

High Purity Extraction and Simultaneous High-performance Liquid Chromatography Analysis of Curcuminoids in Turmeric

Kwang Jin Lee · Jin Yeul Ma · Young-Sik Kim · Dong-Seon Kim · Yinzhe Jin

강황에서 curcuminoids의 고순도 추출 및 고성능 액체 크로마토그래피 동시분석

이광진 · 마진열 · 김영식 · 김동선 · 김은철

Received: 1 November 2011 / Accepted: 28 December 2011 / Published Online: 31 March 2012
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2012

Abstract Three major curcuminoids in turmeric (*Curcuma longa*), curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin, were efficiently extracted by optimizing extraction condition and simultaneously analyzed and identified using reverse phase high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography, and liquid chromatography-mass spectrometry method. The highest yield of extraction amount 0.279 g, 9.30% was obtained by dipping method with extraction time of 7 h.

Keywords curcuminoids · reverse phase high-performance liquid chromatography · simultaneous analysis · thin-layer chromatography · turmeric

국내 · 외 연구자들은 과학적인 방법으로 효율적인 삶의 질을 찾기 위해 육상 및 해양 천연물로부터 유용성분들을 얻기 위한 연구를 오래전부터 시도하고 있다. 특히 천연보존료 개발의 목

적으로 허브류와 한약재 연구가 활발히 이루어지고 있으며(Naik 등, 2011), 이 중에서 식품 및 한약재 소재로 잘 알려진 강황은 오래전부터 아시아와 동남아에서 재배되어온 향신료의 성분이다(Choi, 2009; Oh 등, 2011). 효능 및 효과를 살펴보면 천연 색소들은 오랫동안 항산화, 항염증, 해독작용 등의 다양한 생리 활성이 있는 것으로 알려져 있어 그 기능적 가치가 더욱 높아지고 있다(Singh 등, 2010; Zhao 등, 2011). 또한, 황색 색소로서 curcumin이 0.3% 들어있고 특유한 향이 있는 정유료써 turmerone과 dehydroturmerone이 1~5% 들어 있다(Choi, 2009).

특히 curcuminoids의 curcumin (MW=368), demethoxycurcumin (DMC MW=338), bisdemethoxycurcumin (BDMC MW=308)은 주된 생리활성물질로 보고되었다(Li 등, 2011). 이러한 생리활성물질을 얻기 위한 방법으로 전형적인 용매추출법이 주로 사용되고 있으며(Wakte 등, 2011), 분리기술의 중요성은 더 주목받고 있다. 따라서 제한된 기술과 맞춤형 고순도, 중순도, 저순도의 기술적 조절이 가능해야 할 것이다(Jin 등, 2006). 이에 생물분리기술은 혼합물을 신속하고 고순도로 정제하는 기술뿐만 아니라 생산을 위한 제조용 공정에도 많이 사용되고 탁월한 분리능을 갖고 있다(Row, 1995). 2000년대 국내 바이오산업의 네트워크 특성은 한방 및 바이오 산업체 원료 및 제품 품질검사, 제품개발(제제개발, 시범생산) 활성화, 천연물소재 정보제공 및 효능탐색, 기업과의 공동 연구개발을 통한 천연물 연구분야가 활발히 이루어지고 있다. 따라서 기능성 식품, 의약품 및 기능성소재 개발을 위한 관능적으로 우수한 표준화된 추출법 개발과 생리적 특성 비교를 통해 대량생산을 위한 벨리태이션의 원천기술확보가 필요하다(Jung 등, 2004).

본 연구에서는 이러한 고부가가치를 얻기 위한 정량 및 정성 분석방법으로 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC 및 Thin-Layer Chromatography (TLC)를 쉽게 접근하여 빠르게 분석 및 정제하고(Zhang 등, 2008), curcumin, DMC 및 BDMC를 추출하여 추출량의 최적조건을 제시하였으며, 효

Y. Jin (✉)
College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean Univ.,
Huchenghuan-lu, 999, Shanghai 201-306, China
E-mail: yzjin@shou.edu.cn

K. J. Lee · J. Y. Ma
KIOM, TKM-Based Herbal Drug Research Group, 1672 Yuseongdae-ro,
Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Republic of Korea

Y.-S. Kim
Department of Chemical Engineering, Kangwon National University, 346
Joongang-ro, Samcheok, Gangwon-do 245-711, Republic of Korea

D.-S. Kim
Basic Herbal Medicine Research Group, KIOM, 1672 Yuseongdae-ro,
Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Republic of Korea

올적인 활성소재 확보를 위한 선택적 추출의 가능성을 검토하였고, 주요 성분인 curcumin의 고순도 분리를 통해 상용공정의 기초데이터를 실험적으로 구하여 비교하였다.

연구에 사용된 강황 시료는 중국에서 재배되었으며, 2011년 3월 (주)서릉상사/영천 현대약업사에서 수입 및 구매하여 한국 한의학연구원 융복합연구센터에서 2011년 5월 처리된 시료를 사용하였다[Color and appearance specification/results: dark yellow powder, formonnetin content: no less than 0.2%/0.25%, loss on drying: not more than 8%/5%, total heavy metals (As, Pd, Cd, Hg): 10 ppm/1 ppm, total coliforms: not detected]. 표준시료인 curcumin은 Sigma co. (Shanghai, China, 순도: 80%)에서 구매하였다. 시료의 균일성을 위하여 수분조절 용기(desiccator)에 보관하여 사용하였고 모든 시료는 주입하기 전에 막 여과지(PVDF 0.2 μ m, Waters Co., Milford, MA)를 이용하여 여과하였다. 용매는 HPLC 급(99.9%)으로, 메탄올, 아세트나이트릴, 아세트산은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ)에서 구매하였으며, 물은 2차 증류수(Division of Millipore, Waters)를 사용하였다.

Curcumin의 표준시료 4 mg을 메탄올에 용해하여 200 ppm의 표준원액을 제조하였다. 추출은 상온에서 수행하였으며 건조 분쇄된 시료는 입자를 체 거름(30 μ m)으로 분별하여 시료로 사용하였고 수분 함유량은 11.2%였다. 이후 강황분말 3 g을 200 mL 비커에 담고 추출용매로는 100% 물, 100% 메탄올, 80, 60, 40, 20% 수용성 메탄올, 100 mL을 각각 첨가하여 침적방법을 이용하여 추출(4시간)하였다. 또한 추출수율 및 함량의 변화를 알아보기 위하여 100% 메탄올, 100 mL을 각각 첨가하여 침적 추출(1~7시간) 동안 시행하여 확인하였다. Table 1에서는 추출 용매 조성에 따른 3가지(#1, #2, #3) 성분의 추출효과와 이동상 조성에 따른 동시분석 조건을 비교하여 나타내었다. 침적방법은 상온(23°C, \pm 1)에서 추출하였고, 추출물에는 많은 양의 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용매 추출 후 여지 필터(pore size: 5 μ m)에서 감압 여과하여 시료 잔류물과 분리했고, 감압 농축 후(10 mL) 동결건조(refrigerated vapor trap)를 48시간 동안 진

행하였으며 전체 추출 수율은 실험의 평균값으로 계산하였다. 각각의 시료는 2차 반복 추출 후 시험용액으로 사용하였다.

시약과 추출된 시료를 농축하기 위해서 회전식 증발기(LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co., Wangen, Switzerland)를 사용하였다. HPLC시스템으로는 Dionex Co.의 3000 pump와 10 μ L sample loop (ID \times L 0.18 \times 550 mm Viper 550 mm; Dionex, Sunnyvale, CA)가 연결되었고 데이터 처리는 PC에 설치된 Chromeleon data acquisition system (Dionex version 7.0.1.272)과 HPLC-DAD를 사용하였다. 표준시료는 LC-MS (Varian: 500-MS IT Mass Spectrometer)를 사용하여 정성분석을 하였다. 분석에 사용된 컬럼은 5 μ m 물질이 충전된 분석용 역상 컬럼 RS-tech-column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m, C₁₈, Daejeon, Korea)이며 유속은 1.0 mL/min, 주입부피는 10 μ L, 컬럼 온도는 40°C로 고정하였다. UV 검출기는 DAD의 파장범위를 200~500 nm로 하였고 크로마토그래피는 425 nm로 나타내었다. 이동상은 이성분계로 A: 물/아세트산(99.9/0.1 vol.%), B: 아세트나이트릴/아세트산(99.9/0.1 vol.%)을 사용하여(A:B, 50:50 vol.%) 30분 동안 일정용매 용출법으로 실험하였다. 또한 TLC 분석은 silica XHL TLC plates glass (5 \times 10 cm, 250 μ m, Sorbent Tec., Norcross, GA)를 사용하여 확인하였다.

본 연구는 분리기술 중에서 동시분석 및 추출수율 확인이 탁월한 크로마토그래피를 사용하였으며 최적 HPLC 분석방법을 적용하기 위해(Row, 1995) 이동상조성을 변화하여 비교 평가하였다. Fig. 1에서는 5 μ m 물질이 충전된 분석용 C₁₈ 역상 컬럼을 사용하여 일정용매조성법으로 분석한 결과를 보여주고 있다. 아세트나이트릴의 함량에 따라 이동상의 밀도와 점도가 감소 또는 증가하게 되고 용질의 확산(diffusion) 및 분산(dispersion)이 쉬워진다. 아세트나이트릴의 함량(60 vol.%)을 증가하게 되면, 물질 사이의 각 체류시간은 curcumin 5.46분, DMC 5.01분, BDMC 4.60분 이내로 단축되었고, 분리도가 1.5 이하로 낮아진다. 이것은 시료가 컬럼에 잠깐 머물러 있어서 짧은 분리시간과 빠른 시료의 용출로 말미암아 컬럼 효율에 큰 영향을 미치고 피크의 폭은 감소하여 분리도(R)은 좋을 수 있으나 각 성분

Table 1 Quantitative analysis of curcuminoids from turmeric

Extraction method	Extraction solvent	Time (h)	Peak area #1 (% , mAU \times min)	Peak area #2 (% , mAU \times min)	Peak area #3 (% , mAU \times min)	Three peak area (% , mAU \times min)	Total Amount (g)	Yield (%)
Dipping	100% Water	4	56.38(0.19)	15.01(0.05)	9.66(0.03)	81.05(0.27)	0.680	22.7
	100% Methanol		60.61(352.43)	20.29(117.99)	16.21(94.26)	97.11(564.68)	0.240	8.1
	80% Methanol		49.11(169.59)	22.52(77.76)	20.971(72.40)	92.60(319.75)	0.503	16.8
	60% Methanol		40.58(43.19)	18.01(19.16)	16.31(17.36)	74.90(79.71)	0.556	18.5
	40% Methanol		23.26(0.93)	7.54(0.30)	5.53(0.22)	36.33(1.45)	0.445	14.8
	20% Methanol		32.40(0.34)	9.81(0.10)	7.91(0.08)	50.12(0.52)	0.411	13.7
Extraction time	100% Methanol	1	53.92(1254.8)	9.73(530.82)	8.60(486.11)	72.25(2271.82)	0.187	6.233
		2	52.58(1272.4)	23.61(547.14)	21.95(507.43)	98.14(2326.57)	0.196	6.533
		3	53.72(1286.4)	23.10(569.81)	21.42(518.11)	98.24(2374.31)	0.206	7.866
		4	53.29(1314.7)	23.60(590.18)	21.46(548.83)	98.35(2453.68)	0.237	8.420
		5	52.38(1334.1)	23.73(604.28)	22.18(564.82)	98.29(2503.11)	0.259	8.633
		6	52.11(1348.9)	23.30(617.36)	21.95(579.14)	97.36(2545.35)	0.271	9.033
		7	52.81(1339.8)	23.71(622.98)	22.24(586.82)	97.76(2548.81)	0.272	9.066
Mobile phase		Temperature (°C)	<i>t_R</i> (min) # 1	<i>t_R</i> (min) # 2	<i>t_R</i> (min) # 3	Peak area #1 (% , mAU \times min)	Peak area #2 (% , mAU \times min)	Peak area #3 (% , mAU \times min)
Water (A)	ACN (B)							
60	40	23	23.97	20.77	17.94	66.85(229.76)	15.10(51.89)	3.32(11.42)
50	50		10.39	9.23	8.19	78.9(242.36)	16.79(51.59)	2.98(9.15)
40	60		5.46	5.01	4.60	77.07(242.85)	16.27(51.28)	3.26(10.27)

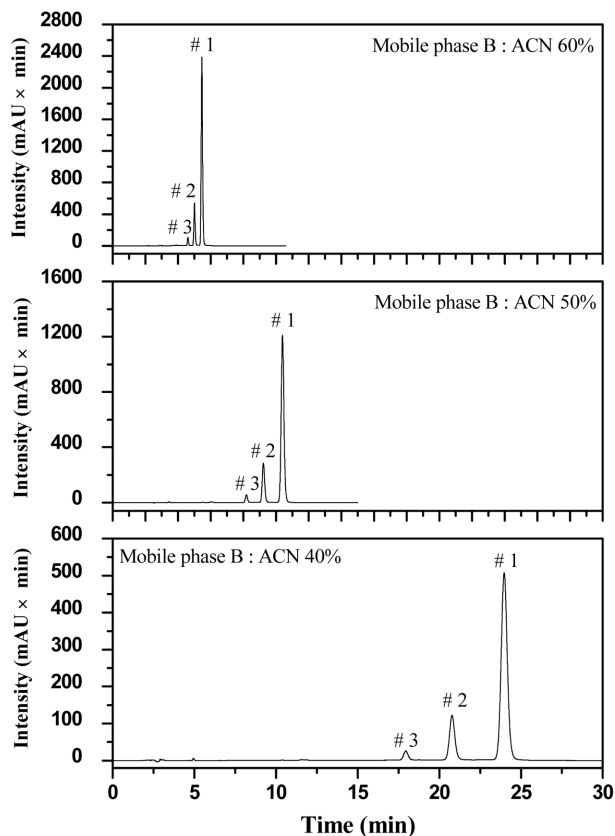


Fig. 1 Separation efficiency of curcuminoids with different mobile phase compositions using RP-HPLC. Isocratic elution B: 40, 50, and 60%, run time: 30 min, flow rate: 1.0 mL/min

사이의 분리는 좋지 않게 될 수 있다(Jin 등, 2006). 반대로 아세트나이트릴의 함량(40 vol.%)이 감소할 경우 컬럼 내에 시료의 체류시간이 증가하게 되어 분석시간이 길어지지만 각 성분의 좋은 분리 및 분리도(R)를 가질 수 있다. 이 경우 각 물질의 체류시간은 각각 curcumin 23.97분, DMC 20.77분, BDMC 17.94분이다. 따라서 분리도(R)를 1.5 이상으로 유지하기 위해서 최적의 분리시간과 분리도 예측은 이동상조성, 유속, 주입량 그리고 물질에 따라 다르게 정의되고 유속변화와 조성을 변화시키는 구배용매조성법(*gradient mode*)을 적용하는 방법도 고려해야 할 것이다(Chang 등, 1997). 또한 물질의 부피를 고려한 아세트나이트릴(50 vol.%) 일 때 각 물질의 체류시간은 각각 curcumin 10.39분, DMC 9.23분, BDMC 8.19분으로 최적화로 판단되어 진다. 이러한 분석조건을 기초로 정성분석을 위해 100% 메탄올(선행결과에 따라 제시된 100% 메탄올)을 사용하여 서로 다른 추출시간(1~7시간)에 따른 추출변화를 확인하였다. 추출시간이 1시간일때 피크면적(mAU × min, %)은 curcumin 53.92%, DMC 9.73%, BDMC 8.60%이고 4시간일때 curcumin 53.29%, DMC 23.60%, BDMC 21.46%이었고, 7시간일때, curcumin 52.81%, DMC 23.71%, BDMC 22.24%으로, 3가지 성분의 전체 피크면적(mAU × min, %)은 각각 72.25, 98.35, 97.79%이었다. 또한 수율변화와 전체 추출함량은 4시간일때 0.237%과 8.420 g으로 4시간 이후에는 추출변화의 폭이 크지 않았다(Mandal 등, 2008). 또한 크로마토그래피의 분리정제에 있어서 최적의 분리시간과 분리도 예측을 유속에 따른 분리도를

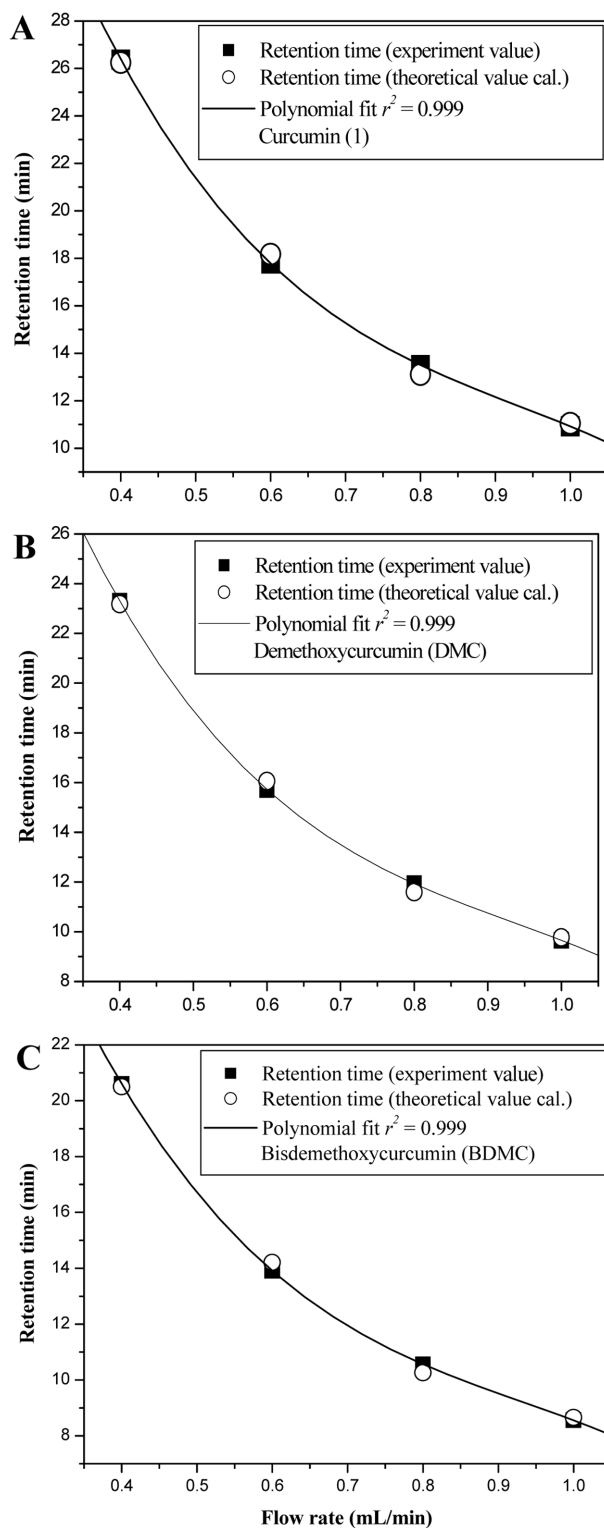


Fig. 2 Shift of the retention time of curcuminoids with mobile phase flow rates using RP-HPLC.

실험상관식으로 예측하였다. 표준물질 200 ppm을 이용한 주입 부피 10 μL에서, 유속 1.0, 0.8, 0.6, 0.4 mL/min를 변화시켜 실험값과 이론값을 비교하여 나타내었다(Fig. 2A, B, C). 이때 피

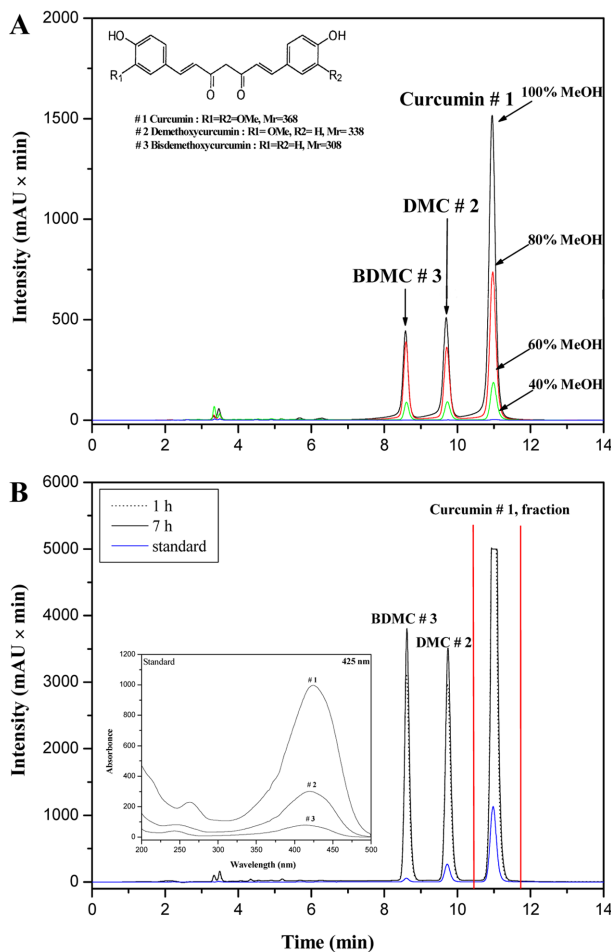


Fig. 3 Comparison of chromatogram by extraction solvent composition. A: 100% MeOH, 80, 60, and 40% aqueous MeOH, B: 100% MeOH extract 1 and 7 h

크면적과 체류시간은 일정하게 증가하였고 실험에서의 매개변수는 선행방정식 Eq.1, 2에 의하여 계산할 수 있었다.

$$y = ax + b \quad (1)$$

$$y = a_2x^2 + a_1x + b \quad (2)$$

여기에서 a , b 는 독립변수이다. 그 결과 curcumin (1), DMC (2) 및 BDMC (3)의 실험값은 각각 0.999로 이론값과 매우 잘 일치 하였다. Fig. 3A에서는 추출용매에 따른 100% 메탄올, 80, 60, 40% 수용성 메탄올과 구조식을 보여주었고 Fig. 3B에서는 100% 메탄올(1~7시간)의 크로마토그램과 UV 흡광도를 보여주고 있다. 크로마토그램에서 보이는 것처럼 100% 메탄올은 안정된 감도를 보여주고 있으며(Gilda 등, 2010), 각각의 체류시간은 curcumin (1): 10.39분, DMC (2): 9.23분, BDMC (3): 8.19분이며 표준물질의 체류시간과 비교되었고 최적의 분리 효율을 볼 수 있었다(여기서 추출 효율이 낮은 100% 물, 20% 수용성 메탄올은 나타내지 않았다). 또한 UV 검출기(DAD) 파장의 범위는 200~500 nm로 하였고 크로마토그래피는 425 nm로 나타내었다. 이때 curcumin (1), DMC (2), BDMC (3)은 각각 425, 420 및 418 nm로 확인되었고 선행연구에서 보고된 결과와 일치하였다(Lee와 Choung, 2011). Fig. 4에서는 Fig. 3B에서

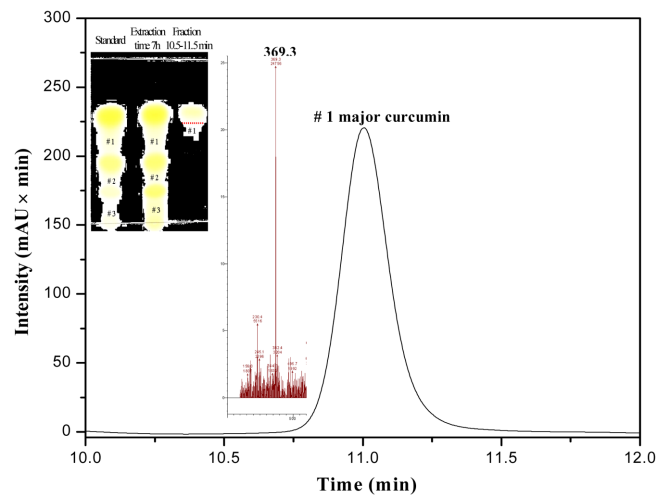


Fig. 4 Identification and high purity extraction with curcumin extract by RP-HPLC, LC-MS and TLC. Shown the Fig. 3 fraction # 1 and TLC (Dichloromethane:Methanol (97:3 vol.%))

분획한 추출물(7시간)을 분석한 크로마토그램이다. Curcuminoids 중에서 메이저 물질인 curcumin (# 1)을 선택적으로 추출하였고 curcumin(순도+98%)의 고순도 물질을 TLC에 의해 쉽게 접근하여 빠르게 분석할 수 있었다(Zhang 등, 2008). 또한 연속 분석 방법으로 LC-MS 분석은 curcumin # 1에 대하여 분자량은 $(M+H)^+$, m/z 369.3을 명확히 보여주고 있다(Jain 등, 2007; Li 등, 2011). 결론적으로 강황으로부터 생물활성 물질인 curcuminoids의 curcumin (1), DMC (2), BDMC (3)의 효율적인 활성소재 확보를 위해 전처리한 추출액에 포함된 유용성분을 일정용매 용출법으로 분석하고 추출 및 분석 조건을 실험적으로 모색하여 최적조건을 제시하였다. 또한 RP-HPLC-UV, TLC, LC-MS를 연속적으로 확인하여 정성분석을 할 수 있었다. 이것은 강황의 추출, 가공 및 고순도 분리 연구 시 기초자료로 충분한 가치가 있다고 판단된다.

참고문헌

- Chang KK, Row KH, and Chung ST (1997) Separation of Taxol from Taxanes by NP-HPLC. *J Korean Ind & Eng Chem* **8**, 286–291.
- Choi HY (2009) Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from *Ulgeum* (*Curcuma longa* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* **38**, 1202–1209.
- Gilda S, Kanitkar M, Bhonde R, and Paradkar A (2010) Activity of water-soluble turmeric extract using hydrophilic excipients. *Food Sci Technol* **43**, 59–66.
- Jain V, Prasad V, Pal R, and Singh S (2007) Standardization and stability studies of neuroprotective lipid soluble fraction obtained from *Curcuma longa*. *J Pharm Biomed Analysis* **44**, 1079–1086.
- Jin CH, Lee JW, and Row KH (2006) Optimum Condition of Mobile Phase Composition for Purine Compounds by HCl Program. *J Korean Ind & Eng Chem* **17**, 317–320.
- Jung SH, Chang KS, and Ko KH (2004) Physiological Effects of Curcumin Extracted by Supercritical Fluid from Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Korean J Food Sci Technol* **36**, 317–320.
- Lee JH and Choung MG (2011) Determination of curcuminoid colouring principles in commercial foods by HPLC. *Food Chemistry* **124**, 1217–1222.

- Li R, Xiang C, Ye M, Li HF, Zhang X, and Guo DA (2011) Qualitative and quantitative analysis of curcuminoids in herbal medicines derived from *Curcuma* species. *Food Chemistry* **126**, 1890–1895.
- Mandal V, Mohan Y, and Hemalatha S (2008) Microwave assisted extraction of curcumin by sample–solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. *J Pharma Biomed Analysis* **46**, 322–327.
- Naik SR, Thakare VN, and Patil SR (2011) Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: Evidence of its antioxidant property. *Exp Toxicol Pathol* **63**, 419–431.
- Oh SW, Cha JY, Jung JE, Chang BC, Kwon HJ, Lee BR, and Kim DY (2011) Curcumin attenuates allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice through NF- κ B inhibition. *J Ethnopharm* **136**, 414–421.
- Row KH (1995) Separation of two components in the case of large difference in concentration by chromatography. *J Korean Ind & Eng Chem* **6**, 193–199.
- Singh G, Kapoor IPS, Singh P, Heluani CS, Lampasona MP, and Catalan CAN (2010) Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food Chem Toxicol* **48**, 1026–1031.
- Wakte PS, Sachin BS, Patil AA, Mohato DM, Band TH, and Shinde DB (2011) Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Sep Purif Technol* **79**, 50–55.
- Zhang JS, Guan J, Yang FQ, Liu HG, Cheng XJ, and Li SP (2008) Qualitative and quantitative analysis of four species of *Curcuma* rhizomes using twice development thin layer chromatography. *J Pharm & Bio Anal* **48**, 1024–1028.
- Zhao XC, Zhang L, Yu HX, Sun Z, Lin XF, Tan C, and Lu RR (2011) Curcumin protects mouse neuroblastoma Neuro-2A cells against hydrogen-peroxide-induced oxidative stress. *Food Chemistry* **129**, 387–394.