

제조용 재순환 크로마토그래피에 의한 가시오갈피에 포함된 Acanthoside-D의 분리

홍승표* · 노경호†

인하대학교 공과대학 화학공학과, *초정밀생물분리기술센터
(2002년 5월 3일 접수, 2002년 7월 7일 채택)

Separation of Acanthoside-D in *Acanthopanax Senticosus* by Preparative Recycle Chromatography

Seung Pyo Hong* and Kyung Ho Row†

*Center for Advanced Bioseparation Technology,
Dept. of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received 3 May 2002; accepted 7 July 2002)

요 약

가시오갈피에 포함되어있는 Acanthoside-D를 추출 및 분리하기 위해서 분석용과 제조용 재순환 크로마토그래피에서의 최적조건을 실험적으로 구하였다. 가시오갈피 분말을 에탄올로 추출하고 헥산으로 분배하였다. 분석용 크로마토그래피에서의 이동상 조건과 주입부피는 각각 water/acetonitrile/methanol=80/14/6 vol%, 20 µl이었고 제조용 재순환 크로마토그래피에서는 각각 70/15/15 vol%, 2 ml이었다. 4번의 재순환을 하여 93%의 순도를 가진 Acanthoside-D를 분취하였다.

Abstract – To extract and separate Acanthoside-D contained in *Acanthopanax Senticosus* as a ginseng-like substance, the optimum operating conditions were experimentally determined in the analytical and preparative chromatography. Acanthoside-D was extracted from the powder of the trunk of *Acanthopanax Senticosus* by ethanol, and the resulting solution was partitioned with n-hexane. The mobile phase composition and injection volume by analytical chromatography were water/acetonitrile/methanol=80/14/6 vol% and 20 µl, respectively while those by recycle chromatography were 70/15/15 vol% and 2 ml. By recycling the sample 4 times, Acanthoside-D with 93% purity was collected.

Key words: Acanthoside-D, Recycle Chromatography, Preparative Separation, Mobile Phase Composition

1. 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]. 오갈피나무는 오갈피(*acanthopanax sessiliflorum seemann*), 가시오갈피(*acanthopanax senticosus harms*), 털오갈피(*acanthopanax rufinerve nakai*), 지리산오갈피(*acanthopanax chiisanensis nakai*), 서울오갈피(*acanthopanax seoulense nakai*)가 있는데 그 중 가시오갈피의 유효성분으로는 sesamin, savinin을 비롯하여 lignan 배당체인 acanthoside A, B, C, D와 chiisanoside, polyacetylene, β -sitosterol, stigmaterol, campesterol, 비타민, 미네랄 등이 풍부하여 좋은 약재로 주목받고 있다. 그 배당체 중 효능이 뛰어나 국내외에서 많은 연구가 진행되고 있는 물질 중 acanthoside-D의 구조식을 Fig. 1에 나타내었다. acanthoside-D의 화학적 구조식은 $C_{34}H_{46}O_{18}$, m.p는 242 °C 이고, (+)-syringaresinol di-O- β -D-glucoside, eleutheroside E 및 acankoreoside

D로 지칭되고 있다[2-4]. Acanthoside-D의 주요효능으로 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]. 이러한 효능 때문에 여러 측면을 연구한 결과 식품, 의약품, 화장품 등의 외용제 및 건강식품, 과립차 및 음료로 이용되고 있고, 오갈피의 성분 분석과 효능에 관한 것뿐만 아니라 고순도 분리에 대한 연구는 계속해서 진행되고 있다[7].

21C의 유망한 생물공학 분야에서 필수 불가결한 분석기기로 사용되고 있는 HPLC는 탁월한 분석 및 분취 능력으로 인해서 최근에는 생물제품 생산용 장치로서도 부각되고 있다. 하지만, 기존의 HPLC로는 아주 미량의 분석만이 가능하기 때문에 2차 분석을 통한 구조 확인, 합성, 임상실험 등 실용적으로 적용하기에는 매우 작은 양이고, 이를 해결하기 위하여 대용량 분취용인 제조용 HPLC가 사용하게 된다. 처리할 수 있는 시료량이 많아져서, 정제된 분취물을 MS 또는 IR 등 기타 분석기기에서 추가적인 정성 분석을 할 수 있고, 필요에 따라 유도체의 합성도 하게 된다[8]. 그러나 일반 천연물이나 약재 등 다양하고 복잡한 혼합물의 시료를 포함한 일반적인 경우에서 제조용 HPLC가 일반 분석용 HPLC의 경우에 비해서 분리능이 매우 낮다. 따라서 더 많은 양을 더

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rowkho@inha.ac.kr

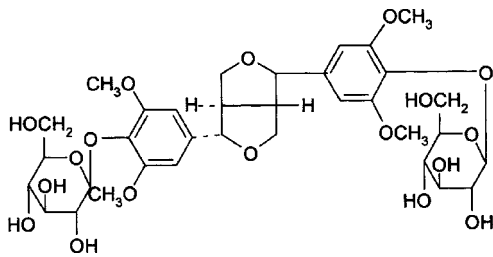


Fig. 1. Chemical structure of acanthoside-D *Senticosus*.

우수한 분리도로 얻기 위한 장치적인 개선이 계속 이루어지고 있다. 이 중에서 최근에 주목받고 있는 장치에는 기존 제조용 HPLC에 비해서 용매사용을 절감하도록 재순환 (recycle) 기능이 추가되었다. 제조용 재순환 HPLC의 장점은 대용량으로 재순환 횟수에 따라서 고순도 분리도를 조절할 수 있다. 재순환 HPLC의 원리는 최초의 주입에서 우리가 원하는 peak가 나오는 순간 재순환을 시작하여 목적물질을 제외한 다른 불순물들을 제거한다. 재순환의 수행과 동시에 칼럼에서 나온 시료들은 다시 칼럼으로 주입되므로 다시 한번 목적물질을 제외한 불순물들을 제거할 수 있게 된다. 즉 이러한 재순환 과정의 반복을 통해서 우리가 원하는 목적물질만을 얻을 수 있게 된다. 또한 이론단수(number of theoretical plates)가 높은 column을 주로 사용하고 이러한 재순환 과정에서 이동상의 재사용이 가능하므로 기존의 제조용 장치보다 이동상의 사용량이 최대 1/10수준으로 절감된다. 현재 제조용 재순환 HPLC의 사용 범위는 주로 천연물에 적용하고 있으며 올리고당 분석, 송진으로부터 항균 활성을 가진 diterpenic acids의 분리, ecdysteroid, 사포닌 및 동충하초에서의 유용성분의 분리 등 점차 사용빈도와 적용되는 물질의 종류가 증가하고 있는 추세이다[9].

본 연구의 목적은 가시오갈피의 줄기에 함유되어 있는 오갈피 배당체의 추출조건과 분석조건을 확립하고, 제조용 재순환 HPLC를 이용하여 유용 물질인 acanthoside-D를 얻는 것이다. 제조용 HPLC의 정제 및 분리조건을 확립하기 위해서 acetonitrile, water, methanol 등의 이동상 조성을 변화시키면서 목적물질인 acanthoside-D를 얻기 위한 최적 분리조건을 구하는 것이다.

2. 실험

2-1. 시약 및 기기

우리나라에 자생하는 오갈피속 식물중 가시오갈피(2001년 채취)는 한국가시오갈피재배협회에서 구입하였고, 이동상으로는 J. T. Baker사의 methanol, acetonitrile과 2차 증류한 증류수를 감압 펌프(division of millipore, Waters)와 필터(FH-0.5 μ m)를 이용하여 감압 여과 한 후에 사용하였다.

추출된 시료는 농축을 하기 위해서 회전식 증발기(LABO-THERM SW 200, Resona Technics사)를 사용하였고, 시료의 분석에 사용된 HPLC는 영린기기의 M930 solvent delivery pump, 486 검지기(M 7200 Absorbance Detector, 영린기기), rheodyne injection valve(20 μ l sample loop)로 구성되어 있다. 데이터 저장 시스템은 autochrowin(ver. 1.42, 영린기기)이고 PC에 설치하여 사용하였다. 본 실험에서 분석용 HPLC는 크기가 15 μ m인 lichrospher 100RP-18 충전물(Merck사)을 stainless column(3.9 \times 300 mm)에 충전하여 사용하였고, 제조용 재순환 HPLC는 충전물의 크기가 13 μ m인 JAIGEL-ODS-AP column (21.5 \times 300 mm, JAI Korea)를 사용하였다.

제조용 재순환 HPLC(LC-918 R/U, JAI Korea)는 PI-50F형 pump, UV-310B형 검지기, RI-50형 검지기, reodyne injection valve(3 ml sample loop)로 구성되어 있고, SS-250F2형 recorder(JAI Korea)를 사용하였다.

2-2. 실험방법

가시오갈피 줄기 분말 5 g를 취하여 ethanol 용액 100 ml를 가하여 환류 냉각기에 넣고 물의 온도를 50 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 환류 추출을 하였다. 추출액을 여과지를 사용하여 여과한 후 감압 농축시켰다. 그 후 물 50 ml에 녹여 불순물을 극성차이로 제거하기 위해 n-hexane 50 ml로 분배하였다. 분배공정 후 water층을 취하여 감압 농축 후 methanol 50 ml에 녹인 후 여과하였다. 이 추출액을 충전물의 크기가 15 μ m인 lichrospher 100RP-18 column을 사용하여 이동상의 조성, 유속, UV 검지기의 wavelength를 변화시키면서 최적 분석조건을 결정하였고, 정제 및 분리조건을 확립하기 위해서 제조용 재순환 HPLC를 이용하였다. 분배공정 이후 methanol에 녹인 용액을 filter(0.2 μ m nylon Alltech)를 이용하여 부유물들을 모두 여과하였다. 제조용 재순환 HPLC에서 최적의 이동상 조건을 구하기 위해 조성을 변화시키면서 실험하여 UV wavelength는 210 nm, 이동상 유속은 5 ml/min에서 2 ml씩 injection하였다. 변화시킨 각각의 이동상 조성마다 peak를 분취하여 분석용 HPLC를 사용하여 acanthoside-D를 분석하였다. 실험결과에 의하면 water/acetonitrile/methanol=70/15/15 vol%가 목적물질인 acanthoside-D를 얻기 위한 최적 이동상 조건이었다. Acanthoside-D를 고순도로 얻기 위하여서 제조용 재순환 HPLC를 사용하기 위해서는 많은 양의 시료를 고순도로 농축하여야 하므로 20번의 반복실험을 통하여 많은 양의 시료가 포함되어 있는 용액을 준비하였고 회전 증발기를 사용하여 한번에 주입 가능한 3 ml의 양으로 농축하여 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

가시오갈피에서 acanthoside-D를 얻기 위해서 침출과 Lee 등[10]에 의한 방법을 적용하였다. Ethanol을 사용하여 acanthoside-D를 침출하였지만 천연물인 가시오갈피에는 많은 불순물들이 포함되어 있기 때문에 정제하기 위해 n-hexane/water를 첨가하는 분배의 단계를 사용하였다. 비극성의 성분들은 주로 n-hexane층으로 이동하고 acanthoside-D를 포함한 극성의 성분들은 water층 이동하게 된다. 따라서 water층을 감압 농축을 한 후에 잔류물을 ethanol에 녹여서 HPLC에 의하여 분리하였다.

문헌에 의하면 가시오갈피에서 acanthoside-D의 분리 방법으로 μ -Bondapak C₁₈(Waters, 3.9 \times 300 mm)을 사용하여 UV 210 nm, 주입량 10 μ l, 유속 1.0 ml/min, acetonitrile/water=15:85 vol%에서 분석하였다[11]. 본 연구에서는 acanthoside-D를 분석하기 위해 충전물의 크기가 15 μ m인 column(3.9 \times 300 mm)을 사용하였고 이동상의 조성을 변화시키면서 목적물질에 대한 분리도를 고찰하였다. 역상 액체 크로마토그래피에서는 이동상으로 극성지수가 높은 물질을 사용하게 되며, 본 연구에서는 사용된 water, acetonitrile, methanol 용매의 극성지수는 각기 10.2, 5.8, 5.1이다[12]. 분석용 HPLC에서 가시오갈피에 대한 분석 결과는 Fig. 2에 나타나있다. 채류시간은 12분으로 나머지 성분과 잘 분리되었다.

Acanthoside-D를 단순한 추출물이 아닌 고순도 의약품으로 생산하기 위해서는 보다 고순도의 물질을 제조하는 것과 대량생산하는 것이 매우 중요하다. 따라서, 제조용으로 scale-up하기 위해 분석용 HPLC에서와 동일한 이동상을 적용하고 제조용 HPLC를 이용하여 시료 주입량을 증가시키면서 acanthoside-D를 분취하고 최종적으로 의학용으로 사용될 수 있는 고순도의 acanthoside-D를 얻기 위한 기본적인 제조용 재순환 HPLC의 실험을 수행하였다[7].

침출과 용매추출을 통해 얻은 용액을 회전 증발기를 사용하여 10배로 농축하였고 methanol과 용액의 비율을 2:1로 혼합하고 이 용액내의 부유물을 걸러내기 위하여 filter(0.2 μ m nylon Alltech)로 여과하였다. 최적의 이동상 조건을 구하기 위해 조성을 변화시키면서 실험한 결과, UV wavelength는 210 nm, 이동상 유속은 5 ml/min에서 2 ml씩 주입하

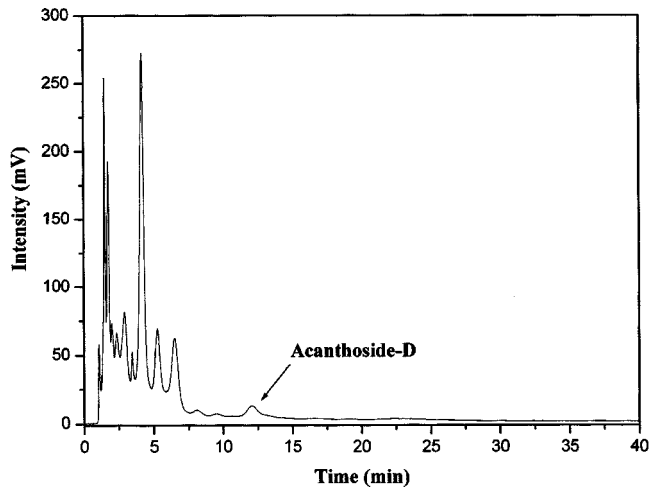


Fig. 2. Analysis of acanthoside-D from the trunk of *Acanthopanax Senticosus* (water/acetonitrile/methanol=80/14/6 Vol%, 20 μ l injection volume).

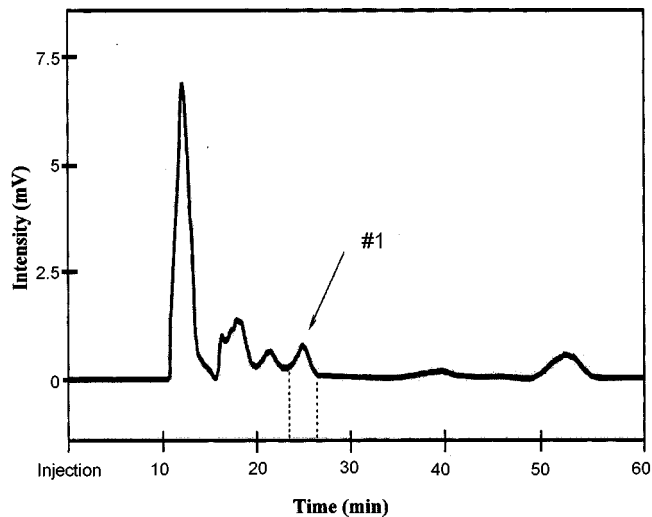


Fig. 3. Separation of acanthoside-D from the trunk of *Acanthopanax Senticosus* by preparative HPLC column (water/acetonitrile/methanol=70/15/15 Vol%, 2 ml injection volume).

있고 이동상은 water/acetonitrile/methanol=70/15/15 vol%의 조성에서 Fig. 3의 크로마토그램을 얻었으며 각각의 peak를 분류하여 분석용 HPLC에서 분석한 결과, Fig. 3에서 #1의 peak에서 acanthoside-D가 존재하였다. Fig. 4에서는 제조용 HPLC에 의해 분리된 peak #1을 분류하여 농축시킨 후에 분석용 HPLC를 이용하여 얻은 결과를 보여주고 있다. Fig. 2와 마찬가지로 12분에서 acanthoside-D의 존재를 확인하였다. Fig. 4에서 확인한 바와 같이, acanthoside-D 이외에도 많은 성분의 물질들이 가시오갈피 안에 포함되어 있으므로 순수한 acanthoside-D를 얻기 위해서 제조용 재순환 HPLC를 적용하였다. 제조용 재순환 HPLC에서 사용되는 column은 직경 21.5 mm에 길이 300 mm인 제조용 column이기 때문에 한번의 주입에 많은 양의 시료가 필요하였다. 따라서 #1의 peak를 분류하는 과정을 20번 정도 반복하여 얻은 시료들을 고통도로 농축하였다. 농축한 시료를 제조용 재순환 HPLC에 3 ml를 주입하여 재순환의 과정을 반복 수행하였다. Fig. 5에서는 각기 재순환 과정에서의 크로마토그램을 보여주고 있다. 처음 주입하였을 때 원하는 acanthoside-D의 전후로 여러 불순물들이 검출되었다. 이 불순물들을 제거하기 위해 acanthoside-D의 peak가 나타나기 시작하는 순간 재순환을 시작하였고

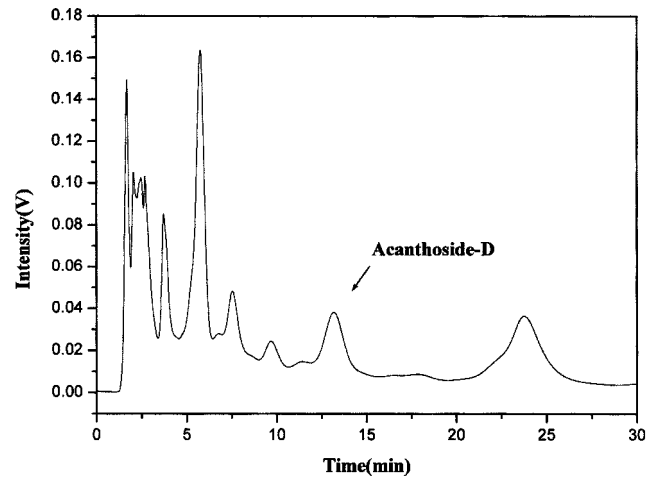


Fig. 4. Analysis of acanthoside-D from the fraction #1 in Fig. 3 (water/acetonitrile/methanol=80/14/6 Vol%, 20 μ l injection volume).

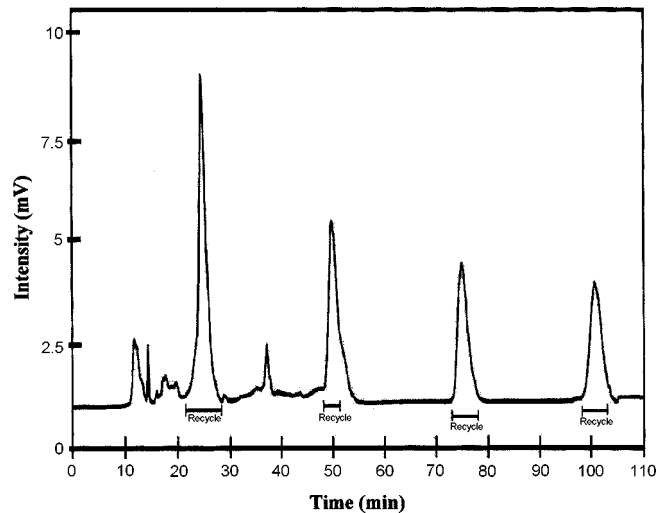


Fig. 5. Separation of fraction #1 by recycle preparative HPLC column (water/acetonitrile/methanol=70/15/15 Vol%, 3 ml injection volume).

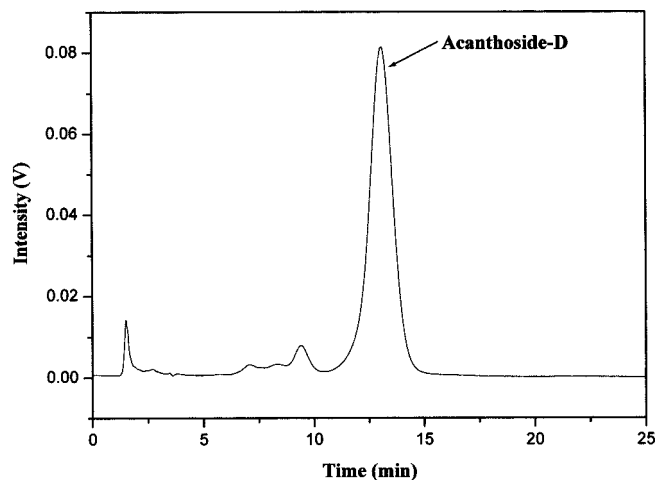


Fig. 6. Analysis of the sample containing acanthoside-D in the 4th recycle (water/acetonitrile/methanol=80/14/6 Vol%, 20 μ l injection volume).

이 peak가 기준선까지 내려왔을 때 종료하였다. 그 결과로서, 다음 acanthoside-D의 peak는 보다 고순도로 얻을 수 있었으나 peak가 tailing

이 일어나므로 peak의 뒷부분은 재순환의 방법을 통해 제거하였고 이러한 재순환 과정을 4번 반복하여 가장 순도가 높은 마지막 peak를 분취하고 농축하여 분석용 HPLC로 분석하였다. 이 결과가 Fig. 6에 나타나 있다. 93% 고순도로 acanthoside-D를 분리를 해낼 수 있었다.

본 연구에서는 가시오갈피의 줄기로부터 acanthoside-D를 얻기 위한 전처리 단계에 이어서 크기가 15 μ m인 lichrospher 100RP-18 충전물이 채워진 column을 이용한 분석용 HPLC를 이용하여 acanthoside-D를 분석하기 위한 이동상의 조성을 실험적으로 정하였다. 이 실험결과에 근거하여 제조용 재순환 HPLC를 이용하여 고부가가치의 고순도 acanthoside-D를 분취할 수 있는 조건을 제시하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 제조용 재순환 HPLC를 사용하여 가시오갈피로부터 acanthoside-D를 고순도로 분리하기 위한 최적의 실험조건을 구하였다. 가시오갈피 줄기의 분말을 ethanol 용액으로 추출한 후 n-hexane으로 분배하였다. 정제된 추출액을 충전물의 크기가 15 μ m인 column(3.9×300 mm)을 이용하여 이동상의 조성이 water/acetonitrile/methanol=80/14/6 vol%에서 acanthoside-D를 분석하였다. Acanthoside-D를 분취하기 위해서 충전물의 크기가 13 μ m인 제조용 column(21.5×300 mm)을 사용한 재순환 HPLC에서의 이동상의 조건은 water/acetonitrile/methanol=70/15/15 vol%로 유속과 주입부피는 각기 5 ml/min, 3 ml로 하였다. 재순환 HPLC에서는 93%의 고순도 acanthoside-D를 제조용 규모로 분리하였다.

참고문헌

1. The Korea Pharmacopeia, 6th Ed., 1027(1992).
2. Zhao, W. M., Qin, G. W., Xu, R. S., Li, X. Y., Liu, J. S., Wang, Y. and Freg, M.: *Fitoterapia*, **70**, 529(1999).
3. Chang, S.Y., Yook, C. S. and Nohara, T.: *Phytochemistry*, **50**, 1369 (1999).
4. Hahn, D. R., Kim, C. J. and Kim, J. H.: *Yakhak Hoeji*, **29**, 357 (1985).
5. Nishiyama, N., Kahiko, T., Iwai, A., Saito, H., Sanada, S., Ida, Y. and Shoji, J.: *Sho. Zas.*, **39**(1985).
6. Brekhman, I. I. and Dardymov, I. V.: *Lioydia.*, **32**(1969).
7. Lee, K. J., Kang, J. H. and Row, K. H.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 71(2001).
8. "Polymer analysis by Recycle Prep-LC," JAI Korea Co. Ltd., 4(2002).
9. "Recycling Preparative HPLC," JAI Korea Co. Ltd., 1(2002).
10. Lee, K. J., Kim, M. H. and Row, K. H.: *Theories and Applications of Chem. Eng.*, **6**, 3281(2000).
11. Shin, K. H.: "The Report of National Institute of Health," 572(1994).
12. "High Purity Solvent Guide," Burick and Jackson Laboratories, Inc.: 133(1984).