



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0073070
(43) 공개일자 2021년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 19/60 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 19/60 (2013.01)

C12P 7/62 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0163522

(22) 출원일자 2019년12월10일

심사청구일자 2019년12월10일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

박천석

경기도 남양주시 와부읍 덕소로116번길 49, 106동 1303호(현대홈타운아파트)

김대욱

경기도 용인시 수지구 수지로113번길 16, 103동 203호(성북동, 성동마을 강남빌리지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

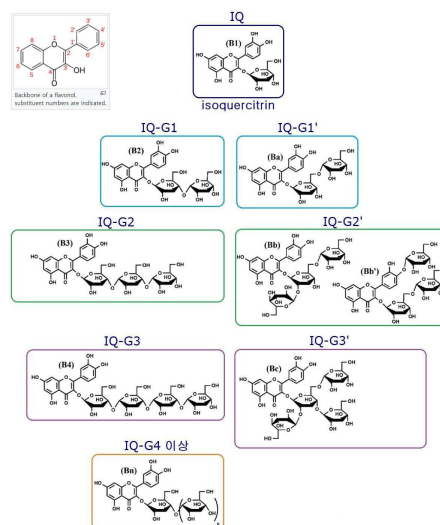
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법

(57) 요약

본 발명은 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법, 이를 이용하여 제조되는 신규한 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 물질에 관한 것으로, 본 발명에 따른 제조방법은 당 공여체로서 수크로즈의 농도, 반응 버퍼의 pH를 조절하여 원하는 이소(iso) 형태의 배당체를 제조할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

라찬수

경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로527번길 80,
117동 2202호(중동, 신동백롯데캐슬에코1단지)

정영성

광주광역시 서구 월드컵4강로112번길 10, 3동 502
호(화정동, 대륙아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

당 수용체(glucose acceptor)로서 하기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

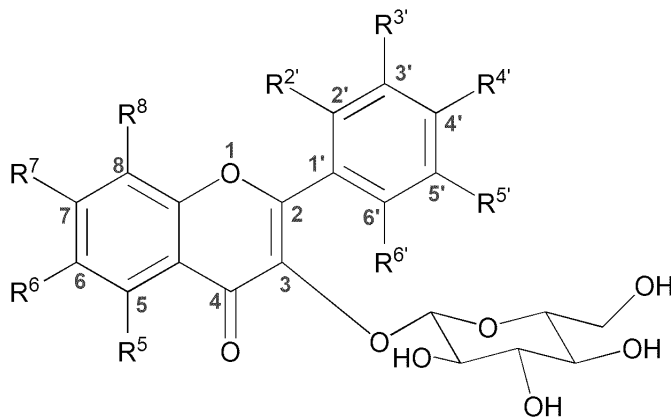
당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 50-1550 mM; 및

당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);

를 pH 3.0-9.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,

플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법;

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , $R^{2'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$, $R^{5'}$ 및 $R^{6'}$ 는 독립적으로 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체는,

3-하이드록시플라본(3-Hydroxyflavone), 아자리틴(Azaleatin), 피세틴(Fisetin), 갈란진(Galangin), 고시페틴(Gossypetin), 캄페라이드(Kaempferide), 캄페롤(Kaempferol), 이소람네티(Isorhamnetin), 모린(Morin), 미리세틴(Myricetin), 나추다이다인(Natsudaaidain), 파치포돌(Pachypodol), 퀘르세틴(Quercetin), 람나진(Rhamnazin) 및 람네티(Rhamnetin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 플라보놀류의 3번 위치 탄소에 연결된 산소원자에 글리코실기가 치환된 것을 특징으로 하는 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

당 수용체(glucose acceptor)로서 상기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 90-1510 mM; 및

pH 4.8-7.4의 버퍼를 사용하는 것을 특징으로 하는 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 버퍼는 시트레이트 포스페이트, 소듐 포스페이트 또는 Tris-HCl인 것을 특징으로 하는 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법.

청구항 5

당 수용체(glucose acceptor)로서 하기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

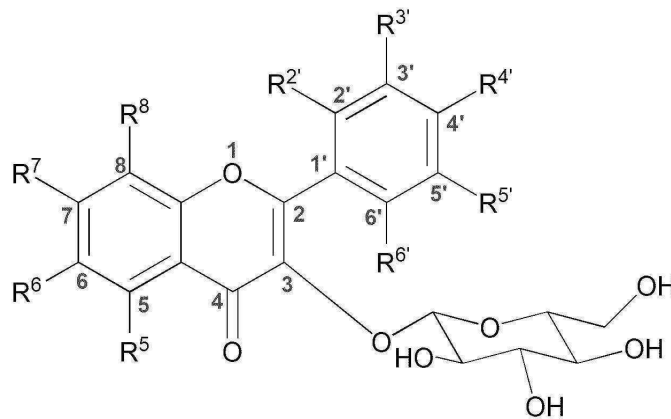
당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 1400-1600 mM; 및

당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);

를 pH 4.0-6.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,

플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체 제조방법:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , $R^{2'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$, $R^{5'}$ 및 $R^{6'}$ 는 독립적으로 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다).

청구항 6

제5항에 있어서,

당 수용체(glucose acceptor)로서 상기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 1450-1550 mM; 및

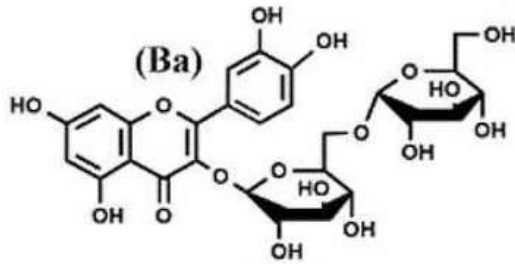
pH 4.8-5.2의 버퍼를 사용하는 것을 특징으로 하는 플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체는 하기 화학식 2의 화합물인 것을 특징으로 하는 플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체 제조방법:

[화학식 2]



청구항 8

당 수용체(glucose acceptor)로서 하기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

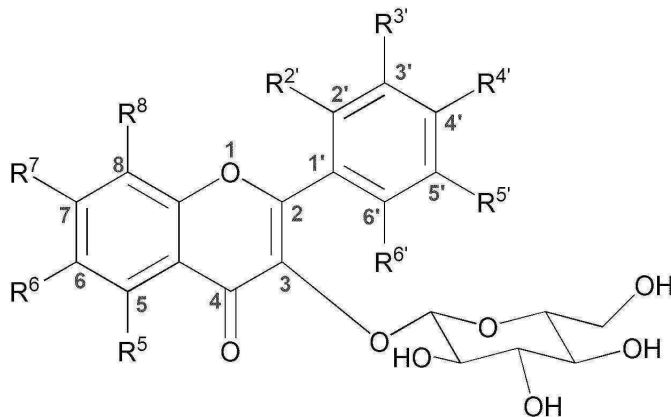
당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 90-110 mM; 및

당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);

를 pH 4.0-6.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,

플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체 제조방법;

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , $R^{2'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$, $R^{5'}$ 및 $R^{6'}$ 는 독립적으로 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다).

청구항 9

제8항에 있어서,

당 수용체(glucose acceptor)로서 상기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 95-105 mM; 및

pH 4.8-5.2의 버퍼를 사용하는 것을 특징으로 하는 플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체 제조방법.

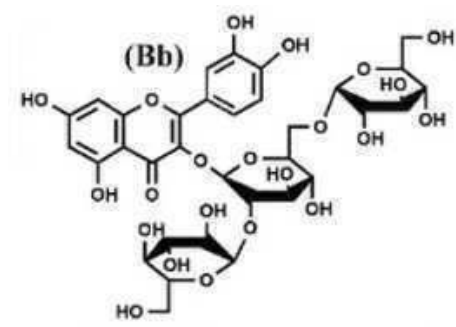
청구항 10

제8항에 있어서,

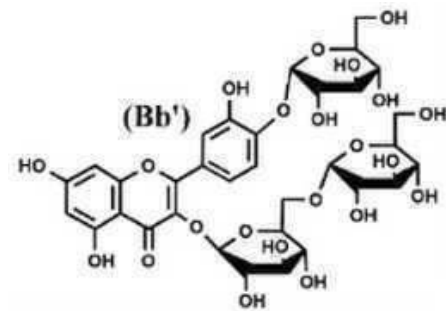
상기 플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체는 하기 화학식 3의 화합물 또는 화학식 4의 화합물인 것을 특징으

로 하는 플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체 제조방법:

[화학식 3]



[화학식 4]



청구항 11

당 수용체(glucose acceptor)로서 하기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

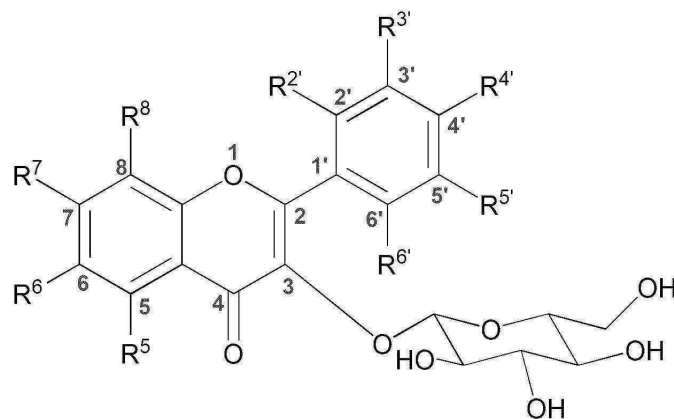
당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 90-110 mM; 및

당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);

를 pH 6.5-8.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,

플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체 제조방법:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , $R^{2'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$, $R^{5'}$ 및 $R^{6'}$ 는 독립적으로 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다).

청구항 12

제11항에 있어서,

당 수용체(glucose acceptor)로서 상기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 95-105 mM; 및

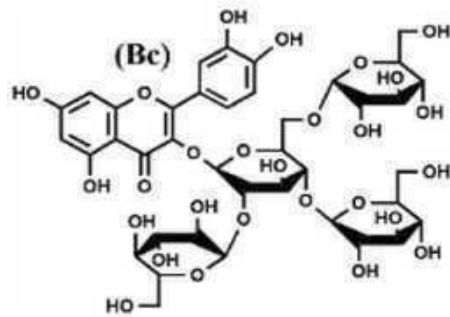
pH 7.0-7.4의 버퍼를 사용하는 것을 특징으로 하는 플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체는 하기 화학식 5로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체 제조방법:

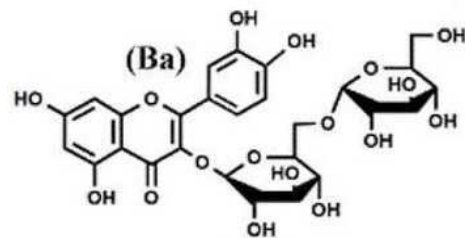
[화학식 5]



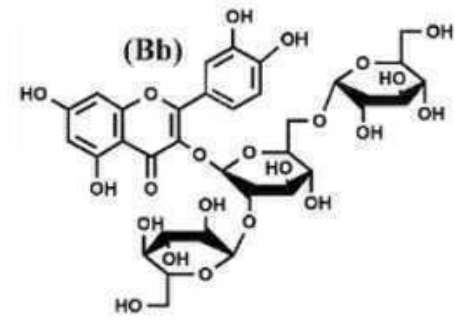
청구항 14

하기 화학식 2 내지 5로 표시되는 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 또는 이의 허용가능한 염:

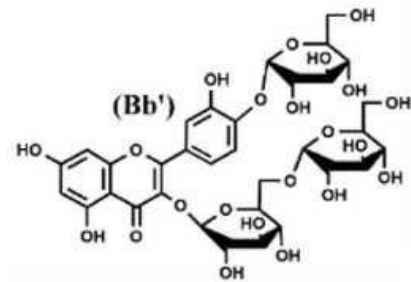
[화학식 2]



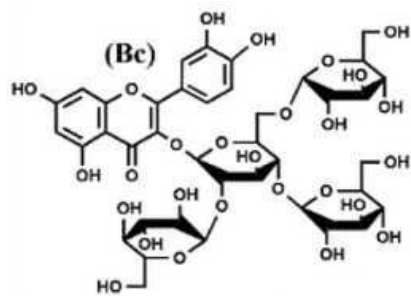
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



청구항 15

제14항에 있어서,

상기 화학식 2 내지 5로 표시되는 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체는 플라보놀-3-글리코시드의 선형 배당체 대비 소화안정성이 개선된 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 허용가능한 염.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 화학식 2 내지 5로 표시되는 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 또는 이의 허용가능한 염은 의약품, 식품 또는 화장품 원료로 사용되는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 허용가능한 염.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법, 이를 이용하여 제조되는 신규한 플라보놀-3-이소글리코

시드 배당체 물질에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 식물 유래의 여러 가지 파이토케미칼(phytochemical) 중에서, 플라보노이드(flavonoid)는 식품에 널리 분포하는 노란색 계통의 색소로, 페닐기 2개가 C3 사슬에 매개하여 C6-C3-C6형 탄소 골격구조로 되어 있으며, 이것이 여러 당류와 에테르 결합을 통해 배당체(glycoside)의 형태로 존재하는 경우가 많다. 플라보노이드는 항균, 항암, 항바이러스, 항알레르기 및 항염증 활성이 있고, 의학분야에서는 새로운 플라보노이드 물질이 추출됨에 따라 치료 대상 질환이 다양해져서 간질환, 당뇨병, 류마티스관절염, 각종 암, 진통, 바이러스성 질환, 알레르기성 질환, 동맥경화 등 혈관계 질환, 심근 관련 질환, 스트레스 및 우울증 등에 약리활성이 있다는 것이 알려지면서 물질의 개발 및 활용에 관한 관심이 커지고 있다.

[0005] 퀘르세틴(Quercetin)은 플라보노이드계 화합물들처럼 열에 대한 불안정성, 산화 조건에 대한 불안정성, 및 물에 대한 불용성 등의 문제점이 있으나, 퀘르세틴의 배당체는 이러한 문제가 감소하고 생물학적 이용성이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 식물체 내에서도 비배당체 형태보다는 글루코오스(glucose), 람노오스(rhamnose), 갈락토오스(galactose) 및 아라비노오스(arabinose) 등 여러 종류의 단일 또는 다수의 당과 결합된 배당체의 형태로 존재한다.

[0007] 본 발명자들은 플라보놀-3-글리코시드 유도체를 출발물질로하여 플라보놀-3-글리코시드 이소(iso) 형태의 배당체를 제조하는 방법에 관하여 연구하던 중, 당공여체(glucose donor)의 농도와 반응 버퍼의 pH를 조절하여 원하는 이소(iso) 형태의 배당체를 생산할 수 있을 알아냄과 동시에, 제조된 신규한 이소 형태의 배당체가 소화안정성이 현저히 향상됨을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2014-0000944호

발명의 내용

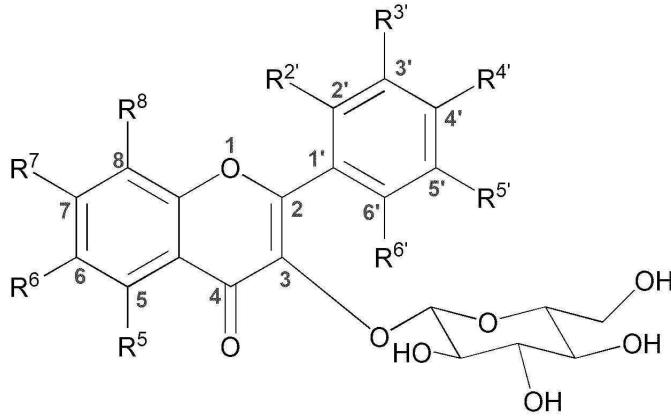
해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 플라보놀-3-이소테트라트리글리코시드 배당체 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0017] 본 발명은 당 수용체(glucose acceptor)로서 하기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;
- [0018] 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 50-1550 mM; 및

- [0019] 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);
- [0020] 를 pH 3.0-9.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,
- [0021] 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법을 제공한다.
- [0022] [화학식 1]



- [0023]
- [0024] (상기 화학식 1에서,
- [0025] R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , $R^{2'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$, $R^{5'}$ 및 $R^{6'}$ 는 독립적으로 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다).

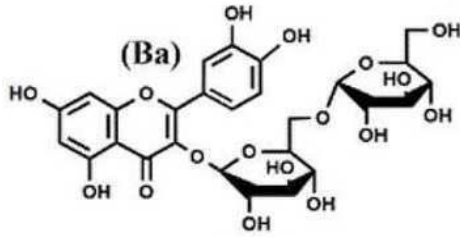
- [0027] 또한, 본 발명은 당 수용체(glucose acceptor)로서 상기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;
- [0028] 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 1400-1600 mM; 및
- [0029] 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);
- [0030] 를 pH 4.0-6.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,
- [0031] 플라보놀-3-이소다이하이드록시글리코시드 배당체 제조방법을 제공한다.

- [0033] 나아가, 본 발명은 당 수용체(glucose acceptor)로서 상기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;
- [0034] 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 90-110 mM; 및
- [0035] 당전이효소로서 아밀로수크레이즈;
- [0036] 를 pH 4.0-6.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,
- [0037] 플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체 제조방법을 제공한다.

- [0039] 또한, 당 수용체(glucose acceptor)로서 상기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;
- [0040] 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 90-110 mM; 및
- [0041] 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);
- [0042] 를 pH 6.5-8.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,
- [0043] 플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체 제조방법을 제공한다.

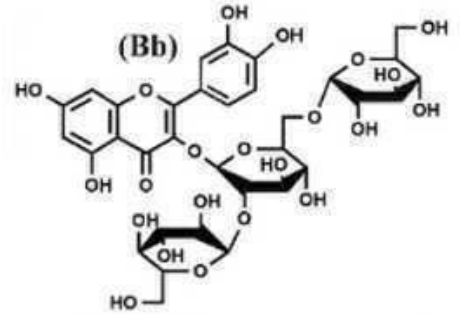
- [0045] 나아가, 본 발명은 하기 화학식 2 내지 5로 표시되는 신규한 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 또는 이의 허용 가능한 염을 제공한다.

[0046] [화학식 2]



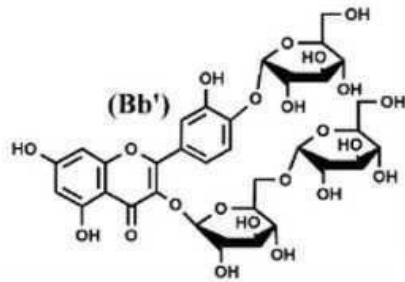
[0047]

[0048] [화학식 3]



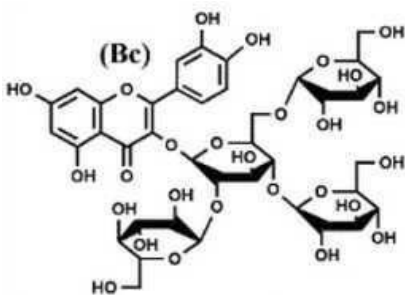
[0049]

[0050] [화학식 4]



[0051]

[0052] [화학식 5]



[0053]

발명의 효과

[0055] 본 발명에 따른 제조방법은 당 공여체로서 수크로즈의 농도와 반응 버퍼의 pH를 조절하여 원하는 이소(iso) 형태의 배당체를 제조할 수 있는 효과가 있다.

[0056] 또한, 본 발명의 제조방법으로 제조한 신규한 이소(iso) 형태의 배당체(도 1에서 IQ-G1' 내지 IQ-G3')는 종래 선형 배당체(도 1에서 IQ-G1 내지 IQ-G4 이상) 대비 소화안정성이 현저히 향상되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 반응조건으로 제조한 플라보놀-3-글루코시드 배당체들의 화학구조식을 나타낸 것으로서, IQ-G1 내지 IQ-G4는 종래기술로 제조한 선형 배당체이고, IQ-G1' 내지 IQ-G3'는 본 발명에 따른 제조방법으로 얻은 신규한 iso 형태의 배당체이다.

도 2는 표 1의 다양한 반응조건으로 제조한 플라보놀-3-글루코시드 배당체들을 크로마토그래피(UV 254 nm)로 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 신규 플라보놀-3-이소글루코시드 배당체(IQ-G2', IQ-G3')와 종래의 선형 배당체(IQ-G2)를 시험관 내 소화조건에 처리한 후 크로마토그램으로 흡광도를 측정하고 질량측정기로 분자량을 측정한 결과이다(분자량은 "[M-H]-xxx.xx"으로 표기하였음).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0061] 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법

[0062] 본 발명은 당 수용체(glucose acceptor)로서 하기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

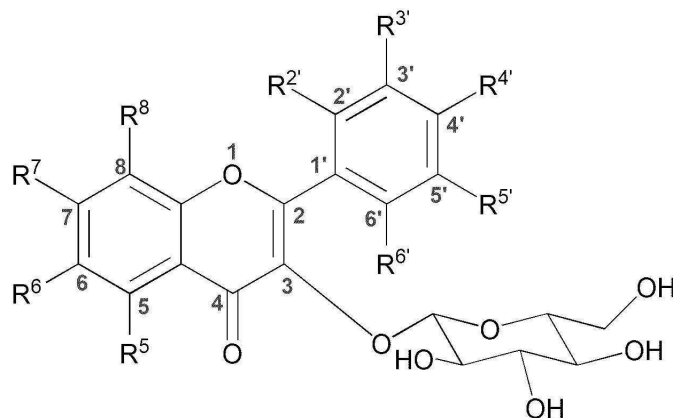
[0063] 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 50-1550 mM; 및

[0064] 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);

[0065] 를 pH 3.0-9.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,

[0066] 플라보놀-3-이소글리코시드 배당체 제조방법을 제공한다.

[0067] [화학식 1]



[0068]

[0069] (상기 화학식 1에서,

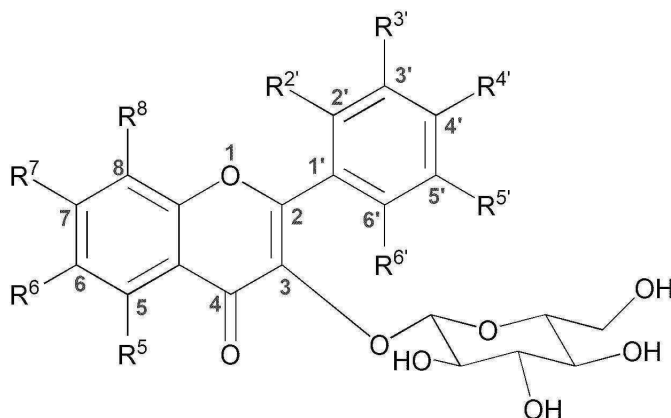
[0070] R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , $R^{2'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$, $R^{5'}$ 및 $R^{6'}$ 는 독립적으로 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다).

[0072] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체로는 3-하이드록시 플라본(3-Hydroxyflavone), 아자리틴(Azaleatin), 피세틴(Fisetin), 갈란진(Galangin), 고시페틴(Gossypetin), 캄페라이드(Kaempferide), 캄페롤(Kaempferol), 이소람네티(Isorhamnetin), 모린(Morin), 미리세틴(Myricetin), 나추다이다인(Natsudaaidain), 파치포돌(Pachypodol), 퀘르세틴(Quercetin), 람나진(Rhamnazin), 람네티(Rhamnetin) 등의 플라보놀류의 3번 위치 탄소에 연결된 산소원자에 글리코실기가 치환된 것이라면 모두 사용할 수 있다.

- [0074] 상기 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase)는 0.2-2.0 units/mL 농도로 사용할 수 있다.
- [0076] 본 발명에 따른 제조방법의 반응온도는 35-55℃, 바람직하게는 40-50℃, 특히 바람직하게는 45℃에서 실시할 수 있다.
- [0078] 바람직하게는, 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 90-1510 mM; 및 pH 4.8-7.4의 버퍼를 사용할 수 있다.
- [0079] 여기서, 상기 당 수용체의 농도는 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 10-1000 μM 농도로 사용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 50-400 μM, 더욱 더 바람직하게는 50-150 μM, 특히 바람직하게는 90-110 μM 사용할 수 있다. 또한, 상기 당 수용체는 과량 사용할 수도 있다. 본 출원인은 당 수용체의 농도를 달리 설정하여도 당 공여체의 농도와 pH 조건이 동일하다면, 당 수용체의 농도와는 관계 없이 원하는 이소 형태의 배당체를 제조할 수 있음을 실험을 통해 확인하였다.
- [0080] 즉, 본 발명의 기술적 특징은 당 공여체의 농도와 pH를 조절함으로써 원하는 이소(iso) 형태의 배당체를 제조할 수 있는 것이다.
- [0082] 상기 버퍼로는 시트레이트 포스페이트(CP), 소듐 포스페이트(SP), Tris-HCl(TH) 등을 사용할 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 제조방법은 당 공여체로서 수크로즈의 농도, 반응 버퍼의 pH를 조절하여 원하는 이소(iso) 형태의 배당체를 제조할 수 있는 효과가 있다(실험예 1 및 2 참조).

[0086] **플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체 제조방법 및 이에 의해 제조되는 신규한 배당체 1종**

- [0087] 본 발명은 당 수용체(glucose acceptor)로서 하기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;
- [0088] 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 1400-1600 mM; 및
- [0089] 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);
- [0090] 를 pH 4.0-6.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,
- [0091] 플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체 제조방법을 제공한다.
- [0092] [화학식 1]



- [0093]
- [0094] (상기 화학식 1에서,
- [0095] $R^5, R^6, R^7, R^8, R^{2'}, R^{3'}, R^{4'}, R^{5'}$ 및 $R^{6'}$ 는 독립적으로 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다).

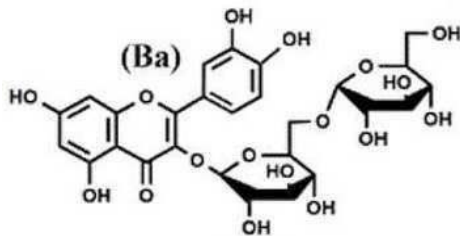
[0097] 바람직하게는, 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 1450-1550 mM; 및 pH 4.8-5.2의 버퍼를 사용할 수 있다.

[0099] 상기 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase)는 0.2-2.0 units/mL 농도로 사용할 수 있다.

[0101] 본 발명에 따른 제조방법의 반응온도는 35-55℃, 바람직하게는 40-50℃, 특히 바람직하게는 45℃에서 실시할 수 있다.

[0103] 상기 당 공여체 농도 및 버퍼의 pH를 조절함에 따라서, 플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체를 제조할 수 있다(실험예 1 및 2 참조). 본 발명에 따른 플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체의 제조방법으로 제조된 신규한 배당체 1종을 하기 화학식 2에 나타내었다.

[0104] [화학식 2]



[0105]

[0107] 본 발명의 제조방법으로 제조한 신규한 이소(iso) 형태의 배당체(도 1에서 IQ-G1': 화합물 Ba)는 종래 선형 배당체(도 1에서 IQ-G1 내지 IQ-G4 이상) 대비 소화안정성이 현저히 향상되는 효과가 있다. 상기 화학식 2로 표시되는 플라보놀-3-이소다이글리코시드 배당체 또는 이의 허용가능한 염은 의약품, 식품 또는 화장품 원료로 사용할 수 있다.

[0109] **플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체 제조방법 및 이에 의해 제조되는 신규한 배당체 2종**

[0110] 본 발명은 당 수용체(glucose acceptor)로서 하기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

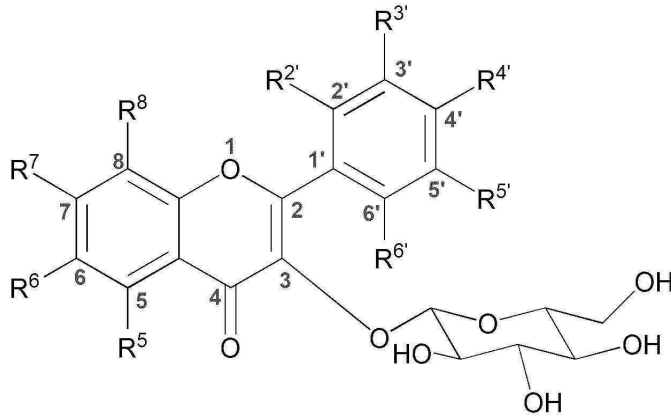
[0111] 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 90-110 mM; 및

[0112] 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);

[0113] 를 pH 4.0-6.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,

[0114] 플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체 제조방법을 제공한다.

[0115] [화학식 1]



[0116]

[0117] (상기 화학식 1에서,

[0118] R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , $R^{2'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$, $R^{5'}$ 및 $R^{6'}$ 는 독립적으로 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다).

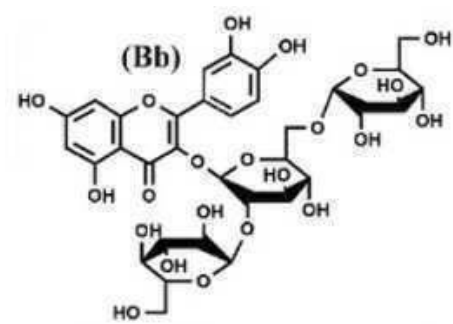
[0120] 바람직하게는, 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 95-105 mM; 및 pH 4.9-5.1의 버퍼를 사용할 수 있다.

[0122] 상기 당전이효소로서 아밀로스크레이즈(amylosucrase)는 0.2-2.0 units/mL 농도로 사용할 수 있다.

[0124] 본 발명에 따른 제조방법의 반응온도는 35-55℃, 바람직하게는 40-50℃, 특히 바람직하게는 45℃에서 실시할 수 있다.

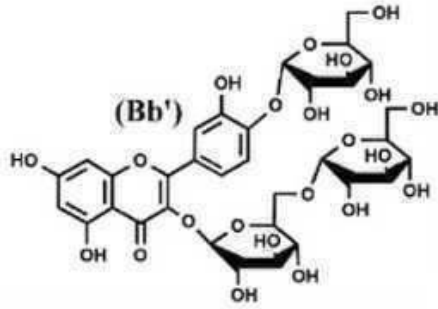
[0126] 상기 당 공여체 농도 및 버퍼의 pH를 조절함에 따라서, 플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체를 제조할 수 있다(실험예 1 및 2 참조). 본 발명에 따른 플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체의 제조방법으로 제조된 신규한 배당체 2종을 하기 화학식 3 및 화학식 4에 나타내었다.

[0127] [화학식 3]



[0128]

[0129] [화학식 4]



[0130]

[0132] 본 발명의 제조방법으로 제조한 신규한 이소(ISO) 형태의 배당체(도 1에서 IQ-G2': 화합물 Bb, 화합물 Bb')는 종래 선형 배당체(도 1에서 IQ-G1 내지 IQ-G4 이상) 대비 소화안정성이 현저히 향상되는 효과가 있다(실험예 4 참조). 상기 화학식 3 또는 4로 표시되는 플라보놀-3-이소트리글리코시드 배당체 또는 이의 허용가능한 염은 의약품, 식품 또는 화장품 원료로 사용할 수 있다.

[0134] **플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체 제조방법 및 이에 의해 제조되는 신규한 배당체 1종**

[0135] 본 발명은 당 수용체(glucose acceptor)로서 하기 화학식 1로 표시되는 플라보놀-3-글리코시드 유도체;

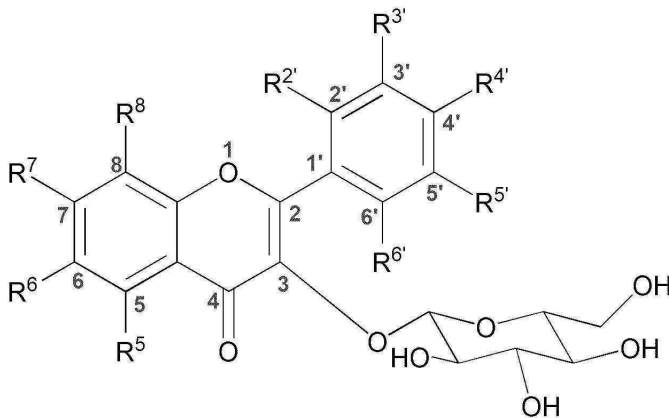
[0136] 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 90-110 mM; 및

[0137] 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase);

[0138] 를 pH 6.5-8.0의 버퍼에 첨가하고 반응시키는 단계를 포함하는,

[0139] 플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체 제조방법을 제공한다.

[0140] [화학식 1]



[0141]

[0142] (상기 화학식 1에서,

[0143] R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , $R^{2'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$, $R^{5'}$ 및 $R^{6'}$ 는 독립적으로 수소, 하이드록시 또는 메톡시이다).

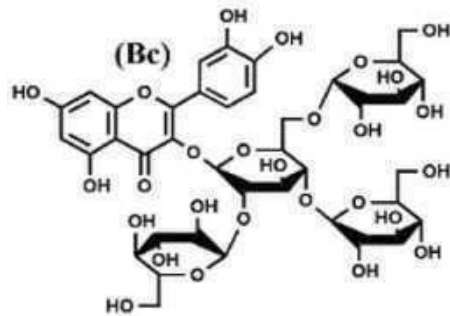
[0145] 바람직하게는, 당 공여체(glucose donor)로서 수크로즈 95-105 mM; 및 pH 7.1-7.3의 버퍼를 사용할 수 있다.

[0147] 상기 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(amylosucrase)는 0.2-2.0 units/mL 농도로 사용할 수 있다.

[0149] 본 발명에 따른 제조방법의 반응온도는 35-55℃, 바람직하게는 40-50℃, 특히 바람직하게는 45℃에서 실시할 수 있다.

[0151] 상기 당 공여체 농도 및 버퍼의 pH를 조절함에 따라서, 플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체를 제조할 수 있다(실험예 1 및 2 참조). 본 발명에 따른 플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체의 제조방법으로 제조된 신규한 배당체 1종을 하기 화학식 5에 나타내었다.

[0152] [화학식 5]



[0153]

[0155] 본 발명의 제조방법으로 제조한 신규한 이소(iso) 형태의 배당체(도 1에서 IQ-G3': 화합물 Bc)는 종래 선형 배당체(도 1에서 IQ-G1 내지 IQ-G4 이상) 대비 소화안정성이 현저히 향상되는 효과가 있다(실험예 4 참조). 상기 화학식 5로 표시되는 플라보놀-3-이소테트라글리코시드 배당체 또는 이의 허용가능한 염은 의약품, 식품 또는 화장품 원료로 사용할 수 있다.

[0157] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0159] <실험예 1> 반응조건에 따른 다양한 플라보놀-3-글루코시드 배당체 제조의 확인

[0160] 다양한 플라보놀-3-글루코시드를 출발물질로 하여, 당전이효소로서 아밀로수크레이즈(Amylosucrase)를 이용하여 배당체를 제조함에 있어서, 수크로즈(glucose donor)의 농도와 반응버퍼의 pH가 배당체의 위치 선택성에 중요한 인자임을 알아보기 위하여, 하기 표 1의 다양한 반응조건에서 플라보놀-3-글루코시드 배당체를 제조하였다. 여기서, 상기 '위치 선택성'은 플라보놀-3-글루코시드의 여러 자유 -OH 작용기에 도입되는 글루코스(수크로즈 유래)의 위치를 의미한다.

[0162] 출발물질(glucose acceptor): 이소퀘르시트린(Isoquercitrin, IQ)

[0163] Glucose donor: 수크로즈(sucrose)

[0164] 당전이효소: 아밀로수크레이즈(Amylosucrase)

[0165] 반응버퍼: 시트레이트 포스페이트(CP), 소듐 포스페이트(SP) 또는 Tris-HCl(TH)

[0166] 반응온도: 45℃

[0167] 반응시간: 10 min ~ 24 h

표 1

	출발물질 IQ 농도 (glucose acceptor)	수크로즈 농도 (glucose donor)	당전이효소	반응버퍼 및 pH	반응시간
실시예 A1	100 μM	100 mM	아밀로수크레이즈 1.0 units/mL	CP, pH 5.0	24 h
실시예 A2				SP, pH 6.0	
실시예 A3				TH, pH 7.2	
실시예 A4				TH, pH 8.0	
실시예 B1	100 μM	1500 mM		CP, pH 5.0	24 h
실시예 B2				SP, pH 6.0	
실시예 B3				TH, pH 7.2	
실시예 B4				TH, pH 8.0	
실시예 C1	400 μM	500 mM		CP, pH 5.0	2 h
실시예 C2				CP, pH 7.0	
실시예 C3				SP, pH 7.0	
실시예 C4				TH, pH 7.2	
실시예 D1	400 μM	500 mM		CP, pH 5.0	10 min
실시예 D2				CP, pH 7.0	
실시예 D3				SP, pH 7.0	
실시예 D4				TH, pH 7.2	

상기 표 1의 반응조건으로 제조한 플라보놀-3-글루코시드 배당체들을 크로마토그래피(UV 254 nm)로 확인한 결과를 도 2에 나타내었다.

도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 반응조건으로 제조한 플라보놀-3-글루코시드 배당체들의 화학구조식을 나타낸 것으로서, IQ-G1 내지 IQ-G4는 종래기술로 제조한 선형 배당체이고, IQ-G1' 내지 IQ-G3'는 본 발명에 따른 제조방법으로 얻은 신규한 iso 형태의 배당체이다.

도 2는 표 1의 다양한 반응조건으로 제조한 플라보놀-3-글루코시드 배당체들을 크로마토그래피(UV 254 nm)로 확인한 결과이다.

도 2에 나타난 바와 같이, 반응조건에 따라서 다양한 플라보놀-3-글루코시드 배당체들이 제조됨을 확인할 수 있었다. 아울러, 본 실험에 1을 통해서 IQ를 출발물질로 하여 수율을 극대화하는 반응시간은 24시간이 필요함을 확인할 수 있었다.

한편, 본 실험에 1에서는 출발물질(당 수용체)로 다양한 플라보놀-3-글루코시드의 일례로서 '이소퀘르시트린(IQ)'을 사용하였으나, 다른 플라보놀-3-글루코시드 역시 출발물질로서 사용할 수 있고, 본 실험에서 사용한 반응조건별 위치 선택성과 동일한 결과를 나타낸다. 즉, 출발물질(다양한 플라보놀-3-글루코시드)의 종류는 달라도 상기 반응조건과 동일하게 실시할 경우 글루코스가 도입되는 위치 선택성은 동일하게 나타난다.

<실험예 2> 신규 플라보놀-3-글루코시드 배당체 제조를 위한 최적의 반응조건 검증

신규 플라보놀-3-글루코시드 배당체 제조를 위한 최적의 반응 조건을 도출하기 위해서, 반응온도, 반응시간 및 당전이효소의 농도는 고정하고 하기 표 2의 반응조건으로 신규 플라보놀-3-이소글루코시드 배당체로서, 도 1에 나타낸 iso 형태 배당체의 IQ-G1', IQ-G2' 및 IQ-G3'를 제조하였다.

- [0183] 반응온도: 45℃
- [0184] 반응시간: 24 h
- [0185] 당전이효소: 아밀로수크레이즈 1.0 units/mL

표 2

Purpose	Buffer	Glucose acceptor(μ M) and donor(mM)	pH	Estimated (%)	Actuals (%)	Paired t-test
Max IQ-G1'	CP	a100 d1500	5	55.58	51.05 $\pm$ 1.49	0.094
	SP	a100 d1500	6	48.45	41.47 $\pm$ 0.28	0.005
	TH	a100 d1500	7.2	5.21	4.96 $\pm$ 0.08	0.08
Max IQ-G2'	CP	a100 d100	5	22.27	24.24 $\pm$ 0.10	0.003
	SP	a100 d100	6	19.68	17.90 $\pm$ 0.17	0.001
	TH	a100 d100	7.2	9.92	9.52 $\pm$ 0.08	0.04
Max IQ-G3'	CP	a100 d100	6	22.26	27.30 $\pm$ 0.42	0.007
	SP	a277 d100	6	24.01	25.62 $\pm$ 0.12	0.001
	TH	a100 d100	7.2	34.83	29.47 $\pm$ 0.78	0.021
Min IQ	CP	a100 d100	5	16.85	17.14 $\pm$ 0.17	0.22
	SP	a100 d100	6	14.28	17.06 $\pm$ 0.22	0
	TH	a100 d100	7.2	4.48	9.65 $\pm$ 0.18	0.001

[0186]

- [0187] 상기 표 2에서,
- [0188] 'Max'는 목적 화합물을 가장 우수한 효율로 제조하기 위한 목적을 의미하고,
- [0189] 'Min'은 목적 화합물을 가장 낮은 효율로 제조하기 위한 목적을 의미하며,
- [0190] 'CP'는 시트레이트 포스페이트이고,
- [0191] 'SP'는 소듐 포스페이트이며,
- [0192] 'TH'는 Tris-HCl이고,
- [0193] 당 수용체(Glucose acceptor)는 이소퀘르시트린(IQ)이며,
- [0194] 당 공여체(Glucose donor)는 수크로즈이다.

- [0196] 표 2에 나타난 바와 같이, 신규 플라보놀-3-이소글루코시드 배당체로서 도 1에 나타낸,
- [0197] IQ-G1'(화합물 Ba)는 Glucose donor(수크로즈) 농도 1500 mM, pH 5에서 가장 높은 효율로 제조되고,
- [0198] IQ-G2'(화합물 Bb, Bb')는 Glucose donor(수크로즈) 농도 100 mM, pH 5에서 가장 높은 효율로 제조되고,
- [0199] IQ-G3'(화합물 Bc)는 Glucose donor(수크로즈) 농도 100 mM, pH 7.2에서 가장 높은 효율로 제조되는 것을 확인하였다.

[0201] <실험예 3> 신규 플라보놀-3-이소글루코시드 배당체의 화학구조 동정

- [0202] 본 발명에 따른 제조방법으로 제조한 신규한 화학식 2(화합물 Ba), 화학식 3(화합물 Bb), 화학식 4(화합물 Bb') 및 화학식 5(화합물 Bc)로 표시한 플라보놀-3-이소글루코시드 배당체의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 데이터를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

No.	화학식 2 ^a		화학식 3 ^a		화학식 4 ^a		화학식 5 ^b	
	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C
2	-	156.4	-	156.0	-	155.4	-	157.4
3	-	133.2	-	133.0	-	133.7	-	134.9
4	-	177.4	-	177.3	-	177.3	-	178.6
5	-	156.5	-	156.3	-	156.4	-	157.5
6	6.38, d, 1.2	93.6	6.39, br. s	93.4	6.44, d, 1.2	93.9	6.66, d, 3.6	94.5
7	-	164.1	-	164.2	-	164.8	-	165.8
8	6.18, d, 1.2	98.7	6.19, br. s	99.4	6.18, d, 1.2	98.3	6.62, d, 3.6	99.7
9	-	161.2	-	161.2	-	161.1	-	162.7
10	-	104.0	-	103.8	-	104.0	-	105.1
1'	-	121.0	-	121.0	-	124.9	-	122.2
2'	7.52, d, 1.8	116.0	7.58, d, 1.8	116.1	7.65, d, 1.8	116.8	8.39, d, 2.4	117.8
3'	-	144.7	-	144.8	-	146.6	-	146.7
4'	-	148.5	-	148.5	-	147.2	-	149.3
5'	6.86, d, 8.4	115.4	6.85, d, 8.4	115.2	7.31, d, 8.4	116.5	7.25, d, 9.0	116.2
6'	7.57, dd, 8.4, 1.8	121.7	7.55, dd, 8.4, 1.8	121.4	7.59, dd, 8.4, 1.8	121.1	8.01, dd, 9.0, 2.4	122.5
1''	5.40, d, 7.2	101.0	5.55, d, 7.2	100.3	5.50, d, 7.2	100.7	6.17, d, 7.8	104.0
2''	3.30, overlapped	73.9	3.31, overlapped	81.1	3.24, overlapped	74.0	3.90, overlapped	82.9
3''	3.27, overlapped	76.4	3.24, overlapped	76.3	3.08, overlapped	77.6	4.37, overlapped	77.6
4''	3.27, overlapped	69.8	3.03, overlapped	70.2	3.26, overlapped	70.1	4.22, overlapped	80.9
5''	3.26, overlapped	75.6	3.48, overlapped	76.1	3.23, overlapped	76.4	3.89, overlapped	77.3
6''	3.60, dd, 11.4, 4.2	66.2	3.62, overlapped	66.9	3.74, overlapped	65.9	4.41, overlapped	68.8
	3.52, br. d, 11.4		3.50, overlapped		3.55, overlapped			
1'''	4.55, d, 3.6	98.4	4.60, d, 3.6	98.7	4.65, d, 3.6	98.2	5.40, br. s	100.5
2'''	3.28, overlapped	71.9	3.11, overlapped	71.8	3.19, overlapped	71.9	4.29, overlapped	73.6
3'''	3.29, overlapped	73.2	3.38, overlapped	73.3	3.27, overlapped	73.2	4.69, overlapped	75.3
4'''	2.99, overlapped	69.7	3.02, overlapped	70.0	3.13, overlapped	70.0	4.23, overlapped	72.1
5'''	3.04, overlapped	72.3	3.25, overlapped	72.0	3.20, overlapped	72.0	4.55, overlapped	74.0
6'''	3.38, dd, 11.4, 1.8	60.5	3.43, overlapped	60.8	3.48, overlapped	60.9	4.27, overlapped	61.6
	3.31, overlapped		3.42, overlapped		3.32, overlapped		4.24, overlapped	
1''''	-	-	4.94, d, 3.6	101.5	5.33, d, 3.6	99.9	5.65, br. s	103.5
2''''	-	-	3.12, overlapped	71.7	3.37, overlapped	71.8	4.65, overlapped	73.3
3''''	-	-	3.37, overlapped	73.1	3.50, overlapped	73.1	4.47, overlapped	75.3
4''''	-	-	3.01, overlapped	70.0	3.09, overlapped	69.9	4.22, overlapped	72.1
5''''	-	-	3.26, overlapped	72.3	3.73, overlapped	72.4	4.10, overlapped	74.0
6''''	-	-	3.85, overlapped	60.8	3.59, overlapped	60.8	4.47, overlapped	62.7
	-	-	3.56, overlapped		3.38, overlapped		4.36, overlapped	
1'''''	-	-	-	-	-	-	5.72, br. s	102.4
2'''''	-	-	-	-	-	-	4.05, overlapped	73.7
3'''''	-	-	-	-	-	-	4.23, overlapped	75.5
4'''''	-	-	-	-	-	-	3.90, overlapped	72.3
5'''''	-	-	-	-	-	-	4.56, overlapped	74.2
6'''''	-	-	-	-	-	-	4.56, overlapped	62.1
	-	-	-	-	-	-	4.18, overlapped	

¹H- and ¹³C-NMR data of compounds in DMSO-d₆ [δ_H (600 MHz), δ_C (150 MHz) in ppm, coupling pattern, J in Hz]

^aData was measured in DMSO-d₆;

^bData was measured in pyridine-d₅

[0203]

[0205] <실험예 4> 신규 플라보놀-3-이소글루코시드 배당체의 소화안정성 평가

[0206] 신규 플라보놀-3-이소글루코시드 배당체(IQ-G2', IQ-G3')와 종래의 선형 배당체(IQ-G2)의 소화안정성을 비교 평가하였다.

[0207] 구체적으로, 시험관 내 소화조건에서 각 샘플을 처리한 후에 이소퀘르시트린-3-글루코시드의 크로마토그램을 254nm에서 흡광도를 측정하였고, 질량측정기(QDa™)를 사용하여 분자량을 측정하였고, 이를 도 3에 나타내었다.

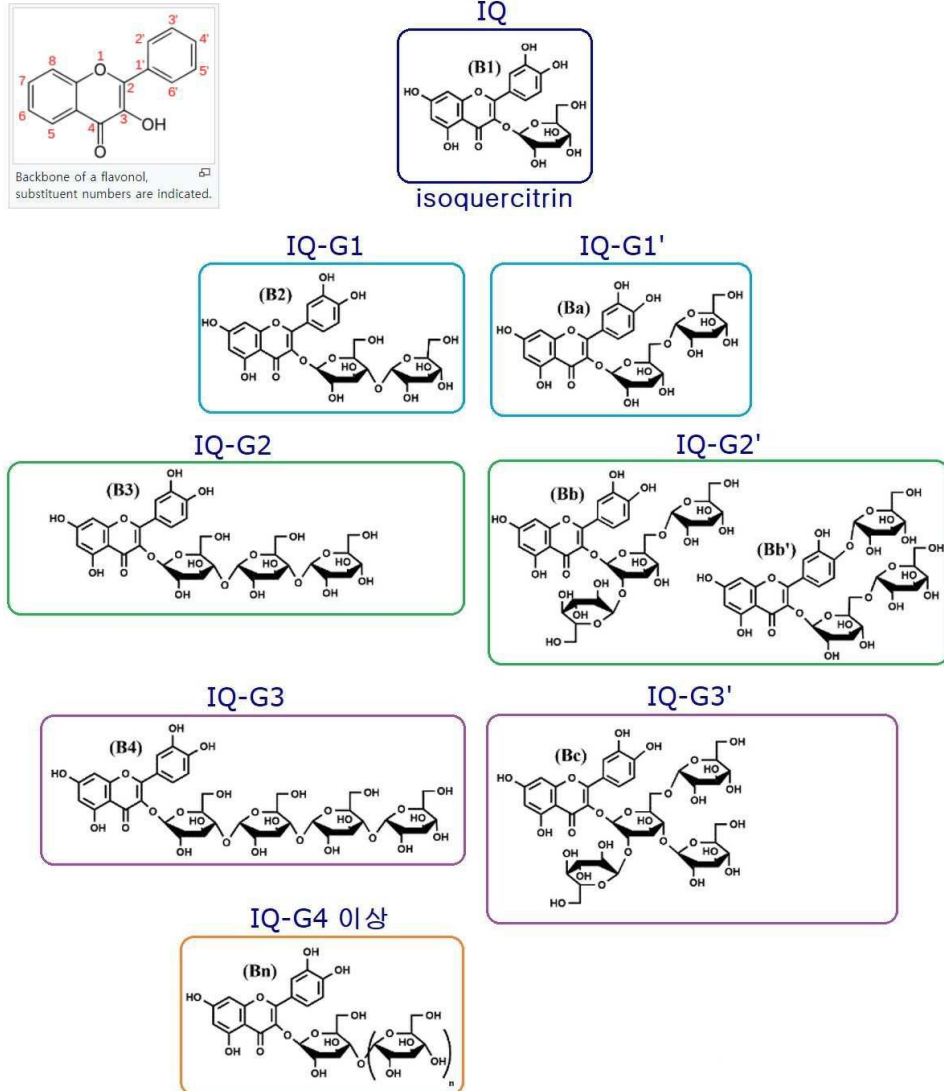
[0209] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 신규 플라보놀-3-이소글루코시드 배당체(IQ-G2', IQ-G3')와 종래의 선형 배당체(IQ-G2)를 시험관 내 소화조건에 처리한 후 크로마토그램으로 흡광도를 측정하고 질량측정기로 분자량을 측정한 결과이다(분자량은 "[M-H]-xxx.xx"으로 표기하였음).

[0211] 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 신규 플라보놀-3-이소글루코시드 배당체(IQ-G2', IQ-G3')의 경우 소화조건에서도 분해되지 않고 그대로 유지되어 소화안정성이 우수한 반면에, 종래의 선형 배당체(IQ-G2)의 경우

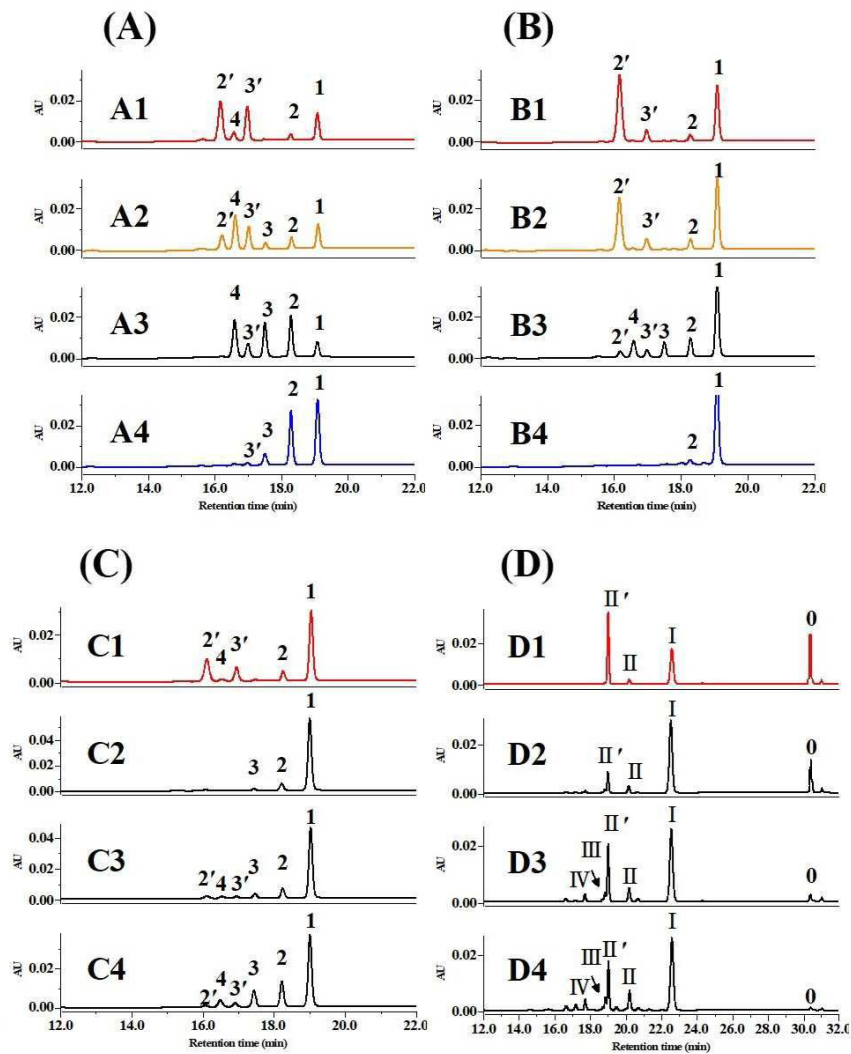
판크레아틴 소화조건에서 분해되어 소화안정성이 낮은 것으로 확인되었다.

도면

도면1



도면2



1, IQ (isoquercitrin);

2, IQ-G1 (isoquercitrin monoglucoside); and

2', IQ-G1' (isoquercitrin monoglucoside);

3, IQ-G2 (isoquercitrin diglucoside);

3', IQ-G2' (isoquercitrin diglucoside); and

4, IQ-G3' (isoquercitrin triglucoside);

0, quercetin;

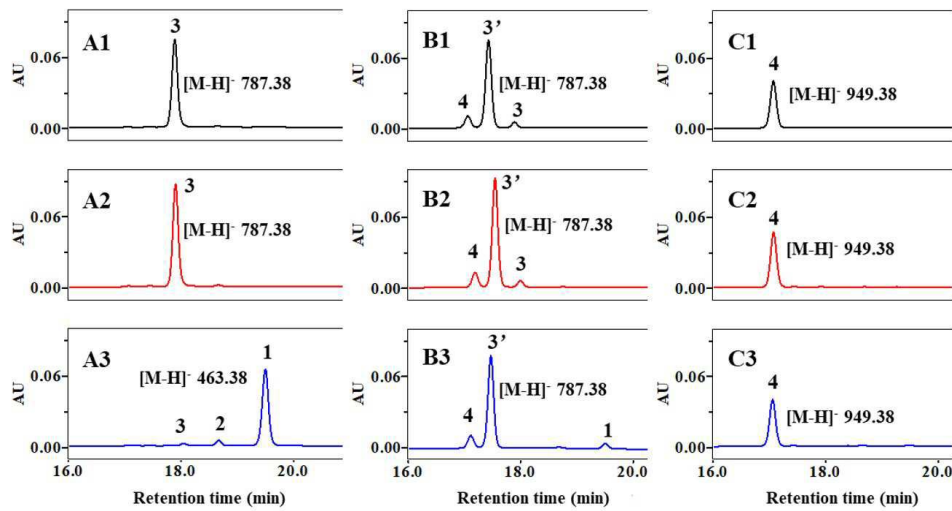
I, quercetin monoglucoside;

II, quercetin diglucoside;

III, quercetin triglucoside;

IV, quercetin tetraglucoside.

도면3



- (A1) Control digestive condition with IQ-G2, (C1) Control digestive condition with IQ-G3',
 (A2) Gastric digestive condition with IQ-G2, (C2) Gastric digestive condition with IQ-G3',
 (A3) Pancreatin digestive condition with IQ-G2, (C3) Pancreatin digestive condition with IQ-G3',
 (B1) Control digestive condition with IQ-G2',
 (B2) Gastric digestive condition with IQ-G2',
 (B3) Pancreatin digestive condition with IQ-G2',