



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0138122

(43) 공개일자 2015년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/29 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A23L 1/29 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0077595

(22) 출원일자 2015년06월01일

심사청구일자 2015년06월01일

(30) 우선권주장
1020140066451 2014년05월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

임순성

강원도 춘천시 후석로 325, 105동 301호(후평동, 춘천더샵아파트)

권신화

강원도 춘천시 봉의산길22번길 14, 301호(봉의동, 우진빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 정안

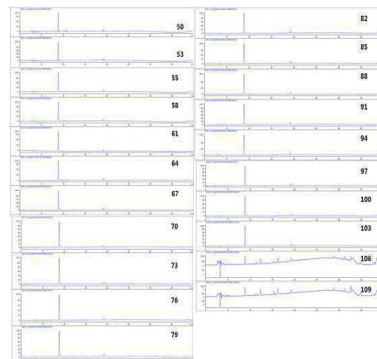
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 차즈기의 유효 성분의 기전 탐색에 의해 발견된 콜레스테롤 유출과 관련한 활성 물질에 대한 안정적인 추출 및 분리법을 확보하고, 이를 통한 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/3262 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)

이세원

서울특별시 강남구 학동로77길 27, 101동 902호(청
담동, 대림아파트)

(72) 발명자

강영희

강원도 춘천시 한림대학길 1 한림대학교 생명과학
관 5층 8513호(옥천동)

이재용

강원도 춘천시 춘주로 174, 103동 1303호(퇴계동,
그린타운아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	112085-3
부처명	농림수산식품부
연구관리전문기관	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	2012 고부가가치식품 기술개발사업
연구과제명	콜레스테롤 대사와 경화성 혈관질환 퇴치를 위한 차즈기 이용 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2014.08.08 ~ 2015.08.07

명세서

청구범위

청구항 1

차즈기 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

식품 조성물은 향미제, 풍미제, 착색제, 증진제, 안정화제, 천연 탄수화물, 영양제, 비타민제, 증점제, pH 조절제, 방부제 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함하는 것인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 3

제 1항 내지 제 2항 중 어느 한 항의 기능성 식품 조성물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품.

청구항 4

- 1) 차즈기를 분쇄하는 단계;
- 2) 상기 분쇄물을 추출시키는 추출 단계; 및
- 3) 상기 추출물을 감압 농축시켜 농축물을 수득하는 단계를 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 1) 단계는 전초 및 꽃을 포함하는 차즈기를 분쇄하는 단계인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

- 상기 2) 단계는 2-1) 유기 용매를 사용하여 상기 분쇄물을 침출시키는 단계;
- 2-2) 시료를 침출 후 건조시키는 단계;
- 2-3) 건조된 시료를 유기 용매를 사용하여 재 침출시키는 단계;
- 2-4) 시료를 침출 후 건조시키는 단계;
- 2-5) 물을 이용하여 침출시키는 단계; 및

2-6) 침출하는 단계를 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 2) 단계의 추출은 물, C₁₋₄ 알코올, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 헥산 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물 또는 상기 용매들을 순차적으로 시료에 적용하여 추출한 것인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 8

제 4항에 있어서,

상기 2) 단계의 추출은 초음파 추출법, 침출법 및 환류 추출법으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 추출법에 의한 것인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 환류 추출법은 C₁₋₄ 알코올 100mL기준으로, 차즈기 분쇄물 10 내지 30g, 환류 시간 1 내지 3시간 및 50 내지 100%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 환류 추출법은 C₁₋₄ 알코올 100mL기준으로, 차즈기 분쇄물 10 내지 20g, 환류 시간 1 내지 2시간 및 70 내지 90%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 침출법은 25 내지 70℃, 2 내지 72시간 동안 및 50 내지 100%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 침출법은 40 내지 60℃, 48 내지 72시간 동안 및 70 내지 80%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 13

제 8항에 있어서,

상기 초음파 추출법은 30 내지 50℃, 0.5 내지 2.5시간 동안 및 50 내지 100%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 초음파 추출법은 40 내지 50℃, 1 내지 2.5시간 동안 및 70 내지 80%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것인 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 15

제 4항에 있어서,

상기 2) 단계 이후, 3) 단계 이전에 유기 용매를 사용하여 추출한 차즈기 추출물을 유기 용매를 사용하여 분획을 실시하는 단계를 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 차즈기의 유효 성분의 기전 탐색에 의해 발견된 콜레스테롤 유출과 관련한 활성 물질에 대한 안정적인 추출 및 분리법을 확보하고, 이를 통한 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

배경 기술

[0002]

차즈기(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo)는 꿀풀과에 속하는 일년생 초본으로 중국이 원산지이며, 약용식물로 들여와 각처에서 재배하고 있는 귀화식물이다. 봄에 씨를 뿌려 재배하는 차즈기의 줄기에는 성긴 털이 나있고 잎은 꼭지가 길며 가장자리는 성긴 톱니 모양이다. 여름철에는 줄기 끝 엽액에서 줄기가 나와 연한 자주색의 작은 꽃이 핀다. 잎은 차즈기, 차조기 또는 차죽라고 부르며, 종자는 소자라고 하며 약재로 사용된다. 한방에서는 자소라 하고 계입, 수소, 향소 및 적소로도 부른다. 특히 한방과 민간에서는 잎과 종자를 발한, 지혈, 해열, 유방염, 진통, 진정 및 치질 등의 약재로 사용되어 왔으며, 현대 의학에서도 자소의 항염증, 항알러지, 항천식, 항산화 작용 등에 주목하고 있다.

[0003]

그러나, 당해 기술 분야에서는 항알러지, 항아토피 피부염 치료에 효과적인 소엽 추출물의 제조방법(한국등록특허 제10-1147970호), 위궤양의 예방 및 치료에 효과가 있는 소엽 추출물의 제조방법(한국등록특허 제10-0353262호), 차조기 추출액 및 이를 이용한 음료(한국등록특허 제10-1127675호) 등의 추출물에 관한 연구만이 이루어졌을 뿐, 차즈기의 유효 성분의 기전 탐색에 의해 발견된 콜레스테롤 유출과 관련한 활성 물질에 대한 안정적인 추출 및 분리법을 확보하고, 이를 통한 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법을 개발하기 위한 연구에 대해서는 아직까지 전혀 이루어진 바가 없는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004]

본 발명의 목적은 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0005]

본 발명의 다른 목적은 본 발명은 차즈기의 유효 성분의 기전 탐색에 의해 발견된 콜레스테롤 유출과 관련한 활성 물질에 대한 안정적인 추출 및 분리법을 확보하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 구현예에서, 차즈기 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물이 제공된다.
- [0007] 본 발명의 일 구현예에서, 차즈기를 분쇄하는 단계, 상기 분쇄물을 추출시키는 추출 단계, 및 상기 추출물을 감압 농축시켜 농축물을 수득하는 단계를 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법이 제공된다.
- [0008] 본 발명의 일 구현예에서, 전초 및 꽃을 포함하는 차즈기를 분쇄하는 단계, 유기 용매를 사용하여 상기 분쇄물을 침출시키는 단계, 시료를 침출 후 건조시키는 단계, 건조된 시료를 유기 용매를 사용하여 재 침출시키는 단계, 시료를 침출 후 건조시키는 단계, 물을 이용하여 침출시키는 단계, 및 침출하는 단계를 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법이 제공된다.
- [0009] 본 발명의 일 구현예에서, 유기 용매를 사용하여 추출한 차즈기 추출물을 유기 용매를 사용하여 분획을 실시하는 단계를 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물의 제조 방법이 제공된다.
- [0010] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0011] 본 발명은 차즈기 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명에서 용어, "추출물"은 천연물로부터 분리된 활성 성분을 의미하며, 여기서는 차즈기로부터 분리된 물질을 의미한다.
- [0013] 본 발명의 조성물의 항 비만 효과는 지방 축적 억제 기능 검증을 위한 3T3-L1세포의 분화억제 시험함으로써 확인할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 침출법 및 환류 추출법 등 당업계의 통상적인 추출 방법일 수 있다. 바람직하게는 세척 및 건조로 이물질이 제거된 차즈기를 물, C₁₋₄ 알코올, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 헥산 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 상기 용매들을 순차적으로 시료에 적용하여 추출한 추출물일 수도 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에서, 환류 추출법은 C₁₋₄ 알코올 100mL기준으로, 차즈기 분쇄물 10 내지 30g, 환류 시간 1 내지 3시간 및 50 내지 100%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것이다. 보다 바람직하게는, C₁₋₄ 알코올 100mL기준으로, 차즈기 분쇄물 10 내지 20g, 환류 시간 1 내지 2시간 및 70 내지 90%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것이다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에서, 침출법은 25 내지 70℃, 2 내지 72시간 동안 및 50 내지 100%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것이다. 보다 바람직하게는 40 내지 60℃, 48 내지 72시간 동안 및 70 내지 80%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것이다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에서, 초음파 추출법은 30 내지 50℃, 0.5 내지 2.5시간 동안 및 50 내지 100%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것이다. 보다 바람직하게는 40 내지 50℃, 1 내지 2.5시간 동안 및 70 내지 80%의 C₁₋₄ 알코올에 의한 것이다.
- [0018] 추출 용매는 시료의 중량 기준으로 2 내지 50배를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 2 내지 20배이다. 추출을 위해 시료는 추출 용매에서 침출을 위해 1 내지 72 시간 동안 방치될 수 있으며, 바람직하게는 24 내지 48시간 동안 방치될 수 있다.
- [0019] 추출 후, 추출물은 새로운 분획 용매를 순차적으로 적용하여 분획할 수 있다. 분획시 사용하는 분획 용매는 물, C₁₋₄ 알코올, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 또는 헥산이며, 바람직하게는 에탄올 또는 헥산이다.
- [0020] 추출물 또는 분획물을 얻은 후에는 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에서, 식품 조성물은 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제, 천연 탄수화물, 영양제, 비타민제, 증점제, pH 조절제, 방부제 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 기능성 식품 조성물은 정제, 환제, 과립제, 분말제, 액제, 경질캡슐제, 연

질갑셀레 등과 같은 일반적인 제형으로 제조될 수 있으며, 죽, 빵, 음료, 바, 초콜릿, 쿠키, 차, 드링크제, 비타민 복합제, 육류, 소시지, 캔디, 면, 젤리 등과 같은 임의의 형태로 제조될 수 있다.

[0023] 상기와 같은 여러 제형 또는 형태를 제조하기 위해, 전술한 부형제들과 같은 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 사용할 수 있으며, 제조하고자 하는 제형 또는 형태의 제조에 당해 기술 분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 차즈기 추출물을 포함하는 식품 조성물은 콜레스테롤 대사 관련 경화성 혈관질환을 개선하는 효과가 있다. 또한, 본 발명을 통해 콜레스테롤 유출과 관련한 활성 물질에 대한 안정적인 추출 및 분리법이 확보되었다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 n-헥산 분획물을 분리한 샘플들의 HPLC 피크 패턴을 나타낸다.
 도 2 내지 4는 n-헥산 분획물을 8개의 군으로 나누어 분석한 HPLC 피크 패턴을 나타낸다.
 도 5는 n-헥산 분획물을 바이오타지(Biotage)를 이용하여 분리한 단일 화합물의 구조를 나타낸다.
 도 6은 최적 추출 조건을 비교하기 위한 HPLC 패턴이다.
 도 7은 최적 침출 조건을 비교하기 위한 HPLC 패턴이다.
 도 8은 최적 환류 조건을 비교하기 위한 HPLC 패턴이다.
 도 9는 환류 추출 조건들의 배합 비율에 따른 α-아사론(Asarone) 함량에 대한 3차원 그래프이다.
 도 10은 침출 추출 조건들의 배합 비율에 따른 α-아사론(Asarone)의 함량에 대한 3차원 그래프이다.
 도 11은 초음파 분해(Sonication) 추출 조건들의 배합 비율에 따른 α-아사론(Asarone) 함량에 대한 3차원 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0027] (1) 활성 추출 분획물로부터 유효성분 도출 및 구조동정을 통한 구조 규명

[0028] n-헥산 분획물을 바이오타지(Biotage)를 이용하여 분리한 단일 화합물에 대한 유효성분을 도출하였으며 NMR(¹H, ¹³C-NMR, COSY, DEPT, HMQC 및 HMBC) 기기를 사용하여 활성성분의 정확한 구조 동정을 통하여 화합물의 구조를 규명하였다.

[0029] (1-1) n-헥산 분획물 분리

[0030] 1차년도에서 n-헥산 분획물 2번 바이오타지(biotage) 분리결과에서 2-2에서 활성을 보였고 비교적 단조로운 패턴을 보였기 때문에 Silica gel을 이용하여 분리를 진행하였다. 실리카(Silica)의 양은 25g을 올려놓고 (loading), 시료의 양은 800mg, 전개 용매는 EA, HEX을 사용하였다.

[0031] 분별 수집기(fraction collector)를 이용하여 총 180개의 테스트 관(test tube)을 받았고 전개용매는 1-32번은 0% EA, 33-45번은 3% EA, 46-82번은 5% EA, 83-180번은 7-100% EA로 흘러주었다.

[0032] 관련 HPLC 결과를 도 1에 도시하였다. 도 1에서 볼 수 있듯이 50번에서 103번에서 단조로운 peak를 얻었으며 이 180개의 테스트 관(test tube)을 8개의 그룹으로 나누어 분석하고 그 결과를 도 2 및 3에 나타내었다. 분석 후 활성을 측정하였더니 1,2,3번에서 활성을 보였다. 활성을 보인 부분을 재분리하였더니 4번과 8번에서 Active peak를 찾을 수 있었다.

[0033] (1-2) n-헥산을 이용하여 분리한 단일 화합물 구조 규명

[0034] n-헥산 분획물을 바이오타지(Biotage)를 이용하여 분리한 단일 화합물에 대한 유효성분을 NMR(¹H, ¹³C-NMR,

COSY, DEPT, HMQC 및 HMBC) 기기를 사용하여 활성성분의 정확한 구조 동정을 통하여 화합물의 구조를 규명하고 규명된 구조를 도 5에 도시하였다.

확보한 $^1\text{H-NMR}$ data에 의하면 H-3의 적분(integral) 값이 3H에 해당하는 값을 나타냄으로 2H를 가진 값은 제외된다. 통상적으로 $\text{C}=\text{C}$ 에서 H이 cis(')의 경우 J값이 6~12Hz 정도에 나타나며 Trans(')의 경우 J값이 12~18Hz에서 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 확보한 $^1\text{H-NMR}$ data의 H-1"과 H-2"f의 J값을 계산한 결과 각각 6.58 (1H, $J=16.6, 1.8\text{Hz}$), 6.12 (1H, $J=15.8, 6.6\text{Hz}$)으로 계산이 되며 이 정보를 통해 분리 정제한 화합물은 trans(')-아사론(Asarone)으로 동정하였다.

(2)활성 추출분획물의 대량 추출법 확립

차즈기 HEX층에서 분리해낸 아사론(Asarone)의 대량 추출법을 확립하기 위하여 추출 방법인 초음파 분해(Sonication), 침출, 환류(Reflux)를 각 17가지로 조건을 나누었다. 총 51가지 조건으로 추출 후 결과를 분석하여 활성 추출 분획물의 대량 추출법을 확립하였다.

초음파 분해(Sonication)과 침출 조건에서는 균질화 된 차즈기(중국산) 10g 및 주정 100ml을 공통 조건으로 하였고, 환류(Reflux) 조건에서는 용매(주정) 100ml와 온도는 70°C 에서 진행되었다.

총 51가지 조건의 결과분석은 HPLC로 진행하였다. HPLC는 Agilent technology 1100을 사용하였고 HPLC 조건은 column: Eclipse Plus C18(150×4.6 mm, 5 μm , Agilent);column temperature, 30°C ; mobile phase, 0.1% TFA (solvent A) and MeOH (solvent B); HPLC analysis, 0-23 min, linear gradient from 5-100%, 24-35 min, linear gradient from 100-5% B (0-35 min). Flowrate, 0.7 mL/min; detection, photodiode array detector; injection volume, 10 μl 이다.

초음파 분해(Sonication) 조건 및 결과 분석은 아래 표 1과 같으며 차즈기를 17개의 그룹으로 나눈 조건을 수행한 물질을 HPLC를 통해 확인한 결과는 도 6에 나타내었다.

표 1

소니케이션	단위	-2	-1	0	+1	+2
X1	temp (°)	30	35	40	45	50
X2	time (min)	30min	1hr	1hr 30min	2hr	2hr 30min
X3	용매(EtOH%)	50%	70%	80%	90%	100%
용매 양 100ml 시료 양 10g	X1	X2	X3	X1 temp (°)	X2 time (hr)	X3 용매(EtOH%)
1	-1	-1	-1	35	1hr	70%
2	-1	-1	1	35	1hr	90%
3	-1	1	-1	35	2hr	70%
4	-1	1	1	35	2hr	90%
5	1	-1	-1	45	1hr	70%
6	1	-1	1	45	1hr	90%
7	1	1	-1	45	2hr	70%
8	1	1	1	45	2hr	90%
9	-2	0	0	30	1hr 30min	80%
10	2	0	0	50	1hr 30min	80%
11	0	-2	0	40	30min	80%
12	0	2	0	40	2hr 30min	80%
13	0	0	-2	40	1hr 30min	50%
14	0	0	2	40	1hr 30min	100%
15	0	0	0	40	1hr 30min	80%
16	0	0	0	40	1hr 30min	80%
17	0	0	0	40	1hr 30min	80%

도 6에서 볼 수 있듯이, 초음파 분해(Sonication) 조건 5, 12, 10번 순으로 많은 양의 아사론(Asarone)이 추출되었고 5번 조건인 45°C , 1hr, 70%주정이 최적 추출 조건이었다.

[0043] (2-2) 침출 조건과 결과 분석

[0044] 침출 조건 및 결과 분석은 아래 표 1과 같으며 차즈기를 17개의 그룹으로 나눈 조건을 수행한 물질을 HPLC를 통해 확인한 결과는 도 7에 나타내었다.

표 2

[0045]

침출	단위	-2	-1	0	+1	+2
X1	temp (°C)	25	40	50	60	70
X2	time (hr)	2hr	8hr	24hr	48hr	72hr
X3	용매(EtOH%)	50%	70%	80%	90%	100%
용매 양 100ml 시료 양 10g	X1	X2	X3	X1 temp (°C)	X2 time (hr)	X3 용매(EtOH%)
1	-1	-1	-1	40	8hr	70%
2	-1	-1	1	40	8hr	90%
3	-1	1	-1	40	48hr	70%
4	-1	1	1	40	48hr	90%
5	1	-1	-1	60	8hr	70%
6	1	-1	1	60	8hr	90%
7	1	1	-1	60	48hr	70%
8	1	1	1	60	48hr	90%
9	-2	0	0	25	24hr	80%
10	2	0	0	70	24hr	80%
11	0	-2	0	50	2hr	80%
12	0	2	0	50	72hr	80%
13	0	0	-2	50	24hr	50%
14	0	0	2	50	24hr	100%
15	0	0	0	50	24hr	80%
16	0	0	0	50	24hr	80%
17	0	0	0	50	24hr	80%

[0046] 도 7에서 볼 수 있듯이, 침출 조건 12, 7, 3번순으로 많은 양의 아사론(Asarone)이 추출되었고 12번 조건인 50°C, 72hr, 80%주정이 최적 추출 조건이었다.

[0047] (2-3) 환류 조건과 결과 분석

[0048] 환류 조건 및 결과 분석은 아래 표 3과 같으며 차즈기를 17개의 그룹으로 나눈 조건을 수행한 물질을 HPLC를 통해 확인한 결과는 도 8에 나타내었다.

표 3

[0050]

환류(Reflux)(70 고정)	단위	-2	-1	0	+1	+2
X1	시료(g)	3g	5g	10g	13g	15g
X2	time (hr)	1hr	1hr 30min	2hr	2hr 30min	3hr
X3	용매(EtOH%)	50%	70%	80%	90%	100%
용매 양 100ml	X1	X2	X3	X1 시료(g)	X2 time (hr)	X3 용매(EtOH%)
1	-1	-1	-1	5g	1hr 30min	70%
2	-1	-1	1	5g	1hr 30min	90%
3	-1	1	-1	5g	2hr 30min	70%
4	-1	1	1	5g	2hr 30min	90%
5	1	-1	-1	13g	1hr 30min	70%
6	1	-1	1	13g	1hr 30min	90%
7	1	1	-1	13g	2hr 30min	70%
8	1	1	1	13g	2hr 30min	90%

9	-2	0	0	3g	2hr	80%
10	2	0	0	15g	2hr	80%
11	0	-2	0	10g	1hr	80%
12	0	2	0	10g	3hr	80%
13	0	0	-2	10g	2hr	50%
14	0	0	2	10g	2hr	100%
15	0	0	0	10g	2hr	80%
16	0	0	0	10g	2hr	80%
17	0	0	0	10g	2hr	80%

[0051] 환류(Reflux) 조건 6,12,16번 순으로 많은 양의 아사론(Asarone)이 추출되었고 6번 조건인 13g, 1hr 30min, 90%주정이 최적 추출 조건이었다.

[0053] (3) 차즈기 추출물의 최적의 침출 조건과 그 결과 분석

표 4

분석대상물질	직선성 범위(Linearity range) (μg/mL)	기울기 (Slope) (a)	y 절편(Intercept) (b)	R ²	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
α-아사론(Asarone)	10.00-100.00	59959	-116.94	0.9999	0.10	0.29

[0056] 본 시험법의 분석조건으로 시험할 때 분석대상물질(α-아사론(Asarone))의 피크는 겹치지 않고 잘 분리가 되었으며, 51개의 RSM sample을 측정할 때 간섭현상도 일어나지 않았다. 또한 분석법 검증을 검토하기 위해 각 물질들의 직선성, 범위, LOD 및 LOQ를 검토하였다. 검량선은 10~100 ug/ml와 내부표준물질의 면적비를 이용하였으며, 상관계수 R²을 구하였을 때 차즈기의 지표성분인 α-아사론(Asarone)에 대하여 y = 59959x - 116.94 (x; 지표성분의 양, y; 피크면적)의 검량선을 얻었으며, 높은 직선성을 나타내는지 확인할 수 있었다. LOD는 S/N = 3, LOQ는 S/N = 10을 기준으로 정할 수 있었다.

표 5

Added standard	정도(Precision)				정확도(Accuracy)	
	일내(Intra-day) (n=3)		일간(Inter-day) (n=3)		(n=3)	
	Rt ^a (% RSD)	Area ^b (% RSD)	Rt (% RSD)	Area (% RSD)	회수율 (Recovery) (%) ^c	(% RSD) ^d
200 μg/mL	0.02	0.36	0.05	2.16	92.7	1.28
100 μg/mL	0.02	0.06	0.01	2.80	97.6	2.26
50 μg/mL	0.02	0.44	0.02	1.64	99.2	1.23
Repeatability injection (n=9)						

[0060] ^a Relative standard deviation of retention time.

^b Relative standard deviation of peak area.

^c Average percent recovery obtained from nine measurements.

^d Relative standard deviation of recovery.

HPLC법에 의한 정확도와 정밀도는 각 표준물질 당 50, 100, 200 ug/ml 3가지 농도로 하여 하루에 실험을 3번 시행하여 일내 (intra-day) 정밀성을 구하였으며, 3일간 반복 실험을 실시하여 일간 (inter-day) 정밀성과 정확성을 확인하였다. 그 결과 각 물질의 피크를 3회씩 반복실험 하였을 때 각 표준물질의 회수율은 92.7-99.2%로 나타났으며 정밀성도 2.8% 이내로 나왔다.

(3-1) 환류 조건과 결과 분석

표 6

No.	X ₁ (mL:g)	X ₂ (hour)	X ₃ (%)	α-아사론(Asarone) 함량 (mg/g)
1	-1 (10:0.5)	-1 (1.5)	-1 (70)	17.47
2	-1 (10:0.5)	-1 (1.5)	1 (90)	14.57
3	-1 (10:0.5)	1 (2.5)	-1 (70)	15.36
4	-1 (10:0.5)	1 (2.5)	1 (90)	14.74
5	1 (10:1.3)	-1 (1.5)	-1 (70)	30.93
6	1 (10:1.3)	-1 (1.5)	1 (90)	46.36
7	1 (10:1.3)	1 (2.5)	-1 (70)	28.77
8	1 (10:1.3)	1 (2.5)	1 (90)	36.80
9	-2 (10:0.3)	0 (2)	0 (80)	9.51
10	2 (10:1.5)	0 (2)	0 (80)	39.71
11	0 (10:1)	-2 (1)	0 (80)	30.71
12	0 (10:1)	2 (3)	0 (80)	43.82
13	0 (10:1)	0 (2)	-2 (50)	28.16
14	0 (10:1)	0 (2)	2 (100)	27.73
15	0 (10:1)	0 (2)	0 (80)	30.07
16	0 (10:1)	0 (2)	0 (80)	41.37
17	0 (10:1)	0 (2)	0 (80)	34.31

본 실험을 통하여 정해진 HPLC 분석조건으로 차르기 추출물(환류 조건)에서의 α-아사론(Asarone)의 함량을 측정하였을 때 6번 조건(10 mL:1.3 g, 1.5 hour, 90% 에탄올(Ethanol))에서 가장 많은 함량을 확인하였다.

도 9는 환류 추출 조건들의 배합 비율에 따른 α-아사론(Asarone) 함량에 대한 3차원 그래프이다. 상기 그래프에 따르면, 환류 추출 조건에서 시간, 용매:시료 비율에 따른 함량을 보면 시간은 길어질수록, 시료는 많아질수록 그리고 용매는 90% 주정에서 대체로 높은 함량을 가지고 있다.

(3-2) 침출 조건과 결과 분석

표 7

No.	X ₁ (°C)	X ₂ (hour)	X ₃ (%)	α-아사론(Asarone) 함량 (mg/g)
1	-1 (40)	-1 (8)	-1 (70)	16.63
2	-1 (40)	-1 (8)	1 (90)	16.23
3	-1 (40)	1 (48)	-1 (70)	33.90
4	-1 (40)	1 (48)	1 (90)	28.78
5	1 (40)	-1 (8)	-1 (70)	31.02

6	1 (60)	-1 (8)	1 (90)	25.89
7	1 (60)	1 (48)	-1 (70)	46.19
8	1 (60)	1 (48)	1 (90)	30.06
9	-2 (25)	0 (24)	0 (80)	29.82
10	2 (70)	0 (24)	0 (80)	33.05
11	0 (50)	-2 (2)	0 (80)	29.33
12	0 (50)	2 (72)	0 (80)	47.77
13	0 (50)	0 (24)	-2 (50)	13.28
14	0 (50)	0 (24)	2 (100)	19.62
15	0 (50)	0 (24)	0 (80)	20.00
16	0 (50)	0 (24)	0 (80)	19.86
17	0 (50)	0 (24)	0 (80)	19.58

[0076] 본 실험을 통하여 정해진 HPLC 분석조건으로 차즈기 추출물(침출 조건)에서의 α -아사론(Asarone)의 함량을 측정하였을 때 12번 조건(50 ℃, 72 hour, 80% 에탄올)에서 가장 많은 함량을 확인할 수 있었다.

[0078] 도 10은 침출 추출 조건들의 배합 비율에 따른 α -아사론(Asarone)의 함량에 대한 3차원 그래프이다. 침출 추출 조건에서 시간, 용매:시료 비율에 따른 함량을 보면 시간은 길어질수록, 온도는 50℃에서 그리고 용매는 80% 주정에서 대체로 높은 함량을 가지고 있다.

[0080] (3-3) 초음파 분해 조건과 결과 분석

표 8

[0081]

No.	X ₁ (℃)	X ₂ (hour)	X ₃ (%)	α -아사론(Asarone) content (mg/g)
1	-1 (35)	-1 (1)	-1 (70)	6.58
2	-1 (35)	-1 (1)	1 (90)	5.60
3	-1 (35)	1 (2)	-1 (70)	11.90
4	-1 (35)	1 (2)	1 (90)	8.80
5	1 (45)	-1 (1)	-1 (70)	36.52
6	1 (45)	-1 (1)	1 (90)	10.51
7	1 (45)	1 (2)	-1 (70)	25.98
8	1 (45)	1 (2)	1 (90)	11.03
9	-2 (30)	0 (1.5)	0 (80)	19.09
10	2 (50)	0 (1.5)	0 (80)	27.77
11	0 (40)	-2 (0.5)	0 (80)	20.03
12	0 (40)	2 (2.5)	0 (80)	28.58
13	0 (40)	0 (1.5)	-2 (50)	26.40
14	0 (40)	0 (1.5)	2 (100)	26.18
15	0 (40)	0 (1.5)	0 (80)	22.38
16	0 (40)	0 (1.5)	0 (80)	23.02
17	0 (40)	0 (1.5)	0 (80)	22.97

[0083] 본 실험을 통하여 정해진 HPLC 분석조건으로 차즈기 추출물(초음파 분해(Sonication) 조건)에서의 α -아사론(Asarone)의 함량을 측정하였을 때 5번 조건(45 ℃, 1 hour, 70% 에탄올)에서 가장 많은 함량을 확인할 수 있었다.

[0085] 도 11은 초음파 분해(Sonication) 추출 조건들의 배합 비율에 따른 α -아사론(Asarone) 함량에 대한 3차원 그래

프이다. 초음파 분해(Sonication) 추출 조건에서 시간, 용매:시료 비율에 따른 함량을 보면 시간은 1시간 30분, 온도는 45℃에서 그리고 용매는 70~80% 주정에서 대체로 높은 함량을 가지고 있다.

[0087]

(3-4) SAS 8.1 프로그램을 이용한 추출 조건에 대한 최대 예상치 및 실측치의 확인

[0088]

표 9

종속변수	X_1	X_2	X_3	최대예상치 (mg/g)	실측치 (mg/g)	형태
환류	13.51	1.45	90.37	40.56	47.84	saddle point
침출	53.06	69.03	68.40	55.67	18.76	saddle point
Sonication	47.35	1.26	59.16	47.00	36.96	saddle point

[0089]

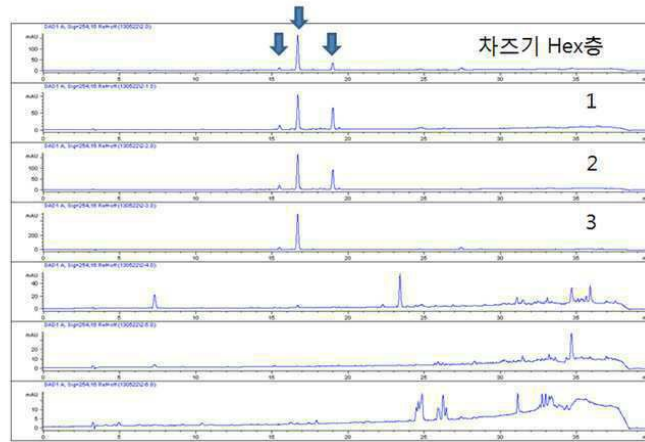
SAS 8.1 프로그램을 이용하였을 때 3가지 추출조건 모두 안장점을 띄고 있었으며 최대 예상치를 바탕으로 실측치를 확인하였다.

도면

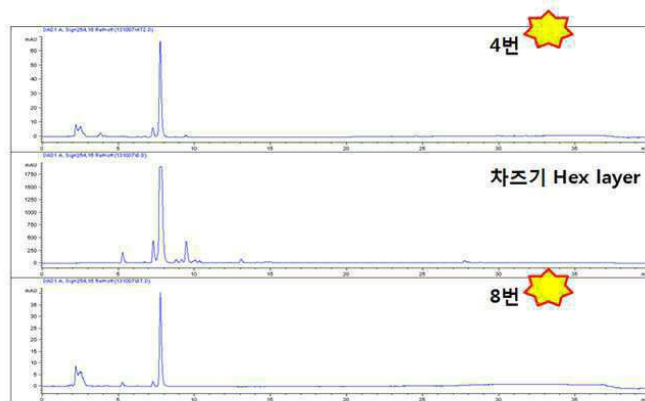
도면1



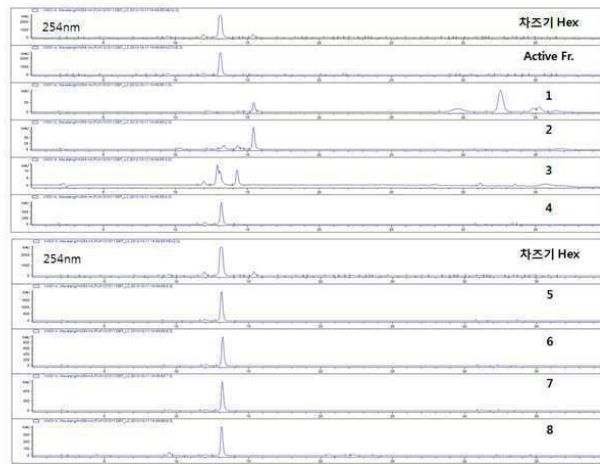
도면2



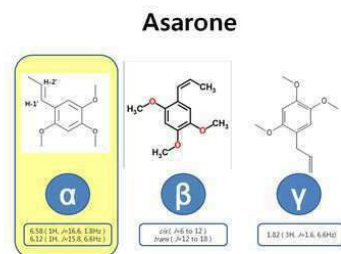
도면3



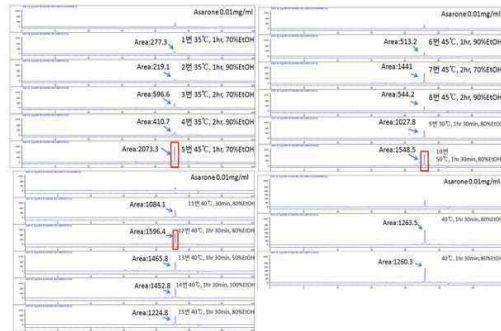
도면4



도면5



도면6



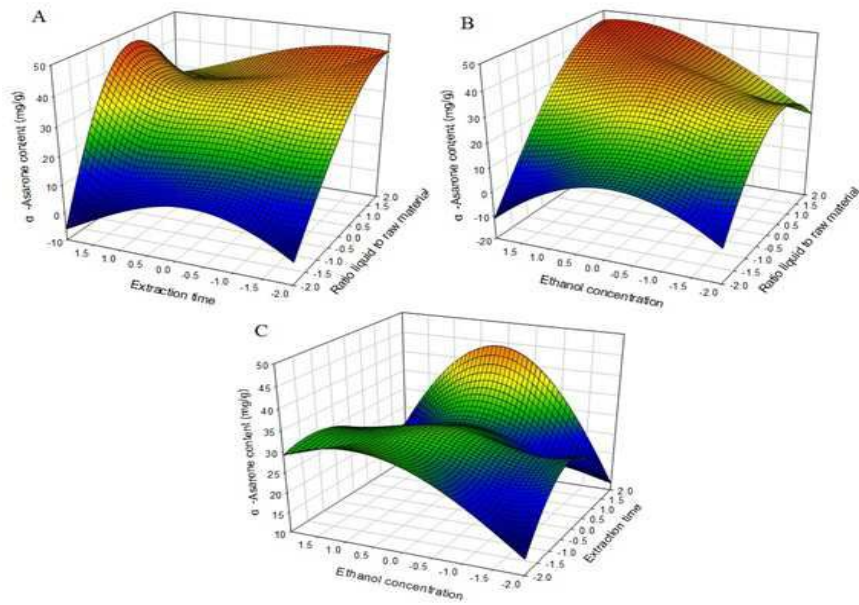
도면7



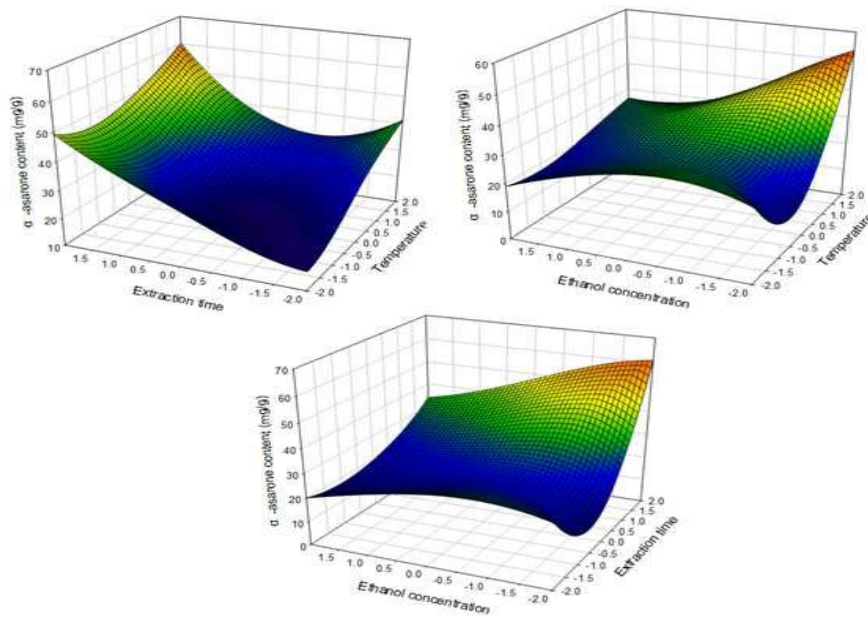
도면8



도면9



도면10



도면11

