

## Optimization of a Process for Extraction of Petasin from *Petasites japonicus* Leaves by Response Surface Methodology

Dong Wan Lee<sup>1</sup>, Se Yeul Lee<sup>1</sup>, Hun Sik Chung<sup>1</sup>, Young Whan Choi<sup>2</sup>, Dong Soon Im<sup>3</sup> and Young Guen Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

<sup>2</sup>Department of Horticultural Bioscience, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutics, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received August 5, 2013 / Revised October 24, 2013 / Accepted November 5, 2013

Petasin extracted from *Petasites japonicus* leaves has been well known to be effective in the treatment of allergic asthma. This study was carried out to optimize the extraction process of petasin from *P. japonicus* leaves by response surface methodology (RSM). The dried powder of *P. japonicus* leaves was extracted at ethanol concentrations ranging from 40% to 80%, extraction rpm ranging from 125 rpm to 225 rpm, and extraction time ranging from 1 to 3 hours. The effects of the extraction conditions on the dry yield and petasin content of the extracts were investigated using a second-order Box-Behnken design. The petasin content was significantly affected by ethanol concentration, extraction rpm, and extraction time, tending to increase more with increasing ethanol concentration. The optimum condition for petasin extraction from *Petasites japonicus* leaves was 79.92% in ethanol concentration, 178.10 rpm in extraction rpm, and 2.06 hours in extraction time, respectively.

**Key words** : Box-Behnken design, extraction process, petasin, *Petasites japonicus*, response surface methodology

### 서 론

머위(*Petasites japonicus*)는 중국, 일본 및 우리나라의 제주도, 울릉도, 남부지방과 중부지방의 산야지 특히 햇볕이 잘 드는 산비탈의 숲이나 계곡 주변의 습지에서 자생하는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본식물이며[1, 17], 민간요법이나 한방에서는 새순을 건조한 후 달여서 마시거나 태워 연기를 쏘이는 방법으로 기침, 기관지 천식, 태독의 치료 등에 이용하였으며, 일부 지역에서는 엽병을 옷나무에 의한 알레르기 치료의 민간약으로 사용하였다. 알레르기성 질환으로는 기관지 천식, 고초염, 담마진, 비염, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염 및 위장염 등이 있는데, 현대사회의 각종 환경오염 등으로 인해 알레르기성 질환은 해마다 증가하고 있으며, 국내·외에서 심각한 문제로 대두되고 있고 우리나라에서도 인구의 약 12~20% 정도가 알레르기성 질환을 가지고 있는 실정이다[4, 12]. 머위 잎은 petasinophenol [6], flavonoid glycosides [15], phenylpropanoyl sulfonic acid [13] 및 fukinolic acid [5]와 같은 다양한 항산화 물질을 함유하고 있으며, *in*

*vitro* 연구에서 RBL-2H3 세포로부터  $\beta$ -hexosaminidase의 방출 억제효과를 측정하여 머위 추출물의 항알레르기 효과를 확인하였다[4]. 또한 머위 잎에는 petasin, S-petasin, isopetasin 및 neopetasin 등의 sesquiterpene ester류가 함유되어 있고, 이들 성분들이 염증반응을 억제함으로써 항천식 및 항알레르기 효능을 가지며, 이들 중 petasin, 그 다음으로 S-petasin의 함량이 많은 것으로 알려져 있다[18, 19]. 머위의 항천식 기능을 이용한 기능성제품개발을 위해서는 우선 머위에서 petasin의 효율적인 추출방법에 관한 연구가 필요하며, 추출공정의 최적화를 도출하는 통계적 실험법으로서 반응표면분석(response surface methodology, RSM)과 같은 최적화기법을 적용할 필요가 있다. 반응표면 분석을 활용한 추출공정에 관한 연구로는, 노루궁뎅이 버섯 에탄올 추출조건의 최적화[3], 진피 에탄올 추출물의 추출조건 최적화[7], 야관문 기능성분의 에탄올 추출조건의 최적화[8], 팽이버섯의 마이크로웨이브 추출조건의 최적화[9], 마늘 열수추출조건의 최적화[11], 메밀새싹 기능성분의 추출조건 최적화[16] 및 동충하초 열수추출공정의 최적화[21] 등이 보고된 바 있다. 이를 볼 때 반응표면분석은 머위 잎으로부터 petasin의 추출공정의 최적화에도 유효할 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 머위 잎에 함유된 항천식 기능성물질들의 효율적 추출공정을 확립하기 위하여 S-petasin을 지표물질로 삼아, 반응표면분석법을 이용한 머위 잎의 에탄올 추출공정에서 에탄올 농도, 추출 rpm 및 추출시간이 조추출물 수율과 S-petasin 함량에 미치는 영향을 구명하고 최적 추출조건을 설정하고자 하였다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5354, Fax : +82-55-350-5359

E-mail : lyg5354@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 재료 및 방법

### 재료

실험용 머위는 2012년 경남 산청지역에서 자생하는 머위를 채취하여 잎 부위만을 분리한 다음 7일간 자연 건조하고 분쇄, 체질(40 mesh)한 후 분말을 얻어 냉장보관 하면서 시료로 사용하였다. 추출용매인 에탄올은 Duksan사(Seoul, Korea) 제품을, HPLC 이동상인 acetonitrile과 methanol은 Fisher사(Pittsburgh, USA) 제품을, 시료의 재부유에 사용한 용매인 tetrahydrofuran은 Merck사(Darmstadt, Germany) 제품을, 그리고 표준물질인 S-petasin은 Sigma-Aldrich사(St Louis, USA) 제품을 각각 구입하여 사용하였다.

### 추출공정의 최적화 실험계획

머위에서 petasin의 에탄올 추출공정의 모델링과 최적화를 위해 3-level-3-factor 실험계획인 Box-Behnken design과 반응표면분석법을 이용하였다. 추출공정에 중요한 독립변수( $X_n$ )로 고려되는 인자 즉, 에탄올 농도(ethanol concentration (%):  $X_1$ ), 추출 rpm (extraction rpm:  $X_2$ )과 추출시간(extraction time (hr):  $X_3$ )을 요인변수로 하여 3단계(-1, 0, 1)로 부호화하였으며, Box-Behnken design에 따라 Table 1과 같이 15구로 설정하여 추출실험을 실시하였다. 또한 상기의 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 조추출물 수율(Dry yield:  $Y_1$ )과 petasin 함량( $Y_2$ )으로 하여 3회 반복으로 측정하여 각각의 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석에 의한 최적 조건의 예측은 SAS statistical package (9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)을

Table 1. The Box-Behnken experimental design used for the ethanol extraction process of petasin from *Petasites japonicas* leave

Experiment number	Ethanol concentration (%), $X_1$		Extraction rpm ( $X_2$ )		Extraction time (hr), $X_3$	
	Coded	Actual	Coded	Actual	Coded	Actual
1	-1	40	-1	125	0	2
2	-1	40	1	225	0	2
3	1	80	-1	125	0	2
4	1	80	1	225	0	2
5	0	60	-1	125	-1	1
6	0	60	-1	125	1	3
7	0	60	1	225	-1	1
8	0	60	1	225	1	3
9	-1	40	0	175	-1	1
10	1	80	0	175	-1	1
11	-1	40	0	175	1	3
12	1	80	0	175	1	3
13	0	60	0	175	0	2
14	0	60	0	175	0	2
15	0	60	0	175	0	2

이용하였으며, 회귀분석 결과, 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점(saddle point)일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다. 반응표면분석에서 독립변수의 종속변수에 대한 2차 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{21}X_2X_1 + b_{22}X_2^2 + b_{31}X_3X_1 + b_{32}X_3X_2 + b_{33}X_3^2$$

여기서, Y는 종속변수,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ 은 독립변수,  $b_0$ 는 절편,  $b_n$ 은 회귀계수이다. 추출특성의 모니터링과 최적조건범위 예측은 각 종속변수의 반응표면분석법을 이용하여 분석하였다.

### 추출공정 및 수율측정

머위 잎 분말 2.5 g을 추출플라스크에 넣고 에탄올 50 ml을 가한 다음 Table 1과 같은 추출조건으로 shaker (VS-202D, Sangwoo, Korea)를 사용하여 상온에서 추출하고, 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 잔사를 3회 반복하여 추출하였다. 추출한 추출액을 여과지(Whatman GF/F)로 감압 여과한 후 농축플라스크의 무게를 측정하여 다음 rotary vacuum evaporator로 증발 농축하여 건조 시키고 무게를 측정하여 조추출물의 수율로 하였다.

### Petasin의 분석

Petasin 함량은 건조시킨 추출물을 tetrahydrofuran (THF) 5 ml로 용해시킨 후 syringe filter (Dismic-13JP, 0.50  $\mu$ m PTFE, ADVANTEC, Japan)로 여과한 후 Wildi 등[20]의 방법을 변형하여 HPLC (9600, Younglin, Korea)를 이용하여 분석하였다. 이때 분석조건으로 컬럼은 Nucleosil C<sub>18</sub> (250×4.6 mm, 10  $\mu$ m film, Phenomenex, USA), 이동상은 methanol : acetonitrile : distilled water (32:31:37, v/v), 유속은 1 ml/min, 검출기는 UV (230 nm)를 각각 사용하였다. 정량은 외부표준법으로 검량선을 작성하여 실시하였다. 즉, 표준물질 S-petasin 1 mg을 THF에 녹여 1,000 ppm으로 한 후 이 액을 희석하여 250, 500, 750 ppm별로 표준용액을 조제하여 HPLC로 분석한 후 Fig. 1과 같은 검량선을 작성하여 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 모델 구축 및 통계분석

머위로부터 petasin의 최적 추출조건을 설정하기 위해 에탄올 농도, 추출 rpm, 추출시간을 독립변수로 하여 Box-Behnken design에 의해 설계된 15구간의 추출 조건에서 얻어진 종속변수 즉, 조추출물 수율과 petasin 함량의 결과는 Table 2와 같다. 이 실험결과를 이용하여 반응표면 회귀분석을 실시하고 각 종속변수에 대한 회귀식을 구하였다. 또한, 종속변수별 최적 추출조건과 이에 따른 조추출물 수율과 petasin 함량을 예측하여 Table 3에 나타내었다. 그리고 추출조건인 에탄올 농도, 추출 rpm, 추출시간이 조추출물 수율과 petasin 함량에 미치는

Table 2. Experimental data for response parameters of *Petasites japonicus* leave extracts in relation to the ethanol extraction conditions

Extraction condition			Dry yield (%) ( $Y_1$ )	Petasin content ( $\mu\text{g/g}$ , $Y_2$ )
Ethanol concentration (%) ( $X_1$ )	Extraction rpm ( $X_2$ )	Extraction time (hr, $X_3$ )		
40	125	2	34.38	50.7357
40	225	2	33.56	108.6051
80	125	2	34.58	531.3584
80	225	2	39.76	678.1991
60	125	1	34.36	392.3998
60	125	3	37.56	465.6967
60	225	1	38.96	280.0364
60	225	3	39.55	361.5585
40	175	1	35.57	140.4525
80	175	1	32.97	683.9102
40	175	3	34.18	143.6024
80	175	3	34.96	668.6243
60	175	2	36.93	529.3841
60	175	2	36.39	374.8585
60	175	2	37.61	326.5760

영향을 보기위해 Fig. 1과 Fig. 2에 반응표면 곡선으로 나타내었다.

조추출물의 수율 변화 및 최적화

Box-Behnken design에 의한 추출 조건별 조추출물의 수율은 Table 2에 나타낸 바와 같고, 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_1 = 34.8660 + 0.3710X_1 - 0.1616X_2 + 1.3199X_3 - 0.0067X_1^2 + 0.0014X_2X_1 + 0.0003X_2^2 + 0.0423X_3X_1 - 0.0130X_3X_2 - 0.2682X_3^2$$

조추출물 수율에 대한 회귀식의  $R^2$ 은 0.8382이고, 10% 이내의 범위에서 유의성이 인정되지 않았으며, 예측된 정상점은 안장점이며 최대값은 39.50%이었고, 이때의 추출조건은 에탄올 농도 65.02%, 추출 rpm 223.36, 추출시간 2.03 hr로 나타났다(Table 3). 각각의 추출조건에 따른 조추출물 수율의 변화를 반응표면 곡선으로 나타낸 결과는 Fig. 2와 같이, 수율은 에탄올 농도, 추출 rpm, 추출시간이 증가함에 따라 증가하는 경향

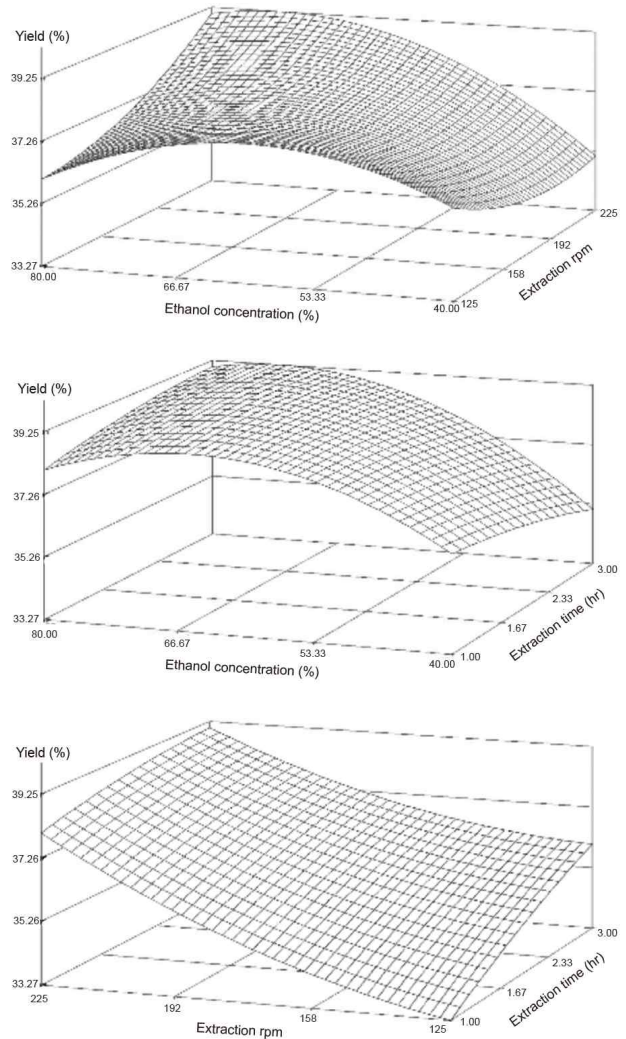


Fig. 1. Response surfaces of dry content of extracts as a function of ethanol concentration, extraction rpm, and extraction time from *Petasites japonicus* leave.

을 나타내었으며, 추출조건 중 추출 rpm의 영향이 가장 큰 것으로 나타났다. 한편, 노루궁뎅이 버섯[3]의 조추출물 수율의 경우는 에탄올 농도에 거의 영향을 받지 않지만, 팽이버섯[9]의 조추출물 수율은 에탄올 농도에 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

Table 3. Predicted values of optimum extraction condition for the maximized and minimized responses to variables by the ridge analysis by their response surface

Responses	$R^2$	Significance	Extraction condition <sup>1)</sup>			Estimated maximum responses	Morphology
			$X_1$	$X_2$	$X_3$		
Dry yield (%)	0.8382	0.1284	65.0267	223.3688	2.0318	39.5008	saddle point
Petasin content ( $\mu\text{g/g}$ )	0.9231	0.0251*	79.9173	178.1022	2.0663	659.2855	saddle point

<sup>1)</sup> $X_1$ : Ethanol concentration,  $X_2$ : Extraction rpm,  $X_3$ : Extraction time.

\*Significance at  $p < 0.05$ .

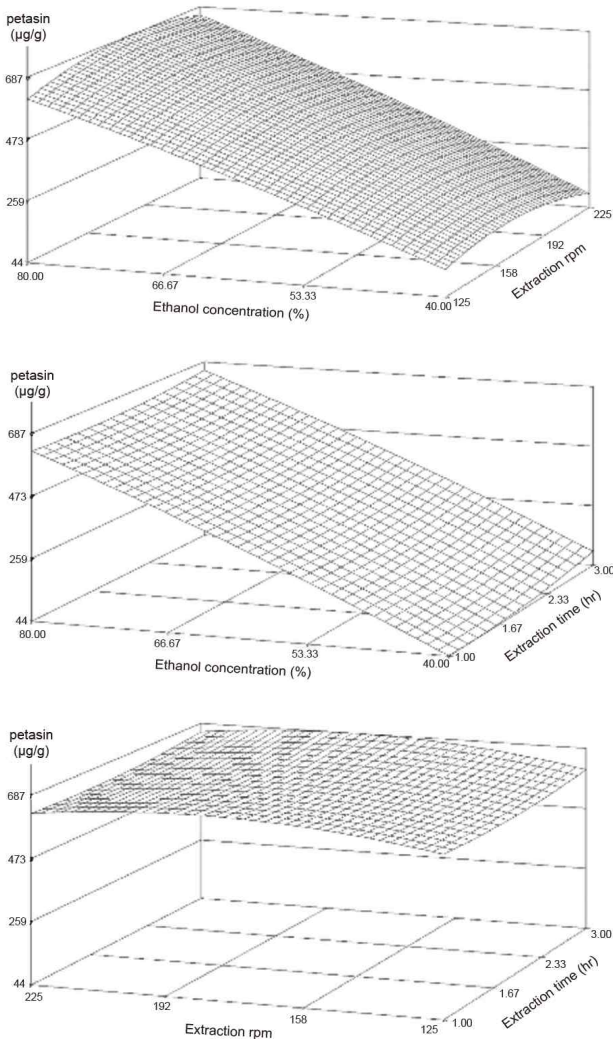


Fig. 2. Response surfaces of petasin content of ethanol extracts as a function of ethanol concentration, extraction rpm, and extraction time *Petasites japonicus* leave.

Petasin 함량의 변화 및 최적화

Box-Behnken design한 추출 조건별 petasin 함량은 Table 2에 나타난 바와 같으며, 그 결과에 대한 반응표면 회귀식은 아래와 같다.

$$Y_1 = -909.9426 + 14.8838X_1 + 6.7127X_2 - 38.6803X_3 - 0.0422X_1^2 + 0.0222X_2X_1 - 0.0204X_2^2 - 0.2304X_3X_1 + 0.0411X_3X_2 + 16.7863X_3^2$$

Petasin 함량에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>은 0.9231로 높은 상관관계를 보였고 5% 이내에서 유의성이 인정되었다(Table 3). Fig. 3에 나타난 반응표면 그래프를 보면 petasin 함량에 추출조건 중 에탄올 농도가 가장 큰 영향을 주었으며 에탄올 농도가 높아질수록 petasin이 증가하는 경향을 나타내었다. 반면에, petasin 수율에서 추출 rpm과 추출시간의 영향은 크지 않은 것으로 나타났다. 진피[7]로부터 hesperidin 추출과 팽이버섯[9]으로부터 페놀성 물질 추출의 경우도 에탄올 농도의 영향을

많이 받으며, 야관문[8]으로부터 페놀성 물질 추출의 경우는 추출시간 보다는 에탄올 농도에 크게 영향을 받고, 마늘[11]로부터 allicin 추출의 경우는 추출시간의 영향이 크지 않은 것으로 보고된 바 있다. 반응표면분석에 따라 예측된 정상점은 saddle point이며 최대값은 659.28 µg/g로 예측 되었고, 이때의 추출조건은 시료에 대한 에탄올 농도 79.92%, 추출 rpm 178.10, 추출시간 2.06 hr로 각각 결정되었다(Table 3). 이상의 결과로써, 머위 잎으로부터 유용성분인 petasin의 추출공정은 추출조건 즉, 에탄올 농도, 추출 rpm, 추출시간의 영향을 받는 것으로 확인되었고 특히, 추출용매인 에탄올의 농도의 영향을 가장 크게 받는 것으로 나타났다. 또한 추출조건에 따른 petasin의 거동을 설명하는 통계적 유의성을 가진 회귀식이 수립되었고, petasin 추출에 최적인 추출조건이 결정되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부의 농림수산식품개발사업의 연구비로 수행되었음에 감사드립니다.

References

- Bang, M. H. 2001. Development of biologically activity compound from edible plant sources-XY. Isolation of triterpenoid glycosides from the leaf of *Petasites japonicus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **48**, 421.
- Cho, S. Y., Han, Y. B. and Shin, K. H. 2001. Screening for antioxidant activity of edible plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **30**, 133-137.
- Choi, M. A., Park, N. Y., Woo, S. M. and Jeong, Y. J. 2003. Optimization of extraction conditions from *Hericium erinaceus* by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* **35**, 777-782.
- Choi, O. B. 2002. Anti-allergic effects of *Petasites japonicum*. *J Food Nutr* **15**, 382-385.
- Hasa, Y. and Tazaki, H. 2004. Biosynthesis of fukinolic acid Isolated from *Petasites japonicus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 2212-2214.
- Iriye, R., Furukawa, K., Nishida, R., Kim, C. and Fukami, H. 1992. Isolation and synthesis of a new bio-antimutagen, peasi-phenol, from scapes of *Petasites japonicum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**, 1773-1775.
- Jeong, J. E., Shim, S. P., Jeong, Y. S., Jung, H. K., Kim, Y. C. and Hong, J. H. 2011. Optimization of extraction conditions for ethanol extracts from *Citrus unshiu* peel by response surface methodology. *Korean J Food Preserv* **18**, 755-763.
- Kim, D. I. and Hong, J. H. 2012. Optimization of ethanol extrction conditions for functional components from *Lespedeza cuneata* using response surface methodology. *Korean J Food Cookery Sci* **28**, 275-283.
- Kim, H. K., Kim, M. O., Choi, M. G. and Kim, K. H. 2003.

- Optimization of microwave extraction conditions for *Flammulina velutipes* by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* **35**, 222-228.
10. Lee, C. H., Chang, M. C., Lee, H. J. and Kho, Y. H. 2000. An apoptosis regulator isolated from *Petasites japonicus*. *Korean J Food Sci Technol* **32**, 448-453.
  11. Lee, J. M., Cha, T. Y., Kim, S. H., Kwon, T. K., Kwon, J. H. and Lee, S. H. 2007. Optimization of hot-water extraction condition of garlic using a response surface methodology. *Korean J Food Preserv* **14**, 385-393.
  12. Lim, W. G. 1990. *The wild plants for food and medicine* pp. 115, Five star Press, Seoul, Korea.
  13. Lin, C. H., Li, C. Y. and Wu, T. S. 2004. A novel phenyl-propenoyl sulfonic acid and a new chlorophyll from the leaves of *Petasites formosanus* Kitamura. *Chem Pharm Bull* **52**, 1151-1152.
  14. Matsuura, H., Amano, M., Kawabata, J. and Mizutani, J. 2002. Isolation and measurement of quercetin glucosides in flower buds of Japanese butterbur (*Petasites japonicus subsp. gigantea* Kitam.). *Biotech Biochem* **66**, 1571-1575.
  15. Mizushima, Y., Ishidoh, T., Kamisuki, S., Sugawara, F., Yoshida, H. and Sakaguchi, K. 2003. Flavonoid glycoside: a new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase  $\alpha$  and a new carrier for inhibitor-affinity chromatograph. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 480-487.
  16. Park, K. J., Lim, J. H., Kim, B. K., Jeong, J. W., Kim, J. C., Lee, M. H., Cho, Y. S. and Jung, H. 2009. Optimization of extraction conditions to obtain functional components from buckwheat(*Fagopyrum esculentum* M.) sprouts using response surface methodology. *Korean J Food Preserv* **16**, 734-741.
  17. Soka, T. 1985. In *Dictionary of chinese Drugs* (1st ed.) Shanghai Sci Tech Shogakukan Press, Tokyo.
  18. Thomet, O. A. R., Wiesmann, U. N., Blaser, K. and Simon, H. U. 2001. Differential inhibition of inflammatory effector functions by petasin, isopetasin and neopetasin in human eosinophils. *Clin Exp Allergy* **31**, 1310-1320.
  19. Wang, G. J., Shum, A. Y. C., Lin, Y. L., Liao, J. F., Wu, X. C., Ren, J. and Chen, C. F. 2001. Calcium channel blockade in vascular smooth muscle cells: major hypotensive mechanism of S-petasin, a hypotensive sesquiterpene from *Petasites formosanus*. *J Pharm Exp Ther* **297**, 240-246.
  20. Wildi, E., Langer, T., Schaffner, W. and Buter, K. B. 1997. Quantitative analysis of petasin and pyrrolizidine alkaloids in leaves and rhizomes of *in situ* grown *Petasites hybridus* plants. *Planta Med* **64**, 264-267.
  21. Youn, K. S., Jeong, Y. J., Lee, G. D., Shin, S. R. and Ku, J. G. 2002. Optimization for hot water extraction process of *Cordyceps militaris* using response surface methodology. *Korean J Food Preserv* **9**, 184-188.

초록 : 반응표면분석법에 의한 머위 잎의 petasin 추출공정 최적화

이동완<sup>1</sup> · 이세열<sup>1</sup> · 정현식<sup>1</sup> · 최영환<sup>2</sup> · 임동순<sup>3</sup> · 이영근<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 식품공학과, <sup>2</sup>부산대학교 원예생명과학과, <sup>3</sup>부산대학교 약학과)

머위 잎에서 알레르기성 천식에 효과적 치료제로 알려져 있는 petasin을 효율적으로 추출하기 위해 반응표면분석법을 사용하여 petasin 추출공정 최적화를 실시하였다. Box-Behnken design에 따라 설정한 에탄올 농도(40-80%), 추출 rpm (125-225), 추출시간(1-3 hr)을 독립변수로 하고 추출물의 특성 즉, 추출수율과 petasin 함량을 종속변수로 하여 분석을 실시하였다. 추출물의 petasin 함량은 에탄올 농도, 추출 rpm, 추출시간의 유의적인 영향을 받으며 특히, 에탄올 농도의 영향이 크며 이의 수준이 높아짐에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 추출조건에 따른 petasin의 거동은 유의적인 회귀식으로 설명이 가능한 것으로 확인되었다. 반응표면분석 결과, 머위 잎으로부터 petasin의 추출에 최적인 조건으로 에탄올 농도는 79.92%, 추출 rpm은 178.10, 추출시간은 2.06 hr로 각각 결정되었다.