

## 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 고려인삼으로부터 Polyacetylene 추출에 관한 연구

유 병 삼 · 이 호 재 · <sup>1</sup>고 성 룡 · <sup>1</sup>양 덕 춘 · \*변 상 요  
이주대학교 공과대학 화학·생물공학부, <sup>1</sup>한국인삼연초연구원  
(접수 : 2000. 1. 22., 게재승인 : 2000. 2. 21.)

### Studies on the Extraction of Polyacetylene from Korean Ginseng Using Supercritical Carbon Dioxide

Byoung Sam Yoo, Ho Jae Lee, Sung Ryong Ko<sup>1</sup>, Deok Chun Yang<sup>1</sup>, and Sang Yo Byun\*  
School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Kyunggi 442-749, Korea  
<sup>1</sup>Korea ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea  
(Received : 2000. 1. 22., Accepted : 2000. 2. 21.)

Polyacetylenes were extracted from Korean ginseng using supercritical CO<sub>2</sub>. Yield of extraction of panaxydol and panaxynol was increased as the pressure of supercritical CO<sub>2</sub> increased at the range from 200 to 300 bar. The optimal yields of panaxydol and panaxynol was achieved at 65 and 55°C, respectively. Methanol was applied as a modifier. The highest yield of panaxydol and panaxynol were 0.230 and 0.054 mg/g-dry weight at modifier concentration of 10%(w/w), 300 bar, and 65°C. When these results were compared to that of methanol-extraction, the recoveries of panaxydol and panaxynol by supercritical CO<sub>2</sub> extraction in SFE were 37.8 and 55.1%, respectively

**Key Word** : supercritical CO<sub>2</sub> extraction, Korean ginseng, panaxydol, panaxynol

#### 서 론

초기 인삼의 약리작용과 관련된 화학성분들에 대한 연구들은 대부분 인삼의 엑기스나 사포닌 또는 단백질분에 치중되어 왔다. 그러나 최근 인삼의 석유에테르 추출물 중 일부 분획이 항암작용이 있다고 발표된(1,2) 이래 인삼의 비사포닌 비단백분획에 대한 의리효능 연구도 많이 진행되고 있다. 특히 그 동안의 인삼의 지용성 성분들 중 항암성 물질이 존재한다는 연구보고들에 기초하여, 단일 항암성분들이 규명되기도 하였다(3) 인삼에서 동정된 항암성분들은 polyacetylene계 화합물로서 비사포닌계 지용성 성분들인 lipid를 제외한 alkaloid, phenolics, 그리고 essential oils 등과 비교하여 높은 함량으로 존재하고 있다(3). 이와 같은 인삼의 polyacetylene계 화합물의 구조적 특성은 hept-1-ene-4,6-diyne-3-ol의 기본골격을 갖는 C17의 다가(多價)불포화 알코올 화합물로서 panaxydol과 panaxynol이 전체 polyacetylene계 성분 총량의 90%를 차지하고 있으며, 특히 panaxynol은 홍삼에만 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 이들 세 가지 성분 이외에 acetylpanaxydol, chloropanaxydol, heptadeca-1,8-trans-diene-

4,6-diyne-3,10-diol 등이 존재하지만 그 함량이 매우 낮은 상태로 분포하고 있다.

인삼의 polyacetylene계 성분들을 동정하거나 약리효능 실험을 위하여 현재까지 methanol, ether, hexane 등과 같은 유기용매를 이용한 추출방법이 사용되어 왔고, 고순도 정제를 위하여 silica gel column chromatography 방법이 사용되어 왔다. 이와 같은 방법들은 그 과정이 복잡하며, 고순도 정제시 추출수율이 떨어진다는 어려움이 있다. 또한 잔류 유기용매의 문제점도 간과해서는 안 될 것이다. 특히 panaxydol의 epoxy ring 구조는 들, saponin, 당류 등과 같은 친핵체의 공격을 받아 다양한 종류의 반응생성물이 생길 가능성이 많다(3). 따라서 인삼으로부터 polyacetylene계 화합물들을 추출할 때, 부가적인 화학반응이 일어나지 않는 조건의 단순하고 짧은 추출시간의 추출방법이 보다 높은 추출수율을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

초임계 유체 추출(supercritical fluid extraction, SFE)법은 기체의 임계점보다 높은 온도와 압력 하에 주어진 물질로부터 용질을 추출하는 방법이다. 비교적 낮은 온도(40~70°C)에서 수행되므로 열에 불안정한 제품의 분리정제에 용이하고, 특히 산화되기 쉬운 물질의 경우에 초임계 유체로서 CO<sub>2</sub>가 사용되므로 더욱 안정한 형태로 부가 반응을 최소화시키면서 분리 추출되는 장점이 있다. 초임계 유체는 기체와 액체의 물성을 절충한 특수한 물성을 나타내는데, 밀도는 액체의 밀도에 가깝고, 점도는 기체의 점도에 가까우며, 확산계수는 액체의 확산계수보다 약 100배정도 크게 나타난다(4). 따라서 용해력과 침투력이 커서 추출

\* Corresponding Author · School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

Tel : 0331-219-2451, Fax : 0331-214-8918

E-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

효율이 높고 추출속도도 빠른 장점을 가지고 있다. 또한 간단히 온도와 압력을 변화시켜 용해력을 조절할 수 있으므로 목적물을 선택적으로 추출할 수 있다. 그 뿐만 아니라, 추출이 완료된 후 용매가 제품으로부터 쉽게 제거될 수 있고 유기용매추출에서 문제가 되는 환경오염도 방지할 수 있는 효율적이며 환경친화적인 추출방법이다(5).

본 연구에서는 여러 종류의 인삼 polyacetylene계 화합물들 중 panaxydol과 panaxynol의 초임계 유체추출을 시도하였는데, 이성분들은 높은 함량으로 수삼에만 존재하면서 높은 함량효과를 보이는 성분들이다(3). 초임계 유체 중에서 효율적이며 환경친화적인 초임계 CO<sub>2</sub>를 추출에 적용하였고, 최적 추출조건을 찾기 위해서 압력, 온도, 그리고 보조용매로서 methanol의 영향을 조사하였다

**재료 및 방법**

**시료 및 시약**

추출시료로 한국산 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)이 이용되었다 서울 경동약초시장의 수삼센터에서 1999년 5월에 채취한 4~5년근의 수삼을 구입하여 실험재료로 사용하였다. 추출목적에 따라 구입된 수삼들은 함량에 도달할 때까지 상온에서 건조시킨 후, 분말화하여 균일한 분포를 갖도록 혼합하였다 초임계 유체 추출에 사용된 추출용매는 99.9% 순도의 액체 CO<sub>2</sub>를 사용하였고, 보조용매와 추출물의 포집을 위한 용매는 HPLC 분석용 methanol(덕산, 한국)을 사용하였다. Polyacetylene 성분의 유기용매 추출에 사용된 모든 추출용매는 일급 시약을 사용하였고, trimethylsilyl(TMS) 유도체화 반응에는 Sigma사 제품의 N,O-bis(trimethylsilyl)-acetamide (BSA)을 사용하였다. 표준품으로 사용된 panaxydol과 panaxynol은 인삼연초연구원에서 공급받았다.

**초임계 유체 CO<sub>2</sub>를 이용한 추출**

건조 분말화된 인삼시료 1 g과 유리 bead 2 g을 균일하게 혼합한 후, 추출용 vessel에 충전하여 초임계 유체 추출에 사용하였다. Figure 1은 본 연구에 사용된 초임계 유체 추출 시스템으로서 크게 세 부분으로 나눌 수 있다. 첫 번째 부분인 fluid delivery module은 CO<sub>2</sub>를 가압하여 임계압력 이상으로 만들어 주는 cooling head가 장착된 HPLC pump(PU-980, JASCO Co., Japan)와 보조용매(modifier)를 공급하는 또 다른 HPLC pump로 구성되어 있다. 두 번째 부분인 extraction module에서는 air-driven oven(CO-965 column oven, JASCO Co., Japan)내에 설치되어 있는 extraction vessel로 초임계 CO<sub>2</sub>가 통과하면서 시료로부터 성분의 추출이 일어난다. 세 번째 부분인 fractionation module에서는 전자식 back-pressure regulator(880-01, JASCO Co., Japan)를 통하여 흘러나오는 effluent가 대기압으로 감압되면서 그 속에 들어있는 초임계 CO<sub>2</sub>는 대기 중으로 제거되고 용질들은 용해도가 감소하면서 수집용기에 포집된다. 위 시스템에서 초임계 CO<sub>2</sub>의 압력조건은 back-pressure regulator에 의해서 조절되고, 온도 조건은 air-driven oven에 의해서 조절할 수 있으므로 광범위한 용매특성을 나타내게 된다.

**유기용매를 이용한 추출**

초임계 유체 추출방법에 의한 polyacetylene의 추출 수율을 비

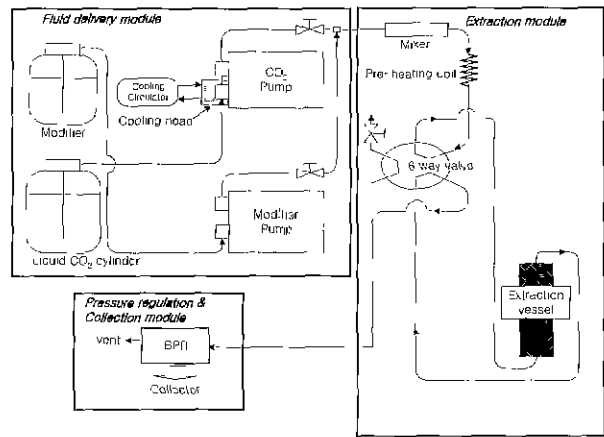


Figure 1. Schematic flow diagram of SFE system.

교하기 위해 유기용매 추출을 하였다. 인삼 건조분말 0.5 g을 60 mL의 80% methanol로 2시간 동안 초음파 분쇄하면서 1차 추출을 하였다. 추출용액은 수증만 남을 때까지 진공 농축하였고, 얻어진 수증과 동일부피의 hexane을 첨가하는 3회의 partitioning으로 2차 추출을 하였다. 3회 추출된 hexane 층을 모두 합하여 진공 농축한 후, polyacetylene 분석에 사용하였다.

**Polyacetylene 성분의 분석**

Polyacetylene계 성분들의 분석은 노(6)의 연구결과에 기초하여 수행하였다. 추출된 polyacetylene 분획물은 질소 기류 하에서 완전히 건조 시킨 후, BSA 100 µL를 첨가하여 80℃ 반응조에서 15분간 반응시켜 TMS 유도체를 제조하였다. TMS 유도체화된 polyacetylene 성분들은 FID detector를 이용한 gas-liquid chromatography(Model DS6200, DONAM, Korea)로 측정되었고, 분석용 컬럼은 EC-5(SE-54 30 m length×0.25 mm I.D., Altech) 모세관 컬럼을 사용하였다. 분석조건은 injector와 detector 온도를 각각 260℃와 290℃로 하였고, 오븐 온도는 100℃에서 300℃까지 3℃/min의 승온조건을 유지하는 온도 프로그램을 사용하였다 이동 가스로 질소를 사용하였고, split ratio는 1:10으로 고정하여 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**초임계 CO<sub>2</sub> 추출시 압력의 영향**

인삼건조분말로부터 panaxydol과 panaxynol의 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 추출에서 최적 압력조건을 찾기 위해 100, 200, 250, 300 bar에서 각각 추출하였다. 추출과정동안 초임계 CO<sub>2</sub>의 온도조건은 55℃, 액체 CO<sub>2</sub>의 공급은 2 mL/min로 동일한 조건을 유지하였다 또한 최적 추출압력 조건을 찾는 목적에 따라서 추출시간은 30분으로 고정하여 각각의 조건에 대한 추출율을 비교하였다. Figure 2에서 볼 때, 200 bar에서 300 bar의 구간에서 panaxydol과 panaxynol의 추출 수율이 압력 증가에 따라 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 이것은 압력증가에 따른 초임계 CO<sub>2</sub>의 밀도가 증가함에 따라 panaxydol과 panaxynol의 용해도가 증가하면서 나타난 결과였다. 이들 성분들의 일반적인 화학구조는 hept-1-ene-4,6-diyne-3-ol의 기본골격을 갖는 C17의 다(多)불포화 알코올 화합물로서 불포화 지방산과 유사한

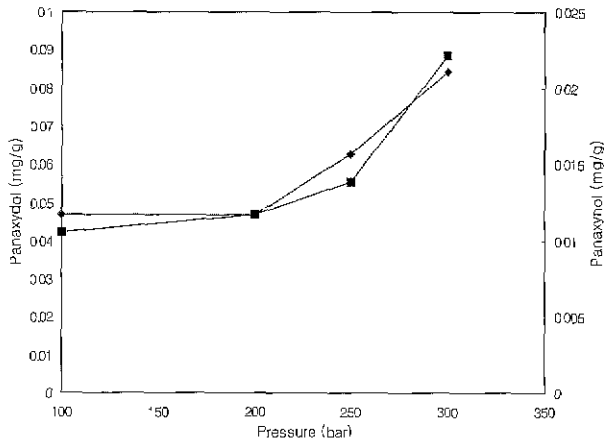


Figure 2. Effect of pressure on the contents of polyacetylenes(panaxydol: ■, panaxynol: ◆) in SFE

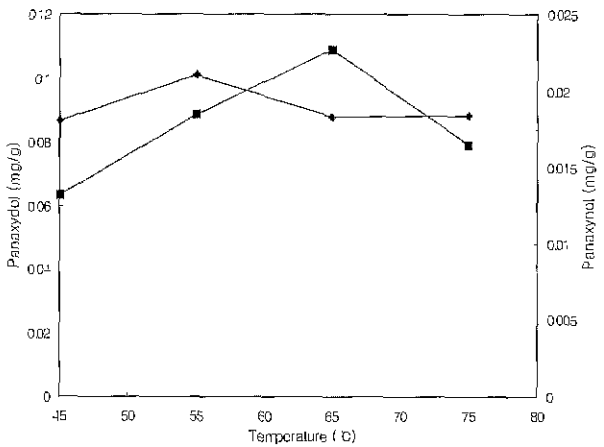


Figure 3. Effect of temperature on the contents of polyacetylenes (panaxydol ■, panaxynol: ◆) in SFE.

화학구조를 갖는다. 이러한 사실을 바탕으로 고찰해 볼 때, 저자 등(7)이 이전에 발표한 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 EPA의 분리정제 실험에서 압력 증가에 따른 추출물의 증가와 유사한 결과였다. 300 bar 이상의 압력조건에서 추출하는 경우는 경제적인 측면에서 볼 때 비효율적이므로 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 panaxydol과 panaxynol의 최적 추출압력 조건을 300 bar로 결정하였다

**초임계 CO<sub>2</sub> 추출시 온도의 영향**

인삼전조분말로부터 panaxydol과 panaxynol의 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 추출에서 최적 온도조건을 찾기 위해 45, 55, 65, 75°C에서 각각 추출하였다. 추출과정동안 압력조건은 위의 실험에서 결정된 300 bar로 유지하였고, 또한 위의 실험 때와 동일하게 액체 CO<sub>2</sub>의 공급은 2 mL/min, 추출시간은 30분으로 동일한 조건을 유지하였다. Figure 3에서 볼 때, panaxydol의 경우 65°C에서 0.109 mg/g의 가장높은 추출물을 나타냈으나, 75°C에서는 오히려 감소하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 panaxydol의 9번과 10번 탄소에 위치한 epoxy ring 구조의 높은 화학반응성 때문으로 생각된다. 서론부분에서도 언급했듯이 높은 온도조건에서 panaxydol의 epoxy ring 구조가 시료 중에 포함되어 있는 saponin이나 당류 등과 같은 친핵체의 공격을 받아 다른 화합물

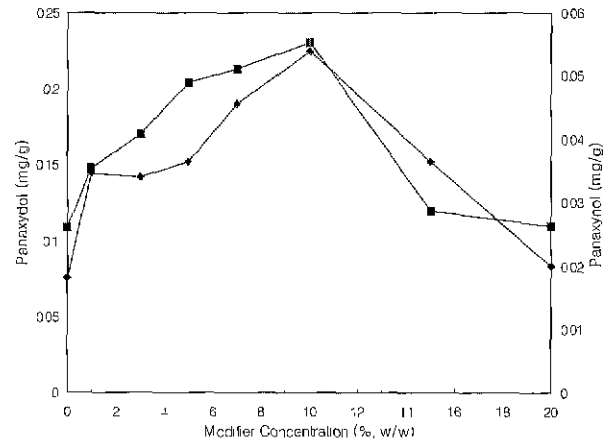


Figure 4. Effect of modifier(methanol) on the contents of polyacetylenes (panaxydol: ■, panaxynol: ◆) in SFE

로 전환되었을 가능성이 있고, 이 때문에 시료 중에 포함된 상대적인 panaxydol의 함량이 감소된 것으로 생각된다. 반면에 panaxynol의 경우 55°C에서 가장 높은 0.021 mg/g의 추출물을 나타내었지만, 전반적으로 온도변화에 따른 추출물의 변화는 크지 않은 것으로 나타났다. 따라서 최적 추출 온도조건은 panaxydol의 최대 추출을 결과를 보였던 65°C로 결정하였다.

**초임계 CO<sub>2</sub> 추출시 보조용매의 영향**

인삼에 존재하는 panaxydol과 panaxynol의 기본 화학구조는 hept-1-ene-4,6-diyne-3-ol의 기본골격을 갖는 C17의 다가(多價)불포화 알코올 화합물이라고 서론에서 이미 언급하였다. 즉, 위 성분들은 한 개의 hydroxyl기를 갖는 약간의 극성을 지니고 있는 화합물이라고 말할 수 있다. 그런데 초임계 CO<sub>2</sub>의 경우 매우 강한 비극성의 성질을 나타내는 용매 특성이 있으므로 약간의 극성을 띠고 있는 화학성분들을 추출하는데는 한계가 있다. 따라서 추출용매로 사용된 초임계 CO<sub>2</sub>에 극성의 성질을 나타내도록 보조용매를 사용한다. 본 실험에서는 가장 일반적으로 사용되고 있는 보조용매인 methanol을 이용하여 최적 추출효율을 나타내는 조건을 찾고자 하였다. HPLC pump에 의해 2 mL/min의 속도로 주입되는 액체 CO<sub>2</sub>의 무게를 기준으로 methanol의 무게비가 각각 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20%(w/w)이 되도록 각각 계산하고, 보조용매 공급을 위한 HPLC pump를 조정하여 공급하였다. 또한 위의 실험에서 최적 조건으로 설정된 압력 300 bar, 온도 65°C를 추출과정동안 일정하게 유지하였다. Panaxydol과 panaxynol 모두 10%의 보조용매 농도까지 추출율이 증가하다가 그 이후로는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다(Figure 4). 추출을 감소 이유는 아마도 10%보다 높은 보조용매의 농도에서 초임계 CO<sub>2</sub>의 극성화가 오히려 panaxydol과 panaxynol의 용해도에 부적합한 영향을 나타냈기 때문으로 생각된다. 따라서 인삼 polyacetylene의 초임계 CO<sub>2</sub> 추출에서 추출용매의 최적 극성화 조건은 보조용매 10%일 때 발휘된다고 할 수 있다.

**유기용매 추출과 초임계 CO<sub>2</sub> 추출의 비교**

인삼 polyacetylene의 유기용매 추출방법은 노(8)의 연구결과를 참고하였다. 이 연구보고서에 의하면, 다양한 유기용매를 사용하여 panaxydol과 panaxynol에 대한 추출율을 서로 비교한 결과

Table 1. Comparison of the contents of polyacetylenes(panaxydol and panaxynol) in the methanol extraction and SFE

	Polyacetylene extracted (mg/g-dry weight)	
	Panaxydol	Panaxynol
Methanol Extraction	0.608	0.098
SFE	0.230	0.054

methanol을 사용할 경우 가장 높은 추출율을 얻었다고 하였다. 그래서 이번 연구에서는 가장 우수한 추출효율을 갖는 methanol을 유기용매 추출에 이용하였고, 초임계 CO<sub>2</sub>에 의한 추출결과와 비교하였다. 초임계 CO<sub>2</sub> 추출의 경우 panaxydol과 panaxynol의 최대 추출효율은 각각 0.230, 0.054 mg/g-dry weight(건조시료)이었는데, 이는 methanol에 의한 추출율과 비교하여 각각 37.8%, 55.1%의 회수율로 나타났다(Table 1). Panaxydol의 경우 비교적 낮은 회수율을 나타내었는데, 이러한 결과는 초임계 CO<sub>2</sub> 상태에서 화학반응이나 효소반응의 활성증가와 연관지어 고려할 수 있다. 일반적으로 높은 확산속도를 갖는 초임계 CO<sub>2</sub>의 특성으로 시료내의 matrix 구조에서 화학성분들간의 화학반응이나 효소기질간의 반응이 유기용매 상태에서 보다 더 유리한 조건이 되는 경우가 많다(9). 따라서 panaxydol의 epoxy ring 구조에 대한 시료내 다른 화학성분들간의 화학반응이 유기용매 상태에서 보다 더 유리한 조건이 되어 결국 panaxydol은 다른 polyacetylene계 화합물로 전환되었을 것으로 생각된다. 초임계 CO<sub>2</sub> 추출에서 panaxydol의 추출수율을 증가시키기 위해서는 추출동안 안정한 화학구조를 유지할 수 있는 추출조건을 찾아야 할 것이다 한편, 고순도 정제를 위한 초임계 유체 크로마토그래피와의 연속공정에 대한 가능성을 고찰해 보았다. 본 연구에서 수행된 최적 초임계 추출조건에서 추출이 거의 완료되는데 걸리는 시간은 40~50분으로 유기용매를 이용할 때보다 약 3배 더 빠른 추출시간이었다. 그리고 90%의 추출공정에 걸리는 시간은 약 30분이 소요되었다. 이러한 결과는 초임계 유체 추출과 초임계 유체 크로마토그래피 공정을 연속하여 수행할 때, polyacetylene계 화합물들간의 분리정제 효율을 더욱 높일 수 있는 조건이 될 수 있다고 판단한다.

요 약

초임계 CO<sub>2</sub>를 이용하여 인삼으로부터 polyacetylene계 화합물들 중 panaxydol과 panaxynol을 추출하였다. 200~300 bar 구간에서 압력의 증가에 따라 panaxydol과 panaxynol의 추출율은 비례적으로 증가하였고, 300 bar에서 최대 추출율을 나타내었다. 또한 추출온도의 영향을 알아보기위해 45~75℃ 온도 구간에서 추출할 결과, panaxydol과 panaxynol은 각각 65, 55℃에서 최대

추출율을 나타내었다. 그러나 panaxynol의 경우 온도변화에 따른 추출율의 변화가 크지 않았으므로, panaxydol의 최대 추출율을 나타내었던 55℃를 최적 추출온도로 결정하였다. 이와 같이 결정된 최적 추출조건인 300 bar, 65℃에서 methanol을 보조용매로 사용하여 panaxydol과 panaxynol의 추출율을 조사한 결과, 10% (w/w)에서 각각 0.230, 0.054 mg/g-dry weight(건조시료)의 최대 추출율을 나타내었다. 이 결과를 methanol에 의한 panaxydol과 panaxynol의 유기용매 추출결과와 비교한 경우, 각각 37.8, 55.1%의 회수율로 나타났다.

감 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 선도연구자지원(과제번호 KRF-99-041-B00379)에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- 1 Yun, Y. S., S. Y. Lee, B. S. Kim, and T. K. Yun (1980), The Studies on the Mechanism of Action of the Cytotoxic Fraction from Korean Ginseng Roots (I) : The Effects of Petroleum Ether Fraction from Korean Ginseng Roots on the Biosynthesis of Macromolecules in Mammalian Neoplastic Cells, *Korean Biochem. J.*, **13**(4), 203-217.
- 2 Lee, S. H. and W. I. Hwang (1986). Inhibitory Effect of Petroleum Ether Extract of *Panax Ginseng* Root against Growth of Human Cancer Cells, *Korean J. Ginseng Sci.*, **10**(2), 141-150.
- 3 Kim, S. I. (1988), Studies on the Cytotoxic Components of the Korean Ginseng Roots, Ph. D. Dissertation, Dept. of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon.
- 4 Stahl, E., K. W. Quirin, and D. Gerard (1988), Dense Gases for Extraction and Refining, p. 176, Springer-Verlag, New York.
- 5 Taylor, L. T (1996). *Supercritical Fluid Extraction*, p1, JOHN WILEY & SONS, INC., New York.
- 6 Nho, K. B. and H. J. Sohn (1989), Determination of the Concentration of Panaxynol, Panaxydol and Panaxytriol by Capillary-GC(FID), *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(2), 183-188.
- 7 Yoo, B. S. and S. Y. Byun (1999), Purification of Eicosapentaenoic Acid (EPA) by Density Gradient Supercritical CO<sub>2</sub> Chromatography, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**(1), 109-113.
- 8 Nho, K. B. and H. J. Sohn (1989), Comparative Studies on Methods of Extracting Polyacetylene Compounds from White Ginseng, *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**(2), 198-201.
- 9 Clifford, A. A (1994), Reaction in Supercritical Fluids, In *Supercritical Fluids Fundamentals for Application*, E. Kiran and J. M. H. Leveit Sengers, Eds, p449, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.