

제비콩 잎의 isoflavone 함량 및 성분 분석

김용욱*[†] · 임세진** · 김명애*** · 최우철* · 윤홍태****

*동국대 생명자원과학대학, **동덕여대 약학대학, ***동덕여대 자연과학대학, ****작물시험장

Determination and Isolation of leaf Isoflavone in Hyacinth Bean

Yong-Wook Kim*[†], Se-Jin Lim**, Myoung-Ae Kim***,
Woo-Chul Choi* and Hong-Tae Yoon****

*Colleges of Biological Resource Science, Dongguk Univ., Seoul 100-715, Korea

**Colleges of Pharmacy, Dongduk Womens Univ., Seoul 136-714, Korea

***Colleges of Nature Sci, Dongduk Womens Univ., Seoul 136-714, Korea

****National Crop Experiment Station, RDA. Suwon 441-857, Korea

ABSTRACT : Legume seed isoflavones may have a variety of desirable physiological effect on the human health including both the circulatory and skeletal systems. The present study was performed to determine the isoflavone content of leaf and seed as well as to purify and identify the types of isoflavone from leaf extract of hyacinth bean (*Lablab purpureus* (L.) Sweet). Reverse phase HPLC revealed six different types of isoflavone such as daidzin, genistin, daidzein, genistein, 6''-o-acetyl genistin and 6''-o-acetyl daidzin in aqueous methanol extract from seeds and leaves of the hyacinth bean. Relatively, leaf isoflavone content of hyacinth bean was greater than seed isoflavone content. Using DiAion HP-20 silica gel and sephadex LH-20 chromatography, pure daidzein was identified in the ether layer, whereas genistin was in the EtOAc fraction.

Keywords : legumes, hyacinth, isoflavone content, isoflavone isolation.

최근에 와서 식품의 영양성과 기호성 외에 식품이 지니는 기능성을 중요시하려는 경향이 점차 높아지고 있는데 한국은 많은 유용한 식물자원과 풍부한 경험에 의한 정보를 갖고 있으면서도 과학적이고 체계적인 연구가 미흡하여 이용기술 개발이 활발하지 못하고 있는 실정이다. 그러므로 시장개방과 국제화시대를 맞이하여 기술보호주의가 증가하고 물질특허가 도입되면서 빠른 시간 내에 대응할 수 있는 기술개발의 필요성이 요구되고 있는 점을 감안한다면 예전부터 관습적으로 이용해온 식물자원에 대한 체계적 연구가 필요하다고 사료된다.

제비콩(*Lablab purpureus* (L.) Sweet)은 한국에서는 널리 재배되고 있지 않고 주로 남부지방에서 일부 농가에서 재배하고

있는 실정이며 생육 중에 잎에서의 독특한 향기가 나고 만화성인 작물로 잎의 수량이 많고 때로는 울타리용의 관상식물로 재배되기도 한다. 제비콩 잎은 특히 열대지방에서 소화기병, 부인병 등에 널리 사용되고 있으며 한국에서도 예전부터 약용으로 사용되어 왔으나 아직도 성분의 분리 및 확인, 임상효과에 대한 과학적인 연구가 보고되고 있지 않다. 그러므로 제비콩 잎에 대한 유효성분의 분리 및 확인과 임상효과에 대한 연구는 유휴자원의 활용 면에서 그 가치가 높다고 사료된다.

콩의 기능성 물질로 식이섬유, 올리고당, 피트산, 사포닌, 아이소플라본 등이 알려지고 있는데 이러한 물질 중 isoflavone은 크게 각광을 받고 있으며 daidzein과 genistin이 Walter (1941)에 의해 분리되었으며 Naim *et al.*(1973)은 glycitein을 분리하였다. 또한 6''-o-acetyl daidzein과 6''-o-acetyl genistin이 분리되었고(Ohta *et al.*, 1979, 1980) 최근 6''-o-malonyl daidzein과 6''-o-malonyl genistin이 분리되었고, 콩에 들어있는 isoflavone은 주로 malonyl 유도체인 것으로 보고되었다(Kudou *et al.*, 1991).

Choi *et al.*(1996)은 한국 콩 품종을 공시하여 isoflavone의 함량을 분석한 결과 전체 isoflavone의 함량변이는 품종에 따라 크게 차이가 있었으며 genistein과 daidzein이 가장 많이 검출되었고 glycitein은 미량이 검출되었음을 보고하였다. Kim & Kim(1996)은 콩의 부위별 isoflavone 함량을 분석한 결과 배축은 자엽보다 높은 농도의 isoflavone을 함유한다고 보고하였고, isoflavone 함량은 품종 및 재배환경에 따라 큰 변이를 나타내며(Eldridge & Kwolek, 1983), 생육단계에 따라서도 차이를 보이고(Yi *et al.*, 1997), 등숙기의 온도에 따라 isoflavone의 함량에 영향을 미친다고 보고하였다(Kitamura *et al.*, 1991).

동물 실험에 의하면 콩의 isoflavone 섭취는 에스트로젠 약화기능과 유방암 예방에 효과가 있고(Messina *et al.*, 1994)

[†]Corresponding author: (Phone) +82-2-2260-3309 (E-mail) Kimyw@dongguk.edu <Received July 20, 2001>

isoflavone에 대한 생리활성 연구가 보고되면서 isoflavone 함량 증가에 대한 과제가 중요시되고 있다. Isoflavone 성분중 genistein은 암세포 증식에 관여하는 효소인 tyrosine-specific protein 작용을 저해하여 발암억제효과가 있고(Akiyama *et al.*, 1987), daidzein은 노인과 여성의 골다공증과 항산화 기능의 효과를 보고하였다(Naim *et al.*, 1976).

따라서, 본 연구는 제비콩잎에 대한 isoflavone의 성분분리 및 확인을 하고자 수행되었다.

재료 및 방법

물질의 추출

제비콩 종실은 전북 익산시 농가에서 구입하였고 제비콩 잎도 동일 농가에서 재배되고있는 식물체에서 개화직전에 채취하여 실험재료로 사용하였다.

제비콩 종실을 건조시킨 후 100 g 추출용기에 넣고 hexane 100 ml를 첨가한 후 3회 환류추출하여 지질성분을 제거하였고, 남은 잔사에 80% MeOH 용액 200 ml를 가하고 3회 환류추출한 다음 얻어진 MeOH 층을 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 제비콩잎 2 kg을 건조기에 건조시킨 다음 세절하여 추출용기에 넣고 80% MeOH를 사용하여 3회 추출한 후 모아진 MeOH를 감압하에서 제거하여 MeOH 엑스를 얻었으며, 여과지 whatman No. 540 여과지를 사용하였으나 섬유물질이 남아있어서 이를 제거하기 위하여 millipore C18 Sep-Pak cartridge를 사용하여 여과하였다.

성분 함량 분석

MeOH 추출물을 TLC를 이용하여 전개용매로 건조시킨 후 시각화하여 Rf값을 계산하였다. TLC는 Kilselgel 60 F254 plate(Merck Co.)를 사용하였고 전개용매는 *n*-hexane-actone (2:1), CHCl₃-MeOH(9:1), BuOH-acetic acid-water(4:1:1)를 사용하였으며 spot를 시각화하는데는 UV와 발색제(Phosphomolybdic acid)를 사용하였다.

HPLC 분석은 Shimadzu사의 HPLC system를 사용하였으며 역상 HPLC를 사용하여 gradient 조건으로 분석하였다. 분석에 사용한 컬럼은 ODS 계열의 YMCAM 303(4.6×250 mm)이었고, 이동상은 acetic acid를 0.1%씩 함유한 acetonitrile과 H₂O이었다. 유속은 1.0 ml/min으로 조절하였고, injection volume은 10 µl이었고 UV detector로 사용하여 262 nm의 파장에서 흡광도를 조사하였고 감도는 0.04이었다. 최적 resolution을 분석하였으며 acetonitrile 용액(0.1% acetic acid)를 10%에서 35%까지 50분에 걸쳐 완만하게 증가시켰다.

표준물질은 MeOH에 용해시켜 0.1~2.5 µg/ml 범위로 표준용액을 조절하였다. Peak area로부터 검량선을 작성하여 성분의 정성 및 정량을 표준물질의 peak와 비교하여 분석하였다.

성분의 분리 및 구조확인

제비콩 잎의 MeOH 추출물 30 g을 물과 ether의 혼합용매에 분산시킨 후 ether 층을 분리하였고, 이를 6회 반복하여 ether층을 감압농축시켜 ether 분획의 추출물을 얻었다. 남은 잔사에 EtOAc를 가하여 6회 반복 추출하여 EtOAc 엑스를 얻은 이후 남은 잔사에 *n*-BuOH를 가하여 4회 반복 추출하여 BuOH 엑스를 얻었고, 각각의 분획을 TLC로 분석하였다.

제비콩의 EtOAc, ether, BuOH 추출물 그리고 나머지 추출물의 유효성분을 확인하기 위하여 Dionex Dual pump Dx-500의 역상 HPLC를 사용하여 gradient 조건으로 분석하였다. 분석에 사용한 컬럼은 Prodigy 5u ODS(3) 100Å(4.6×250 mm)이었으며 유속은 1.5 ml/min으로 하였다. 이동상 A는 H₂O로 0.2% acetic acid를 사용하여 액상을 산성으로 한 후 NaOH를 pH3.8로 보정하여 사용하였고, 이동상 B는 MeOH를 사용하였다. 성분 peak는 262 nm에서 UV detector로 검출하여 성분의 정량 및 정성을 표준물질의 peak와 비교하여 분석하였다. Ether와 EtOAc 분획에 함유된 유효물질을 분리하기 위하여 DiaAion HP-20 column chromatography, silica gel column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 사용하였다. 분리한 compound I과 II는 ¹HNMR, ¹³CNMR, CosyNMR, 질량분석 등으로 구조를 확인하였다.

결과 및 고찰

Isoflavone 함량 분석

제비콩 종실 100 g을 1차적으로 hexane으로 환류추출하고 남은 잔사에 80% MeOH로 환류추출하여 5.5 g의 MeOH 추출물을 얻었고, 제비콩 잎에서는 80% MeOH로 환류추출하여 건물 중 1 kg당 110 g의 추출물을 얻었다. 제비콩 종실과 잎의 MeOH 추출물을 HPLC로 분석한 결과 Fig. 1과 2에서와 같이 잎에서는 daidzin, genistin, daidzein, genistein, 6"-o-acetyl genistin, 6"-o-acetyl daidzin의 6개 isoflavone과 종실에서는 acetyl 유도체를 제외한 4개의 isoflavone 물질을 확인할 수 있었으며 이러한 결과는 일반 콩 종자에서 확인된 성분과 유사한 것으로 나타났다(Walter 1941; Naim *et al.*, 1973; Ohta *et al.*, 1979, 1980).

잎에서 genistin과 genistein 함량이 종실과 비교하여 크게 높았고 전체 isoflavone 함량은 종실에서 100 g당 119 mg, 잎에서는 387 mg으로 종실보다 높았으며(Table 1), Yoon (2000)에 의하면 김정콩의 종실에서 isoflavone 함량이 100 g당 1,200 mg이었고 종피 색이 노란 황금콩에서 106 mg 검출되었다고 보고한 결과와 비교하여 볼 때 제비콩 잎의 387 mg은 일반콩 종실에서 보다 높은 함량을 나타내어 유향자원의 활용면에서 제비콩 잎은 높은 가치가 있을 것으로 사료되었다.

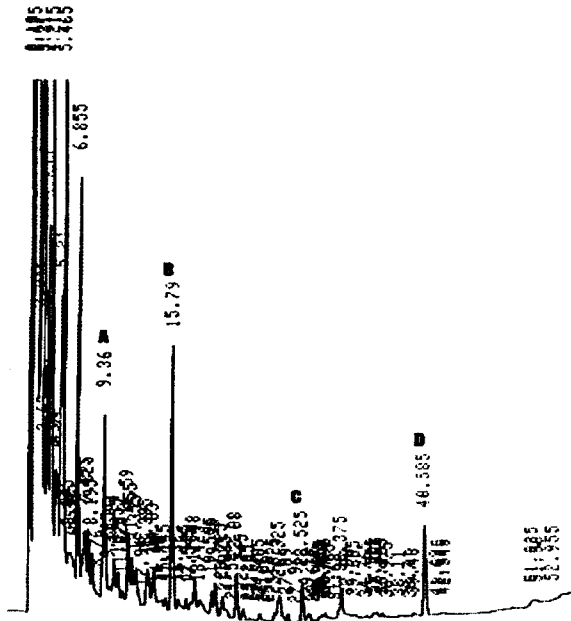


Fig. 1. Chromatography of methanol extract from hyacinth bean seed. A: Daidzin, B: Genistin, C: Daidzein, D: Genistein.

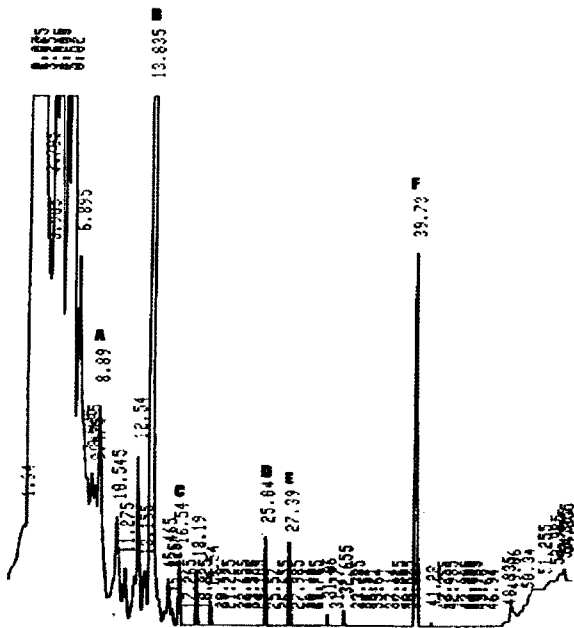


Fig. 2. Chromatography of methanol extract from hyacinth bean leaves. A: Daidzin, B: Genistin, C: 6''-o-acetyl-daidzin, D: 6''-o-acetyl-genistin, E: Daidzein, F: Genistein

성분의 분리 및 확인

제비콩 잎 MeOH 추출물 30 g을 물과 ether 용매에 분산시킨 후 ether 층을 분리하고 감압 농축시켜서 1.35 g의 ether 추출물을 얻었고, 남은 잔사에 EtOAC를 가하여 750 mg의 EtOAC 추출물 분획을 얻었으며 다시 남은 잔사에 n-hexane을 가하여 9.74 g의 BuOH 엑스와 H₂O층을 감압농축하여 7.22

Table 1. Isoflavone content of seed and leaves of hyacinth bean. (mg/100 g)

Isoflavone	Seed	Leaves
Daidzin	43	10
Genistin	67	256
Daidzein	5	13
Genistein	14	85
6''-o-acetyl-daidzin	-	8
6''-o-acetyl-genistin	-	14
Total	119	387
%	0.12	0.39

- : not detected

Table 2. Isoflavone of fraction from methanol extract of leaf of hyacinth bean. (mg/100 g)

Isoflavone	Ether	EtOAC	BuOH	H ₂ O
Genistin	-	14.7	-	-
Daidzein	9.2	2.3	-	-
Genistein	4.5	1.8	-	-
6''-o-acetyl-daidzin	1.2	2.5	-	-
6''-o-acetyl-genistin	-	7.6	-	-

- : not detected

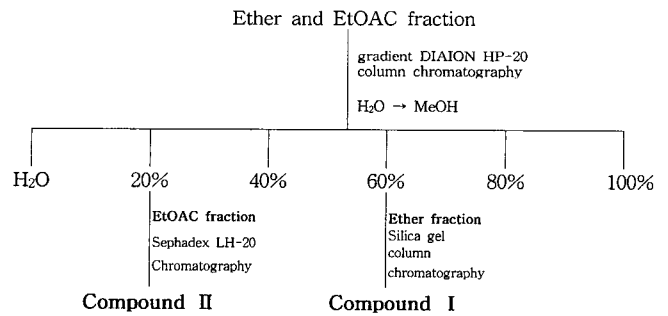


Fig. 3. Isolation of pure isoflavone from ether and EtOAC fraction of hyacinth bean leaf.

g의 H₂O 추출물을 얻었다. 각각의 분획을 TLC와 HPLC로 분석한 결과, EtOAC와 ether 층에는 다수의 isoflavone 화합물이 있었으며 BuOH과 H₂O층에서는 isoflavone을 검출할 수 없었는데, 이러한 원인은 이 두층에 mobile phase를 사용하여도 전개가 힘든 극성이 높은 다른 화합물이 존재하고 있는 것으로 판단되었다(Table 2).

Ether와 EtOAC 분획을 각각 DiAion HP-20 column chromatography 하여 H₂O, 20%~100% MeOH 분획을 얻었으며(Fig. 3), ether 분획에서는 60% MeOH 분획을 다시 silica gel column chromatography하여 compound I을 분리하였고, EtOAC 층에서는 20% MeOH 분획을 Sephadex LH-20 으로 chromatography하여 Compound II를 분리하였다(Fig. 3).

분리한 compound I과 II를 ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY

NMR, 질량분석 등으로 분석한 결과 질량분석에서 compound I은 electron-impact mass spectroscopy(EI-MS)방법에 의해 M+ peak가 발견되었으나, compound II는 해당하는 peak가 발견되지 않았다. 이는 EI-MS조건하에서 배당체 화합물이 분해되기 때문으로 사료된다. Compound II는 FAB-MS로 분석한 결과 분자량에 해당하는 peak가 발견되었다. compound I은 m/z 254, compound II는 433(M+1). ¹H NMR, ¹³C NMR spectroscopy의 결과는 다음과 같다.

Compound I

¹H NMR (DMSO-d₆) δ6.81 (2H, d, J=9.3 Hz, H3' and H5'), 6.87 (1H, s, H8), 6.94 (1H, d, J=10.5 Hz, H6), 7.38 (2H, d, J=8.4 Hz, H2' and H6'), 7.97 (1H, d, J=8.7 Hz, H5), 8.27 (1H, s, H2), 9.59 (1H, s, 4'-OH), and 10.86 (1H, s, 7-OH).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ102.01 (C8), 114.92 (C3'), 114.94 (C5'), 115.26 (C6), 116.34 (C4a), 122.54 (C3), 123.40 (C1'), 127.16 (C5), 130.00 (C2', C6'), 152.66 (C2), 157.19 (C8a), 157.45 (C4'), 162.96 (C7), 174.62 (C4)

Compound II

¹H NMR (DMSO-d₆) δ3.15-3.85 (6H, m, H2"-H6"), 5.06 (1H, d, J=7.3 Hz, H1"), 6.47 (1H, d, J=2.5 Hz, H6), 6.72 (1H, d, J=2.5 Hz, H8), 6.83 (2H, d, J=8.8 Hz, H3', H5'), 7.40 (2H, d, J=8.8 Hz, H2', H6'), 8.41 (1H, s, H2), 9.66 (1H, bs, C4'-OH), 12.92 (OH, bs, C5-OH).

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ60.6 (C6"), 69.6 (C4"), 73.1 (C2"), 76.4 (C3"), 77.2 (C5"), 94.6 (C8), 99.6 (C6), 99.9 (C1"), 106.1 (C10), 115.1 (C3', C5'), 121.0 (C1'), 122.6 (C3), 130.2 (C2', C6'), 154.6 (C2), 157.2 (C9), 157.5 (C4"), 161.7 (C5), 163.0 (C7), 180.5 (C4).

이상 분석된 데이터와 문헌의 데이터를 비교한 결과 compound I은 daidzein, compound II는 genistin으로 판정되었다.

적 요

본 실험은 제비콩 잎의 isoflavone 함량 분석과 isoflavone을 분리하고자 수행되었다.

1. MeOH 추출물을 역상 HPLC로 분석한 결과 제비콩잎에서는 daidzin, genistin, daidzein, genistein, 6"-o-acetyl genistin과 6"-o-acetyl daidzin의 6개 isoflavone 성분이 확인되었고,

종실에서는 두 개의 acetyl 유도체가 제외된 4개의 isoflavone 성분이 검출되었다.

2. Isoflavone 함량은 잎에서 100 g당 387 mg, 종실에서는 119 mg으로 잎에서 보다 높은 함량을 보였다.

3. MeOH 추출물을 여러 용매로 적용하여 분획물을 얻었으며, ether 층에서는 daidzein과 EtOAc 층에서 genistin을 순수 분리할 수 있었다.

인용문헌

- Akiyama, T., S. Ishida, H. Nakagawa, S. I. Ogawara, N. Watanabe, M. Itoh, M. Shibuya, and Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262 : 5592-5595.
- Choi, J. S., T. W. Kwon, and J. S. Kim. 1996. Isoflavone contents in some varieties of soybean. *Food and Biotechnology.* 5(2) : 167-169.
- Eldrige, A. C., and W. F. Kwolek. 1983. Soybean isoflavones : Effect of environment and variety on composition. *J. Agri. Food Chem.* 31 : 394-396. Kim, S. R., and S. D. Kim. 1996. Studies on soybean isoflavones. *RDA. J. Agri. Sci.* 38 : 155-165.
- Kitamura, K., K. Ijita, A. Kikuchi, S. Kudou, and K. Okubo. 1991. Low isoflavone content in some early maturity cultivars. so-called summer type soybeans (*glycine max(L.) Merrill*). *Japan J. Breeding.* 41 : 651-654.
- Kudou, S., Y. Fleury, D. Wilti, D. Magmolats, T. Uchida, K. Kitamura, and K. Okubo. 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*glycine max Merrill*). *Agri. Biol. Chem.* 55(9) : 2227-2233.
- Messina, M. V., Pershy R. Setchell, and S. Branes. 1994. Soy intake and cancer risk : A review of the in vitro and in vivo data. *Naturo. Cancer.* 113-131.
- Naim, M. B., Gestetner I. Koroson, Y. Birk, and A. Bondi. 1973. A new isoflavone from soya beans. *Phyto Chem.* 12 : 169-170.
- Naim, M. B., Gestetner I. Koroson, Y. Birk, and A. Bondi. 1976. Antioxidative and antihemolytic activity of soybean isoflavone. *J. Agri. Food Chem.* 24(6) : 1174-1177.
- Ohta, N., G. Kuwata, H. Akahori, and T. Watanabe. 1979. Isoflavone constituents of soybeans and isolation of new acetyl daidzin. *Agri. Biol. Chem.* 43(7) : 1415-1419.
- Ohta, N., G. Kuwata, H. Akahori, and T. Watanabe. 1980. Isoflavone of new isolation acetyl glucoside, 6"-o-acetylgenistin from soybean. *Agri. Biol. Chem.* 44(2) : 469-470.
- Walter, E. D. 1941. Genistein (an isoflavone glycoside) and its aglycon genistein from soya beans. *J. Am. Soc.* 65 : 3273-3275.
- Yi, M. A., T. W. Kwon, and J. S. Kim. 1997. Changes in isoflavone contents during maturation of soybean seed. *J. Food. Sci.* 2(3) : 255-258.
- Yoon, H. T. 2000. Isoflavone contents in soybean (*glycine max(L.) Merr.*), and the effects of soy-extract on enzyme activities and antioxidant. PhD. thesis, Dongguk Univ. p. 36-38.