

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12P 19/00

(45) 공고일자 1999년 10월 01일
(11) 등록번호 10-0218552
(24) 등록일자 1999년 06월 10일

(21) 출원번호 10-1997-0023369
(22) 출원일자 1997년 06월 05일

(65) 공개번호 특 1999-0000457
(43) 공개일자 1999년 01월 15일

(73) 특허권자 재단법인 한국인삼연초연구원 박명규
대전광역시 유성구 신성동 302
(72) 발명자 고성룡
대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 113동 303호
최강주
대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 119동 1101호
김영희
대전광역시 유성구 어은동 99번지 한빛아파트 105동 1704호
김만욱
경기도 군포시 산본동 1092 장미아파트 1237동 1204호
성현순
대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 131동 1305호
(74) 대리인 백문구

심사관 : 이처영

(54) 미량 진세노사이드의 제조방법

요약

본 발명은 인삼의 재배과정에서 얻어지는 잎, 줄기, 과육과 같은 지상부로부터 20(S)-진세노사이드 Rh₁이 다량 함유된 사포닌을 제조하기 위한 것임. 인삼 지상부에서 추출된 사포닌 혼합물을 수용성용매중에서 효소 락타제와 반응시켜 얻어지며, 생성된 사포닌성분중에는 20(S)-진세노사이드 Rh₁을 70% 이상 고농도로 함유하고 있음. 본 발명은 인삼의 지상부를 활용함으로 경제적인 방법일 뿐 아니라 화학적 방법에 비하여 인체에 전혀 유해성이 없는 효소만을 이용 간단한 효소적 반응으로 20(S)-진세노사이드 Rh₁의 생성 수율을 현저하게 높일 수 있는 장점이 있다.

영세서

[발명의 명칭]

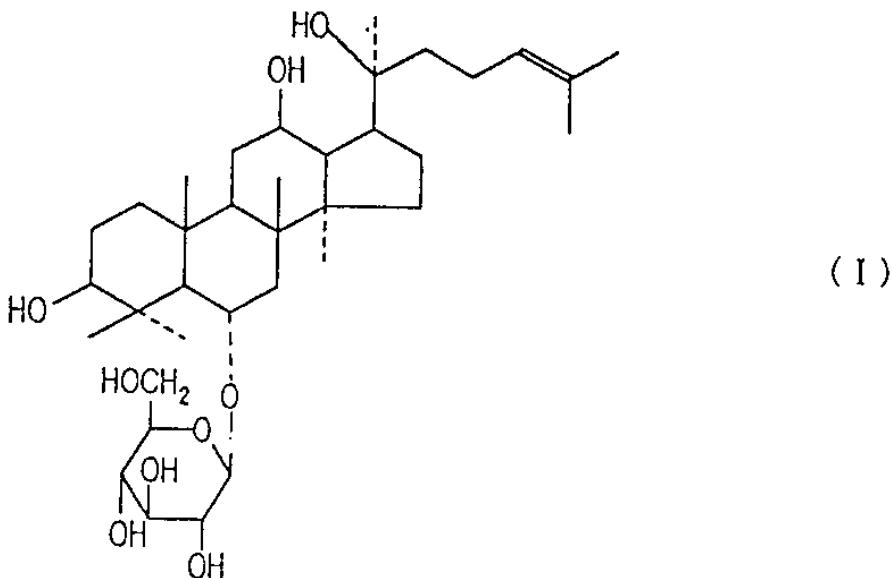
미량 진세노사이드의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

[발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술]

본 발명은 효소적방법에 의해 인삼의 잎, 줄기, 과육과 같은 지상부로부터 다음 일반식(I)으로 표시되는 20(S)-프로토파낙사트라이올-6-0-베타-디-글루코피라노사이드 [20(S)-진세노사이드 Rh₁이라 함]가 다량으로 함유된 미량 진세노사이드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

화학식 1



상기 일반식(I)의 20(S)-진세노사이드 Rh₁은 실험적 간장해 억제작용, 종양세포(F9 세포) 분화 촉진작용, 혈소판응집 억제작용 및 선용활성화작용이 있는 성분으로 이미 알려져 있다.

인삼 특유의 약리활성 사포닌인 진세노사이드 유도체들은 다마란계의 트리테르페노이드인 프로토파낙사다이올과 프로토파낙사트라이올의 알코올성 수산기에 글루코오스, 랑노스, 자일로스 또는 아라비노스와 같은 당류가 결합한 화합물들로서 현재까지 고려인삼에서 30여종의 유도체들이 밝혀져 있다. 또한 인삼 사포닌은 아글리콘에 결합되어 있는 당의 종류나 결합된 당류의 수 또는 결합위치에 따라 약리효능이 각각 다르다는 것이 이미 밝혀져 있으며, 특히 수삼이나 백삼에 함유되어 있는 주요 사포닌의 약리효능에 대해서는 많은 연구가 행해졌으나 주로 홍삼에만 존재하는 미량사포닌의 약리효능에 관한 연구는 상대적으로 적은 편이다.

홍삼은 수삼을 수증기 처리하여 제조하는데 이 과정에서 구조적으로 불안정한 진세노사이드의 아글리콘 C-20위치에 결합되어 있는 배당체결합이 쉽게 가수분해됨과 동시에 수산기가 반전 평형을 일으켜 C-20(R)과 C-20(S)의 이성체가 생성된다. 따라서 홍삼에는 프로사포게닌인 20(R&S)-진세노사이드 Rg₂, Rg₃, Rh₁ 및 Rh₂가 수삼이나 백삼에 비해 월등히 많이 함유되어 있으며, 특히 진세노사이드 Rh₁은 홍삼의 특유 성분이나 홍삼에는 이 성분이 20(R&S) 이성체 혼합물로 존재하기 때문에 20(S)-진세노사이드 Rh₁ 만을 분리하는데는 많은 어려움이 있다. 또한 화학적인 방법에 의해 인삼에 많이 함유된 트라이올 타입 사포닌으로부터 20(S)-진세노사이드 Rh₁을 제조할 수도 있으나 제조과정에서 C-20위치에 있는 수산기의 반전 평형에 의한 C-20(R)과 C-20(S) 이성체 혼합물의 생성, 탈수, 히드록실화 반응과 같은 바람직하지 못한 부반응을 동반하기 때문에 수율이 극히 낮고 여러 단계의 반응을 거쳐야 하는 등의 문제점이 있다(예를 들면 대한민국 특허 제4066호, 제8291호).

한편 인삼은 주로 뿌리를 이용하고, 잎, 줄기 및 씨를 물러싸고 있는 과육 등을 거의 이용되고 있지 않은 실정이다. 그러나 인삼의 지상부는 다음의 표 1에서 알 수 있는 바와 같이 인삼근에 비해 사포닌이 월등히 많이 함유되어 있으며 특히 파낙사트라이올형의 사포닌함량이 높게 분포하고 있으나 진세노사이드 Rh₁은 포함되지 않은 것으로 알려져 있다.

[표 1]

인삼뿌리, 잎, 과육중에 함유된 진세노사이드 함량

(단위 : 건물중 %)

시료	진세노사이드												Crude saponin	
	Ro	Ra	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rf	Rg ₁	Rg ₂	Rg ₃	Rh ₁		
뿌리	0.04	0.03	0.63	0.34	0.33	0.15	0.35	0.07	0.40	0.05	0.02	0.01	2.42	4.78
잎	-	-	0.29	0.92	0.65	2.32	3.24	0.11	3.32	0.07	-	-	10.92	19.58
과육	-	-	0.65	1.42	1.00	2.13	5.43	-	1.45	0.38	0.30	-	12.76	21.39

본 발명자들은 인삼의 지상부를 활용하여 인삼 뿌리에만 미량 함유된 생리활성 미량사포닌을 얻기 위하여 인삼 지상부를 용매 추출하여 얻은 조사포닌 분획에 미생물에서 분리한 락타제를 함께 반응시키면 단기간 내에 C-20위치의 배당체결합이 선택적으로 절단되어 천연형이면서 여러가지 효능을 지닌 20(S)-진세노사이드 Rh₁ 고수율로 생성된다는데 착안하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[발명의 이루고자 하는 기술적 과제]

본 발명의 목적은 용도가 없어 대부분이 폐기되고 있는 인삼의 잎, 줄기, 과육 등의 인삼 지상부로부터 20(S)-진세노사이드 Rh₁를 다량 함유하는 미량 진세노사이드를 제조하기 위한 것이다.

전술한 본 발명의 목적은 인삼의 지상부로부터 얻은 조사포닌 분획이나 인삼을 추출하여 얻은 엑스를 물을 포함하는 용매중에서 효소와 반응시키는 방법에 의하여 달성된다.

본 발명의 방법은 인삼의 잎, 줄기, 과실의 과육과 같은 인삼 지상부를 추출하여 얻은 조사포닌 분획이나 인삼 추출 엑스를 수성용매 또는 유기용매의 혼합액중에서 효소인 락타제와 반응시키는 방법으로 구성된다.

본 발명에 사용되는 용매로는 효소의 활성을 저하시키지 않는 것이라면 특별히 제한을 받지 않으나 pH 4~8, 특히 pH 4~6 범위의 완충용액이 바람직하다. 또한 수성용매와 유기용매의 혼합액을 사용할 수도 있는데, 유기용매로는 물과 혼화되는 것이라면 특히 제한을 받지 않으나 그 중에서도 아세토니트릴, 디옥산, 디메틸 셀록사이드, 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올 등이 바람직하다. 수성용매와 유기용매의 혼합비율은 반응에 사용되는 진세노사이드를 용해시킬 수 있고 효소의 활성을 저하시키지 않는 범위라면 큰 문제점은 없으며, 용매의 량은 사용한 기질을 기준으로 1~50% 농도, 특히 2~30% 농도가 되도록 하는 것이 바람직하다.

본 발명에 의하면 효소로는 아스퍼질러스 또는 페니실리움속에서 분리한 락타제가 사용되며, 효소의 첨가 방법은 효소의 불활성화가 일어나지 않는 방법이라면 특별히 제한을 받지 않는다.

반응온도는 효소의 불활성화가 일어나지 않는 온도조건이어야 하며 수성용매만을 사용하는 경우는 60°C 이하, 수성용매와 유기용매의 혼합액을 사용하는 경우는 40°C 이하가 바람직하다. 본 발명에 사용되는 반응 시간 역시 효소의 활성이 유지되는 기간이라면 특별히 제한을 받지 않으나 1~72시간, 바람직하게는 24~48시간이 적당하다.

본 발명에 의한 20(S)-진세노사이드 Rh₁이 다량 함유된 미량 진세노사이드를 제조하는 방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

인삼의 지상부를 용매추출하여 얻은 조사포닌 분획을 수성용매에 용해시킨 다음, 여기에 아스퍼질러스속에서 분리한 락타제를 가하여 20~60°C에서 1~72시간 반응시키고, 비등 수욕조에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켜 천연형의 20(S)-진세노사이드 Rh₁을 고농도로 함유하고 있는 반응액을 얻는다. 필요에 따라서는 크로마토그래피법 등의 공지방법을 이용하여 20(S)-진세노사이드 Rh₁을 분리할 수 있다. 이와 같은 효소적 방법에 의하면 종래 화학적 방법을 사용하는 경우보다 수율이 높고 단기간 내에 반응이 이루어지며 20(S)형의 진세노사이드 유도체만이 생성되기 때문에 분리하기가 용이하다. 본 발명에 의해 제조된 생성물은 다음과 같은 물리화학적 성상을 나타내어 이들을 20(S)-진세노사이드 Rh₁로 동정하였다.

[20(S)-진세노사이드 Rh₁의 물리화학적 성상]

mp : 210~212°C (분해)

IR(cm⁻¹) : 3420(히드록실), 1636(올레피닉)

Positive FAB-MS : m/z 639.5(M+1)⁺

¹H-NMR(δ) : 5.04(1H, d, J=7.78 Hz, β-아노머릭)

¹³C-NMR(ppm) : 16.4, 16.7, 17.3, 17.6, 17.7, 23.0, 25.8, 26.8, 27.0, 27.8, 31.2, 31.7, 32.0, 35.8, 39.4, 39.6, 40.3, 41.1, 45.2, 48.2, 50.2, 51.6, 54.7, 61.4, 63.1, 71.0, 71.8, 73.0, 75.4, 78.1, 78.6, 79.5, 80.0, 105.9, 126.3, 130.8

이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

[실시예]

[실시예 1]

인삼의 잎에서 분리한 조사포닌 분획 1g을 10ml의 0.1M 초산완충용액(pH 4.5)에 용해시키고 아스퍼질러스 속에서 분리한 락타제 2g을 첨가하여 37°C 수욕조상에서 교반하면서 48시간 반응시킨다. 박총크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여 기질이 완전히 소실되면 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액은 수포화 부탄올로 추출, 농축한다. 반응생성물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=90:10:5)로 분리하여 20(S)-진세노사이드 Rh₁ 488mg을 얻었다.

[실시예 2]

인삼의 과실에서 분리한 조사포닌 분획 1g을 10ml의 초산완충용액(pH 4.8)에 용해시키고 페니실리움속에서 분리한 락타제 3g을 첨가하여 37°C의 수욕조상에서 교반하면서 72시간 반응시킨다. 반응액은 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음 수포화 부탄올로 추출, 농축한다. 반응생성물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=90:10:5)로 분리하여 20(S)-진세노사이드 Rh₁ 505mg을 얻었다.

[실시예 3]

인삼의 줄기로부터 얻어진 조사포닌 분획 1g을 10ml의 초산완충용액(pH 5.3)에 용해시키고 페니실리움속에서 분리한 락타제 3g을 첨가하여 50°C의 수욕조상에서 교반하면서 72시간 반응시킨다. 반응액은 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음 수포화 부탄올로 추출, 농축하여 분말상의 반응생성물 0.79g을 얻었다. 반응생성물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=90:10:5)로 분리하여 20(S)-진세노사이드 Rh₁ 460mg을 얻었다.

[실시예 4]

인삼의 잎에서 분리한 조사포닌 분획 1g을 20% 아세토니트릴을 함유하는 초산완충용액(pH 5.0) 10ml에 용해시키고 락타제 5g을 첨가하여 20°C의 수욕조상에서 교반하면서 72시간 동안 반응시킨다. 반응액은 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음 수포화 부탄올로 추출, 농축하여 분말상의 생성물 0.87g을 얻었다. 반응생성물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=90:10:5)로 분리하여 20(S)-진세노사이드 Rh₁ 490mg을 얻었다.

[실시예 5]

인삼의 잎에서 분리한 조사포닌 분획 1g을 20% 에탄올을 함유하는 시트레이트-포스페이트 완충용액(pH 5.0) 20ml에 용해시키고 락타제 5g을 첨가하여 20°C의 수욕조상에서 교반하면서 72시간 동안 반응시킨다. 반응액은 열수중에서 가열하여 반응을 종료시킨 다음 다이아이온 HP-20 수지를 충진시킨 컬럼에 흡착시킨 후 당류와 효소는 종류수로 세척하여 제거하고 반응생성물은 메탄올로 용출시켜 농축한다. 농축액은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=90:10:5)로 분리하여 20(S)-진세노사이드 Rh₁ 487mg을 얻었다.

[실시예 6]

인삼추출 액스 1g을 물 10ml에 용해시키고 여기에 페니실리움속에서 분리한 락타제 2g을 첨가하여 37°C의 수욕조상에서 교반하면서 48시간 반응시킨다. 반응액은 열수중에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시킨 다음 수포화 부탄올로 추출, 농축한다. 농축액은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름-메탄올-물=65:35:10)에 의해 분리하여 20(S)-진세노사이드 Rh₁ 74mg을 얻었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

인삼의 잎, 과육, 줄기, 뿌리 및 이들의 혼합물로부터 용매추출하여 얻은 조사포닌분획이나 인삼추출 액스를 용매중에서 효소 락타제와 반응시킴으로서 20(S)-진세노사이드 Rh₁를 다량 함유하는 미량 진세노사이드의 제조방법.

청구항 2

제1항에서, 기질이 인삼의 지상부에서 얻어진 조사포닌 분획 또는 인삼근에서 얻어진 트라이올형 사포닌 분획임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에서, 효소가 아스퍼질러스와 페니실리움속 중의 하나에서 분리한 락타제임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에서, 용매가 완충용액, 물 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 수성용매를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에서, 용매가 아세토니트릴, 아세톤, 디옥산, 디메틸설폐사이드, 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 유기용매를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에서, 용매가 수성용매와 유기용매의 혼합물이고, 유기용매는 중량으로 수성용매의 30% 이하로 사용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에서, 반응이 10~60°C에서 진행됨을 특징으로 하는 방법.