

## 3가지 약용 허브 추출물에 함유된 유기산 검색 및 조성 비교

정하열 · 정도현\* · 박영준\*\*

국립 한경대학교 식품공학과 및 식품생물산업연구소,  
\*(주)그린바이오텍, \*\*메사추세츠 대학교 식품공학과

### The Screening and Pattern Comparison of Organic Acids in 3 Kinds of Medicinal Herbal Extracts

Ha-Yull Chung, Do-Hyun Jung\* and Young-Joon Park\*\*

The Department of Food Science & Technology &

Food and Bio-Industrial Research Center, Hankyong National University,

\*Green Biotech Co. Ltd., \*\*The Department of Food Science, University of Massachusetts

#### Abstract

The organic acids in 3 kinds of medicinal herbal extracts were screened and compared each other according to their organic acid contents by an efficient gas chromatographic method. It involves solid-phase extraction of organic acids using Chromosorb P with subsequent conversion to stable *tert*-butyldimethylsilyl derivatives for the direct analysis by capillary column gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. Total of 24 organic acids were reproducibly identified from 3 kinds of herbal extracts. When the GC profiles were simplified to their retention index spectra, characteristic patterns were obtained for each herb sample. As expected, three kinds of herbal extracts showed three distinct patterns.

Key words : herb, organic acids, screening, gas chromatography

#### 서 론

최근에 우리 나라에서는 국민소득의 증가와 함께 의학 및 생명과학의 발달로 인하여 평균 수명이 증가하고 있는 추세이나, 생활의 풍족에 따른 식습관의 변화와 공해와 같은 환경 조건의 악화 등으로 인하여 암, 심장병, 뇌졸중과 같은 성인병의 발병률이 높아지고 있는 상황이다<sup>(1)</sup>.

이러한 성인병들은 주로 생체조직내의 구성성분이 과다한 산화작용에 의하여 점차 퇴화해 가는 퇴행성 질환으로서 생체 분자의 산화적 상해를 유발하는 활성산소류는 생체내의 여러가지 효소작용에 의해 소거되는 데 우리가 섭취하고 있는 식품 중에도 활성산소류에 의한 산소상해를 억제할 수 있는 성분이 다수 존재하고 있으므로 이들을 이용하여 노화와 질병을 예

방하고 식품에 있어서의 산화적인 품질열화를 최소화 하는 방안이 제기되고 있다<sup>(2)</sup>. 이에 따라 많은 천연의 식품 성분에 대하여 그 결과가 보고되고 있는데 일반적으로 식품첨가물로 사용하는 향신료는 식품의 기호성을 높이는 역할 이외에도 산화적 품질저하와 미생물에 의한 변패를 억제하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>(3)</sup>. 또한 향신료에 속하는 많은 허브류 식물들이 다양한 향미의 발현을 통하여 식품의 기호성을 증진시키는 작용을 함이 경험적으로 확인되면서 많은 관심을 끌고 있는 실정이다<sup>(4)</sup>. 허브류 식물들은 기원전 2,800년경 고대 이집트시대 이래 지금까지 서구에서 약초 혹은 향신료로서 사용되어 온 식물들을 지칭하는 것으로서 지금도 서구 각국에서는 허브계통 식물의 대량재배가 날로 증가하고 있다<sup>(3,4)</sup>.

허브는 이미 널리 알려진 식욕증진 효과 및 생약재로서의 역할 이외에도 그 향기나 풍미가 탁월하고 독특하여 식품으로 선별되어 사용되어질 수 있는 소재라고 할 수 있다<sup>(5)</sup>. 일반적으로 많이 알려진 항산화성이 높은 허브류 식물로는 rosemary나 sage 등을 들 수 있는데 이들은 지중해 연안이 원산지이며 향기가 탁

Corresponding author : Ha-Yull Chung, The Department of Food Science & Technology, Hankyong National University, Ansung, Korea.

Tel : 011-712-0100

Fax : 82-31-670-5015

E-mail : chunghy1@hitel.net

월하고 항산화력이 강하여 각종 요리나 소스, 유지식품에 적용되고 있다<sup>(6)</sup>. 이 외에도 많은 허브류 식물들이 서구의 전통음식의 재료로서 사용되어지고 있으며 그동안 주로 그들이 발산하는 향기나 향미가 향수, 화장품, 세정 등의 목적으로 이용되어 왔는데 이외에도 여러 가지 약리작용이 확인되고 있기도 하다<sup>(7)</sup>. 여기에는 피로회복, 안면, 진정 등 스트레스 해소와 더불어 방부, 항균작용, 산화방지, 노화방지 등과 같은 다양한 생리적 기능이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>(6-11)</sup>. 이와 같은 허브류 식물에 대하여 지금까지는 주로 기호성의 증진을 도모시킬 수 있는 소재로서의 사용에 대한 연구가 많이 진행되어온 실정이며 허브류 식물에 함유된 성분 및 조성의 분석에 대한 연구는 미미한 실정이다.

식물, 미생물, 동물의 대사산물이나 이를 원료로 한 다양한 생산제품에서 발견되는 유기산은 생물학적, 생리학적 대사나, 발효과정의 중요한 지표가 되고 있다. 또한 식품 속에 존재하는 유기산은 식품에 색, 맛, 향 등의 관능적 특성을 부여하고 식품의 조직과 식품의 생물학적 안정성에 영향을 미치고 있다. 일반적으로 식품 속의 유기산 조성을 조사하기 위해서는 액체-액체 추출법과 음이온 교환수지법이 널리 이용되고 있으며<sup>(12-14)</sup>, 분리된 유기산의 정성·정량분석은 high performance liquid chromatography(HPLC)<sup>(15-17)</sup>와 gas chromatography(GC)<sup>(18-21)</sup> 분석방법을 많이 사용하고 있다. 그러나, 액체-액체 추출법과 음이온 교환수지법 등은 다량의 용매 사용으로 시료가 오염될 확률이 높고, 전처리 시간이 길기 때문에 유기산의 손실이 커서 유기산의 정확하고 신속하게 정량하기 어려운 점이 있다.

따라서 본 연구실에서는 이미 수용성 및 지용성 시료로부터 다양한 휘발성 유기산 및 비휘발성 유기산을 동시에 분석하고 동정이 가능한 고체상 추출법/*tert*-butyldimethylsilyl(TBDMS) 유도체화/dual-capillary column GC system에 의한 분석법을 개발하여 보고한 바 있으며<sup>(22-24)</sup> 본 연구에서는 이 방법을 사용하여 3가지 약용 허브추출물(*mate*, *thyme*, *peppermint*)에 함유된 유기산을 검색하고 그 함량을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 연구에서 사용한 허브 추출물은 Emil Flachsmann AG(Switzerland)에서 제조한 것으로 유럽지역에서 수거한 3 종류 허브(*mate*, *thyme*, *pepper mint*)의 잎, 줄기 등을 건조 후 자체공정에 따라 각각 열수 추출한

후 여과, 농축 후 분말화 공정을 거쳐 준비된 것이다. 추출용 용매로는 시약급 diethyl ether(Duksan, Korea)를 potassium hydroxide상에서 연속 증류한 후 과량의 sodium sulfate를 넣어 4°C에서 저장하면서 사용하였다. silylation시약인 N-methyl-N-(*tert*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide(MTBSTFA)는 Pierce (Rockford, USA)로부터, 포화 탄화수소 표준물질들(C<sub>8</sub>~C<sub>30</sub>)은 Polyscience(Miles, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 고체상 추출용 흡착제인 Chromosorb P(AW, 80~100 mesh)는 Supelco(Bellefonte, USA)의 시약급이었으며, 황산, NaCl, isooctane은 Junsei(Tokyo, Japan) 회사의 제품을 사용하였다.

### 기기분석

RI값 비교에 의한 유기산 동정의 목적으로 dual capillary column system(HP, USA)을 사용하였다. 컬럼 온도는 60°C에서 2분간 유지한 후 분당 4°C로 상승시켜 280°C에서 30분간 유지하였다. FID의 온도는 300°C였으며 on-column injector를 사용하여 0.2 μL의 시료를 포화탄화수소 혼합 표준용액(isooctane에 100 ppm의 C<sub>8</sub>~C<sub>30</sub>)과 함께 주입하였다. 면적비(AR)를 계산하기 위해서 내부표준물질로서 tridecanoic acid를 사용하였다. GC로 동정된 유기산의 재확인은 HP-6890 series II GC 와 HP-35741 MS chemstation data system이 연결된 HP-5972A3 MSD(70eV, electron impact mode)를 사용하였으며, 컬럼은 HP-5MS(SE-54 bonded phase) capillary column(30 m×0.25 mm I.D. 0.25 μm film thickness)를 사용하였고 컬럼 온도는 60°C에서 2분간 유지시킨 후 분당 4°C로 280°C까지 상승시켰다. Split injector의 온도는 270°C, split ratio는 10:1이며 interface 온도는 290°C로 유지하였다.

### 허브 추출물의 동정

Fig. 1에서와 같은 방법에 의해<sup>(19-24)</sup> 3가지 허브 추출물(25 mg/mL)을 sodium bicarbonate로 포화시킨 후 2 mL의 diethyl ether로 3회 추출하고 추출액은 버렸다. 수용액층에서 1 mL를 취하여 진한 황산을 몇 방울 떨어뜨려 pH 1이하로 산성화시키고 NaCl로 포화시킨 후 Chromosorb P 컬럼에 loading시켰다. Diethyl ether로 유기산들을 선택적으로 용출시켜 얻은 약 5 mL ether 용출액에 TEA 10 μL를 가하고 무수 MgSO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 휘발 농축시키고 MTBSTFA 20 μL와 isooctane 20 μL를 가하여 60°C에서 2시간 반응시킨 뒤 GC 및 GC-MS로 분석하였다.

분리된 유기산 peak들의 RI값을 기존에 확인된<sup>(19-24)</sup>

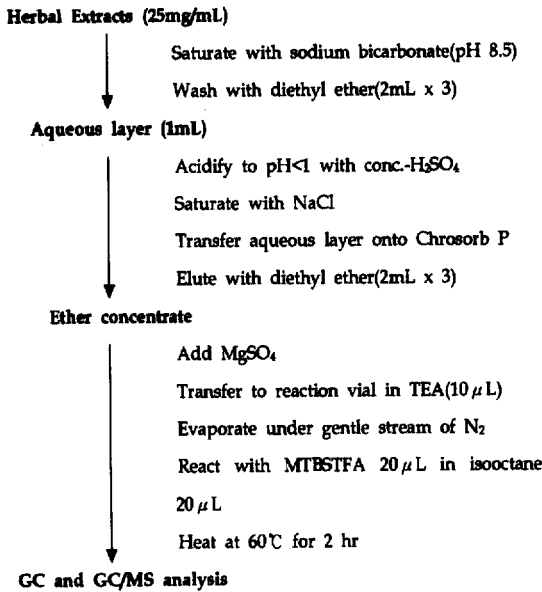


Fig. 1. Schematic diagram of solid-phase extraction and derivatization of free organic acids in herbal extracts.

유기산 RI spectrum의 RI값과 비교하여 동정하였다. 동정된 각 피크들은 면적비 비교법으로 재확인하였으며 GC-MS spectrum들은 미리 작성한 MS library로 비교하였다.

#### 유기산 RI spectrum 작성 및 패턴 비교

각 허브 추출물에 함유된 유기산 조성 및 패턴을 비교하여 상이성을 찾기 위하여 DB-5 컬럼으로 얻어진 GC chromatogram에서 유기산들의 피크 면적을 mass spectrum처럼 각 유기산들의 RI값에 대한 백분 상대치 변화로 표시하여 RI spectrum을 작성하였다.

### 결과 및 고찰

#### 허브 추출물로부터 유기산의 동정

허브류 식물은 크게 aromatic 허브와 medicinal 허브 및 spicing, gardening을 위한 허브 등으로 나눌 수 있는데, 본 실험에 사용된 peppermint, mate, thyme 허브는 지금까지 여러 가지 약리 작용이 확인되고 있으며, 여기에는 피로회복, 진정 등 스트레스 해소와 더불어 방부, 항균작용, 산화방지, 노화방지 등과 같은 다양한 생리적 기능이 있는 것으로 보고되고 있으나 그 조성에 대해서는 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 3종류의 허브로부터 두 단계의 고체상 추출법을 사용하여 유기산만을 선택적으로 분리한 후 각

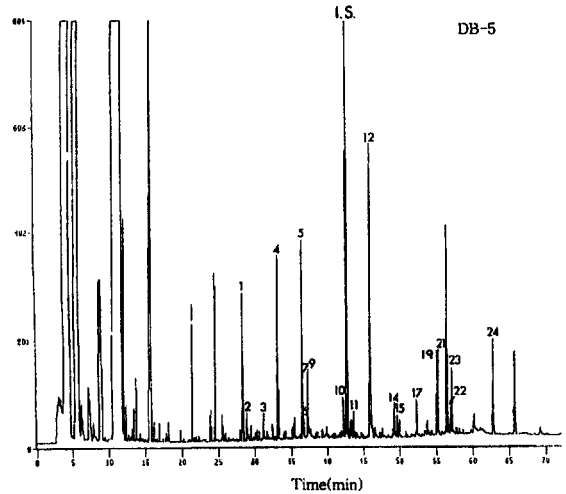


Fig. 2. GC chromatogram of free organic acids in Thyme as TBDMS derivatives on DB-5(30 m×0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness) capillary column programmed from 60°C(held for 2 min) to 280°C(held for 2 min) at 4°C/min. Peak numbers correspond to those in Table 1.

각의 유기산들을 dual capillary column system에 의해 분석하였고 이를 GC-MS로 확인하였다.

고체상 추출법에 의하여 각각의 허브로부터 유기산을 분리하고 농축하는 데는 1시간 정도가 걸렸으며, 각각의 허브로부터 24가지 종류의 유기산을 확인할 수 있었다. 또한 각각의 허브시료(25 mg)로부터 분리된 유기산을 DB-5 capillary 컬럼을 사용하여 얻은 chromatogram의 정량 분석 데이터를 이용하여 각 유기산을 area ratio로서 비교하였다(Table 1). Mate의 경우, succinic acid(17.28%), malic acid(12.41%), caffeic acid(11.09%), protocatechuic acid(9.28%), citric acid(8.74%)의 순서로 함량이 확인되었으며, thyme은 malic acid(24.87%), succinic acid(12.64%), malonic acid(10.83%), caffeic acid(8.71%), lactic acid(8.22%), peppermint의 경우 succinic acid(19.17%), malic acid(18.69%), citric acid(12.50%), caffeic acid(12.10%), lactic acid(8.26%)이었다.

각 허브의 주요 피크는 mate의 경우 succinic acid(17.28%), thyme의 경우 malic acid(24.87%) 그리고 peppermint의 경우 succinic acid(19.17%)로 mate나 peppermint는 동일하였으나 thyme은 서로 상이하였고 각각의 허브에 함유된 유기산의 전체적인 함량도 mate, thyme, peppermint 순서로 서로 상이함을 보였다.

이상과 같은 허브의 유기산 분석 결과로 총 24가지의 유기산을 동정할 수 있었으며, 24가지 유기산은 그 종류가 fatty acid, dioic acid, hydroxy acid, aromatic

Table 1. Organic acids found in 3 kinds of herbal extracts

No.	Organic acids	Area ratio $\pm$ S.D. <sup>1)</sup>		
		Mate	Thyme	Peppermint
1	Lactic	7.12 $\pm$ 0.38	8.22 $\pm$ 0.11	8.26 $\pm$ 1.26
2	Glycolic	2.17 $\pm$ 0.01	1.60 $\pm$ 0.01	0.77 $\pm$ 0.02
3	Oxalic	2.08 $\pm$ 0.01	1.51 $\pm$ 0.01	0.74 $\pm$ 0.03
4	Malonic	0	10.83 $\pm$ 0.10	5.64 $\pm$ 1.25
5	Succinic	17.28 $\pm$ 1.95	12.64 $\pm$ 0.38	19.17 $\pm$ 2.32
6	Methylsuccinic	2.35 $\pm$ 0.01	1.02 $\pm$ 0.01	0
7	Itaconic	0	1.41 $\pm$ 0.01	0
8	Citraconic	3.54 $\pm$ 0.02	0	0
9	Fumaric	5.87 $\pm$ 0.03	3.99 $\pm$ 0.03	4.37 $\pm$ 0.58
10	Salicylic	2.00 $\pm$ 0.01	2.32 $\pm$ 0.01	1.79 $\pm$ 0.61
11	3-Hydroxybenzoic	7.22 $\pm$ 0.03	1.65 $\pm$ 0.01	0
12	Malic	12.41 $\pm$ 1.11	24.87 $\pm$ 1.23	18.69 $\pm$ 2.68
13	2-Hydroxyglutaric	3.04 $\pm$ 0.02	0	0
14	Homovanilic	2.30 $\pm$ 0.01	2.12 $\pm$ 0.02	0
15	Azelaic	0	1.60 $\pm$ 0.01	0
16	trans-Aconitic	0	0	1.67 $\pm$ 0.02
17	Syringic	1.61 $\pm$ 0.01	2.16 $\pm$ 0.01	0
18	Tartaric	0	0	2.68 $\pm$ 0.16
19	2,3-Dihydroxybenzoic	0	5.32 $\pm$ 0.25	0
20	3,4-Dihydroxyphenylacetic	0	0	6.50 $\pm$ 0.96
21	Protocatechuic	9.28 $\pm$ 0.02	4.75 $\pm$ 0.23	2.81 $\pm$ 0.11
22	Ferulic	1.89 $\pm$ 0.01	1.55 $\pm$ 0.1	2.30 $\pm$ 0.32
23	Citric	8.74 $\pm$ 0.75	3.74 $\pm$ 0.21	12.50 $\pm$ 1.26
24	Caffeic	11.09 $\pm$ 1.04	8.71 $\pm$ 0.78	12.10 $\pm$ 1.98

<sup>1)</sup>Mean area ratio  $\pm$  S.D. (N=3) with respect to tridecanoic acid(I.S.) on DB-5(30 m $\times$ 0.25 mm I.D., 0.25  $\mu$ m film thickness) capillary column programmed from 60°C(held for 2 min) to 280°C(held for 2 min) at 4°C/min.

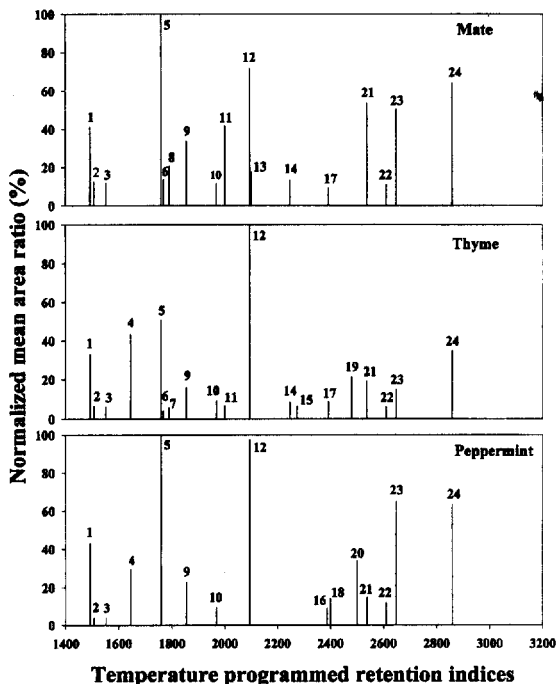


Fig. 3. Average retention index spectra for organic acids of three kinds of herbal extracts.

Peak numbers correspond to those in Table 1.

acid들로 동정되었다. 또한 실험에 사용한 3가지 종류의 허브에 함유된 유기산의 주요 성분은 비슷하나 그 함량이나 미량의 유기산의 존재에 있어서 상이하므로 허브로부터 유기산을 선택적으로 신속히 분리하여 함유된 유기산을 검색하고 동정하는 방법에 의해 허브 추출물을 이용한 식품의 제조 과정의 모니터링 및 품질 관리에 이용될 수 있으리라 본다.

#### 허브 추출물의 RI spectra 비교

각 허브추출물의 유기산 패턴을 비교하여 상이성을 찾기 위하여 DB-5 컬럼에 의해 분리, 동정된 유기산 피크들만을 선택적으로 분리한 후 용매, 시약, 미확인된 성분들의 간섭을 배제하여 막대 그래프 형태의 RI spectra로 단순화 시켰다(Fig. 3). 이에 의해 GC chromatogram만으로는 분석 비교시 미량 성분 및 주요성분의 정성·정량적 분석 비교가 용이하지 않으나, RI spectra를 통해 각 허브류의 전체적인 유기산 함량·조성 등을 적절히 판별할 수 있었다.

#### 요 약

Gas chromatography를 이용한 profiling과 신속한 동

정을 허브류에 존재하는 유기산의 분석에 적용하여 보았다. 흡착제로 Chromosorb P와 용출 용매로 diethyl ether를 사용하는 고체상 추출법을 이용하여 허브추출물로부터 유기산을 분리한 후, tert-butylidimethylsilyl 유도체로 만들어 극성이 다른 DB-5와 DB-17 컬럼으로 동시분석하였다. 두 컬럼에서 분리된 유기산 피크들을 dual capillary column system의 retention index(RI) library 탐색과 RI spectra 비교로 신속하고 정확하게 동정할 수 있었으며 이들을 GC-MS로 확인하였다. 허브 추출물들의 유기산 분석 결과 fatty acid, dioic acid, hydroxy acid, aromatic acid 등 24가지의 유기산이 동정되었고 각 허브의 종류에 따라 특징적인 유기산 GC-profile을 나타내었다. 각 허브추출물의 GC profile의 유기산 조성만을 단순화시킨 RI spectra로 표현한 결과, 각 허브의 유기산 패턴의 분별이 매우 용이하였다.

## 문 헌

- Lee, Y.J. Get out of the superoxide from the body. pp.44-48. In: KBS Bureau of Cultural Business, Seoul, Korea (1998)
- McCord, J.M. Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185: 529-531 (1974)
- Choi, Y.J. Botanical Encyclopedia of Flavor and Seasoning, pp. 53-65. Ohsung Publishing Co., Seoul, Korea (1992)
- Cho, T.D. The Herbs, pp. 62-65. Daewon Publishing Co., Seoul, Korea (1998)
- Chung, H.Y. Screening of herb extracts containing the scavenging activity of superoxide anion produced by xanthine oxidase. Thesis Collection of Hankyong National University 29: 123-127 (1997)
- Boxer, A. and Back, P. The herb book, pp. 57-68. Chancellor Press, London, UK (1980)
- Cleavelly, A. and Richmond, K. The complete book of herbs, pp. 51-52. Smithmark Publishing Inc., New York, USA (1995)
- Bremness L. The complete book of herbs, A practical guide to growing and using herbs, pp. 238-242. Viking Studio Books, New York, USA (1988)
- Chapman, A. The country kitchen Herbs, pp. 6-7. Weldon Publishing Inc, Willoughby, UK (1992)
- Ody, P. Home herbal, pp. 29-47. Dorling Kindersley Publishing Inc., New York, USA (1995)
- Holt, G. Complete book of herbs, pp. 18-19. Henry Holt Co., New York, USA (1992)
- Hawthorne, D.B., Kavanagh, T.E. and Clarke, B.J. Determination of low molecular weight organic compounds in beer using capillary gas chromatography. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52: 23-27 (1987)
- Hamberg, M. Trihydroxyoctadecenoic acids in beer: Qualitative and quantitative analysis. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1568-1572 (1991)
- Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S. and Drawert, F. Identification and Determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 37: 927-932 (1986)
- Marce, R.M., Calull, M., Olucha, J.C., Borrull, F. and Rius, F.X. Optimized isocratic separation of major carboxylic acids in wine. *J. Chromatogr.* 542: 277-293 (1991)
- Hirotsuka, K., Yukinobu, K., Minoru, K., Toshihiko, O. and Shunro, K. Analysis of long chain fatty acids in beer by HPLC-fluorescence. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1363-1367 (1990)
- Hay, B.A. and Homiski, J.W. Efficient one step preparation of the beer additive tetrahydroiso acid. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1732-1734 (1991)
- Beare-rogers, J.L. and Diefenbacher, A. Determination of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 unsaturated fatty acid in vegetable oils and fats by capillary gas liquid chromatography. *Pure and Appl. Chem.* 62: 795-799 (1990)
- Kim, K.R., Kim, J.H. and Park, H.K. Trace analysis as TBDMS derivatives of organic acids in aqueous samples. *Bull. Korean Chem.* 34: 352-359 (1990)
- Kim, K.R., Kim, J.H., Park, H.K. and Oh, C.H. Dual capillary column system for the qualitative gas chromatography: 1. Comparison between split and splitless injection modes. *Bull. Korean Chem.* 12: 87-92 (1991)
- Kim, J.H., Kim, K.R. Chai, J.Y., Oh, C.H., Park, H.K. and Choi, K.S. Rapid gas chromatographic screening of dairy products for volatile and nonvolatile organic acids. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 665-669 (1994)
- Kim, K.R., Kim, J.H., Park, Y.J. and Kim, J.O. Rapid gas chromatographic screening of saliva samples for organic acids. *Yakhak Hoeji.* 39: 283-288 (1995)
- Park, Y.J., Jeong, J.I., Min, S.S. and Park, Y.S. Gas chromatographic organic acid profile analysis of imported scotch whiskeys for pattern recognition. *Food Sci. Biotechnol.* 7: 193-196 (1998)
- Park, Y.J., Kim, K.R. and Kim, J.H. Gas chromatographic organic acid profiling analysis of brandies and whiskeys for pattern recognition analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2322-2326 (1999)