

Chebulae Fructus중 페놀 물질 확인시의 Methylation법 비교

김 정 숙

계명전문대학 식품영양과

Methylation Methods on Identification of Phenolics in Chebulae Fructus

Jeong-Sook kim

Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College

Abstract

Food quality in food processing and storage were affected by the kinds of phenolics involved. To analyze phenolics of Chebulae Fructus by the way of GC-MS, methylation and trimethylsilylation(TMS) are necessary. The methods of methylation were dimethyl sulfate method and diazomethane method. So this study was undertaken to research the better methylation method before measuring GC-MS. But dimethyl sulfate method of methylation was not sufficient to analyze phenolics. So the phenolics of Chebulae Fructus were analyzed by the diazomethane methylation method and TMS with the pyridine, N-O-bis-trimethylsilyl-acetamide(BSTFA) and trimethylchlorosilane(TMCS). With the exception of pyrogallol and phloroglucinol in insoluble phenolics of Chebulae Fructus, the greater part of phenolics analysis could be analyzed by GC-MS in company with diazomethane methylation method and TMS.

Key words : Chebulae Fructus, methylation, phenolics.

서 론

식품중에 함유된 페놀물질들의 종류는 매우 다양하며 그 구조도 모두 다르므로 이들 페놀물질들의 종류와 함유량은 그 식품의 저장, 가공성에 있어서 매우 중요한 요인으로 보고되고 있다^{1,2)}. 따라서 각종 생약재^{3,4)}와 과채류⁵⁾에서 페놀물질의 종류와 구조를 밝힌 연구들이 행해지고 있다.

페놀물질은 일반적으로 항산화 효과를 가지는 생리 활성물질로 알려져 있으며⁶⁾ 포도주스나 포도주 제조등의 식품가공에서 페놀물질의 함

량및 종류에 따라 산화 및 변패에 관여하는 정도가 달라지는 특성^{7,8)}을 가지고 있다. 식품에서 페놀물질의 량과 그 종류를 동정하는 것은 매우 중요하다. 일반적으로 페놀물질의 함유량이 많을수록⁹⁾, 그리고 페놀물질의 구성이 산소흡수속도가 빠른 종류의 비율이 높을수록¹⁰⁾ 산화및 변패가 빠른것으로 알려져 있다.

대부분의 연구에서 페놀물질의 동정은 GC-MS를 이용하여 이루어지는데 페놀물질은 그 구조에서 수산기나 카르복실기를 가지고 있어 반드시 methylation 처리 후 TMS화 하여 분석하여야 한다. 본 실험에서는 혈압강하제 및 항

산화제¹¹⁾로 일상에서 널리 사용되고있는 한약재인 가자(Chebulae Fructus)로부터 페놀물질을 추출하여 methylation의 두 방법으로서 일반적으로 널리 사용되며 비교적 안전한 Dimethyl sulfate법과 조작이 까다롭고 폭발의 위험이 있는 Diazomethane법에 의한 GC-MS측정 결과를 비교 분석하고자 하였다.

재료및 방법

1) 시약및 기기

본 실험에 사용한 시약은 dimethyl sulfate, diazald, N-O-bis-trimethylsilyl-acetamide, trimethylchlorosilane(Sigma사제), pyridine(Fluka사제), dimethyl-d₆ sulfoxide와 chloroform-d(Sigma사

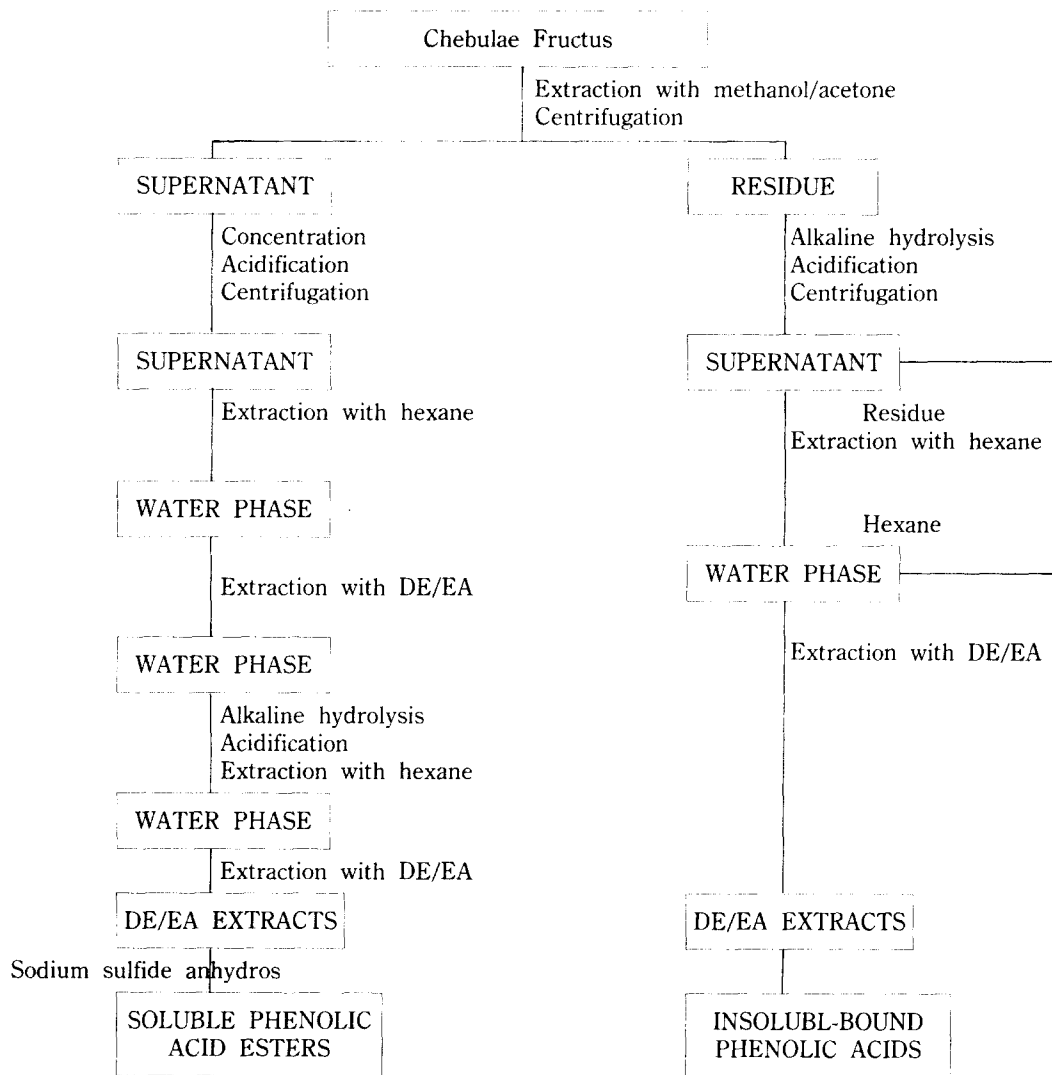


Fig.1. Procedure for the extraction of phenolics.
(DE/EA=diethyl ether-ethyl acetate, 1 : 1)

제)이며 기타 시약 및 용매는 모두 특급품을 사용하였다.

사용된 기기는 GC-MS(Shimadzu GC-MS Qp 1000A, Japan), nuclear magnetic resonance(Bruker FT-300, U.S.A)이었다.

2) 페놀성물질의 추출

페놀성 물질의 추출은 Krygier¹²⁾의 방법에 준하며 Fig.1과 같이 하였다.

3) Dimethyl sulfate법¹³⁾

등근 플라스크에 페놀성 시료 20mg과 dimethyl sulfate 20mg, potassium carbonate 10mg 그리고 소량의 아세톤을 가해 30분간 reflux한 후 적당량의 에테르와 증류수로 추출한 후 에테르층을 진공 농축하여 GC-MS로 분석하였다.

4) Diazomethane법¹⁴⁾

등근 플라스크에 KOH 15g과 에테르 30ml, 에톡시-에톡시 에탄올 50ml와 증류수 25ml를 넣고 폭발을 방지하기 위해 온도가 60°C 이상 올라가지 않도록 주의하면서 에테르 300ml와 diazald 50g의 혼합물을 서서히 적가하며 60분간 diazomethane을 조제하였다. 다음 페놀성 시료 20mg에 diazomethane-에테르 포화액 1ml를 가하여 methylation한 후 GC-MS 분석에 사용하였다.

5) Trimethylsilylation¹⁵⁾

시료 10mg에 피리딘 1ml와 BSTFA 0.9ml와 TMCS 0.1ml를 합한 액을 0.5ml로 진공농축한 후 첨가하여 TMS화 하였다.

6) GC-MS 측정¹⁶⁾

GC-MS측정시 column은 fused silica capillary column(0.2mm×25m)에 충전 물질은 3% SE-30 chromosorb W. 80/100 mesh를 사용하였으며 Splitless mode로 F.I.D detector를 사용하였다. Flow rate는 28ml/min, injection volume은 2ul, carrier

gas는 helium, oven 온도는 180°C에서 1분, 216°C에서 5분, 250°C에서 10분이었으며 온도 상승률은 분당 6°C, 9°C로 하였다. Ion source pressure는 1.8×10^{-5} torr, ionizing voltage는 70eV, injector 온도는 260°C, detector 온도는 270°C였다.

7) Column chromatography에 의한 페놀 물질의 분리 및 NMR측정

가자의 불용성 페놀물질은 column chromatography를 행하였으며 column(2.5×95.0cm)에 silicagel 60을 충전하여 유속 0.8-1.2ml/min.로 용출시켰고 8ml씩 분획하였다. column은 헥산으로 활성화한 silica gel로 충전하였으며 용매조건은 헥산과 에칠 아세테이트 (4:1→2:1→1:1→1:2)용액에서 에칠 아세테이트로, 다시 에칠 아세테이트와 메탄올(9:1→1:1)용액으로 용출시켰다. 용출된 각 분획은 TLC로 검색하였으며 용출 후 감압농축하여 재결정하고 진공건조시켜 NMR분석에 사용하였다.

8) TLC

TLC plate는 Merck사제 silicagel 60F 254 No. 5721을 사용하였으며 페놀성 물질의 확인시 용매는 헥산과 에칠 아세테이트 1:1용액을 사용하였고 전개 후 건조하여 254nm파장의 UV lamp로 spot들을 확인하였다.

9) NMR측정

Proton-NMR은 tetramethylsilane을 내부 표준 물질로 사용하여 chemical shift는 (ppm)으로 표시하였다. NMR 측정시 Wilmad사 507-99번 tube에 시료 5mg을 chloroform-d와 DMSO-d₆에 5%(W/V)비율로 용해시켜 측정하였으며 DMSO-d₆용매는 1%의 TMS가 함유된 것으로 사용하였다.

결과 및 고찰

1) Dimethyl sulfate법에 의한 분석

이 방법은 diazomethane법보다 충격이나 고온에 의한 폭발의 위험이 적어 안전하며 일반적으로 methylation에 흔히 사용되는 방법이므로 이 방법으로 분석하기 위해 충분한 처리를 거친 후 TLC로 검색한 결과 페놀물질은 검출되지 않았다. 또한 TMS화시켜 GC-MS로 분석한 결과에서도 peak가 나타나지 않았는데 그 이유는 마지막 과정에서 에테르와 증류수를 가해 추출한 후 에테르층만을 진공 농축하여 사용하였으므로 수층에 페놀물질들이 모두 용출되어 나갔기 때문인 것¹⁷⁾으로 사료되었다.

2) Diazomethan법에 의한 분석

이 방법은 유독한 냄새와 함께 폭발의 위험이 크므로 필히 후드와 보호막을 설치해야 하고 고온에서 행할 경우 혹은 숙련된 조작을 못할 경우 조제가 어렵다고 알려져 있다¹⁸⁾. 조제액을 페놀시료와 혼합하면 실온에서 급격히 반응하여 methylation이 일어나므로 이를 TMS화 하여 GC-

MS로 분석하여 결과를 얻었다.

(1) 용성 페놀물질

가자의 용성 페놀물질은 TLC상에서 세개의 compound로 나타나서 *p*-coumaric acid, vanillic acid, caffeic acid가 분리되었으며 그 GC chromatogram을 Fig.2에 나타내었다.

Peak 1은 *p*-coumaric acid의 원 분자량 164에서 methylation하면 분자량이 192로 증가하므로 M⁺ 192, 164(M-2CH₂), 133(M-COOCH₃) 등의 Ion peak로 보아 *p*-coumaric acid로 확인하였다.

Peak 2는 M⁺ 196, 182(M-CH₂), 168(M-2CH₂), 137(168-OCH₃) 등의 Ion peak로 보아 vanillic acid로 동정되었다.

Peak 3은 caffeic acid의 원분자량 180에서 methylation에 의해 분자량이 222로 증가되므로 M⁺ 222, 208(M-CH₂), 180(M-3CH₂), 149(180-OCH₃) 등의 Ion peak로 미루어 caffeic acid로 확인하였다.

(2) 불용성 페놀물질

가자의 불용성 페놀물질은 TLC상에서 세개의 compound로 나타났으며 그 GC chromatogram을 Fig.3에 나타내었다.

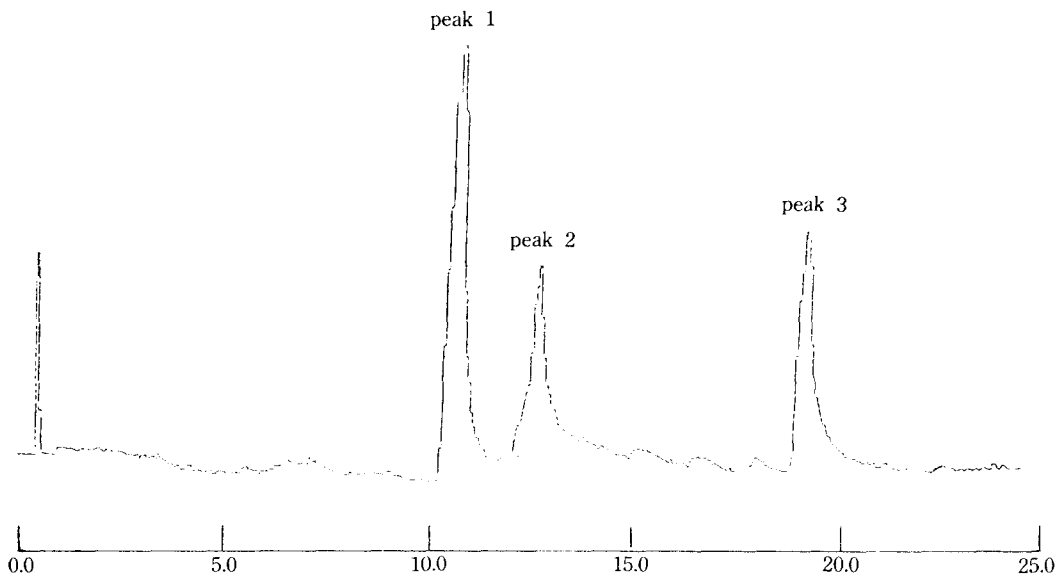


Fig.2. GC chromatogram of soluble phenolics in Chebulae Fructus.

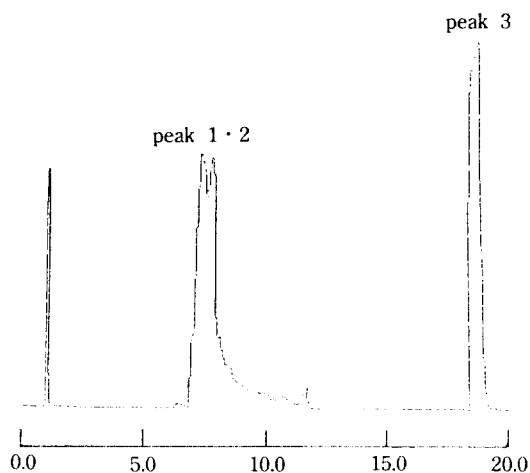


Fig.3. GC chromatogram of insoluble phenolics in Chebulae Fructus.

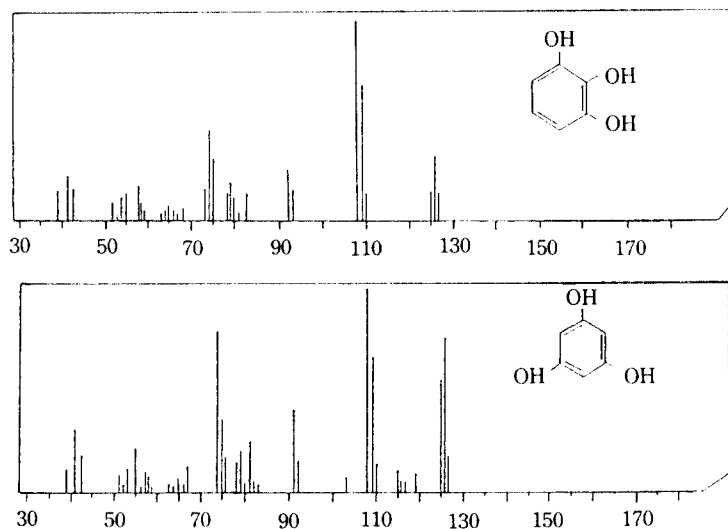


Fig.4. MS spectrum of peak 1,2 (pyrogallol, phloroglucinol).

Fig.4에서 Fig.3의 peak 1과 peak 2의 MS spectrum이 $M^+ 168$, $153(M-CH_3)$, $140(M-2CH_2)$, $126(M-3CH_2)$, $109(126-OH)$ 의 Ion peak로 보아 pyrogallol 혹은 phloroglucinol로 짐작되었다. 이 두물질은 retention time과 methylation 전과 후의 분자량이 동일하여 MS spectrum 상에서 구별이 불가능하였다. Peak 3은 caffeic acid로 동정되었다.

3) NMR에 의한 불용성 페놀물질의 확인

가자의 불용성 페놀물질은 Fig.3,4의 GC 및 MS chromatogram에서 확인하지 못하였기에 column chromatography로 분리하여 proton-NMR로 분석하였다. 그 결과 hexan과 에칠 아세테이트 4:1 과 2:1 분획에서 caffeic acid, 에칠 아세테이트 분획에서 phloroglucinol, 에칠 아세테이트와 메

탄을 분획에서 pyrogallol이 용출되었다.

(1) 헥산과 에칠 아세테이트 분획물

이 compound는 TLC상의 Rf치가 0.83이며 분획후 농축하여 에테르로 재결정하여 얻어진 미황색의 침상결정 90mg으로서 NMR 분석결과 caffeic acid로 밝혀져서 Fig.5에 나타내었다.

NMR 분석결과 세개의 aromatic proton과 두개의 olefinic proton이 관찰 되었다. 6.43과 6.46 ppm에서 C-5와 C-6의 proton이 coupling하여

나타났으며 C-2 proton은 7.62 ppm인 것으로 생각되었다. CH=CH-COOH의 두개의 olefinic proton은 6.15 및 7.62 ppm에서 doublet 및 singlet으로 나타났다.

(2) 에칠 아세테이트 분획물

이 compound는 TLC상의 Rf치가 0.26이며 분획후 농축하여, 물과 메탄올로 재결정하여 얻어진 백색의 침상결정 20mg으로서 NMR 분석결과 phloroglucinol로 밝혀져서 Fig.6에 나타내었다.

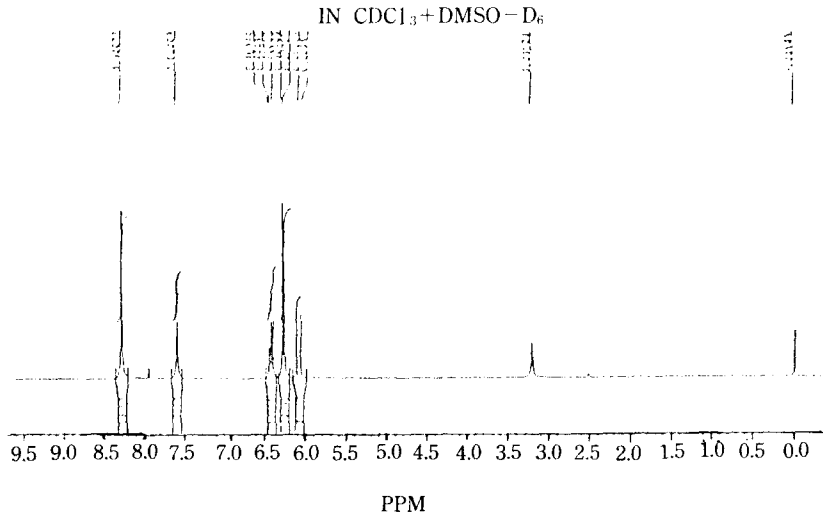


Fig.5. NMR spectrum of peak 3 in insoluble phenolics of Chebulae Fructus.

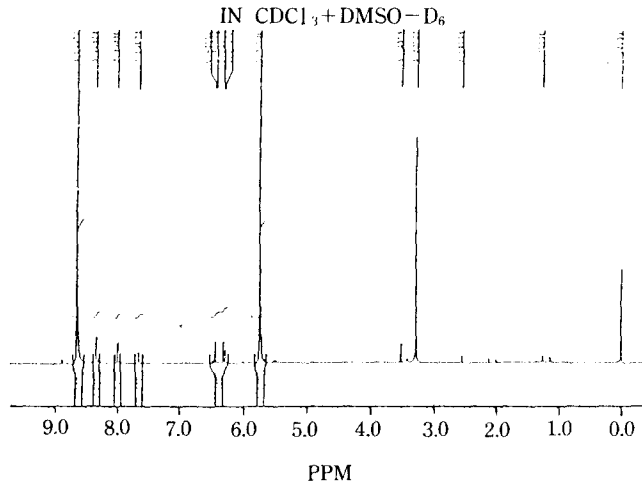


Fig.6. NMR spectrum of peak 2 in insoluble phenolics of Chebulae Fructus.

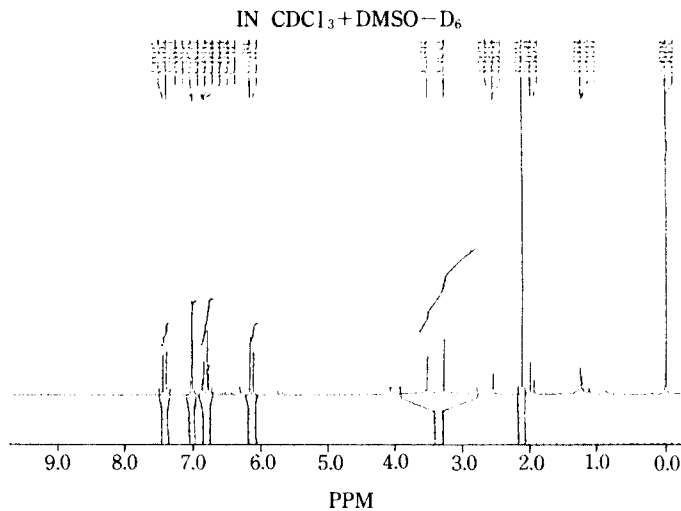


Fig.7. NMR spectrum of peak 1 in insoluble phenolics of Chebulae Fructus.

NMR상에서 5.72ppm의 singlet은 2,4,6위치의 세 aromatic proton으로 확인되었고 8.63ppm의 singlet은 C-1,3,5 위치의 세 hydroxyl기들의 proton으로 분석되었다.

(3) 에칠 아세테이트와 메탄올 분획물

이 compound는 TLC상의 Rf치가 0.13이며 분획 후 농축하여 물과 메탄올로 재결정하여 얻어진 백색의 침상결정 20mg으로서 NMR분석결과 pyrogallol로 확인되어 Fig.7에 나타내었다.

NMR 분석결과 benzene ring의 proton 세개와 C-3,4,5 hydroxyl기의 세 proton이 확인되었다. 6.13 ppm의 doublet과 6.81 ppm의 multiplet은 3-H, 4-H, 5-H로 밝혀졌으며 7.01 ppm과 7.41 ppm의 doublet은 1,2,3-OH의 proton으로 나타났다.

이상과 같이 가자의 불용성 페놀물질에서의 pyrogallol과 phloroglucinol의 경우에서 수산기가 붙은 위치는 다르나 분자량이 같은 경우 GC-MS상에서 확인이 되지 않는 수가 있었다. 그러나 가자의 용성 페놀물질에서와 같이 분자량이 같지 않은 경우에는 diazomethane법으로 처리하여 TMS화한 후 GC-MS분석으로 페놀물질의 종류가 확인되었다. 식품에서 페놀성분의 완전한 분리 및 동정이 꼭 필요하다면 column chromatography

로 분리하여 MS 및 NMR로 분석하여야 할 것이나 많은 시간과 노력을 요하므로 보다 빨리 페놀물질의 종류를 확인하여 그 식품의 가공, 저장시에 일어나는 변화만을 예측하기 위하여서는 diazomethane법으로 methylation 하여 TMS화한 후 분리하지 않은 상태에서 GC-MS상에서 우선 확인이 가능한 것으로 나타났다.

요 약

식품에 함유된 페놀물질은 그 종류에 따라 저장, 가공 특성에 많은 영향을 미치게 되므로 한약재인 가자(Chebulae Fructus)로부터 용성, 불용성 페놀물질을 추출하여 dimethyl sulfate법과 diazomethane법의 두가지 방법으로 methylation 한 후 TMS화 하여 GC-MS 분석을 행하였다.

Dimethyl sulfate법은 일반적으로 많이 이용되는 methylation 법이나 그 마지막 과정에서 페놀물질이 수층에 용출되어 소실되는 단점이 있어 페놀물질의 methylation에는 부적합한 것으로 나타났다.

Diazomethane법은 폭발의 위험이 따르나 가자의 용성 페놀물질에서 methylation이 잘 일어

났으며 TMS화 시켜 GC-MS로 분석한 결과 *p*-coumaric acid, vanillic acid, caffeic acid가 확인되었다.

가자의 불용성 페놀물질에서는 두물질의 methylation 전과 후의 분자량이 동일하여 GC-MS 분석만으로 확인이 불가능한 경우가 있어 column chromatography로 분리하여 NMR 분석으로 확인한 결과 peak 1은 pyrogallol, peak 2는 phloroglucinol로 분리되었다. 이상에서 가자의 불용성 페놀물질의 경우와 같이 분자량이 같고 구조가 유사한 특별한 경우를 제외하면 일반적으로 페놀물질의 확인에서는 diazomethane법에 의한 methylation 후 TMS화 시켜 GC-MS 분석으로 페놀물질의 종류를 신속히 확인하여 식품의 저장, 가공시에 수반되는 변화 정도를 예측할 수 있다는 결과를 얻었다.

참 고 문 헌

1. Rhee, K. I., Rhee, K. C.. Antioxidant activity of methanolic extracts of varioms oilseed protein ingredients, *J. Food Sci.*, 46, 75, 1981.
2. Avenas S. L., Hinoat, L. V.. Ferulic acid and other phenolics in oat seed, *J. Food. Sci.*, 42, 551, 1977.
3. Toshiko, H.. Antioxidative substance in *Glycyrrhizae radix*, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi*, 29, 418, 1982.
4. Wee, J. J.. Isolation of phenolic antioxidants from *Panax ginseng*, *J. Korean Agric.Chem. Soc.*, 32(1) : 44, 1989.
5. Masako, N.. antioxidant activities of some vegetable food and active component of avocado epicarp, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29, 507, 1982.
6. Paik, T. H.. Studies on the antioxidigenic substances in *Panax ginseng* roots, *Korean J. Food Sci. Tech.*, 14, 130, 1982.
7. Singleton, V. L.. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems, *Am. J. Enol. Vitic.*, 38(1) : 69, 1987.
8. Singleton, V. L.. The phenolic cinnamates of white grapes and wine, *J. Sci. Food Agric.*, 29, 403, 1978.
9. Senter, S. D., Horvat, R. J. and Forbus. JR. W. R.. Relation between phenolic acid content and stability of pecans in accelerated storage, *J. Food Sci.*, 45, 1380, 1980.
10. cilliers, J. J. L.. Singleton, V.L, Nonenzymic antioxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *Agric. Biol. Chem.*, 41(12) : 2401, 1989.
11. 陳存仁, 漢方醫藥辭典, 東都文化社, 380, 1984.
12. Krygier, K., Free.. esterified and insoluble-bound phenolic acid extraction and purification procedure, *J. Agric. Food Chem.*, 30, 330, 1982.
13. L. Fieser, M. Fieser, Reagents for organic synthesis, *John Wiley*, New York, 293, 1967.
14. Schlenk, H., *Anal. Chem.*, 32, 1413, 1960.
15. Junji, T., Setsuro, M.. Geometrical isomers of monohydroperoxides formed by autoxidation of methyl linoleate, *Agric. Biol. Chem.*, 41(12) : 2401, 1977.
16. Michael, J.. Bonded fused silica capillary column GLC determination of BHA and BHA in chewing gums, *J. Food Sci.*, 49, 1622, 1984.
17. Kozłowska, H., Zadernowski, R.. Phenolic acids in rapeseed and mustard, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1119, 1983.
18. J.S. Pizey, Synthetic reagents, 2, *John wiley*, New York, 65, 1974.