



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0103745
(43) 공개일자 2013년09월24일

| | |
|--|--|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 36/23</i> (2006.01) <i>A61P 31/00</i> (2006.01) | (71) 출원인 나뭇렉스 프랑스공화국, 에프-84140 아비뇽, 몽파베, 작 뵈 떼끄놀로지끄 아그로파르끄 |
| (21) 출원번호 10-2013-7009101 | (72) 발명자 뒤발, 샤를르 프랑스공화국, 에프-71000 마콩, 쉬멩 드 라 베까 씨에르, 1 |
| (22) 출원일자(국제) 2011년09월02일 심사청구일자 없음 | (74) 대리인 특허법인오리진 |
| (85) 번역문제출일자 2013년04월09일 | |
| (86) 국제출원번호 PCT/FR2011/052013 | |
| (87) 국제공개번호 WO 2012/032250 국제공개일자 2012년03월15일 | |
| (30) 우선권주장 1057179 2010년09월09일 프랑스(FR) | |

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **센텔라 아시아티카의 추출물의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정제 추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 흡착 수지로 통과시키는 단계; 30 중량% 이상의 알코올성 용매를 포함하는 용리제로 용리시키는 단계; 및 물 및 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물을 사용하여 재결정화하는 단계를 포함한다.

특허청구의 범위

청구항 1

마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정제(refined) 추출물의 제조방법으로서, 하기의 단계를 포함하는 제조방법:

α) 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 수용액을 흡착 수지로 통과시키는 단계;

β) 30 중량% 이상의 알코올성 용매 및 선택적으로 물을 포함하는 용리제로 상기 흡착 수지를 용리시키는 단계; 및

물 및 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물에 의해 재결정화하여 센텔라 아시아티카의 정제 추출물을 수득하는 단계, 여기서 상기 알코올성 용매는 바람직하게는 에탄올, 메탄올 및 부탄올로 이루어진 군에서 선택됨.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 α) 단계 이전에 하기의 단계가 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법:

a) 물, 또는 10 중량% 이상의 물 및 선택적으로 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물에 의해 센텔라 아시아티카의 지상부를 추출하여, 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 수용액을 수득하는 단계.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 β) 단계 이후에 하기의 단계가 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법:

b) 상기 β) 단계 이후에 수득된 용출액을 변색 수지로 통과시켜, 변색된 액상을 수득하는 단계; 및

c) 상기 변색된 액상을 농축하여, 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물을 수득하는 단계.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 재결정화 단계는 하기의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법:

d) 상기 c) 단계 이후에 수득된 추출물을 물 및 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물에 용해화하고, 40℃ 내지 70℃의 온도로 가열하여, 용액을 수득하는 단계;

e) 상기 d) 단계 이후에 수득된 용액의 온도를 -20℃ 내지 30℃로 감소시켜, 냉각된 혼합물을 수득하는 단계;

f) 상기 냉각된 혼합물을 여과하여, 여과액을 수득하는 단계;

g) 상기 여과액을 농축하여, 추출물의 총 중량에 대하여 50 중량% 초과인 터미놀로사이드 및 마데카소사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정제 추출물을 수득하는 단계.

청구항 5

마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정화(purified) 추출물의 제조방법으로서,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 제조방법에 따라 수득된 정제 추출물을 물 및 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물에 의해 정화하는 단계를 포함하는 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 정화 단계는 하기의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법:

- h) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 제조방법에 따라 수득된 정제 추출물에 알코올성 용매 및 선택적으로 물을 포함하는 용매 혼합물을 첨가하고, 25℃ 내지 65℃의 온도로 가열하여, 용액을 수득하는 단계;
- i) 상기 용액의 온도를 -20℃ 내지 30℃로 감소시켜, 냉각된 혼합물을 수득하는 단계;
- j) 상기 냉각된 혼합물을 여과하여, 여과액을 수득하는 단계; 및
- k) 상기 여과액을 농축하여, 추출물의 총 중량에 대하여 90 중량% 초과 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정화 추출물을 수득하는 단계.

명세서

기술분야

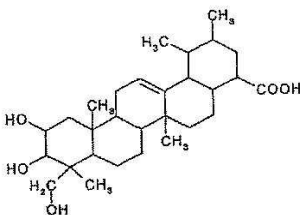
[0001] 본 발명은 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드를 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

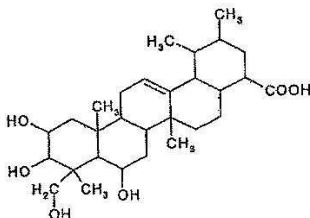
[0002] 센텔라 아시아티카는 산형(Umbelliferae)과(미나리과: Apiaceae), 특히 피막이(Hydrocotyle)아과에 속한다. 이러한 식물은 3,000년 넘게 전통적인 약제로 알려지고 사용되었다. 치료, 진정, 진통, 항우울 및 항균 성질이 특히 관심의 대상이 되었다.

[0003] 센텔라 아시아티카의 활성 화합물은 트리테르펜 게닌(triterpene genin) 형태: 아시아틱산(asiatic acid)(식 I) 및 마데카식산(madecassic acid)(식 II); 또는 트리테르펜 헤테로사이드(triterpene heteroside) 형태: 아시아티코사이드(asiaticoside)(식 III), 마데카소사이드(madecassoside)(식 IV) 및 터미놀로사이드(terminoloside)(식 V);의 펜타시클릭 트리테르펜(pentacyclic triterpene)이다.

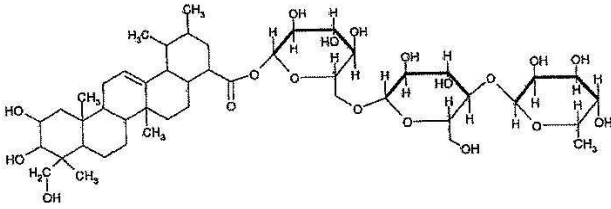
[0004] 식 I: 아시아틱산



[0006] 식 II: 마데카식산

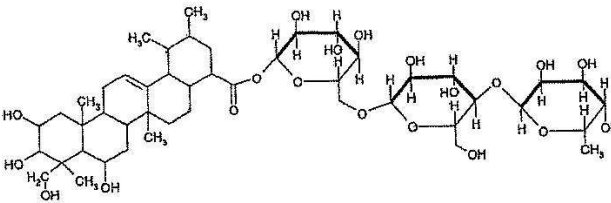


[0008] 식 III: 아시아티코사이드



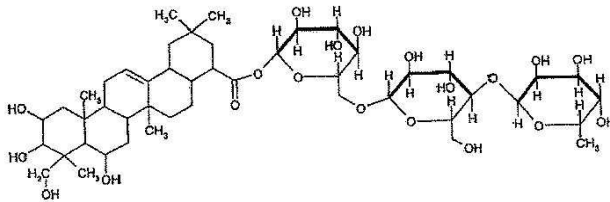
[0009]

[0010] 식 IV: 마테카소사이드



[0011]

[0012] 식 V: 터미놀로사이드



[0013]

[0014] 터미놀로사이드는 마테카소사이드의 위치 이성질체이고, 동일한 당 사슬(sugar chain), 즉 글루코스-글루코스-람노스 사슬을 갖는다. 터미놀로사이드의 테르펜(terpene) 고리 구조는 터미놀릭산(terminolic acid)의 테르펜 고리 구조와 동등하다.

[0015] 본 발명자가 알고 있는 바에 따르면, 아시아티코사이드의 이성질체는 지금까지 발견된바 없다. 그러나, 마테카소사이드와 터미놀로사이드 사이에 존재하는 이성질(isomerism)과 유사한 이성질을 가지는 아시아티코사이드의 위치 이성질체가 존재한다고 추정할 수 있다.

[0016] 센텔라 아시아티카의 헤테로사이드인 아시아티코사이드 및 마테카소사이드는 각각 식물의 아시아틱산 및 마테카식산의 저장 형태를 형성하는 당질 복합체이다.

[0017] 트리테르펜 분자는 이들의 콜라겐 합성 조절 및 활성화 때문에 특히 관심의 대상이다. 센텔라 아시아티카에서 추출된 게닌 및 헤테로사이드는 특히 제1형 및 제3형 콜라겐 합성을 촉진한다. 이들 활성 물질은 약제분야에서 기본적으로 치료를 용이하게 하고 정맥부전(venous insufficiency)을 치료하기 위하여 사용된다. 이들은 미용분야에서 기본적으로 주름 방지제 및 셀룰라이트 방지제로 사용된다. 종래 기술에서 보다 일반적으로 사용되는 센텔라 아시아티카의 활성 화합물은 아시아틱산, 마테카식산 및 아시아티코사이드이다.

[0018] 마테카소사이드는 물에 매우 가용성이기 때문에, 종래의 지용성 활성물질 추출법(liposoluble active substance extraction method)을 사용할 때 마테카소사이드는 일반적으로 세척수에 의해 쓸려 내려간다.

[0019] 국제출원 WO 2004/062678은 마테카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물의 제조방법을 제공하며, 상기 방법은 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물로부터 아시아티코사이드를 제거하기 위하여 액체-액체 추출에 의한 선택성 탈지, 수득된 하이드로-알코올상의 농축, 및 연속 여과 단계를 포함한다. 그러나, 마테카소사이드는 아시아티코사이드의 일부를 가용화시키며, 이러한 잔여분의 아시아티코사이드는 산업적 규모에서 선호되지 않는 고비용의 정제 기술인 실리카겔 크로마토그래피에 의해 제거되어야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명자는 놀랍게도 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 새로운 추출법을 개발하였다. 이러한 방법에서, 본 발명자는 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 용액을 정화하는데 새로운 단계를 사용하였다.

과제의 해결 수단

- [0021] 본 발명은 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물을 제조하는데 있어서 흡착 수지로의 통과 단계의 사용에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에 따른 방법에서 사용되는 흡착 수지는 유리하게는 예를 들어 스티렌-디비닐벤젠(styrene-divinylbenzene) 또는 포르모-페놀(formo-phenolic) 타입 흡착 수지와 같이, 센텔라 아시아티카에 함유된 트리테르펜 헤테로사이드를 흡착하는데 적합한 수지이다.
- [0023] 본 발명은 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물의 제조방법에 관한 것으로서, 하기의 단계를 포함한다:
- [0024] α) 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 수용액을 흡착 수지로 통과시키는 단계; 및
- [0025] β) 상기 흡착 수지를 적어도 30 중량%의 알코올성 용매, 선택적으로 물을 포함하는 용리제로 용리하는 단계.
- [0026] 본 명세서의 범위 내에서, "알코올성 용매"란 하나 이상의 -OH 알코올기를 포함하는 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 더 구체적으로는 메탄올 및 에탄올을 나타낸다.
- [0027] α) 단계 중에, 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 용액을 흡착 수지로 통과시키는 것은 이들 트리테르펜 헤테로사이드의 우선적 흡착을 가능하게 한다.
- [0028] β) 단계에서 사용되는 용리제는 선택적으로는 희석되지 않은 알코올성 용매 또는 유리하게는, 바람직하게는 50 내지 80%의 알코올성 용매, 더욱 바람직하게는 60 내지 70%의 알코올성 용매를 포함하는 알코올성 용매와 물의 혼합물이다.
- [0029] 본 방법의 유리한 일 구현예에서, α) 단계에 앞서 센텔라 아시아티카의 지상부(aerial part)를 물, 또는 10 중량% 이상의 물 및 선택적으로 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물로 추출하여, 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 수용액을 수득하는 α) 단계가 선행될 수 있다.
- [0030] 본 명세서의 범위 내에서, "센텔라 아시아티카의 지상부"는 5cm 이하의 엽병(petiole)을 갖는 라미나(lamina)로 구성되는 센텔라 아시아티카 잎을 나타낸다.
- [0031] 활성 물질은 유리하게는 센텔라 아시아티카 식물에서 그 뿌리를 손상시키지 않음으로써 이러한 다년생 식물의 자연발생적 재생을 가능하게 하는 것을 주목적으로, 센텔라 아시아티카 식물의 지상부를 사용하여 추출된다.
- [0032] 본 발명에 따른 유리한 일 구현예에서, 추출 단계는 물 또는 용매 혼합물(물, 및 선택적으로 알코올성 용매를 포함함)에서 교반하에 지상부가 침윤되는 침윤(maceration) 단계를 포함한다.
- [0033] 본 명세서의 범위 내에서, "용매 혼합물"은 특히 둘 이상의 용매, 바람직하게는 두 용매, 예를 들어 물 및 알코올성 용매의 혼합물을 나타낸다.
- [0034] 상기 침윤은 유리하게는 물, 또는 10 중량% 이상의 물 및 선택적으로 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물을 사용하여, 일반적으로 20 내지 90℃, 바람직하게는 50 내지 70℃, 더욱 바람직하게는 약 50℃의 온도에서, 일반적으로 20 내지 180분 동안, [센텔라 아시아티카]:[용매 혼합물]의 비가 1:2 내지 1:20으로 수행된다.
- [0035] 수득된 침윤 혼합물은 일반적으로 여과되어, 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 수용액이 수득된다. 상기 여과는 일반적으로 보통 600 μ m, 100 μ m 및 25 μ m의 다공성 필터들을 이용하여 연속 여과(successive filtration)에 의해 수행된다.
- [0036] 본 발명에 따른 일 구현예에서, 상기 추출 단계 이후에 수득된 수용액은 처리되는 부피를 감소시키고 2 내지 25%의 건조물을 포함하는 농축액을 수득하기 위하여 선택적으로 농축될 수 있다.
- [0037] 수득된 농축액은 유리하게는 예를 들어 수산화리튬(LiOH), 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH)과 같은 고체

또는 액체 용액 형태의 알칼리 수산화물(alkaline hydroxide), 또는 생석회(quick lime, CaO), 또는 소석회(slaked lime, Ca(OH)_2) 등 미네랄 강염(strong mineral base)을 첨가하여, 농축액의 pH를 바람직하게는 8 내지 12로 조절하도록, 선택적으로 염기화될 수 있다. 미네랄 강염은 바람직하게는 수산화나트륨, 수산화칼륨 및 생석회 중에서 선택된다.

[0038] 강염기의 첨가는 일반적으로 강염기와 반응하기 쉬운 금속 및 다른 물질의 침전, 및 여과에 의한 제거를 가능하게 한다. 일반적으로, 침전 또는 응집된 단백질 및 레지노이드(resinoid) 화합물은 염기화된 혼합물로부터 여과에 의해 이어서 제거된다.

[0039] 상기 여과단계에 따라 수득된 여과액은 유리하게는 예를 들어 인산(H_3PO_4), 염산(HCl), 질산(HNO_3), 황산(H_2SO_4), 과염소산(HClO_4), 브롬화수소산(HBr)과 같은 미네랄 강산(strong mineral acid), 또는 예를 들어 포름산(formic acid), 에타노익산(ethanoic acid), 벤조산(benzoic acid), 시트르산(citric acid) 또는 탄산(carbonic acid) 등 하나 이상의 카르복실산기($-\text{COOH}$)를 포함하는 방향족 또는 비방향족 화합물과 같은 유기산을 첨가하여 선택적으로 산성화될 수 있다. 이러한산성화 단계는 여과액의 pH를 바람직하게는 5 내지 7로 조절하는 데에 적합하다. 미네랄 강산은 바람직하게는 인산 및 염산 중에서 선택된다. 유기산은 바람직하게는 시트르산 또는 탄산 중에서 선택된다.

[0040] 형성된 염 및 침전된 화합물은 산성화된 혼합물로부터 일반적으로 여과에 의해 제거된다.

[0041] 상기 방법의 유리한 일 구현예에서, β) 단계 이후에 하기의 단계가 수행된다:

[0042] b) 상기 β) 단계에 따라 수득된 용출액을 변색 수지(discolouring resin)로 통과시켜, 변색된 액상(aqueous phase)을 수득하는 단계; 및

[0043] c) 상기 변색된 액상을 진공 농축하여, 마테카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물을 수득하는 단계.

[0044] 바람직하게는, 상기 수득된 혼합물은 마테카소사이드, 25 내지 65%의 터미놀로사이드 및 20 내지 40%의 아시아티코사이드로 구성된다.

[0045] 바람직하게는, 상기 수득된 추출물은 추출물의 총 중량에 대하여 25 내지 65 중량%의 터미놀로사이드 및 마테카소사이드 혼합물, 및 20 내지 40 중량%의 아시아티코사이드를 포함한다.

[0046] 본 발명에 따른 유리한 일 구현예에서, β) 단계 후에 수득된 용출액은 먼저 활성화 탄소로 처리된다. 활성화 탄소의 첨가는 일반적으로 지방산 또는 산화 생성물을 고정시켜 용출액의 변색을 가능하게 한다.

[0047] 선택적으로 활성화 탄소로 처리된 상기 용출액은 그 후 알코올성 용매(들)를 증류하여 농축될 수 있다. 그 후, 농축된 용출액은 예를 들어 액상의 불용성 화합물을 제거하기 위하여 여과될 수 있다. 아시아티코사이드의 일부는 일반적으로 용출액의 농축 중에 침전되고, 이어서 일반적으로 여과에 의해 제거된다.

[0048] b) 단계 중에, 선택적으로 활성화 탄소로 처리되고, 선택적으로 농축 및 여과된, β) 단계에서 수득된 용출액은 예를 들어 강한 음이온성 스티렌-클로라이드(strong anionic styrene-chloride) 타입 수지와 같은 변색 수지를 통과함으로써 변색된다.

[0049] 본 발명에 따른 유리한 일 구현예에서, 변색된 액상은 그 후 선택적으로 용해된 염 및 원하지 않는 화합물을 액상에서 제거하기 위하여, 연속적으로 양이온 이온교환 수지 및 음이온 이온교환 수지를 통과시킴으로써 처리된다. 유리하게는, 사용되는 양이온 수지는 설포네이트 타입 기능을 포함하는 강한 양이온성 수지이다. 유리하게는, 사용되는 음이온 수지는 제4차 암모늄 타입 기능을 포함하는 강한 음이온성 수지이다. 본 발명에 따른 방법의 범위 내에서, 잔여 산 분획(residual acid fraction)의 고정을 강화하기 위하여 이온교환 수지의 순서가 중요하다. 그럼에도 불구하고, 상기 순서는 필요에 따라 바뀔 수 있다.

[0050] 양이온 및 음이온 수지로의 연속적인 통과는 유리하게는 반복될 수 있고, 변색된 액상의 상기 수지의 혼합층(mixed bed)으로의 통과에 의해서도 수행될 수 있다.

[0051] c) 단계 중에, 선택적으로 양이온 및 음이온 수지를 통과시킴으로써 처리된 변색된 액상은 진공 농축되며, 수득된 농축액은 일반적으로 진공 또는 분무 건조된다. 농축은 유리하게는 200 내지 100 kDa의 컷오프 임계(cut-off threshold)를 가지는 매질을 사용하는(즉, 200 내지 100,000 g/mol의 분자량을 가지는 분자를 사용하는) 접선 여과막(tangential filtration membrane) 기법을 유기막 또는 무기막에서 사용함으로써 수행할 수 있다.

- [0052] c) 단계 후에, 일반적으로 추출물의 총 중량에 대해 25 내지 65 중량%의 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물, 및 20 내지 40 중량%의 아시아티코사이드를 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물이 수득된다.
- [0053] c) 단계 후에, 일반적으로 추출물의 총 중량에 대해 25 내지 65 중량%의 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물이 수득된다.
- [0054] c) 단계 후에, 일반적으로 추출물의 총 중량에 대해 20 내지 40 중량%의 아시아티코사이드를 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물이 수득된다.
- [0055] 본 발명의 범위 내에서, "아시아티코사이드"는, 선택적으로 이들의 올레아닉 이성질체(oleanic isomer)의 혼합물로 존재하는, 식 III에 따른 화학 분자를 나타낸다.
- [0056] 본 발명은 또한 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정제 추출물의 제조방법으로서, 전술한 방법에 따라 수득된 추출물을 물 및 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물로 재결정화하는 단계를 포함하는 제조방법에 관한 것이다.
- [0057] 재결정화 단계에 적합한 알코올성 용매의 예로는 에탄올, 메탄올, 부탄올 및 이들의 혼합물이 있다.
- [0058] 본 명세서의 범위 내에서, "센텔라 아시아티카의 정제(refined) 추출물"은 추출물의 총 중량에 대하여 50 중량% 초과 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물을 나타낸다.
- [0059] 이와 같은 추출물은 일반적으로 추출물의 총 중량에 대하여 15 중량% 미만의 아시아티코사이드를 포함한다.
- [0060] 본 발명에 따른 재결정화 단계는 다량의 아시아티코사이드의 제거 및 그에 따른 수득된 정제 추출물에서의 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물의 함량의 증가에 적합하다.
- [0061] 재결정화 정화 기법은 용매에 대한 화합물의 냉·온 가용성(hot and cold solubility)의 차이에 기반한다. 고체 화합물은 가용성은 일반적으로 온도에 따라 상승한다. 따라서, 뜨거운 용매에 용해되는 경우, 이들의 결정화는 용액을 과포화상태로 냉각시킴으로써 유도할 수 있다. 따라서, 재결정화는 고체 화합물을 용매 또는 용매 혼합물 중에서 정화되도록 위치시키는 것(일반적으로 끓는점에서), 그 후 용매를 냉각하는 것, 그 후 고체의 결정화를 유도하는 것 및 여과에 의해 분리하는 것으로 구성된다. 용질은 또한 용매를 증발시켜 침전물로 농축될 수 있다.
- [0062] 더욱 구체적으로, 상기 재결정화 단계는 하기의 단계를 포함한다:
- [0063] d) 상기 방법에 따라 c) 단계 후에 수득된 추출물을 물 및 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물에 40 내지 70 °C의 온도에서 용해화시켜, 용액을 수득하는 단계;
- [0064] e) 상기 d) 단계 후에 수득된 용액의 온도를 -20 내지 30°C로 감소시켜, 냉각된 혼합물이 수득되는 단계;
- [0065] f) 상기 냉각된 혼합물을 여과하여, 여과액을 수득하는 단계; 및
- [0066] g) 상기 여과액을 농축하여, 마데카소사이드, 터미놀로사이드 및 아시아티코사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정제 추출물을 수득하는 단계.
- [0067] 본 발명의 범위 내에서, 재결정 용매 혼합물은 물 및 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물이다. 특히 유리한 재결정 용매 혼합물은 70%의 물 및 30%의 알코올성 용매, 바람직하게는 에탄올 또는 메탄올을 포함하며, 바람직하게는 55 내지 65°C, 더욱 바람직하게는 약 60°C의 온도로 가열된다.
- [0068] 재결정 용매 혼합물은 선택적으로 추출물의 용해도가 정화될 수 있도록 가열된다.
- [0069] c) 단계 후에 수득되는 추출물의 용해화 중에, 용매 혼합물은 일반적으로 모든 추출물이 용해되면 용매의 첨가를 멈출 수 있도록 한방울씩 첨가된다.
- [0070] 그 후, 수득된 용액은 아시아티코사이드의 결정화를 유도하기 위하여 냉각된다. 온도의 감소는 유리하게는 1 내지 250시간, 바람직하게는 100 내지 250 시간 동안 일반적으로 느리고 점진적으로 이루어지며, 형성되는 아시아티코사이드 결정의 순도를 높이고 이에 따라 상기 결정에 터미놀로사이드 및 마데카소사이드가 포함(trap)되지 않도록 하여, 모액(mother liquor)에서의 상기 화합물들의 함량을 더 낮춘다. 냉각된 혼합물의 온도는 일반적으로 -10°C 내지 10°C, 바람직하게는 -5°C 내지 5°C이다.
- [0071] 형성된 결정 및 모액(특히 터미놀로사이드 및 마데카소사이드를 포함함)을 포함하는 냉각된 혼합물은 여과되어, 결정화된 및/또는 침전된 불용성 고체 화합물이 도달 온도에서 제거된다. 제거된 결정은 일반적으로 75%를 초과

하는 아시아티코사이드를 함유하며, 이는 재사용될 수 있다.

- [0072] 모액으로도 지칭되는 여과액은 증류에 의해 농축되고 일반적으로 진공 건조된다.
- [0073] 추출물의 총 중량에 대하여 일반적으로 50 중량%, 또는 60 중량%, 또는 70 중량% 초과 마데카소사이드 및 터미놀로사이드 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정제 추출물이 수득된다.
- [0074] 이 추출물은 또한 추출물의 총 중량에 대하여 15 중량%, 또는 10 중량% 미만의 아시아티코사이드를 포함한다.
- [0075] 본 발명은 또한 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정제 추출물의 제조방법으로서, 전술한 방법에 따라 g) 단계 후에 수득되는 정제된 추출물을 물 및 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물로 정화하는 단계를 포함하는 제조방법에 관한 것이다.
- [0076] 본 명세서의 범위 내에서, "센텔라 아시아티카의 정화(purified) 추출물"은 추출물의 총 중량에 대하여 90 중량% 초과 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 추출물을 나타낸다. 이와 같은 추출물은 일반적으로 추출물의 총 중량에 대하여 6 중량% 미만의 아시아티코사이드를 함유한다.
- [0077] 본 발명에 따른 정화 단계는 일반적으로 센텔라 아시아티카의 정제 추출물에 함유되는 아시아티코사이드 중 40%, 또는 50%를 초과하는 비율의 아시아티코사이드를 제거할 수 있게 한다.
- [0078] 본 발명에 따른 첫번째 다른 구현예에 따르면, 정화(purification) 단계는 하기의 단계를 포함한다:
- [0079] h) 상기 방법에 따라 g) 단계 후에 수득되는 정제된 추출물에 알코올성 용매 및 선택적으로 물을 포함하는 용매 혼합물을 첨가하고, 25 내지 65℃의 온도로 가열하여, 용액을 수득하는 단계;
- [0080] i) 상기 용액의 온도를 -20 내지 30℃의 온도로 감소시켜, 냉각된 혼합물을 수득하는 단계;
- [0081] j) 상기 냉각된 혼합물을 여과하여, 여과액을 수득하는 단계;
- [0082] k) 상기 여과액을 농축하여, 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정화 추출물을 수득하는 단계.
- [0083] h) 단계 동안 전술한 방법에 따라 g) 단계 후에 수득되는 정제된 추출물에 첨가된 용매 혼합물은 유리하게는 85 중량%, 바람직하게는 95 중량% 이상의 알코올성 용매를 포함한다. 이러한 용매 혼합물은 바람직하게는 30 내지 50℃, 더욱 바람직하게는 약 45℃의 온도로 가열된다.
- [0084] g) 단계 후에 수득된 추출물의 용해화 동안, 용매 혼합물은 일반적으로 모든 추출물이 용해화되면 용매의 첨가를 멈출 수 있도록 한방울씩 첨가된다.
- [0085] 수득된 용액은 그 후 바람직하게는 1 내지 250 시간 동안, 유리하게는 -15℃ 내지 15℃, 바람직하게는 -10℃ 내지 0℃, 더욱 바람직하게는 약 -5℃로 일반적으로 느리고 점진적으로 냉각된다.
- [0086] 특히 터미놀로사이드 및 마데카소사이드를 포함하는 모액 및 형성된 결정을 포함하는 냉각된 혼합물은 여과되어, 결정화된 및/또는 침전된 불용성 고체 화합물이 도달 온도에서 제거된다. 모액으로도 지칭되는 여과액은 증류에 의해 농축되고 일반적으로 진공 건조된다.
- [0087] 본 발명에 따른 정화 단계 후에, 추출물의 총 중량에 대하여 90 중량% 초과 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 센텔라 아시아티카의 정화 추출물이 수득된다. 이러한 추출물은 또한 추출물의 총 중량에 대하여 6 중량% 미만의 아시아티코사이드를 포함한다.
- [0088] 상기 정화 단계는 유리하게는 센텔라 아시아티카의 정화 추출물의 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 함량을 증가시키기 위하여 2 내지 3회 반복될 수 있다. 정화 단계를 반복하는 것은 추출물의 총 중량에 대하여 95 중량%, 또는 98 중량% 초과 마데카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물, 및 3 중량%, 또는 1 중량% 미만의 아시아티코사이드를 얻을 수 있게 한다.
- [0089] g) 단계 후에 수득되는 센텔라 아시아티카의 정제 추출물 및 k) 단계 후에 수득되는 센텔라 아시아티카의 정화 추출물은 선택적으로 마데카소사이드 및 터미놀로사이드 각각의 함량을 증가시키기 위하여 실리카겔 예비 크로마토그래피(silica gel preparative chromatography)에 의한 연속되는 정화를 거칠 수 있다. 이러한 크로마토그래피 단계는 알코올성 용매 및 물을 포함하는 용매 혼합물을 용리 용매로 사용하여 수행된다.
- [0090] 본 명세서의 범위 내에서, 예비 크로마토그래피에서 사용되는 용리제는 일반적으로 극성 용매이다. 유리하게는, 상기 용매는 물 및 에탄올과 같은 알코올성 용매의 혼합물이고, 바람직하게는 물 및 에탄올을 1:1(50%의 물 및

50%의 에탄올)의 비율로 포함하는 것이다.

- [0091] 본 발명의 범위 내에서, 예비 크로마토그래피 중에 사용되는 정지상은 비극성 정지상이다. 유리하게는, 상기 정지상은 그래프트(graft)된 비극성 실리카로 구성된다. 비극성 그래프트는 유리하게는 2 내지 18개, 더욱 유리하게는 12 내지 18개의 탄소 원자를 포함한다.
- [0092] 본 발명은 또한 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물을 포함하는 셀렐라 아시아티카의 정화 추출물의 제조방법으로서, 하기의 단계를 포함하는 제조방법에 관한 것이다:
- [0093] a) 물, 또는 10 중량% 이상의 물 및 선택적으로 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물로 셀렐라 아시아티카의 지상부를 추출하여, 용액을 수득하는 단계;
- [0094] a) 상기 용액을 흡착 수지로 통과시키는 단계;
- [0095] β) 상기 흡착 수지를 30 중량% 이상의 알코올성 용매 및 선택적으로 물을 포함하는 용리제로 용리시켜, 용출액을 수득하는 단계;
- [0096] b) 상기 용출액을 변색 수지(discolouring resin)로 통과시켜, 변색된 액상을 수득하는 단계;
- [0097] c) 상기 변색된 액상을 농축하여, 추출물을 수득하는 단계;
- [0098] d) 상기 c) 단계 후에 수득된 추출물을 물 및 알코올성 용매를 포함하는 용매 혼합물에 용해화하고 40 내지 70 °C의 온도로 가열하여, 용액을 수득하는 단계;
- [0099] e) 상기 d) 단계 후에 수득된 용액의 온도를 -20 내지 30°C로 감소시켜, 냉각된 혼합물을 수득하는 단계;
- [0100] f) 상기 냉각된 혼합물을 여과하여, 여과액을 수득하는 단계;
- [0101] g) 상기 여과액을 농축하여, 정제된 추출물을 수득하는 단계;
- [0102] h) 상기 방법에 따라 g) 단계 후에 수득된 정제 추출물에 알코올성 용매 및 선택적으로 물을 포함하는 용매 혼합물을 첨가하고 25 내지 65°C로 가열하여, 용액을 수득하는 단계;
- [0103] i) 상기 용액의 온도를 -20 내지 30°C로 감소시켜, 냉각된 혼합물을 수득하는 단계;
- [0104] j) 상기 냉각된 혼합물을 여과하여, 여과액을 수득하는 단계; 및
- [0105] k) 상기 여과액을 농축하여, 마테카소사이드 및 터미놀로사이드를 포함하는 셀렐라 아시아티카의 정화 추출물을 수득하는 단계.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0106] 실시예 1
- [0107] 셀렐라 아시아티카의 원(raw) 추출물의 제조
- [0108] 1킬로의 셀렐라 아시아티카 잎(절단된 잎)을 70°C로 가열된 20L의 물에 침지시킨다. 혼합물이 2시간 동안 교반 하에 침윤되도록 놓아두고, 다공성 필터(600μm, 그 후 100μm, 그 후 25μm)를 증가시키면서 연속적인 여과를 통해 여과한다.
- [0109] 이에 따라, 2%의 건조물 및 건조물의 총 중량에 대하여 11.8 중량%의 적정 농도의 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물, 및 10.9 중량%의 적정 농도의 아시아티코사이드를 포함하는 16.2L의 추출 원액이 생산된다.
- [0110] 셀렐라 아시아티카의 반정제(semi-refined) 추출물의 제조
- [0111] 추출 원액은 RES-00820(Burgundy) 타입 흡착 수지로 통과되고, 상기 수지는 그 후 70 vol/vol%의 에탄올 및 30 vol/vol%의 물로 이루어진 용리제에 의해 용리된다.
- [0112] 회수된 에탄올성 용출액은 RES-01541(Burgundy) 타입 음이온 변색 수지로 통과되고, 변색상(discoloured phase)은 증류를 통해 알코올이 제거되고 진공 농축되어, 변색된 수성 농축물이 수득된다. 이러한 농축액은 그 후 동결 건조된다.
- [0113] 이에 따라, 추출물의 총 중량에 대하여 47.2 중량%의 적정 농도의 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물 및 37.4 중량%의 적정 농도의 아시아티코사이드를 포함하는 70 g의 반정제 추출물이 생산된다.

- [0114] 센텔라 아시아티카의 정제(refined) 추출물의 제조
- [0115] 반정제 추출물은 70%의 물 및 30%의 메탄올을 포함하는 용액에 용해되고, 60℃의 온도로 가열된다. 상기 추출물이 완전히 용해된 후, 용액의 온도는 240 시간에 걸쳐 5℃의 온도로 감소된다(저온유지장치(cryostat), 그 후 냉장실에 보관).
- [0116] 수득된 냉각된 혼합물은 여과되고, 여과액은 증류를 통해 알코올 제거되고 진공 농축되어, 정제된 수성 농축물이 수득된다. 이러한 농축액은 그 후 동결 건조된다.
- [0117] 이에 따라, 추출물의 총 중량에 대하여 67.2 중량%의 적정 농도의 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물, 및 10 중량% 미만(4.5%)의 적정 농도의 아시아티코사이드를 포함하는 45g의 정제된 추출물이 수득된다.
- [0118] 센텔라 아시아티카의 정화(purified) 추출물의 제조
- [0119] 정제된 추출물은 5%의 물 및 95%의 메탄올을 포함하는 용액에 용해되고, 45℃의 온도로 가열된다. 상기 추출물이 완전히 용해된 다음, 용액의 온도는 120 시간에 걸쳐 5℃의 온도로 감소된다.
- [0120] 수득된 냉각된 혼합물은 여과되고, 여과액은 증류를 통해 알코올 제거되고 진공 농축되어, 정화된 수성 농축물이 수득된다. 이러한 농축액은 그 후 동결 건조된다.
- [0121] 이에 따라, 추출물의 총 중량에 대하여 90 중량% 초과(91.2%)의 적정 농도의 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물, 및 6 중량% 미만(3.1%)의 적정 농도의 아시아티코사이드를 포함하는 20g의 정화된 추출물이 생산된다.
- [0122] 실시예 2
- [0123] 센텔라 아시아티카의 원 추출물의 제조
- [0124] 1킬로의 센텔라 아시아티카 잎(절단된 잎)을 50℃로 가열된 15L의 70 부피%의 에탄올에 침지시킨다. 혼합물을 2 시간 동안 교반 하에 침윤되도록 놓아두고, 다공성 필터(600 μ m, 그 후 100 μ m, 그 후 25 μ m)를 증가시키면서 연속적인 여과를 통해 여과한다.
- [0125] 여과액은 그 후 증류를 통해 알코올 제거되고, 농축된 여과액이 여과된다.
- [0126] 이에 따라, 9%의 건조물, 및 건조물의 총 중량에 대하여 11.2 중량%의 적정 농도의 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물, 및 8.6 중량%의 적정 농도의 아시아티코사이드를 포함하는 3.7L의 추출 원액이 생산된다.
- [0127] 센텔라 아시아티카의 반정제 추출물의 제조
- [0128] 추출 원액은 RES-00408(Burgundy) 타입 흡착 수지로 통과되고, 상기 수지는 그 후 60 vol/vol%의 에탄올 및 40 vol/vol%의 물로 이루어진 용리제에 의해 용리된다.
- [0129] 회수된 에탄올성 용출액은 이어서 증류에 의해 알코올 제거되고, RES-01953(Burgundy) 타입 음이온 변색 수지, 그 후 RES-01747(Burgundy) 타입 양이온 이온교환 수지, 그 후 RES-02056(Burgundy) 타입 음이온 이온교환 수지로 통과된다. 수득된 변색 및 탈이온 상은 진공 농축되어, 변색 및 탈이온 수성 농축물이 수득된다. 이러한 농축액은 그 후 동결 건조된다(선택적으로 분무 건조로 대체됨).
- [0130] 이에 따라, 추출물의 총 중량에 대하여 47.2 중량%의 적정 농도의 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물, 및 27.4 중량%의 적정 농도의 아시아티코사이드를 포함하는 60g의 반정제 추출물이 생산된다.
- [0131] 센텔라 아시아티카의 정제(refined) 추출물의 제조
- [0132] 반정제 추출물은 70%의 물 및 30%의 메탄올을 포함하는 용액에 용해되고, 60℃의 온도로 가열된다. 상기 추출물이 완전히 용해된 다음, 용액의 온도는 240 시간에 걸쳐 5℃의 온도로 감소된다(저온유지장치, 그 후 냉장실에 보관).
- [0133] 수득된 냉각된 혼합물은 여과되고, 여과액은 증류를 통해 알코올 제거되고 진공 농축되어, 정제된 수성 농축물이 수득된다. 이러한 농축액은 그 후 동결 건조된다.
- [0134] 이에 따라, 추출물의 총 중량에 대하여 67.5 중량%의 적정 농도의 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물, 및 13.2 중량%의 적정 농도의 아시아티코사이드를 포함하는 35g의 정제된 추출물이 수득된다.
- [0135] 센텔라 아시아티카의 정화(purified) 추출물의 제조

- [0136] 정제된 추출물은 5%의 물 및 95%의 메탄올을 포함하는 용액에 용해되고, 45℃의 온도로 가열된다. 상기 추출물이 완전히 용해된 다음, 용액의 온도는 120 시간에 걸쳐 5℃의 온도로 감소된다.
- [0137] 수득된 냉각된 혼합물은 여과되고, 여과액은 증류를 통해 알코올 제거되고 진공 농축되어, 정화된 수성 농축물이 수득된다. 이러한 농축액은 그 후 동결 건조된다.
- [0138] 이에 따라, 추출물의 총 중량에 대하여 90 중량% 초과(91.5%)의 적정 농도의 마테카소사이드 및 터미놀로사이드의 혼합물, 및 6 중량% 미만(4.6%)의 적정 농도의 아시아티코사이드를 포함하는 20g의 정화된 추출물이 생산된다.