

다양한 페놀성 물질과 Folin-Ciocalteu 시약의 반응성에 미치는 영향 요인 평가

홍정일[†] · 김현정 · 김지윤
서울여자대학교 식품과학부

Factors Affecting Reactivity of Various Phenolic Compounds with the Folin-Ciocalteu Reagent

Jungil Hong[†], Hyun Jung Kim, and Ji Yun Kim

Division of Food Science, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

Abstract

The Folin-Ciocalteu (F-C) reagent has been extensively used for quantifying total phenolic contents in many different types of food materials. Since several different procedures of the assay methods using the F-C reagent have been applied, we investigated changes in reactivity of various phenolic compounds with the F-C reagent under three different assay conditions and factors affecting reactivity. Among 10 standard compounds tested, compounds with high hydroxyl density (number of -OH/molecular weight) showed a largely different response according to addition sequence of the F-C reagent or Na₂CO₃. Preincubation in Na₂CO₃ significantly reduced the reactivity of the phenolic compounds bearing galloyl moiety (e.g. gallic acid, tannic acid, and epigallocatechin-3-gallate) with the F-C reagent, while monophenol compounds including ferulic acid and sinapinic acid were more stable as compared to diphenols. There was little change in response to the F-C reagent of all phenolic compounds incubated in acidic pH; their reactivity except ferulic acid was reduced significantly when incubated in neutral or alkaline pH. Changes in reactivity of gallic acid incubated in Na₂CO₃ or neutral/alkaline pH conditions were the most prominent. H₂O₂ generated from phenolic compounds did not affect the reaction with the F-C reagents. The present results suggest that reactivity of different phenolic compounds with F-C reagent was affected considerably by different procedures of the assay, and the total phenolic contents could be fluctuated according to standard compounds and assay scheme.

Key words: Folin-Ciocalteu reagent, phenol content, gallic acid, polyphenol

서 론

현재까지 상당수의 기능성식품 연구는 천연식품소재로부터 추출물을 제조하고 그 가운데 생리활성을 가진 물질의 분리와 동정에 목적을 두고 진행되어 왔다. 일반적으로 추출 물질의 1차적 생리활성 검정을 위해 다양한 화학적 산화제를 이용한 전자공여능 또는 항산화능 측정 등의 방법이 가장 빈번하게 사용되고 있으며 이와 같은 활성검증 시스템을 기반으로 하여 발굴되는 물질 중에는 페놀성 화합물이 상당수를 점유하고 있다(1,2). 이러한 식이 페놀성 화합물들은 항산화 효과 외에도 다양한 생리활성으로 인하여(3-5) 식품의 연구 분야뿐만 아니라 이를 소재로 이용하는 관련 산업분야에 관심의 대상이 되어왔다.

따라서 다양한 식이소재 및 그 추출물 등에 대한 연구에서 페놀성 물질의 함량 측정이 일반적으로 진행되고 있으며(6), 각종 식품첨가물 등의 규격에도 중요한 기준이 되고 있다(7,8). 페놀성 물질의 정량방법으로 Folin-Denis 방법(9,10),

Prussian blue assay(11) 및 Löwenthal 방법(12) 등이 있는데 이들은 페놀성 물질의 일반적인 oxidation-reduction 성질을 이용한 방법이다. 이중 Folin-Ciocalteu(F-C)시약을 이용하는 Folin-Denis 방법이 실험자들에게 있어서 가장 널리 이용되고 있다. F-C시약은 sodium molybdate와 sodium tungstate를 인산용액과 반응시켜 제조하며, 다양한 페놀성 물질들은 알칼리 조건에서 F-C시약의 phosphomolybdic/phosphotungstic acid complex에 전자를 공여하여 청자색 환원물을 생성하게 된다(10,13). 이 방법은 간단하면서도 비교적 감도가 높고, 페놀성 물질들의 중합도에 관계없이 정량을 나타낸다는 점에서 유용성을 가지고 있다(6,14).

하지만 F-C 시약과 반응할 수 있는 다양한 종류의 화합물들로 인해 시료 중의 페놀성 물질 정량에 있어서 간섭요인들이 발생하고 있으며, 이에 대한 많은 연구가 진행된 바 있다. F-C시약과 반응하는 물질들로서 단백질, 핵산, 환원당을 포함한 탄수화물류, 아스코빈산, 각종 thiol성 물질들, amine성 물질들이 있으며, 이외에도 다양한 환원성 물질들이 알려져

[†]Corresponding author. E-mail: hjil@swu.ac.kr
Phone: 82-2-970-5639, Fax: 82-2-970-5977

있다(6,15-17).

지금까지 발표된 phenol성 물질 정량 결과를 보고한 논문들을 살펴보면, 널리 통용되는 방법으로 인해 구체적인 실험 방법의 기술 없이 F-C시약을 이용하였음이 간단하게 언급된 경우가 많고, 비교적 상세히 기술된 경우에도 여러 연구자들 간의 방법상 차이가 발견되며 특히 시약의 첨가순서 및 반응 조건 등에 있어서 다양하게 변형된 방법들이 보고되고 있다. 특히 시료에 F-C시약과 Na_2CO_3 용액을 첨가하는 순서 및 첨가 사이의 시간 등에 많은 차이를 발견할 수 있는데, 심지어 식품첨가물 공전의 각종 천연물 성분규격 검정을 위한 페놀성 물질 정량에서도 첨가순서 및 반응시간의 차이를 보이고 있다(7,8).

지금까지 F-C시약을 이용한 페놀물질의 정량에 있어서 다양한 간섭물질과 요인들이 연구된 바 있으나, 연구자들에 의해 변형된 다양한 정량방법 간에 페놀성 물질들이 나타내는 반응성의 차이에 대해서는 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 총 페놀성 물질에 대해 신속하게 다량의 시료를 정량할 수 있는 microplate법을 응용하여(18), gallic acid를 포함한 10여종 페놀성 물질들의 각 조건 하에서 반응성 차이 및 반응영향인자 등을 조사하였고, 시료 중의 페놀물질 정량 시 오차를 줄이기 위한 적정 처리방법 및 표준물질의 조건 등에 대한 관련 자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 F-C시약, ferulic acid(FeA), sinapinic acid(3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid; SiA)와 caffeic acid(CaA), 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid(DHC), tannic acid(TA), gallic acid(GA), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG), quercetin(Qct), catechine(Ctc), 그리고 *trans*-cinnamic acid(CiA) 및 methoxy cinamic acid류는 모두 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 각 표준물질은 200 mM 농도로 dimethyl sulfoxide에 녹여 aliquot한 후, -80°C 초저온 냉동고(DF8520, Ilshin lab., Yangju, Korea)에 저장하여 사용하였다. 미지시료로 사용된 연잎 열수 추출물은 전보의 보고에 따라 제조하였다(19). 이외에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich 제품 및 일반특급시약을 사용하였다.

페놀함량 측정

F-C시약을 이용한 총 폴리페놀 함량 정량방법으로 선행 연구 또는 식품첨가물 공전 등에서 빈번하게 차이를 보이는 F-C시약과 Na_2CO_3 용액의 처리순서 및 시간에 따라 다음 3가지의 scheme으로 나누어 측정하였다. Method 1(F-C시약 선처리 방법)(8,10,20,21): 증류수 또는 pH 완충용액에 녹인 시료 80 μL 에 50% F-C시약 20 μL 를 첨가하여 5분간 방치한 후, 2% Na_2CO_3 용액 100 μL 를 가하였다. 상온에서

30분간 또는 일정시간 반응시킨 후 microplate reader (Spectra Max 250, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Method 2(Na_2CO_3 선처리 방법)(7,22-26): 각 시료 80 μL 에 2% Na_2CO_3 100 μL 를 넣고 3분간 실온에서 반응시킨 후, 50% F-C시약을 첨가하고 30분간 실온에서 방치한 후 microplate reader로 흡광도를 측정하였다. Method 3(F-C시약/ Na_2CO_3 동시처리 방법)(27-31): 각 시료 80 μL 에 50% F-C시약 20 μL 를 가한 후 즉시 100 μL 2% Na_2CO_3 용액을 차례로 첨가하거나(Method 3.1), 2% Na_2CO_3 용액과 50% F-C시약을 위의 비율대로 혼합 후 시료 80 μL 에 첨가하여(Method 3.2), 각각 상온에서 30분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 한편 Na_2CO_3 용액과 F-C시약의 첨가시간 차이가 시료의 반응성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 시약과 표준시료를 먼저 혼합하여 시간을 달리하여 저장하고, F-C시약 또는 Na_2CO_3 을 해당 반응혼합물에 가하여 30분간 반응시킨 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 반응조건에서의 pH는 Thermo Orion pH meter(420A, Beverly, MA, USA)로 측정하였다.

페놀성 물질의 pH별 안정도 및 반응성 변화

각 표준물질을 0.1 M pH 3 citrate buffer, 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer 및 0.1 M pH 9 Tris buffer에 녹여 37°C 에서 시간을 달리하여 저장 후, 위에 기술한 각각의 정량 방법에 따라 반응성을 측정하였다. 이때 물질들의 산화정도는 405 nm에서의 갈색화합물의 생성도로 측정하였다. 한편 pH 7.4 phosphate buffer에서 24시간 저장한 시료에 15 unit/mL superoxide dismutase(SOD)와 30 unit/mL catalase를 첨가하고, 동일한 조건에서 SOD/catalase를 첨가하지 않은 시료와의 반응성 차이를 Method 1에 의해 측정하였다.

통계처리

모든 측정값은 3회 이상 분석하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 실험결과 간의 유의차 분석은 Student's *t*-test 또는 One-way ANOVA와 Tukey's HSD test를 실시하여 99%의 유의수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

정량방법 차이에 따른 페놀성 물질의 반응성 변화

페놀성 물질은 고리구조상의 -OH기로부터 전자를 공여할 수 있으며, 페놀 고리구조의 공명에 의한 구조적 안정화를 이룰 수 있으므로 환원성 물질로서 항산화 활성을 나타낸다. F-C시약을 이용한 정량은 페놀성 물질이 공통적으로 가지고 있는 이러한 환원성 성질을 이용한 것이다. 본 연구에서는 기존에 보고된 서로 다른 정량 방법 하에서 다양한 구조의 페놀성 물질에 대한 반응성 변화를 조사하였다. 사용된 물질은 페놀산 구조로서 하나의 -OH를 가진 ferulic acid

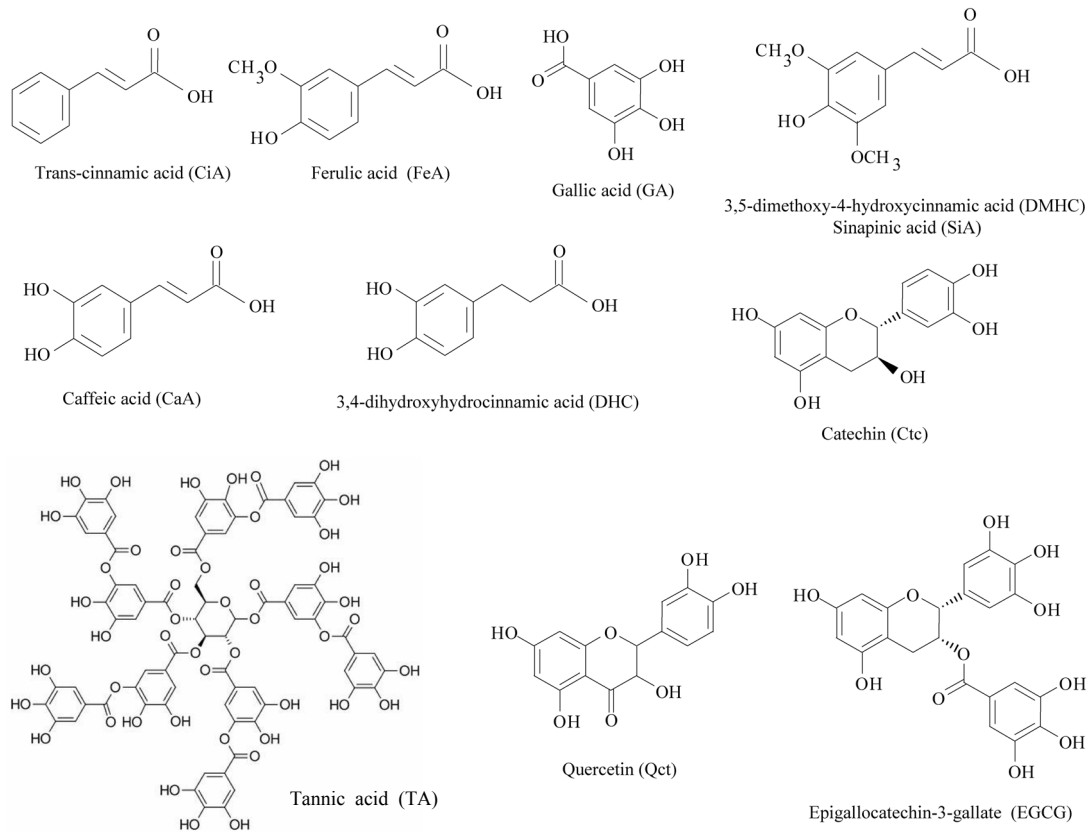


Fig. 1. Structures of phenolic compounds used in the present study.

(FeA)와 sinapinic acid(SiA), 2개의 -OH를 가진 caffeic acid(CaA)와 DHC, 3개의 -OH를 가진 페놀성 물질의 표준 물질로 가장 널리 이용되는 gallic acid(GA)와 그 중합체인 tannic acid(TA), flavonoid류로서 flavan 3-ol 형태의 (+)-catechine(Ctc)과 EGCG, flavonol류의 quercetin(Qct)이었다(Fig. 1). 한편 비페놀성 물질로서 cinnamic acid(CiA)와 methoxy cinamic acid류 등의 반응성도 조사하였다.

문헌상에 가장 보편적으로 보고되고 있는 F-C시약을 이용한 페놀정량 방법은 Singleton과 Rossi의 방법(10)으로서, F-C시약을 시료에 먼저 처리한 후 일정시간 후 Na_2CO_3 용액을 넣어 발색시키는 방법이다(Method 1; 8,10, 20,21). 하지만 상당수의 문헌에서 변화된 방법들이 보고되고 있는데 대표적인 차이를 보이는 것이 Na_2CO_3 용액을 시료와 먼저 혼합하여 균질화하고 일정시간 후 F-C시약을 처리하는 방법(Method 2; 7,22-26)이고, 또는 F-C시약과 Na_2CO_3 를 동시에 처리하는 방법들(Method 3; 27-31)도 발견되고 있다. 본 연구에서는 이상의 방법들을 응용한 F-C시약과 Na_2CO_3 간 첨가순서에 차이를 두어 각종 페놀성 물질들의 반응성 차이를 조사하였고 그 결과를 Table 1과 Fig. 2에 나타내었다. F-C시약 선처리 방법(Method 1)을 적용하였을 경우, EGCG가 가장 높은 시료무게 당 발색도(slope 1)를 보였으며 CaA와 GA도 상대적으로 높은 반응성을 나타내었다(시료 무게당 반응발색도 slope 기준). Monophenol ring 구조를

가진 FeA와 SiA는 다른 물질에 비해 낮은 반응성을 나타내었으며 CiA는 반응하지 않았다. 흥미롭게도 Na_2CO_3 선처리 방법(Method 2)에서 FeA, SiA와 quercetin을 제외한 대부분 물질의 반응성이 현저히 감소하였으며 특징적으로 Method 1에서 높은 반응성을 나타내었던 EGCG와 GA의 F-C시약과의 반응성은 급격하게 감소하여, slope를 기준으로 각각 74 및 61%의 감소를 보였다(Table 1). 따라서 EGCG를 표준물질로 사용한 경우, 두 방법 간에 동일한 발색정도를 나타낸 시료에 대해 총 페놀함량은 무려 3.81배 차이가 발생하며, 가장 빈번하게 표준물질로 사용되고 있는 GA의 경우에도 2.54배 차이를 보이게 된다(Table 1). 한편 F-C시약과 Na_2CO_3 를 동시에 처리하는 방법(Method 3.2)을 적용하였을 때, 대부분의 경우 Method 1에 의한 반응성과 유사하거나 약간 떨어지는 경향을 나타내었다(Fig. 2).

구조상으로 볼 때 FeA와 SiA 등 monophenol류는 정량방법에 따른 반응성의 차이를 거의 보이지 않았으나, ring에 -OH의 밀도가 높은 galloyl group을 가진 물질들이 비교적 큰 차이를 나타내었다. 분자내 ring구조의 -OH기 수를 분자량으로 나눈 hydroxyl No. density와 시료 무게당 발색반응성(slope) 간의 상관관계를 분석해 보았을 때, Method 1에 의한 회귀상수는 0.564 정도로 약한 양의 상관관계를 보였으나, Method 2에 의한 분석에서는 -0.867(Qct 제외)로 비교적 높은 부의 상관관계를 나타내었다(Fig. 3). 이 결과는

Table 1. Changes in reaction properties of various phenolic compounds by different procedures of analysis using the F-C reagent

Compounds	Method 1			Method 2			S2/S1 ³⁾
	Slope 1 ¹⁾	Intercept	R ²	Slope 2	Intercept	R ²	
CiA ⁴⁾	0.000±0.000	0.000±0.000	—	—	—	—	—
FA	9.237±0.336	0.058±0.002	0.996	102.0	10.078±0.113	0.067±0.001	0.999
SiA	11.526±0.107	0.061±0.001	0.997	81.4	11.333±0.239	0.069±0.003	0.999
CaA	17.775±0.057	0.069±0.001	0.997	52.4	11.234±0.109**	0.095±0.003	0.985
DHC	13.138±0.182	0.057±0.001	0.997	71.8	10.536±0.508**	0.061±0.005	0.999
GA	16.887±0.078	0.026±0.002	0.999	57.7	6.548±0.262**	0.042±0.005	0.997
Qct	12.686±0.059	0.061±0.006	0.999	74.0	13.804±1.310	0.072±0.012	0.999
EGCG	24.579±0.126	0.048±0.001	1.000	38.7	6.284±0.259**	0.072±0.002	0.999
Ctc	12.290±0.062	0.077±0.001	0.995	75.1	7.695±0.166**	0.085±0.001	0.993
TA	11.231±0.187	0.043±0.009	1.000	85.2	7.628±0.572**	0.065±0.021	0.998

¹⁾A slope calculated from linear correlation between color development at 750 nm and weight based-concentration.

²⁾Each compound equivalent (CE, µg/mL) at absorbance 1.0 using a corresponding standard curve.

³⁾Ratio of slope 1 vs. slope 2.

⁴⁾Abbreviations of compounds are the same as described in Fig. 1.

**p<0.01; Significantly lower as compared to slope 1 according to Student's *t*-test.

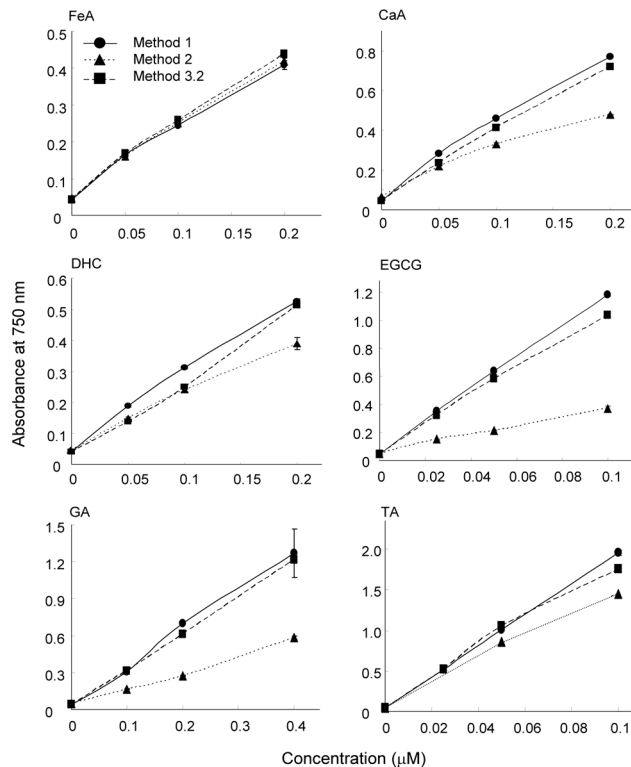


Fig. 2. Comparison of responses of various phenolic compounds according to different schemes of phenol analysis using the F-C reagent. Three different procedures of analysis as described in methods and materials including the Method 1 (●), 2 (▲), and 3.2 (■) were applied to different concentrations of each phenolic compound. The result represents the mean±SD (n=3 or 4). Abbreviations of compounds are the same as described in Fig. 1.

Method 2를 적용했을 때 분자상의 -OH 밀도의 증가에 따라 반응성이 감소하여 이들을 표준물질로 사용할 경우 시료 중 페놀함량이 높게 나타날 수 있으며, 시료 중에 이와 같은 물질들이 많이 함유된 경우 상대적으로 저평가될 수 있음을

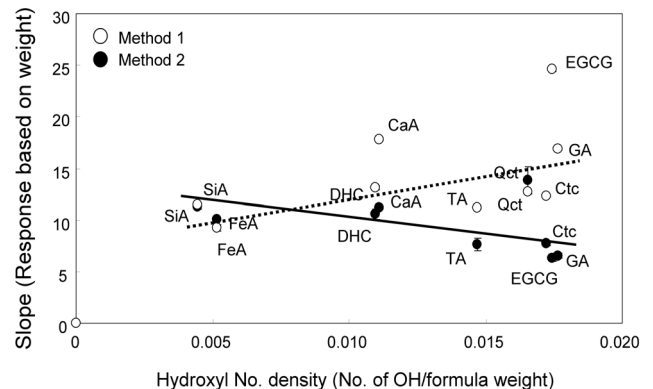


Fig. 3. Correlation between hydroxyl No. density and reaction slope of different phenolic compounds analyzed by the Method 1 or 2. The result represents the mean±SD (n=3 or 4). Abbreviations of compounds are the same as described in Fig. 1.

의미한다.

반응환경 및 반응시약이 페놀성 물질에 미치는 영향

Folin-Dennis 법에 따른 정량에서 시료 중의 페놀성 물질은 F-C시약 및 Na₂CO₃용액과 반응 중 만나게 된다. 사용된 50%(1 N) F-C시약은 pH 1 이하의 강한 산성이었으며, 본 실험조건에서 각 시료의 첨가 시 pH 1.4 정도를 나타내었다. Na₂CO₃(2%)용액은 강알칼리 조건을 조성하여 증류수 상의 시료와 혼합 시 pH 11.5 정도가 되었으며, 최종적으로 시료, F-C시약, Na₂CO₃가 모두 첨가된 후의 pH는 약 7이었다 (Fig. 4A). 이는 페놀성 물질들이 Method 1과 2의 반응조건에서 각각 강산성 또는 강알칼리 조건에 일정시간 노출된다는 것을 의미하며, 이 과정 중에 페놀성 물질의 다양한 화학적 변화가 초래되어 전체적인 반응도에 영향을 미칠 것으로 예상되었다. 따라서 F-C시약이나 Na₂CO₃를 시료에 첨가한 후 다양한 incubation 시간들을 적용하고, 각종 페놀성 물질들의 반응성 변화를 조사하였다.

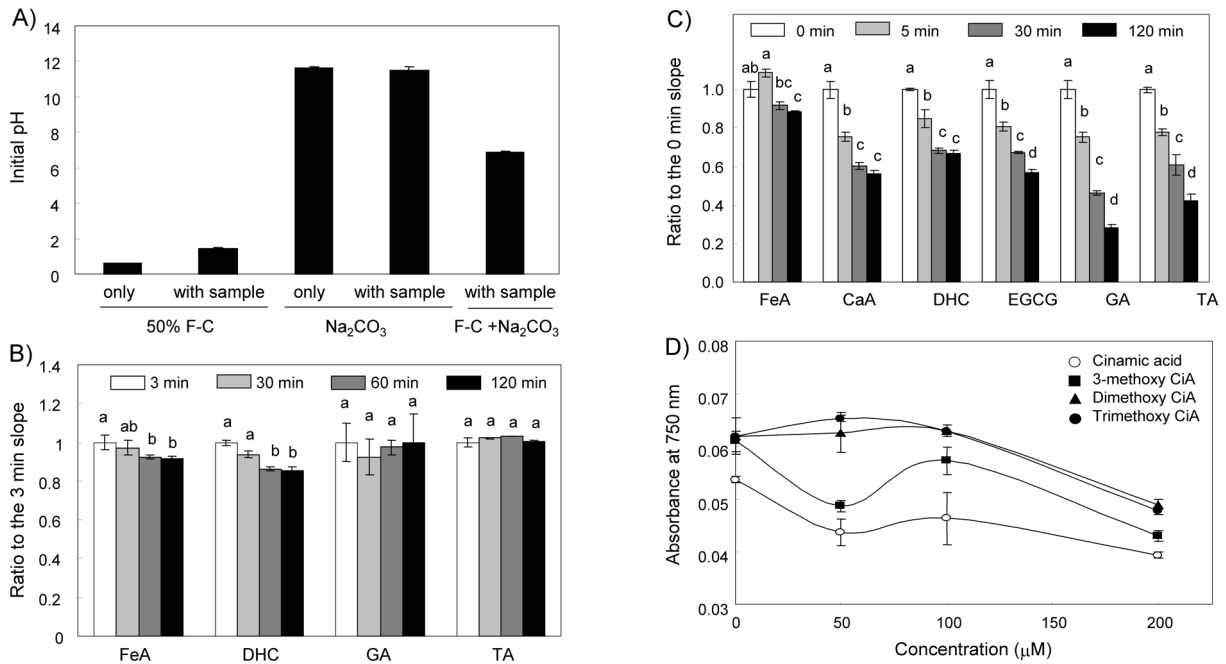


Fig. 4. pH conditions in each incubation step during Folin-Dennis analysis (A), effects of incubation time in the F-C reagents (B) or Na₂CO₃ (C) on reactivity of different phenolic compounds, and responses of cinamic acid and its methoxy derivatives in the Folin-Dennis analysis (D). Three or 4 concentrations of each phenolic compound were incubated in the F-C reagent (B) or Na₂CO₃ (C) first. After incubation of different time periods indicated, the alternate reagents were added and incubated further for 30 min. Ratio of each reaction slope of phenolic compounds were compared. pH conditions of each incubation step (A) and reactivity of cinamic acid and its derivatives under the Method 2 were also analyzed (D). Each value represents the mean ± SD (n=3 or 4). Different letters indicate a significant difference (p<0.01) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (B and C).

우선 Method 1 방법에 따라 F-C시약을 먼저 첨가하고 3분부터 120분까지 incubation한 후 Na₂CO₃용액을 반응시켜 각 물질의 반응성 변화를 측정하였다. FeA나 DHC는 60분, 120분으로 F-C시약과의 반응시간을 연장시켰을 때 10% 이내에서 반응성이 약간 감소하였으며, GA나 TA에서는 반응시간에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4B). 하지만 Method 2에 의한 Na₂CO₃를 먼저 첨가하는 조건에서, 대부분 페놀성 물질들은 Na₂CO₃의 처리시간 증가에 따라 현저하게 발색반응도가 감소하였으며, 특히 GA와 TA의 감소가 두드러졌다. FeA는 다른 물질과는 달리 Na₂CO₃와의 incubation에 의한 반응성의 변화가 크게 나타나지 않았다(Fig. 4C). 이상의 결과에서 Na₂CO₃의 선첨가 및 반응시간의 연장에 의해 대다수 페놀성 물질들의 반응성이 현저하게 저하되는 것을 알 수 있으며, 이는 Na₂CO₃와 반응 시 강알칼리 조건에서 페놀성 물질들의 화학안정성이 감소되기 때문으로 보인다. 특히 ring 구조상 *ortho*-diphenol이나 galloyl moiety를 가진 물질은 Na₂CO₃ 존재 하에 빠른 속도로 산화되어, F-C시약과의 반응성이 약한 quinone류 등의 산화물을 생성하는 것으로 사료된다. 한편 페놀성 물질의 특성상 산성에서는 비교적 안정하여 F-C시약 자체에 의한 반응성은 크게 변하지 않는 것으로 나타났다. 이와 같이 Method 2의 조건에서는 Na₂CO₃와의 우선적인 조우에 의해 강알칼리 환경이 조성되고 따라서 ring 구조물들의 다양한 modification이 발

생할 것으로 예상되는 바, ring 구조상 methoxy group을 가진 비페놀성 물질에서 methoxy group의 유리에 의한 F-C시약과 반응할 수 있는 페놀성 물질로의 전환 여부를 조사하였다. Method 2에 따라 CiA와 그 유도체인 methoxy CiA, dimethoxy 및 trimethoxy CiA에 Na₂CO₃용액을 선처리 한 후 F-C시약과의 반응성을 측정된 결과, 청자색으로의 발색은 거의 나타나지 않았으며 농도에 따른 증가현상도 없었다(Fig. 4D). 따라서 Method 2의 조건에서 비페놀성 CiA유도체들의 변형에 의한 페놀성 화합물로의 전환은 일어나지 않는 것으로 보인다.

pH별 저장에 따른 페놀성 물질의 반응성 변화

Method 1과 2의 정량법에서 페놀성 물질들의 반응성 차이는 F-C시약의 강산성 및 Na₂CO₃용액의 강알칼리 조건의 서로 다른 pH에 노출되었을 때의 화학안정성 차이에 근거한 것으로 판단되어, 각 물질의 pH별 저장시간에 따른 발색반응도 변화를 분석하였다. 각 페놀성 물질들을 pH 3, citrate buffer에 저장한 후 총 페놀량을 Method 1에 의해 분석한 결과, 24시간 저장시간 내에 반응성 변화는 거의 나타나지 않았다(Fig. 5A). 각 물질들을 pH 7.4, phosphate buffer에 저장하였을 때, 4시간 이내 저장시료에서 발색반응성의 급격한 변화는 나타나지 않았으며, EGCG와 GA의 발색도는 각각 19 및 23% 감소하였다. 하지만 8시간 저장시료에서는 현저한 변화를 보여 GA와 DHC는 각각 80와 57% 발색도가

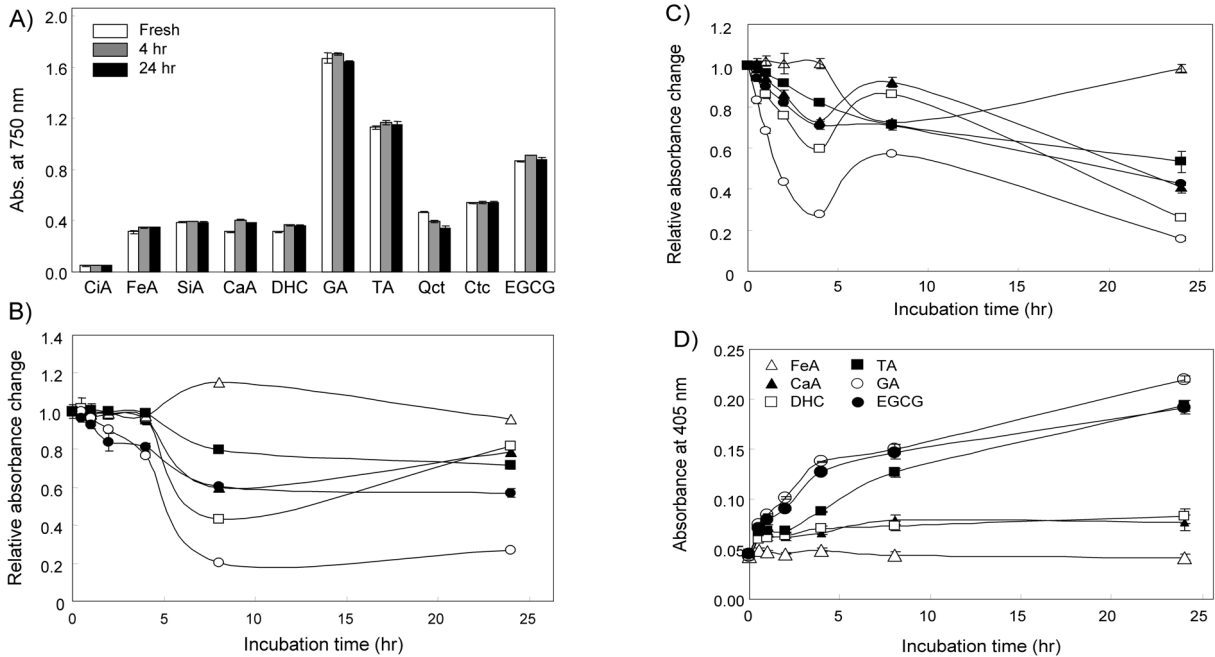


Fig. 5. Effects of incubation pH on reactivity of different phenolic compounds in Folin-Dennis analysis (A~C), and changes in stability of phenolic compounds in pH 7.4 (D). Phenolic compounds were incubated in 0.1 M pH 3 citrate buffer (A), pH 7.4 phosphate buffer (B) or pH 9 Tris buffer (C) at 37°C. After time period indicated, responses of each phenolic compound were analyzed by the Method 1. During incubation, formation of oxidation products was also analyzed by measuring abs. at 405 nm (D). Each value represents the mean \pm SD (n=3 or 4). Symbols in B and C are described in D.

저하되었으며, EGCG와 CaA도 40% 가량의 감소를 보였다 (Fig. 5B). FeA는 8시간 저장 시 오히려 15% 정도 색도가 증가하였으나 24시간 저장 시까지 큰 변화를 나타내지 않았다. 이들을 pH 9, Tris buffer에 저장하였을 때, FeA를 제외한 대부분의 시료에서 4시간 이내에 급격한 반응성 감소현상을 보였으며 GA의 변화가 가장 현저하게 나타났다(Fig. 5C). 하지만 이들의 발색도는 저장시간에 따라 지속적으로 감소하지는 않았으며, 시료에 따라 감소와 증가를 보이는 유동적 결과를 나타내었다. 이와 같은 반응성의 차이는 중성 이상의 pH환경에서 페놀성 물질들이 화학적으로 불안정하여 산화가 진행되며, 저장시간이나 생성된 산화물의 종류에 따라 F-C시약과 다양한 반응성을 나타내기 때문으로 사료된다. 일반적으로 페놀성 물질, 특히 폴리페놀성 물질들의 산화에 의해서 갈색의 산화물들이 생성되는 것으로 알려져 있는데(32), 이를 확인하기 위하여 각 시료물질의 산화과정의 진행을 405 nm에서 흡광도로 측정하였다. 그 결과, pH 3에서 저장한 시료에서는 갈색도의 증가를 나타내지 않아 산화가 진행되지 않은 것으로 사료되며(data not shown), pH 7.4에서는 FeA를 제외한 모든 물질에 있어서 갈색도가 증가하였고, 특히 GA, EGCG 및 TA가 현저한 증가를 보였다(Fig. 5D).

한편 폴리페놀성 물질의 산화에 의해서 H_2O_2 를 비롯한 활성산소종이 발생하는데, 본 실험에서도 pH 7.4에서 24시간 저장 시 400 μ M CaA와 FeA는 약 50~60 μ M, 100 μ M EGCG로부터는 약 100 μ M의 H_2O_2 가 생성됨을 확인하였고

(data not shown), 생성된 H_2O_2 가 F-C시약과의 반응성에 미치는 영향을 조사하였다. pH 7.4에서 24시간 저장한 각 시료에 대해 SOD와 catalase를 첨가하여 활성산소종을 제거한 후 반응시켰을 때, 항산화효소를 첨가하지 않은 시료와 발색도의 차이는 나타나지 않았다(Fig. 6A). 활성산소종을 거의 생성하지 않는 FeA에 200 μ M의 H_2O_2 를 인위로 첨가하였을 때에도 반응의 차이가 없었으며, H_2O_2 자체도 F-C시약과의 반응에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 6B). 한편 기존연구에서 H_2O_2 가 페놀정량 시 영향요인으로 보고된 바 있으나(33), 이는 과량의 H_2O_2 에 의해 페놀성 물질의 산화가 진행되어 반응성의 차이를 나타낸 것으로 사료되며, 200 μ M의 H_2O_2 수준에서는 반응성 자체에 영향을 주지 않는 것으로 보인다. 한편 EDTA의 첨가는 7~8% 정도의 반응성 감소를 가져왔는데(Fig. 6C), Cu^{2+} 등의 금속이온의 존재가 F-C시약의 반응성을 증대시킨다고 보고된 바(34), 반응계에 존재하는 미량의 금속이 EDTA에 의해 제거됨에 따라 발색도가 감소한 것으로 보인다.

발색 kinetics 및 실제시료에의 영향

Folin-Dennis 정량에서 청자색의 발색은 비교적 알칼리 조건에서 페놀성 물질에 의한 F-C시약의 phosphomolybdic/phosphotungstic acid complex로의 전자공여에 의해 나타난다. 따라서 페놀성 물질의 전자공여 패턴에 따라 발색양상에 차이가 날 것으로 예상되어, 시간별 청자색 발색의 kinetics를 조사하였다. Fig. 7A는 Method 1의 정량조건에서

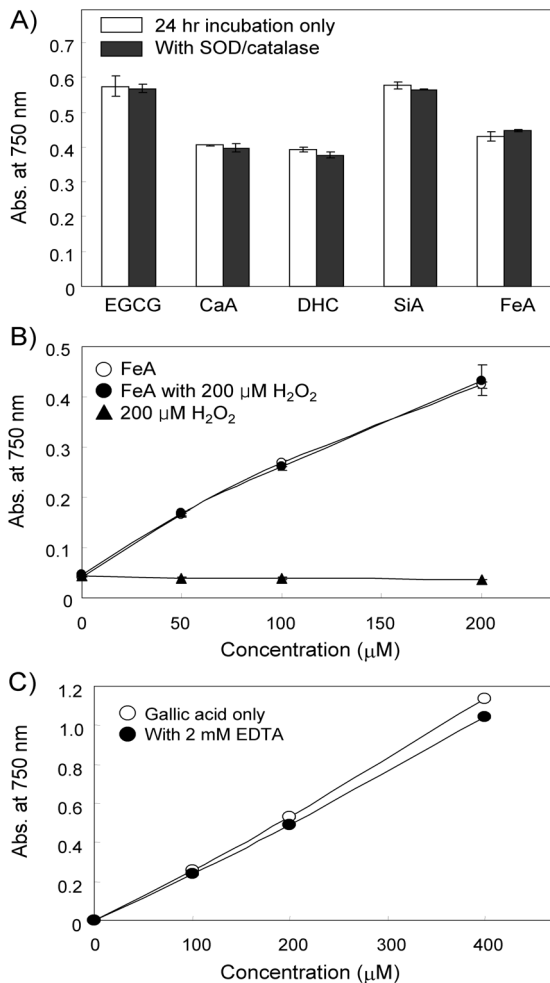


Fig. 6. Effects of H₂O₂ and EDTA on reactivity of different phenolic compounds in Folin-Dennis assay. The phenolic compounds were incubated in pH 7.4 for 24 hr, and SOD/catalase were added. Reactivity of ones with and without adding SOD/catalase was compared by the Method 1 (A). Changes in reactivity of FeA (B) or GA (C) in the presence or absence of 200 μM H₂O₂ or 2 mM EDTA were also analyzed. Each value represents the mean ± SD (n=3 or 4).

각 페놀성 물질에 대한 시간별 청자색 발색도의 변화를 각 물질에 대해 120분간 반응 시 발색도를 1로 기준한 상대적 수치로 나타낸 것이다. GA, TA 및 EGCG 등의 galloyl group을 가진 물질들이 10분 이내에 신속한 발색을 나타낸 반면, Qct과 SiA, CaA, DHC 등의 phenolic acid류는 상대적으로 초기발색반응이 더디게 나타났다(Fig. 7A). 반응시간을 구간별로 나누어 발색진행도를 비교한 결과, SiA와 FeA는 60~120분 사이에도 상당한 반응성을 나타내어 초기 5~10분 사이 반응속도의 약 30~40%를 유지하며 꾸준히 진행됨을 알 수 있었다. 반면 다른 시료들은 60분 이내에 대부분의 발색이 진행되며 이후의 반응은 미미한 것으로 나타났다(Fig. 7B). 이상의 결과는 각 페놀성 물질의 pH별 안정도와 관련이 있는 것으로 사료되며, 중성 이상의 pH 조건에서 비교적 안정한 monophenol류 물질은 반응이 느리지만 꾸준히

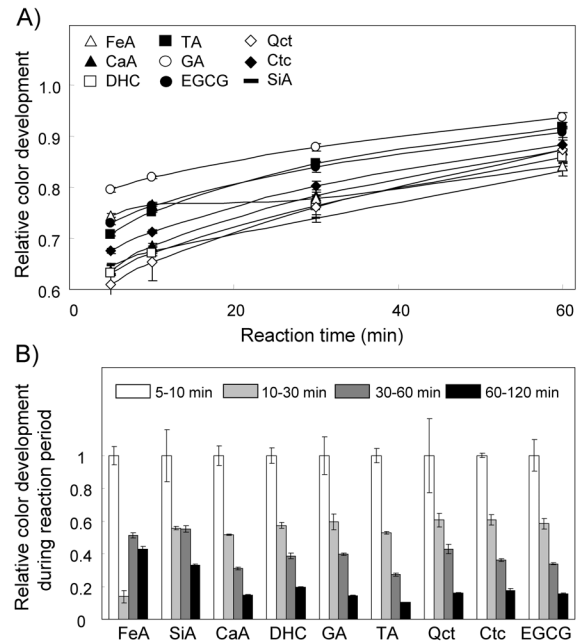


Fig. 7. Reaction kinetics of different phenolic compounds under Folin-Dennis analysis. Each phenolic compound was analyzed by the Method 1 and time-dependent color development was monitored. Based on abs. at 750 nm at 2 hr incubation, relative absorbance at each time point was calculated (A). A relative color development during several incubation periods was also shown (B). Each value represents the mean ± SD (n=3 or 4).

진행되는 양상을 보이는 반면, galloyl group을 함유한 화합물의 경우 신속하게 반응이 일어나고 쉽게 불안정화 되는 것으로 보인다.

서로 다른 scheme의 Folin-Dennis 정량방법이 실제 추출물 시료에서 어떠한 차이를 나타내는지 알아보기 위하여, 연잎 열수 추출물을 제조하여 조사하였다. F-C시약을 선처리하는 Method 1에 의한 결과는 Na₂CO₃를 먼저 처리하는 Method 2에 비해 40% 정도 높은 발색반응도를 나타내었으며, 동시에 처리하는 경우에 F-C시약에 이어 바로 Na₂CO₃를 처리하는 경우가 섞여 처리하는 경우보다 반응성이 컸다(Fig. 8A). 한편 F-C시약 또는 Na₂CO₃ 용액을 가한 후 60분까지 처리시간을 달리하여 연잎 시료의 발색도 변화를 본 결과, F-C시약의 처리시간에 따른 반응성의 차이는 없었으나, Na₂CO₃ 용액을 먼저 처리한 시료에 있어서는 즉시 현저하게 반응성을 상실하였으며, 시간의 경과에 따라 발색도가 낮아지는 경향을 나타내었다(Fig. 8B). 이는 연잎 중 상당량의 페놀성 물질들이 Na₂CO₃에 노출되는 즉시 파괴되어 F-C시약과의 반응성을 상실했기 때문이며, Method 1과 Method 2 사이의 반응성 차이가 큰 시료일수록 ring의 -OH의 밀도가 높은 화합물이 많이 포함된 시료로 예측된다. 이상의 결과는 Na₂CO₃가 -OH 밀도가 높은 galloyl moiety를 가진 물질을 포함하여 대부분의 페놀성 물질들의 화학안정성이 크게 영향을 미치고, 현재 사용되는 여러 scheme의 정량방법에 의해 이들의 반응성이 현저하게 변화되며, 보다 정확한 총

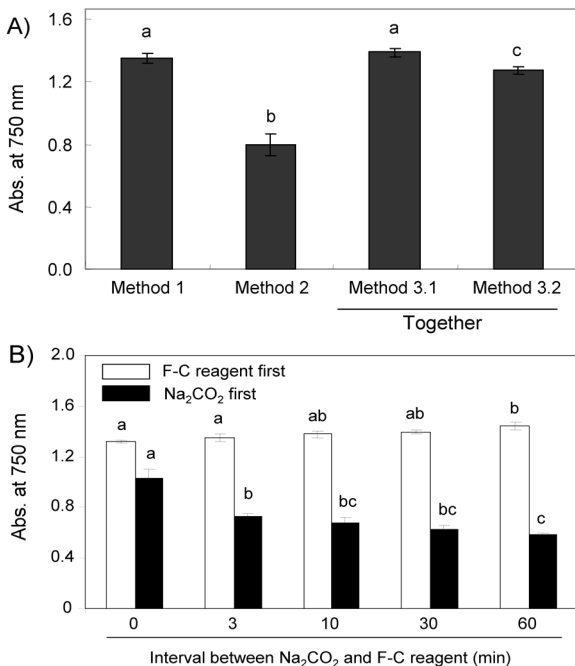


Fig. 8. Changes in response of lotus leaf extracts by different schemes of Folin-Dennis analysis (A), and effects of incubation time in Na_2CO_3 or the F-C reagents on reactivity of the extracts (B). Total phenol levels of lotus leaf extract (1 mg/mL) was analyzed by the different methods using the F-C reagent. The extracts was also incubated in Na_2CO_3 or the F-C reagent first during different time periods indicated, the alternate reagents were added, and changes in color development at 750 nm were analyzed (B). Different letters indicate a significant difference ($p < 0.01$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

페놀성 물질의 정량을 위해서 이러한 요인들이 신중하게 고려되어야 할 것을 시사한다.

요 약

본 연구에서는 F-C시약을 이용한 페놀성 물질의 정량방법에서 다양한 종류의 페놀성 성분들의 반응특성 및 반응영향요인들을 분석하였다. 정량방법 중 Na_2CO_3 를 선처리하는 F-C시약을 먼저 처리하는 방법에 비해 대부분 페놀성 물질들의 발색반응도 감소를 야기하였으며, 특히 -OH 밀도가 높은 galloyl group을 가진 gallic acid 및 EGCG 등의 성분이 두드러진 감소를 나타내었다. F-C시약과 Na_2CO_3 를 동시에 처리하는 경우 F-C시약을 선처리 하는 경우에 비해 각 페놀성 물질의 반응성이 약간 감소되는 경향을 나타내었다. 그 원인은 페놀성 물질들이 산성인 F-C시약에서보다 Na_2CO_3 용액의 알칼리 환경에서 화학적으로 불안정하기 때문이며, pH 7.4 및 9의 환경에서 페놀성 물질로부터 생성된 산화물들은 F-C시약과의 반응성이 약화됨을 확인하였다. 이 과정 중에 같이 형성된 H_2O_2 는 F-C와의 반응에 직접적인 영향을 미치지 않았다. FeA와 SiA와 같은 monophenol류는 방법의 차이에 따라 큰 반응성의 변화를 나타내지 않았으며, 발색도

는 느리지만 꾸준히 증가하는 kinetics 패턴을 보였다. 실제 시료에의 적용을 위해 연잎 추출물을 제조하고 각 정량방법에 대한 반응도 차이를 조사한 결과, 역시 Na_2CO_3 처리환경에서 현저한 발색반응도 저하를 나타내었다. 보다 정확한 페놀성 물질의 정량을 위해 적절한 표준물질의 선택 및 정량방법 등에 대한 표준화가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2010년 서울여자대학교 교내특별연구비의 지원에 의해 수행되었고 이에 감사드립니다.

문 헌

- Dai J, Mumper RJ. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
- Jacobo-Velázquez DA, Cisneros-Zevallos L. 2009. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. *J Food Sci* 74: R107-113.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333.
- Guo W, Kong E, Meydani M. 2009. Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutr Cancer* 61: 807-810.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287-306.
- Prior R, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
- KFDA. Korea Food additives codes, Natural additives, 120. Defatted rice bran extract. available at: <http://fa.kfda.go.kr/foodadditivescode.html>. accessed Oct. 1, 2010.
- KFDA. Korea Food additives codes, Natural additives, 117. Tea extract. available at: <http://fa.kfda.go.kr/foodadditivescode.html>. accessed Oct. 1, 2010.
- Folin O, Dennis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
- Budini R, Tonelli D, Girotti S. 1980. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. *J Agric Food Chem* 28: 1236-1238.
- Snyder H. 1893. Notes on Löwenthal's method for the determination of tannin. *J Am Chem Soc* 15: 560-563.
- Bray HG, Thorpe WV. 1954. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. *Meth Biochem Anal* 1: 27-52.
- Salunkhe DK, Chavan JK, Kadam SS. 1990. *Dietary tannins: consequences and remedies*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, USA. p 84-87.
- Peterson GL. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall. *Anal Biochem* 100: 201-220.
- Box JD. 1983. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol

- reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res* 17: 511-525.
17. Ikawa M, Schafer T, Dollard C, Sasner J. 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J Agric Food Chem* 51: 1811-1815.
 18. Ainsworth EA, Gillespie KM. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2: 875-877.
 19. Kang S, Hong J. 2009. Ferrous ion chelating and radical scavenging properties, and cytotoxic effects of hot water extracts from lotus (*Nelumbo nucifera* G.). *J Natural Science SWINS* 21: 35-42.
 20. Bahorun T, Luximon-Ramma A, Crozier A, Aruoma OI. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J Sci Food Agr* 84: 1553-1561.
 21. Kaur C, Kapoor HC. 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int J Food Sci Tech* 37: 153-161.
 22. Altunkaya A, Gökmen V. 2008. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactucasativa*). *Food Chem* 107: 1173-1179.
 23. Dudonn S, Vitrac X, Coutire P, Woillez M, Mrillon JM. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem* 57: 1768-1774.
 24. Ha TY, Kang SH, Kwon TY, Ahn JY, Kim SR, Kim DS. 2006. Antioxidant activity and contents of bioactive components in polar microalgae. *Ocean Polar Res* 28: 37-43.
 25. Lee NH, Hong JI, Kim JY, Chang MH. 2009. Antioxidant properties and protective effects of *Inula britannica* var. *chinensis* Regel on oxidative stress-induced neuronal cell damage. *Korean J Food Sci Technol* 41: 87-92.
 26. Seo SJ, Choi Y, Lee SM, Kong S, Lee J. 2008. Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 129-135.
 27. Minussia RC, Rossic M, Bolognac L, Cordib L, Rotilioc D, Pastorea GM, Duránd N. 2003. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem* 82: 409-416.
 28. Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Núñez MJ. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J Agric Food Chem* 53: 2111-2117.
 29. Rababah TM, Hettiarachchy NS, Horax R. 2004. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grapeseed, ginger, rosemary, gotukola, and ginkgo extracts, vitamin E, and *tert*-butylhydroquinone. *J Agric Food Chem* 52: 5183-5186.
 30. Zieliński H, Kozłowska H. 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J Agric Food Chem* 48: 2008-2016.
 31. Pastrana-Bonilla E, Akoh CC, Sellappan S, Krewer G. 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J Agric Food Chem* 51: 5497-5503.
 32. Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli MC, Lerici CR. 2000. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci Tech* 11: 340-346.
 33. Snell FD, Snell CT, Snell CA. 1961. *Colorimetric methods of analysis*. 3rd ed. Van Nostrand, Princeton, NJ, USA. Vol 3, p 77.
 34. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. 2010. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem* 58: 8139-8144.

(2010년 11월 5일 접수; 2010년 11월 26일 채택)