

초임계 이산화탄소를 이용한 약용식물 성분의 선택적 추출

최영해, 박은정, 김영림, 진영원, 김진웅*, 전성호¹, 정승남¹, 유기풍¹

서울대학교 약학대학, ¹서강대학교 화학공학과

Selective Extraction of Cytotoxic Substances from Medicinal Plants using Supercritical Carbon Dioxide

Young Hae Choi, Eun Jung Park, Youngleem Kim, Young-Won Chin,
Jinwoong Kim*, Seong Ho Jeon¹, Seung Nam Joung¹ and Ki-Pung Yoo¹

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea and

¹Department of Chemical Engineering, Sogang University, C.P.O Box 1142, Seoul, Korea

Abstract - Supercritical fluid extraction (SFE) technique was applied to extract cytotoxic substances from five medicinal plants including *Angelica gigas*, *Angelica acutiloba*, *Aralia cordata*, *Spirodela polyrhiza*, *Bupleurum falcatum*, and *Acanthopanax sessiliflorus*. The cytotoxicities against P388, A549, and HL-60 cell lines were determined for the supercritical carbon dioxide extracts of five plant materials employed and were compared with those of the conventional organic solvent extracts such as *n*-hexane, CHCl₃, and MeOH to evaluate the SFE as an alternative method to conventional organic solvent extraction. In most cases, the SFE extracts of plant materials showed enhanced cytotoxicities when compared with those of other organic solvent extracts. In addition, the optimum temperature and pressure of SFE for extraction of the cytotoxic substances were largely affected by both the plant species and the cell lines tested. These results suggested that SFE could be an alternative to the conventional organic solvent method for the selective extraction of cytotoxic compounds from plants.

Key words - Supercritical carbon dioxide; cytotoxicity; medicinal plants.

환경 문제에 대한 관심이 사회 전반적으로 대두되고 있는 현재, 모든 산업 분야에서 기존의 공정을 환경친화적인 방법으로 대체하려는 시도가 활발히 진행되고 있다. 특히 인체에의 적용을 전제로 하는 생리활성 물질의 추출, 정제에 있어서는 기존의 유기용매 사용 시에 발생가능한 유해물질의 잔류나 환경독성 등이 더욱 문제될 수 있다. 최근 이러한 기존의 유기용매 추출법이 갖고 있는 문제점을 극복하기 위

한 방법의 하나로 초임계 유체 기술을 천연물의 추출·정제 분야에 적용하기 위한 노력들이 국내외적으로 시도되고 있다.¹⁻³⁾

초임계 유체는 일반적으로 임계 온도와 임계 압력 이상에 존재하는 유체로써 기체와 액체의 중간적인 성격에서 기인한 낮은 점도, 높은 물질 전달 능력 등의 장점으로 인하여 각 종 추출·정제 분야에 활발히 응용되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 사용가능한 대표적인 초임계 유체들로는 이산화탄소, 에탄, 에틸렌, 프로판, 프로필렌, 암모니아 등이 있으며 이 중 이산화탄소는 낮

*교신저자 : Fax 02-887-8509

은 임계 온도, 압력, 저렴한 가격, 무독성, 환경친화성 등으로 인하여 가장 각광받고 있는 초임계 유체이다.^{4,6)}

최근 저자들은 초임계 유체 기술을 다양한 천연 생리활성 물질의 추출·정제에 적용한 바 있다. 그 결과 squalene, podophyllotoxin, schisandrin 등 수종의 생리활성 물질에 대해 초임계 유체 추출법이 기존의 유기용매 추출법보다 추출 효율을 향상시키는 것을 확인하였다.⁷⁻¹⁰⁾ 초임계 유체를 이용한 생리활성 성분의 추출 효율 향상 외에도 30여종의 약용식물에 대한 초임계 이산화탄소 추출물의 다양한 생리활성을 검색하여 수종의 식물체에서 기존의 유기용매 추출물 보다 초임계 유체 추출물의 생리활성이 우수함을 입증하였다.^{11,12)}

일반적으로 초임계 유체는 기존의 유기용매와는 달리 온도, 압력의 변화에서 기인한 용매력의 변화로 목적 성분의 추출 선택성을 높일 수 있는 것으로 알려져 있다. 이에 근거하여 본 연구에서는 초임계 유체의 온도, 압력 변화에 따른 세포독성 성분의 선택적 추출능력을 밝히는 연구의 일환으로 당귀(*Angelica gigas* Nakai), 일당귀(*Angelica acutiloba*(Siebold & Zucc.) Kitag.), 독활(*Aralia cordata* Thunb.), 부평초(*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid.), 시호

(*Bupleurum falcatum* L.) 및 오가피(*Acanthopanax sessiliflorus* (Rupr. & Maxim.) Seem.)의 초임계 이산화탄소 추출물에 대하여 P388 (mouse leukemia), A549(human lung carcinoma), HL-60(human leukemia) 세포주에 대한 세포독성을 측정하고 다시 이것을 기존의 유기용매 추출물과 비교하여 초임계 유체가 기존의 추출 방법에 비해 선택적으로 생리활성 성분을 추출할 수 있음을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 연구에서 사용한 당귀, 일당귀, 독활, 시호, 및 오가피는 의약품수출입협회에서 기증 받았으며 부평초는 1994년 5월 수원에서 채집하였다. 모든 식물시료는 vacuum oven을 이용하여 40℃에서 24시간 건조하였으며 세절한 후 사용하였다.

유기용매 추출 - 3 g의 식물시료를 *n*-hexane, CHCl₃ 및 MeOH(덕산약품공업, 경기도 용인)로 40℃에서 3시간동안 초음파 추출기를 이용하여 추출하였고 여과지로 여과한 후 감압상태에서 건조하였다.

초임계 이산화탄소 추출 - 본 실험에 사용된 초임

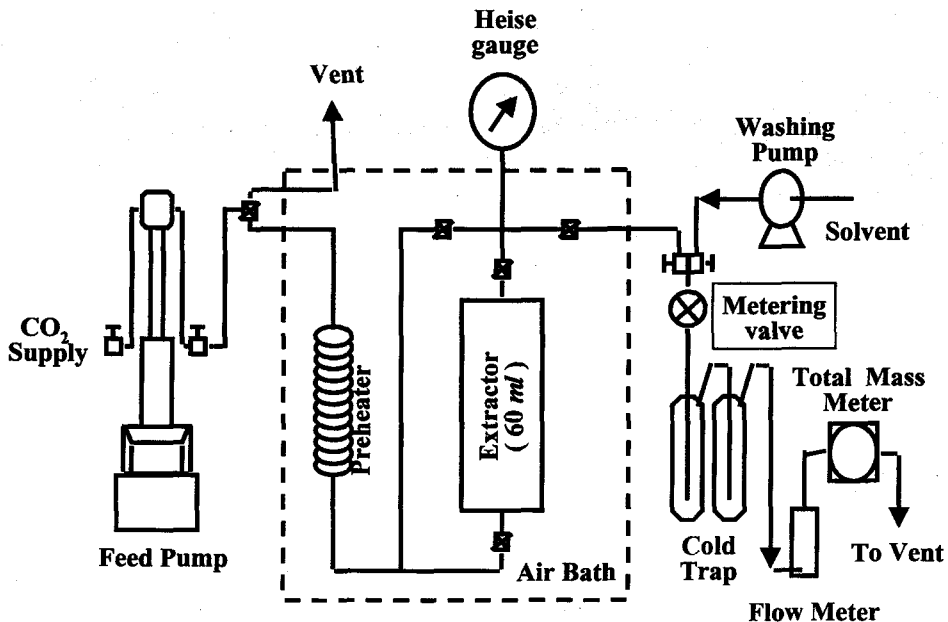


Fig. 1. Schematic diagram of the SFE apparatus.

계 유체 추출장치는 본 저자들에 의해 자체 제작된 흐름법 방식의 장치를 사용하였으며 Fig. 1에 간략히 실험장치의 구조를 나타내었다. 식물시료 3 g을 60 ml의 추출조에 채운 후 ISCO 260 DM syringe pump(ISCO, Lincoln, NE, USA)에 의해 가압한 후 정확한 압력을 유지하기 위하여 HEISE MM-43776 gauge(HEISE, Stratford, CT, USA)를 사용하였다. 추출온도는 air-bath에서 PID 조절기(한영, 서울)를 통하여 $\pm 1^\circ\text{C}$ 범위로 조절하였다. 추출된 유체 혼합물을 가열된 HIP 60-11-HEV-V 미터링 밸브(HIP, Erie, PA, USA)를 이용하여 유속을 200~300 ml/min로 고정된 후 대기압으로 감압하여 방출하였다. 이산화탄소의 누적된 총유량은 wet testmeter(Sierra, Chicago, IL, USA)에 의해 측정하였다. 총 이산화탄소 소비량은 1 atm, 25°C 에서 50 μl 였다. 추출물은 냉각 MeOH로 채워진 포집기에 의해 수집되었다. 실험온도는 35, 45, 55°C , 압력은 10, 20, 30 MPa였다.

세포독성 검색용 시료의 조제 - 세포독성시험 검색을 위한 시료를 *n*-hexane: *i*-propanol(1:1)에 1 mg/ml 농도로 녹인 후 RPMI media(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin 첨가)로 검색최종농도가 100, 20, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 희석하였으며 각각의 검색농도에서 시료는 quadruplicate로 제조하였다.

세포배양 - P388 세포주는 한국화학연구소, A549 세포주와 HL-60 세포주는 서울대 암연구소에서 각각 분주받았다. 각 세포주는 5% heat-inactivated fetal calf serum과 penicillin(100 units)-streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 포함한 RPMI 1640 media(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 37°C , 5% CO_2 , 100% relative humidity의 조건하에서 배양하였다. 각 세포주에 따라 2~5일 마다 계대배양을 실시하였다.

ED₅₀의 결정 - NCI가 제시한 방법에 따라 시행하였다.¹³⁾ Log phase에 있는 세포를 예비실험에서 정한 세포 농도(P388, 10×10^4 cells; A549, 15×10^4 cells; HL-60, 30×10^4 cells)로 맞춘 후, 세포 배양액을 100 μl 씩 96 well microtiter에 넣고 24시간 배양하였다. 그 다음 시료를 포함한 media를 100 μl 씩 quadruplicate로 넣고 48시간 동안 반응시킨 다음 MTT나 SRB assay를 실시하였다. Positive control로써 adriamycin을 사용하였다.

MTT assay - P388 및 HL-60 세포주에 대해서 MTT assay를 실시하였다. MTT용액(5 mg MTT/ml in PBS와 serum free media를 2:3의 비율로 혼합) 일정량을 각 well에 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 2000 rpm에서 20분간 원심분리하여 생성된 formazan을 well plate 바닥에 가라앉힌 후 배지를 제거하였다. DMSO를 가하여 formazan을 용해시키고 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.¹⁴⁻¹⁷⁾

SRB assay - A549 세포주에 대해서 SRB assay를 실시하였다. 반응이 끝난 plate의 각 well에 50% TCA를 50 μl 씩 넣어준 후 4°C 에서 1시간 방치하여 세포를 고정시키고 증류수로 세척한 후 공기중에서 건조시켰다. 각 well에 0.4% SRB(w/v in 1% acetic acid) 용액을 100 μl 씩 넣어 30분간 반응시킨 후 1% acetic acid로 세척하였고 다시 공기중에서 건조시켰다. 고정세포에 염색되어 있는 SRB를 10 mM trizma base(pH 10.5)로 용출시켜 515 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 각 plate에 media만을 포함한 plate를 background level로, sample을 넣지 않은 plate를 대조군으로 하였다. 대조군과 함께 background level(media 자체내의 protein에 의한 흡광도)을 결정하기 위해 media도 포함시켰다.^{18,19)}

결과 및 고찰

천연물로부터 초임계 이산화탄소를 이용하여 세포독성 성분이 추출되는 가를 알아보기 위하여 세 종류의 암세포주에 대해 활성을 측정하였다. P388 (mouse leukemia) 세포주에 대한 각 시료의 유기용매 추출물 및 초임계 이산화탄소 추출물의 세포독성은 Table I에 나타내었다. 대상으로한 모든 식물의 초임계 이산화탄소 추출물이 기존의 유기용매 추출물보다 강력한 세포독성을 나타내었다. 특히 독활과 시호의 경우에 있어서는 초임계 이산화탄소 추출물이 *n*-hexane, CHCl_3 , MeOH 추출물보다 현저하게 강한 세포독성을 나타내었다. 당귀의 경우 추출 선택성 면에서 초임계 이산화탄소 추출물은 비극성 용매인 *n*-hexane 및 CHCl_3 추출물과는 비슷하고 극성 용매인 MeOH에 비해서는 2배 가까운 세포독성의 증가를 나타내었다. 부평초의 초임계 이산화

Table I. Cytotoxicities of the extracts against P388 cell line (ED₅₀ values, µg/ml)

Plant material	SF-CO ₂ extraction (the optimum condition)	<i>n</i> -hexane extraction	CHCl ₃ extraction	MeOH extraction
<i>A. gigas</i>	36.2 (55°C and 30 MPa)	38.5	38.3	52.5
<i>A. cordata</i>	14.5 (55°C and 10 MPa)	33.3	20.9	22.7
<i>S. polyrhiza</i>	27.5 (45°C and 30 MPa)	30.8	29.7	28.1
<i>B. falcatum</i>	18.9 (45°C and 10 MPa)	>100	27.0	>100

탄소 추출물의 세포독성은 비교된 모든 유기용매 추출물에 비해 약간 증가된 세포독성을 나타내었다. 이러한 결과로부터 초임계 이산화탄소가 현재까지 사용된 유기용매 추출물에 비해 기존에 알려진 장점-낮은 비용, 무독성, 환경친화성 등-외에도 생리활성 물질의 선택적 추출면에서 그 유용성이 입증되었다.

P388 세포주외에 또 다른 세포주에 대한 초임계 이산화탄소 추출물의 세포독성 성분 추출 선택성을 알아보기 위하여 인체암세포주인 A549, HL-60에 대하여 각각의 활성을 측정하였다. 그 결과 각 식물 시료 추출물의 세포독성은 P388 세포주와는 다른 결

과를 나타내었다(Table II, III). 당귀의 경우 A549 세포주에 대해서는 초임계 이산화탄소 추출물이 유기용매 추출물에 비해 상대적으로 매우 강한 세포독성을 나타내었다. 그러나 HL-60 세포주에 대해서는 오히려 *n*-hexane 추출물이 초임계 이산화탄소 추출물 보다 약간 높은 세포독성을 나타내었다. 이 결과는 초임계 이산화탄소가 당귀로부터 A549 세포주에 대해 활성 특이성이 있는 화합물을 선택적으로 추출할 수 있음을 나타낸다. 또한 오가피 초임계 이산화탄소 추출물도 A549 및 HL-60 세포주에 대한 특이적인 세포독성을 나타내었다. 일당귀는 HL-60

Table II. Cytotoxicities of the extracts against A549 cell line (ED₅₀ values, µg/ml)

Plant material	SF-CO ₂ extraction (the optimum condition)	<i>n</i> -hexane extraction	CHCl ₃ extraction	MeOH extraction
<i>A. gigas</i>	18.5 (35°C and 30 MPa)	38.0	29.8	>100
<i>A. cordata</i>	24.4 (55°C and 20 MPa)	<4.0	48.1	>100
<i>A. sessiliflorus</i>	27.9 (35°C and 20 MPa)	76.0	>100	>100

Table III. Cytotoxicities of the extracts against HL-60 cell line (ED₅₀ values, µg/ml)

Plant material	SF-CO ₂ extraction (the optimum condition)	<i>n</i> -hexane extraction	CHCl ₃ extraction	MeOH extraction
<i>A. gigas</i>	14.3 (35°C and 20 MPa)	10.9	26.0	45.8
<i>A. acutiloba</i>	16.2 (35°C and 20 MPa)	40.2	57.5	>100
<i>A. cordata</i>	28.0 (35°C and 30 MPa)	<0.8	45.7	>100
<i>A. sessiliflorus</i>	18.1 (55°C and 10 MPa)	>100	>100	60.5

세포주에 대해 초임계 이산화탄소 추출물이 *n*-hexane, CHCl₃, MeOH 추출물 보다 높은 추출 선택성을 나타내었다. 독활의 초임계 이산화탄소 추출물은 A549 및 HL-60 세포주에 대해 P388 세포주 결과와는 달리 *n*-hexane 추출물 보다 오히려 낮은 세포독성을 나타내었다.

현재까지 초임계 이산화탄소는 낮은 극성으로 인하여 천연물 추출에 있어서 주로 lipid, steroid, aliphatic compound 등 비극성 성분 추출에 응용되었다.¹⁻³⁾ 따라서 본 연구에서 초임계 이산화탄소를 이용한 식물 추출법이 기존의 유기용매에 비해 높은 세포독성을 보이는 것은 식물체에 존재하는 성분 중 세포독성 성분이 상대적으로 높게 추출된 것으로 판단된다. 또한 독활이 세포주에 따라 활성의 차이는 *n*-hexane 추출물의 polyacetylene계 세포독성 물질이 보고된 예를 볼 때 흥미있는 결과로 판단된다.²⁰⁾

세포독성 물질의 선택적 추출을 위한 최적 초임계 이산화탄소 추출 조건은 각 식물 시료에서 대상 세포주에 따라 많은 차이를 나타내었다. 예를 들어 독활에 있어서 P388 세포주에 대한 최적 추출 조건은 55°C-10 MPa였으나 A549 및 HL-60 세포주에 대해서는 각각 55°C-20 MPa 및 35°C-20 MPa로 서로 상이한 최적 추출 조건을 나타내었다. 이러한 원인은 초임계 유체가 기체나 액체와는 달리 온도, 압력의 변화에 따라 같은 용매라도 용해력, 밀도, dielectric constant 등의 인자들이 현격히 변화하여 각 조건에서 추출되는 성분이 서로 상이함에 기인하는 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구결과는 앞으로 초임계 유체 추출법을 이용하여 목적하는 성분을 천연물로부터 추출할 때 온도, 압력 등의 간단한 변화만으로도 생리활성성분의 추출 선택성을 높일 수 있는 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 한국과학재단의 1994년도 특정기초연구 지원에 의하여 수행되었기에 감사드립니다.

인용문헌

1. Bevan, C. D. and Marshall, P. S. (1994) The

- use of supercritical fluids in the isolation of natural products. *Nat. Prod. Rep.* 11: 451-466.
2. Chester, T. L. Pinkston, J. D. and Raynie, D. E. (1996) Supercritical fluid chromatography and extraction. *Anal. Chem.* 58: 487R-514R.
3. Modey, W. K., Mulholland, D. A. and Raynor, M. W. (1995) Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochem. Anal.* 7: 1-15.
4. McHugh, M. A. and Krukonsis, V. J. (1994) Supercritical fluid extraction. Principles and practice. 2nd ed. Butterworth-Heinemann, Boston.
5. Hoyer, G. G. (1985) Extraction with supercritical fluids: why, how and so what. *Chemtech.* July: 440-448.
6. Stahl, E., Quirin, K.-W. and Gerard, D. (1988) Dense gases for extraction and refining. Springer Verlag, Berlin.
7. Choi, Y. H., Kim, J., Noh, M. J., Choi, E. S., Yoo, K.-P. (1997) Comparison of supercritical carbon dioxide extraction with solvent extraction of nonacosan-10-ol, α -amyryn acetate, squalene and stigmasterol from medicinal plants. *Phytochem. Anal.* 8: 233-237.
8. Choi, Y. H., Kim, J., Noh, M. J., Choi, E. S., Yoo, K.-P. (1998) Effect of functional groups on the solubilities of coumarin derivatives in supercritical carbon dioxide. *Chromatographia* 47: 93-97.
9. Choi, Y. H. Kim, J. Y., Ryu, J. H., Yoo, K.-P., Chang, Y. S. and Kim, J. (1998) Supercritical carbon dioxide extraction of podophyllotoxin from *Dysosma pleiantha*. *Planta Med.* 64: 482-483.
10. Choi, Y. H., Kim, J., Jeon, S. H., Yoo, K.-P. and Lee, H.-K. (1998) Optimum SFE condition for lignans of *Schisandra chinensis* fruits. *Chromatographia* 48: 695-699.
11. Noh, M. J., Choi, E. S., Kim, S. H., Yoo, K.-P., Choi, Y. H., Chin, Y. W. Kim, J. (1997) Supercritical fluid extraction and bioassay identification of prodrug substances from natural resources. *Kor. J. Chem. Eng.* 14: 109-116.
12. Noh, M. J., Choi, E. S., Yoo, K.-P., Choi, Y. H., Yeo, H., Lee, J., Park, E. J., Kim, J., Park, H. K. and Kim, K. H. (1997) Selective extraction of bioactive substances from natural medicinal resources utilizing supercritical fluid

- technology. *Chem. Ind. & Technol.* 15: 14-21.
13. Monks, A., Scudiero, D. A., Skehan, P., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Vistica, D. T., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. R. (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 757-766.
 14. Alley, M. C. and Lieber, M. M. (1984) Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumor cells. *Br. J. Cancer* 49: 225-233.
 15. Plumb, J., Milroy, R. and Kaye, S. (1989) Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 49: 4435-4440.
 16. Twentyman, P. R., Walls, G. A. and Wright, K. A. (1984) The response of tumor cells of radiation and cytotoxic drugs. A comparison of clonogenic and isotope uptake assay. *Br. J. Cancer* 50: 625-631.
 17. Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M. R. (1991) Tetrazolium based assays for cellular viability. A critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 51: 2515-2520.
 18. Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A. and Boyd, M. R. (1990) Comparison of *in vitro* anticancer drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1113-1118.
 19. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D. T., Warren, J., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxic assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112.
 20. Park, S.-Y. and Kim, J. (1995) Cytotoxic poly-acetylenes from *Aralia cordata*. *Yakhak Hoeji* 39: 681-688.

(1998년 11월 28일 접수)