

페놀화합물 분석

정일민[†] · 김승현

건국대학교

I. 서 언

식물과 식품 등에 널리 존재하는 폴리페놀물질들은 식물체 및 인체의 항산화 효과 및 방어 기작 등의 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 일반적으로, 페놀 화합물은 한개 또는 두개 이상의 수산기(hydroxyl group)로 치환된 방향족 환(aromatic ring)을 가지고 있는 물질로서, phenolic acid 및 coumarin류(C_6-C_1 , C_6-C_3), flavonoid류($C_6-C_3-C_6$) 그리고 탄닌류(hydrolyzable 및 condensed tannins)로 나누며, 그 구조에 따라 이화학적 성질 및 생리적 기능이 달리 나타난다. 이러한 페놀물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원 반응 시 기질로 작용하며, 미생물의 공격을 막아 식물자체를 보호하는 동시에 식품 등에서 떫은 맛, 쓴 맛과 같은 식물성 식품의 고유한 맛에 관계한다. 식물 및 식품에 포함되어 있는 페놀 화합물은 다양한 형태로 존재하며, 또 양에 있어서도 많은 차이를 보여 정성·정량 분석 시 다소 어려운 점이 있다. 본 장에서는, 여러 가지 분석 방법들 중에서 실험 과정이 빠르고, 간단하며, 결과가 정확한 발색 정량법(Folin-Dennis법) 및 HPLC 분석법에 대하여 살펴보기로 하겠다.

II. 분석방법

1. 총 페놀 함량 분석법(Folin & Dennis법)

식물체에서 총 페놀 함량을 측정하는 방법은 다양하나 주로 Folin-Dennis법, Prussian-blue 법, Hagerman & Butler법 및 Vanillin-HCl법 등이 널리 이용되고 있다. 특히, Folin-Dennis법은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 발광하는 현상을 이용하여 식물체 중의 총 페놀 함량을 측정하는 방법으로서 시료간의 변이가 적게 나타나고 빠르게 측정할 수 있는 장점이 있어 분석 초보자들도 쉽게 할 수 있는 장점이 있다.

1) 장치 및 기구

- (1) 분광광도계
- (2) Shaking-bath

[†]Corresponding author: (Phone) +82-2-450-3730 (E-mail) imcim@konkuk.ac.kr

2) 시약

- (1) Folin-Dennis 시약
- (2) 페놀 표준물질: Ferulic acid
- (3) 탄산나트륨(Na_2CO_3)
- (4) DMSO(dimethylsulfoxide)
- (5) 3차 증류수

3) 조작

- (1) 건조 후 분쇄된 시료 2 g을 80% MeOH 50 ml을 가하여 shaking bath에서 24 h 동안 추출한다.
- (2) 추출용액은 Whatman No. 42을 이용하여 filter한다.
- (3) 추출 시료용액 1 ml에 3차 증류수 3 ml를 첨가한 후, Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1ml를 넣고 5 min 간 27°C의 shaking bath에서 혼합한다.
- (4) 5min 후, 탄산나트륨(Na_2CO_3) 포화용액 1 ml를 넣어 혼합하여 실온에서 1 h 동안 방치 시킨 후 640 nm 에서 분광광도계로 흡광도를 측정한다.
- (5) 검량선의 작성
 - ① 1종의 페놀 표준물질(Ferulic acid)을 선택하여 1 mg을 정확히 평량한 후, DMSO 용액 10 ml에 녹여 100 ppm의 표준용액을 만든다.
 - ② 100 ppm 표준용액을 희석하여 75 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 1 ppm을 각각 조제한다.
 - ③ 표준용액 1 ml를 (1)~(4)의 과정을 거쳐 흡광도를 측정한다.
 - ④ 분광광도계로 측정된 흡광도와 사용한 표준용액의 농도를 이용하여 검량선을 작성한다.

4) 계산

- (1) 검량선

$$Y = aX + b$$

X : 분광광도계로 측정한 흡광도(Absorbance)

Y : 분광광도계 주입된 표준용액의 농도(ppm: $\mu\text{g/ml}$)

- (2) 시료 중 총 페놀 함량

$$\text{시료 중 총 페놀 함량}(\mu\text{g/g}) = Y' \times \frac{V}{S}$$

Y' : 분광광도계로 구한 표준물질의 흡광도를 검량선에 대입하여 얻은 Y 값(ppm)

V : 추출 용매(80% MeOH)의 총 부피(ml)

S : 추출 시료의 무게(g)

5) 비교

- (1) Folin-Dennis법에 따른 총 페놀 함량의 분석은 반응시간이 매우 중요하기 때문에 시료의 양이 많을 경우 실험자는 분광광도계를 이용한 측정시간을 파악하여, 실험간 혹

은 반복간의 시간을 조절해야 한다. 만약 반응시간(1h)을 지키지 않을 경우 발색이 지속되어 정확한 페놀함량의 측정은 불가능하게 된다.

- (2) Folin-Dennis 시약의 최초색은 노란색이며, 시료의 페놀성 물질과 반응하게 되면 청색 또는 녹색으로 변색을 하게 된다. 즉 시료 중 페놀성 물질의 함량이 적게 되면 최초의 색이 반응시간동안 유지되므로 실험자는 이를 숙지하도록 한다.
- (3) 시중의 Folin-Dennis시약은 구입회사에 따라 순도와 감도가 다르게 나타나기 때문에 순도가 높은 등급의 제품을 사용하여야 보다 정확한 정량이 가능해지므로 이를 권장한다.

2. HPLC를 이용한 individual 페놀 화합물 분석법

HPLC등의 기계를 이용하는 분석방법은 기기의 발전과 함께 빠르게 발전되어 왔다. HPLC를 이용한 페놀물질 분석법은 장비 및 용매의 고가에도 불구하고, 시료 중 의 페놀화합물을 보다 정확하고 빠르게 측정할 수 있고, 결과의 재현성이 뛰어나 널리 이용되고 있다. 또한, 이 방법은 개개의 페놀화합물에 대한 정량 및 정성이 가능하여 특정 물질을 목표로 분석 할 때 더욱 널리 이용되고 있다.

1) 장치 및 기구

- (1) 고속액체크로마토그래프(High Performance Liquid Chromatograph: HPLC)
- (2) 분쇄기
- (3) Shaking-bath
- (4) Freeze drier

2) 시약

- (1) 페놀 표준물질 : Gentisic acid 외 15종(표 2 참조)
- (2) Acetonitrile(ACN) : HPLC용
- (3) 0.1N HCl
- (4) MeOH : HPLC용
- (5) 증류수 : HPLC용
- (6) Glacial acetic acid : HPLC용
- (7) Ammonium acetate
- (8) *n*-butanol

3) 조작

- (1) 준비된 시료를 24°C에서 7일간 풍건을 시킨 후, 완전 건조된 시료를 Wiley mill(40-mesh screen)을 이용하여 분쇄한다.
- (2) 분쇄 시료 2 g을 ACN 10 ml 와 0.1 N HCl 2 ml를 가하여 2h 동안 shaking bath에서 추출한다.

- (3) 추출용액은 Whatman No. 42 으로 filtering 한 후, freeze drier(-40°C)를 사용해서 에서 완전 농축 건조한다.
- (4) 건조된 추출물을 80% MeOH 10ml로 재 용해하여 0.45 μm filter unit(cameo 13N syringe-filter, nylon)를 이용해서 미세 불순물을 완전히 제거 하여 분석한다.
- (5) 위 용액 20 μl 를 고속 액체 크로마토그래프(HPLC)에 주입하여 분석한다.
- (6) 검량선의 작성
 - ① Gentisic acid를 포함하는 16종의 페놀 표준물질 1 mg을 정확히 평량하여 DMSO 용액 10 ml에 녹여 100 ppm의 표준용액을 만든다.
 - ② 16종의 100 ppm 표준용액을 각각 희석하여 75 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 1 ppm을 조 제한다.
 - ③ 표준용액 20 μl를 HPLC에 주입한다.
 - ④ HPLC상에 나타나 표준품의 peak 면적을 구하고, 주입한 표준용액의 농도를 이용 하여 검량선을 작성한다.
- (7) HPLC를 이용한 시료 중 페놀화합물 분석 조건의 예(그림 1, 2, 3 참조)
 - ① Flow rate: 1 ml/min
 - ② 검출: 280 nm.
 - ③ Column: C₁₈ column(250×4.6mm, I.D.)
 - ④ 이동상 A: 98% water, 2% glacial acetic acid in 0.018 M ammonium acetate
 - ⑤ 이동상 B: 70% solvent A and 30% organic solution
 - ⑥ Organic solution: 82% methanol, 16% n-butanol, 2% glacial acetic acid in 0.018 M ammonium acetate
 - ⑦ Linear gradient 조건
 - Ⓐ 0.0 to 1.0 min isocratic at 10% solvent B
 - Ⓑ 1.0 to 21.0 min linear gradient from 10% to 25% solvent B
 - Ⓒ 21.0 to 36.0 min linear gradient from 25% to 45% solvent B
 - Ⓓ 36.0 to 56.0 min linear gradient from 45% to 100% solvent B
 - Ⓔ 50.0 to 50.15 min flow increased to 1.2 ml/min
 - Ⓕ 82.0 to 82.15 min linear gradient from 100% to 10% solvent B
 - Ⓖ 92.0 to 92.15 min flow rate decreased to 1 ml/min
 - Ⓗ 99.0 min 까지 Ⓖ의 상태로 유지한 후, 반복 함.

4) 계산

(1) 검량선

$$Y = aX + b$$

X : HPLC 크로마토그램 상에서 구한 표준품의 피이크 면적 또는 높이

Y : HPLC에 주입된 표준용액의 농도(ppm: μg/ml)

페놀화합물 분석

(2) 시료 중 페놀화합물 함량

$$\text{시료 중 페놀화합물 함량}(\mu\text{g/g}) = Y' \times \frac{V}{S}$$

Y' : HPLC 크로마토그램 상에서 구한 표준품의 면적을 검량선에 대입하여 얻은 Y 값(ppm)

V : 추출 용매(80% MeOH)의 총 부피(ml)

S : 추출 시료의 무게(g)

5) 비고

- (1) HPLC를 이용한 페놀물질 분석 시, 이동상의 특성 상 column에 고압이 작용하므로 시료분석 간에 컬럼의 washing time(최소 20 min)을 충분히 주도록 한다.
- (2) 검량선을 이용하여 시료중의 페놀성 물질을 정량할 때, HPLC 크로마토그램의 peak 높이 보다는 면적이 농도에 따라 비례하여 증가하므로 면적을 사용하여 계산하는 것이 보다 정확한 정량이 가능하므로 이를 권한다.
- (3) 조작 (4)의 과정 시 80% MeOH을 이용하여 재 용해 할 때, 건조된 물질이 완전히 용해되어야 HPLC를 이용한 정량이 정확히 된다. 콩이나 몇몇 약용식물의 경우 이 과정 중 1차 추출 건조된 물질이 잘 용해되지 않기 때문에 특히 주의 하여야 한다.

II. 결 과

1. 콩과 약용식물에서 총 페놀 함량 분석

Table 1. Composition of total phenol contents using Folin-Dennis methods from nine soybeans and medicinal plants (Kim *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2004).

Soybean Variety	Total phenols	Medicinal Plant	Korean name	Total phenols
	-- $\mu\text{g/g}$ --			-- $\mu\text{g/g}$ --
Muhankong	3,176	<i>Acanthopanax gracilistylus</i>	오가피	28,528
Daweonkong	5,790	<i>Adenophora triphylla</i>	사삼	7,333
Myeongjunamulkong	3,545	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	천문동	4,657
Jinpumkong 2	3,652	<i>Cassia tora</i>	결명자	25,889
Taekwangkong	3,794	<i>Codonopsis lanceolata</i>	만삼	1,824
Geomjeongkong 1	4,769	<i>Lilium longiflorum</i>	백합	280
Hwaecomputkong	3,661	<i>Mentha arvensis</i>	박하	12,556
Pureunkong	4,006	<i>Rehmannia glutinosa</i>	지황	333
Hannamkong	4,869	<i>Scrophylaria buergeriana</i>	현삼	8,120
LSD _{0.05}	795.6	LSD _{0.05}		23,948

2. HPLC에 의한 페놀화합물 정량

Table 2. Calibration curves of sixteen phenolic compounds (Kim *et al.*, 2004).

Standard chemicals		Molecular Weight	Retention Time (min)	Equation	
Gentisic acid	C ₇ H ₆ O ₄	154.1	17.577	Y= 10.05x - 3.96	r ² = 0.998***
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138.1	19.030	Y= 32.83x - 3.42	r ² = 0.998***
Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.3	21.160	Y= 21.38x - 7.85	r ² = 0.998***
Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	180.2	24.212	Y= 43.12x - 7.43	r ² = 0.997***
Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.2	26.307	Y= 40.60x - 0.03	r ² = 0.999***
<i>p</i> -coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	164.2	24.040	Y= 67.50x - 5.55	r ² = 0.998***
Cathechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.3	19.505	Y= 1.87x - 0.18	r ² = 0.999***
Myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.2	55.753	Y= 15.99x - 36.52	r ² = 0.999***
Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.2	39.413	Y= 47.41x - 14.45	r ² = 0.999***
Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138.1	52.292	Y= 6.96x - 5.78	r ² = 0.998***
<i>t</i> -cinnamic acid	C ₈ H ₈ O ₂	148.2	66.845	Y= 123.80x - 19.08	r ² = 0.999***
Kampferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.2	76.122	Y= 22.97x - 32.75	r ² = 0.997***
Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.3	67.800	Y= 38.95x - 18.70	r ² = 0.999***
Naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.5	50.357	Y= 24.92x - 3.50	r ² = 0.999***
Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ · 2H ₂ O	338.3	65.077	Y= 15.99x - 36.52	r ² = 0.998***
Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.6	49.675	Y= 20.46x - 4.47	r ² = 0.999***

Table 3. Composition of phenolic compounds in leaf and root parts of *Rehmannia glutinosa* (Yu *et al.*, 2004).

	Genti- sic acid	Cathe- chin	<i>p</i> - Hydroxy benzoic acid	Chloro- genic acid	Caffe- ic acid	Syringi- c acid	<i>p</i> -cou- maric acid	Feru- lic acid	Hes- peridin	Nari- gin	Sali- cyclic acid	Myri- cetin	Quer- cetin	<i>t</i> - Cinna- mic acid	Narin- genin	Kamp- ferol	Total
	-----µg/g-----																
Leaf	0	0	99.32	6.03	12.79	2.45	11.89	4.60	74.1	3.93	169.48	26.87	0	0.17	0	0	411.66
Root	0	0	0.28	10.56	1.62	0.12	0	3.21	1.92	1.18	33.64	60.96	0	0	0	0	113.49
LSD (0.05)	0	0	1.51	0.80	0.05	5.94	0.11	0.46	1.54	4.0	43.0	9.56	12.93	0.16	0	0	27.14

Table 4. Composition of phenolic acids in nine soybean varieties (Kim *et al.*, 2004).

	Muhan	Daweon	Myeongju namul	Jinpum	Taek- wang	Geom- jeong 1	Hwaecom- put	Pureun	Hanam	LSD _{0.05}
	-----g/g-----									
Gentisic acid	410.9	32.9	344.9	448.0	415.4	392.3	255.2	377.2	396.6	58.3
<i>p</i> -hydroxy benzoic acid	31.1	51.9	43.9	nd	34.4	35.4	34.1	45.3	53.3	6.4
Chlorogenic acid	nd	3.9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.2	2.2
Caffeic acid	nd	nd	nd	nd	nd	1.0	nd	nd	nd	0.1
Syringic acid	nd	2.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.4
<i>p</i> -coumaric acid	9.2	4.2	14.2	8.3	10.7	5.1	6.6	21.5	16.5	1.5
Ferulic acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.6	nd	0.1
Hesperidin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	18.8	0.5
Naringin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.2	0.1
Salicylic acid	33.1	265.4	819.2	362.9	295.9	197.2	208.3	581.1	627.7	10.1
Myricetin	nd	19.4	19.7	nd	9.5	9.4	19.3	nd	23.0	43.5
Total	784.2	379.6	1241.8	819.2	765.8	640.3	523.5	1027.9	1137.0	-

nd: not detect

패랭이잎을 분석

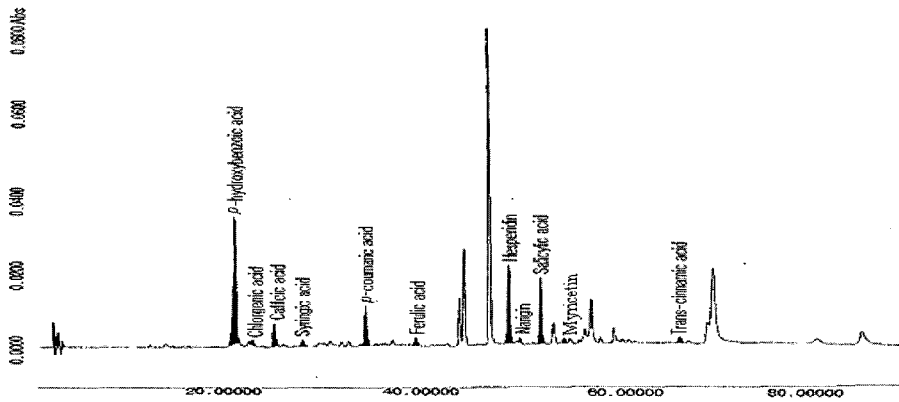


Fig. 1. HPLC chromatogram of phenolic compounds in leaf part of *Rehmannia glutinosa* (Yu *et al.*, 2004)

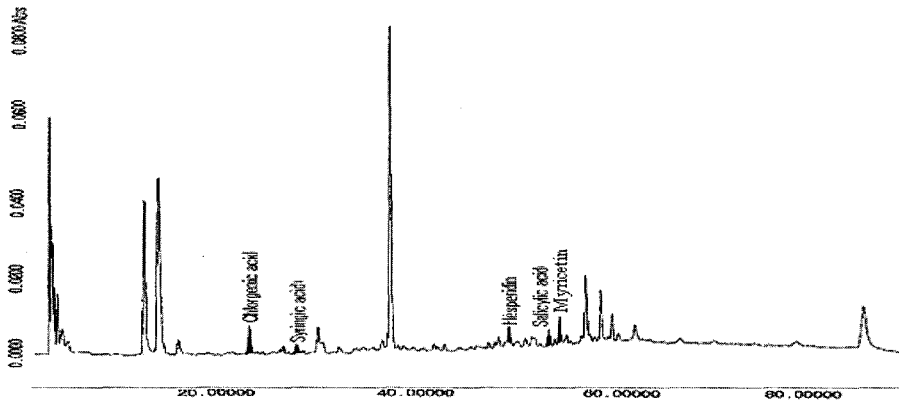


Fig. 2. HPLC chromatogram of phenolic compounds in root part of *Rehmannia glutinosa* (Yu *et al.*, 2004)

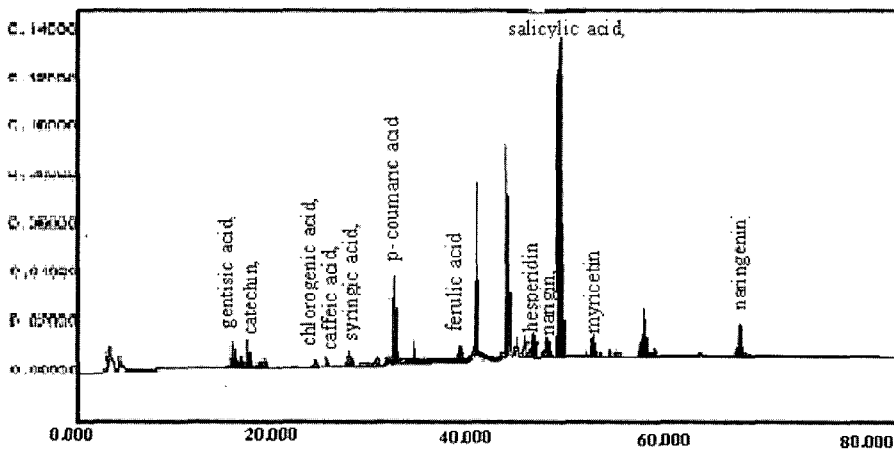


Fig. 3. HPLC chromatogram of phenolic acids in Myeongjunamul (Kim *et al.*, 2004).

참고 문헌

1. A.O.A.C. Official methods of analysis, 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 1980.
2. Banwart, W. L., P. M. Porter, T. C. Granato, and J. J. Hassett. 1985. HPLC separation and wavelength area ratios of more than 50 phenolics and flavonoids. *J. Chem. Ecol.* 11 : 383-395.
3. Chung, I. M., K. H. Kim, J. K. Ahn, H. Y. Chi, and J. O. Lee. 2000. Screening for antioxidative activity in soybean local varieties in Korea. *Korean J. Crop Sci.* 45 : 328-334.
4. Kim, S. H., H. K. Song, J. K. Ahn, J. T. Kim, S. J. Hahn and I. M. Chung. 2004. Changes of phenol compounds according to storing years in soybean. *Korean J. Crop Sci.* 49 : 82-88.
5. Lee, J. H. and S. R. Lee. 1994. Analysis of phenolic substances contents in Korean plant foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26 : 310-316.
6. Lim, J. D., C. Y. Yu, M. J. Kim, S. J. Yun, S. J. Lee, N. Y. Kim, and I. M. Chung. 2004. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various medicinal plants. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12 : 191-202.
7. Yu, C. Y., J. D. Lim, S. H. Kim S. J. Hahn, and I. M. Chung. 2004. Chemical analysis of *Rehmannia glutinosa* (GAERTNER) LIBOSHITZ on resveratrol, phenolic acid, free amino acid and SOD activity with water and temperature treatments. The Korean Society of Medicinal Crop Science in Spring Symposium. pp. 200-201.

Analysis of Phenol Compounds

Ill-Min Chung[†] and Seung-Hyun Kim

*Konkuk University, Dept. of Crop Science, Seoul 143-701, Korea
+82-2-450-3730, imcim@konkuk.ac.kr*