



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년12월10일  
(11) 등록번호 10-0930927  
(24) 등록일자 2009년12월02일

(51) Int. Cl.

A23L 1/29 (2006.01) A23L 2/00 (2006.01)

A23L 1/212 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0022574

(22) 출원일자 2008년03월11일

심사청구일자 2008년03월11일

(65) 공개번호 10-2009-0097440

(43) 공개일자 2009년09월16일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020050055479 A\*

KR1019970064619 A

KR1019870008523 A

US6306450 B1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

이광원

경기 성남시 분당구 이매동 삼환아파트 1104동 1901호

이현순

서울 성북구 장위1동 231-157 웨미리타운 104호

박호영

서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 동관 식품공학과411호

(74) 대리인

현종철

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김태산

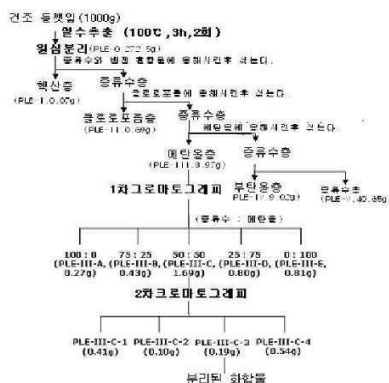
(54) 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는카페인산을 제조하는 방법, 그로부터 제조된 카페인산, 및 상기 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법, 그로부터 제조된 카페인산, 및 상기 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 건조 들깨잎에 대하여 증류수를 이용한 환류 냉각추출을 수행하는 단계; 상기 환류 냉각추출 단계로부터 얻어진 추출물에 대하여 원심분리를 수행하여 상등액을 얻는 단계; 상기 상등액을 여과한 여과액을 감압농축 및 동결건조시킴으로써 들깨잎 추출 분말을 얻는 단계; 상기 들깨잎 추출 분말을 복수 개의 추출용매를 사용하여 순차적으로 추출함으로써 분획물들을 제조하는 단계; 및 상기 분획물들 중 가장 높은  $\gamma$ -GCS 활성을 나타내는 분획물을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법, 그로부터 제조된 카페인산, 및 상기 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 들깨잎으로부터 간편하고 저렴한 방법으로  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시켜 간 기능을 향상시키며 강력한 항산화 효능을 갖는 카페인산을 제조할 수 있으며, 제조된 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물을 간 기능 저하 예방 및 치료에 광범위하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

건조 들깻잎에 대하여 증류수를 이용한 환류 냉각추출을 수행하는 단계;  
 상기 환류 냉각추출 단계로부터 얻어진 추출물에 대하여 원심분리를 수행하여 상등액을 얻는 단계;  
 상기 상등액을 여과한 여과액을 감압농축 및 동결건조시킴으로써 들깻잎 추출 분말을 얻는 단계;  
 상기 들깻잎 추출 분말을 복수 개의 추출용매를 사용하여 순차적으로 추출함으로써 분획물들을 제조하는 단계;  
 및  
 상기 분획물들 중 가장 높은  $\gamma$ -GCS 활성을 나타내는 분획물을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 들깻잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 환류 냉각추출 단계는 건조 들깻잎 100g에 대해서 0.8리터 내지 1.2리터 부피의 증류수로 100℃ 내지 110℃ 온도에서 3시간 내지 4시간 동안 추출하는 과정을 2회 반복함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 들깻잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 원심분리 단계는 4℃의 온도에서, 7,500rpm의 속도로 25분 내지 30분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 들깻잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 분획물 제조 단계는 제1 추출용매, 제2 추출용매, 제3 추출용매 및 제4 추출용매로 이루어진 4가지 추출용매를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 들깻잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 분획물 제조 단계는,  
 상기 들깻잎 추출 분말을 상기 제1 추출용매 중에 용해시킨 후 교반하여 제1 유기용매층 및 제1 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제1 유기용매층으로부터 제1 분획물을 수득하는 단계;  
 상기 제1 증류수층을 상기 제2 추출용매와 혼합한 후 교반하여 제2 유기용매층 및 제2 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제2 유기용매층으로부터 제2 분획물을 수득하는 단계;  
 상기 제2 증류수층을 상기 제3 추출용매와 혼합한 후 교반하여 제3 유기용매층 및 제3 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제3 유기용매층으로부터 제3 분획물을 수득하는 단계; 및  
 상기 제3 증류수층을 상기 제4 추출용매와 혼합한 후 교반하여 제4 유기용매층 및 제4 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제4 유기용매층으로부터 제4 분획물을 수득하고 상기 제4 증류수층으로부터 제5 분획물을 수득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 들깻잎으로부터 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 추출용매는 각각 증류수와 헥산의 혼합 용액, 클로로포름, 아세트산에틸 및 부탄올인 것을 특징으로 하는 들깻잎으로부터 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 제1 추출용매는 증류수 100 중량부에 대해서 헥산 100 내지 120 중량부를 혼합한 혼합 용액인 것을 특징으로 하는 들깻잎으로부터 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 8**

제6항에 있어서, 상기 제1 증류수층과 제2 추출용매, 상기 제2 증류수층과 제3 추출용매 및 상기 제3 증류수층과 제4 추출용매의 혼합비는 각각, 상기 제1 증류수층, 제2 증류수층 및 제3 증류수층 100 중량부에 대해서, 상기 제2 추출용매, 제3 추출용매 및 제4 추출용매 100 내지 120 중량부인 것을 특징으로 하는 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 분리 및 정제 단계는 컬럼 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 분리 및 정제 단계는,

상기 분획물들에 대하여 정지상으로서 폴리스티렌-디비닐벤젠계 공중합체 수지를 사용하고 이동상으로서 메탄올 수용액을 사용하는 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 1차 분리 단계;

상기 1차 분리 단계의 결과물들에 대하여 정지상으로서 히드록시프로필화 텍스트란 수지를 사용하고 이동상으로서 메탄올 수용액을 사용하는 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 2차 분리 단계; 및

상기 2차 분리 단계의 결과물들 중 가장 높은  $\gamma$ -GCS 활성을 나타내는 결과물을 선별하여 정제하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 1차 분리 단계는 각각 증류수:메탄올의 중량비가 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 및 0:100인 5 종류 이동상들을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 상기 2차 분리 단계는 증류수:메탄올의 중량비가 30:70인 이동상을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

<1> 본 발명은 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법, 그로부터 제조된 카페인산, 및 상기 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 들깨잎으로부터

강력한 항산화 효과를 나타내며,  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시킴에 따라 간기능 보호에 효과가 있어 간기능 저하 예방 및 치료에 광범위하게 활용할 수 있는 카페인산을 제조하는 방법, 그로부터 제조된 카페인산 및 상기 방법으로 제조된 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

- <2> 들깨는 식품분류학적으로 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 1년생 초본으로써, 깻잎이라 함은 넓게는 들깨의 잎사귀를 모두 지칭한다. 들깨는 기름을 짜내기 위하여 재배되는 작물인데, 생육하는 동안에 잎을 수확하여 식용으로 하는 것이 바로 깻잎이다. 들깻잎은 페틸라알데히드나 리모넨, 페틸케톤 등과 같은 방향성 정유 성분이 들어 있어 독특한 향이 입맛을 돋구어 주므로 쌈 채소로 많이 이용된다. 이 외에도 들깻잎은 나물 반찬이나 장아찌, 깻잎 김치 등의 밑반찬으로 먹기도 하고, 무침이나 탕 등에 향신료처럼 사용되기도 한다. 과거에는 주로 종실유를 채취할 목적으로 들깨가 재배되어왔으나 최근 육류의 소비증가, 외식문화의 발달 및 웰빙 열풍에 의한 쌈채소 소비 시장의 급성장으로 잎들깨용 품종이 개발되어 연중 생산이 가능해졌다. 따라서 들깻잎의 의학적 기능성을 밝히고 이를 식품, 의약 부문에 다양하게 응용할 경우 산업상 이용 가치가 클 것으로 예상된다.
- <3> 들깻잎의 기능성을 나타내는 물질로는 페틸라알데하이드, 로즈마리산, 안토시아닌 카페인산 등이 보고된 바 있다. 이들 성분은 높은 수용성을 갖기 때문에 섭취하였을 경우 높은 이용율을 기대할 수 있으며, 특히 카페인산은 섭취하였을 경우 소장 흡수율이 95% 이상이다. 카페인산은 강한 항산화 활성을 가지고 있으며, 특히 채소나 과일류에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 다만 현재까지 카페인산의 항암효과에 관한 기작은 보고된 바가 없다.
- <4> 국내의 간 질환 및 간암에 의한 사망률은 전체 사망 원인의 10%를 차지한다. 통계청에서 발표한 2005년 사망원인 통계결과에 따르면 국내 사망원인의 6위에 간 질환이 올라있고, 총 국민의 5~8%가 B형 간염 바이러스 보유자로 알려져 있을 만큼 국민 건강을 크게 위협하고 있는 것도 현실이다. 그러나, 병원 또는 시중에서 처방되는 간장약은 대개 동물 또는 임상 시험에서 급성 간손상에 대한 예방 및 치료 효과를 보이는 것들이며, 이들 대부분은 합성 화학 물질로서 병을 근본적으로 치료한다기보다는 간세포의 손상을 경감시킨다는 의미에서 보조 치료제로 기능할 뿐이며, 생활 관리나 정기적인 검진을 대체할 수는 없다. 따라서, 합성 화학 물질이 아닌 천연 물질에서 간 보호 및 간 기능 향상 치료제를 찾는 기술의 개발이 요구되고 있다. 이러한 요구에 따라서, 종래 식물 추출물을 이용하여 간암 및 간질환 치료에 이용하는 다양한 기술이 개발되었는데, 버섯 추출물, 마늘 추출물, 나물 추출물 등이 그 예이다. 종래 기술은 간보호 효과를 나타내는 식물 추출물을 유효성분으로 한 의약품이나 기능성 식품 제조에 관한 것이며, 이러한 식물 추출물은 혈청 ALT, AST, CT 및  $\gamma$ -GCS 수치를 유의적으로 증가시킴으로써 궁극적으로 간 보호 작용을 나타낸다.
- <5> 한편, 글루타티온 (Glutathione)은 대표적인 간 보호 효소로써 간 내의 해독작용과 산화, 환원 반응에 있어서 중요한 역할을 하며 이 효소의 양을 조절하는 것이  $\gamma$ -글루타미실스테인 신테타아제 ( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase,  $\gamma$ -GCS)이다. 다만, 종래 식물로부터 간암 치료에 유효한 성분을 추출하는 방법은 고가의 장비가 필요하고, 방법이 복잡하며, 고비용이 소모되고, 오랜 분석시간을 필요로 한다는 단점을 내포하고 있으며, 더욱이 여러 가지 성분의 혼합물인 식물 추출물 자체가 간 보호 또는 간질환 예방에 효과가 있다는 것일 뿐, 천연 단일 물질이 단독으로  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시켜 간 질환에 유용하다는 사실을 밝힌 연구는 전무한 실정이다.
- <6> 또한, 식물에서 유효물질을 분리해 내는 방법으로는 거름, 분별결정, 추출, 증류, 분별증류, 크로마토그래피에 의한 혼합물의 분리 등이 있으며, 추출은 액체의 용매를 사용해서 고체 또는 액체 속에서 어떤 특정한 물질을 용해·분리하는 조작을 뜻한다. 보통 유기용매 (클로로포름, 디클로로메탄, 에틸 아세테이트 : 비수용성 용매) 와 물을 이용하여 추출을 행하는데, 유기용매와 물을 서로 섞으면, 두 용매의 층이 갈라지고 유기용매의 밀도가 물보다 크기 때문에 물층은 위로, 유기용매층은 아래로 위치한다. 따라서, 분별깔대기를 이용하여 아래층을 받아내어 혼합물을 분리한 후, 용매로 쓰인 유기물질과 물을 각각 증류하여 순수한 물질을 얻게 된다. 이는 보통 수용성 물질과 비수용성 물질 (유기용매에 녹는 물질)을 분리할 때 쓰이는 방법이다. 또한, 크로마토그래피는 복잡한 화합물을 구성하는 유사한 화합물을 분리할 수 있는 분리법으로서, 정지상 (stationary phase)과 이동상 (mobile phase)으로 구성된다. 분리하고자 하는 물질을 적당한 용매에 용해시켜서 이동상을 따라서 이동시키거나 고정상에 흡착됨으로써 분리가 된다. 이는 정지상과 이동상의 친화도에 따라 분리하고자 하는 물질의 각 성분이 분배되는 정도가 달라지기 때문이다. 즉, 고정상에 강하게 결합한 성분은 고정상에 존재하고 약하게 결합한 성분은 이동상을 따라 고정상을 통과하게 되어, 결국 각 성분은 다른 속도로 이동하므로 분리된다. 이와 같은 과정을 용리 (resolution)라 하고, 이동거리를 나타내기 위해 Rf (rate of flow)를 사용한다.

- <7> [  $R_f$  = 각 시료가 움직인 거리/용매가 움직인 거리 (용매선)]
- <8> 크로마토그래피는 이동상에 따라 이동상이 기체인 기체 크로마토그래피 (Gas Chromatography, GC)와 이동상이 액체인 액체 크로마토그래피 (Liquid Chromatography, LC)로 분류되고, 정지상의 형태와 관련하여 정지상을 컬럼에 넣고 용리하는 컬럼 크로마토그래피 (Column Chromatography)가 있다.
- <9> 상술한 혼합물의 분리방법은 혼합물의 물리적 및 화학적 특징이 서로 다른 점을 이용한 것으로서, 혼합물의 특성과 조건에 따라 적합한 방법을 선택해야 한다. 따라서, 종래에 널리 사용되는 혼합물 분리방법이라도 특정 혼합물에서 목적하는 특정 물질만을 분리, 정제하고자 할 때, 분리방법의 종류, 사용되는 시약, 분리순서, 분리조건 등을 엄선하여야 한다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

- <10> 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하고자 안출된 것으로서, 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 들깻잎으로부터 간편하고 저렴한 방법으로  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- <11> 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는 상기 방법에 의해서 제조되며,  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시킴으로써 간 기능 향상 및 간 보호 활성을 갖는 카페인산을 제공하는 것이다.
- <12> 본 발명이 해결하고자 하는 세 번째 및 네 번째 과제는 상기 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물을 제공하는 것이다.

**과제 해결수단**

- <13> 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 달성하기 위해서,
- <14> 건조 들깻잎에 대하여 증류수를 이용한 환류 냉각추출을 수행하는 단계;
- <15> 상기 환류 냉각추출 단계로부터 얻어진 추출물에 대하여 원심분리를 수행하여 상등액을 얻는 단계;
- <16> 상기 상등액을 여과한 여과액을 감압농축 및 동결건조시킴으로써 들깻잎 추출 분말을 얻는 단계;
- <17> 상기 들깻잎 추출 분말을 복수 개의 추출용매를 사용하여 순차적으로 추출함으로써 분획물들을 제조하는 단계; 및
- <18> 상기 분획물들 중 가장 높은  $\gamma$ -GCS 활성을 나타내는 분획물을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 들깻잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법을 제공한다.
- <19> 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 환류 냉각추출 단계는 건조 들깻잎 100g에 대해서 0.8리터 내지 1.2리터 부피의 증류수로 100℃ 내지 110℃ 온도에서 3시간 내지 4시간 동안 추출하는 과정을 2회 반복함으로써 수행될 수 있다.
- <20> 본 발명의 바람직한 다른 실시예에 따르면, 상기 원심분리 단계는 4℃의 온도에서, 7,500rpm의 속도로 25분 내지 30분 동안 수행될 수 있다.
- <21> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 분획물 제조 단계는 제1 추출용매, 제2 추출용매, 제3 추출용매 및 제4 추출용매로 이루어진 4가지 추출용매를 사용하여 수행될 수 있다.
- <22> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 분획물 제조 단계는,
- <23> 상기 들깻잎 추출 분말을 상기 제1 추출용매 중에 용해시킨 후 교반하여 제1 유기용매층 및 제1 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제1 유기용매층으로부터 제1 분획물을 수득하는 단계;
- <24> 상기 제1 증류수층을 상기 제2 추출용매와 혼합한 후 교반하여 제2 유기용매층 및 제2 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제2 유기용매층으로부터 제2 분획물을 수득하는 단계;
- <25> 상기 제2 증류수층을 상기 제3 추출용매와 혼합한 후 교반하여 제3 유기용매층 및 제3 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제3 유기용매층으로부터 제3 분획물을 수득하는 단계; 및

- <26> 상기 제3 증류수층을 상기 제4 추출용매와 혼합한 후 교반하여 제4 유기용매층 및 제4 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제4 유기용매층으로부터 제4 분획물을 수득하고 상기 제4 증류수층으로부터 제5 분획물을 수득하는 단계를 포함할 수 있다.
- <27> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 추출용매는 각각 증류수와 헥산의 혼합 용액, 클로로포름, 아세트산에틸 및 부탄올일 수 있다.
- <28> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 제1 추출용매는 증류수 100 중량부에 대해서 헥산 100 내지 120 중량부를 혼합한 혼합 용액일 수 있다.
- <29> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 제1 증류수층과 제2 추출용매, 상기 제2 증류수층과 제3 추출용매 및 상기 제3 증류수층과 제4 추출용매의 혼합비는 각각, 상기 제1 증류수층, 제2 증류수층 및 제3 증류수층 100 중량부에 대해서, 상기 제2 추출용매, 제3 추출용매 및 제4 추출용매 100 내지 120 중량부일 수 있다.
- <30> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 분리 및 정제 단계는 컬럼 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행될 수 있다.
- <31> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 분리 및 정제 단계는,
- <32> 상기 분획물들에 대하여 정지상으로서 폴리스티렌-디비닐벤젠계 공중합체 수지를 사용하고 이동상으로서 메탄올 수용액을 사용하는 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 1차 분리 단계;
- <33> 상기 1차 분리 단계의 결과물들에 대하여 정지상으로서 히드록시프로필화 텍스트란 수지를 사용하고 이동상으로서 메탄올 수용액을 사용하는 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 2차 분리 단계; 및
- <34> 상기 2차 분리 단계의 결과물들 중 가장 높은  $\gamma$ -GCS 활성을 나타내는 결과물을 선별하여 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- <35> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 1차 분리 단계는 각각 증류수:메탄올의 중량비가 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 및 0:100인 5 종류 이동상들을 사용하여 수행될 수 있다.
- <36> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 2차 분리 단계는 증류수:메탄올의 중량비가 30:70인 이동상을 사용하여 수행될 수 있다.
- <37> 본 발명은 상기 두 번째 과제를 달성하기 위해서,
- <38> 상기 방법에 의해 제조된 카페인산을 제공한다.
- <39> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 카페인산은  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시킴으로 간보호 효능을 가질 수 있다.
- <40> 본 발명은 상기 세 번째 과제를 달성하기 위해서,
- <41> 상기 카페인산을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- <42> 또한, 본 발명은 상기 네 번째 과제를 달성하기 위해서,
- <43> 상기 카페인산을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

### 효 과

- <44> 본 발명에 따르면, 들깨잎으로부터 간편하고 저렴한 방법으로  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시켜 간 기능을 향상시키며 강력한 항산화 효능을 갖는 카페인산을 제조할 수 있으며, 제조된 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물을 간 기능 저하 예방 및 치료에 광범위하게 활용할 수 있다.

### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <45> 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.
- <46> 들깨잎에 함유된 카페인산은 섭취하였을 경우 소장 흡수율이 95% 이상으로 체내 이용률이 매우 우수하며, 카페인산은 강한 항산화 활성을 갖기 때문에 항암 효과가 있다고 알려져 있다. 이에 더하여, 본 발명은 들깨잎(*Perilla frutescens*)으로부터 분리, 정제한 카페인산 (caffeic acid)이 간보호 효소인 GSH를 높여주는  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 효과가 있다는 사실을 밝혀내었으며, 이에 기초하여 들깨잎으로부터 효과적이고 간편

하게 카페인산을 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

- <47> 구체적으로, 본 발명은,
- <48> 건조 들깻잎에 대하여 증류수를 이용한 환류 냉각추출을 수행하는 단계; 상기 환류 냉각추출 단계로부터 얻어진 추출물에 대하여 원심분리를 수행하여 상등액을 얻는 단계; 상기 상등액을 여과한 여과액을 감압농축 및 동결건조시킴으로써 들깻잎 추출 분말을 얻는 단계; 상기 들깻잎 추출 분말을 복수 개의 추출용매를 사용하여 순차적으로 추출함으로써 분획물들을 제조하는 단계; 및 상기 분획물들 중 가장 높은  $\gamma$ -GCS 활성을 나타내는 분획물을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 들깻잎으로부터 카페인산을 제조하는 방법을 제공한다.
- <49> 상기 환류 냉각추출단계는 열수추출시 기화되는 수증기를 포집하기 위하여 수증기를 냉각시켜 밑부분의 용기 속으로 돌려보내는 장치인 환류냉각기를 사용하였으며 따라서 열수추출단계와 환류냉각추출 단계는 동일한 과정이다. 상기 환류 냉각추출 단계는 건조 들깻잎 100g에 대해서 0.8리터 내지 1.2리터 부피의 증류수로 100℃ 내지 110℃ 온도에서 3시간 내지 4시간 동안 추출하는 과정을 2회 반복함으로써 수행되는 것이 바람직한데, 상기 증류수의 부피가 0.8리터 미만인 경우에는 환류 냉각추출 과정으로부터 얻어지는 추출물의 부피가 너무 작아서 후속 공정을 수행하기가 용이하지 않으며 들깻잎과 증류수의 혼합물의 비열이 커지므로 가열 온도가 높아지거나 가열 시간이 길어지게 되어 환류 냉각 추출의 시간과 비용이 많이 소요되는 문제점이 있고, 상기 증류수의 부피가 1.2리터를 초과하는 경우에는 상기 추출물로부터의 최종 분말 수득율이 높지 않으며 불필요하게 가열시간이 길어져 공정비용이 증가하는 문제점이 있어서 바람직하지 않다.
- <50> 또한, 상기 추출 시간은 3시간 내지 4시간인 것이 바람직한데, 가열시간이 3시간 미만일 경우에는 들깻잎을 구성하는 성분이 분리되지 않아 들깻잎으로부터 추출물이 생성되지 않을 염려가 있으며, 4시간 이상 가열할 경우에는 유효성분이 파괴되거나 변질 될 우려가 있다. 또한, 환류 냉각추출 과정의 수득율을 최대로 높이기 위해 상기 과정을 두 번 반복함이 바람직하다. 환류 냉각추출 과정을 한번 진행할 경우 들깻잎에 유효성분이 완전히 추출되지 않고 남아 있으며, 1차 환류 냉각추출 후 추출물이 제거된 들깻잎을 회수하여 2차 환류 냉각추출 과정을 반복할 경우 1차 환류 냉각추출시 추출된 추출물의 중량 중 60%를 얻을 수 있으나 세 번 이상 환류 냉각추출을 진행할 경우 수율이 낮아지므로 더 이상 진행하는 것은 바람직하지 않다. 상기 환류 냉각추출의 온도는 100℃ 내지 110℃ 온도에서 진행될 수 있고 100℃이하의 온도에서는 제공되는 열이 건조 들깻잎과 증류수의 혼합물의 온도를 높이는 데에만 사용될 뿐 들깻잎의 액체 유효성분이 기화되지 않아 추출과정이 진행되지 않으며, 110℃ 이상의 온도에서는 들깻잎의 유효성분이 화학적 변화를 일으키거나 파괴될 우려가 있다.
- <51> 상기 원심분리 단계는 4℃의 온도에서, 7,500rpm의 속도로 25분 내지 30분 동안 수행될 수 있다. 이는 SOP(Standard Operating Procedure)에 고시된 규정을 따르는 것이다.
- <52> 또한, 상기 분획물 제조 단계는 제1 추출용매, 제2 추출용매, 제3 추출용매 및 제4 추출용매로 이루어진 4가지 추출용매를 사용하여 수행될 수 있다.
- <53> 상기 분획물 제조 단계는, 상기 들깻잎 추출 분말을 상기 제1 추출용매 중에 용해시킨 후 교반하여 제1 유기용매층 및 제1 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제1 유기용매층으로부터 제1 분획물을 수득하는 단계; 상기 제1 증류수층을 상기 제2 추출용매와 혼합한 후 교반하여 제2 유기용매층 및 제2 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제2 유기용매층으로부터 제2 분획물을 수득하는 단계; 상기 제2 증류수층을 상기 제3 추출용매와 혼합한 후 교반하여 제3 유기용매층 및 제3 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제3 유기용매층으로부터 제3 분획물을 수득하는 단계; 및 상기 제3 증류수층을 상기 제4 추출용매와 혼합한 후 교반하여 제4 유기용매층 및 제4 증류수층으로 층분리시킴으로써 상기 제4 유기용매층으로부터 제4 분획물을 수득하고 상기 제4 증류수층으로부터 제5 분획물을 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 이하, 유기용매를 이용해 추출하는 단계를 구체적으로 설명하기로 한다.
- <54> 제1, 제2, 제3 및 제4 추출용매는 각각 증류수와 헥산의 혼합 용액, 클로로포름, 아세트산 에틸 및 부탄올을 사용한다. 제1 추출용매는 증류수 100 중량부에 대해서 헥산 100 내지 120 중량부를 혼합한 용액을 사용한다. 유기용매의 극성은 다음의 표 1과 같다.

표 1

유기 용매	극성 지수 (Polarity Index)
헥산	0

부탄올	4
클로로포름	4.1
아세트산에틸	4.4
물	9

- <56> 극성 지수는 크기가 클수록 극성의 정도가 크다는 것을 의미하며, 따라서 상기 표 1에 의하면, 물은 강한 극성을 띠며, 헥산, 클로로포름, 아세트산 에틸 및 부탄올은 상대적으로 비극성 물질이라고 할 수 있다. 극성 물질과 비극성 물질이 섞인 혼합물을 극성 용매와 비극성 용매에 녹이면, 극성 물질은 극성 용매에 주로 녹고 비극성 물질은 비극성 용매에 주로 녹는다. 이러한 성질을 이용해 혼합물을 분리할 수 있으며, 본 발명은 이러한 유기 용매를 이용한 추출법을 이용, 들깨잎의 환류 냉각추출물로부터 카페인산 혼합물을 분리한다.
- <57> 도 1에는, 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라서, 물과 헥산의 혼합용매, 물과 클로로포름의 혼합용매, 물과 아세트산 에틸의 혼합용매 및 물과 부탄올의 혼합용매를 이용하여 열수 추출물(이하 열수추출물은 환류 냉각추출과정을 통해 추출된 들깨잎 유효성분의 혼합물을 의미한다.)을 분리하는 과정을 도시하였다. 예를 들어, 들깨잎 (*Perilla frutescens*) 열수 추출물 (PLE-0)로부터 상기 네 가지 유기용매를 이용한 분획결과, 높은  $\gamma$ -GCS 활성을 보인 PLE-III (아세트산 에틸층, 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해서 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 133.1  $\pm$  4.5 % 증가) 획분을 얻어낼 수 있었다.
- <58> 상기 제1 증류수층과 제2 추출용매, 상기 제2 증류수층과 제3 추출용매 및 상기 제3 증류수층과 제4 추출용매의 혼합비는 각각, 상기 제1 증류수층, 제2 증류수층 및 제3 증류수층 100 중량부에 대해서, 상기 제2 추출용매, 제3 추출용매 및 제4 추출용매 100 내지 120 중량부임이 바람직하다. 상기 제1 증류수층, 제2 증류수층 및 제3 증류수층 100 중량부에 대해서, 상기 제2 추출용매, 제3 추출용매 및 제4 추출용매를 100 중량부 미만의 비율로 혼합할 경우 극성이 큰 증류수의 비율이 커지게 되므로 추출용매가 전체적으로 극성을 띠게 되어 분리 대상인 열수 추출물 중 비극성 물질의 분리가 어려워지는 문제점이 있고, 120 중량부를 초과하여 혼합할 경우 추출용매가 전체적으로 비극성을 띠어 열수 추출물 중 극성 물질이 추출용매에 용해되지 않아 분리과정이 진행되지 않는 문제점이 있다.
- <59> 상기 분리 및 정제 단계는 컬럼 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행될 수 있다. 특히 상기 컬럼 크로마토그래피 장치를 이용한 분리 및 정제는, 상기 분획물들에 대하여 정지상으로서 폴리스티렌-디비닐벤젠계 공중합체 수지를 사용하고, 이동상으로서 메탄올 수용액을 사용하는 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 1차 분리 단계; 상기 1차 분리 단계의 결과물들에 대하여 정지상으로서 히드록시프로필화 텍스트란 수지를 사용하고 이동상으로서 메탄올 수용액을 사용하는 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 2차 분리 단계; 및 상기 2차 분리 단계의 결과물들 중 가장 높은  $\gamma$ -GCS 활성을 나타내는 결과물을 선별하여 정제하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 컬럼크로마토그래피는 혼합물의 물리적 성질이 비슷하여 분리가 힘들 경우에 사용되는 방법으로서, 50-100cm 가량의 투명한 관(컬럼)에 정지상인 폴리스티렌-디비닐벤젠계 공중합체 수지를 2/3정도 충전하고, 메탄올 수용액을 부어서 내부를 젖 상태로 만들어 둔다. 이 경우 용매가 정지상의 최상단부보다 항상 많이 들어 있어야 함을 유의해야 한다. 혼합물을 이동상인 메탄올에 녹여서 컬럼의 상부에서 투입하면 혼합물을 녹인 메탄올은 중력에 따라 아래로 천천히 이동한다. 이때, 이동상은 혼합물을 모두 용해시킬 수 있는 물질을 선택함이 바람직하고, 본 발명에서는 이러한 이유로 메탄올을 이동상으로 사용하였다. 이동상의 조건은 100% 증류수  $\rightarrow$  100% 메탄올(극성도 5.1)로, 단계별로 메탄올 농도 (25%씩)를 증가시키면서 컬럼 용량의 5배 이상의 이동상을 용출시킨다(도 1 참조). 즉, 각각 증류수:메탄올의 중량비가 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 및 0:100인 5 종류 이동상들을 사용하여 수행될 수 있다. 증류수와 메탄올의 중량비에 따라 혼합물 (PLE-III 분획)이 용해되는 정도가 다르며, 50:50인 경우 가장 잘 용해되므로 혼합물을 정제할 수 있다. 각 단계마다 분리를 정확하게 하기 위하여 용출되어 나온 물질의 흡광도가 280nm에서 0.3 이하가 될 때까지 용출한다. 용출되어 나온 각 획분을 농축 및 건조 후  $\gamma$ -GCS 활성을 측정하면 50% 증류수:50% 메탄올 PLE-III-C 획분의 활성이 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 135.6  $\pm$  7.4% 증가하는 현상을 보인다.
- <60> 이 획분을 정지상으로서 히드록시프로필화 텍스트란 수지, 예를 들어 Sephadex LH-20 수지를 이용하여 이동상의 조건을 증류수 30%:메탄올 70%의 조건으로 이동상을 용출시킨다. 혼합물 (PLE-III-C 획분) 속의 화합물들이 정지상인 히드록시프로필화 텍스트란 수지에 흡착되는 정도는 조금씩 차이가 있는데, 그 차이에 따라 밑으로 내려감에 따라 혼합물이 분리되어 총 4가지 획분을 얻을 수 있다. 이 4가지 획분 중, PLE-III-C-3 획분(도 2 참조; 171.4  $\pm$  13.2 % 증가)이 카페인산이다(도 1 참조). 분리된 용액을 회전식 진공 증발기(rotatory vacuum



evaporator)에 넣어 이동상만 날려 보내면 순수한 물질을 얻을 수 있다.

- <61> 상기 2차 분리 단계의 4가지 획분 (PLE-III-C-1, PLE-III-C-2, PLE-III-C-3, PLE-III-C-4) 중 카페인산을 구별하는 방법은 도 2에 도시한 대로  $\gamma$ -GCS 활성이 가장 높은 것을 택하는 방법으로 수행한다. 획분 PLE-III-C-1 획분과 PLE-III-C-2 획분은  $\gamma$ -GCS 활성의 증가 효과가 전혀 나타나지 않으며, PLE-III-C-3 획분은  $\gamma$ -GCS 활성을 약 75% 증가시키는 효과가 있으며, PLE-III-C-4 획분은 역시  $\gamma$ -GCS 활성을 증가시키나 그 정도는 25% 미만으로 미미하다. 따라서,  $\gamma$ -GCS 활성을 측정하여 뚜렷하게 높은 활성을 띠는 획분을 카페인산으로 판단하여 분리한다. 효소의 활성은 Ray (Ray et al., (1999). *Free Radic Biol Med* 27, 1346-56) 등에 의해 실험된 방법을 참고할 수 있으며, 젖산 탈수소효소 (lactate dehydrogenase)와 피루브산 인산화효소 (pyruvate kinase)의 두 가지 효소를 이용한 ADP의 형성으로서  $\gamma$ -GCS의 활성을 측정할 수 있다. 구체적으로는, 미리 37°C에서 5분간 효소반응액 (Tris-HCl buffer 0.1M pH 8.0, 10 mM L-glutamate, 10 mM L- $\alpha$ -aminobutylate, 5 mM ATP, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM KCl, 2mM EDTA, 2mM phosphoenolpyruvate, 0.2 mM NADH)을 예열한 후, 17 $\mu$ g의 피루브산 인산화효소와 젖산 탈수소효소를 첨가한 후 340nm의 파장에서 3분 동안 NADH의 산화되는 비율을 측정하고, 단백질량을 보정하여 이를  $\gamma$ -GCS의 활성으로 표현하고, 추출물을 처리하지 않은 대조군을 100% 기준으로 한다.
- <62> 한편, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 카페인산을 제공한다. 상기 단계를 따라 제조된 카페인산은 이미 강력한 항산화 효과를 나타냄이 알려졌고, 여기에 더해서  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시킴에 따라 간기능 보호에 효과를 더함을 밝혔다. 이는, 글루타티온 (glutathione)이 대표적인 간 보호 효소로써 간 내의 해독작용과 산화, 환원 반응에 있어서 중요한 역할을 하는데, 글루타티온 효소의 양을 조절하는 것이  $\gamma$ -GCS이고, 카페인산은 이러한  $\gamma$ -GCS의 수치를 유의적으로 증가시키기 때문이다.
- <63> 또한, 본 발명은 상기 카페인산을 포함하는 식품조성물을 제공한다.
- <64> 본 발명에 따른 식품 조성물은 통조림, 병조림, 건조가공식품, 발효식품 등 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 여러 종류의 첨가제를 혼합시킬 수 있다. 상기 첨가제는 이러한 종류의 영양식품에서 통상적으로 사용되는 것일 수 있다. 그러므로, 이러한 첨가제로는 여러 종류의 비타민, 무기질, 합성 풍미료 물질 및 천연 풍미료, 농축물, 천연 감미료 (소르마틴 (sormatin), 스티비아 (stevia) 등), 합성 감미료 (사카린, 스티비아 추출물, 아스파테임 등), 착색제, 풍미료 (치즈, 초콜릿 등) 및 폴리텍스트로스, 펩트산 및 그의 염 등과 같은 식물섬유, 알긴산 및 그의 염 등이고 이러한 첨가제는 단일 또는 조합해서 사용할 수 있다.
- <65> 본 발명의 카페인산은 청량음료, 캔디, 스낵, 빙과류 등 다양한 식품에 첨가될 수 있으며, 이러한 식품은 적당한 용기에 충전되어 증류 살균 (120°C, 20분)하면 충분한 저장 수명을 갖는다. 더 나아가, 미각을 돋우기 위해서 공지의 첨가제로서, 장미향, 레몬향, 바닐라향 또는 박하향과 같은 천연향료나 클로로필린 (Chlorophyllin), 플라보노이드 (Flavonoid) 등의 천연색소 및 감미성분인 글루코오스, 벌꿀, 설탕 등을 혼합 사용할 수도 있다.
- <66> 마지막으로, 본 발명은 상기 카페인산을 포함하는 약학조성물을 제공한다.
- <67> 본 발명의 약학 조성물에는 약제학적으로 허용가능한 첨가제가 포함될 수 있다. 상기 첨가제는 통상적인 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제, 현탁화제 등 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택적으로 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 정제 또는 경질캡슐제 등의 고형제형으로 제조할 경우, 부형제로서 미결정 셀룰로오스, 유당, 저치환도 히드록시셀룰로오스 등이 사용될 수 있고, 붕해제로서 전분글리콜산 나트륨, 무수인산일수소 칼슘 등이 사용될 수 있다. 결합제로는 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등이 사용될 수 있고, 활택제로서는 스테아린산 마그네슘, 이산화규소, 탈크 등으로부터 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 현탁화제로는 약제학 분야에서 통상적으로 사용되는 계면활성제 (예를 들어, 소르비탄 에스테르류, 또는 폴리소르베이트류 등)를 사용할 수 있다.
- <68> 본 발명의 조성물은 고형 및 액상 형태를 포함한 다양한 형태의 제형으로 제제화할 수 있으며, 이들 제형은 정제, 캡슐제 (경질 또는 연질), 액제 (solution), 현탁제, 유제, 및 시럽제 등을 포함한다. 바람직하게는 액제, 현탁제, 유제, 및 시럽제 등의 액체 제형을 가질 수 있다.
- <69> 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구를 포함한 다양한 투여방법으로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 경구로 투여될 수 있다. 투여량은 나이, 연령 및 성별과 같은 상태 및 질병의 경중 등에 따라 적당한 양으로 조정하여 투여될 수 있으며, 임상적으로 환자의 치료 또는 예방에 종사하는 당업자라면 용이하게 조정할 수 있다.
- <70> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하지만, 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

- <71> 들깻잎 (*Perilla frutescens*)부터  $\gamma$ -GCS 활성 증가 지표물질의 분리 및 정제 (도 1 참조)
- <72> 건조된 들깻잎 (*Perilla frutescens*) 1 kg을 증류수 15 L를 이용하여 3 시간 동안 환류냉각추출한 후, 7,500 rpm, 30분, 4°C에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 원심분리된 상등액에 남아 있을지 모르는 불용성 물질을 제거하기 위하여 재차 상등액을 whatman No. 41을 사용하여 여과하였다. 여과된 상등액을 감압농축한 다음, 동결 건조를 통하여 분말 형태의 들깻잎 열수 추출물 (perilla leaves extract; PLE-0)을 얻었다. 이렇게 얻어진 PLE-0 추출물을 물에 녹인 뒤 순차적으로 유기용매의 극성도를 달리하며 헥산, 클로로포름, 아세트산에틸, 부탄올 희분으로 극성에 따라 일차적 분리를 하였다.  $\gamma$ -GCS 활성이 가장 높은 아세트산에틸 희분을 연속적으로 diaion HP-20 수지 (Mitsubishi Chemical Co. 제조, Japan)에 흡착 후 증류수:메탄올 혼합용출액의 농도를 달리하여 50% 증류수:50% 메탄올 용액에서 용출하였다. 용출된 희분을 다시 sephadex LH-20 (Amersham Bio Sciences 제조, Sweden)이 충전된 컬럼을 이용하여 들깻잎의 간 보호 지표물질인 카페인산을 분리하였다.
- <73> PLE-III-C-3 희분이 카페인산임을 확인하는 실험예 (도 3 내지 도 8 참조)
- <74> PLE-III-C-3 희분의 단일물질에 대하여 NMR 분석을 통한 구조분석을 하였다. 대부분의 유기화합물의 관능기들은 자외선 영역의 전자기파를 흡수하는데, 포화 유기분자는 근자외선 및 가시광선 (200~800 nm)에서 전혀 흡수가 없지만, C=C, C-O 등의 이중결합과 같은 발색단 (chromospheres)이 존재하면 흡수가 일어난다. 따라서, 정제된 PLE-III-C-3 희분의 구조적 특징을 규명하기 위하여 이 물질의 자외선 스펙트럼 스캐닝 (UV spectrum scanning)을 실시한 결과, 320 nm 근처에서 높은 흡광도를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이 파장대의 물질의 특징은 페놀 고리에 수산기를 갖는 구조적인 특징을 보인다.
- <75> 또한, 전자 충돌 질량 스펙트럼 (electron impact mass spectrum, EI-MS)을 이용하여 분자량을 측정하였는데, 들깻잎 (*Perilla frutescens*)으로부터 얻은 PLE-III-C-3 물질의 분자량을 확인하였다 (도 3 참조). 실험 결과로부터, 들깻잎 (*Perilla frutescens*) 열수 추출물부터 얻은 PLE-III-C-3 희분의 간기능 개선 효능 물질의 분자량은 180임을 확인할 수 있었다.
- <76>  $^1\text{H-NMR}$ 을 통해 물질의 산화 경향, 메톡시기의 수 및 당의 존재와 결합위치 등을 알 수 있으며, 일반적으로, 6 ppm 이상에서는 방향족 수소가, 5 ppm 이하에서는 지방족 수소가 검출되는데, 들깻잎 (*Perilla frutescens*)으로부터 얻은 PLE-III-C-3 희분의  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼 (하기 표 2)을 참조하면, 6.19ppm과 7.54ppm 사이에 나타난 5개의 피크들은 올레핀 수소임을 알 수 있다.

**표 2**

	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	127.95		
2	115.23	7.03 (1H, d, 1.5)	C4, C6, C7
3	147.16		
4	149.59		
5	116.63	6.93 (1H, d, 8.0)	C1, C3
6	122.98	6.77 (1H, dd, 8.0, 1.5)	C2, C4, C7
7	146.78	7.54 (H, d, 16)	C1, C2, C6, C9
8	115.69	6.22 (H, d, 16)	C1, C9
9	171.17		

- <77> ( $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR은 500 MHz에서 측정)
- <79> 다음으로, 도 5에 도시된  $^{13}\text{C}$  NMR 데이터를 참조하면, 113.87ppm과 148.34ppm 사이에 있는 8개의 피크들은 메탄탄소임을 알 수 있고, 178.39ppm에 single로 나타난 피크는 카르복실산 탄소의 피크임을 알 수 있고, 이로써 탄소의 개수는 9개임을 확인하였다. 여기에 2D NMR의 COSY (도 6)와 HMBC (도 7) 분석도 병행하여 실시하였다.
- <80> 상기 스펙트럼 분석 데이터들을 기초로 하여, 들깻잎 (*Perilla frutescens*)으로부터  $\gamma$ -GCS 활성을 찾아 얻은 PLE-III-C-3 희분의 간기능 증강 물질은 도 8과 같은 화학식을 갖는 카페인산임을 알 수 있었다.

- <81> t-BHP를 주입한 간기능 손상에 있어서 들깨잎 (*Perilla frutescens*)의 보호효과
- <82> 실험동물로서 랫트 6마리를 한 군으로 설정하여 본 발명에 따른 들깨잎 추출물과 *t*-부틸히드로퍼옥시드 (*tert*-butylhydroperoxide, *t*-BHP)를 처리하지 않은 미처리 대조군, *t*-BHP만을 처리한 군, 본 발명에 따른 들깨잎 추출물 1000  $\mu$ g/kg을 식이에 첨가한 후 *t*-BHP를 처리한 군, 및 본 발명에 따른 들깨잎 추출물 3000  $\mu$ g/kg을 식이에 첨가한 후 *t*-BHP를 처리한 군으로 구분하여 4개의 군을 설정하였다. *t*-BHP는 랫트의 간을 손상시킬 목적으로 사용하였다. 5일간 식이를 조절한 후 미처리 대조군을 제외한 군에 *t*-BHP를 0.2 mmol/kg 처리하고 18시간 경과한 후 해부하고 간조직을 꺼내서 GSH와 GSSG를 측정하였다.
- <83> 하기 표 3에는 각각의 군들에 대한 평가 결과를 나타내었다. 하기 표 3을 참조하면, 0.2 mmol/kg의 *t*-BHP를 처리한 그룹에서의 GSH/GSSG 비율은 처리하지 않은 그룹에 비해 감소했으나, 본 발명에 따른 들깨잎 추출물 1000, 3000 mg/kg를 처리한
- <84> 그룹에서는 그 비율이 증가하는 것을 알 수 있으며, 따라서 본 발명에 따른 들깨잎 추출물은 *t*-BHP 처리에 따른 간 손상에 대해서 우수한 간 보호 효능을 갖는 것을 알 수 있다.

**표 3**

Treatment		GSH (nmol/mg protein)	GSSG (nmol/mg protein)	GSH/GSSG
Untreated control		67.7 $\pm$ 4.7	16.5 $\pm$ 1.4	4.1 $\pm$ 0.1
<i>t</i> -BHP (0.2 nmol/kg)		57.0 $\pm$ 1.6 <sup>d</sup>	36.7 $\pm$ 8.0 <sup>d</sup>	1.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
PLE <sup>a</sup> (mg/kg)	1000	75.1 $\pm$ 11 <sup>e</sup>	14.5 $\pm$ 4.3 <sup>e</sup>	5.5 $\pm$ 1.5 <sup>e</sup>
	3000	99.2 $\pm$ 15 <sup>c,d</sup>	17.3 $\pm$ 4.2 <sup>e</sup>	5.8 $\pm$ 0.7 <sup>e</sup>

- <86> <sup>a</sup> 수치들은 평균  $\pm$  표준 편차로 표시 (n=6).
- <87> <sup>b</sup> 미처리 대조군 대비  $p < 0.01$ .
- <88> <sup>c</sup> *t*-BHP 단독 처리군 대비  $p < 0.01$  (n = 6).
- <89> <sup>d</sup> 미처리 대조군 대비  $p < 0.05$ .
- <90> <sup>e</sup> *t*-BHP 단독 처리군 대비  $p < 0.05$  (n = 6).

**도면의 간단한 설명**

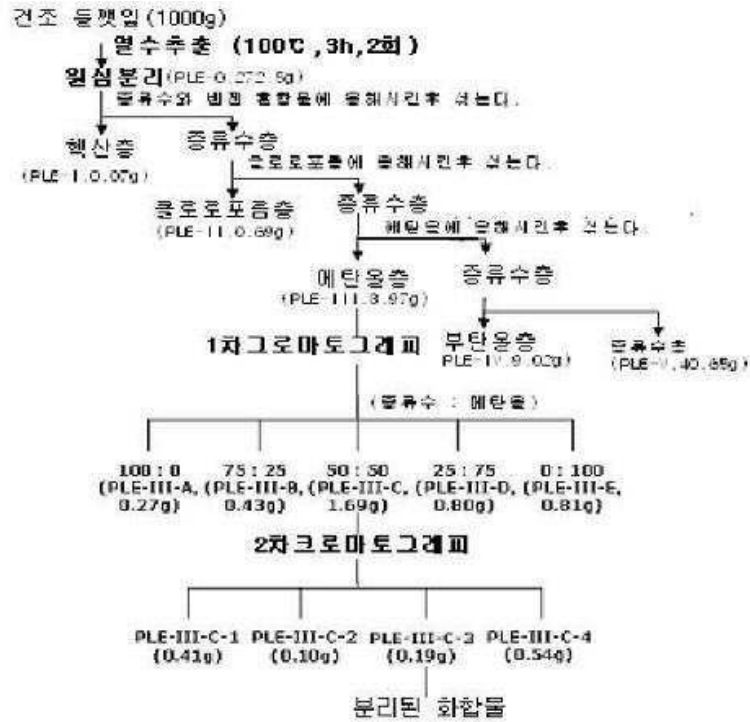
- <91> 도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 들깨잎으로부터  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법에 대한 개략적인 공정 흐름도이다.
- <92> 도 2는 본 발명에 따른 방법에 의해서 얻어진 PLE-III-C 획분으로부터 Sephadex LH-20 column을 거쳐 얻은 4개의 획분 (PLE-III-C-1, PLE-III-C-2, PLE-III-C-3, PLE-III-C-4)들의  $\gamma$ -GCS 활성을 도시한 도면이다.
- <93> 도 3은 본 발명에 따른 방법에 의해서 얻어진 PLE-III-C-3 획분에 대한 전자 충돌 질량 스펙트럼 (electron impact mass spectrum, EI-MS) 결과를 도시한 도면이다.
- <94> 도 4는 본 발명에 따른 방법에 의해서 얻어진 PLE-III-C-3 획분에 대한 1D NMR의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼 결과를 도시한 도면이다.
- <95> 도 5는 본 발명에 따른 방법에 의해서 얻어진 PLE-III-C-3 획분에 대한 1D NMR의 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼 결과를 도시한 도면이다.
- <96> 도 6은 본 발명에 따른 방법에 의해서 얻어진 PLE-III-C-3 획분에 대한 2D NMR의 COSY 스펙트럼 결과를 도시한 도면이다.

<97> 도 7은 본 발명에 따른 방법에 의해서 얻어진 PLE-III-C-3 획분에 대한 2D NMR의 HMBC 스펙트럼 결과를 도시한 도면이다.

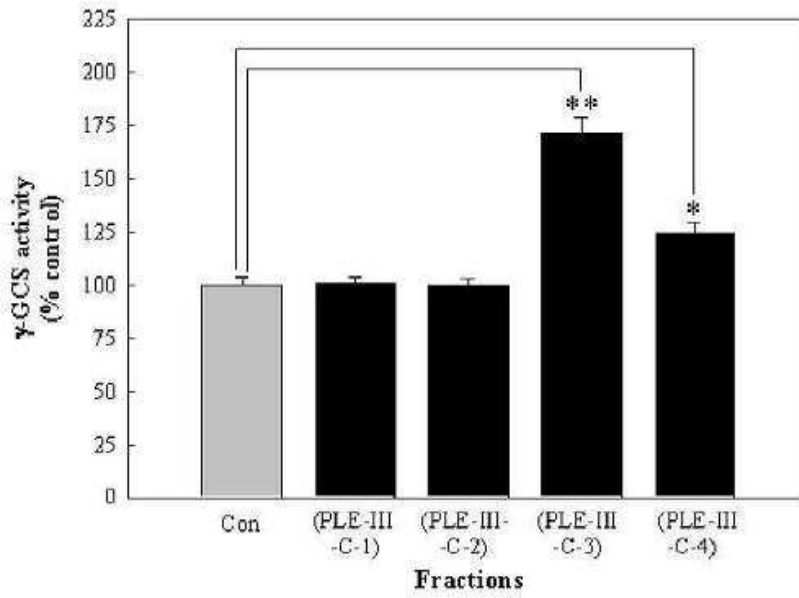
<98> 도 8은 본 발명에 따른 방법에 의해서 얻어진  $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산에 대한 화학식을 도시한 도면이다.

도면

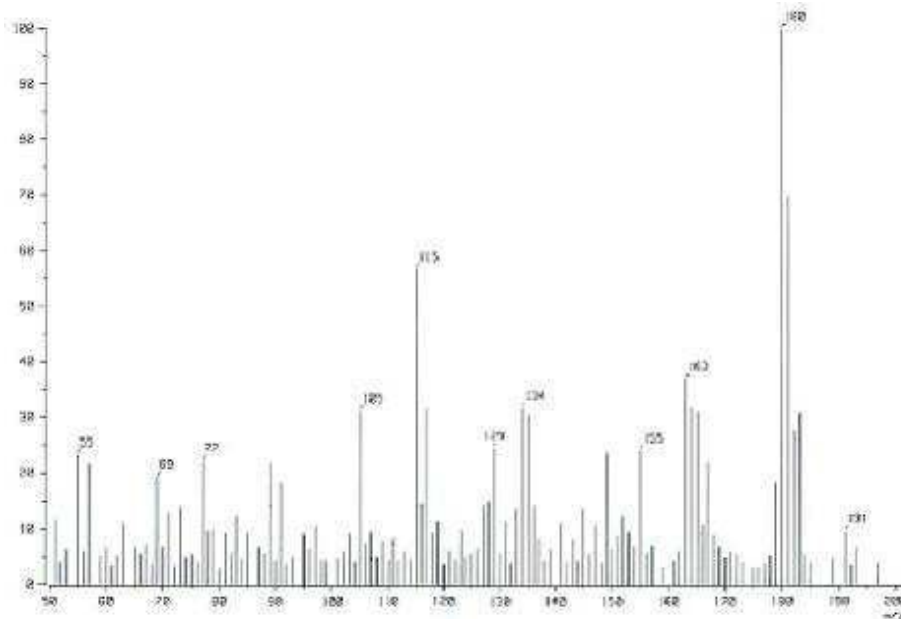
도면1



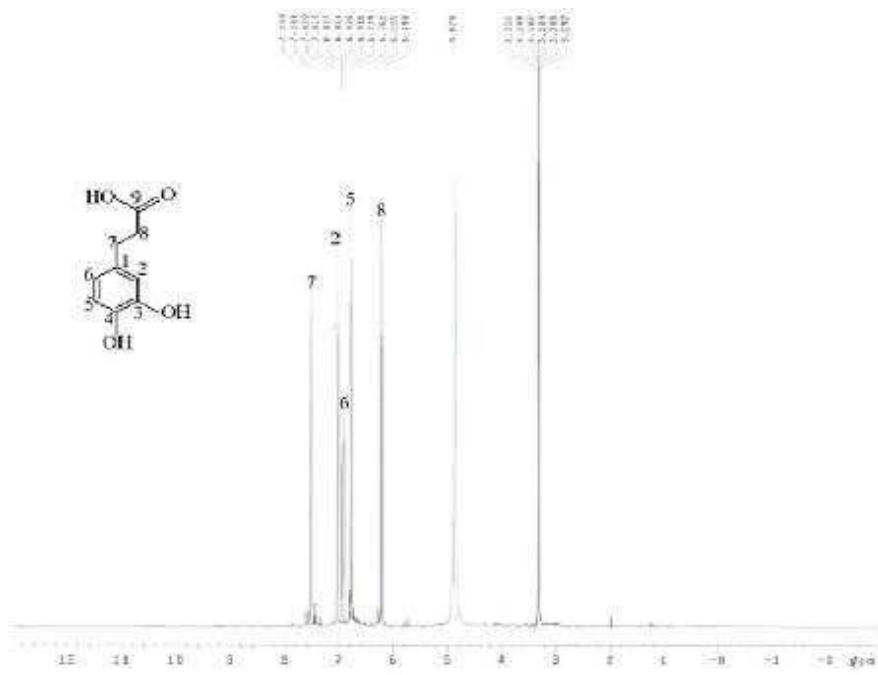
도면2



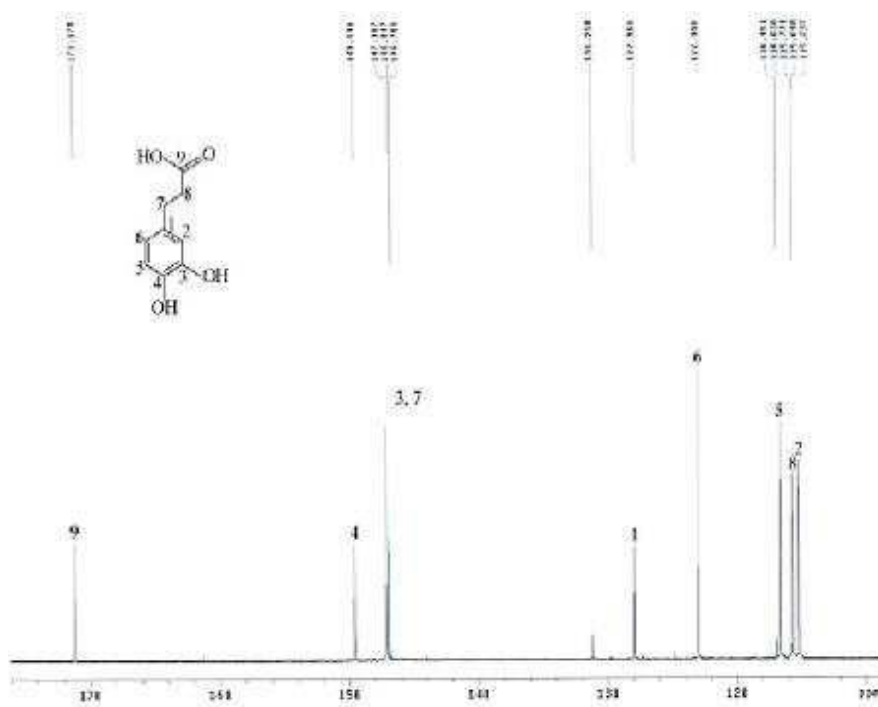
도면3



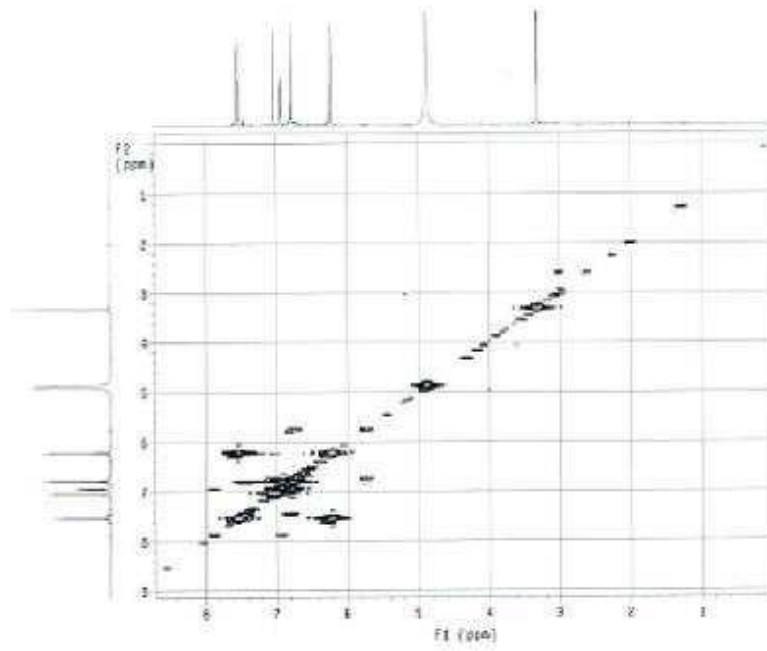
도면4



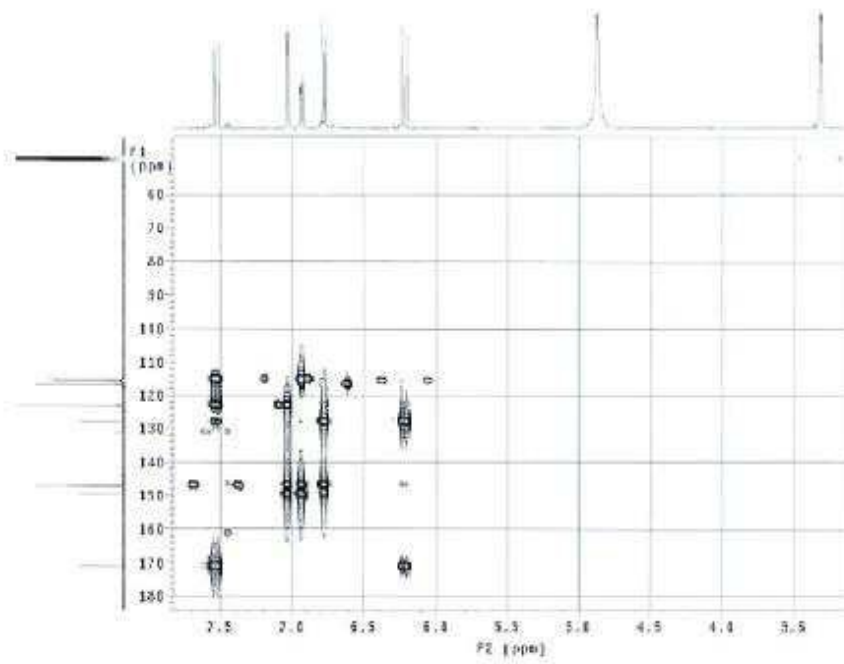
도면5



도면6



도면7



도면8

