

## 신갈나무 잎으로부터 분리한 페놀성 화합물의 함량분석

황인혁 · Yin Jun · 윤성혜 · 안혜신 · 왕혜수 · 이민원\*  
중앙대학교 약학대학

### Contents Analysis of phenolic compounds from the Leaves of *Quercus mongolica*

In Hyeok Hwang, Jun Yin, Sung Hye Youn, Hye Shin Ahn, Hye Soo Wang and Min Won Lee\*

Laboratory of Pharmacognosy and Natural Product Derived Medicine, College of Pharmacy,  
Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** – *Quercus mongolica* (QM) is a species of *Quercus* native to Eastern Mongolia, Siberia, China, Japan, and Korea. QM has been used as Korean traditional medicine for the treatment of inflammation of the skin. Present work, the validation and content determination of the phenolic compounds which were isolated from the leaves of QM, including pedunculagin (1) and kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside (2) were conducted through High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). As a result, the contents of these compounds were 4.14% and 0.76% in QM extract, respectively.

**Keywords** – *Quercus mongolica*, Pedunculagin, Kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside, HPLC

*Quercus* 속 식물 중 국내 자생식물인 신갈나무(*Quercus mongolica*, QM)는 몽골 동부, 시베리아 동부, 중국, 일본, 한국에서 자생하고 있는 것으로 알려져 있으며, 민간에서 전통적으로 종자를 강장, 수렴약, 종독 및 주름살 제거의 목적으로 이용해왔으며, 소화 장애나 구강, 생식기, 항문 등 피부에 발생하는 염증 질환에 관한 약으로도 널리 이용되어 왔다.<sup>1-3)</sup> QM의 수용성 추출물들은 항균 효과와 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 이는 gallotannin과 ellagitannin을 포함하는 가수분해성 tannin의 높은 함량 때문인 것으로 알려졌다.<sup>4)</sup>

본 연구에서는, 이전 연구에서 확보한 QM 잎으로부터 분리된 화합물인 pedunculagin(1)과 kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(2)에 대하여 High-Performance Liquid Chromatography(HPLC)를 사용하여 밸리데이션 및 함량평가를 실시하였다.<sup>5)</sup>

본 연구를 통해 위와 같은 활성을 나타내는 신갈나무에 대한 함량분석을 실시함으로써, 국내 자생식물인 신갈나무의 산림자원으로써의 활용을 위한 기초자료를 마련코자 한다.

### 재료 및 방법

**기기 및 시약** – 밸리데이션과 함량분석에 사용된 High-Performance Liquid Chromatography(HPLC) 기기는 Waters 600E Multi-solvent Delivery System(Waters, USA) 모델을 이용하였으며, 컬럼은 Hector-M C18 column(5  $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm)을 이용하였다. HPLC 분석 용매는 acetonitrile, acetic acid, water(Honey well, USA)를 이용하였으며, 모든 표준 용액과 검액의 조제는 Whatman<sup>®</sup> Membrane filters(0.45  $\mu$ m, diam. 47 mm)로 여과하여 사용하였다.

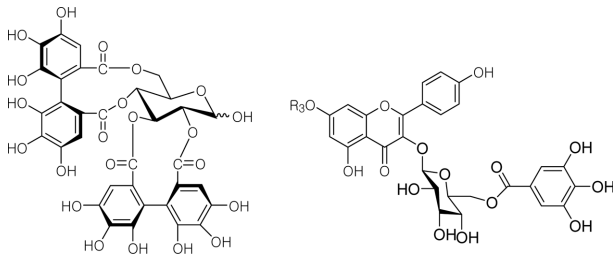
**재료** – 본 실험에 사용된 QM 잎의 원산지는 경기도 포천시 국립수목원(2017. 06)으로, 제공받은 QM 잎은 김성식 연구관(국립수목원)의 검증을 받았다. 확증표본은 QM 2017-06이며, 중앙대학교 약학대학 표본실에 보관되어 있다.

이전 연구를 통해 QM 잎으로부터 분리된 pedunculagin(1)과 kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(2)을 확보하여, 이를 함량분석의 표준품으로 이용하였다(Fig. 1).<sup>5)</sup>

**추출물** – 3일간 건조시킨 QM 잎(628 g)을 분쇄 후, 실온, 70% prethanol(10 L) 용매 조건으로 3일씩 3회 반복 추출하여 추출물(166 g)을 확보하였다.

**표준용액과 검액의 조제** – Pedunculagin(1)과 kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(2)를 MeOH에 녹여

\*교신저자(E-mail): mwlee@cau.ac.kr  
(Tel): +82-2-820-5602



**Fig. 1.** The structures of **1** - **2** isolated from leaves of *Quercus mongolica*.

stock solution을 조제했다. 표준용액의 농도는 pedunculagin (**1**)이 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/mL}$ , kaempferol-3-*O*-(6''-galloyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside(**2**)는 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625  $\mu\text{g/mL}$  농도의 표준용액을 조제하였다.

검액은 QM 잎 추출물 10 mg을 취해 70% MeOH 1 ml에 녹여 sample로 이용하였다.

**HPLC 조건** - Pedunculagin(**1**)과 kaempferol-3-*O*-(6''-galloyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside(**2**)의 정량은 HPLC를 이용하였다. 분석 조건은 flow rate; 1 ml/min, 이동상으로 A line; 0.2% Acetic acid- $\text{H}_2\text{O}$ , B line; Acetonitrile을 이용하여 Table I과 같은 조건으로 각 시료에 대한 함량분석을 실시하였다(Table I).

분석에 이용한 UV 파장은 220 nm로 설정하여 함량분석을 하였고, injection volume은 10  $\mu\text{L}$ 로 하였다.

**특이성(Specificity)** - 지표성분이 신갈나무 추출물 내 다른 물질과 간섭 없이 분리가 되는 것에 의해 특이성을 확인한다.

**직선성(Linearity)** - 직선성 평가를 위한 검량선을 얻기 위해 pedunculagin(**1**)을 MeOH로 희석하여 4 개의 농도(500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ), kaempferol-3-*O*-(6''-galloyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside(**2**)를 MeOH로 희석하여 5개의 농도(250, 125, 62.5, 31.25, 15.625  $\mu\text{g/mL}$ )가 되도록 용액을 만들어 실험을 진행하였다. Linear regression equation( $y=ax+b$  y: peak 면적, x: 시료 농도 a: 직선의 기울기, b: y절편)을 구하였으며 상관계수( $R^2$ )의 값을 통해 직선성을 확인하였다.  $R^2$ 의 값이 0.999이상인 경우 지표성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

**Table I.** HPLC analysis condition

HPLC condition			
Flow rate	1 ml/min		
UV detection	220 nm		
Run time	42 min		
	Time (min)	A (%) 0.2% Acetic acid - $\text{H}_2\text{O}$	B (%) Acetonitrile
Gradient	0 min	10	90
	40 min	30	70
	42 min	0	100

**정량한계(LOQ)** - 분석물질의 정량 가능한 최저농도 확인을 위하여, 정량한계(LOQ)를 측정하였다. LOQ는  $QL=10\times\sigma/S$  ( $\sigma$ : 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)의 식을 이용해 계산하였다. 기울기 S는 분석물질의 검량선으로부터 구하였으며, 회귀직선에서 y절편의 표준편차를 표준편차  $\sigma$ 로서 활용하였다.

**정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)** - 동일 농도의 시료에 대하여 일간 및 일내 변동을 알아보기 위해 정밀성 및 정확성 평가를 실시하였다. Pedunculagin(**1**)과 kaempferol-3-*O*-(6''-galloyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside(**2**)의 혼합 표준용액을 각 범위에서, 시료 농도당 3일간 반복성 시험, 일내 3회 반복성 시험을 하였다. 각 농도 범위는 pedunculagin(**1**) 500, 250, 125, 62.5  $\mu\text{g/mL}$ , kaempferol-3-*O*-(6''-galloyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside (**2**)는 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였다. 정확성은 표준값과 측정값 간의 일치되는 정도로 확인하였으며, 정밀성은 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 측정값들 사이의 근접성으로 측정하였다.

**함량분석** - Pedunculagin(**1**)과 kaempferol-3-*O*-(6''-galloyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside(**2**)의 함량은 linear regression equation을 이용해 계산하였다.

## 결과 및 고찰

**HPLC 분석조건 확립** - 지표성분인 pedunculagin(**1**)과 kaempferol-3-*O*-(6''-galloyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside(**2**)의 최적 분석법을 확립하였다. Flow rate; 1 ml/min, 이동상 용매 A: 0.2% Acetic acid- $\text{H}_2\text{O}$ , B: acetonitrile을 선정하여 각각 gradient elution을 적용하였다. 이를 통해 검액의 피크를 다른 물질의 간섭 없이 명확하게 분리할 수 있었다(Fig. 2).

Pedunculagin(**1**)은 ellagitannin으로, ellagitannin 화합물들은 중심 당 구조에 free anomer hydroxyl기가 존재해  $\alpha$ -anomer와  $\beta$ -anomer의 혼합물 상태로 존재하기 때문에, pedunculagin(**1**)은 HPLC 분석 시 두 개의 피크가 관찰된다. Pedunculagin(**1**)과 같은 ellagitannin 성분의 화합물들은 함량평가 시 두 피크(P1, P2)의 area를 합산한 것으로 함량평가를 실시하였다.<sup>6,7)</sup>

**특이성(Specificity)** - HPLC를 이용해 신갈나무 잎 추출물의 chromatography를 비교해 pedunculagin(**1**)과 kaempferol-3-*O*-(6''-galloyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside(**2**)의 retention time(RT)을 확인한 결과, 각 pedunculagin(**1**)의 두 피크는 P1; 7.718분, P2; 12.066분에서 검출되었으며, kaempferol-3-*O*-(6''-galloyl)- $\beta$ -*D*-glucopyranoside(**2**)의 피크(K)는 35.002분에서 다른 물질의 간섭 없이 성분의 피크가 분리된 것을 확인하였다. 표준용액의 RT은 P1; 7.787분, P2; 12.195분, K; 35.154분으로 표준용액의 피크 유지시간과 신갈나무 추출물 내의 피크 유지시간이 거의 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증하였다(Fig. 2).

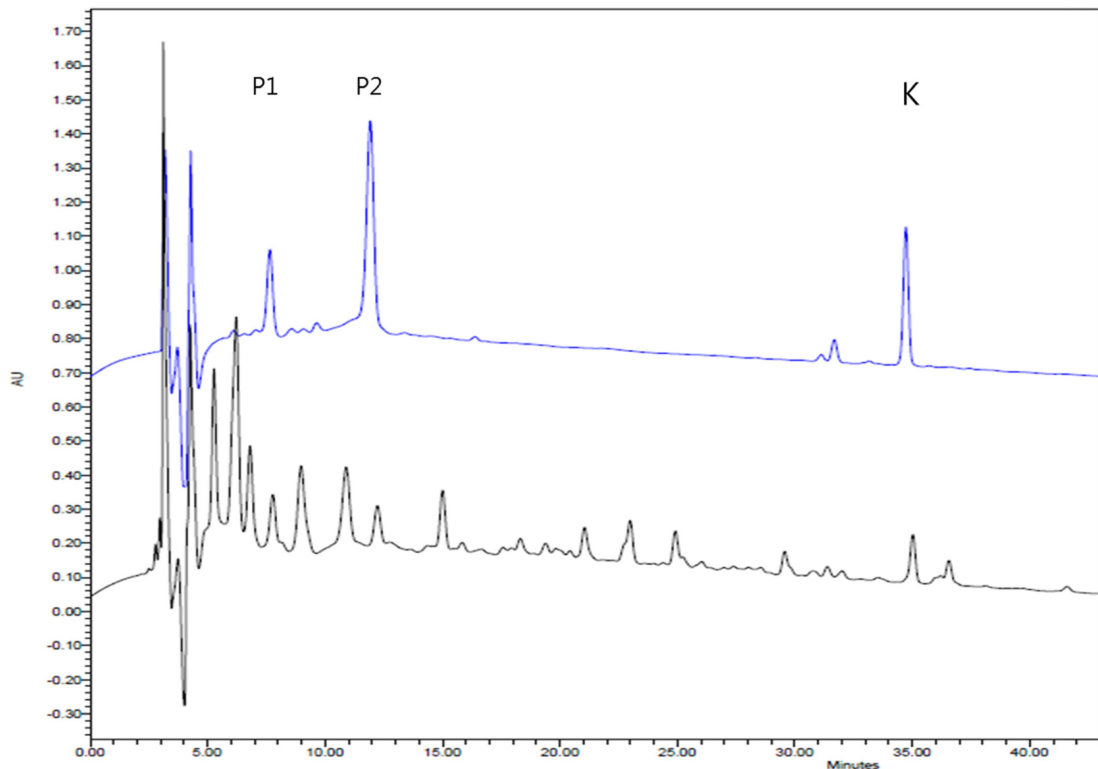


Fig. 2. HPLC chromatograms of QM at 220 nm.

Table II. Contents of compounds (1-2)

Compound	Contents (%)	
	1	2
Extract	4.14%	0.76%
Original plant	1.10%	0.20%

**직선성(Linearity)** – 검량선의 Linear regression equation은 다음과 같았다. (1)  $Y = 10740.67X - 227247.3$ 이며, 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9993. (2)  $Y = 26564.33X - 106725$ 이며,  $R^2$ 는 0.9997이다. 함량분석 결과, 두 화합물의 검량선 모두  $R^2$ 가 0.9990 이상으로 나타나 높은 직선성을 보이고 있음을 확인하였다(Fig. 3, Table III).

**정량한계(LOQ)** – 정량한계(LOQ)는 공식을 이용하여 그 값을 구하였다. Pedunculagin(1)은  $69.39 \mu\text{g/mL}$ , kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(2)는  $48.19 \mu\text{g/mL}$ 으로 측정되었다. 이를 통해 미량도 정량 가능함을 확인하였다(Table III).

**정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)** – Pedunculagin(1)의 정확성은 94.98~102.21% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로써 0.94~1.41%로 양호한 값을 나타내었다. kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(2)의 정확성은 99.62~100.62% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로써 0.75~1.77%

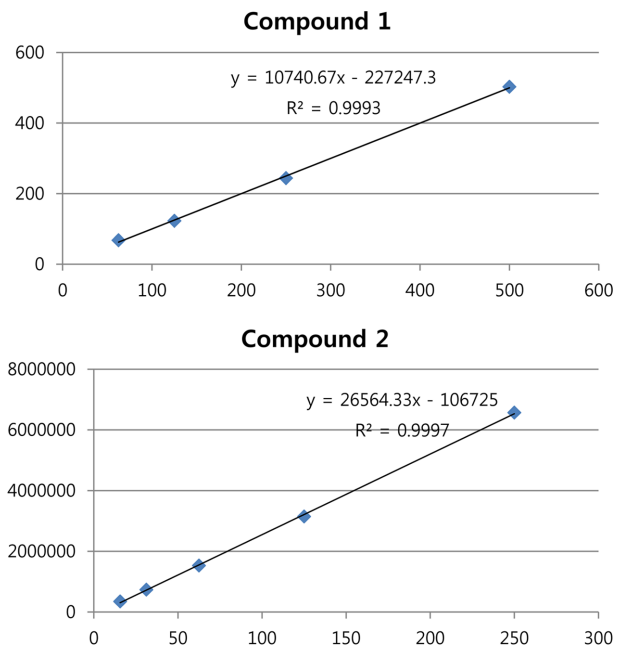


Fig. 3. Calibration curve and linear regression equation of compounds of 1-2 isolated from leaves of *Quercus mongolica*.

로 양호한 값을 나타내었다(Table IV).

**함량분석** – Table I의 HPLC 조건을 적용해 검체의 피크를 분리하였다(Fig. 2). Penculagin(1)과 kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(2)의 함량은 QM 잎 prethanol

**Table III.** Linear ranges, linear regression equation and LOQ of compounds (1-2)

Compounds	Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Response Slope (a)	Response Factor (b)	Correlation Coefficient ( $R^2$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	62.5~500	10740.67	-227247.3	0.9993	69.39
2	15.625~250	26564.33	-106725	0.9997	48.19

**Table IV.** Precision and accuracy for the determination of compounds (1-2)

Compounds	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Accuracy(%)		Precision(c.v.,%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
1	500	1.32	1.41	99.84	99.81
	250	0.50	0.94	100.15	100.54
	125	0.58	1.14	103.29	102.21
	62.5	0.53	1.41	93.99	94.98
2	250	1.12	1.08	100.47	100.40
	125	1.79	1.77	98.37	100.46
	62.5	0.88	1.16	99.07	99.62
	31.25	1.23	0.75	100.46	100.38
	15.625	0.90	1.13	99.48	100.62

추출물 대비 각 4.14%, 0.76%가 함유되어 있음을 확인하였다. 또한, 원소재의 건조 중량 대비 화합물(1-2)의 함량은 각 1.10%, 0.20%로 확인되었다(Table II).

## 결 론

이전 연구를 통해 확보한 pedunculagin(1), kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(2)를 지표성분으로 이용한 밸리데이션 실험에 의해 분석법의 특이성, 직선성, 정량 한계, 정밀성, 정확성을 검토하여 분석법을 검증하였다.

확립한 분석을 이용하여 함량분석을 시행한 결과, QM 잎 추출물에는 pedunculagin(1), kaempferol-3-O-(6"-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside(2)이 각 4.14%, 0.76%가 함유되어 있음을 확인하였다. 또한, 원소재의 건조 중량 대비 화합물(1-2)의 함량은 각 1.10%, 0.20%로 확인되었다. 연구의 결과로 QM 추출물에 존재하는 화합물의 함량분석에 있어서 중요한 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 산림청(Korea Forest Service, KFS)의 재원으로, 산림과학기술 연구개발사업의 지원을 받아 연구되었음(과제 번호: 2017037B10-1719-BA01).

## 인용문헌

1. 김태정(2008) 한국의 야생화와 자원식물, 95-101. 서울대학교출판부, 서울.

- Kaur, G., Hamid, H., Ali, A., Alam, M. S. and Athar, M. (2004) Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*. *J. Ethnopharmacol.* **90**: 285-292.
- Kong, Y., Park, B. and Oh, D. (2001) Antimicrobial activity of *Quercus mongolica* leaf ethanol extract and organic acids against food-borne microorganisms. **33**: 178-183.
- Salminen, J., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K. and Pulkkinen, P. (2004) Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *J. Chem. Ecol.* **30**: 1693-1711.
- Kim, H. H., Kim, D. H., Oh, M. H., Park, K. J., Heo, J. H. and Lee, M. W. (2015) Inhibition of matrix metalloproteinase-1 and type-I procollagen expression by phenolic compounds isolated from the leaves of *Quercus mongolica* in ultraviolet-irradiated human fibroblast cells. *Arch. Pharm. Res.* **38**: 11-17.
- Barry, K., Davies, N. and Mohammed, C. (2001) Identification of hydrolysable tannins in the reaction zone of *Eucalyptus nitens* wood by high performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **12**: 120-127.
- Fecka, I. (2009) Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. *Phytochem. Anal.* **20**: 177-190.

(2017. 11. 19 접수; 2017. 12. 12 심사;  
2017. 12. 14 게재확정)