

땅콩 품종 및 생육기별 *trans*-Resveratrol 함량

이미자*[†] · 정영근* · 김형순** · 박기훈* · 두홍수* · 서득용*

*호남농업시험장, **서남대학교 환경화학공학과

trans-Resveratrol Content of Varieties and Growth Period in Peanut

Mi-Ja Lee*[†], Young Keun Cheong*, Hyung Soon Kim**, Ki Hun Park*, Hong Soo Doo*, and Duck Yong Suh*

*National Honam Agricultural Experiment Station, RDA, Iksan 570-080, Korea

**Dep. of Environ. & Chem. Eng. Seonam National University, Namwon, 590-711, Korea

ABSTRACT : *trans*-Resveratrol(3,5,4'-trihydroxystilbene) is phenolic compound present in grapes, wines, and peanuts, has been reported to have health benefits including anticarcinogenic effects, protection against cardiovascular diseases and reduced cancer risk. A simple method for the quantitative extraction of *trans*-resveratrol from peanut has been developed. Optimal conditions for extraction were investigated. Type of solvent, time, and temperature assayed influenced *trans*-resveratrol yield. Adequate extraction condition was decided to ethanol/water (80:20 v/v) maintained at 25°C for 45 min. After extraction, the protocol consists of sample preparation using a C₁₈ solid-phase extraction (SPE) cartridge after concentrate with rotary evaporator and quantified by reversed phase HPLC using a C₁₈ column at 308 nm. Analytical methods for measuring *trans*-resveratrol in peanut were adapted to isolate, identify, and quantify *trans*-resveratrol in 11 peanut varieties by HPLC (high-performance liquid chromatography) with UV detector. The 11 peanut varieties content ranged from 0.018 to 1.125 µg/g with an average of 0.289 µg/g. The contents were higher in the seeds with than without testa, regardless of varieties. The *trans*-resveratrol content was higher in 110, 130 days after sowing than that of other period.

Keywords: *trans*-resveratrol, peanut, C₁₈ SPE cartridge, HPLC

trans-Resveratrol(3,5,4'-trihydroxystilbene)과 유도체인 viniferin은 포도나 포도주(Powell RG *et al.*, 1994; Lamuela-Raventós RM *et al.*, 1995; Dourtoglou VG *et al.*, 1999)와 같이 여러 가지 관련 생산물에 존재하는 천연 phenolic 성분으로, 1992년 Siemann 및 Creasy에 의해 포도주에서 *trans*-resveratrol이 처음 발견되었다. Resveratrol은 *trans*와 *cis* 및 배당체인 *picid* 형태로 존재하며, *trans* type은 광에 의하여

cis type으로 쉽게 변한다(Vassilis *et al.*, 1999). *trans*-resveratrol은 식물에서 UV 광조사나 상해와 같은 스트레스 상황 또는 포도의 균류(*botrytis cinerea*)나 곰팡이와 같은 감염균으로부터 항생물질처럼 작용하여 자신의 몸을 보호하기 위해 생산하는 phytoalexin(Romero-pérez *et al.*, 2001)으로 알려져 있고, 혈소판 응집제어로 혈청 콜레스테롤을 낮춤으로써 항산화 및 심장병 예방에 효과적이며, 저질 단백질의 산화방지 및 정상세포가 암세포로 변하는 것을 막고 악성종양의 증식 방지 및 항염증 기능과 같은 병리적 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Dourtoglou *et al.*, 1999; Sobolev *et al.*, 1999; Ibern-Gomez *et al.*, 2000). 특히 적포도주에 다량 함유되어 있는 polyphenols, anthocyanoside, resveratrol 등은 동맥경화증, 심장병 및 암 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다(Powell *et al.*, 1994). Resveratrol은 포도(Domínguez *et al.*, 2001; Dourtoglou *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 1998; Jeandet *et al.*, 1997; Lamuela-Raventós *et al.*, 1995), 오디, 나무딸기, blueberry(Romero-pérez *et al.*, 2001), 땅콩(Sobolev and Cole, 1999; Ibern-Gomez *et al.*, 2000; Sanders *et al.*, 2000) 등에 함유되어 있으며, 최근에는 땅콩에서 *trans*-resveratrol의 추출과 분석(Sobolev and Cole, 1999; Ibern-Gomez *et al.*, 2000; Sanders *et al.*, 2000)에 대한 연구가 이루어지고 있으나 아직은 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 땅콩에서 *trans*-resveratrol 추출 및 분석방법을 확립하고, 품종 및 생육시기에 따른 *trans*-resveratrol 함량을 조사하여 고기능성 땅콩 품종 육성의 기초 자료로 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

본 시험은 2001년에 호남농업시험장에서 재배된 땅콩을 시험재료로 사용하여 팔광땅콩 등 11품종에 대한 *trans*-resveratrol 함량을 분석하였고, 종피 유무와 생육시기별 *trans*-resveratrol 함량 변화를 구명하기 위하여 시험품종은 중립종은 팔광땅콩과 대광땅콩, 대립종은 밀양16호 및 신남광땅콩을

[†]Corresponding author: (Phone) +82-63-840-2257 (E-mail) esilvia@rda.go.kr

<Received March 24, 2003>

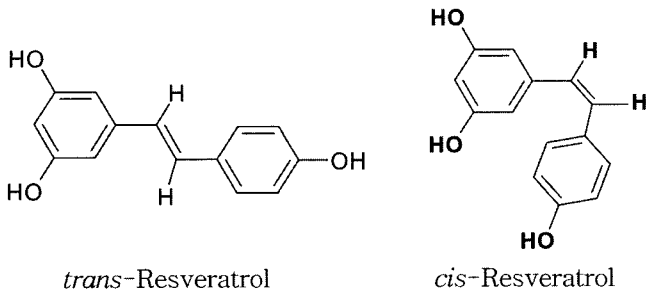


Fig. 1. Chemical structure of resveratrol.

파종 후 100일, 110일, 130일, 150일에 조사하였다. *trans*-Resveratrol(*trans*-3,4',5-trihydroxystilbene)의 화학적인 구조식은 Fig. 1과 같은 구조의 페놀성 화합물로서 광에 의하여 쉽게 *cis* 형태로 변화되므로 모든 처리와 보관은 암조건에서 수행하였으며, 분석과 추출에 사용한 *trans*-resveratrol 표준시약(Sigma chemical co.)은 LC grade(Fisher)로 하였다.

추출 및 시료 전처리

땅콩 시료 1 g을 blender로 갈고 암조건에서 ethanol/water (80:20 v/v) 수용액 3 ml로 상온에서 30분간 교반하여 추출하였으며, 추출조건을 최적화하기 위하여 추출용매는 각각 100%, 80% ethanol과 methanol을 사용하였고, 추출 온도는 25, 45, 60°C, 추출시간은 15, 30, 45, 60, 120분으로 하였다. 추출액은 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상정액을 0.45 µm nylon membrane filter로 여과한 후 이 여과액을 C₁₈ sep-pak plus cartridge(waters)를 이용하여 전처리하고 진공 농축하여 HPLC로 분석하였다.

HPLC 분석

trans-Resveratrol 분석에 사용한 고속액체크로마토그래피(HPLC)는 Dionex LC20으로 UV-Vis 검출기(AD20 Absorbance detector), D-2500 데이터 처리장치를 이용하였다. 컬럼은 Waters Xterra C₁₈ column(150×4.6 mm i.d., 5 µm packed column)을 사용하였으며, 분리도를 양호하게 하기 위하여 (A) glacial acetic acid:DCW(52.6:900)과 (B) acetonitril :

solution A(80:20) 이동상을 시간에 따라 기울기 용리하여 분석하였다. 이때 이동상 속도는 1.1 ml/min, 시료 주입량은 25 µl로 하여 UV-Vis 검출기 308 nm에서 검출하였다(Table 1). 표준용액은 100 mg/L을 80% methanol에 용해하여 stock solution으로 amber bottle에 냉장보관 한 후 희석하여 각각의 크로마토그램을 얻었으며, peak 면적당 표준용액 농도의 관계로 검량선을 작성하여 땅콩의 *trans*-resveratrol 함량 정량분석에 적용하였다.

결과 및 고찰

trans-Resveratrol 추출

땅콩으로부터 *trans*-resveratrol 추출용매를 선택하기 위하여 100% 에탄올과 메탄올 및 80% 에탄올과 메탄올 수용액을 용매로 25°C에서 30분간 추출한 결과는 Fig. 2와 같다. 일반적으로 페놀성 물질의 경우 에탄올, 메탄올 및 H₂O를 이용하여 추출하지만 실험결과 80% 메탄올의 경우 최대 추출효과를 나타내는 등 Ana *et al.*(2001)가 보고한 결과와 같은 경향을 나타내었다. 그러나 80% 에탄올과 유의차가 없었으며, ICH (International Conference on Harmonisation) guideline에 따르면 메탄올이 피해야 할 용매로 되어 있으므로 본 연구에서는 *trans*-resveratrol 추출은 독성이 덜한 80% 에탄올을 이용하였다. 적정 *trans*-resveratrol 추출시간과 온도는 Fig. 2에서와 같이 추출시간에 따른 *trans*-resveratrol의 추출량은 45분에 최대치에 달하였으며, 그 이후에는 점차 감소하는 경향이였다.

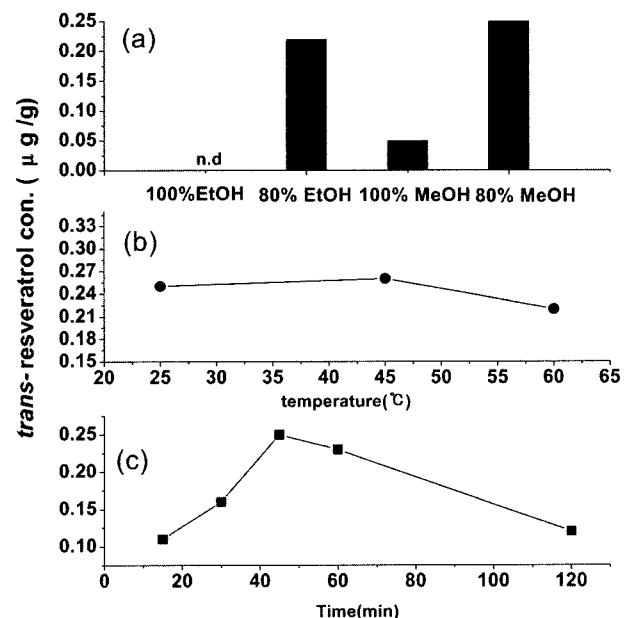


Fig. 2. Extraction profile of *trans*-resveratrol vs. time and the effect of different solvent, temperature on extraction of *trans*-resveratrol from raw peanut, n.d; not described. (a) 25, 60 min, (b) 80%MeOH, 60 min (c) 25, 80%MeOH.

Table 1. Elution gradient programme.

Time(min)	Solvent A(%)	Solvent B(%)	Flow rate/(min)
0	82	18	1.1
5	82	18	1.1
10	70	30	1.1
15	55	45	1.1
16	50	50	1.1
18	0	100	1.1
20	100	0	1.1
22	82	18	1.1

*equilibrium for 10 minute before following injection

추출온도별 *trans*-resveratrol 함량은 1% 수준에서 DMRT분석 시 유의차가 없었다. 이상의 결과로 보아 용매의 유해성과 경제성을 고려해볼 때 땅콩에서 *trans*-resveratrol 추출시 최적 조건은 추출용매는 80% 에탄올, 추출온도는 25°C, 추출시간은 45분이었다.

HPLC 분석 최적화

HPLC 분석방법의 타당성은 정밀성과 표준곡선의 직선성, 감도로 평가할 수 있는 바, 각각 농도에 대한 HPLC 크로마토그램을 얻고, 이에 따른 주입 농도와 피크면적에 대한 검량선을 작성한 결과 $r^2=0.99601$, $P<0.0001$ 로 분석 농도범위에서 직선성을 보여 분석방법이 양호함을 알 수 있었다(Fig. 3).

땅콩 추출물의 HPLC(308 nm)를 분석한 크로마토그램은 Fig. 4와 같다. 전처리를 하지 않은 땅콩 추출물인 (a)에서는 13.5분에서 14.3분대에 피크가 분리되지 않고 broad한 하나의 피크로 검출되어 *trans*-resveratrol 피크분리가 잘 이루어지지 않았으나, sep-pak C₁₈을 이용하여 전처리한 땅콩 추출물의 크로마토그램 (b)에서는 표준시료 (c)에서의 *trans*-resveratrol 특성피크와 같은 머무름 시간에서 검출되어 sep-pak전처리에 의한 분리효율을 높일 수 있었다. 일반적으로 HPLC분석시 분석하고자 하는 성분에 해당하는 피크는 머무름 시간외에도 표준물 첨가에 의한 피크 증가로 확인할 수 있다. 즉, 땅콩 추출물(b)에서 *trans*-resveratrol 피크가 표준시료의 머무름 시간과 같은 13.921분에서 검출되었으며, 땅콩 추출물(b)에 표준시료를 첨가한 (d)의 경우 13.921분대의 피크가 증가함으로써 이 피크가 *trans*-resveratrol 피크임을 확인할 수 있었다.

땅콩 품종별 *trans*-resveratrol 함량

HPLC를 이용하여 땅콩 품종별 *trans*-resveratrol 함량 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 품종별 *trans*-resveratrol 함량

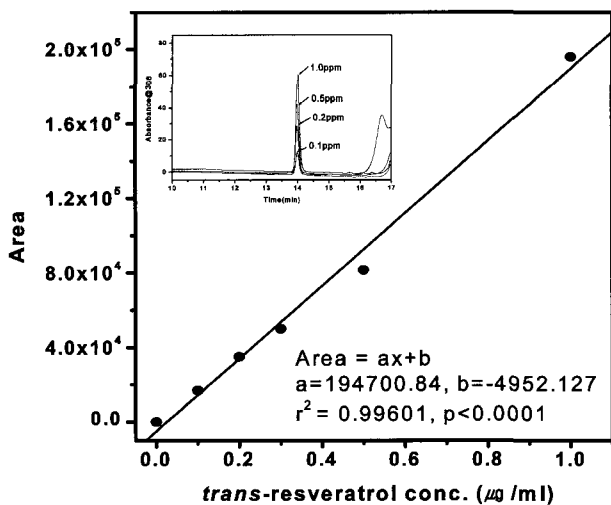


Fig. 3. Calibration curve of *trans*-resveratrol.

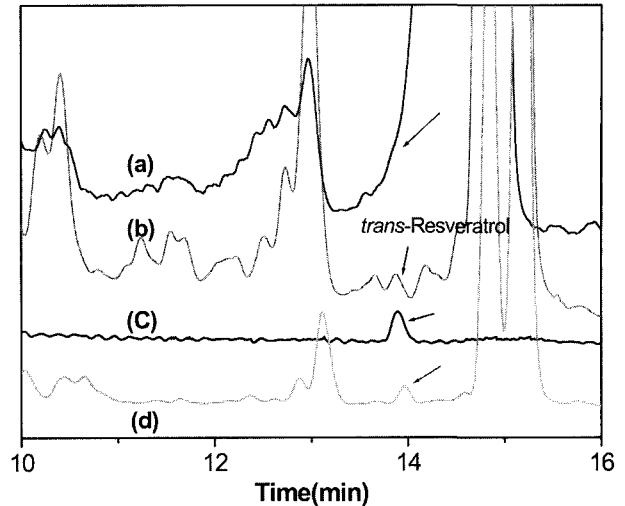


Fig. 4. Chromatograms at 308 nm, corresponding to a peanut extracts and *trans*-resveratrol standard, (a) By direct injection, (b) After purified extract (c) *trans*-resveratrol standard (d) Spiked with a *trans*-resveratrol standard.

범위는 0.018~1.125 µg/g으로 Sanders *et al.*(2000)와 Ibern-Gomez *et al.*(2000) 등이 보고한 결과와 같이 품종간 차이를 나타내었고 5%수준에서 유의차를 나타내었다. 그러나 초형 및 립 크기와 *trans*-resveratrol함량과는 일정한 경향을 보이지 않았던 점으로 미루어 보아 초형이나 립 크기보다는 품종간의 차이에 기인된 것으로 생각된다.

땅콩 부위별 *trans*-resveratrol 함량

땅콩 종피와 종실에서의 함량은 종피를 포함하지 않은 일반 종실만의 경우 품종별 0.152~0.305 µg/g이었으며, 종피를 포함한 일반 종실의 *trans*-resveratrol의 함량은 품종별 0.188~0.345

Table 2. *trans*-Resveratrol content in peanut varieties.

Varieties	Botanical type	Grain size	<i>trans</i> -Resveratrol content (µg/g)
Milyang 16	Spanish	L ¹⁾	0.312 ^d
Daekwang	Spanish	M	0.318 ^d
Shinnamkwang	Virginia	L	0.188 ^a
Palkwang	Virginia	M	0.345 ^{cd}
Sadle	Spanish	M	0.161 ^e
Hokwang	Virginia	L	0.176 ^e
Namkwang	Virginia	L	0.135 ^e
Sadonoga	Virginia	M	0.536 ^b
Daechong	Spanish	L	1.125 ^a
Jeokwang	Spanish	S	0.396 ^c
Gipung	Spanish	M	0.018 ^f

¹⁾ L; large, M; middle, S; small.

*Extract condition; at 25°C 80% EtOH for 45 min.

*Small letters compare the mean values at 0.05 probability of DMRT

Table 3. *trans*-Resveratrol content of seed with testa and not in peanut.

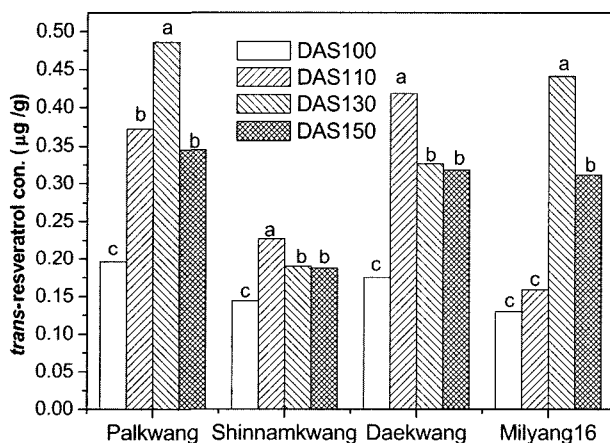
Varieties	<i>trans</i> -Resveratrol cont.(/g)	
	with testa	without testa
Palkwang	0.345**	0.305**
Shinnamkwang	0.188	0.152
Daekwang	0.318	0.285
Milyang16	0.312	0.255

**Signification at 1% probability level

μg/g이었다(Table 3). 이상의 결과로 보아 *trans*-resveratrol의 함량은 각 품종 공히 종피를 제거한 일반종실보다 종피를 포함한 경우가 높았지만, 땅콩 g당 종피에서의 *trans*-resveratrol의 함량은 약 0.036~0.040 μg/g으로 Sanders *et al.*(2000)가 종실보다 종피에서 *trans*-resveratrol 함량이 훨씬 많이 검출되었다는 보고와는 차이가 있다. 이는 사실상 평균 종피 무게는 0.04~0.07g에 불과하므로 실제 종피가 땅콩 종자의 *trans*-resveratrol 함량에 미치는 영향은 적으나, 종피에도 *trans*-resveratrol이 다량 함유되어 있으므로 종피를 함께 이용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

생육시기별 *trans*-resveratrol 함량

생육시기별 *trans*-resveratrol 함량 변화는 Fig. 5에서의 같이 품종에 따라 파종 후 110~130일에 최대로 증가한 후 점차 감소하는 경향을 보였으며, 품종별로는 신남광땅콩과 대광땅콩은 파종 후 110일에 각각 0.227 μg/g, 0.418 μg/g, 풋땅콩용인 팔광땅콩과 밀양16호는 파종 후 130일에 각각 0.486 μg/g, 0.441 μg/g으로 가장 많았다. 이상의 결과에서 각 품종 공히 완전성숙 이전 즉 풋땅콩용의 적정 수확시기(개화 후 71일)

**Fig. 5.** Change of *trans*-Resveratrol content with days after sowing(DAS) in peanut. Small letters compare between the mean values with days within the same variety at 0.01 probability of DMRT.

에 *trans*-resveratrol함량이 가장 많은 점으로 보아 금후 풋땅콩 이용 증진과 관련된 심화된 연구가 필요하다 하겠다.

적 요

본 연구에서는 땅콩의 resveratrol에 대한 체계적인 연구를 위하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 땅콩의 *trans*-resveratrol 분석체계 확립과 품종 및 생육시기별 *trans*-resveratrol 함량 변화를 구명하여 금후 고부가가치 고품질 가능성 품종개발의 기초 자료로 활용하고자 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. HPLC를 이용한 *trans*-resveratrol 분석조건은 컬럼은 Xterra C₁₈, 이동상 용매조성은 (A) glacial acetic acid : DCW (52.6 : 900)과 (B) acetonitril : solution A(80 : 20), 용매흐름속도는 1.1 ml/min, 검출기는 UV-Vis detector 308 nm 이었다.

2. 땅콩에서 *trans*-resveratrol 추출시 추출용매의 경우 80%EtOH과 80%MeOH이 유의차가 없었고, 추출온도의 경우에도 온도간 유의성이 인정되지 않았으며, ICH guideline에 따른 안전성과 경제성을 고려한 *trans*-resveratrol의 최적추출 조건은 80% EtOH, 25°C, 45분이었다.

3. 땅콩 품종별 *trans*-resveratrol 함량 분포범위는 0.018~1.125 μg/g으로 품종별 유의차가 있었으나, 초형과 립 크기에 따른 *trans*-resveratrol 함량은 일정한 경향을 보이지 않았다.

4. 종실과 종피를 포함한 종실의 *trans*-resveratrol 함량은 종실(0.152~0.305 μg/g) 보다 종피를 포함한 종실(0.188~0.345 μg/g)에서 더 높았다.

5. 생육시기별 *trans*-resveratrol 함량은 신남광땅콩(0.227 μg/g)과 대광땅콩(0.418 μg/g)은 파종 후 110일에 팔광땅콩(0.486 μg/g)과 밀양16호(0.441 μg/g)는 파종 후 130일에 가장 높았다.

인 용 문 헌

- Ana, I. R.P., Rosa, M. L.R., Cristina, A.L., 2001. Method for the quantitative extraction of resveratrol and picid isomers in grape berry skins. effect of powdery mildew on the stilbene content. *J. Agric. Food Chem.* 49 : 210-215.
- Chu, Q., O'Dwyer, M., Zeece, M.G. 1998. Direct analysis of resveratrol in wine by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 46 : 509-513.
- Domínguez, C., Guillén, D.A., Barroso, C.G. 2001. Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *J. of Chromatography A* 918 : 303-310.
- Dourtoglou, V.G., Makris, D.P., Fabienne, B.D., and Zonas, C. 1999. *trans*-Resveratrol concentration in wines produced in greece. *J. of Food Comp. and Anal.* 12 : 227-233.
- Ibern-Gomez, M., Roig-Perez, M., Lamuela-Raventós, R.M., de la

- Torre-Boronat, M.C. 2000. Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut. *J. Agric. Food Chem.* 48 : 6352-6354.
- Jeandet, P., Céline Breuil, A., Weston, L.A., Debord, S., Meunier, P., Maume, G., Bessis, R. 1997. HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Anal. Chem.* 69 : 5172-5177.
- Lamuela-Raventós, R.M., Romero-pérez, A.I., Waterhouse, A.L., de la Torre-Boronat, M.C. 1995. Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in spanish red vitis vinifera wines. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 281-283.
- Powell, R.G., Tepaske, M.R., Plattner, R.D., White, J.F., Clement, S.L. 1994. Isolation of resveratrol from festuca versuta and evidence for the widespread occurrence of this stilbene in the poaceae. *Phytochemistry*. 35 : 335-338.
- Romero-pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Andres-Lacueva, C., Cristina, A.L., de la Torre-Boronat, M.C. 2001. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skin. effect of powdery mildew on the stilbene content. *J. Agric. Food Chem.* 49 : 210-215.
- Sanders, T.H., McMichael, R.W., Hendrix, K.W. 2000. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J. Agric. Food Chem.* 48 : 1243-1246.
- Siemann, E.H., Creasy, L.L. 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J enol Vitic* 43 : 49-52.
- Sobolev, V.S., Cole, R.J. 1999. trans-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 1435-1439.
- Vassilis, G.D., Dimitrios, P.M., Fabienne, B.D., Christophoros, Z. 1999. Trans-Resveratrol concentration in wine produced in greece. *J. Food Comp. and Anal.* 12 : 227-233.