(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월05일
(11) 등록번호 10-1662498
(24) 등록일자 2016년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 27/10 (2016.01) *A23L 29/00* (2016.01)
B01D 15/36 (2006.01) *C12N 9/42* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 1/2215 (2013.01)
A23L 1/034 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0164823
(22) 출원일자 2015년11월24일
심사청구일자 2015년11월24일
(56) 선행기술조사문헌
JP58190370 A*
KR1019980078646 A*
정창환. 수국 잎으로부터 천연감미소재 필로둘신 추출 증진을 위한 효율적 공정개발 및 필로둘신 생성기작 규명. 세종대학교 석사학위 논문. 2014.08.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
유상호
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 219동 1401호
김양
서울특별시 서초구 강남대로 321, 1005호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 장은경

(54) 발명의 명칭 **수국차 잎으로부터 천연 고감미료인 필로둘신을 수득하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 수국차 잎으로부터 천연 고감미료인 필로둘신을 생산하는 방법에 과한 것으로, 본 발명의 방법을 이용할 경우, 수국차 잎으로부터 필로둘신을 고순도, 고수율로 수득할 수 있다. 본 발명에서 수득된 필로둘신은 감미료로 식품에 사용될 수 있는데, 당뇨병 식이에 감미료로 첨가되어 사용될 수도 있다.

대 표 도 - 도10

(52) CPC특허분류
B01D 15/361 (2013.01)
C12N 9/2445 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
(72) 발명자
정창환
서울특별시 동작구 여의대방로10길 100, 101동 501호
김민수
서울특별시 중랑구 용마산로 669, 109동 1507호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 313024-03-3-SB010
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치식품기술사업
연구과제명 수국 phyllodulcin의 효율적 생산 공정 개발 및 특성 규명
기 여 율 1/1
주관기관 세종대학교 산학협력단
연구기간 2013.11.20 ~ 2016.11.19
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

수국차 잎으로부터 필로둘신을 함유하는 추출물을 회수한 후, 이를 정제하여 필로둘신을 수득하는 방법에 있어서,

상기 수국차 잎은,

동결건조한 수국차 잎 가루 1 g 당 5~6 mL의 물을 가하고, 10~20시간 동안 침지한 후, 건조하고 분쇄한 것이고,

상기 정제는,

상기 필로둘신을 함유하는 추출물을 이온교환수지를 통과시키는 단계;

상기 이온교환수지를 통과한 용리액을 역상 흡착 카트리지 (reverse-phase sorbent cartridge)를 통과시키는 단계;

상기 카트리지를 통과한 용리액을 HPLC를 통과시키는 단계; 포함하는 과정에 의해 수행하되,

상기 이온교환수지는, 레진으로 'Amberlite® 200C Na' 및 'Amberlite® IRA-67'을 사용한 이온교환수지이고,

상기 HPLC는, 'ODS-AP'을 컬럼으로 사용하는 '리사이클링 프렙. HPLC'인 것을 특징으로 하는 수국차 잎으로부터 필로둘신을 고순도 및 고수율로 수득하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 건조는,

60~80℃의 온도로 10~21시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 수국차 잎으로부터 필로둘신을 고순도 및 고수율로 수득방법.

청구항 4

수국차 잎으로부터 필로둘신을 함유하는 추출물을 회수한 후, 이를 정제하여 필로둘신을 수득하는 방법에 있어서,

상기 수국차 잎은,

동결건조한 수국차 잎 가루를 끓여 내재하는 효소를 불활성화시키고, 패네로케테 크리소스포리움 (*Phanerochaete crysosporium*) 유래 베타-글루코시다아제를 가하여 효소반응 시킨 것이고,

상기 정제는,

상기 필로둘신을 함유하는 추출물을 이온교환수지를 통과시키는 단계;

상기 이온교환수지를 통과한 용리액을 역상 흡착 카트리지 (reverse-phase sorbent cartridge)를 통과시키는 단계;

상기 카트리지를 통과한 용리액을 HPLC를 통과시키는 단계; 포함하는 과정에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는

수국차 잎으로부터 필로둘신을 고순도 및 고수율로 수득하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 이온교환수지는, 레진으로 'Amberlite® 200C Na' 및 'Amberlite® IRA-67'을 사용한 이온교환수지이고,

상기 HPLC는, 'ODS-AP'을 컬럼으로 사용하는 '리사이클링 프렙. HPLC'인 것을 특징으로 하는 수국차 잎으로부터 필로둘신을 고순도 및 고수율로 수득하는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제4항에 있어서,

상기 역상 흡착 카트리지 (reverse-phase sorbent cartridge)는, 'Waters Oasis HLB 20cc (1g) LP extraction cartridge'인 것을 특징으로 하는 수국차 잎으로부터 필로둘신을 고순도 및 고수율로 수득하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 수국차 잎으로부터 천연 고감미료인 필로둘신을 수득하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 전처리 과정, 추출 과정 및 분리·정제 과정을 통하여 필로둘신을 고수율, 고순도로 수득할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 수국차(Hydrangea tea)는 우리나라에 16속 36종이 분포되어 있는 범의귀과(Saxifragaceae)의 30년생 낙엽 저목인데, 일반적으로 감로차로 알려져 있다. 수국차의 원료가 되는 수국류(Hydrangea)는 본래 관상학적 가치가 높게 평가되어 장식화로 주로 사용되었으나, 최근에는 수국의 잎, 줄기, 뿌리를 생약으로 사용하며, 그 약리 효능에 주목하고 있다.

[0004] 국내산 수국차 (*Hydrangea macrophylla*)는 중국의 첨엽차 (*Hydrangea aspera* DON)에 비해 독성이 없으며, 일본의 아마차 (*Hydrangea macrophylla* SERINGE var. *thunbergii* Makino)에 있는 쓴맛과 불쾌한 단맛 없이 청량한 단맛을 가져 매우 우수한 관능적 특성을 가진 것으로 알려져 있다. 특히, 우리나라의 수국차는 해발 700 m 이상의 고랭지에서 재배되기 때문에, 고유의 비당성 단맛과 박하 향을 나타낸다.

[0005] 수국차에는 필로둘신(phyllodulcin), 이소필로둘신(isophyllodulcin), 툰베르기놀(thunberginol) A, B, C, E, F 등이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다. 수국차 단맛의 주요 성분은 필로둘신과 이소필로둘신인데, 설탕과 비교하여 400~800배의 감미도를 갖는 것으로 알려져 있다. 다만, 이들은 생잎 자체에서는 배당체인 8-β-글루코시드의 형태로 존재하기 때문에, 단맛이 없다가, 건조 및 분쇄 등의 과정을 거치면서 효소작용에 의한 분해로 단맛을 내는 것으로 알려져 있다.

[0006] 필로둘신은 비당성분이기 때문에, 비만이나 당뇨 등 설탕의 섭취 제한이 필요한 사람에게 감미를 즐기면서도 건강을 지킬 수 있게 해 주는 당 대체재이다. 하지만, 아직까지 수국차 잎으로부터 필로둘신을 효과적으로 추출 및 분리·정제하고자 하는 연구는 미미한 실정이다.

[0007]

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) WO2008075528 (공개일자 2008. 06. 26)에는, 감차를 물 또는 저급 알코올로 추출하는 것에 의해서 얻을 수 있는 추출물을 유효 성분으로서 함유하는 항당뇨병용 조성물이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명에서는 필로둘신의 효율적인 생산 및 분리·정제를 위한 최적의 생산방법에 대해 연구하였다. 다양한 전처리 조건으로 인한 필로둘신 전환율 및 다양한 추출 조건에 따른 추출 수율을 비교하였으며, 여러 수지를 이용한 분리·정제방법을 통해 높은 회수율 및 높은 순도로 필로둘신을 분리하고자 하였다. 상기와 같은 과정을 통해, 본 발명은 수국차 잎으로부터 필로둘신을 고수율, 고순도로 회수할 수 있는 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 수국차 잎으로부터 필로둘신을 함유하는 추출물을 회수한 후, 이를 정제하여 필로둘신을 수득하는 방법에 있어서, 상기 정제는, 상기 필로둘신을 함유하는 추출물을 이온교환수지를 통과시키는 단계; 상기 이온교환수지를 통과한 용리액을 역상 흡착 카트리지 (reverse-phase sorbent cartridge)를 통과시키는 단계; 상기 카트리지를 통과한 용리액을 HPLC를 통과시키는 단계; 포함하는 과정에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 수국차 잎으로부터 필로둘신의 수득방법을 제공한다.

[0012] 한편, 상기 본 발명 수국차 잎으로부터 필로둘신의 수득방법에 있어서, 상기 수국차 잎은, 바람직하게 동결건조한 수국차 잎 가루를 물에 침지한 후, 건조하고 분쇄한 것을 사용하는 것이 좋다. 이때, 상기 침지는, 더욱 바람직하게 동결건조한 수국차 잎 가루 1 g 당 5~6 mL의 물을 가하고, 10~20 시간 동안 침지하는 것이 좋다. 또한, 상기 건조는, 더욱 바람직하게 60~80℃의 온도로 10~21시간 동안 수행하는 것이 좋다.

[0013] 한편, 상기 본 발명 수국차 잎으로부터 필로둘신의 수득방법에 있어서, 상기 수국차 잎은, 바람직하게 동결건조한 수국차 잎 가루를 끓여 내재하는 효소를 불활성화시키고, 베타-글루코시다아제를 가하여 효소반응 시킨 것을 사용하는 것이 좋다. 이때, 상기 베타-글루코시다아제는, 더욱 바람직하게 패네로케테 크리소스포리움(*Phanerochaete crysosporium*) 유래인 것을 사용하는 것이 좋다.

[0014] 한편, 상기 본 발명 수국차 잎으로부터 필로둘신의 수득방법에 있어서, 상기 이온교환수지는 바람직하게 레진으로 'Amberlite® 200C Na' 및 'Amberlite® IRA-67'을 사용한 이온교환수지를 사용하는 것이 좋고, 상기 역상 흡착 카트리지 (reverse-phase sorbent cartridge)는 바람직하게 'Waters Oasis HLB 20cc (1g) LP extraction cartridge'를 사용하는 것이 좋으며, 상기 HPLC는 바람직하게 'ODS-AP'을 컬럼으로 사용하는 '리사이클링 프렙. HPLC'인 것이 좋다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 방법을 이용할 경우, 수국차 잎으로부터 필로둘신을 고순도, 고수율로 수득할 수 있다. 본 발명에서 수득된 필로둘신은 감미료로 식품에 사용될 수 있는데, 당뇨병 식이에 감미료로 첨가되어 사용될 수도 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 수국차 잎으로부터 필로둘신을 추출하기 위한 공정의 전반적 흐름도이다.

도 2는 물에 침지한 시간에 따른 필로둘신의 생성량을 측정한 결과이다.

도 3은 핸드-롤링(hand-rolling) 처리 여부 및 건조 온도의 변화에 따른 필로둘신 생성량의 비교 결과이다.

도 4는 블렌딩(물을 넣고 20초간 분쇄) 후, 방치 시간의 경과에 따른 필로둘신 생성량의 비교 결과이다.

도 5는 추출 조건 (시간 및 온도)에 따른 필로둘신 생성량 비교 결과이다.

도 6은 이온교환수지(Amberlite® 200C Na 및 Amberlite® IRA-67)를 사용하여 추출물의 색소체 및 불순물을 제거한 결과이다.

도 7은 이온교환수지(Amberlite® 200C NA 및 TRILITE® AW90)를 사용하여 추출물의 색소체 및 불순물을 제거한 결과이다.

도 8은 이온교환 후, 잔존하는 색소 및 불순물을 카트리지 정제를 통해 제거한 결과이다.

도 9는 '리사이클링 프렙. HPLC'를 이용해 필로둘신을 정제한 것을 보여주는 크로마토그램이다.

도 10은 순수하게 정제된 필로둘신의 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 수국차 잎으로부터 천연 고감미료인 필로둘신을 추출 및 분리·정제하는 것에 관한 것으로, 전처리, 용매를 사용한 추출, 분리·정제 과정이 수행된다 (도 1). 도 1은 수국차 잎으로부터 필로둘신을 추출하기 위한 공정의 전반적 흐름도이다.

[0020] 수국차 잎은 핸드-롤링, 건조 및 분쇄 등의 전처리 공정에 의해 세포벽이 붕괴되고, 내재된 효소 (베타-글루코시다아제 등)의 활성화로 말미암아 배당체인 필로둘신-β-글루코사이드로부터 필로둘신이 생산된다. 이와 같이 생산된 필로둘신은 추출 및 정제가 되어야 산업적으로 이용 가능한데, 본 발명에서는 '필로둘신의 생성을 위한 전처리 과정', '생성된 필로둘신의 추출', '추출물로부터 필로둘신의 분리·정제'를 수행하여 본 발명을 완성하였다.

[0021] 먼저, 전처리 과정에 있어서, 본 발명은 '물 침지', '핸드-롤링 및 건조', '블랜딩', '효소처리' 등의 전처리를 다양하게 수행해 보고, 이들 결과로부터 필로둘신의 생산을 위한 최적 전처리 조건을 탐색하였다.

[0022] 실험 결과, '물 침지' 전처리의 경우, 12시간부터 필로둘신의 생성량이 포화되기 시작하였으며, 대략 20.86 mg/g의 생성 수율을 나타냈다. '핸드-롤링 및 건조' 전처리의 경우, 핸드-롤링을 한 샘플 중 70℃에서 건조한 샘플이 가장 우수한 필로둘신 생성능을 나타냈다. 생잎을 물에 넣고 분쇄한 후, 일정시간 방치하는 소위 '블렌딩(blending)' 전처리의 경우, 분쇄 즉시 다량의 필로둘신의 생성되기 시작하였으며, 방치시간의 경과에 따른 유의적 차이는 관찰되지 않았다. '효소 처리' 전처리의 경우, 베타-글루코시다아제 유래 미생물 종류별로 필로둘신의 생성 속도에 있어 차이가 났다. 여러 미생물 중 패네로케테 크리소스포리움 (*Phanerochaete crysosporium*) 유래의 베타-글루코시다아제가 가장 빠른 필로둘신 생성 속도를 보였고, 생성량에 있어서도 다른 미생물 유래의 것보다 다소 높게 나타났다.

[0023] 다음으로, 본 발명에서는 생성된 필로둘신을 효과적으로 추출할 수 있는 추출 조건을 탐색하여 보았다. 다양한 용매 (메탄올, 에탄올 등)를 사용하여 다양한 방법{침지, 가속용매추출방법, 초음파처리(ultrasonification)}을 적용하여 필로둘신의 최적 추출조건을 탐색해 보고자 하였다.

[0024] 실험 결과, 100% 메탄올 또는 70% 에탄올을 용매로 사용하여 가속용매추출장치를 통해 추출하였을 때, 추출 수율이 가장 좋게 나타났다. 초음파 처리는 100% 메탄을 사용했을 때, 가속용매추출장치를 사용한 경우와 추출 수율이 유사하게 나타났다. 아임계수는 메탄올 대비 35% 정도의 추출 수율을 보였으나, 물에 비해서는 높게 나타났다.

[0025] 이상과 같은 실험 결과를 바탕으로 하여, 전처리 조건 및 추출 조건을 최적화하고자 하였는데, 경제성, 공정의 단순성 등을 고려하여, 동결건조 수국차 잎 가루를 물에 침지(동결건조분말 1g 당 5~6 mL의 물 첨가, 15 hr, 30 ℃) 후 건조 (18 hr, 70℃) 및 분쇄를 하고, 가속용매추출장치를 사용하여 70℃, 5분, 3회 조건하에서 메탄올로 추출하는 것을 최적 조건으로 산출하였다.

[0026] 마지막으로, 본 발명에서는 추출된 필로둘신을 최적으로 분리·정제할 수 있는 조건을 탐색하여 보았다. 본 발명에서는 이온교환수지, 역상 흡착 카트리지 (reverse-phase sorbent cartridge), HPLC (바람직하게 '리사이클링 프렙. HPLC')를 단계적으로 적용하여, 색소 및 불순물을 효과적으로 제거하고자 하였다.

[0027] 이온교환수지를 이용하여 분리·정제를 수행한 결과, 색소체 및 불순물이 효과적으로 제거되었고, 필로둘신의 회수율은 약 90% 정도로 나타났다. 이는 스케일- 업(scale-up)을 한 경우에서도 유사하게 유지되었다.

[0028] 본 발명에서는 상기 이온교환수지 적용 이후, 잔존 색소 및 불순물을 더 제거하고자 역상 흡착 카트리지 (reverse-phase sorbent cartridge)를 사용하여 2차 정제를 수행하였다. 그 결과, 색소가 효율적으로 제거되고, 81%의 회수율을 보임을 확인할 수 있었다.

[0029] 본 발명에서는 상기 역상 흡착 카트리지 (reverse-phase sorbent cartridge) 적용 후, 순수한 필로둘신을 정제

하여 수득하고자, HPLC (바람직하게 Recycling Prep. HPLC)를 적용하였다. 이를 사용하여 정제한 결과, 최종 순도 99.2%의 필로둘신을 생산할 수 있었다.

[0031] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0033] **[실시예 1: 전처리 방법에 따른 필로둘신 함량의 변화 측정]**

[0034] 본 실시예에서는 다양한 전처리 과정을 통해 수국차 잎에 함유된 전구체로부터 필로둘신의 생산량 변화를 탐색해 보고자 하였다. 전처리는 하기의 4개 방법으로 각각 진행하였다.

[0036] **(1) 물 침지**

[0037] 동결건조한 수국차 잎 가루 1 g을 30 mL의 물에 침지하였다. 이후, 동결건조 및 분쇄를 하고, 가속용매추출장치를 사용하여 70℃, 5분, 3회 조건하에서 메탄올로 추출하였다. 추출 후, 생산된 필로둘신의 양을 정량하였다.

[0038] 실험결과는 도 2와 같이 나타났다. 도 2는 물에 침지한 시간에 따른 필로둘신의 생성량을 측정한 결과이다. 도 2에서 보는 바와 같이, 12시간 침지하였을 경우, 20.86 mg/g 필로둘신이 생성됨을 확인할 수 있었다. 24시간 침지도 이와 유사한 양의 필로둘신이 생성되는 것으로 나타났다. 따라서, 12시간 이상 물에 침지하여야, 필로둘신의 생합성이 크게 증가하는 것으로 결론내릴 수 있었다.

[0039]

[0040] **(2) 핸드-롤링(Hand-rolling) 및 건조 온도**

[0041] 70℃에서 10분간 방치한 수국차 잎을 손으로 30초간 비빈 후, 25℃에서 12시간 또는 70℃에서 4시간 동안 완전 건조하였다. 이후, 분쇄하여 가속용매추출장치를 사용하여 추출함으로써, 핸드-롤링 여부 및 건조 온도에 따른 필로둘신의 생성량을 비교하였다.

[0042] 실험결과, 도 3에서 보듯이 핸드-롤링군은 그렇지 않은 군에 비해 다량의 필로둘신이 생성됨을 확인할 수 있었다. 또한, 70℃에서는 25℃보다 다량의 필로둘신이 생성됨을 확인할 수 있었다. 도 3은 핸드-롤링(hand-rolling) 처리 여부 및 건조온도의 변화에 따른 필로둘신 생성량의 비교 결과이다.

[0044] **(3) 블렌딩 (blending)**

[0045] 50 g의 수국차 잎에 100 mL의 물을 넣고, 20초간 분쇄하는 소위 '블렌딩 과정'을 거친 후, 일정 시간 방치하고 나서 가속용매추출장치를 사용하여 필로둘신을 추출하였다. 이를 통해 블렌딩 후 방치 시간의 경과에 따른 필로둘신 생성량을 비교하였다.

[0046] 실험결과, 도 4에서 보듯이 블렌딩을 한 경우, 분쇄 직후부터 다량의 필로둘신이 생성됨을 확인할 수 있었다. 다만, 방치 시간의 경과에 따른 유의성 있는 생산량 변화는 없었다. 도 4는 블렌딩 (물을 넣고 20초간 분쇄) 후, 방치 시간의 경과에 따른 필로둘신 생성량의 비교 결과이다.

[0048] **(4) 효소 처리**

[0049] 동결건조 수국 잎 가루를 100℃에서 10분간 끓여 내재하는 효소를 불활성화시킨 후, 다양한 미생물(*Theromotoga maritime, Phanerochaete chrysosporium, Aspergillus niger, Agrobacterium sp.*) 유래 β-글루코시다아제를 각각 처리하여 초음파 처리로 30℃에서 1시간 추출하였다. 이후, 필로둘신 함량을 측정하였다. 실험결과는 하기 표 1과 같이 나타났다.

표 1

[0050]

시간 (h)	필로둘신 (mg/g db)						
	브랜칭 분말 (Blanched powder)	동결건조분말 (Lyophilized powder)	*Aspergillus niger*	*Agrobacterim Sp.*	*Phanerochaete crysosporium*	*Thermotoga maritima*	Almond
0	3.01±0.01	3.71±0.41	2.51±0.36	3.00±0.16	1.83±1.13	1.09±1.64	0.08±0.00
1	2.47±0.00	2.10±0.11	16.10±0.59	13.77±0.48	22.72±1.36	8.92±0.65	1.46±0.03
3	2.72±0.01	10.18±2.70	20.18±2.70	21.94±0.89	26.01±0.17	24.75±0.18	1.90±0.03
9	2.56±0.01	26.73±0.36	23.71±0.61	21.33±0.71	24.96±1.03	25.47±0.05	3.79±0.03

24	1.74±0.04	24.69±1.61	24.41±0.01	22.85±0.36	24.58±0.37	25.74±0.10	5.18±0.03

[0052] 상기의 결과에서 보듯이, 미생물 유래에 따라 필로둘신의 전환율 및 속도가 다른 것을 확인할 수 있었다. 미생물 중 패네로케테 크리소스포리움 (*Phanerochaete crysosporium*) 유래의 베타-글루코시다아제 처리군에서 가장 우수한 필로둘신 전환 효과 (빠른 생성속도 및 높은 생성량)가 나타났다.

[0054] **[실시예 2: 추출 조건에 따른 필로둘신 함량의 변화 측정]**

[0055] 본 실시예에서는, 상기 전처리 과정을 통해 필로둘신이 생성된 수국차 잎 가루로부터 필로둘신을 효율적으로 추출하기 위한 추출 조건 (추출 용매 및 추출 방법)을 탐색해 보았다. 샘플로는 동결건조 시판 수국차 잎 가루를 분쇄한 것을 사용하였다.

[0057] **(1) 가속용매추출장치(accelerated solvent extraction)를 사용한 추출 조건 확립**

[0058] 서로 다른 온도 (40~80℃) 및 시간 (5분 × 1, 2, 3, 4, 5 cycle) 동안 메탄올을 사용하여 필로둘신을 추출하였다. 실험 결과는 도 5와 같이 나타났다. 도 5는 추출 조건 (시간 및 온도)에 따른 필로둘신 생성량 비교 결과이다. 도 5에서 보듯이, 시간 및 용매 사용량을 고려하여 볼 때, 70℃에서 5분×3 cycle이 최적 조건으로 나타났다.

[0060] **(2) 추출 용매 및 추출 방법에 따른 추출 수율 확인**

[0061] 전처리를 거쳐 필로둘신이 생성된 수국차 잎 가루에 물, 메탄올 및 에탄올 0, 30, 70 및 100%를 용매로 사용하여, 침지 (25℃, 24시간), 초음파 처리 (30℃, 1시간), 가속용매추출장치 (70℃, 5분×3cycle)를 통해 필로둘신의 추출량을 측정하였다. 또한, 아임계수추출은 가속용매추출장치를 이용하여 150℃에서 20분간 추출하였다.

[0062] 실험결과는 표 2에 나타냈다.

표 2

[0063]

추출용매		필로둘신 (mg/g)			F
(%)		SE	UE	ASE	
메탄올	30	6.72 ± 0.23^{dB}	9.81 ± 0.49^{dA}	4.44 ± 1.95^{cdC}	8.265^{***}
	70	18.65 ± 0.04^{bB}	18.47 ± 0.22^{bB}	21.33 ± 0.03^{aA}	308.058^{***}
	100	19.33 ± 0.17^{abB}	21.20 ± 0.33^{aA}	21.28 ± 0.10^{aA}	48.789^{***}
에탄올	30	9.80 ± 0.56^{cA}	11.84 ± 1.47^{cA}	11.23 ± 4.51^{bcA}	0.288^{***}
	70	19.82 ± 0.11^{aB}	19.54 ± 0.29^{abB}	21.11 ± 0.27^{aA}	24.863^{***}
	100	18.78 ± 0.08^{bA}	11.73 ± 0.20^{cB}	17.69 ± 0.63^{abA}	193.17^{***}
물	100	0.02 ± 0.00^{eA}	0.15 ± 0.09^{eA}	0.06 ± 0.06^{dA}	2.201^{***}
아임계수 (Subcritical water)	100			7.47 ± 0.21^{c}	
F		2068.72^{***}	280.40^{***}	46.193^{***}	

[0065] 상기 표 2에서 보듯이, 100% 메탄올 및 70% 에탄올을 용매로 사용하여 가속용매추출장치를 적용했을 때, 추출 수율이 가장 높게 나타났다. 초음파 처리는 100% 메탄올을 사용했을 때, 가속용매추출장치와 추출 수율이 유사하게 나타났다. 아임계수는 메탄올 대비 35% 정도의 추출 수율을 보이나, 물에 비해서는 현저히 높은 추출 수율을 나타냈다.

[0067] **(3) 가속용매추출장치의 스케일-업**

[0068] 본 실험에서는 아임계수 및 가속용매추출장치의 스케일-업 실험을 수행하였다. 실험을 위해, 전처리된

수국차 잎 가루 10 g을 100 mL 추출용기에 넣고 규조토 1 g을 넣어 추출하였다.

[0069] 실험 결과는 하기 표 3에 나타냈다. 10 g 추출 시, 기본적으로 사용하던 5 min×3 cycles로는 추출 수율이 낮게 나타났고, 스케일-업 추출 시 최적의 조건은 10 min×5 cycles로 나타났다.

표 3

[0070]

Time × Cycles	샘플 (g)	농도 (mg/mL)	필로둘신 (mg/g db)
5 min × 3 cycles	1	0.11	23.67
5 min × 3 cycles	5	0.26	26.24
5 min × 3 cycles	10	0.086	14.22
10 min × 5 cycles	10	0.16	24.91

[0072] **[실시예 3: 최적 추출 조건의 확립]**

[0073] 경제성 및 공정의 단순성 등을 고려하여 전처리 조건으로 '물침지'를 선택하고, 상기 실시예 1 및 2의 실험 결과를 참조하여 최적 추출 조건을 설정하였다.

[0074] 여러 조건을 설정하여 최적화 실험을 수행한 결과, 동결건조 수국차 잎 가루를 물에 침지(동결건조분말 1g 당 5~6 mL의 물 첨가, 15 hr, 30℃) 후 건조 (18 hr, 70℃) 및 분쇄를 하고, 가속용매추출장치를 사용하여 70℃, 5분, 3회 조건 하에서 메탄올로 추출하는 것이 우수하게 나타났다 (표 4).

표 4

[0075]

	동결건조 수국차 잎 가루 중 함량	물 침지 전처리 후 함량
필로둘신 (mg/g)	0.48	25.29

[0077] 상기 최적화 조건으로 전처리 및 추출을 수행할 경우, 필로둘신이 원물 대비 약 52배 정도 증가하는 것으로 나타났다.

[0079] **[실시예 4: 정제방법에 따른 필로둘신 함량 및 순도 변화 측정]**

[0080] 추출물 내의 다량의 색소체 및 불순물을 효율적으로 제거하기 위해 다양한 정제방법을 사용하였다.

[0082] **(1) Amberlite® 200C Na 및 Amberlite® IRA-67 이온교환수지(ion exchange resin)을 통한 색소체 및 불순물 제거**

[0083] 활성화된 Amberlite® 200C Na 및 Amberlite® IRA-67을 동량으로 넣어 교반하고, 오픈컬럼(open column)에 레진을 패킹하였다. 이동상(mobile phase)을 메탄올(methanol)로 바꿔주기 위해, 레진의 2배에 해당하는 메탄올을 오픈컬럼에 흘려주고, 혼합 레진과 동량의 추출액을 로딩하였다. 유속(Flow rate)은 3 SV space velocity로 하고, 부하한 추출액 양의 3배에 해당하는 메탄올을 더 흘려 레진 내에 잔존하는 필로둘신을 수세하여 모았다.

[0084] 실험결과, 이온교환수지를 사용하였을 때, 효율적으로 색소체 및 불순물을 제거할 수 있었으며, 회수된 필로둘신의 회수율은 약 90%이었다 (표 5). 또한, 600 mL 스케일에서도 90% 이상의 회수율을 얻을 수 있었다 (도 6). 도 6은 이온교환수지(Amberlite® 200C Na 및 Amberlite® IRA-67)를 사용하여 추출물의 색소체 및 불순물을 제거한 결과이다.

표 5

[0085]

컬럼 크기 (cm^2)	주입 (Injection, mL)	레진 (mL)	세척 메탄올 (Washing MeOH, mL)	최종 부피 (mL)	회수율 (%)
2 × 45	60	60	180	225	88.48
5 × 50	300	300	1000	1400	88.56
5 × 50	600	500	1500	2300	92.58

[0087] **(2) Amberlite® 200C NA+와 TRILITE® AW90 이온교환수지를 통한 색소체 및 불순물 제거**

[0088] 본 실험에서는 상기와 다르게 레진으로 Amberlite® 200C NA+ (강산 양이온) 와 TRILITE® AW90 (약염기 음이온)을 혼합 사용하였고, 기타 실험 방법은 상기의 방법을 동일하게 사용하였다. 실험결과, 색소체 제거능력이 Amberlite® 200C Na와 Amberlite® IRA-67을 사용했을 때보다 열등하게 나타났고, 회수율은 38.29%로 낮게 나타났다 (도 7). 도 7은 이온교환수지(Amberlite® 200C NA+ 및 TRILITE® AW90)를 사용하여 추출물의 색소체 및 불순물을 제거한 결과이다.

[0090] **[실시예 5: 카트리지 사용에 따른 필로둘신 함량 및 순도 변화 측정]**

[0091] 상기의 이온교환 후, 잔존 색소 및 불순물을 제거하기 위해 카트리지 정제를 수행하여 보았다. 이온교환수지를 통과한 용리액을 10배 농축한 후, 0.45 mm 시린지 필터 (syringe filter)로 여과하고, 20 mL 50% 아세토니트릴(acetonitrile)로 포화시킨 'Waters Oasis HLB 20cc (1g) LP extraction cartridge'에 로딩하였다. 60 mL의 50% 아세토니트릴로 필로둘신을 용리하고, 80 mL의 100% 아세토니트릴로 카트리지에 남은 필로둘신을 씻어내었다. 이 과정을 1회 반복하고 농축한 후 침전물을 100% 메탄올에 녹였다. 실험 결과, 색소가 효율적으로 제거됨을 확인할 수 있었고, 회수율은 81%를 나타내었다 (도 8). 도 8은 이온교환 후, 잔존하는 색소 및 불순물을 카트리지 정제를 통해 제거한 결과이다.

[0093] **[실시예 6: '리사이클링 프렙. HPLC (Recycling Prep. HPLC)' 적용에 따른 필로둘신 함량 및 순도 변화 측정]**

[0094] 순수한 필로둘신을 정제하고자, 상기 실시예 5의 카트리지 정제 후, '리사이클링 프렙. HPLC'를 사용한 정제를 더 수행하였다. 실험방법은 하기와 같았다.

[0096] **(1) '리사이클링 프렙. HPLC (recycling prep HPLC)'의 조건**

[0097] - 기기: LC9104 (JAI Co., Japan)

[0098] - 컬럼 : ODS-AP (20 × 500 mm) + ODS-AP (20 × 500 mm, JAI Co., Japan) (2개의 컬럼을 연달아 연결하여 사용함)

[0099] - 용리제(Eluent) : 50%(v/v) 아세토니트릴 수용액

[0100] - 유속(Flow rate) : 6 mL/min

[0101] - UV 검출 : 265 nm

[0102] - 주입 부피 (injection volume) : 4 mL (32 mL의 조샘플에 상응)

[0103] - 리사이클 챔버 (Recycle number) : 1 time

[0104] - 총 분석 시간 : 255 min

[0106] **(2) 수행 과정**

[0107] 1) 컬럼을 50% 아세토니트릴 수용액으로 평형화(Equilibrate) 시켰다.

[0108] 2) 컬럼에 4 mL의 샘플을 주입하였다 (외부 주입기 사용).

[0109] 3) 91분부터 180분까지의 분획 회수한 후, 리사이클(컬럼에 재주입)시켰다.

[0110] 4) 분획 수집기 (fraction collector)를 이용하여 수국 산 (hydrangea acid) 피크 (앞 피크) 및 필로둘신 피크 (뒷 피크)를 수집하였다 (도 9). 도 9는 '리사이클링 프렙. HPLC'를 이용해 필로둘신을 정제한 것을 보여주는 크로마토그램이다.

[0111] 5) 'analytical HPLC'를 사용하여 각각의 피크를 확인하였다.

[0112] 6) 진공 하에서 로타리 증발기를 이용하여 각각의 분획으로부터 용리제를 제거하였다 (수조 온도 = 55 ℃).

[0113] 7) 100 mL의 에탄올을 첨가하였다.

[0114] 8) '잔존하는 아세토니트릴을 제거하기 위해 사용한 단계 6)'의 방법을 동일하게 이용하여 에탄올을 제

거하였다.

[0115] 9) 단계 7) ~ 단계 8)을 2번 반복하였다.

[0116] 10) 정제된 화합물을 현탁시키기 위하여 100 mL의 물을 첨가하고 잘 섞어 주었다.

[0117] 11) 정제된 화합물을 포함하는 현탁액을 동결건조하였다.

[0119] **(3) 정제된 필로둘신 (도 10)**

[0120] - 성상: 옅은 노란색 분말

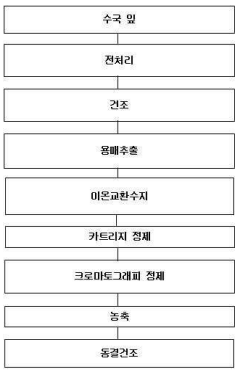
[0121] - 무게 : 1.093 g

[0122] - 순도 : 99.2%

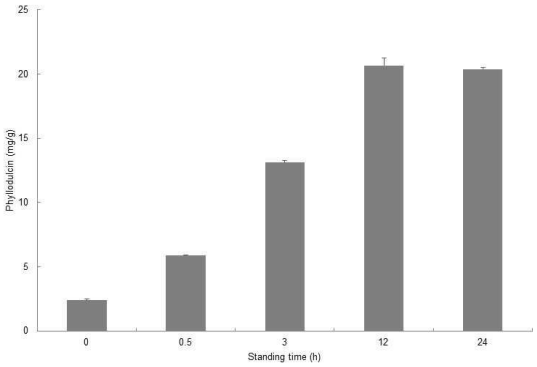
[0123] 도 10은 순수하게 정제된 필로둘신의 사진이다.

도면

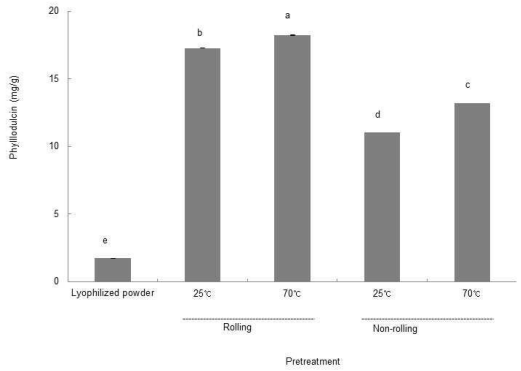
도면1



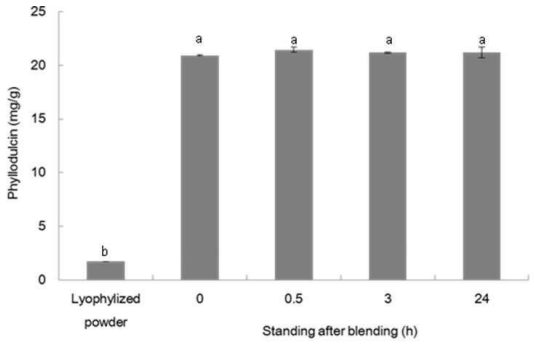
도면2



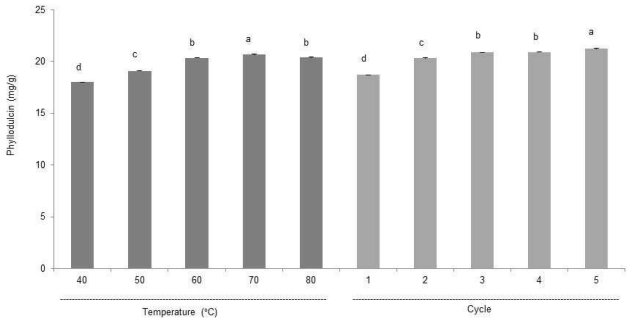
도면3



도면4



도면5

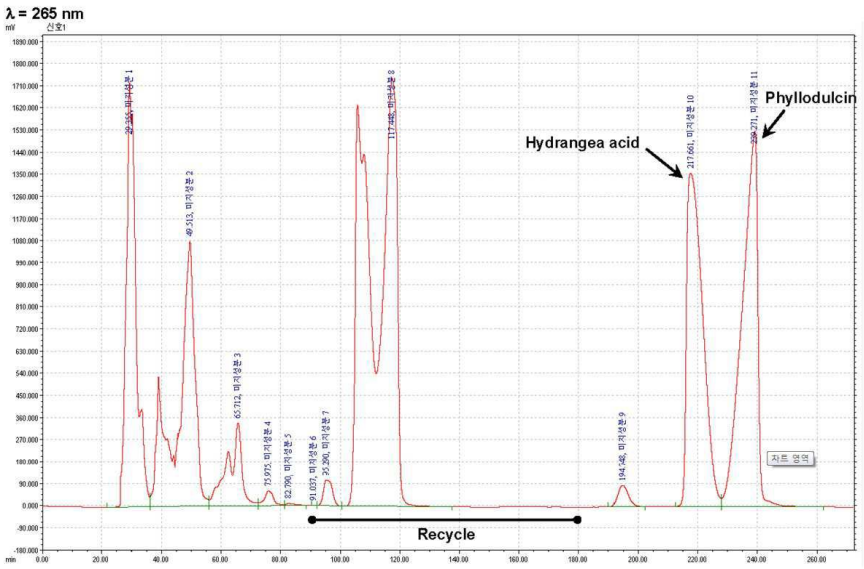


도면6

도면7

도면8

도면9



도면10