

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2021년 1월 28일 (28.01.2021)



(10) 국제공개번호

WO 2021/015583 A2

(51) 국제특허분류:

A01H 3/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/009766

(22) 국제출원일:

2020년 7월 24일 (24.07.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0090238 2019년 7월 25일 (25.07.2019) KR

(71) 출원인: 경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: 박기훈 (PARK, Ki Hun); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 반영준 (BAN, Yeong Jun); 52828 경상남도 진주시 진주

대로 501, Gyeongsangnam-do (KR). 송영훈 (SONG, Yeong Hun); 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

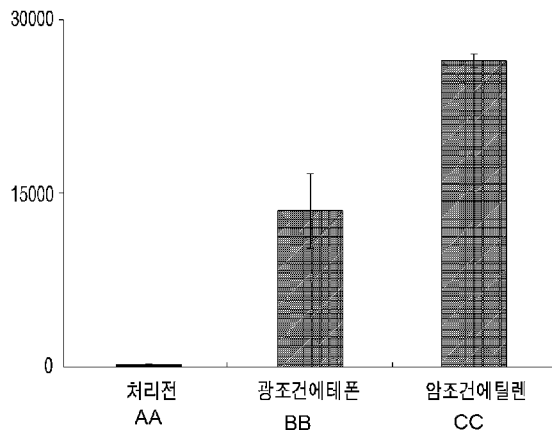
(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: METHOD FOR PREPARATION OF SOYBEAN LEAF HAVING HIGH CONTENT OF ISOFLAVONE DERIVATIVE IN DARK CONDITION AND SOYBEAN LEAF HAVING HIGH CONTENT OF ISOFLAVONE DERIVATIVE PREPARED THEREBY

(54) 발명의 명칭: 암조건에서 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎



AA ... Before treatment
BB ... Ethephon in light condition
CC ... Ethylene in dark condition

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparation of soybean leaves having a high content of an isoflavone derivative in a dark condition and soybean leaves having a high content of an isoflavone derivative prepared thereby. Specifically, treatment of a soybean plant 20 days to 60 days after seeding with a predetermined concentration of ethylene in a dark condition was found to accumulate higher concentrations of isoflavone derivatives in soybean leaves than treatment with ethephon in a light condition, which requires a high level of energy. Therefore, when used, the method of the present invention can economically and quickly prepare soybean leaves having a very high content of isoflavones, and the soybean leaves having a high content of isoflavone derivatives, an extract of the soybean leaves, and a fraction of the extract can be advantageously used as a food and medicine material against diseases caused by estrogen unbalance and deficient antioxidant activity.

(57) 요약서: 본 발명은 암조건(dark condition)에서 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎에 관한 것이다. 구체적으로, 암조건에서 파종 후 20일 내지 60일 경과한 콩 식물체(soybean plant)에 일정 농도의 에틸렌을 처리하면 높은 수준의 에너지가 요구되는 광조건에서 에테폰을 처리한 경우보다, 이소플라본 유도체가 콩잎에 높은 농도로 축적됨을 확인하였다. 따라서 본 발명의 방법을 이용할 경우 이소플라본이 매우 높게 함유된 콩잎을 경제적이고 빠르게 제조할 수 있고, 이소플라본 유도체를 고함량으로 함유하는 콩잎, 콩잎의 추출물, 추출분획물은 에스트로겐 불균형 및 항산화능 결핍에서 유발되는 질환용 식품 및 의약소재로 유용하게 사용될 수 있다.



LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 암조건에서 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎 기술분야

- [1] 본 발명은 암조건(dark condition)에서 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 용도 및 콩잎으로부터 이소플라본 유도체의 대량 생산 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 여성호르몬인 에스트로젠은 40대 이후 줄어들기 시작하여 궁극적으로 갱년기를 유발한다. 에스트로젠이 줄어들면 이 호르몬의 작용점인 뼈, 심장, 피부, 뇌 등에 노화가 시작된다. 이러한 노화 진행을 억제하기 위해 에스트로젠 대체제가 절실히 요구되며 구조적인 유사성을 갖는 이소플라본 유도체가 효과적인 에스트로젠 대체제로 보고되고 있다.
- [4] 이소플라본 유도체는 약리학적 효능이 뛰어난 대표적인 플라보노이드(flavonoid)로서 전세계적으로 이들이 고함유된 기능성 식물개발에 많은 자본이 투자되고 있는 실정이다. 이소플라본은 비스테로이드 에스트로젠(nonsteroid estrogen)으로 화학적 및 생리학적 특성이 에스트로젠과 유사하여 식물성 에스트로젠이라 불리며 경쟁적으로 에스트로젠 수용체와 결합함으로써 에스트로젠 또는 항 에스트로젠 작용을 하는 물질이다(Hudson, 2001). 이들은 여성호르몬인 에스트로젠과 구조가 유사하여 에스트로젠에서 나타나는 유용한 생리활성을 보여준다. 이소플라본을 섭취하면, 여성의 내분비 상태를 조절하고 난소의 주기성에 영향을 미친다고 알려져 있다(Kenneth, Setchell, & Cassidy, 1999). 특히 여성호르몬이 부족하여 나타날 수 있는 갱년기 증세 중 하나인 골다공증의 위험을 감소시키고, 혈장 내 콜레스테롤 수치를 낮추는 것으로 보고되고 있다(Obstetrics & Gynecology 2001. 389). 또한 관상동맥심장질환(coronary arterial heart disease, CAHD)의 위험을 낮추는 효과와 항산화 활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다.
- [5] 이소플라본 유도체는 베타-글리코시드 결합에 의해 당이 연결된 배당체 형태나 당이 떨어져 나간 비배당체 형태로 존재한다. 비배당체로는 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein) 및 글리시테인(glycitein) 등이 있으며, 배당체로는 제니스틴(genistin), 다이드진(daidzin) 및 글리시틴(glycitin) 등이 있다. 대두유래 비 발효 식품에는 배당체가 많은 반면, 된장과 같은 대두를 이용한 발효식품에는 발효에 관계된 박테리아에 의해 배당체로부터 당이 분해되면서 비배당체가 주로 존재하게 된다.

- [6] 콩에 있는 제니스테인(genistein) 및 다이드제인(daidzein)과 같은 비배당체는 에스트로젠 수용체(estrogen receptor, ER)인 ER-베타(estrogen receptor beta)에 높은 친화도를 가지고 있어 가장 효과적인 에스트로젠 대체제이다(Endocrinology 1997, 863). 이와 같이 콩 이소플라본은 에스트로젠 대체제로 유용한 생물소재이지만 콩에 포함된 단백질, 지방 및 탄수화물의 함량이 높아 이소플라본 유도체의 추출, 정제 및 제품화와 같은 가공과정에 어려움이 있다.
- [7] 이소플라본이 고함유된 콩 개발을 위해 많은 연구가 진행되고 있으며, 최근에 콩잎에 에틸렌 또는 에틸렌 공여체인 에테폰을 처리하여 이소플라본 유도체 고함유 콩잎을 생산하는 재배 방법 기술이 보고되었다. 이는 이소플라본 유도체가 13,000 $\mu\text{g/ml}$ 이상 축적된 콩잎을 넓은 면적의 필드에서 생산할 수 있는 효과적인 기술이나(한국 등록특허 제 10-1451298), 밀폐된 공간에서만 가능하다는 점, 소비자들이 화학물질인 에테폰에 대해 거부감을 가지고 있다는 점 및 높은 수준의 에너지가 요구되는 LED 인조 전등이 반드시 필요하다는 점에서 한계가 있다.
- [8] 식물의 광합성 과정은 명반응(light reaction)과 암반응(dark reaction)으로 나누어지는데, 암반응에서는 캘빈 베니슨 회로(Calvin Benison cycle)에 의해 대사체들이 합성된다(J. Biol. Chem. 1950, 781). 본 발명자들은 에너지가 요구되지 않는 암조건에서 이소플라본 유도체 고함유 콩잎 재배 기술을 연구하던 중, 명반응에서 얻어진 ATP와 NADPH를 암조건(dark condition)에서 이용하여 일차 대사산물인 탄수화물을 비롯한 이차 대사체 합성이 가능함을 알아내었다.
- [9] 이에, 본 발명자들은 암조건이라도 밀폐된 공간에서 콩 식물체에 높은 농도의 에틸렌을 콩잎에 처리하면 보다 높은 효율로 이소플라본 고함유 콩잎을 생산할 수 있음을 밝히고 본 발명을 완성하였다.

[10]

발명의 상세한 설명

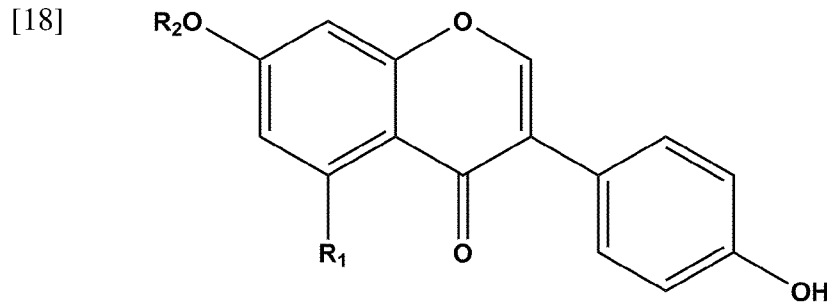
기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하는 단계를 포함하는 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 포함하는 식품 및 의약소재 용도를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 암조건(dark condition)에서 에틸렌을 이용하여 콩잎으로부터 이소플라본 유도체를 대량 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [15]

과제 해결 수단

[16] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 암조건(dark condition)에서 에틸렌(ethylene)을 처리하는 단계를 포함하는 하기 [화학식 1]로 표기되는 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법을 제공한다;

[17] [화학식 1]



[19] (상기 화학식 1에서, R_1 은 독립적으로 H 또는 OH이고, R_2 는 독립적으로 글루코오스(glucose) 또는 글루코오스 말로네이트(glucose malonate)이다.)

[20] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎을 제공한다.

[21] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[22] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 에스트로겐 결핍에 기인한 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[23] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 에스트로겐 결핍에 기인한 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[24] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화용 약학적 조성물을 제공한다.

[25] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화용 건강식품을 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부미용용 약학적 조성물을 제공한다.

[27] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부미용용 화장품 조성물을 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부미용용

건강식품을 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎을 이용한 차(Tea)를 제공한다.

[30] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎을 이용한 차(Tea)의 제조방법을 제공한다.

[31] 또한, 본 발명은 에틸렌(ethylene)을 이용하여 콩잎으로부터 이소플라본 유도체를 대량 생산하는 방법을 제공한다.

[32] 아울러, 본 발명은

[33] 1) 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 콩잎을 제조하는 단계; 및

[34] 2) 상기 단계 1)의 콩잎을 추출하여 이소플라본 유도체를 분리하는 단계를 포함하는 이소플라본 유도체의 대량 생산 방법을 제공한다.

[35]

발명의 효과

[36] 본 발명은 암조건(dark condition)에서 파종 후 20일 내지 60일 경과한 콩 식물체(soybean plant)에 일정 농도의 에틸렌을 처리하면 높은 수준의 에너지가 요구되는 광조건에서 에틸렌을 처리한 경우보다 이소플라본 유도체가 콩잎에 높은 농도로 축적됨을 확인하였다. 따라서 본 발명의 방법을 이용할 경우 이소플라본이 매우 높게 함유된 콩잎을 경제적이고 빠르게 제조할 수 있고, 이소플라본 유도체를 고함량으로 함유하는 콩잎, 콩잎의 추출물, 추출 분획물은 에스트로겐 불균형 및 항산화능 결핍에서 유발되는 질환용 식품 및 의약소재로 유용하게 사용될 수 있다.

[37]

도면의 간단한 설명

[38] 도 1은 에틸렌을 처리하지 않은 콩잎 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 도이다.

[39] 도 2는 암조건에서 에틸렌을 처리하여 얻은 콩잎 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램(검출파장: 254nm)을 나타낸 도이다(피크 a: 다이드진, 피크 b: 제니스틴, 피크 c: 말로닐 다이드진, 및 피크 d: 말로닐 제니스틴).

[40] 도 3은 암조건에서 에틸렌을 처리하여 얻은 콩잎 열수 추출물의 HPLC 크로마토그램(검출파장: 254nm)을 나타낸 도이다(피크 a: 다이드진, 피크 b: 제니스틴).

[41] 도 4는 암조건에서 에틸렌을 처리하여 얻은 콩잎 에탄올 추출물의 LC-ESI-TOF/MS의 BPI(Base Peak Intensity) 크로마토그램을 나타낸 도이다(피크 a: 다이드진, 피크 b: 제니스틴, 피크 c: 말로닐 다이드진, 및 피크 d: 말로닐 제니스틴).

[42] 도 5는 도 4(LC-ESI-TOF/MS의 BPI) 피크 a의 고분해능질량분석 (HRESIMS)

스펙트럼을 나타낸 도이다.

[43] 도 6은 도 4(LC-ESI-TOF/MS의 BPI) 피크 b의 고분해능질량분석 (HRESIMS) 스펙트럼을 나타낸 도이다.

[44] 도 7은 도 4(LC-ESI-TOF/MS의 BPI) 피크 c의 고분해능질량분석 (HRESIMS) 스펙트럼을 나타낸 도이다.

[45] 도 8은 도 4(LC-ESI-TOF/MS의 BPI) 피크 d의 고분해능질량분석 (HRESIMS) 스펙트럼을 나타낸 도이다.

[46] 도 9는 에틸렌을 처리하지 않은 콩잎, 광조건에서 에테폰을 처리한 콩잎 및 암조건에서 에틸렌을 처리한 콩잎의 이소플라본 총 함량을 비교한 도이다.

[47]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[48] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[49]

[50] 본 발명은 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌(ethylene)을 처리하는 단계를 포함하는 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법을 제공한다.

[51] 상기 암조건에서의 에틸렌 처리는 광이 완전히 차단된 밀폐된 공간에서 이루어지는 것일 수 있다.

[52] 상기 밀폐 공간의 온도는 20°C 내지 40°C인 것이 바람직하고, 25°C 내지 35°C인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[53] 상기 밀폐 공간의 습도는 50% 내지 80%인 것이 바람직하고, 60% 내지 70% 인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[54] 상기 콩잎은 과종 후 20일 이상 경과한 콩잎인 것이 바람직하고, 과종 후 50일 경과한 콩잎인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[55] 상기 에틸렌은 가장 간단한 올레핀계 탄화수소(화학식: C_2H_4)로 무색이며, 감미가 있는 기체이다. 식물호르몬의 일종으로서 청과물의 수확 뒤의 생리변화, 특히 원예작물의 성숙이나 엽채류의 황색화 등 식물조직의 성숙을 촉진하는 작용을 갖는다.

[56] 상기 에틸렌은 500 내지 4000 ppm의 농도로 처리하는 것이 바람직하며, 2500 내지 3500 ppm의 농도로 처리하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

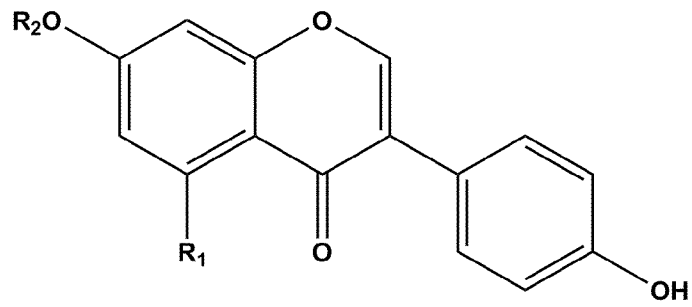
[57] 상기 에틸렌은 6시간 내지 72시간 처리하는 것이 바람직하며, 6시간 내지 48시간 처리하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[58] 상기 에틸렌은 콩잎 수확 전 또는 수확 후 처리가 가능하고, 콩잎 수확 전에 처리하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[59] 상기 이소플라본 유도체는 하기 [화학식 1]로 표기되는 화합물인 것이 바람직하고, 하기 [화학식 2] 내지 [화학식 5]로 표기되는 화합물 중 어느 하나인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

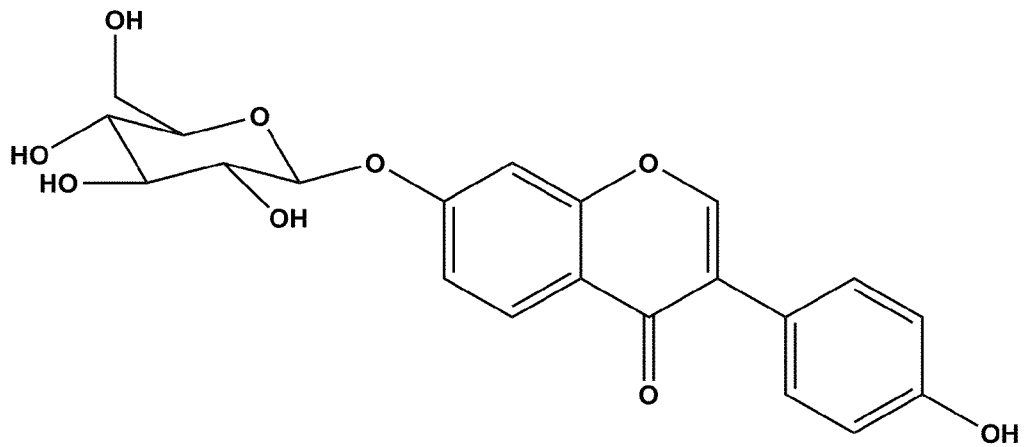
[60]

[화학식 1]

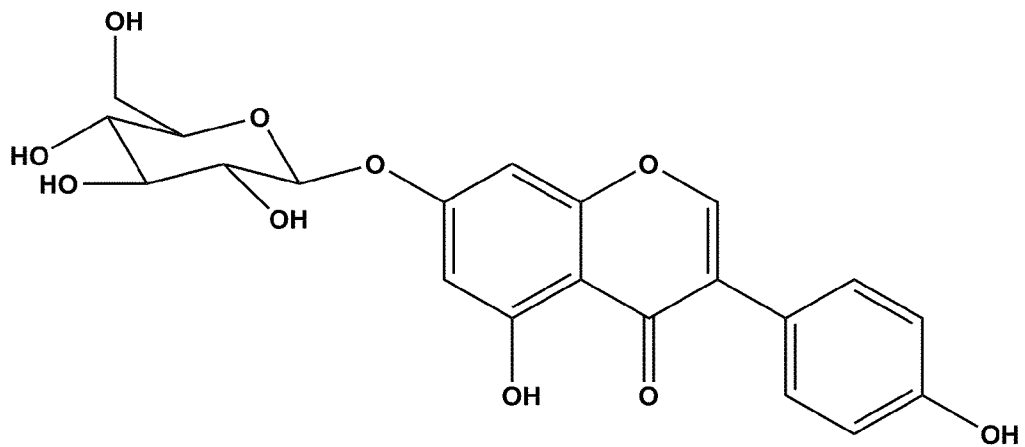


[61] (상기 화학식 1에서, R_1 은 독립적으로 H 또는 OH이고, R_2 는 독립적으로 글루코오스(glucose) 또는 글루코오스 말로네이트(glucose malonate)이다.)

[62] [화학식 2]

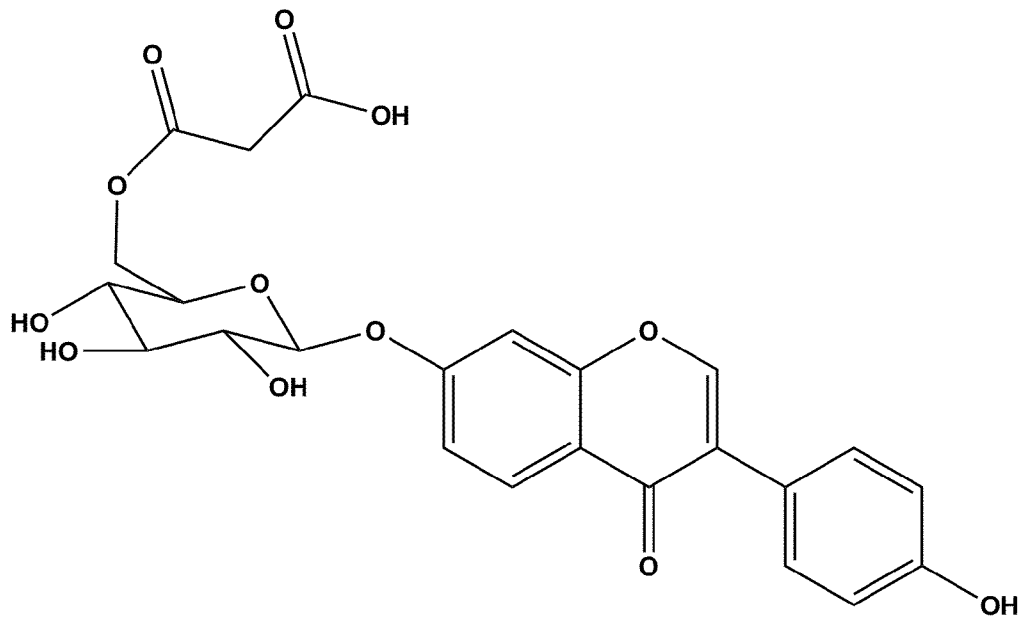


[63] [화학식 3]

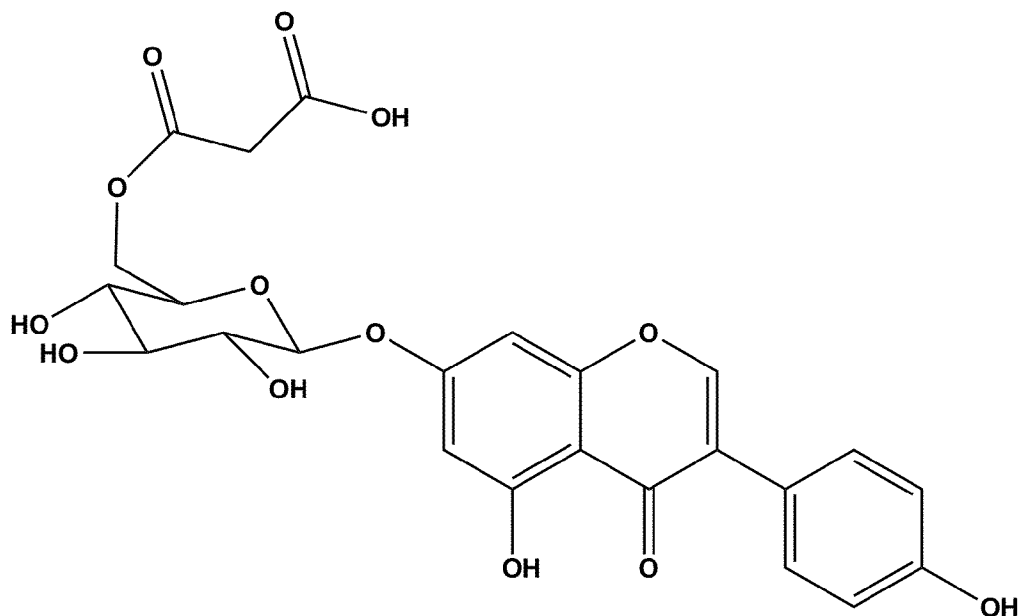


[64]

[화학식4]



[65] [화학식5]



[66]

[67] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎을 제공한다.

[68] 상기 이소플라본 유도체는 상기 [화학식 1]로 표기되는 화합물인 것이 바람직하고, 상기 [화학식 2] 내지 [화학식 5]로 표기되는 화합물 중 어느 하나인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[69] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 콩 파종 후 20일 내지 60일의 콩 식물체에 암조건에서 에틸렌을 처리한 결과, 처리 전보다 처리 후 콩잎에 이소플라본 유도체가 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 3 참조).

또한, 에틸렌을 처리하지 않은 콩잎에서는 이소플라본 유도체가 검출되지 않았고, 암조건에서 에틸렌을 처리한 콩잎에서는 4종의 이소플라본 유도체인 다이드진(daidzin), 제니스틴(genistin), 말로닐 다이드진(malonyldaidzin), 말로닐 제니스틴(malonylgenistin)이 콩잎에 급격히 축적됨을 확인하였다(표 5 및 표 6 참조). 또한, 상기 암조건에서 에틸렌을 처리한 콩잎을 에탄올로 추출하여 추출물을 획득하고, 이를 분리 정제하여 4종의 이소플라본 유도체, 다이드진(daidzin), 제니스틴(genistin), 말로닐 다이드진(malonyldaidzin) 및 말로닐 제니스틴(malonylgenistin)을 획득하였다(도 4 내지 도 8 참조).

[70] 또한, 본 발명자들은 암조건에서 에틸렌 처리 후 수확한 콩잎에서 분리된 4종의 이소플라본 유도체, 다이드진(daidzin), 제니스틴(genistin), 말로닐 다이드진(malonyldaidzin) 및 말로닐 제니스틴(malonylgenistin)에 대한 정량분석을 수행한 결과, 암조건에서 에틸렌을 처리한 후 수확한 콩잎의 경우 광조건에서 에틸렌을 처리한 콩잎에 비해 이소플라본 유도체의 함량이 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써, 암조건에서 콩잎에 에틸렌을 처리한 후 수확하는 방법이 이소플라본 유도체 고함량 콩잎 제조 방법으로 가능함을 확인하였다(표 7 및 도 9 참조).

[71]

[72] 또한, 본 발명은 암조건에서 에틸렌을 이용하여 콩잎으로부터 이소플라본 유도체를 대량으로 생산하는 방법을 제공한다.

[73] 구체적으로, 상기 방법은

[74] 1) 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 콩잎을 제조하는 단계; 및

[75] 2) 상기 단계 1)의 콩잎을 추출하여 이소플라본 유도체를 분리하는 단계를 포함하는 방법으로 수행하는 것이 바람직하다.

[76] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 콩잎은 파종 후 20일 이상 경과한 콩잎인 것이 바람직하고, 파종 후 50일 경과한 콩잎인 것이 더욱 바람직하며, 파종 후 20 내지 60일 경과한 콩잎이 가장 바람직하다.

[77] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 에틸렌은 콩잎 수확 전 또는 수확 후 처리 가능하다.

[78] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 에틸렌은 500 내지 4000 ppm의 농도로 처리하는 것이 바람직하며, 2500 내지 3500 ppm의 농도로 처리하는 것이 더욱 바람직하다.

[79] 상기 방법에 있어서, 이소플라본 유도체는 상기 [화학식 1]로 표기되는 화합물인 것이 바람직하고, 상기 [화학식 2] 내지 [화학식 5]로 표기되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것이 더욱 바람직하다.

[80] 본 발명은 암조건에서 에틸렌을 콩잎에 처리하여 이소플라본 유도체가 고함유된 콩잎을 제조하고, 상기 제조방법은 이소플라본 유도체의 대량 생산 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

[81]

- [82] 또한, 본 발명은 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [83] 상기 콩잎 추출물 또는 이의 분획물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [84] 1) 콩잎에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [85] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;
- [86] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 콩잎 추출물을 제조하는 단계; 및
- [87] 4) 단계 3)의 콩잎 추출물에 추가적으로 유기용매로 추출하여 콩잎 분획물을 제조하는 단계.
- [88] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 콩잎은 암조건에서 에틸렌 처리 후 이소플라본이 높은 농도로 축적된 콩 식물체에서 채취하여 사용한다. 상기 에틸렌 처리는 식물체를 채취하고 난 후에도 가능하나 채취하기 전에 처리하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 에틸렌을 처리한 콩 식물체는 잎, 잎 또는 뿌리 모두 이용가능하고 이에 한정하지 않으나, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 콩잎을 사용하는 것이 바람직하다.
- [89] 상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C_1 내지 C_2 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 콩잎 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 4 내지 6배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 20°C 내지 100°C 인 것이 바람직하고, 20°C 내지 40°C 인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하고, 24시간인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [90] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [91] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 콩잎 추출물은 감압농축된 콩잎 추출물인 흑갈색 조추출물을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 또한, 유기용매는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하고, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 클로로포름인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 콩잎 추출물을 물에 현탁시킨

후 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 상기 콩잎 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[92]

[93] 또한, 본 발명은 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 에스트로겐 결핍에 기인한 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[94] 상기 에스트로겐 결핍에 기인한 질환은 골다공증, 심장질환, 유방암, 외음질 질환, 과지질혈증, 피부노화 및 안면홍조로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[95] 본 발명의 이소플라본 고함량 콩잎에서 분리한 이소플라본 유도체들은 생리활성이 확립되어 있으므로, 상기 화합물들을 포함하는 콩잎 추출물 및 이의 분획물을 에스트로겐 결핍에 기인한 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[96]

[97] 상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[98] 상기 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[99] 상기 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 혼합생약제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘

스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[100] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[101]

[102] 또한, 본 발명은 콩잎에 에틸렌을 처리하여 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 에스트로겐 결핍에 기인한 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[103] 상기 에스트로겐 결핍에 기인한 질환은 골다공증, 심장질환, 유방암, 외음질 질환, 과지질혈증, 피부노화 및 안면홍조로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[104] 본 발명의 이소플라본 고함유 콩잎에서 분리한 이소플라본 유도체들은 생리활성이 확립되어 있으므로, 상기 화합물들을 포함하는 콩잎 추출물 및 이의 분획물을 에스트로겐 결핍에 기인한 질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로 유용하게 사용할 수 있다.

[105] 본 발명의 건강기능식품은 상기 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[106]

[107] 본 명세서의 "건강기능식품"이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조한 식품으로, 인체의 건강을 유지하는데 도움을 주는 식품을 의미하나 이에 한정되지 않으며 통상적인 의미의 건강식품을 모두 포함하는 의미로 사용한다.

[108] 건강기능식품의 형태 및 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환의 형태일 수 있다. 상기 건강기능식품은 추가성분으로서 여러 가지 향미제, 감미제 또는 천연

탄수화물을 포함할 수 있다. 상기 감미제는 천연 또는 합성 감미제일 수 있고, 천연 감미제의 예로는 타우마틴, 스테비아 추출물 등이 있다. 한편, 합성 감미제의 예로는 사카린, 아스파탐 등이 있다. 또한, 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드, 디사카라이드, 폴리사카라이드, 올리고당 및 당알코올 등일 수 있다.

[109] 본 발명의 건강기능식품은 상기 서술한 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. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 조성물의 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택될 수 있다.

[110] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 이때, 첨가되는 유효성분의 함량은 목적에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 함량은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부일 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없다면 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[111] 또한, 본 발명은 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화용 약학적 조성물을 제공한다.

[112] 또한, 본 발명은 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화용 건강식품을 제공한다.

[113] 본 발명의 이소플라본 고함량 콩잎에서 분리한 이소플라본 유도체들은 생리활성이 확립되어 있으므로, 상기 화합물들을 포함하는 콩잎 추출물 및 이의 분획물을 항산화용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[114]

[115] 또한, 본 발명은 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부미용용 약학적 조성물을 제공한다.

[116] 또한, 본 발명은 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부미용용 화장품 조성물을 제공한다.

[117] 또한, 본 발명은 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부미용용 건강식품을 제공한다.

- [118] 본 발명의 이소플라본 고함유 콩잎에서 분리한 이소플라본 유도체들은 생리활성이 확립되어 있으므로, 상기 화합물들을 포함하는 콩잎 추출물 및 이의 분획물을 피부미용용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.
- [119]
- [120] 상기 화장료 조성물은 로션, 연고, 겔, 크림, 패치 또는 분무제 등이 있으나 여기에 국한되는 것은 아니다. 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 함유하는 화장료 조성물을 제조함에 있어서, 통상적으로 함유되는 피부 외용제 조성물에 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물이 3 내지 30 중량부, 바람직하게는 5 또는 20 중량부로 첨가할 수 있다.
- [121] 본 발명의 화장료 조성물에는 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소나브 또는 화장료 조성물에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.
- [122] 또한 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- [123]
- [124] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎을 이용한 차(tea)를 제공한다.
- [125] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 및 향미를 갖는 허브 식물체를 혼합한 혼합차를 제공한다.
- [126] 상기 콩잎을 이용한 차는
- [127] 1) 본 발명에 따른 이소플라본 유도체 고함량 콩잎을 세척한 후 파쇄하는 단계;
- [128] 2) 상기 파쇄된 잎을 볶는 단계; 및
- [129] 3) 상기 볶은 잎을 건조하는 단계를 포함하는 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [130] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 분쇄는 파쇄기를 이용하여 1 내지 5 mm로 잘게 파쇄하는 것이 바람직하나 상기 크기는 이에 한정되지 않는다.
- [131] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 볶음은 볶음기에서 250 내지 300°C의 온도로 30 내지 60분 동안 타지 않게 볶는 것이 바람직하나 상기 온도 및 시간은 이에 한정되지 않는다.
- [132] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 건조는 자연건조 또는 건조기를 이용하여 건조시킬 수 있으며, 30 내지 50°C의 온도로 24 내지 36시간 동안 건조하는 것이 바람직하나 상기 온도 및 시간은 이에 한정되지 않는다.
- [133] 상기 허브 식물체는 캐모마일, 레몬그라스, 로즈힙, 라벤다, 페퍼민트, 펜넬,

로즈마리, 자스민, 히비스커스, 로즈플라워, 애플후르츠, 스트로베리후르츠, 레몬후르츠 및 오렌지 플라워로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것이 바람직하고 티로 사용되는 허브는 모두 사용가능하다.

[134] 상기 차 또는 혼합차는 착향차, 티백(tea bag), 인스턴트(instant tea) 및 캔(can)으로 구성된 군으로부터 선택된 형태로 가공될 수 있다.

[135]

발명의 실시를 위한 형태

[136] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[137] 단 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[138]

[139] <실시예 1> 암조건에서 에틸렌을 처리한 콩잎의 제조

[140] 파종 후 10일 내지 15일이 경과된 콩 식물체를 실험용 포트(pot)에 이식하고, 50일 내지 60일간 생육시기 R1이 될 때까지 재배하였다. 재배된 콩 식물체 포트를 광이 완전히 차단된 암 조건(dark condition)의 밀폐된 공간에 넣고 온도 30°C 및 습도 70% 조건에서 24시간 안정화 시켰다. 상기 조건의 밀폐된 공간에 3000ppm의 에틸렌을 콩잎의 생육상태(큐틴층의 발달 정도)에 따라 6시간 내지 48시간 처리하였고, 에틸렌 처리 시간 경과 후 바로 수득하여 40°C에서 건조하였다.

[141]

[142] <실시예 2> 암조건에서 에틸렌 처리된 콩잎의 에탄올 추출물의 제조

[143] <2-1> 초음파 처리(sonication)를 통한 콩잎의 에탄올 추출물의 제조

[144] 상기 <실시예 1>의 방법으로 수득한 콩잎을 건조하고, 건조된 콩잎 1g에 90% 에탄올 50ml를 넣고 2시간 동안 초음파 처리(sonication) 하며 40 °C에서 추출하였다. 상기 추출한 용매를 감압농축하여 15-20% 수율로 콩잎의 에탄올 추출물을 얻었다.

[145]

[146] <2-2> 실온에서 콩잎의 에탄올 추출물의 제조

[147] 상기 <실시예 1>의 방법으로 수득한 콩잎을 건조하고, 건조된 콩잎 1g에 90% 에탄올 50ml를 넣고 25°C에서 5일간 추출하였다. 상기 추출한 용매를 감압농축하여 18-22 %의 수율로 콩잎의 에탄올 추출물을 얻었다.

[148]

[149] <실시예 3> 암조건에서 에틸렌 처리된 콩잎의 열수 추출물의 제조

[150] 상기 <실시예 1>의 방법으로 수득한 콩잎을 건조하고, 건조된 콩잎 1g에 물 50ml를 넣고 100°C의 열수로 24시간 추출하였다. 상기 추출한 용매를 감압 농축하여 20 - 25% 수율로 콩잎의 열수 추출물을 얻었다.

[151]

- [152] <실험예 1> 암조건에서 에틸렌 처리 콩잎의 에탄올 및 열수 추출물에서 이소플라본 유도체 축적 여부 확인
- [153] 암조건에서 에틸렌 처리된 콩잎의 이소플라본 유도체 축적정도를 확인하기 위해 상기 <실시예 2-1> 및 <실시예 3>에서 준비된 추출물에 대해 HPLC 분석을 수행하였다.
- [154] HPLC는 에이질런트 테크놀로지사(Agilent, USA)의 1290 Infinity LC를 이용하였으며, 칼럼은 ODS 계열의 Zolbox Bonus-RP(150×4.6mm)을 사용하였다. 용리속도는 1 ml/분, 용리 조건은 0.1% 아세트산 수용액(용매 A)과 아세토니트릴(용매 B) 혼합용액을 사용하여 아세토니트릴(용매 B)을 표 1과 같은 구배용출(gradient elution)을 적용하여 이소플라본 유도체를 분리하였다. 이 때 254 nm의 검출파장에서 분석하였다.
- [155] 그 결과, 암조건이라도 에틸렌을 처리하지 않은 콩잎에서는 주로 켐페롤 배당체(kaempferol glycoside)가 대사체로 확인되었고(도 1), 에틸렌을 처리한 경우 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이 이소플라본 유도체가 급격히 축적됨을 확인하였다. 구체적으로, 암조건에서 에틸렌을 처리한 콩잎의 에탄올 추출물의 경우 다이드진(피이크 a), 제니스틴(피이크 b), 말로닐 다이드진(피이크 c), 및 말로닐 제니스틴(피이크 d)이 높은 농도로 검출되었으며, 에틸렌을 처리한 콩잎의 열수 추출물의 경우, 말로닐 다이드진(피이크 c)과 말로닐 제니스틴(피이크 d)은 가수분해되어 다이드진(피이크 a)과 제니스틴(피이크 b)으로 전환되었음을 확인하였다(도 2 및 도 3). 상기 결과는 콩 식물체에 암조건에서 에틸렌을 처리하는 경우 이소플라본 유도체를 고농도로 함유한 콩잎을 수득할 수 있음을 제시한다.

[156] [표1]

시간(분)	용매 B 농도(%)
0-5	15%
5-20	20%
20-50	50%

- [157]
- [158] <실험예 2> 암조건에서 에틸렌 처리로 얻어진 콩잎의 에틸렌 추출물로부터 이소플라본 유도체의 분리, 정제 및 구조분석
- [159] 상기 실시예 2-1의 에탄올 추출물에 포함된 이소플라본 유도체에 대해 UPLC-ESI-TOF/MS 분석을 수행하였다.
- [160] 구체적으로, UPLC BEH C18 칼럼(2.1mm×100mm, 1.7 μ waters)을 이용하고, 용리조건은 0.1% 포름산 수용액(용매 A)과 0.1% 포름산 아세토니트릴(용매 B) 혼합용액으로 아세토나이트릴(용매 B)을 표 2와 같은 구배용출(gradient elution)을 적용하여 이소플라본 유도체를 분리하였다. 이 때 주입된 추출용액의

양은 1 μ l 였으며, UPLC-ESI-TOF 질량분석은 표 3과 같은 조건으로 수행하였다.

[161] [표2]

시간(분)	용매 B 농도(%)
0-1	3%
1-5	15%
5-10	25%
10-11	30%
11-12	45%

[162] [표3]

세부사항	조건
Ionization	ESI-positive mode
Capillary voltage	3 kV
Sample cone voltage	40 V
Desolvation gas flow	800 L/h
Cone gas flow	30 L/h
Desolvation temperature	400°C
Ion source temperature	100°C
Data collection	<i>m/z</i> 50-1500 range with a scan time of 0.2 s
Lock mass	Leucine-enkephalin(556.2771 Da)

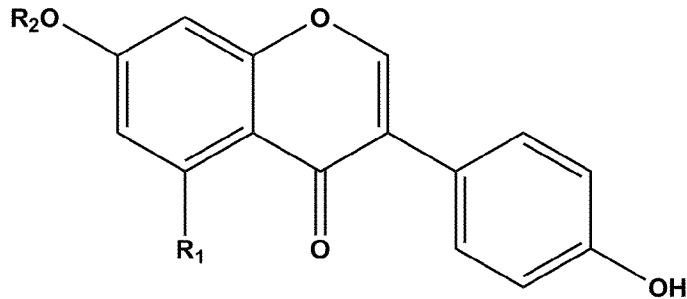
[163]

[164] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 이소플라본 유도체 4종의 BPI(Base Peak Intensity) 크로마토그램을 얻었다.

[165] 도 4의 피크 a의 고분해능 질량분석(HRESIMS) 스펙트럼에서 [M+H]⁺는 417.1184 (이론치, 417.1186)로 나타났다. 이로부터 원소조성이 다이드진의 원소조성과 일치하는 C₂₁H₂₁O₉임을 확인하였다. 또한 조각이온 255.0652 [M+H-248]는 다이드진에서 글루코실기가 떨어져 나가 생성된 것으로 피크 a는 참고문헌 (J. Agric. Food Chem. 2016, 64, 7315-7324)에 나타난 다이드진과 일치하는바, 다이드진으로 동정하였다(도 5).

[166] [화학식 1]

[167]

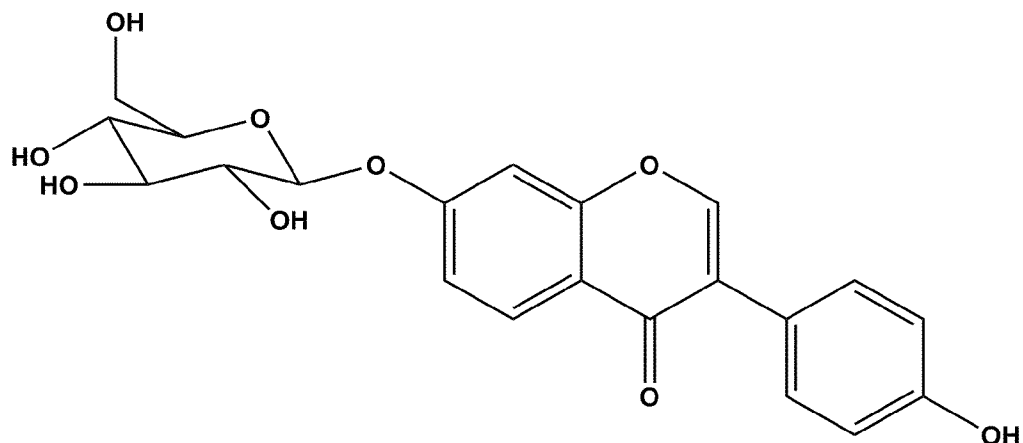


[168]

[169] 또한, 도 4의 피크 b 고분해능 질량분석(HRESIMS) 스펙트럼에서 $[M+H]^+$ 는 433.1133 (이론치, 433.1135)로 나타났다. 이로부터 원소조성이 제니스틴의 원소조성과 일치하는 $C_{21}H_{21}O_{10}$ 임을 확인하였다. 또한 조각이온 271.0602 $[M+H-248]$ 은 제니스틴에서 글루코실기가 떨어져 나가 생성된 것으로 피크 b는 참고문헌 (J. Agric. Food Chem. 2016, 64, 7315-7324)에 나타난 제니스틴과 일치하는바, 제니스틴으로 동정하였다(도 6).

[170] [화학식 2]

[171]

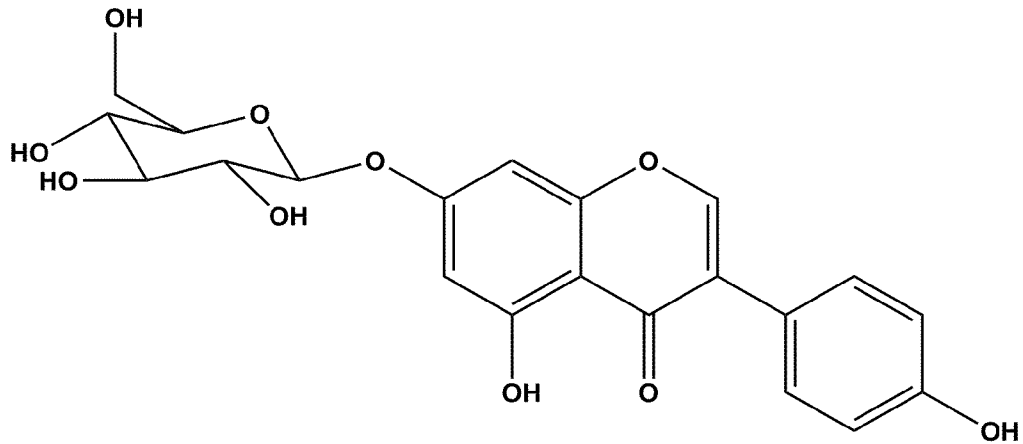


[172]

[173] 또한, 도 4의 피크 c 고분해능 질량분석(HRESIMS) 스펙트럼에서 $[M+H]^+$ 는 503.1195 (이론치, 503.1190)로 나타났다. 이로부터 원소조성이 말로닐 다이드진의 원소조성과 일치하는 $C_{24}H_{23}O_{12}$ 임을 확인하였다. 또한 조각이온 255.0653 $[M+H-248]$ 은 말로닐 다이드진에서 말로닐 글루코실기가 떨어져 나가 생성된 것으로 피크 c는 참고문헌 (J. Agric. Food Chem. 2016, 64, 7315-7324)에 나타난 말로닐 다이드진과 일치하는바, 말로닐 다이드진으로 동정하였다(도 7).

[174] [화학식 3]

[175]

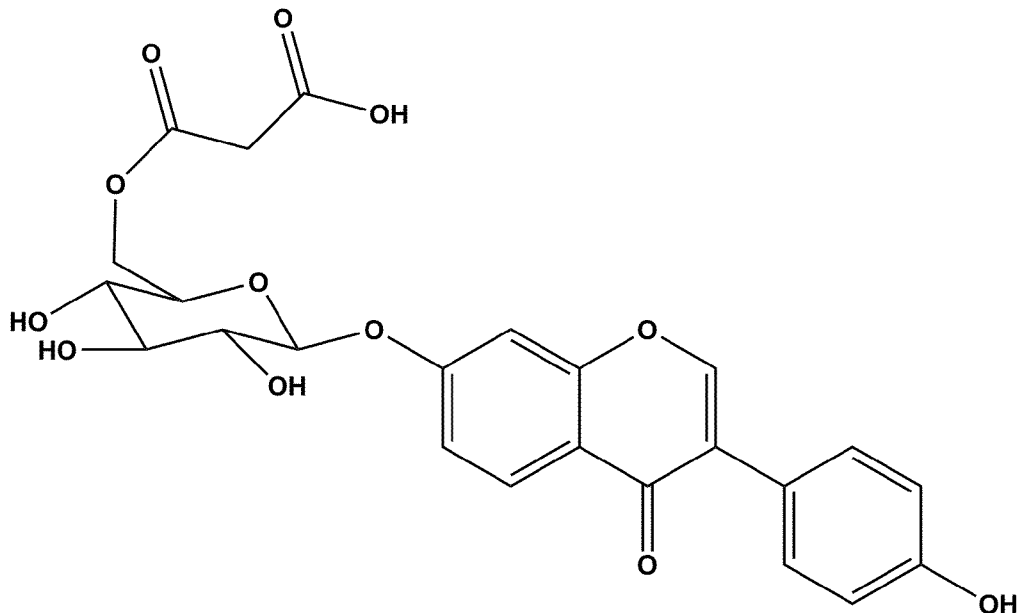


[176]

[177] 또한, 도 4의 피크 d 고분해능 질량분석(HRESIMS) 스펙트럼에서 $[M+H]^+$ 는 519.1141 (이론치, 519.1139)로 나타났다. 이로부터 원소조성이 말로닐 제니스틴의 원소조성과 일치하는 $C_{24}H_{23}O_{13}$ 임을 확인하였다. 또한 조각이온 271.0604 $[M+H-248]$ 은 말로닐 제니스틴에서 말로닐 글루코실기가 떨어져 나가 생성된 것으로 피크 d는 참고문헌 (J. Agric. Food Chem. 2016, 64, 7315-7324)에 나타난 말로닐 제니스틴과 일치하는바, 말로닐 제니스틴으로 동정하였다(도 8).

[178] [화학식 4]

[179]



[180]

[181] <실험예 3> HPLC를 이용한 이소플라본 유도체의 정량분석

[182] 상기 실시예 2-1의 에탄올 추출물을 0.2 μ m의 공극을 가진 막 여과 필터를 이용하여 여과한 후 에틸렌 처리 유무, 처리 농도 및 시간에 따른 이소플라본 총량을 측정하였다.

[183] 구체적으로, HPLC는 에이질런트 테크놀로지사(Agilent, USA)의 1290 Infinity LC를 이용하였으며, 칼럼은 ODS 계열의 Zolbox Bonus-RP(150 $\times$ 4.6mm)을

사용하였다. 이동상은 0.1% 아세트산 수용액(용매 A)과 아세토니트릴(용매 B)을 사용하였으며, 표 4와 같은 구배 용출(gradient elution)을 적용하였다. 유속은 1 ml/min로 조절하였고 주입된 추출 용액의 양은 10 μ l였으며, 검출파장은 254 nm로 분석하였다. 정량분석에 이용한 표준용액은 시그마사(Sigma, 미국)에서 구입한 순도 98%의 다이드진과 제니스틴을 메탄올에 용해시켜 1-100 μ g/ml범위로 제조하였다. 제조한 표준용액으로 HPLC 분석을 실시하여 피크 면적(peak area)으로부터 검량선을 작성하였다. 이 때, 다이드진과 제니스틴의 머무름 시간(retention time, RT)은 각각 13.19 분과 23.89 분으로 나타났다.

[184] 그 결과, 암조건에서 에틸렌을 다양한 농도로 온도 $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 처리한 경우 이소플라본의 총량은 3000ppm일 때 26500 μ g/g로 최고치를 나타내어 3000 ppm이 최적의 에틸렌 농도임을 확인하였다(표 5).

[185] 또한, 암조건에서 에틸렌 3000ppm의 농도로 온도 $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 6~48시간 처리한 결과, 이소플라본의 총량은 24시간 처리시 26500 μ g/g로 최고치를 나타내어 24시간이 최적의 처리 시간임을 확인하였다(표 6).

[186] [표4]

시간(분)	용매 B 농도(%)
0-5	15%
5-20	20%
20-50	50%

[187] [표5]

이소플라본(μ g)	에틸렌 농도(ppm)			
	500	1000	2000	3000
다이드진	476	1024	1923	2754
제니스틴	938	2016	3787	5424
말로닐다이드진	1298	2792	5245	7513
말로닐제니스틴	2506	5390	10124	14502
총 계	4580	9850	18500	26500

[188]

[189]

[표6]

이소플라본(μg)	처리시간(hr)			
	6	12	24	48
다이드진	996	1964	2754	2557
제니스틴	1961	3869	5424	5036
말로닐다이드 진	2716	5358	7513	6974
말로닐제니스 틴	5243	10343	14502	13462
총 계	9580	18900	26500	24600

[190]

[191] <실험예 4> 암조건에서 에틸렌을 처리한 경우와 광조건에서 에테폰을 처리한 경우의 이소플라본 유도체 함량 비교 분석

[192] 광조건에서 에테폰을 처리하여 제조한 이소플라본 유도체 고품량 콩잎과 본 발명의 암조건에서 에틸렌을 처리하여 제조한 이소플라본 유도체 고품량 콩잎의 이소플라본 유도체 함량을 비교하는 실험을 하기와 같이 수행하였다.

[193] 구체적으로, 상기 실시예 1과 동일한 방법 및 조건으로 각 실험군 별 50개의 콩 식물체 포트를 제조하였다. 빛이 있는 광조건에서 재배된 콩 식물체 포트에 800ppm의 에테폰을 $28\pm 10^\circ\text{C}$ 의 온도에서 96시간 동안 처리한 후 바로 콩잎을 수득하여 40°C 에서 건조하였다. 재배된 콩 식물체 포트를 광이 완전히 차단된 암조건에 밀폐된 공간에 넣고 온도 30°C 및 습도 60% 조건에서 24시간 안정화시킨 후, 상기 조건의 밀폐된 공간에 3000ppm의 에틸렌을 24시간 처리한 후 바로 콩잎을 수득하여 40°C 에서 건조하였다. 수득한 건조 콩잎을 상기 실험예 3과 동일한 조건 및 방법으로 처리하여 콩잎의 에탄올 추출물을 제조하고, 이소플라본 유도체 함량 정량 분석을 실시하였다.

[194] 그 결과, 하기 표 7 및 도 9에 나타난 바와 같이, 광조건에서 800ppm의 에테폰을 처리한 콩잎에서는 $13500\mu\text{g/g}$ 의 이소플라본 유도체가 함유되어 있었으나, 암조건에서 3000ppm의 에틸렌을 처리한 콩잎에서는 $26500\mu\text{g/g}$ 의 총 이소플라본 유도체가 함유되어 있어 암조건에서 에틸렌을 처리한 경우 약 2배의 이소플라본 유도체 함량이 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 이소플라본 유도체 함량 평균값의 표준편차가 암조건에서 에틸렌을 처리한 경우 1/4로 감소하여 표준편차의 균질도가 개선됨을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 암조건에서 최적 농도의 에틸렌을 처리하는 경우 이소플라본 유도체 함량이 현저히 증가하며 높은 함량의 이소플라본 유도체가 함유된 콩잎을 안정적으로 수득할 수 있음을 보여준다.

[195] [표7]

구분	무처리 쿵잎	광조건에서 에테폰처리 쿵잎	암조건에서 에틸렌처리 쿵잎
총이소플라본함량(μg)	<200	13500 $\pm$ 2500	26500 $\pm$ 600

[196]

[197] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[198]

[199] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[200] <1-1>산제의 제조

[201] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 쿵잎,

[202] 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 0.1 g

[203] 유당 1.5 g

[204] 탈크 0.5 g

[205] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[206]

[207] <1-2>정제의 제조

[208] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 쿵잎,

[209] 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 0.1 g

[210] 락토오스 7.9 g

[211] 결정성 셀룰로오스 1.5 g

[212] 마그네슘 스테아레이트 0.5 g

[213] 상기의 성분들을 혼합한 후 직타법(direct tableting method)으로 정제를 제조하였다.

[214]

[215] <1-3>캡슐제의 제조

[216] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 쿵잎,

[217] 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 0.1 g

[218] 옥수수전분 5 g

[219] 카르복시 셀룰로오스 4.9 g

[220] 상기의 성분들을 혼합하여 분말을 제조한 후, 상기 분말을 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라 경질 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[221]

[222] <1-4> 주사제의 제조

[223] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 쿵잎,

[224] 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 0.1 g

[225] 주사용 멸균 증류수 적량

- [226] pH 조절제 적량
- [227] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플 당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.
- [228]
- [229] **<1-5>액제의 제조**
- [230] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎,
- [231] 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 0.1 g
- [232] 이성화당 10 g
- [233] 만니톨 5 g
- [234] 정제수 적량
- [235] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고, 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합하였다. 그 다음 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.
- [236]
- [237] **<제조예 2> 건강식품의 제조**
- [238] **<2-1> 혼합차의 제조**
- [239] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 이의 추출물 또는 추출물의 분획물과 향미를 갖는 허브 식물체를 혼합하여, 혼합차를 제조하였다.
- [240]
- [241] **<2-2> 밀가루 식품의 제조**
- [242] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이를 혼합한 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [243]
- [244] **<2-3> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**
- [245] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 0.1 ~ 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
- [246]
- [247] **<2-4> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**
- [248] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.
- [249]
- [250] **<2-5> 유제품(dairy products)의 제조**
- [251] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[252]

[253] <2-6> 선식의 제조

[254] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화한 후 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[255] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[256] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 이의 추출물 또는 추출물의 분획물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[257] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및, 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 이의 추출물 또는 추출물의 분획물을 하기의 비율로 배합하여 제조하였다.

[258] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[259] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[260] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 이의 추출물 또는 추출물의 분획물(3 중량부),

[261] 영지(0.5 중량부),

[262] 지황(0.5 중량부)

[263]

[264] <제조예 3> 건강 음료의 제조

[265] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎,

[266] 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 100 mg

[267] 구연산 100 mg

[268] 올리고당 100 mg

[269] 매실농축액 2 mg

[270] 타우린 100 mg

[271] 정제수를 가하여 전체 500 ml

[272] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하여 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[273] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였으나, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합 비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[274]

[275] <제제예 4> 화장료 조성물의 제조

[276] <4-1> 크림의 제조

[277] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎,

[278] 이의 추출물 또는 추출물의 분획물 4.6 중량부

[279] 세토스테아릴알코올 2.8 중량부

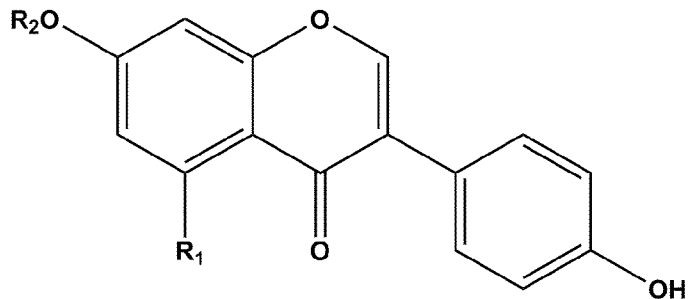
- [280] 밀납 2.6 중량부
- [281] 스테아린산 1.4 중량부
- [282] 친유형모노스테아린산글리세린 2 중량부
- [283] 피이지-100 스테아레이트 1 중량부
- [284] 세스퀴올레인산소르비탈 1.4 중량부
- [285] 호호바오일 4 중량부
- [286] 스쿠알란 3.8 중량부
- [287] 폴리소르베이트 60 1.1 중량부
- [288] 마카다미아오일 2 중량부
- [289] 초산토코페롤 0.2 중량부
- [290] 메칠폴리실록산 0.4 중량부
- [291] 에칠파라벤 0.1 중량부
- [292] 프로필파라벤 0.1 중량부
- [293] Euxyl K-400 0.1 중량부
- [294] 1,3-부틸렌글리콜 7 중량부
- [295] 메칠파라벤 0.05 중량부
- [296] 글리세린 6 중량부
- [297] d-판테놀 0.2 중량부
- [298] 트리에탄올아민 0.2 중량부
- [299] pt 41891 0.2 중량부
- [300] p-H₂O 46.05 중량부
- [301]
- [302] **<4-2> 로션의 제조**
- [303] 본 발명의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 추출물 또는 추출물의 분획물 3.5 중량부
- [304] 세토스테아릴알코올 1.6 중량부
- [305] 스테아린산 1.4 중량부
- [306] 친유형모노스테아린산글리세린 1.8 중량부
- [307] 피이지-100 스테아레이트 2.6 중량부
- [308] 세스퀴올레인산소르비탈 0.6 중량부
- [309] 스쿠알렌 4.8 중량부
- [310] 마카다미아오일 2 중량부
- [311] 호호바오일 2 중량부
- [312] 초산토코페롤 0.4 중량부
- [313] 메칠폴리실록산 0.2 중량부
- [314] 에칠파라벤 0.1 중량부
- [315] 프로필파라벤 0.1 중량부
- [316] 1,3-부틸렌글리콜 4 중량부

- [317] 메칠파라벤 0.1 중량부
- [318] 산탄검 0.1 중량부
- [319] 글리세린 4 중량부
- [320] d-판테놀 0.15 중량부
- [321] 알란토인 0.1 중량부
- [322] 카르보네(2% aq. Sol) 4 중량부
- [323] 트리에탄올아민 0.15 중량부
- [324] 에탄올 3 중량부
- [325] pt 41891 0.1 중량부
- [326] p-H2O 48.3 중량부

청구범위

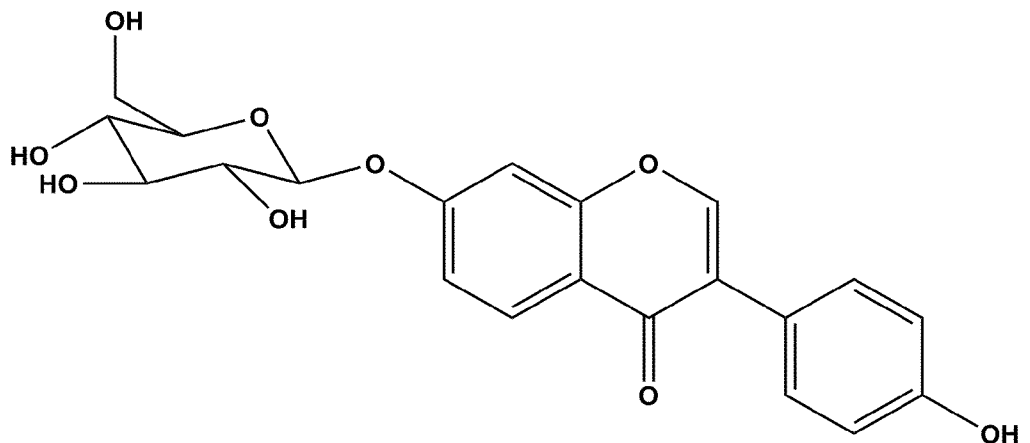
- [청구항 1] 암조건(dark condition)에서 콩잎에 에틸렌(ethylene)을 처리하는 단계를 포함하는 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 콩잎은 파종 후 20일 내지 60일 경과한 콩잎인 것을 특징으로 하는 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 에틸렌은 500내지 4000ppm의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 이소플라본 유도체는 하기 [화학식 1]로 표기되는 화합물인 것을 특징으로 하는 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법:

[화학식 1]

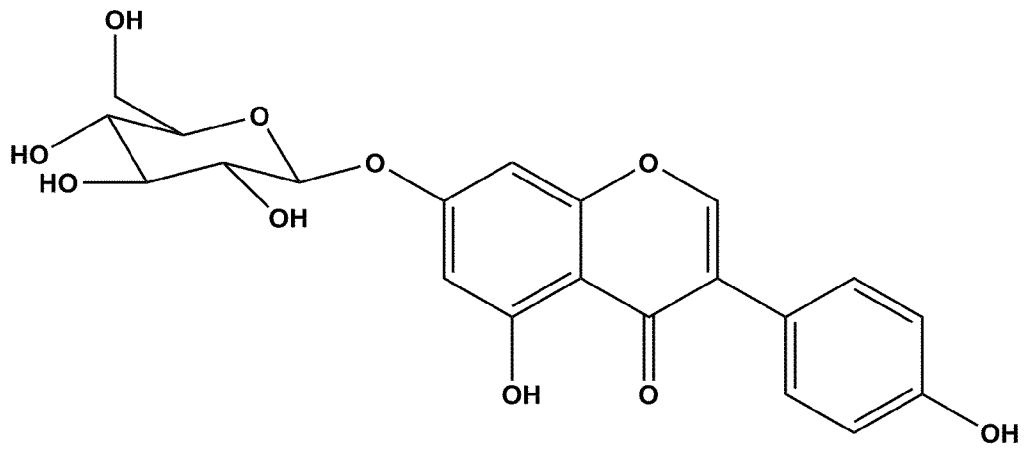


- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 이소플라본 유도체는 하기 [화학식 2] 내지 [화학식 5]로 표기되는 화합물인 것을 특징으로 하는 이소플라본 유도체 고함량 콩잎의 제조방법:

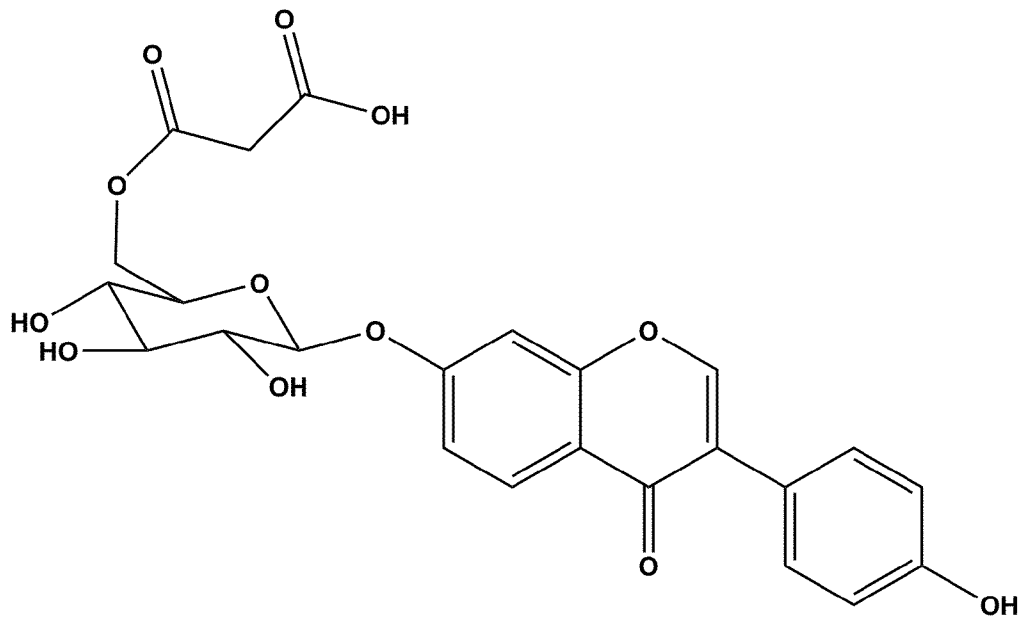
[화학식 2]



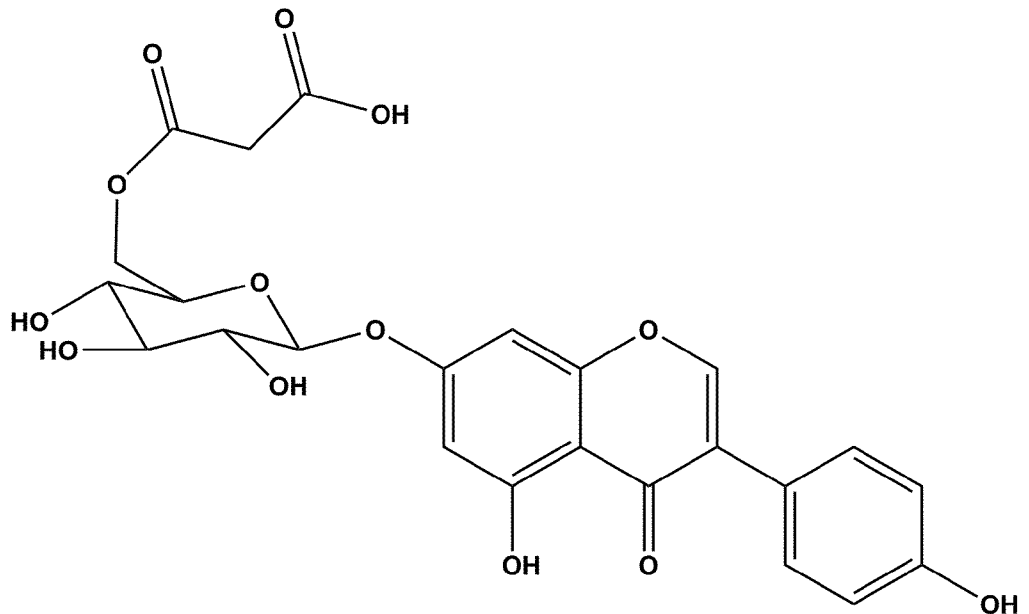
[화학식 3]



,
[화·학·식 4]



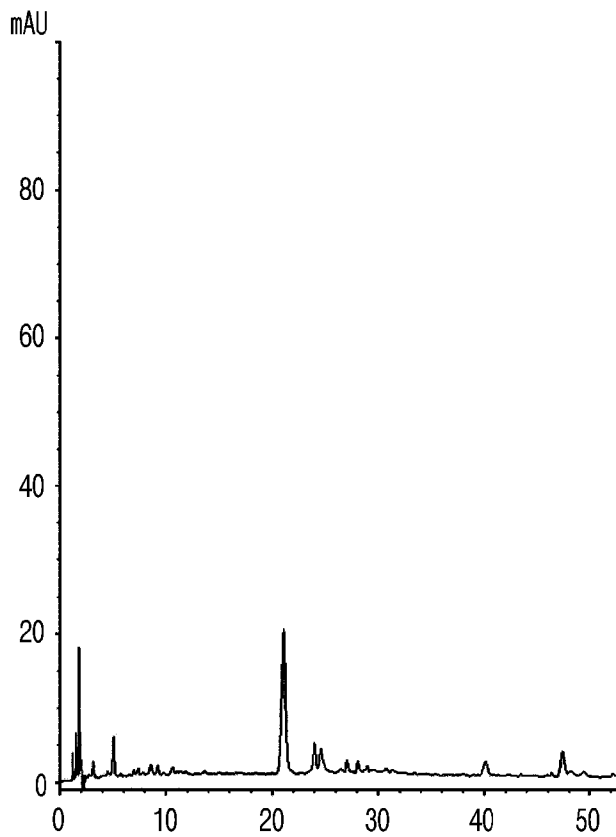
, 및
[화·학·식 5]



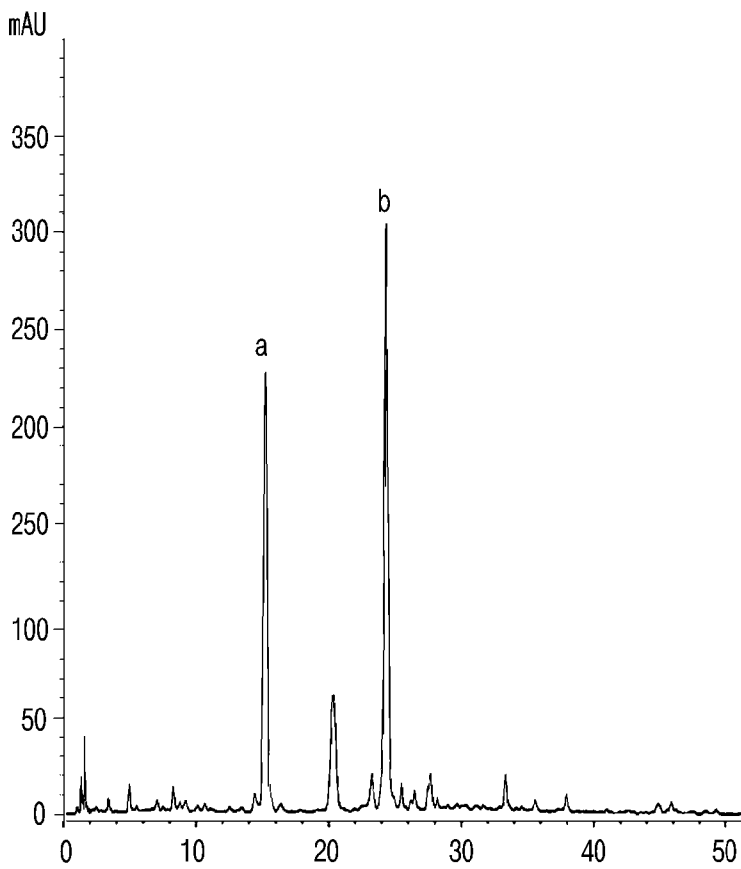
- [청구항 6] 제1항의 제조방법으로 제조된 이소플라본 유도체 고함량 콩잎.
- [청구항 7] 1) 암조건에서 콩잎에 에틸렌을 처리하여 콩잎을 제조하는 단계; 및
2) 상기 단계 1)의 콩잎을 추출하여 이소플라본 유도체를 분리하는 단계를 포함하는 이소플라본 유도체의 대량 생산 방법.
- [청구항 8] 제6항의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 포함하는 조성물.
- [청구항 9] 제6항의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 에스트로겐 결핍에 기인한 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 에스트로겐 결핍에 기인한 질환은 골다공증, 심장질환, 유방암, 외음질 질환, 과지질혈증, 피부노화 및 안면홍조로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것을 특징으로 하는 에스트로겐 결핍에 기인한 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제6항의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 에스트로겐 결핍에 기인한 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 에스트로겐 결핍에 기인한 질환은 골다공증, 심장질환, 유방암, 외음질 질환, 과지질혈증, 피부노화 및 안면홍조로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것을 특징으로 하는 에스트로겐 결핍에 기인한 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.
- [청구항 13] 제6항의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항산화용 건강기능식품.
- [청구항 14] 제6항의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기

- 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부미용용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제6항의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부미용용 화장품 조성물.
- [청구항 16] 제6항의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎, 상기 콩잎의 추출물, 또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부미용용 건강기능식품.
- [청구항 17] 제6항의 이소플라본 유도체 고함량 콩잎을 이용한 차(tea).

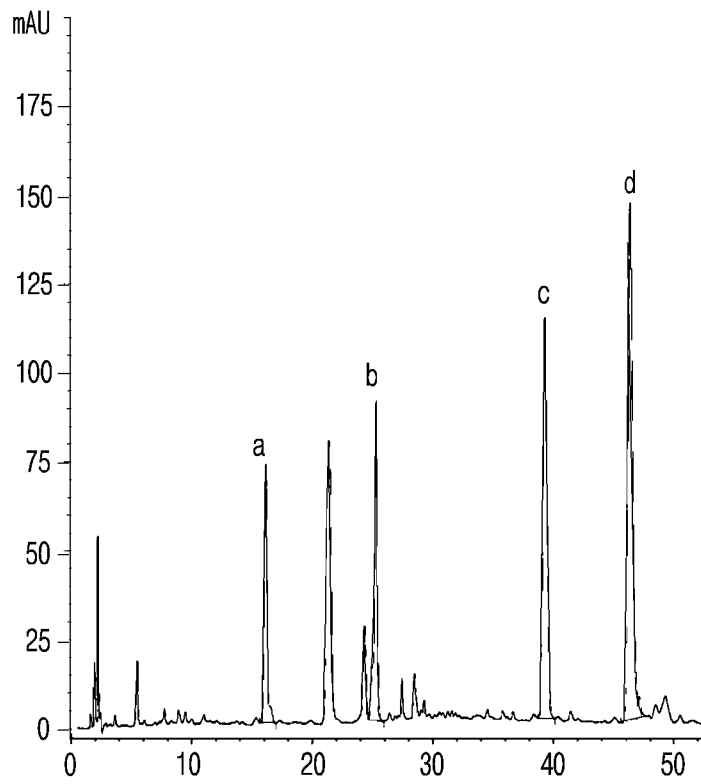
[도1]



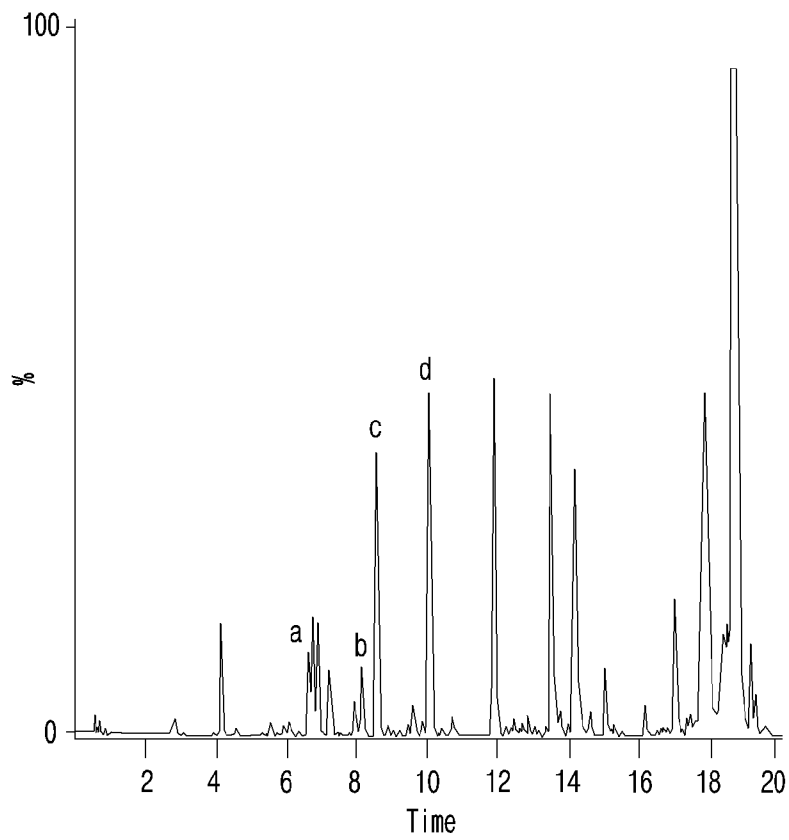
[도2]



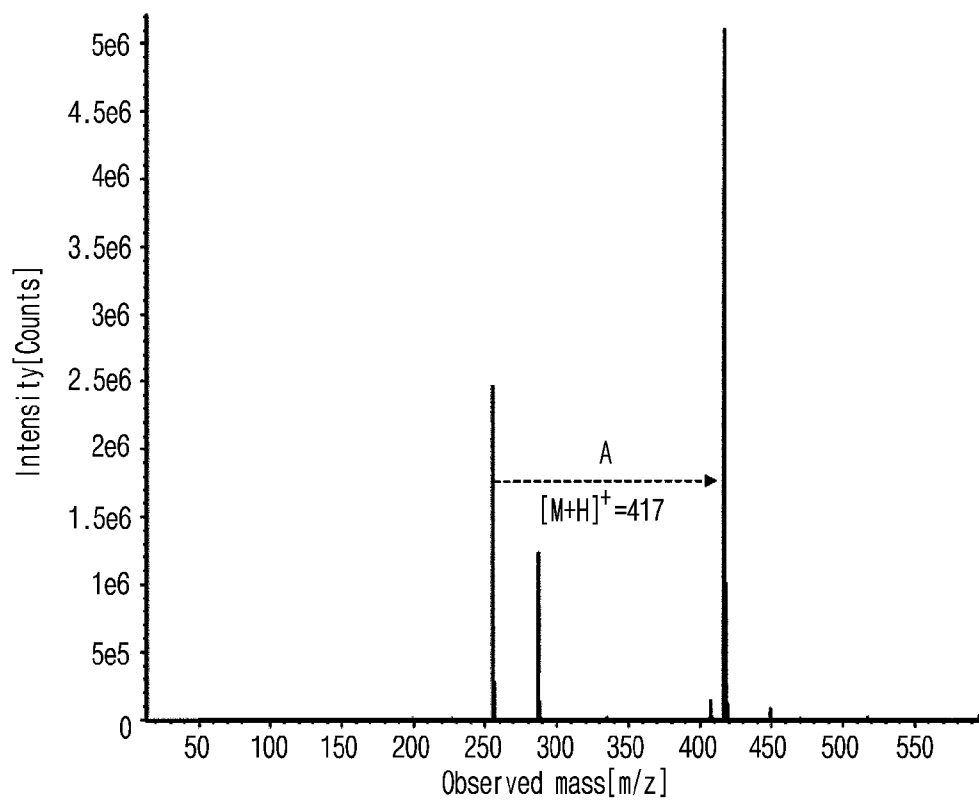
[도3]



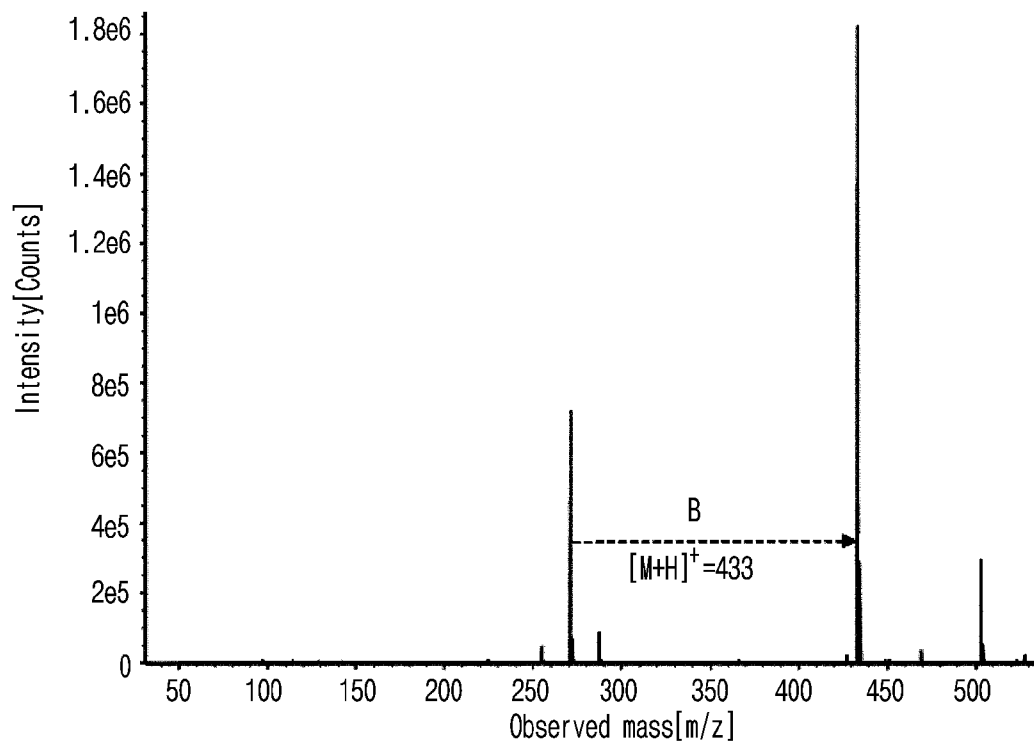
[도4]



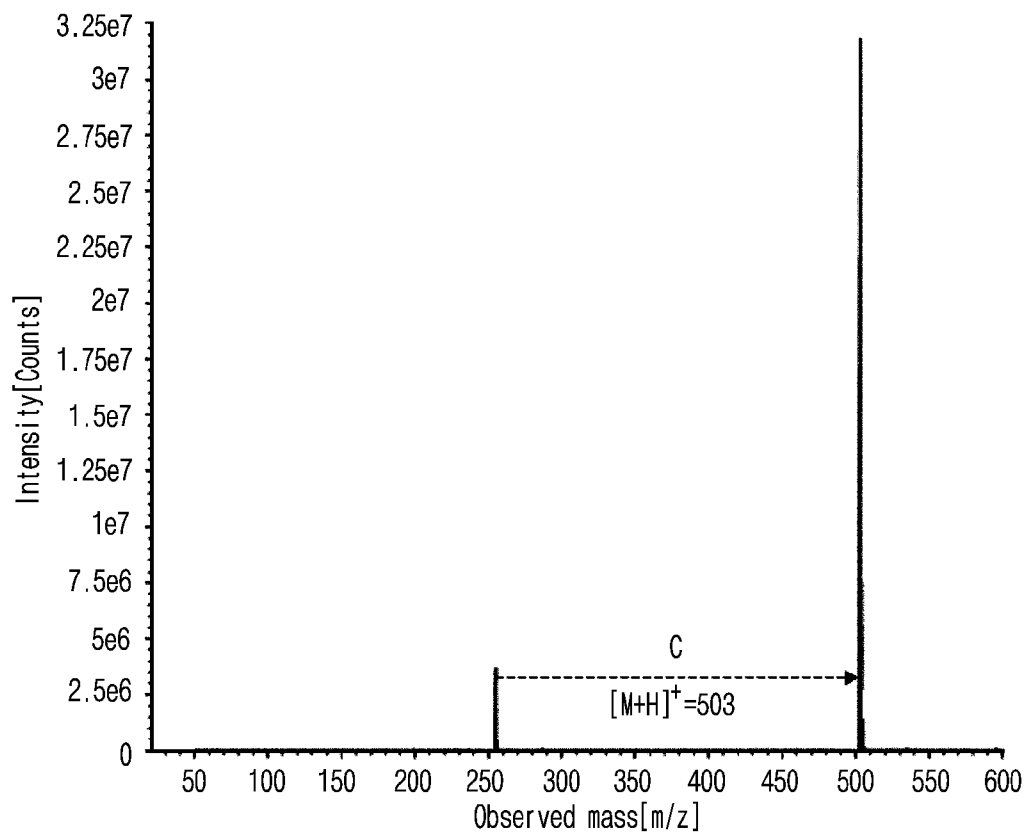
[도5]



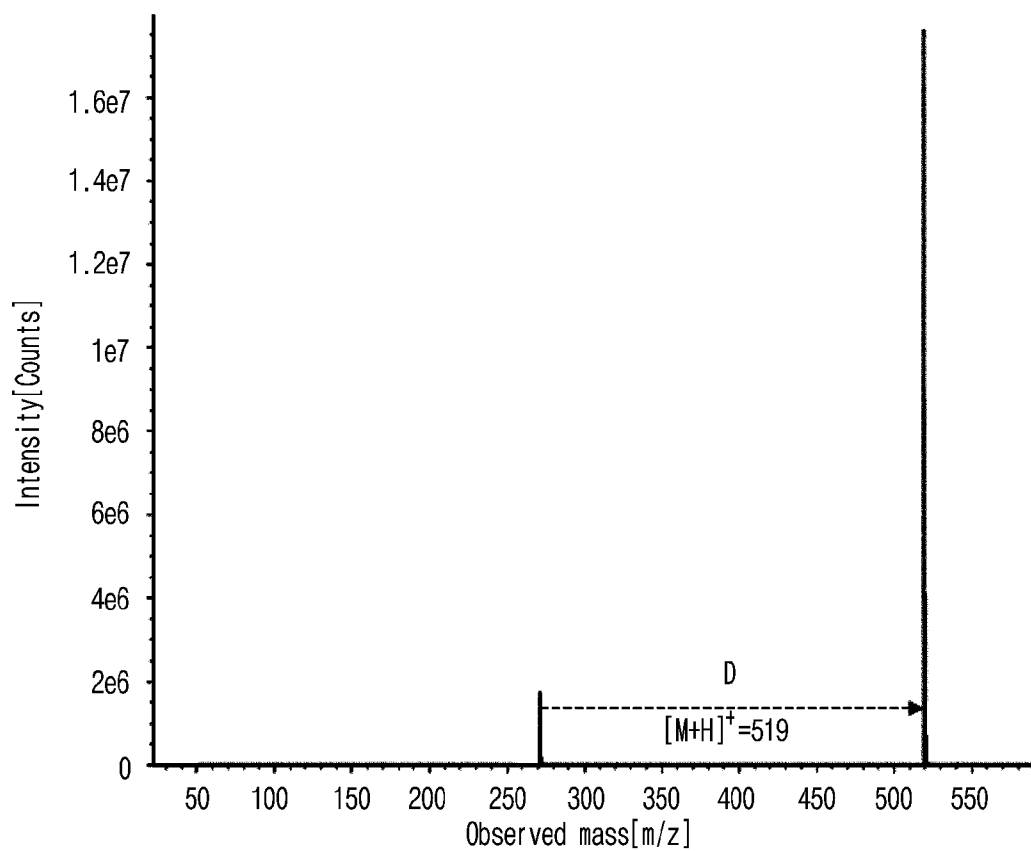
[도6]



[도7]



[도8]



[도9]

