

Solid Phase Micro Extraction을 이용한 산초의 휘발성 성분 분석

이재곤 · 장희진 · 곽재진 · 김옥찬 · 이계호*

한국인삼연초연구원 화학부, *충남대학교 자연과학대학 화학과

Analysis of Volatile Components of Sancho(*Zanthoxylum schinifolium*) by Solid Phase Micro Extraction

Jae-Gon Lee, Hee-Jin Jang, Jae-Jin Kwag, Ok-Chan Kim and Gae-Ho Lee*

Dept. of Chemistry, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

*Dept. of Chemistry, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract

Test of the optimum condition of solid phase micro extraction(SPME) was performed by use of 5 volatile components in dilute aqueous solution. Volatile components of Sancho(*Zanthoxylum schinifolium*) were isolated by SPME method and were analyzed by GC /MSD, and compared with volatile components isolated by simultaneous distillation extraction(SDE) method. Total 31 components were identified by comparing gas chromatography retention time and mass spectral data. The major compounds were limonene, geranyl acetate, β -phellandrene, phellandral, myrcene, linalool, rose oxide, caproic acid and caprylic acid. SPME sampling procedure was found to be a good method for qualitative analysis of the volatile components.

Key words : solid phase micro extraction, Sancho, volatile components.

서 론

식물체의 휘발성 성분 및 식품의 맛과 향 성분 분석은 먼저 simultaneous distillation extraction (SDE) 법^{1,2)}, headspace 분석법^{3,4)}, 용매추출법^{5,6)} 등으로 목적물질을 분리해야 한다. 그러나 유기용매와 시간이 다량 소요되기 때문에 새로운 전처리법이 필요하다. 90년도 개발된 solid phase micro extraction(SPME) 법⁷⁾은 유기용매를 사용하지 않고 1g 이하의 적은 양의 시료도 전처리할 수 있는 기술로 초기에는 수용액으로부터 유기성분을 추출하는데 이용하였다⁸⁾. 그후 Zhang과 Pawliszyn의 headspace SPME방법⁹⁾이 개발되어 유해물질 분석¹⁰⁾, 식품 및 음료의 휘발성 성분 분석^{11,12)}, 식물체의 향기성분 분석 등^{13,14)}에 이용되고 있다. 산초는 우리 나라를 비롯하여 중국, 일본 등 동북아시아에 널리 자생하는 운향과 (*Rutaceae*)의 산초나무(*Zanthoxylum*)에 속하는

낙엽관목으로 정유성분과 유지가 함유되어 있어서 동북아시아에서 향신료 및 약용으로 사용되어 왔다¹⁵⁾. 산초는 방향성 진위, 소염, 이뇨, 구충제로서 사용되고 위장을 자극하여 신진대사를 향진시키고 위화장 등에 유용하다¹⁶⁾. 최근, SPME방법으로 많은 연구를 하고 있으나^{17,18)} 국내에서는 이에 관한 연구가 발표된 바 없다. 저자들은 국내산 식물자원의 휘발성분 연구에 활용할 목적으로 온도, 시간, 농도에 따른 SPME 최적 추출조건을 설정하고, 설정된 조건에서 국내산 산초의 휘발성 성분을 추출한 후 GC /MSD로 확인하고, 또한 휘발성 성분 추출에 비교적 자주 이용되는 동시증류추출(SDE) 방법에 의해 분석된 휘발성 성분과 조성비를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Corresponding author : Jae-Gon Lee

본 시료는 1997년도산 산초(*Zanthoxylum schinifolium*) 건조물을 대전의 약초상에서 구입하였으며, 향기성분이 휘발되지 않도록 밀봉하여 저온에서 보관하였다.

2. Solid phase micro extraction(SPME)법에 의한 최적 추출조건 시험

1) 표준용액 제조

Solid phase micro extraction(SPME)법의 분석에 사용된 표준용액은 limonene, linalool, citronellyl acetate, neryl acetate 및 geranyl acetate 1g을 에탄올로 1만배 희석하여 제조하였다.

2) 시간, 온도 및 농도별 추출조건 시험

시간별 추출조건은 20ml병 3개에 표준용액 100 μ l씩을 넣고 증류수를 가하여 2ml로(5ppm) 한 후 마개로 막고 SPME 장치를 시료병에 주입하고 50°C로 가열하면서 10분, 30분, 50분간 추출하였다. 온도별 조건은 추출온도 30°C, 50°C, 70°C에서 30분간 추출하였다. 농도별조건은 20ml병 4개에 표준용액 1 μ l, 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l씩 취하여 증류수로 부피 2ml가 되도록 희석한 후 마개로 막은 다음 SPME 장치를 시료병에 주입하고 50°C에서 30분간 추출하였다.

3) SPME 장치

SPME장치¹⁹⁾를 시료병에 꽂아 화이버가 접촉하지 않도록 일정한 높이를 조정한 후 홀더의 플린저를 눌러 화이버가 밖으로 나오게 하여 추출하였다. 이때 시료병은 일정한 온도의 물증탕에 넣고 추출하였다. 실험에 사용한 SPME장치의 화이버는 Supelco사 65 μ m carbowax / divinylbenzene을 사용하였다.

3. 휘발성 성분 추출

1) Solid Phase Micro Extraction(SPME)법

산초 1g을 원상태로 20ml병에 넣고 마개로 막은 후 시료가 채워진 병에 SPME 장치를 주입하고 50°C 물증탕에 시료병을 넣고 30분간 추출하였다.

2) Simultaneous Distillation Extraction(SDE)법

산초 원상태 50g에 증류수 1ℓ를 가하여 2ℓ 플라스크에 넣고 Schultz 등¹⁹⁾의 방법에 따라 개량된 SDE(Likens & Nickerson type simultaneous steam distillation and extraction apparatus)장

치로 휘발성 성분을 2시간 추출하였다. 추출용매로서는 n-pentane:diethylether(1:1, v/v %) 50ml를 사용하였으며, 추출완료 후 무수황산나트륨으로 탈수시키고 30°C에서 감압농축하여 분석용 시료로 사용하였다.

4. 휘발성 성분의 분석

SPME법 및 SDE법으로 추출한 휘발성 성분은 GC / MSD로 분석하였다. 기기는 HP5890 / HP5970B 모델을 사용하였다. 컬럼은 FFAP fused silica capillary(50m × 0.2mm i.d.)를 사용하였고 50°C에서 3분간 유지한 후 250°C까지 3°C / min으로 승온하였다. 주입기 및 interface의 온도는 250°C, 이온화 전압은 70eV로 하였고 헬륨량은 0.5ml / min으로 하고, 시료 주입량은 0.5 μ l를 split mode(split ratio = 100:1)로 하였다. SPME로 얻은 휘발성 성분을 GC / MSD에 주입할 때는 SPME장치의 플린저를 다시 위로 옮겨 화이버가 안으로 들어가면 GC / MSD 주입구에 꽂아 250°C의 고온으로 2분동안 열탈착시켜 분석하였다. 각 성분은 GC / MSD에 의해서 얻은 total ion chromatogram에서 각 피크의 mass spectrum을 표준 mass spectrum과 비교하여 확인하였다.

결과 및 고찰

일정 온도(50°C)와 농도(5ppm)에서 추출시간 변화에 따른 SPME 흡착력은 Fig. 1과 같이 비점이 낮은 limonene과 linalool은 시간에 따른 영향은 크지 않으나 분자량이 크고 비점이 높은 citronellyl acetate, neryl acetate, geranyl acetate 등은 추출시간이 길 수록 흡착되는 양이 증가하였다. 일정 농도(5ppm)와 추출시간(30min)에서 온도를 30°C, 50°C, 70°C로 증가시키면 Fig. 2와 같이 비점이 낮은 limonene은 SPME 흡착량이 감소되지만 linalool, citronellyl acetate 등의 다른 성분들은 거의 변화가 없었다. Fig. 3은 일정 온도(50°C)와 추출시간(30 min)에 농도에 따른 SPME 흡착량이다. 전반적으로 농도가 증가할수록 흡착량은 증가하였으며 비점이 낮은 limonene, linalool은 약간 증가하였고, 분자량이 크고 비점이 높은 citronellyl acetate, geranyl acetate는 급격히 증가하였다. 이상의 결과로부터 최적 추출시간(30min)과 온도(50°C)를 SPME 법에 설정하였고, SPME법과 SDE법으로 산초의 휘발성 성분을 분리하여 GC / MSD로 분석한 total

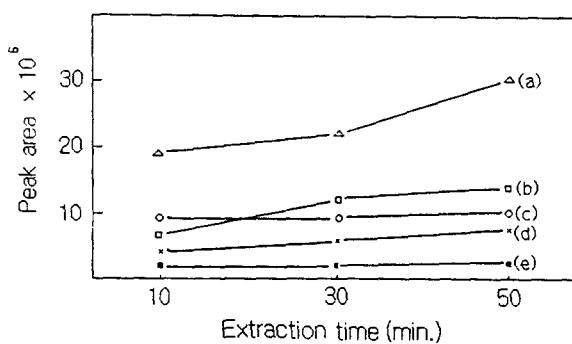


Fig. 1. Influence of extraction time on SPME headspace sampling at concentration of 5ppm per component and extraction temperature 50°C. (a) citronellyl acetate, (b) geranyl acetate, (c) limonene, (d) neryl acetate, (e) linalool.

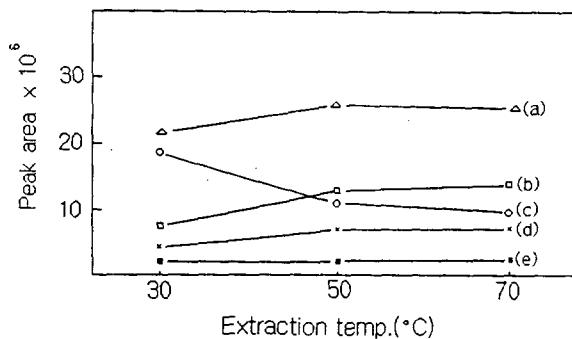


Fig. 2. Influence of extraction temperature on SPME headspace sampling at concentration of 5ppm per component and extraction time 30min. (a) citronellyl acetate, (b) geranyl acetate, (c) limonene, (d) neryl acetate, (e) linalool.

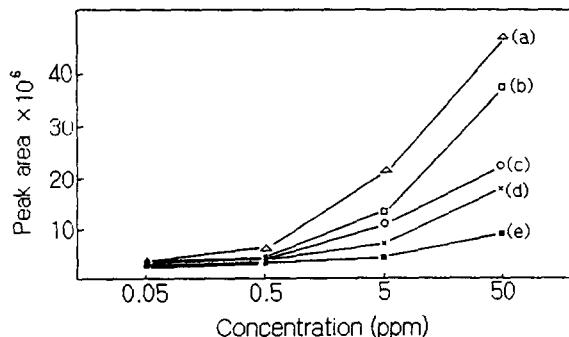


Fig. 3. Influence of sample concentration on SPME headspace sampling at extraction temperature 50°C and time 30min. (a) citronellyl acetate, (b) geranyl acetate, (c) limonene, (d) neryl acetate, (e) linalool.

ion chromatogram은 Fig. 4와 같다. 분리된 각 성분은 mass spectrum library(Wiley138)와 mass spectral data book²⁰의 spectrum과의 일치, GC 분석에 의한 retention index²¹와의 일치 및 표준물질의 분석 데이터를 비교, 확인하여 Table 1에 나타내었다. 확인된 31개 성분 중에서 피크면적(%)을 비교하면 SPME법에서는 limonene(14.65%), geranyl acetate(11.07%), β -phellandrene (7.42%), phellandral(3.08%), myrcene(1.64%), linalool(1.25%) 및 rose oxide(1.03%)등의 monoterpenoids 화합물과 caproic acid(11.99%), caprylic acid(8.01%), heptanoic acid(3.49%) 등의 지방산 화합물이 주요 성분으로 확인되었고, SDE 법에서는 geranyl acetate(13.31%), limonene (12.81%), β -phellandrene(8.86%), trans-geraniol(5.22%), β -pinene(3.18%), caprylic acid (3.03%), citronellyl acetate(2.63%) 및 linalool(1.57%) 등이 주요 성분으로 확인되었다. 또한 caproic acid, heptanoic acid, caprylic acid 등의 지방산 성분들은 SPME법에서 높게 나타난 반면에 β -citronellol, trans-geraniol 등의 alcohol 성분들

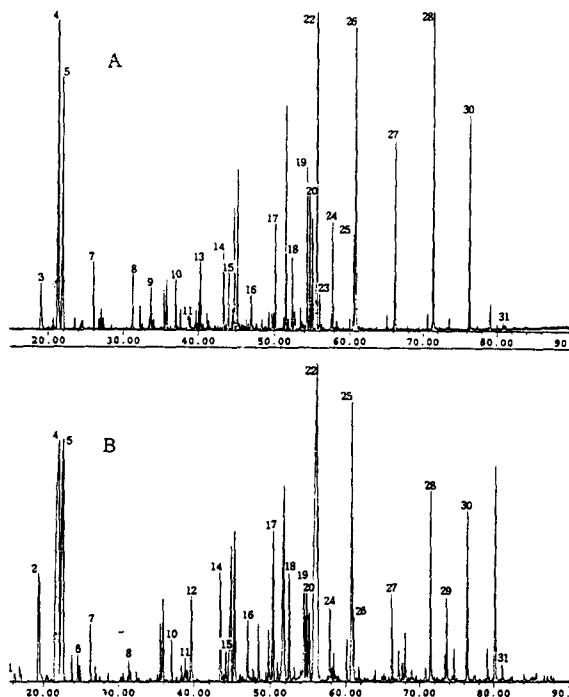


Fig. 4. Total ion chromatogram of volatile compounds isolated from Sancho by solid phase micro extraction method (A) and simultaneous distillation extraction method(B).

Table 1. Volatile components identified from Sancho

Peak ^{a)} No.	Components	Peak area(%)	
		SPME ^{b)}	SDE ^{c)}
1	α -Pinene	— ^{d)}	0.16
2	β -Pinene	—	3.18
3	Myrcene	1.64	—
4	Limonene	14.65	12.81
5	β -Phellandrene	7.42	8.86
6	γ -Terpinene	t ^{e)}	0.36
7	p-Cymene	1.37	0.61
8	Rose oxide	1.03	0.24
9	2-Nonanone	0.74	t
10	cis-Linalool oxide	1.07	0.46
11	trans-Linalool oxide	t	0.36
12	Citronellal	0.31	1.54
13	Decanone	1.13	t
14	Linalool	1.25	1.57
15	Linalyl acetate	0.99	0.39
16	Terpinen-4-ol	0.53	0.86
17	Citronellyl acetate	1.72	2.63
18	α -Terpineol	1.30	1.53
19	Phellandral	3.08	1.94
20	Piperitone	2.50	1.29
21	Carvone	2.20	1.18
22	Geranyl acetate	11.07	13.31
23	β -Citronellol	0.62	1.98
24	4-Isopropenyl benz-aldehyde	1.94	0.97
25	trans-Geraniol	1.63	5.22
26	Caproic acid	11.99	0.62
27	Heptanoic acid	3.49	0.98
28	Caprylic acid	8.01	3.03
29	Cumanyl alcohol	t	1.06
30	Pelargonic acid	3.87	2.54
31	Capric acid	t	0.22

a) : Numbers refers to Fig. 4, b) : Solid phase micro-extraction method, c) : Simultaneous distillation-extraction method, d) : not detected, e) : peak area % less than 0.1%.

은 SDE법보다 낮았다. 이는 SPME의 추출시간을 길게 하면 저비점 alcohol류 성분들은 화이버에 흡착되는 양이 감소하는 반면에 고비점 지방산 성분들은 흡착되는 양이 증가하기 때문에 생각된다. 고와 한²²⁾은 headspace법으로 산초에서 17개의 휘발성 성분을 확인하였으며, 이를 성분중 myrcene(57.9%), citronellal(22.0%), β -phellandrene(6.4%), linalool(1.1%), geraniol(1.2%), α -pinene(1.1%), β -pinene(1.1%)을 주요 성분으로 보고하였다. 이 결과는 본 결과와 유사하나 전처리 방법이 다르므로

피크면적(%)에서 차이가 있는 것으로 생각된다. 이²³⁾는 아니스 씨앗을 SDE법, headspace법, steam distillation법 및 용매추출법으로 추출하여 각 성분의 피크면적(%) 조성비를 확인하고, 전처리 방법간에 각 성분의 조성비에 많은 차이가 있는 것으로 보고하였다. Table 1의 두 방법간 피크면적(%) 차이는 추출조건 및 흡착물질이 다르기 때문으로 생각된다. SDE법은 전처리 시간이 많이 소요되며 시료가 최소한 10g 이상이 필요하나, SPME법은 1g 이하의 적은 양의 시료로도 매우 신속하고 간단하게 전처리를 할 수 있기 때문에 기존의 휘발성 분석시 주로 사용한 SDE법에 비해 편리하며 경제적인 것으로 생각된다.

요 약

Solid phase micro extraction(SPME)법의 최적조건 실험 및 SPME로 추출된 산초(*Zanthoxylum schinifolium*)의 휘발성 성분을 GC / MSD로 확인하였다. 휘발성 성분 추출에 자주 이용되는 동시증류추출(SDE)법으로 산초의 휘발성분을 분석하여 SPME 법에서 확인된 휘발성 성분과 조성비를 비교하였다. SPME 최적조건 실험에서 분자량이 적고 비점이 낮은 성분은 온도가 증가할수록 화이버에 흡착되는 양은 적게 나타났으며, 분자량이 크고 비점이 높은 성분은 추출시간이 증가할수록 흡착되는 양은 증가하였다. SPME 최적조건인 추출시간 30분과 50°C에서 분리된 휘발성 성분에서는 limonene(14.65%), geranyl acetate(11.07%), β -phellandrene(7.42%), 및 phellandral(3.08%) 등의 monoterpenoids 화합물과 caproic acid(11.99%), caprylic acid(8.01%), heptanoic acid(3.49%) 등의 지방산 화합물이 주요 성분으로 확인되었고, SDE 법으로 추출된 휘발성 성분에서는 geranyl acetate(13.31%), limonene(12.81%) β -phellandrene(8.86%), trans-geraniol(5.22%) 및 caprylic acid(3.03%) 등의 화합물이 주요 성분으로 확인되었다. 지방산 성분들은 SPME법에서 높게 나타난 반면에 알코올 성분들은 SDE법보다 낮았다. SPME법은 적은 양의 시료로도 매우 신속하고 간단하게 전처리 할 수 있기 때문에 기존의 휘발성 분석시 주로 사용한 SDE법에 비해 편리하며 경제적인 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Godefroot, M., Sandra, P. and Verzere M. : New method for quantitative essential oil analysis, *J. Chromatogr.*, **203**, 325~335(1981).
2. Nicherson, G. B. and Likens, S. T. : Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer, *J. Chromatogr.*, **21**, 1~5 (1966).
3. Takeoka, G. R., Flath, R. A., Guntert, M. and Jenning, W. : Vacuum steam distillation versus headspace sampling, *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 553 ~560(1988).
4. Nunez, A. J. and Maarse, H. : Headspace methods for volatile components of grapefruit, *J. Chromatographia.*, **21**, 44~48(1986).
5. Hardy, P. J. : Extraction and concentration of volatiles from dilute aqueous and aqueous-alcoholic solution using trichlorofluoromethane, *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 656~658(1969).
6. Marais, J. and Hountman, A. C. : Quantitative gas chromatographic determination of specific esters and higher alcohols in wine using freon extraction, *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 250~252(1979).
7. Zhang, Z. Y. and Pawliszyn, J. : Solid phase microextraction, *Anal. Chem.*, **66**, 844~853(1994).
8. Arthur, C. L. and Pawliszyn, J. : Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibres, *Anal. Chem.*, **62**, 2145~2148 (1990).
9. Zhang, Z. and Pawliszyn, J. : Headspace solid phase microextraction, *Anal. Chem.*, **65**, 1843~1852(1993).
10. Zhang, Z. and Pawliszyn, J. : Analysis of organic compounds in environmental samples by headspace solid phase microextraction, *J. High Resol. Chromatogr.*, **16**, 689~692(1993).
11. Yang, X. and Peppard, T. : Solid phase microextraction for flavor analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1925~1930(1994).
12. Steffen, A. and Pawliszyn, J. : Analysis of flavor volatiles using headspace solid phase microextraction, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2187~2193(1996).
13. Schafer, B., Henning, P. and Engewald, W. : Analysis of monoterpenes from conifer needle using solid phase microextraction, *J. High Resol. Chromatogr.*, **18**, 587~596(1995).
14. Field, J. A., Nickerson, G. and Heider, C. : Determination of essential oil in hops by headspace solid phase microextraction, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1968~1972(1996).
15. Lee, S. W. : Search of Korea tradition food, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **12**, 52~57(1979).
16. Lee, S. J. : Korean folk medicine monographs series, No. 3, Publishing Center of Seoul National University, 88~93(1966).
17. John, R. D., William, R. T. and Valeriya, M. : Solid phase micro extraction as a method for estimating the octanol water partition coefficient, *Anal. Chem.*, **68**, 130~133(1996).
18. Page, B. D. and Lacroix, G. : Application of solid phase micro extraction to the headspace gas chromatographic analysis of halogenated volatiles in selected foods, *J. Chromatogr.*, **648**, 199~211 (1993).
19. Schultz, T. H., Flath, R. A., Mon, T. R. and Teranishi, R. : Isolation of volatile components from a model system, *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 446~449(1977).
20. Stehagen, E., Abbrahansom, S. and McLafferty, F. W. : Isolation of volatile components from a model system, *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 446~449 (1977).
21. Schultz, T. H., Flath, R. A., Mon, T. R. and Teranishi, R. : Isolation of volatile components from a model system, *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 446~449(1977).
22. Ko, Y. S. and Han, H. J. : Chemical constituents of Korean chopi and sancho, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 19~27(1996).
23. Lee, J. G. : Comparison of different extraction methods for the volatile components of Anise, *Agri. Chem. Biotec.*, **40**, 144~147(1997).

(1999년 1월 30일 접수)