

## 우슬 중 $\beta$ -Ecdysone의 초임계추출법(SFE)과 용매추출법의 비교

심재한\* · 김미라 · 김명석<sup>1</sup>

전남대학교 농과대학 농업과학기술연구소, 생물환경화학

<sup>1</sup>전남농업기술원 작물과

(2001년 6월 7일 접수, 2001년 7월 23일 수리)

우슬(*Achyranthis radix*) 중  $\beta$ -ecdysone의 초임계추출법과 용매추출법의 비교를 위해 초임계유체추출(SFE) 및 용매추출 후 초임계유체크로마토그래피(SFC)에 의한 우슬 중  $\beta$ -ecdysone 분석을 실시하였다. SFE에 있어서 추출 최적압력은 300 atm이었으며, 온도는 80°C, 추출량은 100 ml, 보조제인 methanol의 함량비율은 20%였다. 우슬에서  $\beta$ -ecdysone의 분석시 SFC의 최소검출량은 5 ng이었고, SFE의 회수율은 증기에서는 90.7~93.5%였으며, 뿌리에서는 77.8~81.9%였다. 용매추출의 회수율은 증기에서는 76.4~93.0%였고 뿌리에서는 80.6~93.1%였다. 우슬의 생육기별 조사에서  $\beta$ -ecdysone은 주로 뿌리에서 많이 검출되었고 1년생이면서 8월에 수확한 것이 654.9 ppm으로 가장 많이 함유한 것으로 나타났다.

**Key words:**  $\beta$ -Ecdysone, 우슬(*Achyranthis radix*), 초임계 유체추출(SFE), 용매추출법, 초임계 유체크로마토그래피(SFC)

### 서 론

쇠무릎(*Achyranthes japonica*)은 생약명으로는 우슬(*A. radix*)이라해서 동양삼국에서는 옛부터 이뇨, 진통, 구이혈, 요통 등의 치료에 쓰여져 왔다. 우리나라에서 생약으로 실용화되는 것은 쇠무릎이고 일부 남부지역에서는 긴잎쇠무릎(*A. longifolia*)도 쓰이고 있다. 일본산우슬(*A. fauriei*)에서 ecdysteroid의 존재가 보고되었으며 이 종자에서는 mantanic acid 와 linoleic acid 등의 분리에 관한 보고가 있다.

Ecdysteroid는 ecdysone(2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,22R,25-pentahydroxy-5 $\beta$ -cholest-7-en-6-one)에 관계된 polyhydroxyecdysteroid군을 형성하며 곤충의 성장과정에서 그의 생산은 짧은기간에 시작되고 조절되므로 곤충생리학자나 해충방제의 새로운 방법을 모색하는 이들에게 ecdysteroids의 동정과 정량은 많은 관심을 가져왔다. 지금까지 곤충이나 갑각류와는 달리 식물체에서 높은 수준의 ecdysteroids를 *Kaladana* 종자와 소나무 *podocapus slatus*의 껍질에서 분리하기도 하였다.

용해성 유기화합물의 비용해성물질로부터의 추출은 용매로 시료를 진탕하거나 여과하는 방법으로 수행해왔다. 일반적으로 쓰여진 방법이 Soxhlet추출인데 이 추출법은 계속해서 가열해야하기 때문에 천연물 중 열에 약한 용질을 분해하고 많은 양의 용매를 필요로 한다는 단점이 있다.<sup>1)</sup>

이러한 단점을 보완하기 위해 최근에 널리 사용되는 방법이 supercritical fluid extraction(SFE)이다. SF는 임계점 이상의 상태에 있는 물질로서 CO<sub>2</sub>가 값이 싸고 쉽게 임계점에 도달할 수 있는 장점 때문에 널리 사용되고 있다. SFE가 가지고 있는 문제들 중 압력을 낮춘 후 초임계로부터 분석물을 효율적으로

모으는 것이 어려움의 하나로 알려져 왔다. 용질의 초임계용매에 대한 용해성이 SFE의 성공적 선결조건 중 하나이며, 이는 SFE의 분배단계 중 용질의 추출용매에 대한 용해성, 세포조직과 용질간 상호작용을 중단시키는 추출용매의 능력에 따라 조절된다. 탈피호르몬의 초임계용매에 대한 용해성 결과는 거의 없다. 그래서 사용할 수 있는 것이 보조용매인 메탄올의 첨가가 있는데 이에 적절한 비율의 보조용매에 대한 검토 및 추출효율과 감도, 분리효율에 관한 연구결과를 필요로 한다. 초임계 추출에 관한 연구보문으로는 Djanmati 등<sup>2)</sup>이 초임계 CO<sub>2</sub>추출에 의해 세이지로부터 높은 항산화력이 있는 물질을 추출하여 BHT보다 높은 항산화능을 확인한 것이 있고 Pearce 등<sup>3)</sup>이 딸기 중의 유기인계, 유기염소계 농약잔류를 위한 초임계추출을 행하여 74~126%의 회수율을 보여 초임계추출법이 용매추출법보다 훨씬 경제적이고 환경친화적이며 빠른 추출법이라는 것을 보여주었다. 이외에도 헝가리의 과학자는 마리화나 시료 중 중성 cannabinoids를 SFE로 추출하는데 최적조건을 구하여 20~35분에 95%의 회수율로 추출하였다고 보고하였다.

한편 SFE 자체의 검토로는 "off-line" SFE를 행하여 최대한 농축된 용질용액을 얻어내서 감도를 높였다는 연구보고<sup>4)</sup>가 있었고, 항산화성 방향족아민의 타이에르무로부터 분리에 SFE추출법을 사용하여 여러 가지 조직의 성질을 조사한 결과 추출하고자하는 물질의 성질에 따라 추출효율이 다르게 나온다는 것을 발표한 보고<sup>5)</sup>도 있었으며, Sangenti 등<sup>6)</sup>은 천연물 중에서 시료의 조제에 있어 간단한 초임계추출법의 고안에 관하여 연구하는 등 SFE에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 또한 초임계 용매크로마토그래피(SFC)가 탈피호르몬 분석에 사용되어져 왔는데 이 방법은 HPLC방법보다 용매가 적게 들고 분리능이 좋고 보유시간이 짧은 것이 특징으로 알려져 있다. Ecdysteroid 중 20, 22 위치에 있는 OH기를 boronic acid로 ester화하여  $\beta$ -ecdysteroid를 분석한 연구<sup>7)</sup>도 있다.

\*연락처

Phone: 82-62-530-2135; Fax: 82-62-530-2139

E-mail: jhshim@chonnam.chonnam.ac.kr

이에 본 연구에서는 천연항암제인 우슬<sup>8-14)</sup>의 생육기간 중 새로운 호르몬의 분리 및 동정을 하는데 있어 보다 효율적인 추출 및 정량기술을 개발하기 위해 최근 외국에서는 널리 사용되고 있고 간편하며 환경친화적인 방법으로 잘 알려진 SFE의 최적조건을 결정하여 이 결정된 SFE법과 용매추출법에 의해 식물체 중 탈피호르몬의 추출을 행하고 이 추출물의 정량분석은 SFC로 행하고  $\beta$ -ecdysone의 변화양상을 조사하여 천연물 농약 개발을 위한 기본단계로 천연생리활성물질 탐색연구의 기초자료를 얻고자 한다.

## 재료 및 방법

**우슬.** 1996년 4월 1일 전라남도 나주시 산포면 전남농업기술원 포장에 파종하여 재배한 후 수확일을 달리하여 각각 8월 20일, 9월 20일, 그리고 10월 10일 수확하고, 1997년에도 마찬가지로 4월 1일 같은포장에 파종하여 재배한 후 수확일을 달리하여 각각 8월 20일, 9월 20일, 그리고 10월 10일에 수확하여 줄기와 뿌리로 구분하고, 시료를 음건 후 Ball Mill(Shin Myung Electricity Co., Korea)을 사용하여 마쇄하였다.

**시약 및 기기.**  $\beta$ -Ecdysone은 Biocenter(Hungary)에서 구입하였고, Sep-Pak LC<sub>18</sub>은 Supelco(USA)제품이며 SFE와 SFC에 사용된 액화 CO<sub>2</sub>는 신정가스(Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 그 밖의 용매는 HPLC용을 사용하거나 시약특급을 재증류하여 사용하였다. Supercritical Fluid Extractor(SFE)와 Supercritical Fluid Chromatograph(SFC)는 일본 Jasco사의 기기로써, 두 개의 PU-980모델의 HPLC 펌프를 사용하여 CO<sub>2</sub>와 보조용매인 methanol의 유속을 유지하였고, 검출기는 UV-970/975 모델의 검출기를 사용하여 측정하였으며, 880-81모델의 back pressure regulator를 이용하여 압력을 일정하게 유지시켰다. 컬럼은 silica 25 cm×4.6 mm를 사용하였다. 용매 추출 후 농축은 Rotary Vacuum Evaporator(Büchi, Switzerland)와 Nitrogen Vacuum Evaporator(Eyela Co., Japan)를 이용하였으며, 시료의 동결건조를 위해 Freeze-Dryer(II-Sin Engineering, Korea)와 Deep Freezer(Dongwon Precision Co. Ltd., Korea)를 사용하였다.

**SFE의 최적조건 결정.** 이동상인 CO<sub>2</sub>의 양, 보조제인 methanol의 양, 컬럼온도의 온도와 압력 등을 달리하여 최적조건을 결정하였다. 우슬시료 1g을 추출용 cell에 넣어 앞서 실험된 최적조건하에서 100 ml까지 추출하고 이를 농축하여 methanol 3 ml로 용해시켜 -4°C에서 보관하여 사용하였다. 회수율은 무처리시료 1g에 표준용액 2 ml를 가하여 용매를 날려 보낸 후 SFE 최적추출조건하에서 추출하였다.

**용매추출의 최적조건 결정.** 우슬시료 3g을 60 ml methanol로 진탕기에서 30분간 진탕한 후 büchner funnel에 여과지와 celite 1g을 깔고 감압여과하여, 40 ml의 methanol로 잔사를 세척하고 여과된 액을 농축하였다. 농축된 액은 증류수 20 ml로 녹여 분액여두에서 chloroform 20 ml로 분배추출하고 얻어진 수용액층을 동결건조시켰다. 동결건조된 시료를 물 2 ml로 용해하여 Sep-Pak LC<sub>18</sub>을 통과하여 60% MeOH/H<sub>2</sub>O를 넣어 용출시킨 용액을 질소농축하여 SFC 분석 전까지 -4°C에서 보관하

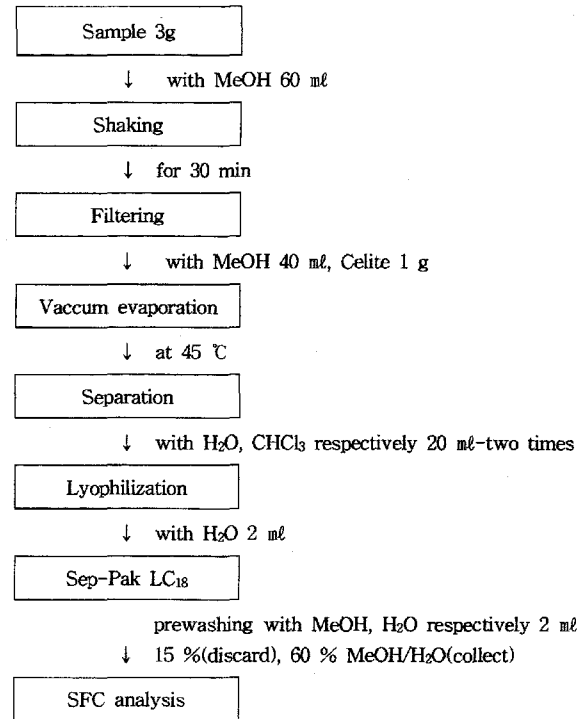


Fig. 1. Procedure for solvent extraction of  $\beta$ -ecdysone from *A. radix*.

여 사용하였다. 회수율은 무처리시료 3g에 대하여 표준용액 3 ml씩을 가하여 하룻밤 방치 후 추출 및 정제과정을 위 과정과 동일하게 실시하여 표준용액의 chromatogram과 비교하였다 (Fig. 1).

**수확시기별 우슬에서  $\beta$ -ecdysone의 SFC 분석.** 우슬시료를 지상부와 뿌리 그리고 1년차와 2년차로 나누어 수확된 시료에서  $\beta$ -ecdysone의 변화양상을 알아보기 위하여 앞서 확립한 최적조건하의 SFE와 용매추출을 행한 후 SFC 분석을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

**SFE의 최적추출조건.** 우슬에서  $\beta$ -ecdysone을 정량하기 위한 SFE의 최적 추출조건을 결정하기 위해  $\beta$ -ecdysone 10 ppm을 무처리시료에 처리하여 추출을 실시하였다. SFE 추출조건에는 압력, CO<sub>2</sub>의 양, 온도와 보조제인 methanol의 양이 있는데, 압력은 300 atm에서, 전체 유속은 3 ml/min하에서 추출액량이 100 ml가 될 때까지, 온도는 40, 80°C에서 추출하였고 보조제의 양은 전체 유속의 5, 10, 15, 20%에서 흘러주는 조건으로 최적 추출조건을 검사하였다. 그 결과 보조제의 흐름을 전체유속의 20%로 일정하게 유지한 상태에서 온도는 80°C에서 추출했을 때 가장 많은 83.8%의  $\beta$ -ecdysone이 추출되었고, 온도가 40°C, methanol양이 전체 유속의 5%였을 때 가장 적은 25.3%의  $\beta$ -ecdysone이 추출되었다 (Fig. 2). 이 결과는 Barth 등<sup>15)</sup>이 당근으로부터 carotenoid를 SFE로 추출시 압력을 300, 400 그리고 500 atm에서, 온도는 30, 40 그리고 50°C, 보조제인 EtOH은 5, 10%에서 추출해 본 결과 최적조건은 300 atm, 50°C, 10% EtOH에서 가장 높은 양인 605 ppb의  $\alpha$ -carotene과

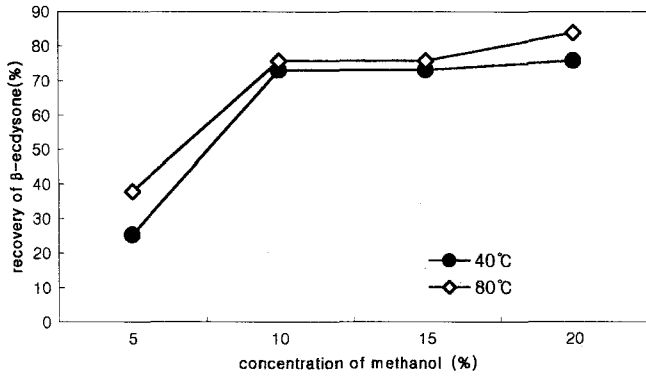


Fig. 2. SFE screening of  $\beta$ -ecdysone from *A. radix* as affected by the temperature and percentage of methanol.

485 ppb의  $\beta$ -carotene을 추출하였고 Scott 등<sup>16)</sup>이 옥수수에서 aflatoxin B<sub>1</sub> 추출 시, 압력은 136, 340 그리고 510 atm에서, 온도는 40, 80°C, 보조제인 CH<sub>3</sub>CN/MeOH(2:1, v/v)은 5, 10, 15% 중 340 atm의 압력과 80°C의 온도, 15%의 MeOH에서 가장 많은 양인 505 ppb가 추출되었다고 보고한 것처럼 본 실험에서도 조사된 압력, 온도와 보조제 조건 중 높은 압력, 많은 보조제 함량, 그리고 높은 온도조건인 300 atm, 80°C 그리고 보조제 20%에서 최적조건을 확립할 수 있었다.

**SFE와 용매추출에 의한 회수율.** 저농도와 고농도의  $\beta$ -ecdysone을 무처리 시료에 처리한 후 SFE로 회수율실험을 행한 결과, 줄기에서는 저농도인 10 ppm에서 평균 93.5%의 회수율을 보였고, 20 ppm에서는 90.7%의 회수율을 보였다(Fig. 3). 뿌리에서 저농도에서는 81.9%, 고농도에서는 77.8%의 회수율을 보여 줄기와 뿌리 모두 75%이상의 높은 회수율을 보여주었다. 5, 10 ppm의  $\beta$ -ecdysone을 무처리시료에 처리한 후 용매추출로 회수율 실험을 행한 결과, 줄기의 저농도에서는 93.0%, 고농도에서는 76.4%의 회수율을 보였고, 뿌리의 경우 저농도에서는 93.1%, 고농도에서는 80.6%로 줄기와 뿌리 모두에서 SFE와 비슷한 75%이상의 회수율을 보여주었다. 이 회수율 실험에서는  $\pm 2.2\sim 13.7$ 의 표준편차를 나타내었으며, SFE와 용매추출시 회수율실험의 농도에 차이가 있는 것은 각기 실험에 사용되는 우슬의 양이 달라 이의 보정을 위해서 1g과 3g으로 실시하였다.

**SFC 최적분석조건.** Shim 등<sup>7)</sup>이 실시한  $\beta$ -ecdysone의 SFC 분석조건을 바탕으로 하여 세 가지 컬럼인 silica 4.6 mm  $\times$  15 cm, silica 4.6 mm  $\times$  25 cm, C<sub>18</sub> 컬럼에서 분석을 실시하였고, 압력은 250, 290 atm에서, 컬럼온도 온도는 60, 80°C에서, 유속은 2, 3, 4 ml/min 그리고 modifier 함량은 20, 25%조건에서 조사해 본 결과, silica 4.6 mm  $\times$  25 cm 컬럼과 압력은 290 atm, 온도는 80°C, 유량은 2 ml/min, 그리고 modifier 함량을 25%로 했을 때 피크의 머무름 시간이 7.8 min이었고, 회수율이 96.7%를 보여, 이 조건에서 각각 SFE와 용매추출에 의해 얻어진 수확시기별 우슬의 분석을 실시하였으며, 이 결과  $\beta$ -ecdysone의 SFC 최소검출량은 5 ng이었다.

**생육시기별 우슬 중에 존재하는  $\beta$ -ecdysone의 SFE에 의한 추출결과.** 생육시기별로 수확한 우슬에서  $\beta$ -ecdysone의 SFE-

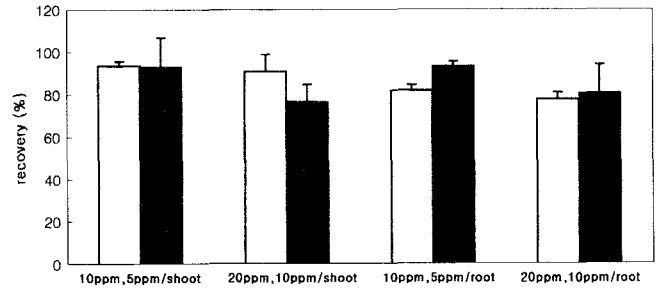


Fig. 3. Recovery of  $\beta$ -ecdysone from *A. radix* as affected by the SFE (□) and Solvent extraction (■). (mean and standard deviation of triplicate determinations)

SFC 정량결과 1년생 8월에 수확한 뿌리에서 654.9 ppm으로 가장 많은 양의  $\beta$ -ecdysone이 존재하는 것으로 나타났고, 2년생 10월에 수확한 우슬 지상부에서 311.8 ppm이 추출되어 가장 적은 양의  $\beta$ -ecdysone이 존재하는 것을 알 수 있었다.  $\beta$ -ecdysone은 뿌리에서 1년생을 보면 8월 수확시료가 654.9 ppm, 9월시료가 600.0 ppm, 그리고 10월시료가 540.0 ppm으로 10월 수확시료 중  $\beta$ -ecdysone양이 가장 적게 존재함을 알 수 있었고, 2년생의 경우도 8, 9, 10월 수확시료의  $\beta$ -ecdysone값이 각각 563.8, 460.2, 337.6 ppm이 존재하는 것으로 나타나 1년생과 비슷한 추이를 보였으며, 2년생에 비해 1년생이 더 많은  $\beta$ -ecdysone을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 지상부는 1년생으로 8월 20일 수확시료가 550.0 ppm으로 가장 많은  $\beta$ -ecdysone을 함유하고 있으며, 2년생이며 10월 수확시료가 311.8 ppm으로 가장 적은 양을 함유한 것을 알 수 있었다(Fig. 4). Robert<sup>17)</sup>는 지렁이의 번데기에서 성충으로 변하는 시기에 곤충체내에 ecdysteroids가 존재시 정보세포의 성장률에 따른 ecdysteroid의 농도변화에 대한 실험을 통해  $\beta$ -ecdysone은 번데기 중기인 즉, 정보세포의 성장률이 70%선인 12일째에 최대값을 보이다가 시간이 흐를수록 줄어들어 성장이 끝난 뒤인 18일경에는 없어지게 된다는 실험결과를 보고하였는데, 본 실험의 식물은  $\beta$ -ecdysone이 식물성장호르몬으로 작용하여 성장중기인 8월경에 수확한 시료에서 최대값을 보이다가 성장이 끝난 10월경에 수확한 시료에서는 그 양이 줄어든 것으로 생각된다. 또한 Ogawa 등<sup>11)</sup>에 의하면 *Achyranthes rubrofusca* (Okinawa산)에  $\beta$ -ecdysone이 18.7 ppm이 존재하는 것으로 보고하였지만, 본 실험에서는  $\beta$ -ecdysone이 655 ppm까지 분석되어 일본종에 비해 35배 정도 많이 함유한 것으로 나타나 이를 이용하여 곤충이나 식물의 생리활성연구를 하는데 유용하게 이용될 수 있으며 이를 활용한 생물농약의 개발에 관한 연구로도 확대해볼 가치가 있는 것으로 생각된다.

**생육시기별 우슬 중에 존재하는  $\beta$ -ecdysone의 용매추출에 의한 추출결과.** 우슬 중  $\beta$ -ecdysone의 양을 결정하는데 먼저 용매추출에 의해 추출한 후 SFC로 분석을 행한 결과,  $\beta$ -ecdysone은 1년생 8월 20일에 수확한 뿌리에 623.6 ppm으로 가장 많이 존재하는 것으로 나타났고, 1년생 10월 10일에 수확한 지상부에서 179.8 ppm으로 가장 적게 존재하였다. 전체적으로 SFE결과와 비슷한 경향을 보여주고 있으나, 두 가지 추출법의 결과를 비교해볼 때 5.6~147.2 ppm의 차이를 보이고 있어 이는 우

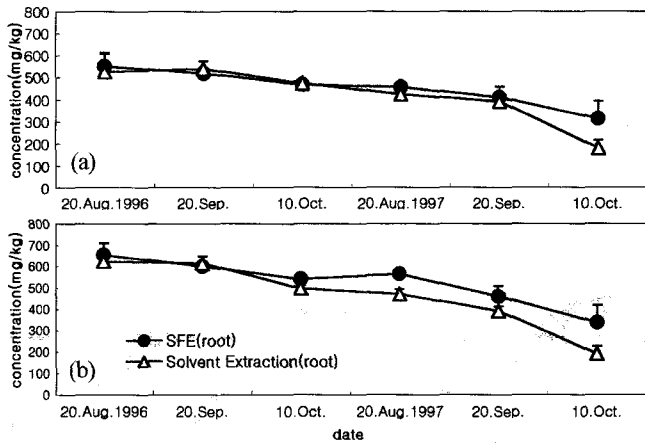


Fig. 4. Concentration of  $\beta$ -ecdysone in the shoot(a) and root(b) of *A. radix* at different harvest time. (mean and standard deviation of triplicate determinations)

슬이 생물시료인 관계로 다소간 차이가 나타난 것으로 생각된다(Fig. 4).

$\beta$ -Ecdysone의 정량과는 다른 측면인 환경과 경제성을 고려해 볼 때 우슬 중  $\beta$ -ecdysone의 추출시, 용매추출은 환경에 유해한 용매류인 methanol과 chloroform이 170 ml가 소요되는데 비해 SFE에서는 methanol 25 ml만이 소요되어 6.8배의 용매절약 효과와 더불어 비용절감과 환경오염방지에 크게 기여하며 용매 추출 시 동결건조로 인한 시간소요로 9시간이 요구되나 SFE는 단지 1시간이면 추출이 가능하였다. 이러한 예는 여러 실험결과에서도 볼 수 있었으며 Barth 등<sup>15)</sup>에 의한 당근으로부터 carotenoid의 추출시 일반용매추출에 비해 200 ml의 용매가 소비되고 6시간이 걸리는데 비해 SFE에서는 40 ml의 용매와 1시간의 분석시간이 소요되어졌다고 보고하였으며, Meyer 등<sup>18)</sup>은 가죽으로부터 pentachlorophenol의 잔류량 측정시 soxhlet 추출에 300 ml의 용매와 2일의 분석시간이 소요되었지만 SFE의 경우 50 ml의 용매와 3시간의 시간이 소요되었다고 보고한 실험결과와 유사하게 본 실험에서도 용매와 분석시간이 감소되었음을 보여주었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 추출시 장시간이 소요되고 고가의 비용이 들며, 환경오염원의 발생등을 유발하는 용매추출보다는 환경보존형이며 경제적인 SFE법에 대한 연구 및 검토가 많이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 1997년도 전남대학교 학술연구비에 의해 이루어진 결과의 일부로서, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Wilson, I. D., Morgan, E. D. and Murphy, S. J. (1990) Sample preparation for the chromatographic determination of ecdysteroids using solid-phase extraction methods. *Analytica Chem. Acta.* **236**, 145-155.
- Djarmati, Z., Jankor, R. M., Schwirich, E., Djulinac, B. and Djordjevic, A. (1991) High antioxidant activity of extracts obtained from Sage by supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *JAOC.* **68**, 731-734.
- Pearce, K. L., Trenerry, V. C. and Were, S. (1997) Supercritical fluid extraction of pesticide residues from strawberries. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 153-157.
- Vejrosta, J., Ausorgova, A., Mikesova, M. and Bartle, K. D. (1994) Sensitivity enhancement in dynamic "off-line" supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr.* **659**, 209-212.
- Janda, J. K., Vejrosta, J. and Bartle, K. D. (1994) Supercritical fluid extraction and chromatography of aromatic amines. *J. Chromatogr.* **669**, 241-245.
- Sargenti, S. R. and Laucas, F. M. (1994) Design and construction of a simple supercritical fluid extraction system with semi-preparative and preparative capabilities for application to natural products. *J. Chromatogr.* **667**, 213-218.
- Shim, J. H., Wilson, I. D. and Morgan, E. D. (1993) Boronic Esters as derivatives for supercritical fluid chromatography of ecdysteroids. *J. Chromatogr.* **639**, 281-285.
- Hahn, D. R. and Lee, M. W. (1991) Studies on the constituents of *Achranthis radix* (I). *Yakhak Hoeji.* **35**(6), 457-460.
- Ida, Y., Katsumata, M., Satoh, Y. and Shoji, J. (1994) Glucuronide saponins of oleanolic acid from *Achranthis fauriei* roots. *Planta Med.* **60**, 286-287.
- Kim, M. S., Park, G. C., Chung, B. J., Park, T. D., Kim, C. C. and Shim, J. H. (1997) Effect of different sowing date and black P.E. mulching on growth, yield and germination characteristics of *Achyranthes japonica* N. *Kor. J. Medi. Crop. Sci.* **5**(2), 91-94.
- Ogawa, S., Nishimoto, N., Okamoto, N. and Takemoto, T. (1971) Studies on the constituents of *Achyranthis radix* (VIII), The insect-moulting substances in *Achyranthes* genus. *Yakugaku Zasshi.* **91**(9), 916-920.
- Takemoto, T., Ogawa, S., Nishimoto, N., Hirayama, H. and Taniguchi, S. (1968) Studies on the constituents of *Achyranthis radix* (VII), The insect-moulting substances in *Achyranthes* and *Cythula* genera. *Yakugaku Zasshi.* **88**(10), 1293-1297.
- Takemoto, T., Ogawa, S., Nishimoto, N., Yen, K. Y., Abe, K., Sato, T., Osawa, K. and Takahashi, M. (1967) The isolation of ecdysterone from the radix of *Achyranthes obtusifolia* L. *Yakugaku Zasshi.* **87**(12), 1521-1523.
- Han, D. S. (1993) In *Pharmacognosy*. DongMyungSa, Seoul, pp. 217-218.
- Barth, M. M., Zhou, C., Kute, K. M. and Rosenthal, G. A. (1995) Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot tissue. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2876-2878.
- Scott, L. T., King, J. W., Richard, J. L. and Greer, J. I. (1993) Analytical-scale supercritical fluid extraction of Aflatoxin B1 from field-inoculated corn. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 910-913.
- Robert, P. B. (1986) Ecdysteroid hormone levels in the pupa of the bertha armyworm, *mamestra configurata* colk, during spermatogenesis. *J. Insect Physiol.* **32**(11), 931-935.
- Meyer, A. and Kleibohmer, W. (1995) Determination of pentachlorophenol in leather using supercritical fluid extraction with in situ derivatization. *J. Chromatogr.* **718**, 131-139.

---

**A Comparative Study on the Solvent Extraction and Supercritical Fluid Extration Method of  $\beta$ -Ecdysone in *Achyranthis radix***

Jae-Han Shim\*, Mi-Ra Kim and Myong-Seok Kim<sup>1</sup> (*Inst. of Agricultural Sci. and Tech., Faculty of Biol. and Environ. Chemistry, College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea; <sup>1</sup>Chollanamdo Provincial Agricultural Technology Institute, Sanpo-Myun, Naju 570-170, Korea*)

**Abstract :** Extraction efficiency of  $\beta$ -ecdysone in *Achyranthis radix* was investigated using the methods of solvent extraction and supercritical fluid extraction (SFE). The optimum SFE conditions for the analysis of  $\beta$ -ecdysone in *A. radix* were 300 atm, 80°C, 100 ml of extraction volume, and 20% ratio of modifier(methanol). As revealed through SFE, detection limit of  $\beta$ -ecdysone in *A. radix* was 5 ng and recoveries of  $\beta$ -ecdysone in *A. radix* shoots and root were 90.7~93.5% and 77.8~81.9%, respectively. Recoveries of  $\beta$ -ecdysone in *A. radix* shoots and root through solvent extraction were 76.4~93.0% and 80.6~93.1%, respectively.  $\beta$ -Ecdysone content was determined to be highest at 654.9 ppm in the first year *A. radix* roots harvested in August.

---

Key words:  $\beta$ -ecdysone, *Achyranthis radix*, supercritical fluid extraction (SFE), solvent extraction, supercritical fluid chromatography(SFC)

\*Corresponding author