목재공학 32(2): 58~64, 2004
Mokchae Konghak 32(2): 58~64, 2004

Biomass 자원의 활용(I)*1
- 율추의 유효이용을 위한 화학적 조성분의 HPLC분석 -

金 允 根*2† · 趙 鍾 洙*3

Utilization of Biomass Resources(I)*1
- HPLC Analysis of Chemical Components for Utilization of Chestnut Inner Bark -

Yun-Geun Kim*2† · Jong-Soo Jo*3

요 약

임산바이오매스 자원 이용의 일환으로 율추(栗皺) 열수추출물의 디에틸에테르 가용부의 HPLC 분석결과, 표준물질과의 retention time이 일치한 것을 RI detector로 얻어진 각 피크의 스펙트럼을 표준물질과 비교하고, 순도를 확인하는 방법으로 피크의 동정을 실시하였다. 피크의 동정 결과, phenolic acids와 aldehyde류로는 gallic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, 2,4,6-trihydroxybenzoic acid, 그리고 protocatechualdehyde이었으며, flavonoids는 catechin과 epicatechin으로 모두 6종이 확인되었다.

ABSTRACT

For the utilization of chestnut inner bark as forest biomass, the diethyl ether solubles of hot water extract from chestnut inner bark was analyzed by HPLC. Each peak was identified by comparing with retention time of standard regents and their purity from obtained UV spectrum by RI detector. Identified 6 compounds were gallic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, 2,4,6-trihydroxybenzoic acid and protocatecualdehyde as phenolic acids and aldehyde, and catechin and epicatechin as flavonoids.

Keywords: Biomass, chestnut inner bark, HPLC, flavonoids, phenolic acids and aldehydes

* 1 접수 2003년 10월 27일, 채택 2003년 11월 27일
* 2 진주산업대학교 부설 식품과학연구소 Food Science Research Institute, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea
* 3 진주산업대학교 임산공학과, Department of Forest Products, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea
† 주저자(corresponding author) : 김윤근(e-mail: yungun-kim@hanmail.net)

1. 서 론

식물체에서 생산되는 플라보노이드, 페놀산과 알데하이드는 식물의 2차 대사산물에 속하는 그룹으로서 물리화학적, 약리학적, 분류학적으로 중요하게 응용이 되고 있다. 이들 화합물의 분석에 대한 크로마토그래피의 다양한 기술이 개발되어 왔는데, HPLC가 다른 기기에 비하여 우수한 것은 고감도로 TLC보다도 더욱 효과적이기 때문이며, 유도체화 없이도 polyphenol의 분석이 가능하다. HPLC에 의한 이들의 polyphenol 성분의 분석은 reversal phase가 가장 적합한 칼럼으로 알려져 있으나, normal phase에 의한 분석으로 C_8이나 C_{18} 칼럼을 사용하는 것이 좋다고 주장되기도 한다(Conde *et al*, 1995). Polyphenol 성분의 분리를 위한 용출용매로서 메탄올과 물, 아세토니트릴과 물이 혼합되기도 하는데, 이들 용출용매는 유기산 또는 무기산과 혼합하여 분리를 용이하게 하거나 피크의 테일링을 없애고, 페놀수산기 그룹의 탈 proton을 막아주기도 한다. Flavonoids류와 phenolic acids 및 aldehydes류를 포함하는 페놀화합물의 혼합물들의 분리에는 gradient 용출이 바람직하다. 일반적으로 UV detection이 가장 유용하며, 다파장의 UV와 diode array detector는 크로마토그래피 피크의 동정과 순도를 평가하는데 이용되어지기도 한다(Conde *et al*, 1995).

본 연구에서는 율추로부터 페놀화합물을 분석하는데, 가장 좋은 HPLC 분석 조건을 확립하여 표준물질을 사용하여 화합물을 동정코자 하였다.

국내에서 생산되는 대부분의 밤은 겉껍질과 속껍질(율추)을 벗겨서 통조림가공을 하여 일본으로 수출을 하고 있다. 진주를 중심으로 한 서부경남의 주요한 밤 생산지는 산청, 함양, 하동이 주류를 이루고 있다. 가을철의 수확기에 즉시 수매를 하여 당년에 가공처리를 하고 있는데, 이 과정에서 부산물로 얻어진 율추는 특별한 용도가 없이 퇴비용이나 사료용으로 사용되어지고 있는 실정이다. 이러한 율추는 옛부터 궁중에서는 율추숙수를 음용수로 만들어서 즐겨 마셨다고 한다(장세우, 2001).

따라서 본 연구에서는 임산자원의 하나인 율추의 바이오매스자원을 유효 활용코자 율추의 화학적 조성분의 정성분석을 실시하여 유효성분을 알아보고, 율추의 페놀화합물을 중심으로 한 화학적 조성분을 HPLC로 분석하여 그 특성을 구명코자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

본 연구에 이용된 시료는 2000년 10월 진주시 일원에서 수거한 밤의 율추이다. 율추 추출물을 얻기 위하여 시중 구입의 율추를 건조기에 넣고 건조를 시키는 도중에 문을 열었을 때에 굉장한 포르말린 냄새를 맡을 수 있었다. 밤재배 농가에서는 밤을 수확하여 출하하기 전에 다량의 방부제를 살포하는 사실에 주목하여 본 실험에서는 음료용으로 부적합하다는 판단을 내렸다. 따라서 본 연구에서는 방부제가 미살포된 밤을 구입하여 시료로 사용한 점은 음용수로서의 개발에 앞서 매우 중요한 부분으로 지적하는 바이다.

2.2. 시료준비

율추를 얻기 위하여 밤의 겉껍질을 벗겨내고 칼로 밤의 속껍질을 깎아내었다. 깎아낸 밤의 껍질로부터 밤의 속살이 함께 붙은 것을 제거하기 위하여 일광에 건조시켜 밤의 율추(속껍질)와 속살을 분리한 후 율추를 시료로 사용하였다.

2.3. 분획 용매추출

율추의 열수추출물로부터 페놀화합물을 얻기 위하여 디에틸에테르를 사용하여 3회 추출하여 가용부를 얻었다.

2.4. Flavonoids, phenolic acids 및 aldehydes의 표준물질

본 연구에 사용된 표준물질은 Sigma사, Merck사, Wako사에서 구입한 flavonoids류 25종, phenolic acids

및 aldehydes류 17종으로 Table 3과 Table 4에 나타낸 바와 같다.

표준물질 중에는 매우 순수한 시약도 있었지만, 다소 불순물이 포함된 시약도 있음을 확인할 수 있었다. 특히, flavonoid 중에 일부는 분석 전에 용출용매인 methanol 및 H_2O에 녹였을 때에 결정으로 석출되는 시약도 있어서, 이들 시약은 칼럼의 막힘을 유발하며 불순물로서 작용하므로 이들을 제외시켰으며, 분석에 주의가 요구되는 부분으로 생각되었다. 그러나 용출용매의 특성에 따라서는 사용가능한 시약도 있을 것으로 생각된다.

2.5. HPLC 분석용 칼럼의 선정

분석할 시료의 성질에 따라서 용출용매와 분석용 HPLC 칼럼을 선정해야하는데, 본 연구의 율추에 함유되어 있을 가수분해형 탄닌을 포함한 친수성의 polyphenol 성분의 분석에는 normal phase의 칼럼이 유리한 것으로 판단되었다. Develosil ODS-HG 칼럼은 Si에 다수의 OH기가 치환된 normal phase의 칼럼으로 본 연구의 분석 결과에서 얻은 가장 적합한 칼럼으로 생각되었다. 특히, 칼럼 하나를 연결하여 사용하였을 때보다 두개를 직렬로 연결하여 분석한 것이 훨씬 분리능이 향상되었음을 확인할 수 있었으며, 분석에 요구되는 retention time은 당연히 늦어졌다. 특히, 칼럼 선정에서 중요시 된 부분은 구입한 표준물질인 flavonoids류, phenolic acids 및 aldehydes 중에 분자량이 같거나 유사하여 retention time이 같거나 아주 밀접하게 피크가 겹쳐 나올 때에는 보다 분리능이 우수한 칼럼을 선정해야 되는 점도 주지해야 될 부분으로 사료된다.

2.6. HPLC 분석 조건

본 연구에 사용된 분석기기는 HPLC(Waters 2690)이며, 사용한 칼럼은 Develosil ODS-HG 칼럼으로 2개를 연결하여 사용하였고, 가드칼럼(Precolumn)도 사용하였다. 용출용매는 A(메탄올 : 인산 = 999 : 1), B (물 : 인산 = 999 : 1)이며, 분석 gradient 및 washing gradient는 Table 1, 2와 같고, 온도는 30℃이었다. 검출기는 refractive index detector(RID, 210~400 nm)를 사용하였다.

Table 1. Analysis gradient

Time(min)	Eluents(mℓ)	A	B
0	1	20	80
50	1	100	0
60	1	100	0

Table 2. Washing gradient

Time(min)	Eluents(mℓ)	A	B
0	1.5	100	0
5	1.5	100	0
20	1.3	70	30
23	1.3	100	0
33	1.0	20	80
50	1.0	20	80

2.7. 표준물질 및 율추 디에틸에테르 가용부의 분석

표준물질과 율추의 디에틸에테르(Et_2O) 가용부는 메탄올에 녹여서 PTFE-membrane filter(0.20 μm)에 여과하여 표준물질 5 μℓ를 주입하였고, Et_2O 가용부는 50 μℓ를 주입, 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 표준물질 및 율추 디에틸에테르 가용부의 분석

본 연구에서는 정성분석에 중점을 두어 분리능이 우수한 칼럼을 선정한 다음, 율추 추출물의 flavonoids류와 phenolic acids 및 aldehydes류를 알아보고자 한 것으로 결과는 다음과 같다.

Table 3. Retention times of flavonoid standards

No.	Standard	RT(min)	MW
	Catechins		
1	Catechin	9.694	290
2	Epicatechin	12.921	290
	Flavones		
3	Luteoin	29.132	286
4	Apigenin	32.135	270
5	Flavone	37.976	224
	Flavanones		
6	Eriodictyol	25.130	288
7	Naringenin	28.544	272
8	Hesperetin	29.486	-
9	Isosakuranetin	35.811	286
10	Sakuranetin	35.860	286
11	Pinocembrin	36.135	256
12	Flavanone	38.915	224
	Dihydroflavonols and flavonols		
13	Taxifolin	17.839	304
14	Myricetin	23.513	318
15	Fisetin	24.416	286
16	Quercetin	27.861	302
17	Kaempferol	31.680	286
	Flavone Glycosides		
18	Vitexin	18.507	-
19	Luteolin-7-O-glucoside	20.331	-
	Flavanone Glycosides		
20	Naringin	21.000	580
	Flavonol Glycosides		
21	Hyperoside	21.115	464
22	Rutin	21.210	610
23	Isoquercitrin	21.338	448
24	Kaempferol-7-neohesperidoside	22.356	-
25	Quercitrin	23.882	448

3.1.1. 표준물질의 분석

HPLC 분석 결과, 본 연구에 사용된 flavonoids류 25종, phenolic acids 및 aldehydes 17종에 대한 표준물질의 retention time은 Table 3과 Table 4에서 나타낸 바와 같다. Flavonoids류의 각 표준물질의 retention time(RT, min)을 살펴보면, catechin이 9.694로 가장 빨리 검출되었고, epicatechin이 12.921분으로 늦게 용출되었다. 이들 두 catechin은 분자량이 290으로 동일하지만, epi type의 것이 약 3분 RT가 지연되었다.

Table 4. Retention times of phenolic acids and aldehyde standards

No.	Standard	RT(min)	MW
1	Gallic acid	5.605	188
2	3,5-Dihydroxybenzoic acid	8.198	154
3	Protocatechuic acid	8.876	154
4	2,4,6-Trihydroxybenzoic acid	9.275	188
5	Protocatechualdehyde	10.634	138
6	Chlorogenic acid	11.257	354
7	Vanillic acid	13.528	168
8	2,5-Dihydroxybenzoic acid	13.534	154
9	Caffeic acid	13.878	180
10	Syringic acid	14.073	198
11	Vanillin	15.245	152
12	2,6-Dihydroxybenzoic acid	15.701	154
13	Syringaaldehyde	15.828	182
14	Ferulic acid	18.507	194
15	Ellagic acid	21.973	338
16	Rosonic acid	23.333	290
17	Salicylic acid	25.694	138

Phenolic acids 및 aldehydes의 RT를 살펴보면, gallic acid가 5.605로 가장 빨랐으며, salicylic acid가 25.694로 가장 늦었다. Gallic acid의 분자량은 188이고, salicylic acid는 138이었다.

3.4.2. 율추의 디에틸에테르 가용부 분석

Et_2O 추출물은 500 ppm으로 조제하였고, 50 $\mu\ell$ 주입한 것이 피크의 겹침이 없이 가장 피크가 잘 나타났다.

율추의 디에틸에테르 가용부의 HPLC 분석결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 각 피크의 동정은 표준물질과의 RT 비교와 RI detector로서 UV spectrum

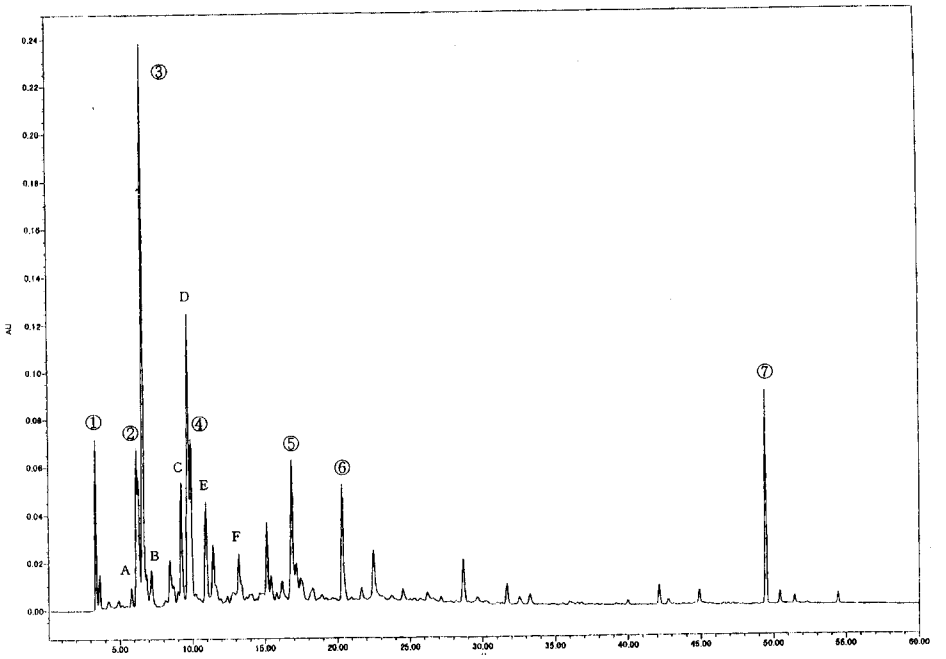


Fig. 1. HPLC chromatogram of an extract from chestnut inner bark. A: Gallic acid, B: 3,5-Dihydroxybenzoic acid, C: 2,4,6-Trihydroxybenzoic acid, D: Catechin, E: Protocatechualdehyde, F: Epicatechin, ①~⑦: Unknown

280 nm에서 비교 분석한 결과로서 피크의 성상이 명백히 밝혀졌다. 먼저 표준물질과의 RT가 일치하는 것은 5.807분의 gallic acid, 8.133분의 3,5-dihydroxybenzoic acid, 9.229분의 2,4,6-trihydroxybenzoic acid, 9.707분의 catechin, 10.943분의 protocatechualdehyde 그리고 13.195분의 epicatechin이 확인되었다. 이들 성분들은 용출용매 A와 B의 혼입비율이 100 : 0에서 70 : 30으로 설정된 gradient에서 검출되어진 것들로서, RT가 15분 이내의 전반부에서 모두 검출되어졌다.

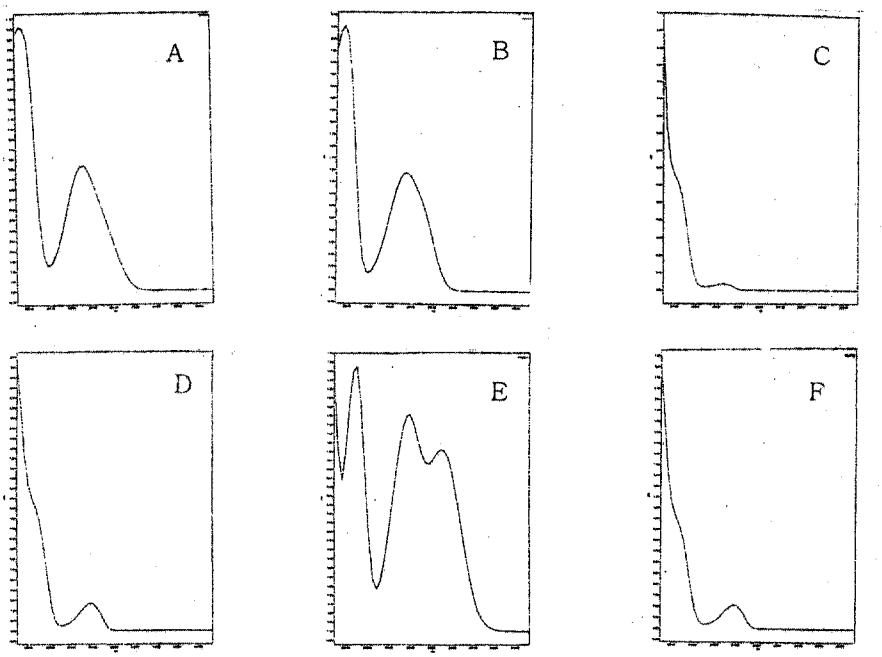
또한 이들 피크의 동정 결과에 대한 신뢰성을 더해주기 위하여, 먼저 표준물질의 retention time으로 동정된 각 피크를 RI detector로 얻어진 피크에 대해서 순도를 확인하고 표준물질과의 그래프를 비교 · 대조하였다.

불순물 포함 여부 등의 순도 확인은 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 얻어진 그래프상에서 피크의 정점과 좌 · 우 shoulder의 피크 3점의 피크를 비교하여 그래프가 일치하는지의 여부로 순도를 확인하는 방법으로 동정된 피크 모두가 순수한 화합물임을 확인하였다.

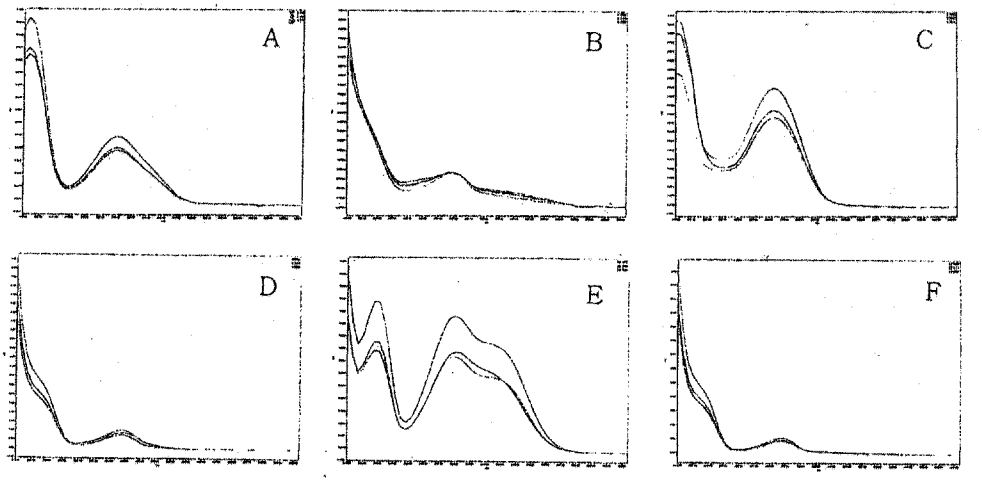
본 연구에서 밝혀진 화합물들의 특징은 Table 5에서 보는 바와 같이, catechin이 전체면적 중에서 약 10%의 면적을 차지하며, 6종의 화합물 가운데 가장 큰 면적을 차지하고 있음을 알 수 있었다. 그 다음이 2,4,6-trihydroxybenzoic acid, protocatechualdehyde, epicatechin, gallic acid 그리고 3,5-dihydroxybenzoic acid의 순임을 알 수 있었다.

Catechin은 녹차에서도 강조되는 성분으로서 항균 및 항산화작용이 탁월한 것으로 알려져 있는데, 그 주요한 내용으로서 항균과 살균작용으로는 콜레라균, 황색포도상구균, 마이코프라스마, O157, 백일해균 그리고 무좀균에 강한 것으로 알려져 있다. 그 외 인프루엔자의 바이러스를 퇴치하고, 에이즈바이러스의 증식을 억제하며, 암을 퇴치하고 생활습관병(고혈압, 당뇨병, 비만병)을 예방한다(島村忠勝, 2000).

탄닌에는 가수분해형 탄닌과 축합형 탄닌으로 구분되는데, 가수분해형 탄닌으로는 일반적으로 gallic acid



<Standard samples each peak>



<Identified extract sample peaks>

Fig. 2. Comparison between standards and identified sample peaks of HPLC chromatogram. A: Gallic acid, B: 3,5-Dihydroxybenzoic acid, C: 2,4,6-Trihydroxybenzoic acid, D: Catechin, E: Protocatechualdehyde, F: Epicatechin

Table 5. Characteristic of identified compounds in each peak

No.	Compounds	Max absorbance wave length	Max absorbance	%면적
1	Gallic acid	213.4	0.026	0.56
2	3,5-Dihydroxybenzoic acid	209.9	0.015	0.20
3	2,4,6-Trihydroxybenzoic acid	213.4	0.082	3.96
4	Catechin	209.9	0.946	9.63
5	Protocatechualdehyde	209.9	0.048	3.81
6	Epicatechin	209.9	0.263	1.89

와 그 유사 화합물이 당과 펩타이드 결합을 한 것으로 산 · 알칼리 · 효소 등의 작용에 의해 탄수화물과 gallic acid 또는 그와 관련이 있는 화합물, 즉 *m*-digallic acid, ellagic acid, chebulic acid, catechin이 알려져 있다(신 등, 1983). 탄닌류는 의약, 피혁, 염색 및 기타 공업용으로 쓰이는 것은 탄닌의 약 4/5가 축합형 탄닌이라고 한다(村上孝夫 等, 1985). 또한 탄닌은 천연물에서 물에 쉽게 추출되며 세포대사에 관련하고 있다고 전해지며, 특히 축합형 탄닌으로 catechin과 leucoantocyanin으로부터 유도된 것은 발암성을 가질 가능성이 강하다고 하였다(谷田貝光克 等, 1987). 본 연구의 율추에서 밝혀진 catechin, 2,4,6-trihydroxybenzoic acid, protocatecualdehyde, epicatechin, gallic acid 그리고 3,5-dihydroxybenzoic acid는 플라보노이드와 페놀산 및 알데하이드로서 열수추출에 의한 가수분해형 화합물로 사료된다. 일반적으로 녹차를 비롯한 음용수에는 catechin을 비롯한 ellagic 탄닌 등의 가수분해형 탄닌이 많이 존재하며, 그들의 임상적 결과로부터 인체에 매우 유익한 물질로 알려져 있다(淺川義範 等, 1995). 따라서 매년 생산되는 밤 가공상 얻어지는 율추의 부산물을 이용하여 고부가가치의 창출을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 율추에 대하여 본 연구에서 밝힌 6종을 포함한 미지의 페놀성 화합물들에 대해서는 이후 지속적인 정량분석과 각 성분들의 구조동정이 실시될 계획이다.

4. 결 론

임산바이오매스 자원 이용의 일환으로 율추 열수추출물의 디에틸에테르 가용부를 HPLC 분석하였다. 그 결과 표준물질과의 RT가 일치하고, RI detector로 얻어진 각 피크의 스펙트럼을 표준물질과의 비교 및 순도를 확인하는 방법으로 피크의 동정을 실시하여 밝혀진 화합물로서 phenolic acids와 aldehyde류로는 gallic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, 2,4,6-trihydroxybenzoic acid, 그리고 protocatechualdehyde이었으며, flavonoids류는 catechin과 epicatechin으로 모두 6종이 확인되어졌다.

참 고 문 헌

1. 신동소 외 9명. 1983. 임산화학. p. 73.
2. 장세우. 전통건강음료. 2001. 대원사. pp. 45~46.
3. 淺川義範 外 8人. 1995. 藥用天然物化學. 廣川書店. pp. 77~87.
4. Conde E., E. Cadahia, and M. C. Garcia-Vallejo. 1995. HPLC Analysis of Flavonoids and Phenolic acids and aldehydes in *Eucalyptus* spp. *Chromatographia* 41(3): 657~660.
5. Cadahia E., E. Conde, M. C. Garcia-Vallejo, and B. Fernandez de Simon. 1997. Tannin composition of Eucalyptus camaldulensis, E. globulus and E. rudis. *Holzforschung* 51(2): 119~124.
6. 村上孝夫, 岡本敏彦. 1985. 天然物化學. 廣川書店. pp. 98~99.
7. 島村忠勝. 2000. 奇蹟のカテキン. PHP研究所. pp. 15~20.
8. 谷田貝光克 外 3人 譯者, 1987. 木材の化學成分とアレルギー. 學會出版センター. pp. 165-166.