

# 종자추출액의 안정성에 관한 연구 I

-가스크로마토그래피를 이용한 산패도 측정-

고 병섭\*·이 한구\*\*·김 정숙\*

\* 한국한의학연구소 한약연구부 신약개발연구실

\*\* 한국한의학연구소 한약연구부 본초연구실

= Abstract =

## Studies on Stability of Yoon-Je for Herb-Acupuncture (I)

-Measurement of Rancidity by Gas Chromatographic Analysis-

Byoung-Seob Ko, Ph.D., Han-Goo Lee, O.M.D., Ph.D. and

Chungsook Kim, Ph.D.

Department of Herbal Medicine, KIOM

In order to study the stability of herbal oil(Yoo-Je), the Yoo-Je from walnut and safflower measured their rancidity by gas chromatographic analysis. The use of specificity of column for estimating the oxidative deterioration of Yoo-Je was attempted. These results suggested the possible implication of pentanal and hexanal as an stability index for rancidity evaluation of Yoo-Je.

【Key words】 Herbal oil, Yoo-Je, pressure-filtration, rancidity, headspace GC

## I. 서론

종자추출액은 약침에서 윤제라고 하여 많이 사용되어지고 있는데 요법은 약물과 경락학설의 원리가 결합한 신침요법으로 약물의 효과와 침의 효과를 동시에 얻고 있어서 현재 임상에 많이 활용되고 있다. 또한 한약은 전통적으로 경구복용

---

corresponding author : H.G.Lee.

에 의존하고 있으나 생활양상의 변화로 최근에는 다양한 제제가 요구되어지고 있어서 한약제형을 개선하는 일환으로 약침에 대한 관심이 고조되고 있는데, 이에 대한 연구는 임상효과 및 안전성에 대하여 일부 보고되어지고<sup>1)</sup> 있으나 아직도 미흡한 실정이다.

또한 임상가에서 약침액의 제조후 보관방법 및 기간에 따른 안정성의 확보에 대한 연구가 절실히 요구되어지고 있으나, 현재 이에 관한 연구는 전혀 이루어지고 있지 않기 때문에 약침제제의 안정성 확보에 대한 연구가 시급한 과제라고 사료된다.

따라서 본 연구에서는 종자추출액(이후 유제라고 칭한다)의 안정성 연구의 기초자료를 얻기위하여 홍화종자와 호도에서 AOAC추출법<sup>2)</sup>과 에탄올추출법<sup>3)</sup> 및 압착법<sup>4)</sup>을 이용하여 유제를 제조한 후, 지질의 추출, 지질의 분획 및 지방산의 조성을 비교분석하였다. 또한 유제에 있어서 안정성 확보라는 면에서 중요한 인자라고 사료되는 산화생성물을 간단하고 재현성 있게 측정하는 방법의 연구가 필요하다고 생각되어 가스크로마토그래피를 이용하여 산화과정에서 생성되는 이차산화생성물을 관측하는 방법의 확립에 대한 연구를 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 홍화종자와 호도는 올해 6월에 시중에서 구입한 것으로 호도는 국내산, 홍화종자는 중국산을 사용하였다.

지방산 분석용 표준품중 palmitic acid 는 Nakarai사의 것을 사용하였고 그외의 시약은 Aldrich사의 것을 사용하였으며, methyl화 시약은 nitrosomethyl urea<sup>5)</sup>를 합성하여 diazomethane을 발생시켜 사용하였다. 이차산화생성물의 표준품과 GC의 내부표준품인 resolucinol dimethyl ether는 Nakarai사, 그리고 mesitylene은 Wako사의 것을 사용하였다. 모든 용매는 증류하여 사용하였고, TLC plate 는 Merk사의 Kieselgel 60F<sub>254</sub> (20×20cm, thickness 0.25mm)를 사용하였다.

원심분리기는 Beckman Avanti<sup>TM</sup> 30 centrifuge를 사용하였고, GC는 Hewlett Packard HP5890 seriesII 와 HP 3395 Integrator를 사용하였다.

## 2. 유제의 제조

제조한 모든 유제는 질소로 치환하여 냉장 및 실온에서 보관하였다.

### 2-1. AOAC추출<sup>2)</sup>

각각의 시료(100g)을 믹서기로 분쇄하여 n-hexanes(400ml)에서 하루밤 정치한 후, 여과하여 무수 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조하고 20℃ 정도의 온도에서 감압농축하였다. 감압농축한 잔사를 40000×g로 20분간 원심하고 상층을 분리하여 상층액을 감압건조한 후, 유제로 사용하였다.

### 2-2. 에탄올추출<sup>3)</sup>

각각의 시료(100g)을 믹서기로 분쇄하여 95%EtOH(400ml)에서 하루밤 정치한 후, celite여과하여, 20℃ 정도의 온도에서 감압농축하였다. 감압농축한 잔사를 2-3시간 정치한 후 상층액을 조심스럽게 원심분리기용 tube에 옮기고 40000×g로 20분간 원심하고 상층을 분리하여 상층액을 감압 건조한 후, 유제로 사용하였다.

### 2-3. 압착추출<sup>4)</sup>

호도(100g)를 믹서기로 분쇄하고 Fig. 1과 같은 장치를 이용하여 감압하 압착하여 추출한 후, 추출된 여액을 40000×g로 20분간 원심하고 상층을 분리하여 상층액을 감압건조한 후, 유제(48.2g)로 사용하였다.

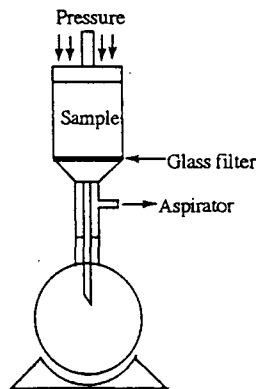


Fig 1. Apparatus of pressure filtration for Herbal-oil

### 3. 총지질(Total lipid, TL)

총지질의 추출은 Folch등의 방법<sup>5)</sup>으로 추출하였다. 즉, 유제, 1g에 CHCl<sub>3</sub>(C)-MeOH(M) 2:1, v/v을 넣은 후 H<sub>2</sub>O(W)가하여 C-M-W의 비율이 8:4:3이 되도록 하였다. 잘 흔들고 정치 후 상층과 하층을 나누고, 하층에 C-M-W(3:48:47, v/v 또는 1:10:10, v/v)을 가하여 가볍게 진탕한 후 정치하여 CHCl<sub>3</sub>층과 H<sub>2</sub>O층을 분리하였다. 이방법을 3회 반복하였다. CHCl<sub>3</sub>층을 합쳐서, 감압하 튜거하여 정제된 총지질로 하였다. 정제된 총지질은 질소 gas로 충전한 후 냉장보관하면서 분석시료로 사용하였다.

### 4. 지질의 분획

Silica gel(Merk Kieselgel 60, 70-230mesh) 10g을 column(2.0×30cm)에 충전하고 흡착시킨후, column용적의 2-3 배의 CHCl<sub>3</sub>로 silica gel을 세척하여 정제된 총지질 500mg를 흡착시켰다. 용출속도 3-4ml/min으로 조절하여, 중성지질(natural lipid, NL)은 CHCl<sub>3</sub> 250ml로, 당지질(glycolipid, GL)은 acetone 300ml로, 인지질(phospholipid, PL)은 MeOH 250ml로 각각 용출하여 분획하였다. 분획한 각 용출액은 30℃이하에서 용매를 제거한 후 중량법에 의하여 각 지질의 함량을 구하였다.

### 5. 지방산(Free fatty acid, FFA)의 분석

각각의 총지질 1g에 4.5N KOH-40% EtOH용액 20ml을 넣고 질소 gas하 60℃로 10분간 교반시킨 다음 실온이 될때까지 교반하였다. 반응 혼합물은 6N HCl로 pH 1로 산성화시키고 ether(20ml)로 3회 지방산을 추출하고 ether층을 증류수로 3회, 포화 NaCl수용액으로 1회 세척후, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 다음 여과하여 감압 농축하였다.

GC에 의한 지방산의 분석은 얻어진 지방산 300mg을 CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>로 반응시켜 methyl ester화한 후, HP-1(100% dimethylpolysiloxane, 25m×33 $\mu$ m×0.20mm) capillary column을 사용하여 구성지방산을 분석하였다. 분석조건은 detector(FID)온도가 280℃, oven의 온도를 40℃에서 1분간 머무른 후 5.0℃/min에서 300℃까지 올리고 그 온도에서 5분간 유지하였다. Carrier gas 는 N<sub>2</sub>로 유속은 1ml/min(spilt ratio 100:1) injection 양은 1.0 $\mu$ l이었다.

## 6. 이차산화생성물의 분석

유제의 산화생성물을 손쉽게 재현성 있게 측정하기 위해 원제에서 각각의 시료를 밀봉하지 않고 인위적으로 60°C에서 400Lux형광등을 2주일 조사하여 산패를 유도하고, GC로 분석하였는데 조건은 지방산 methyl ester분석과 동일한 조건에서 행하였다.

검량선을 작성하기 위해 GC의 내부표준품인 resolucinol dimethyl ether 50.7mg을 정확히 달고 ester에 녹이고 10ml로 하여 표준액을 만들었다. 이차산화생성물의 표준품인 pentanal과 hexanal을 각각 47.6mg과 65.1mg을 ether에 녹이고 10ml로 하여, 이 액을 순차적으로 10배, 100배 희석하여 검액으로 사용하였다.

## 7. 유제의 안정성연구

유제의 안정성을 위한 기초자료를 얻기 위해 각각의 약침액을 GC에 의해 경향분석을 시도하였다. 분석조건은 Supelcowax<sup>TM</sup> 10(Poly(ethylene glycol), 30cm × 0.25mm × 0.32mm) capillary column을 사용하여 detector(FID) 온도가 250°C, Injection 온도는 240°C, oven의 온도를 40°C에서 2분간 머무른 후 4.0°C/min으로 250°C까지 올리고 그 온도에서 10분간 유지하였다.

Carrier gas는 N<sub>2</sub>로 유속은 1ml/min(split ratio 100:1), injection 양은 0.2μl (neat)이었다.

또한, 호도 유제를 질소를 치환하지 않고 실온에서 광선을 차단하여 보관하고 1주일 단위로 GC를 이용하여, 이차산화생성물을 지방산 methyl ester분석 조건과 동일하게 측정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 총지질의 함량

홍화종자(*Oleum carthami*) 및 호도(*Juglandis semen*)에서 유제의 제조는 추출방법에 따라 현저하게 수율의 차이를 보이고 있는데(Table 1.), 95% EtOH에 의한 에탄올 추출에서는 대부분 점성과 방향이 강한 물질들이 추출되었는데, 이 물질들은 Molisch반응에서 자색을 나타내는 것으로 보아 당류라고 추정된다.

Table 1. Total lipid contents and composition of nertral lipids, glycolipids and phosphelipids fractionated from total lipids using silica gel chromatography in Herbal-oil

Varieties	Extraction	Crude Yield (%)	TL (mg/g)	NL	GL (%)	PL
	Method					
<i>Oleumcarthami</i>	AOAC	47.2	443.7	69.4	21.2	9.4
	95% EtOH Pressure-	14.1	79.2	56.3	29.2	14.5
<i>juglandis semen</i>	Filtration	48.2	462.7	65.8	23.6	10.6
	95% EtOH	16.1	82.2	54.3	28.4	17.3

\* TL : Total lipids, NL: Neutral lipids, GL: Glycolipids, PL: Phospholipids

Table 1.에 나타난 바와 같이 AOAC방법과 압착법으로 제조한 유제는 총지질 함량이 각각 443.7mg과 462.7mg/g으로 95% 에탄올 추출에 의한 약침액 보다 약 5.5배로, 이것은 본 실험의 품종과는 다르지만 Applewhite 등<sup>7)</sup>과 Fristrom 등<sup>8)</sup>의 보고와 비슷한 함량치를 보였다. 또한, 95% 에탄올 추출은 당지질의 함량이 상대적으로 높은 함량치를 나타내고 있었다.

유제에서 총지질을 정제한 후, silica gel 크로마토그래피에 의하여 중성지질, 당지질 및 인지질로 분획한 결과(Table 1.), 중성지질이 가장 높았고, 그다음 당지질, 인지질 순으로 나타났다.

이러한 사실에서 유제제조시 추출방법에 따라 많은 성분의 차이가 나타나기 때문에 추출방법에 대한 공부가 필요하다고 생각되어 진다.

## 2. 지방산 조성

유제의 총지질로 부터 지방산조성을 GC에 의하여 분석 정량한 결과를 Table 2에 나타냈는데, 지방산의 조성은 제조방법에 따라 정도의 차이는 있으나 비교적 비슷한 경향을 보여 주었다.

유제의 지방산조성 결과에서 리놀레산(linoleic acid, 18:2)과 올레산(oleic acid, 18:1)이 가장 많이 함유되었는데, 이 결과는 Applewhite 등<sup>7)</sup>과 Fristrom<sup>8)</sup> 등의 결과와 비슷한 경향을 보여 주었다. 홍화유는 리놀레산이 많은 것과 올레산이 많

은 것에 따라 두가지 종류로 나누고 있는데, 식품에서는 제품유형의 표시기준<sup>9)</sup>으로 사용되고 있으며, 또한 식물유전학과 분류학에서는 가장 중요한 홍화의 판정 기준이 되고 있다.<sup>10)</sup> 호도의 경우도 black과 English로 종류를 나누고 있는데, 지방산 조성은 서로 비슷하다.<sup>9)</sup> 이러한 사실로 미루어 볼때 유제를 제조 할 경우 임상목적에 맞게 일부 약제에서는 신중한 종류의 선택이 고려되어야 한다고 생각되어진다.

또한, 총지질 중에서 모두 불포화지방산의 함량이 포화지방산보다 많았는데, 이는 유제의 제조 및 저장시 지방산중 불포화지방산인 리놀레산 함량이 많기 때문에 지방이 산패가 일어나 이취발생을 가져올 가능성이 높을 것으로 생각되므로 주의를 해야 한다고 사료된다.

Table 2. The fatty acid compositions of the totoa lipid by GC

Fatty acid	<i>Oleumcarthami</i>		<i>Juglandis semex (%)</i>	
	AOAC	95% EtOH	Pressure-Filtration	95% EtOH
12:0	0.1	0.2	0.1	<0.1
14:0	0.1	0.1	-	<0.1
16:0	5.8	5.1	5.2	4.9
18:0	2.5	2.0	3.2	4.9
20:0	8.9	7.5±0.1	9.1	9.0±0.3
Total saturated	8.9	7.5±0.1	9.1	9.0±0.3
16:1	0.2	0.1	-	-
18:1	10.4	8.1	15.1	9.3
18:2	74.1	72.8	64.7	77.8
18:3	-	-	3.4	-
20:4	0.5	0.2	0.9	<0.1
Total unsaturated	85.2	81.2	84.1	87.1±0.1
Others	5.9	11.3±0.1	6.8	3.9±0.4

### 3. 이차산화생성물

유제에 있어서 산화생성물을 간편히 측정하는 방법의 확립을 위해서, 60℃에서 형광등 조사하 인위적으로 산패를 유도한 유제에서 이차산화생성물을 분석한 크

로마토그래피는 Fig. 2와 같고, 검량선은 Fig. 3과 같다. 검량선을 검액 및 표준액으로 분석한 결과  $Y_{\text{hexanal}} = 0.69x + 0.03$  과  $Y_{\text{pentanal}} = 0.52x + 0.02$ 으로 직선상에 나타내었다.

이차산화생성물의 동정을 GC로 정량한 결과는 Table 3과 같은데, 세가지의 유제중 hexanal이 비교적 쉽게 관측되었으나, pentanal은 호도에서만 0.1%가 관측되었다. 이와같은 결과는 대두유의 산화생성물에 관한 연구보고<sup>11)</sup>와 유사한 것으로 유제들이 전체 지방산에서 oleic acid와 linoleic acid함량이 80%가 넘기 때문이라고 판단된다. 또한, GC에 사용한 HP-1은 고정상이 cross-linked methyl siloxane 으로 OV-1, SE-30, SPB-1등이 비슷한 특성으로 갖는 column으로서 nonpolar결합에 적합하고 polar결합에는 부적합하므로, 이러한 고정상의 특성을 살리면 headspace GC<sup>12)</sup>를 사용하지 않고도 쉽게 hexanal과 pentanal을 관찰할 수 있다는 새로운 사실이 관찰되었다.

#### 4. 유제의 안정성

GC에 의한 유제의 경향분석은 Supelcowax<sup>TM</sup> 10을 고정상으로 사용하였는데, Fig. 4에 유제를 조제한 직후의 GC의 차-트를 나타냈다. 이들 차-트에서 보듯이 홍화와 호도의 기본경향이 많이 달라지고 있으며, 또한 홍화에서 추출방법에 따라 기본경향이 달라지고 있다. 특히 추출방법에 따라 홍화에서 RT 52min이후에 현저한 양상을 보이고 있다. 이는 Supercowax<sup>TM</sup> 10 column의 특성이 극성 poly(ethylene glycol)-type이기 때문에 극성 화합물이 조성이 현저하게 다름을 보여주고 있다고 생각된다. 현재 이들 조성에 대한 연구는 진행중이다. 이러한 사실로 미루어 볼때 추출방법의 선택은 약제의 제조상 중요한 인자라고 생각되며, 유제의 연구에 있어서 추출방법에 대한 연구가 활발히 진행되어야 한다고 생각된다.

호도유의 안정성을 측정하기 위해 측정방법이 확립되어진 이차산화생성물의 분석방법을 이용하여 1주일 단위로 측정한 결과 6주째에 hexanal이 RT 6.550으로 관측되었다(Fig.5). 이 결과는 호도유를 질소로 치환하지 않고 실온에서 보관한 것을 측정한 결과이기 때문에, 현재 유제를 4가지군(질소치환실온 또는 냉장, 무질소 실온 또는 냉장)으로 분류하여 추가실험을 진행중이다.

본연구에서 column의 고정상 특성을 이용하면 headspace GC를 사용하지 않고도 쉽게 일반적인 GC에서 이차산화생성물인 hexanal 과 pentanal을 측정할 수 있고 호도 또는 홍화의 유제에서 hexanal과 pentanal은 산화진행도를 측정하는 품질 지표성분으로 이용이 가능함을 알 수 있었다.



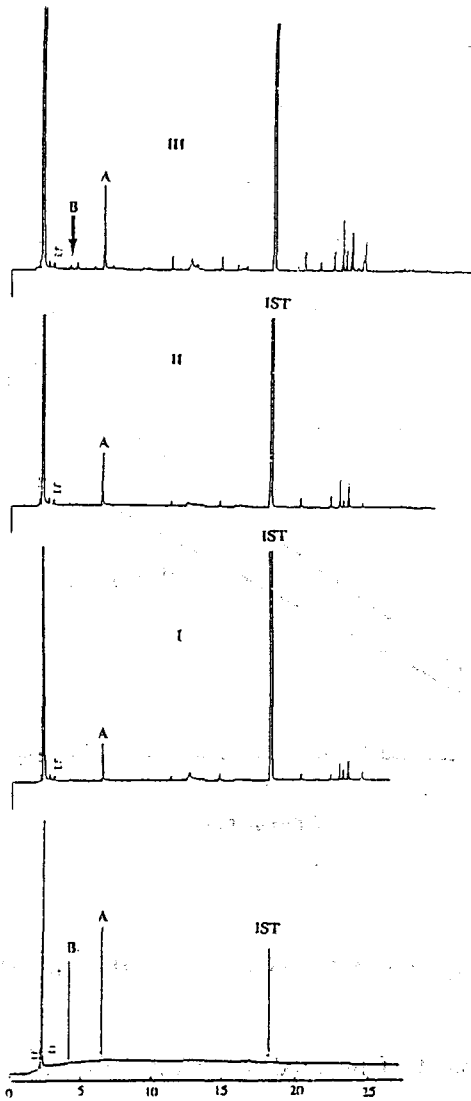


Fig 2. Gas chromatogram in oxidated Hebal-oil after 14 days storage at 60°C with daily 24 hours fluorescent light

\* A: Hexanal, B: Pentanal, IST: Internal standard(Resolucinol dimethyl ether), I: Safflower-AOAC extract, II: Safflower-95% EtOH extract, III: Walnut-Pressure Filtration

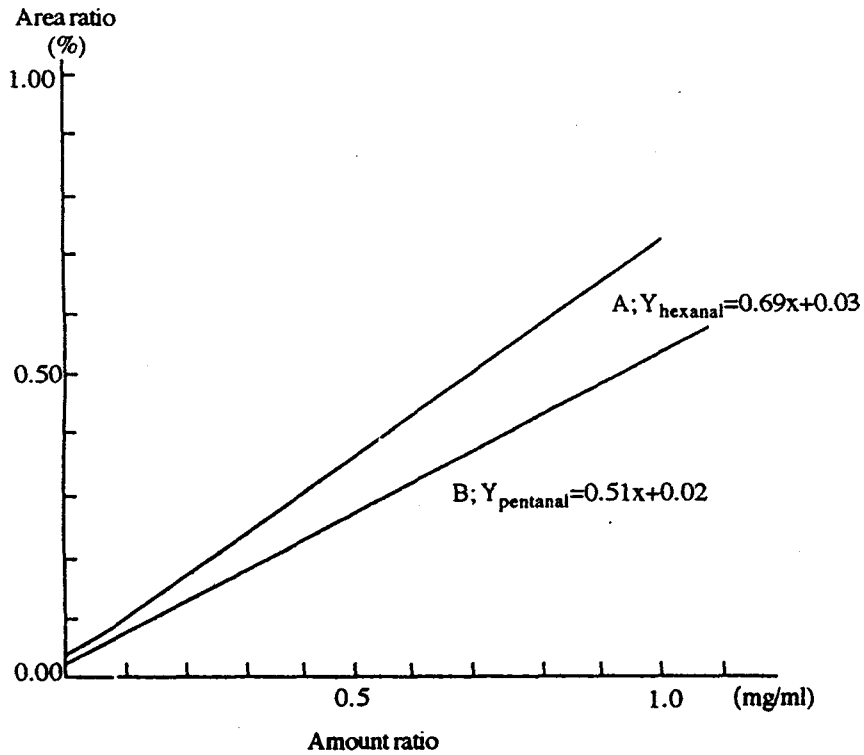


Fig 3. Calibration Curve of Hexanal(A) and Pentanal(B)

Table 3. The content of hexanal or pentanal in oxidated Herbal-oil

Compounds	RT (min)	<i>Oleumcarthami</i>		<i>Juglandis semex (%)</i>
		AOAC	95% EtOH	Pressure-Filtration x (n=3)
Hexanal	6.520	0.76	1.13	0.77
Pentanal	4.128	-	-	0.10

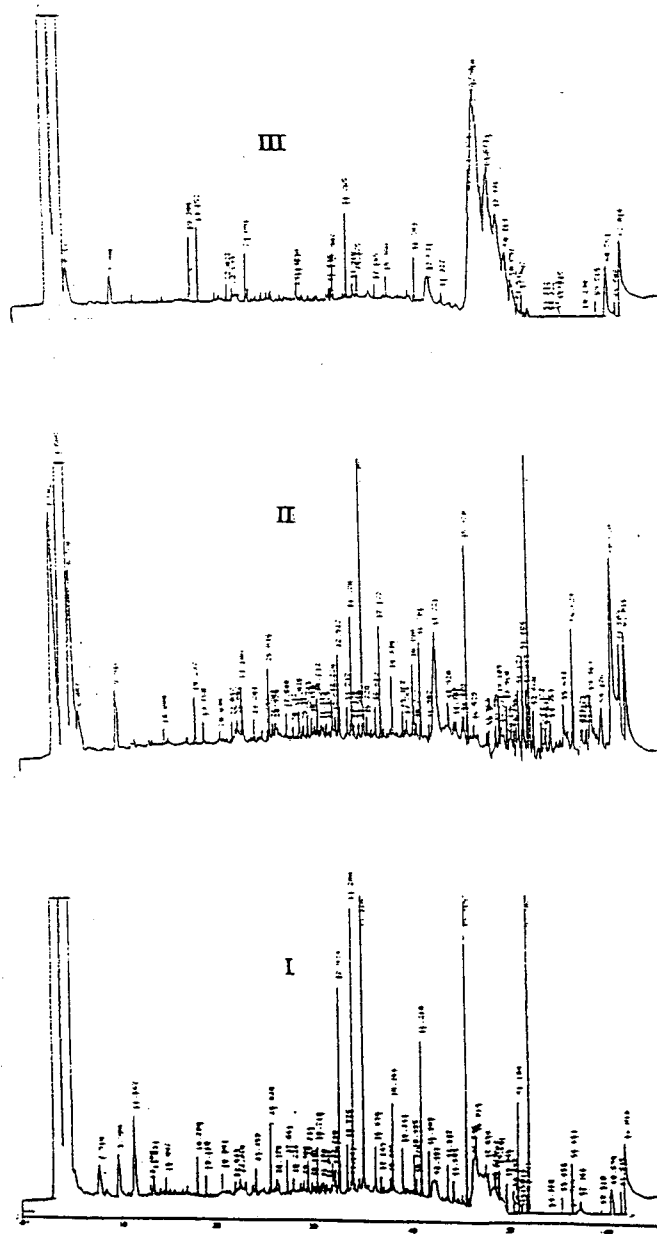


Fig 4. Gas chromatogram of Herbal-oil by Supelco<sup>TM</sup>10 column  
 \* I: Safflower-AOAC extract, II: Safflower-95% EtOH extract, III  
 Walnut-Pressure Filtration

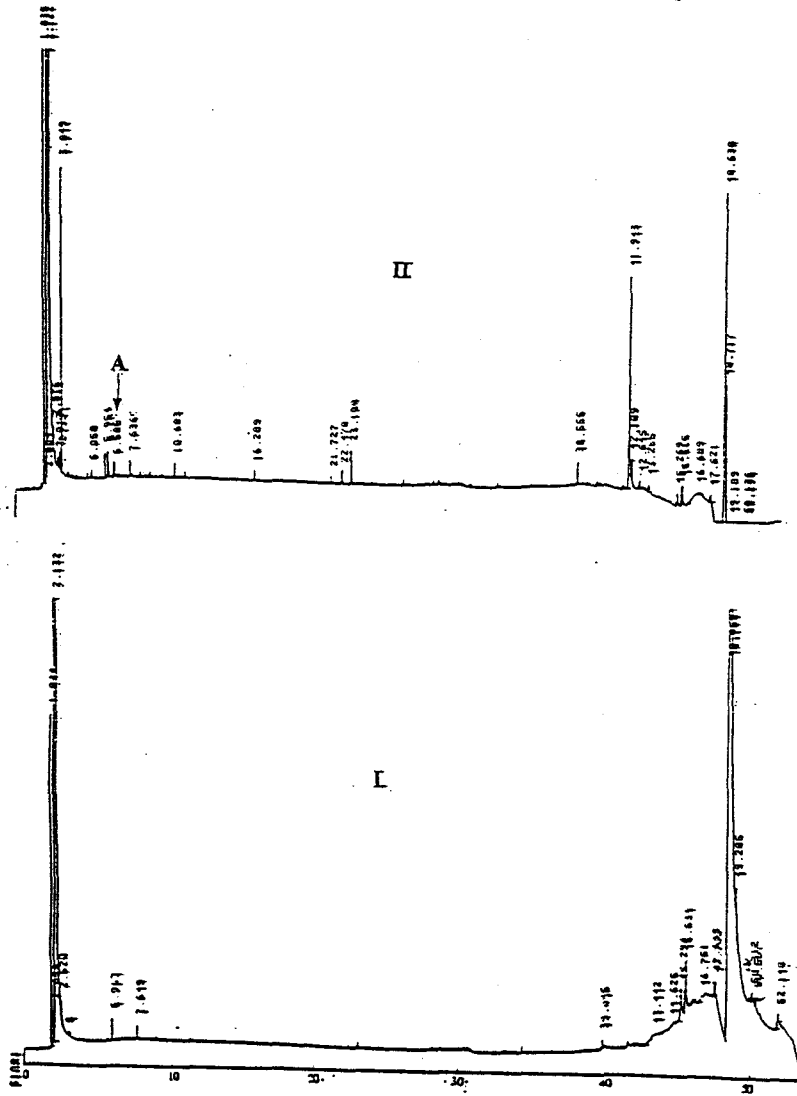


Fig 5. Gas chromatogram in oxidated Walnut by HP-1 column

\* A: Hexanal,

I: Walnut-Pressure Filtration, II: Oxidated Walnut-Pressure Filtration

## 참 고 문 헌

1. 최준배, 약침용 당귀추출액의 안전성 평가에 관한 연구, 경희대학교 대학원, 박사학위논문(1993), 신길조, 황련해독탕 약침액의 안전성 및 효능에 관한 연구, 경희대학교 대학원, 박사학위논문(1994)
2. AOAC : Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Ed., Association of Official Analytical Chemistry, U.S.A. Arlington, vol. 2(1995)
3. 大岳望, 鈴木昭憲, 高橋信孝, 室伏旭, 米原弘, 物質の單離と精製, 東京(日本), 東京大學出版會, p. 230(1990)
4. 吉村永星, 임유 및 호도유수침이 진통효과에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 석사학위논문(1987)
5. 동북대학 농학부 농예화학과, 농예화학실험, 일본 p.42(1979)
6. Folch, J., M. Lee and G.H. Sloane-stanly, *J. BIO. Chem.*, 226, 497(1957)
7. 주현규, 조광형, 박충균, 조규성, 채수규, 마상조 공저, 식품분석법, 서울 유림문화사, p.241(1994)
8. Applewhite, T. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 43, 406(1966)
9. Fristrom, G. A., B. C. Stewart, J. L. Werhrauch and L. P. Posati, *J. Am. Diat. Assoc.*, 67, 351(1975)
10. 한국식품공업협회, 식품공전, 서울, p.277 (1994)
11. K. Arnis, Handbook of Lipid Research Fatty Acids and Glycerides, New York and London, Plenum Press, p.360(1978)
12. 전호남, 김재욱, 한국농화학회지, 34(2), 154(1991)
13. 전호남, 김재욱, 한국농화학회지, 35(1), 34(1992)