



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0070610

(43) 공개일자 2015년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 67/48 (2006.01) C07B 63/00 (2006.01)

C07C 69/732 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0157036

(22) 출원일자 2013년12월17일

심사청구일자 2013년12월17일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

노경호

서울 강남구 남부순환로 2763, 2107호 (도곡동, 에스케이리더스뷰)

이유리

인천 남구 경인북길471번길 41, 102동 201호 (도화동, 롯데맨션)

이유진

인천광역시 부평구 십정동 백운로 12번길 10-10

(74) 대리인

이원희

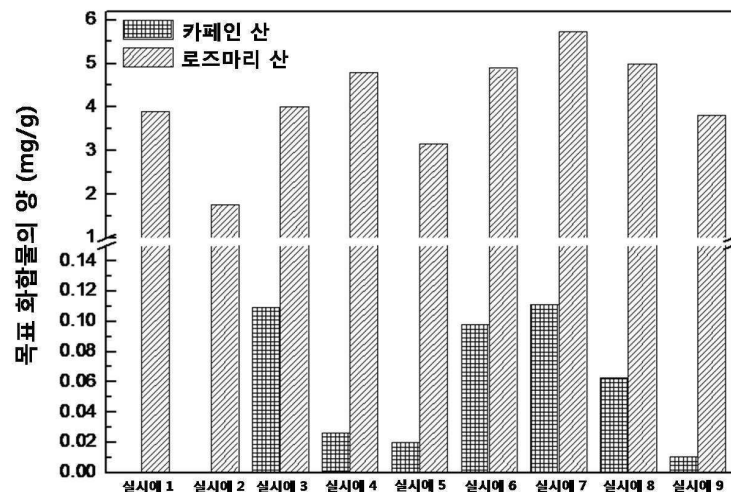
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 잘피를 준비하는 단계(단계 1); 및 이온성 액체 또는 공용 용매(Deep eutectic solvent)인 첨가제, 상기 단계 1에서 준비된 잘피 및 용매를 혼합하여 로즈마리 산(Rosmarinic acid) 및 카페인 산(Caffeic acid)을 포함하는 용액을 추출하는 단계(단계 2);를 포함하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법은 이온성 액체 또는 공용 용매를 첨가하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출조건을 최적화할 수 있으며, 로즈마리 산 및 카페인 산 추출공정에서 빠르고 많은 양의 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 47359-4

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양한국발전프로그램

연구과제명 [4세부]고부가가치 해양생리활성성분의 정제(노경호)

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

잘피를 준비하는 단계(단계 1); 및

이온성 액체 또는 공융 용매(Deep eutectic solvent)인 첨가제, 상기 단계 1에서 준비된 잘피 및 용매를 혼합하여 로즈마리 산(Rosmarinic acid) 및 카페인 산(Caffeic acid)을 포함하는 용액을 추출하는 단계(단계 2);를 포함하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 2에서 이온성 액체의 양이온은 1-에틸-3-메틸이미다졸리움(1-Ethyl-3-methylimidazolium, [EMIM]), 1-부틸-3-메틸이미다졸리움(1-Butyl-3-methylimidazolium, [BMIM]), 1-헥실-3-메틸이미다졸리움(1-Hexyl-3-methylimidazolium, [HMIM]), 1-옥틸-3-메틸이미다졸리움(1-Octyl-3-methylimidazolium, [OMIM]), 1-데실-3-메틸이미다졸리움(1-Decyl-3-methylimidazolium, [DMIM]) 및 1-테트라데실-3-메틸이미다졸리움(1-Tetradecyl-3-methylimidazolium, [TMIM])으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계 2에서 이온성 액체의 음이온은 브로마이드(Bromide, [Br]), 클로라이드(Chloride, [Cl]), 테트라플루오로보레이트(Tetrafluoroborate, [BF<sub>4</sub>]) 및 헥사플루오로포스페이트(Hexafluorophosphate, [PF<sub>6</sub>])로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 2의 이온성 액체는 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 테트라플루오로보레이트([BMIM][BF<sub>4</sub>])인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 2의 용매는 물(Water), 에탄올(Ethanol) 및 메탄올(Methanol)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단계 2의 용매는 메탄올(Methanol)인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 단계 2에서 공용 용매의 염은 테트라메틸암모늄 클로라이드(Tetramethylammonium chloride,  $\text{Et}_4\text{NCl}$ ), 콜린 클로라이드(Choline chloride,  $\text{ChCl}$ ) 및 메틸 트리페닐 포스포늄 브로마이드(Methyl triphenyl phosphonium bromide,  $\text{Me}(\text{Ph})_3\text{PBr}$ )로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단계 2에서 공용 용매의 수소 결합 주개(Hydrogen bond donor, HBD)는 에틸렌 글라이콜(Ethylene glycol), 1,2-부탄디올(1,2-Butanediol) 및 페놀(Phenol), 우레아(Urea)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 단계 2의 공용 용매의 염은 테트라메틸암모늄 클로라이드(Tetramethylammonium chloride,  $\text{Et}_4\text{NCl}$ )이고; 수소 결합 주개는 페놀(Phenol)인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 단계 2의 공용 용매의 함량은 전체 용액에 대하여 0.1 내지 50 중량%인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 단계 2의 공용 용매의 함량은 전체 용액에 대하여 5 내지 25 중량%인 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 단계 2의 추출은 초음파 처리(Ultra sonic), 디핑(Dipping) 및 환류(Reflux)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종의 방법을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

### 청구항 13

제1항에 있어서,

상기 단계 2의 추출은 디핑(Dipping) 방법을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

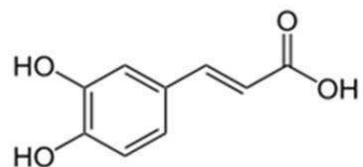
[0001] 본 발명은 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 잘피(*Zostera marina*, *Z.marina*)는 거머리말과의 여러해살이 해초로 전 세계적으로 5 과 13 속 60 여종이 한국, 중국, 일본, 유럽, 북아메리카에 분포하며 얕은 바다 나 하구에 자생한다. 잘피는 해조류와는 달리 꽃이 피는 현화식물로서 뿌리와 잎은 구분이 확실하며 녹색의 꽃을 피우며, 광합성을 통해  $950 \text{ L/m}^2$ 의 산소를 생산하고 어린 물고기나 갑각류, 조개 등의 수중 생물의 서식지를 제공하고 수중에 존재하는 오염물질을 걸러 내어 물을 맑게 한다.

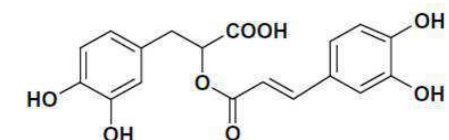
[0003] 잘피에는 카페인 산(Caffeic acid), 갈 산(Gallic acid), 페룰 산(Ferrulic acid), 로즈마린 산(Rosmarinic acid) 등과 같은 항산화 작용, 항염 작용으로 널리 알려진 페놀산 화합물이 다량 존재한다. 카페인 산(화학식 1)의 항염, 피부암 감소, 구강암 세포 성장 억제 등의 효과는 많은 연구에 의해 증명되었으며 채소나 과일에서 쉽게 찾을 수 있다. 로즈마린 산(화학식 2)은 강력한 항산화 효과, 항알러지, 면역억제, 아토피에 효과가 있다.

[0004] <화학식 1>



[0005]

[0006] <화학식 2>



[0007]

[0008] 한편, 이온성 액체(Ionic liquids, ILs)는 거대 해테로 고리 양이온과 다양한 무기 음이온의 결합으로 이루어진 염으로, 낮은 융점 (<100 °C)을 가져 상온에서 액체로 존재한다. 또한, 이온성 액체는 끓는점이 낮고, 낮은 증기압, 비휘발성, 낮은 용해점, 높은 이온 전도성 등 다양한 특성을 갖기 때문에 많은 분야에 적용되고 있다. 나아가, 이온성 액체는 소수성, 유무기 용매에 대한 상용성, 목표화합물과 이온성 액체 사이의  $\pi-\pi$  상호작용 등으로 추출과 분리 분야에서 많이 적용되어왔다(Electrochim. Acta., 52, 1398, 2006).

[0009] 또한, 공용 용매(Deep Eutectic solvent, DES)는 단순히 두 가지의 염을 혼합하여 두 염의 수소결합을 형성하여 생성되는 이온성 액체와 유사한 물질이다. 상기 공용 용매는 가격이 싸며, 독성이 없어 인체에 무해하고 밀도, 점도, 이온 전도도 등 많은 물리화학적 특성이 이온성 액체와 유사하기 때문에 새로운 청정용매로 많은 연구가 진행되고 있다(Chem. Soc. Rev., 41, 7108, 2012)

[0010] 이에, 본 발명자들은 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법에 대한 연구를 하던 중, 이온성 액체 또는 공용 용매를 첨가제로 사용하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 최적의 추출 조건을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0013] 잘피를 준비하는 단계(단계 1); 및

[0014] 이온성 액체 또는 공용 용매(Deep eutectic solvent)인 첨가제, 상기 단계 1에서 준비된 잘피 및 용매를 혼합하여 로즈마리 산(Rosmarinic acid) 및 카페인 산(Caffeic acid)을 포함하는 용액을 추출하는 단계(단계 2);를 포함하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법은 이온성 액체 또는 공용 용매를 첨가제로 사용하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출조건을 최적화할 수 있으며, 로즈마리 산 및 카페인 산 추출공정에서 빠르고 많은 양의 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출할 수 있는 효과가 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명에 따른 실시예 1 내지 10에서 추출된 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출량을 나타낸 그래프이고;

도 2는 본 발명에 따른 실시예 10 내지 17 및 비교예 3에서 추출된 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출량을 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은

[0018] 잘피를 준비하는 단계(단계 1); 및

[0019] 이온성 액체 또는 공용 용매(Deep eutectic solvent)인 첨가제, 상기 단계 1에서 준비된 잘피 및 용매를 혼합하여 로즈마리 산(Rosmarinic acid) 및 카페인 산(Caffeic acid)을 포함하는 용액을 추출하는 단계(단계 2);를 포함하는 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법을 제공한다.

[0020] 이하, 본 발명에 따른 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법에 대하여 각 단계별로 상세히 설명한다.

- [0021] 먼저, 본 발명에 따른 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법에 있어서, 단계 1은 잘피를 준비하는 단계이다.
- [0022] 상기 단계 1은 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하기 위해 잘피를 준비하는 단계로서,
- [0023] 일례로, 상기 단계 1의 잘피는 뿌리 또는 잎을 각각 적절한 크기로 자른 뒤 동결 건조시키고, 믹서기로 갈아서 분말 형태로 준비할 수 있다.
- [0024] 다음으로, 본 발명에 따른 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법에 있어서, 단계 2는 이온성 액체 또는 공용 용매(Deep eutectic solvent)인 첨가제, 상기 단계 1에서 준비된 잘피 및 용매를 혼합하여 로즈마리 산(Rosmarinic acid) 및 카페인 산(Caffeic acid)을 포함하는 용액을 추출하는 단계이다.
- [0025] 본 발명에 따른 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법은 이온성 액체 또는 공용 용매를 첨가제로 사용하여 용매와 혼합하고, 상기 단계 1에서 준비된 잘피 분말을 침지시켜 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출할 수 있다. 이때, 사용되는 용매의 종류, 이온성 액체 또는 공용 용매의 종류 및 첨가량을 조절하여 최적의 추출 조건을 확립할 수 있다.
- [0026] 구체적으로, 상기 단계 2의 이온성 액체는 양이온으로써 1-알킬-3-메틸이미다졸리움(1-Alkyl-3-methylimidazolium)을 포함하는 이온성 액체를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 1-에틸-3-메틸이미다졸리움(1-Ethyl-3-methylimidazolium, [EMIM]), 1-부틸-3-메틸이미다졸리움(1-Butyl-3-methylimidazolium, [BMIM]), 1-헥실-3-메틸이미다졸리움(1-Hexyl-3-methylimidazolium, [HMIM]), 1-옥틸-3-메틸이미다졸리움(1-Octyl-3-methylimidazolium, [OMIM]), 1-데실-3-메틸이미다졸리움(1-Decyl-3-methylimidazolium, [DMIM]) 및 1-테트라데실-3-메틸이미다졸리움(1-Tetradecyl-3-methylimidazolium, [TMIM]) 등을 포함하는 이온성 액체를 사용할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 1-부틸-3-메틸이미다졸리움(1-Butyl-3-methylimidazolium, [BMIM])을 포함하는 이온성 액체를 사용할 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 단계 2의 이온성 액체는 음이온으로써 브로마이드(Bromide, [Br]), 테트라플루오로보레이트(tetrafluoroborate, [BF<sub>4</sub>]), 헥사플루오로포스페이트(hexafluorophosphate, [PF<sub>6</sub>]), 비스(트리플로오로메탄설포닐)이미드(bis(trifluoromethanesulfonyl)imide, [Tf<sub>2</sub>N])를 포함하는 이온성 액체를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 테트라플루오로보레이트(tetrafluoroborate, [BF<sub>4</sub>])를 사용할 수 있다. 바람직하게는 테트라플루오로보레이트(tetrafluoroborate, [BF<sub>4</sub>])를 포함하는 이온성 액체를 사용할 수 있다.
- [0028] 이에, 상기 단계 2의 이온성 액체는 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 테트라플루오로보레이트([BMIM][BF<sub>4</sub>])를 사용할 수 있다. 상기 단계 2에서 이온성 액체를 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 테트라플루오로보레이트([BMIM][BF<sub>4</sub>])를 사용하면, 로즈마리 산에 대하여 더욱 우수한 추출 효율을 보인다.
- [0029] 또한, 상기 단계 2의 용매는 물(Water), 에탄올(Ethanol) 및 메탄올(Methanol) 등을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는, 메탄올을 사용할 수 있다. 로즈마리 산과 카페인 산의 구조는 많은 하이드록시기(-OH)를 갖고 있어 물이나 알코올에 잘 녹는 성질을 갖고 있기 때문에 물과 에탄올을 혼합하여 사용할 수 있다. 다만, 본 발명에서는 추출 효율을 증가시키기 위한 첨가제로써 이온성 액체와 공용 용매를 사용하기 때문에, 메탄올을 사용하는 것이 바람직하다. 물의 경우 목표 화합물과 첨가제의 상호작용을 방해할 수 있다.
- [0030] 나아가, 상기 단계 2에서 공용 용매의 염은 테트라메틸암모늄 클로라이드(Tetramethylammonium chloride,

Et<sub>4</sub>NCl), 콜린 클로라이드(Choline chloride, ChCl) 및 메틸 트리페닐 포스포늄 브로마이드(Methyl triphenyl phosphonium bromide, Me(Ph)<sub>3</sub>PBr) 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 테트라메틸암모늄 클로라이드(Tetramethylammonium chloride, Et<sub>4</sub>NCl)를 포함하는 공용 용매를 사용할 수 있다.

[0031] 또한, 상기 단계 2에서 공용 용매의 수소 결합 주개(Hydrogen bond donor, HBD)는 에틸렌 글라이콜(Ethylene glycol), 1,2-부탄디올(1,2-Butanediol) 및 페놀(Phenol), 우레아(Urea) 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 페놀(Phenol)을 포함하는 공용 용매를 사용할 수 있다.

[0032] 이에, 상기 단계 2에서 공용 용매는 염으로써 테트라메틸암모늄 클로라이드(Tetramethylammonium chloride, Et<sub>4</sub>NCl)를 포함하고; 수소 결합 주개으로써 페놀(Phenol)을 포함하는 공용 용매를 사용할 수 있다. 이때, 상기 공용 용매의 염과 수소 결합 주개의 몰비는 1 : 2일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 상기 단계 2의 공용 용매의 함량은 전체 용액에 대하여 0.1 내지 50 중량%인 것이 바람직하며, 5 내지 25 중량%인 것이 더욱 바람직하다. 만약, 상기 단계 2의 공용 용매의 함량이 전체 용액에 대하여 0.1 중량% 미만인 경우에는 추출되는 로즈마리 산 및 카페인 산의 양이 적은 문제가 있으며, 50 중량%를 초과하는 경우에도 추출되는 로즈마리 산 및 카페인 산의 양이 적은 문제가 있다.

[0034] 나아가, 상기 단계 2의 추출은 용액을 사용하여 추출할 수 있는 방법이면 제한되지 않고 사용할 수 있으나, 초음파 처리(Ultra sonic), 디핑(Dipping) 및 환류(Reflux) 등의 방법을 사용하여 추출할 수 있다. 바람직하게는, 잘피를 추출 용매에 침지시키는 방법인 디핑 방법을 사용하여 추출할 수 있다.

[0035] 이하, 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세하게 설명한다.

[0036] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0037] <제조예 1> 공용 용매의 제조 1

[0038] 콜린 클로라이드(Choline chloride, ChCl)와 에틸렌 글라이콜(Ethylene glycol)을 1 : 2의 비율로 혼합한 뒤, 100 °C의 온도에서 단일 상이 될 때까지 스핀 바로 잘 혼합하여 공용 용매를 제조하였다.

[0039] <제조예 2> 공용 용매의 제조 2

[0040] 콜린 클로라이드(Choline chloride, ChCl)와 1,2-부탄디올(1,2-Butanediol)을 1 : 2의 비율로 혼합한 뒤, 100 °C의 온도에서 단일 상이 될 때까지 스핀 바로 잘 혼합하여 공용 용매를 제조하였다.

[0041] <제조예 3> 공용 용매의 제조 3

[0042] 테트라메틸암모늄 클로라이드(Tetramethylammonium chloride, Et<sub>4</sub>NCl)와 1,2-부탄디올(1,2-Butanediol)을 1 : 2의 비율로 혼합한 뒤, 100 °C의 온도에서 단일 상이 될 때까지 스핀 바로 잘 혼합하여 공용 용매를 제조하였다.

- [0043] <제조예 4> 공용 용매의 제조 4
- [0044] 테트라메틸암모늄 클로라이드(Tetramethylammonium chloride,  $\text{Et}_4\text{NCl}$ )와 우레아(Urea)를 1 : 2의 비율로 혼합한 뒤, 100 °C의 온도에서 단일 상이 될 때까지 스펀 바로 잘 혼합하여 공용 용매를 제조하였다.
- [0045] <제조예 5> 공용 용매의 제조 5
- [0046] 메틸 트리페닐 포스포늄 브로마이드(Methyl triphenyl phosphonium bromide,  $\text{Me(Ph)}_3\text{PBr}$ )와 에틸렌 글라이콜(Ethylene glycol)을 1 : 4의 비율로 혼합한 뒤, 100 °C의 온도에서 단일 상이 될 때까지 스펀 바로 잘 혼합하여 공용 용매를 제조하였다.
- [0047] <실시예 1> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 1
- [0048] 단계 1: 잘피(인천 영흥도, 수자원연구소, 대한민국)의 뿌리를 0.5 cm로 자른 뒤 동결건조 시킨 후, 믹서기로 갈아서 잘피 분말을 준비하였다.
- [0049] 단계 2: 상기 단계 1에서 준비된 잘피 분말 0.05 g과 이온성 액체인 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 브로마이드(1-Butyl-3-methylimidazolium bromide, [EMIM][Br], Milwaukee, WI, USA) 0.01 g을 추출 용매인 메탄올(Methanol, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml에 첨가하였다.
- [0050] 그 후, 디핑(Dipping) 방법을 수행하여 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하였다. 추출한 후, 남아 있는 잘피 분말을 제거하기 위해 필터(MFS-25, 0.45  $\mu\text{m}$  TF, Whatman, U.S.A.)로 여과시킨 후, 물, 메탄올 및 인산(50:50:0.1, v/v)을 이동상으로 사용하는 HPLC로 분석하여, 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0051] <실시예 2> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 2
- [0052] 상기 실시예 1의 단계 2에서 이온성 액체로써 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 클로라이드(1-Butyl-3-methylimidazolium chloride, [BMIM][Cl], Milwaukee, WI, USA)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0053] <실시예 3> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 3
- [0054] 상기 실시예 1의 단계 2에서 이온성 액체로써 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 헥사플루오로포스페이트(1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [BMIM][PF<sub>6</sub>], Milwaukee, WI, USA)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0055] <실시예 4> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 4
- [0056] 상기 실시예 1의 단계 2에서 이온성 액체로써 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 테트라플루오로보레이트(1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [BMIM][BF<sub>4</sub>], Milwaukee, WI, USA)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0057] <실시예 5> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 5
- [0058] 단계 1: 잘피(인천 영흥도, 수자원연구소, 대한민국)의 뿌리를 0.5 cm로 자른 뒤 동결건조 시킨 후, 믹서기로 갈아서 잘피 분말을 준비하였다.

- [0059] 단계 2: 상기 단계 1에서 준비된 잘피 분말 0.05 g과 상기 제조예 1에서 제조된 공용 용매 0.01 g을 추출 용매인 메탄올(Methanol, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml에 첨가하였다.
- [0060] 그 후, 디핑(Dipping) 방법을 수행하여 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하였다. 추출한 후, 남아 있는 잘피 분말을 제거하기 위해 필터(MFS-25, 0.45  $\mu$ m TF, Whatman, U.S.A.)로 여과시킨 후, 물, 메탄올 및 인산(50:50:0.1, v/v)을 이동상으로 사용하는 HPLC로 분석하여, 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0061] <실시예 6> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 6
- [0062] 상기 실시예 5의 단계 2에서 공용 용매로써 상기 제조예 2에서 제조된 공용 용매를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 5와 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0063] <실시예 7> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 7
- [0064] 상기 실시예 5의 단계 2에서 공용 용매로써 상기 제조예 3에서 제조된 공용 용매를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 5와 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0065] <실시예 8> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 8
- [0066] 상기 실시예 5의 단계 2에서 공용 용매로써 상기 제조예 4에서 제조된 공용 용매를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 5와 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0067] <실시예 9> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 9
- [0068] 상기 실시예 5의 단계 2에서 공용 용매로써 상기 제조예 5에서 제조된 공용 용매를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 5와 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0069] <실시예 10> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 10
- [0070] 상기 실시예 7의 단계 2에서 공용 용매 0.05 g을 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 7과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0071] <실시예 11> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 11
- [0072] 상기 실시예 7의 단계 2에서 공용 용매 0.1 g을 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 7과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0073] <실시예 12> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 12
- [0074] 상기 실시예 7의 단계 2에서 공용 용매 0.2 g을 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 7과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0075] <실시예 13> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 13
- [0076] 상기 실시예 7의 단계 2에서 공용 용매 0.3 g을 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 7과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.

- [0077] <실시예 14> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 14
- [0078] 상기 실시예 7의 단계 2에서 공용 용매 0.5 g을 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 7과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0079] <실시예 15> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 15
- [0080] 상기 실시예 7의 단계 2에서 공용 용매 1.0 g을 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 7과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0081] <실시예 16> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 16
- [0082] 상기 실시예 7의 단계 2에서 공용 용매 1.5 g을 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 7과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0083] <실시예 17> 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출 17
- [0084] 상기 실시예 7의 단계 2에서 공용 용매 2.0 g을 첨가한 것을 제외하고는 상기 실시예 7과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0085] <비교예 1>
- [0086] 단계 1: 잘피(인천 영흥도, 수자원연구소, 대한민국)의 뿌리를 0.5 cm로 자른 뒤 동결건조 시킨 후, 믹서기로 갈아서 잘피 분말을 준비하였다.
- [0087] 단계 2: 상기 단계 1에서 준비된 잘피 분말 0.05 g을 추출 용매인 물 5 ml에 첨가하였다.
- [0088] 그 후, 디핑(Dipping) 방법을 수행하여 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하였다. 추출한 후, 남아 있는 잘피 분말을 제거하기 위해 필터(MFS-25, 0.45  $\mu$ m TF, Whatman, U.S.A.)로 여과시킨 후, 물, 메탄올 및 인산(50:50:0.1, v/v)을 이동상으로 사용하는 HPLC로 분석하여, 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0089] <비교예 2>
- [0090] 상기 비교예 1의 단계 2에서 추출 용매로써 에탄올(Ethanol, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 비교예 1과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0091] <비교예 3>
- [0092] 상기 비교예 1의 단계 2에서 추출 용매로써 메탄올(Methanol, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 비교예 1과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0093] <비교예 4>
- [0094] 상기 비교예 1의 단계 2에서 추출 용매로써 에틸 아세테이트(Ethyl acetate, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 비교예 1과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.

- [0095] <비교예 5>
- [0096] 상기 비교예 1의 단계 2에서 추출 용매로써 아세토나이트릴(Acetonitrile, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 비교예 1과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0097] <비교예 6>
- [0098] 상기 비교예 1의 단계 2에서 추출 용매로써 n-헥산(n-Hexane, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 비교예 1과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0099] <비교예 7>
- [0100] 상기 비교예 1의 단계 2에서 추출 용매로써 디클로로메탄(Dichloromethane, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 비교예 1과 동일하게 수행하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0101] <비교예 8>
- [0102] 단계 1: 잘피(인천 영흥도, 수자원연구소, 대한민국)의 뿌리를 0.5 cm로 자른 뒤 동결건조 시킨 후, 믹서기로 갈아서 잘피 분말을 준비하였다.
- [0103] 단계 2: 상기 단계 1에서 준비된 잘피 분말 0.05 g을 추출 용매인 메탄올(Methanol, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml에 첨가하였다.
- [0104] 그 후, 초음파 처리(Ultra sonic) 방법을 수행하여 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하였다. 추출한 후, 남아 있는 잘피 분말을 제거하기 위해 필터(MFS-25, 0.45  $\mu$ m TF, Whatman, U.S.A.)로 여과시킨 후, 물, 메탄올 및 인산(50:50:0.1, v/v)을 이동상으로 사용하는 HPLC로 분석하여, 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.
- [0105] <비교예 9>
- [0106] 단계 1: 잘피(인천 영흥도, 수자원연구소, 대한민국)의 뿌리를 0.5 cm로 자른 뒤 동결건조 시킨 후, 믹서기로 갈아서 잘피 분말을 준비하였다.
- [0107] 단계 2: 상기 단계 1에서 준비된 잘피 분말 0.05 g을 추출 용매인 메탄올(Methanol, DUKSAN Pure Chemical CO., LTD) 5 ml에 첨가하였다.
- [0108] 그 후, 80  $^{\circ}$ C의 온도에서 환류(Reflux) 방법을 수행하여 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하였다. 추출한 후, 남아 있는 잘피 분말을 제거하기 위해 필터(MFS-25, 0.45  $\mu$ m TF, Whatman, U.S.A.)로 여과시킨 후, 물, 메탄올 및 인산(50:50:0.1, v/v)을 이동상으로 사용하는 HPLC로 분석하여, 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 회수율을 측정하였다.

표 1

[0109]

| 구분     | 용매      | 추출방법   | 이온성 액체                   | 공용 용매 | 공용 용매의 첨가량 (g) |
|--------|---------|--------|--------------------------|-------|----------------|
| 실시예 1  | 메탄올     | 디핑     | [BMIM][Br]               | -     | 0.01           |
| 실시예 2  | 메탄올     | 디핑     | [BMIM][Cl]               | -     | 0.01           |
| 실시예 3  | 메탄올     | 디핑     | [BMIM][PF <sub>6</sub> ] | -     | 0.01           |
| 실시예 4  | 메탄올     | 디핑     | [BMIM][BF <sub>4</sub> ] | -     | 0.01           |
| 실시예 5  | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 1 | 0.01           |
| 실시예 6  | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 2 | 0.01           |
| 실시예 7  | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 3 | 0.01           |
| 실시예 8  | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 4 | 0.01           |
| 실시예 9  | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 5 | 0.01           |
| 실시예 10 | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 3 | 0.05           |
| 실시예 11 | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 3 | 0.1            |
| 실시예 12 | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 3 | 0.2            |
| 실시예 13 | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 3 | 0.3            |
| 실시예 14 | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 3 | 0.5            |
| 실시예 15 | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 3 | 1.0            |
| 실시예 16 | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 3 | 1.5            |
| 실시예 17 | 메탄올     | 디핑     | -                        | 제조예 3 | 2.0            |
| 비교예 1  | 물       | 디핑     | -                        | -     | -              |
| 비교예 2  | 에탄올     | 디핑     | -                        | -     | -              |
| 비교예 3  | 메탄올     | 디핑     | -                        | -     | -              |
| 비교예 4  | 에틸아세테이트 | 디핑     | -                        | -     | -              |
| 비교예 5  | 아세토나이트릴 | 디핑     | -                        | -     | -              |
| 비교예 6  | n-헥산    | 디핑     | -                        | -     | -              |
| 비교예 7  | 디클로로메탄  | 디핑     | -                        | -     | -              |
| 비교예 8  | 메탄올     | 조음과 처리 | -                        | -     | -              |
| 비교예 9  | 메탄올     | 환류     | -                        | -     | -              |

[0110]

<실험예 1> 추출 용매에 따른 로즈마리 산 및 카페인 산 추출 평가

[0111]

잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하기 위한 최적의 추출 용매를 찾기 위하여, 상기 비교예 1 내지 7에서 추출된 로즈마리 산 및 카페인 산의 양을 비교하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0112]

| 구분    | 추출량 (mg/g) |         |
|-------|------------|---------|
|       | 카페인 산      | 로즈마리 산  |
| 비교예 1 | 0.3452     | 0.1967  |
| 비교예 2 | 0.0303     | 0.4999  |
| 비교예 3 | 0.0804     | 3.7144  |
| 비교예 4 | 0.0264     | 검출되지 않음 |
| 비교예 5 | 검출되지 않음    | 검출되지 않음 |
| 비교예 6 | 0.0052     | 0.0054  |
| 비교예 7 | 0.0243     | 0.0286  |

[0113]

상기 표 2에 나타난 바와 같이, 에틸 아세테이트, 아세토나이트릴, n-헥산 및 디클로로메탄을 추출 용매로 사용하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 비교예 4 내지 7의 경우에는 로즈마리 산 및 카페인 산이 잘 녹지 않아 낮은 추출량을 나타내거나, 전혀 검출되지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0114]

반면, 물, 에탄올 및 메탄올을 추출 용매로 사용하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 비교예 1

내지 3의 경우에는 높은 추출량을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이는, 로즈마리 산 및 카페인 산의 구조는 많은 하이드록시기(-OH)를 가지고 있어 물이나 알코올에 잘 녹는 성질을 가지기 때문이다.

특히, 메탄올을 추출 용매로 사용하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 비교예 3의 경우에는 로즈마리 산의 추출량이 3.7144 mg/g으로 매우 높은 것을 확인할 수 있다.

<실험예 2> 추출 방법에 따른 로즈마리 산 및 카페인 산 추출 평가

잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하기 위한 최적의 추출 방법을 찾기 위하여, 상기 비교예 8 및 비교예 9에서 추출된 로즈마리 산 및 카페인 산의 양을 비교하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

| 구분    | 추출량 (mg/g) |        |
|-------|------------|--------|
|       | 카페인 산      | 로즈마리 산 |
| 비교예 3 | 0.0804     | 3.7144 |
| 비교예 8 | 0.0604     | 2.5728 |
| 비교예 9 | 0.0256     | 3.2118 |

상기 표 3에 나타난 바와 같이, 초음파 처리(Ultra sonic) 방법을 통해 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 비교예 8의 경우 로즈마리 산의 추출량은 2.5728 mg/g을 나타냈으며, 80 °C의 온도에서 환류(Reflux) 방법을 통해 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 비교예 9의 경우 로즈마리 산의 추출량은 3.2118 mg/g을 나타냈다. 이때, 디핑(Dipping) 방법을 통해 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 비교예 3의 경우에는 3.7144 mg/g으로 제일 높은 추출량을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

<실험예 3> 이온성 액체에 따른 로즈마리 산 및 카페인 산 추출 평가

잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하기 위해 첨가된 이온성 액체의 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1 내지 4에서 추출된 로즈마리 산 및 카페인 산의 양을 비교하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, 이온성 액체인 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 브로마이드(1-Butyl-3-methylimidazolium bromide, [BMIM][Br]), 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 클로라이드(1-Butyl-3-methylimidazolium chloride, [BMIM][Cl]), 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 헥사플루오로포스페이트(1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [BMIM][PF<sub>6</sub>]) 및 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 테트라플루오로보레이트(1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [BMIM][BF<sub>4</sub>])을 추출 용매에 첨가하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 실시예 1 내지 4의 경우 모두 이온성 액체의 첨가로 인해 추출량이 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

특히, 이온성 액체로 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 헥사플루오로포스페이트(1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [BMIM][PF<sub>6</sub>])를 첨가하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 실시예 3의 경우에는 카페인 산의 추출량이 높게 나타났으며, 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 테트라플루오로보레이트(1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [BMIM][BF<sub>4</sub>])를 첨가하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 실시예 4의 경우에는 로즈마리 산의 추출량이 우수한 것을 확인할 수 있다.

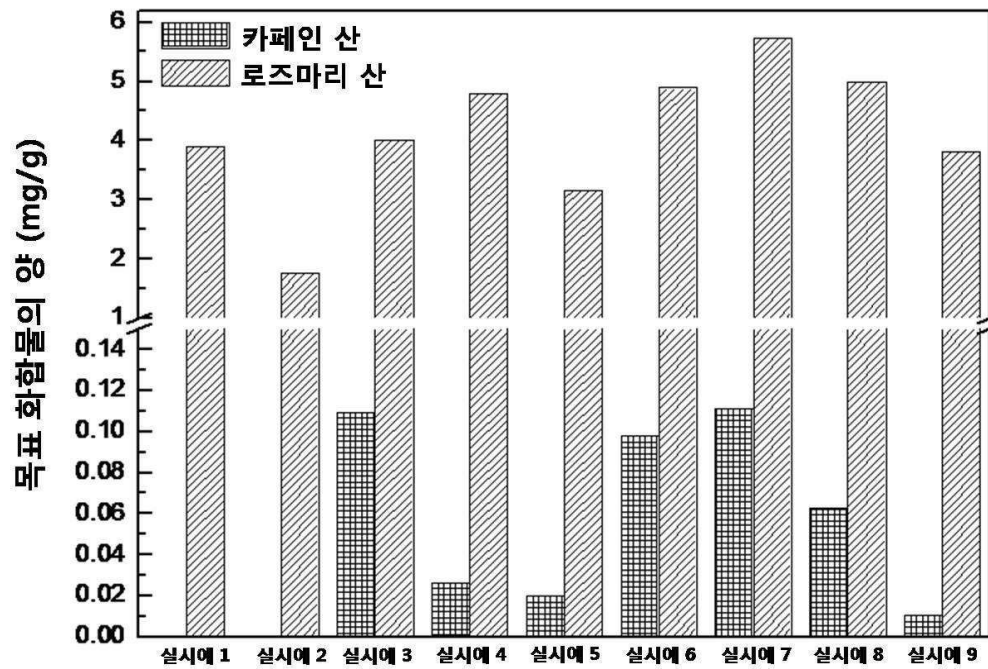
<실험예 4> 공용 용매에 따른 로즈마리 산 및 카페인 산 추출 평가

잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하기 위해 첨가된 공용 용매의 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 5 내지 9에서 추출된 로즈마리 산 및 카페인 산의 양을 비교하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

- [0126] 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 제조예 1 내지 5에서 제조된 공용 용매를 추출 용매에 첨가하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 실시예 5 내지 9의 경우 모두 공용 용매의 첨가로 인해 추출량이 향상되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0127] 특히, 공용 용매로써 염은 테트라메틸암모늄 클로라이드(Tetramethylammonium chloride,  $\text{Et}_4\text{NCl}$ )이고, 수소 결합 주개는 페놀(Phenol)인 제조예 3의 공용 용매를 첨가한 실시예 7의 경우에 가장 우수한 추출량을 확인할 수 있었다.
- [0128] <실험예 5> 공용 용매의 첨가량에 따른 로즈마리 산 및 카페인 산 추출 평가
- [0129] 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하기 위한 최적의 공용 용매 첨가량을 찾기 위하여, 상기 실시예 10 내지 17 및 비교예 3에서 추출된 로즈마리 산 및 카페인 산의 양을 비교하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0130] 도 2에 나타낸 바와 같이, 공용 용매의 첨가량을 0.05 내지 2.0 g 첨가하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 실시예 10 내지 17의 경우 모두 공용 용매를 첨가하지 않고 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 비교예 9의 경우보다 추출량이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 일정량 이상의 공용 용매가 첨가되면 추출 수율이 약간 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 공용 용매의 양이 일정량 이상 증가할 경우 점도가 증가하기 때문에 목표 화합물과 공용 용매의 상호작용을 방해할 수 있기 때문일 것이라고 생각된다.
- [0131] 나아가, 공용 용매를 0.5 g 첨가하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출한 실시예 14의 경우에 로즈마리 산 추출량이 매우 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [0132] 따라서, 본 발명에 따른 잘피질로부터 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출하는 방법은 이온성 액체 또는 공용 용매를 첨가제로 사용하여 잘피로부터 로즈마리 산 및 카페인 산의 추출조건을 최적화할 수 있으며, 로즈마리 산 및 카페인 산 추출공정에서 빠르고 많은 양의 로즈마리 산 및 카페인 산을 추출할 수 있다.

도면

도면1



도면2

