

## HPLC On-line ABTS<sup>+</sup> Screening을 이용한 왕대(*Phyllostachys bambusoides*) 잎으로부터 Homoorientin의 확인

이광진 · 량춘 · 양혜진 · 마진열<sup>#</sup>

한국한의학연구원 한의신약연구그룹

(Received June 14, 2012; Revised August 20, 2012; Accepted August 23, 2012)

### Rapid Identification of Homoorientin from *Phyllostachys bambusoides* Leaves by HPLC On-line ABTS<sup>+</sup> Screening Method

Kwang Jin Lee, Chun Liang, Hye Jin Yang and Jin Yeul Ma<sup>#</sup>

Korea Institute of Oriental Medicine, KM-Based Herbal Drug Research Group, Daejeon 305-811, Korea

**Abstract** — To determination of antioxidant substance homoorientin, from *Phyllostachys bambusoides* leaves, the ultrasonic extraction and HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening method were employed. Also, the various experimental variables such as the frequency and time of ultrasonic system were investigated and homoorientin was extracted efficiently at the low frequency 35 kHz and the extraction time 60 min. The values were positive peak 1574.71 (relative area, 23.67%) and negative peak 6924.34 (relative area, 1.23%), respectively. This HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening method was rapid and efficient to search for antioxidants from natural products. These results will provide a database for investigating the constituents of natural products and the resources of pharmaceutical and cosmetic products.

**Keywords** □ HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening, *Phyllostachys bambusoides* leaves, antioxidant, homoorientin, ultrasonic

왕대 잎으로부터 homoorientin의 추출 및 스크리닝 분석은 초음파 추출 시스템을 이용한 HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening 방법으로 실시하였다. 예로부터 질병의 치료 및 예방의 목적으로 사용된 전통의약은 구성 유용성분의 복합적인 상호작용에 의하여 다양한 약리효과를 보이며, 상대적으로 인체 부작용이 적다는 장점이 있다. 따라서 이러한 연구는 전통의약을 이용한 기능성 식품 및 의약품, 기능성 소재산업에 기여할 것으로 기대된다. 또한 HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening과 같은 응용 시스템의 적용은 고효율의 추출과 신속한 활성분석을 통하여 효율적인 연구가 가능 할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 확립한 왕대 잎으로부터 homoorientin의 효율적인 추출방법은 우리나라에 널리 분포한 자생식물의 기초연구에 기여할 것으로 판단된다.<sup>1)</sup>

대나무의 대표적인 품종은 왕대, 솜대, 맹종죽, 조릿대 등이 있다. 왕대는 중국에서 자생, 재배하는 천연물로 참대 또는 고죽이라고도 부른다.<sup>2)</sup> 대나무는 용도에 따라 가지, 잎, 순 등이 건축

신소재, 수공예품으로 사용되고 식용으로는 죽순, 열매, 수액 등이 이용되고 있다.<sup>3,4)</sup> 약리적 특성으로는 플라보노이드 계열의 화합물이 많이 함유되어 있으며, homoorientin, orientin, vitexin, luteolin, tricin 등이 있다.<sup>5)</sup> 이러한 성분들은 해열, 지혈, 이뇨작용과 중풍, 고혈압을 예방하며 항산화, 항염, 항암 등의 활성을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다.<sup>5-7)</sup> 또한 연구자들에 의해 대나무의 잎과 줄기에서 항산화 활성, 아질산염제거능, 항균활성연구 등이 소개되었다.<sup>8,9)</sup> 가공 및 추출방법으로는 일반적인 열수추출법, Soxhlet법, 고온용매추출법과 같은 전통적인 방법이 사용되었고,<sup>10,11)</sup> 초임계유체법, 초고압처리법, 초음파추출법을 통한 추출효율을 증대시키기 위한 기술이 많이 이용되고 있다.<sup>12)</sup> 그 중에서도 초음파 추출법은 추출시간이 짧고 추출효율이 높은 장점으로 천연물추출공정에 많이 사용되고 있다.<sup>12,13)</sup> 초음파의 고주파와 저주파의 변화에 따라 기포(bubble)의 크기 및 에너지의 세기가 변화되며, 이로 인해 파장의 침투력이 미세부분의 조직까지 쉽게 침투하여 추출 효과를 향상시킬 수 있다.<sup>14-16)</sup> ABTS<sup>+</sup> assay는 타겟으로 하는 유용성분의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능력을 측정하여 항산화력을 확인하는 방법으로, 천연물에서 바이오활성을 갖는 다양한 생리활성물질의 항산화 활성 탐색에 적용되고

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 042-868-9466 (팩스) 042-868-9573  
(E-mail) jyma@kiom.re.kr

있다.<sup>17,18)</sup> 또한 최근에는 성분 분석과 동시에 유용 성분의 항산화 활성 분석을 위하여 HPLC 시스템에 ABTS<sup>+</sup> 시약을 적용하여, 천연물에서 항산화 활성을 가지고 있는 다양한 유용물질을 빠른 시간 내에 탐색할 수 있다.<sup>19,20)</sup> 본 연구의 목적은 이러한 HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening 시스템을 이용하여 최적화된 왕대 잎 내 함유된 homoorientin의 분석 방법을 연구하여 HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening 시스템의 장점과 가능성을 제시하고자 하였으며, 최적의 초음파 추출조건을 모색하여 이후의 연구에 대한 자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 시료는 강원도 강릉시 인근 산에서 채취(2011년 3월)하여 음지, 상온 25°C에서 7일간 건조하여 사용하였다. 표준 시료인 homoorientin은 Sigma사에서 구입하였다. 모든 시료들은 HPLC에 주입하기 전에 막 여과지(PVDF 0.2 μm, Waters Co.)를 이용하여 여과하였다. 용매는 HPLC급(99.9%)으로 물, 아세토나이트릴과 에탄올은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서, 아세트산은 동양화학(Incheon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 활성분석에 사용된 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>S<sub>4</sub>)와 potassium persulfate는 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며, 순도는 99.9% 이상이다. Homoorientin의 구조식은 Fig. 1에 나타내었다.

### 추출 및 전처리

추출은 일정한 온도로 상온에서 수행하였으며 건조된 시료는 푸드믹서(220 W, 1.3 A person Hannil Mixer FM)에서 2분 동안 분쇄 후, 입자를 체 거름(30 μm)으로 분리하여 시료로 사용하였다. 이후 왕대 잎 분말 3 g을 100 mL 비이커에 추출용매로서 50% 수용성 에탄올을 각각 100 mL씩 첨가하여 초음파 추출하였다. 최적의 초음파 추출조건을 모색하기 위하여 다양한 초음파 주파수(35, 72, 170 kHz, 300±2 W)를 적용하였으며, 추출시간은 15,

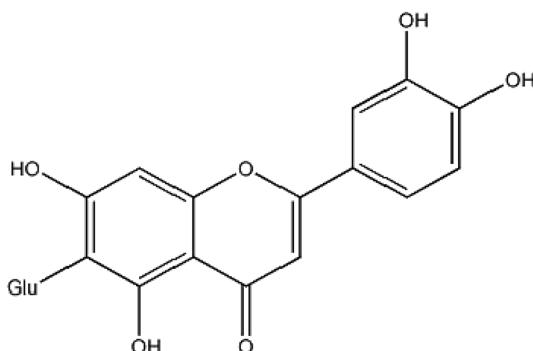


Fig. 1 – Chemical structures of flavone, homoorientin.

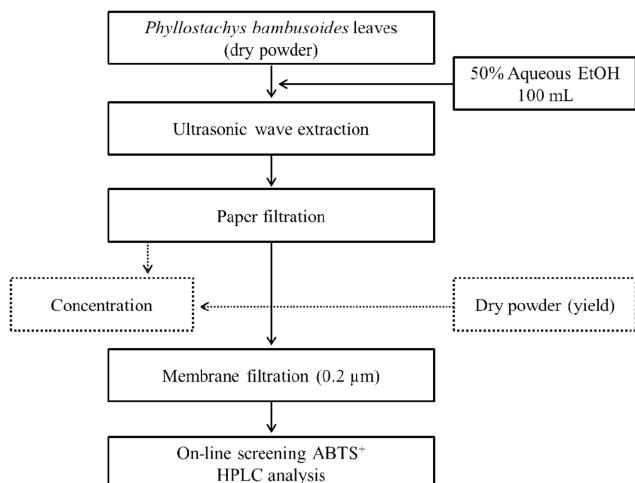


Fig. 2 – Process of extraction and purification.

30, 60분으로 하였다. 이때 추출온도는 반응기 내의 물을 chiller를 통해 순환시켜 일정한 온도( $25\pm1^{\circ}\text{C}$ )로 유지하였다. 각각의 추출물에는 많은 양의 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용매 추출 후 여지 필터(pore size: 5 μm)에서 감압 여과하여 시료 잔류물과 분리시켰으며, 시료 용액을 멤브레인 필터(FH - 0.2 μm, Waters, Milford, MA, USA)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다(Fig. 2).

### 초음파 시스템

연구에 사용된 초음파 추출시스템은 bath type의 관통형 4주파 초음파 발생 장치(Mirae Ultrasonic Tech. Co., Korea)를 실험에 사용하였다. 초음파 추출시스템은 Flexonic-500/100, W 382×L 450×H 150 mm, Reactor: 1L를 사용하였다.

### 표준액 제조

표준 시료인 homoorientin 2 mg을 고순도 에탄올 4 mL에 녹여 500 ppm의 표준원액으로 제조하였다.

### ABTS<sup>+</sup> 표준액 제조

On-line 라디칼활성 측정을 위한 표준시료 조제는 중류수 40 mL에 potassium persulfate 시약 37.8 mg을 넣어 완전히 녹인 후, ABTS<sup>+</sup> 시약 44 mg을 첨가하여 충분히 교반 후 차광시켰다. 제조된 용액 40 mL 중 30 mL을 취하여 중류수 870 mL에 희석시킨 후, 1 liter 갈색 병에 넣고 하루 정도 라디칼의 안정성을 위해 어두운 곳에서 보관한 뒤 사용하였다.

### 기기 및 HPLC online screening ABTS<sup>+</sup> 분석

HPLC급 100% 물(순도: 99.9%)에서 추출한 시료는 회전식 증발기(LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co., Japan)

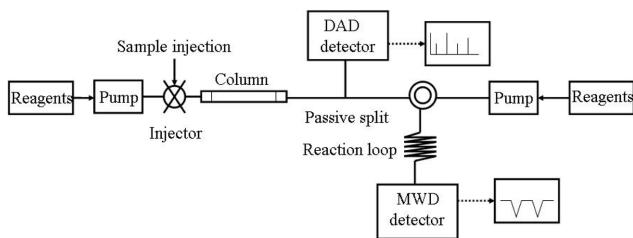


Fig. 3 – Scheme of on-line screening ABTS<sup>+</sup> HPLC system.

를 사용하여 농축하였다. 본 연구에 사용된 HPLC system은 Agilent 1200(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)으로 Chemstation(Agilent Technologies), HPLC-diode-array detector (DAD)로 구성되었고, 데이터 처리는 Agilent사의 Millennium 3.2를 사용하였다. 분석은 RP-HPLC 컬럼(RS-tech OP C<sub>18</sub>, 5 μm, 4.6×250 mm)을 이용하여 수행되었으며, 유속은 1 ml/min로 고정하였다. UV detector의 파장범위는 200~400 nm를 적용하였고, 크로마토그램은 homoorientin의 흡수극대파장인 330 nm에서 나타내었다. 이동상은 이성분계 A: water/trifluoroacetic acid(99.9/0.1, vol.%), B: acetonitrile(100, vol.%)를 사용하여 45 분 동안 기울기 용출법(90 : 10~60 : 40%, A:B vol.%)으로 실험하였다. ABTS<sup>+</sup> 표준액은 Agilent 1200 pump에 의하여 유속 0.5 ml/min로 운반되며, 혼합기에서 혼합된 시료의 항산화 활성은 734 nm에서 측정하였다. Fig. 3에서는 HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening system을 나타내었다.

## 결과 및 고찰

최근 식품 및 의약품 분야에서 대나무에 대한 관심이 높아지고

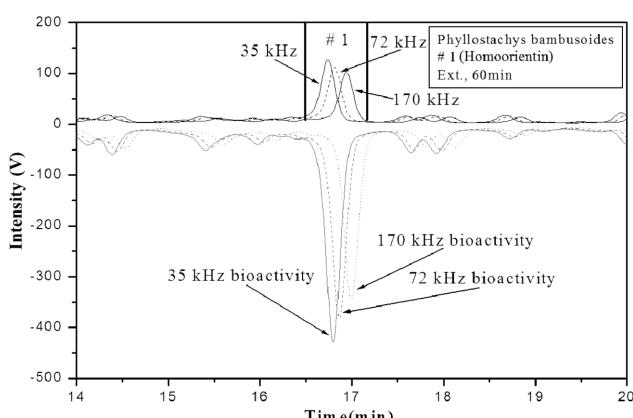
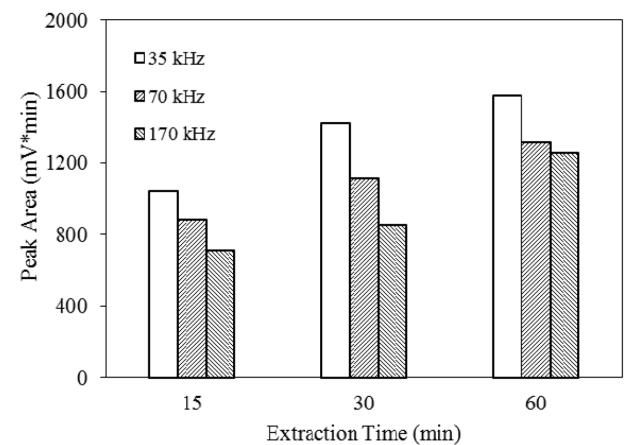
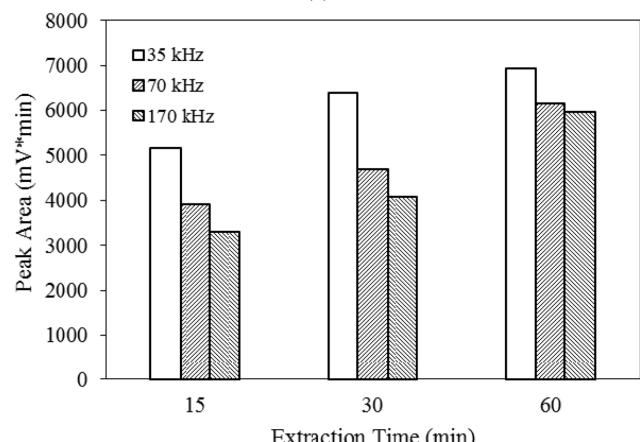


Fig. 4 – Chromatogram of antioxidant activity of flavone, homoorientin from *Phyllostachys bambusoides* leaves using on-line screening ABTS<sup>+</sup> HPLC system (mobile phase A: water/trifluoroacetic acid (99.9/0.1, vol.%), B: acetonitrile (100, vol.%), gradient elution B: 10~40%, run time: 45 min, flow rate: 1 ml/min, ABTS<sup>+</sup> flow rate: 0.5 ml/min, injection volume: 20 μl).

있으며, 그 중에서도 대나무 왕대 잎에서 분리한 homoorientin<sup>o</sup> 자체 내의 항산화 활성을 촉진하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 왕대 잎으로부터 homoorientin의 추출 효율을 향상시키기 위하여 초음파 추출방법을 사용하였으며, HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening을 활용하여 항산화 활성을 신속하고 효율적으로 분석하였다. 앞서 제시한 HPLC 조건 하에서 homoorientin의 체류시간은 16.82분으로, 상대표준편차는 0.5%로 확인되었다. Fig. 4에서는 왕대에서 추출한 homoorientin의 HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening 분석 크로마토그램을 보여주고 있다. 이러한 결과는 HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening을 통해 homoorientin의 분석 및 항산화 활성 평가를 동시에 진행할 수 있다는 것을 나타낸다. 크로마토그램에서 확인된 homoorientin의 positive peak를 기준으로 한 negative peak의 크기는 항산화 활성의 세기를 나타낸다. 각각 동일한 추출시간(15, 30, 60 min)



(a)



(b)

Fig. 5 – Effect of different extraction times on the peak area and antioxidant activity (a: extraction efficiency on intensity and extraction time b: antioxidant activity on intensity and extraction time, extraction temperature: 25±1°C, 300±2 W).

에서 추출된 homoorientin의 peak와 항산화 활성 peak 면적을 비교해보면, 초음파 주파수가 저주파일 때(35 kHz) 항산화 활성의 세기도 증가하였으며, 이와 반대로 초음파 주파수가 고주파(170 kHz), 중주파(72 kHz) 일 때 항산화 활성의 세기는 주파수의 영향에 따라 각각 감소하였다. 또한 크로마토그램 상에서, homoorientin의 피크면적(%)은 35 kHz에서 60분(23.67%)>30분(23.51%)>15분(23.36%) 순으로, 72 kHz에서 15분(24.39%)>30분(23.86%)>60분(23.59%) 순으로, 172 kHz에서 15분(24.71%)>30분(24.69%)>60분(23.21%)으로 주파수에 따라 35 kHz>72 kHz>170 kHz 순으로 추출효율을 보였다. 또한 homoorientin의 항산화 활성은 35 kHz, 60분에서 가장 높았으며, 초음파 추출시간이 길어질수록 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5(a, b)).

이러한 이유는 초음파 에너지가 증가하면 용액의 분자간 응집력이 파괴되고 미세한 케비테이션(기포가 생성되는 현상)인 공동(cavity)이 발생되며, 이 공동이 폭발하면서 방출되는 에너지에 의한 것으로 사례되고,<sup>13)</sup> 주파수의 변화에 따라 발생된 기포가 터질 때의 압력과 기포 안의 방전 때문에 초음파를 받은 물질은 기계적인 작용을 받거나 화학 변화를 일으켜 유용성분의 추출이 용이하게 되는 것이다.<sup>14,15)</sup> 또한 초음파 에너지는 저주파일 때 케비테이션의 진동이 크고 주변 작업장 소리도 작게 들리며 에너지 파장의 전달 폭도 크다. 반면 고주파일 때는 케비테이션의 진동이 매우 작고 주변 작업장 소리는 크게 들리며 에너지 파장의 전달 폭이 직진형이다. 이러한 기계적 에너지의 변화에 근거하면 저주파는 조직이 세밀하고 밀도가 큰 천연물의 추출에 적합하고 고주파는 조직이 부드럽고 밀도가 작은 천연물의 추출에 적합하다고 사료된다.

Fig. 6은 왕대 잎의 SEM 현미경 사진이다. 그림에서와 같이 초음파 추출 후 왕대 잎의 미세 성분들 대부분이 초음파의 에너지에 의하여 추출되었음을 확인할 수 있었으며, 초음파 추출이

활성성분의 추출효율을 높여준다는 것을 알 수 있다. 일반적으로 추출 시간이 길어지거나 초음파 주파수가 높아지면 활성성분의 구조가 깨지거나 분해되기 때문에 추출 수율은 급속히 감소하거나, 얼마간 증가할지라도 일정 시간이 지나면 감소하게 된다.<sup>16,17)</sup> 대나무의 조직은 일반 천연물의 조직과 비교하면 상대적으로 섬유질의 밀도가 크고 조직구조가 밀집되어 있기 때문에 동일한 추출 조건 하에서도 초음파의 에너지가 미세한 부분의 조직까지 침투되어 추출 효율이 높다. 본 실험에서 왕대 잎으로부터 항산화 활성이 우수한 homoorientin을 효율적으로 얻기 위한 추출 방법으로 초음파 에너지의 주파수와 추출시간 변화에 따른 추출효율을 확인하였고, 전 처리한 추출액에 포함된 homoorientin을 분석하고 최적의 추출조건을 실험적으로 모색하였다.

## 결 론

왕대 잎으로부터 HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> screening 기법을 사용하여 flavone C-glycosides인 homoorientin의 항산화 활성을 신속하게 분석하였으며, 초음파 주파수와 시간에 따른 전 처리한 왕대 잎의 추출액에 포함된 homoorientin을 분석하고 최적의 추출조건을 실험적으로 모색하였다. 실험 결과에 의하면 최적의 추출조건으로 35 kHz, 60분일 때가 positive peak 면적이 1574.71(mAU)로써 23.67%, negative peak의 면적이 6924.34(mAU)로써 1.23%로 추출 효율이 가장 우수하였다. 이러한 결과는 기능성식품, 의약품 및 화장품 소재 개발 시 유용성분을 조사하는 기초자료로 제공될 것이다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원 한의신약연구그룹의 연구지원

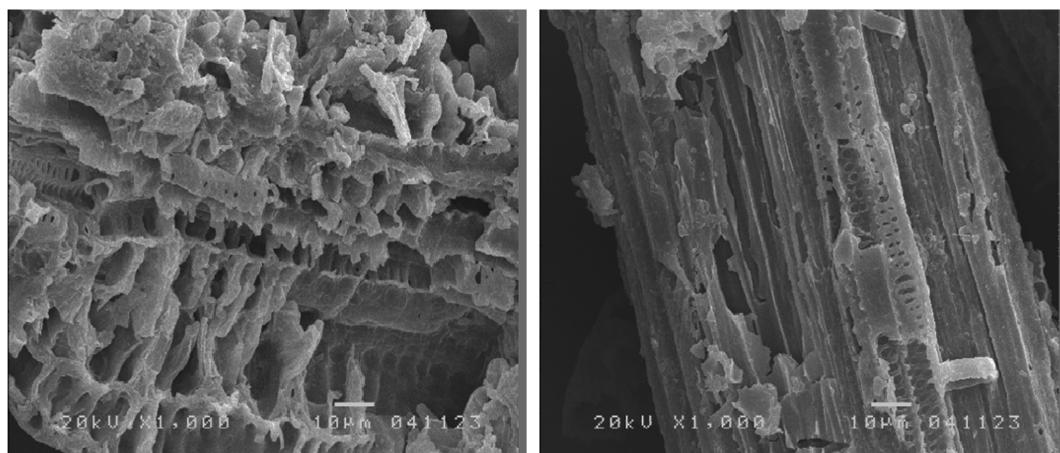


Fig. 6 – SEM images of the *Phyllostachys bambusoides* leaves (ultrasonic frequency: 35 kHz, extraction time: 60 min, extraction temperature: 25±1°C).

(K12050)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 1) Zhang, Y., Jiao, J., Liu, C., Wu, X. and Zhang, Y. : Isolation and purification of four flavone c-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **107**, 1326 (2008).
- 2) Lu, B., Wu, X., Tie, X., Zhang, Y. and Zhang, Y. : Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. *Food. Chem. Toxicol.* **43**, 783 (2005).
- 3) Choi, S. D. and Lee, K. J. : Enhanced extraction and antioxidant activity analysis of flavone C-glycosides from black bamboo using ultrasonic wave. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 297 (2008).
- 4) Ju, I. O., Jung, G. T., Ryu, J., Choi, J. S. and Choi, Y. G. : Chemical components and physiological activities of bamboo extracts prepared with different methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 542 (2005).
- 5) Wu, J. H., Wu, S. Y., Hsieh, T. Y. and Chang, S.-T. : Effects of copper-phosphorous salt treatments on green colour protection and fastness of ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*). *Polymer Degradation and Stability* **78**, 379 (2002).
- 6) Chung, D. K. and Yu, R. N. : Antimicrobial activity of bamboo leaves extract on microorganisms related to Kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 1035 (1995).
- 7) Hu, C., Zhang, Y. and Kitts, D. D. : Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *henonis* leaf extract *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3170 (2000).
- 8) Kim, M. J., Byun, M. W. and Jang, M. S. : Physiological and antibacterial activity of bamboo (*Sasa coreana* Nakai) leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 135 (1996).
- 9) Baek, J. W., Chung, S. H. and Moon, G. S. : Antimicrobial activities of ethanol extracts from Korean bamboo culms and leaves. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 1073 (2002).
- 10) Cushnie, T. T. P. and Lamb, A. J. : Antimicrobial activity of flavonoids. *International J. of Antimicrobial Agents.* **26**, 343 (2005).
- 11) Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. and Lee, D. U. : Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 261 (2004).
- 12) Lee, K. J. and Row, K. H. : Enhanced extraction of isoflavones from Korean soybean by ultrasonic wave. *Korean J. Chem. Eng.* **23**, 779 (2006).
- 13) Rezić, I., Horvat, A. J. M., Babić, S. and Kastelan-Macan, M. : Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry* **12**, 477 (2005).
- 14) Jerković, I., Mastelić, J., Marijanović, Z., Klein, Z. and Jelić, M. : Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and *Castanea sativa* L. *Ultrasonics Sonochemistry* **14**, 750 (2007).
- 15) Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D. : Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**, 161 (2008).
- 16) Lee, K. J. and Um, B. H. : Extraction of useful component from natural plants using ultrasound system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 101 (2008).
- 17) Karaman, S., Tütem, E., Başkan, K. S. and Apak, R. : Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. *J. Sci. Food. Agric.* In press (2012).
- 18) Nuño, G., Zampini, I. C., Ordoñez, R. M., Alberto, M. R., Arias, M. E. and Isla, M. I. : Antioxidant/antibacterial activities of a topical phytopharmaceutical formulation containing a standardized extract of baccharis incarum, an extremophile plant species from argentine puna. *Phytother. Res.* In press (2012).
- 19) Lee, K. J. : Antioxidant activity analysis of catechin compounds in Korean green tea using HPLC on-line ABTS<sup>+</sup> antioxidant screening system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 96 (2008).
- 20) Bountagkidou, O., van der Klift, E. J., Tsimidou, M. Z., Ordoudi, S. A. and van Beek, T. A. : An on-line high performance liquid chromatography-crocin bleaching assay for detection of antioxidants. *J. Chromatogr. A.* **1237**, 80 (2012).