

최적 분석조건에 의한 강황으로부터 Curcuminoids의 고체상추출(SPE)

이광진¹, 마진열¹, 김영준², 김영식^{3*}

¹한국한의약연구원 한의신약연구그룹

²청운대학교 화장품과학과, ³강원대학교 화학공학과

Solid Phase Extraction(SPE) of Curcuminoids from Turmeric by Optimization Analytical Condition

Kwang Jin Lee¹, Jin Yeul Ma¹, Young Jun Kim² and Young Sik Kim^{3*}

¹KIOM, KM-Based Herbal Drug Research Group

²Department of Cosmetic Science, Chungwoon University

³Department of Chemical Engineering, Kangwon National University

요약 강황은 다양한 약리활성을 가진 약초이다. 강황에 포함된 curcumin, demethoxycurcumin(DMC)과 bisdemethoxycurcumin(BDMC)을 침적과 초음파방법을 이용하여 추출하였다. 그리고 고체상추출(SPE)을 사용하여 추출효율을 확인 하였다. 추출액은 3가지 상업용 C₁₈ 역상 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 이동상으로 물과 아세토나이트릴을 사용하여 일정용매법으로 동시분리·분석을 하였다. 유속은 1.0mL/min, 주입부피는 10 μ L, 컬럼온도 40 $^{\circ}$ C, 파장 425nm에서 수행되었다. 실험결과, RS tech column을 사용하고 물과 아세토나이트릴의 조성비가 (50 : 50vol%)일 때 최적 조건을 얻을 수 있었다. 용매조성(물과 메탄올)에 따른 추출 수율에의 영향을 살펴본 결과 100% 메탄올에서 curcuminoids(추출시간 4h)가 가장 많이 추출되었고, 수용성 메탄올 조성보다 함량이 높았다. 100% 물에 의해, 고체상추출은 curcuminoids의 추출함량(mAU \times mim)이 침적과 초음파방법보다 24.5와 14.3배 높았다. 이상의 결과는 제약 및 기능성 소재로서의 응용 가능성을 나타내었다.

Abstract Turmeric is a medicinal herb with various pharmacological activities. Curcumin, demethoxycurcumin(DMC) and bisdemethoxycurcumin(BDMC) were extracted from turmeric by dipping and ultrasonic wave method. And extraction efficiency was identified using solid phase extraction(SPE). The extracted sample were simultaneously separated and analyzed from three kinds of commercial C₁₈ reversed-phase high performance liquid chromatography using water and acetonitrile as mobile phase with isocratic elution mode. Flow rate 1.0mL/min, injection volume 10 μ L and column oven temperature 40 $^{\circ}$ C at 425nm wavelength has been conducted. From the experimental results, the optimum mobile phase composition of water/acetonitrile 50/50vol% using RS tech column. It is evident that the amount of curcuminoids extracted(extraction time 4h) by 100% MeOH was higher than any aqueous MeOH composition. Finally, in 100% water extraction, the amount(mAU \times mim) of curcuminoids extracted by SPE was 14.3 and 24.5 times respectively higher than ultrasonic wave and dipping method. The shown results can be applied as sources for pharmaceuticals and functional material.

Key Words : Turmeric, RP-HPLC, Separation, Purification, SPE

본 논문은 한국한의약연구원 연구과제로 연구지원(K12050)에 의하여 수행 되었음.

*Corresponding Author : Young Sik Kim

Tel: +82-33-570-6542 email: jameskim@kangwon.ac.kr

접수일 12년 09월 12일

수정일 12년 10월 04일

게재확정일 12년 10월 11일

1. 서론

전 세계는 다양한 질병의 치료 및 예방법을 지역적 특성에 적합한 민간요법을 적용하였고 삶의 의존도를 개선시켜왔다. 하지만 오늘날 민간요법은 과학적 근거를 바탕으로 한 질환 치료와 삶의 의존도를 개선시키고, 나아가 바이오산업은 맞춤형 서비스 산업으로부터 사람들의 건강에 대한 관심과 웰빙생활 패턴의 육구와 수요증가를 만족시키고 있다[1]. 따라서 고효율 고부가 가치를 창출하는 기능성식품, 의약품 및 기능성 소재의 개발은 기술적 조절이 가능토록 요구되어진다. 이러한 생약재로 널리 이용되고, 식품첨가물로 잘 알려진 강황(*Curcuma longa* 이하 turmeric)은 카레의 주원료인 향신료 성분이며[2], 아시아 국가에서 넓게 재배되고, 전통적으로 염증치료에 탁월하며, 항산화작용, 항돌연변이성, 간 해독, 항암 및 혈소판 응집억제 등이 보고되고 있다[1-3]. 특히 curcuminoids의 curcumi(MW=368), demethoxycurcumin(DMC, MW=338) 및 bisdemethoxycurcumin(BDMC, MW=308)이 주된 생리활성 물질로 보고되었다[4,5]. 이러한 강황의 생리활성물질 탐색으로부터 유용성분을 얻기 위한 방법 중 분리기술의 크로마토그래피 공정은 물질을 분석하는 기술뿐만 아니라 생산을 위한 제조용 공정에도 많이 사용되고 있다[6]. 본 연구자는 3가지 상업용 C₁₈ 컬럼을 HPLC를 이용한 curcuminoids의 빠른 동시 분리·분석조건을 찾아 정확한 분리능과, 분석시간, 용매 조성에 따른 분리효율을 통해 기존의 분석조건보다 우수성을 갖는 향상된 분리·분석조건을 찾는데 유용하게 이용될 수 있다[7]. 뿐만 아니라 강황은 생리활성 및 저해기작에 관한 연구는 많이 보고되었으나[8,9], 생리활성물질 추출분야의 산업적 응용을 위한 초임계, 초음파, 초고압 및 마이크로웨이브 등의 물리적 가공법을 이용한 물질 특성을 비교한 연구는 미흡한 실정이다[2,10]. 따라서 유용성분을 효율적으로 얻기 위한 추출방법으로는 전형적인 용매추출법이 알려져 있지만, 이것은 여러 단계의 조작이 요구되고 시료의 손실, 사용되는 다량의 용매자체의 불순물에 의한 오염 및 독성등의 문제점들을 가지고 있다[11]. 이들 문제점을 해결하기 위하여 조작이 간편하며, 자동화가 가능한 고체상추출법(SPE)이 잘 알려져 있어 분리 및 정제를 통해 고순도의 물질을 신속하고 쉽게 추출하는 용매 추출법을 대체하고 있다[12-14]. 이러한 기술적 측면에서 강황으로부터 고체상추출법의 연구가 매우 미약하고 기술적 소개가 전무한 상태이므로 산업적 응용 측면에서 매우 중요하리라 사료된다.

본 연구에서는 생약재로 널리 이용되고 식품소재로 잘 알려진 강황으로부터 침적 및 초음파방법을 적용한 3가

지 C₁₈ 컬럼으로부터 cur- cumin(# 1), DMC(# 2) 및 BDMC(# 3)의 추출효율의 증가와 동시분리·분석조건을 비교 평가하여 최적 조건을 제시하였다. 또한 추출효율이 낮은 100% 물 추출을 고체상추출(SPE)에 적용하여 효율적인 활성소재 확보를 위한 선택적추출 가능성을 검토하고 curcuminoids의 활용가능성을 RP-HPLC를 이용하여 추출량을 실험적으로 구하여 알아보고자 하였다.

2. 실험 및 방법

2.1 실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 강황(*Curcuma longa* 이하 Turmeric) 시료는 중국 지방에서 재배되었으며, 한국한의학연구원 한의신약연구그룹에서 처리된 시료를 사용하였다. 표준 시료인 curcumin은 Sigma co.(제조국 : 중국, 순도 : 80%)에서 구입하였다. 시료의 균일성을 위하여 수분조절 용기(desiccator)에 보관하여 사용하였고, 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(PVDF 0.2 μ m, Waters co)를 이용하여 여과를 하였다. 용매는 HPLC급(99.9%)으로 메탄올, 아세트나이트릴, 아세트산은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, U.S.A.) 그리고 물은 2차 증류수(Division of Millipore, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다.

2.2 강황의 표준시료

Curcumin의 표준시료(순도 : 80%) 4mg을 고순도 메탄올 20mL 취하여 200ppm의 표준원액을 제조하였다.

2.3 HPLC분석조건 및 기기

HPLC급 시약과 추출된 시료를 농축하기 위 해서 회전식 증발기(Heidolph Instruments Lab-orata 4000 efficient, Germany)를 사용하였다. HPLC시스템으로는 Dionex co.의 Ultimate 3000 (Dionex, USA), 3000 pump와 injector에는 10 μ L sample loop(Dionex, ID \times L 0.18 \times 550mm Viper 550mm USA)가 연결 되었고, 데이터 처리는 Dionex co.의 PC에 설치된 Chromeleon data acquisition system(Dionex version 7.0.1.272)과 HPLC-DAD를 사용하여 정량 및 정성분석을 하였다. 비교분석에 사용된 3가지 컬럼은 5 μ m 물질이 충전된 분석용 역상 컬럼 YMC RP-column(250 \times 4.6mm, 5 μ m, C₁₈, Japan), Knauer RP-column(250 \times 3.0mm, 5 μ m, C₁₈, Germany)와 RS tech RP-column(250 \times 4.6mm, 5 μ m, C₁₈, Korea)이 사용되었고, 유속은 1.0mL/min, 주입부피는 10 μ L. 컬럼오븐 온도 40 $^{\circ}$ C로 고정하였다. UV detector는

[표 1] 3가지 컬럼 및 이동상 조성에 관한 쿠쿠미노이드류의 체류시간 및 피크 면적

[Table 1] Retention time and peak area of curcuminoids with three kinds column and mobile phase composition

Kinds Column	Solvent composition(%)		t_R (min) #1	t_R (min) #2	t_R (min) #3	Peak area (% , #1)	Peak area (% , #2)	Peak area (% , #3)	Peak area (mAU×min) #1	Peak area (mAU×min) #2	Peak area (mAU×min) #3	Total Peak area (#1,2,3)
	Water (A)	ACN (B)										
YMC (1)	60	40	18.49	16.19	14.20	67.53	16.22	6.83	245.99	59.09	24.88	329.96
	50	50	18.91	8.05	7.30	75.80	16.50	4.32	259.24	56.44	14.78	330.46
	40	60	5.61	5.21	4.85	77.14	16.49	3.68	255.20	54.55	12.10	321.85
	30	70	4.23	4.01	3.80	76.45	16.29	3.45	256.72	54.72	11.57	323.02
Kanuer (2)	60	40	13.55	11.96	10.59	76.01	15.53	6.35	222.16	45.40	18.56	286.11
	50	50	5.22	4.73	4.29	79.42	13.85	3.96	259.04	45.19	12.93	317.15
	40	60	2.87	2.66	2.48	80.56	13.89	3.13	255.37	44.04	9.92	309.37
	30	70	1.99	1.89	1.78	74.61	11.58	2.69	258.32	40.11	9.31	307.74
RS-tech (3)	60	40	23.97	20.77	17.94	66.85	15.10	3.32	229.76	51.89	11.42	293.08
	50	50	10.39	9.23	8.19	78.91	16.79	2.98	242.36	51.59	9.15	303.09
	40	60	5.46	5.01	4.60	77.07	16.27	3.26	242.85	51.28	10.27	304.40
	30	70	3.83	3.60	3.39	77.40	16.38	3.25	244.09	51.66	10.25	306.00

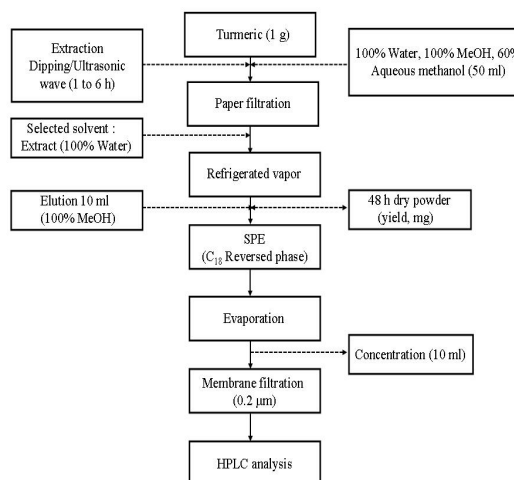
DAD의 파 장범위를 200~500nm로 하였고, 크로마토그래 피는 425nm로 나타내었다. 이동상은 이성 분계 A : 물/아 세트산 (99.9/0.1 vol.%), B : 아세트 나이트릴/아세트산 (99.9/0.1 vol.%)을 사용하여 (A:B 50:50 vol.%)으로 30min 동안 일정용매 조성법으로 실험하였다. 표 1에서 는 3가지 C₁₈ 컬럼과 이동상 조성으로부터 curcuminoids 의 HPLC 분석을 보여주고 있다.

2.4 용매추출법

추출은 일정한 상온에서 수행 하였으며, 건조 분쇄된 시료는 입자를 체 거름(30 μ m)으로 분별하여 시료로 사용 하였고 수분 함유량은 11.2%였다. 이후, 강황분말 1g을 100mL 비이커에 추출용매로서 100% 물, 100% 메탄올, 60% 수용성메탄올 50mL를 각각 첨가하여 침적 및 초음 파방법을 적용하여 추출(4h) 하였다. 또한 추출수율 및 함량의 변화를 알아보기 위하여 100% 물, 50mL를 각각 첨가하여 초음파방법을 적용하여 추출시간 1~6h 동안 시행하여 물질의 변화를 확인하였다. 표 2에서는 추출용 매조성 및 추출방법에 따른 curcumin(# 1), DMC(# 2) 및 BDMC(# 3)의 추출효율을 나타내었다.

또한 추출법에서의 침적방법은 상온(23 \pm 1)에서, 초음파방법은 bath type의 (Branson ultrasonic Co., Model No : 5510R-MTH, Overall size : W 16mm \times L 15.5mm \times H 14.5mm, Reactor size : W 11.5mm \times L 9.5mm \times H 6mm, Frequency : 40kHz, Intensity : 135 Watt, Input solvent : water 9.5L)로 반응기내 물의 초기온도(19 \pm 1)에서 시작하여 최대(49 \pm 1) 까지 증가하였다. 추출 물에는 많은 양의 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용 매추출 후 여지필터(pore size : 5 μ m)에서 감압 여과하여

시료 잔유물과 분리시켰고, 이후 감압 농축후(10mL) 동 결건조(refrigerated vapor trap)를 하여 전체 추출 수율 계 산과 시험용액으로 사용하였다. 그림 1에서는 강황으로 부터 cur- cumanoinds의 추출 및 정제 과정을 나타내었다.



[그림 1] 추출 및 정제 공정
[Fig. 1] Extraction and purification process

2.5 고체상추출 (SPE)

고체상추출은 빠른 시료의 제조와 분석이 가능하며 물 질에 따라 선택적 추출이 가능하다. 따라서 상용공정의 가능성을 확인하기 위하여 추출방법에 따른 고체상추출 사용 전, 후를 비교하였다. 고체상추출(Solid Phase Extraction, 이하 SPE)을 하기 위해(PrepSep-C₁₈ Octadecyl, FisherScientific, USA) 컬럼을 사용하였다.

[표 2] 다른 용매, 추출방법 및 고정상 추출에 관한 쿠쿠미노이드류의 정량분석 데이터

[Table 2] Data for quantitative analysis of curcuminoids with difference extraction solvent, extraction method, and Solid Phase Extraction (SPE)

Extraction method		Extraction Solvent	Peak area (% , #1)	Peak area (% , #2)	Peak area (% , #3)	Total Peak area (% , #1,2,3)	Peak area (mAU× min) #1	Peak area (mAU× min) #2	Peak area (mAU× min) #3	Total Peak area (#1,2,3)	
Dipping		100% Water	34.36	10.24	6.03	50.63	0.37	0.11	0.07	0.55	
		60% MeOH	48.97	22.36	22.08	93.41	21.66	9.89	9.77	41.31	
		100% MeOH	57.72	21.36	18.02	97.10	128.93	47.71	40.25	216.88	
Ultrasonic wave		100% Water	40.21	15.87	14.43	70.51	2.83	1.12	1.02	4.96	
		60% MeOH	53.04	21.59	21.30	95.93	92.45	37.64	37.13	167.21	
		100% MeOH	55.95	21.54	19.80	97.29	205.27	79.02	72.65	356.94	
Dipping	before	SPE	100% Water	22.96	9.36	8.83	41.15	2.65	1.08	1.02	4.75
Ultra, wave	before			35.60	13.80	13.05	62.45	4.65	1.80	1.70	8.15
Ultra, wave	after			53.21	21.76	17.81	92.78	66.79	27.31	22.35	116.45

(Extraction time : 4 h, and room temp., : 23℃)

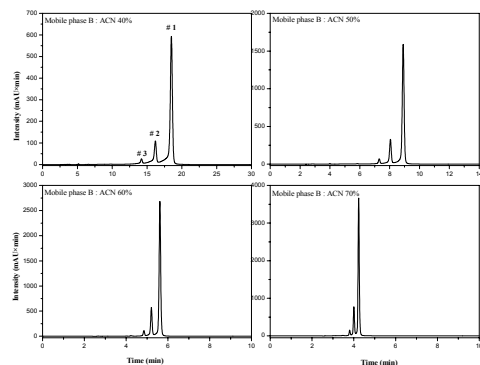
시료 추출은 강황분말 1g을 100mL 비이커에 추출용매로서 100% 물 50mL를 침적 및 초음파방법을 이용하여 추출(4h) 하였다. 이후, 동결 건조된 시료를 용매100% MeOH 10mL 를 용출시켰으며, 다시 멤브레인 필터 (FH-0.2µm, Waters, Milford, MA, USA)로 여과하여 시험 용액으로 사용하였다. 표 2에서는 추출용매, 추출방법 및 고정상 추출에 관한 curcuminoids의 정량분석의 데이터를 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 HPLC최적 동시분리 분석

분리기술은 혼합물을 신속하고 고순도로 정제하는 것이 중요하다. 다양한 분리기술중에서 탁월한 크로마토그래피를 이용한 분리방법을 적용하기 위해 상업용으로 잘 알려진 C₁₈ 컬럼을 선정하여 이동상조성을 변화하여 동시분리·분석조건을 비교 평가하였다. 실험에 사용된 컬럼은 5µm 물질이 충전된 분석용 역상 컬럼을 사용하였다. 그림 2에서는 (1) : YMC RP-column (250×4.6mm, 5µm, C₁₈), 그림 3에서는 (2) : Knauer RP-column(250×3.0mm, 5µm, C₁₈), 그림 4에서는 (3) : RS-tech-column(250×4.6mm, 5µm, C₁₈)이 사용되었고, 유속은 1.0mL/min 주입부피는 10µL 컬럼온도 40℃로 고정하였다. UV detector는 DAD의 파장범위를 200~ 500nm로 하였고 크로마토그래피는 425nm로 나타내었다. 이동상(물, 아세트나이트릴, 아세트산의 극성은 각각 9, 5.8, 6.2)으로써 이성분계 A : 물/아세트산(99.9/0.1 vol.%) B : 아세트나이트릴/아세트산(99.9/0.1 vol.%)을 사용하여 각각 (B : 40~70 vol.%)까지 30min동안 일정용매 조성법으로 하였다. 그림 2, 그림

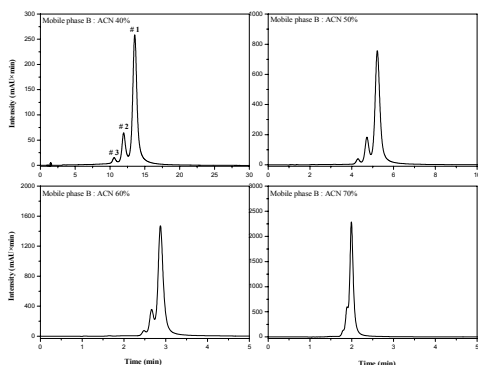
3 및 그림 4에서는 C₁₈ 컬럼으로부터 동시분리·분석된 크로마토그램을 비교하여 보여주고 있다. 분석은 각각의 조건에서 두 번의 실험을 수행 하였다. 대부분 사용되고 있는 고정상은 organochlorosilane이나 alkoxyisilane로서 silanol group을 실리카로부터 반응시킴으로써 만들어 지고, RP-HPLC는 고정상이 이동상보다 극성이 적은 경우이다. 이러한 방법을 사용하면 감도가 좋고 분리능이 우수하며 재현성이 뛰어나다[7]. 이 결과 아세트나이트릴의 함량이 증가할수록 (조성비 : 70%) 체류시간은 감소하는 경향을 보이는데, 이동상의 밀도는 감소하고 점도는 증가하기 때문에 용질의 확산(diffusion) 및 분산(dispersion)이 용이하고 표준물질은 컬럼을 지나가면서 이동상과 고정상 사이에서 흡·탈착 시간이 짧아지고, 물질사이에 체류시간의 간격이 작아 물질 분리는 현저히 떨어지는 현상



[그림 2] YMC 컬럼-HPLC를 사용한 이동상 조성에 관한 쿠쿠미노이드류의 분리효율

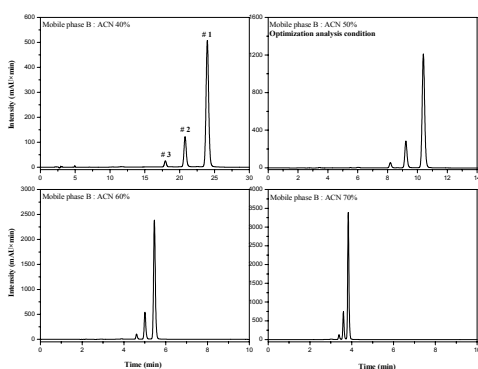
[Fig. 2] Separation efficiency of curcuminoids with mobile phase compositions using YMC column (isocratic elution B : 40, 50, 60, and 70 %, run time : 30 min, flow rate : 1.0mL/min, injection volume : 10

을 보였다. 이때 체류시간은 curcumin(# 1) ; (1) : μL , column oven temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$).4.23, (2) : 1.99, (3) : 3.83min, DMC(# 2) ; (1) : 4.01, (2) : 1.89, (3) : 3.60min, BDMC(# 3) ; (1) : 3.39, (2) : 1.78, (3) : 3.80min이내로 단축되었고 분리도가 1.5 이하로 낮아진다[6]. 이것은 시료가 컬럼에 잠시 동안 머물러 있어서 짧은 분리시간과 빠른 시료의 용출로 인해 컬럼 효율에 큰 영향을 미치고 피크의 폭은 감소하여 분리도(R)는 좋을 수 있으나 각 성분 사이의 분리는 좋지 않게 될 수 있다[15].



[그림 3] Kanauer 컬럼-HPLC을 사용한 이동상 조성에 관한 쿠쿠미노이드류의 분리효율

[Fig. 3] Separation efficiency of curcuminoids with mobile phase compositions using Kanauer column (isocratic elution B : 40, 50, 60, and 70 %, run time : 30 min, flow rate : 1.0 mL/min, injection volume : 10 μL , column oven temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$)



[그림 4] RS-tech 컬럼-HPLC을 사용한 동상 조성에 관한 쿠쿠미노이드류의 분리효율

[Fig. 4] Separation efficiency of curcuminoids with different mobile phase compositions using RS tech column (isocratic elution B : 40, 50, 60, and 70 %, run time : 30 min, flow rate : 1.0 mL/min, injection volume : 10 μL , column oven temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$)

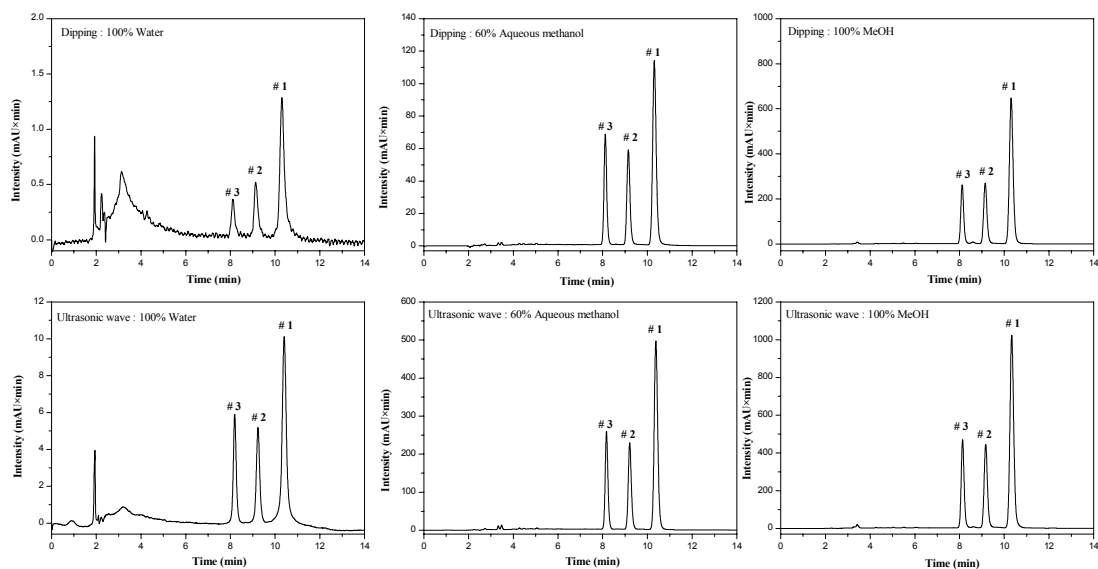
또한 상대적으로 아세트나이트릴의 조성을 40, 50%로 감소 할 경우 컬럼내에 시료의 체류시간이 증가하게 되어 분석시간이 길어지지만, 각 성분의 좋은 분리 및 분리도(R)를 가질 수 있다. 결과적으로 아세트나이트릴의 조성이 40- 70%일 때 컬럼 (1)과 컬럼 (3)의 분리도가 1.5 이상으로 만족하게 나타낼 수 있었으나 (그림 2, 4), 컬럼 (2)의 경우 컬럼의 효율이 떨어지는 경향을 보였다(그림 3). 그러므로 일정용매조성법을 사용하여 분석을 할 경우 빨리 용출되어 나오는 물질의 분리도(R)를 1.5 이상으로 유지하기 위해서는 최적의 분리시간과 분리도 예측 공정 모델이 필요하고 이동상조성, 유속, 주입량 그리고 물질에 따라 다르게 정의되고 유속변화와 조성을 변화시키는 구배용매조성법(gradient mode)을 적용하는 방법도 고려해야 될 것이다[15,16]. 따라서 그림 4에서는 동시분리-분석조건이 우수한 컬럼(3) : RS tech column (250 \times 4.6mm, 5 μm , C₁₈)을 사용한 크로마토그램을 보여주었다. 대체로 아세트나이트릴 증-감에 따라 curcumin(# 1), DMC(# 2), BDMC (# 3)의 분리능이 우수하였다. 또한 scale-up을 위한 공정의 변수중 주입량에 따른 물질의 부피를 고려한 아세트나이트릴 B : 50 vol.%일때 최적화로 판단되어진다.

3.2 고체상추출 (SPE) 및 정량·정성화

정량 및 정성분석을 위해 침적방법은(23 $^{\circ}\text{C} \pm 1$)에서 초음파방법은(frequency 40 kHz, intensity 135 watt, input solvent : water 9.5L)로써 반응기 내 초기 온도는(19 $^{\circ}\text{C} \pm 1$) 에서 추출 용매 100% 물, 100% 메탄올 60% 수용성 메탄 올과 추출시간 4h 동안 추출하여 RS tech column(250 \times 4.6mm, 5 μm , C₁₈)을 사용하여 분석하였다. 이때 curcumin(# 1), DMC(# 2) 및 BDMC(# 3)의 체류시간은 각각 10.39, 9.23, 8.19min이었다(그림 5).

추출방법중 침적방법을 이용한 100% 물 추출에서는 전체(# 1, 2, 3)의 피크면적 (mAU \times min)이 50.63% 이었고, 100% 메탄올 추출에서는 97.10%와 60%, 수용성 메탄올 추출에서는 93.41 % 이었다. 초음파방법에서는 100% 물 추출에서 전체(# 1, 2, 3)의 피크면적 (mAU \times min)이 70.51 %이었고, 100% 메탄올 추출에서는 97.29%, 60% 수용성 메탄올 추출에서는 95.93%이었다.

이러한 결과는 용매선정(물과 메탄올)에 따라 curcuminoids의 용해도는 약 40%정도 큰 차이가 있었고, 물리적 가공 측면(초음파사용 전,후)에서는 100% 물 추출에서 약 20%정도 차이가 있었지만, 100% 메탄올과 60% 수용성메탄올에서는 미미한 변화가 있었다. 하지만, 초음파추출에서 고주파와 저주파의 사용에 미세한 공동화 현상인 공동(cavity)이 시료의 미세부분조직까지 쉽게 침투하여 추출효과를 향상시킬 수 있었다[11,17]. 따라서



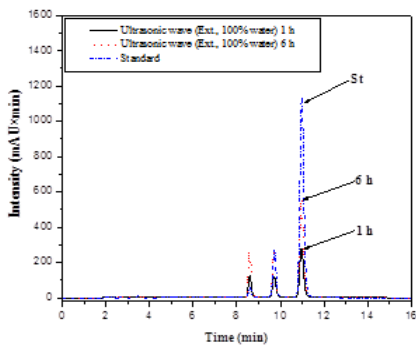
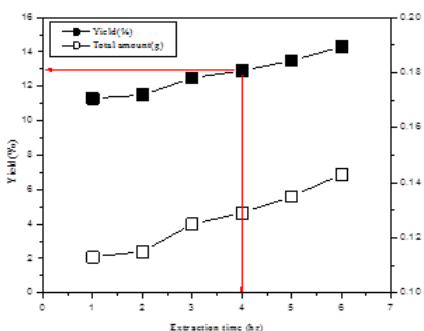
[그림 5] 100% 물, 100% 메탄올 및 60% 수용성메탄올 조성에 의한 추출효율 비교
 [Fig. 5] Comparison of extraction efficiency by 100% water, 100% MeOH and 60% aqueous methanol composition. (isocratic elution B : 50 %, extraction time 4 h, using RS-tech column)

기초 데이터의 적용가능성을 다양하게 확인하기 위해 curcumanoids의 추출 수율이 낮은 100% 물을 이용한 초음파 방법으로부터 시간변화에 따른 추출효율을 확인하였다. 추출시간동안 반응기내 온도증가는 (1h : 10, 2h : 8, 3h : 6, 4h : 3, 5h : 2, 6h : 1℃, ± 1) 최대 (49℃ ± 1)까지 약 (30℃ ± 1)의 온도가 증가되었고, 수율(%) 및 함량(mg) 변화를 그림 6(a)에 나타내었다. 이 결과 수율은 1h(11.3%), 4h(12.9%), 6h(14.3%)로 미미한 증가추세를 보였으나, 유용성분을 얻기 위한 물리적 가공법은 경제성을 고려한 고효율 고비용의 산업적 영향으로 수학적 모델링으로부터 적용가능성을 예측해야 될 것으로 사료된다. 따라서 실제적인 천연물 추출공정에서도 유용성분의 초음파 추출은 많은 실험을 통하여 확인해야 할 것이며 frequency(kHz), intensity(watt), 시간(min)과 온도(℃) 그리고 시료의 조직형태에 따라 추출 효율 및 유용성분의 영향은 다양한 변수에 의하여 편차가 클 것으로 사료된다. 그림 6(b)에서는 추출시간 변화에 따른 크로마토그램을 보여주고 있다. 전 처리한 강화 추출물을 분석용 컬럼을 사용하여 이동상 1.0mL /min, 주입부피 10μL와 425nm의 실험조건에서 확인하였다.

여기에서 초음파추출은 높은 감도의 크로마토그램을 보이고 있으며 시료 중의 각 성분인 curcumin(# 1), DMC(# 2), BDMC(# 3)은 안정된 감도에 의해 최적의 분리 효율을 볼 수 있었다. 또한 선행 연구의 정량 및 정성 분석을 위한 추출 및 분석 패턴의 결과와 일치 하였다

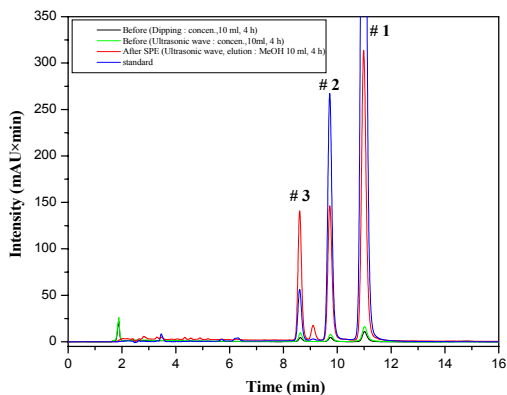
[19]. 그림 7에서는 고체상추출(SPE)을 보여주고 있다. 여기에서는 (Prep Sep-C₁₈ Octadecyl) 컬럼을 이용한 고체상추출 사용 전, 후를 비교하였다. 100% 물을 이용하여 침적 및 초음파방법을 적용한 강화분말 1g에서 4h동안 추출하여 10mL로 농축 후 분석하였다. 고체상 추출은 동일한 추출방법후 동결건조된 시료를 용매100% MeOH 10mL에 녹여 용출시켰다. 이 과정을 통해서 전체 함량을 피크 면적값으로 나타내었다.

침적에서는 4.75(mAU×mim) 초음파에서는 8.15(mAU×mim)를 확인하였고, 반면 초음파추출 후 고체상추출에서는 116.45(mAU×mim)를 얻을 수 있었고, 침적 및 초음파추출보다 24.5와 14.3배 차이의 높은 추출함량 차이를 보여주었다. 이러한 결과로서 초음파추출이 단시간 내에 물질의 내부까지 강력한 에너지가 전파되어 추출효율이 향상되었다[17, 18]. 또한 고체상추출에서는 빠른 시료의 제조와 분석이 가능하며, 물질에 따라 선택적 추출이 가능한 추출 기법의 장점을 통해서 고분자량과 낮은 분자량의 이온성 물질들이 분리 및 제거되고 HPLC를 통한 정성분석의 추출효율이 향상될 수 있음을 보여준다 [13,14,20]. 그림 8에서는 초음파방법(6 h)에서 분석한 크로마토그램을 보여주고 있다. 여기서 얻어진 생물활성 스펙트럼, UV흡광도 및 구조식을 나타내었다. 파장의 범위는 200~500nm로 하였고, 크로마토그래피는 425nm로 나타내었다.



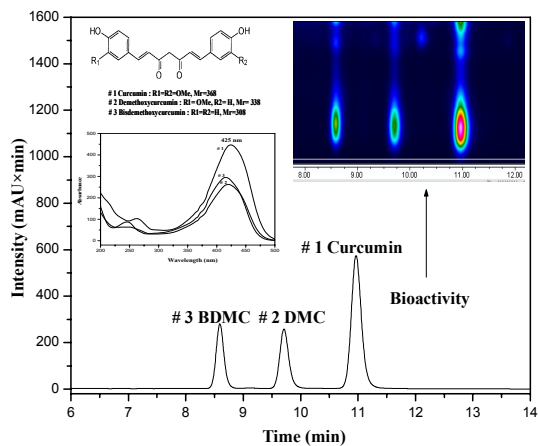
[그림 6] 추출시간에 관한 쿠쿠미노이드류의 함량 및 추출 수율

[Fig. 6] Extraction yields and amounts of curcuminoids with extraction times (a : extraction solvent and method : 100% water and ultrasonic wave at 1 to 6 h, b : shown the analysis chromatogram at 1 and 6 h)



[그림 7] SPE의 전과 후의 크로마토그램
[Fig. 7] Chromatogram of SPE before and after : (a) Before SPE ; dipping at 4 h. (b) Before SPE ; ultrasonic wave method at 4 h. (c) After SPE ; ultrasonic wave at 4 h, elution solvent 100% MeOH)

curcumin(# 1), DMC(# 2) 및 BDMC(# 3)은 각각 425, 420 및 418nm에서 흡광하는 성질로 확인되어 다른 계열의 물질과 구별할 수 있게 되었고 선행연구에서 보고된 결과와 일치 하였다[20]. 따라서 본 연구에서 수행된 연구 결과는 사실을 실험적으로 입증하는 기초자료로 이용 될 수 있다.



[그림 8] RS tech column-HPLC을 이용한 초음파 6시간 추출에 관한 쿠쿠미노이드류의 분석

[Fig. 8] Analysis of curcuminoids with ultrasonic wave at 6 h extraction by RS tech column-HPLC (Shown the chemical structure, UV absorbance 425 nm and bioactivity, using 100% water)

4. 결론

본 연구에서는 강황의 생리활성물질 추출분야도 물리적 가공을 이용한 산업적 응용 측면에서 매우 중요하며, 고체상추출(SPE) 방법으로 추출된 물질의 특성 연구는 매우 미흡한 실정이다. 이 결과 초음파로부터 추출효율 향상과 C₁₈, RS tech column(Korea)으로부터 아세트나이트릴 B : 50vol.%일때 순수 물질분리를 하였고 최적의 동시분리·분석조건을 확립하였다. 또한 용매추출은 초음파 방법(4h)에서 100% 메탄올 추출이 100% 물 추출보다 curcuminoids 의 함량이 71.96배 높았다. 이때 수율이 낮은 100% 물을 이용하여 초음파추출후 고체상추출법을 적용한 결과 침적과 초음파방법보다 24.5와 14.3배의 함량을 보여 추출효율이 우수하였다. 위에서 얻은 기초자료는 상용공정의 활용가능성을 실험적으로 모색하였고 충분한 가치가 있다고 판단된다.

References

- [1] W. S. Kang, J. H. Kim, E. J. Park, and K. R. Yoon, "Antioxidative Property of Turmeric (*Curcuma Rhizoma*) Ethanol Extract" *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, Vol. 30, No. 2, pp. 266-271, 1998.
- [2] S. H. Jung, K. S. Chang, and K. H. Ko, "Physiological Activity/Nutrition : Physiological Effects of Curcumin Extracted by Supercritical Fluid from Turmeric (*Curcuma longa* L.)", *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, Vol. 36, No. 2, pp. 317- 320, 2004.
- [3] M. Cousins, J. Adelberg, F. Chen, and J. Rieck, "Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of tumeric (*Curcuma longa* L.) grown in vitro," *Industrial Crops and Products*, Vol. 25, No. 2, pp. 129-135, 2007.
- [4] S. Pandit, H. J. Kim, J. E. Kim, and J. G. Jeon, *Food Chemistry*, "Separation of an effective fraction from tumeric against *Streptococcus mutans* biofilms by the comparison of curcuminoid content and anti-acidogenic activity", Vol. 126, No. 4, pp. 1565-1570, 2011.
- [5] R. Li, C. Xiang, M. Ye, H. F. Li, X. Zhang, and D. A. Guo, "Quantitative and qualitative analysis of curcuminoids in herbal medicines derived from *Curcuma* species." *Food Chemistry*, Vol. 126, No. 4, pp. 1890 - 1895, 2011.
- [6] C. H. Jin, J. W. Lee, and K. H. Row, "Optimum condition of Mobile Phase Composition for Purine Compounds by HCl Program", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, Vol 17, No. 3, pp. 317 - 320, 2006.
- [7] K. H. Row, "Separation of Two Components in the case of Large Difference in Concentration by Chromatography.", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, Vol 6, No. 2, pp. 193 - 199, 1995.
- [8] S. W. Oh, J. Y. Cha, J. E. Jung, B. C. Chang, H. J. Kwon, B. R. Lee, and D. Y. Kim, "Curcumin attenuates allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice through NF- κ B inhibition", *J. Ethnopharma.*, Vol. 136, No. 3, pp. 414 - 421, 2011.
- [9] G. Singh, I. P. S. Kapoor, P. Singh, C. S. Heluani, M. P. Lampasona, and C. A. N. Catalan, "Comparative study of chemical composition and anti-oxidant activity of fresh and dry rhizomes of tumeric (*Curcuma longa* Linn.)", *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 48, No. 4, pp. 1026 - 1031, 2010.
- [10] P. Y. Zhan, X. H. Zeng, H. M. Zhang, and H. H. Li, "High-efficient column chromatographic extraction of curcumin from *Curcuma longa*." *Food Chemistry*, Vol. 129, No. 2, pp. 700 - 703, 2011.
- [11] P. S. Wakte, B. S. Sachin, A. A. Patil, D. M. Mohato, T. H. Band, and D. B. Shinde, *Separ. Purif. Technology*, "Optimization of microwave, ultra sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*." Vol. 79, No. 1, pp. 50 - 55, 2011.
- [12] X. Sun, C. Gao, W. Cao, X. Yang, and E. Wang, "Capillary electrophoresis with amperometric detection of curcumin in chinese herbal medicine pretreated by solid-phase extraction", *J. Chromatography A*, Vol. 962, No. 1-2, pp. 117 - 125, 2002.
- [13] B. Liu, H. Yan, F. Qiao, and Y. Geng, "Determination of clenbuterol in porcine tissues using solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC-UV detection" *J. Chromatography B*, Vol. 879, No. 1, pp. 90 - 94, 2011.
- [14] M. Tian, H. Yan, and K. H. Row, "Solid-phase extraction of tanshinones from *Salvia Miltiorrhiza* Bunge using ionic liquid-modified silica sorbents" *J. Chromatography B*, Vol 877, No.8-9, pp. 738 - 742, 2009.
- [15] D. Y. Choi, J. Zheng, and K. H. Row, "Characteristics of Extraction of Daidzein and Genistein in Soybean Using Sub/Supercritical Fluids.", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, Vol. 16, No. 5, pp. 609 - 613, 2005.
- [16] K. K. Chang, K. H. Row, and S. T. Chung, "Separation of Taxol from Taxanes by NP-HPLC", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, Vol 8, No. 2, pp. 286 - 291, 1997.
- [17] M. Alexei, G. Christian, and D. Bertrand, "Ultrasonic cavitation in thin liquid layers", *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 12, No. 6, pp. 415 - 422, 2005.
- [18] Y. S. Kim and K. J. Lee, *Korean Chem. Eng. Resear.*, "Extraction of Genistein and Formononetin from *Sophoraflavescens Aiton* using Ultrasonic wave" Vol 47, No. 2, pp. 258 - 261, 2009.
- [19] S. Gilda, M. Kanitkar, R. Bhonde, and A. Paradkar, "Activity of water-soluble turmeric extract using hydrophilic excipients", *LWT-Food Sci. Techn.*, Vol. 43, No. 1, pp. 59 - 66, 2010.
- [20] J. H. Lee and M. G. Choung, "Determination of curcuminoid colouring principles in commercial foods by HPLC", *Food Chemistry*, Vol. 124, No. 3, pp. 1217 - 1222, 2011.

이 광 진(Kwang Jin Lee)

[정회원]



- 2001년 2월 : 인하대학교 대학원 화학공학과 (공학석사)
- 2006년 8월 : 인하대학교 대학원 화학공학과 (공학박사)
- 2008년 8월 : 한국과학기술연구원 (KIST) 천연물연구센터 Postdoctoral.
- 2012년 3월 : 미국 University of Hawaii at Hilo, College of Pharmacy Researcher fellow.
- 2012년 11월 ~ 현재 : 한국한의학연구원(KIOM) 한의 신약연구그룹 분리·분석 팀 Senior.

<관심분야>

생물화공, 생물분리기술, 천연물화학

김 영 식(Young Sik Kim)

[정회원]



- 1979년 2월 : 충북대학교 대학원 화학공학과 (공학석사)
- 1989년 2월 : 충북대학교 대학원 화학공학과 (공학박사)
- 1996년 8월 ~ 1997년 8월 : 영국 Strathclyde Univ. 방문교수
- 2010년 2월 ~ 2011년 2월 : 미국 Eastern Michigan Univ. 방문교수
- 2011년 11월 ~ 현재 : 한국가스안전공사 비상임이사
- 1982년 02월 ~ 현재 : 강원대학교 화학공학과 교수

<관심분야>

레올로지, 분리정제, 정밀화학

마 진 열(Jin Yeul Ma)

[정회원]



- 2004년 2월 : 성균관대학교 대학원 제약학과 (약학박사)
- 1987년 5월 ~ 1994년 11월 한국 화학연구소, 연구원
- 2010년 2월 ~ 2011년 12월 한국 한의학연구원 한의융합연구본부, 본부장
- 2011년 12월 ~ 현재 : 한국한의학연구원 한의신약연구그룹, 그룹장
- 2010년 2월 ~ 2011년 2월 : 식품의약품안전청 중앙약사심의위원
- 2012년 9월 ~ 현재 : 한국의료분쟁조정중재원 의료사고감정단 자문위원

<관심분야>

약학, 한약학, 독성학

김 영 준(Young Jun Kim)

[정회원]



- 1977년 2월 : 인하대학교 화학공학과 (공학사)
- 1979년 2월 : 인하대학교 대학원 고분자공학과 (공학석사)
- 1993년 2월 : 충북대학교 대학원 화학공학과 (공학박사)
- 1982년 3월 ~ 1995년 2월 : 대전대학교 공업화학학과 교수
- 1995년 3월 ~ 현재 : 청운대학교 화장품과학과 교수

<관심분야>

고분자합성, 화장품소재