

Analytical evaluation of the effects of hydrogen-bond acceptor (HBA) structure and deep eutectic solvent (DES) composition on terpenoid extraction efficiency from *Centella asiatica*

Yujeong Jang^{1,†}, Nahyun Lee^{1,†}, Won Jun Jo¹, Jaeyeong Choi^{2,★}, and Sung Ho Ha^{1,★}

¹Department of Chemical Engineering, Hannam University, Daejeon 34054, Republic of Korea

²Department of Chemistry, Hannam University, Daejeon 34054, Republic of Korea

(Received October 20, 2025; Revised December 1, 2025; Accepted December 1, 2025)

수소결합 받개(HBA)의 구조와 deep eutectic solvent (DES) 조성이 병풀(*Centella asiatica*)로부터 테르페노이드 추출 효율에 미치는 영향에 대한 분석적 평가

장유정^{1,†} · 이나현^{1,†} · 조원준¹ · 최재영^{2,★} · 하성호^{1,★}

¹한남대학교 화학공학과, ²한남대학교 화학과

(2025. 10. 20. 접수, 2025. 12. 1. 수정, 2025. 12. 1. 승인)

Abstract: This study investigated the effects of hydrogen-bond acceptor (HBA) structure, hydrogen-bond donor (HBD)/HBA ratio, and water content on the extraction efficiency of asiaticoside and madecassoside from *Centella asiatica* using deep eutectic solvents (DESs). Three quaternary ammonium HBAs—choline chloride (ChCl), acetylcholine chloride (AChCl), and chlorocholine chloride (CCC)—were combined with ethylene glycol (EG) as HBD. Under 20 % water, asiaticoside showed little variation among DESs, while the more polar madecassoside exhibited distinct trends depending on HBA structure. CCC-DES achieved the highest extraction yield (17.38 ng/mg) due to weakened hydrogen bonding and lower viscosity, whereas AChCl-DES, with an ester group ($-O-COCH_3$), showed reduced efficiency from increased viscosity and restricted diffusion. Increasing HBD/HBA ratio and moderate water addition enhanced extraction by reducing viscosity; however, excessive water (>30 %) disrupted the DES network. EG acted as an internal factor maintaining structural integrity, while water functioned as an external factor, promoting diffusivity. These results highlight that HBA structure and DES composition cooperatively determine physicochemical behavior and extraction efficiency, providing insights for designing eco-friendly solvents for natural product extraction.

요약: 본 연구에서는 병풀(*Centella asiatica*)로부터 주요 테르페노이드 성분인 asiaticoside와 madecassoside를 효율적으로 추출하기 위하여, deep eutectic solvent (DES)의 수소결합 받개(HBA) 구조, 수소결합 주개/받

[†]These authors contributed equally to this work.

★ Corresponding authors

Phone : +82-(0)42-629-8821, 8896 Fax : +82-(0)42-629-8811, 8835

E-mail : feelcjy@hnu.kr, shha@hnu.kr

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.

개 비율(HBD/HBA), 그리고 수분 함량이 추출 효율에 미치는 영향을 조사하였다. HBA로는 choline chloride (ChCl), acetylcholine chloride (AChCl), chlorocholine chloride (CCC)를, HBD로는 ethylene glycol (EG)을 사용하였다. 20% 수분 조건에서 asiaticoside는 DES 종류에 따른 차이가 거의 없었으나, 극성이 높은 madecassoside는 HBA 구조에 따라 뚜렷한 차이를 보였다. 특히 CCC-DES는 약한 수소결합과 낮은 점도 특성으로 가장 높은 추출 효율(17.38 ng/mg)을 나타냈으며, 반대로 에스터기(-O-COCH₃)를 가진 AChCl-DES는 점도가 높아 확산이 제한되어 효율이 낮았다. HBD/HBA 비율 증가와 적정 수준(≤20%)의 수분 첨가는 점도를 완화시켜 추출 효율을 향상시켰으나, 과도한 수분(>30%)은 DES 네트워크를 붕괴시켰다. EG는 내부 수소결합망을 완화하며 안정성을 유지하는 내부 조절인자(internal factor), 물은 외부에서 수소결합망을 교란하여 확산성을 높이는 외부 조절인자(external factor)로 작용한 것으로 보인다. 본 연구는 HBA 구조와 DES 조성이 용매의 물리·화학적 특성과 추출 효율을 결정하는 핵심 인자임을 보여주며, 친환경 용매 기반 천연물 추출 공정 설계에 중요한 기초 자료를 제공한다.

Key words: *Centella asiatica*, asiaticoside, madecassoside, quantitative analysis, deep eutectic solvent (DES), extraction, HPLC, terpenoid

1. 서 론

최근 환경 친화적이며 인체에 무해한 용매 또는 녹색화합물을 이용한 추출 기술이 주목받고 있다. 그 중에서도 deep eutectic solvent (DES)는 낮은 휘발성과 높은 생분해성을 동시에 갖춘 차세대 녹색 용매(green solvent)로 평가되고 있다.^{1,3} DES는 일반적으로 수소결합 받개(hydrogen bond acceptor, HBA)와 수소결합 주개(hydrogen bond donor, HBD)의 혼합에 의해 형성되며,⁴ 두 성분 사이의 강한 수소결합 네트워크로 인해 각각의 구성 성분보다 낮은 용점을 가지는 액상 용매로 존재하게 된다. 이러한 특성 덕분에 DES는 전통적인 유기용매를 대체할 수 있는 친환경적 용매 시스템으로 다양한 화학 및 생명공학 분야에서 활발히 연구되고 있다.^{2,5}

DES의 형성 안정성과 물리·화학적 물성은 HBA와 HBD의 화학적 구조에 따라 크게 달라진다.^{2,4,6} 특히 HBD로 자주 사용되는 ethylene glycol (EG)은 낮은 점도와 우수한 용해성을 동시에 가지며, 식물 및 천연물 유래 화합물의 추출에 적합한 용매 조합으로 보고되고 있다.⁷ 그러나 EG와 결합하는 HBA의 화학적 구조적 차이는 DES의 형성 여부, 안정성, 그리고 점도, 극성, 용점 등과 같은 물성에 직접적인 영향을 미친다.^{4,8} 일반적으로 HBA로는 choline chloride (ChCl), betaine, L-carnitine, 4차 암모늄 염 등이 사용되며, 이들의 양이온과 음이온의 종류 및 구조에 따라 DES의 수소결합 강도, 극성, 점도 및 열적 안정성이 달라진다.^{2,6}

예를 들어, ChCl은 하이드록실기 (-OH)를 포함한

친수성 양이온을 가지며, EG의 하이드록실기와 강한 수소결합 네트워크를 형성하여 안정적이고 유동성이 우수한 DES를 생성한다.⁹ 하지만 4차 암모늄 염은 상대적으로 비극성이 강하여 수소결합 형성이 어렵고 EG와의 상용성(compatibility)이 낮아 DES 형성이 제한된다. 또한 음이온이 염화이온 (Cl⁻)인 경우에는 높은 전하 밀도로 인해 HBD와의 수소결합이 강하게 형성되어 DES의 안정성이 증가하지만, 브로마이드 (Br⁻)나 질산염 (NO₃⁻)과 같은 음이온을 포함하는 경우에는 수소결합력이 약해져 DES의 형성 능력이 저하된다고 보고되었다.^{10,11} 이러한 사실로부터 HBA의 화학적 구조는 DES를 이용한 추출에서 그 효율에 직접적으로 영향을 미칠 것으로 예측할 수 있다.

이에 본 연구에서는 기존의 첫번째 선행연구 결과에서 단일 methanol (MeOH)를 사용할 때보다 물 30%와 DES 70%가 혼합된 경우 약 1.4배 높은 추출효율을 보인 결과와 두번째 선행연구로 확인된 물 20%와 DES (ChCl:EG) 80% 혼합환경에서 더 높은 추출 효율을 보이는 연구 결과의 후속 연구로,^{12,13} HBA의 양이온 구조 차이가 테르페노이드의 추출 효율에 미치는 영향을 관찰하였다. 이를 위해 음이온의 영향을 최소화하기 위해 모두 Cl⁻을 포함하면서, choline skeleton을 기본 골격으로 하는 choline 유도체로 양이온의 말단 치환기만 서로 다른 acetylcholine chloride (AChCl)와 chlorocholine chloride (CCC)를 비교 대상으로 선정하였다. 그 밖의 추출과정 및 시료 전 처리 그리고 정량 평가 방법 등은 선행 연구와 동일한 조건으로 수행하여,¹² HBA의 양이온 구조가 병풀 내 주요 테르페노이드(예:

asiaticoside와 madecassoside)의 추출 효율에 미치는 영향과 수분 함량의 영향을 함께 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

본 연구에 사용된 병풀(*Centella asiatica*)은 (주)허브마을(청주, 대한민국)에서 구입하였다. 정량분석용 표준 물질로 asiaticoside ($M=959.12$ g/mol, Cat# 43191)와 madecassoside ($M=975.12$ g/mol, Cat# PHL80230)를 Sigma-Aldrich (USA)로부터 구입하여 사용하였다.

DES 제조에는 acetylcholine chloride (AChCl, Cat# A2661), chlorocholine chloride (CCC, Cat# C4049), ethylene glycol (EG, $\geq 99.8\%$, Cat# 324558)을 모두 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 사용하였다. 각 성분은 지정된 몰비(HBD/HBA)에 맞추어 혼합 후, 핫 플레이트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 가열하며 교반하였고, 필요 시 vortex mixer (Talboys Standard Vortex Mixers Analog Type, USA)를 이용하여 균질하게 혼합하였다.

정량 및 정성분석은 결과의 신뢰성과 재현성을 확보하기 위해 3회 반복하여 수행하였다. 분석에 사용된 HPLC는 Agilent 1260 Infinity Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)를 사용하였으며, 컬럼은 Symmetry C18 (5 μm , 4.6×250 mm, Waters, USA)을 사용하였다.

이동상은 acetonitrile (ACN, $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 초순수(18.2 M Ω /cm)를 사용하였으며, 초순수는 RO system (Pure Power I, Human Science, Hannam, Korea)에 연결된 초순수 제조장치 Milli-Q (EQ 7000, Millipore Sigma, Burlington, MA, USA)를 통해 제조된 물을 사용하였다.

2.2. DES 제조

본 연구에서는 HBA로 AChCl와 CCC 두 종류를 사용하였으며, HBD로는 EG를 선택하였다. DES 제조를 위한 HBD/HBA의 혼합 몰비(molar ratio)는 각각 4:1 그리고 5:1로 설정하였으며, 제조된 DES는 “HBA 종류-몰비-물 함량”의 순서로 명명하였다.

각 DES의 제조는 미리 계산된 비율에 따라 HBA와 EG를 250 mL 용매병에 넣고, 핫플레이트 교반기(Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 80 °C에서 800 rpm으로 1 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료되면 투명한 액상 형태의 DES가 얻어졌으며, 실온에서 약 15–20 분간 냉각한 뒤 용매의 조성 변화를 방지하기 위해 밀봉하여 상온 보관하였다. 제조된 DES는 추출을 위해 각각 다른 수분 함량(0, 10, 20, 30 % (v/v)) 조건으로 조절하였다. 각 조성별 DES의 시료명과 예상 점도는 Table 1에 정리하였다. 점도 값은 선행 연구 및 문헌 보고 값을 기반으로, 일반적인 물리화학적 거동을 고려하여 추정하였다.^{9,12,14-17}

Table 1. Sample names and estimated viscosity based on DES composition and water content. The viscosity values were estimated from literature data at 25 °C.^{12,15-21}

Sample ID (HBA-HBD/HBA ratio-DW%)	Estimated viscosity (mPa·s)	Sample ID (HBA-HBD/HBA ratio-DW%)	Estimated viscosity (mPa·s)
AChCl-DES2-0	72	CCC-DES2-0	48
AChCl-DES3-0	48	CCC-DES3-0	32
AChCl-DES4-0	30	CCC-DES4-0	20
AChCl-DES5-0	18	CCC-DES5-0	12
AChCl-DES2-10	48	CCC-DES2-10	32
AChCl-DES3-10	30	CCC-DES3-10	20
AChCl-DES4-10	18	CCC-DES4-10	12
AChCl-DES5-10	12	CCC-DES5-10	8
AChCl-DES2-20	30	CCC-DES2-20	20
AChCl-DES3-20	14	CCC-DES3-20	10
AChCl-DES4-20	10	CCC-DES4-20	6
AChCl-DES5-20	6	CCC-DES5-20	4
AChCl-DES2-30	18	CCC-DES2-30	12
AChCl-DES3-30	8	CCC-DES3-30	6
AChCl-DES4-30	5	CCC-DES4-30	3
AChCl-DES5-30	4	CCC-DES5-30	2

2.3. 테르페노이드의 추출

건조된 병풀(*Centella asiatica*)은 추출 효율을 높이기 위해 분쇄기(HMS-3250s, Hanil Electric, Bucheon, Korea)를 사용하여 7,500 rpm에서 10분간 분쇄하였다. 분쇄된 병풀 분말은 입자 크기가 균일하지 않아, 추출 시 표면적 차이에 따른 효율 변동을 최소화하기 위해 체 진동기(HAVER EML digital plus, HAVER & BOECKER, Germany)를 이용하여 150 μm 이하의 시료만 선별하였다. 체 거름 된 병풀 분말은 10 mg/mL 농도로 각 DES 용매를 10 mL에 첨가하여 추출에 사용하였다. 혼합 과정 중 시료의 응집(agglomeration)을 방지하고 균일하게 분산시키기 위해 Standard Vortex Mixer (Talboys, USA)를 이용하여 3,500 rpm으로 40초간 진탕하였다. 이후 Shaking Incubator (Vision, Daejeon, Korea)에서 300 rpm으로 6시간 동안 교반하여 병풀 내 테르페노이드 성분을 추출하였다.

추출이 완료된 용액은 잔여 고형물을 완전히 제거하기 위해 0.45 μm syringe filter (CTK Corporation, Daejeon, Korea)로 1차 여과 후, 0.22 μm syringe filter (CTK Corporation, Daejeon, Korea)를 사용하여 입자성 부유물을 제거하였다. 여과된 추출 용액은 분석 과정에서 시간 경과에 따른 조성 변화나 분해를 방지하기 위해 즉시 HPLC 분석에 사용하였다.

병풀 추출물 내 테르페노이드 성분인 asiaticoside와 madecassoside는 선행 연구에서 확정된 HPLC 분석조건과 동일한 장비를 그대로 사용하여 분석하였으며,^{12,13} 검정곡선을 새로 작성하여 정량평가에 활용하였다. 추출 결과의 재현성과 신뢰성을 확보하기 위하여 동일 조건에서 3회 반복 추출하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. HPLC-UV를 통한 테르페노이드의 정량분석

Fig. 1(a)는 HPLC분석으로 작성된 asiaticoside와 madecassoside의 표준물질 검정곡선을 보여주고 있다. 두 표준물질 모두 R^2 값이 0.999 이상으로 우수한 직선성을 보이고 있으며, 검정곡선으로부터 계산된 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 asiaticoside의 경우 각각 22.6 pg와 68.6 pg, 그리고 madecassoside의 경우 각각 88.6 pg와 268.6 pg으로 확인되었다. Fig. 1(b)는 동일한 분석 조건에서 얻어진 두 표준물질과 추출된 시료의 크로마토그램을 보여주고 있다. DES 제조에 사용된 HBA의 종류에 따라서 추출 정도가 달라지는 것을 보여준다. 이와 같이 AChCl-DES와 CCC-DES의 조성에서 추출된 테르페노이드의 정량 결과는 선행된 ChCl-DES에서의 결과와 쉬운 비교를 위하여 Fig. 2와 Table 2에 같이 보여주고 있다.¹²

3.2. HBA의 양이온 구조적 차이에 따른 영향

선행 연구에서 사용된 ChCl과 양이온의 구조적 차이를 가지는 두 물질인 AChCl과 CCC를 사용하여 HBA의 양이온 구조가 추출 효율에 미치는 영향을 비교하였다. 세 HBA 물질의 물리·화학적 특성은 Table 3에 요약하였다. Table 3에서 보여주고 있듯이, 세 HBA는 4차 암포늄 양이온을 공통적으로 가지지만 말단 치환기(-OH, -O-COCH₃, -Cl)의 화학적 구조가 다를 수 있다. 이러한 구조적 차이는 DES 내 수소결합 네트워크의 강도, 극성, 점도 등에 직접적인 영향을 미치며,

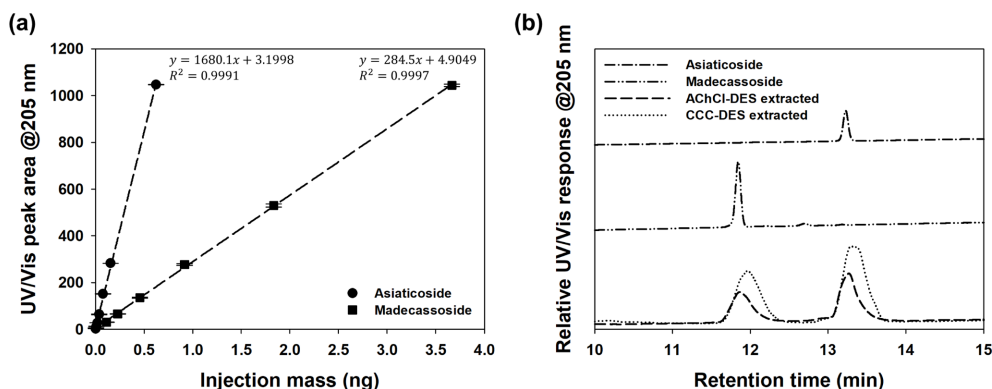


Fig. 1. (a) Calibration curves of asiaticoside (●) and madecassoside (■) determined by HPLC-UV at 205 nm. Each point represents the mean \pm SD of three injections ($n = 3$), showing linearity with $R^2 = 0.9991$ and 0.9997 , respectively. (b) Representative HPLC-UV chromatograms showing the relative UV/Vis responses at 205 nm for standard samples of asiaticoside and madecassoside and extracted asiaticoside and madecassoside with AChCl-DES-20 and CCC-DES-20.

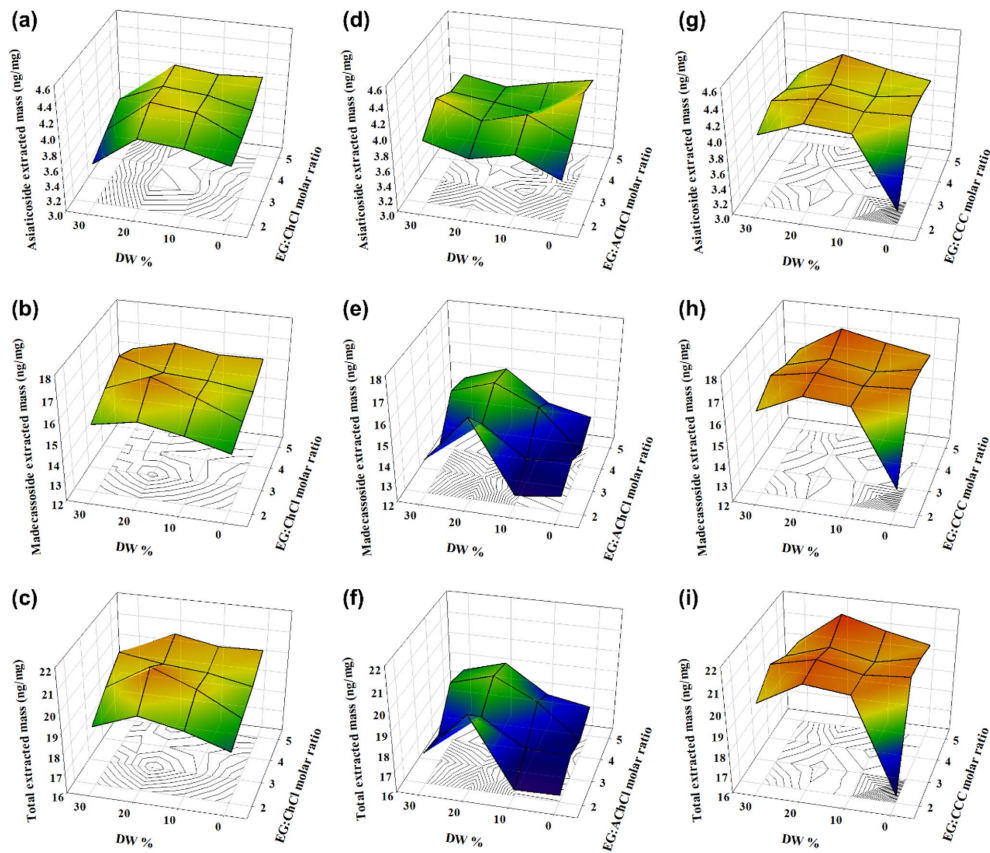


Fig. 2. 3D surface plots showing the extracted masses of asiaticoside, madecassoside, and total terpenoids from *Centella asiatica* at different DES compositions. (a-c) ChCl-DESs (data adopted from Ref. 12), (d-f) AChCl-DESs, and (g-i) CCC-DESs prepared with various HBD/HBA molar ratios (2:1–5:1) and water contents (DW, 0–30%, v/v). The extracted masses of asiaticoside (d, g), madecassoside (e, h), and their total amounts (f, i) were calculated based on calibration curves in Fig. 1(a).

결과적으로 테르페노이드 용해 및 확산 특성을 결정하게 된다.

물 20% 조건은 선행연구에서 ChCl-DES에서 추출 효율이 가장 높은 조성으로 확인되었다.¹² 따라서 본 연구에서는 HBA의 양이온 구조가 추출 효율에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 물 함량이 20%로 조정된 동일한 조건에서 AChCl-DES와 CCC-DES의 추출 결과를 비교하였다.

Fig. 2와 Table 2에 제시된 결과를 물 20% 조건에서 동일한 HBD/HBA 비율(2:1~5:1) 별로 비교하면, HBA의 양이온 구조적 차이에 따라 추출 효율이 뚜렷하게 구분되었다. 먼저 asiaticoside의 경우 세 HBA 계열 간의 차이는 크지 않았다. 예를 들어 2:1 비율에서 ChCl-DES 3.93 ± 0.01 ng/mg, AChCl-DES 3.68 ± 0.11 ng/mg, CCC-DES 4.15 ± 0.01 ng/mg으로 나타났고, 5:1 비율에서도

ChCl-DES 4.10 ± 0.01 ng/mg, AChCl-DES 3.82 ± 0.03 ng/mg, CCC-DES 4.26 ± 0.15 ng/mg으로 거의 동일한 수준을 유지하였다. 이는 asiaticoside가 비교적 비극성으로 용매의 점도나 수소결합 강도 변화에 대한 민감도가 낮기 때문으로 해석된다.²⁴

하지만 이와 다르게, madecassoside는 상대적으로 극성이어서 HBA 구조의 미세한 차이에 의해 확산 및 용해 효율이 크게 달라졌다. 2:1 비율에서 ChCl-DES 15.79 ± 0.07 ng/mg, AChCl-DES 16.04 ± 0.07 ng/mg, CCC-DES 17.00 ± 0.07 ng/mg으로 CCC-DES가 가장 높은 값을 보였다. 이와 같은 경향성은 HBD/HBA 비율이 증가하더라도 유지되어, 5:1 비율에서 ChCl-DES 16.67 ± 0.30 ng/mg, AChCl-DES 15.44 ± 0.45 ng/mg, CCC-DES 17.38 ± 0.56 ng/mg으로 나타났다. 이러한 결과는 HBA의 말단기 구조가 DES의 수소결합 네트워크

Table 2. Quantitative analysis of extracted asiaticoside and madecassoside from *Centella asiatica* at different DES compositions. The extracted masses of asiaticoside and madecassoside were calculated based on the calibration curves in Fig. 1(a).

Sample ID (HBA-HBD/HBA ratio-DW%)	Extracted asiaticoside mass (ng/mg)*	Extracted madecassoside mass (ng/mg)*	Sample ID (HBA-HBD/HBA ratio-DW%)	Extracted asiaticoside mass (ng/mg)	Extracted madecassoside mass (ng/mg)	Sample ID (HBA-HBD/HBA ratio-DW%)	Extracted asiaticoside mass (ng/mg)	Extracted madecassoside mass (ng/mg)
ChCl-DES2-0	3.74 ± 0.02	14.84 ± 0.04	AChCl-DES2-0	3.56 ± 0.10	12.80 ± 0.07	CCC-DES2-0	3.19 ± 1.24	13.17 ± 4.84
ChCl-DES3-0	3.80 ± 0.01	15.31 ± 0.06	AChCl-DES3-0	3.78 ± 0.01	13.43 ± 0.04	CCC-DES3-0	4.12 ± 0.01	16.88 ± 0.18
ChCl-DES4-0	3.89 ± 0.01	15.74 ± 0.33	AChCl-DES4-0	4.13 ± 0.11	12.73 ± 0.07	CCC-DES4-0	4.11 ± 0.08	16.83 ± 0.45
ChCl-DES5-0	4.07 ± 0.05	16.38 ± 0.11	AChCl-DES5-0	4.04 ± 0.10	13.49 ± 1.60	CCC-DES5-0	4.05 ± 0.09	16.59 ± 0.48
ChCl-DES2-10	3.88 ± 0.01	15.40 ± 0.03	AChCl-DES2-10	3.81 ± 0.12	12.51 ± 0.15	CCC-DES2-10	4.10 ± 0.04	16.81 ± 0.01
ChCl-DES3-10	4.06 ± 0.01	16.16 ± 0.11	AChCl-DES3-10	4.04 ± 0.23	13.18 ± 0.14	CCC-DES3-10	4.10 ± 0.07	16.75 ± 0.23
ChCl-DES4-10	4.02 ± 0.02	16.02 ± 0.07	AChCl-DES4-10	3.79 ± 0.17	14.75 ± 0.18	CCC-DES4-10	4.03 ± 0.06	16.47 ± 0.14
ChCl-DES5-10	4.04 ± 0.02	16.35 ± 0.05	AChCl-DES5-10	3.94 ± 0.39	13.97 ± 0.42	CCC-DES5-10	4.14 ± 0.12	16.94 ± 0.43
ChCl-DES2-20	3.93 ± 0.01	15.79 ± 0.07	AChCl-DES2-20	3.68 ± 0.11	16.04 ± 0.07	CCC-DES2-20	4.15 ± 0.01	17.00 ± 0.07
ChCl-DES3-20	4.12 ± 0.01	16.89 ± 0.06	AChCl-DES3-20	3.89 ± 0.11	14.68 ± 0.68	CCC-DES3-20	4.19 ± 0.01	17.11 ± 0.10
ChCl-DES4-20	4.07 ± 0.02	16.15 ± 0.05	AChCl-DES4-20	3.87 ± 0.14	15.70 ± 0.36	CCC-DES4-20	4.12 ± 0.05	16.84 ± 0.35
ChCl-DES5-20	4.10 ± 0.01	16.67 ± 0.30	AChCl-DES5-20	3.82 ± 0.03	15.44 ± 0.45	CCC-DES5-20	4.26 ± 0.15	17.38 ± 0.56
ChCl-DES2-30	3.53 ± 0.02	15.39 ± 0.15	AChCl-DES2-30	3.84 ± 0.09	13.71 ± 0.13	CCC-DES2-30	3.94 ± 0.09	16.07 ± 0.15
ChCl-DES3-30	3.69 ± 0.02	16.10 ± 0.19	AChCl-DES3-30	4.11 ± 0.17	13.22 ± 0.10	CCC-DES3-30	4.10 ± 0.04	16.74 ± 0.10
ChCl-DES4-30	3.84 ± 0.01	16.70 ± 0.36	AChCl-DES4-30	3.94 ± 0.21	15.04 ± 0.23	CCC-DES4-30	3.99 ± 0.01	16.31 ± 0.31
ChCl-DES5-30	3.66 ± 0.07	16.17 ± 0.17	AChCl-DES5-30	3.92 ± 0.08	14.74 ± 0.09	CCC-DES5-30	3.96 ± 0.08	16.17 ± 0.09

*The extracted masses of asiaticoside and madecassoside obtained at ChCl-DESs were adopted from previous literature as values for comparison.¹² All extraction masses are expressed as the mass of extracted constituents per milligram of dried *Centella asiatica* leaves (ng/mg = ppm).

Table 3. Structural and physicochemical characteristics of three HBAs used in DES preparation.^{4,9,10,22,23}

Property	Choline chloride (ChCl)	Acetylcholine chloride (AChCl)	Chlorocholine Chloride (CCC)
Molecular formula	$C_5H_{14}ClNO$	$C_7H_{16}ClNO_2$	$C_5H_{13}Cl_2N$
Functional group	Hydroxyl ($-OH$)	Ester ($-O-COCH_3$)	Chloro ($-Cl$)
Representative cation structure	$(CH_3)_3N^+$ $-CH_2CH_2OH$	$(CH_3)_3N^+$ $-CH_2CH_2-O-COCH_3$	$(CH_3)_3N^+$ $-CH_2CH_2Cl$
Polarity	High (strong hydrogen bonding)	Very high (ester oxygen and carbonyl dipole)	Moderate to low (less hydrogen bonding capability)
Hydrogen bond acceptor ability	Strong (due to $-OH$ and Cl)	Moderate strong (ester oxygen participates, but sterically hindered)	Weak (Cl atom is poor hydrogen bond acceptor)
Effect on solute diffusion	Moderate	Restricted (due to higher viscosity)	Enhanced (due to lower viscosity)
Characteristic chemical behavior	Excellent HBA for alcohol-based DES	Strong dipole moment, forms tight network	Weakly hydrogen-bonded, more mobile solvent matrix

워크 밀도와 점도를 결정하며, 그 결과 용질의 확산 속도에 직접적으로 영향을 미친다는 사실을 뒷받침한다고 볼 수 있다. ChCl은 말단 $-OH$ 기로 인해 강한 수소결합을 형성하여 높은 극성과 점도를 유지하지만, 이는 확산을 다소 제한할 수 있으며, AChCl은 에스터기($-O-COCH_3$)로 인해 극성은 증가하나 입체적 방해로 수소결합 망이 더 조밀해져 점도가 상대적으로 높게 유지될 수 있을 것이다. 이에 따라 용질 확산이 억제

되어 발생된 현상이라 예상된다. 반면 CCC는 $-Cl$ 치환기로 인해 수소결합 수용능이 감소하여 네트워크가 느슨해지고, 점도가 감소하면서 용질 확산성이 크게 향상되었을 것이다. 따라서 CCC-DES는 모든 HBD/HBA 비율에서 madecassoside 추출 효율이 가장 높은 결과를 보이게 된 것이고, 이는 수소결합 강도 완화 → 점도 저하 → 확산성 증가로 이어지는 현상으로부터 기인한 것이라 조심스럽게 예상된다.

결론적으로, 물 20% 조건에서 점도 완화가 이미 진행된 상태에서도 HBA 양이온 말단기의 화학구조 차이는 추출 효율에 충분한 영향을 미칠 수 있다는 것을 알 수 있었다.

3.3. DES 조성에 따른 영향

본 연구에서 관찰된 결과는 EG와 물이 모두 DES의 점도를 완화하고 용질 확산성을 향상시킬 수 있지만, 그 작용 메커니즘이 다를 가능성을 보여주고 있다고 생각된다. 우선 EG는 DES의 구조 내부(intrinsic network)에서 작용하는 조절 인자로 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다. EG는 2개의 하이드록실기(-OH)를 가지며 HBA의 염화이온(Cl⁻) 및 양이온과 강한 수소결합을 형성할 수 있다. 이때 EG 분자는 DES의 수소결합 네트워크에 구조적으로 통합되어(network-integrated) 점도를 완화시키면서도 전체 수소결합망의 안정성을 유지하는 것으로 알려져 있다. 따라서 EG 농도가 증가하면 수소결합망이 점진적으로 느슨해지지만 완전히 붕괴되지는 않는 것으로 예상된다. 이로 인해 용질 확산은 향상되지만 용매의 극성 균형은 유지되는 것으로 판단된다. 이러한 특성은 Table 2에서 HBD/HBA 비율이 증가함에 따라 madecassoside 추출량이 일정하게 증가한 결과로 이어진 것이라고 예상된다. 예를 들어 CCC-DES 계열에서 HBD/HBA 비율을 2:1 → 5:1로 높였을 때, madecassoside의 추출량은 13.17 ng/mg → 16.59 ng/mg으로 약 26% 향상되었다. 이때 asiaticoside의 농도는 4.0 ± 0.1 ng/mg 수준으로 거의 일정하게 유지되었으며, 이는 점도 감소가 용매의 극성 변화를 초래하지 않고 확산 경로만 개선되었음을 의미한다고 볼 수 있을 것이다. 즉, EG는 DES 시스템 자체를 구성하는 핵심 성분으로 DES 형성을 위한 수소결합 네트워크를 유지한 상태에서 내부 점도 조절 및 확산 촉진에 기여하는 내부 조절인자(internal factor)로 작용한 것으로 예상하고 있다.

반면, 물은 DES의 외부(external environment)에서 작용하는 조절 인자로서 역할을 한다고 가정한다면, 소량의 물 첨가는 수소결합망 내부에 부분적으로 침투하여 HBA-HBD 간 결합을 느슨하게 만들어 점도를 낮추는 역할을 하기 때문에 과량의 물은 HBA와 HBD의 결합 부위에 경쟁적으로 작용해 DES의 네트워크 구조를 붕괴시킬 수 있을 것으로 본다. 이로 인해 점도는 낮아지더라도 용매의 극성 균형이 무너질 수 있고, 용질-용매 상호작용이 감소하는 현상이 발생할 수 있을 것이다. 이러한 양상은 수분 함량 변화에 따른 madecassoside의 추출 효율 결과로부터 유추할 수 있다. 예를 들어, CCC-DES5의 경우 물 0%에서 16.59 ng/mg, 20%에서 17.38 ng/mg으로 증가했으나, 30%에서는 다시 16.07 ng/mg으로 감소하였다. 이는 물 10%와 20%의 조성에서는 확산 촉진 효과를 보였지만, 30%에서는 DES 구조의 붕괴로 인한 용해능력 저하가 발생했음을 보여준다고 예상할 수 있다. 즉, 물은 DES 시스템을 구성하는 핵심 성분은 아니지만 DES 외부에서 네트워크를 교란하면서 물리적 유연성을 부여하는 외부 조절인자(external factor)로 역할을 하는 것으로 해석할 수 있을 것이다.

이러한 경향을 통계적으로 뒷받침하기 위해, HBA 종류, HBD/HBA 비율, 그리고 물 함량의 영향을 3요인 주 효과 ANOVA를 통해 추가적으로 신뢰성 평가를 수행하였다. 그 결과 세 요인 모두 madecassoside의 추출 효율에 유의미한 영향을 미치는 것으로 확인되었으며(p < 0.05), asiaticoside의 경우 이러한 요인들에 대한 민감도가 상대적으로 낮게 나타났다. 자세한 통계 분석 결과는 Table 4에 나타내었으며, 본 연구에서 얻어진 각 조건 별 추출 효율의 차이가 유의미하다는 것을 보여주고 있다.

결과적으로 EG와 물은 모두 추출 효율을 향상시키지만, EG는 내부 수소결합망을 완화시키며 점도와 확산을 조절하는 반면, 물은 외부에서 수소결합망을 교

Table 4. Results of three-factor main-effects ANOVA evaluating the effects of HBA type, HBD/HBA ratio, and water content on asiaticoside and madecassoside extraction efficiencies.

Factors	Degree of freedom	Asiaticoside		Madecassoside	
		F [†]	p-value [‡]	F [†]	p-value [‡]
HBA	2	3.91	2.84 × 10 ⁻²	54.97	4.49 × 10 ⁻¹²
HBD/HBA ratio	3	5.12	4.40 × 10 ⁻³	4.15	1.21 × 10 ⁻²
DW%	3	2.56	6.91 × 10 ⁻²	9.10	1.08 × 10 ⁻⁴

[†]F-values compare between-group variance to within-group (residual) variance, with larger values indicating more significant factor effects.

[‡]p-values represent the probability that the observed effects occurred by chance. Effects with p < 0.05 were regarded as statistically significant.

란하여 구조적 유연성을 부여한다는 점에서 작용 메커니즘이 다르다는 것을 제안하고자 한다.

4. 결 론

본 연구에서는 병풀(*Centella asiatica*)로부터 주요 테르페노이드 성분인 asiaticoside와 madecassoside를 효율적으로 추출하기 위하여 다양한 HBA 구조, HBD/HBA 비율, 그리고 물의 함량이 DES의 물리·화학적 특성과 추출 효율에 미치는 영향을 체계적으로 평가하였다.

선행연구에서 추출 효율이 가장 높았던 20% 수분 함량 조건에서, HBA의 양이온 구조가 추출 효율에 미치는 영향을 비교한 결과, 세 HBA 계열(ChCl, AChCl, 그리고 CCC) 모두 asiaticoside의 추출량에는 큰 차이가 없었으나(약 3.7~4.3 ng/mg 범위), 극성이 더 높은 madecassoside에서는 유의미한 차이를 보였다.

특히, 비극성 치환기(-Cl)를 가진 CCC-DES는 수소 결합 수용능이 약해 점도가 낮고 확산성이 우수하여 모든 HBD/HBA 비율에서 가장 높은 madecassoside 추출 효율(최대 17.38 ± 0.56 ng/mg)을 나타냈다.

반면, 에스터기(-O-COCH₃)를 가진 AChCl-DES는 극성은 높으나 내부 수소결합 네트워크가 치밀하게 형성되어 점도가 유지되며, 이에 따라 madecassoside의 확산이 억제되어 추출 효율이 가장 낮게 나타난 것으로 보인다. 이 결과는 HBA 양이온 구조의 미세한 차이가 DES의 수소결합망 안정성, 점도, 그리고 확산성에 복합적으로 영향을 미친다는 것을 간접적으로 보여준다.

또한, HBD인 EG와 물의 역할을 비교한 결과, 두 조절 인자는 모두 DES의 점도를 완화시켜 추출 효율을 높이지만 그 작용 메커니즘은 근본적으로 다르다고 예상된다. EG는 DES 내부의 수소결합망에 통합되어 점도를 완화하면서도 구조적 안정성을 유지하는 “내부 조절인자(internal factor)”로 작용한 것으로 여겨진다. 반면, 물은 수소결합망의 외부에서 작용하여 HBA-HBD 간 상호작용을 교란시키는 “외부 조절인자(external factor)”로 기능한 것으로 여겨지며 20% 수준까지는 확산 촉진에 기여하지만, 30% 이상에서는 수소결합망 붕괴로 용해능력의 저하가 발생하였을 가능성이 있다. 수소 결합망의 붕괴를 증명하기 위한 이론화학적 접근방법으로 후속 연구를 진행하고 있으며, 이 후 보다 명확한 설명이 가능할 것으로 보인다.

결과적으로, HBA의 구조적 특성, HBD/HBA 비율,

그리고 수분 함량의 삼중 조합이 DES의 물리화학적 성질을 결정하며, 이는 테르페노이드 추출 효율의 핵심 조절 요인으로 작용함을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 향후 친환경 용매 기반의 식물화학물질 추출 공정 설계에 유용한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 한국연구재단에서 지원하는 세종과학펠로우십(RS-2021-NR061834)과 2025년도 교육부 및 대전광역시 지원으로 대전RISE센터의 지원을 받아 수행된 지역혁신중심 대학지원체계(RISE)의 결과입니다(2025-RISE-06-013).

References

1. A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, and V. Tambyrajah, *Chem. Commun.*, **1**, 70-71 (2003). <https://doi.org/10.1039/B210714G>
2. E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, *Chem. Rev.*, **114**, 11060-11082 (2014). <https://doi.org/10.1021/CR300162P>
3. A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, and A. R. C. Duarte, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2**, 1063-1071 (2014). <https://doi.org/10.1021/SC500096J>
4. Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, and F. Jérôme, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 7108-7146 (2012). <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>
5. Y. Dai, J. van Spronsen, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, *Anal. Chim. Acta.*, **766**, 61-68 (2013). <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2012.12.019>
6. C. Florindo, L. C. Branco, and I. M. Marrucho, *Fluid Phase Equilib.*, **448**, 135-142 (2017). <https://doi.org/10.1016/J.FLUID.2017.04.002>
7. I. M. Aroso, R. Craveiro, Á. Rocha, M. Dionísio, S. Barreiros, R. L. Reis, A. Paiva, and A. R. C. Duarte, *Int. J. Pharm.*, **492**, 73-79 (2015). <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2015.06.038>
8. A. Shishov, A. Pochivalov, L. Nugbienyo, V. Andruch, and A. Bulatov, *TrAC Trends Anal. Chem.*, **129**, 115956 (2020). <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2020.115956>
9. S.P. Ijardar, V. Singh, and R. L. Gardas, *Mol.*, **27**, 1368 (2022) <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27041368>
10. X. Shen, N. Sinclair, C. Kellamis, B. Gurkan, J. Wain-

- right, and R. Savinell, *J. Mol. Liq.*, **391**, 123314 (2023). <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2023.123314>
11. K. Chai, Y. Zhou, X. Lu, T. Yamaguchi, K. Ohara, H. Liu, and F. Zhu, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **25**, 10481-10494 (2023). <https://doi.org/10.1039/D3CP00570D>
12. J. Choi, S. J. Kim, and S. H. Ha, *Korean Chem. Eng. Res.*, **63**, 350-354 (2025). <https://doi.org/10.9713/KCER.2025.63.3.105125>
13. J. Choi, Y. Jeon, and S. H. Ha, *Anal. Sci. Technol.*, **36**(3), 128-134 (2023). <https://doi.org/10.5806/AST2023.36.3.128>
14. K. Shahbaz, F. S. Mjalli, M. A. Hashim, and I. M. *Thermochim. Acta.*, **515**, 67-72 (2011). <https://doi.org/10.1016/J.TCA.2010.12.022>
15. A. Roosta, R. Haghbakhsh, A. Rita C. Duarte, and S. Raeissi, *J. Mol. Liq.*, **388**, 122747 (2023). <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2023.122747>
16. M. Mohan, K. D. Jetti, M. D. Smith, O. N. Demerdash, M. K. Kidder, and J.C. Smith, *J. Chem. Theory Comput.*, **20**, 3911-3926 (2024). <https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.3C01163>
17. L. V. Tavares Duarte de Alencar, S. B. Rodríguez-Reartes, F. W. Tavares, and F. Llovel, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **12**, 7987-8000 (2024). <https://doi.org/10.1021/ACS-SUSCHEMENG.3C07219>
18. D. Lapeña, L. Lomba, M. Artal, C. Lafuente, and B. Giner, *Fluid Phase Equilib.*, **492**, 1-9 (2019). <https://doi.org/10.1016/J.FLUID.2019.03.018>
19. S. Rozas, C. Benito, R. Alcalde, M. Atilhan, and S. Aparicio, *J. Mol. Liq.*, **344**, 117717 (2021). <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2021.117717>
20. N. F. Gajardo-Parra, V. P. Cotroneo-Figueroa, P. Aravena, V. Vesovic, and R. I. Canales, *J. Chem. Eng. Data.*, **65**, 5581-5592 (2020). <https://doi.org/10.1021/ACS.JCED.0C00715>
21. G. Gygli, X. Xu, and J. Pleiss, *Sci. Rep.*, **10**, 1-11 (2020). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-78101-Y;SUBJMETA>
22. S. Subedi, *Electron. Theses Diss.*, (2021). <https://openprairie.sdstate.edu/etd2/225> (accessed October 17, 2025).
23. B. Tang, H. E. Park, and K. H. Row, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 4309-4313 (2014). <https://doi.org/10.1007/S00216-014-7817-5/METRICS>
24. S. Phaisan, F. Makkliang, W. Putalun, S. Sakamoto, and G. Yusakul, *RSC Adv.*, **11**, 8741-8750 (2021). <https://doi.org/10.1039/D0RA09934A>