

산수유로부터 gallic acid 추출 및 HPLC에 의한 정량분석

장 미 · 김연주 · 민진우 · 양덕춘*

경희대학교 고려인삼명품화사업단 및 인삼유전자원소재은행

Optimization of Extraction Method for the Quantitative Analysis of Gallic Acid from *Cornus officinalis*

Mi Jang, Yeon-Ju Kim, Jin-Woo Min, and Deok-Chun Yang*

Korea Ginseng Center for Most Valuable Products & Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University

Abstract: *Cornus fructus* has been used as a tonic, astringent, and haemostatic agent in Korea, China, and Japan. In this study, the fruit of *Cornus officinalis* was treated with different osmotic pressures, pH values, heat, and ethanol percentages in order to establish optimum extraction conditions for gallic acid, an example of a hydrolyzable tannin. The extract was analyzed by HPLC and LC-MS/MS to identify the gallic acid. As a result, the highest extraction rate of gallic acid (1.57 mg/g) occurred when the *Cornus fructus* was extracted with 100% ethanol for 1 hr at 80°C. Also, when it was treated with 70% ethanol for 24 and 48 hr, contents of gallic acid were 1.35 and 1.50 mg/g, respectively.

Key words: *cornus fructus*, gallic acid, tannic acid, HPLC, LC-MS/MS

서 론

산수유나무는(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc)는 층층나무과(Cornaceae)의 낙엽교목으로 최근 우리나라 토종나무임이 밝혀졌으며, 주로 중남부 일대에 자생하며 남부지방에서 채배된다. 산수유나무의 붉은 열매인 산수유(*Cornus fructus*)의 종자는 유독하다고 하여 제거하고 과육만을 약용으로 이용한다.

산수유의 열매는 축산초 라고도 불리며 윤이 나고 거친 주름이 있는 암적색 외관에 독특한 냄새와 신맛 및 약간의 단맛이 난다(1). 예로부터 산수유는 다뇨증, 요통, 이명 및 폐결핵 등의 치료에 효과가 있고, 이뇨작용과 함께 혈압 강하 작용, 항암 작용 및 항균 작용 등이 있는 것으로 알려져 있으며 단백질의 소화를 돕는다고 동의학에서 말하고 있다(2).

산수유의 성분으로는 과실에 malic acid, tartaric acid 등이 함유되어 신맛(酸味)을 나타내고 loganin, sweroside 등이 들어 있어 쓴맛(苦味)을 나타내며, gallic acid 등 기타 tannin 류가 있어 떫은 맛을 나타낸다(3).

산수유의 떫은 맛을 내게 하는 tannin은 자연계 polyhydroxyl phenol로서 gallic acid로 에스테르화되며, 식물 및 과일, 녹차 등에서 많이 볼 수 있는 유기 화합물이다. 붉은 산이나 가열 시 가수분해 되는 hydrolyzable tannin은 중심부에 polyol(주로 D-glucose) 구조를 가지며, 당류의 hydroxyl기에 gallic acid 또는 ellagic acid와

같은 phenol 기와 결합된 형태로 존재한다고 보고된 바 있다(4).

최근에는 gallic acid의 항산화, 항염증, 항돌연변이, 항알러지 등의 생리 활성 관련 연구가 많이 보고되고 있다(5). 또한 식품 과학 분야에서는 천연 생물자원으로부터 항산화력이 우수한 물질을 탐색하는 연구가 활발히 행해지고 있으며, 추출된 생리활성 소재를 기능성 식품에 첨가하는 식품개발에 대한 연구가 많은 관심을 받고 있지만(6), 산수유를 이용한 기능성식품 개발에 필요한 기능성분 추출에 대한 연구는 미진하다. 기능 성분의 추출 방법에는 삼투압에 의한 추출, 산에 의한 추출, 열수 추출, 용매 추출 등이 있다. 삼투압에 의한 추출은 과일·채소 주스 제조 시 과실 속의 모든 성분이 추출되지 않고, 향이나 일부 유용 성분만 추출되기 때문에 건강 음료 제조 시 사용되며(7), 산에 의한 가수분해는 산의 촉매작용 하에서 쉽게 당 가수분해가 일어나 인삼 사포닌과 같은 배당체 전환 시 이용되어 진다(8). 식품 공정에서 많이 사용되는 열처리 성분의 다양한 화학적 변화로 인해, 생리 활성이 증가한다고 알려져 있으며, 표고버섯(9), sweet corn(10) 및 citrus peels(11) 등을 열처리 시 polyphenol 함량 및 항산화 활성이 증가 한다는 연구 결과도 보고 된 바 있다. 물과 에탄올을 이용한 용매 추출은 카테킨 화합물을 회수하기 위해 많이 이용되고 있다(12). 현재까지 산수유에 대한 연구로는 산수유의 영양 성분 분석(3), 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육 분리 특성(13), 산수유에 함유된 항암물질의 정제 및 특성(14) 등이 있으나 산수유의 기능성식품 개발에 필요한 기능성분 추출 및 가공 방법, 이화학적 특성에 대한 연구는 미약하다. 따라서 기능성 식품으로써 산수유의 다양한 활용을 위해서는 기능 성분 추출에 대한 다양한 연구가 필요한 실정이다. 본 연구에서는 산수유로부터 떫은 맛을 내며 항산화 물질로 알려진 gallic acid를 추출하기 위해 삼투압, pH, 온도, 주정의 함량을 달리하여 추출 조건을 확립 하고 기능성 식품 및 한방 재료의 다양한 활용을 위한 기초 자료로 제시하고자 본 실험을 수행 하였다.

*Corresponding author: Deok-Chun Yang, Korea Ginseng Center for Most Valuable Products & Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 449-701, Korea
Tel: 82-31-201-2100
Fax: 82-31-205-2688
E-mail: dcyang@khu.ac.kr
Received July 14, 2009; revised August 7, 2009;
accepted August 11, 2009

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 산수유는 전남 구례군 산동면(2009년도 산)에서 수확한 것을 수세하여 과육과 씨를 분리한 다음 과육을 -20°C 에서 냉동 보관한 후, 건조·분쇄하여 사용하였다.

추출물 제조

삼투압 추출 실험을 위해 산수유 과육을 일정한 시간(24, 48 hr), 일정한 농도(0, 1, 3, 5%)의 NaCl 용액에 침지한 후 추출물을 여과지로 분리하였다. 산 가수분해는 증류수에 구연산을 첨가하여 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 로 맞춘 각각의 용액에 산수유를 24시간 침지 후 여과지로 침전물을 분리 하였으며 열수 추출 조건은 에탄올(50, 60, 80, 100%)을 추출용매로 80°C 에서 1시간 동안 환류 추출하였다. 물과 에탄올을 이용한 추출 실험은 우선 다양한 비율의 에탄올 용액(20, 40, 50, 60, 70, 80, 100%)을 준비한 후 각각의 추출용액을 일정한 시간(12, 24, 48 hr) 동안 37°C 에서 침지한 후 추출하였다.

HPLC에 의한 정량

각각의 추출물에 ethyl acetate를 첨가하여 혼합한 후 ethyl acetate 층을 분리 추출하였다. 이 과정을 2회 반복하여 ethyl acetate 층을 회수하고, 여기에 무수 황산나트륨을 가하여 여과지로 분리한 후 감압 농축기(Eyela, Tokyo, Japan)로 농축한 후 시액(0.2 M 인산완충액:메탄올:물=2:3:15, v/v/v, pH 3.0)에 용해시킨 후 0.2 m membrane filter로 여과하여 이를 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 사용한 HPLC는 NS3000 system(FUTECS, Deajeon, Korea)이었고, column은 Hypersil-ODS(200×4.6 mm i.d., $5 \mu\text{m}$ 40°C , Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였으며, UV 280 nm 파장에서 측정하였다. 이동상으로는 acetonitrile:acetic acid:methanol:water(113:5:20:862, v/v/v/v)를 사용하였으며 유속은 1.0 mL/min, 시료 주입량은 20 L를 사용하였다. Gallic acid의 동정은 표준품인 gallic acid의 LC/MS/MS 분석 결과와 비교하여 동정하였고, gallic acid 표준용액을 물에 녹여 0.01, 0.1, 0.35 mg/mL 로 각각 조제하여 검량선을 작성한 후 계산된 함량으로 나타내었다. 함량을 나타내기 위한 단위로 mg gallic acid equivalents (GAE)/g dry weight을 이용하였다. 추출과 분석에 사용되는 acetonitrile, acetic acid, methanol, water는 HPLC grade로 J.T. Baker사(Phillipsburg, NJ, USA) 제품을 사용하였고 gallic acid, tannic acid, ethyl acetate, sodium sulfate anhydrous 등 기타 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

LC/MS/MS 분석

기존의 HPLC/UV 방법은 ppm 수준에서 분석을 수행하는 반면 LC/MS/MS 방법은 ppb 수준까지 정량성을 나타내므로 미량의 물질도 용이하게 검출될 수 있다. 따라서 HPLC상에서 검출된 gallic acid 성분을 확인하기 위해 LC/MS/MS를 시행하여 분석하였다. LC-MS/MS는 Agilent 1200 series HPLC와 Agilent 6410 Triplequadrupole mass spectrometer(Agilent Technologies, Foster city, CA, USA)를 사용하였으며 칼럼은 Zorbax Eclipse Plus C18(2.1×100 mm i.d., $1.8 \mu\text{m}$, Agilent Technologies)를 사용하였다. 데이터 처리 및 기기운용 프로그램으로서 Agilent masshunter workstation data acquisition을 사용하였다. LC-MS/MS 분석 조건으로 이동상은 acetonitrile:acetic acid:methanol:water(113:5:20:862, v/v/v/v)를 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 유속으로 흘려주었고,

Table 1. Main working parameter for tandem mass spectrometry

Parameter	Value
Ion polarity	Negative
Fragmentor voltage	4000 V
Nebulizer pressure	45 psi
Drying gas temperature	350°C
Dry gas flow	10 L/min
Dwell time per transition	200 ms
Ion transition for gallic acid, m/z	169.0 \rightarrow 125.0

시료의 주입량은 1 μL 를 사용하였다. Curtain gas와 collision gas로는 고순도 N_2 를 사용하였다. LC-MS/MS 분석 조건으로는 음이온 모드에서 ESI needle voltage는 4000V이며 gas temperature는 350°C , gas flow는 10 L/min, nebulizer pressure는 45 psi로 하였다 (Table 1). 분석에 사용되는 acetonitrile, acetic acid, methanol, water는 HPLC grade로 J.T. Baker사(Phillipsburg, NJ, USA) 제품을 사용하였다.

통계분석

결과 수치는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험군 간의 통계학적인 분석은 Sigma-Stat 3.5(Jandel Co., San Rafael, CA, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance(ANOVA)분석을 실시하였으며 유의성 검정은 p -value가 0.05 이하일 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

HPLC에 의한 gallic acid의 함량 변화

맑은 맛을 내며 항산화 물질 등으로 알려진 tannin 류의 gallic acid 추출 최적 조건을 검색하기 위해 삼투압, pH, 열처리, 물과 주정 함량을 달리하여 추출 조건별로 gallic acid 함량을 측정하였다.

표준용액 gallic acid를 0.01, 0.1, 0.35 mg/mL 되게 희석하여 검량선을 구한 결과 상관계수(r^2)는 0.999로 양호한 직선성을 나타내었고 함량을 나타내기 위한 단위로 mg gallic acid equivalents(GAE)/g dry weight을 이용하였다.

NaCl 농도를 이용한 삼투압 추출은 Fig. 1에서와 같이 NaCl 1, 3, 5% 침지 용액보다 NaCl 무 침지구에서 gallic acid 함량이 유의적으로 증가하였으며 침지시간은 24시간보다 48시간에서 gallic acid 함량이 유의적으로 증가하였다. 이는 삼투압 작용이 gallic acid 추출에 영향을 주지 않는 것으로 생각되어지며, 이러한 결과는 삼투압 차로 인한 추출 저하로 추출용매에 대한 gallic acid의 용해속도가 감소하여 나타난 것으로 생각되어진다(Fig. 1).

가수 분해성 타닌은 glucose의 수산기에 gallic acid가 ester 결합을 하고 있기 때문에, 산 가수 분해 시 gallic acid 함량이 증가할 것으로 사료되어 구연산을 이용해 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 로 맞춘 각각의 용액에 산수유를 24시간 침지하여 gallic acid의 용해속도를 조사한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 pH 3.0에서 pH 6.0으로 갈수록 gallic acid 함량이 증가하다 pH 7.0에서 gallic acid 함량이 감소하는 경향을 알 수 있었다. pH 7.0에서는 gallic acid가 0.33 mg/g이 추출된 반면에 pH 6.0 수용액에서는 0.48 mg/g을 나타냈다(Fig. 2).

일정한 온도(80°C)에서 주정 농도(%)를 달리하여 1시간 동안 환류 추출한 경우 gallic acid 함량은 Fig. 3에서 나타난 바와 같

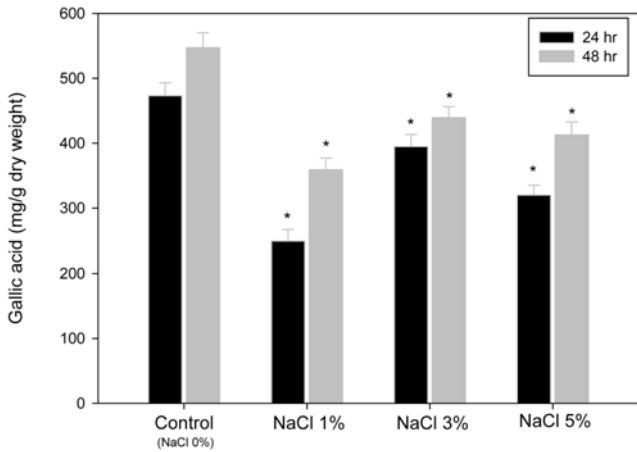


Fig. 1. Changes of the content of gallic acid from *Cornus fructus* after soaking with different NaCl concentration (%) at 37°C for 24 and 48 hr, respectively. Data are presented as mean±SD (n=3). *significantly different from control ($p < 0.05$).

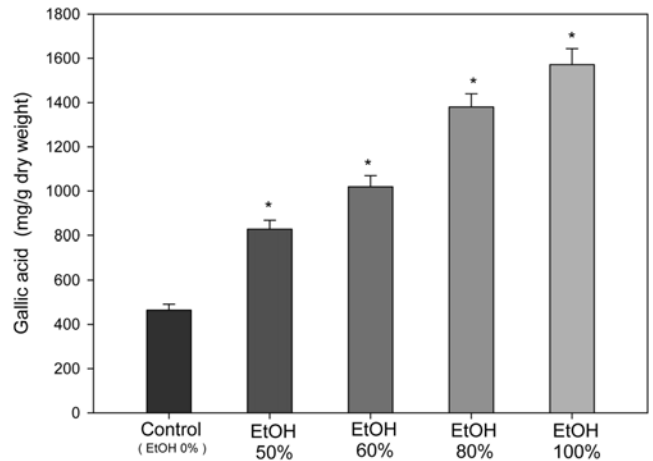


Fig. 3. Changes in gallic acid contents of *Cornus fructus* extract during heat treatment at various ethanol concentration. Data are presented as mean±SD (n=3). *significantly different from control ($p < 0.05$).

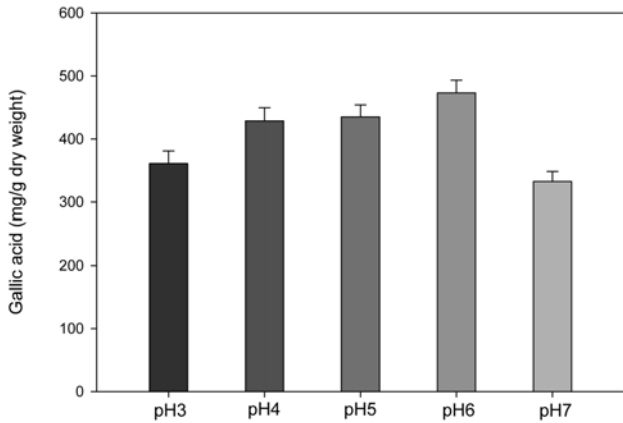


Fig. 2. Changes of the content of gallic acid from *Cornus fructus* after soaking with various pH at 37°C for 24 hr. Data are presented as mean±SD (n=3).

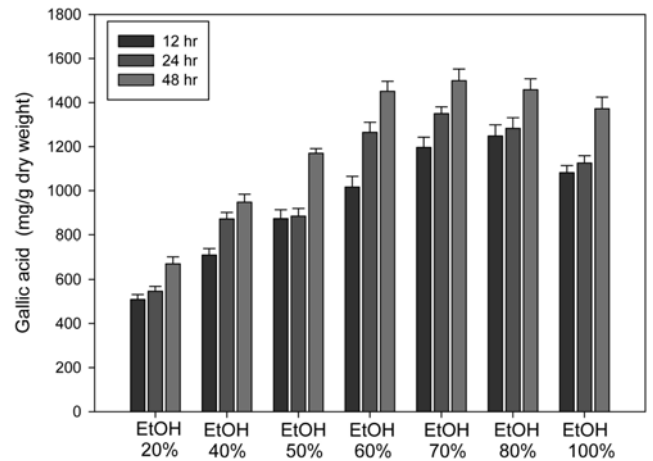


Fig. 4. Changes of the content of gallic acid from *Cornus fructus* after soaking with each solvent ratio (ethanol 20, 40, 50, 60, 70, 80, and 100%) for 12, 24, and 48 hr, respectively. Data are presented as mean±SD (n=3).

다. 물을 추출 용매로 하였을 경우 gallic acid 함량은 0.46 mg/g 이었으며, 주정 100% 추출 용매에서는 1.57 mg/g이었다. 따라서 산수유를 80°C에서 1시간 동안 환류 추출한 경우 주정의 농도가 높을수록 gallic acid 함량이 유의적으로 증가하였다(Fig. 3). 이는 에탄올의 농도차이로 인한 gallic acid의 용해도가 다르게 나타나는 것으로 생각되어진다.

또한 산수유를 37°C에서 주정 농도 별로 12, 24, 48시간 침지하여 추출한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 침지 시간과 주정의 농도가 증가할수록 gallic acid 함량이 증가되었다. 산수유를 주정 80%로 12시간 침지 시 gallic acid 함량이 1.25 mg/g로 나타났으며, 주정 70%로 24, 48시간 침지했을 경우 gallic acid 함량이 각각 1.35, 1.50 mg/g로 보다 높은 추출 효율을 보였다. 주정 농도를 달리하여 일정시간(12, 24, 48시간) 동안 침지 시, gallic acid 함량은 침지 시간과 주정의 농도에 크게 영향을 받는 것으로 사료되어진다. 주정의 농도가 증가할수록 추출된 gallic acid 함량은 증가하지만 주정의 농도가 70-80% 이후에는 오히려 gallic acid의 추출 효율이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 4). 이러한 경향은 국화과에 속하는 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)의 경우와 유사한 경우로서(15), 계피에 대한 총 페놀성 화합물의 추출에서

70% 에탄올이 가장 우수한 추출 효율을 보인다는 보고와 일치하였다(16,17).

LC-MS/MS에 의한 정성분석

HPLC를 통해 분리된 gallic acid를 확인 하기위해 LC/MS/MS를 이용하여 분석하였다. Gallic acid의 표준 용액을 바탕으로 ESI/Ion Trap MS를 negative mode로 분석하여 [M-H]⁻값과 이온화되었을 때의 fragment MS/MS의 값을 확인하였다. 선택한 이온과 모드에서 충돌에너지를 가하여 분자 이온을 딸이온(찌개짐 이온)으로 찌개고 에너지별 찌개짐과 딸이온의 세기를 비교하여 최적의 딸이온을 생성하는 충돌에너지 및 기타 파라미터를 저장하여 MRM조건을 확립하였다(18). MRM은 구조가 다른 분자의 찌개짐 에너지와 찌개짐 패턴의 차이를 이용하여 분자의 확인과 정량을 하므로 정량성과 분자에 대한 특이성을 제공하는 것으로 알려져 있다(19). LC-MS/MS 분석결과는 Fig. 5에 나타내었다. 분리된 각 성분들의 retention-time(RT)별 LC/MS/MS을 분석한 결과, Fig 5은 LC 분리 성분 중 RT 1.0분의 성분이 MS에 도입되

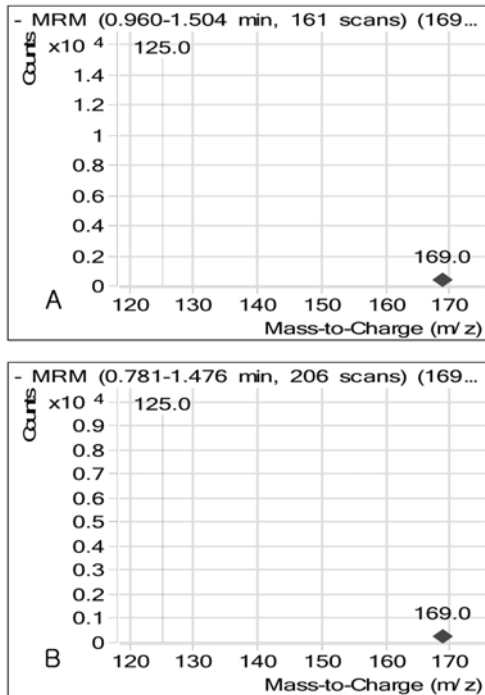


Fig. 5. LC/MS/MS spectra of gallic acid obtained after injecting extract from heat-treated *Cornus fructus* (A) and gallic acid standard at 10 ppm (B). The negative electrospray product ion spectra of the ion at $m/z=125$ coming from in-source fragmentation of the ion at $m/z=169$.

면서 분석된 결과이며 RT 1.0분에서 분리된 성분은 m/z 125.0과 169.0의 두 가지 질량 분석 피크가 강하게 나타났다. LC/MS/MS 분석에서 negative mode로 측정할 경우 일반적으로 양성자(proton)가 하나가 빠진 형태의 molecular ion이 측정되는데 여기에서 m/z 169.0은 gallic acid(exact mass: 170.02)에서 수소원자 하나가 빠진 형태임을 알 수 있으며 m/z 169.0보다 intensity가 높은 m/z 125.0은 exact mass가 170.02인 gallic acid에서 카르복실기(-COOH, mass: 45)가 빠진 형태임을 알 수 있다(20).

요 약

떫은 맛을 내며 항산화 물질 등으로 알려진 tannin 류의 gallic acid 추출 최적 조건을 검색하기 위해 삼투압, pH, 열처리, 주정 함량을 달리하여 추출 조건 별로 gallic acid 함량을 조사하였다. NaCl 농도를 이용한 삼투압 작용은 gallic acid 추출에 큰 영향을 주지 않는 것으로 사료되며 추출 용매의 pH가 3.0에서 6.0으로 갈수록 gallic acid 함량이 증가하다가 pH 7.0에서 gallic acid 함량이 감소되는 경향을 나타내었다. 80°C에서 다양한 주정 농도로 1시간 동안 환류 추출한 경우 주정의 농도가 높을수록 gallic acid 함량이 유의적으로 증가하였고 산수유 과육을 일정한 온도(37°C)에서 주정 농도 별로 12, 24, 48시간 침지 하여 추출한 결과 침지 시간과 주정 농도가 증가할수록 gallic acid 함량도 증가하였지만 주정의 농도가 70-80% 이후에는 오히려 gallic acid의 추출 효율이 감소되는 경향을 나타내었다. 따라서 산수유로부터 gallic acid의 추출 최적 조건으로는 산수유 과육을 37°C에서 침지 시 주정 70%로 48시간 추출한 경우 gallic acid 함량이 높았고, 환류 추출의 경우 80°C에서 주정 100%로 1시간 열처리 하였을 때 상대적으로 gallic acid 함량이 높게 나타났다. 본 실험 결과 산수유

과육으로부터 떫은 맛을 내는 gallic acid의 추출률은 주정의 농도와 온도, 추출 시간에 영향을 받는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2009년 정부(과학기술부)의 재원으로 자생식물이용기술개발사업단(code PF06222-00)의 지원으로 수행된 연구결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Chung SR, Jeune KH, Park SY, Jang SJ. Toxicity and lectins constituents from the seed of *Cornus officinalis*. Korean J. Pharmacogn. 24: 177-182 (1993)
2. Seo KI, Lee SW, Yang KH. Antimicrobial and antioxidative activities of *Cornus fructus* extracts. Korean J. Postharv. Sci. Technol. 6: 99-103 (1999)
3. Kim YD, Kim HK, Kim KJ. Analysis of nutritional components of *Cornus officinalis*. J. Korean Sci. Nutr. 32: 785-789 (2003)
4. Fechtal M, Garro Galvez JM, Riedl B. Gallic acid as a model of tannins in condensation with formaldehyde. Thermochim. Acta 274: 149-163 (1996).
5. Jeon YH, Kim MH, Kim MR. Antioxidative, antimutagenic, and cytotoxic activities of ethanol extracts from *Cornus officinalis*. J. Korean Sci. Nutr. 37: 1-7 (2008)
6. Kim JH, Oh HS. Development of functional soy-based stew sauce including hot water extract of *Cornus officinalis* S. et Z. Korean J. Food Culture 21: 550-558 (2006)
7. Ponting JD, Watters GG, Forrey RR, Jackson R, Stanley WL. Osmotic dehydration of fruits. Food Technol.-Chicago 20: 1365 (1966)
8. Han BH, Park MH, Han YN. Degradation of ginseng under malic acid condition. Planta Med. 44: 146-149 (1982)
9. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. Food Chem. 99: 381-387 (2006)
10. Dewanto V, Wu X, Liu RH. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. J. Agr. Food Chem. 50: 4959-4964 (2002)
11. Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, Lee SC. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peel. J. Agr. Food Chem. 52: 3389-3393 (2004)
12. Chang CJ, Chiu KL, Chen YL, Chang CY. Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. Food Chem. 68: 109-113 (2000)
13. Lee YC, Kim YE, Lee BY, Kim CJ. Chemical compositions of corni fructus and separating properties of its flesh by drying. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 447-450 (1992)
14. Kim BH, Park KW, Kim JY, Jeong IY, Yang GH, Cho YS, Yee ST, Seo KI. Purification and characterization of anticarcinogenic compound from corni fructus. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 1001-1007 (2004)
15. Park, NY, Lee GD, Jeong YJ, Kwon JH. Optimization of extraction conditions for physicochemical properties of ethanol extracts from *Chrysanthemum* petals. J. Korean Sci. Nutr. 27: 585-590 (1998)
16. Kim NM, Sung HS, Kim WJ. Effect of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 25: 204-209 (1993)
17. Kim, NM, Yang, JW, Kim WJ. Effect of ethanol concentration on index components and physicochemical characteristics of cinnamon extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 25: 282-287(1993)
18. Zhang Y, Ding L, Tian Y, Yang J, Yang L, Wen A. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for the quantification of mitogline in human plasma: Validation and its application to pharmacokinetic studies. Biomed. Chromatogr. 22: 873-878 (2008)
19. Daeseleire E, Ruyck HD, Renterghem RV. Rapid confirmatory

assay for the simultaneous detection of ronidazole, metronidazole, and dimetridazole in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analyst* 125: 1533-1535 (2000)

20. Yoon SH, Kim TK, Kim MK, Lim YJ, Yoon NS, Lee YS. Antimicrobial finishing of cotton fabrics using gallnut extracts. *J. Korean Soc. Dyers Finishers* 15: 27-32 (2003)