

상수리 성분의 항산화 효과에 관한 연구

-제 I 보 상수리 타닌 성분의 분리 및 동정-

신두호 · 조정순* · 정승태*

중경공업전문대학 식품공학과

* 명지대학교 식품영양학과

Study on Antioxidant Effects of Acorn(*Quercus acutissima* CARRUTHERS) Components

- I. The Separation and Identification of Tannin Components from Acorn -

Shin, Doo-Ho · Cho, Jung-Soon* · Jung, Seung-Tai*

Dept. of Food Technology, Joong Kyoung Technical Junior College

* Dept. of Food and Nutrition, Myong Ji University

(Received May, 20, 1993)

ABSTRACT

This study aimed to search for separate and identify of *Quercus acutissima* CARRUTHERS tannins. Tannins were extracted with methanol and ethylacetate from acorn powder and identified TLC, UV spectrum, HPLC, IR, GC/MS, and ¹H NMR. Three spots(R_f 0.94, 0.84 and 0.29) detected on TLC. These spots gave dark blue color fairly on spraying with 0.3% potassium ferricyanid-0.3% ferricchloride reagent, and these tannins identified as gallic acid, caffeic acid and ellagic acid by UV spectrum, HPLC, IR, GC/MS, and ¹H NMR.

I. 서 론

상수리(橡實)는 너도밤나무과에 속하는 참나무(*Quercus acutissima* CARRUTHERS)의 열매로 전국 야산에 널리 분포되어 있으며 지리적으로는 일본, 만주, 인도에 분포하고 있다.¹⁾ 상수리는 다른 종실과는 달리 떫은 맛을 내는 타닌을 6~9%^{3~5)} 함유하고 있는 것이 특징이다. 타닌은 종류도 많고 화학구조도 대단히 복잡하며 일정한 구조를 가지고 있지 않아 완전한 분류 방법은 없는 듯하다. 그러나 화학적으로는 모두 polyphenol 화합물이며 일반적으로는 가수분해형 타닌과 축합형 타닌으로 대별된다.⁶⁾ 가수분해형

타닌은 산, 알칼리, 또는 tannase에 의해 알콜과 phenolcarbonyl산으로 분해되는 타닌군으로서 가수분해에 의하여 gallic acid만을 생성하는 것을 gallo-tannin, ellagic acid만을 생성하는 것을 ellagitannin이라고 한다. gallotannin은 五倍子, 沒食子에 함유되어 있고 ellagitannin은 divi-divi, 밤, 떡갈나무잎 등에 함유되어 있다. 축합형의 타닌은 보통 flavan-3-ol(catechin)을 구성단위로 해서 각종 결합 양식에 의해 dimer, trimer, oligomer, polymer를 형성한다. 이것은 산처리에 의해 anthocyanidin류를 생성하는 것으로서 proanthocyanidin이라 한다. monomer에는 catechin, gallocatechin, epicatechin, dimer에는 procyanidin A-2, trimer에는 procyanidin C-1

등이 있다. 이들 타닌들은 항산화작용, 항종양작용, 항비루스작용, 항알레르기작용, BUN(혈중요소질소)저하작용 등의 생리활성이 알려져 있다.⁶⁾ 도토리 에 관한 연구는 도토리 전분의 이화학적 특성과 물리적 특성에 관한 연구⁷⁻¹³⁾는 많이 있으나 타닌성분의 조성에 관한 연구는 별로 없을 뿐만 아니라 미흡한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 생물활성을 갖고 있는 것으로 알려진 타닌을 상수리로 부터 분리동정하

고 항산화력을 측정하여 몇가지 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1990년 9월 충남 논산군에서 채취한 것을 95~98℃의 water bath에서 5분 동안 가열한 후 냉각하

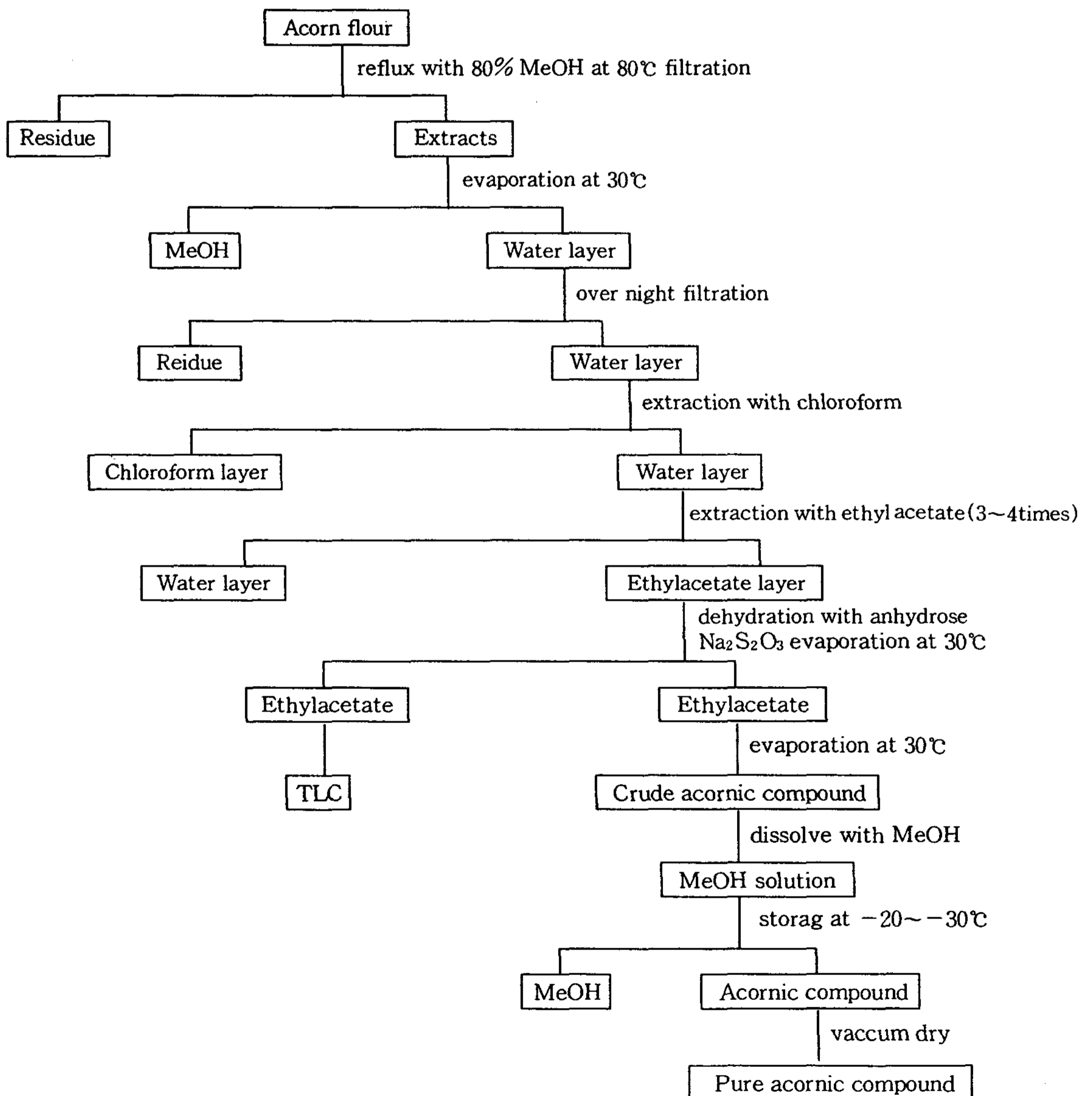


Fig. 1. Flow diagram for the extraction and purification of acornic compound in acorn flour.

여 탈피하고 냉동건조하여 80mesh로 분쇄하였다.

2. 실험방법

1) 탄닌성분의 추출

Nose¹⁴⁾와 Nakabayashi¹⁵⁾의 방법을 병용하여 Fig. 1과 같이 행하였다. 즉 시료 200g에 3배량의 80% methanol을 가하여 80℃에서 1시간 추출(3번 반복)하고 전추출액을 합하여 30℃에서 진공농축한 후 불용성 물질을 제거하고 동량의 chloroform을 혼합진탕하여 chloroform가용성 물질을 제거하였다. 여기에 아세트산에틸을 가하고 1시간 진탕 추출하여 탄닌성분을 아세트산에틸층에 이행시킨 다음 아세트산에틸층만을 모아서 30℃로 농축하였다. 농축액의 반은 분리용으로 하고 나머지는 더욱 농축하여 미황색의 조타닌을 얻었다.

2) 탄닌성분의 분리

① SEP-PAK(waters Associates Inc.)에 의한 분획

농축액 1m를 SEP-PAK에 흡착시키고 n-hexan, chloroform, chloroform과 아세트산에틸 혼합액 ① 8:1 ② 4:1 ③ 2:1 ④ 1:1 ⑤ 1:2, 아세트산에틸 각 30mL로 순차 용출, 분취후 30℃에서 감압 농축하여 1mL로 하였다.

② TLC에 의한 분리

SEP-PAK으로 분획한 c, d, e 획분을 농축한 후 kieselgel 60F₂₅₄ TLC plate(20×20cm, Merk Inc.)에 점적하고 ethylacetate:chloroform:formic acid:H₂O(8:1:1:1)로 전개시킨 후 UV lamp로 조사하여 발광 spot를 각각 분취하고 methanol로 추출하여 감압농축 하였다.

3) 탄닌성분의 동정

① TLC에 의한 확인

TLC에 의해 분취한 탄닌성분과 표준물질을 kieselgel 60plate(20×20cm, 0.2mm, Merk Inc.)에 점적하고 ethylacetate:chloroform:formic acid:H₂O(8:1:1:1)로 전개시켜 발색제로 발색시킨 후 표준물질의 R_f치와 비교하여 동정하였다. 발색제는 0.3% potassiumferricyanide와 0.3% ferric chloride용액을 동량 혼합한 것(polyphenol류에서는 청색으로 발색) 그리고 바니린 염산용액(1% Vanilin ethanol용액 5mL와 농염산 3mL를 사용 직전에 혼합,

catechin류에서는 홍색으로 발색)을 사용하였다.^{14, 16)}

② HPLC에 의한 확인

TLC에 의하여 분리 분취한 methanol 추출물을 HPLC로 분석하여 탄닌 표준품과 비교 동정하였다. 이때 HPLC의 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for analysis of tannin

Instrument : Shimadzu liquid chromatography (Model : 6AD)
Column : CAPCELL PAK-C ₁₈ (4.6mm I. D.×2.5 cm, 5μm, SUS)
Mobil phase : 0.5% H ₃ PO ₄ : methanol(95 : 5) This is gradient program increase from 0.5% H ₃ PO ₄ of 95 volume to methanol of 100 volume after 22 minutes.
Column oven : 40℃ DEG
Flow rate : 1.5mL/min
Detector : UV 280nm
Sensitivity : 0.08 AUFS
Injection volume : 10μL

③ UV spectrum에 의한 확인

분리된 성분을 UV-160(Shimadzu, Japan)으로 spectrum을 조사하였다.

④ IR, GC/MS에 의한 확인

분리된 성분을 KBr pellet을 만들어 IR-435(Shimadzu, Inc.)로 측정하였고, MS분석은 분리된 성분을 GC-MS-QP1000(Shimadzu Inc.)을 사용하여 electron ionization방법으로 분석하였다.

⑤ ¹H NMR에 의한 확인

분리된 성분을 DMSO 용매에 용해하여 Varian Gemini 200 ¹H NMR spectrometer로 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 항산화 성분의 분리 및 확인

1) SEP-PAK에 의한 분획

Fig. 1에서 얻어진 아세트산에틸층 1mL를 SEP-PAK에 흡착시킨 후 용출시켜 얻어진 각 용출 분획

Table 2 Hydrogen donating activity of fractions isolated by SEP-PAK Silica Cartridge column

Fraction No	Procedure	Reaction time(sec.)		
		60	300	600
a	eluate with n-hexane	0	0	0
b	eluate with chloroform	0	0	0
c	eluate with CHCl ₃ : ethylacetate(8 : 1)	36.08	17.79	12.04
d	eluate with CHCl ₃ : ethylacetate(4 : 1)	31.85	10.70	6.47
e	eluate with CHCl ₃ : ethylacetate(2 : 1)	82.43	38.37	25.96
f	eluate with CHCl ₃ : ethylacetate(1 : 1)	224.56	107.52	79.71
g	eluate with CHCl ₃ : ethylacetate(1 : 2)	207.80	115.09	84.57
h	eluate with ethylacetate	82.42	36.68	23.22
blank		0.98	0.40	0.26

을 농축해서 DPPH용액에 대한 수소 공여능을 측정
한 결과는 Table 2와 같다. c, d, e, f, g, h분획에서
DPPH용액에 대한 환원성을 나타냈으며 이중 f분획
이 가장 강한 활성을 나타내어 강한 항산화 물질을
함유하고 있음을 알 수 있었다. 이¹⁷⁾와 최¹⁸⁾는 항산화
능과 DPPH용액에 대한 환원성은 비례한다고 보고
하였다.

2) TLC에 의한 분리 및 확인

각 유출액의 분획을 농축하여 Kieselgel 60plate에
점적하여 전개시킨 후 발색시킨 결과는 Fig. 2와 같
다. c분획에서 R_f 0.90(spot A), 0.84(spot B), d와
e분획에서 R_f 0.84, f, g 분획에서 R_f 0.29(spot C)
의 spot가 발색되었다. 따라서 이들 spot가 어떤 종
류의 탄닌인지를 확인하기 위하여 Kieselgel 60F₂₅₄
plate에 점적하여 전개시킨 후 UV lamp를 조사하여
발광하는 R_f 0.90, 0.84, 0.29의 spot를 분취하였다.
이를 methanol로 추출한 후 소량으로 농축하였으며
이 중 caffeic acid와 gallic acid로 추측되는 R_f 0.90
과 0.84의 것을 kieselgel 60plate에 점적하여 전개하
고 발색시켜서 표준물질과 비교하였다. Fig. 3에서
보는 것처럼 R_f 0.90(A)의 것은 표준물질 caffeic
acid(Ⅱ)와 R_f치가 같아서 caffeic acid임이 확인되
었으며 R_f 0.84(B)는 gallic acid(Ⅰ), catechin
(Ⅲ), epicatechin(Ⅴ)과 R_f가 같았다. 따라서 이들
을 구분하기 위하여 1% Vanilin 염산용액으로 발색
시킨 결과 catechin과 epicatechin은 홍적색으로 그
리고 gallic acid는 착색되지 않았다. 그러나 0.3%

Potassium-ferricyanide-ferric chloride용액에서는
모두 청색으로 착색되어 gallic acid임이 확인되었다.

3) UV spectrum에 의한 확인

분취한 spot(A)와 spot(B)에 대하여 UV spec-
trum을 조사한 결과는 Fig. 4, 5와 같다. 그림에서
보는 바와 같이 spot(A)는 표준물질 caffeic acid와
거의 비슷한 흡수 곡선을 나타내어 caffeic acid임이

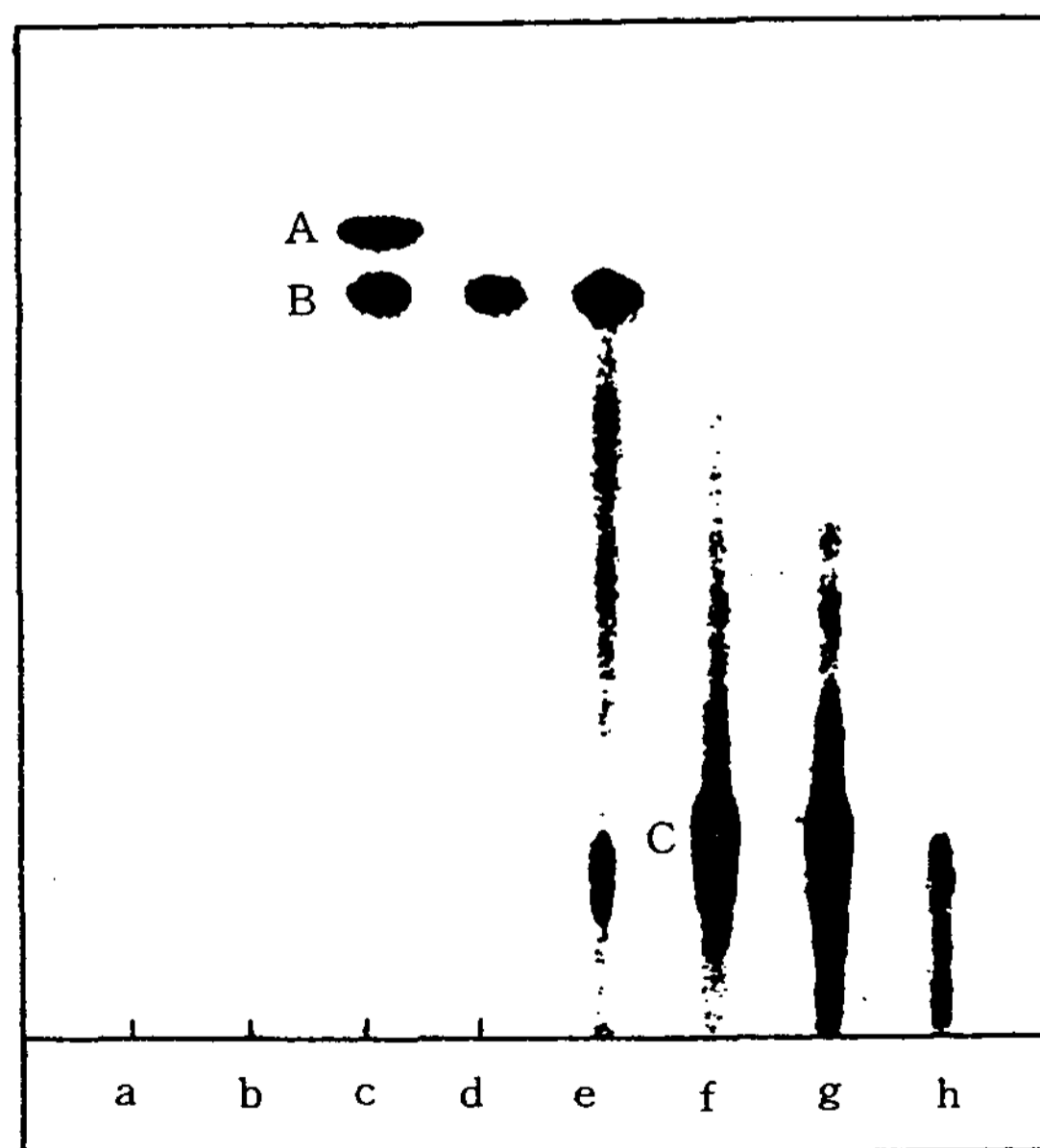


Fig. 2. Thin layer chromatogram of patterns each
fraction of acorn extracts isolated by SEP-
PAK silica cartridge.

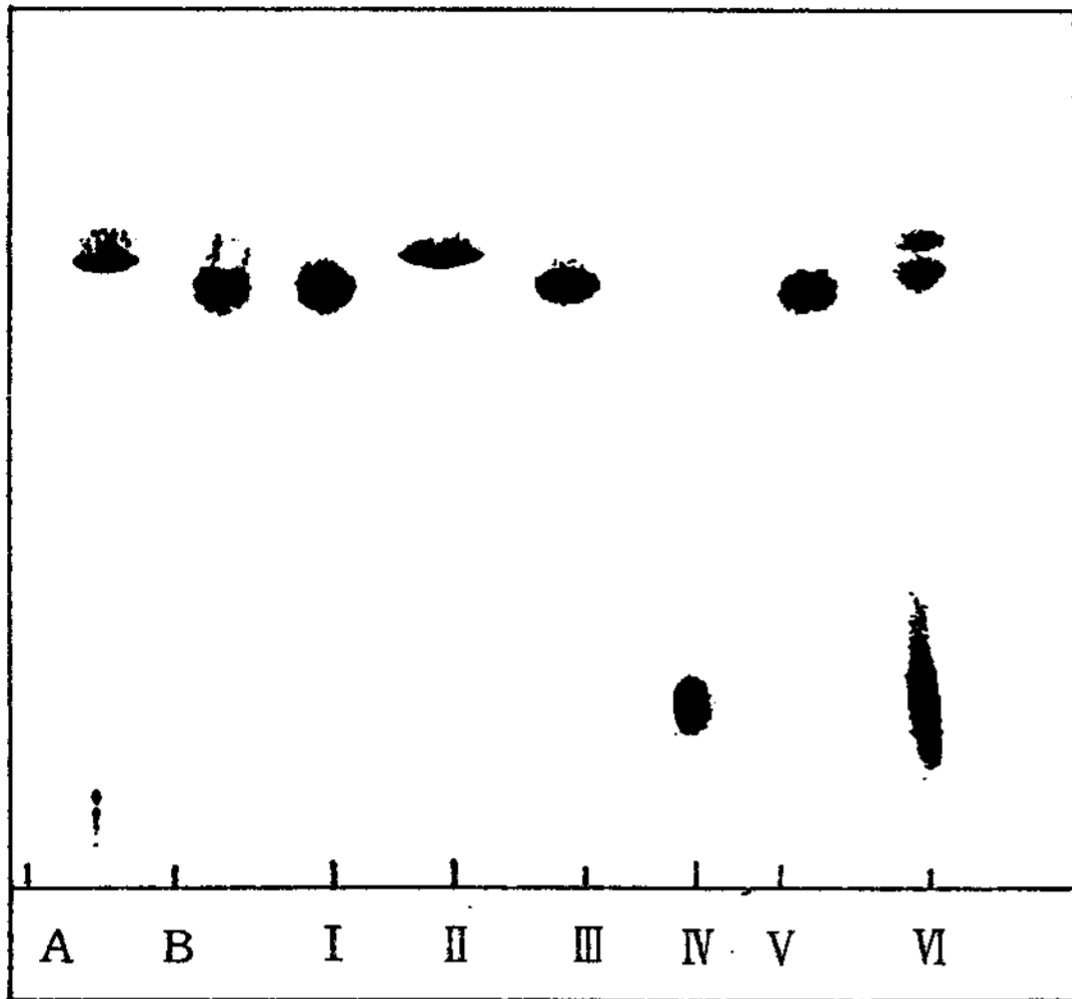


Fig. 3. Thin layer chromatogram patterns of spot A, spot B and standard tannins.

A : spot A (R_f 0.90) B : spot B (R_f 0.84)
 I : gallic acid II : caffeic acid
 III : catechin IV : chlorogenic acid
 V : epicatechin VI : tannic acid

확인되었으며 역시 spot(B)도 표준물질의 gallic acid와 같은 흡수 곡선을 나타내어 gallic acid임이 확인 되었다.

4) HPLC에 의한 확인

TLC에 의하여 얻어진 R_f 0.90, 0.84, 0.29의 것과 타닌 표준물질에 대하여 HPLC를 행한 결과는 Fig. 6, 7과 같다. 그 결과 R_f 0.90의 것은 R_f 11.87로 caffeic acid임이 확인되었고 R_f 0.84는 R_f 4.968로 gallic acid임이 확인 되었다. R_f 0.29의 것은 HPLC로 분석한 결과 Fig. 8과 같이 여러개의 peak가 나타났다. 따라서 이를 확인하기 위하여 over-lay를 실시한 결과 Fig. 9와 같이 ellagic acid와 일치하여 ellagic acid임이 확인 되었다.

5) IR, GC/MS, 1H NMR에 의한 확인

spot A (R_f 0.90)에 대한 IR, spectra는 $3,500cm^{-1}$ 에서 wide한 aromatic ring의 O-H stretching vibration peak가 나타났으며, $1,600cm^{-1}$ 에서 전형적인 C=O stretching vibration peak가 강하게 나타났다(Fig. 10). 1H NMR spectra는 9.4ppm에서 broad한 aromatic ring의 OH peak를 얻었고, $-CH=CH-$ 의 peak는 7.45ppm과 6.2ppm에서 각각

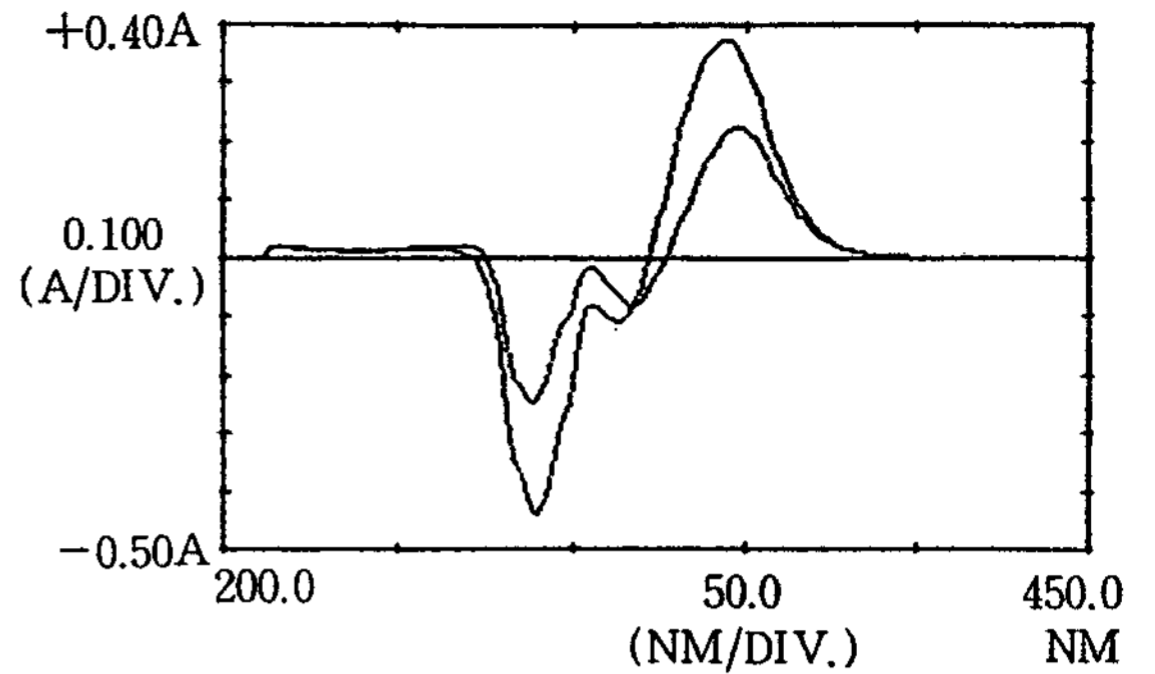


Fig. 4. UV absorption spectra of caffeic acid and spot A.

First curve : standard caffeic acid
 Second curve : spot A (R_f 0.90)

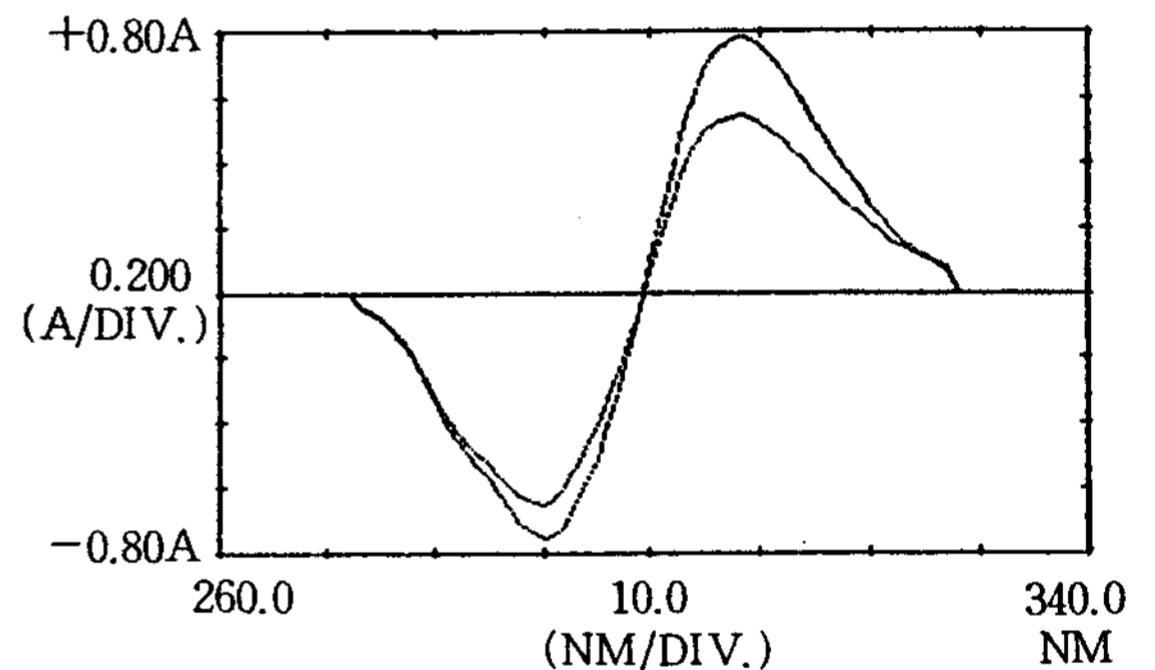


Fig. 5. UV absorption spectra of gallic acid and spot B.

First curve : standard gallic acid
 Second curve : spot B (R_f 0.84)

doublet의 peak를 7.0ppm에서는 aromatic H의 multiple peak를 얻었다(Fig. 11). 또한 Mass spectra(Fig. 12)에 의해 분자량이 180이었으므로 이 물질이 caffeic acid임을 확인할 수 있었다. 그리고 spot B (R_f 0.84)의 물질에 대한 IR spectra는 $3,300cm^{-1}$ 에서 broad한 aromatic OH의 stretching vibration peak를 얻었고, $1,700cm^{-1}$ 에서 C=O의 강한 peak를 얻었다(Fig. 13). 1H NMR spectra는 9.3ppm에서 broad한 3H의 peak가 나타났고, 6.95ppm에서 aromatic OH의 singlet peak가, 3.45ppm에서 1H의 singlet peak가 나타났다(Fig. 14). 또한 Mass spectra(Fig. 15)에 의해 분자량이 170이었으므로 gallic acid임을 확인할 수 있었다. 박¹⁹⁾은 도토

리를 methanol로 추출하여 chloroform:ethylformate:formic acid(50:40:10)으로 전개시켜 TLC를 해 본 결과 R_f 0.39의 gallic acid성분을 HPLC에 의해 확인했다고 보고하였으며 김²⁰⁾은 도토리를 methanol로 추출하여 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}(65:38:10)$ 용액으로 전개시켜 TLC를 행하여 R_f 0.34와 0.18의 spot가 분리되었으며 이 중 R_f 0.34는 gallic

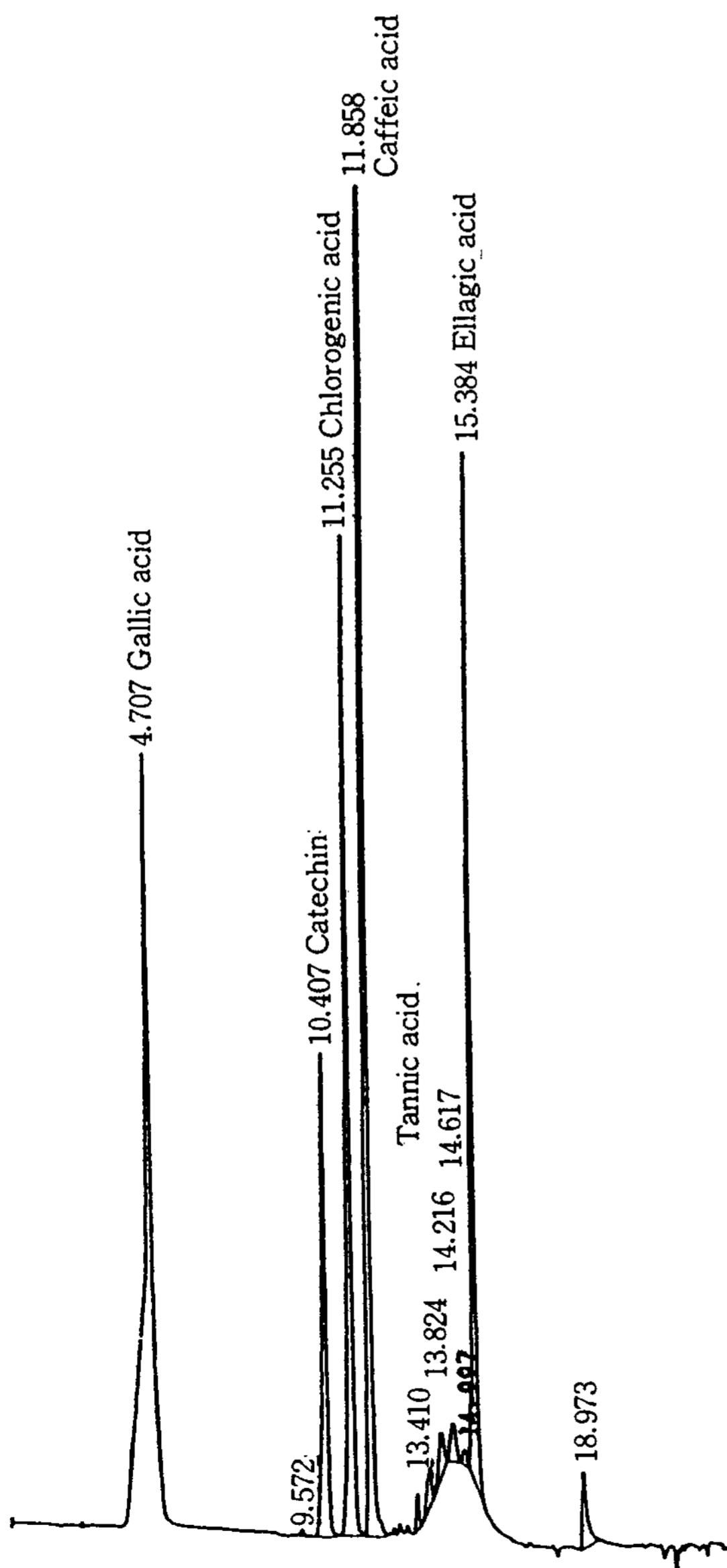


Fig. 6. HPLC chromatograms of standard tannins.

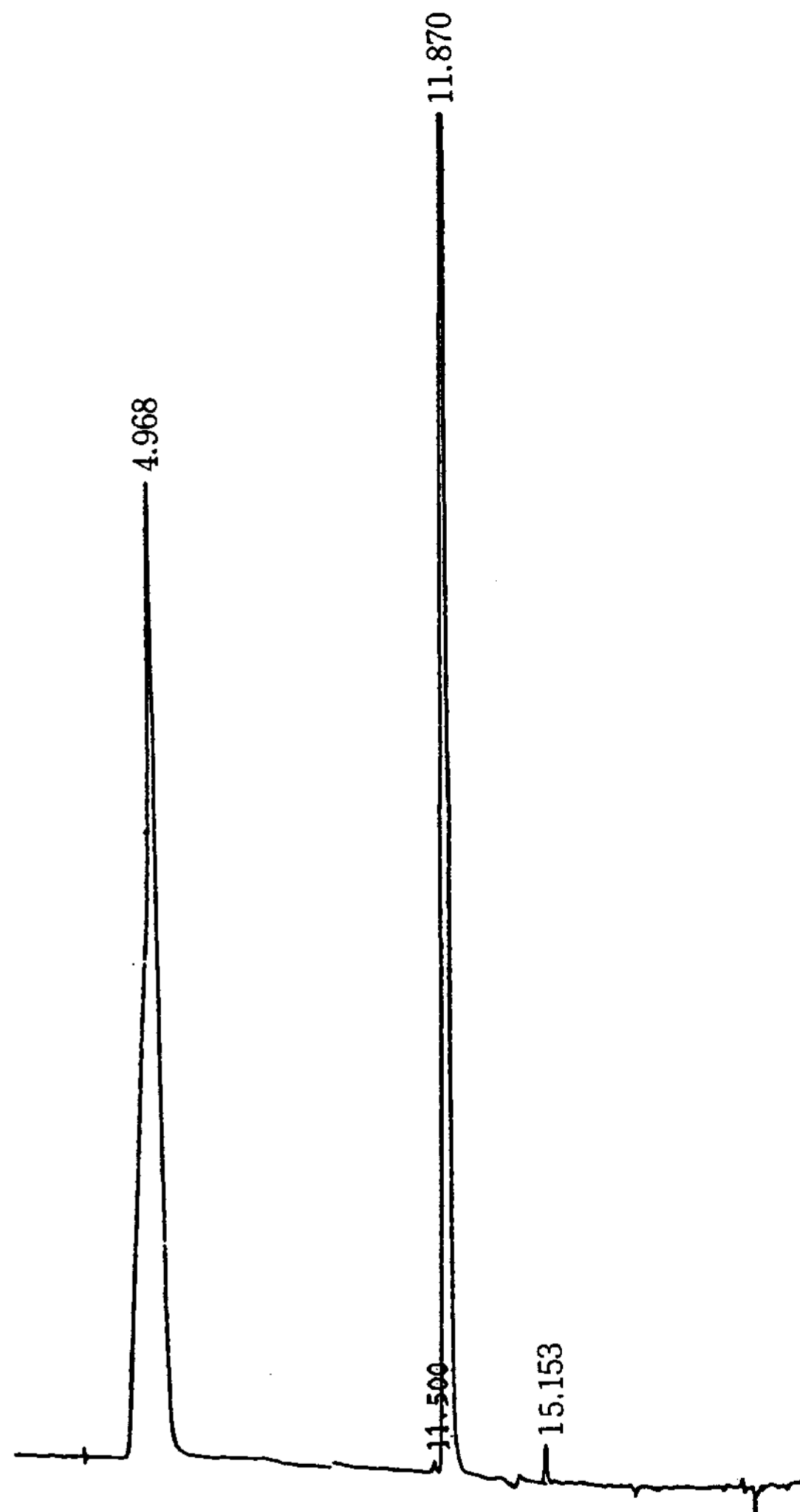


Fig. 7. HPLC chromatograms of spot A(R_f 0.90) and spot B(R_f 0.84).

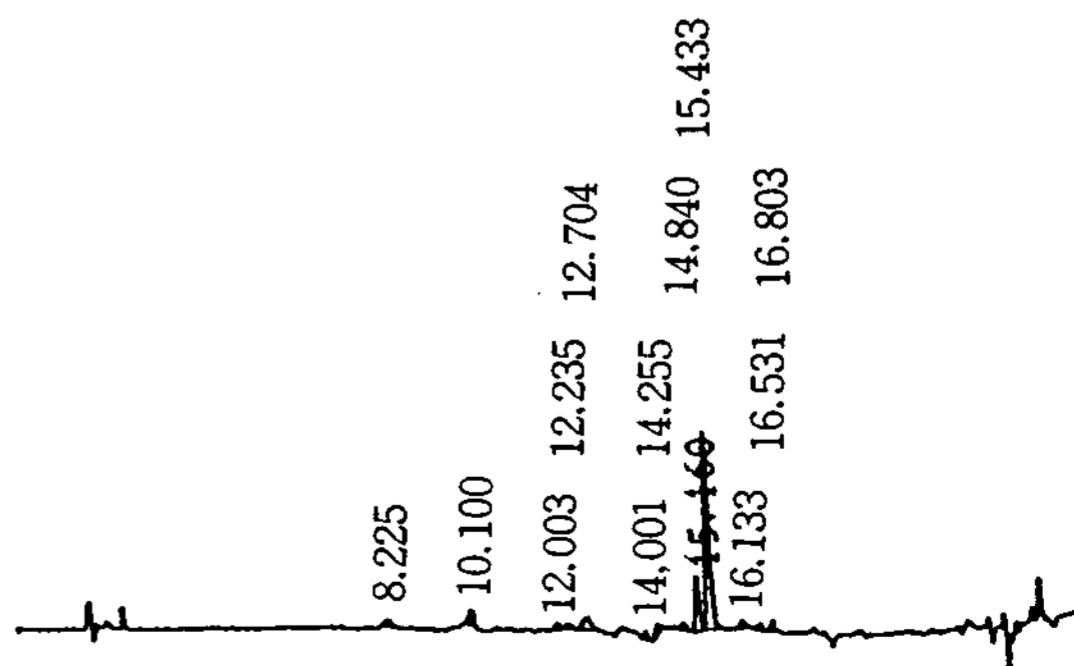


Fig. 8. HPLC chromatograms of spot C(R_f 0.29).

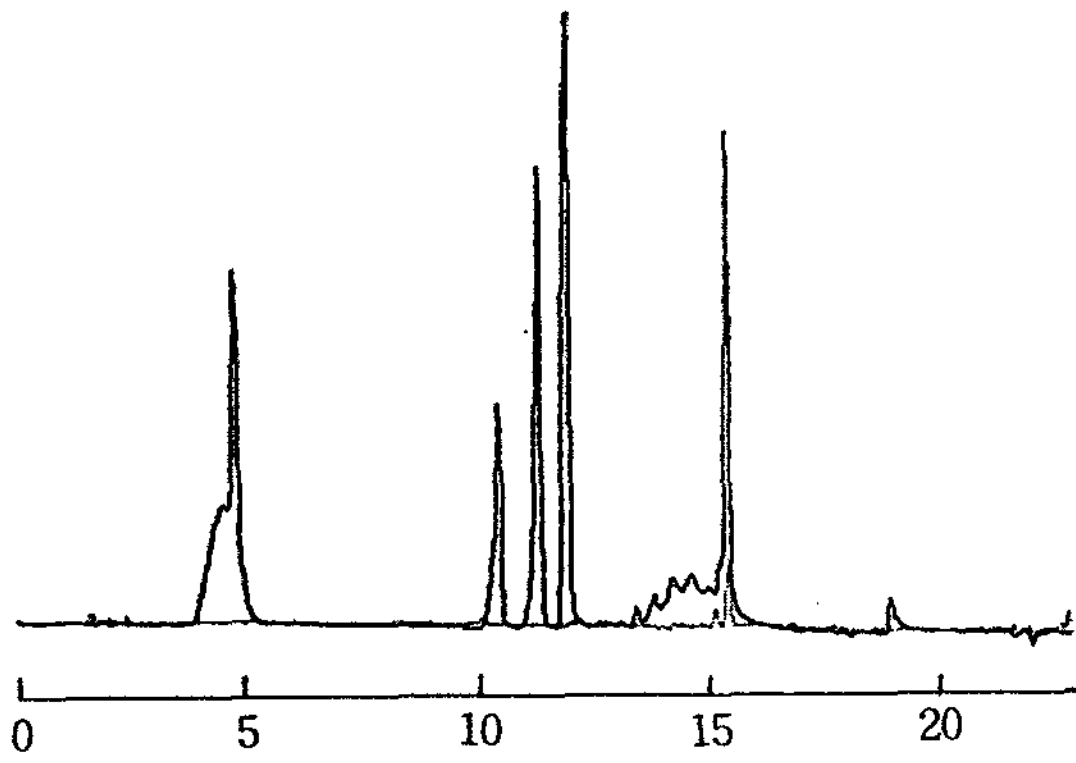


Fig. 9. Over lay of spot C(R_f 0.29) for HPLC chromatograms of standard tannins.

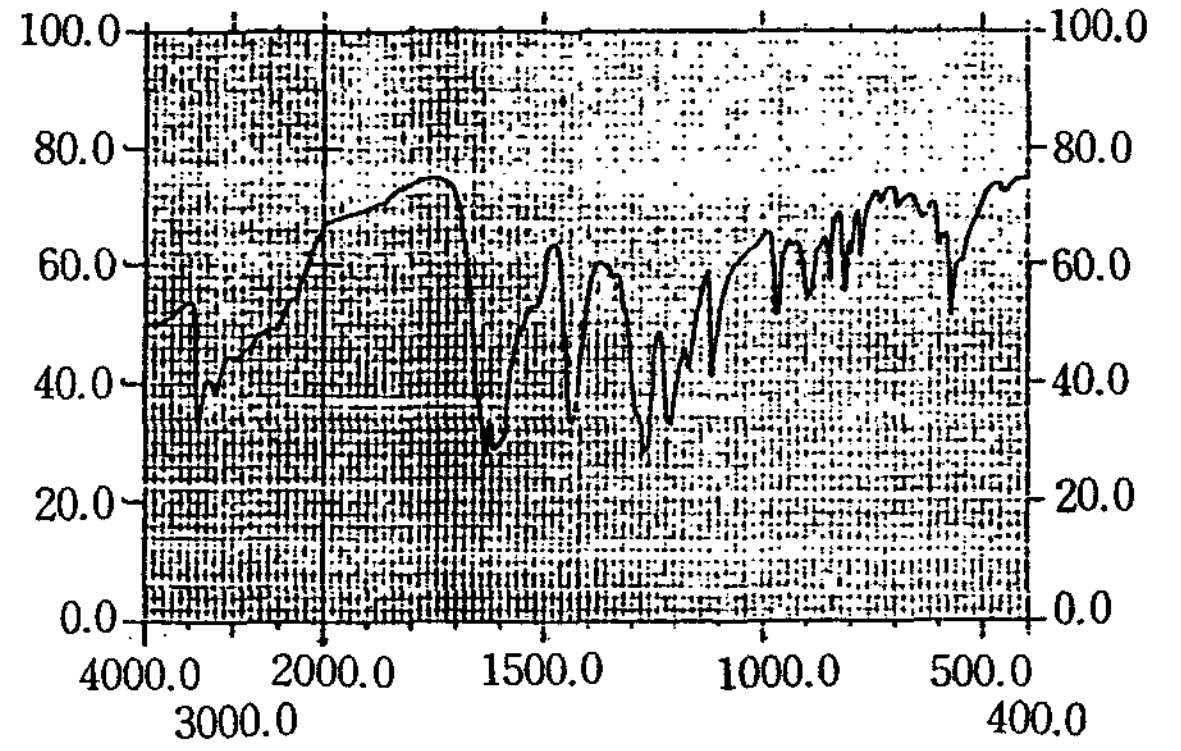


Fig. 10. IR spectrum of spot A(R_f 0.90).

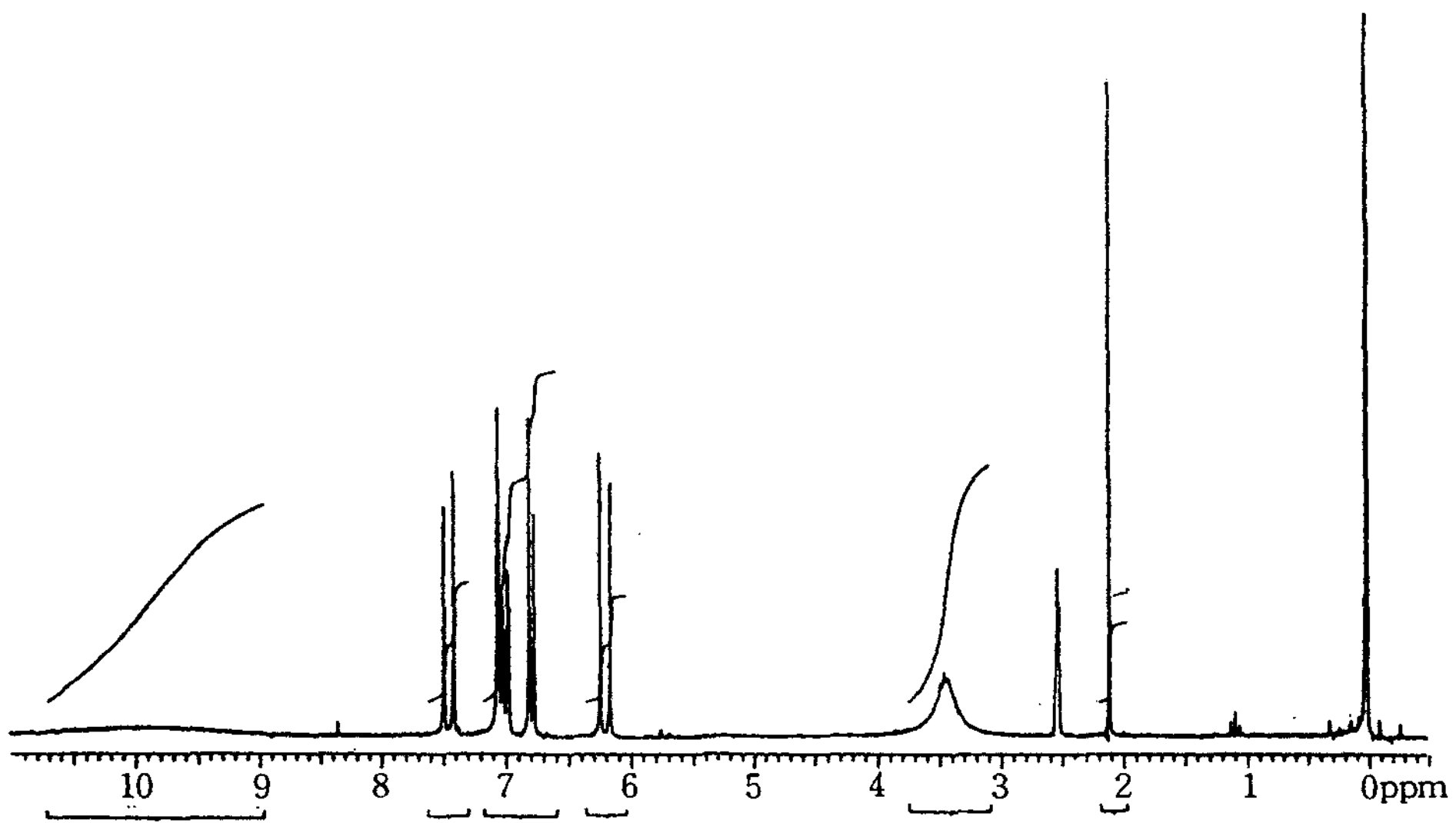


Fig. 11. 1H NMR spectrum of spot A(R_f 0.90).

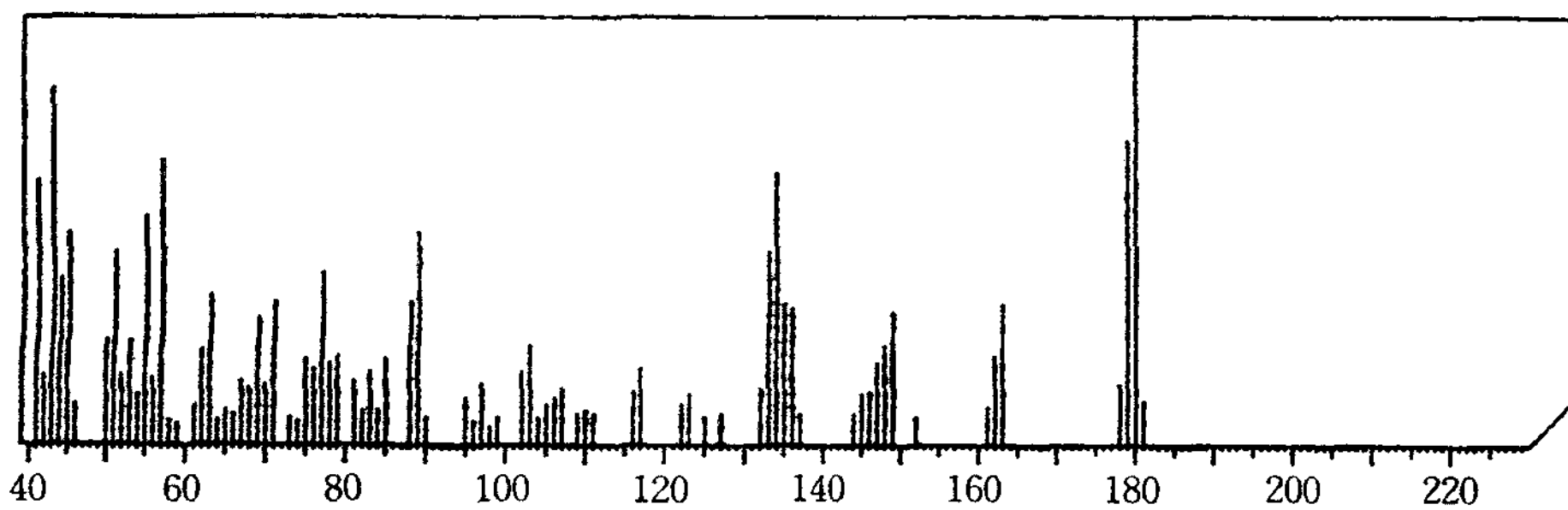


Fig. 12. Mass spectrum of spot A(R_f 0.90).

acid임이 IR와 ¹H NMR에 의하여 확인되었으나 R_f 0.18의 것은 확인하지 못했다고 하였다. 또한 정 등¹⁰⁾은 도토리를 acetone으로 추출하여 paper chromatography를 행하여 catechin, gallic acid, chlorogenic acid, gallocatechin을 검출했다고 보고하였다.

본 실험에서는 상수리 중에 gallic acid caffeic acid 성분을 함유하고 있음이 TLC, HPLC, IR, GC/MS, ¹H NMR에 의해 확인되었으며 R_f 0.29의 것은 순수 분리가 곤란하여 TLC, GC/MS, ¹H NMR에 의한 확인은 하지 못하였으나 HPLC에 의하여 ellagic acid 성분이 함유되어 있음이 확인되었

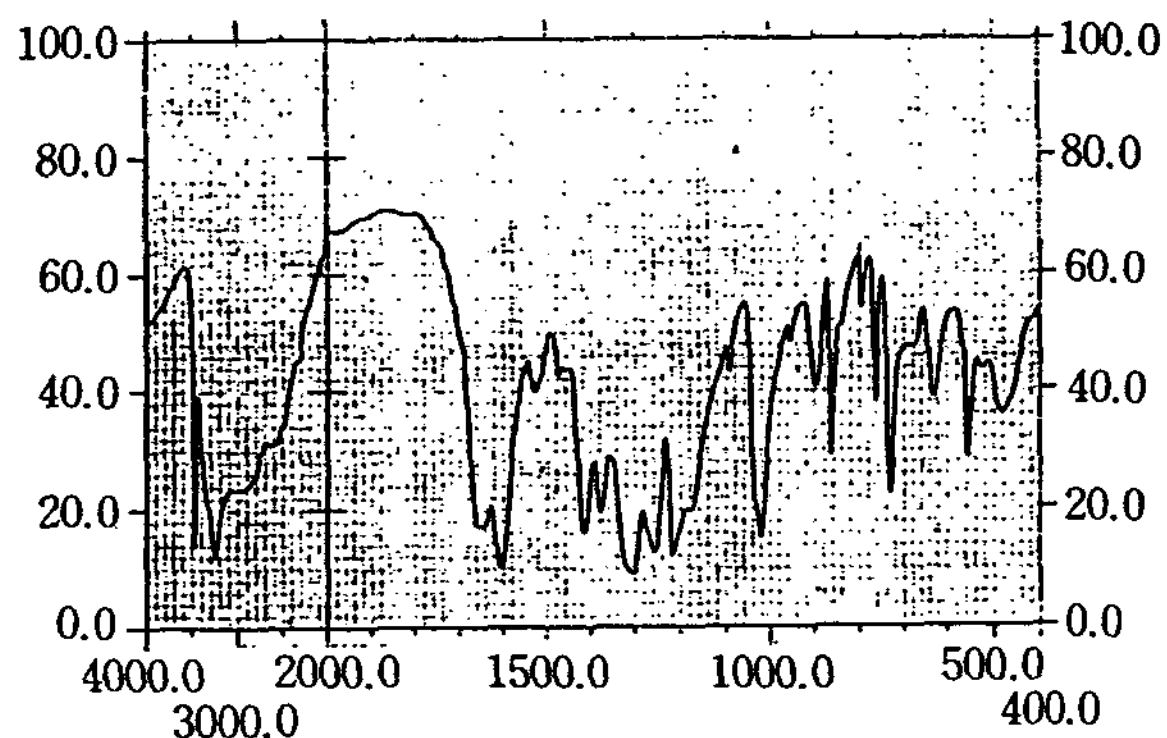


Fig. 13. IR spectrum of spot B(R_f 0.84).

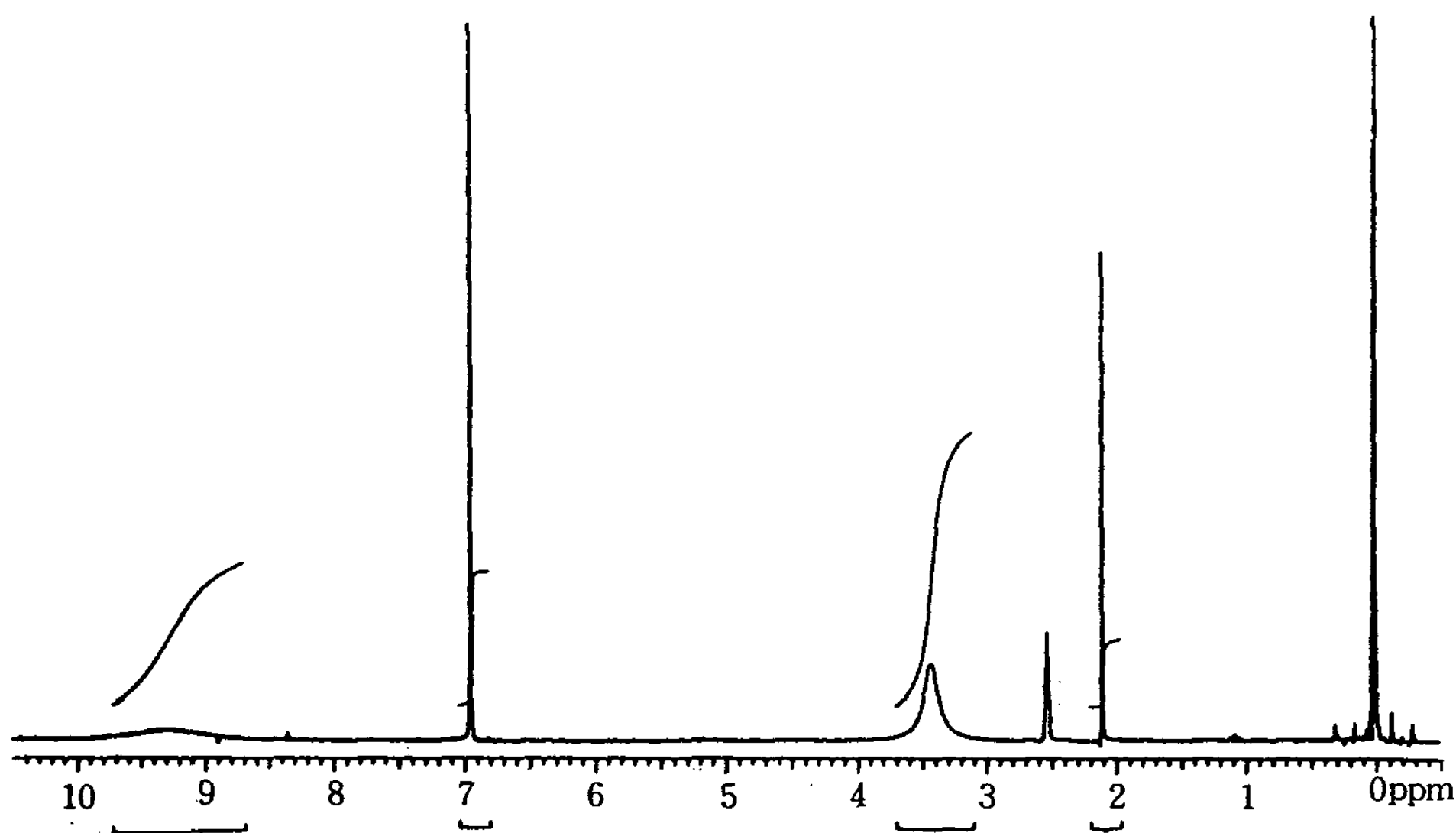


Fig. 14. ¹H NMR spectrum of spot B(R_f 0.84).

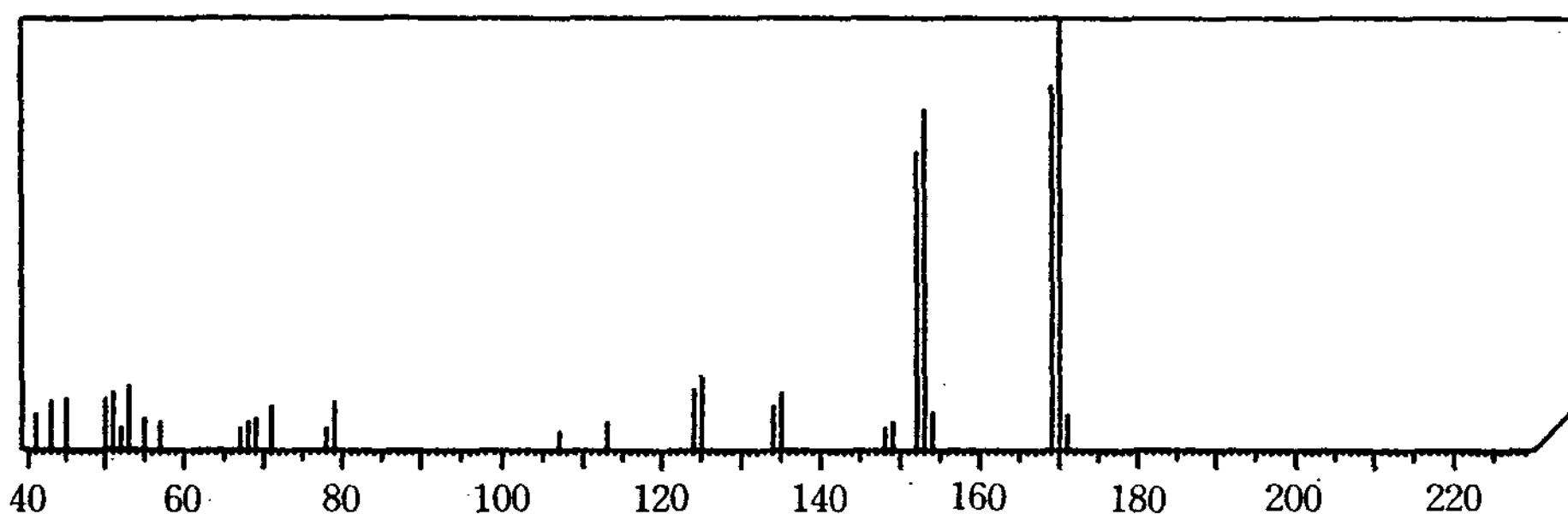


Fig. 15. Mass spectrum of spot B(R_f 0.84).

다. 앞으로 이 부분에 대해서는 더욱 연구를 계속해야 할 것으로 생각된다.

IV. 결 론

상수리로부터 타닌성분을 methanol과 ethylacetate로 추출하여 TLC, UV spectrum, HPLC, IR, GC/MS, ¹H NMR에 의해 타닌성분을 분리 동정한 결과 TLC에 의해 R_f 0.93, 0.84, 0.29의 3개 타닌 성분이 검출되었다. 이들은 0.3% potassiumferricyanid-0.3% ferriechloride 발색제에 의해 청색을 나타냈으며 UV spectrum, HPLC, IR, GC/MS, ¹H NMR에 의해 확인해 본 결과 caffeic acid, gallic acid, ellagic acid임이 확인되었다.

문 헌

1. 정태현, 한국 동식물 도감(제5권 식물편): 삼화출판사, 157(1984)
2. 迂俊三, 任慶彬: 韓國食文化學會, 1(1), 67~85(1986)
3. 蔡洙圭, 劉太鍾: 韓國食品科學會誌, 5(4), 258~267(1973)
4. 金昌湜, 申應泰: 韓國微生物學會誌, 3(1), 17~22(1975)
5. R. P. Ofcarcik and E. E. Burns: Jorunal of Food Science, 36, 576~578(1971)
6. Itsuo Nishioka: Yakugaku Zasshi, 103(2), 125~142(1983)
7. 李相榮, 咸昇市: 江原大學 研究 論文集, 8, 75~79(1974)
8. 咸昇市, 李相榮: 江原大學 研究 論文集, 8, 81~87(1974)
9. 김영아, 이혜수: 한국조리과학회지, 3(1), 14~19(1987)
10. 정동효, 유태중, 최병규: 한국농화학회지, 18(2), 102~108(1975)
11. 김영아, 이혜수: 한국조리과학회지, 53~56(1985)
12. 안호경: 도토리묵 제조시 기계적 물성과 관능 검사값과의 상관관계, 연세대학교 석사학위(1990)
13. 김영아: 한국영양식량학회지, 20(2), 173~178(1991):
14. Masako Nose and Naoko Fujino: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 29(9), 507~512(1982)
15. Toshio Nakabayashi, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi: 15(2), 73~78(1968)
16. 黒木 柁吉, 別所康守: 食總研報, 36, 33~37(1980)
17. 이가순: 葛根 isoflavonoid의 抗酸化能에 관한 연구, 忠南大學校 博士學位(1990)
18. 崔康注: 紅蓼 및 白蓼의 脂肪質 成分의 抗酸化 成分에 관한 研究, 高麗大學校 博士學位(1983)
19. 朴在英: 도토리澱粉의 tannin成分과 物理的 特性에 관한 연구—gallic acid 함량과 粘度特性—, 경희대학교 碩士學位(1983)
20. 金琪憲: 약학연구지, 16(1), 1~3(1982)