



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년11월09일
(11) 등록번호 10-1080648
(24) 등록일자 2011년11월01일

(51) Int. Cl.

B01D 15/30 (2006.01) *A61K 36/282* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0016498

(22) 출원일자 2009년02월26일

심사청구일자 2009년02월26일

(65) 공개번호 10-2010-0097517

(43) 공개일자 2010년09월03일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020020090672 A*

Preparative Isolation of Alisol B and Alisol B, *Chromatographia* 2009, 69, 791-793 (2009.1.13 online publication)*

KR100127777 B1

JP05149934 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

서울대학교산학협력단

서울 관악구 신림동 산 56-1

(72) 발명자

김진웅

서울특별시 관악구 봉천7동 산 4-2 교수아파트 122B동 201호

윤기동

서울특별시 관악구 봉천동 1717 관악푸르지오아파트 120동 1602호

(74) 대리인

신동인

전체 청구항 수 : 총 4 항

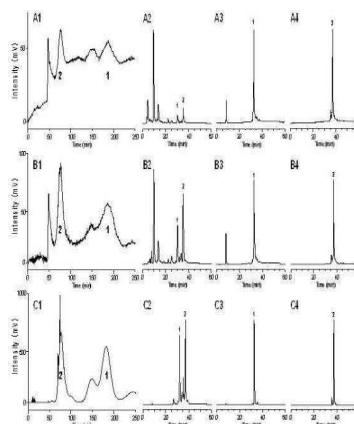
심사관 : 박수진

(54) **쑥속 (*Artemisia species*) 식물의 추출물로부터 원심향류분배 크로마토그래피를 이용한 고농도 유파티린(Eupatilin) 및 자세오시딘 (Jaceosidine) 을 대량으로 분리 및 생산하는 방법**

(57) 요약

쑥속(*Artemisia species*)식물의 추출물로부터 원심향류분배 크로마토그래피를 이용한 고농도 유파티린(Eupatilin) 및 자세오시딘(Jaceosidine)을 대량으로 분리 및 생산하는 방법에 관한 것으로서, 상세하게는 본 발명의 쑥속식물의 추출물로부터 혼화되지 않는 두 상의 용매계의 분배계수의 차이를 극대화시킨 원심향류분배 크로마토그래피(Centrifugal Partition Chromatography, CPC)를 이용하여 안정성, 수득률 및 경제성이 뛰어난 고농도 유파티린 및 자세오시딘을 대량으로 분리 및 생산하는 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

쑥, 사자발쑥, 타래쑥(*Artemisia princeps* Pampan.), 또는 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)을 추출하여 조추출물, 추출 분획물 또는 추출 정제물의 수득하는 제 1단계; 상기 조추출물, 추출 분획물 또는 추출 정제물의 용매 시스템은 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수)의 혼합 용매이고, CPC의 회전 속도가 600 ~ 1000rpm이고, 이동상의 용리속도는 1.0 ~ 2.0 ml/min인 원심향류분배 크로마토그래피 (CPC)를 이용하여 단일의 유파티린 및 자세오시딘만을 고함유한 화합물을 대량으로 분리하는 제 2단계 공정을 포함하는 쑥, 사자발쑥, 타래쑥(*Artemisia princeps* Pampan.), 또는 개똥쑥(*Artemisia annua* L.) 추출물로부터 유파티린 및 자세오시딘을 대량으로 분리하는 분리 및 생산 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물인 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 추출 분획물은 제 1항에 기재된 조추출물을 물에 현탁하여 얻은 조추출물 현탁액에, 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄, 메틸렌클로라이드 또는 에틸아세테이트의 비극성 용매로 순차적으로 분획하여 수득되는 비극성 용매 가용 분획물; 및 상기 비극성 용매 가용부로 제거하고 남은 잔사에 탄소수 1 내지 4의 극성용매로 분획하여 수득되는 극성용매 가용 추출 분획물을 포함하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 추출 정제물은 상기 조추출물, 추출 분획물을 대상으로 보다 활성이 강한 생리활성 성분을 분리하기 위하여 수행되는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법, 세파텍스 컬럼 크로마토그래피법 또는 이온교환수지 컬럼 크로마토그래피법의 분리 정제용 컬럼크로마토그래피를 통하여 수득되는, 제 1항의 조추출물, 추출 분획물보다 정제된 형태의 추출 정제물인 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명의 쑥속식물의 추출물로부터 혼화되지 않는 두 상의 용매계의 분배계수의 차이를 극대화시킨 원심향류 분배 크로마토그래피(CPC)를 이용하여 안정성, 수득률 및 경제성이 뛰어난 고농도 유파티린 및 자세오시딘을 대량으로 분리 및 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] [문헌 1] Kwon et al., Korean J. Medicinal Crop. Sci., 15, pp.233-240, 2007
- [0003] [문헌 2] Ryu et al., Korean J. Crop. Sci., 49, pp.452-456, 2004
- [0004] [문헌 3] Bae K., The Medicinal Plants of Korea, Kyo-Hak, pp.488-489, 2000
- [0005] [문헌 4] Kang et al., Diabetes Res. Clin. Pract., 82, pp.25-32, 2008
- [0006] [문헌 5] Kim et al., Biochem. Pharmacol., 68, pp.1081-1087, 2004
- [0007] [문헌 6] Lee et al., J. Ethnopharmacol., 98, pp.339-343, 2005
- [0008] [문헌 7] Lee et al., Int. Immunopharmacol., 7, pp.1678-1684, 2007
- [0009] [문헌 8] Kim et al., Arch. Pharm. Res., 31, pp.429-437, 2008

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0010] 현재, 질병을 치료하는 약물이나 질병의 치료를 기대하는 물질이 동물, 식물, 미생물 등으로부터 다양하게 분리되어 있지만, 이러한 물질들은 구조적으로 화학적 합성에 의해 확보하기가 어려워 물질의 기원으로부터 분리를 통해 얻어지고 있다.
- [0011] 예를 들어 항암제로 쓰이고 있는 탁솔의 경우 전합성의 곤란성으로 인해 탁솔의 기원인 주목나무로부터 직접 분리하거나 영국산 주목나무 잎에서 탁산유도체(10-deacetyltaxol, 10-deacetylbaicacation, cephalomannine)를 분리하여 반합성을 이용하는 방법으로 생산하고 있다. 따라서 천연물로부터 이러한 약리활성을 나타내는 화합물들을 효율적으로 분리하기 위하여 많은 연구자들이 이들의 추출, 분리, 정제과정에 관한 여러 방법들을 개발, 보고하고 있는 실정이다. 일반적으로 천연물 성분분리는 여러 종류의 고체 정지상과 액체 이동상을 이용한 칼럼 크로마토그래피법을 이용하고 있다. 최근에 많이 사용되고 있는 분취용 HPLC 분리법은 여러 단계를 거쳐야 하는 오픈 칼럼 크로마토그래피 또는 중기압 칼럼 크로마토그래피(medium pressure column chromatography)에 비해 고 분리능과 분리시간의 단축을 장점으로 하는 분리방법으로 보고되고 있다. 하지만 이 방법은 한 번에 분리할 수 있는 양에 제한이 있고, 장비의 가격과 고체 정지상의 주기적인 교체의 이유로 분리 양에 비해 비용이 많이 들어 대량분리/생산 방식의 공업화에 어려움이 있다. 또한 고체 정지상을 사용할 경우 고체 정지상에 대한 시료의 흡착 문제로 시료의 손실이 발생한다.
- [0012] 원심향류분배크로마토그래피(Centrifugal Partition Chromatography, 이하, CPC 이라 함)는 액체-액체 크로마토그래피(liquid-liquid chromatography)의 일종으로써, 서로 상이 나누어지는 두 액체를 고정상과 이동상으로 하여 두 상 사이에 목적성분의 분배계수의 차이에 의하여 성분 분리가 이루어지는 원리를 가지며, 고정상으로 실리카겔과 같은 고체를 사용하지 않고 순수 액체만을 사용하므로, 고정상 고체를 사용시 발생하는 목적성분의 비가역적 흡착, 화학적 반응이 전혀 일어나지 않기 때문에 액체-고체 크로마토그래피에 비하여 목적성분의 안정성 및 수득률이 뛰어나는 뿐만 아니라, 비싼 고체 고정상을 사용하지 않고 오직 용매만을 사용하기 때문에 경제성이 탁월하다는 장점이 있어 천연물의 분리 및 유기합성물의 정제법에 일부 응용되고 있으나 우리나라에서 천연 의약품의 조성물의 제조법에 활용한 예는 없다.
- [0013] 쑥속(Artemisia spp.) 식물은 우리나라 전국의 산야에 분포하는 여러해살이 풀로 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본이고 북반구에 약 200여종이 알려져 있으며 우리나라에 38종이 분포한다고 보고되고 있으나 종의 구분은 명확하게 이루어지지 않고 있다(Kwon et al., Korean J. Medicinal Crop. Sci., 15, pp.233-240, 2007; Ryu et al., Korean J. Crop. Sci., 49, pp.452-456, 2004). 민간에서 쑥속 식물은 약쑥, 애엽, 애자 등으로

블리우고 예로부터 식용으로 사용되고 있으며 약용으로는 쑥속 식물의 하나인 더위지기 (*Artemisia iwayomogi* Kitamura)의 전초를 인진호 (茵陳蒿)라 부르고, 황달, 해열, 진통, 지혈에 사용하였으며, 개똥쑥 (*Artemisia annua* Linne)은 항말라리아 효과를 가지는 아르테미시닌(artemisinin)의 원료 생약으로 알려져 있다(Bae K., The Medicinal Plants of Korea, Kyo-Hak, pp.488-489, 2000). 또한, 현재 동아제약의 ‘스티렌(STILLEN)’은 위점막보호작용을 가지는 위염치료제로써 애엽 95% 에탄올 추출물로 이루어져 있고 1 정중에 유파티린 0.48 1.4 mg 을 함유한다고 알려져 있으며, 추가로, 최근의 보고에 따르면 쑥속 식물의 플라보노이드 계열 화합물인 유파티린(eupatilin)과 자세오시딘(jaceosidine)의 항위염 활성이 보고되고 있어 이 두 화합물에 대한 관심이 폭발적으로 증가되는 추세이고, 그밖의 유파티린은 당뇨를 유발한 흰쥐의 간과 혈장 글루코스의 대사의 촉진 및 인슐린 분비 증강작용(Kang et al., Diabetes Res. Clin. Pract., 82, pp.25-32, 2008), 종양증식억제작용(Kim et al., Biochem. Pharmacol., 68, pp.1081-1087, 2004), 등이 알려져 있으며, 자세오시딘은 항암작용(Lee et al., J. Ethnopharmacol., 98, pp.339-343, 2005), 과민반응 억제작용(Lee et al., Int. Immunopharmacol., 7, pp.1678-1684, 2007), 항염증 작용(Kim et al., Arch. Pharm. Res., 31, pp.429-437, 2008)이 알려져 있으나, 상기 문헌의 어디에도 쑥속식물의 추출물로부터 원심향류분배 크로마토그래피를 이용한 고농도 유파티린 및 자세오시딘을 대량으로 분리 및 생산하는 효율적인 방법이 교시되거나 기재된 바가 없다.

[0014] 이에 본 발명자들은 쑥속 식물의 성분인 유파티린과 자세오시딘이 천연물의약품으로서 응용될 수 있는 가능성이 높아, 그 약리효과를 극대화하는 한편 대량의 유파티린 및 자세오시딘을 확보하기 위해서는 유파티린 및 자세오시딘을 고농도로 함유하는 조성물 제조법 및 단일성분 분리법이 필수적이라 생각하여, 혼화되지 않는 두 상의 용매계의 분배계수의 차이를 극대화시킨 원심향류분배 크로마토그래피(Centrifugal Partition Chromatography, CPC)의 장점을 살린 용매조건 및 분리방법을 이용하여 고농도 유파티린 및 자세오시딘을 대량으로 분리 및 생산하는 방법을 개발함으로써, 비용, 시간 등의 절감 효과뿐만 아니라, 최종 산물의 고수율, 고농도 및 안정성 효과 등의 장점을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 쑥속 식물을 추출하여 추출물을 수득하는 제 1단계; 상기 추출물을 원심향류분배 크로마토그래피 (CPC)를 이용하여 단일의 유파티린 및 자세오시딘만을 고함유한 화합물을 대량으로 분리하는 제 2단계 공정을 포함하는 쑥속 식물 추출물로부터 유파티린 및 자세오시딘을 대량으로 분리하는 분리 및 생산 방법을 제공한다.

[0016] 본원에서 정의되는 “쑥속식물”은 쑥, 사자발쑥, 타래쑥(*Artemisia princeps* Pampan.), 개똥쑥(*Artemisia annua* Linne), 개사철쑥(*Artemisia apiacea* HANCE), 비쑥(*Artemisia scoparia*), 맑은대쑥(개제비쑥, *Artemisia keiskeana*), 물쑥(*Artemisia selengensis* TURCZ.), 흰쑥(*Artemisia stelleriana* Bess), 더위지기(*Artemisia iwayomogi* Kitamura), 털산쑥(*Artemisia sacrorum* subsp.), 약쑥 (*Artemisia asistica* Nakai), 산쑥 (*Artemisia montana* Pampan), 인진쑥(*Artemisia iwayomogi* Kitamura), 사철쑥(*Artemisia capillaris* Thunb.), 참쑥(*Artemisia lavandulaefolia*), 황해쑥(*Artemisia argyi*), 또는 제비쑥(*Artemisia japonica* Thunb.) 등이며, 바람직하게는 쑥, 사자발쑥, 타래쑥, 약쑥 또는 인진쑥을 포함한다.

[0017] 본원에서 정의되는 “추출물”은 조추출물, 추출 분획물 및 추출 정제물을 포함한다.

[0018] 본원에서 정의되는 “조추출물”은 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물, 에탄올 또는 에탄올과의 혼합용매에 가용한 추출물, 보다 바람직하게는 80 내지 100% 에탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[0019] 본원에서 정의되는 “추출 분획물”은 상기 “조추출물”을 물에 현탁하여 얻은 조추출물 현탁액에, 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄, 메틸렌클로라이드 또는 에틸아세테이트 등의 비극성 용매로 순차적으로 분획하여 수득되는 비극성 용매 가용 분획물; 및 상기 비극성 용매 가용부로 제거하고 남은 잔사에 탄소수 1 내지 4의 극성용매로 분획하여 수득되는 극성용매 가용 추출 분획물을 포함한다.

[0020] 본원에서 정의되는 “추출 정제물”은 상기 조추출물, 추출 분획물로부터 보다 활성을 강한 생리활성 성분을 분리하기 위하여 수행되는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법, 세파텍스 컬럼 크로마토그래피법 또는 이온교환수지 컬럼 크로마토그래피법 등의 당업계에 잘 알려진 일반적인 분리 정제용 컬럼 크로마토그래피를 통하여 수득되는, 상기 조추출물, 추출 분획물 보다 정제된 형태의 추출 정제물을 포함한다.

- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명의 추출물은 건조된 쑥을 건조중량의 약 1 내지 30배 부피량, 바람직하게는 5 내지 15배 부피량(w/v%)의 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물, 에탄올 또는 에탄올과의 혼합용매에 가용한 추출물, 보다 바람직하게는 80 내지 100% 에탄올을 가하여, 약 0 내지 100℃로, 실온에서 1 내지 20 시간, 바람직하게는 3 내지 15 시간 동안 냉침 추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 또는 가열추출법 등의 추출방법으로, 바람직하게는 초음파 추출 방법으로 약 1 내지 7회, 바람직하게는 2 내지 5회 추출한 후 여과하고 감압 농축하여 본 발명의 쑥 조추출물을 얻을 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로부터 얻어진 쑥 조추출물로부터 추출 분획물 및 추출 정제물을 제조할 수 있다.
- [0024] 구체적으로, 본 발명의 추출 분획물은 상기 제조방법으로부터 얻어진 쑥 조추출물을 물(탈이온수)에 현탁시킨 후에 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄, 메틸렌클로라이드 또는 에틸아세테이트 등이며, 바람직하게는 헥산, 메틸렌클로라이드 또는 에틸아세테이트로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 가용한 용매를 이용하여 1회 내지 10회, 바람직하게는 2회 내지 5회 반복하여 순차적으로 분획한 후 여과하고 감압 농축하여 비극성 용매 가용 분획물을 수득한 후에; 남은 잔사에 탄소수 1 내지 4 등의 극성 용매로 분획을 수행하여 수득되는 극성 용매 가용 추출 분획물을 수득 가능하다.
- [0025] 또한, 본 발명의 추출 정제물은 상기 제조방법으로부터 얻어진 쑥 조추출물 또는 추출 분획물을 대상으로 보다 활성을 강한 생리활성 성분을 분리하기 위하여 수행되는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법, 세파텍스 컬럼 크로마토그래피법 또는 이온교환수지 컬럼 크로마토그래피법 등의 당업계에 잘 알려진 일반적인 분리 정제용 컬럼 크로마토그래피를 통하여 수득되는 정제된 형태의 추출 정제물을 얻을 수 있다.
- [0026] 최종적으로, 상기 쑥속식물의 추출물로부터 활성 성분인 유파티린 및 자세오시딘만을 고함유한 화합물을 대량으로 분리하는 본 발명의 방법을 하기에 상세하게 예시한다.
- [0027] 예를 들어, 본원에서 정의되는 쑥속식물의 추출물인 조추출물, 추출 분획물 및 추출 정제물을 상용의 원심향류 분배 크로마토그래피(CPC), 예를 들어, Model LLB-M High Performance CPC 기기를 이용하여 (a) 용매 시스템은 혼화되지 않는 두 상(phase)의 용매계의 분배계수의 차이를 극대화시킨 용매 시스템, 구체적으로는, 혼합용매에서 나누어지는 상층 및 하층에 분배되는 분배상수가 0.5 내지 5 범위를 갖고, 근접한 분배상수를 갖는 기타 물질과 1.5 내 이상의 분배 상수 차이를 갖는 용매 시스템, 예를 들어, 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수)의 혼합 용매, 바람직하게는, 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수)의 혼합비가 1:3~7:3~7:1~5 (v/v), 보다 바람직하게는 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수)의 혼합비가 1:4~6:4~6:1~3 (v/v)의 용매시스템(순상 또는 역상)을 적용하고; 고정상을 펌프를 이용하여 CPC에 용리시켰으며; CPC의 방출구에서 고정상이 흘러나오는 것이 육안으로 관찰될 때 이를 중지하고, (b) CPC의 회전 속도가 약 600 내지 1000rpm, 바람직하게는, 약 800 rpm으로 고정시킨 후에 하향 모드(descending mode)로 하여 이동상을 용리시키고 CPC의 방출구에서 이동상이 용리되는 것이 확인되는 것이 관찰될 때 리오딘 밸브와 루프를 사용하여 시료를 주입한다. 이때 (c) 바람직한 이동상의 용리속도는 약 1.0 내지 2.0 ml/min이며, 보다 바람직하게는 1.3 ml/min 이다.
- [0028] 보다 구체적으로, 본 발명에서 사용되는 원심향류분배 크로마토그래피의 용출액은 HPLC-자외선 검출기를 이용하여 검출함과 동시에 자동 분취기를 사용하여 분획하고; 얻어진 유파티린 및 자세오시딘으로 분리하기 위해서 적정한 K-value값을 가진 용매 시스템, 바람직하게는 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수), 보다 바람직하게는, 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수) (1:5:5:2, v/v) 용매시스템(순상 또는 역상)을 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수)의 용매는 혼합하여 분획 여두에 담고 이를 강하게 흔들어 진탕하여 만든 후 하층을 이동상으로, 상층을 고정상으로 나누어 상층과 하층을 분리하여 따로 담고, 사용 전에 바로 초음파 처리하여 기포를 제거한 후, 원심향류분배 크로마토그래피의 분리방법은 상기과 동일하게, 고정상을 펌프를 이용하여 CPC에 용리시켰으며. CPC의 방출구에서 고정상이 흘러나오는 것이 육안으로 관찰될 때 이를 중지시켰고, CPC의 회전을 약 600 내지 1000rpm, 바람직하게는, 약 800 rpm으로 고정시킨 후 하향 모드(descending mode)로 하여 이동상을 용리시켰으며 CPC의 방출구에서 이동상이 용리되는 것이 확인되는 것이 관찰될 때 리오딘 밸브와 루프를 사용하여 시료를 주입하였으며, 이때 이동상의 용리속도는 1.0 내지 2.0 ml/min이며, 바람직하게는 1.3 ml/min로 한다.
- [0029] 본 발명자들은 상기 제조방법으로 수득되는 쑥속식물의 추출물을 대상으로 한 원심향류분배 크로마토그래피를

이용함으로써 안정성, 수득률 및 경제성이 뛰어난 고농도 유파티린 및 자세오시딘을 대량으로 분리 및 생산하는데 유용함을 확인하였다.

효 과

[0030] 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 쑥속식물의 추출물로부터 혼화되지 않는 두 상의 용매계의 분배계수의 차이를 극대화시킨 원심향류분배 크로마토그래피(CPC)를 이용하여 안정성, 수득률 및 경제성이 뛰어난 고농도 유파티린 및 자세오시딘을 대량으로 분리 및 생산하는 방법으로 유용하게 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예, 참고예 및 실험에는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0032]

[0033] 참고예 1. 실험 준비

[0034] 쑥의 성분을 확인하기 위한 원심향류분배 크로마토그래피(CPC) 기기는 LLB-M High performance centrifugal partition chromatography (Sanki Eng., Kyoto, Japan)을 사용하였다. 이동상 및 고정상을 송액하기 위한 펌프(pump)로는 Gilson 321 pump (Middleton, WI, USA)를 사용하였고 자동분취기는 Gilson FC 203B (Middleton, WI, USA)를 사용하였으며, 시료 주입을 위하여 리오딘 밸브(Rheodyne valve, Cotati, CA, USA)를 사용하였으며 5 mL 루프를 사용하였다. 또한 CPC에서 용리하는 성분 모니터링을 위해 Gilson UV/VIS 디텍터 (Middleton, WI, USA)를 사용하였다. CPC에서 나온 분획에 대한 성분 분석을 위해서 워터스 520 펌프(Waters 520 pump, Milford, MA, USA) 및 워터스 996 포토다이오드 어레이 디텍터(Waters 996 photodiode array detector, Milford, MA, USA) 및 워터스 717 플러스 오토샘플러(Waters 717 plus autosampler, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 그밖의 유기 용매는 (주)대정화학금속에서 구입하여 사용하였고, 물(탈이온수)은 (Millipore Rios™ water purification system, Bedford, MA, USA)를 이용하여 사용하였으며, HPLC 분석에 사용된 탈이온수와 아세트니트릴은 한국피서과학 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 데이터의 처리 및 산정은 엠파워 소프트웨어 (Empower software)를 이용하였다.

[0035] 실시예 1. 쑥 추출물의 제조

[0036] 1-1. 쑥 에탄올 조추출물의 제조

[0037] 경동시장에서 구입한 건조된 쑥(*Artemisia princeps* Pampan.) 600g을 곱게 분쇄하여 분쇄된 쑥에 95% 에탄올((주)대정화학금속) 6L를 3시간씩 3회 가열하여 추출한 후 여과하고, 이 여과액을 감압농축기를 이용하여 향량이 될 때까지 감압 건조하여 쑥 에탄올 조추출물 47g(이하, A-EtOH 라 함)을 얻었다.

[0038] 1-2. 에틸아세테이트 추출 분획물의 제조

[0039] 경동시장에서 구입한 건조된 쑥(*Artemisia princeps* Pampan.) 600g을 곱게 분쇄하여 분쇄된 쑥에 95% 에탄올((주)대정화학금속) 6L를 넣고 3시간씩 3회 가열하여 추출한 후 여과하고, 이 여과액을 감압농축기를 이용하여 감압 건조하여 쑥 에탄올 추출물 52g을 얻었다. 감압 건조된 에탄올 추출물을 1.5 L의 물(탈이온수)에 현탁시켰고 여기에 물과 헥산 두 층으로 분획하여 헥산 추출물을 얻은 후 다시 물층을 계속 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하여 향량이 될 때까지 감압 건조하였으며, 최종적으로 에틸아세테이트 가용 추출 분획물 4.3 g(이하, A-EtOAc 라 함)을 얻었다.

[0040] 1-3. 세파덱스(Sephadex) LH-20 칼럼 크로마토그래피로 정제한 추출 정제물의 제조

[0041] 경동시장에서 구입한 건조된 쑥(*Artemisia princeps* Pampan.) 600g을 곱게 분쇄하여 분쇄된 쑥에 95% 에탄올

((주)대정화학금속) 6L를 넣고 3시간씩 3회 가열하여 추출한 후 여과하고, 이 여과액을 감압농축기를 이용하여 감압 건조하여 썬 에탄올 추출물 49g을 얻었다. 이를 메탄올을 용출용매로 하여 세파덱스(Sephadex) LH-20 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 크게 2 개의 분획으로 나누었으며 이 중 두번째 분획을 항량이 될 때까지 감압농축하여 엽록소 및 지질 등의 불순물이 제거된 유파티린과 자세오시딘만을 고함유한 추출 정제물 421 mg(이하, A-Sep 라 함)을 얻었다.

실시예 2. 썬 화합물들의 분리

2-1. 용매 시스템계의 선정

본 실험에서 사용되는 썬속식물의 추출물에서 분리된 유파티린 및 자세오시딘이 혼합용매에서 나누어지는 상층과 하층에 분배되는 분배상수가 0.5~5사이의 값을 가지고, 근접한 분배상수를 가지는 다른 물질과 1.5배 이상의 분배 상수 차이를 가지는 클로로포름: 메탄올: 물, 헥산: 에틸아세테이트: 메탄올: 물, 부탄올: 에탄올: 물, 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수) 등의 용매시스템을 배합하여 K value 값을 측정한 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이 헥산: 클로로포름: 메탄올: 탈이온수 (2:5:5:2, v/v)가 유파티린 및 자세오시딘을 분리하기 위한 최적의 용매배합임을 확인할 수 있었다 (표 1 참조).

표 1

용매조성	용매비율	유파티린(K)	자세오시딘 (K)
헥산-클로로포름-메탄올-탈이온수	1:5:5:2	0.23	0.76
헥산-클로로포름-메탄올-탈이온수	2:5:5:2	0.25	1.25
헥산-클로로포름-메탄올-탈이온수	3:5:5:2	0.28	1.98

상기 참고예에서 선정한 용매계에서 적절한 분배상수를 가지더라도 원심향류분배 크로마토그래피분리 과정에서 정지상이 칼럼에 머무름 비율이 작으면 실패할 확률이 크므로 정지상의 머무름 비율을 확인해야 하며, 원심향류분배 크로마토그래피분리 과정에서 이동상의 흐름속도와 칼럼의 원심속도는 분리능을 좌우하므로, 이동상의 흐름속도는 낮을수록 분리능은 좋아지지만 전체 분리시간이 증가하며, 칼럼의 원심속도는 증가할수록 분리능이 증가한다.

상기 실시예 1에서 얻은 썬 추출물(조추출물, 추출 분획물, 추출 정제물)을 각각 150mg, 100mg, 50mg을 시험관에 넣고 평형화된 2상계의 이동상 층에 5ml를 녹여 첨가한다. 시험관에서 충분히 교반한 후에 두개의 층으로 깨끗하게 나누어지면 각 층을 분리 한 후에 질소가스를 이용하여 건조한다. 각 층의 잔사는 메탄올에 녹여 HPLC과정을 수행한다. 분배상수는 상층액에 포함되어 있는 목표물질의 피크면적을 하층액의 피크면적으로 나눈 값으로 계산한다.

2-2. 원심향류분배 크로마토그래피를 이용한 분리조건

본 실험에 사용한 원심향류분배 크로마토그래피를 이용한 분리조건은 하기와 같다.

헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수)의 용매는 혼합하여 분획 여두에 담고 이를 강하게 흔들어 진탕하여 만든 후 하층을 이동상으로, 상층을 고정상으로 나누어 상층과 하층을 분리하여 따로 담고, 사용 전에 바로 초음파 처리하여 기포를 제거한 후, 상기의 고정상에 펌프를 이용하여 CPC의 방출구에서 고정상이 흘러나오는 것이 육안으로 관찰될 때 중지시킨 후에 800rpm 원심의 속도로 고정시키고, 하향 모드(descending mode)로 하여 이동상을 용리시켜서 CPC의 방출구에서 이동상이 용리되는 것이 확인되는 것이 관찰될 때 시료를 주입하여 이동상을 1.3 ml/min 흐름속도로 흘렸으며, CPC의 방출구 내에서 정지상과 이동상간의 평형화가 이루어지면 각 시료 (A-EtOH (150 mg), A-EtOAc (100 mg), A-Sep (50 mg))를, 이동상 5 ml에 녹여서 주입하고, 약 250 분간 작동한다. CPC에서 용리되어 나오는 용리액은 자외선 검출기를 이용하여 340 nm에서 모니터링 하였고 용리액은 자동 분취기를 이용하여 1개의 시험관당 6.5 ml 씩 분취하였다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

원심향류분배 크로마토그래피의 용출액은 HPLC-자외선 검출기를 이용하여 검출함과 동시에 자동 분취기를 사용하여 분획하고, 얻어진 각각의 유파티린 및 자세오시딘으로 분리하기 위해서 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수) (2:5:5:2, v/v) 용매계(순상)를 사용하였다.

- [0053]
- [0054] **실험예 1. 단일 유파티린 및 자세오시딘의 함량 측정**
- [0055] 상기 실시예 1에서 얻은 썬 추출물(조추출물, 추출 분획물, 추출 정제물)을 각각 150mg, 100mg, 50mg을 상기 실험예 2-2의 CPC의 헥산: 클로로포름: 메탄올: 물(탈이온수)(2:5:5:2, v/v) 용매시스템(순상)을 이용하여 각각의 추출물, 추출 분획물 및 추출 정제물에서 유파티린과 자세오시딘을 분리하여 함량을 측정하였다.
- [0056] 그 실험 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 원심향류분배 크로마토그래피 실험방법에 의해 수행되어진 추출물(조추출물, 추출 분획물, 추출 정제물)로부터 얻은 각 단일 유파티린 및 자세오시딘의 함량은 추출물(에탄올)의 경우는 유파티린(5.8mg), 자세오시딘(2.7mg)이었고, 추출 분획물(에틸아세테이트)의 경우는 유파티린(12.4mg), 자세오시딘(9.1mg)이었으며, 추출 정제물(칼럼크로마토그래피)의 경우는 유파티린(20.1mg), 자세오시딘(11.7mg)이었다(도 1 참조).
- [0057] 이러한 결과는, 기존에 판매중인 유파티린이 함유된 정제의 경우 보다 원심향류분배 크로마토그래피법을 이용한 유파티린이 약 2 ~ 4배의 높은 함량을 가지고, 상대적으로 적은 양의 시료로 큰 약리효과를 낼 수 있을 것으로 사료됨에 따라 경제성이 뛰어날 뿐만 아니라, 품질을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 보인다.
- [0058]
- [0059] **실험예 2. 유파티린 및 자세오시딘의 구조 측정**
- [0060] 실험예 1에서 수득한 원심향류분배 크로마토그래피를 이용하여 분리한 화합물, 즉 유파티린 및 자세오시딘의 구조를 측정하기 위해서, ¹H-NMR, ¹³C-NMR을 UV 분광기(Spectrometer)를 이용하여 기존의 보고된 문헌 (Ryu et al., Korean J. Crop. Sci., 49, pp.452-456, 2004)을 통하여 그 구조를 측정하였다.
- [0061] 실험결과, 도 2 내지 도 5에서 나타난 바와 같이 각각의 분리된 화합물인 유파티린과 자세오시딘의 구조를 확인할 수 있었다(도 2 내지 도 5 참조).
- [0062] 화합물 (1): 유파티린 (이하 "Eupatilin"으로 명명함)
- [0063] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.87 (3H, s, OCH₃), 6.62 (1H, s, H-3), 6.93 (1H, s, H-8), 7.11 (1H d, J = 8.6 Hz, H-5'), 7.54 (1H, d, J = 1.9, H-2'), 7.65 (1H, dd, J = 8.6, 2.1 Hz, H-6'), 10.64 (s, 7-OH), 13.03 (1H, s, 5-OH)
- [0064] ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 182.1 (C-4), 163.3 (C-2), 157.7 (C-7), 152.7 (C-5), 152.4 (C-9), 152.1 (C-4'), 149.0 (C-3'), 131.3 (C-6'), 122.9 (C-1'), 119.9 (C-6'), 111.6 (C-5'), 109.4 (C-2'), 104.1 (C-10), 103.3 (C-3), 94.3 (C-8), 59.9 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 55.7 (OCH₃)
- [0065] UV 스펙트럼: lmax (loge)in MeOH: 275 (4.26), 340 (4.04) nm
- [0066] 화합물 (2): 자세오시딘 (이하 "Jaceosidine"으로 명명함)
- [0067] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 3.75 (3H, s, OCH₃), 3.86 (3H, s, OCH₃), 6.60 (1H, s, H-8), 6.87 (1H, s, H-3), 6.92 (1H d, J = 9.3 Hz, H-5'), 7.55 (1H, d, J = 1.9, H-2'), 7.55 (1H, dd, J = 9.3, 1.9 Hz, H-6'), 13.08 (1H, s, 5-OH)
- [0068] ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 182.1 (C-4), 163.7 (C-2), 157.4 (C-7), 152.7 (C-9), 152.4 (C-5), 150.7 (C-3'), 148.0 (C-4'), 131.3 (C-6), 121.5 (C-1'), 120.3 (C-6'), 115.7 (C-5'), 110.2 (C-2'), 104.0 (C-2'), 102.7 (C-3), 94.3 (C-8), 59.9 (OCH₃), 55.9 (OCH₃)
- [0069] UV 스펙트럼: lmax (loge) in MeOH: 274 (4.18), 344 (4.42) nm

[0070] **실험예 3. 유파티린 및 자세오시딘의 회수율 및 순도 측정**

[0071] 상기 실험예 1에서 수득한 유파티린과 자세오시딘의 회수율 및 순도를 측정하기 위하여 HPLC-UV/VIS를 사용하였으며, 이동상으로 메탄올(0.5% 아세트산 함유)과 0.5% 아세트산을 이용하여 혼합하여 사용하였다.

[0072] 메탄올(0.5% 아세트산 함유, (A))과 0.5% 아세트산(B)이 각각 0 min(40% A, 60% B), 40 min(70% A, 30% B), 50 min(70% A, 30% B)이 되도록 하였고, 유속 (flow rate)는 1ml/min로, Gilson UV/VIS 검출기(Middleton, WI, USA)를 사용하였으며, 성분 분석을 위해서 워터스 520 펌프(Waters 520 pump, Milford, MA, USA), 워터스 996 포토다이오드 어레이 검출기(Waters 996 photodiode array detector, Milford, MA, USA) 및 워터스 717 플러스 오토샘플러(Waters 717 plus autosampler, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 이때, 사용된 컬럼은 Shiseido-Capcell Pak (250 × 4.6 mm ID, 5 mm, Japan)을 사용하였고, 시료의 주입량은 20 ml로 하였으며, 데이터의 처리 및 산정은 엠파워 소프트웨어(Empower software)를 이용하였다.

[0073] 그 실험결과, 표 2 에 나타낸 바와 같이 추출물(조추출물, 추출 분획물, 추출 정제물)에서 유파티린은 각각 94.7%, 96.9%, 95.9%의 회수율을 보였고, 자세오시딘은 각각 73.0%, 72.9%, 77.8% 의 회수율을 보였으며, 또한, 순도는 유파티린의 경우 각각 75.3%, 77.7%, 91.4%를, 자세오시딘은 각각 79.2%, 74.9%, 94.6%를 보여, 특히, 추출 정제물의 순도가 탁월함을 확인하였다(표 2 참조).

[0074] 이러한 결과는, 기존의 다른 어떤 문헌에는 찾아볼 수 없는 방법으로, 다양한 종류의 속속식물에 함유된 유파티린 및 자세오시딘을 분리 및 제조하는 방법에 모두 적용될 수 있다고 사료된다.

표 2

[0075]

시료	유파티린 CPC 분획 (피크 2)		자세오시딘 CPC 분획 (피크 1)	
	회수율(%)	순도(%)	회수율(%)	순도(%)
A-EtOH	94.7 ± 0.4	75.3 ± 1.2	73.0 ± 1.1	79.2 ± 0.7
A-EtOAc	96.9 ± 1.8	77.7 ± 1.4	72.9 ± 3.1	74.9 ± 0.9
A-Sep	95.9 ± 0.8	91.4 ± 0.7	77.8 ± 0.9	94.6 ± 0.8

도면의 간단한 설명

[0076]

도 1은 속속식물의 추출물로부터 원심향류분배 크로마토그래피와 고성능액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 유파티린(2) 및 자세오시딘(1)을 분리(A1: 속 에탄올 조추출물의 원심향류분배크로마토그래피를 이용한 유파티린 및 자세오시딘의 분리; A2: 속 에탄올 조추출물의 HPLC 크로마토그램; A3: 원심향류크로마토그래피로 분리한 자세오시딘의 HPLC 크로마토그램; A4: 원심향류크로마토그래피로 분리한 유파티린의 HPLC 크로마토그램; B1: 속 에틸아세테이트 추출 분획물의 원심향류분배크로마토그래피를 이용한 유파티린 및 자세오시딘의 분리; B2: 속 에틸아세테이트 추출 분획물의 HPLC 크로마토그램; B3: 원심향류크로마토그래피로 분리한 자세오시딘의 HPLC 크로마토그램; B4: 원심향류크로마토그래피로 분리한 유파티린의 HPLC 크로마토그램; C1: 속을 세파텍스 LH-20으로 정제한 추출 정제물의 원심향류분배크로마토그래피를 이용한 유파티린 및 자세오시딘의 분리; C2: 속 세파텍스 LH-20으로 정제한 추출 정제물의 HPLC 크로마토그램; C3: 원심향류크로마토그래피로 분리한 자세오시딘의 HPLC 크로마토그램; C4: 원심향류크로마토그래피로 분리한 유파티린의 HPLC 크로마토그램)한 결과를 나타낸 도이고,

[0077]

도 2는 유파티린의 ¹H-NMR에 관한 도이며,

[0078]

도 3은 유파티린의 ¹³C- NMR에 관한 도이고,

[0079]

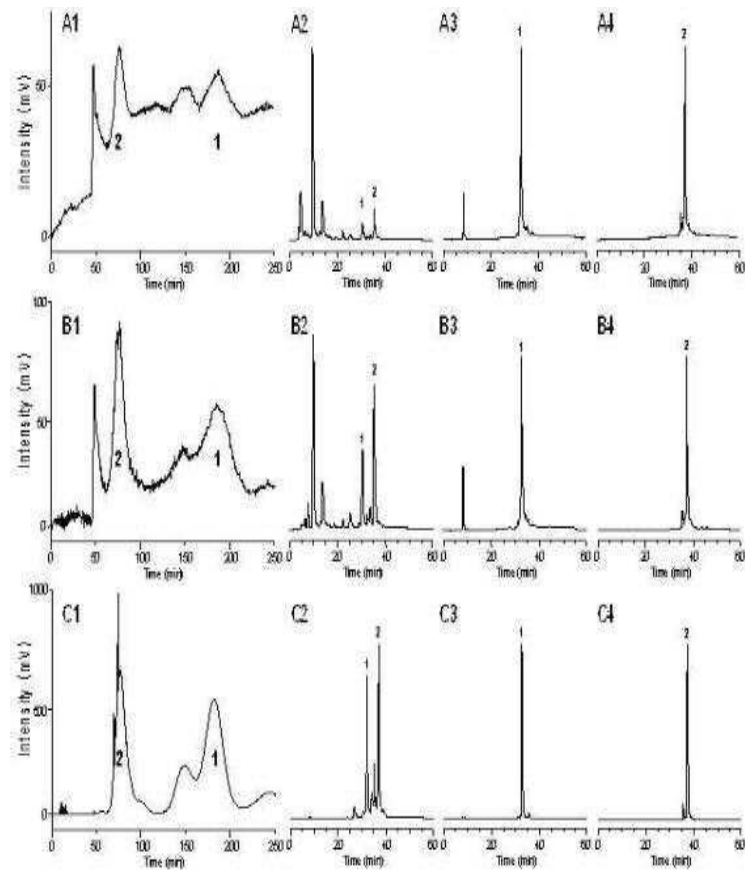
도 4는 자세오시딘의 ¹H-NMR에 관한 도이며,

[0080]

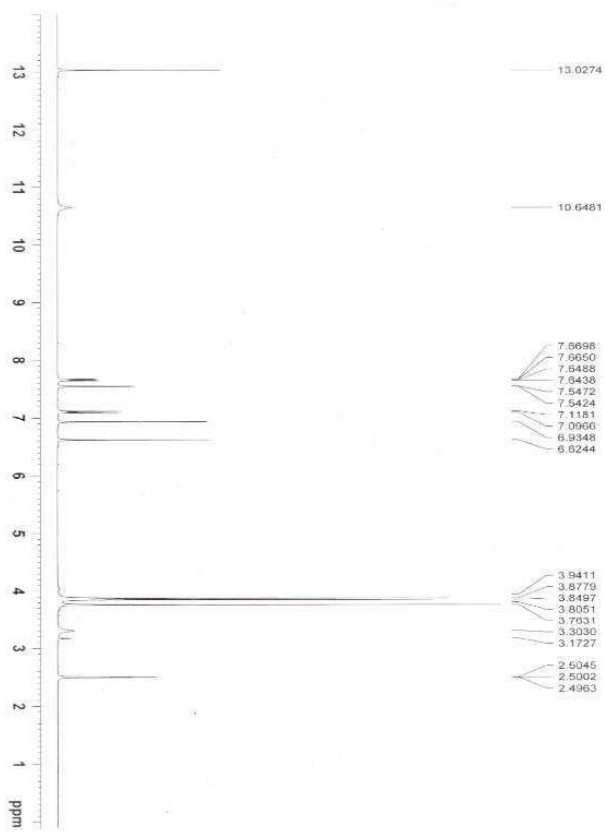
도 5는 자세오시딘의 ¹³C- NMR에 관한 도이다.

도면

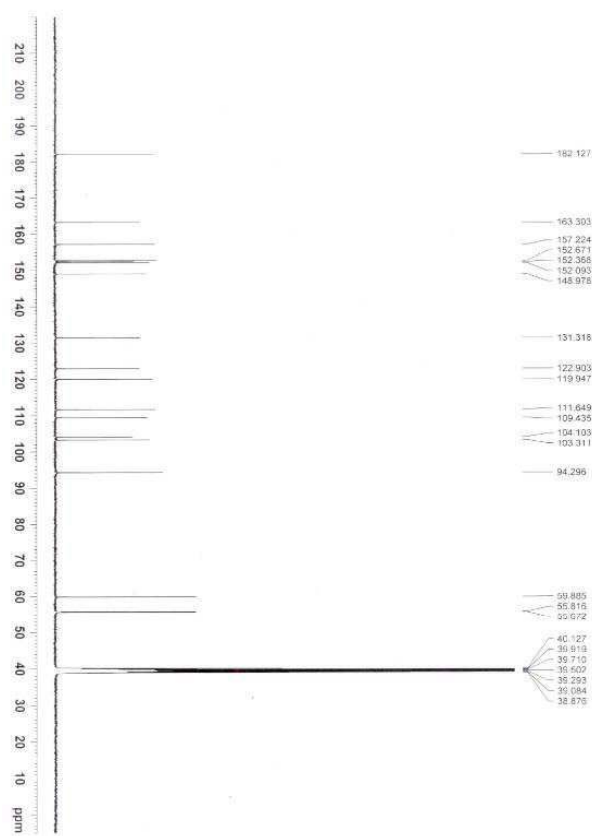
도면1



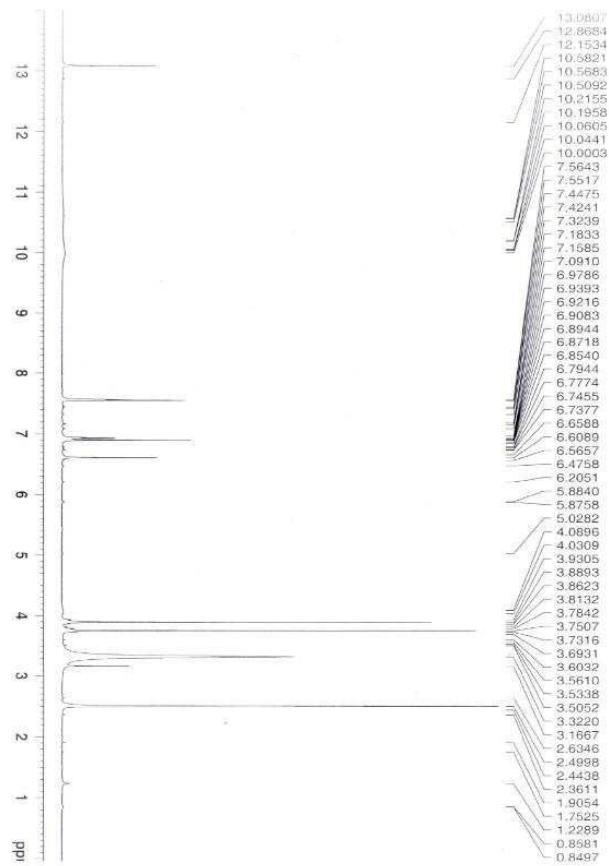
도면2



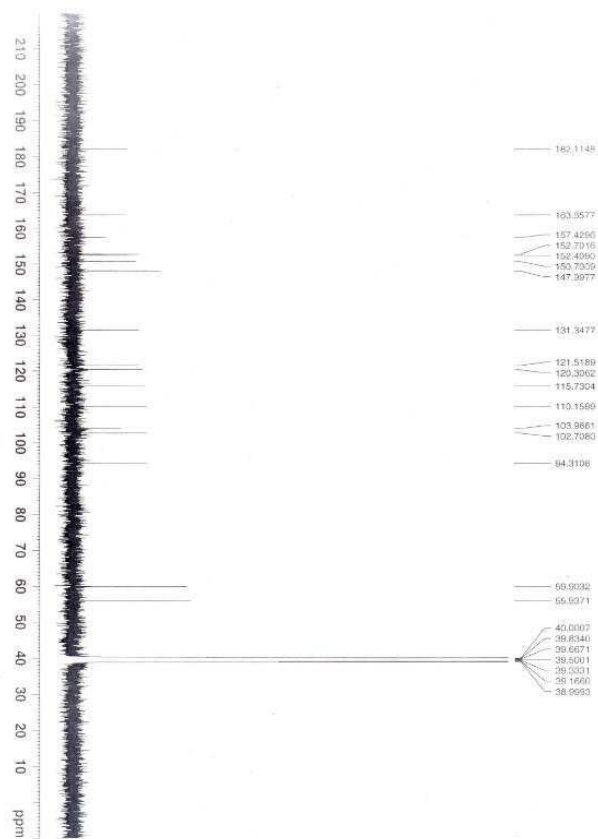
도면3



도면4



도면5



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제6항

【변경전】

보다 활성을 강한 생리활성 성분을 분리하기 위하여

【변경후】

보다 활성이 강한 생리활성 성분을 분리하기 위하여

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제1항

【변경전】

상기 조출출물, 추출분획물 또는 추출 정제물을 용매시스템은

【변경후】

상기 조출출물, 추출분획물 또는 추출 정제물의 용매시스템은