



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0054638
(43) 공개일자 2010년05월25일

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0113632

(22) 출원일자 2008년11월14일

심사청구일자 2008년11월14일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기
획팀

(72) 발명자

오원근

광주광역시 북구 두암동 현대아파트 105-1601

배기환

대전광역시 유성구 지족동 열매마을 506-1502

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

민병준, 이문옥, 박상선, 백경업

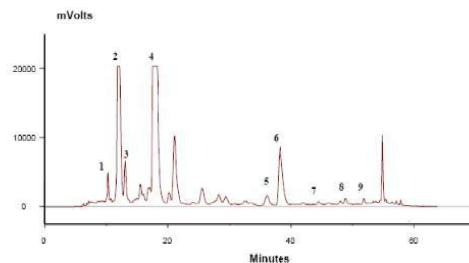
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 쿠딩차 추출물로부터 항산화 활성을 갖는 페놀릭 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 기능성식품

(57) 요약

본 발명은 베트남 전통차로서 사용되고 있는 *Ilex kudingcha*(bitter tea)로부터 항산화 활성을 갖는 페놀릭계 성분을 함유하는 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 베트남에서 전통차로 사용하여 왔지만 항산화 활성을 나타내는 물질에 대한 보고가 없었던 쿠딩차의 알코올 추출물을 용매 분획한 후, 항산화 활성을 보이는 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 항산화 활성을 갖는 화합물 1 내지 화합물 9를 포함하는 쿠딩차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화용 기능성 식품에 관한 것이다. 쿠딩차 추출물은 산화적 스트레스를 저해하는 기능이 우수하므로 쿠딩차 추출물을 포함하는 본 발명의 기능성 식품은 활성산소에 의해 유발되는 질환을 예방 또는 치료하기 위한 기능성 식품의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



화합물 1 (3-caffeoylquinic acid), 화합물 2 (5-CQA), 화합물 3 (4-CQA),
화합물 4 (4-CQA methyl ester), 화합물 5 (4,5-diCQA methyl ester),
화합물 6 (3,5-diCQA methyl ester), 화합물 7 (CA methyl ester), 화합물
8 (3,4-diCQA methyl ester), 화합물 9 (3,5-dicaffeoyl-*epi*-quinic acid
n-butyl ester).

(72) 발명자

탕퐁티엔

베트남 인스티튜트 오브 메디시날 머티리얼스, 3비
광 트롱, 호안키엠 디스트릭트, 하노이, 베트남

누옌두이 투완

3비, 쿠앙 트롱, 호안 키엠 디스트릭트, 하노이,
베트남

특허청구의 범위

청구항 1

쿠딩차(*Ilex kudingcha*) 메탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 관상동맥 심장병, 동맥경화 및 심근경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 심혈관계 질환, 관절염, 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 자가면역질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

쿠딩차(*Ilex kudingcha*) 메탄올 추출물은 화합물 1 (3-caffeoylquinic acid), 화합물 2 (5-caffeoylquinic acid), 화합물 3 (4-caffeoylquinic acid), 화합물 4 (4-caffeoylquinic acid methyl ester), 화합물 5 (4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester), 화합물 6 (3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester), 화합물 7 (caffeic acid methyl ester), 화합물 8 (3,4-dicaffeoylquinic acid methyl ester) 및 화합물 9 (3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester)을 포함하는 그룹에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 건강기능식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 4

쿠딩차(*Ilex kudingcha*) 메탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 관상동맥 심장병, 동맥경화 및 심근경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 심혈관계 질환, 관절염, 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

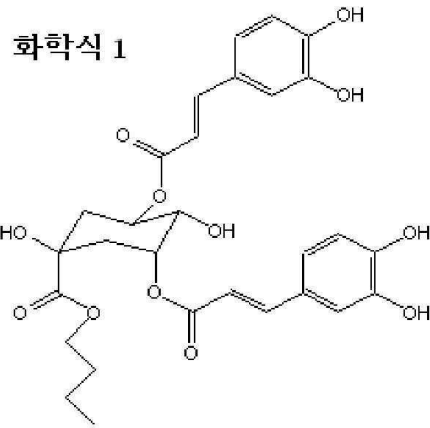
청구항 5

제 4 항에 있어서,

쿠딩차 (*Ilex kudingcha*) 메탄올 추출물은 화합물 1 (3-caffeoylquinic acid), 화합물 2 (5-caffeoylquinic acid), 화합물 3 (4-caffeoylquinic acid), 화합물 4 (4-caffeoylquinic acid methyl ester), 화합물 5 (4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester), 화합물 6 (3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester), 화합물 7 (caffeic acid methyl ester), 화합물 8 (3,4-dicaffeoylquinic acid methyl ester) 및 화합물 9 (3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester)을 포함하는 그룹에서 선택되는 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

쿠딩차(*Ilex kudingcha*) 메탄올 추출물로부터 분리한 하기 화학식 1의 구조를 가지는 3,5-디-오-카페오일-에피-퀴닉산 노르말-부틸 에스테르(3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester) 화합물



청구항 7

3,5-디-오-카페오일-에피-퀴닉 산 노르말-부틸 에스테르(3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester) 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항산화용 조성물.

청구항 8

3,5-디-오-카페오일-에피-퀴닉 산 노르말-부틸 에스테르(3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester) 화합물을 유효성분으로 함유하는 관상동맥 심장병, 동맥경화 및 심근경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 심혈관계 질환, 관절염, 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 자가면역질환의 치료 및 예방용 약학 조성물.

청구항 9

3,5-디-오-카페오일-에피-퀴닉 산 노르말-부틸 에스테르(3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester) 화합물을 유효성분으로 함유하는 관상동맥 심장병, 동맥경화 및 심근경색으로 이루어진 군으로부터 선택되는 심혈관계 질환, 관절염, 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 자가면역질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 건강기능식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 베트남 전통차로서 사용되고 있는 *Ilex kudingcha*(bitter tea)로부터 항산화 활성을 갖는 페놀릭계 성분을 함유하는 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 베트남에서 전통차로 사용하여 왔지만 항산화 활성에 관한 물질에 대하여 연구가 없었던 쿠딩차의 알코올 추출물을 용매 분획한 후, 항산화 활성을 보이는 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 항산화 활성을 갖는 화합물 1 내지 화합물 9을 포함하는 쿠딩차 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화용 기능성 식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 몸은 정상적인 에너지를 생성하는 대사과정에서 활성산소라는 입자가 부수적으로 생산된다. 이러한 활성산소는 화학적 반응성이 뛰어나므로 이들에 의하여 유도된 프리라디칼(free radical) 반응은 생체내의 각종 반응에 영향을 미치며 생체에 치명적인 산소독성을 일으킨다. 즉, 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질

질, 당 및 인체 유전체의 구성물질인 DNA 등에 영향을 주어 암을 비롯한 노화, 동맥경화, 관절염, 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이병 등의 각종 질병의 원인으로 작용하고 있다[Physiol Rev., 82(1), 47-95 (2002); Science, 307, 384-387 (2005)].

[0003] 지금까지 알려진 항산화제로는 BHA(Butylated hydroxy anisole), BHT(Butylated hydroxy toluene) 및 PG(3,4,5-Trihydroxy benzoic acid propyl ester) 등이 있으며 천연 항산화제로는 비타민 E, 비타민 C, 글루타치온 등의 물질이 있다. 그러나 식생활과 생활수준의 향상에 따라 합성 항산화제에 대한 사용은 소비자들이 거부감을 일으키는 단점이 존재한다. 천연 항산화제의 사용은 합성 항산화제에 비하여 생체에 안전하다는 장점은 있으나 그 효과가 약하다는 단점이 있다[FASEB J., 2, 2867-2870 (1988)]. 또한, 최근 합성 항산화제로서 널리 사용되던 BHT가 50mg/kg/day 이상을 섭취시 암을 유발한다는 보고가 있을 정도로 천연 소재로부터 새로운 항산화제의 개발 필요성이 존재한다. 일반적으로, 새로운 성분의 약제를 개발하기 위한 여러 가지 방법 중 기존 약제의 실험적 변형에 의한 노력보다는 전통 의학에서 사용되고 있는 천연물 약제들로부터 새로운 활성 성분을 발견할 수 있는 가능성이 매우 높으며 오랫동안 사용되어 왔기 때문에 개발된 약물들에 의한 독성 염려가 적은 장점이 있다. 따라서 본 연구자들은 독성이 적은 항산화제를 개발하기 위하여 식용으로 사용한 천연물로부터 항산화제 화합물의 탐색을 시도하였다.

[0004] 쿠딩차(*Ilex kudingcha* C.J. Tzeng)는 남부 중국이나 베트남에서 사용되어온 차로 그것의 쓴맛에 기인하여 bitter tea로 불리어져 왔다. 베트남에서는 전통적으로 이 차를 두통, 감기, 고혈압, 고열, 당뇨 등의 치료에 처방하여 왔을 정도로 안전성이 보장된 식물이다. 이러한 쿠딩차와 관계된 특허 및 문헌으로는 acyl-CoA cholesteryl acyl transferase(ACAT)를 저해하는 트리테르페노이드 계열의 화합물[J. Nat. Prod., 62(7), 1061-1064 (1999)], 피부염을 치료하는 차 조성물[미국특허 제2005/0186293호], 사포닌과 ACAT 저해 화합물[일본특허 공개 제2000-44594호]등과 본 연구진들이 베트남에서 발표한 본 발명의 몇몇 화합물의 항산화 효과에 대한 보고[International workshop on herbal medicinal plants and traditional herb remedies, 2007] 등이 있으며, 동속식물로서 남미에서 사용되는 *Ilex paragarariensis*(mate tea)에 관한 항산화 활성[European Journal of Nutrition, 42, 50-54 (2003)]에 대한 보고는 있으나, 쿠딩차 분획물의 화학구조, 물리화학적 특성 및 항산화 활성에 관한 제시나 보고는 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 이에, 본 발명자들은 각종 자생식물 및 한약재를 채집하여 조사하던 중 쿠딩차를 메탄올 추출한 후 크로마토그래피를 이용하여 순수 분리, 정제하여 페놀릭 계열의 화합물 1 내지 화합물 9 를 얻고, 이들의 화학구조, 물리화학적 특성 및 항산화 활성을 조사함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 쿠딩차 유래의 항산화 화합물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 항산화 화합물을 유효성분으로 함유하는 활성산소에 유발되는 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

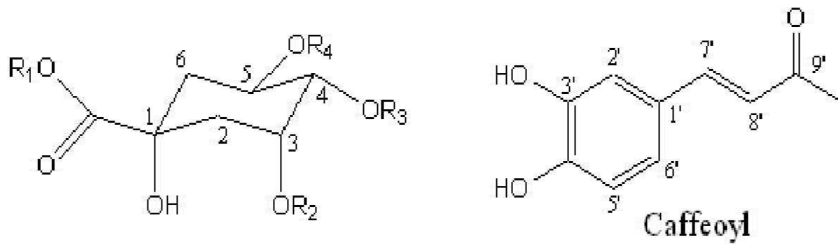
과제 해결수단

[0008] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 쿠딩차 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화용 기능성 식품을 제공한다.

[0009] 본 발명자들은 활성산소를 저해하는 화합물을 찾기 위하여 1,000 여종의 자생식물 및 외국식물을 대상으로 항산화 활성을 검색하여 쿠딩차를 후보물질로 이용하였다. 본 발명에 사용한 쿠딩차 식물은 2004년 봄에 베트남의 카오방(Caobang) 지역에서 채집한 것을 확인하여 확증식물은 베트남 의약물질연구소에 보관되어 있다.

[0010] 본 발명의 기능성식품에 포함되는 쿠딩차 추출물은 알코올 수용액을 이용하여 추출하는 것을 특징으로 한다. 쿠딩차 추출물은 알코올 조추출물, 바람직하게는 에탄올(EtOH) 조 추출물을 얻은 뒤 에틸아세테이트로 분획하며, 크로마토그래피 과정을 거쳐서 하기 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물 9 종을 포함하는 추출물을 얻는다. 또한 구조분석 결과, 본 발명에서 수득한 화학식 3으로 기재되는 화합물 9(3,5-di-O-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester)는 자연계로부터 처음으로 분리한 신규화합물임을 확인하였다.

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013]

[0014]

[0015]

[0016]

[0017]

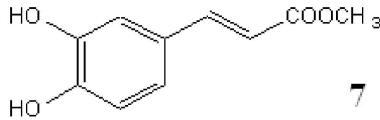
[0018]

[0019]

[0020]

1. R₂ = Caffeoyl, R₁ = R₃ = R₄ = H
2. R₄ = Caffeoyl, R₁ = R₂ = R₃ = H
3. R₃ = Caffeoyl, R₁ = R₂ = R₄ = H
4. R₃ = Caffeoyl, R₁ = CH₃, R₂ = R₄ = H
5. R₃ = R₄ = Caffeoyl, R₁ = CH₃, R₂ = H
6. R₂ = R₄ = Caffeoyl, R₁ = CH₃, R₃ = H
8. R₂ = R₃ = Caffeoyl, R₁ = CH₃, R₄ = H

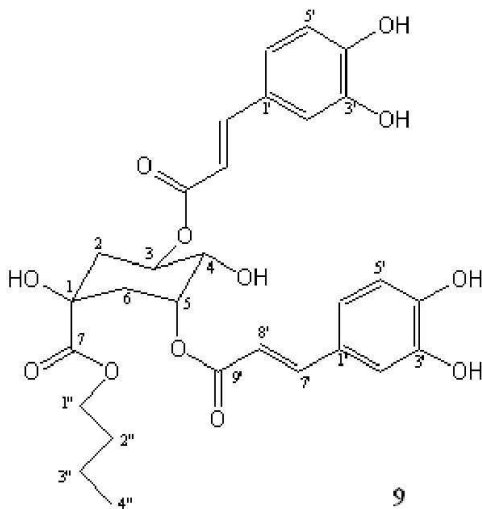
[화학적식 2]



[0021]

[0022]

[화학적식 3]



[0023]

[0024]

상기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 본 발명의 화합물의 경우 쿠딩차 추출물 총 중량에 대하여 화합물 4로 표시되는 화합물은 0.1 내지 10.00 중량%, 화합물 2로 표시되는 화합물은 0.01 내지 1.00 중량%를 함유하는 것이 바람직하다.

[0025]

상기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 본 발명의 화합물은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 활성, 하이드록실 라디칼(hydroxyl), 슈퍼옥사이드(superoxide)(도 1 참조), 지질 과산화 억제 활성, LDL (low density lipoprotein) 산화의 저해작용을 갖는다.

[0026]

본 발명의 항산화 활성을 갖는 기능성 식품에 포함되는 쿠딩차 추출물은 화합물 1 (3-caffeoylquinic acid, 3-CQA), 화합물 2 (5-CQA), 화합물 3 (4-CQA), 화합물 4 (4-CQA methyl ester), 화합물 5 (4,5-diCQA methyl ester), 화합물 6 (3,5-diCQA methyl ester), 화합물 7 (CA methyl ester), 화합물 8 (3,4-diCQA methyl ester), 화합물 9 (3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester)로 표시되는 화합물로 구성된 군으로부터

터 선택된 화합물을 포함하는 것이 바람직하다.

- [0027] 본 발명의 항산화용 활성을 갖는 페놀릭 화합물은 쿠딩차로부터 알코올, 에테르, 아세톤 등의 유기용매에 의하여 추출, 에틸아세테이트와 물의 분배, 칼럼크로마토그래피 등 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합하여 용이하게 얻을 수 있다. 또한, 조추출물은 필요에 따라 상기 방법에 따라서 더욱 정제할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용하는 크로마토그래피에는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이치-20 칼럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등이 이용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 쿠딩차는 전통적으로 차로써 사용되었을 뿐만 아니라 안정도도 높으므로 식품, 의약품 등의 첨가제로 이용할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학조성물은, 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. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 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 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 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, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0031] 상기 활성성분의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.001mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 100mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 추출물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 추출물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 쿠딩차 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 비만 예방을 위한 건강 기능 식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다. 상세하게는, 본 발명은 쿠딩차 추출물을 유효성분으로 함유하는 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 비만 예방 및 치료용 건강 기능 식품을 제공한다.

효 과

- [0033] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 쿠딩차(*Ilex kudincha*) 유래의 추출물 및 이로부터 분리한 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 화합물은 합성 항산화제보다 저해 활성이 강하고 전통적으로 베트남에서 차로 사용되어 왔기에 안전성이 우수하므로 활성산소에 의해 유발되는 질환인 암을 비롯하여 동맥경화, 관절염, 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 자가면역질환 등의 각종 질병에 대한 예방 및 치료와 피부 노화 억제를 위한 식품, 화장품 및 의약품의 소재로서 산업적으로 널리 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0034] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.

[0035] <실시예 1: 항산화 활성물질의 분리 및 정제>

[0036] 쿠딩차의 건조된 잎 2 kg을 잘게 부순 후 메탄올에 2 일간 침지하여 실온에서 추출하였다. 상기 메탄올 추출물을 감압농축한 후, 농축물(680 g)을 물에 용해시킨 뒤 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 등의 용매를 사용하여 분획하여 항산화 활성이 강한 에틸아세테이트 분획물(113 g)을 얻었다. 항산화 작용을 갖는 활성물질을 분리 정제 후 구조를 확인하기 위하여 에틸아세테이트 분획물(1 g)을 메탄올(A)과 물(B)을 이동상으로, 분취용 HPLC[ODS-H80 컬럼(20×150 mm), 유속: 3 ml/min. 용매조건: 0-30 min (45% A), 30-45 min (45→55% A), 45-60 min (55→100% A)]을 실시하였다. 이때 도 3 의 HPLC 그림을 참조하여 실시하였다. 각각 화합물의 칼럼상에서 머무름 시간(t_R)과 활성을 고려하여, 화합물 **1** (t_R , 10.2 min), 화합물 **2** (t_R , 11.9 min), 화합물 **3** (t_R , 12.9 min), 화합물 **4** (t_R , 17.9 min), 화합물 **5** (t_R , 36.0 min), 화합물 **6** (t_R , 38.2 min), 화합물 **7** (t_R , 42.0 min), 화합물 **8** (t_R , 48.9 min)과 화합물 **9** (t_R , 51.8 min)를 얻었다.

[0037] <실시예 2: 분리된 화합물의 구조 분석>

[0038] 상기 실시예 1에서 쿠딩차로부터 분리된 9 종 화합물의 구조를 분석하였다. 화합물의 화학적 구조를 ESI 질량분석기(Electrospray Ionization mass spectrometer)을 사용하여 얻은 분자량 및 핵자기 공명 분석의 ^1H 및 ^{13}C -NMR 분석 결과를 토대로 화합물의 구조를 분석하였다. 신규 화합물 **9** 의 화합물의 구조는 추가적인 핵자기공명(NMR) 분석을 통하여 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HMQC(^1H -detected heteronuclear multiple-quantum coherence), HMBC(heteronuclear multiple-bond coherence), DEPT(distortionless enhancement by polarization) 스펙트럼을 얻고 분자구조를 결정하였다.

[0039] 그 결과, 구조 결정된 화합물은 상기 실시예 1에서 보여준 구조를 갖는 것으로 결정 되었으며 신규 화합물인 화합물 **9** 의 기기 분석값을 표1 에 표시하였다. 또한, 분리된 물질 중 화합물 **9** 는 신규 화합물로 3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester로 구조 결정하였으며 하기와 같은 특성을 갖고 있었다.

[0040] (화학적 특성)

[0041] 3,5-디-오-카페오일 에피-퀴닉 산 노르말-부틸에스테르(3,5-di-*O*-caffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butylester, **9**).

[0042] HR-EIMS m/z 572.1886[M]⁺, calcd.for $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$ 572.1894

[0043] [α]_D 143.4 (c 0.1, MeOH)

[0044] IR(KBr) ν_{max} 3370, 2930, 1720, 1700, 1605, 1540, 1470, 1190 cm^{-1}

[0045] ^{13}C -NMR(CD_3OD , 125 MHz): δ (ppm)175.4 (C-7),168.8 and 168.1 (C-9'),149.9 and 149.7 (C-4'),147.6 and 147.3 (C-3'),147.0 (2C, C-7'),128.0 and 127.8 (C-1'),123.2 and 123.1 (C-6'),116.7 and 116.6 (C-5'),115.6 and 115.0 (C-8'), 115.3 (2C, C-2'), 74.7 (C-1), 72.5 (C-5), 72.0 (C-3), 69.6 (C-4), 36.5 (C-2), 35.7 (C-6), 66.6 (C-1'), 31.7 (C-2'), 20.2 (C-3'), 14.2 (C-3').

[0046] 표1. 화합물 9의 핵자기 공명 분석 결과

[0047]

Position	3,5diCepiQA nbutyl ester (9)
2eq	2.18 m
2ax	2.30 m
3	5.40 dt (8.5, 4.5)
4	3.99 dd (3.0, 6.5)
5	5.29 m

6ax	2.13 m
6eq	2.34 m
2'	7.07 d (2.0), 7.05 d (2.0)
5'	6.79 d (8.0), 6.78 d (8.0)
6'	6.97 dd (2.0, 8.0), 6.96 dd (2.0, 8.0)
7'	7.62 d (15.5), 7.55 d (15.5)
8'	6.34 d (15.5), 6.21 d (15.5)
1"	4.07 m
2"	1.61 m
3"	1.33 m
4"	0.88 t (7.5)

<실시예 3: DPPH 라디칼 소거 활성(DPPH radical scavenging activity)의 측정>

본 발명자들은 상기 실시예 2에서 분리한 화합물들의 DPPH 라디칼 소거 활성(DPPH radical scavenging activity)을 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용하여 측정하여 표2 에 나타내었다. 표2 는 쿠딩차로부터 메탄올 추출물, 핵산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획의 페놀릭 함량과 항산화 활성을 나타내는 도표이다.

DPPH radical 소거활성법은 시료의 free radical 소거능력이나 수소 공여능력을 평가하는 방법으로서 식품을 비롯한 여러 분야에서 널리 사용되고 있는 방법이다. 대부분의 라디칼들은 반응성이 매우 커서 불안정하지만 DPPH 라디칼은 안정한 free 라디칼로서 517 nm에서 강한 흡수를 갖는 화합물이다.

표2.

시료	Free radical scavenging (IC ₅₀ , µg/ml)				Lipid peroxidation (IC ₅₀ , µg/ml)
	DPPH	OH ^a	OH ^b	O ₂	
H ₂ O ex	47.7 ± 2.6	> 100	> 100	12.4 ± 2.6	28.6 ± 5.2
MeOH ex	28.7 ± 3.0	> 100	37.6 ± 10.7	3.4 ± 0.4	17.4 ± 2.3
Hx	> 100	> 100	> 100	> 20	> 100
EA	16.3 ± 0.1	87.5 ± 9.6	27.3 ± 3.7	1.3 ± 0.4	7.1 ± 1.3
Bu	67.5 ± 7.7	> 100	> 100	11.6 ± 1.9	60.8 ± 9.3
(+)Catechin	10.6 ± 2.0	> 100	34.9 ± 5.3	2.0 ± 0.3	3.9 ± 0.9
αTocopherol	19.1 ± 3.6	NA	NA	NA	29.5 ± 2.8

^a Nonsitespecific and ^b Sitespecific assays. NA: not active.

측정 결과, 표2 를 참조하면, 쿠딩차의 에틸아세테이트 층이 다른 용매 분획물에 비하여 DPPH 라디칼 소거활성에 강한 저해활성(16.3 ± 0.1 µg/ml)을 나타내었다. 분리한 화합물 1 - 9은 시행된 항산화활성에 대하여 농도 의존적으로 강한 라디칼 저해 활성을 보여 주었다. 이 수치들은 표3 에 나타내었다. 표3 은 쿠딩차의 에틸 아세테이트 분획으로부터 분리 정제한 화합물의 항산화 활성을 측정한 표이다.

표3.

화합물	Free radical scavenging activity ^b				Lipid peroxidatio	LDL oxidation	
	DPPH	OH ^a	OH ^b	O ₂		AAPH	Cu ²⁺
1	27.3±2.2	> 5	> 5	48.7±4.6	29.6±3.7	23.6±4.8	6.8±1.0
2	29.6±2.5	> 5	> 4.5±0.7	51.4±7.3	22.3±1.8	29.5±3.2	5.9±0.5
3	32.8±3.6	> 5	> 4.1±0.5	38.2±4.6	21.6±2.9	19.9±1.4	7.4±1.6
4	16.4±1.3	> 5	> 5	16.2±0.7	17.7±3.4	20.6±2.2	5.5±0.6
5	17.3±1.7	3.7±0.2	2.2±0.4	13.8±2.0	17.2±1.6	14.6±2.8	2.2±0.4
6	21.6±1.2	3.2±0.3	2.6±0.1	16.4±3.4	14.5±2.7	13.3±3.0	2.5±0.1
7	36.8±4.9	> 5	> 5	51.5±6.4	22.8±6.8	32.6±4.4	5.7±1.3
8	19.5±1.0	4.1±0.6	2.4±0.3	15.5±1.9	15.2±2.2	10.5±0.8	2.8±0.1
9	23.6±1.7	> 5	> 5	15.3±2.6	25.7±0.8	28.6±4.7	3.0±0.4
(+)Catechin	27.6±2.1	3.6±1.1	2.7±0.2	13.2±2.3	18.6±1.3	14.7±3.8	4.6±0.3

BHT	59.7±5.5	> 5	> 5	> 100	6.9±1.9	11.4±1.7	3.3±0.1
α Tocopherol	26.8±1.1	NA	NA	NA	44.9±8.3	NA	17.7±1.6
참조: a Non-site-specific and b Site-specific assays							

[0056] 구체적으로 표3 을 참조하면 화합물 2 (5CQA)와 화합물 4 (4CQA methyl ester)는 쿠딩차에 들어있는 항산화 활성을 갖는 주요성분(도 3 참조)으로 지질 과산화 작용을 저해하는 활성으로 양성 대조군인 α-tocopherol ($IC_{50} = 44.9 \pm 8.3 \mu M$)보다 강하였으며 DPPH, OH, O_2 등에 강한 저해 활성을 보여 주었다.

[0057] <실시예 4: 하이드록실 라디칼 라디칼 소거 활성(hydroxyl radical scavenging activity) 측정>

[0058] Hydroxyl radical (OH)은 생체내에서 생성되는 활성산소 중 가장 반응성이 높은 것으로 알려져 있다. 하이드록실 라디칼은 이온화 방사선을 조사하거나 금속이온의 H_2O_2 의 분해로부터 생성 가능한데 $FeCl_3$ 를 사용하여 측정하였다. 구체적으로 살펴보면, 0.1 mM $FeCl_3$, 0.1 mM ascorbic acid, 0.1 mM EDTA, 10 mM H_2O_2 , 2.8 mM 테옥시리보스에 시료를 첨가한 포스페이트 버퍼 (PBS, 20 mM, pH 7.4)를 1시간동안 상온에서 반응시켰다. 이후 각각 trichloroacetic acid (10%, w/v) 와 thiobacbituric acid (1%, w/v) 250 μl 를 첨가하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였고 그 결과를 표3 에 나타내었다.

[0059] 하이드록실 라디칼은 생체내에서 생성되는 활성산소 중 반응성이 높은 라디칼로 직접적으로 체내 단백질, 지질 및 DNA의 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 측정 결과, 표 3을 참조하면, 분리한 화합물 1 - 9는 농도 의존적으로 강한 하이드록실 라디칼 저해 활성을 보여 주었다. 구체적으로 보면 화합물 5 (4,5diCQA methyl ester, $IC_{50} = 2.2 \pm 0.4 \mu M$)와 화합물 6 (3,5diCQA methyl ester, $IC_{50} = 2.6 \pm 0.1 \mu M$)은 양성 대조군으로 사용한 catechin ($IC_{50} = 2.7 \pm 0.2 \mu M$)과 비슷한 저해 활성을 보여 주었다.

[0060] <실시예 5: 슈퍼옥사이드 라디칼 라디칼 소거 활성(superoxide radical scavenging activity) 측정>

[0061] 슈퍼옥사이드 라디칼 자체는 비교적 반응성이 낮지만, 쉽게 과산화수소수로 변화되어 반응성이 강한 하이드록실 라디칼을 생성하는 것으로 알려져 있다. 슈퍼옥사이드 라디칼은 크산틴/크산틴 산화 효소(xanthine/xanthine oxidase)의 효소반응에 의하여 생성한 라디칼의 저해 정도를 측정하여 표3 에 나타내었다. 구체적으로 보면 20 mM xanthine oxidase, 100 M nitro blue tetrazolium(NBT), 50 M xanthine에 시료를 첨가하여 반응시켰다.

[0062] 측정 결과, 표3 을 참조하면, 분리한 화합물 1 - 9 는 농도 의존적으로 강한 슈퍼옥사이드라디칼 저해 활성을 보여 주었다. 구체적으로 쿠딩차에 들어있는 주요 성분인 화합물 4 (4CQA methyl ester, $IC_{50} = 16.2 \pm 0.7 \mu M$)은 양성 대조군으로 사용한 catechin ($IC_{50} = 13.2 \pm 2.3 \mu M$)과 비슷한 저해 활성을 보여 주었다.

[0063] <실시예 6: 화합물의 저밀도 지질단백질(low density lipoprotein, LDL) 산화 활성 측정>

[0064] LDL 산화는 동맥경화를 유발하는 인자로 중요시 되고 있다. 생체내에서 산화적 스트레스는 혈액 내의 LDL을 산화된-LDL(oxidized-LDL)로 변형시키게 되고, 이것은 혈관의 내막(intima)내로 유입된다. 유입된 산화된-LDL을 단핵구(monocyte)가 탐식하여 거품세포(foam cell)를 형성하면서 동맥경화의 초기단계를 발생시킨다. 항산화제는 이러한 산화된-LDL의 발생을 낮출 수 있는 가능성을 가질 수 있기에 화합물의 LDL 산화 정도를 측정하여 도 2 와 표3 에 나타내었다.

[0065] 항산화 활성은 저밀도 지질단백질의 산화를 유도하는 것으로 알려져 있는 Cu^{2+} 로 생성된 불포화 지방산의 산화 산물인 디알데하이드를 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance)법으로 측정하였다. 구체적으로 보면 사람으로부터 채취한 혈장을 채취하여 초원심분리기로 1.02 - 1.06 g/ml 사이의 비중을 갖는 분획을 분리하였다. 이후 일정량의 LDL(0.1 mg protein/ml)을 첨가한 후 5 mM $CuSO_4$ 나 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)dihydrochloride(AAPH)10 mM PBS 용액을 이용하여 활성을 측정하여 표3 에 나타내었다.

[0066] 측정 결과, 표3 을 참조하면, 분리한 화합물 1 - 9 는 농도 의존적으로 AAPH나 Cu^{2+} 에 유도되는 저밀도 지질단백질의 산화를 저해하였다. 구체적으로 쿠딩차에 들어있는 페놀릭 계열의 화합물은 양성 대조군으로 사용한 (+)-catechin이나 BHT가 AAPH와 Cu^{2+} 에 유도된 산화를 저해하는 것과 같이 비슷하거나 강한 활성을 나타내었다. 더욱

이 양성 대조군으로 사용한 α -tocopherol이 Cu^{2+} 에 유도되는 저밀도 지질단백질의 산화만을 저해($\text{IC}_{50} = 17.7 \pm 1.6 \mu\text{M}$)하는 것에 강한 분리된 화합물들은 AAPH와 Cu^{2+} 에 의한 산화를 모두 저해하였다.

[0067] <실시예 7: 독성시험>

[0068] 상기 실시예 1에서 항산화 활성이 강한 에틸아세테이트 분획물의 랫트에 대한 경구투여에 의한 독성 존재유무를 조사하기 위해 SD계통의 웅성 및 자성 랫트에 각각 1 g/kg, 2 g/kg 및 5 g/kg 3개의 투여용량으로 5 마리씩 단회 경구투여하고 14 일간의 사망예, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 이와 같이 시험한 결과는 본 발명의 조성물의 모든 투여군에서 시험 전 기간동안 관찰시 사망예는 없었으며, 대조군에 비해 특이적으로 관찰된 일반증상의 변화도 없었다.

[0069] 따라서 경구투여에 의한 랫트에서의 LD50 (lethal dose)은 5 g/kg 이상인 것으로 판단된다.

[0070] <실시예 8: 약학적 제제예>

[0071] 8-1. 정제의 제조

[0072] 본 발명에 따른 쿠딩차 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 250 g을 락토오스 175.9 g, 감자전분 180 g 및 콜로이드성 규산 32 g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160 g, 활석 50 g 및 스테아린산 마그네슘 5 g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0073] 8-2. 주사액제의 제조

[0074] 본 발명에 따른 쿠딩차 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 1 g, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르브산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20 °C에서 30 분간 가열하여 멸균시켰다.

[0075] <실시예 9: 식품 제제예>

[0076] 9-1. 조리용 양념의 제조

[0077] 본 발명에 따른 쿠딩차 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 각각 0.2~10 중량부로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0078] 9-2. 밀가루 식품의 제조

[0079] 본 발명에 따른 쿠딩차 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 각각 0.1~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0080] 9-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0081] 본 발명에 따른 쿠딩차 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 각각 0.1~1.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0082] 9-4. 유제품(dairy products)의 제조

[0083] 본 발명에 따른 쿠딩차 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 각각 0.1~1.0 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0084] <실시예 10: 음료 제제예>

[0085] 10-1. 야채주스 제조

[0086] 본 발명에 따른 쿠딩차 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 0.5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0087] 10-2. 과일주스 제조

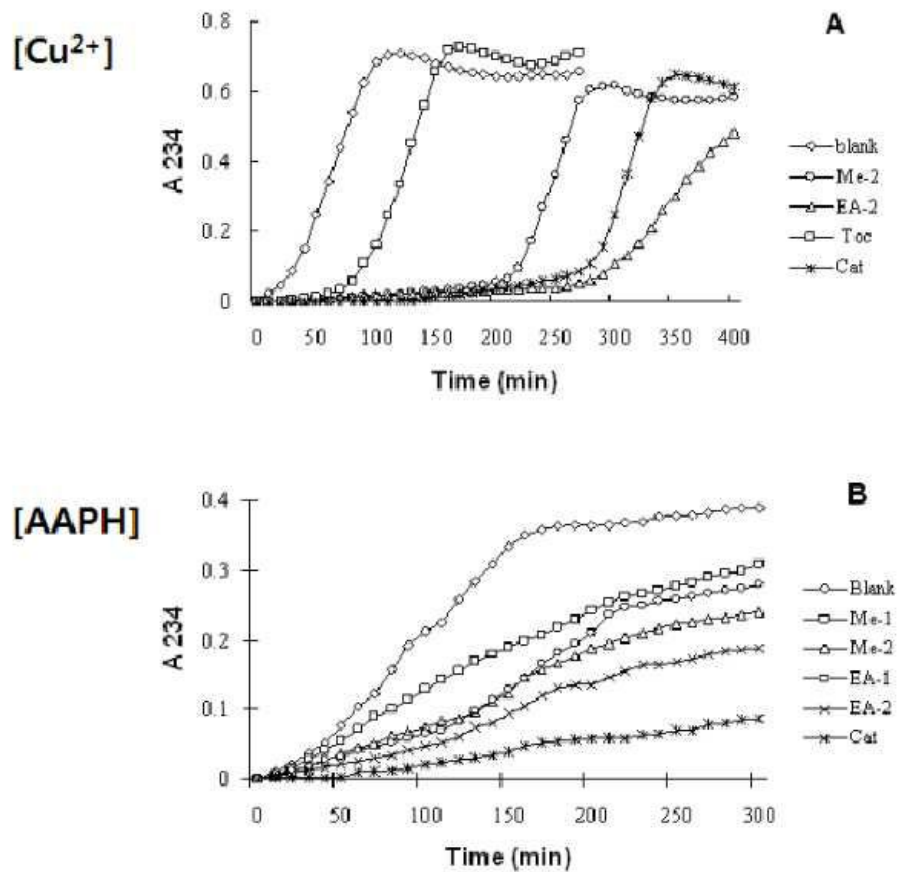
[0088] 본 발명에 따른 쿠딩차 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 0.1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면의 간단한 설명

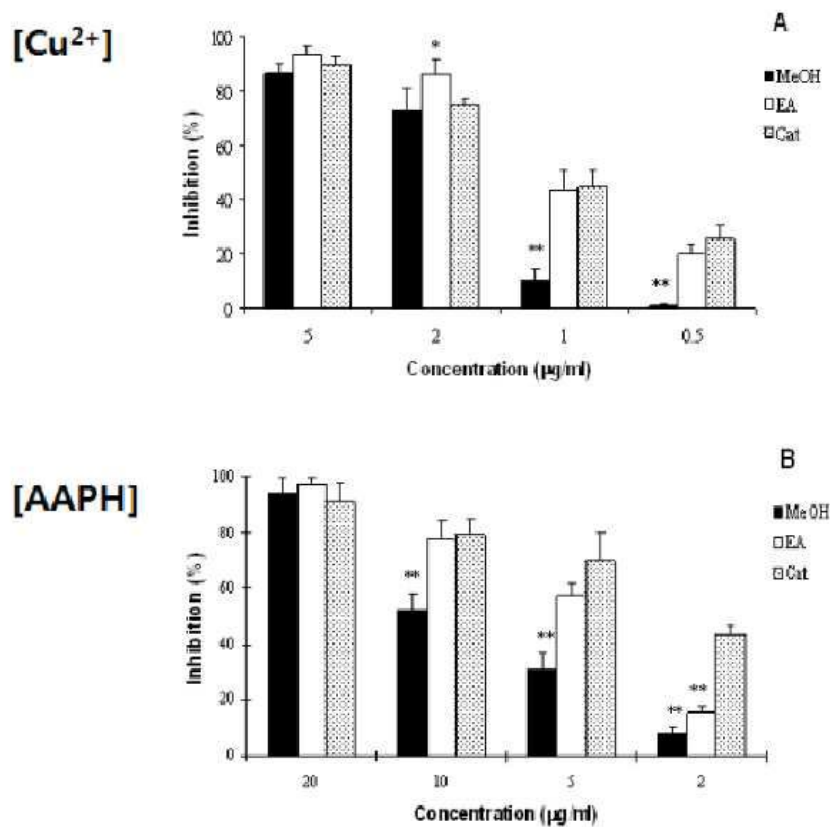
- [0089] 도 1은 쿠딩차로부터 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획의 Cu^{2+} , AAPH에 의해 유도된 LDL 산화 저해활성을 측정한 그래프이다.
- [0090] 도 2는 쿠딩차로부터 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획의 Cu^{2+} , AAPH에 의해 유도된 LDL 산화에 있어서의 TBARS 저해활성을 측정한 그림이다.
- [0091] 도 3은 쿠딩차의 에틸아세테이트 분획으로부터 항산화 활성을 갖는 화합물을 분석하기 위한 HPLC 그림이다.

도면

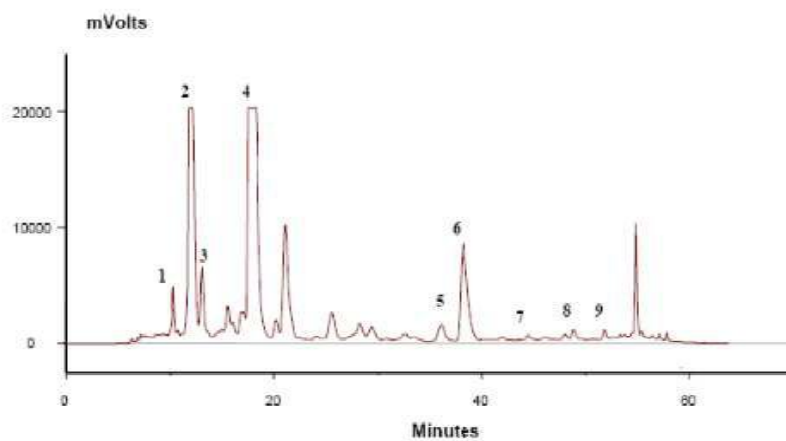
도면1



도면2



도면3



화합물 1 (3-caffeoylquinic acid), 화합물 2 (5-CQA), 화합물 3 (4-CQA), 화합물 4 (4-CQA methyl ester), 화합물 5 (4,5-diCQA methyl ester), 화합물 6 (3,5-diCQA methyl ester), 화합물 7 (CA methyl ester), 화합물 8 (3,4-diCQA methyl ester), 화합물 9 (3,5-dicaffeoyl-*epi*-quinic acid *n*-butyl ester).