



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월08일
(11) 등록번호 10-1251589
(24) 등록일자 2013년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/34 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0108010(분할)

(22) 출원일자 2012년09월27일

심사청구일자 2012년09월27일

(65) 공개번호 10-2012-0112343

(43) 공개일자 2012년10월11일

(62) 원출원 특허 10-2009-0070151

원출원일자 2009년07월30일

심사청구일자 2009년07월30일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100086923 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

김영섭

대전광역시 유성구 송강동 송강그린A 310-502

유시용

대전광역시 유성구 노은동 536-8번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 3 항

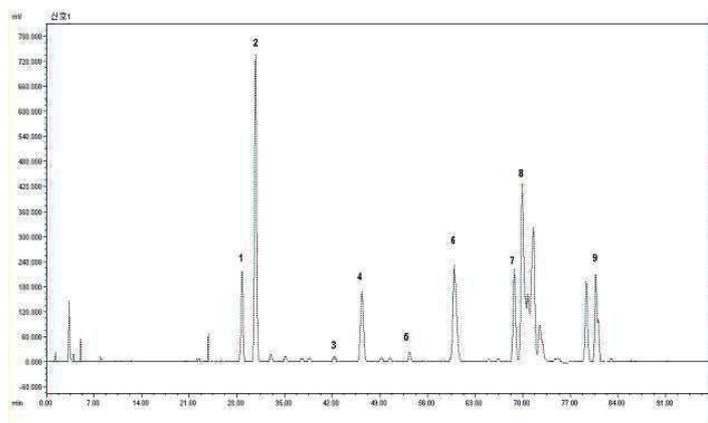
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **도라지 또는 도라지 추출물로부터의 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 도라지 또는 도라지 추출물로부터의 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 상기 제조방법은 도라지로부터 착즙공정 또는 증류수, C₁ 내지 C₃의 저급알코올, 에틸아세테이트, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 도라지 추출물을 수득하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 수득한 추출물을 증류수에 용해시킨 후 역상겔이 충전된 컬럼에 가하여 사포닌 성분을 흡착시키는 흡착공정 및 흡착된 사포닌을 에탄올 또는 메탄올 수용액으로 용출시키는 용출공정을 포함하는 사포닌을 수득하는 단계(단계 2); 및 상기 단계 2에서 수득한 사포닌을 유기용매를 사용하여 정제하는 단계(단계 3)를 포함한다. 본 발명은 도라지 추출물을 부탄올로 추출하는 종래의 조사포닌 제조방법에 비하여 순도가 높을 뿐만 아니라 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 얻을 수 있으므로 도라지 또는 도라지 추출물로부터 사포닌 추출시 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자
연규환
 대전광역시 유성구 어은동 한빛A 110-1004
홍경식
 대전광역시 동구 가오동 은어송마을1단지 101-1804
유대석
 대전광역시 서구 내동 코오롱 아파트 5동 1505호

최연희
 대전광역시 중구 태평동 버드내아파트 207-2102
최춘환
 대전광역시 유성구 장동 한국화학연구원 창조관 103호
차미란
 경상남도 거제시 연초면 연사리 1317-1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2009K000909
 부처명 교육과학기술부
 연구사업명 21세기프론티어연구개발사업
 연구과제명 인지기능개선 건강기능식품의 규격화 연구
 주관기관 한국화학연구원
 연구기간 2009.04.01 ~ 2010.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 SK-0804
 부처명 산업기술연구회
 연구사업명 협동연구사업
 연구과제명 건강수명연장을 위한 기능성식품/천연물 의약소재의 산업화연구(2단계1차년도)
 주관기관 한국화학연구원
 연구기간 2008.11.01 ~ 2009.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

착즙공정을 이용하여 도라지로부터 도라지 추출물을 수득하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 수득한 추출물을 증류수에 용해시킨 후 역상겔이 충전된 컬럼에 가하여 사포닌 성분을 흡착시키는 흡착공정 및 흡착된 사포닌을 에탄올 또는 메탄올 수용액으로 용출시키는 용출공정을 포함하는 사포닌을 수득하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2에서 수득한 사포닌을 유기용매를 사용하여 정제하는 단계(단계 3)을 포함하며,

여기에서, 상기 단계 2의 용출공정에서 사용하는 에탄올 또는 메탄올 수용액은 70 내지 90%의 에탄올 수용액 또는 70 내지 90% 메탄올 수용액이며;

상기 단계 2의 흡착공정과 용출공정 사이에 증류수 및 3 내지 5%의 아세토니트릴을 이용하여 컬럼을 세척하는 세척공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 도라지 또는 도라지 추출물로부터 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 대량으로 수득하기 위한 조사포닌 조성물의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세척 공정은 컬럼에 증류수 및 3 내지 5%의 아세토니트릴을 순차적으로 가한 후 다시 증류수를 가하여 수행되는 것을 특징으로 하는 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 대량으로 수득하기 위한 조사포닌 조성물의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 3의 유기용매는 에틸아세테이트, 에테르 및 아세톤으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 대량으로 수득하기 위한 조사포닌 조성물의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 도라지 또는 도라지 추출물로부터 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 도라지(*Platycodon grandiflorum* A. DC)는 오랫동안 식용 및 약용으로 사용되어 왔으며, 이의 주요 약리성분인 테르펜계 사포닌은 진해, 거담작용, 중추신경억제작용(진정, 진통, 해열효과), 급·만성 염증에 대한 항염증작용, 항레양 및 위액분비억제작용, 혈관을 확장하여 혈압을 낮추는 항콜린작용, 혈당강하작용, 콜레스테롤 대사 개선작용 등이 있는 것으로 밝혀져 있다(Toshiyuki Akiyama *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1952(1972); Akihito Tada *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2965(1975); Hiroshi Ishii *et al.*, *J. Chem. Soc.*, *Perkin trans I*, 661(1984); Eun Bang Lee, *J. Pharm. Soc. Kor.*, **19**, 164(1975)).

[0003] 또한, 도라지의 열수 및 에탄올 추출물은 곰팡이의 아프라톡신을 억제하며, 이눌린 분획은 식균 작용과 고형 압 및 복수 압에 대한 강력한 항종양효능이 있고, 40% 도라지 엑기스는 알코올흡수 억제작용이 있는 것으로 알려져

있다(Hitokoto H.S. *et al.*, *Mycopathologia*, **66**, 16(1979); Michinori Kubo, *et al.*, *Shoyakugaku Zasshi*, **40**, 367(1986); Takaharu Nagao *et al.*, *Shoyakugaku Zasshi*, **40**, 375(1986); JPA 60-89427(1985); JPA 3-264534(1991)).

[0004] 또한 최근에 밝혀진 효능으로는 고지혈증 치료 활성(Kyung-sook Kim *et al.*, *J. Nur. Sci. Vitaminol*, **41**, 485(1995)), 간 기능 보호 활성(Jeong H. K., *et al.*, *CANCER LETTERS*, **174**, 73(2001)) 및 면역기능 조절 활성(Sang B. Han *et al.*, *International Immunopharmacology*, **1**, 1969(2001); Jeong H. K., *et al.*, *CANCER LETTERS*, **166**, **17**(2001); Jeong H. K., *et al.*, *International Immunopharmacology*, **1**, 1141(2001))을 갖는 것으로 보고된 바 있다.

[0005] 이러한 도라지는 그 약리 성분이 사포닌에 기인하는 경우가 대부분이다. 그럼에도 불구하고 도라지로부터 조사포닌의 분리정제 방법은 도라지 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 부탄올로 추출하는 방법(Akihiro Tada, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **23**(11)2965-2972(1975); Il Hong Son *et al.*, *Molecules* **2007**, **12**, 1147-1152) 외에는 특별한 방법이 알려져 있지 않다.

[0006] 그러나 상기 부탄올로 추출하는 방법은 추출물로부터 부탄올로 사포닌을 액액 추출하는 과정에서 사포닌 성분이 외에도 글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스, 프락토올리고당 및 이눌린 성분들이 상당량 부탄올 층으로 이행되며, 잔류 증류수 층에도 유효 도라지 사포닌들이 상당량 잔류하게 되어 사포닌 함량이 줄어들고 순도가 떨어지는 문제점이 있었다.

[0007] 이에 본 발명자들은 보다 간단하고 효율이 높으면서 유효 사포닌의 함량을 증가시키는 방법을 연구하던 중, 종래의 부탄올을 이용한 조사포닌 제조방법에 비하여 유효 사포닌의 함량이 많고 고순도의 조사포닌 조성물을 얻을 수 있는 조사포닌 조성물의 제조방법을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 도라지 또는 도라지 추출물로부터 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법에 따라 제조되는 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 도라지로부터 착즙공정, 증류수, C₁ 내지 C₃의 저급알코올, 에틸아세테이트, 헥산, 디클로로메탄 또는 증류수와 C₁ 내지 C₃의 저급알코올, 에틸아세테이트, 헥산, 디클로로메탄의 혼합용매를 이용하여 도라지 추출물을 수득하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 수득한 추출물을 증류수에 용해시킨 후 역상겔이 충전된 컬럼에 가하여 사포닌 성분을 흡착시키는 흡착공정 및 흡착된 사포닌을 에탄올 또는 메탄올 수용액으로 용출시키는 용출공정을 포함하는 사포닌을 수득하는 단계(단계 2); 및 상기 단계 2에서 수득한 사포닌을 유기용매를 사용하여 정제하는 단계(단계 3)를 포함하는 도라지 또는 도라지 추출물로부터의 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 따라 제조되는 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 조사포닌 조성물의 제조방법은 도라지 추출물을 부탄올로 추출하는 종래의 조사포닌 제조방법에 비하여 순도가 높을 뿐만 아니라 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 얻을 수 있으므로 도라지 또는 도라지 추출물로부터 사포닌 추출시 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명에 따른 실시예 1의 단계 1의 도라지 에탄올 추출물의 크로마토그램이고;
 도 2는 비교예 1의 부탄올 분획물의 크로마토그램이고;
 도 3은 비교예 1의 잔류 물층의 크로마토그램이고;
 도 4는 본 발명에 따른 실시예 1의 단계 3의 사포닌 조성물의 크로마토그램이다.

*도면의 중요부분에 대한 부호의 설명

- 1 : Deapio-platycoside E
- 2 : Platycoside E
- 3 : Deapio-platycodin D₃
- 4 : Platycodin D₃
- 5 : polygalacin D₂
- 6 : platyconic acid A
- 7 : platycodin D₂
- 8 : platcodin D
- 9 : 2"-O-Acetylpolygalacin D₂

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 도라지 또는 도라지 추출물로부터 순도 및 유효 사포닌 함량이 증가된 조사포닌 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 보다 구체적으로 본 발명의 조사포닌 조성물은

[0017] 도라지로부터 착즙공정 또는 증류수, C₁ 내지 C₃의 저급알코올, 에틸아세테이트, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 도라지 추출물을 수득하는 단계(단계 1);

[0018] 상기 단계 1에서 수득한 추출물을 증류수에 용해시킨 후 역상겔이 충전된 컬럼에 가하여 사포닌 성분을 흡착시키는 흡착공정 및 흡착된 사포닌을 에탄올 또는 메탄올 수용액으로 용출시키는 용출공정을 포함하는 사포닌을 수득하는 단계(단계 2); 및

[0019] 상기 단계 2에서 수득한 사포닌을 유기용매를 사용하여 정제하는 단계(단계 3)를 포함하여 이루어지는 제조방법에 의해 이루어질 수 있다.

[0020] *

- [0021] 이하, 본 발명에 따른 상기 제조방법을 단계별로 더욱 구체적으로 설명한다.
- [0022] 먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 도라지로부터 착즙공정 또는 증류수, C₁ 내지 C₃의 저급알코올, 에틸아세테이트, 핵산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 도라지 추출물을 수득하는 단계이다.
- [0023] 상기 단계 1의 도라지는 생도라지, 건조도라지 또는 이의 건조물을 분쇄한 분말 등 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0024] 상기 추출물은 착즙공정, 증류수, C₁ 내지 C₃의 저급알코올, 에틸아세테이트, 핵산, 디클로로메탄 또는 증류수와 C₁ 내지 C₃의 저급알코올, 에틸아세테이트, 핵산, 디클로로메탄의 혼합용매를 이용하여 추출될 수 있다. 상기 C₁ 내지 C₃의 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 50 내지 100% 농도인 것이 더욱 바람직하고, 70 내지 100% 농도의 에탄올인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 착즙공정은 생도라지를 민찍기로 분쇄한 후, 착즙기로 착즙하는 과정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 용매는 도라지 무게의 2 내지 200배의 증류수 또는 C₁ 내지 C₃의 저급알코올, 에틸아세테이트, 핵산, 디클로로메탄 또는 증류수와 C₁ 내지 C₃의 저급알코올, 에틸아세테이트, 핵산, 디클로로메탄의 혼합용매를 가하여 추출하는 것이 바람직하고, 10 내지 30배를 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 추출방법은 침지추출, 초음파 추출, 환류 추출 등의 방법을 이용하여 추출할 수 있고, 필요에 따라 2회 이상 반복하여 실시할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 추출은 10° C 내지 100° C의 온도에서 수행하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 상기 방법에 의하여 추출한 도라지 추출물을 여과 또는 원심 분리하여 고형분을 제거하고 농축하는 과정을 추가적으로 수행할 수 있다.
- [0030] 다음으로, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 수득한 추출물을 증류수에 용해시킨 후 역상겔이 충전된 컬럼에 가하여 사포닌 성분을 흡착시키는 흡착공정 및 흡착된 사포닌을 에탄올 또는 메탄올 수용액으로 용출시키는 용출공정을 포함하는 사포닌을 수득하는 단계이다.
- [0031] 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 수득한 추출물을 증류수에 용해시킨 후 역상겔이 충전된 컬럼에 가하여 사포닌 성분을 흡착시키는 흡착공정을 포함한다. 이때, 상기 단계 1에서 수득한 추출물은 10 내지 100배의 증류수에 용해시킬 수 있다. 상기 역상겔은 상기 단계 1에서 수득한 추출물을 증류수에 용해시킨 용액의 5 내지 100배의 역상겔을 사용할 수 있고, 이때 역상겔은 Diaion HP-20, RP-18 또는 MCI 등을 사용할 수 있다.
- [0032] 상기 흡착공정과 용출공정 사이에 증류수 또는 아세트니트릴을 이용하여 컬럼을 세척하는 세척공정을 추가적으로 수행할 수 있다. 상기 세척공정은 컬럼에 흡착된 조사포닌 이외의 글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스, 프락토올리고당 또는 이눌린 등과 같은 당성분들을 제거하기 위해 수행될 수 있다. 구체적으로 상기 세척공정은 컬럼에 증류수 및 아세트니트릴을 순차적으로 가한 후 다시 증류수를 가하는 방법으로 수행될 수 있고, 이때 상기 아세트니트릴은 3 내지 5%의 아세트니트릴인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 또한, 상기 단계 2는 상기 흡착공정을 통해 흡착된 사포닌을 에탄올 또는 메탄올 수용액으로 용출시키는 용출공정을 포함한다. 이때 상기 에탄올 또는 메탄올 수용액은 30 내지 90%의 에탄올 수용액 또는 30 내지 90% 메탄올 수용액인 것이 바람직하며, 70 내지 90%의 에탄올 수용액 또는 70 내지 90%의 메탄올 수용액인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 상기 방법에 의하여 용출된 에탄올 또는 메탄올 수용액을 감압 농축하는 과정을 추가적으로 수행하여 사포닌을 수득할 수 있다.
- [0035] 다음으로, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 수득한 사포닌을 유기용매를 사용하여 정제하는 단계이다.
- [0036] 구체적으로, 상기 단계 2에서 수득한 사포닌을 다시 알코올에 용해시킨 후 고형분을 여과한 여액에 유기용매를

가하여 사포닌 성분을 석출시키는 단계이다. 상기 알코올은 C₁ 내지 C₄의 저급 알코올인 것이 바람직하며, 상기 유기용매로는 에틸아세테이트, 에테르, 아세톤 등을 사용하는 것이 바람직하다.

[0037] 상기 방법에 의하여 석출된 고형분을 여과하고 건조하는 과정을 추가적으로 수행하여 조사포닌 조성물을 수득할 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 제조방법은 부탄올 분획 과정을 거치지 않기 때문에 유효 사포닌의 손실을 최소화할 수 있어 유효 사포닌의 함량을 높일 수 있고, 종래의 분리 방법보다 고순도의 사포닌을 수득할 수 있어 도라지 또는 도라지 추출물로부터 사포닌 추출시 유용하게 활용될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 따라 제조되는 조사포닌 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명에 따른 조사포닌 조성물은 조사포닌 조성물의 함유 성분을 측정된 실험에서 종래의 부탄올을 이용한 사포닌의 추출방법에 따른 조사포닌 조성물에 비하여 유효 사포닌의 함량이 높고 그 순도가 높은 것을 알 수 있다 (실험예 1, 도 1, 2, 3, 4, 및 표 1 참조).

[0041] 또한, 본 발명에 따른 조사포닌 조성물은 추출용매조건에 따른 사포닌 함량의 변화를 측정된 실험에서 추출용매 중 알코올의 농도가 높아질수록 사포닌 추출효과가 증가하며, 메탄올 추출 또는 착즙공정을 이용하는 경우에 사포닌 추출효과가 우수한 것을 알 수 있다(실험예 2 및 표 2 참조).

[0042]

[0043] 또한, 본 발명에 따른 조사포닌 조성물은 용출용매에 따른 사포닌의 함량 변화를 측정된 실험에서 용출용액 중 알코올의 농도가 높아질수록 조사포닌 조성물의 수득량 및 회수율이 증가하는 것을 알 수 있다(실험예 3 및 표 3 참조).

[0044] 따라서 본 발명에 따라 제조되는 조사포닌 조성물은 순도가 높을 뿐만 아니라 유효 사포닌 함량이 높아 사포닌을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 화장용 조성물을 제조하는데 유용하게 활용될 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0046] <실시예 1> 100% 에탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0047] 단계 1 : 도라지 100% 에탄올 추출물의 제조

[0048] 음지에서 잘게 분쇄한 도라지 분말 1,000 g에 100 % 에탄올 5 l를 가하고 상온에서 1주(168시간)동안 추출한 후 30분 동안 10,000 × g에서 원심 분리하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 감압 건조하여 분말 상의 도라지 100% 에탄올 추출물 277 g을 수득하였다.

[0049] 단계 2 : 도라지 100% 에탄올 추출물로부터 사포닌의 제조

[0050] 상기 단계 1에서 수득한 도라지 100% 에탄올 추출물 100 g을 증류수 1,000 ml에 녹인 후 RP-18 겔(40 μm-60 μm, 90 A, Merck) 400 g이 충전된 컬럼(50 x 250 mm)에 주입한 후 컬럼을 증류수 1,000 ml, 3 % 아세토니트릴 수용액 500 ml 순으로 세척한 후 증류수 500 ml로 재차 세척하여 추출물에 함유된 글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스, 프락토올리고당 및 이눌린 성분들을 제거하였다. 이후 컬럼에 80% 에탄올 500 ml를 가한 후 10 ml/분의

속도로 용출하였다. 용출액을 모아 감압 농축하여 조사포닌 14.5 g을 수득하였다.

[0051] 단계 3 : 유기용매를 사용하여 조사포닌 조성물의 정제

[0052] 상기 단계 2에서 수득한 조사포닌을 에탄올 50 ml에 녹인 후 여과지로 여과하고 여액에 에틸아세테이트 100 ml를 가한 후 12시간 동안 상온에 정치하여 고형분이 석출되도록 하였다. 석출된 고형분을 다시 여과지로 여과한 후 잘 건조시켜 13.8 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0053] **<실시예 2> 10% 에탄올을 이용하여 용출한 조사포닌 조성물의 제조**

[0054] 단계 2 : 도라지 100% 에탄올 추출물로부터 사포닌의 제조

[0055] 상기 실시예 1의 상기 단계 1에서 수득한 도라지 100% 에탄올 추출물 20 g을 증류수 200 ml에 녹인 후 RP-18 겔 (40 μm-60 μm, 90 A, Merck) 100 g이 충전된 컬럼(50 x 250 mm)에 주입한 후 컬럼을 증류수 200 ml, 3 % 아세토니트릴 수용액 100 ml 순으로 세척한 후 증류수 100 ml로 재차 세척하여 추출물에 함유된 글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스, 프락토올리고당 및 이눌린 성분들을 제거하였다. 이후 컬럼에 10% 에탄올 500 ml를 가한 후 10 ml/분의 속도로 용출하였다. 용출액을 모아 감압 농축하여 조사포닌 0.18 g을 수득하였다.

[0056] 단계 3 : 유기용매를 사용하여 조사포닌 조성물의 정제

[0057] 상기 단계 2에서 수득한 조사포닌을 에탄올 10 ml에 녹인 후 여과지로 여과하고 여액에 에틸아세테이트 20 ml를 가한 후 12시간 동안 상온에 정치하여 고형분이 석출되도록 하였다. 석출된 고형분을 다시 여과지로 여과한 후 잘 건조시켜 0.17 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0058] **<실시예 3> 30% 에탄올을 이용하여 용출한 조사포닌 조성물의 제조**

[0059] 상기 실시예 2의 단계 2에서 10% 에탄올 대신에 30% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 2의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 0.86 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0060] **<실시예 4> 50% 에탄올을 이용하여 용출한 조사포닌 조성물의 제조**

[0061] 상기 실시예 2의 단계 2에서 10% 에탄올 대신에 50% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 2의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 2.5 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0062] **<실시예 5> 80% 에탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조**

[0063] 상기 실시예 1의 단계 1에서 100% 에탄올 대신에 80% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 14.5 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0064] **<실시예 6> 증류수를 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조**

[0065] 상기 실시예 1의 단계 1에서 100% 에탄올 대신에 증류수를 사용하고 90 °C에서 3시간씩 3회 반복 추출하여 수행하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 5.5 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0066] **<실시예 7> 100% 메탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조**

[0067] 상기 실시예 1의 단계 1에서 100% 에탄올 대신에 100% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 18.6 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0068] <실시예 8> 도라지 착즙공정을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0069] 단계 1 : 도라지 착즙물의 제조

[0070] 생도라지 5,000 g을 민찍기로 분쇄한 후, 착즙기로 1차 착즙하여 300 ml의 도라지 생즙을 얻었다. 1차 착즙하고 남은 잔류물에 다시 증류수 1,000 ml를 가해 25 °C에서 12시간 동안 숙성한 후 착즙기로 2차 착즙하여 1,100 ml를 수득하였다. 1차, 2차 착즙한 도라지 생즙을 합하고 30분 동안 10,000 × g에서 원심 분리하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 동결 건조하여 분말 상의 도라지 착즙물 476 g을 수득하였다.

[0071] 단계 2 : 도라지 착즙물로부터 사포닌의 제조

[0072] 상기 실시예 8의 상기 단계 1에서 수득한 도라지 착즙물 100 g을 증류수 1,000 ml에 녹인 후 RP-18 겔(40 μm-60 μm, 90 A, Merck) 400 g이 충전된 컬럼(50 x 250 mm)에 주입한 후 컬럼을 증류수 1,000 ml, 3 % 아세트니트릴 수용액 500 ml 순으로 세척한 후 증류수 500 ml로 재차 세척하여 추출물에 함유된 글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스, 프락토올리고당 및 이눌린 성분들을 제거하였다. 이후 컬럼에 80% 에탄올 500 ml를 가한 후 10 ml/분의 속도로 용출하였다. 용출액을 모아 감압 농축하여 조사포닌 15.8 g을 수득하였다.

[0073] 단계 3 : 유기용매를 사용하여 조사포닌 조성물의 정제

[0074] 상기 실시예 8의 상기 단계 2에서 수득한 조사포닌을 다시 에탄올 50 ml에 녹인 후 여과지로 여과하고 여액에 에틸아세테이트 100 ml를 가한 후 12시간 동안 상온에 정치하여 고형분이 석출되도록 하였다. 석출된 고형분을 다시 여과지로 여과한 후 잘 건조시켜 14.6 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0075] <실시예 9> 10% 메탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0076] 단계 1 : 도라지 10% 메탄올 추출물의 제조

[0077] 상기 실시예 1의 단계 1에서 100% 에탄올 대신에 10% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 1과 동일한 방법으로 10% 메탄올 추출물 454 g을 수득하였다.

[0078] 단계 2 : 도라지 10% 메탄올 추출물로부터 사포닌의 제조

[0079] 상기 단계 1에서 수득한 10% 메탄올 추출물 100 g을 증류수 1,000 ml에 녹인 후 상기 실시예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 조사포닌 1.3 g을 수득하였다.

[0080] 단계 3 : 유기용매를 사용하여 조사포닌 조성물의 정제

[0081] 상기 단계 2에서 수득한 조사포닌을 에탄올 10 ml에 녹인 후 여과지로 여과하고 여액에 에틸아세테이트 20 ml를 가한 후 12시간 동안 상온에 정치하여 고형분이 석출되도록 하였다. 석출된 고형분을 다시 여과지로 여과한 후 잘 건조시켜 1.2 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0082] <실시예 10> 50% 메탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0083] 상기 실시예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 50% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 11.3 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0084] <실시예 11> 80% 메탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0085] 상기 실시예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 80% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 9의 단계

1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 15.9 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0086] <실시예 12> 100% 메탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0087] 상기 실시예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 100% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 19.7 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0088] <실시예 13> 10% 에탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0089] 상기 실시예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 10% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 0.6 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0090] <실시예 14> 50% 에탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0091] 상기 실시예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 50% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 8.6 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0092] <실시예 15> 80% 에탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0093] 상기 실시예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 80% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 15.3 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0095] <실시예 16> 100% 에탄올을 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0096] 상기 실시예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 100% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 9의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 14 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0097] <실시예 17> 증류수를 이용하여 추출한 조사포닌 조성물의 제조

[0098] 상기 실시예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 증류수를 사용하고 추출온도를 4 °C로 하는 것을 제외하고는 상기 실시예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 1.3 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0099] <실시예 18> 10% 에탄올을 이용하여 용출한 조사포닌 조성물의 제조

[0100] 상기 실시예 1의 단계 3에서 얻은 도라지 조사포닌 조성물 1 g에 증류수 20 ml를 가한 후 80% 에탄올 대신에 10% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 처리하여 조사포닌 조성물을 0.01 g을 수득하였다.

[0101] <실시예 19> 30% 에탄올을 이용하여 용출한 조사포닌 조성물의 제조

[0102] 상기 실시예 18에서 10% 에탄올 대신에 30% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 18과 동일한 방법으로 0.32 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

[0103] <실시예 20> 80% 에탄올을 이용하여 용출한 조사포닌 조성물의 제조

[0104] 상기 실시예 18에서 10% 에탄올 대신에 80% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 18과 동일한 방법으로 0.96 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

- [0105] <실시예 21> 10% 메탄올을 이용하여 용출한 조사포닌 조성물의 제조
- [0106] 상기 실시예 18에서 10% 에탄올 대신에 10% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 18과 동일한 방법으로 0.02 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.
- [0107] <실시예 22> 30% 메탄올을 이용하여 용출한 조사포닌 조성물의 제조
- [0108] 상기 실시예 18에서 10% 에탄올 대신에 30% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 18과 동일한 방법으로 0.42 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.
- [0109] <실시예 23> 80% 메탄올을 이용하여 용출한 조사포닌 조성물의 제조
- [0110] 상기 실시예 18에서 10% 에탄올 대신에 80% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 18과 동일한 방법으로 0.97 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.
- [0111] <비교예 1> 부탄올을 이용한 사포닌의 추출방법
- [0112] 실시예 1의 단계1에서 수득한 도라지 에탄올 추출물 100 g을 증류수 1,000 ml에 현탁시킨 후 디에틸에스테르 1,000 ml로 3회 액액추출하였다. 디에틸에스테르층을 제거한 후 남은 증류수 층을 포화부탄올 1,000 ml로 3회 추출한 후 부탄올 층을 모아 감압농축하여 부탄올 분획물 5.5 g을 수득하였다.
- [0113] <실험예 1> 조사포닌 조성물의 함유 성분 측정
- [0114] 본 발명에 따른 조사포닌 조성물의 함유 성분을 측정하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.
- [0115] 실시예 1의 단계 1의 도라지 에탄올 추출물, 비교예 1의 부탄올 분획물, 비교예 1의 잔류 증류수 층 및 실시예 1의 단계 3의 조사포닌 조성물에 대하여 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 함유 성분을 측정하였다. 분석방법으로 실험 기기는 NS-3000i 일체형 고성능 액체크로마토그래피 시스템(integrated HPLC Gradient type(Futechs.co.Ltd))에 광 산란 검출기(Evaporation light scattering detector(ELSD, USA, Softa))를 장착하여 분사구 온도(spray): 25 °C, 이동 및 검출 온도(Drift, Detector chamber): 70 °C, 주입 가스 압력(Gas Pressure): 질소 가스(N₂ gas): 55.0 psi, 감도(Filter): 4, 역상 칼럼 4.6 x 150 mm, 3 μm(Chemco) 으로 하고, 온도는 40 °C를 유지하여 기기 조건을 설정하고 이동상으로는 하기 A와 B 용매를 기울기(gradient) 용리 방법을 이용하였다.
- [0116] A : 50 mM 아세트산 암모늄 : 아세토니트릴 : 메탄올(85 : 10 : 5 v/v%)
- [0117] B : 50 mM 아세트산 암모늄 : 아세토니트릴 : 메탄올(55 : 40 : 5 v/v%)
- [0118] 유속(flow rate) : 0.5 ml/min,
- [0119] 전체 분석 시간(total run time) : 98분
- [0120] 상기 실험에 대한 측정결과를 도 1 내지 도 4에 나타내었다. 보다 상세하게는 실시예 1의 단계 1의 도라지 에탄올 추출물의 크로마토그램을 도 1에 나타내었고, 비교예 1의 부탄올 분획물의 크로마토그램을 도 2에 나타내었고, 비교예 1의 잔류 증류수 층의 크로마토그램을 도 3에 나타내었으며, 실시예 1의 단계 3의 조사포닌 조성물의 크로마토그램을 도 4에 나타내었다.
- [0121] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 단계 1의 도라지 에탄올 추출물의 경우에는 머무름 시간 20분 이후에 Deapio-platycoside E, Platycoside E, Deapio-platycodin D₃, Platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂, platycodin D 등 도라지의 대표적인 사포닌 성분들이 순서적으로 잘 검출되고 있으며 머무름 시간 5분 이내에서는 도라지의 당 성분들의 피크들이 복잡하게 나타나는 것을 알 수 있다.
- [0122] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 비교예 1의 부탄올 분획물의 경우에는 polygalacin D₂, platycodin D₂,

platycodin D 등 상대적으로 극성이 작은 사포닌들은 양호하게 검출되고 있는 반면 Deapio-platycoside E, Platycoside E, Deapio-platycodin D₃, Platycodin D₃ 등 극성이 큰 사포닌 종류들은 상대적으로 함량이 적게 나타나고 있는 것을 알 수 있다.

[0123] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 비교예 1의 부탄올로 사포닌 성분들을 추출하고 남은 잔류 증류수 층의 경우에는 Deapio-platycoside E, Platycoside E, Deapio-platycodin D₃, Platycodin D₃ 등 극성이 큰 사포닌 종류들이 상당량 검출되는 것을 알 수 있다. 이를 통해 종래의 부탄올 추출방법으로는 사포닌의 추출효율이, 특히 Deapio-platycoside E, Platycoside E, Deapio-platycodin D₃, Platycodin D₃ 등 극성사포닌 종류들의 추출효율이 크게 저하되고 있음을 알 수 있다.

[0124] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 단계 3의 조사포닌 조성물의 경우에는 머무름 시간 20분 이후에 Deapio-platycoside E, Platycoside E, Deapio-platycodin D₃, Platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂, platycodin D 등 도라지의 대표적인 사포닌 성분들이 순서적으로 잘 검출되는 것을 알 수 있으며, 도 1의 실시예 1의 단계 1의 도라지 에탄올 추출물의 경우에 크게 관찰되고 있는 머무름 시간 5분 이내의 당 성분들이 모두 제거되어 있는 것을 알 수 있다.

[0125] 또한, 본 발명에 따른 실시예 1의 단계 3의 조사포닌 조성물 및 비교예 1의 부탄올 분획물에 함유된 각 사포닌의 함량을 정량분석하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

사포닌 성분명	비교예 1의 부탄올 분획물 (mg/g)	실시예 1의 단계 3 (mg/g)
Deapio-platycoside E	10	85
Platycoside E	20	350
Platycodin D ₃	15	85
Deapio-platycodin D ₃ ,	5	40
polygalacin D ₂	3	60
platyconic acid A	80	95
platycodin D ₂	50	80
platcodin D	90	90
2"-O-Acetylpolygalacin D ₂	60	95
Total	333	980

[0127] 상기 표 1을 참조하면, 본 발명에 따른 실시예 1의 단계 3의 조사포닌 조성물은 비교예 1의 부탄올 분획물에 비하여 총 사포닌 함량이 2배 이상 증가하였으며, 특히 Deapio-platycoside E, Platycoside E, Deapio-platycodin D₃, Platycodin D₃ 등 극성이 큰 사포닌 종류들의 함량은 5배 내지 10배 정도 증가하였음을 알 수 있다.

[0128] 이로부터 본 발명에 따른 조사포닌 조성물은 종래의 부탄올을 이용한 사포닌의 추출방법에 따른 조사포닌 조성물에 비하여 유효 사포닌의 함량이 높고 그 순도가 높은 것을 알 수 있다.

[0129] <실험예 2> 추출용매조건에 따른 사포닌의 함량 변화

[0130] 본 발명에 따른 조사포닌 조성물의 추출용매조건에 따른 사포닌 함량의 변화를 알아보기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[0131] 실시예 8 내지 17의 조사포닌 조성물의 중량을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0132]

추출용매	조사포닌 조성물(g)
실시예 8	14.6
실시예 9	1.2
실시예 10	11.3
실시예 11	15.9
실시예 12	19.7
실시예 13	0.6
실시예 14	8.6
실시예 15	15.3
실시예 16	14.0
실시예 17	1.3

[0133]

상기 표 2를 참조하면, 추출용매의 농도에 의존적으로 사포닌 추출효과가 증가하며, 100% 메탄올을 사용하는 경우에 조사포닌 조성물의 함량이 19.7 g으로 사포닌 추출효과가 가장 우수한 것을 알 수 있다. 또한, 착즙을 사용하는 경우에 조사포닌 조성물의 함량이 14.6 g으로 사포닌 추출효과가 우수한 것을 알 수 있다.

[0134]

이로부터 본 발명에 따른 조사포닌 조성물은 추출용매 중 알코올의 농도가 높아질수록 사포닌 추출효과가 증가하며, 메탄올 추출 또는 착즙을 사용하는 경우에 사포닌 추출효과가 우수한 것을 알 수 있다.

[0135]

<실험예 3> 용출용매에 따른 사포닌의 함량 변화

[0136]

본 발명에 따른 조사포닌 조성물의 용출용매에 따른 사포닌의 함량 변화를 알아보기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[0137]

실시예 18 내지 23의 조사포닌 조성물의 수득량 및 회수율을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0138]

용출용액	조사포닌 조성물의 수득량(g)	조사포닌 조성물의 회수율(%)
실시예 18	0.01	1.0
실시예 19	0.32	32.0
실시예 20	0.96	96.0
실시예 21	0.02	2.0
실시예 22	0.42	42.0
실시예 23	0.97	97.0

[0139]

상기 표 3을 참조하면, 조사포닌 조성물의 수득량 및 회수율은 용출용액의 종류에 영향을 받지 않고 용출용액 중 알코올의 농도에 영향을 받는 것을 알 수 있다. 용출용액으로 에탄올을 사용한 상기 실시예 18 내지 20과 용출용액으로 메탄올을 사용한 실시예 21 내지 23의 조사포닌 조성물의 수득량 및 회수율은 큰 차이가 없는 것을 알 수 있다. 반면에, 용출용매로 에탄올을 사용하는 경우에 에탄올의 농도가 10%, 30%, 80%로 높아질수록 조사포닌 조성물의 수득량이 0.01 g, 0.32 g, 0.96 g으로 증가하며, 용출용매로 메탄올을 사용하는 경우에 메탄올의 농도가 10%, 30%, 80%로 높아질수록 조사포닌 조성물의 수득량이 0.02 g, 0.42 g, 0.97 g으로 증가하는 것을 알 수 있다.

[0140]

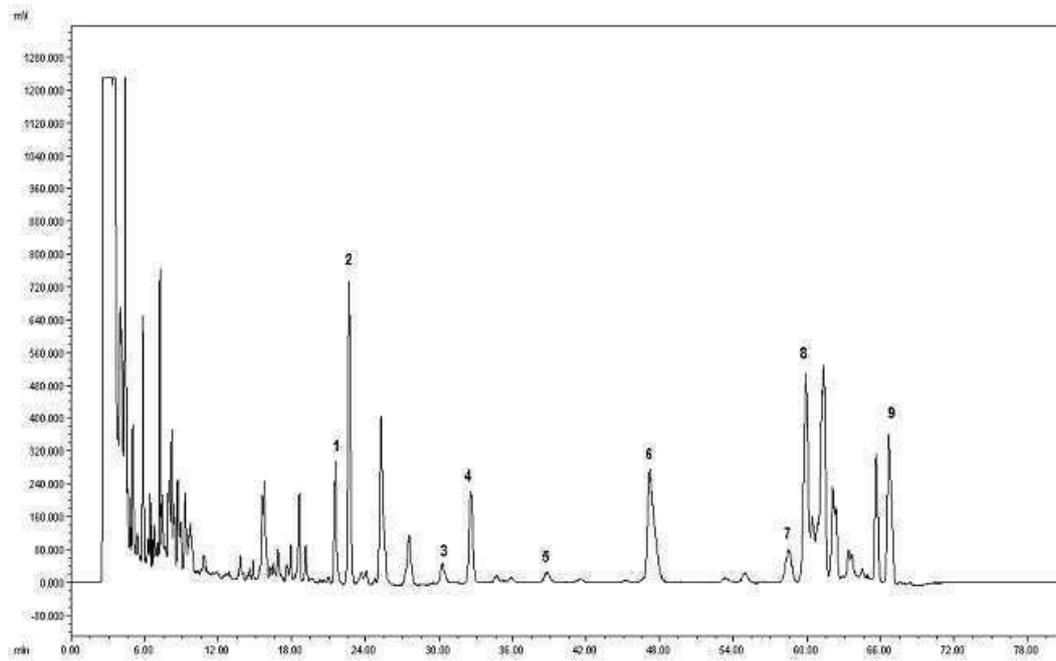
이로부터 본 발명에 따른 조사포닌 조성물은 용출용액 중 알코올의 농도가 높아질수록 조사포닌 조성물의 수득량 및 회수율이 증가하는 것을 알 수 있다.

[0141]

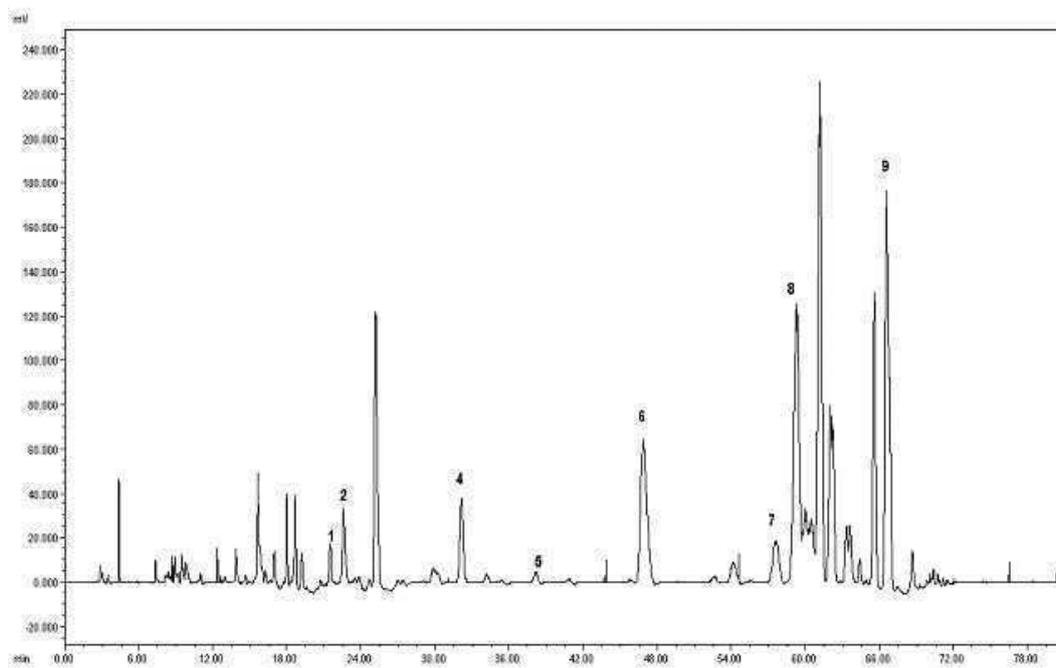
그러므로 본 발명에 따라 제조되는 조사포닌 조성물은 순도 및 유효 사포닌 함량이 높아 사포닌을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 화장용 조성물을 제조하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면

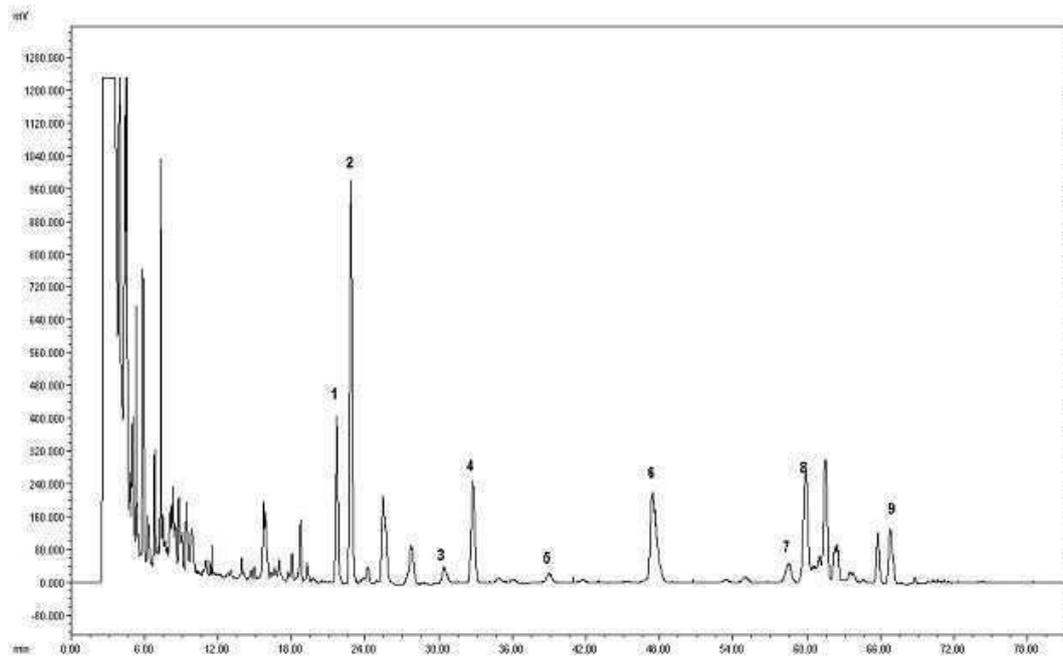
도면1



도면2



도면3



도면4

