

시판 녹황색 채소류 중의 플라보노이드 함량과 조리과정에 의한 변화

조 정 옥 · 정 인 창*

대구광역시 보건환경연구원, 동해대학교 관광의식산업학과*

Analysis of Flavonoids in Raw and Blanching of Several Green-Yellow Vegetables

Jeong-Ok Jo and In-Chang Jung*

Dept. of Food Analysis, Institute of Health and Environment, Taegu 706-042, Korea

*Dept. of Tourism and Food Service Industry, Tonghae University, Tonghae City, 240-150, Korea**

Abstract

Flavonoids in commercial green-yellow vegetables(carrot, mugwort, perilla leaf, leek and water dropwort) were analyzed by HPLC. Flavonoids analyzed in samples were myricetin, luteolin, quercetin, apigenin and kaempferol. When 2N HCl and a reaction period of 1 hour was used, quercetin and kaempferol could be detected in leek and water dropwort, luteolin and apigenin could be detected in perilla leaf. Increasing reaction period up to 6 hours with 2N HCl led a degradation of quercetin and kaempferol to approximately 90% in leek and water dropwort, but it led to a increasing of luteolin and apigenin of maximum 300% in perilla leaf. After the blanching process, the amount of the flavonoids increased whereas the components of the flavonoids were not changed.

Key words: green-yellow vegetables, flavonoids, HPLC.

I. 서 론

산업이 발달하면서 생활은 풍요로워졌지만 환경오염은 더욱 심해졌으며, 스트레스 발생, 운동량 부족, 식습관의 변화로 인하여 각종 질병이 급격히 늘어나고 있다. 현재까지 제약 및 의학적인 방법이 질병의 주된 치료방법으로 이용되어 왔지만 치료의 한계성 및 부작용의 발현 등으로 많은 제약을 받고 있으며,

항암치료법 개발에 있어서도 직접적인 독성을 가지는 기존의 불완전한 암치료에 병행하여 생체의 방어 기능, 특히 숙주의 암세포에 대한 면역능을 증강시켜 줌으로써 항암효과를 거두려는 시도가 보고되고 있다^{1,2)}. 또한, 최근에 녹황색 채소류의 섭취가 만성질환의 발생을 억제 또는 지연시킨다는 연구결과가 보고^{3,4)}되면서 부터 만성질환의 치료방법으로서 식이요법을 중요하게 생각하게 되었다.

한편 식물체에 널리 분포되어 있는 플라보노이드

는 수용성 색소로 식물세포의 액포중에 배당체 형태로 존재하며 기본구조인 2-phenylbenzopyrone에 결합하는 히드록실 그룹의 수와 위치에 따라 구분된다. Sorata 등⁵⁾은 플라보노이드가 리놀산에 대한 항산화 효과를 가지며, hesperidin, rutin, quercetin, luteolin 등은 bioflavonoid로 다량의 비타민 C와 함께 존재할 때는 생체내 혈관의 지나친 투과성을 억제시켜주는 약리작용을 가진다고 하였다. 또한 Samejima 등⁶⁾은 식품에서 얻은 quercetin 등의 플라보노이드가 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 항돌연변이와 항발암 효과를 가진다고 보고하였으며, Hertog 등⁷⁾은 플라보노이드 섭취가 가장 높은 군이 가장 낮은 군보다 관상동맥심장병의 발생율이 68% 감소하였다고 보고하였다. 우리나라에서도 이 등⁸⁾이 30여종의 녹황색 채소류에 대해 aflatoxin B₁과 4-NQO(4-nitroquinoline-1-oxide)에 대한 항돌연변이 효과를 실험한 결과 대부분의 시료에서 항돌연변이성을 관찰하였으며, 박 등⁹⁾은 26종의 시험채소 중 24종이 MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)에 대한 항돌연변이성이 있다고 보고하였다. 그러나 국내에서는 채소류에 관해서 메밀과 메밀 식품에서 플라보노이드 색소인 rutin 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 것이 있을 뿐 일반 채소에 대해서 플라보노이드 색소의 함량 및 분포에 관한 분석이나, 조리과정을 거쳤을 때 색소의 성분변화 비교에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 우리나라 일반 가정에서 주로 섭취하는 채소를 대상으로 HPLC를 이용하여 플라보노이드 색소의 분포 및 함량 변화를 알아보고 데치기를 하였을 때 색소에 어떠한 변화가 있는지를 비교 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

대구시내 대형유통센터 3곳에서 4월에 무작위로 3회 구입한 당근(carrot), 깻잎(perilla leaf), 썩(leek), 미나리(mugwort), 부추(water dropwort)의 5가지 시료를 비가식 부위를 제거한 후 증류수로 세척하여 실험 재료로 사용하였다.

2. 시약 및 기기

표준품(Sigma, Co.)인 아세토니트릴, 아세톤, 석유에테르, 메탄올(Merk, Co.)은 HPLC용을 사용하였으며, 초산, 클로로포름, 무수황산나트륨 등은 실험용 시약 특급을, 증류수는 비저항계수 18m Ω 이상의 순수한 물을 사용하였다. HPLC(Spectra Physics, Co), UV분광광도계(unicon 930, KONTRON, Co)는 KONTRON사의 uicon 930을 그리고 진공회전농축기(RE121, Buchi, Co)는 Buchi RE 121을 사용하였다.

3. 분석방법

1) 시료의 처리

구입한 시료는 각각 혼합하여 이등분한 후 반은 생것으로 분석하였다. 나머지 반은 일반 가정에서 주로 사용되는 형태인 시료 무게의 5배량에 해당하는 끓는 3% 소금물로, 채소의 종류에 따라 3~5분간 데치기하여 조직의 연화와 함께 채소의 녹색이 선명하게 유지되도록 하였다. 이들 시료를 적당한 크기로 세절한 후 믹서기에서 균질하게 마쇄하여 분석시료로 하였다.

2) 플라보노이드의 스펙트럼 분석

표준물질인 myricetin, luteolin, quercetin, apigenin, kaempferol을 각각 메탄올에 용해한 후 일정 농도로 희석하여 200nm에서 500nm 사이의 흡광도를 분광 광도계로 측정하였다.

3) 플라보노이드의 HPLC 분석

믹서기로 균질화한 시료 20g을 각각 5배량에 해당하는 메탄올로 추출용액의 색이 나타나지 않을 때까지 추출기로 반복 추출하였다. 추출물에 2g의 활성탄을 첨가한 후 여과하고 추출액은 40°C에서 감압농축기를 이용하여 증발 건조시켰다. 이 잔류물에 2N 염산 50ml를 넣어 90°C의 항온 수조에서 환류 냉각기를 부착하여 1시간 가수분해한 것을 가수분해 조건 I로 하였으며, 같은 방법으로 2N 염산 50ml를 넣어 6시간 가수분해 한 것을 가수분해 조건 II로 하여 각각을 실온에서 냉각시킨 다음 에틸아세테이트

Table 1. HPLC condition of flavonoids analysis

Operating conditions	
Instrument	SP 8810, Spectra 200
Column	Lichrosorb RP-18 (244 mm×4.0 mm ID, 5 μm)
Guard column	RP-18 NEWGUARD (7 micron, 15 mm×3.2 mm ID)
Detector	UV 350 nm
Mobile phase	(A) Acetonitrile : H ₂ O = (75 : 24) (B) THF : Dioxane : MeOH : Acetic acid : 5% H ₃ PO ₄ : H ₂ O = (145 : 125 : 50 : 20 : 2 : 658)
Flow rate	1.0 ml/min
Chart speed	0.25 cm/min
Attenuation	32
Injection volumn	10 μl

20ml 씩으로 3회 추출하여 40°C에서 감압농축하여 증발건조시켰다. 이 잔류물에 메탄올 5ml를 넣어 용해하고 0.45 μm 여과기를 사용하여 여과한 후 시험용액으로 하였으며 HPLC 조건은 Table 1과 같다.

III. 결과 및 고찰

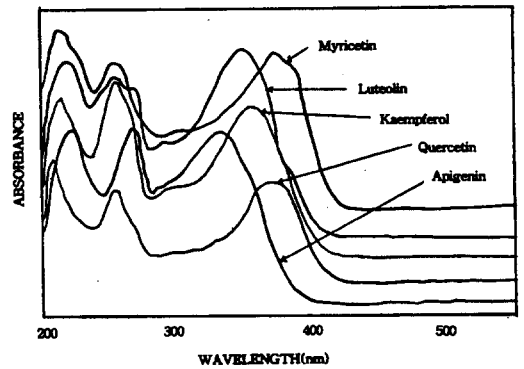
1. 데치기에 따른 시료의 수분함량 변화

실험에 사용된 당근, 깻잎, 쑥, 미나리, 부추의 비가식 부위를 제거한 후 시료 부피의 5배에 해당하는 3% 소금물로 데치기한 후 수분함량 변화를 관찰하였다.

Table 2와 같이 데치기 시간을 다른 시료에 비하여 비교적 짧게 가진 들깻잎과 부추의 경우에만 데치기 후 수분함량이 조금 감소하였으며, 그 외 시료의 수분함량은 증가하였다. 그러나 대부분 생것과 수

Table 2. Water contents of edible portions of raw and blanched vegetables

Materials	Blanching time(min)	Water content (%)	
		Raw	Blanching
Carrot	5	90.4	92.5
Perilla leaf	3	85.1	80.3
Leek	4	89.0	87.0
Mugwort	4	79.4	79.5
Water dropwort	4	91.4	92.4

**Fig. 1.** Absorption spectra of myricetin, luteolin, quercetin, apigenin and kaempferol.

분함량이 2% 미만으로 거의 차이를 나타내지 않았다.

2. 플라보노이드의 스펙트럼 분석

표준물질인 myricetin, luteolin, quercetin, apigenin, kaempferol 각 표준용액을 메탄올에 용해하고 일정 농도로 희석하여 200 nm에서 500 nm 사이의 흡광도를 측정하였을 때 각 파장에서의 흡수 스펙트럼은 Fig. 1과 같다. 플라보노이드의 흡수 스펙트럼은 보통 두 개의 특수 흡수파장으로 구성된다고 하나 본 실험에서는 세 개의 특수 흡수파장으로 나타났다. Fig. 1에서처럼 200~280 nm 사이에서도 강한 흡광도를 나타내었지만, 시료의 HPLC 분석에서 방해 피크가 검출되었으므로 350 nm를 스펙트럼 분석 파장으로 사용하였다.

3. 검량선의 작성

표준물질은 quercetin, myricetin, luteolin, apigenin, kaempferol 각 10mg을 메탄올 10ml에 용해하여 표준원액으로 하였다. 이 표준원액을 일정량씩 취하여 10, 50, 100, 150, 200 μg/ml 되게 희석하고 각각 3회 HPLC에 주입한 후 각각의 크로마토그램에서 얻은 피크면적을 이용하여 각 플라보노이드의 회귀방정식을 구한 결과, Fig. 2와 같이 quercetin은 $Y = 14.09x - 408259.3 (r = 0.9987)$, luteolin은 $Y = 25.59x - 257546.2 (r = 0.9995)$, myricetin은 $Y = -10.80x - 127938.5 (r = 0.9994)$, apigenin은 $Y = 12.69x + 14273.5$

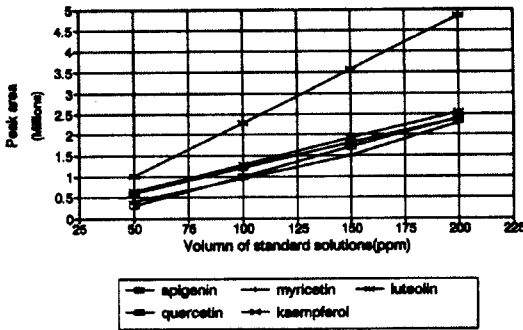


Fig. 2. Calibration curves of myricetin, luteolin, quercetin, apigenin and kaempferol.

($r = 0.9981$) 그리고 kaempferol은 $Y = 11.88x + 19896.6$ ($r = 0.9998$)인 검량선을 얻었다.

4. 채소류 중의 플라보노이드

본 연구에서는 항발암 연구에서 가장 넓게 연구되어진 quercetin, kaempferol, myricetin의 flavonol 세 가지와 luteolin과 apigenin 같은 flavones 두가지를 분석에 이용하였다.

플라보노이드는 플라본의 기본구조에 결합하는 히드록실 그룹의 수와 위치에 따라 다르며 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins, flavanones으로 구성된다. 또한 플라보노이드는 자연계에 유리상태로 존재하기도 하나 대개의 경우 당류와 결합하여 배당체의 형태로 존재하며 결합되는 당류로서는 rhamnose, glucose, rutinose 등이다. quercetin의 경우 배당체가 70종 이상에 달한다고 하며¹⁰⁾, 배당체의 형태로 존재할 경우 본 연구에서 비교한 rutin, isoquercitrin, quercitrin은 aglycone인 유리상태보다 크로마토그램의 앞부분에서 각각 다른 머무름 시간에 검출된다. 이와 같이 결합하는 당류에 따라 HPLC에 검출되는 머무름 시간이 다양함으로 본 연구에서는 배당체 표준품 및 시료를 가수분해시켜 aglycone 상태로 분석하였다.

플라보노이드 가수분해 조건 I로 이들 플라보놀 배당체 표준품인 rutin, isoquercitrin, quercitrin을 가수분해하여 HPLC에 주입한 결과 세 표준품 모두 가수분해되어 quercetin으로 검출되었다. 그래서 이

들 배당체 표준품이 aglycone으로 가수분해 되어 나오는 가수분해 조건 I로 시료에 실시한 결과, 표준품인 rutin, isoquercitrin, quercitrin의 머무름 시간에 시료에서도 같은 피크가 검출되었는데 이것은 가수분해 조건 I로 가수분해 되지 않는 다른 물질들이 존재하는 것을 나타내는 것으로, 시료중 quercetin이 검출되지 않고 quercitrin의 머무름 시간에 피크 면적의 70% 이상을 차지하는 피크가 검출된 껌잎을 대상으로 가수분해 조건의 추가 실험을 하였다. 2N, 4N 염산으로 2시간, 4시간, 6시간 가수분해한 결과 2N 염산으로 6시간 가수분해하였을 때 quercitrin의 머무름 시간에 해당하는 피크가 분해되어 가장 적당하였다. 따라서 시료별 최적 가수분해 조건은 다르지만¹¹⁾, 2N 염산으로 6시간 환류하여 시료를 재분석하였다.

Quercetin, kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin을 표준품으로 하여 가수분해 조건 I로 분석하였을 경우(Table 3)는 부추와 미나리에서 quercetin과 kaempferol이 검출되었으며, 껌잎에서는 apigenin과 luteolin이 검출되었다. 또한 가수분해 조건 II로 분석한 경우(Table 4)에는 껌잎에서 luteolin과 apigenin

Table 3. Flavonoid contents of edible portions of raw and blanched vegetables after hydrolysis in 2N HCl for 2h (unit : $\mu\text{g}/100\text{g}$, wet weight)

Materials	Myricetin	Luteolin	Quercetin	Apigenin	Kaempferol
Carrot					
raw	ND	ND	ND	ND	ND
blanching	ND	ND	ND	ND	ND
Perilla leaf					
raw	ND	1,135	ND	2,035	ND
blanching	ND	2,096	ND	2,124	ND
Leek					
raw	ND	ND	533	ND	1,939
blanching	ND	ND	554	ND	2,409
Mugwort					
raw	ND	ND	ND	ND	ND
blanching	ND	ND	ND	ND	ND
Water dropwort					
raw	ND	ND	12	ND	307
blanching	ND	ND	94	ND	994

ND: Not Detected

Table 4. Flavonoid contents of edible portions of raw and blanched vegetables after hydrolysis in 2N HCl for 6h (unit : $\mu\text{g}/100\text{g}$. wet weight)

Materials	Myri- cetin	Lute- olin	Quer- cetin	Apig- enin	Kaem- pferol
Carrot					
raw	ND	ND	ND	ND	ND
blanching	ND	ND	ND	ND	ND
Perilla leaf					
raw	ND	1,658	ND	5,561	ND
blanching	ND	4,642	ND	9,130	ND
Leek					
raw	ND	ND	Tr	ND	132
blanching	ND	ND	21	ND	152
Mugwort					
raw	ND	Tr	ND	Tr	ND
blanching	ND	Tr	ND	Tr	ND
Water dropwort					
raw	ND	ND	Tr	ND	Tr
blanching	ND	ND	Tr	ND	Tr

ND: Not Detected, Tr: trace

의 증가가 있었으며, 썬에서도 luteolin과 apigenin이 미량 검출되었다. 이 결과로 미루어 보아 시료중에는 flavonol glycoside 보다 가수분해가 훨씬 느리게 진행되는 flavonol glucuronide 결합이나 flavone glycoside가 존재함을 알 수 있었으며, 깻잎의 경우 quercitrin의 머무름 시간에 해당하는 물질은 apigenin의 배당체로 추정할 수 있었다. 그러나 가수분해 조건 I에서 검출되었던 미나리와 부추의 quercetin, kaempferol은 90%이상 파괴되었다. 이와같은 사실은 반응 시간과 산 농도에 따라 가수분해율이 달라지므로 완벽한 가수분해를 위해서는 각 시료마다 최적 조건이 고려되어야 함을 의미한다. 따라서 정확한 플라보노이드의 측정을 위해서는 시료에서 색소를 완벽하게 추출하는 것과 시료에 따른 최적 가수분해 조건을 찾는 것이 필요하다. 시료 추출후에는 2% 비율로 활성탄을 첨가하여 클로로필이나 왁스 물질을 제거하는 것이 필요하며 이때 플라보놀의 회수율은 98%이상임을 Bilyk 등¹²⁾은 보고하였다.

플라보노이드의 HPLC 이동상으로는 아세트니트릴:인산완충액(25:75)^{7,11)}, 물:초산:메탄올(42:8:50)¹³⁾, 그리고 물:아세트니트릴:THF(tetrahydrofur-

an):빙초산(80:16:3:1)¹⁴⁾을 사용한 경우도 있지만 본 실험에 사용한 이동상으로 분석한 경우 시간을 단축하며 분리 효율이 양호하였다.

일반적으로 식물계에 많이 존재한다고 알려진 quercetin, kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin 중 본 실험에 사용한 시료에서는 미나리와 부추에서 quercetin과 kaempferol이 검출되었고 깻잎에서 apigenin과 luteolin이 검출되었다. 이것은 Hertog 등¹⁵⁾이 네델란드에서 상용되는 28 종류의 채소와 9 종류의 과일을 분석하였을 때 채소에서 주로 발견된 플라보노이드는 quercetin과 kaempferol이었다는 보고와, Bilyk와 Sapers¹³⁾가 상치, 케일 등 몇 종류의 채소를 분석하였을 때 주로 검출된 것을 quercetin과 kaempferol이었으며 myricetin은 검출되지 않았다는 보고와 비슷하였다. 또한 Hertog 등¹⁵⁾은 luteolin이 red bell pepper에서, apigenin은 셀러리에서, 본 시료에서는 검출되지 않은 myricetin은 신선한 콩에서 검출되었다고 보고하였으며, 서양부추와 꽃상추, 순무 어린잎의 평균 kaempferol 함량은 대부분의 다른 채소에서 보다 높았다고 보고하였다. 그리고 본 실험에서 당근은 사용한 플라보노이드 중 어느 것도 검출되지 않았는데, 이것은 당근, 오이, 시금치, 버섯에서는 quercetin, kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin 중 어느 것도 검출되지 않았다는 것¹⁵⁾과 일치한다. 이와 같이 플라보노이드 함량은 시료의 생장 정도와 품종에 따라 다양한 차이가 있을 수 있으며^{12,13)}, 시료의 분석 방법에 따라라도 차이가 있을 수 있다⁷⁾. 그리고 생것과 데친것을 비교할 때 가수분해 조건 I, II 모두 데친것에서 각각 플라보노이드 색소의 함량 증가가 있었다.

IV. 요약

시판 녹황색 채소를 대상으로 하여 생것과 3% 묽은 소금물에 데치기 한 후의 플라보노이드 색소 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과는 다음과 같다.

플라보노이드 색소인 myricetin, luteolin, quercetin, apigenin, kaempferol을 분석한 결과 2N 염산으로 1시간 가수분해하였을 때는 미나리와 부추에서 quercetin과 kaempferol이, 깻잎에서 luteolin과 api-

genin이 검출되었다. 한편, 2N 염산에서 1시간 가수분해하였을 때 미나리와 부추에서 검출되었던 quercetin과 kaempferol은 2N 염산으로 6시간 가수분해하였을 때는 90% 이상 파괴되었지만 깻잎에서 검출된 luteolin과 apigenin은 최고 300% 이상의 증가가 있었다. 생것과 데친것의 비교에서는 생것보다 데친것에서 플라보노이드 색소의 함량 증가가 있었는데, 미나리에서 검출된 quercetin과 kaempferol은 높은 증가를 나타내었으며, 깻잎에서 검출된 luteolin과 apigenin도 60% 이상의 증가가 있었다.

실험에 사용한 시료 모두에서, 플라보노이드 색소의 구성 성분에는 변화가 없었으나 생것과 비교하였을 때 데친 것에서 함량 증가가 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 채소류는 끓는 3% 소금물에 살짝 데친 후에 섭취하는 것이 플라보노이드 색소의 이용 측면에서 유용하다고 생각된다.

V. 참고문헌

- Ortaldo, J. R. and Longo, D. L.: Human natural lymphocyte effector cell: Definition, analysis of a activity and effectiveness, J. Nat. Can. Inst., 80: 999-1008, 1988.
- Nielsen, H. J., Moesgaard, F. and Kehlet, H.: Ranitidine for prevention of postoperative suppression of delayed hypersensitivity. Am. J. Surg., 157: 291-294, 1989.
- Hirayama, T.: Nutrition and cancer - A large scale cohort study - in "Genetic toxicology of diet" Kundse.l (ed.) Alan R Liss, Inc., New York, p 200, 1986.
- Breesnick, E., Birt, D. F., Wolterman, K., Wheeler, M. and Markin, R. S.: Reduction in mammary tumorigenesis in the rat by cabbage and cabbage residue, Carcinogenesis, 11(7): 1159-1165, 1990.
- Sorata, Y., Takayama, U. and Kimura, M.: Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin, Biochem. Biophys. Acta, 799:313-319, 1984.
- Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H. and Danno, G.: Luteolin: A strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-P-2, in peppermint, sage, and thyme, J. Agric. Food Chem., 43(2):410-414, 1995.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. and Putte, B.: Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea Infusions, wines, and fruit juices, J. Agric. Food Chem., 41(8):1242-1246, 1993.
- 이경임, 박건영, 이숙희: Aflatoxin B₁과 4-NQO에 대한 녹황색 채소류의 항돌연변이 효과, 한국영양식량학회지, 21(2):143-148, 1992.
- 박건영, 이경임, 이숙희: 녹황색 채소류의 돌연변이유발 억제 및 AZ-521 위암세포의 성장 저해효과, 한국영양식량학회지, 21(2):149-153, 1992.
- 우원식: 천연물 화학 연구법, 민음사: 서울, 91-100, 1984.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. and Venima, D. P.: Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, J. Agric. Food Chem., 40(9):1591-1598, 1992.
- Bilyk, A., Cooper, P. L. and Sapers, G. M.: Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion(*Allium cepa* L.) tissue, J. Agric. Food Chem., 32(2):274-276, 1984.
- Bilyk, A. and Sapers, G. M.: Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek, horseradish, red radish, and red cabbage tissues, J. Agric. Food Chem., 33(2):226-228, 1985.
- Mouly, P. P., Arzouyan, C. R., Gaydou, E. M. and Estienne, J. M.: Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides, J. Agric. Food Chem., 42(1):70-79, 1994.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. and Katan, M. B.: Content of potentially carcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, J. Agric. Food Chem., 40(12):2379-2383, 1992.