

산겨릅나무 간 보호 화합물 salidroside의 추출조건 최적화

유귀재* · 최인욱 · 최상윤
한국식품연구원 식품기능연구본부

Optimization of Extraction Conditions of Salidroside, Hepatoprotective Compound from *Acer Tegmentosum*

Guijae Yoo*, In-Wook Choi, and Sang Yoon Choi

Research Division of Food Functionality, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea

Abstract – Salidroside is a major phenolic glycoside of *Acer tegmentosum* (Aceraceae) and known to be a hepatoprotective compound. Extraction conditions are one of the most important factors to save time and cost from an economic point of view. For this reason, this study was conducted to optimize the extraction condition for maximum yield of salidroside. For optimization, three extraction factors such as ethanol concentration (%), extraction temperature (°C), and solvent to material ratio (mg/mL) were tested and optimized for maximum yield of salidroside using response surface methodology (RSM). The optimal condition was obtained as an ethanol concentration of 53.4%, an extraction temperature at 67.11 °C and a solvent to material ratio (mg/mL), 195.55 mg/ml. The salidroside yield under optimal conditions was found to be 1.59 mg/g dried samples, which were well-matched with the predicted value of 1.56 mg/g dried samples. These results will provide useful information about optimized extraction conditions for the development of salidroside as hepatoprotective therapeutics.

Keywords – *Acer tegmentosum*, Box–Behnken design, Response surface methodology, Salidroside

산겨릅나무(*Acer tegmentosum*)는 단풍나무과(Aceraceae)의 낙엽활엽 소교목으로서 국내 고산지대와, 동부 시베리아, 중국 북동부에 자생한다.¹⁾ 높이는 10 m 안팎이며, 작은 가지는 녹색이며 줄이 있고, 잎은 넓은 난형으로 가장자리가 3-5개로 얇게 갈라진다.^{2,3)} 민간에서는 벌나무 또는 산청목이라 불리며, 간암, 간경화 등 간에 관련된 질병에 탁월한 효과가 있다고 보고되어 있다.⁴⁾

산겨릅나무에서 분리된 성분으로는 salidroside, 6'-O-galloylsalidroside, scopoletin과 (+)-catechin 등과 같은 phenol 화합물이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있으며,^{5,6)} 산겨릅나무의 주성분인 salidroside는 간 암세포 전이 억제,⁷⁾ 간 섬유화 억제⁸⁾ 등 다양한 간보호 활성이 보고되고 있다.

최근에 반응표면분석법(Response surface methodology)을 이용하여 산겨릅나무의 항산화 활성을 위한 추출조건 최적화 연구⁹⁾가 보고되었지만 지표성분인 salidroside의 함량이 아닌 추출물 수준에서 추출조건을 최적화하였으며, 홍경천(*Rhodiola crenulata*) 추출물로부터 salidroside의 초음파 추

출공정을 최적화한 연구¹⁰⁾도 보고되었지만 초음파 추출공정은 산업화하기에 많은 어려움이 따르고 있다.

이에 본 연구에서는 반응표면분석을 이용하여 산겨릅나무 열수 추출 공정이 salidroside 추출 수율에 미치는 영향을 연구하고 이를 통계학적으로 분석하여 최적의 추출 조건을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 산겨릅나무 가지는 농업회사법인 (주)우리밀로부터 구입하였다. 한국식품연구원 최상윤 박사가 감정하여 동정하였고, 시료 표본(KFRI-NP-0002)은 KFRI 식품소재은행 표본실에 보관되어 있다.

시약 및 기기 – 분석에 사용된 HPLC grade 용매는 JT Baker(Phillipsburg, NJ, USA) 에서 구매하였다. Salidroside 표준품은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MP, USA)에서 구입하여 사용하였다. HPLC분석을 위한 기기로 pump, autosampler, column oven, photodiode array detector로 구성된 Waters Alliance 2695 HPLC system(Waters Corp., Milford, MA)를 사용하였으며, 분석용 컬럼은 XBridge C₁₈(4.6 × 150 mm,

*교신저자(E-mail): gjyoo@kfri.re.kr
(Tel): +82-63-219-9463

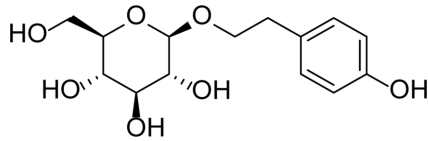


Fig. 1. Chemical structures of salidroside.

3.5 μm, Waters) column을 사용하였다.

HPLC 분석 조건 - HPLC 이동상으로 0.1% formic acid(A)와 acetonitrile(B)을 이용하였다. 분석하는 0, 19, 25, 26분 동안 이동상 B를 5, 14, 32, 100%의 비율로 흘려주었다. 유속은 1.0 mL/min 이고 컬럼 온도는 35°C, UV 검출 파장은 280 nm, 주입 용량은 5 μL로 설정하였다.

반응표면분석 실험 계획 - 산겨릅나무 가지로부터 salidroside의 추출 조건을 최적화하기 위하여 Box-Behnken design(BBD)에 따라 3가지 독립변수(X₁: 에탄올 농도, X₂: 추출 온도, X₃: 용매 대 시료 비율)를 설정하였다. 독립변수의 범위를 설정하고 -1, 0, 1 총 3단계로 코드화하였다. BBD에 따라 중심점 3개를 포함하는 총 15개 구간을 설정하고 랜덤화하여 실험을 수행하였으며, 종속변수로는 salidroside의 함량을 선정하였다(Table I). BBD를 통해 얻어진 결과는 Design Expert 7.0(StatEase Inc., USA) program을 이용하여 회귀분석에 의한 모델식을 예측하였으며, ANOVA 분석을 통하여 각 변수간의 상관관계를 분석하였다.

시료 추출 - 건조한 산겨릅나무 가지를 분쇄한 후 BBD 실험 조건에 따라 에탄올 농도, 추출 온도 및 시료 대 용매

비를 맞추어 추출하였으며, 추출 후 0.45 μm 시린지 필터로 여과하여 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

산겨릅나무 추출물은 다양한 효능이 보고되어 있으며 특히 주성분인 salidroside는 뛰어난 간 보호 효능이 보고되어 건강기능식품 산업에서 새로운 소재로 주목받고 있다. Salidroside를 기능성 소재로 개발되기 위해서는 효율적인 추출 조건을 찾는 것이 필수적이다. 본 연구에서는 반응표면분석법을 이용하여 산겨릅나무로부터 salidroside 성분의 추출 조건을 최적화하고자 하였다. 반응표면분석법이란 많은 독립변수와 그들 간의 상호작용이 종속변수에 미치는 영향을 통계적학적으로 분석하여 최적화된 조건을 얻는 실험계획법이다.¹¹⁾

예비실험을 통하여 salidroside 추출 수율에 영향을 주는 세가지 추출 조건(에탄올 농도, 추출 온도, 시료 대 용매 비율)을 독립변수로 설정하였다. 각 추출 조건의 범위는 일차 변수 실험을 통하여 에탄올 농도를 0, 50, 100%로 설정하였으며, 추출 온도는 20, 60, 100°C, 시료당 추출 용매의 비율은 150, 200, 250 mg/mL으로 설정하였다. 이러한 추출 조건을 바탕으로 BBD에 의해 설계된 15개의 추출조건에서 얻어진 종속변수의 결과는 Table I과 같다.

추출조건에 따른 salidroside의 함량은 HPLC를 이용하여 수행하였으며 표준품을 이용하여 산겨릅나무 추출물 당 salidroside의 함량을 정량하였다(Fig. 2).

Table I. Experimental design and responses of the dependent variables to extraction conditions

Run order	Coded variables			Independent variables			Dependent variables
	X ₁	X ₂	X ₃	EtOH conc. (% , X ₁)	Extraction temp. (°C, X ₂)	Solvent ratio (mg/mL, X ₃)	Salidroside (mg/g)
1	-1	1	0	0	100	200	1.01
2	0	-1	1	50	20	250	0.63
3	0	0	0	50	60	200	1.59
4	0	0	0	50	60	200	1.62
5	0	-1	-1	50	20	150	0.65
6	1	0	-1	100	60	150	0.82
7	1	0	1	100	60	250	1.03
8	0	1	-1	50	100	150	1.23
9	1	1	0	100	100	200	1.09
10	-1	0	-1	0	60	150	1.06
11	0	1	1	50	100	250	0.92
12	-1	-1	0	0	20	200	1.32
13	-1	0	1	0	60	250	0.47
14	1	-1	0	100	20	200	1.22
15	0	0	0	50	60	200	1.43

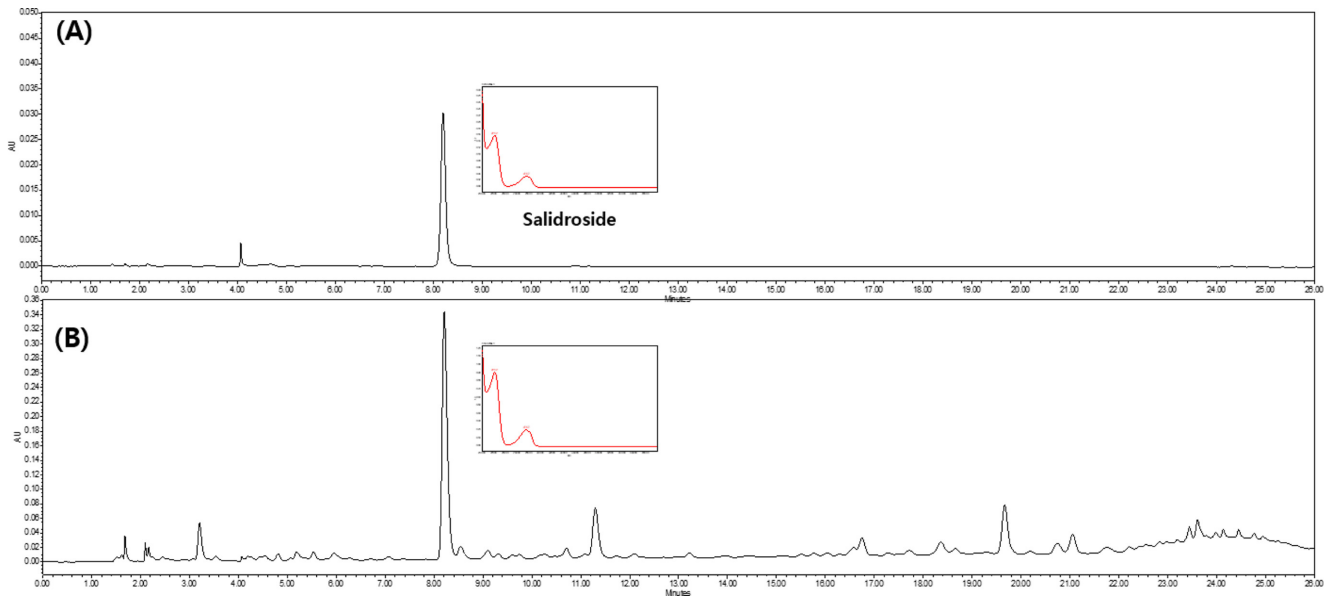


Fig. 2. (A) HPLC chromatogram of solidroside and (B) HPLC chromatogram of *A. tegmentosum* extract prepared from extraction condition of center point.

Table II. Regression coefficients and their significances in the quadratic polynomial regression equations for solidroside contents

Factor	Coefficient	Standard Error	95% Confidence Interval Low	95% Confidence Interval High
Intercept	1.54	0.13	1.21	1.88
X_1	0.037	0.079	-0.17	0.24
X_2	0.056	0.079	-0.15	0.26
X_3	-0.090	0.079	-0.29	0.11
X_1X_2	0.045	0.11	-0.24	0.33
X_1X_3	0.20	0.11	-0.087	0.49
X_2X_3	-0.073	0.11	-0.36	0.21
X_1^2	-0.20	0.12	-0.50	0.099
X_2^2	-0.18	0.12	-0.48	0.11
X_3^2	-0.50	0.12	-0.80	-0.20

Solidroside 수율에 대한 추출 조건의 영향은 2차 회귀식으로 다음과 같이 유도되었다(Table II).

$$\text{Yield} = 1.54 + 0.037X_1 + 0.056X_2 - 0.09X_3 + 0.045X_1X_2 + 0.2X_1X_3 - 0.073X_2X_3 - 0.2X_1^2 - 0.18X_2^2 - 0.5X_3^2$$

2차 회귀식에 대한 상수 및 회귀계수의 유의성은 p-values를 통하여 평가하였으며 ANOVA 분석을 통하여 solidroside 추출 수율에 대한 회귀식의 유의성을 판단하였다(Table III).

본 연구에서 비교한 세가지 추출 조건 중 시료 대 용매 비율의 이차 계수(X_3^2)가 가장 유의성 있는 영향을 나타내었으며, 에탄올 농도의 이차 계수(X_1^2) 및 에탄올 농도와 시료 대 용매 비율의 상호 계수(X_1X_3)도 유의성 있는 영향을

나타내었다. 이러한 회귀식의 신뢰도는 0.0039의 낮은 p-value를 통하여 적정한 것으로 판단하였으며 0.1273의 lack of fit과 0.9873의 R^2 값도 결과의 신뢰성을 뒷받침하였다(Table III).

Solidroside의 수율에 미치는 추출 조건의 영향은 반응표면곡선으로 나타낼 수 있다(Fig. 3). 세가지 추출 조건 중 에탄올의 농도(X_1)가 증가할수록 solidroside의 수율이 증가하다가 다시 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 시료 대 용매 비율(X_3) 역시 증가할수록 수율이 증가하다가 다시 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 추출 온도(X_2)가 높을수록 점차 수율이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이와 같이 세가지 추출 조건은 산겨릅나무로부터 solidroside의 추출 수율에 중요한 역할을 하는 것을 확인하였으며 이에 최적을

Table III. Analysis of variance for the response surface quadratic models

	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	<i>f</i> -value	<i>p</i> -value
[Model]	1.39	9	0.15	3.08	0.0039
X_1	0.011	1	0.011	0.22	0.6596
X_2	0.025	1	0.025	0.50	0.5127
X_3	0.065	1	0.065	1.30	0.3064
X_1X_2	0.008	1	0.008	0.16	0.7036
X_1X_3	0.16	1	0.16	3.22	0.1326
X_2X_3	0.021	1	0.021	0.43	0.5407
X_1^2	0.15	1	0.15	2.95	0.1464
X_2^2	0.13	1	0.13	2.51	0.1740
X_3^2	0.93	1	0.93	18.65	0.0076
[Residual error]	0.25	5	0.05		
Lack-of-fit	0.23	3	0.076	7.01	0.1273
Pure error	0.022	2	0.011		
Total	1.64	14			
R^2	0.9873				

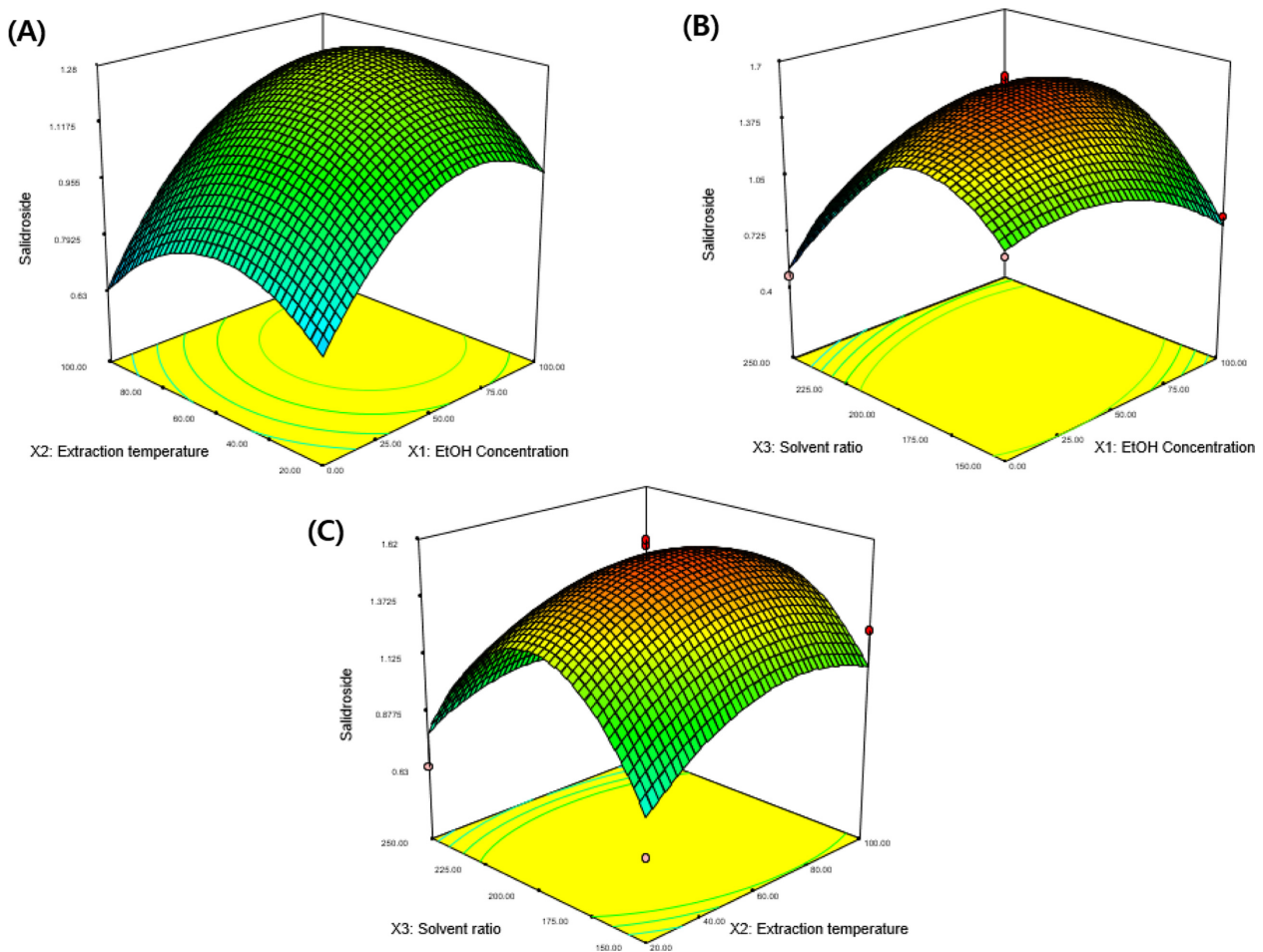


Fig. 3. Response surface plot for the effects of extraction conditions for salidroside from the *A. tegmentosum* extract, (a) ethanol concentration and extraction temperature, (b) ethanol concentration and solvent to material ratio, (c) extraction temperature and solvent to material ratio.

Table IV. Predicted and experimental values of response variables under optimal conditions

Extraction parameters			Salidroside (mg/g)	
Ethanol concentration (%)	Extraction temperature (°C)	Solvent to material ratio (mg/mL)	Predicted Values	Experimental values
53.40	67.11	195.55	1.56	1.59±0.02

추출 조건을 도출하고자 하였다.

반응표면분석을 통하여 도출된 최적의 추출 조건은 에탄올 농도 53.4%, 추출 온도 67.11°C, 시료 대 용매 비율 195.55 mg/mL이었다. 최적 추출조건에서 얻어진 salidroside의 예측 값은 1.56 mg/g이었으며 동일한 조건에서 실제 실험에 의해 얻은 실측값은 1.59±0.02으로 유의적인 차이는 없었으며 예측값의 신뢰성을 뒷받침하였다(Table IV). 이상의 결과는 반응표면분석법을 통해 도출된 최적화된 추출조건에서 추출할 경우 효율적으로 salidroside의 확보가 가능함을 제시할 수 있다.

결 론

본 연구에서는 간 보호 화합물인 salidroside를 기능성소재로 개발하기 위해 산겨릅나무로부터 salidroside의 추출 조건을 최적화하고자 하였다. 에탄올 농도, 추출 온도 및 시료 대 용매 비율이 salidroside의 추출 수율에 미치는 영향을 평가하고 반응표면분석을 통하여 최적의 추출 조건을 도출하였다. 본 연구를 통하여 도출된 최적의 추출 조건인 에탄올 농도 53.4%, 추출 온도 67.11°C, 시료 대 용매 비율 195.55 mg/mL에서 추출하는 경우 1.59 mg/g의 salidroside을 얻을 수 있었다. 이러한 추출 조건을 이용하여 산겨릅나무로부터 salidroside를 효율적으로 추출 가능함을 제시하였으며 이는 추후 salidroside의 기능성 소재로의 개발에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 한국식품연구원 주요사업(E0210300-02)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

- 김태욱 (1996) 한국의 수목, 476, 교학사, 서울.
- 김태정 (2008) 한국의 야생화와 자원식물 3, 211. 서울대학교출판부, 서울.
- 이정석, 이계한, 오찬진 (2010) 새로운한국수목대백과도감(하) 166 학술정보센터 서울.
- 김일훈 (1986) 신약, 79-288. 나무, 서울.
- Park, K. M., Yang, M. C., Lee, K. H., Kim, K. R., Choi, S. U. and Lee, K. R. (2006) Cytotoxic phenolic constituents of *Acer tegmentosum* Maxim. Arch. Pharm. Res. **29**: 1086-1090.
- Kwon, D.-J., Kim, J.-K. and Bae, Y.-S. (2011) DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds isolated from the stem wood of *Acer tegmentosum*. Mokchae Konghak **39**: 104-112.
- Linlin, L., Shousheng, L., Quanjiang, D. and Yongning, X. (2019) Salidroside suppresses the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the activation of the Notch1 signaling pathway. Mol. Med. Rep. **19**: 4964-4972.
- Qiannan, Y., Yang, Z., Changqing, Z., Lieming, X. and Jian, P. (2021) Salidroside inhibits CCl₄-induced liver fibrosis in mice by reducing activation and migration of HSC induced by liver sinusoidal endothelial cell-derived exosomal SphK1. Front. Pharmacol. **12**: 677810.
- Kim, I., Ha, J. and Jeong, Y. (2021) Optimization of extraction conditions for antioxidant activity of *Acer tegmentosum* using response surface methodology. Appl. Sci. **11**: 1103-1134.
- Liu, R., Guo, C., Feng, M. and Liu, C. (2021) Efficient microwave-assisted extraction of salidroside from *Rhodiola crenulata*. SN Appl. Sci. **3**: 93-103.
- Jeon, S. and Ryu, G. (2015) Optimization of extrusion process conditions to increase the corn fiber gum and soluble arabinoxylan yield from corn fiber. Korean J. Food Sci. Technol. **47**: 149-157.

(2022. 11. 23 접수; 2022. 12. 15 심사;
2022. 12. 19 게재확정)