상기 혼합용제의 헥산, 아세트산에틸, 포름산의 부피비가 100:50:0.5인 것을 특징으로 하는 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법.

청구항 6.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페루릭산이 포함된 분류물(fraction)을 분취하는 단계 이후에 UV 흡광도 또는 Rf값을 이용하여 페루릭산을 확인하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 고구마 줄기로부터 페루릭산을 추출하는 방법.

도면

도면1



도면2

