

식물체 플라보노이드 성분 분석을 위한 적정 가수분해 조건

박진순 · 황인욱 · 정호철 · 김숙경¹ · 정신교[†]

경북대학교 농업생명과학대학 식품공학과

¹경북대학교 식품생물산업연구소

Determination of Optimum Hydrolysis Conditions for Flavonoid Analysis in Plant Leaves

Jin-Soon Park, In-Wook Hwang, Hu-Zhe Zheng, Suk-Kyung Kim¹
and Shin-Kyo Chung[†]

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹Food and Bio-industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Acidic hydrolysis conditions prior to HPLC analysis of plant flavonoids was investigated by response surface methodology (RSM), using leaves of *Ginkgo biloba* L. Ten hydrolysis conditions using 0.5 - 2.5 M HCl and 0.5 - 2.5 hr hydrolysis time were chosen to form a central composite rotatable design (CCRD), and optimization by RSM was achieved by measuring myricetin, quercetin, and kaempferol levels by HPLC. Optimum hydrolysis condition was 1.5 M HCl for 1.5 hr. The levels of flavonoids obtained under the condition were in good agreement with predicted maximum values, with yields of more than 95%. These optimum hydrolysis condition was applied to analysis of flavonoid content in the leaves of *Camellia sinensis*, *Ficus carica*, and *Sageretia theezans*.

Key words : flavonoid contents, acid hydrolysis condition, optimization, RSM, *Ginkgo biloba* L

서 론

식물체 속에 포함되어 있는 플라보노이드는 일반적으로 당과 결합하여 배당체 형태로 존재하며, 플라보노이드 aglycone은 100 여 종 이상이 알려져 있다. 최근의 연구에서는 플라보노이드에 항돌연변이 효과, 항암 효과, 항산화작용, 항알러지작용, 항염증작용 및 항균효과 등 생리활성에 대한 다양한 연구결과가 보고되고 있지만(1,2) 식물체의 플라보노이드 함량의 정량적 분석 방법에 대한 연구 보고는 그다지 많지 않다. 동일한 식물 조직 중에서도 플라보노이드 배당체는 당의 종류와 개수, 결합 위치에 따라 화학적 구조가 다양하므로 이들 성분의 정성 및 정량에는 각개의 표준품을 필요로 하며 또한 분리 양상이 복잡하여 어려움이 많다. 따라서 현재까지 식물체 중의 플라보노이드 성분의

분석은 산이나 효소로 플라보노이드에 결합된 당을 가수분해하여 myricetin, quercetin, kaempferol 등의 aglycone 형태로 High performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 정량하는 방법을 많이 사용하고 있다(3,4).

그러나 이들 플라보노이드 성분들은 가수분해 조건에 따라 완전히 aglycone으로 분해되지 않거나, 장시간 열과 산에 노출되어 그 일부가 분해되므로 정량 분석에 어려움이 있다. 따라서 여러 가지 식물체에 적합한 플라보노이드 배당체의 가수분해 조건을 확립하는 연구가 필요하다. Herotog 등(5,6)은 과채류의 플라보노이드를 분석할 경우에 1.6 M HCl에서 4 시간 이상 가수분해하면 플라보놀 성분의 분해가 일어나므로 2 M HCl에서 2 시간 정도의 반응이 플라보놀 성분의 가수분해에 적합하다고 보고하였다. 또한 Kim 등(7)은 90°C에서 1.2 M HCl로 2 시간 가수분해하여 한국 약용식물 중의 플라보노이드 함량을 보고한 바 있다.

은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 은행나무과에 속하는 낙엽

[†]Corresponding author. E-mail : kchung@mail.knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-5778, Fax : 82-53-950-6772

교목으로 단 1과 1속 1종뿐이며, 중국이 원산지로서 역사적으로 잎과 종실이 식용과 약용으로 많이 이용되어 왔다(8). 주로 혈액순환 개선제나 천식 치료 등에 이용되고 있는 은행잎에는 주성분인 플라보노이드계 및 terpene계 화합물 외에도 polyphenol, polysaccharide 등의 100여종의 화합물이 존재하는 것으로 보고되고 있다(9-11). 은행잎의 플라보노이드 화합물은 대개 식물체 중에서 보편적으로 발견되는 kaempferol, quercetin, myricetin 등 플라보놀 배당체의 혼합물로 구성 되어있다(12).

따라서 본 연구에서는 플라보노이드 함량이 풍부한 은행잎을 이용하여 식물체 중에 존재하는 myricetin, quercetin, kaempferol 배당체와 같은 주된 플라보노이드 성분의 함량을 신속하고 정확하게 HPLC 방법으로 분석하는데 필요한 적정 가수분해 조건을 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)으로 조사하였으며, 나아가 수종의 식물에 대하여 구한 적정 가수분해 조건을 적용하여 플라보노이드 함량을 분석하고 그 타당성을 검토하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 은행잎은 2007년 7월 중순 경 팔공산에서 채취하여 이를 동안 그늘에서 말린 것을 20~40 mesh의 크기로 분쇄하여 사용하였다. 실험에 사용한 myricetin, quercetin, kaempferol은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며, 그 외 분석용으로 사용한 methanol, acetonitrile, acetic acid, ethyl acetate, HCl 등은 일급 시약(Duksan, Seoul, Korea)을 사용하였다. 녹차(*Camellia sinensis*)는 (주) 아모레 퍼시픽의 설록차(작설, 2009)를 사용하였고, 무화과(*Ficus carica*) 잎과 상동나무잎(*Sageretia theezans*)은 각각 2008년도 8월경에 경북대학교와 제주도에서 채취하여 그늘에서 말린 것을 냉장 보관하여 사용하였다.

HPLC에 의한 플라보노이드 분석

소정의 조건에 따라 가수분해한 식물체의 시료 용액 2 mL를 취하여 ethyl acetate 용액으로 3회 분획하고 이를 다시 농축하여 농축액을 50% methanol 수용액으로 1 mg/mL 농도로 희석한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC (LC-10A Shimadzu Co., Kyoto, Japan)로 분석하였다. 이동상은 2% acetic acid 수용액과 50% acetonitrile/0.5% acetic acid 수용액의 혼합용액(7:3)으로 하여 분 당 1 mL의 유속으로 TSK gel ODS-100Z column (TOSOH Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 UV detector (370nm)를 사용하여 분석하였다. 표준물질로서 myricetin, quercetin, kaempferol을 사용

하여 각각의 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 mg% 농도에서 구한 크로마토그램상의 면적 값과의 회귀곡선으로부터 각 시료 중의 플라보노이드의 함량을 구하였다. 분석에 사용한 각 표준물질의 회귀식은 다음과 같다.

$$Y_1 = 46823x - 42772 \quad (r^2=0.9968),$$

$$Y_2 = 72876x - 58864 \quad (r^2=0.9979),$$

$$Y_3 = 61735x - 43960 \quad (r^2=0.9990),$$

여기에서 Y_1 , Y_2 , Y_3 는 각각 myricetin, quercetin, kaempferol의 함량이다.

산 가수분해조건의 중심합성 실험

산 가수분해처리하는 Hertog 등(5, 6)에 의한 방법을 변형하여 사용하였다. 시료 0.5 g에 50% MeOH 수용액으로 Table 1과 같이 조제한 소정 농도의 HCl 용액 50 mL을 가하고, 95°C에서 환류냉각하면서 소정의 시간 동안 가수분해하였다. 산 가수분해 최적 조건을 설정하기 위하여 반응표면분석법을 적용하였다(13). 독립변수로 HCl 농도(X_1)와 가수분해 시간(X_2)을 설정하여 각각 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하여 중심합성계획에 따라 실험을 진행하였다. 예비실험과 선행 연구 결과를 고려하여 Table 1과 같이 중심합성 실험을 설계하였으며, 각 조건에 따른 각각의 플라보노이드 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 독립변수에 따른 종속변수는 각각 myricetin 함량(Y_1), quercetin 함량(Y_2), kaempferol 함량(Y_3)으로 정하였다.

Table 1. The levels of hydrolysis conditions for the flavonoids analysis in the leaves of *Ginkgo biloba* L. by central composite design

X_i	Hydrolysis conditions	Coded levels				
		-2	-1	0	1	2
X_1	HCl concentration (M)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
X_2	Hydrolysis time (hr)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

산 가수분해 조건의 최적화

산 가수분해 조건에 따른 myricetin, quercetin, kaempferol 함량의 회귀식은 SAS (Statistical Analysis System) software (Version 9.1, SAS Institute INC., Cary, NC, USA, 2003)의 반응표면분석법으로 구하였다. 이때, 독립변수 X_i 와 X_j 에 대한 종속변수 Y (myricetin, quercetin, kaempferol) 값은 2차 회귀식으로 나타내었다. 가수분해 조건의 최적화는 각각의 반응변수에 대한 목표값을 설정하여 그 범위를 만족시키면서 합성된 만족도를 최대화하는 인자의 최적조합으로 결정하였다.

결과 및 고찰

산 가수분해 조건과 플라보노이드 함량의 회귀식

식물체 조직의 산 가수분해 방법은 플라보노이드 성분의 분석에 가장 널리 사용되고 있는 방법 중의 하나로서, 시료 조직에 강산인 염산과 메탄올 등의 유기용매를 가한 후 비교적 고온에서 가열하면서 목적 성분을 가수분해하고 추출하는 방법이다. 이 때 가수분해에 의하여 유리되는 당이 포함된 시료 용액은 가열에 따라 대개 자색으로 변하게 된다. Fig. 1에 나타나는 바와 같이 은행잎 속의 플라보놀 배당체가 강산 용액에서 가열하면 당이 가수분해 되면서 aglycone 인 myricetin, quercetin, kaempferol로 된다. 따라서 HCl 농도, 가수분해 시간을 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 10구간의 가수분해 조건에 따라 HPLC로

분석한 은행잎의 플라보노이드 함량은 Table 2와 같다. 먼저 SAS 프로그램을 사용하여 구한 각각의 플라보노이드 함량을 최대로 하는 적정 산 가수분해조건을 Table 3에 나타내었으며 동시에 구한 myricetin, quercetin, kaempferol 함량의 회귀식은 각각 아래의 식 (1), (2), (3)과 같다.

$$Y_1 = -299.014286 + 233.023810X_1 + 376.157143X_2 - 50.385714X_1^2 - 54.400000X_1X_2 - 94.585714X_2^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = -400.942857 + 240.888095X_1 + 555.588095X_2 - 59.707143X_1^2 - 1.000000X_1X_2 - 179.607143X_2^2 \quad (2)$$

$$Y_3 = -422.342857 + 74.671429X_1 + 895.471429X_2 + 83.842857X_1^2 - 229.200000X_1X_2 - 185.357143X_2^2 \quad (3)$$

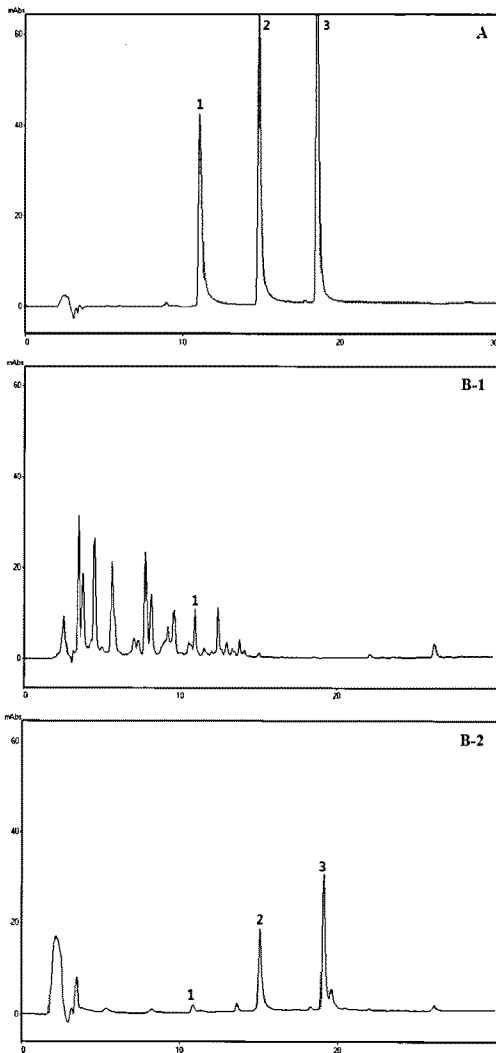


Fig. 1. The HPLC chromatogram of the flavonoids analysis in the leaves of *Ginko biloba* L.

A; standard, B-1; before acid hydrolysis, B-2; after acid hydrolysis, 1; myricetin, 2; quercetin, 3; kaempferol.

Table 2. The flavonoids contents in the leaves of *Ginko biloba* L. under different hydrolysis conditions by central composite design

Exp. No.	Hydrolysis conditions		Myricetin (mg%)	Quercetin (mg%)	Kaempferol (mg%)
	HCl conc. (M)	Hydrolysis time (hr)			
1	2.0	2.0	95.2±3.8	206.1±5.8	261.2±10.4
2	2.0	1.0	136.3±4.8	175.9±6.3	373.7±14.2
3	1.0	2.0	150.9±7.4	187.5±9.8	295.5±7.7
4	1.0	1.0	137.6±8.6	156.3±3.6	178.8±6.4
5	1.5	1.5	165.6±6.4	267.3±7.9	222.1±7.3
6	1.5	1.5	166.6±9.5	262.4±7.4	327.6±18.6
7	2.5	1.5	130.4±6.3	280.1±5.5	299.1±15.6
8	0.5	1.5	101.1±5.4	118.4±5.7	432.2±26.8
9	1.5	2.5	94.7±5.2	86.9±2.5	88.8±3.3
10	1.5	0.5	48.4±3.4	71.8±4.2	104.1±4.6

Table 3. The predicted levels of optimum hydrolysis conditions on the flavonoids contents in the leaves of *Ginko biloba* L. by ridge analysis

Responses	R ²	Significance	Hydrolysis condition		Estimated maximum responses (mg%)	Morphology
			HCl (M)	Time (hr)		
Myricetin	0.8282	0.1077	1.47	1.57	166.53	Maximum
Quercetin	0.9222	0.0245	2.00	1.54	268.58	Maximum
Kaempferol	0.8085	0.1308	1.55	1.46	288.43	Saddle point

Myricetin 함량에 대한 가수분해의 회귀식은 R² 값이 0.8282이고, 10% 이내의 범위에서 유의성이 인정되지 않았으며, 예측된 정상점에서 최대값은 166.53 mg%로서, 이때의 산 가수분해 조건은 1.47 M HCl, 1.57 시간이었다. 각각의 가수분해 조건에 따른 myricetin 함량은 Fig. 2에서와 같이 정상점을 중심으로 타원형으로 나타났다. Myricetin에 대한 가수분해 조건의 영향은 가수분해 시간에 유의한 영향

을 받고 있었으며, HCl 농도에 대한 영향은 낮은 것으로 나타났다(Table 4). 또한 quercetin 함량에 대한 가수분해의 회귀식은 R² 값이 0.922이고, 5% 이내의 범위에서 유의성이 인정되었으며, 예측된 정상점에서 최대값은 268.58 mg%로서, 이때의 산 가수분해 조건은 2 M HCl, 1.54 시간이었다. 각각의 가수분해 조건에 따른 quercetin 함량은 Fig. 3과 같이 정상점을 중심으로 타원형으로 나타났다. Quercetin에 대한 가수분해 조건의 영향은 산 농도와 가수분해 시간에 유의하며, 가수분해 시간이 산 농도보다 유의성이 높으므로 가수분해 시간의 영향이 큰 것으로 추정된다. 한편 kaempferol 함량에 대한 가수분해의 회귀식은 R² 값이 0.8085이고, 10% 이내의 범위에서 유의성이 인정되지 않았으며, 예측된 정상점에서의 최대값은 288.43 mg%이었으며, 이때의 가수분해 조건은 1.55 M HCl, 1.46 시간으로 나타났다. 각각의 산 가수분해 조건에 따른 kaempferol 함량은 Fig. 4와 같이 산의 농도가 높을수록 증가하다가 가수분해 시간이 길고 산의 농도가 증가하면 감소하는 것으로 나타났다. Kaempferol 함량에 대한 가수분해 조건의 영향은 산의 농도와 가수분해 시간에 대하여 모두 유의하지 않아서 두 조건의 영향이 비교적 낮은 것으로 추정된다.

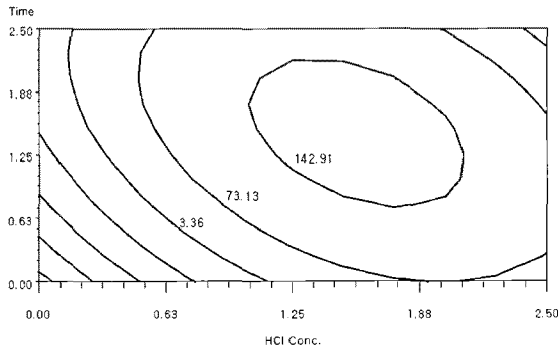


Fig. 2. The contour map for myricetin contents in the leaves of *Ginkgo biloba* L. as a function of hydrolysis time and HCl concentration.

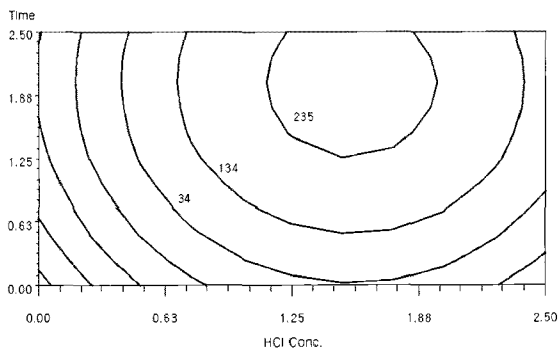


Fig. 3. The contour map for quercetin contents in the leaves of *Ginkgo biloba* L. as a function of hydrolysis time and HCl concentration.

Table 4. Analysis of variables for the regression models of the flavonoids contents in the leaves of *Ginkgo biloba* L.

Hydrolysis condition	F-Ratio	
	HCl (M)	Time (hr)
Myricetin	2.08	6.41*
Quercetin	5.01*	11.73**
Kaempferol	1.33	3.05

*Significant at 10% level, **significant at 5% level.

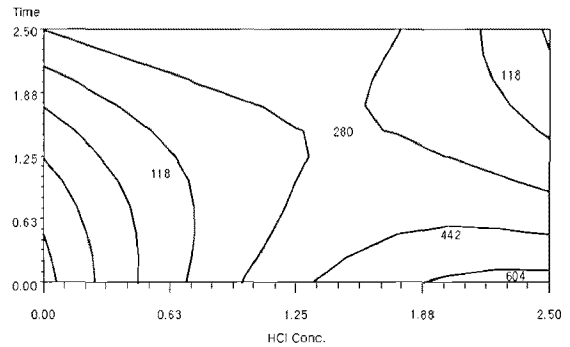


Fig. 4. The contour map for kaempferol contents in the leaves of *Ginkgo biloba* L. as a function of hydrolysis time and HCl concentration.

적정 산 가수분해 조건의 추정과 실증

적정 산 가수분해 조건을 구하기 위하여 myricetin, quercetin, kaempferol 함량이 최대가 되는 은행잎의 가수분해 조건에서의 각 반응표면을 superimposing하여 Fig. 5에 나타내었다. 이 반응표면으로부터 설정될 수 있는 산 가수분해 조건 범위는 HCl 농도 1.5~1.9 M에서 1.4~2.0 시간이며, 최적 조건은 HCl 1.5 M에서 1.5 시간 가수분해하는 것으로 나타났다(Table 5). 본 실험에서 얻은 적정 산 가수분해 조건에서 은행잎의 플라보노이드 함량의 예측치와 실제 측정치를 Table 6에 나타내었다. Myricetin을 포함하여 quercetin, kaempferol과 같은 플라보노이드 함량의 측정치가 동일 조건에서의 예측치와 비교하여 95% 이상 일치하였

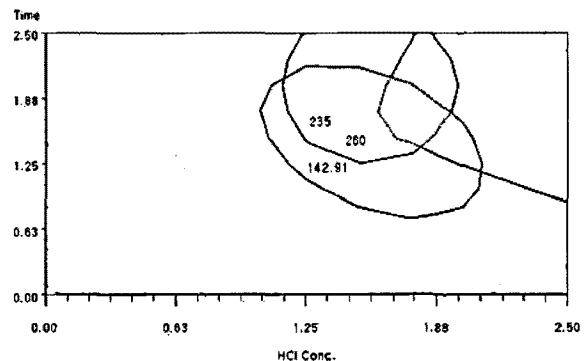


Fig. 5. The superimposed response surfaces of the flavonoids contents in the leaves of *Ginkgo biloba* L. as a degree of hydrolysis time and HCl concentration.

으므로, 본 연구에서 구한 적정 산 가수분해 조건이 은행잎을 비롯하여 여러 식물체에 적합하게 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

이어서 본 연구에서 얻은 적정 산 가수분해 조건을 녹차잎, 무화과잎, 상동나무잎의 플라보노이드 함량의 분석에 적용하여 보았다. 대개 이들 조직 중에 배당체로 존재하는 플라보노이드 화합물들이 산 가수분해 처리에 의하여 거의 완전하게 각각의 aglycone으로 분해되는 것을 HPLC 크로마토그램으로 관찰할 수 있었다(HPLC 크로마토그램 생략). 녹차잎, 무화과잎, 상동나무잎의 myricetin, quercetin, kaempferol 함량을 Table 7에 나타내었다. 녹차잎은 myricetin, quercetin, kaempferol 순으로 각각 586.6±13.5, 817.7±33.5, 860.7±36.3 mg%, 무화과잎은 319.7±11.0, 348.3±15.6, 98.0±3.5 mg%, 상동나무잎은 614.8±15.5, 355.1±6.4, 135.3±1.8 mg% 함량을 나타내었다. 한편 Wang 등(14)은 녹차잎의 myricetin, quercetin, kaempferol 함량을 각각 83~159, 179~405, 156~331 mg%로 보고한 바 있으며 이는 본 연구에 의한 측정치 보다 상당히 낮은 함량이다.

Table 5. The optimum acid hydrolysis condition for the flavonoids contents in the leaves of *Ginko biloba* L.

Hydrolysis condition	Range of predicted condition	Given optimum condition of independent variables
HCl concentration (M)	1.5~1.9	1.5
Hydrolysis Time (hr)	1.4~2.0	1.5

Table 6. The predicted and experimental values of the flavonoids contents in the leaves of *Ginko biloba* L.

Flavonoids	Predicted value (A) ¹⁾	Experimental values (B) ²⁾	B/A × 100
Myricetin	166.53	166.1±5.2	99.7
Quercetin	268.58	264.85±9.3	98.6
Kaempferol	288.43	274.85±8.5	95.3

¹⁾ Calculated using predicted equations for response variables.

²⁾ Mean values of triplicate at given optimum condition of independent variables; HCl 1.5M, and hydrolysis for 1.5hr.

Table 7. The flavonoid contents in the leaves of *Camellia sinensis*, *Ficus carica*, and *Sageretia theezans*

Plant leaves	Myricetin	Quercetin	Kaempferol
<i>Camellia sinensis</i>	586.6±13.5	817.7±33.5	860.7±36.3
<i>Ficus carica</i>	319.7±11.0	348.3±15.6	98.0±3.5
<i>Sageretia theezans</i>	614.8±15.5	355.1±6.4	135.3±1.8

요 약

식물체의 플라보노이드 성분 함량 분석에 필요한 적정 가수분해 조건을 구명하기 위하여 은행잎을 이용하여 중심 합성법으로 설계한 산 가수분해 시간과 HCl 농도에 따라 myricetin, quercetin, kaempferol 함량을 HPLC로 분석하고, SAS의 반응표면분석법으로 산 가수분해 조건의 최적화를 시도하였다. HCl 0.5~2.5 M, 0.5~2.5시간 범위 내에서 10 개의 구간을 잡아서 최적화한 결과 1.5~1.9 M의 HCl 농도와 1.4~2.0시간의 가수분해 조건에서 myricetin, quercetin, kaempferol 성분이 가장 높았다. Superimposing하여 구한 식물체의 플라보노이드의 적정 가수분해 조건은 HCl 1.5 M, 1.5시간이었으며, 이 조건에서 구한 플라보노이드 함량의 예측치와 측정치는 95% 이상 일치하였다. 본 연구에서 구한 적정 가수분해 조건을 이용하여 녹차잎, 무화과잎, 상동나무잎의 플라보노이드 함량을 분석하여 보았다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(기초연구 사업, 과제번호 313-2008-2-F00169).

참고문헌

- Haveteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1141-1148
- Middleton, E.J. and Kandaswami, C. (1993) The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer *The flavonoids*. Chapman & Hall, London., 636-638
- Hasler A., Sticher, O. and Meier, B. (1992) Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 605, 41-48
- Hasler A., Sticher, O. and Meier, B. (1990) High-performance liquid chromatographic determination of five widespread flavonoid aglycones. *J. Chromatogr.*, 508, 236-240
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. and Venema, D.P. (1992) Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruit. *J. Agric. Food. Chem.*, 40, 1591-1598
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. and Van de Putte, B.

- (1993) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1242-1246
7. Kim H.Y. and Kang M.H. (2003) Flavonoid content of some Korean medicinal plants. *Food Sci. Biotechnol.*, 12, 687-690
 8. Lee, T.B. (1980) *Encyclopedia of Flora of Korea*. Hyang Mun Publishing Co. Seoul, Korea
 9. Tang, C., Wei, X. and Chunhua, Y. (2003) Analysis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* L. extract injections by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 33, 811-817
 10. Jaracz, S., Malik, S. and Nakanishi, K. (2004) Isolation of ginkgolides A, B, C, J and bilobalide from *G. biloba* extracts. *Phytochemistry*, 65, 2897-2902
 11. Goh, L.M.L. and Barlow, P.J. (2004) Flavonoid recovery and stability from *Ginkgo biloba* subjected to a simulated digestion process. *Food Chem.*, 86, 195-202
 12. Harborne, J. and Williams, C.A. (1975) *The Flavonoids*, part 1. Academic Press. New York, p.376-441
 13. Sergio, L.C.F., Roy, E.B., Erik, G.P.S., Walter, N.L.S., Cristina, M.Q., Jorge, M.D., Jailson, B.A., Marcia, C.B., Isabel, C.S.F.J., Benicio, B.N., (2007) Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J. Chromatogr. A.*, 1158, 2-14
 14. Wang, H. and Helliwell, K. (2001) Determination of flavonols in green and black tea and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Res. Int.*, 34, 223-227

(접수 2009년 11월 23일, 채택 2010년 3월 5일)