

## 추출방법에 의한 아니스의 휘발성 성분 조성 비교

이재곤\* · 권영주 · 장희진 · 곽재진 · 김옥찬 · 최영현

한국인삼연초연구원 화학부

**초록 :** 식물체의 향기성분을 분리하는데 사용되는 몇가지 방법을 비교하기 위해서 headspace(purge & trap)법, simultaneous distillation extraction(SDE)법, steam distillation법, 용매추출법 등으로 분리된 휘발성 성분의 조성 차이를 분석하여 각각의 사용된 방법들의 특징을 비교하였다. 휘발성 성분 분석시료로는 Anise(*Pimpinella anisum L.*)씨앗을 사용하였으며 분리된 휘발성분중 GC/MSD를 이용하여 43종의 성분을 확인하였다. Headspace (purge & trap)법에서는 휘발성이 강한 2-butanol, pentanal, 3-hexen-1-ol 등과 같은 alcohol류 및 aldehyde류 성분들을 주요성분으로 확인할 수 있었으며, 용매추출에서는 비점이 높은 성분들인 myristic acid, oleic acid 등의 acid류 성분들과 ethyl hexadecanoate, ethyl octadecanoate 등과 같은 ester 화합물들이 주요성분으로 확인되었다. SDE법과 steam distillation법에서 추출된 성분의 조성은 유사하였으며 terpene 화합물들이 주요성분으로 확인되었다. Anise의 주성분인 anethole은 SDE법, headspace(purge & trap)법으로 추출하였을 때 가장 많이 추출되었다.(1996년 10월 24일 접수, 1997년 1월 10일 수리)

### 서 론

식물체로부터 휘발성 성분을 분리하기 위해 headspace 분석법,<sup>1-3)</sup> simultaneous distillation extraction(SDE)법,<sup>4,5)</sup> steam distillation법,<sup>6)</sup> 용매추출법<sup>7,8)</sup> 등에 관해 많은 연구가 수행되어져 왔다. Headspace 분석법은 휘발성분을 흡착제에 흡착시킨 후 추출 및 농축단계를 거치지 않고 바로 GC에 투입하므로 비점이 낮은 휘발성 성분 분석시 용이하며,<sup>9)</sup> SDE법은 소량의 용매로 추출하면서 비교적 향기의 순실이 적은 장점이 있으나 시료를 추출하는 동안 고온을 유지해야 하므로 주요성분이 분해되어질 수도 있다.<sup>10,11)</sup> Steam distillation법은 정유성분을 대량제조시 주로 사용하며 추출된 휘발성 성분은 SDE장치에서 추출된 성분과 유사하다. 용매추출은 일반적인 성분 분석시 주로 이용되고 사용한 용매에 따라 추출되는 성분이 다르며 추출물을 농축할 때 저비점 성분들이 손실될 수 있다.<sup>12,13)</sup> 분석용 시료로 사용한 아니스는 7~8월 경에 흰꽃이 피고 9월 경에 열매를 맺는 일년생 초본식물로 중동지역이 원산지며 요즈음에는 유럽, 러시아, 아시아 등지에서 재배되고 있다.<sup>14)</sup> 아니스 씨앗은 특유의 맛과 향기를 지니고 있어 세계적으로 널리 이용되고 있는 기호성이 좋은 향신료의 하나로 essential oil, oleoresin의 형태로 유통되며 식용, 약용 또는 담배향료로 사용되고 있다.<sup>15)</sup> 아니스의 약리효능에 관한 연구로는 S.C. Tripathi 등<sup>16,17)</sup>이 아니스의 정유성분은 항진균성(抗真菌性), 구풍약(驅風藥), 이뇨제(利尿劑), 산통(疝痛) 등에 효능이 있다고 하였으며 Albert puleo<sup>18)</sup>는 아니스의 주성분 anethole의 polymer인 dianethole, photoanethole이 약리효과가 있다고 보고한 바 있다. 아니스의 휘발성분에 관한 연

구는 Fehr 등<sup>19)</sup>이 저장조건에 따라 정유성분의 일반성분을 검토하였고, Burkhardt G. 등<sup>20,21)</sup>은 아니스의 정유성분을 column chromatography하여 sesquiterpenes 성분을 중점적으로 연구하였으며 E. E. Langenau 등<sup>22)</sup>은 정유성분의 이화학적 성질에 관해 연구한 바 있다. 기타 학자들에 의하여 아니스의 휘발성분에<sup>23-27)</sup> 관해서 많은 연구가 수행되어져 왔으며 이들 휘발성분 추출시 사용한 방법은 대부분 SDE법을 사용하였다. 아직까지도 국내에서는 식물체로부터 향기성분 추출시 추출방법에 따른 연구가 극히 미비한 실정으로 저자들은 아ни스 휘발성분에 대한 체계적인 연구의 일환으로 추출방법에 따른 휘발성 성분의 조성차이를 조사하여 그 결과를 기초자료로 활용코자 한다.

### 재료 및 방법

#### 재료

본 실험에서 사용한 아니스(*Pimpinella anisum L.*) 씨앗은 1995년도에 네덜란드에서 수확한 것을 수집하여 사용하였으며, 시료는 수집 즉시 향기성분이 휘발되지 않도록 밀봉하여 저온에서 보관하면서 분석시료로 하였다.

#### 휘발성 성분의 추출

##### (1) Headspace(purge & trap)법

아니스 20 g에 20 ml의 증류수를 가하여 일본 Japan analytical industry사가 제작한 purge & trap 장치의 flask에 넣고 온도를 60°C 유지시키면서 N<sub>2</sub>를 50 mL/min의 유속으로 2시간 동안 불어넣어 휘발되는 성분을 tenax GR로 흡착시켜 분석용 시료로 사용하였다.

찾는말 : 추출방법, 아니스, 휘발성 성분

\*연락처자

## (2) Steam distillation extraction(SDE)법

아니스 300 g에 2 l의 증류수를 가하여 3 l flask에 넣고 Schultz 등<sup>28)</sup>의 방법에 따라 개량된 SDE(Likens & Nikerison type simultaneous steam distillation and extraction apparatus)장치를 사용하여 휘발성 성분을 2시간 추출하였다. 추출용매로서는 n-pentane:diethylether(1:1, v/v) 50 ml를 사용하였으며, 추출완료 후 무수황산나트륨으로 탈수시키고 30°C에서 감압농축하여 분석용 시료로 사용하였다.

## (3) Steam distillation법

아니스 10 Kg을 본 연구소에서 제작한 steam distillation장치(Fig. 1)에 넣고 steam을 1 Kg/cm<sup>2</sup>압력으로 2시간 동안 불어넣어서 수증기와 함께 추출된 휘발성 성분을 냉각시킨 후 oil총을 물총으로 부터 분리하여 무수황산나트륨으로 탈수시키고 분석용 시료로 사용하였다.

## (4) Solvent extraction법

아니스 500 g에 hexane 3 l를 가하여 45°C에서 8시간 추출한 후 감압농축한 농축물을 alcohol로 추출, 농축하여 분석용 시료로 사용하였다.

## 휘발성 성분의 분석

Headspace(purge & trap)법, SDE법, steam distillation법, 용매추출에서 얻어진 휘발성분은 GC/MSD에 의하여 분석하였다. 이때 사용한 기기는 HP5890/HP5970B 모델을 사용하였으며, column은 ULTRA2 fused silica capillary (50 m × 0.2 mm i.d.)을 사용하여 온도는 50°C에서 3분간 유지한 후 250°C까지 3°C/min으로 승온하였으며, injector 및 interface의 온도는 270°C, ionizing voltage 70 eV로 하였고 He유량은 0.8 ml/min으로 하고, 시료의 주입량은 0.2 μl를 split mode(split ratio=100:1)로 하였다.

Headspace(purge & trap)에 의해서 얻어진 휘발성분은 온도 -30°C에서 3분간 유지한 후 50°C까지 5°C/min으로 승온시키고 50°C에서 250°C까지는 2°C/min로 승온하였다. 시료를 GC/MSD에 주입할때는 일본 Japan analytical industry사가 제작한 purge & trap 장치의 JHS-100A 모델을 사용하였으며, 다른 분석조건은 위와 동일하다. 각 성분의

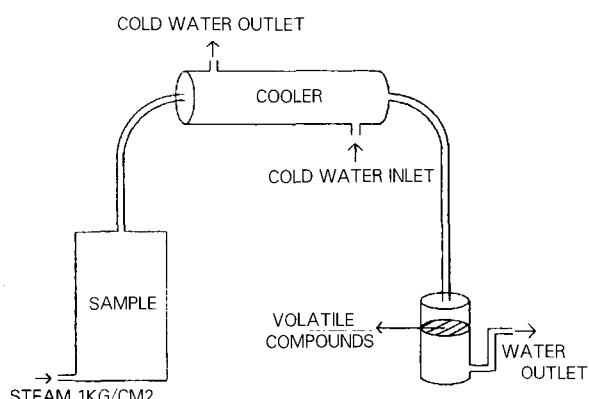


Fig. 1. Schematic apparatus of steam distillation used for the isolation of the volatile flavor compounds of Anise.

확인은 GC/MSD에 의해서 얻은 total ion chromatography에서 각 peak의 mass spectrum를 표준 mass spectrum과 비교하여 확인하였다.

## 결과 및 고찰

아니스로부터 휘발성 성분을 분석하고자 저비점 성분 분석시 용이한 headspace(purge & trap)법, 소량의 용매로 추출하면서 비교적 향기의 손실이 적은 장점이 있는 SDE 법, 대량의 정유성분 추출시 주로 사용하는 steam distillation법 그리고 용매추출을 이용하여 추출된 정유성분의 조성을 분석한 total ion chromatograms을 Fig. 2에 나타내었고, 분리된 peak를 GC retention time과 GC/MSD로 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. 추출방법별로 성분을 GC/MSD로 분석한 결과 43개의 성분을 확인하였다. Headspace 분석법은 전처리 방법에 따라 dynamic headspace, vacuum headspace, purge & trap 분석법으로 분류되며<sup>29)</sup> 본 실험에서는 이중 가장 최근에 개발된 purge & trap 분석법을 사용하여 SDE장치 등에서 추출하기 어려운 휘발성이 강한 2-butanol, pentanal, hexanal, 3-hexen-1-ol 등과 같은 alcohol류 및 aldehyde류 성분들을 확인할 수 있었다. SDE장치와 steam distillation장치에서는 20개의 성분을 확인하였으며 이중에서 α-pinene, limonene, fen-

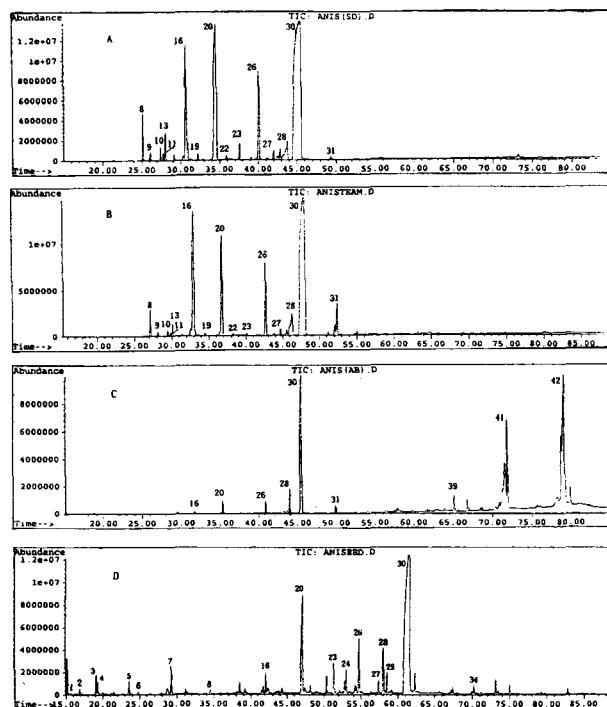


Fig. 2. Total ion chromatogram of anise (*Pimpinella anisum* L.) A, SDE procedure; B, Steam distillation procedure; C, Solvent extraction procedure; D, Headspace(purge & trap) sampling procedure. The oven temperature of A, B, C was initially 50°C for 3 min, then programmed at 3°C/min to 250°C. The oven temperature of D was initially -30°C for 3 min, then programmed at 5°C/min to 50°C, from 50°C to 250°C was programmed at 2°C/min to 250°C.

Table 1. Volatile components identified from the different extraction methods of Anise

Peak No.	components	Peak area (%)			
		Headspace	SDE	Steam	Solvent
1	2-Butanol	0.16			
2	Pentanal	0.34			
3	3-Methyl-1-butanal	1.22			
4	2-Methyl-1-butanol	0.74			
5	Hexanal	0.79			
6	3-Hexen-1-ol	0.15			
7	para-Xylene	1.83			
8	$\alpha$ -Pinene	0.30	1.69	1.48	
9	Camphephene		0.35	0.29	
10	Sabinene		0.52	0.32	
11	$\beta$ -Pinene	0.16	0.25	0.17	
12	2-Ethyl-1-hexanol	0.21			
13	$\beta$ -Myrcene		1.08	0.73	
14	Phellandrene		0.26	0.09	
15	para-Menth-1,3,5,8-tetraene		0.33	0.67	
16	Limonene	1.15	9.94	15.27	0.15
17	1,8-Cineole	0.44	0.59		
18	trans-Ocimene			0.08	
19	$\gamma$ -Terpinene	0.40	0.27	0.15	
20	Fenchone	9.94	19.62	10.22	0.87
21	$\alpha$ -Terpinolene	0.11			
22	Allocimene		0.23	0.18	
23	Camphor	1.92	0.67	0.17	
24	Borneol	0.67			
25	para-Menth-1-en-4-ol		0.13		
26	Estragole	3.86	6.29	6.41	0.85
27	Fenchyl acetate	0.14	0.35	0.44	
28	Cuminaldehyde	3.64	1.91	3.71	1.91
29	Anisaldehyde	0.32			
30	trans-Anethole	51.65	52.71	46.67	21.69
31	1-(4-methoxyphenyl)-2-Propanone		0.14	2.50	0.69
32	$\alpha$ -Cubene	0.25			
33	Tetradecane	0.36			
34	trans-Caryophyllene	0.52		0.15	
35	Pentadecane	0.24			
36	Hexadecane	0.12			
37	Heptadecane		0.14		
38	Myristic acid		0.48		
39	Ethyl tetradecanoate		0.91		
40	Ethyl pentadecanoate		0.22		
41	Ethyl hexadecanoate		6.94		
42	Oleic acid		23.22		
43	Ethyl octadecanoate		1.93		

chone, estragole, trans-anethole 등의 성분이 면적 비율이 높아 향기의 주성분으로 나타났고, 두 방법 간에 확인된 휘발성 성분들은 대부분이 유사하였다.

용매추출에서는 비점이 높은 성분들인 myristic acid, oleic acid 등의 acid류 성분들과 ethyl hexadecanoate, ethyl octadecanoate 등과 같은 ester 성분들이 주요성분으로 확인되었다. SDE장치와 steam distillation 장치에서 분리된 정유성분에서만 확인된 성분들은 camphephene, sabinene,  $\beta$ -myrcene, phellandrene, para-menth-1,3,5,8-

tetraene, allocimene 등이었다. Lawrence<sup>30)</sup>는 터키산 아니스 정유성분 중 24개의 휘발성 성분을 확인했는데 이중 linalool,  $\alpha$ -terpineol, safrole 등은 네팔산 정유성분에서는 확인되지 않았으며, 터키산에서 확인되지 않은 fenchone, limonene, camphor 등은 네팔산에서는 확인할 수 있었다. 이것으로 보아 재배지역에 따라 휘발성 성분의 차이가 있음을 알 수 있었다.  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene, camphor, fenchyl acetate 등은 용매추출법에서는 확인되지 않았으나 다른 3가지 추출방법에서는 확인되었다. 4가지 추출방법 모두에서 확인된 성분은 limonene, fenchone, estragole, cuminaldehyde, trans-anethole 등이었다. Fig. 2에서 아니스 주성분인 peak 30 trans-anethole은 headspace 방법, SDE방법에서는 약 52%인 반면 용매추출에서는 21.7 %로 낮게 나타났다. 이는 용매추출은 추출시간이 길고 감압동축하므로 휘발성이 강한 향기성분의 손실이 발생하기 때문이다. 이와같이 천연물로 부터 휘발성분 분석시 가장 적합한 방법은 4가지 방법간의 장단점은 있지만 휘발성이 강한 저비점 성분 분석이 용이한 headspace(purge & trap) 방법인 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Takeoka G. R., R. A. Flath, M. Guntert, and W. Jennings (1988) Vacuum steam distillation versus headspace sampling. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 553-560.
- Nunez A. J. and H. Maarse (1986) Headspace methods for volatile components of grapefruit. *Chromatographia*. **21**, 44-48.
- Doi Y., T. Tsugita, T. Kurata and H. Kato (1980) Changes of headspace volatile components of soybeans during roasting. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1043.
- Godefroot M., P. Sandra, and M. Verzere (1981) New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr.* **203**, 325-335.
- Nicherson G. B. and S. T. Likens (1966) Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *J. Chromatogr.* **21**, 1-5.
- Shoichi Kobayashi (1980) "A study of steam distillation," 香料, No.129, 65, 小川香料株式會社香粧研究所, 日本.
- Hardy P. J. (1969) Extraction and concentration of volatiles from dilute aqueous and aqueous-alcoholic solution using trichlorofluoromethane. *J. Agric. Food Chem.* **17**, 656-658.
- Marais J. and A. C. Hountman (1979) Quantitative gas chromatographic determination of specific esters and higher alcohols in wine using freon extraction. *Am. J. Enol. Vitic.* **30**, 250-252.
- Charalambous G. (1978) Ed. "Analysis of Foods and Beverages," Headspace Technique, Academic press, New York, U.S.A.
- Nunez A. J., J. M. H. Bemelmans and H. Maarse (1984) Isolation methods for the volatile components of grapefruit juice. Distillation and solvent extraction methods. *Chromatographia*. **18**, 153-158.

11. Frutos M. de, J. Sanz and I. Martinez Castro (1988) Simultaneous distillation extraction(SDE) method in the qualitative and quantitative GC analysis of cheese volatile components. *Chromatographia*. **25**, 861-864.
12. Maarse H. and R. Belz (1985) "Isolation and identification of volatile compounds in aroma research," D. Reidel publishing, Dordrecht, Holland.
13. Weurman C. (1969) Isolation and concentration of volatiles in food odor research. *J. Agric. Food Chem.* **17**, 370-384.
14. Lust B. (1973) "The herb book" p99-100.
15. Albert Y. (1995) 'Encyclopedia of common natural ingredients" p36-38
16. Singh S. P., H. S. Shukla, R. S. Singh and S. C. Tripathi (1986) *Natl. Acad. SciLett.* **9**, 97.
17. Chopra R. N., S. L. Nayar and I. C. Chopra (1956) "Glossary of Indian medicinal plants," C.S.I.R., p121, New Delhi.
18. Albert puleo M. (1980) Fennel and Anise as estrogenic agents. *J. Ethnopharmacol.* **2**(4), 337-344.
19. Fehr (1980) Untersuchungen zur Lagerstabilität von Anis Fenchel und Kummel. *Pharm. ztg.* **125**, 1300-1303.
20. Burkhardt G., J. Reichling, R. Martin and H. Becker (1986) Terpene hydrocarbons in *pimpinella anisum L.* *Pharm weekbl[SCI]*. **8**(3), 190-193
21. Fisher L., P. Tornow and B. Proper (1945) *Natl. Formulary Comm.* **13**, 6-10.
22. Langenau E. (1948) "The essential oil," Vol 1, p227, E. Guenther, Robert E. Krieger publishing co., Huntington, New York, U.S.A.
23. Guenther E. (1950) "The essential oil," Vol 4, D.Van Nostrand co., p563-570, New York, U.S.A.
24. Tsvetkov R. (1970) Study on the fruit quality of some umbelliferous essential oil plants. *Planta Med.* **18**, 350-353.
25. Wahba S. K. (1962) Analysis of some essential oils by gas liquid partition chromatography. *J. pharm sci.* **3**, 63-78.
26. Wakeil E., M. Khairy, S. Morsi, R. S. Farag, A. A. Shiha-taand and A. Z. M. A. Badel (1986) Biochemical studies on the essential oil of some fruits of Umbelliferae family. *Seifen-Ole-Fette-Wachse*. **112**, 77-80.
27. Embong M. B., D. Hadziyev and S. Molmar (1977) Essential oil from spices grown in Alberta Anise oil. *Can. J. plant sci.* **57**, 681-688.
28. Schultz T. H., R. A. Flath, T. R. Mon and Teranishi R. (1977) Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 446.
29. Nunez A. J., L. F. Gonzalez and J. Janak (1984) Pre-concentration of headspace volatiles for trace organic analysis by gas chromatography. *J. chromatogram.* **300**, 127-162.
30. Lawrence B. M. (1980) Progress in Essential oils(Anise oil). *Perf. Flav.* **8**(4), 63.

---

A Comparison of Different Extraction Methods for the Volatile Components of Anise(*Pimpinella anisum L.*)

Jae-Gon Lee\*, Young-Ju Kwon, Hee-Jin Jang, Jae-Jin Kwag, Ok-Chan Kim and Young-Hyun Choi (*Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea*)

**Abstract :** Different isolation methods for the volatile components of Anise(*Pimpinella anisum L.*) are compared in terms of the difference of components obtained with each analytical procedure. These methods include headspace(purge & trap) sampling procedure, simultaneous distillation extraction(SDE), steam distillation and solvent extraction. Total 43 components were identified by comparing gas chromatography retention time and mass spectral data. Different isolation techniques result in compositionally different isolates. The headspace(purge & trap) sampling procedure was found to be the best method of choice for a qualitative analysis of the volatile components.

**Key words :** extraction methods, *Pimpinella anisum L.*, volatile components

\*Corresponding author