

다양한 용매에서 Soxhlet 추출기를 이용한 감귤 껍질에서 *d*-limonene 추출의 최적조건 연구

박상민 · 고관영 · 김인호[†]

충남대학교 화학공학과
34134 대전광역시 유성구 대학로 99
(2015년 3월 10일 접수, 2015년 4월 17일 수정본 접수, 2015년 4월 21일 채택)

Optimization of *d*-limonene Extraction from Tangerine Peel in Various Solvents by Using Soxhlet Extractor

Sang Min Park, Kwan Young Ko and In Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea
(Received 10 March 2015; Received in revised form 17 April 2015; accepted 21 April 2015)

요 약

감귤류의 과일 내에 포함된 것으로 알려진 *d*-limonene 성분은 정유 성분을 추출하여 분리하는 방법으로 얻을 수 있다. 연속 증류 추출법 중 하나인 Soxhlet 추출법을 사용하여 감귤 껍질의 정유 성분을 추출한 후, 역상 HPLC를 통해 정량 분석을 하였다. 추출용매의 끓는점과 극성도가 수율에 주는 영향을 알아보기 위해 에탄올, n-헥산, 석유에테르 3가지 용매를 추출 용매로 사용하였다. 120 °C에서 각각의 용매를 1, 2, 4시간 동안 추출했을 때의 시료를 얻어 총 9가지 시료를 분석하였다. 역상 HPLC에서 정량분석을 한 결과, 세 가지 용매 모두 2시간 동안 추출했을 때 *d*-limonene의 함유량이 가장 많았으며, 이 때 감귤 껍질 1 g당 함유량은 7.77 mg(에탄올), 0.49 mg(n-헥산), 0.28 mg(석유에테르)였다. 에탄올을 사용했을 때 수율이 가장 높은 것으로 보아 용매의 극성도가 끓는점보다 추출 효율에 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

Abstract – *D*-limonene included in citrus fruits is obtainable to extract essential oil as well as separate the oil ingredient. Soxhlet extraction, a type of SDE (Simultaneous steam Distillation and solvent Extraction), was used to extract limonene from tangerine peel. HPLC analysis was performed to quantify extracted *d*-limonene by using reversed-phase HPLC column. Results of HPLC analysis showed that the optimal extraction time was 2 hours in any solvent, and the extracted amounts of *d*-limonene in tangerine peel (per g tangerine peel) were 7.77 mg, 0.49 mg, and 0.28 mg in ethyl alcohol, n-hexane, and ether. Because yield was the highest in using ethyl alcohol as a solvent, polarity is stronger factor to effect on yield of extraction than boiling point.

Key words: Tangerine Peel, *d*-limonene, Soxhlet Extraction, HPLC

1. 서 론

우리가 섭취하는 감귤류의 과일들은 서로 비슷한 특유의 향을 가지고 있다. 이는 과일 껍질 속에 존재하는 limonene 성분 때문이다. Limonene은 무색투명한 천연 성분으로, 방향성을 갖는 비극성 분자이다. 대표적인 모노테르펜 탄화수소이고, *d*-limonene 및 *l*-limonene 두 가지의 광학 이성질체가 존재한다[1,2]. 특히 두 이성질체 중 *d*-limonene은 상쾌한 향과 인체에 대한 무독성 때문에 향수, 방향제,

비누 등의 화장품과 식품산업 등에 널리 사용되고 있고, 최근에는 중추 신경의 흥분을 진정시켜주고 항암작용이 있는 것으로 밝혀졌다[3,4].

d-limonene은 감귤류의 과일 내에 포함된 정유 성분을 추출 후 분리하여 얻을 수 있다. 정유 성분은 특히 과일의 껍질에 다량 함유되어 있어 감귤 껍질에서 정유 성분을 추출하는 것이 효율적이며, 감귤 껍질에 포함된 정유성분의 70~90%가 *d*-limonene에 해당된다. 실제로 정유 성분 추출과 *d*-limonene의 분리에 대한 연구와 이들의 생리기능 활성에 대한 평가 및 연구가 활발히 진행되고 있다[5].

일반적으로 원료에서 정유 성분을 추출하는 방법은 침지법, 용매 추출법, 연속 증류 추출법, 초임계 추출법 등이 있다[6]. 그 중 연속 증류 추출법을 사용하면 정유성분이 적게 함유된 식품이라도 짧은 시간에 높은 수율로 정유 성분을 얻을 수 있다. 연속 증류 추출법을 사용하였을 때 다른 추출 방법들에 비해 *d*-limonene 함량이 평균적

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

‡이 논문은 공주대학교 박관영 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.
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.

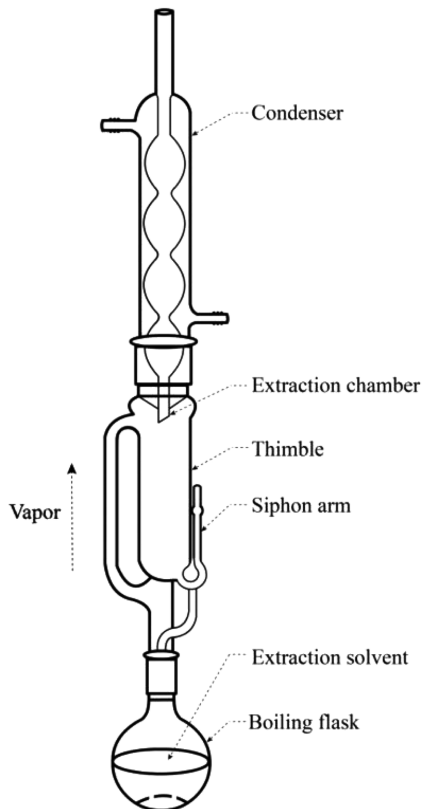


Fig. 1. Diagram of soxhlet extractor.

으로 65.31%로 가장 많다는 연구결과도 있다[7]. 연속 증류 추출법 중 하나로, Soxhlet 추출기를 이용한 추출법은 소량의 용매를 반복적으로 증류-액화시키면서 고체 원료에서 지방 성분을 추출할 수 있도록 고안된 방법이며 추출 용매, 추출 시간에 따라 추출 정도가 달라진다. 일반적인 Soxhlet 추출기의 모식도를 Fig. 1에 나타내었다.

HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)는 *d*-limonene과 같은 비극성 물질을 분석하게 용이한 장치이다. 용매에 녹일 수 있는 물질이라면 비휘발성이거나 열적 안정성에 무관하게 분석이 가능하고, 고압을 극복하여 높은 용매 유속을 이용할 수 있는 분석 기기이다[8,9]. 그 중 역상(reversed-phase) HPLC는 극성을 띠는 이동상과 비극성을 띠는 고정상 컬럼을 사용하는 HPLC 분석 방법으로, 분리하고자 하는 물질이 포함된 혼합물 구성 성분들의 극성도의 차이를 이용해 고정상에 흡착되는 시간을 다르게 하여 분석한다[7].

본 연구에서는 Soxhlet 추출기에서 극성도가 서로 다른 에탄올, 헥산, 석유에테르 3가지 용매를 사용하여 1시간, 2시간, 4시간 동안 각각 추출시간을 바꾸며 일정량의 감귤 껍질을 추출하였다. 그리고 *d*-limonene 추출의 효율성 및 경제성을 비교하기 위한 역상 HPLC의 최적의 분석 조건을 찾고, 감귤 껍질로부터 추출한 시료들을 HPLC에서 정량 분석하여 가장 효율적으로 *d*-limonene을 추출할 수 있는 최적의 용매와 추출 시간을 알아보았다.

2. 실험 방법

2-1. HPLC를 이용한 표준 *d*-limonene 분석

표준 *d*-limonene의 정량분석을 위해 *d*-limonene 표준용액을 제작

하였다. 표준용액 제작에 사용된 표준시약은 순도 97%의 액상(R)-(+)-Limonene (Sigma, USA)이다. *d*-limonene이 비극성 물질이므로, 이를 희석하기 위한 비극성 용매는 *n*-헥산(Duksan Chemistry, Korea)을 사용하였다. *d*-limonene 표준시약을 0.006, 0.032, 0.064, 0.096 mL 만큼 각각 측정 후 *n*-헥산 40 mL에 희석하여 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM의 표준용액을 만들었다.

표준용액 및 시료를 분석하기 위한 HPLC 장치를 구성하였다. 이동상을 컬럼에 흘려보내는 펌프로 110B Solvent Delivery Module (Beckman, Germany)을 사용했다. Automated Switching Valve (Millipore, USA)를 이용하여 ULTRAMEX-C18 (0.46×25 cm, 5 μm) 컬럼에 시료를 주입하였다. 이 때 컬럼의 온도를 일정하게 유지시키기 위해 BAS LC-22C Temperature Controller (SpectraLab Scientific Inc., Canada)을 사용하였다. 컬럼을 통과한 시료를 UV-detector 장치인 783A Programmable Absorbance Detector (Applied Biosystem, USA)를 통해 전기적 신호를 받고, Autochro Data Module (Younglin Instrument, Korea)과 Autochro 2000 (Younglin Instrument, Korea) 프로그램을 사용하여 전기 신호를 디지털 신호로 바꾸어 PC 화면으로 크로마토그램을 확인하였다.

d-limonene을 분석하기 용이한 이동상을 찾기 위해 4번에 걸쳐 용매 종류와 부피 비를 변경하였다. 첫 번째로 *n*-헥산과 에탄올(Duksan Chemistry, Korea)의 90:10[10], 두 번째는 메탄올(Samchun Chemical, Korea)과 증류수 75:25로 섞은 용매[11], 세 번째와 네 번째는 메탄올과 증류수를 각각 85:15 및 80:20으로 혼합한 용매를 사용하였다. 펌프의 유량은 1.0 mL/min, 컬럼 온도는 25 °C, 시료용량은 20 μL, UV 파장은 200 nm로 일정하게 유지시켰다. 적합한 용매를 결정 후 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM 표준용액을 분석하여 표준 *d*-limonene을 정량분석 할 수 있는 검량선을 얻었다.

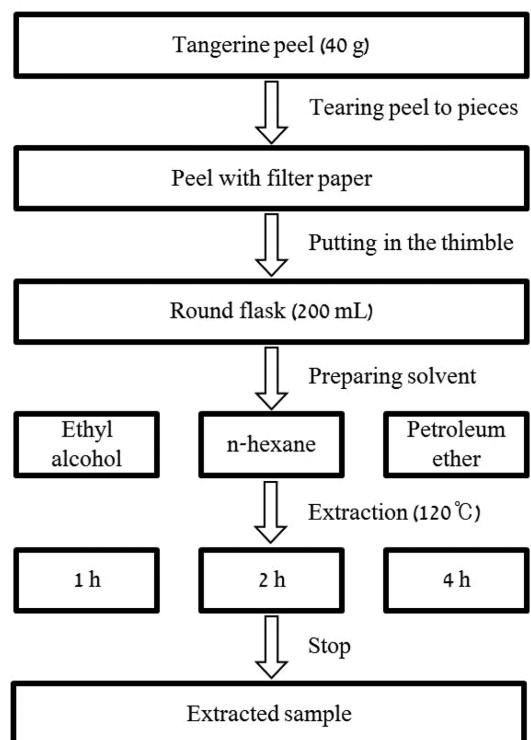


Fig. 2. Scheme of obtaining samples from tangerine peel by soxhlet extraction.

2-2. 감귤 껍질 추출 조건과 방법 및 분석

감귤 껍질로부터 *d*-limonene을 추출하기 위해 국내 제주도산 감귤을 사용하였다. 보관 온도를 약 4 °C로 유지시켜 냉장보관 했으며, 최대한 오염이 되지 않은 상태로 유수분이 있는 원래의 상태를 유지시킨 상태에서 과육으로부터 껍질을 분리하고 즉시 실험에 이용하였다. 환류냉각장치와 heating mantle (Taisite, China), Soxhlet 추출기 (Duran group, Germany)를 추출 장비로 구성하였다. 감귤 껍질 추출 과정을 Fig. 2에 모식도를 나타냈다. 감귤 껍질 40 g을 표면적을 크게 하기 위해 약 1×1 cm 크기로 자르고, filter paper (Whatman, UK)를 Soxhlet 추출기의 추출관 내부에 펴서 넣어 그 위에 감귤 껍질을 채웠다. *d*-limonene을 추출하기 위한 용매는 유기 용매가 주로 사용되었다 [6]. 본 연구에서는 극성도(polarity)와 끓는점의 차이에 의한 추출 정도 알아보기 위해 추출 용매를 에탄올(Duksan Chemistry, Korea), n-헥산(Duksan Chemistry, Korea), 석유에테르(J. T. Baker, USA), 세 가지를 사용했다. 각 용매의 극성도와 끓는점을 Table 1에 정리하였다[12].

Table 1. The polarity and boiling point of three solvents

Solvent	Polarity	Boiling point (°C)
ethyl alcohol	5.2	79
n-hexane	0.1	69
petroleum ether	0.1	30-60

에탄올과 나머지 두 용매의 결과를 비교하여 극성도에 대한 효율차이를 알 수 있고, 극성도가 같은 n-헥산과 석유에테르를 비교함으로써 끓는점에 대한 차이를 알 수 있다. 세 가지 용매 모두 200 mL를 측정하여 Soxhlet 추출기의 둥근 플라스크에 담아 추출 용매로 사용하였고, 추출 온도는 heating mantle을 이용해 플라스크를 가열하여 120 °C로 일정하게 유지시켰다. 2시간 동안 추출한 선행연구를 바탕으로 [6] 추출 시간에 따라 수율의 차이를 알아보기 위해 추출 시간을 1시간, 2시간, 4시간으로 하였다. 각 용매 당 3회에 걸쳐 총 9가지의 추출 시료를 얻었다. 그 이후엔 앞서 결정된 HPLC 분석 조건을 이용하여 9가지의 추출 시료에 대해 각각 정량분석 하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. *d*-limonene 표준용액 분석

이동상 조건을 변경하며 *d*-limonene을 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 용매를 결정하는 과정에서 모두 5 mM 표준용액을 사용하였다. 또한 이동상 조건 변경에 따른 용매의 극성도를 계산하여 Table 2에 나타내었다[12]. Fig. 3A는 극성도 0.61의 n-헥산-에탄올 (90:10, v/v) 이동상, UV 파장 200 nm에서 *d*-limonene 표준용액을 분석한 결과이다. 하나의 단일 피크가 발생했고, 머무름 시간은 2~3분으로 짧은 시간 내에 *d*-limonene이 용출되었다. 그러나 분석에 사용된

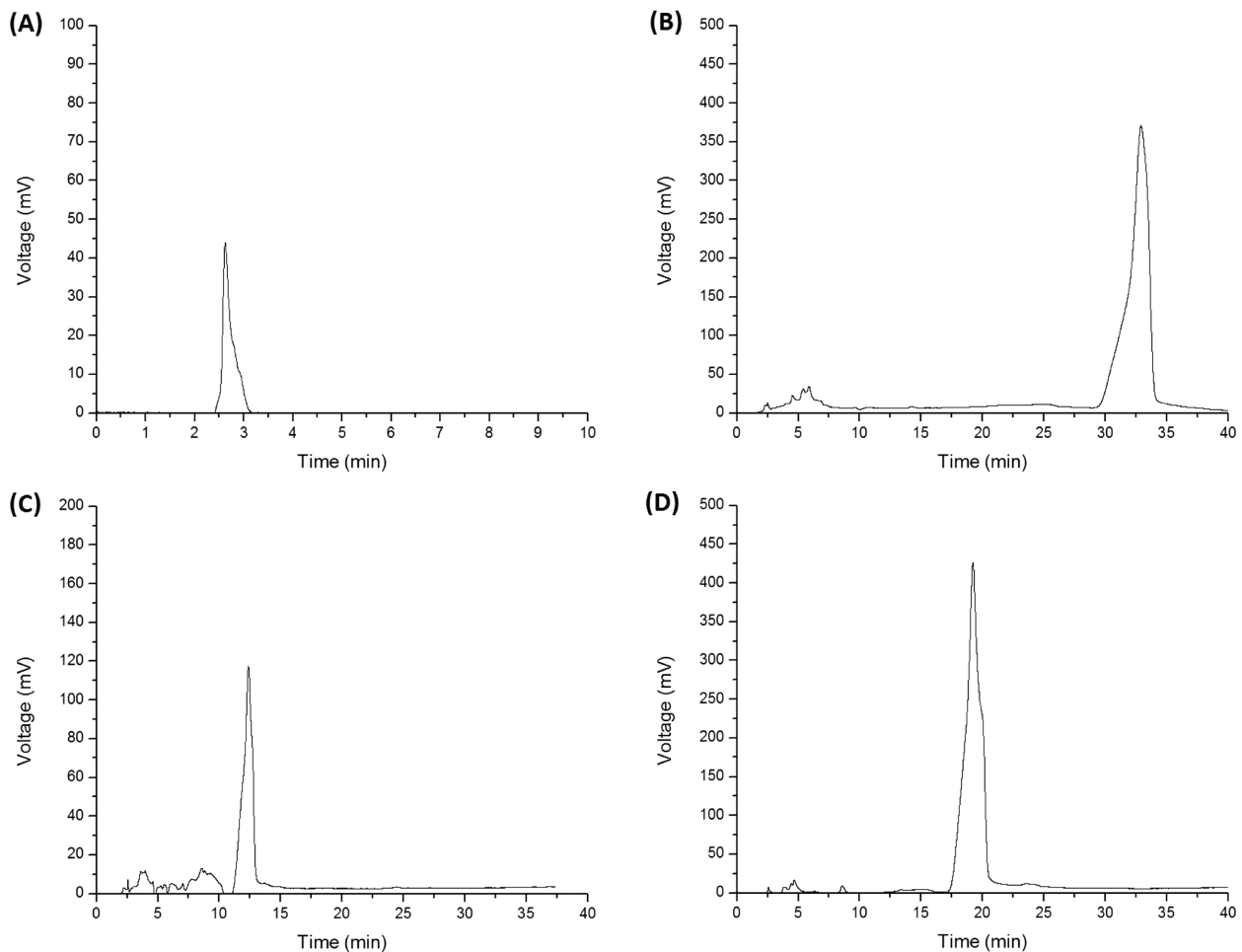


Fig. 3. Chromatograms of standard *d*-limonene solutions according to different HPLC mobile phases; (A) 90% n-hexane, (B) 75% methyl alcohol, (C) 85% methyl alcohol, and (D) 80% methyl alcohol.

Table 2. The polarity of each mobile phase composition

Solvent composition	Polarity
(1) n-hexane-ethyl alcohol (90:10, v/v)	0.61
(2) methanol-water (75:25, v/v)	7.20
(3) methanol-water (85:15, v/v)	6.96
(4) methanol-water (80:20, v/v)	7.08

d-limonene 표준시약의 순도가 97%임에도 불구하고 나머지 3%의 불순물 피크와 *d*-limonene 피크가 분리되지 않아 분석하기 어렵다고 판단하였다. Fig. 3B는 극성도 7.20의 메탄올-증류수(75:25, v/v) 이동상 조건으로 *d*-limonene 표준용액을 분석한 결과이다. 머무름 시간 10분 이전에 불순물 피크가 검출되었고, 머무름 시간 32분에서 *d*-limonene의 단일 피크가 검출되었다. 이동상의 극성도에 따른 검출 시간 차이는 이동상의 극성도가 높을수록 비극성인 고정상과 비극성인 시료의 결합력이 이동상과 시료의 결합력보다 강하기 때문에 검출이 늦어지는 원리이다. 이 조건에서는 *d*-limonene을 분리하기에는 용이하나 불순물 피크와의 시간차가 크기 때문에 분석 시간이 길어지는 단점이 있다. 메탄올-증류수 이동상의 조성은 (85:15, v/v) (극성도 6.96)으로 변경하여 1 mM *d*-limonene 표준용액을 분석한 결과를 Fig. 3C에 나타내었다. 이 경우 *d*-limonene 피크가 머무름 시간 12분이지만 여러 개의 작은 불순물 피크와 명확하게 분리가 안 된 것을 확인할 수 있다. Fig. 3D는 극성도 7.08의 메탄올-증류수(80:20, v/v) 이동상, 그 외의 조건은 변경하지 않은 상태에서 5 mM *d*-limonene 표준용액을 분석한 결과이다. *d*-limonene 피크의 머무름 시간은 19분으로 나와 Fig. 3B의 조건보다 분석시간이 단축되었고, 불순물과의 분리도 명확하기 때문에 추출시료를 분석하는 위한 HPLC 이동상은 메탄올과 증류수를 80:20으로 혼합한 용매를 선택하였다. 이 용매 조건에서 *d*-limonene 농도에 따라 피크면적을 나타내는 검량선을 얻은 결과, 수식은 $y(\text{mV}\cdot\text{s})=6858.4x-479.98$ 이었고, 상관계수 R^2 값은 0.9997이었다.

3-2. 용매별 추출 시료 분석

S Soxhlet 추출기에서 에탄올, n-헥산, 석유에테르를 용매로 하여 굴껍질 40 g을 120 °C에서 각각 1시간, 2시간, 4시간 동안 추출한 시료를 HPLC에서 정량분석 하였다.

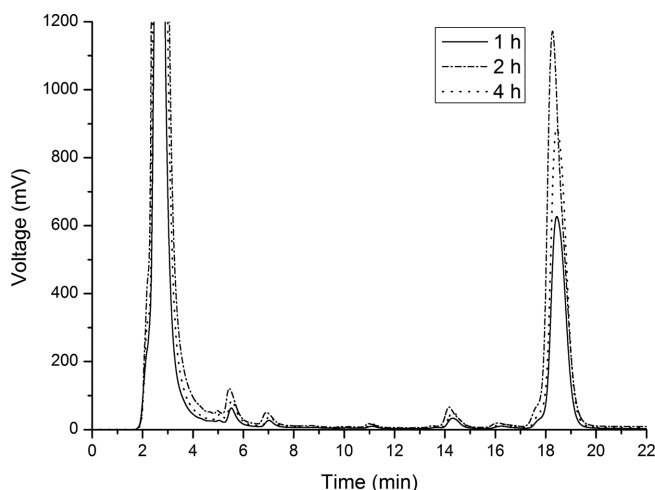
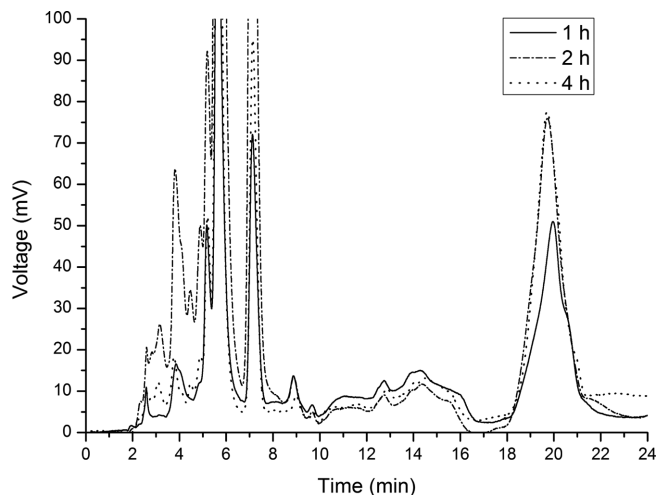
**Fig. 4. The chromatogram of extraction samples in ethyl alcohol.**

Fig. 4는 에탄올을 용매로 사용하여 1, 2, 4시간 동안 추출한 시료를 HPLC에서 분석한 결과이다. 초기에 추출시료를 분석했을 때, *d*-limonene으로 추정되는 피크가 신호 출력 범위를 초과해서 HPLC 시료를 2배 희석한 후, 다시 분석한 결과를 나타냈다. 머무름 시간을 보았을 때 2~8분 사이에 불순물로 추정되는 많은 피크들이 나타났고, 표준용액 분석 결과(Fig. 3D)와 마찬가지로 19분에 단일 피크가 검출되었다. 세 피크를 비교했을 때 피크의 폭은 모두 비슷했으나 1시간 추출 시료의 피크 높이가 가장 낮게 나타났고 2시간 추출 시료의 피크가 가장 높았다. 4시간 추출 시료의 피크는 2시간의 경우보다 조금 작은 피크가 검출되었다. 시간별 *d*-limonene 피크 면적을 적분한 결과, 1시간 추출 시료의 피크 면적은 $2.60 \times 10^4 \text{ mV}\cdot\text{s}$, 2시간 추출 시료는 $5.00 \times 10^4 \text{ mV}\cdot\text{s}$, 4시간 추출 시료는 $3.87 \times 10^4 \text{ mV}\cdot\text{s}$ 이었다. 검량선을 통해 *d*-limonene 농도를 추정한 결과 7.72, 14.72, 11.43 mM 이었고, 추출 후 남은 용매의 부피를 고려하여 실제 추출량을 계산한 결과 각각 171.99, 310.84, 225.69 mg의 *d*-limonene이 검출되었다.

Fig. 5는 n-헥산을 용매로 하여 120 °C에서 각각 1, 2, 4시간 동안 추출한 시료를 HPLC에 주입한 결과를 나타내는 크로마토그램이다. 에탄올추출물의 시료보다 다양한 불순물 피크가 발생했고, 머무름 시간 19분에 단일 피크가 검출되었다. 에탄올의 경우와 마찬가지로 1시간 추출 시료의 피크 높이가 가장 낮았으며, 2시간 추출 시료와 4시간 추출 시료의 피크 높이는 비슷하게 나타났다. 하지만 에탄올 추출 결과와 비교했을 때 폭은 2배가량 늘어났으나 높이는 1/12 정도로 비교적 작은 피크가 발생했다. 시간별 *d*-limonene 피크 면적을 적분한 결과, 1시간 추출 시료의 피크 면적은 $3.46 \times 10^3 \text{ mV}\cdot\text{s}$, 2시간 추출 시료는 $5.65 \times 10^3 \text{ mV}\cdot\text{s}$, 4시간 추출 시료는 $5.45 \times 10^3 \text{ mV}\cdot\text{s}$ 이었다. 검량선을 통해 *d*-limonene 농도를 추정한 결과 0.57, 0.89, 0.86 mM 이었고, 추출 후 남은 용매의 부피를 고려하여 실제 추출량을 계산한 결과 각각 12.80, 19.48, 20.02 mg의 *d*-limonene이 검출되었다.

마지막으로 석유에테르를 이용해 120 °C에서 1, 2, 4시간 동안 추출한 시료를 HPLC 분석한 결과를 종합하여 Fig. 6에 나타내었다. 불순물의 피크들은 같은 비극성 용매인 n-헥산에서의 피크들과 비슷했으며, 머무름 시간 19분에 리모넨이 검출되었다. 전체적인 피크의 높이는 세 가지 용매 추출 결과 중 가장 작은 피크 높이가 발생했다. 에탄올, n-헥산의 경우와 마찬가지로 1시간 추출 시료의 피크 높이가 가장 낮게 나타났고, 2시간 추출 시료의 피크가 가장 높게 나타났

**Fig. 5. The chromatogram of extraction samples in n-hexane.**

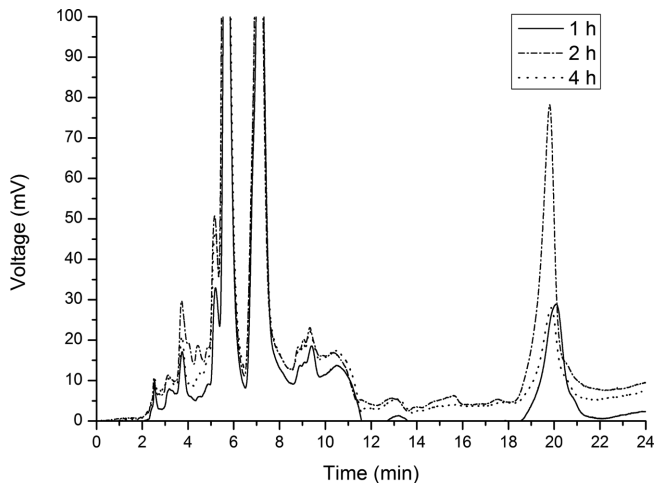


Fig. 6. The chromatogram of extraction samples in petroleum ether.

다. 4시간 추출 시료의 피크는 1시간, 2시간의 경우보다도 작은 피크가 검출되었음을 알 수 있다. 시간별 *d*-limonene 피크 면적을 적분한 결과, 1시간 추출 시료의 피크 면적은 1.67×10^3 mV·s, 2시간 추출 시료는 3.15×10^3 mV·s, 4시간 추출 시료는 1.18×10^3 mV·s 이었다. 검량선을 통해 *d*-limonene 농도를 추정한 결과 0.31, 0.53, 0.24 mM이었고, 추출 후 남은 용매의 부피를 고려하여 실제 추출량을 계산한 결과 각각 6.88, 11.18, 5.06 mg의 *d*-limonene이 검출되었다.

40 g의 감귤 껍질로부터 세 가지 용매를 이용해 *d*-limonene을 추출한 결과를 Table 3과 Fig. 7에 정리하였다. *d*-limonene을 분리하는 최적의 조건은 에탄올에서 2시간 동안 추출하는 방법이며, 이 때 감귤 껍질 1 g당 *d*-limonene 함량은 7.77 mg/g 이었다. 즉, 에탄올을 이용해 추출할 경우 나머지 두 용매를 이용해 추출하는 경우에 비해 더 많은 *d*-limonene을 얻을 수 있었다. 끓는점이 크게 차이가 나지 않는 세 용매에서 *d*-limonene 추출량을 비교했을 때, 에탄올 내에서의 *d*-limonene 함유량이 n-헥산 및 에테르의 함유량보다 현저하게 많은 것으로 보아 용매의 끓는점 보다는 극성도가 더욱 중요한 인자라는 것을 알 수 있었다. 에탄올에 비해 상대적으로 비극성 용매인 n-헥산과 석유에테르 용매에서 *d*-limonene의 용해도가 높기 때문에, 증류와 냉각을 반복한 추출 과정에서 용매와 함께 *d*-limonene 성분이 증발한 것으로 보인다. 상대적으로 *d*-limonene에 대한 용해도가 작은 에탄올 용매로 추출할 때 *d*-limonene이 증발되지 않고 둥근 플라스크에 남아있어 더욱 효과적으로 추출이 가능했던 걸로 보인다.

에탄올과 석유에테르의 경우 4시간 동안 추출한 시료의 *d*-limonene 함유량이 오히려 2시간 동안 추출한 시료보다 줄어들었음

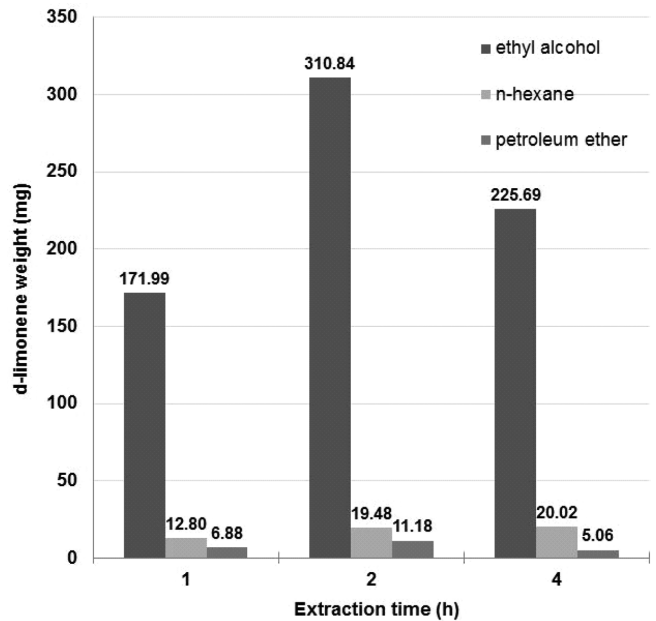


Fig. 7. Comparison of amounts of *d*-limonene according to extraction time in three solvents.

을 확인할 수 있었다. 이는 2시간까지 귤껍질 내에서 *d*-limonene이 지속적으로 추출되면서 함유량이 증가하면서 최대치에 도달한 후, 증발량이 추출량보다 많아지는 시간 때가 있어 양이 감소하는 것으로 보인다. n-헥산의 경우 4시간 동안 추출한 시료의 *d*-limonene 함유량이 2시간 동안 추출한 시료와 거의 비슷한 양을 함유하고 있었다. 이는 아직 증발량이 추출량보다 더 큰 시간을 지나지 않은 것으로 보인다. 하지만, *d*-limonene 함유량이 에탄올 추출물에 비해 낮은 농도이므로 극성도가 높은 에탄올에서의 추출이 가장 효율적인 방법이라는 것을 알 수 있었다. 추출조건의 최적화는 천연물 추출과 크로마토그래피 분석에서 필요한 실험방법으로 반응표면 분석법이 자주 사용된다[13,14].

4. 결 론

본 연구에서는 Soxhlet 추출을 이용하여 감귤 껍질을 추출할 때 용매의 종류와 추출 시간이 *d*-limonene 추출량에 미치는 영향을 알아보고, 그에 따른 최적의 추출 조건을 조사하였다. 추출 용매로 에탄올, n-헥산, 석유에테르를 사용했고, 각 용매마다 추출 시간을 1시간, 2시간, 4시간으로 두었다. 추출 시료를 HPLC에서 분석한 결과,

Table 3. Results of *d*-limonene extraction using three solvents

Solvent	Extraction time (h)	<i>d</i> -limonene concentration (mM)	<i>d</i> -limonene weight (mg)	<i>d</i> -limonene yield (mg/g tangerine peel)
Ethyl alcohol	1	7.72	171.99	4.30
	2	14.72	310.84	7.77
	4	11.43	225.69	5.64
n-hexane	1	0.57	12.80	0.32
	2	0.89	19.48	0.49
	4	0.86	20.02	0.50
Petroleum ether	1	0.31	6.88	0.17
	2	0.53	11.18	0.28
	4	0.24	5.06	0.13

세 용매 중 극성도가 가장 높은 에탄올을 추출 용매로 하여 2시간 동안 추출했을 때 7.77 mg/g의 수율로 *d*-limonene이 가장 많이 추출된 것으로 나타났다. 이를 통해 Soxhlet 추출기와 같은 연속증류 추출 방법을 사용하여 감귤 껍질로부터 *d*-limonene을 추출할 때는 껍질에서 추출되는 양과 증발로 인한 손실되는 양을 모두 고려한 최적시간인 2시간에 근접한 시간을 선택하고, 용매는 *n*-헥산이나 석유에테르와 같은 무극성 용매보다는 에탄올과 같은 극성 유기용매를 선택하는 것이 효과적이다.

감 사

본 연구는 2014년 충남대학교 자체연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Morse, M. A. and Toburen, A. L., "Inhibition of Metabolic Activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by Limonene," *Cancer Lett.*, **104**(2), 211-217(1996).
2. Budavari, S., *The Merck Index*, 7th ed., Merck, New Jersey(1989).
3. Langer, R. S. and Wise, D. L., *Medical Applications of Controlled Release*, 2nd ed., CRC Press, Florida(2004).
4. Rosen, H. B., Chang, J., Wnek, G. E., Linhardt, R. J. and Langer, R., "Bioerodible Polyanhydrides for Controlled Drug Delivery," *Biomaterials*, **4**(2), 131-133(1983).
5. Oh, E. H., Im, H. S. and Yoon, C. H., "A Study on the Antibiotic Effect Using the *d*-limonene Oil Extracted to Wasted Mandarin Peels in Cheju," *Journal of the Korean Oil Chemists' Society*, **26**(3), 350-356(2009).
6. Im, H. H., "Studies on Extraction of Limonene from Citron and Immunomodulation Activity of Limonene," M.S. Thesis, Hankyong National University, Ansong, Korea(2005).
7. Beak, J. I., Jin, S. Y. and Kim, I. H., "Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin by Using HPLC," B. S. Thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea(2009).
8. Wixom, R. L., *Chromatography*, Wiley Press, New York(2011).
9. Jung, I. K., Choi, D. Y. and Row, K. H., "Separation of Whey Proteins by Anion-exchange Membranes," *Korean J. Chem. Eng.*, **20**(3), 538-541(2003).
10. Nilsson, U., Bergh, M., Shao, L. P. and Karlberg, A-T., "Analysis of Contact Allergenic Compounds in Oxidized *d*-limonene," *Chromatographia*, **42**(3-4), 199-205(1996).
11. Zhang, R. L. Zhang, Q. and Xu, S. A., "Determination of Limonene in Spearmint Oil by HPLC Method," *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, **13**(2), 743-744(2012).
12. http://www.sanderkok.com/techniques/hplc/elutotropic_series_extended.html.
13. Yoon, C. W., Bok, H. S., Choi, D. K. and Row, K. H., "Optimization Condition of Astaxanthin Extract from Shrimp Waste Using Response Surface Methodology," *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**(3), 545-550(2012).
14. Lee, K. J., Choi, D. Y. and Row, K. H., "Extraction and Purification of Isoflavones from Korean Soybean and Soybean Paste," *Korean Chem. Eng. Res.*, **41**(5), 612-616(2003).