

On-line screening HPLC-ABTS를 이용한 땅콩새싹으로부터 Resveratrol의 생물활성 분석

김영식^{1*}

¹강원대학교 화학공학과

Bioactivity analysis of Resveratrol from peanut sprouts using On-line screening HPLC-ABTS

Young Sik Kim^{1*}

¹Department of Chemical Engineering, Kangwon National University

요 약 땅콩새싹은 많은 아시아 국가에서 오랜 시간 동안 식품으로 사용되어왔다. 그중에서 resveratrol은 항산화 및 항암 등의 생리 활성 효과가 있다. 본 연구는 resveratrol은 침적방법(추출시간 3h, 25℃)을 이용하여 추출하였다. 그리고 on-line screening HPLC-ABTS를 사용하여 추출 효율 및 함량을 확인 하였다. 추출액은 상업용 C18 역상 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 이동상으로 물과 아세토나이트릴을 사용하여 선형기울기용매법으로 분리·분석을 하였다. 유속은 1.0mL/min, 주입부피는 10 μ L, 컬럼오븐 온도 40℃, 파장 320nm에서 수행되었다. 실험결과, 50% 에탄올에서 resveratrol 함량이(0.310-0.346 μ g/mL) 100% 물과 에탄올 조성보다 높았다. 또한 100% 물 추출물의 수율은 2.040-2.145%로 낮았다. 위의 결과 on-line HPLC-ABTS 분석은 식품추출물의 생물활성을 빠르고 특화된 강력한 기술이 될 수 있음을 보여주었다. 이것은 제약 및 기능성 소재로서의 응용 가능성을 나타내었다.

Abstract The Peanut sprouts have been used as food for long time in many Asian countries. Among them, resveratrol have bioactivity effects as antioxidant and anticancer. In this work, resveratrol was extracted from peanut sprouts by dipping(extraction time 3h, 25℃) method. And extraction efficiency and amount was identified using on-line screening HPLC-ABTS. From the experimental results, it is evident that the amount of resveratrol(0.310-0.346 μ g/mL) by 50% aqueous EtOH was higher than any 100% water and EtOH composition. Also, the 100% water extracts sample was low yield 2.040-2.145%. The shown results can be applied as sources for pharmaceuticals and functional material.

Key Words : Analysis, Bioactivity, Extraction, On-line screening HPLC-ABTS, Peanut sprouts

1. 서 론

최근 생활 및 의료 수준의 향상에 따른 국민들은 건강에 대한 관심이 높아지면서 식품 선택에 있어서 기능성을 갖춘 식품 및 의약품을 선호하는 추세이다[1]. 이것은 21세기 바이오산업에 있어서 많은 연구자들로부터 천연물 및 한약재로부터 유용성분을 얻기 위한 노력과 기능이 강화된 생물소재 산업에 높은 관심을 가지고 있다[2]. 나아가 바이오산업은 맞춤형 서비스를 제공함으로써 사

람들의 웰빙생활 패턴의 욕구와 수요를 충족시키는데 노력하고 있다[2,3]. 땅콩은 콩과에 속하는 일년생의 초본식물로서 지방과 단백질을 많이 함유하고 있는 고열량 식품으로서 직접 식용으로 이용되거나 가공식품 등 다양한 분야에 이용되고 있다[4]. 이 중에서 발아 땅콩새싹은 기능성 영양성분이 풍부하고 수분함량이 높고 식미가 우수하며 식품소재로서의 이용범위가 넓은 장점을 지니고 있다[5]. 이것은, 싹을 띄운 것을 토대로 발아하는 과정에서 지방 및 칼로리가 낮아지고 땅콩에 미량으로 존재하는

*Corresponding Author : Young Sik Kim(Kangwon National Univ.)

Tel: +82-10-2235-4467 email: jameskim@kangwon.ac.kr

Received May 20, 2013

Revised (1st July 16, 2013, 2nd August 6, 2013)

Accepted August 7, 2013

천연 폴리페놀 화합물인 resveratrol이 증가된다[4-6]. 이러한 땅콩새싹은 암, 당뇨, 심장병 예방, 항산화작용, 염증억제, 노화방지, 동맥경화, 혈중 콜레스테롤 저하 및 기억력 증진 등의 효능 및 효과가 잘 알려졌으며[5-7,13], 특히 resveratrol은 적포도, 땅콩, 오디 등에 함유되어 다양한 약리효과들이 보고되고 있다[7,8].

이처럼 다양한 유용성분을 얻기 위한 가공 및 추출방법으로는 일반적인 열수추출법, Soxhlet법, 고온용매추출법과 같은 전통적인 방법이 사용되고[9], 초임계유체법, 초고압처리법, 초음파추출법을 통한 추출효율을 증대시키기 위한 기술이 많이 이용되고 있다[10]. 또한 효율적 가공 및 추출방법은 다량의 성분을 선택적으로 얻을 수 있고 추출 효율도 높일 수 있지만 천연 화합물의 화학적 특성상 구조적으로 불안정한 생리활성 물질이 많이 함유되었다[11,12]. 특히 resveratrol을 포함한 많은 폴리페놀 성분은 빛과 산소에 노출될 경우 분해되는 경우가 크다[13]. 따라서 고효율 고부가 가치를 창출하는 기능성 식품, 의약품 및 기능성 소재의 개발은 기술적 조절이 가능토록 과학적 접근법의 제시가 요구되어진다. 본 연구에서는 땅콩새싹을 이용한 기능성 소재 이용을 높이기 위한 기초자료 확립과 추출용매조성에 따른 추출효율을 탐색 하고 on-line screening HPL-ABTS assay 기법을 적용한 빠른 생물활성을 확인하였고 resveratrol의 함량을 분석하였다.

2. 실험

2.1 실험재료 및 시약

본 연구에 사용한 땅콩새싹은 전남 광양시 지역에 위치한 섬진강영농조합에서 재배한 것으로서 2013년 4월에 제공 받아 사용하였다. 새싹은 7일 동안 땅콩종자를 수경 재배 받아서 키친 것으로서 수확 후 신선한 상태의 시료를 공급 받았으며 저온 냉장에 빛을 차단시켜 보관 후 실험에 사용하였다. Fig. 1에서는 땅콩새싹의 재배과정을 보여주고 있다.

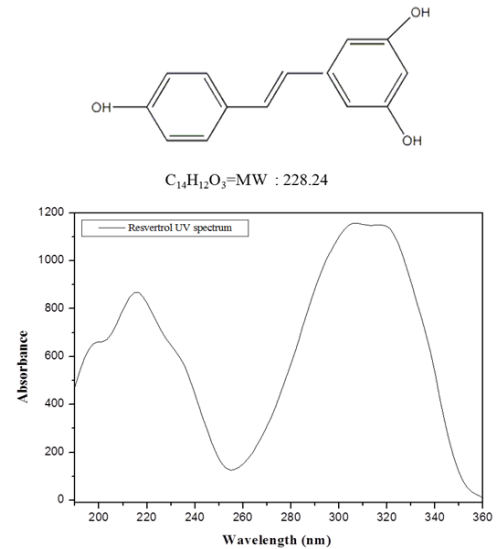
표준시료인 resveratrol은 TCI Co.(Tokyo Chemical Industry)에서 구입하였다. 시료의 균일성을 위하여 수분 조절 용기(desiccator)에 보관하여 사용하였고 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(PVDF 0.2 μ m, Waters co)를 이용하여 여과를 하였다. 용매는 HPLC급(99.9%)으로 메탄올, 아세토나이트릴, 아세트산은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, U.S.A.) 그리고 물은 3차 증류수 (Division of Millipore, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다.



[Fig. 1] Photo image : peanut sprouts cultivation in the factory

2.2 표준시료 제조

Resveratrol의 표준시료(순도: 98% $>$) 4mg을 고순도 메탄올20mL취하여 200ppm의 표준원액을 제조하였다. Fig. 2에서는 resveratrol의 구조식과 UV파장을 나타내었다.



[Fig. 2] Chemical structure and UV spectrum of resveratrol

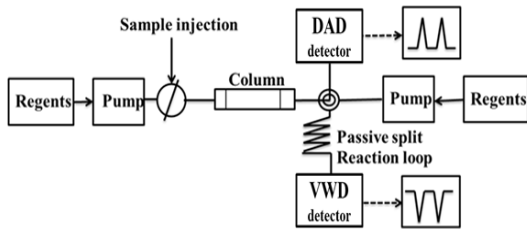
2.3 ABTS시약 제조

Radical scavenging 활성분석을 위하여 ABTS 시험법을 사용했으며 사용된 시약은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS, C₁₈H₂₄N₆S₄)와 potassium persulfate를 사용하여 완전히 녹인 후 ABTS 시약과 충분히 교반 후 차광시켰다. 제조된 용액은 1L 갈색병에 넣고 하루 정도 radical의 안정성을 위해 어두운 곳에서 보관한 뒤 사용하였다[9].

2.4 On-line HPLC분석조건 및 기기

추출된 시료를 농축하기 위해서 회전식 증발기

(Heidolph Instruments Laborata 4000 efficient, Gemany) 를 사용하였다. HPLC 시스템 으로는 Dionex co.(Ultimate-3000)의 3000 pump와 injector는 10 μ L sample loop(Dionex, ID 0.18 \times L 550mm Viper 550mm USA)가 연결되었고, 데이터 처리는 Dionex co.의 PC에 설치된 Chromeleon data acquisition system (Dionex version 7.0.1.272)과 HPLC-DAD를 사용하여 정량 및 정성분석을 하였다. Fig 3에서는 on-line screening HPLC-ABTS assay 시스템을 나타내었다. 분석에 사용된 컬럼은 (RS-Tech 4.6 \times 250 mm, 5 μ m, C₁₈, Korea)와 유속은 1.0mL/min, 주입 부피는 10 μ L, 컬럼 오븐 온도 40 $^{\circ}$ C 로 고정하였다.



[Fig. 3] Schematic of on-line screening HPLC- ABTS system

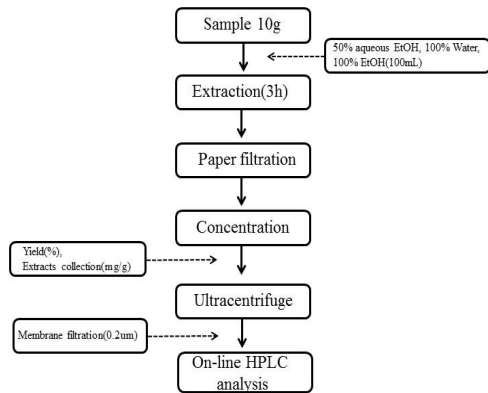
UV 검출기(DAD)의 파장범위를 200-400nm로 적용하여 320nm로 검출하였고 생물활성은 734nm로 나타내었다. 이동상은 이성분계 A: H₂O/TFA(99.9/0.1 v/v), B: Acetonitrile(100 v/v)을 사용하여(A:B 90:10-60:40 v/v)으로 60 min동안 기울기용매조성법으로 실험하였다. Table 1에서는 resveratrol의 분석 조건을 나타내었다.

[Table 1] HPLC analysis condition

Instrument	HPLC (Dionex, Ultimate-3000)
RP Column	RS-Tech Optimapak C ₁₈ (4.6 \times 250 mm, 5 μ m)
Injection vol.	10 μ L
Column oven temp.	40 $^{\circ}$ C
UV wavelength	320nm(positive) 734nm(negative)
Flow rate	1.0mL/min
Run time	60min
Mobile phase	A: Water (0.1 vol.% TFA), B: Acetonitrile(ACN)
Linear gradient elution	A: 90-60%, B: 10-40%

2.5 용매추출법

침적추출(dipping)은 일정한 상온(25 $^{\circ}$ C)에서 수행 하였으며 땅콩새싹은 잘게 잘라서 시료로 사용하였다. 이때 수분 함유량은 80.62%이었다. 이후 땅콩새싹 10g을 200mL 비이커에 추출용매로서 50% 수용성에탄올, 100% 물, 100% 에탄 올 100mL를 각각 첨가하여 침적방법을 적용하여 3h동안 추출하였다. 추출물에는 많은 양의 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용매추출 후 여지필터 (pore size : 5 μ m)에서 감압 여과하여 시료 잔유물과 분리시켰고 이후 감압 농축 후 동결건조(refrigerated vapor trap)를 하여 전체 추출 수율 계산과 시험용액으로 사용하였다. Fig. 4에서는 땅콩새싹으로부터 resveratrol의 추출 및 정제과정을 나타내었다.



[Fig. 4] Extraction and Purification process of resveratrol from peanut sprouts

3. 결과 및 고찰

본 연구는 땅콩새싹으로부터 resveratrol의 추출 거동을 확인하기 위하여 침적추출(dipping)을 적용한 용매조성 50% 수용성에탄올, 100% 물, 100% 에탄올에서 추출 조건을 설정하였다. 이것의 추출물에서 얻은 resveratrol은 빠른 생물활성을 표준물질(순도: 98% $>$)을 통해 확인되었고 resveratrol의 함량을 분석하여 기능성소재로 사용이 가능한 기초 자료를 제시하였다.

추출 수율 및 함량. 침적추출(dipping)은 상온(25 $^{\circ}$ C)에서 3h동안 수행하였으며 일정한 크기로 자른 땅콩새싹은 수분(80.62%)이 함유되었다. 용매조성 변화에 따라 추출 수율(yield)의 변화는 50% 수용성에탄올 추출물에서 8.715-8.865%, 100% 물 추출물에서 2.040-2.145%, 100% 에탄올 추출물에서 9.040-9.605%의 추출 거동을 확인 할

수 있었다. 또한 건조 추출물 함량은 50% 수용성 에탄올 추출물에서 0.585-0.597g, 100% 물 추출물에서 0.053-0.054g, 100% 에탄올 추출물에서 0.535-0.557g을 얻을 수 있었다[11]. 따라서 100% 물 추출물의 추출효율이 가장 낮았고 50% 수용성 에탄올 추출물의 추출효율이 가장 높았다[Table 2]. 또한 추출물에서 resveratrol 함량은 0.310-0.346 μ g/mL을 각각 얻을 수 있었으며, 50% 수용성 에탄올에서 가장 높은 함량을 얻을 수 있었다[Table 3]. 이 결과 추출 효율은 추출 방법에 따른 영향을 다양한 각도에서 확인되어 빛, 열에 불안정 성분을 얻기 위한 안정한 추출 방법을 찾아야 할 것이다[11-13]. 또한 활성산소(free radical oxygen radical)에 기인하여 추출 과정 중 유용성분이 소멸되거나 재배기술 방법에 따른 유용성분의 함유되는 정도는 매우 큰 차이가 있을 것으로 사료된다[6,11-14]. 결과적으로 resveratrol의 추출은 미미한 증가 추세를 보였고 실제 유용성분을 효율적으로 얻기 위한 방법으로 산업적 경제성을 고려한 고효율 고비용의 추출조건이 제조공정 특성에 맞게 제시 되어야 할 것이며 나아가 기초 데이터의 사용은 공학적 기반을 기초로 한 수학적 모델링을 통해 산업적 적용을 예측해야 될 것으로 사료된다[11,12].

[Table 2] Comparison of extract amounts weight of resveratrol in fresh peanut sprouts

Extraction Solvent(%)	Resveratrol <i>Rt</i> (min)	Extract amount weight(g)	S.D(\pm)	Wet content (%)
50% EtOH(1)	32.320	0.585	0.002	80.620 \pm 0.86
50% EtOH(2)	32.357	0.597		
100% H ₂ O(1)	32.107	0.053	0.001	
100% H ₂ O(2)	32.360	0.054		
100% EtOH(1)	32.283	0.535	0.008	
100% EtOH(2)	32.293	0.557		

Data expressed mean S.D($n=2$)

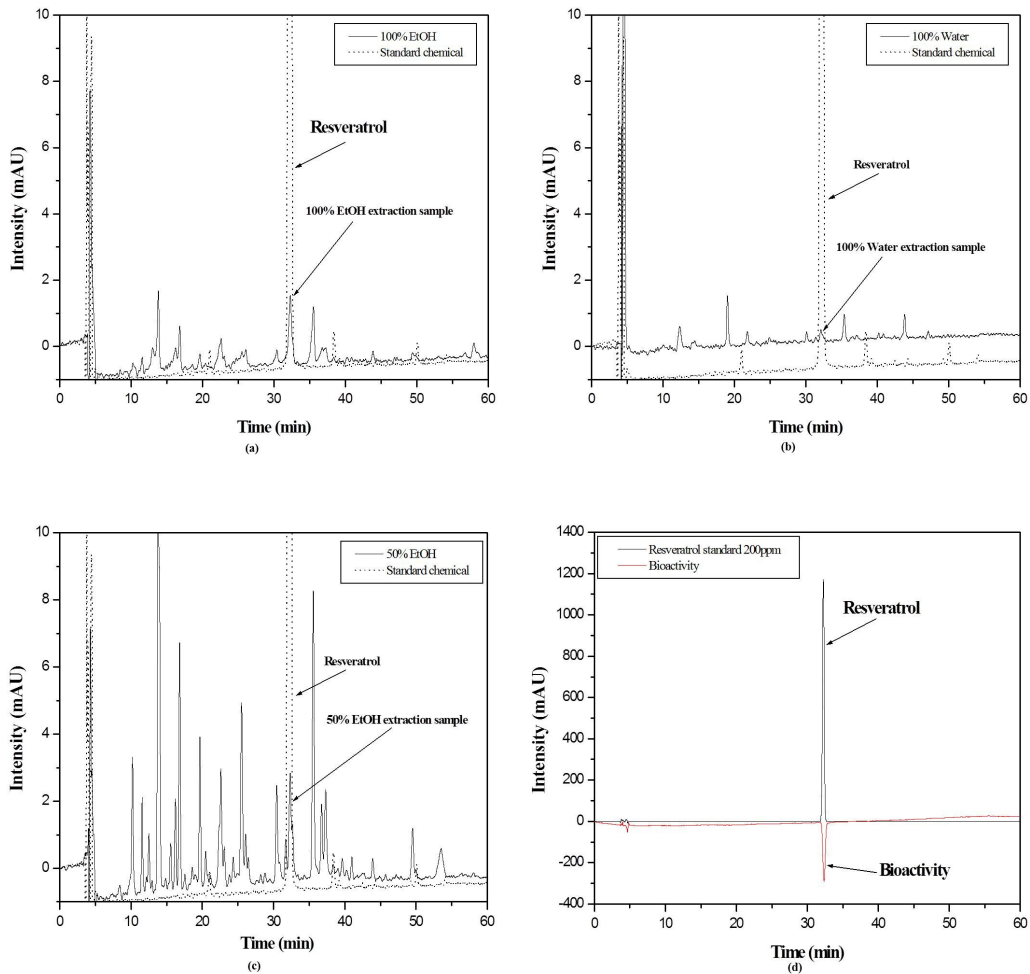
[Table 3] Identification and amount of resveratrol in peanut sprouts using on-line screening HPLC-ABTS

Extraction Solvent(%)	Total extraction yield(%)	Peak Area (mAU)	S.D(\pm)	R.S.D(%)	Amount(μ g/mL)
50% EtOH(1)	8.715	0.585	0.0089	0.171	0.339
50% EtOH(2)	8.865	0.597			0.346
100% H ₂ O(1)	2.040	0.053	0.0008	0.016	0.031
100% H ₂ O(2)	2.145	0.054			0.031
100% EtOH(1)	9.605	0.535	0.0157	0.158	0.310
100% EtOH(2)	9.040	0.557			0.323

Data expressed mean S.D($n=2$)

On-line HPLC-ABTS 분석. 땅콩새싹에서 resveratrol의 추출효율 비교는 역상 액체 크로마토그래피를 이용한 지표 성분에 대하여 정성 및 정량 분석을 수행하였고 추출물의 생물활성을 빠르게 탐색 할 수 있는 on-line screening HPLC-ABTS assay 기법을 적용한 크로마토그램 분석 결과를 보여주고 있다[Fig. 5].

지표 성분 resveratrol에 대하여 체류시간(*t_R*)과 UV흡광도(nm)를 비교한 패턴은 반복 밸리 데이션 분석을 통해 일치함을 확인 하였다. 그 결과, resveratrol은 정성 및 정량분석을 위한 최적의 추출법이 확립되었고 크로마토그램의 피크가 서로 영향을 받지 않는 효율적인 분석이 가능하였다. 이때 체류시간은 50% 수용성 에탄올 추출물에서는 32.338min, 100% 물 추출물에서는 32.233min, 100% 에탄올 추출물에서는 32.288 min에서 검출되었다. 특히 선행연구를[9], 기초로 한 on-line screening HPLC-ABTS assay의 빠른 생물활성 능력을 표준물질 resveratrol(순도: 98% > 200ppm)을 사용해 확인 할 수 있었다[Fig. 5 (d)]. 이때 positive 피크의 감도는 좋은 intensity와 분리능이 우수한 형태를 보였고 빠른 시료의 용출로 인해 분리도가 1.5 이하로 낮았으며 negative 피크 면적도 완만히 비례하게 분석되었다[11,12]. 하지만, 실제 추출물의 resveratrol 함량은 매우 작았고 radical 반응이 매우 미미하게 반응되어 추출물에서의 negative 활성 능력을 명확히 확인 할 수 없었다. 따라서 전 처리한 추출액에 포함된 땅콩새싹으로부터 on-line screening HPLC-ABTS-assay 기법을 이용한 생물활성을 빠르게 탐색 할 수 있었고 최적의 추출조건을 실험적으로 모색 할 수 있었다. 또한 땅콩 새싹으로부터 추출된 resveratrol의 활성 물질에 대하여 더욱 깊이 있는 연구가 필요하리라 사료된다.



[Fig. 5] Analysis of resveratrol from peanut sprouts using on-line screening HPLC-ABTS((a) injection volume: 10 μ L, UV wavelength 320nm, negative wavelength: 734nm, mobile phase(A: 0.1% TFA in water 90-60%, B: acetonitrile 10-40%, run time 60min, flow rate: 1mL/min, negative ABTS flow rate: 0.5 mL/min)

4. 결론

발아 땅콩새싹으로부터 on-line screening HPLC-ABTS assay 기법을 사용한 resveratrol의 생물활성을 신속하게 분석하였고, 전 처리한 땅콩새싹의 추출액에 포함된 resveratrol의 최적 추출조건을 실험적으로 모색 하였다. 이러한 생리활성물질인 resveratrol을 효율적으로 얻기 위한 방법은 기능성소재 개발의 산업적 측면에서 매우 중요하다. 이러한 연구는, on-line 분석방법을 적용한 물질 screening 특성 연구는 거의 전무하며 매우 미흡한 실정이다.

이 결과, 침적방법을 적용한 추출효율 비교와 C₁₈ column 을 통하여 최적의 분리·분석조건을 확인하였다. 이때 50% 수용성에탄올의 추출물 에서 resveratrol의 함량은 0.339- 0.346 μ g/mL으로 함유 되었고, 100% 물 추출물의 수율은 2.040- 2.145%로 가장 낮았다. 위에서 얻은 기초 자료 는 상용공정의 활용 가능성을 실험적으로 모색 하였고 충분한 가치가 있다고 판단되며 기능성 소재 개발 시 매우 유용한 기초자료로 사용될 수 있을 것이다.

References

- [1] H. I. Kang, J. Y. Kim, K. W. Park, J. S. Kang, M. R. Choi, K. D. Moon, and K. I. Seo, "Resveratrol Content and Nutritional Components in Peanut Sprouts", *Korean J. Food Preserv.* Vol. 17, No. 3, pp. 384-390, 2010.
- [2] K. J. Lee, J. Y. Ma, Y. S. Kim, D. S. Kim, and Y. Jin, "High Purity Extraction and Simultaneous High-performance Liquid Chromatography Analysis of Curcuminoids in Turmeric", *J App Bio Chem.* Vol. 55, No. 1, pp. 61-65, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2011.060>
- [3] S. B. Pae, T. J. Ha, M. H. Lee, C. D. Hawang, K. B. Shim, C. H. Park, K. Y. Park, and I. Y. Baek, "Evaluation of Characteristics of Peanut Sprout Using Korean Cultivars", *Korean J. Crop Sci.* Vol. 56, No. 4, pp. 394-399, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7740/kjcs.2011.56.4.394>
- [4] H. I. Kang, J. Y. Kim, S. J. Kwon, K. W. Park, J. S. Kang, and K. I. Seo, "Antioxidative Effects of Peanut Sprout Extracts", *J Korean Soc Food Sci Nutr.* Vol. 39, No. 7, pp. 941-946, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.7.941>
- [5] H. J. Kim, J. S. Kang, H. R. Park, and Y. I. Hwang, "Neuroprotective Effects of Methanolic Extracts from Peanut Sprouts", *Journal of Life Science.* Vol. 20, No. 2, pp. 253-259, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2010.20.2.253>
- [6] M. J. Lee, Y. K. Cheong, H. S. Kim, K. H. Park, H. S. Doo, and D. Y. Suh, "trans-Resveratrol Content of Varieties and Growth Period in Peanut", *Korean J. Crop Sci.* Vol. 48, No. 6, pp. 429-433, 2003.
- [7] H. W. Kim, S. M. Chu, and D. J. Lee, "Determination of Resveratrol Content in Grapes and Wines", *Korean J. Crop Sci.* Vol. 51, No. 5, pp. 259-263, 2006.
- [8] H. B. Kim, J. B. Kim, S. L. Kim, S. H. Koh, Y. S. Seok, Y. S. Kim, G. B. Sung, and P. D. Kang, "Quantitative Analysis of Resveratrol in Mulberry Leaves", *Korean J. Crop Sci.* Vol. 56, No. 1, pp. 23-28, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7740/kjcs.2011.56.1.023>
- [9] K. J. Lee, C. Liang, H. J. Yang, and J. Y. Ma, "Rapid Identification of Homoorientin from *Phyllostachys bambusoides* Leaves by HPLC On-line ABTS+ Screening Method", *Yakhak Hoeji.* Vol. 56, No. 4, pp. 217-221, 2012.
- [10] K. J. Lee, J. Y. Ma, Y. J. Kim, and Y. S. Kim, "Solid Phase Extraction(SPE) of Curcuminoids from Turmeric by Optimization Analysis Condition", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society.* Vol. 13, No. 10, pp. 4927-4935, 2012.
- [11] V. S. Sobolev, and R. J. Cole, "trans-Resveratrol Content in Commercial Peanuts and Peanut Products", *Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 47, No. 4, pp. 1435-1439, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf9809885>
- [12] M. Wang, Y. Jin, and C. T. Ho, "Evaluation of Resveratrol Derivatives as Potential Antioxidants and Identification of a Reaction Product of Resveratrol and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical", *Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 47, No. 10, pp. 3974-3977, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf990382w>
- [13] Y. K. Lee, S. I. Ahn, and H. S. Kwak, "Optimizing microencapsulation of peanut sprout extract by response surface methodology", *Food Hydrocolloids.* Vol. 30, No. non, pp. 307-314, 2013.

김 영 식(Young Sik Kim)

[정회원]



- 1979년 2월 : 충북대학교 대학원 화학공학과 (공학석사)
- 1989년 2월 : 충북대학교 대학원 화학공학과 (공학박사)
- 1996년 8월 ~ 1997년 8월 : 영국 Strathclyde Univ. 방문교수
- 2010년 2월 ~ 2011년 2월 : 미국 Eastern Michigan Univ. 방문교수
- 2011년 11월 ~ 현재 : 한국가스안전공사 비상임이사
- 1982년 2월 ~ 현재 : 강원대학교 화학공학과 교수

<관심분야>

레올로지, 분리정제, 정밀화학