

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 35/78

(45) 공고일자 1996년08월06일
(11) 공고번호 특1996-0010622

(21) 출원번호	특1992-0022987	(65) 공개번호	특1999-0000001
(22) 출원일자	1992년12월01일	(43) 공개일자	1999년01월01일
(73) 특허권자	유유산업주식회사 유승필		
(72) 발명자	경기도 안양시 만안구 석수동 212 강승안 서울특별시 서초구 반포동 901 반포아파트 108동 405호 김중권 서울특별시 관악구 신림1동 1580번지 9호 박경호 서울특별시 관악구 봉천동 1번지 현대아파트 102동 104호		
(74) 대리인	허상훈		

심사관 : 노재철 (책
자공보 제4586호)

(54) 은행잎으로부터 유효활성물질을 추출정제하는 방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

은행잎으로부터 유효활성물질을 추출정제하는 방법

[도면의 간단한 설명]

제1도, 제2도 및 제3도는 본 발명의 방법에 따른 실시예 1, 2 및 8에서 추출정제된 유효활성물질중 프로 안토시아닌 화합물에 대해 정량 분석결과로 나타난 흡수극대 곡선을 각각 비교예 2의 경우와 비교 도시한 그래프이고,

제4도와 제5도는 본 발명의 방법에 따른 실시예 2에서 추출정제된 분말과 표준품에 대해 각각 고속액체 크로마토그래피를 이용하여 유효활성물질의 량을 정량적으로 분석한 크로마토그램이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 은행잎으로부터 유효생리활성물질을 추출정제하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 은행잎으로부터 혈관 및 혈액순환장애와 노인성 질환치료에 사용될 수 있는 유효생리활성물질을 추출하되 유효성 물질을 사용하지 않고서도 간단하고 경제적인 방법으로 고농도의 유효활성물질을 추출정제하는 방법에 관한 것이다.

일반적으로 은행잎에 함유되어 있는 강고 플라본 유효성분들은 여러가지 유효를 나타내므로 은행잎 추출물을 이용한 의약품이나 건강식품등이 개발되고 있다.

구체적으로 은행잎 추출물은 혈관확장 작용을 타나내고 혈류촉진 작용에 의하여 말초혈류 및 뇌 혈류량을 현저히 증가시키고 인체 조직내에서 ATP의 농도를 증가시켜 준다. 또한 세포내의 에너지 대사를 촉진시키는 것도 알려지고 있다. 그 외에도 뇌허혈증, 뇌말초 혈관확장 작용과 각종 저산소증에 탁월한 예방 및 치료효과가 있는 것으로 밝혀져서, 이러한 효능으로 인해 그 이용이 더욱 증가되고 있다.

이러한 은행잎으로부터 유효성분을 추출해 내는 방법은 기존에 여러방법이 알려져 있다.

예컨대, 일본특허공고 소46-28091호 및 49-27323호에서는 은행잎 추출물을 제조하는 방법으로 디클로로메탄, 글로로포름, 사염화탄소와 같은 할로겐화 탄화수소를 용매로 하여 유효성분을 추출정제하는 방법이 개시되어 있다. 그러나, 이런방법은 그 사용용매가 의약품에서 매우 바람직하지 않은 유해물이기 때문에 정제과정에 세심한 주의가 필요하고 또는 환경문제를 유발시킬 수 있을 뿐 아니라 추출정제에 관여하는 작업자에게 직접적인 폐해도 우려된다. 더우기, 일본특허공고 소49-27323호에서는 추출과정에서 유

독한 납화합물이 사용되고 있기 때문에 바람직하지 못한 것으로 지적되고 있다.

특히, 일본특허공고 소46-28091호에서의 은행잎 추출물은 경구투여제로는 적당하나 유효활성 성분의 안정성을 손상시키는 미지의 물질을 제거해야 주사제로 사용할 수 있다고 했으며, 그 미지물질을 제거하는 처리수단을 찾아야 한다고 기술되어 있다.

또, 일본특허공고 소49-27323호에서는 소46-28091호에서 언급한 유효활성물질의 안정성을 손상시키는 미지의 물질이 용액상태에서 침전을 발생시킨다는 사실을 발견했으며 침전을 유발시키는 원인이 프로펠피니딘임을 언급하고 있으나, 이를 제거하여 추출물중의 잔유량을 저하시키는 추출방법으로 유해물질인 납화합물을 사용하고 있다.

또한, 국내에서도 특허공고 제81-333호 및 제90-5318호 및 제90-5319호 등의 은행잎 엑기스 추출방법이 있는 바, 특허공고 제81-333호의 경우 상기 일본특허공고 소49-27323호와 실질적으로 같은 방법으로서, 할로겐화 탄화수소와 초산납 또는 수산화납을 사용하는 방법으로 위와 같은 문제가 있다.

다만, 국내특허공고 제90-5318호와 제90-5319호의 경우 기존의 방법을 개선한 공정을 보여주고 있으나, 전자인 국내특허공고 제90-5318호는 정제과정으로 정제칼럼을 사용하고 있으며 이 칼럼의 제조시 할로겐화 지방족 탄화수소인 사염화탄소를 사용하고 있는 문제가 있고, 후자인 국내특허공고 제90-5319호의 경우는 일부 개선점이 평가할만 하지만 비스무스 화합물을 사용하기 때문에 역시 주의가 필요하다.

이와 같이, 기존에 알려진 은행잎 엑기스 추출물을 제조하는 방법들은 모두가 할로겐화 탄화수소나 유해성 중금속 화합물을 이용하고 있어서 인체 유해성문제나 환경오염의 문제와 공정상의 세심한 주의가 필요한 문제등으로 인해 개선의 여지가 많았다.

이에 본 발명자들은 이러한 종래방법에서 사용되었던 유독성 유기용매나 중금속 화합물을 전혀 사용하지 않고서 은행잎으로부터 유효성분을 추출정제하는 방법을 연구한 결과, 은행잎 추출물에서 침전을 생성하는 원인이 되는 물질을 분명하게 규명해 내고, 이를 토대로 종래사용된 바 없는 한외여과막을 이용하면 유해한 물질을 사용하지 않을 뿐 아니라 공정을 크게 단축시키면서 경제적으로 고순도의 은행잎 추출물을 추출정제해낼 수 있다는 사실을 알게되어 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명은 은행잎으로부터 유효성분을 추출정제함에 있어서, 무해성 유기용매를 사용하고 한외여과 방법을 이용하여서 고순도의 은행잎 추출물을 고수율로 제조하는 새로운 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 은행잎을 메탄올 또는 물과 아세톤 또는 알코올의 혼합용액으로 추출하고 무기염을 가한다음, 유기용매로 다시 추출한 후, 얻어진 조엑기스로부터 불순물을 제거하여 유효활성물질을 추출정제함에 있어서, 상기 조엑기스로부터 불순물이 제거된 추출물을 얻기 위하여 그 조엑기스를 감압농축하여 얻은 잔류물에 메탄올 수용액을 첨가한 다음 한외여과막을 통과시키고, 그 통과된 용액을 메탄올 수용액으로 처리한 후 감압건조하여서 분말상으로 제조함을 그 특징으로 한다.

이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 은행잎으로부터 종래의 방법에 의해 혼합용매 또는 유기용매로 추출하여 조추출물을 제조하고 난 다음, 이를 한외여과 방법으로 추출정제하는 것에 특징을 두고 있다.

본 발명에 따르면, 건조된 은행잎을 메탄올 또는 물과, 아세톤이나 메탄올, 에탄올 또는 프로판올과 같은 알코올의 혼합용액으로 상온 또는 용매의 비점온도에서 추출한다. 이렇게 얻어진 추출액을 찌꺼기와 분리한 다음 감압하에서 유기용매를 제거하여 전체중량의 10% 이하로 농축한다. 이때 필요하면 추출액에서 유기성분을 치환하기 위하여 물을 첨가할 수 있다. 위와 같이 농축된 추출농축액에 물을 가하여 건조 추출물이 전체 수용액에 10~20중량%가 되도록 희석시킨 다음, 20℃이하로 냉각한 후 지용성 성분을 침전시켜 여과하여 제거하고 맑은 수용액에 염화나트륨 또는 황산암모늄을 교반하면서 20~30%의 부피량으로 가한다. 이 용액에 추출용매로서 메틸에틸케톤 또는 메틸에틸케톤과 아세톤의 혼합유기용액을 가하고 방치한다. 이때 혼합 유기용액을 사용하는 경우는 메틸에틸케톤 : 아세톤의 비율이 부피비로 9 : 1 내지 4 : 6이 되도록 혼합 사용하며 이렇게 방치한 상태에서 두층으로 분리되면 유기용매층에 은행잎의 유효활성물질이 다량 함유된 상태로 얻어지며, 이를 감압하여서 고형분이 전체 용액의 50중량%가 되도록 농축하여 조엑기스를 얻는다.

본 발명에 따르면 이 농축된 조엑기스에 50v/v% 메탄올 수용액을 첨가하여 고형성분이 5~20중량%가 되도록 희석한 다음, 은행잎 추출물의 조엑기스에 함유된 단백질, 다당류, 폴리페놀 중합체인 프로안토시아닌 화합물과 같은 중합체를 효과적으로 제거하기 위해 상기 희석된 용액을 약 3,000~10,000달톤의 배제한계를 가진 한외여과막을 통과시켜 유효활성물질만 추출한다.

이때 한외여과막의 배제한계가 3,000달톤 보다 낮아지면 유효활성물질들의 추출효과가 떨어져서 수율이 크게 저하되며, 10,000달톤 보다 높게되면 유효활성물질의 수득량은 많아지지만 중합체의 제거효율이 크게 떨어져서 최종 추출물중에 불순물인 프로안토시아닌 화합물이 다량 잔류하기 때문에 순도가 나빠지는 문제가 있다.

본 발명에서 사용한 한외여과막은 상기 용액을 통과시켜서 용액중에 용해되어 있는 물질의 분자들을 크기에 따라 분리하기 위해 사용되는 매우 얇고 선택적인 여과막으로, 특정크기 이상의 고분자물질을 걸러내서 정제하므로써 용매를 포함한 대부분의 작은 분자들을 정량적으로 통과시키는 분자 여과막이다.

이러한 한외여과막은 생명공학 분야에서의 연구영역을 넘어서 백신등 의약품의 제조공정에 사용하며 그 예로서 백신과 인터페론 제조시 배양된 고농도의 세포를 배지에서 분리하고 있고, 단백질등 생체고분자의 농축과 세척(desalting), 적혈구 용해물질중의 헤모글로빈과 효소와의 분리 및 콜로이드 미생물등 발

열성물질(pyrogen)의 제거에 사용하고 있다.

본 발명에서는 위와 같이 분자량에 따른 분획이 가능한 한외여과막을 이제까지 전혀 고려된 바 없는 천연물의 추출에 새롭게 이용함으로써 기존의 공지된 방법보다 더욱 간단하게 매우 고순도의 유효활성물질을 얻을 수 있다는 놀라운 사실을 알게 되었다.

즉, 본 발명에서는 기존에 천연물에서의 유효활성 성분의 추출에 사용된 바 없었던 한외여과 방법을 사용함으로써 종래의 방법과 비교할때 상변화(phase change)에 따른 화학적 물성변화의 우려가 전혀 없으므로 보다 안정적이고 은행잎 유효활성 성분인 플라본 글리코사이드가 고농도로 함유되어 있으면서 단백질, 당류, 프로안토시아니딘류 등의 고분자 불순물은 거의 없는 매우 고순도의 추출물을 얻게 되었다.

따라서, 이러한 한외여과막을 통과시키게 되면 고분자물질이 농축된 부분과 이런 고분자물질이 거의 들어있지 아니한 부분을 동시에 분리하여 얻을 수 있으므로 추출 및 정제효과가 좋으며, 특히 본 발명에서는 분자량 약 3,000~10,000달톤의 배제한계를 갖는 것을 사용함으로써 단백질, 다당류 및 폴리페놀 중합체와 같은 중합체를 통과시키지 않게 되므로 본 발명에서 필요로 하는 유효활성물질만을 선택적으로 추출해낼 수 있다. 이렇게 사용한 후 한외여과막은 수세하여 반복 재사용도 가능하며, 한외여과시 어떠한 전처리 공정도 필요없고, 특별한 조건없이 상온에서 가능하다.

이와 같이, 본 발명에 따라 한외여과막으로 추출한 추출액은 감압하에 농축하고, 다시한번 85~95v/v% 에탄올 수용액에 용해시킨 다음, 상온에서 하룻밤 정도 정치시키면 침전이 생기고 이것을 여과하면 맑은 여액을 얻게 되는데, 이 과정은 상기 한외여과막 추출이전에 혼합유기용액을 이용하여 추출할 때에 혼입된 물로 인해서 추출이후까지 추출액중에 남아있게 되는 용존 황산암모늄을 제거하기 위한 것이며, 이 과정을 거쳐 얻은 여액은 감압건조시켜서 잔류수분이 5중량%이하인 분말로 목적물을 얻는다.

이와 같은 과정을 거쳐 얻어진 목적물인 은행잎 유효활성물질은 케르세틴 글리코사이드, 캄페롤 글리코사이드, 이소람네티 글리코사이드 등의 플라본 글리코사이드의 함량이 다량 함유된 등황색의 무정형 흡습성 분말로서, 침전 형성물질인 프로안토시아니딘 화합물의 함량이 크게 저하된 고순도의 추출물을 고수율로 얻게되며, 통상의 방법에 따라 경구용액제, 주사용제제로 사용하더라도 침전등의 생성이 전혀 생기지 않는다. 이는 경구용액제나 주사용제제로 사용시 침전의 생성으로 인해 안정성에 영향을 주는 폴리페놀 중합체인 프로안토시아니딘 화합물을 비롯하여 단백질이나 다당류 등의 제반 불순물을 한꺼번에 한외여과 방식으로 제거시켜 주기 때문에 매우 간단한 공정으로 순도를 높여주므로써 액제나 주사제로 사용가능한 것이다.

결국, 본 발명에서는 기존에 은행잎 추출물의 안정성을 저해하는 침전 형성물질이 프로델피니딘이라는 사실을 명확히 규명하기 위해 부단히 연구한 결과, 침전 형성물질이 프로델피니딘을 비롯하여 프로시아니딘 등 프로안토시아니딘 화합물이 모두 안정성을 저해하는 침전 형성물질이라는 새로운 사실을 규명해 내고, 이들 침전 형성물질이 함유되지 아니한 은행잎 추출물을 제조하기 위해 종래 천연물 추출에는 물론 은행잎으로부터 유효활성물질의 추출에 전혀 사용된 바 없는 한외여과법을 사용하여 상기 침전 형성물질인 고중합 프로안토시아니딘 화합물이 거의 모두 제거된 은행잎 추출물을 간단하게 추출정제하여 목적을 달성할 수 있게 된 것이다.

상술한 바와 같이 본 발명에 따라 한외여과법으로 추출함으로써 간단하고 개선된 공정을 통해 고순도, 고수율로 은행잎 추출물을 얻을 수 있는 바, 종래에 추출방법과 비교하여 본 발명에서만 특징적으로 나타나는 효과를 열거하면 다음과 같다.

첫째, 종래에 거의 모든 추출방법에서 사용되었던 유해물질을 사용하지 않는다.

둘째, 혼합용매추출 후 복잡한 불순물제거 공정이 크게 단축되었다.

셋째, 주사제 제조시 침전 형성물질의 프로안토시아니딘 화합물임을 밝혀내고 이를 거의다 제거하므로써 순도를 크게 개선시켰다.

넷째, 주사제 제조시 침전 형성물질이 제거된 고순도의 은행잎 추출물을 제공하므로써 부작용 없이 액제나 주사액으로서 이용 가능한 원료를 제공할 수 있게 되었다.

다섯째, 최종 추출물중에 함유된 유효활성물질인 플라본 글리코사이드의 함량을 높은 수준으로 유지하면서도 추출수율을 크게 향상시켜 고수율로 목적화합물을 얻게 되었다.

여섯째, 추출시 사용된 한외여과막은 수세하여 재사용 가능하기 때문에 경제적으로도 유리하다.

일곱째, 한외여과법으로 추출시 온도조건이나 특별한 전처리 과정없이 간단한 공정으로 추출이 가능하다.

이하, 본 발명을 실시예에 거의 상세히 설명하면 다음과 같은 바, 본 발명이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

은행잎 건조분말 100g을 원추용기에 채워놓고 60v/v% 아세톤 수용액 930ml을 잎분말이 침출되도록 넣는다. 12시간 경과후 가압 여과하고 여액을 감압하에 총량이 150ml되도록 농축시킨다. 농축액에 물을 가해 200ml로 하고 격렬하게 교반한 후 12시간 동안 15℃로 냉각시켜 방치한 후 상등액을 침전물과 분리여과한다.

여액을 교반하면서 황산암모늄 50g을 가하고 15분 후에 메틸에틸케톤 37ml와 아세톤 25ml 혼합용액을 가하여 혼합교반 후 정치시켜 유기용매층을 분리한 후 동량의 메틸에틸케톤과 아세톤 혼합용액으로 3회 반복추출하여 분리하여 합한다. 메틸에틸케톤, 아세톤층을 총량이 10g 되도록 감압하에 농축시킨다.

얻어진 농축액에 50v/v% 에탄올 수용액 68ml를 가해 용해시킨 후 4기압의 압력으로 아미콘사의 다이아플

로(R) 한외여과막(Amicon's Diaflo Ultrafiltration Membranes) YM3(배제한계 : 3,000달톤)로 여과시킨다. 여액을 감압하여 5g이 되도록 농축시키고 90v/v% 에탄올 수용액 25ml로 용해시켜 상온에서 1일방 방치한 후 맑게 여과하고 최대 60℃로 감압하에 건조시킨다. 2.16g의 유효활성물질(등황색분말)을 얻는다.

실시에 2

상기 실시예 1과 동일하게 실시하되 배제한계가 5,000달톤인 한외여과막을 사용하여 목적물을 얻었다. 이런 과정을 7회 반복하여 얻은 결과는 다음 표 1과 같았으며, 그 결과 2.2g의 유효활성물질(등황색분말)을 얻었다.

[표 1]

표 1 : 유효활성물질 분석결과

유효성분	(단위 : 중량%)			
	케르세틴 글리코사이드	키프페롤 글리코사이드	이소람네틴 글리코사이드	플라본 글리코사이드 총량
1회	12.88	9.91	2.76	25.55
2회	13.55	9.94	3.04	26.53
3회	12.26	9.84	2.83	24.93
4회	12.97	9.79	2.81	25.57
5회	13.83	9.62	3.58	27.03
6회	13.61	9.43	3.64	26.68
7회	13.65	10.01	3.11	26.77
평균	13.25	9.79	3.11	26.15
표준편차	0.56	0.20	0.36	0.79

*상기 단위는 최종 목적물내에 함유된 유효활성물질의 함량에 대한 단위임.

실시에 3

은행잎 건조분말 100g을 원추용기에 채워놓고 60v/v% 아세톤 수용액 대신에 메탄올 930ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일하게 실시하여 2.17g의 유효활성물질(등황색분말)을 얻었다.

실시에 4

은행잎 건조분말 100g을 원추용기에 채워놓고 60v/v% 아세톤 수용액 대신에 60v/v% 메탄올 수용액 930ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일하게 실시하여 2.54g의 유효활성물질(등황색분말)을 얻었다.

실시에 5

은행잎 건조분말 100g을 원추용기에 채워놓고 60v/v% 아세톤 수용액 대신에 60v/v% 에탄올 수용액 930ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일하게 실시하여 2.2g의 유효활성물질(등황색분말)을 얻었다.

실시에 6

은행잎 건조분말 100g을 원추용기에 채워놓고 60v/v% 아세톤 수용액 대신에 60v/v% 이소프로판올 수용액 930ml를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일하게 실시하여 1.66g의 유효활성물질(등황색분말)을 얻었다.

실시에 7

상기 실시예 2와 동일하게 실시하되 한외여과막을 통과시킨 다음, 여과된 에탄올 수용액을 반분량으로 감압농축하고 황산암모늄 50g을 가하고 15분후 메틸에틸케톤 37ml와 아세톤 25ml 혼합용액을 가하여 혼합교반 후 정치시켜 유기용매층을 분리한 후 동량의 메틸에틸케톤과 아세톤 혼합용액으로 3회 반복 추출 분리하여 합한다.

메틸에틸케톤과 아세톤층을 감압하여 총량이 5g이 되도록 농축시키고 90v/v% 에탄올 수용액 25ml로 용해시켜 상온에서 1일방 방치한 후 맑게 여과하여 최대 60℃로 감압하에 건조시킨다. 1.95g의 유효활성물질(등황색분말)을 얻었다.

실시에 8

상기 실시예 2와 동일하게 실시하되 배제한계가 10,000달톤인 한외여과막을 사용하여 3.17g의 유효활성물질(황갈색분말)을 얻었다.

참고예

상기 실시예 1과 동일하게 실시하되 배제한계가 1,000달톤인 한외여과막을 사용하여 0.67g의 유효활성물질(등황색분말)을 얻었다.

비교예 1

은행잎 건조분말 100g을 원추용기에 채워놓고 60v/v% 아세톤 수용액 930ml을 잎분말이 침출되도록 넣는

다. 12시간 경과후 가압 여과한뒤 여액을 감압하에 총량이 150ml 되도록 농축시킨다. 농축액에 물을 가해 200ml로 하고 격렬하게 교반한 후 12시간 동안 15℃로 냉각시켜 방치한 후 상등액을 침전물과 분리여과한다. 여액을 교반하면서 황산암모늄 50g을 가하고 15분 후에 메틸에틸케톤 37ml와 아세톤 25ml 혼합용액을 가하여 혼합교반 후 정치시켜 유기용매층을 분리한 후 동량의 메틸에틸케톤과 아세톤 혼합용액으로 3회 반복추출하여 분리하여 합한다. 메틸에틸케톤, 아세톤층을 감압하에 농축시킨다. 얻어진 잔류물을 90v/v% 에탄올 수용액 25ml로 용해시켜 상온에서 1일밤 방치한 후 맑게 여과하고 최대 60℃로 감압하여 건조한다. 그 결과 3.7g 유효활성물질(갈색분말)을 얻었다.

비교예 2

은행잎 건조분말 100g을 원추용기에 채워놓고 60v/v% 아세톤 수용액 930ml을 잎분말이 침출되도록 넣는다. 12시간 경과후 가압 여과한뒤 여액을 사염화탄소 100ml씩 3회 추출하여 수성아세톤층을 각별히 분리한다. 이 수성아세톤층을 감압하여 150ml 되도록 농축시킨다. 이 용액에 물을 가해 200ml로 하고 격렬하게 교반한 후 12시간 동안 15℃로 냉각시켜 방치한 후 상등액을 침전물과 분리여과한다. 여액을 교반하면서 황산암모늄 50g을 가하고 15분 후에 메틸에틸케톤과 아세톤 혼합용액으로 3회 반복 추출분리하여 합한다. 메틸에틸케톤, 아세톤층을 감압하에 농축시킨다. 얻어진 잔류물을 90v/v% 에탄올 수용액 25ml로 용해시켜 상온에서 1일밤 방치한 후 맑게 여과하고 최대 60℃로 감압하여 건조한다. 그 결과 3.13g의 유효활성물질(갈색분말)을 얻었다.

비교예 3

은행잎 건조분말 100g을 원추용기에 채워놓고 60v/v% 아세톤 수용액 930ml을 잎분말이 침출되도록 넣는다. 이 수성아세톤층을 감압하에 총량이 150ml 되도록 농축시킨다. 농축액에 물을 가해 200ml로 하고 격렬하게 교반한 후 12시간 동안 15℃로 냉각시켜 방치한 후 상등액을 침전물과 분리여과한다. 여액을 교반하면서 황산암모늄 50g을 가하고 15분 후에 메틸에틸케톤과 아세톤 혼합용액으로 3회 반복추출분리하여 합한다. 메틸에틸케톤, 아세톤층을 총량 10g 되도록 감압하에 농축시킨다.

얻어진 농축액에 50v/v% 에탄올 수용액 68ml를 가해 용해시킨 후 10% 초산납[Pb(COOCH)₃·3H₂O]수용액 30ml를 가하고 교반한 뒤에 정치시키고 형성된 침전물을 여과하여 제거한다. 에탄올 수용액을 반부량으로 감압농축하고 황산암모늄 50g을 가하고 15분 후에 메틸에틸케톤 37ml와 아세톤 25ml 혼합용액을 가하여 혼합교반 후 정치시켜 유기용매층을 분리한 후 동량의 메틸에틸케톤과 아세톤 혼합용액으로 3회 반복추출분리하여 합한다. 메틸에틸케톤, 아세톤층을 총량이 10g 되도록 감압하에 농축시킨다. 얻어진 농축액을 90v/v% 에탄올 수용액 25ml로 용해시켜 상온에서 1일밤 방치한 후 맑게 여과하고 최대 60℃로 감압하여 건조한다. 그 결과 1.22g 유효활성물질(등황색분말)을 얻었다.

비교예 4

은행잎 건조분말 100g을 원추용기에 채워놓고 60v/v% 아세톤 수용액 930ml을 잎분말이 침출되도록 넣는다. 이 수성아세톤층을 감압하에 총량이 150ml 되도록 농축시킨다. 농축액에 물을 가해 200ml로 하고 격렬하게 교반한 후 12시간 동안 15℃로 냉각시켜 방치한 후 상등액을 침전물과 분리여과한다. 여액을 교반하면서 황산암모늄 50g을 가하고 15분 후에 메틸에틸케톤과 아세톤 혼합용액으로 3회 반복 추출분리하여 합한다. 메틸에틸케톤, 아세톤층을 총량 10g 되도록 감압하에 농축시킨다.

얻어진 농축액에 50v/v% 에탄올 수용액 68ml를 가해 용해시킨 후 10% 초산납[Pb(COOCH)₃·3H₂O]수용액 30ml를 가하고 교반한 뒤에 정치시키고 형성된 침전물을 여과하여 제거한다. 에탄올 수용액을 약 5g을 감압농축하고 얻어진 농축액을 90v/v% 에탄올 수용액 25ml로 용해시켜 상온에서 1일밤 방치한 후 맑게 여과하고 최대 60℃로 감압하여 건조한다. 그 결과 1.11g 유효활성물질(진황색분말)을 얻었다.

실험예 1

상기 실시예 1~8 및 참고예에서 얻어진 분말을 상기 비교예 1~4에서 얻어진 분말과 함께 자외/가시흡수 분광광도계를 이용하여 유효활성물질중에 액제나 주사제 제조시 침전생성을 일으키는 폴리페놀 중합체인 잔류 프로안토시아닌딘 화합물의 함량을 확인하기 위해 정량적으로 분석하였다.

이중에서, 유해물질인 초산납을 사용하지 않고 그 대신에 한외여과법을 사용한 실시예 1, 2, 8과 역시 유해물질인 초산납을 사용하지 않은 비교예 2의 경우를 같은 조건에서 대비해 보기위해 각각 첨부도면 제1도, 제2도 및 제3도로 비교하였다.

이 결과로부터, 실시예 1, 2, 8의 경우 비교예 2에 비해 각각 크게 낮은 흡광도가 나타났음을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명의 경우 갖은 조건의 종래 것과 비교하여 프로안토시아닌딘 화합물의 함량(잔류량)이 훨씬 낮음을 알 수 있다.

[시험방법]

은행잎에서 추출한 유효활성물질 20mg을 정밀히 달아 이소프로판올 : 3노르말 염산(5 : 1) 혼합용액에 녹여 25ml로 하고 여액 5ml를 취하여 10ml용량 플라스크에 옮기고 완전히 밀봉후 끓는 수욕상에서 45분간 가열하고 20℃에서 15분간 냉각하고 이소프로판올 : 3노르말 염산(5 : 1) 혼합용액을 가하여 표선을 채운다음 556nm에서 흡광도를 측정한다.

지표물질 프로안토시아닌딘 0.5mg은 상기조건에 따라 10ml로 할때 0.477의 흡광도를 갖는다.

실험예 2

상기 실시예 1~8에서 얻어진 분말을 비교예 1과 비교예 2, 비교예 3 및 초산납 수용액으로 처리한 후 유기용매를 사용하는 추출공정을 시행하지 않은 비교예 4에서 얻어진 분말과 함께 다음 방법과 조건으로 고속액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 유효활성물질인 플라본 글리코사이드의 양을 정량적으로 분석하여 그 결과를 다음 표 2에 나타내었다.

또한, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 유효활성물질의 성분에 대한 동질성 확인은 상기 실시예 2에서 얻어진 분말의 크로마토그램인 제4도와 표준품의 크로마토그램인 제5도를 통해 확인되었다.

[시험방법]

은행잎에서 추출한 유효활성물질 10mg을 정밀히 달아 메탄올 20ml에 용해시킨 후 염산 10ml을 가하고 끓는 수욕상에서 1시간 동안 가열하여 가수분해시키고 냉각 후 메탄올을 정확히 50ml로 하여 검액으로 하고 따로 케르세틴, 캠페롤, 이소람네티닌 등의 지표물질을 사용하여 표준액을 만들고 고속액체 크로마토그라피로 분석하였다.

[분석조건]

- 기기명 : Waters 6000A Pump
- Waters U6K Injector
- Schimidzu Auto Integrator
- A. 칼럼 : 3.9×150mm Nova-Pak C18, Waters
- B. 이동상용매 : 물 : 메탄올 : 초산(60 : 40 : 3)
- C. 유속 : 1.0ml/min
- D. 검출기 : UV 365nm
- E. 주입량 : 10 μ l
- F. 감도 : 0.1Aufs.
- G. 기록지감도 : 0.1cm/min

[표 2]

표 2

구 분	플리본 글리코사이드의 양 (중량%)	프로안토시아닌의 함량 (중량%)	추출물의 수율	총유효활성물질 수득량 (g/100g)
실시예1	24.97%±1.36	3.25%±0.05	2.16%	0.54g
실시예2	26.15%±0.79	3.49%±0.23	2.20%	0.58%
실시예3	16.85%±0.29	3.64%±0.06	2.17%	0.37%
실시예4	20.43%±0.61	3.16%±0.22	2.54%	0.52%
실시예5	17.25%±0.29	3.49%±0.30	2.20%	0.38%
실시예6	22.88%±0.75	3.10%±0.37	1.66%	0.38%
실시예7	30.49%±0.60	2.83%±0.05	1.95%	0.59%
실시예8	23.45%±0.04	5.37%±0.40	3.17%	0.74%
참고예	20.00%±0.38	2.91%±0.10	0.67%	0.13%
비교예1	21.77%±0.59	14.11%±0.35	3.70%	0.80%
비교예2	21.65%±0.54	13.19%±0.16	3.13%	0.67%
비교예3	40.45%±4.11	3.88%±0.23	1.22%	0.49%
비교예4	12.99%±0.52	0.95%±0.02	1.11%	0.14%

상기 분석결과로부터 본 발명의 추출정제방법에 따른 실시예(한외여과법)의 경우 한외여과법을 실시하지 않은 상태인 비교예 1이나 납화합물을 사용하지 아니한 비교예 2(일본특허공고 소46-28091호)에 비해 프로안토시아닌의 함량이 크게 줄어든 것을 확인할 수 있다.

또한, 본 발명의 실시예(한외여과법)와 유해성분인 납화합물을 사용한 비교예 3(일본특허공고 소49-27323)을 비교해 보면, 유해물질인 초산납을 사용한다는 점에서도 비교예 3에 비해 실시예가 우수한 것이지만, 본 발명의 방법인 실시예에서는 단한번의 간단한 한외여과 방식을 사용하는 대신에 비교예 3에서는 95v/v% 에탄올 100ml 사용, 10v/v% 초산납 30ml 사용, 여과, 농축, 60v/v% 에탄올 사용, 황산암모늄 사용, 교반, 여과, 메틸에틸케톤과 아세톤 혼합용매로 3회 추출등의 복잡한 공정을 거치는 불리한 방법을 사용하고서도 수율이나 프로안토시아닌 함량(잔류율)에서 실시예에 비해 거의 같은 수준으로 유지할 뿐이므로, 이로부터 본 발명의 방법은 공정단축 및 유해물질 불사용의 진보된 효과가 있음을 확인할 수 있다.

또, 납화합물을 사용한 상기 비교예 3과 같은 방법으로 실시하되 실시예에서의 한외여과법 대신 초산납과 에탄올을 이용하여 추출하고 그 외의 공정을 시행하지 아니한 비교예 4의 경우에는, 본 발명의 실시예에 비해 유효활성물질의 함량이 크게 낮고 수율도 크게 낮아진 것을 알 수 있는 바, 여기서 프로안토시아닌 함량이 낮게 나타난 것은 유효활성물질과 수율이 낮아지므로서 당연히 프로안토시아닌 함량도 낮게 측정된 것이므로 어느면으로나 본 발명에 비해 효과가 크게 떨어진다는 것을 확인할 수 있게 된다.

위 결과로부터, 본 발명은 종래의 방법에 비해 유효활성물질을 사용하지 아니하면서도 공정을 크게 단축

시켰고 고순도, 고수율의 은행잎 추출물을 얻을 수 있는 것임을 알 수 있으며, 특히 목적하는 총유효활성물질 수득량을 비교해 보면 본 발명의 방법은 그 순도 뿐만아니라 수율에서도 크게 개선되었음을 알 수 있다.

한편, 상기 실시예 1~8과 비교하여 참고예의 경우 한외여과법을 사용하되 배제한계가 1,000달톤인 것을 사용한 것으로서 수율이 실시예에 비해 떨어지는 것을 알 수 있으므로 한외여과막의 배제한계가 3,000달톤 이상의 경우가 바람직함을 확인할 수 있고, 또 실시예 8의 경우에는 배제한계가 10,000달톤인 것을 사용하였을때 프로안토시아니딘의 함량이 다른 실시예에 비해 다소 증가된 것으로 보아 10,000달톤 보다 높은 배제한계를 갖는 한외여과막을 사용하면 바람직하지 않음을 확인할 수 있다.

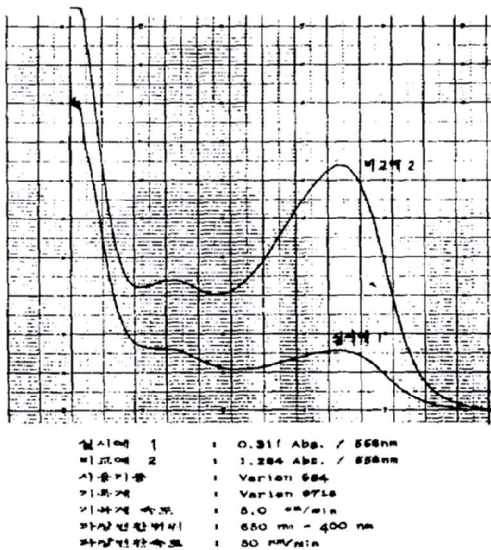
(57) 청구의 범위

청구항 1

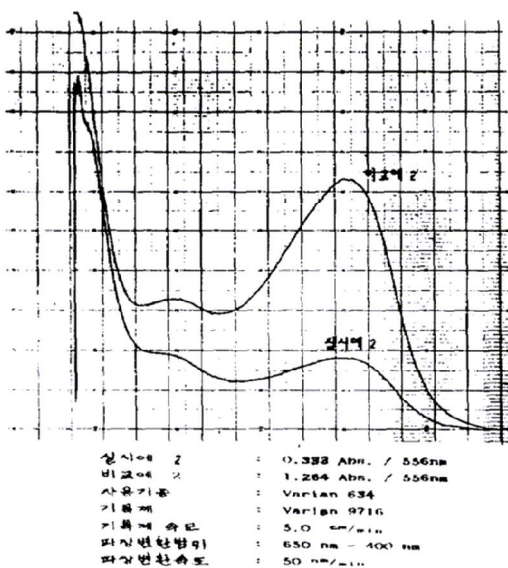
은행잎을 메탄올이나 물과 아세톤 또는 알코올의 혼합용액으로 초기 추출하고 무기염을 가한 다음, 유기용매로 다시 추출한 후, 얻어진 조액기스로부터 불순물을 제거하여 유효활성물질을 추출정제함에 있어서, 상기 조액기스를 감압농축하여 얻은 잔류물에 50v/v% 농도의 에탄올 수용액을 첨가하여 고형성분이 5~20중량%가 되게한 다음 4기압의 압력조건에서 배제한계가 3,000~10,000달톤인 한외여과막을 통과시켜 단백질, 다당 및 프로안토시아니딘 성분을 제거함을 특징으로 하는 은행잎으로부터 유효활성물질을 추출정제하는 방법.

도면

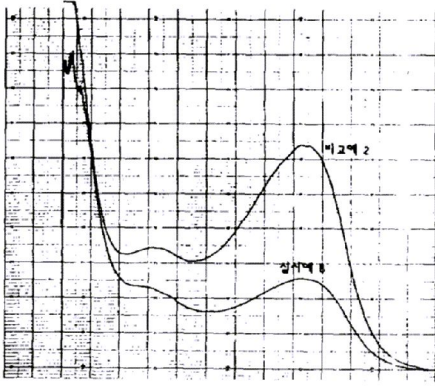
도면1



도면2

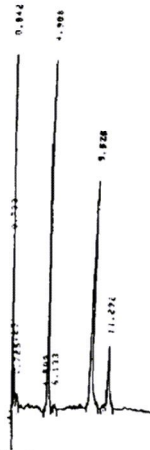


도면3



검시예 8 : 0.512 Abs. / 556nm
 비교예 2 : 1.264 Abs. / 556nm
 사용기종 : Varian 684
 기록기 : Varian 9716
 기록기 속도 : 5.0 mm/min
 파장변환범위 : 450 nm - 400 nm
 파장변환속도 : 50 mm/min

도면4



CHROMATOPAC C-83A FILE 9
 SAMPLE NO 0 METHOD 0021
 REPORT NO 11

PKNO	TIME	AREA	%	IDNO	CONC	NAME
1	0.733	2805			1.9874	
2	0.842	98143			32.886	
3	1.125	2842	V		2.4501	
4	1.2	5924	V		5.1502	
5	1.225	3672	V		3.1701	
6	4.908	27905	V		24.051	
7	9.525	16528			22.9141	
8	11.292	8561			7.884	
TOTAL		115990			100	

도면5



CHROMATOPAC G-RSA FILE B
 SAMPLE NO D METHOD 0021
 REPORT NO 14

PKNO	TIME	AREA	MS	IDNO	CONC	NAME
1	0.898	16205			17.4264	
2	1.112	5177	V		5.938	
3	5.228	28548			82.4874	
4	10.312	28646			32.8808	
5	12.208	9877	V		11.2294	
TOTAL		87253			100	