



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0100516
(43) 공개일자 2024년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01G 7/04 (2006.01) A01G 22/15 (2018.01)
A01G 31/00 (2018.01) A01G 9/14 (2006.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 8/9789 (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01) F21V 9/40 (2018.01)

(52) CPC특허분류

A01G 7/045 (2013.01)
A01G 22/15 (2018.02)

(21) 출원번호 10-2022-0181328

(22) 출원일자 2022년12월22일

심사청구일자 2022년12월22일

(71) 출원인

대한민국(환경부 국립생물자원관장)

인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물
자원관 (경서동)

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

박정미

세종특별자치시 나성북1로 52, 601동 3002호

이상준

인천광역시 서구 승학로495번길 7, 104동 406호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

조영신

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 카페오일린산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법 및 그 이용

(57) 요약

본 발명에는 카페오일린산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법 및 그 이용이 개시된다. 본 발명에 따른 추산쑥부쟁이 증식 방법에 의하면, 단기간에 카페오일린산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 생산할 수 있다. 또한 본 발명의 증식방법은 카페오일린산 유도체 고 함유 추산쑥부쟁이를 연중 안정적으로 생산할 수 있다. 본 발명에 따른 카페오일린산이 증진된 추산쑥부쟁이의 잎, 그 추출물 또는 그 분획물은 건강기능성식품 및 화장품 소재로 유용하다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

A01G 31/00 (2013.01)
A01G 9/14 (2020.08)
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61Q 19/00 (2013.01)
F21V 9/40 (2024.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/302 (2013.01)
A23V 2250/2132 (2013.01)

(72) 발명자

박지은

경상남도 밀양시 상남면 운내길 3, 403호

변하연

경상남도 창원시 의창구 북면 무동서로 24, 107동
2403호

김나영

경상남도 밀양시 초동면 성만4길 16-23

손기호

경상남도 진주시 선학산길17번길 5-1,302호

김정윤

경상남도 진주시 내동로 348번길, 111동 903호

심한솔

경상남도 창원시 마산합포구 노산북8길 20, A동
402호

손윤곤

부산광역시 강서구 대저로 89

명세서

청구범위

청구항 1

카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법으로, 상기 증식 방법은,

- i) 증식 시설에서 추산쑥부쟁이를 증식시키는 단계;
- ii) 수확하기 직전에 추산쑥부쟁이에 자외선 A(UV-A)를 24 내지 72시간 조사하는 단계; 및
- iii) 추산쑥부쟁이의 잎을 수확하는 단계;를 포함하는 것인 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 카페오일킨산 유도체는 3-카페오일킨산, 3,4-디카페오일킨산, 3,5-디카페오일킨산 및 4,5-디카페오일킨산로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 증식 시설은 스마트팜, 식물공장, 식물재배장치, 수직농장, 수직재배장치, 컨테이너 재배장치, 수경 재배장치, 스마트 챔버, 온실시스템, 및 재배시스템으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 단계 i)에서 추산쑥부쟁이는 묘본 또는 삽목(줄기) 형태의 추산쑥부쟁이인 것인, 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 단계 i)에서 생육은 50 내지 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광량, 15 ~ 30℃의 온도, 40 ~ 70%의 습도의 환경에서 40일 내지 60일 수행하는 것인, 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 단계 ii)에서 자외선 A의 조사는 5 W/m^2 내지 15 W/m^2 의 세기로 수행하는 것인, 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 단계 ii)에서 자외선 A의 조사는 10 W/m^2 의 세기로 48시간 수행하는 것인, 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법.

청구항 8

제 1항에 따른 증식 방법에 의해 제조된 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이.

청구항 9

제 8항에 있어서, 추산쑥부쟁이는 추산쑥부쟁이의 잎인 것인, 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이.

청구항 10

제 9항에 있어서, 카페오일킨산 유도체는 3-카페오일킨산, 3,4-디카페오일킨산, 3,5-디카페오일킨산 및 4,5-디카페오일킨산으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 추산쑥부쟁이는, 단계 ii) 없이 증식된 추산쑥부쟁이에 비하여, 3-카페오일킨산의 함량이 2.23배 이상, 3,4-디카페오일킨산의 함량이 2.1배 이상, 3,5-디카페오일킨산의 함량이 1.97배 이상, 및 4,5-디카페오일킨산의 함량이 2.13배 이상 증진된 것인, 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이.

청구항 12

제 9항에 따른 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 유효성분으로 함유하는 건강기능성 식품.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 건강기능성 식품은 항산화 활성 및 총 페놀 함량이 강화된 것인, 건강기능성 식품.

청구항 14

제 9항에 따른 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 유효성분으로 함유하는 화장품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 특정 조건의 자외선 A(UV-A) 조사를 이용하여 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이의 증식 방법 및 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이의 이용에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 추산쑥부쟁이 (*Aster chusanensis*; Y. Lim, J.O.Hyun, Y.D.Kim & H.Shin)는 9~10월 연보라색 꽃을 피우는 여러해살이 식물로 우리나라 울릉도에 주로 분포하는 고유종이다 (국립생물자원관 한반도의 생물다양성; <https://species.nibr.go.kr>). 추산쑥부쟁이는 2005년 우리나라 식물학자들에 의해 신규 종으로 학계에 보고된 후 2014년 섬쑥부쟁이와 왕해국의 자연 교잡종으로 밝혀졌으며 해열, 해독 등 다양한 효능을 갖는 것으로 알려져 있다 (Journal of Plant Biology, December 2005, 48(4), 479-482; J. Plant Biol. (2014) 57:174-185).

[0004] 최근 추산쑥부쟁이의 줄기와 잎을 활용한 대량증식법이 개발됨에 따라, 우리 고유 식물인 추산쑥부쟁이의 안정적인 생물 소재 물량 확보가 가능하게 되어 수입 식물 소재의 대체에도 중요한 역할을 할 수 있게 되었다

(2022. 9. 12.자 환경부 국립생물자원관 보도자료).

- [0005] 카페오일퀸산 유도체 (caffeoyl quinic acid derivatives)는 생물학적 활성 화학 성분인 피토케미칼로, 3,4-디-카페오일퀸산은 항균 활성이 보고되어 있^고 (특허공개 2020-0000225호), 4,5-디카페오일퀸산은 골관절염 치료 활성이 보고되어 있으며 (특허등록 10-2338416호), 1,5-디카페오일퀸산은 당뇨병 치료 효과가 보고되어 있다 (특허등록 10-2208559호).
- [0006] 그러나 카페오일퀸산 유도체를 현저히 증진시키는 추산쑥부쟁이의 증식방법은 개발된 바 없다.

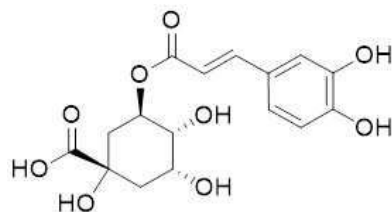
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에, 본 발명자들은 종래 기술에서의 요구에 부응하기 위해 지속적으로 연구한 결과, 특정 조건의 자외선 A(UV-A)를 조사할 경우 카페오일퀸산 유도체 (caffeoyl quinic acid derivatives)가 현저히 증진된 추산쑥부쟁이를 증식할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 본 발명의 주 목적은 카페오일퀸산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 방법에 의해 증식된 카페오일퀸산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 카페오일퀸산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 포함하는 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 카페오일퀸산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 포함하는 화장품을 제공하는 것이다.

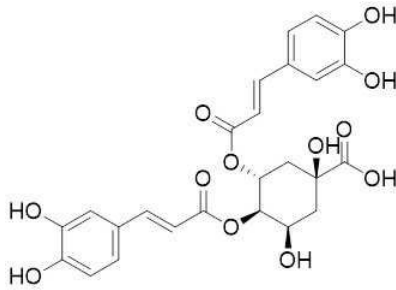
과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 카페오일퀸산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이 증식 방법을 제공한다.
- [0015] 상기 증식 방법은,
- [0016] i) 증식 시설에서 추산쑥부쟁이를 증식시키는 단계;
- [0017] ii) 수확하기 직전에 추산쑥부쟁이에 자외선 A(UV-A)를 24 내지 72시간 조사하는 단계; 및
- [0018] iii) 추산쑥부쟁이의 잎을 수확하는 단계;를 포함한다.
- [0019] 본 발명에서 카페오일퀸산 유도체는 하기와 같은 화학식을 갖는 3-카페오일퀸산, 3,4-디카페오일퀸산, 3,5-디카페오일퀸산 및 4,5-디카페오일퀸산의 4종을 포함한다.
- [0020] 3-카페오일퀸산 (3-caffeoylquinic acid, 3-CQA)는 화학식 1의 구조를 갖는다:



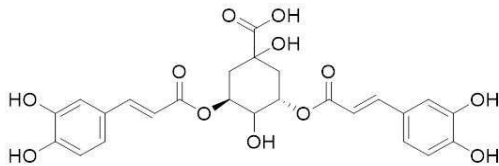
(화학식 1)

- [0021]
- [0022] 3,4-디카페오일퀸산 (3,4-dicafeoylquinic acid, 3,4-diCQA)는 하기 화학식 2의 구조를 갖는다:



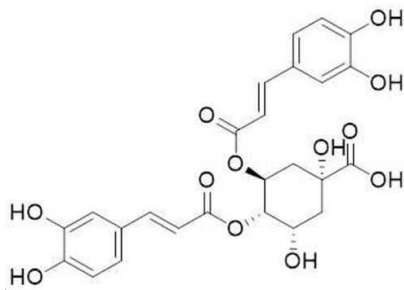
(화학식 2)

3,5-디카페오일킨산 (3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-diCQA)는 하기 화학식 3의 구조를 갖는다:



(화학식 3)

4,5-디카페오일킨산 (4,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-diCQA)는 하기 화학식 4의 구조를 갖는다:



(화학식 4)

단계 i) 증식

증식 시설에서 추산썩부쟁이를 증식시킨다.

본 발명에서 '증식 시설'은 인공적으로 증식환경을 조절할 수 있는 증식 시설이면 제한되지 않으며, 스마트팜, 식물공장, 식물재배장치, 수직농장, 수직재배장치, 컨테이너 재배장치, 수경 재배장치, 스마트 챔버, 온실시스템, 재배시스템 등일 수 있다.

단계 i)에서 추산썩부쟁이로는 묘본 또는 삽목(줄기) 형태의 추산썩부쟁이를 이용할 수 있다.

단계 i)에서, 증식은 40일 내지 60일 수행될 수 있으며, 바람직하게는 50일 수행된다. 40일 미만의 경우 추산썩부쟁이의 생육이 완전하지 않아 바이오매스량(일)이 충분치 않고 60일 초과인 경우 추산썩부쟁이의 개화가 이루어질 수 있어 잎의 수확량이 적어질 수 있고 생리활성성분 함량 변화도 없을 뿐만 아니라 경제적이지도 않다.

추산썩부쟁이의 증식을 위하여 증식 시설에는 LED 광원부가 설치될 수 있으며, LED 광원부는 백색, 청색, 적색의 단일광원; 백색과 청색, 백색과 적색, 청색과 적색의 이중 혼합광원; 또는 백색과 청색과 적색의 삼중 혼합광원이 사용될 수 있다.

추산썩부쟁이의 증식을 위한 증식 시설의 광량은 50 내지 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 이 바람직하며, 더 바람직하게는 100 내지 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 이다. 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 미만의 경우 광합성이 원활하지 않아 추산썩부쟁이의 바이오매스(일)의 양이 적고, 생리활성성분의 생성 또한 원활하지 않다. 그리고 높은 광량의 경우, 즉 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 초과는 잎 등이 열에 의해서 고사될 수 있다.

추산썩부쟁이의 증식을 위한 증식 시설의 온도는 15 ~ 30℃인 것이 바람직하고, 20 ~ 22℃인 것이 더욱 바람직하다. 15℃ 미만의 경우 추산썩부쟁이 냉해로 인해 생육이 원활하지 못하고 30℃ 초과인 경우 고온 장애와 곰팡이 증식으로 뿌리 썩음병이 발생할 수 있다.

추산썩부쟁이의 증식을 위한 증식 시설의 습도는 40 ~ 70%인 것이 바람직하고, 50 ~ 70%인 것이 더욱 바람직하다. 40% 미만의 경우 수분 부족으로 추산썩부쟁이의 광합성 등이 원활하지 않아 잎이 고사할 수 있고 70% 초과

의 경우 과다한 수분으로 뿌리 등이 썩을 수 있다.

[0037] 단계 ii) 자외선 조사

[0038] 수확하기 직전에 추산쑥부쟁이에 자외선 A(UV-A)을 24 내지 72시간 조사한다.

[0039] 자외선 조사를 위해서는 증식 시설에는 자외선 광원의 LED 광원부가 설치된다.

[0040] 본 발명에서 자외선 A(UV-A)는 400nm~315 nm 파장의 자외선이다. 바람직하게는 370nm 파장을 이용한다.

[0041] 단계 ii)에서, 자외선 조사는, 증식 시설에서 추산쑥부쟁이를 수확하기 직전에 24시간 내지 72시간 동안 수행한다. 바람직하게는 자외선 A는 36시간 내지 48시간 동안 조사한다. 24시간 미만의 경우 유효 카페오일킨산 유도체 함량이 변화가 없고 72시간 초과인 경우 추산쑥부쟁이가 스트레스를 과도하게 받아 유효 카페오일킨산 유도체가 감소할 수 있다.

[0042] 증식 시설에서 자외선 A 조사는 5 W/m^2 내지 15 W/m^2 의 세기로 조사하는 것이 바람직하고, 10 W/m^2 이상 조사하는 것이 가장 바람직하다. 상기 범위 미만의 경우 유효 카페오일킨산 유도체 함량이 변화가 없고 상기 범위 초과인 경우 추산쑥부쟁이가 스트레스를 과도하게 받아 유효 카페오일킨산 유도체가 감소할 수 있다.

[0043] 단계 ii)에서 자외선 조사는 증식 시설이 완전히 닫힌 밀폐된 공간에서 이루어지는 것이 효율적이다.

[0044] 자외선 조사시, 증식 시설의 온도는 $15 \sim 30^\circ\text{C}$ 인 것이 바람직하다. 습도는 $40 \sim 70\%$ 인 것이 바람직하다. 자외선 조사 온도 15°C 및 습도 40% 미만의 경우 카페오일킨산 유도체 합성 대사가 원활하지 않고 온도 30°C 및 습도 70% 초과인 경우에 스트레스를 과도하게 받아 유효 카페오일킨산 유도체가 감소할 수 있다.

[0045] iii) 수확

[0046] 단계 ii)에서 자외선 조사가 완료된 추산쑥부쟁이의 잎을 수확한다.

[0047] 상기과 같이 본 발명에 따른 증식 방법은 추산쑥부쟁이를, 수확 직전에 단계 ii)와 같이 특정 조건으로 자외선을 조사함에 따라서 추산쑥부쟁이 잎의 카페오일킨산 유도체의 함량을 현저히 증진시킬 수 있다.

[0048] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 상기 방법에 의해 증식된 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 제공한다.

[0049] 본 발명에 따른 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이는 3-카페오일킨산의 함량이 2.23배 이상, 3,4-디카페오일킨산의 함량이 2.1배 이상, 3,5-디카페오일킨산의 함량이 1.97배 이상, 및 4,5-디카페오일킨산의 함량이 2.13배 이상으로 현저히 증진된다 (표 1 참조).

[0050] 본 발명에 따른 3-카페오일킨산, 3,4-디카페오일킨산, 3,5-디카페오일킨산 및 4,5-디카페오일킨산이 증진된 추산쑥부쟁이는 그 자체로, 또는 용매로 추출되어 식품, 화장품 및 약제학적 조성물의 소재로 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명에서 추출 용매로는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 알코올로는 C1 내지 C2 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다.

[0052] 추출 방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 구체적으로는 추출 용매를 건조된 추산쑥부쟁이에 1~10배(v/w) 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 추출온도는 $20\sim 100^\circ\text{C}$ 인 것이 바람직하고, 추출시간은 10~48시간인 것이 바람직하나 이에 한정되지는 않는다.

[0053] 추출물은 감압 농축한 후 건조될 수 있으며, 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0054] 추출물은 추가로 유기용매로 분획될 수 있으며, 추출물을 물에 현탁시킨 후 유기용매로 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올을 사용하여 분획할 수 있으며, 클로로포름을 사용하는 것이 바람직하다. 추출물로부터 분획 과정을 1~5회, 바람직하게는 3회 반복하여 분획물을 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0055] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 포함하는 건강기능성 식품을 제공한다.

[0056] 본 발명에 따른 건강기능성 식품은 면역증진용, 항산화용, 혈행개선용 및 피부미용용으로 유용하다.

- [0057] 본 발명에서 '건강기능성 식품'이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조한 식품으로, 인체의 건강을 유지하는데 도움을 주는 식품을 의미한다.
- [0058] 본 발명에서 건강기능성 식품의 형태 및 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환의 형태일 수 있다. 건강기능성 식품은 추가성분으로서 여러 가지 향미제, 감미제 또는 천연탄수화물을 포함할 수 있다. 감미제는 천연 또는 합성 감미제일 수 있고, 천연 감미제의 예로는 타우마틴, 스테비아 추출물 등이 있다. 한편, 합성 감미제의 예로는 사카린, 아스파탐 등이 있다. 또한 천연 탄수화물은 모노사카라이드, 디사카라이드, 폴리사카라이드, 올리고당 및 당알코올 등일 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 건강기능성 식품은 상기 추가성분 외에, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙스탄 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등을 더 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합으로 사용될 수 있다.
- [0060] 본 발명에서 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 환제, 정제, 캡슐제, 차, 선식, 밀가루 식품, 스프, 유제품, 소스, 육류 첨가제, 음료 (파우치제, 드링크제 등) 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 상기 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 포함하는 화장품을 제공한다.
- [0062] 본 발명에 따른 화장품은 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 그대로 포함하거나, 상기와 같은 추출물 또는 분획물의 형태로 다른 화장품 성분과 함께 포함될 수 있다.
- [0063] 본 발명에서 화장품은 로션, 연고, 겔, 크림, 패치, 마스크팩 또는 분무제 등의 형태일 수 있으나 여기에 국한되는 것은 아니며, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제, 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소나 등 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 첨가제를 함유할 수 있다.

발명의 효과

- [0065] 본 발명에 따른 추산쑥부쟁이 증식 방법에 의하면, 단기간에 카페오일킨산 유도체가 증진된 추산쑥부쟁이를 생산할 수 있다. 또한 본 발명의 증식 방법은 카페오일킨산 유도체 고 함유 추산쑥부쟁이를 연중 안정적으로 생산할 수 있다.
- [0066] 본 발명에 따른 카페오일킨산이 증진된 추산쑥부쟁이의 잎, 그 추출물 또는 그 분획물은 건강기능성식품 및 화장품 소재로 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0068] 도 1a는 본 발명에 따른 스마트 챔버에서 추산쑥부쟁이 증식 후 자외선 A를 조사하는 과정을 보여주는 사진이다 (사진 촬영을 위해 스마트 챔버 문은 열림).
- 도 1b는 스마트 챔버에서 50일간 증식시키고 자외선 A 조사 (48시간)를 한 후의 추산쑥부쟁이 사진이다.
- 도 2의 (A)는 비교예 1의 추산쑥부쟁이 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램 (254 nm)이고, (B)는 실시예 1의 추산쑥부쟁이 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램 (254 nm)이다.
- 피크1: 3-카페오일킨산 (3-caffeoyl quinic acid, 3-CQA), 피크2: 3,4-디카페오일킨산 (3,4-dicafeoyl quinic acid, 3,4-diCQA), 피크3: 3,5-디카페오일킨산 (3,5-dicafeoyl quinic acid, 3,5-diCQA), 피크4: 4,5-디카페오일킨산 (4,5-dicafeoyl quinic acid, 4,5-diCQA)
- 도 3의 (A)는 비교예 1의 추산쑥부쟁이 에탄올 추출물의 BPC (Base peak chromatogram)이고, (B)는 실시예 1의 추산쑥부쟁이 에탄올 추출물의 BPC이다.
- 피크1: 3-카페오일킨산 (3-caffeoyl quinic acid, 3-CQA), 피크2: 3,4-디카페오일킨산 (3,4-dicafeoyl quinic acid, 3,4-diCQA), 피크3: 3,5-디카페오일킨산 (3,5-dicafeoyl quinic acid, 3,5-diCQA), 피크4: 4,5-디카페

오일퀸산 (4,5-dicaffeoyl quinic acid, 4,5-diCQA)

도 4는 도 3의 피크1이 3-카페오일퀸산 (3-caffeoyl quinic acid, 3-CQA)임을 규명하는 개별 매스 그래프 (Mass gram)이다.

도 5는 도 3의 피크2가 3,4-디카페오일퀸산 (3,4-dicaffeoyl quinic acid, 3,4-diCQA)임을 규명하는 개별 매스 그래프 (Mass gram)이다.

도 6은 도 3의 피크3이 3,5-디카페오일퀸산 (3,5-dicaffeoyl quinic acid, 3,5-diCQA)임을 규명하는 개별 매스 그래프 (Mass gram)이다.

도 7은 도 3의 피크4가 4,5-디카페오일퀸산 (4,5-dicaffeoyl quinic acid, 4,5-diCQA)임을 규명하는 개별 매스 그래프 (Mass gram)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하, 본 발명을 도면, 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다. 단 도면, 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 도면, 실시예 및 제조예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0071] 제조예 1: 스마트 챔버 에서 추산쑥부쟁이의 증식

[0072] 추산쑥부쟁이를 줄기 약 15cm 절단하여 상토를 채운 삼목상자에 10cm 간격의 재식간격으로 총 35개체를 삼목하고 온도 $20\pm3^{\circ}\text{C}$, 습도 $60\pm10\%$, 평균 광량(혼합광원 : 청색과 적색)은 $46.4\pm0.3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 유지되는 환경인 스마트 챔버에서 추산쑥부쟁이를 50일간 증식시켰다. 관수 방법은 일주일에 한 번씩 1L씩 두상 관수하였고, 표면이 말랐을 때 미리 받아 둔 수돗물을 1 L씩 두상 관수했다.

[0073] 50일간 증식된 추산쑥부쟁이에 자외선 A를 조사하였다. 스마트 챔버 안에서 자외선 조사는 370nm의 파장 및 약 $10 \text{ W}/\text{m}^2$ 의 세기를 갖는 UV-A LED를 이용하여 48시간 수행하였고, 자외선 A 조사 환경은 증식환경과 동일하게 유지시켜 주었다. 자외선을 조사한 후 추산쑥부쟁이의 잎을 수확하여 70°C 의 드라이오븐(WOF-155, DAIHAN, Korea)에서 3일간 건조 후 잎을 분말화하여 분석에 사용하였다 (실시예 1).

[0074] 비교를 위하여, 상기와 동한 방식으로 증식시키고 자외선을 조사하지 않은 추산쑥부쟁이의 잎을 수확한 후 동일한 방식으로 건조/분말화하여 준비하였다 (비교예 1).

[0076] 참고예: 추산쑥부쟁이의 추출물 제조

[0077] 상기 제조예 1에서 제조된 실시예 1 및 비교예 1의 추산쑥부쟁이 잎 분말을 95% 에탄올로 상온에서 2시간 동안 초음파 추출(sonication extraction)하였다. 상기 추출용액을 감압농축하여 10~15% 수율로 추출물을 얻었다.

[0079] 실험예 1: HPLC를 이용한 추산쑥부쟁이의 카페오일퀸산 유도체 함량분석

[0080] 상기 참고예에서 준비된 실시예 1 및 비교예 1의 추출물 각각의 카페오일퀸산 유도체 함량 분석을 위해 HPLC (Shimadzu) 분석을 실시하였다. 분석조건은 0분에서 용매 A (0.1% 아세트산) 100%에서 60분에서 용매 B (0.1% 아세트산이 포함된 아세트나이트릴) 100%가 되도록 용매 B의 농도를 지속적으로 증가시키면서 $0.35 \text{ ml}/\text{min}$ 의 유속으로 용리시켰다. 칼럼은 애질런트사의 ZORBAX Bonus-RP ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 150 \text{ mm}$)를 이용하였으며 파장은 254 nm였다. 그 결과 HPLC 크로마토그램을 도 2에 나타냈다.

[0081] 도 2에 도시된 HPLC 크로마토그램의 각각의 피크 면적을 산출하여 표 1에 나타냈다:

표 1

피크	HPLC 크로마토그램 내 피크면적 ($\text{mAU}\cdot\text{min}$)	
	비교예 1 (무조사 추산쑥부쟁이)	실시예 1 (UV-A 조사 추산쑥부쟁이)

피크 1 (3-카페오일퀸산)	1,302.7	2,909.3
피크 2 (3,4-디카페오일퀸산)	161.9	338.9
피크 3 (3,5-디카페오일퀸산)	903.5	1,778.7
피크 4 (4,5-디카페오일퀸산)	393.5	837.2
합계	2,761.6	5,864.1

[0083] 도 2 및 표 1에 나타난 바와 같이, 비교예 1의 추산쑥부쟁이에 비하여 실시예 1의 추산쑥부쟁이는 3-카페오일퀸산의 함량이 약 2.23배, 3,4-디카페오일퀸산의 함량이 약 2.1배, 3,5-디카페오일퀸산의 함량이 약 1.97배, 및 4,5-디카페오일퀸산의 함량이 약 2.13배로 현저히 증진되었음을 확인할 수 있다.

[0085] **실험예 2: LC-Q-TOF/MS를 이용한 추산쑥부쟁이의 카페오일퀸산 유도체 성분분석**

[0086] 상기 참고예에서 준비된 실시예 1 및 비교예 1의 추출물 각각의 카페오일퀸산 유도체 성분분석을 위해 LC-Q-TOF/MS 분석을 실시하였다.

[0087] 분석조건은 0분에서 용매 A (0.1% 아세트산) 100%에서 60분에서 용매 B (0.1% 아세트산이 포함된 아세토나이트릴) 100%가 되도록 용매 B의 농도를 지속적으로 증가시키면서 0.35 ml/min의 유속으로 용리시켰다. 칼럼은 애질런트사의 ZORBAX Bonus-RP (5 μ m, 4.6 X 150 mm)를 이용하였으며 이온화는 음이온 모드(negative mode)에서 수행되었다. 캐필러리(capillary) 전압은 4.0 kV, nebulizer 가스와 drying 가스는 각각 10 ml/min과 50 kPa로 설정하였다. 프래그멘터(fragmenter)는 100, 150, 200, 콜리전 에너지(collision energy)는 10V, 매스 범위(mass range)는 100~1,000 m/z 범위로 분석을 진행하였다. 분석 결과의 BPC (Base peak chromatogram)를 도 3에 나타냈다.

[0088] 도 3에서 나타난 추산쑥부쟁이 에탄올 추출물의 BPC (base peak chromatogram) 및 각 피크의 개별 매스그램을 통해 피크 1이 3-카페오일퀸산 (3-caffeoyl quinic acid, 3-CQA), 피크 2는 3,4-디카페오일퀸산 (3,4-dicafeoyl quinic acid, 3,4-diCQA), 피크 3은 3,5-디카페오일퀸산 (3,5-dicafeoyl quinic acid, 3,5-diCQA), 그리고 피크 4가 4,5-디카페오일퀸산 (4,5-dicafeoyl quinic acid, 4,5-diCQA)임을 규명하였다.

[0089] 도 3에 의하면, 실시예 1 (UV-A를 조사한) 추산쑥부쟁이 추출물의 피크 1-4가 비교예 1의 추산쑥부쟁이 추출물에 비해 뚜렷하게 높아지는 양상이 확인된다. 따라서 본 발명에 따른 방법에 의해 증식된 추산쑥부쟁이 내 카페오일퀸산 유도체들은 현저히 증진됨을 확인할 수 있다.

[0090] 도 3의 피크 1은 상기 [화학적식 1]로 표기되는 3-카페오일퀸산으로 확인되었으며, 구체적으로는 도 4에서 나타난 질량분석 스펙트럼에서 $[M-H]^-$ 는 353.0870 (이론치, 353.0873)로 나타났다. 이로부터 원소조성이 $C_{16}H_{18}O_9$ 임을 확인하였으며 이는 3-카페오일퀸산의 원소조성과 잘 일치하였으며 이론치와 검출치의 오차가 -0.85 ppm임을 확인하여 최종 물질 동정을 완료하였다.

[0091] 도 3의 피크 2는 상기 [화학적식 2]로 표기되는 3,4-디카페오일퀸산으로 확인되었으며, 구체적으로는 도 5에서 나타난 질량분석 스펙트럼에서 $[M-H]^-$ 는 515.1188 (이론치, 515.1190)로 나타났다. 이로부터 원소조성이 $C_{25}H_{24}O_{12}$ 임을 확인하였으며 이는 3,4-디카페오일퀸산의 원소조성과 잘 일치하였으며 이론치와 검출치의 오차가 -0.39 ppm임을 확인하여 최종 물질 동정을 완료하였다.

[0092] 도 3의 피크 3은 상기 [화학적식 3]으로 표기되는 3,5-디카페오일퀸산으로 확인되었으며, 구체적으로는 도 6에서 나타난 질량분석 스펙트럼에서 $[M-H]^-$ 는 515.1186 (이론치, 515.1190)로 나타났다. 이로부터 원소조성이 $C_{25}H_{24}O_{12}$ 임을 확인하였으며 이는 3,5-디카페오일퀸산의 원소조성과 잘 일치하였으며 이론치와 검출치의 오차가 -0.78 ppm임을 확인하여 최종 물질 동정을 완료하였다.

[0093] 도 3의 피크 4는 상기 [화학적식 4]로 표기되는 4,5-디카페오일퀸산으로 확인되었으며, 구체적으로는 도 7에서 나타난 질량분석 스펙트럼에서 $[M-H]^-$ 는 515.1187 (이론치, 515.1190)로 나타났다. 이로부터 원소조성이 $C_{25}H_{24}O_{12}$ 임을 확인하였으며 이는 4,5-디카페오일퀸산의 원소조성과 잘 일치하였으며 이론치와 검출치의 오차가 -0.58 ppm임을 확인하여 최종 물질 동정을 완료하였다.

[0095] **실험예 3: 추산쑥부쟁이의 총 페놀 함량 및 항산화 활성 분석**

[0096] <총 페놀 함량>

[0097] 실시예 1 및 비교예 1 추산쑥부쟁이의 총 페놀 함량(Total phenolic contents)을 Folin Denis법으로 측정하였다.

[0098] 구체적으로는 실시예 1 및 비교예 1의 추산쑥부쟁이의 잎 분말 각각 1 g에 50 % 메탄올 20 mL를 첨가하여 12~16 시간 추출한 후 20배 희석한 시료를 사용하였다. 각 시료의 추출물 0.5 mL에 25 % Na₂CO₃를 첨가하여 3분 동안 정치하였다. 2 N Folin-Ciocalteu's 페놀 시약 0.25 mL를 넣고 충분히 섞어서 30℃에서 1시간 동안 반응시키고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 흡광도를 750 nm에서 측정하였다. 측정된 흡광도는 갈산으로 작성한 표준 곡선에서 산출된 계산식에 대입하여 함량을 계산하였고, 그 결과를 표 2에 나타냈다.

표 2

[0099]

	비교예 1	실시예 1
총 페놀 함량 (GAE mg/DW g)	8.44±0.10	12.85±0.14
ABTS 라디칼 소거활성(%)	33.19±0.56	51.50±1.91
FRAP 환원력 (OD593 nm)	1.06±0.01	1.67±0.01
DPPH 라디칼 소거활성(%)	21.03±0.65	39.13±0.90

[0100] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 추산쑥부쟁이 (실시예 1)의 총 페놀 함량은 비교예 1의 추산쑥부쟁이에 비하여 현저히 증진됨을 확인할 수 있다.

[0101] <항산화 활성>

[0102] 실시예 1 및 비교예 1 추산쑥부쟁이의 항산화 활성은 ABTS 라디칼 소거활성, FRAP 환원력 및 DPPH 라디칼 소거활성의 측정으로 분석하였다.

[0103] ABTS 라디칼 소거활성은 Kim 등 (2019)의 방법을 응용하였다. 실시예 1 및 비교예 1의 추산쑥부쟁이의 잎 분말 각각 1 g에 50% 메탄올 20 mL를 첨가하여 12~16 시간동안 추출한 후 50배 희석한 시료를 사용하였다. ABTS+ 시약은 7 mM ABTS+ 2.5 mL에 2.45 mM 포타슘퍼설파이트(potassium persulphate) 7.5 mL를 첨가하여 암실에서 12~16 시간 정도 방치하고 흡광도 732 nm에서 0.7 ± 0.02가 되도록 메탄올로 희석하여 사용하였다. 시험관에 각 시료 추출액 0.1 mL를 분주하고 ABTS+ 시약 0.9 mL를 첨가하여 흔들어 암실에서 3분 동안 반응시켰다. 이후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 시료 추출액 대신 시료 추출 용매인 50% 메탄올을 첨가하여 수행하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 아래와 같은 계산식으로 계산하여 백분율 (%)로 산출하여 표 2에 나타내었다:

[0104] 라디칼 소거활성(%) = {1-(실험구 흡광도 / 음성대조구 흡광도)}×100

[0105] FRAP (OD593 nm) 환원력 측정은 Kim 등 (2019)의 방법을 준하여 측정하였다. 실시예 1 및 비교예 1의 추산쑥부쟁이의 잎 분말 각각 1 g에 50% 메탄올 20 mL를 첨가하여 12~16 시간동안 추출한 후 10 배 희석한 시료를 사용하였다. pH 3.6인 0.3 M 소듐아세테이트 버퍼(sodium acetate buffer)와 0.01 M TPTZ와 0.02 M FeCl₃를 10 : 1 : 1 (v/v/v) 비율로 혼합하였다. 이후 37℃ 항온 수조에서 15분 동안 예비반응을 시킨 후 FRAP 환원력 측정 용액을 제조하였다. 시험관에 각 시료 추출액 0.05 mL를 넣고 FRAP 용액 0.95 mL를 가하여 37℃ 항온 수조에서 15분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[0106] DPPH 라디칼 소거활성은 Ahn 등 (2012)의 방법을 이용하여 측정하였다. 실시예 1 및 비교예 1의 추산쑥부쟁이의 잎 분말 각각 1 g에 50% 메탄올 20 mL를 첨가하여 12~16 시간동안 추출한 시료를 사용하였다 (희석배수는 20 배). 시험관에 각 시료 추출물 0.2 mL를 분주하고 1.5 X 10⁻⁴ M DPPH 시약 0.8 mL를 첨가하여 충분히 섞은 뒤 암실에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 분광광도계를 이용하여 525 nm에서 측정하였다. 음성대조구는 시료 추출액 대신 시료 추출 용매인 50 % 메탄올을 첨가하여 수행하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 상기와 같은 계산식으로 계산하여 백분율 (%)로 산출하여 표 2에 나타내었다.

[0107] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 추산쑥부쟁이 (실시예 1)의 BTS 라디칼 소거활성, FRAP 환원력

및 DPPH 라디칼 소거활성은 비교예 1의 추산쑥부쟁이에 비하여 현저히 증진된 바, 본 발명에 따른 추산쑥부쟁이의 항산화 활성은 강화됨을 확인할 수 있다.

도면

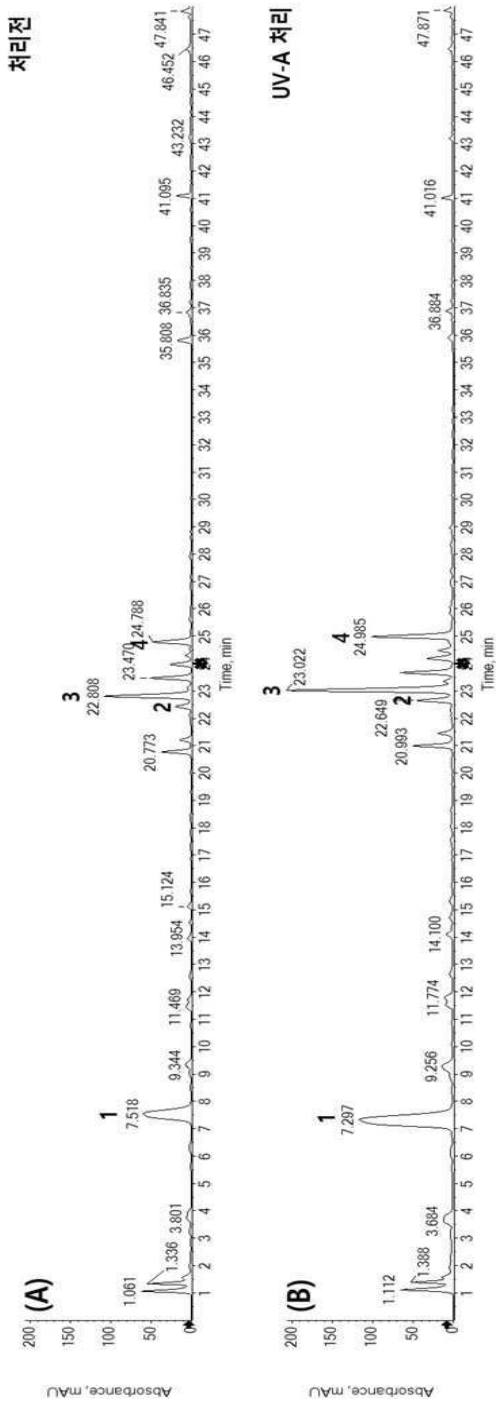
도면1a



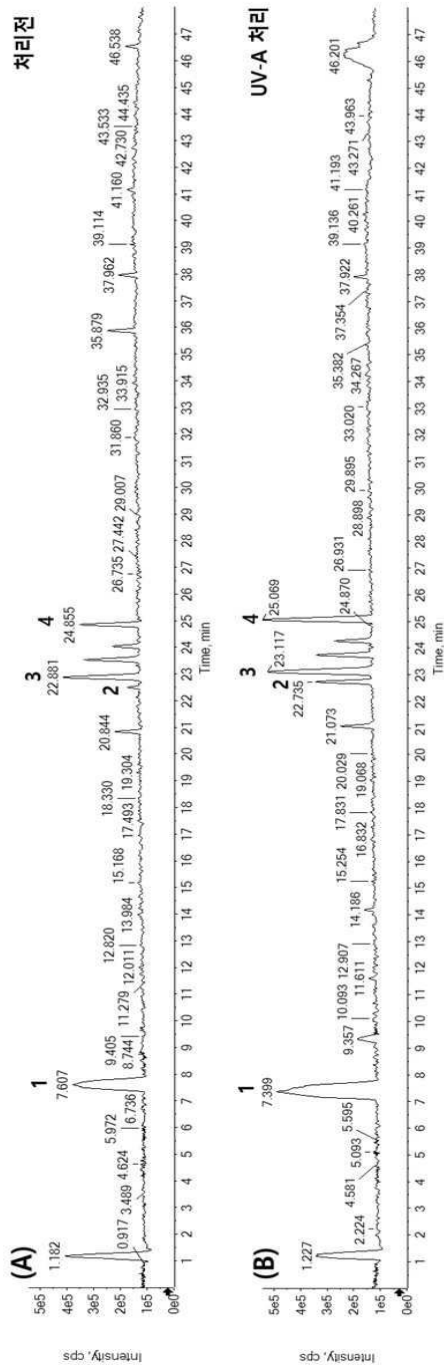
도면1b



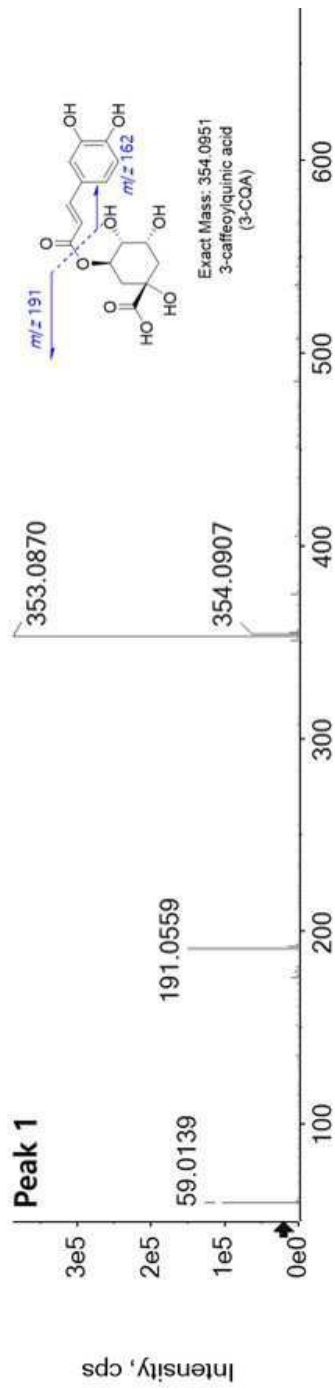
도면2



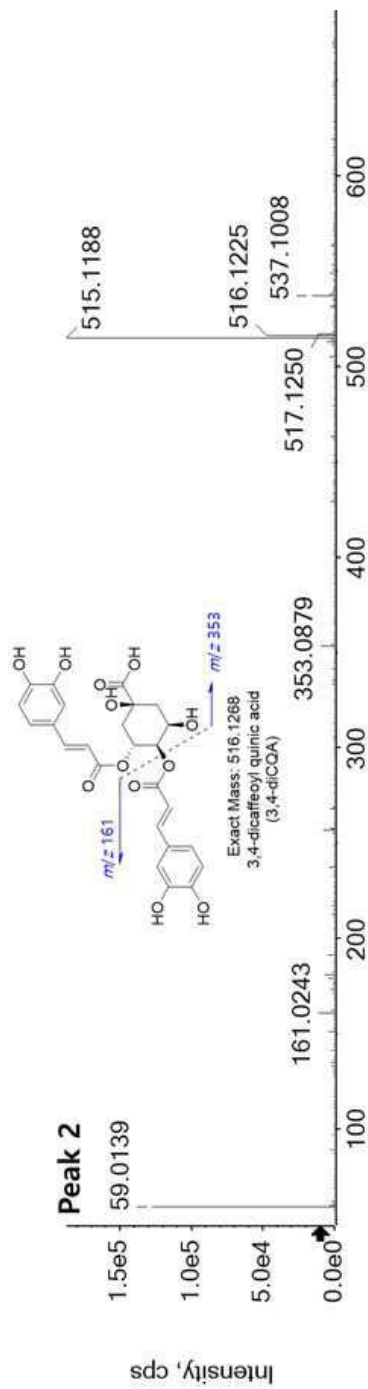
도면3



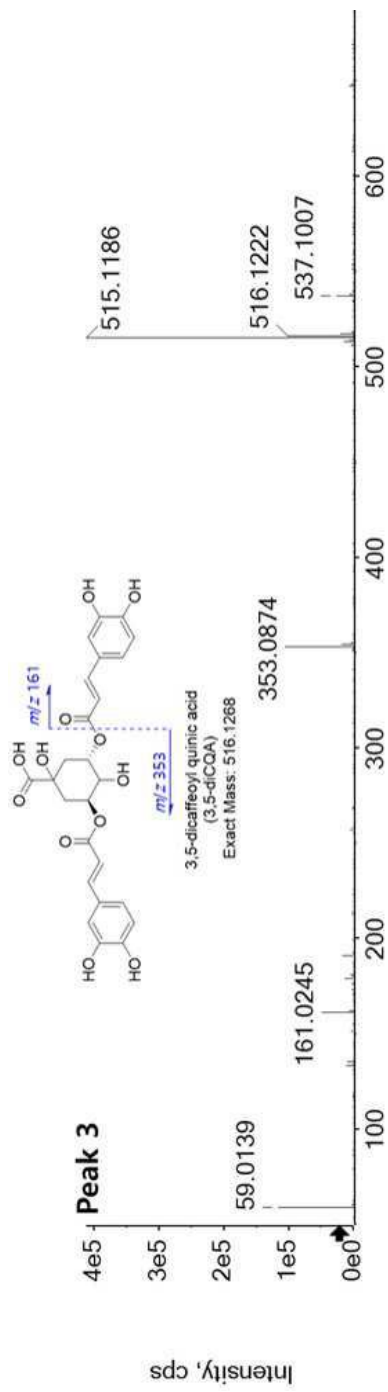
도면4



도면5



도면6



도면7

