

Bioactivity Analysis of Curcuminoids from Turmeric using On-line Screening HPLC-ABTS

Sun Do Choi*

On-line Screening HPLC-ABTS를 이용한 강황으로부터 Curcuminoids의 생리활성 분석

최 선 도*

Received: 16 April 2013 / Accepted: 25 April 2013 / Published Online: 30 September 2013
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2013

Abstract Free radical scavengers in the bisdemethoxycurcumin (BDMC), demethoxycurcumin (DMC) and curcumin of turmeric (*Curcuma longa*) were screened, identified, quantified and isolation using coupled off-line-2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and on-line screening high-performance liquid chromatography (HPLC)-ABTS assay. There was a very small margin of error between the off-line-ABTS method and the on-line screening HPLC-ABTS method.

Keywords isolation · on-line screening high-performance liquid chromatography · simultaneous analysis · turmeric

강황(*Curcuma longa* 이하 turmeric)은 생약재로 널리 이용되고 식품첨가물로 잘 알려졌으며 카레의 주원료인 향신료 성분이다 (Zhang, 등 2008; Choi, 2009). 또한 전통적으로 염증, 항산화, 항돌연변이성, 간 해독, 항암 및 혈소관 응집억제 등의 효능이 보고되었다 (Singh 등, 2010; Zhao 등, 2011). 본 연구에서는 curcuminoids의 curcumin (MW=368), demethoxycurcumin (DMC, MW=338), bisdemethoxycurcumin (BDMC, MW=308)를 용매 추출하여 (Lee 등, 2012), 빠른 생리활성 평가를 on-line screening high-performance liquid chromatography (HPLC)-2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) assay로 확인하였고 off-line-assay와 비교 하여 활성이 우수한 curcumin (MW=

368)을 고순도로 분리를 하였다. 이러한 on-line screening HPLC-ABTS assay를 사용한 빠른 활성물질의 탐색은 선택적으로 유용성분의 고순도 획득 및 동시 분리·분석을 통해 효율적인 활성소재 확보를 위한 선택적 추출 및 분리의 가능성을 확인할 수 있었다. 하지만 강황으로부터 on-line screening HPLC-ABTS assay를 적용한 빠른 생리활성 평가의 연구는 매우 미미한 실정이다. 따라서 본 연구는 상용공정의 기초데이터를 실험적으로 구하여 비교하였다. 연구에 사용된 강황(turmeric) 시료는 중국 지방에서 재배되었으며 2012년 3월 (주)서룡상사/영천 현대약품사에서 수입 및 구매하여 한국한의학연구원 한의신약개발그룹에서 엄선된 시료를 사용하였다. 표준시료인 curcumin은 Sigma-Aldrich Co. (C1386, USA)에서 구입하였다. 시료의 균일성을 위하여 수분조절 용기(desiccator)에 보관하여 사용하였고 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(PVDF 0.2 µm, Waters co)를 이용하여 여과를 하였다. 용매는 HPLC급(99.9%)으로 methanol, acetonitrile은 J.T. Baker Co. (USA)과 TFA은 Sigma-Aldrich Co. (USA) 용액을 사용하였으며 물은 3차 증류수(Waters, USA)를 사용하였다. Radical scavenging 활성분석을 위하여 ABTS 시험법을 사용했으며, 사용된 시약은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, C₁₈H₂₄N₆S₄)와 potassium per-sulfate를 사용하여 완전히 녹인 후, ABTS 시약과 충분히 교반 후 차광시켰다. 제조된 용액은 1 L 갈색병에 넣고 하루 정도 라디칼의 안정성을 위해 어두운 곳에서 보관한 뒤 사용하였다 (Lee 등, 2012). 추출은 일정한 상온(25°C)에서 수행 하였으며 건조 분쇄된 시료는 입자를 체 거름(30 µm)으로 분별하여 시료로 사용하였고 이때 수분 함유량은 10.5%였다. 이후, 강황 건조분말 3 g을 250 mL 비이커에 추출 용매 100% 메탄올을 각각 100 mL를 첨가하여 침적법(dipping)을 적용하여 추출시간 1~5 h 동안 시행하여 물질의 변화를 확인하였다. Curcumin의 표준시료 2 mg을 고순도 메탄올

S. D. Choi
Department of Chemical Engineering, Kangwon National University
Samcheok Campus, Gangwon-do, Samcheok, 245-711, Republic of Korea

*Corresponding author (S. D. Choi: sun1215@kangwon.ac.kr)

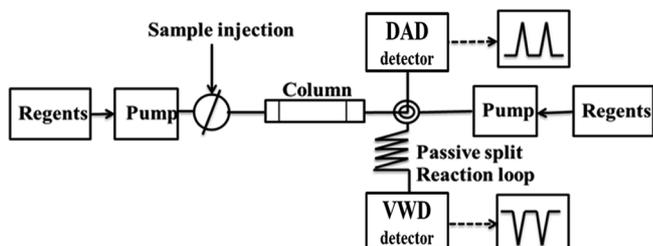


Fig. 1 Schematic of on-line screening HPLC-ABTS system.

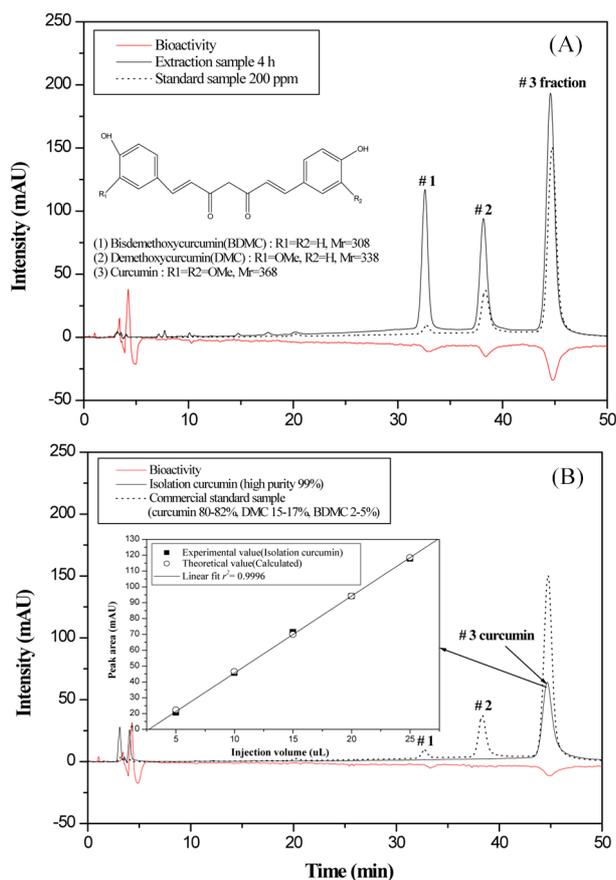


Fig. 2 Analysis of curcuminoids from turmeric using on-line screening HPLC-ABTS ((A) injection volume: 10 µL, (B) injection volume: 15 µL, positive UV wavelength 420 nm, negative wavelength: 730 nm, mobile phase (A: 0.1% TFA in water 60%, B: acetonitrile 40%, run time 50 min, flow rate: 1 mL/min, ABTS-flow rate: 0.5 mL/min).

10 mL를 취하여 200 ppm의 표준원액을 제조하였다. HPLC시스템으로는 Dionex Co.의 3000 pump와 injector는 10 µL sample loop (Dionex, ID×L 0.18×550 mm Viper 550 mm, USA)가 연결되었고, 데이터 처리는 Dionex Co.의 PC에 설치된 Chromeleon data acquisition system (Dionex version 7.0.1.272)과 HPLC-DAD를 사용하여 정량 및 정성분석을 하였다. 분석에 사용된 컬럼은(RS-tech 4.6×250 mm, 5 µm, C₁₈, Korea)와 유속은 1.0 mL/min, 주입부피는 10 µL, 컬럼온도 40°C로 고정하였다. UV 검출기(DAD)의 파장범위를 200-450 nm로 적용하여 420 nm로 검출하였고 생물활성은 734 nm로 나타내었다.

Table 1 Identification and amount of extraction time using on-line screening HPLC-ABTS

Extraction Solvent (%)	Compounds name	t_R (min)	Yield (%)	Total extraction amount (g)	Amount (µg/mL)
1 h	BDMC	32.563			67.819
	DMC	38.107	6.547	0.196	66.532
	Curcumin	44.417			170.751
2 h	BDMC	32.540			76.696
	DMC	38.087	6.733	0.202	71.629
	Curcumin	44.453			184.058
3 h	BDMC	32.510			80.895
	DMC	38.083	7.190	0.216	76.714
	Curcumin	44.477			199.190
4 h	BDMC	32.590			83.171
	DMC	38.170	7.533	0.226	78.971
	Curcumin	44.577			201.657
5 h	BDMC	32.670			87.188
	DMC	38.253	7.567	0.227	81.658
	Curcumin	44.667			209.572

이동상은 이성분계 A: H₂O/TFA(99.9/0.1 v/v), B: Acetonitrile (100 v/v)을 사용하여 (A:B 60:40 v/v)으로 50 min동안 일정용매 조성법으로 실험하였다. Fig. 1에서는 on-line screening HPLC-ABTS assay 시스템을 나타내었다. 이러한 생물활성 screening 시스템을 이용한 동시분석과 추출 확인이 탁월한 on-line screening HPLC-ABTS assay를 적용한 크로마토그램 결과를 Fig. 2(A, B)에서 보여주고 있다. 특히 선행연구(Lee 등, 2013)를 기초로 한 이동상 조성에서 BDMC, DMC 및 curcumin의 빠른 생물활성 능력을 screening 할 수 있었고 이 중 curcumin의 생물 활성이 peak area (negative mAU: 45.0284)로 제일 높았다. 이때 물질 사이의 각 체류시간(t_R)은 curcumin 44.417 min, DMC 38.107 min, 및 BDMC 32.563 min이었고 분리도가 1.5 이하로 낮았다(Fig. 2(a)). 또한 생물활성이 우수한 curcumin(# 3)을 선택적으로 분획하여 순도(99%)의 고순도 물질을 얻을 수 있었다(Jiang 등, 2012). 이러한 순수 물질은 이론값=계산값(Theoretical value)과 실험값(Experimental value)으로 상호 비교하여 실험값이 $r^2=0.999$ 이상으로 이론값과 매우 잘 일치되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2(B)). Table 1에서는 추출시간에 따른 curcuminoids의 BDMC (# 1), DMC (# 2) 및 curcumin (# 3)의 추출 효율을 나타내었다. 이때, curcuminoids의 추출 수율은 4 h일때 7.533%로 5 h 일때 7.567%보다 오차 범위 내에서 확인되었고 변화가 작았다. 이때 최적의 추출 시간은 4 h이었으며 선행연구 결과와 일치 하였다(Lee 등, 2013). 이러한 연구경향은 추출시간에 따른 생물 활성을 on-line ABTS-assay와 off-line ABTS-assay를 비교하여 나타내었다(Table 2). 추출시간 증가에 따른 on-line ABTS-assay (peak area negative mAU)는 5 h 45.5460>4 h 45.0284 >3 h 41.9803>2 h 36.3800>1 h 29.5831로 시간에 따라 증가하였고, off-line ABTS-assay IC₅₀(%)은 1 h 1.8984>2 h 1.6924 >3 h 1.6774>4 h 1.6272로 활성이 증가되었다. 하지만 5 h 이후 IC₅₀(%)이 1.7297로 감소 하는 경향을 보여 최적의 생물활성 추출 시간은 4 h임을 확인 할 수 있었다(Inoue 등 2011). 따라서

Table 2 Comparison of bioactivity by on-line-ABTS assay and off-line-ABTS assay

Extraction Solvent (%)	Compounds name	On-line ABTS assay		Off-line ABTS assay		
		Peak area (negative)	SD (±)	Total Peak area	IC ₅₀ (%)	SD (±)
1 h	BDMC	2.5843	0.013	29.5831	1.8984	0.1134
	DMC	5.7899	0.023			
	Curcumin	21.2086	0.025			
2 h	BDMC	3.7211	0.012	36.3800	1.6924	0.0840
	DMC	6.2459	0.028			
	Curcumin	26.4131	0.029			
3 h	BDMC	4.8580	0.009	41.9803	1.6772	0.0590
	DMC	6.7458	0.021			
	Curcumin	30.3765	0.015			
4 h	BDMC	5.3324	0.007	45.0284	1.6272	0.0667
	DMC	7.5681	0.027			
	Curcumin	32.1279	0.021			
5 h	BDMC	5.8165	0.009	45.5460	1.7297	0.0599
	DMC	7.3862	0.015			
	Curcumin	32.3433	0.013			

Data expressed mean ± SD (n=3)

전 처리한 추출액에 포함된 강황으로부터 on-line screening HPLC-ABTS-assay를 이용한 생물활성을 빠르게 screening하여 탐색하고 최적의 추출조건을 실험적으로 모색 할 수 있었다.

초 록

강황(*Curcuma longa*)으로부터 bisdemethoxycurcumin (BDMC), demethoxycurcumin (DMC) 및 curcumin의 생물 활성을 off-line-ABTS 측정법과 on-line screening high-performance liquid chromatography (HPLC)-ABTS 측정법을 적용한 빠른 스크리닝을 통해 정량 및 성분 분리를 하였다. 이때, off-line-ABTS와 on-line screening HPLC-ABTS 비교는 미미한 오차를 보여주었다.

Keywords 강황 · 동시분석 · 분리 · 온라인 스크리닝 HPLC

References

Choi HY (2009) Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from Ulgeum (*Curcuma longa* L.) *J Korean Soc Food Sci Nutr* **38**, 1202–9.
 Inoue K, Kitade M, Hino T, and Oka H (2011) Screening assay of

angiotensin-converting enzyme inhibitory activity from complex natural colourants and foods using high-throughput LC-MS/MS. *Food Chemistry* **126**, 1909–15.
 Jiang JL, Jin XL, Su HZX, Qiao B, and Yuan YJ (2012) Identification of antitumor constituents in curcuminoids from *Curcuma longa* L. based on the composition-activity relationship. *J Pharm Biomed Anal* **70**, 664–70.
 Lee KJ, Liang C, Yang HJ, and Ma JY (2012) Rapid Identification of Homoorientin from *Phyllostachys bambusoides* Leaves by HPLC On-line ABTS+ Screening Method. *Yakhak Hoeji* **56**, 217–21.
 Lee KJ, Ma JY, Kim YS, Kim DS, and Jin YZ (2012) Solid Phase Extraction (SPE) of Curcuminoids from Turmeric by Optimization Analytical Condition. *J of the Korea Academia Industrial cooperation Society* **13**, 4927–35.
 Lee KJ, Kim YS, and Ma JY (2013) Separation and Identification of Curcuminoids from Asian Turmeric (*Curcuma long L.*) Using RP-HPLC and LC-MS. *Asian Journal of Chemistry* **25**, 909–12.
 Lee KJ, Choi SD, and Ma JY (2013) Phytochemical Analysis of Curcumin from Turmeric by RP-HPLC. *Asian Journal of Chemistry* **25**, 995–8.
 Singh G, Kapoor IPS, Singh P, Heluani CS, Lampasona MP, and Catalan CAN (2010) Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food Chem Toxicol* **48**, 1026–31.
 Zhao XC, Zhang L, Yu HX, Sun Z, Lin XF, Tan C et al. (2011) Curcumin protects mouse neuroblastoma Neuro-2A cells against hydrogen-peroxide-induced oxidative stress. *Food Chemistry* **129**, 387–94.
 Zhang JS, Guan J, Yang FQ, Liu HG, Cheng XJ, and Li SP (2008) Qualitative and quantitative analysis of four species of *Curcuma* rhizomes using twice development thin layer chromatography. *J Pharm & Bio Anal* **48**, 1024–8.