

## 지리산 오갈피나무로부터 Acanthoside-D의 추출 및 정제

이 광 진·강 지 훈·\*노 경 호  
인하대학교 화학공학과, 초정밀생물분리기술연구센터  
(접수 : 2000. 12. 13., 게재승인 : 2001. 2. 7.)

### Extraction and Purification of Acanthoside-D from *Acanthopanax chilsanensis*

Kwang Jin Lee, Ji Hoon Kang, and Kyung Ho Row\*  
Department of Chem. Eng., Inha University and Center of Advanced Bioseparation Technology,  
Inchon 402-751, Korea  
(Received : 2000. 12. 13., Accepted : 2001. 2. 7.)

Acanthoside-D, contained in *Acanthopanax chilsanensis* is known as a ginseng-like substance. This work was focused to set up analytical and preparative conditions for Acanthoside-D purification. The ethanol extract from the powder of the trunk of *Acanthopanax chilsanensis* was partitioned with hexane. A  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (3.9×300 mm, 10  $\mu$ m) column was used to separate Acanthoside-D from the trunk of *Acanthopanax chilsanensis*. From the experimental results, the mobile phase used for isolating Acanthoside-D from the extract was water/acetonitrile/methanol=80/14/6 % (v/v). The flow rate of mobile phase was 1.0 mL/min, and UV wavelength was fixed at 210 nm. Finally on a semi-preparative column (3.9×300 mm, 15  $\mu$ m, Lichrospher 100RP-18) with the same mobile phase composition, the allowable maximum injection volume increased to 250  $\mu$ l.

**Key Words** : *Acanthopanax chilsanensis*, Acanthoside-D, extraction, HPLC

#### 서 론

오갈피(*Acanthopanax Cortex*)는 오갈피나무과(*Araliaceae*)에 속하는 오갈피나무(*Acanthopanax sessiliflorum* Seeman) 및 그 동속 식물의 뿌리, 줄기 및 가지의 껍질을 말한다(1). 그 중 지리산에서 서식하는 나무를 지리산 오갈피나무(*Acanthopanax chilsanensis*)라 명명하였다.

시베리아 인삼이라 불리는 오갈피 동속 식물은 자양강장, 요통, 신경통, 중풍 등의 약효뿐만 아니라 신진대사 활성 작용이 있다고 알려져 있다. 오갈피나무의 유효성분으로는 sesamin, savinin을 비롯하여 lignan 배당체인 acanthoside A, B, C, D와 chiisanoside, polyacetylene,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol, 비타민, 미네랄 등이 풍부하여 좋은 약재로 주목 받고 있다. 지리산 오갈피나무의 잎과 줄기에서 추출된 오갈피 배당체(Chiisanoside, Acanthoside A, B, C, D)는 기초대사(수분대사, 지방대사, 당질대사)의 생체기능을 보전하고 광범

위하게 작용하는 성질이 있다. 오갈피 배당체 중 효능이 뛰어나 국내외에서 많은 연구가 진행되고 있는 Chiisanoside와 Acanthoside-D의 구조식을 Figure 1에 나타내었다. Chiisanoside의 효능은 혈당저하작용, 간비대역제, 항암효과, 탐식촉진작용 등이고(2,3), Acanthoside-D는 T세포 증가 작용, 콜레스테롤 수치 저하, 전립선 활성화, 정력 증대와 학습력 향상, 간기능 개선, 위궤양 억제, 생체활력지수와 면역기능 증진 및 백혈병(항암) 억제 작용 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(4-6). 특히, 목적물질인 오갈피 배당체 Acanthoside-D의 화학적 구조식은 C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>O<sub>18</sub>, mp는 242℃이고, (+)-syringaresinol di-O- $\beta$ -D-glucoside, Eleutheroside E 및 acankoreoside D로 지칭되고 있다(6-8). 이러한 효능 때문에 소련, 중국에서는 가시오갈피의 분포, 재배, 분류학적 감별, 화학성분, 약효물질, 생리작용, 약리작용, 제제, 임상, 복용량, 부작용 등 여러 측면을 연구한 결과 식품, 의약품, 화장품 등의 외용제로 사용했고, 각 나라에서 건강식품, 과립차 및 음료로 이용되고 있고, 오갈피의 성분 분석과 효능에 관한 연구는 계속해서 진행되어 오고 있다.

Brekman 등은 인삼과 가시오갈피의 추출물에서 유효성분과 약효를 비교하여 가시오갈피의 유효성분이 인삼보다 생체활력지수와 세포 활성이 크게 증대되는 것을 확인하였고(5), Hahn 등은 인삼과 가시오갈피의 유효성분인 ginsenosides와 eleutherosides를 비교, 분석하여 간기능개선에 대한 연구를

\*Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Inha University and Center of Advanced Bioseparation Technology,  
Inchon 402-751, Korea  
Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959  
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

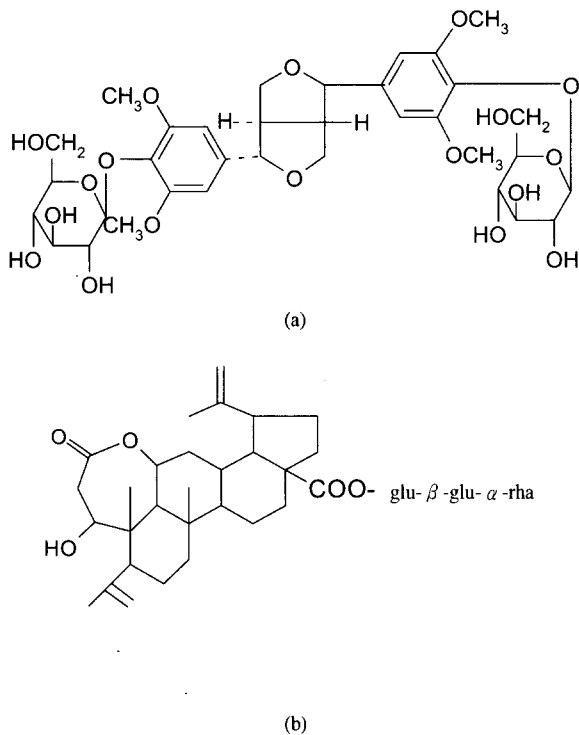


Figure 1. Chemical structures of Acanthoside-D (a) and Chiisanoside (b).

하였고(6), Wagner 등은 한국산과 외국산 오갈피의 약효를 비교하였다(9). 한편 가시오갈피의 원산지인 국내에서는 경희대학교의 Yook 등과 중앙대학교의 Hahn 등에 의해 유효성분의 분석 및 효능에 대한 연구가 활발히 진행되면서 많은 관심을 모으고 있다(2, 3, 6, 8, 9-11).

본 연구의 목적은 지리산 오갈피나무의 줄기에 함유되어 있는 오갈피 배당체의 추출조건과 분석조건을 확립하고, 반제조용 HPLC를 이용하여 유용 물질인 Acanthoside-D를 얻는 것이다. UV wavelength와 이동상의 유속을 변화시켰고, 제조용 규모의 정제 및 분리조건을 확립하기 위해서 acetonitrile, water, methanol 등의 이동상 조성을 변화시키면서 목적물질인 Acanthoside-D를 얻기 위한 최적 분리조건을 구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

우리나라에 자생하는 오갈피속 식물 중 지리산 오갈피나무(1999년 6월 채취)를 초림농장에서 기증받았고, 표준시료 물질인 Acanthoside-D와 Chiisanoside (구조식은 Figure 1 참조)는 중앙대학교 약학대학의 한덕룡 명예교수로부터 제공받았고, 이동상으로는 J. T. Baker사의 methanol, acetonitrile과 2차 증류한 증류수를 감압 펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(FH-0.5 μm)를 이용하여 감압 여과 한 후에 사용하였다.

추출된 시료는 농축을 하기 위해서 회전식 증발기(LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co.)를 사용하였고, 시료의 분석에 사용된 HPLC는 Alltech사의 426 HPLC 펌프, 486 검지기(M 7200 Absorbance Detector, 영인과학), Reodyne injection valve(2 mL sample loop)로 구성되어 있다. 데이터

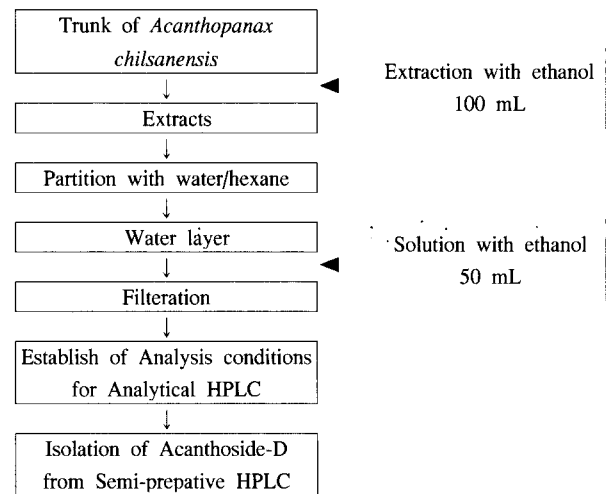


Figure 2. Extraction and purification procedure from *Acanthopanax chilsanensis*.

저장 시스템(data acquisition system)은 Autochrom(ver. 1.42, 영인과학)을 PC에 설치하여 사용하였다. 본 실험에서 분석용 HPLC는 μ-Bondapak 컬럼(3.9×300 mm, 10 μm, Waters Co.)을 사용하였고, 반제조용 HPLC는 크기가 15 μm인 Lichrospher 100RP-18 충전물(Merck Co.)을 컬럼(3.9×300 mm)에 충전하여 사용하였다.

### 실험방법

오갈피 줄기 분말 5 g을 취하여 ethanol 용액 100 mL를 가하여 환류 냉각기에 넣고 물의 온도를 50°C에서 3시간 동안 환류 추출 후 냉각시킨 다음 여과하여 감압 농축시킨 후 물 100 mL에 녹여 불순물을 제거하기 위해 hexane 100 mL로 분배하였다. 분배공정 후 water층을 취하여 감압 농축 후 ethanol 50 mL에 녹인 후 여과하였다. 이 추출액을 분석용 μ-Bondapak 컬럼의 이동상의 조성, 유속, UV 검지기의 wavelength를 변화시키면서 최적 분석조건을 결정하였고, 제조용 규모의 정제 및 분리조건을 확립하기 위해서 반제조용 HPLC를 이용하였고, 크기가 15 μm인 Lichrospher 100RP-18 충전물이 채워진 컬럼(3.9×300 mm)을 사용하였다. Acetonitrile, water, methanol의 이동상 조성을 변화시키면서 목적물질인 Acanthoside-D를 얻기 위한 최적조건을 구하였다. Figure 2에서는 오갈피의 줄기에서 Acanthoside-D를 추출 및 정제단계를 도식적으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

추출액 중에 포함된 Acanthoside-D를 분석하기 위해 μ-Bondapak 컬럼을 사용하였다. 분석조건을 결정하기 위해 UV wavelength는 200~270 nm, 이동상 유속은 0.5~1.5 mL/min으로 변화시켰다. 컬럼에서 나오는 유출물 중에 포함된 Acanthoside-D의 강도가 가장 높은 UV wavelength는 Figure 3에서 보는 바와 같이, 210 nm일 때 표준물질과 추출액의 피크면적이 가장 크게 나타나는 것을 알 수 있었다. Figure 4에서는 이동상의 유속을 변화에 따른 Acanthoside-D의 체류시간을 비교하였다. 유속이 0.5 mL/min일 때에는 분리도는 우수하였지만, 체류시

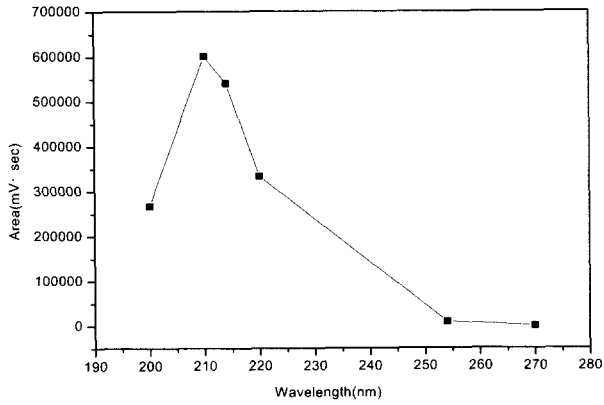


Figure 3. Effect of wavelengths on intensity of Acanthoside-D. (water/acetonitrile=85/15 % (v/v), 1.0 mL/min, 20 mL injection volume)

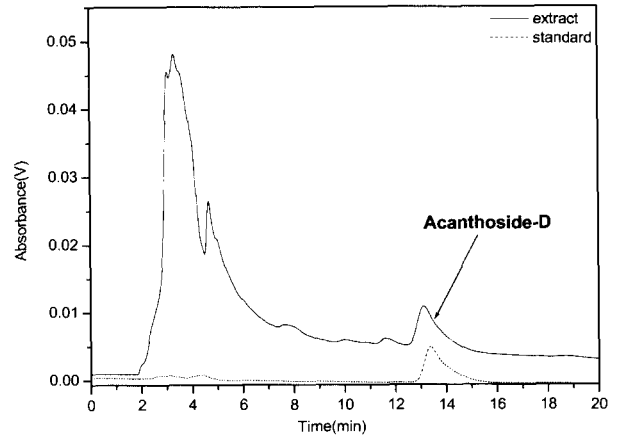


Figure 5. Analysis of Acanthoside-D from the trunk of *Acanthopanax chilsanensis* by  $\mu$ -Bondapak column. (water/acetonitrile=85/15 % (v/v), 1.0 mL/min, 20  $\mu$ L injection volume)

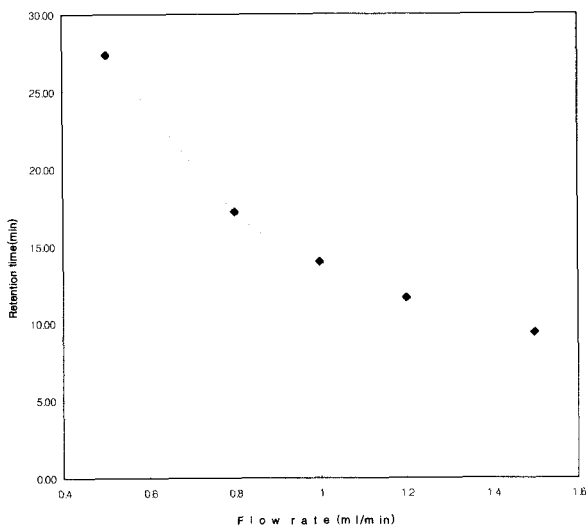


Figure 4. Shift of the retention times of Acanthoside-D with mobile flow rates. (water/acetonitrile=85/15 % (v/v), 20  $\mu$ L injection volume)

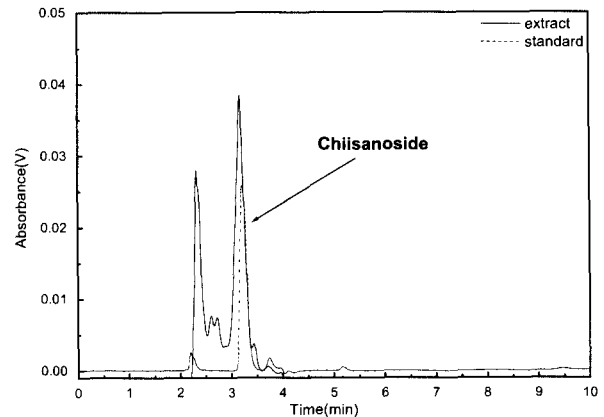


Figure 6. Analysis of Chiisanoside from leave of *Acanthopanax chilsanensis* by  $\mu$ -Bondapak column. (water/methanol=10/90 % (v/v), 1.0 mL/min, 20  $\mu$ L injection volume)

간이 너무 긴 단점이 있었고, 1.5 mL/min에서는 짧은 체류시간에 비해서 분리가 잘 안되었다. Acanthoside-D의 분리도와 분석시간을 동시에 고려할 때 바람직한 이동상 유속은 1.0 mL/min이었다.

지리산 오갈피로부터 추출되는 오갈피 배당체 중 목적물질인 Acanthoside-D를 얻기 위해 오갈피의 잎과 줄기에서 Lee 등의 방법(12)에 따라 추출하여 분배한 후  $\mu$ -Bondapak 컬럼을 이용하여 분석하였다. 실험결과에 의하면 Chiisanoside는 오갈피 잎에서, Acanthoside-D는 오갈피 줄기에서 주로 존재하였다. 오갈피의 줄기에서 추출한 Acanthoside-D의 분석결과가 Figure 5에 나타나있다. 유기용매로서 acetonitrile를 사용하였고 Acanthoside-D는 표준시료물질의 체류시간과 비교하여 확인하였다. 이에 비해서 오갈피의 잎에서 추출된 Chiisanoside를 분석하기 위해서 acetonitrile 대신에 methanol을 사용하였다. 체류시간을 줄이기 위해서 methanol의 함량을 90 vol.%까지 증가시켜서 5분 이내에 분석하였다(Figure 6). 지리산 오갈피에서 Acanthoside-D를 얻기 위해서 침출과 용매추출의 단계를 적용하였다. Ethanol을 사용하여 Acanthoside-D를 침출하였지만 천연물인 오갈피에는 많은 불순물들이 포함되어

있기 때문에 정제하기 위해 hexane/water를 첨가하는 분배의 단계를 사용하였다. 비극성의 성분은 주로 hexane층으로 이동하고 Acanthoside-D를 포함한 극성의 성분들은 water층 이동하게 된다. 따라서 water층을 감압 농축을 한 후에 잔류물을 ethanol에 녹여서 HPLC에 의하여 정제하였다.

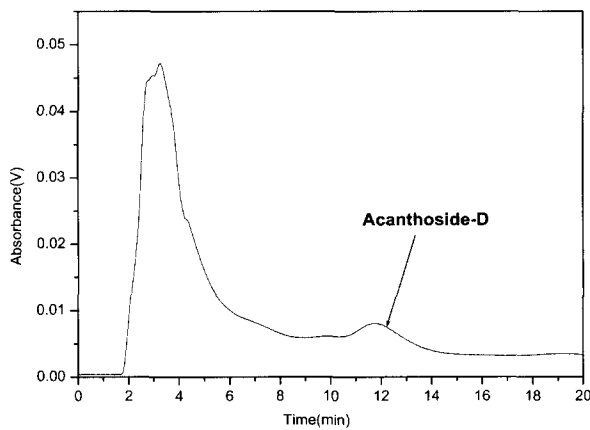
위의 분석용 조건을 제조용으로 적용시키기 위해 크기가 15  $\mu$ m인 Lichrospher 100RP-18(Merck Co.)을 충전시킨 컬럼 (3.9  $\times$  300 mm)의 반제조용 HPLC를 사용하였고 이동상의 조성과 최대 분리가능한 시료 주입량을 실험적으로 고찰하였다. 역상 액체 크로마토그래피에서는 이동상으로 극성지수(polarity index)가 높은 물질을 사용하게 되며, 본 연구에서는 사용된 water, acetonitrile, methanol 용매의 극성지수는 10.2, 5.8, 5.1이다(13).

이동상은 이성분 계인 water/acetonitrile, water/methanol, 삼성분계인 water/acetonitrile/ methanol에 대한 조성을 변화시킴에 따라서 Acanthoside-D 체류시간을 Table 1에 나타내었다. Lee 등의 방법(12)과 같이 분석조건과 동일한 water/acetonitrile=85/15 % (v/v)의 2성분계를 사용하였을 때에는 체류시간은 다소 늦지만 Acanthoside-D를 잘 분획할 수 있었고, 이동상이

**Table 1.** Effect of type and composition of mobile phase on resolution.

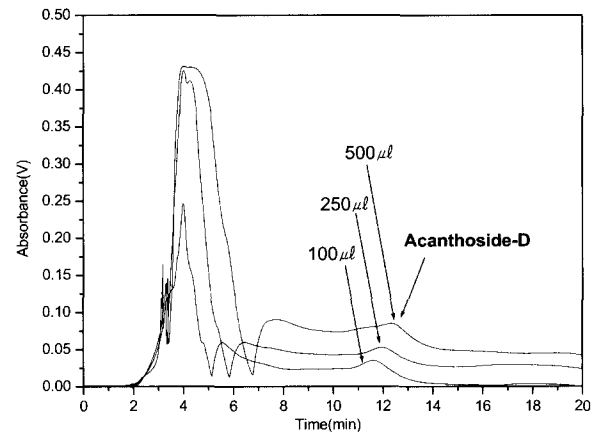
Mobile phase(%(v/v))	Retention time(min)
water/acetonitrile(95:5)	11.58
water/acetonitrile(90:10)	11.02
water/acetonitrile(85:15)	13.25
water/acetonitrile(84:16)	12.64
water/methanol(83:17)	11.76
water/acetonitrile(80:20)	12.10
water/methanol(95:5)	×
water/methanol(90:10)	×
water/methanol(85:15)	×
water/methanol(80:20)	×
water/acetonitrile/methanol(93:4:3)	10.04
water/acetonitrile/methanol(90:5:5)	9.13
water/acetonitrile/methanol(85:10:5)	12.77
water/acetonitrile/methanol(85:8:7)	8.15
water/acetonitrile/methanol(80:17:3)	7.66
water/acetonitrile/methanol(80:15:5)	9.92
water/acetonitrile/methanol(80:14:6)	11.72
water/acetonitrile/methanol(80:13:7)	12.21
water/acetonitrile/methanol(75:20:5)	10.12
water/acetonitrile/methanol(75:15:10)	12.85

× : not detected



**Figure 7.** Isolation of Acanthoside-D from the trunk of *Acanthopanax chilsanensis* by semi-preparative chromatographic column. (water/acetonitrile/methanol=80/14/6 %(v/v), 20  $\mu$ L injection volume)

water/methanol인 경우에는 분리가 이루어지지 않았다. Methanol을 첨가한 3성분계에서는 water/methanol, water/acetonitrile의 이성분계에 비해서 체류시간이 빠르고 충분히 정제할 수 있었다. Table 1에서의 실험결과에 의하여 반제조용 HPLC에서의 이동상의 조성은 water/acetonitrile/methanol=80/14/6 %(v/v)으로 정하였다. 이 이동상조성에서 지리산 오갈피의 줄기에 포함된 Acanthoside-D의 분리가 Figure 7에서 보여주고 있다. Acanthoside-D를 단순한 추출물의 건강식품이나 의약품, 화장품의 외용제가 아닌 고부가가치가 있는 의약품으로 생산하기 위해서는 보다 고순도의 물질을 제조하는 것과 대량생산하는 것이 매우 중요하다. 따라서, 제조용으로 scale-up하기 위해 반제조용 HPLC를 이용하여 시료 주입량을 증가시키면서



**Figure 8.** Increase in the injection volumes of extract by semi-preparative chromatographic column. (water/acetonitrile/methanol=80/14/6 %(v/v))

Acanthoside-D를 분획을 하게 된다. Figure 8에서는 오갈피로부터의 추출액의 주입량을 100, 250, 500  $\mu$ L로 증가시킨 결과를 보여주고 있으며 250  $\mu$ L까지는 Acanthoside-D를 비교적 잘 분획할 수 있었다. 본 연구에서는 오갈피의 줄기를 ethanol로 추출하고 hexane/water를 사용한 분배의 전처리단계로 구성되었다. 최종적으로 의학용으로 사용될 수 있는 고순도의 Acanthoside-D를 얻기 위한 기본적인 제조용 HPLC의 실험을 수행하였다.

본 연구에서는 지리산 오갈피의 줄기로부터 Acanthoside-D를 얻기 위한 전처리 단계,  $\mu$ -Bondapak 컬럼을 이용한 이동상의 조성, UV wavelength, 유속의 분석용 HPLC에서의 조건을 확립하였다. 또한, 15  $\mu$ m인 Lichrospher 100RP-18 충전물

이 채워진 컬럼을 이용한 반 제조용 HPLC에서 Acanthoside-D를 분획하기 위한 이동상의 조성과 시료 주입량을 실험적으로 정하였다. 이 실험결과에 근거하여 단순한 추출물의 건강 식품이 아닌 고부가 가치의 고순도 Acanthoside-D를 분획할 수 있는 조건을 제시하였다.

## 요 약

지리산 오갈피에 주로 포함된 Acanthoside-D은 인삼과 유사한 물질로 알려져 있다. Acanthoside-D에 대한 분석용뿐만 아니라 제조용에서의 실험조건을 구하는 것이 연구의 목적이 된다. 지리산 오갈피의 줄기의 파우더를 ethanol 용액으로 추출한 후 hexane으로 분배하였다. 정제된 추출액을  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (3.9×300 mm, 10  $\mu$ m) 컬럼을 이용하여 지리산 오갈피 줄기에 포함된 Acanthoside-D를 분리하기 위한 분석조건을 확립하였다. 본 연구의 결과에 의하면 목적물질인 Acanthoside-D를 분리하기 위해 이동상의 조성은 water/ acetonitrile/methanol=80/14/6 % (v/v)이었고, 유속은 1.0 mL/min, UV 검지기는 210 nm로 고정하였다. 위의 분석조건을 이용하여 반제조용 컬럼 (3.9×300 mm, 15  $\mu$ m, Lichrospher 100RP-18)에서 분리 가능한 최대 주입량은 250  $\mu$ L이었다.

## 감 사

본 연구는 인하대학교의 생명공학 특성화사업 연구비 지원에 의하여 고순도분리연구실에서 수행되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

## REFERENCES

1. The Korea Pharmacopoeid, 6th Ed., (1992), p1027.
2. Kim, C. J. and D. R. Hahn (1980), The Biological Activity of a New Glycoside, Chiisanoside from *Acanthopanax chiisanensis* Nakai Leaves, *Yakhak Hoeji*, **24**(2), 123-134.
3. Yook, C. S., Y. S. Rho, S. H. Seo, J. Y. Leem, and D. R. Han (1996), Chemical Components of *Acanthopanax divaricatus* and Anticancer Effect in Leaves, *Yakhak Hoeji*, **40**(3), 251-261.
4. Nishiyama, N., T. Kahiko, A. Iwai, H. Saito, S. Sanada, Y. Ida, and J. Shoji (1985), Effect of Eleutherococcus senticosus and Its Components on Sex-and Learning-Behaviours and Tyrosine Hydroxylase Activities of Adrenal Gland and Hypothalamic Regions in Chronic Stressed Mice, *Sho. Zas.*, **39**(3).
5. Brekhman, I. I. and I. V. Dardymov (1969), New Substances of Plant Origin which Increase nonspecific resistance, *Lioydia.*, **32**(1).
6. Hahn, D. R., C. J. Kim, and J. H. Kim (1985), A Study on Chemical Constituents of *Acanthopanax koreanum* Nakai and Its Pharmacological Activities, *Yakhak Hoeji*, **29**(6), 357-361.
7. Zhao, W. M., G. W. Qin, R. S. Xu, X. Y. Li, J. S. Liu, Y. Wang, and M. Feng (1999), Constituents from the roots of *Acanthopanax setchuenensis*, *Fitoterapia*, **70**, 529-531.
8. Chang, S. Y., C. S. Yook, and T. Nohara (1999), Lupane-Triterpene Glycosides from Leaves of *Acanthopanax koreanum*, *Phytochemistry*, **50**, 1369-1374.
9. Wagner, H., Y. H. Heur, A. Obermeier, G. Tittel, and S. Bladt (1982), Die DC- and HPLC-Analyse der Eleutherococcus Droge, *Planta medica*, **44**, 193-198.
10. Hahn, D. R., R. Kasai, J. H. Kim, S. Taniyasu, and O. Tanaka (1984), a New Glycosyl ester of A 3, 4-Seco-Triterpene from Korean medical plant *Acanthopanax Chiisanensis* (Araliaceae), *Chem. Pharm. Bull.*, **32**(3), 1244-1247.
11. Yook, C. S., I. H. Kim, D. R. Hahn, T. Nohara, and S. Y. Chang (1998), A Lupane-Triterpene Glycoside from Leaves of Two *Acanthopanax*, *Phytochemistry*, **49**(3), 839-843.
12. Lee, K. J., M. H. Kim, and K. H. Row (2000), Extraction and purification of Chiisanoside and Acanthoside-D in *Acanthopanax Chilsanensis* : Determination of analytical condition(I), *Theories and Applications of Chem. Eng.*, **6**(2), 3281-3284.
13. Burick and Jackson Laboratories, Inc. (1984), High Purity Solvent Guide, p.133.