

## 초임계유체 추출에 의한 초피나무 과피 중 신미성분의 추출조건

이창주\* · 김명석\*\* · 신경우 · 김용두\*\*\* · 심재한†

\*광주대학교 토목환경공학부, \*\*전남농업기술원, \*\*\*순천대학교 식품공학과, †전남대학교 응용생물공학부, 농업기술연구소

### The extraction condition of pungent compounds from *Zanthoxylum piperitum* D.C pericarps by using supercritical fluid extraction

Chang Joo Lee, Myung Seok Kim, Jing Yu Shen  
Yong Doo Kim and Jae Han Shin†

\* Division of Civil and Environmental Engineering, Kwangju University

\*\* Chonnam Agricultural Research and Extension Service, Naju, Korea

\*\*\* Dept. of Food Science and Technology, Sunchon National University, Korea

† Division of Applied Bioscience and Biotechnology and Institute of Agricultural Science and Technology, Gwangju, Korea

**ABSTRACT :** The optimum extraction condition of pungent component from *Zanthoxylum piperitum* D.C pericarps by using supercritical fluid extraction(SFE) was investigated. The optimum condition of SFE was 300 kg/cm<sup>2</sup> of pressure, 60 °C of extraction temperature, 80% of CO<sub>2</sub> fluid, 20% of modifier(methanol) volume and 20 min of extraction time. The extraction efficiency between the classical solvent extraction method and SFE was studied. About 40% of extraction efficiency was improved when SFE was applied.

**Key words :** *Zanthoxylum piperitum*, SFE, modifier, optimum extraction condition, pungent component

## 서 언

초피나무(*Zanthoxylum piperitum* De Candolle)는 운향과(*Zanthoxylum schinifolium*) 산초나무속에 속하는 낙엽 관목으로 과피, 수피 및 뿌리 등에 독특한 신미와 향기성분을 많이 함유하고 있어 동북아시아에서 가장 오래된 전통적인 향신료와 약용식물로 민간에 널리 사용되어 왔다. 일본에서는 근래에 야사쿠라 산초(*Zanthoxylum piperitum* var. *inermis* Makino)라는 결실량이 많고 정유성분의 함량이 높은 우량품종을 육성할 정도로 주목받고 있다. 우리나라의 요록(要錄), 음식지미방(飲食知味方), 주방문(酒方文) 그리고 산림경제(山林經濟)등 기재에 따르면 고추가 사용되기 전 초피를 김치류의 향신료로 사용하였다는 기록이 있으며(Kim et al., 1993), 현재 중부이남

의 민간에서 김치에 넣거나 민물고기의 비린내를 제거하는데 사용하고 있다. 초피나무의 과피는 특유의 향기성분을 갖고 있어 생선류의 비릿한 냄새를 제거하는데 효과적이므로 추어탕에 향신료로 쓰며 한약재로도 이용한다(Kim et al. 1993).

Yasuda 등(1980, 1981, 1982)은 일본산 초피로부터  $\alpha$ -sanshool,  $\beta$ -sanshool, hydroxy  $\alpha$ -sanshool, hydroxy  $\beta$ -sanshool,  $\gamma$ -sanshool, 그리고 hydroxy  $\gamma$ -sanshool 등 6가지 신미성분을 밝히는 등 초피의 유효성분에 대한 많은 연구가 이루어지는 반면 한국산 초피의 신미성분에 관한 연구는 드물다. 특히 신미성분의 추출에 있어서 지금까지 사용해 왔던 수증기 증류법이나 용매 추출법 대신 초임계 유체추출(SFE; supercritical fluid extractor)를 사용하여 신미성분을 추출한 사례는 찾아볼 수 없었다.

† Corresponding author(phone) : 062-530-2135, Homepage : //chonnam.ac.kr / ~jhshim  
Received 14 November 2002 / Accepted 19 February 2003

1822년 Baron이 초임계 상을 발견하였고 1879년에 Hannay와 Hogarth에 의해 고체를 용해하기 위해 초임계 유체가 이용되었다. 1963년 Zosel이 커피에서 카페인이 제거된 커피를 만드는데 SFE를 사용하면서 산업적으로 많이 응용되고(Kim, 1998)있고 1980년대 이후 급격한 발전을 이루어 cholesterol 추출(Scalia et al. 1998)이나 환경분석(Bowadt & Hawthorne, 1995) 천연물질추출(Barth et al., 1995)과 딸기 중 농약의 추출(Pearce et al., 1997) 등에 널리 사용되고 있다. 우리나라에서는 Shim 등(2001)이 우슬 중  $\beta$ -ecdysone의 용매추출과 SFE 추출법에 관하여 비교한 보고도 있다. 오늘날 SFE는 환경적인 측면에서 유기용매의 환경오염을 줄일 수 있고 정제과정이 간단화되어 비용절감 및 시간절약으로 경제적 효율이 좋을 뿐만 아니라 토양이나 식품의 bound residue에도 효과적으로 사용될 수 있는 방법으로 생각된다(Khan, 1995).

따라서 본 연구에서는 SFE를 이용하여 초피나무 과피에서 신미성분의 추출최적조건을 확립하기 위하여 시간, 온도, 압력 및 modifier(methanol)양 비율을 조사하고 이를 용매추출법과 비교하여 초피 신미성분의 새로운 추출 방법으로 SFE의 사용 가능성을 알아보는 것을 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

### 가. 재료 및 분석기기

초피 시료는 전남 순천시 근교에서 1999년 5~7월에 채취하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉장 보관하여 사용하였다.

사용된 시약으로는 MeOH,  $\text{CHCl}_3$ , n-hexane, 그리고 isopropanol은 HPLC용을 사용하였고 액화 $\text{CO}_2$ 는 고순도(99.99%)를 구입하여 사용하였다.

SFE(Supercritical fluid extractor, JASCO, JAPAN)는 PU-980 HPLC pump, CO-965 column oven, 880-81 back pressure regulator, RBC-10 refig bath circulator system을 사용하였고 HPLC(High performance liquid chromatography, KONTRON, ITALY)는 335 UV detector, 322 pump system을 사용하였다.

### 나. HPLC 분석조건

Column은 Waters  $\mu$ porasil<sup>TM</sup> (L 300 mm, ID 3.9 mm)를 사용하였고 이동상은 n-hexane : isopropanol 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 19:1 비율로, 유속은 1ml/min로 하여 UV 275nm 에서 분석하였다.

### 다. SFE 추출조건

SFE에서 초피나무 과피 신미성분의 최적 추출조건을 확립하기 위하여 온도, 압력, modifier양, 그리고 추출시간을 달리하여 신미성분을 추출하여 HPLC로 분석하였

다. SFE의 기본조건은 유속 3ml/min으로 하고 압력을 280 kg/cm<sup>2</sup>, 300 kg/cm<sup>2</sup>, 그리고 320 kg/cm<sup>2</sup>에서, 온도는 30 $^{\circ}\text{C}$ , 40 $^{\circ}\text{C}$ , 50 $^{\circ}\text{C}$ , 그리고 60 $^{\circ}\text{C}$ 로, 보조제 MeOH양은 10%, 20% 그리고 30%로 달리하여 최적 압력, 온도 및 보조제 양을 조사하였다. 아울러 추출시간은 처음 20분, 다음 20분 그리고 마지막 40분으로 3분획을 취하여 최적 추출시간을 조사하였다.

### 라. SFE 와 용매 추출의 비교

초피나무 과피의 신미 성분을 SFE와 용매로 추출하여 신미성분의 추출효과를 HPLC에서 비교 조사하였다. SFE 추출조건은 온도 60 $^{\circ}\text{C}$ , 압력 300 kg/cm<sup>2</sup>, modifier 양 ( $\text{CO}_2$ :MeOH) 80:20, 그리고 추출시간은 20분으로 하여 추출하고 농축한 다음 5 ml  $\text{CHCl}_3$ 로 용해하여 분석을 행하였다. 용매추출은 SFE 추출과 동일한 양(1.0 g)의 시료를 취하여 50 ml의 MeOH를 가하고 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 추출하고 여과, 농축하여 같은 양의  $\text{CHCl}_3$ 로 용해하여 신미성분을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 가. 초피나무 과피의 신미성분의 최적분석 조건

초피나무 과피 신미성분의 최적분석조건을 확립하기 위하여 압력 300 kg/cm<sup>2</sup>, modifier는 MeOH 20%, 온도는 60 $^{\circ}\text{C}$ 의 SFE 기본조건에서 신미성분을 추출하여 여러 가지 mobile phase 조건(n-hexane : isopropanol ratio; 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 그리고 19:1)에서 HPLC로 분석한 결과 그림 1 에서 보여준 바와 같이 신미성분으로 추정되는 세 개의 성분 peak를 15:1 조건에서 얻을 수 있었다. 조사된 5가지 이동상중에서 14:1에서는 24.4%, 15:1에서는 41.0%, 16:1에서는 31.2%, 17:1에서는 24.8% 그리고 19:1에서는 24.5%의 peak 면적을 나타내어 15:1조건에서 세 가지 성분의 함량이 상대적으로 높아 15:1의 조건

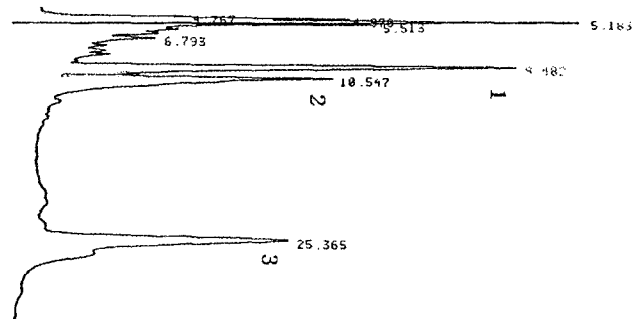


Fig. 1. HPLC Chromatogram of extraction of *Z. piperitum* D.C pericarps by SFE.

을 최적 분석 조건으로 결정하였다.

초피나무 과피 1.0g을 SFE로 추출하여 농축한 다음 5 ml CHCl<sub>3</sub>로 용해하여 3 $\mu$ l를 HPLC에 주입시켜 각 peak의 면적을 구하였다. HPLC chromatogram에서 나타난 바와 같이 UV 275nm에서 9.48, 10.55 그리고 25.36분의 보유 시간을 가진 위치에서 세 개의 신미성분의 peak가 나타났으며 이들의 면적별 분포는 각각 38%, 32% 그리고 30%로 나타났다.

나. SFE를 이용한 초피나무 과피 신미성분의 최적추출 조건

SFE의 온도별 분석결과 그림 2 에서와 같이 60 $^{\circ}$ C 추출 물에서 세 가지 성분의 peak 합이 30 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C, 그리고 50 $^{\circ}$ C 추출물에서의 합보다 2배 정도 증가됨을 알 수 있었다. SFE의 압력별 분석결과에서는 300 kg/cm<sup>2</sup> 압력조건에서는 세 가지 성분의 peak 면적의 합이 41.0으로서 320 kg/cm<sup>2</sup>에서의 30.0보다 37% 높고 280 kg/cm<sup>2</sup>에서의 21.5 보다 91% 높은 것으로 나타나 300 kg/cm<sup>2</sup> 압력조건에서 세 가지 성분의 추출효과가 가장 높은 것을 보여주었다(그림 3). SFE modifier양 (CO<sub>2</sub> : MeOH; v/v(%))을 70:30, 80:20 그리고 90:10으로 분석한 결과 80:20에서 추출 peak면적이 41.0로 90:10의 39.7과는 비슷하였으나 70:30보다는 높게 나타나 modifier 비율은 80:20이 가장 적합한 추출조건으로 추정되었다(그림 4). 그리고 SFE 추출시간별로는 그림 5에서와 같이 처음 20분에 추출된 세 가지 성분의 peak 면적은 각각 전체의 89.5, 95.1 그리고 98.2%를 차지하고 다음 20분, 나중 40분에 추출 된 세 가지 성분 peak 면적은 5%미만으로 나타나 처음 20분에 대부분의 성분이 추출가능하며 그 이상의 추출시간은 필요치 않은 것으로 판단되었다.

이러한 결과는 Shim 등(2001)이 SFE를 이용하여 우슬에서  $\beta$ -Ecdysone을 추출할 때의 온도 80 $^{\circ}$ C, 압력 300 kg/cm<sup>2</sup>, 보조제 methanol 20%의 최적추출 조건과 유사하였다. Barth 등(1995)은 당근으로부터 carotenoid를 SFE로 추출 시 압력을 300atm, 온도는 50 $^{\circ}$ C, 보조제 ethanol량을 10%으로 하였을 때 가장 높은 양인 605ppb의  $\alpha$ -carotene과 485ppb의  $\beta$ -carotene을 추출하였고 Diaz-Maroto 등(2002)은 SFE를 이용하여 향신료에서 휘발성 물질 추출 시 온도는 40 $^{\circ}$ C, 압력은 120bar에서 가장 많은 양의 휘발성 성분을 추출하였다.

이상의 결과를 종합하여 초피나무 과피 중 신미성분의 추출을 위한 SFE 최적조건은 표 1과 같이 온도 60 $^{\circ}$ C, 압력 300 kg/cm<sup>2</sup>, modifier의 종류는 MeOH로 하였고 이때 modifier 양은 80:20 v/v(%)로 하고 back pressure regulator의 조절에 의해 추출시간을 20분으로 하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났고, 신미성분의 HPLC분석 시

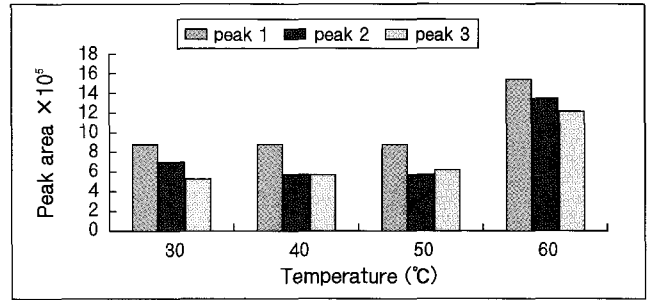


Fig. 2. Effect of temperature on the extraction of *Z. piperitum* D.C pericarps of SFE.

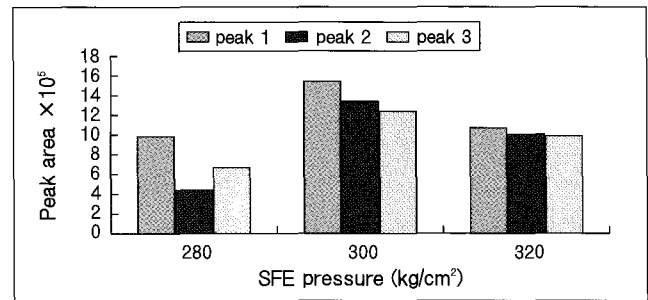


Fig. 3. Effect of pressure on the extraction of *Z. piperitum* pericarps by SFE.

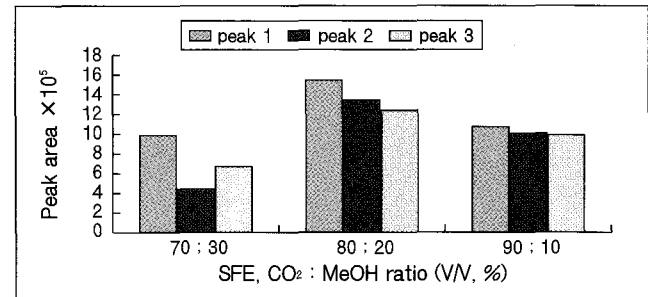


Fig. 4. Effect of modifier ratio on the extraction of *Z. piperitum* by SFE.

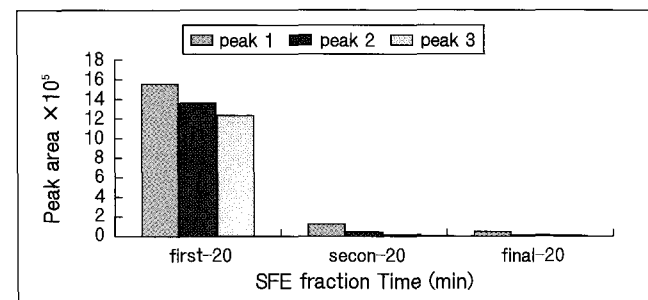


Fig. 5. Effect of collecting time on the extraction of *Z. piperitum* by SFE.

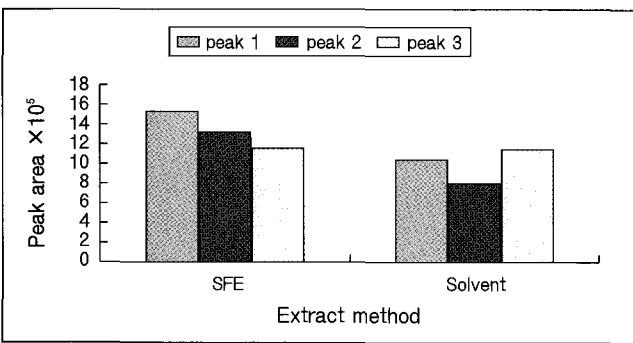
이동상은 hexane : isopropanol (15:1)에서 가장 좋은 결과를 보인 것으로 밝혀졌다.

**Table 1.** Optimum condition of SFE extraction from *Z. piperitum* pericarp

Temperature: 60 °C,	Pressure : 300 kg/cm <sup>2</sup> ,
Modifier ratio: CO <sub>2</sub> : MeOH=80 : 20 % ( V/V )	
Extraction Time: 20 min,	Flow rate: 3 ml/min

**다. SFE와 용매추출의 비교**

초피나무 과피의 신미성분을 SFE와 용매추출 방법으로 추출하여 추출효과를 HPLC로 확인한 결과는 그림 6에 나타냈다. SFE 추출조건은 표 1에 제시한 최적 추출조건에서 실행하였다.



**Fig. 6.** Extraction efficiency of *Z. piperitum* pericarp between SFE and solvent extraction.

SFE 추출과 용매추출 두 가지 방법으로 초피나무 과피에서 신미성분을 추출하여 세 개의 peak 면적을 비교 분석한 결과 SFE 추출의 세 개의 peak 면적(41.0)은 용매추출의 peak 면적 29.3에 비해 추출효과가 높게 나타났다. 또한 SFE 추출시간이 20분밖에 소요되지 않고 용매도 MeOH로 12 ml(1.0 g 시료)정도가 사용되는 반면 용매추출은 적어도 2시간 이상에서 10시간 이상이 소요되고 용매도 50~100 ml의 MeOH이 소요되는 것으로 나타났다. 이러한 예는 Barth 등(1995)에 의한 당근으로부터 carotenoid의 용매추출 시 200ml의 용매가 소비되고 6시간이 걸리는데 비해 SFE에서는 40ml의 용매와 1시간의 분석시간이 소요되었다고 보고였으며 Meyer 등(1995)은 가죽으로부터 pentachlorophenol의 잔류량 측정시 soxhlet 추출에 300ml의 용매와 2일간의 분석시간이 소요되었지만 SFE추출의 경우 50ml의 용매와 3시간의 시간이 소요되었다는 실험결과와 유사하다. 따라서 SFE추출은 용매추출에 비해 짧은 시간(20분)과 소량의 유기용매(MeOH 12 ml)를 사용하는 등 여러 가지 면에서 우월하므로 약용작물 및 천연물의 추출에 널리 사용 할 수 있는 추출방법으로 생각되어 진다.

**적 요**

초임계추출(SFE)를 이용한 초피나무 과피 중 신미성분의 최적추출조건을 조사하였다. 최적 추출 압력은 300kg/cm<sup>2</sup> 이었으며 온도는 60°C, 추출 부피는 12 ml, flow rate는 3ml/min 그리고 modifier로 사용한 methanol의 함량비율은 20%였다. 추출시간은 초반 20분 안에 대부분의 신미성분이 추출되었다. 또한 용매추출법과 비교한 결과 추출효능이 약 40%정도 향상되었고 시간은 20분으로 단축되었으며 유기용매 methanol은 12 ml 밖에 소요되지 않을 뿐만 아니라 주요한 추출용매로 무독성 액화CO<sub>2</sub>를 사용하기에 독성 유기용매의 다량 사용을 피할 수 있는 친환경적이고 경제적인 방법으로 생각되어 진다.

**감사의 글**

이 연구는 1998년도 농림부의 지원에 의해서 수행된 "초피를 이용한 향신료 개발"과제의 수행결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

**LITERATURES CITED**

Barth MM, Zhou C, Kute KM, Rosenthal GA (1995) Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot tissue. J. Agric. Food Chem. 43 : 2876~2878

Bowadt S, Hawthorne SB (1995) Supercritical fluid extraction in environmental analysis. J. Chromatogr. A 703: 549~571

Diaz-Maroto MC, Perez-Coello MS, Cabezudo MD (2002) Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices comparison with simultaneous distillation-extraction. J. Chromatogr. A 947: 23~29

Hannay JB, Hogarth J (1879) On the solubility of solids in gases. Proc. R. Soc. London. 29: 324~326

Kim MR (1998) Analysis for the ecdysteroids by SFE-SFC system in *Achyranthis Radix*. Chonnam National University, Graduate School

Khan SU (1995) Supercritical fluid extraction of bound residue from soil and food commodities. J. Agric. Food Chem. 43: 1718~1723

Kim YD, Kang SK, Oh MR (1993) A study on the ichthyotoxic constituents of chopi(*Xanthoxylum piperitum* DC). J. Korean Soc. Food Nutr. 22(5)617 ~ 620

Meyer A, Kleibohmer W (1995) Determination of pentachlorophenol in leather using supercritical fluid extraction with in situ derivatization. J. Chromatogr. 718: 131~139

Pearce KL, Trenerry VV, Were S (1997) Supercritical fluid extraction of pesticide residues from strawberries. J.

- Agric. Food Chem. 45: 153~157
- Scalia S, Williams JR, Shim JH, Law B, Morgan ED** (1998) Supercritical fluid extraction of bile acids from bovine bile raw materials. *Chromatographia* 48: 11~12
- Shim JH, Kim MR, Kim MS** (2001) A comparative study on the solvent extraction and supercritical fluid extraction method of  $\beta$ -ecdysone in *Achyranthis radix*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 44(3): 197~201
- Yasuda I, Seto T, Shimohira A, Takubo E** (1980) Studies on the evaluation of crude drugs (VI) Quality of zanthoxyli fructus on the market. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab.* P H 31-1: 82-85
- Yasuda I, Takeya K, Itokawa H** (1981) Two new pungent principles isolated from the pericarps of zanthoxylum dilanthoides. *Chem. Pharm. Bull.* 29(6): 1791~1793
- Yasuda I, Takeya K, Itokawa H** (1982) Evaluation of chinese zanthoxyli fructus commercial available in japan by pungent principles and essential oil constituents. *Shoyakugaku Zasshi* 36(4): 301~306