



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0010698
(43) 공개일자 2018년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07J 17/00 (2006.01) C07J 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07J 17/005 (2013.01)
C07J 9/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0093240
(22) 출원일자 2016년07월22일
심사청구일자 2016년07월22일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
송규용
대전광역시 중구 태평로 55, 412동 101호 (태평동, 삼부아파트4단)
이지현
대전광역시 서구 청사로 281, 201동 506호 (둔산동, 샘머리아파트2단지)
(74) 대리인
특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 3 항

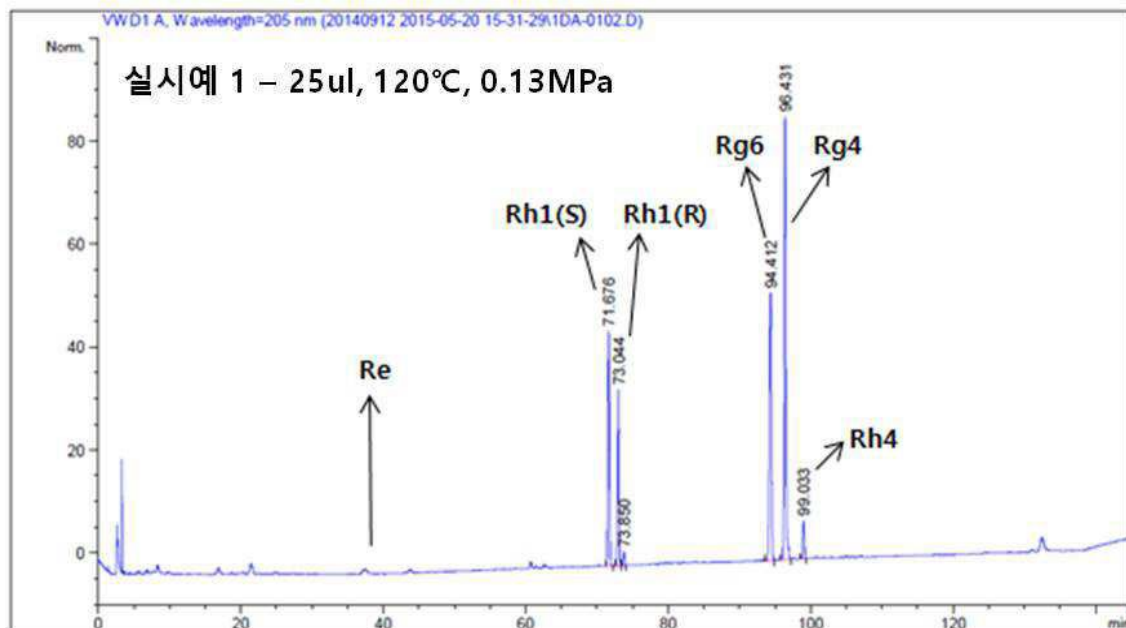
(54) 발명의 명칭 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 대량 제조방법

(57) 요약

본 발명은 진세노사이드 Re에 증류수를 혼합한 다음, 고온 고압 처리를 하여 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 특이 진세노사이드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 특이 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6은 인삼 추출물에 미량으로 존재하기 때문에, 정제되는 양이 매우 적어 이

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



를 이용하기가 쉽지 않았으나, 본 발명을 통해서는 인삼의 잎으로부터 용이하게 분리 가능한 진세노사이드 Re만을 이용하여 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6를 제조하기 때문에, 인삼, 홍삼, 흑삼 등의 추출물을 이용할 때와 비교하여 상대적으로 진세노사이드 Rc, Rd, Rf 등으로부터 생성될 수 있는 진세노사이드의 혼입을 막을 수 있어, 특히 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 정제가 쉽고, 대량생산이 아주 용이하다. 또한, 산처리를 통해 상기 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6를 제조하는 경우 분리 정제시 분리 레진이 오염되어 장기사용이 어려우므로 경제적 손실이 발생할 수 있으나, 본 발명의 방법은 진세노사이드 Re에 증류수를 혼합하여 고온 고압 처리함으로써 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 대량 제조가 가능하므로, 분리 과정에서 발생할 수 있는 오염 문제도 해결할 수 있어 특히 진세노사이드의 제조가 용이하다.

(72) 발명자

조수현

대전광역시 서구 문예로 174, 116동 105호(문산동, 샘머리아파트1단지)

윤은주

대전광역시 대덕구 계족로690번길 21, 104동 601호(법동, 선비마을1단지아파트)

오유석

대전광역시 서구 월평새뜸로8번길 41, 301호(월평동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0299092

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 중소기업청

연구사업명 중소기업청(산학연공동기술개발 지원사업)

연구과제명 인삼부산물을 활용한 기능성 화장품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

(1공정) 인삼으로부터 진세노사이드 Re를 분리 제조하는 단계;

(2공정) 1공정에서 분리 제조된 진세노사이드 Re 100중량부에 증류수 0.2~0.4중량부를 혼합하는 단계;

(3공정) 2공정에서 증류수를 혼합한 진세노사이드 Re를 고온 고압 처리하는 단계; 및

(4공정) 3공정에서 고온 고압 처리된 진세노사이드 증숙물을 크로마토그래피하여 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 진세노사이드를 분리 제조하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 Re로부터 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 진세노사이드를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 3공정의 고온 고압 처리는 7~9시간 동안, 110~140℃의 온도범위 및 0.11~0.16MPa의 압력 조건으로 수행하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 Re로부터 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 진세노사이드를 제조하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 4공정의 진세노사이드 증숙물을 크로마토그래피하여 순도 90% 이상의 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 진세노사이드를 얻는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 Re로부터 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 진세노사이드를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진세노사이드 Re로부터 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 진세노사이드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인삼(*Panax ginseng*)은 오갈피나목과(*Araliaceae*) 인삼 속에 속하는 다년생 초본류로, 한국과 중국에서 각종 질병의 예방 또는 치료에 전통적으로 사용되어왔으며, 치료 효과가 우수할 뿐만 아니라 장기간 사용하여도 전혀 부작용이 없다고 알려져 있다.

[0003] 인삼의 주요 효능을 나타내는 인삼 사포닌(saponin)은 진세노사이드(ginsenoside)로 불리며, 다른 식물에서 발견되는 사포닌과는 다르게 특이한 화학구조와 약리효능을 가진 것으로 알려져 있다.

[0004] 진세노사이드는 트리테르페노이드(triterpenoid) 계열의 담마란(dammarane) 골격에 글루코즈(glucose), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xylose), 람노스(rhamnose) 등이 결합되어 있는 중성배당체이며, 현재 약 30종 이상의 화학 구조가 밝혀졌고, 화학 구조의 특성에 따라 프로토파낙사디올(protopanaxadiol, PPD)계(19종), 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol, PPT)계(10종) 및 올레안(oleanane)계(1종)로 구분된다.

[0005] 수삼이나 백삼에 존재하는 주요 진세노사이드는 Rg1, Re, Rf, Rh1, Rb1, Rb2, Rc, Rd 등으로, 전체 진세노사이드의 80~90% 이상을 차지한다. 반면, 특이 진세노사이드의 경우에는, 상기 다량으로 존재하는 진세노사이드로부터 당의 일부가 떨어져 나가거나 탈수반응이 일어나서 생성되는데, 인삼을 물과 알코올로 추출한 추출물에는 미

량으로 존재한다.

[0006] 진세노사이드에 의한 약리 활성은 상기 다량으로 존재하는 진세노사이드로부터 기인되는 특이 진세노사이드에 의해 나타나며, 면역력강화, 항염증, 항알러지, 항암, 혈압강하, 항콜레스테롤, 항혈전, 항노화, 항산화, 두뇌 활동 촉진, 피부미용 효과 등이 주요 효능으로 알려져 있다(Kim, Y. S. et al., Arch Pharm Res., 2000; Tachikawa, E. et al., Biochem Pharmacol., 2003; Tsai, S. C. et al., Chin J Physiol., 2003; Shibata, S., J Korean Med Sci., 2001). 또한, 특이 진세노사이드의 경우, 다량으로 존재하는 진세노사이드와는 다르게 장내 흡수율이 우수하여 각종 질환의 약학적 조성물로서 사용되기에 적합하다. 이에, 약리 활성이 우수하고 흡수가 용이한 특이 진세노사이드를 대량으로 제조하는 방법에 대한 연구가 요구된다.

[0007] 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 또는 Rg6를 제조하는 방법과 관련하여, 한국등록특허 제10-0564383호에는 진세노사이드 Re와 Rg1을 구연산 이용하여 F4(Rg4), Rg6, Rk3 및 Rh4의 혼합물 제조방법에 대해 개시되었으며, 한국등록특허 제10-1625474호에는 진세노사이드 Re에 유기산을 혼합한 다음 고온 고압 처리를 하여 진세노사이드 Rh4를 대량 제조하는 방법이 개시되었고, 한국공개특허 제10-2012-0134166호에는 유산균을 이용하여 미량 진세노사이드를 고농도로 함유하는 인삼 추출물의 제조방법이 개시되어 있으나, 진세노사이드 Re에 증류수를 혼합한 후 고온 고압 처리하여 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6를 제조한 방법에 대해서는 개시된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0564383호(진세노사이드 유도체의 제조방법, 2006년 03월 20일, 등록)
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1625474호(진세노사이드 알에이치4의 대량 제조방법, 2016년 5월 24일, 등록)
(특허문헌 0003) 한국공개특허 제10-2012-0134166호(미량 진세노사이드를 고농도로 함유하는 인삼 추출물의 제조방법, 2012년 12월 12일, 공개)

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Kim, Y. S. et al., Differential expression of protein kinase C subtypes during ginsenoside Rh2-induced apoptosis in SK-N-BE(2) and C6Bu-1 cells, Arch Pharm Res., 23(5), 518-524, 2000.
(비특허문헌 0002) Shibata, S., Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds, J Korean Med Sci., 16(suppl), S28-37, 2001.
(비특허문헌 0003) Tachikawa, E. et al., In vitro inhibition of adrenal catecholamine secretion by steroidal metabolites of ginseng saponins, Biochem Pharmacol., 66(11), 2213-2221, 2003.
(비특허문헌 0004) Tsai, S. C. et al., Stimulation of the secretion of luteinizing hormone by ginsenoside-Rb1 in male rats, Chin J Physiol., 46(1), 1-7, 2003.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 진세노사이드 Re로부터 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 진세노사이드를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 진세노사이드 Re로부터 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 진세노사이드를 제조하는 방법에 관한 것으로,

[0012] (1공정) 인삼으로부터 진세노사이드 Re를 분리 제조하는 단계;

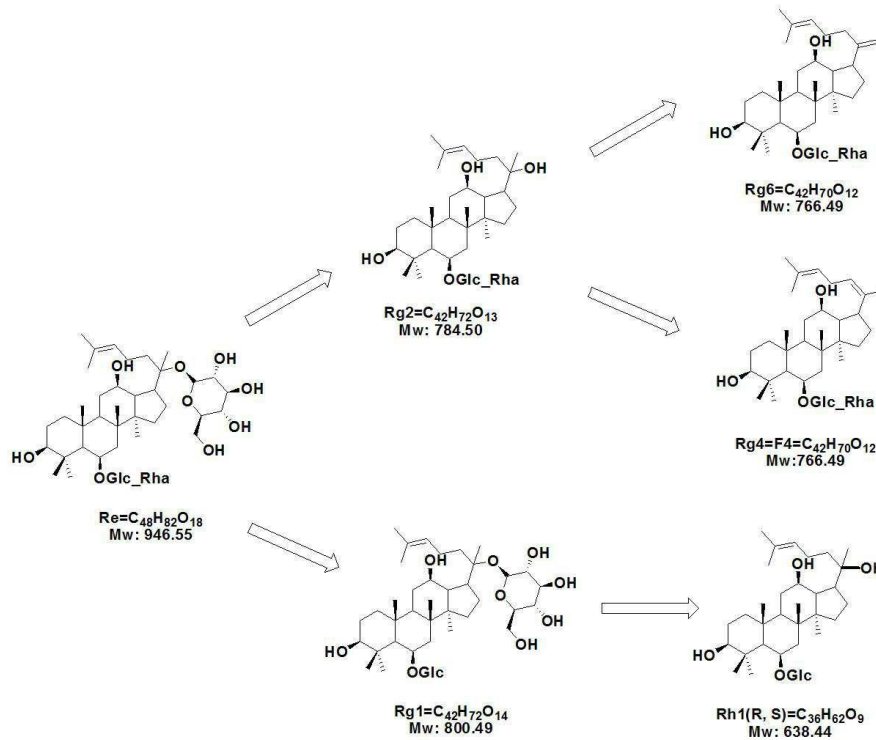
[0013] (2공정) 1공정에서 분리 제조된 진세노사이드 Re 100중량부에 증류수 0.2~0.4중량부를 혼합하는 단계;

[0014] (3공정) 2공정에서 증류수를 혼합한 진세노사이드 Re를 고온 고압 처리하는 단계; 및

[0015] (4공정) 3공정에서 고온 고압 처리된 진세노사이드 증숙물을 크로마토그래피하여 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 진세노사이드를 분리 제조하는 단계; 를 포함한다.

[0016] 또한, 하기 반응식 1의 과정을 통해 진세노사이드 Re로부터 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6를 생성한다.

[0017] [반응식 1]



[0018]

[0019] 상기 1공정의 진세노사이드 Re는, 인삼 추출물로부터 얻은 것이며, 상기 인삼 추출물은 인삼의 뿌리, 열매, 잎, 줄기 등의 인삼 유래의 모든 것을 이용하여 제조할 수 있으나, 바람직하게는 인삼의 잎으로부터 다량의 진세노사이드 Re를 얻을 수 있다.

[0020] 상기 진세노사이드 Re의 추출에 이용되는 인삼은 파낙스(*Panax*) 속에 속하는 다년생 식물로, 고려인삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*Panax quinquefolia*), 전칠삼(삼칠, *Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonicus*), 히말라야삼(*Panaxa pseudoginseng*), 베트남삼(*Panax vietnamensis*), 파낙스 엘레가티오르(*Panax elegatior*), 파낙스 완지아누스(*Panax wangianus*) 및 파낙스 비핀라티피두스(*Panax bipinratifidus*), 파낙스 안구스티폴리움(*Panax angustifolium*)에서 선택되는 1종 이상의 인삼을 이용할 수 있고, 사포닌 함량이 많다고 알려진 고려인삼을 사용하는 것이 가장 바람직하나, 인삼 종류가 특별히 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 인삼 추출물은, 인삼을 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용액을 용매로 하여 추출할 수 있으며, 상기 C1 내지 C4의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 및 이소부탄올로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 인삼 추출물의 제조시 사용되는 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용액은 사용되는 인삼의 중량 대비 1~40배 부피(인삼 1kg 기준 1~40ℓ)를 사용할 수 있고, 바람직하게는 5~40배를 사용할 수 있으며, 상기 과정은 1~4번까지 반복할 수 있다.

[0022] 상기 인삼 추출물로부터 진세노사이드 Re를 추출하기 위해서는 당분야의 통상적인 방법으로서 인삼의 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용액 추출물을 물에 녹인 후에 n-헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 클로로포름, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, 수포화부탄올 및 n-부탄올로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매를 사용하여 추가적으로 분획하거나, 이들 용매들을 조합하여 순차적으로 분획한 다음, 컬럼크로마토그래피

를 이용하여 정제할 수 있다. 또한, 상기 추출물 또는 이의 분획물의 추출시간은 특별히 제한되는 것은 아니나, 10분 내지 1일 이내에 추출하는 것이 바람직하며, 추출용 기기로는 통상의 추출기기, 초음파분쇄추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.

[0023] 한편, 상기 인삼 추출물은 상법에 따라, 유기용매(알코올, 에테르, 아세톤 등)에 의한 추출, 헥산과 물의 분배, 크로마토그래피에 의한 방법 등, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합한 방법을 이용하여 분획 또는 정제함으로써 진세노사이드 Re를 얻을 수 있다. 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography), 실리카겔 진공 액체 크로마토그래피(silica gel vacuum liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 중에서 선택될 수 있다.

[0024] 상기 2공정에서는, 진세노사이드 Re 100중량부에 증류수 0.2~0.4중량부를 혼합하며, 상기 조건을 벗어나서 진세노사이드 Re 100중량부에 혼합되는 증류수가 0.2중량부 미만이거나 0.4중량부를 초과하는 경우, 본 발명에서 대량으로 제조하려는 특이 진세노사이드인 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 전환되지 않고 남아있는 진세노사이드 Re의 양이 많아, 제조비용이 손실되므로 바람직하지 않다.

[0025] 상기 3공정의 고온 고압 처리는 7~9시간 동안, 110~140℃의 온도범위 및 0.11~0.16MPa의 압력 조건으로 수행하며, 상기 조건을 벗어나서 고온 고압 처리시간이 7시간 미만이거나 또는 압력이 0.11MPa 미만이거나 또는 온도가 110℃ 미만인 조건으로 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6을 제조하는 경우, 특이 진세노사이드로 전환되지 않고 남아 있는 진세노사이드 Re로 인해, 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6을 얻는 수율이 현저하게 저하되어 경제적이지 않아 바람직하지 않다. 또한, 상기 고온 고압 처리 시간이 12시간을 초과하거나 또는 압력이 0.16MPa의 압력 조건을 초과하거나 또는 온도가 140℃를 초과하는 경우, 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6을 증가시키는 효과 상승 폭이 크지 않고, 오히려 감소할 수 있어, 제조비용의 손실이 유도되므로 바람직하지 않다.

[0026] 상기 4공정의 상기 크로마토그래피로는 역상 컬럼 크로마토그래피(C18) 또는 HPLC를 이용하는 것이 바람직하며, 상기 크로마토그래피를 통해 정제된 진세노사이드는 바람직하게는 순도 90% 이상, 보다 바람직하게는 90~99%, 가장 바람직하게는 95~99%의 순도를 가질 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 진세노사이드 Re에 증류수를 혼합한 다음, 고온 고압 처리를 하여 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 특이 진세노사이드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 특이 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6은 인삼 추출물에 미량으로 존재하기 때문에, 정제되는 양이 매우 적어 이를 이용하기가 쉽지 않았으나, 본 발명을 통해서서는 인삼의 잎으로부터 용이하게 분리 가능한 진세노사이드 Re만을 이용하여 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6을 제조하기 때문에, 인삼, 홍삼, 흑삼 등의 추출물을 이용할 때와 비교하여 상대적으로 진세노사이드 Rc, Rd, Rf 등으로부터 생성될 수 있는 진세노사이드의 혼입을 막을 수 있어, 특이 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 정제가 쉽고, 대량생산이 아주 용이하다. 또한, 산처리를 통해 상기 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6을 제조하는 경우 분리 정제시 분리 레진이 오염되어 장기 사용이 어려우므로 경제적 손실이 발생할 수 있으나, 본 발명의 방법은 진세노사이드 Re에 증류수를 혼합하여 고온 고압 처리함으로써 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 대량 제조가 가능하므로, 분리 과정에서 발생할 수 있는 오염 문제도 해결할 수 있어 특이 진세노사이드의 제조가 용이하다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 진세노사이드 Re에 실시예 1의 조건으로 고온 고압 처리했을 때의 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6에 대한 전환을 분석한 HPLC 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0030] <실시예 1. 진세노사이드 Re로부터 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 제조>

[0031] 2013년 9월 금산에서 채취한 건조된 인삼잎 1kg에 70%(v/v) 메탄올 수용액 10ℓ를 가하여 하루 동안 침출시킨 후, 3시간 동안 초음파 진탕을 실시하고, 여과하였다. 여과 후 잔여 인삼잎은 70%(v/v) 메탄올 8ℓ를 더한 다음 침출 및 초음파 진탕 과정을 2회 더 반복하였으며, 상기 과정에서 획득한 여액을 모두 합한 후, 감압 농축하여 완전히 건조된 메탄올 추출물 416g을 얻었다. 이후, 상기 메탄올 추출물을 초음파 진탕하여 3ℓ의 물에 완전히 녹인 다음, 2ℓ의 디에틸에테르를 더하여 실온에서 2일간 교반하였다. 교반이 끝난 후, 용액을 분액깔때기로 옮겨 디에틸에테르 층은 제거하고, 남은 물층에 5ℓ의 수포화 부탄올을 가하여 교반기에서 2일간 교반하였다. 교반이 끝난 용액을 분액깔때기로 옮겨 하루 이상 층 분리를 한 후, 부탄올 층만 모아 감압 농축하여 완전히 건조된 부탄올 추출물 157g을 얻었다. 이후, 상기 부탄올 분획물 157g을 메탄올에 녹인 뒤, 실리카겔(250~400mesh) 500g과 혼합 반죽하고, 감압 농축하여 고운 파우더로 제조하였다. 또한, 실리카겔을 클로로포름에 반죽하여 12×50cm의 오픈 컬럼에 부은 다음, 25cm 높이까지 채우고 위에 씨샌드(sea sand : 실리카겔과 반죽한 물질들이 용매와 섞이지 않고 충전되어 있는 상태로 분리할 때 사용)를 2cm 올려주고, 이후, 상기 제조된 파우더를 올려 주었다. 분액깔때기에서 클로로포름:메탄올:물을 10:2:0.2(1500ml:300ml:30ml)의 비율로 혼합한 후, 하층을 받아 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 위한 전개 용매로 사용하여 분리정제 함으로써 진세노사이드 Re가 다량 포함된 컬럼분획을 얻을 수 있었고, 이를 감압농축 하였다. 상기 진세노사이드 Re가 포함된 컬럼분획을 C18 역상 컬럼크로마토그래피를 수행하였으며, 40%(v/v) 메탄올 수용액으로 반죽한 C18 역상 충전제를 3.5×60cm 플래쉬 컬럼에 높이 30cm까지 채워준 후 여기에 진세노사이드 Re 컬럼분획을 90%(v/v) 메탄올 수용액에 녹여 로딩한 후 전개 용매는 메탄올:물을 1:1(v:v)에서 2:1(v:v), 3:1(v:v) 조건으로 변화시켜 가며 분리 정제하였다. 상기 과정을 통해 최종적으로 11.5g의 순수한 진세노사이드 Re를 얻을 수 있었다.

[0032] 상기 과정에서 얻은 진세노사이드 Re 10mg을 취해 1.5ml의 바이알(vial)에 넣고 25μl 또는 35μl의 증류수를 혼합하였으며, 이를 125ml 광구병에 담고, 내부에 증류수 5ml를 추가한 다음 시료를 중탕하였다. 이후, 멸균기(SANYO autoclave, MLS-3780 model)에 넣고, 120℃, 0.13~0.15Mpa의 압력 하에서 8시간 동안 증숙하였으며, 상기 과정에서 얻은 증숙물은 회전 농축기(Centrifan PE)에서 건조시켰다. 농축된 파우더는 C18 역상 컬럼크로마토그래피법을 이용해 1차 분리하였다. 이때, 40%(v/v) 메탄올 수용액으로 반죽한 C18 역상 충전제를 3.5×60cm 플래쉬 컬럼에 높이 30cm까지 채워준 후 여기에 증숙물을 25%(v/v) 메탄올 수용액에 녹여 로딩하였고, 전개 용매는 메탄올:물을 사용하였으며 이를 1:1(v:v)에서 2:1(v:v), 3:1(v:v) 조건으로 변화시켜 가며 분리 정제하였다.

[0033] 상기 C18 역상 컬럼크로마토그래피법으로부터 1차 정제된 분획물 CFr01과 CFr02는 YMC의 LC-forte/R을 이용하여 Multiple Preparative HPLC 법으로 2차 정제하였다. 사용된 컬럼은 YMC-Dispapak AT ODS-25(40g)였으며 이를 3개 멀티로 연결하여 분리 정제하였다. 분리에 사용된 용매로는 물(H₂O)과 아세트나이트릴(CH₃CN)을 사용하였으며, 최초 15%(v/v) 아세트나이트릴 수용액으로 YMC-Dispapak AT ODS-25를 충분히 채운 후, 시료를 35%(v/v) 메탄올 수용액에 녹여 로딩하였다. 전개용매는 물(H₂O, A용매)과 아세트나이트릴(CH₃CN, B용매)을 사용하였으며, 0~25분(20% B), 25~90분(40% B), 90~120분(50% B), 120~135분(65% B), 135~155분(85% B), 155~160분(100% B), 160~180분(100% B)의 농도구배 시스템(gradient elution system)으로 분리 정제하여, 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6을 얻었다. 또한, 분리 정제 전 회전 농축기에서 농축된 파우더 일부를 취하여 HPLC분석을 통해 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로의 전환을 확인하여 하기 실험예 1의 표 2에 나타내었다.

[0034] <비교예 1. 비교대상 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 제조①>

[0035] 실시예 1과 동일하게 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6를 제조하되, 멸균기에서 8시간 동안 증숙하는 대신 2, 4, 6 또는 10시간 동안 증숙하여, 각각의 증숙 시간에 따른 증숙물의 HPLC분석을 통해 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로의 전환을 확인하여 실험예 1의 표 2에 비교예 1-1 내지 1-4로 나타내었다.

[0036] <비교예 2. 비교대상 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 제조②>

[0037] 실시예 1과 동일하게 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6를 제조하되, 멸균기에서 120℃로 8시간 동안 증숙하는 대신 100℃ 또는 150℃에서 각각 8시간 동안 증숙하여 증숙 온도에 따른 증숙물의 HPLC분석을 통해, 진세노사이드 Re에서 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로의 전환을 확인하여 실험예 1의 표 2에 비교예 2-1 및 2-2로 나타내었다.

[0038] <비교예 3. 비교대상 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 제조③>

[0039] 실시예 1과 동일하게 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6를 제조하되, 진세노사이드 Re 10mg을 취해 1.5ml의 바이알(vial)에 넣고 25 μ l의 증류수 대신, 10, 50 또는 100 μ l의 증류수를 각각 혼합하고, 멸균기에서 8시간 동안 증숙하여 혼합되는 증류수의 양에 따른 증숙물의 HPLC분석을 통해, 진세노사이드 Re로부터 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로의 전환을 확인하여 실험예 1의 표 2에 비교예 3-1 내지 비교예 3-3으로 나타내었다.

[0040] <비교예 4. 비교대상 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 제조⑤>

[0041] 상기 실시예 1의 과정과 동일한 방법으로 얻은 진세노사이드 Re 10mg을 취해 5ml 라운드 플라스크에 담고 증류수를 10ml로 용해하였다. 시료에 환류장치와 히팅멘틀을 설치한 후 100℃에서 30일 동안 가열 환류하였다. 반응이 종료된 후 플라스크를 실온으로 냉각 후 감압농축장치에서 증류수를 제거하였으며 건조된 반응물을 일부 취하여 HPLC분석을 통해 열에 의한 진세노사이드 Re의 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로의 전환을 확인하였다.

[0042] <비교예 5. 비교대상 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 제조⑥>

[0043] 상기 실시예 1의 과정과 동일한 방법으로 얻은 진세노사이드 Re 10mg을 취해 1.5ml의 바이알(vial)에 넣고 25 μ l의 사과식초를 혼합하였으며, 시료를 125ml 광구병에 담고, 내부에 증류수 5ml를 추가한 다음 시료를 중탕하였다. 이후, 멸균기(SANYO autoclave, MLS-3780 model)에 넣고, 121℃, 0.13~0.15Mpa의 압력 하에서 2시간 동안 증숙하였다. 증숙물은 회전 농축기(Centrifan PE)에서 건조시켰으며 농축된 파우더는 HPLC분석을 통해 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로의 전환을 확인하였다.

[0044] <실험예 1. 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6의 전환 확인>

[0045] 진세노사이드 Re의 변화를 측정하기 위해, 상기 실시예 1 내지 2 및 비교예 1 내지 5의 증숙물 또는 혼합물을 회전 농축기(Centrifan PE)에서 건조하여, 증숙과정을 통해 포함된 소량의 물을 제거하였고, 각각의 샘플을 1mg씩 취하여 HPLC용 메탄올 1ml에 녹인 후 0.50 μ m 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위해 사용하였다.

표 1

	HPLC 수행 조건
컬럼	ACE 5-C ₁₈ (250×4.6mm)
유량(Flow rate)	1.0ml/min
디텍터(Detector)	UV detector, 205nm
용매(Solvent)	A; H ₂ O, B; CH ₃ CN 0~35분(20% B), 35~85분(40%B), 85~105분(50%B), 105~135분(65% B), 135~145분(85% B), 145~155분(100% B), 155~160분(100% B), 160~163분(20% B), 163~165분(20% B)
온도	40℃

표 2

조건		진세노사이드(μ g/mg)						
		Re	Rh1-S	Rh1-R	Rg4	Rg6	Rh4	total
실시예 1	25 μ l, 120℃, 8시간 증숙한 증숙물	7.0	153.0	121.0	228.0	202.0	4.2	715.2
실시예 2	35 μ l, 120℃, 8시간 증숙한 증숙물	4.1	148.0	119.0	212.0	196.5	3.1	682.7
비교예 1-1	25 μ l, 120℃, 2시간 증숙한 증숙물	513.9	25.3	19.4	101.7	65.1	0	725.4
비교예 1-2	25 μ l, 120℃, 4시간 증숙한 증숙물	305.6	64.1	61.8	122.9	123.9	3.5	681.8
비교예 1-3	25 μ l, 120℃, 6시간 증숙한 증숙물	85.3	122.0	95.3	200.6	147.0	9.2	659.4
비교예 1-4	25 μ l, 120℃, 10시간 증숙한 증숙물	0	108.0	98.0	145.0	122.0	53.0	526.0
비교예 2-1	25 μ l, 100℃, 8시간 증숙한 증숙물	202.1	101.2	108.0	158.2	146.2	2.8	718.5
비교예 2-2	25 μ l, 150℃, 8시간 증숙한 증숙물	12.1	83.1	76.4	135.2	115.4	132.2	554.4

비교예 3-1	10 μ l, 120℃, 8시간 증숙한 증숙물	151.4	101.1	96.8	192.6	151.0	4.3	697.2
비교예 3-2	50 μ l, 120℃, 8시간 증숙한 증숙물	97.0	102.0	101.0	193.0	159.0	5.9	657.9
비교예 3-3	100 μ l, 120℃, 8시간 증숙한 증숙물	87.0	112.4	98.1	194.0	165.0	0.8	657.3
비교예 4	끓임법 30일	0	62.1	26.4	3.4	20.6	4.1	116.6
비교예 5	25 μ l 산처리 후, 120℃, 2시간 증숙한 증숙물	0	20.5	23.1	60.5	33.1	274.5	411.7

[0048] 표 2 및 도 1을 참고하면, 본 발명과 같이 진세노사이드 Re에 증류수를 혼합한 다음 고온 고압 처리한 경우에는, 남아있는 진세노사이드 Re가 거의 없이 대부분이 가수분해되어, 특히 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로 전환되었음을 확인할 수 있었다.

[0049] 그러나, 본 발명과는 다르게 고온 고압 처리하는 시간이 7~9시간을 벗어나는 경우인 비교예 1-1 내지 1-4와, 고온 고압 과정에서 온도가 110~140℃를 벗어나는 경우인 비교예 2-1 내지 2-2 및, 진세노사이드 Re 10mg에 첨가되는 증류수의 양이 20~40 μ l를 벗어나는 경우인 비교예 3-1 내지 3-3의 경우에는, 남아있는 진세노사이드 Re로 인해 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로의 전환율이, 본 발명의 실시예에 비해 현저하게 낮아 경제적이지 않은 방법임을 확인할 수 있었다.

[0050] 또한, 압력이 전혀 주어지지 않은 조건에서 온도만 100℃의 고온 상태로 가열한 비교예 4의 경우, 매우 천천히 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로 전환되어 1일 이내에는 전혀 변화가 없었으며, 30일째가 되어서야 진세노사이드 Re가 완전히 소멸되는 것이 확인되었으며, 진세노사이드 Re에서 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로 전환율이 10%정도로 매우 낮은 것임을 확인하였다.

[0051] 반면, 진세노사이드 Re에 증류수 대신 산을 처리한 비교예 5의 경우, 본 발명의 목적 진세노사이드인 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로 전환되지 않고 대부분이 진세노사이드 Rh4로 전환되는 것을 알 수 있었다.

[0052] 따라서, 본 발명과 같이 진세노사이드 Re에 증류수를 혼합한 다음 7~9시간동안 110~140℃에서 고온 고압 처리하는 방법이, 특히 진세노사이드 Rh1-S, Rh1-R, Rg4 및 Rg6로의 전환율을 현저하게 상승시켜, 대량 제조가 용이한 방법임을 알 수 있다.

도면

도면1

