

손바닥선인장 추출물의 플라보노이드 구조 규명 및 HPLC-PDA를 이용한 지표성분의 함량 분석

박승배¹ · 강동현^{2,3} · 진창배² · 김형자²

¹울산과학기술원 화학과

²한국과학기술연구원 분자인식연구센터

³경희대학교 약학대학

Identification of Flavonoids from Extracts of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* and Content Determination of Marker Components Using HPLC-PDA

Seungbae Park¹, Dong Hyeon Kang^{2,3}, Changbae Jin², and Hyoung Ja Kim²

¹Department of Chemistry, Ulsan National Institute of Science and Technology

²Molecular Recognition Research Center, Korea Institute of Science and Technology

³College of Pharmacy, Kyung Hee University

ABSTRACT This study aimed to establish an optimal extraction process and high-performance liquid chromatography (HPLC)-photodiode array (PDA) analytical method for determination of marker compounds, dihydrokaempferol (DHK) and 3-O-methylquercetin (3-MeQ), as a part of materials standardization for the development of health functional foods from stems of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* (OFS). The quantitative determination method of marker compounds was optimized by HPLC analysis, and the correlation coefficient for the calibration curve showed very good linearity. The HPLC-PDA method was applied successfully to quantification of marker compounds in OFS after validation of the method in terms of linearity, accuracy, and precision. Ethanolic extracts from stems of *O. ficus-indica* var. *saboten* (OFSEs) were evaluated by reflux extraction at 70 and 80°C with 50, 70, and 80% ethanol for 3, 4, 5, and 6 h. Among OFSEs, OFS70E at 80°C showed the highest contents of DHK and 3-MeQ of 26.42±0.65 and 3.88±0.29 mg/OFS 100 g, respectively. Furthermore, OFSEs were determined for their antioxidant activities by measuring 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and lipid peroxidation (LPO) inhibitory activities in rat liver homogenate. OFS70E at 70°C showed the most potent antioxidant activities with IC₅₀ values of 1.19±0.11 and 0.89±0.09 mg/mL in the DPPH radical scavenging and LPO inhibitory assays, respectively. To identify active components of OFS, various chromatographic separation of OFS70E led to isolation of 11 flavonoids: dihydrokaempferol, dihydroquercetin, 3-O-methylquercetin, quercetin, isorhamnetin 3-O-glucoside, isorhamnetin 3-O-galactoside, narcissin, kaempferol 7-O-glucoside, quercetin 3-O-galactoside, isorhamnetin, and kaempferol 3-O-rutinoside. The results suggest that standardization of DHK in OFSEs using HPLC-PDA analysis would be an acceptable method for the development of health functional foods.

Key words: *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*, dihydrokaempferol, 3-O-methylquercetin, quantitative determination, health functional foods

서 론

손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino)은 선인장과(Cactaceae)에 속하는 다년초로 민간에서 당뇨, 고혈압, 화상, 부종, 소화불량, 종기 및 기관지 천식 등에 사용됐으며, 특히 피부질환, 류마티스, 화상 치료에 효과가 있는 약재로 알려져 있다(1,2). 손바닥선인장 추출물의 스트

레스로 인한 위염, 대사성 질환으로 인해 발생하는 비알코올성 지방간, 산화적 스트레스, 면역 활성, 진통 및 혈당강하작용, 면역증강작용의 효능도 보고되었다(3-11). 우리나라 제주도에서 재배되고 있는 손바닥선인장은 지역특산품 제조를 위한 생물 소재로 지정되어 차, 잼, 주스 등 다양한 형태의 기호식품이나 분말 형태로 식품첨가제, 건강보조식품과 비누와 같은 미용제품으로 개발되어 시판되고 있다. 손바닥선인장의 자유라디칼 소거 활성, 멜라닌 생합성에 관여하는 tyrosinase 억제 활성, 항알레르기 활성 및 열매의 70% 메탄올 추출물의 신경손상 억제 효과 등이 보고된 바 있다(12,13). 또한, 본 연구팀에서 손바닥선인장 줄기의 뇌신경

Received 26 October 2016; Accepted 15 November 2016

Corresponding author: Hyoung Ja Kim, Molecular Recognition Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 02792, Korea

E-mail: khj@kist.re.kr, Phone: +82-2-958-5187

보호 효능과 기억력 개선 효능을 보고하였으며, 손바닥선인장 줄기로부터 분리된 플라보노이드 배당체(flavonoid glycosides)들이 효과적으로 항산화 활성을 나타낸다고 보고한 바 있다(14-17). 이에 본 연구에서는 인지 능력 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개발을 위하여 다양한 손바닥선인장 에탄올 추출물을 제조하고 표준화를 위하여 함량이 높은 dihydrokaempferol(DHK)과 항산화 효능이 우수한 3-O-methylquercetin(3-MeQ)을 지표성분으로 선정하여 HPLC-PDA를 활용한 함량 분석법을 확립하고자 하였다. 또한, 손바닥선인장 에탄올 추출물로부터 다양한 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 추출물에서 항산화 효능을 나타내는 성분을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 손바닥선인장은 2016년 3월에 제주도에서 줄기를 채취하여 세절한 후 열풍 건조하여 사용하였으며, 증거 시료(901-15-1603)는 한국과학기술연구원 표본실에 보관하고 있다. 손바닥선인장 에탄올 추출물의 validation에 사용한 DHK와 3-MeQ는 손바닥선인장 70% 에탄올 추출물에서 분리한 것으로 기기분석을 활용한 구조분석 후 에탄올 추출물의 지표성분으로 사용하였다.

시약 및 기기

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)와 resveratrol, ascorbic acid, Trolox는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 효능검색에 사용한 검출기는 EpoCh microplate spectrophotometer(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 억제효능을 분석하였다.

High performance liquid chromatography(HPLC) 분석

HPLC 기기는 Waters 1500 Series System, Waters 2998 PDA Detector(Waters Corp., Worcester, MA, USA), Luna C18(5 μm, 250×4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였으며, 분석에 사용된 모든 용매는 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입한 HPLC급 용매를 사용하였다. 이동상으로는 아세트니트릴(A)과 1% 인산용액(B)을 사용하여 1 mL/min의 유속으로 시료 20 μL를 주입하여 gradient condition으로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다. 분석 시료는 280 nm에서 크로마토그램을 추출하여 DHK의 면적을 구하였으며, 360 nm에서 크로마토그램을 추출하여 3-MeQ 피크 면적을 구한 다음 표준화합물의 검량곡선으로부터 각 화합물의 함유량을 계산하였다.

Table 1. Mobile phase condition for HPLC analysis

Time (min)	% A (CH ₃ CN)	% B (1% H ₃ PO ₄ in H ₂ O)
Initial	10	90
40	40	60
60	100	0
70	10	90

지표성분 용액 제조 및 분석법 검증(validation)

DHK와 3-MeQ를 각각 1 mg씩 정밀히 취하여 메탄올 1 mL에 용해해 표준원액을 제조한 후, 메탄올로 희석하여 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 및 7.80 μg/mL 농도에서 반복 측정하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정량한계(limit of quantitation, LOQ), 검출한계(limit of detection, LOD), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다(18).

특이성: DHK와 3-MeQ의 표준용액과 손바닥선인장 에탄올 추출물을 HPLC로 분석하여 크로마토그램상의 retention time과 UV spectrum을 비교하였다.

직선성: DHK와 3-MeQ 표준용액의 크로마토그램은 280과 360 nm에서 각각 추출한 피크 면적을 이용하여 검량곡선을 작성한 후, 회귀방정식을 얻어 이 식의 상관계수(R²)를 계산하였다.

검출한계 및 정량한계: 검량선의 y 절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로, 표준용액을 단계별로 3회 반복 측정된 평균값으로 검량선을 작성하여 다음의 식에 따라 계산하여 검출한계와 정량한계를 확인하였다.

$$LOD=3.3 \times \sigma/S, LOQ=10 \times \sigma/S$$

(σ: y 절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

기울기 S는 분석대상물질의 검량선으로부터 구하였으며 표준편차(σ)는 정량한계 내에 있는 분석대상물질을 포함한 검체를 사용하여 특이적인 검량선을 작성한 후 y 절편의 표준편차를 표준편차 σ로서 이용하였다.

정확성: 일정 농도의 DHK와 3-MeQ의 표준액을 조제하여 각각의 샘플로 일내 분석(intra-day)과 일간 분석(inter-day)의 변이성을 측정하였다. 시험농도의 100%에 해당하는 농도로 DHK와 3-MeQ의 표준액을 조제하여 분석법의 전 조작을 3회 반복 주입하여 검량선에 따라 구해진 값과 참값을 비교한 회수율로 나타내었다.

정밀성: 성분피크 면적비의 표준편차를 각 성분피크 면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율로서 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 확인하여 정밀성을 나타내었다.

시험용액의 추출조건

손바닥선인장 추출에 사용한 에탄올은 95% 에탄올(Samchun Chemical, Gyeonggi, Korea)을 사용하였다. 제조공정의 추출조건을 검토하기 위하여 손바닥선인장 건시료 10 g에 70 mL의 50, 70, 80% 에탄올을 사용하여 70 및 80°C

에서 3, 4, 5, 6시간 동안 각각 환류 추출한 후 종료시점에 상층액을 취하고 0.45 μm PVDF syringe filter로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다. 추출물은 감압여과 후 농축하고 건조해 에탄올 추출물을 수득하였으며 동일한 방법으로 총 3회 실시하였다.

에탄올 추출물로부터 플라보노이드 분리

열풍 건조한 손바닥선인장 줄기 500 g을 80°C에서 70% 에탄올 3.5 L를 사용하여 5시간 동안 추출 농축하여 70% 에탄올 추출물 89.9 g을 수득하였다. 이 추출물 50 g을 dia-ion HP-20을 고정상으로 사용하여 분획을 실시하였다. 칼럼에 사용한 용매는 30, 50, 70, 90, 100% 메탄올, CH_2Cl_2 : MeOH(50:50)의 혼합용매를 각각 2.5 L씩 이동상으로 사용하여 6개의 분획(OFS70E1~OFS70E6)으로 나누었다. 소분획 OFS70E3(1.37 g)은 sephadex LH-20을 사용하고 메탄올을 전개용매로 칼럼크로마토그래피를 실시하여 8개의 소분획(OFS70E3A~H)으로 나누었다. 소분획 OFS70E3D(32.6 mg)는 분취용 HPLC를 실시하여 화합물 1(Rt 27 min, 23.9 mg)과 2(Rt 22 min, 2.3 mg)를 분리하였으며, 소분획 OFS70E3G로부터 화합물 3(Rt 33 min, 15.0 mg)을 얻었다. 소분획 OFS70E3C(39.0 mg)는 분취용 HPLC를 실시하여 화합물 1(19.1 mg)을 추가 분리하였으며, 화합물 7(Rt 23 min, 5.08 mg), 8(Rt 20 min, 2.11 mg), 10(2.5 mg)을 순수하게 분리하였다. 소분획 OFS70E3B(770.0 mg)는 sephadex LH-20을 고정상으로 사용하고 70% 메탄올을 전개용매로 사용하여 화합물 1(9.0 mg)과 7(3.3 mg)을 추가로 분리하였으며, 화합물 6(Rt 24 min, 6.3 mg)과 9(8.0 mg)를 분리하였다. 소분획 OFS70E3E(36.6 mg)는 분취용 HPLC를 실시하여 화합물 1(11.6 mg), 2(Rt 22 min, 11.3 mg), 4(Rt 36 min, 1.3 mg), 11(Rt 25 min, 1.9 mg)을 순수하게 분리하였다. 소분획 OFS70E4는 분취용 RP-18 TLC를 실시하여 화합물 5(Rt 42 min, 2.4 mg)를 분리하였다.

화합물 1(Dihydrokaempferol): $[\alpha]_D^{25} + 11.9^\circ$ (c 0.135, MeOH); ESIMS m/z 287.0668[M-H]⁻; ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.26(2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.75(2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', 5'), 5.84(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 5.79(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 4.89(1H, d, $J=11.6$ Hz, H-2), 4.46(1H, d, $J=11.6$ Hz, H-3); ¹³C NMR(150 MHz, CD₃OD): δ 198.6(C-4), 168.9(C-7), 165.4(C-5), 164.6(C-9), 159.3(C-4'), 130.5(C-2', 6'), 129.4(C-1'), 116.3(C-3', 5'), 101.9(C-10), 97.4(C-6), 96.4(C-8), 85.1(C-2), 73.7(C-3).

화합물 2(Dihydroquercetin): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 6.86(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.75(1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 6.70(1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 5.81(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 5.78(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 4.83(1H, d, $J=11.6$ Hz, H-2), 4.40(1H, d, $J=11.6$ Hz, H-3); ¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD): δ 198.7(C-4), 169.2(C-7), 165.7(C-5), 164.9(C-9), 147.5(C-4'), 146.7(C-3'), 130.3

(C-1'), 121.3(C-6'), 116.5(C-2'), 116.3(C-5'), 102.2(C-10), 97.7(C-6), 96.7(C-8), 83.1(C-2), 74.1(C-3).

화합물 3(Quercetin): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.64(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.54(1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 6.78(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.29(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.08(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6).

화합물 4(3-O-Methylquercetin): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.53(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.44(1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 6.81(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.30(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.10(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 3.69(3H, s, H-OMe); ¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD): δ 180.4(C-4), 166.3(C-7), 163.5(C-5), 158.8(C-9), 158.4(C-2), 150.3(C-4'), 146.8(C-3'), 139.9(C-3), 123.3(C-1'), 122.7(C-6'), 116.9(C-5'), 116.8(C-2'), 106.2(C-10), 100.1(C-6), 95.1(C-8), 60.9(OCH₃).

화합물 5(Isorhamnetin): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.79(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.66(1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 6.86(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.33(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.11(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 3.87(3H, s, H-OMe).

화합물 6(Isorhamnetin 3-O-glucoside): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.86(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.52(1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 6.84(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.33(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.13(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.34(1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 3.84(3H, s, H-OMe), 3.67(1H, dd, $J=2.4, 12.0$ Hz, H-6''), 3.49(1H, dd, $J=5.2, 12.0$ Hz, H-6''), 3.43~3.65(2H, m, H-2'', 3''), 3.20~3.16(2H, m, H-4'', 5''); ¹³C NMR(CD₃OD, 150 MHz): δ 179.4(C-4), 166.0(C-7), 163.1(C-5), 158.6(C-2), 158.5(C-9), 150.8(C-4'), 148.4(C-3'), 135.3(C-3), 122.8(C-6'), 123.1(C-1'), 115.9(C-5'), 114.4(C-2'), 105.8(C-10), 103.6(C-1''), 99.9(C-6), 96.7(C-8), 78.5(C-5''), 78.0(C-3''), 75.9(C-2''), 71.5(C-4''), 62.5(C-6''), 56.8(C-OMe).

화합물 7(Isorhamnetin 3-O-galactoside): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.96(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.51(1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 6.83(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.33(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.13(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.27(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 3.89(3H, s, H-OMe), 3.77(1H, overlapped, H-4''), 3.74(1H, dd, $J=8.0, 9.6$ Hz, H-2''), 3.58(1H, dd, $J=5.6, 11.2$ Hz, H-6''), 3.51(1H, t, $J=6.4, 11.2$ Hz, H-6''), 3.48(1H, dd, $J=3.6, 9.6$ Hz, H-3''), 3.40(1H, brt, $J=5.6$ Hz, H-5''); ¹³C NMR(CD₃OD, 150 MHz): δ 179.6(C-4), 166.1(C-7), 163.2(C-5), 158.7(C-2), 158.5(C-9), 150.9(C-4'), 148.5(C-3'), 135.4(C-3), 123.6(C-6'), 123.1(C-1'), 116.0(C-5'), 114.6(C-2'), 105.9(C-10), 104.4(C-1''), 99.9(C-6), 94.8(C-8), 77.3(C-5''), 75.0(C-3''), 73.2(C-2''), 70.1(C-4''), 62.2(C-6''),

57.0(C-OMe).

화합물 8(Quercetin 3-*O*-galactoside): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.73(1H, d, *J*=2.4 Hz, H-2'), 7.49(1H, dd, *J*=2.0, 8.4 Hz, H-6'), 6.77(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.31(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.11(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.05(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1''), 3.76(1H, brd, *J*=3.2 Hz, H-4''), 3.72(1H, dd, *J*=8.0, 9.6 Hz, H-2''), 3.54(1H, dd, *J*=6.0, 11.2 Hz, H-6''), 3.47(1H, m, H-3''), 3.44(1H, dd, *J*=6.0, 11.2 Hz, H-6''), 3.38(1H, brt, *J*=5.2 Hz, H-5'').

화합물 9(Narcissin): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.87(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 7.55(1H, dd, *J*=2.0, 8.4 Hz, H-6'), 6.84(1H, d, *J*=8.8 Hz, H-5'), 6.33(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.13(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.16(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1''), 4.45(1H, d, *J*=1.2 Hz, H-1'''), 3.88(3H, s, H-OMe), 3.76(1H, dd, *J*=1.2, 11.2 Hz, H-6''), 3.53(1H, dd, *J*=1.2, 3.2 Hz, H-2'''), 3.42~3.35(5H, m, H-2'', 3'', 3''', 5'', 6''), 3.18(2H, m, H-4'', 4'''), 1.02(3H, d, *J*=6.4 Hz, H-6'''); ¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD): δ 179.7(C-4), 166.4(C-7), 166.3(C-5), 159.3(C-2), 158.8(C-9), 151.2(C-4'), 148.7(C-3'), 135.9(C-3), 124.4(C-6'), 123.4(C-1'), 116.5(C-5'), 115.0(C-2'), 106.1(C-10), 104.9(C-1''), 102.9(C-1'''), 100.4(C-6), 95.4(C-8), 78.6(C-5''), 77.7(C-3''), 76.3(C-2''), 74.2(C-4'''), 72.7(C-3'''), 72.5(C-2'''), 72.0(C-4''), 70.2(C-5'''), 68.9(C-6''), 57.2(OCH₃), 18.3(C-6''').

화합물 10(Kaempferol 3-*O*-rutinoside): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.99(2H, d, *J*=9.2 Hz, H-2', 6'), 6.81(2H, d, *J*=9.2 Hz, H-3', 5'), 6.33(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.13(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.04(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1''), 4.43(1H, d, *J*=1.6 Hz, H-1'''), 3.73(1H, dd, *J*=1.2, 11.6 Hz, H-6''), 3.54(1H, dd, *J*=1.6, 3.2 Hz, H-2'''), 3.46~3.34(5H, m, H-2'', 3'', 3''', 5'', 6''), 3.18(2H, m, H-4'', 4'''), 1.04(3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6''').

화합물 11(Kaempferol 7-*O*-glucoside): ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 8.06(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2', 6'), 6.84(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3', 5'), 6.71(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.40(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 4.99(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1''), 3.86(1H, dd, *J*=1.2, 12.0 Hz, H-6''), 3.64(1H, dd, *J*=5.6, 12.0 Hz, H-6''), 3.48(1H, m, H-5''), 3.43(1H, m, H-3''), 3.32(1H, t, *J*=9.6 Hz, H-4'').

DPPH 자유라디칼 소거효능

자유라디칼 소거효능은 100 μM DPPH 에탄올 용액 190 μL에 손바닥선인장 에탄올 추출용액 10 μL를 가해 30분 동안 37°C에서 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하여 IC₅₀ 값으로 구하였다(19). IC₅₀ 값은 자유라디칼 소거효능을 계산하여 50% 소거효능을 나타내는 농도(IC₅₀)를 의미한다. 대조 약물은 라디칼 소거제로 잘 알려진 quercetin,

resveratrol, ascorbic acid를 사용하였으며, 데이터는 3회 실시한 평균값을 제시하였다.

쥐의 간 균질액을 이용한 지질과산화 저해효능

체중 200±20 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(오리엔탈바이오, 경기)는 실험 전 24시간 동안 상수만을 공급하였다. 동물실험은 한국과학기술연구원의 동물실험윤리위원회의 승인 후 진행하였다(2014-065). 에테르로 가볍게 마취 후 해부하여 간 문맥을 통하여 0.15 M ice cold KCl 용액을 관류시켜 간 내의 혈액을 제거하여 간을 적출하고 간 무게 10배량의 KCl 용액을 가한 후 homogenizing 하여 간 균질액을 만들었다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Bradford protein method에 의하여 정량하였다(20). 지질과산화 시험은 Sanz 등(21)의 방법을 약간 변형하여 이용하였다. 간 균질액(10 mg protein/mL) 300 μL, 10 μM FeSO₄, 시험 약물 10 μL, 0.4 mM ascorbic acid에 50 mM Tris HCl(pH 7.5)로 총 부피가 1 mL가 되도록 가한 다음 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후에 TBA-TCA 용액(0.375% thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, 0.25 N HCl, 0.01% butylated hydroxytoluene)을 가하여 95°C에서 30분 동안 반응시킨 후 냉각시켜 10분 동안 원심분리(5,000×g) 하여 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정한다. 지질과산화 저해효능을 비교하기 위한 약물로 Trolox를 이용하였고 control은 시험 약물 대신에 DMSO를 사용하였으며, 3회 반복 측정하여 과산화지질의 생성을 50% 저해하는 데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)를 측정하였다.

결과 및 고찰

손바닥선인장 에탄올 추출물의 지표성분 및 화합물의 구조 규명

손바닥선인장 70% 에탄올 추출물(OFS70E)로부터 diaion HP-20, sephadex LH-20, preparative HPLC 등 다양한 column chromatography를 실시하여 11종의 플라보노이드 유도체 dihydrokaempferol(1), dihydroquercetin(2), quercetin(3), 3-*O*-methylquercetin(4), isorhamnetin(5), isorhamnetin 3-*O*-glucoside(6), isorhamnetin 3-*O*-galactoside(7), quercetin 3-*O*-galactoside(8), narcissin(9), kaempferol 3-*O*-rutinoside(10), kaempferol 7-*O*-glucoside(11)를 분리하였다(Fig. 1).

화합물 1은 무정형 분말로 TLC에서 10% 황산 발색 시 주황색으로 발색되며, 선광도는 [α]_D²⁵+11.9°(c 0.135, MeOH)로 나타났다. ESIMS에서는 molecular ion peak가 287.0668([M-H]⁺)로 나타났으며, UV 스펙트럼에서는 290 nm에서 최대 흡광도를 나타내고 있다(Fig. 2). ¹H NMR에서 δ 5.84(1H, *J*=2.0 Hz)와 5.79(1H, *J*=2.0 Hz)의 doublet peaks는 A ring에서 기인하는 peak로 서로 *meta* coupling

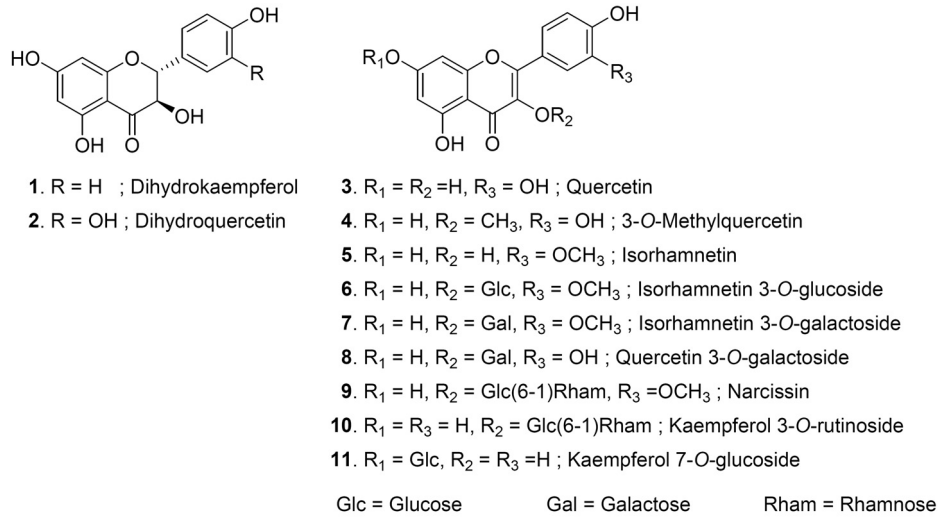


Fig. 1. Structures of flavonoids isolated from the stems of *O. ficus-indica* var. *saboten*.

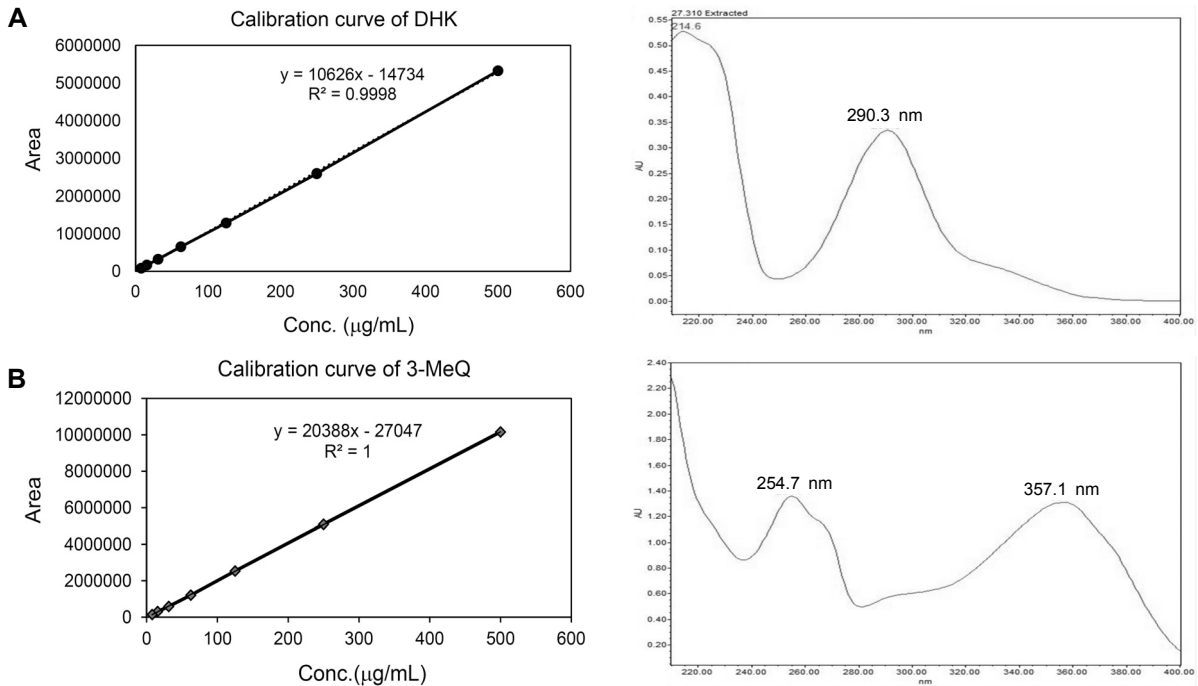


Fig. 2. Calibration curves and UV spectra of (A) DHK and (B) 3-MeQ.

을 하고 있음을 알 수 있었으며, δ 4.89와 4.46에서의 peaks는 C ring에서 기인하는 peak로 coupling constants가 각각 11.6 Hz로 나타나 두 개의 수소는 *trans* 결합을 하는 flavanol 구조임을 알 수 있었다. δ 7.26(2H, *J*=8.8 Hz)과 6.75(2H, *J*=8.8 Hz)에서의 doublet peaks는 B ring에서 기인하는 peak로 para 치환체임을 알 수 있었다. ¹³C NMR에서 C-2와 C-3에서 기인한 peak가 δ 85.1과 73.7에서 각각 나타나고, δ 198.6에서의 peak는 4번 위치의 carbonyl group에서 기인한 peak로 이 화합물 2번과 3번에서 수소 첨가된 flavanol 구조를 확인할 수 있었다. Aromatic ring에서 기인한 나머지 peak들과 측정된 선광도 등 기기분석 결

과를 문헌과 비교하여 이 화합물은 (+)-dihydrokaempfer-이임을 알 수 있었다(22).

화합물 7과 8은 이 식물에서 분리된 quercetin(3)과 isorhamnetin(5)의 3번 위치에 galactose가 치환된 구조이며 잘 알려진 플라보노이드 배당체이다. 그러나 화합물 8은 본 연구를 통해서 이 식물에서 처음으로 분리 보고된 화합물이며, 화합물 7은 선인장 꽃 메탄올 추출물의 주성분 중의 하나로 보고되었으나 줄기에서는 처음으로 분리된 화합물이다(23).

이들 화합물 이외에 분리된 화합물 dihydroquercetin(2), quercetin(3), 3-O-methylquercetin(4), isorhamnetin(5),

isorhamnetin 3-*O*-glucoside(6), narcissin(9), kaempferol 3-*O*-rutinoside(10), kaempferol 7-*O*-glucoside(11)는 손바닥선인장을 비롯하여 다른 식물에도 존재하는 플라보노이드 유도체이며, 신장보호효능, 혈관형성억제효능(antiangiogenic), 진통효능(antinociceptive), 항염효능 등과 같은 다양한 생리활성을 나타내는 화합물로 알려져 있다(14,24,25).

지표성분의 분석법 검증

손바닥선인장 에탄올 추출물의 건강기능성 원료 개발을 위한 기준규격인정 및 품질관리 validation은 식품의약품안전처 의약품등의 분석법 validation 가이드라인에 기초하여 수행되었다(18). 표준품으로 사용한 DHK와 3-MeQ의 분석은 최대 흡광도를 나타내는 280 nm와 360 nm에서 각각의 크로마토그램을 3회 반복 실험하여 얻은 평균값으로 계산하여 검량곡선을 구하였다. DHK의 경우 $y=10626x-14734$, 상관관계(R^2)=0.9998로 나타났으며, 3-MeQ의 경우에는 $y=20388x-27047$, 상관관계(R^2)=1로 나타나 매우 우수한 직선성을 나타내었다. 여기서 y는 peak area 값이며 x는 농도($\mu\text{g/mL}$)이다(Fig. 2).

특이성 확인을 위하여 표준용액과 같이 시료 전처리 방법으로 처리하여 분석한 손바닥선인장 추출액의 크로마토그램을 설정한 파장 280 nm에서 DHK 피크가 분리되는지를 확인하였다. 그 결과 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되어 특이성을 확인할 수 있었다. 360 nm에서는 3-MeQ의 피크가 분리되는지를 확인한 결과 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 잘 분리되어 특이성을 확인할 수 있었다. 표준용액 DHK의 머무름 시간(R_t)은 27.218분이고 3-MeQ의 머무름 시간(R_t)은 36.368분으로 나타나 손바닥선인장 추출액에서의 DHK의 머무름 시간(R_t) 27.219분과 3-MeQ의 머무름 시간 35.572분으로 피크 유지시간이 표준용액에서의 머무름 시간과 거의 일치하였다(Fig. 3).

검출한계와 정량한계는 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 앞서 서술한 식에 의하여 결정하였으며, DHK의 경우 검출한계는 1.38 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계는 4.18 $\mu\text{g/mL}$ 였고, 3-MeQ의 경우에는 검출한계 3.49 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계는 10.6 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인할 수 있었다(Table 2). 표준용액들의 intra-, inter-day 분석의 정밀성, 정확성 및 회수율을 측정된 결과는 Table 3에 나타내었다. Intra-day 분석에서 회수율은 시료 면적을 검량선에 근거하여 회수되는 시료량을 백분율로 계산한 값이 97.0~115.9%의 범위로 나타났으며, RE는 DHK의 가장 낮은 농도를 제외하고 모두 10% 이내로 나타났고 RSD는 0.14~5.76%를 나타내 6% 이내의 정밀성을 나타내었다. Inter-day 분석에서의 회수율은 95.9~115.2%를 나타내었으며, RE는 0.62~15.2%와 RSD는 0.08~6.37%로 나타나 정확성과 정밀성을 확인할 수 있었다.

손바닥선인장 에탄올 추출물의 지표성분 함량 비교

손바닥선인장 에탄올 추출물(OFSEs)로부터 기능성 원료 개발을 위해 50, 70, 80% 에탄올을 사용하여 70과 80°C에서 3, 4, 5, 6시간 동안 환류 추출하여 각각의 OFSEs를 수득하였다. OFSEs에서의 추출수율과 DHK와 3-MeQ의 함량 분석은 3회 반복 실험하여 수득한 결과를 평균±표준편차로 Table 4에 나타내었다.

70°C에서 추출한 손바닥선인장 추출물에서의 DHK와 3-MeQ의 함량은 OFS80E에서 6시간 추출하였을 때, DHK의 경우 27.79±5.40 mg/OFS 100 g과 3-MeQ의 경우 3.71±0.50 mg/OFS 100 g으로 높은 함량을 나타내고 있다. OFS 50E와 OFS70E의 경우에도 높은 함량이 측정되었으며 추출 시간에 따른 함량 변화도 비교적 적게 나타났다. 한편 70% 에탄올을 사용하여 4시간 이상 추출할 경우에 지표물질의 함량이 높은 추출물을 수득할 수 있으며, 80% 에탄올을 사용할 경우에는 6시간 이상 추출하는 것이 효과적일 것으로 예상된다.

80°C 추출물에서의 DHK와 3-MeQ의 함량은 70%와 80% 에탄올 용액으로 추출하였을 때 높게 측정되었으며 추출 시간에 따른 함량 변화는 큰 차이를 나타내지 못하였다. 이 추출물 중에서 OFS70E는 6시간 추출하였을 때, DHK의 경우 26.42±0.65 mg/OFS 100 g, 3-MeQ의 경우 3.88±0.29 mg/OFS 100 g으로 높은 함량을 나타내고 있다. OFS50E는 5시간 추출하였을 때 비교적 높은 함량을 나타내었지만, 추출 시간이 6시간인 경우에는 오히려 함량이 가장 낮게 측정되었다. 그러므로 80°C에서 추출할 경우에는 70% 이상의 에탄올을 사용하여 추출하는 것이 DHK와 3-MeQ의 함량이 높은 추출물을 수득할 것으로 예상된다.

한편, 추출조건에 따른 추출수율은 에탄올의 함량이 낮을수록 높게 측정되었다. 80°C에서 추출한 OFS50E와 OFS 70E에서 17% 이상의 높은 수율이 측정되었지만 OFS80E에서는 13.9~15.7%로 낮은 수율을 보인다. 70°C에서 추출한 경우에도 에탄올의 함량이 낮을수록 높게 측정되었으며, OFS50E의 경우 20% 정도의 높은 수율을 나타내었다. 그러나 같은 용매를 사용하고 추출시간을 달리한 추출물 간의 수율은 추출시간과 무관한 수율을 나타내 효율적인 에탄올 추출물을 얻기 위한 추출 변수로 작용하지 못하였다. 그러므로 지표성분 함량이나 항산화 효능을 비교하여 적절한 용매와 온도를 설정하여 추출시간을 선정하는 것이 효율적인 추출물 제조를 위해 필요할 것으로 생각한다. 따라서 효율적인 추출물 제조는 80°C에서 6시간 동안 추출한 OFS70E가 가장 효율적인 추출조건으로 사료되며, OFSEs에서의 표준화를 위해서는 지표성분으로 DHK와 3-MeQ를 선정함이 타당할 것으로 생각한다.

손바닥선인장 에탄올 추출물에 대하여 HPLC profiling을 실시하고 표준물질 DHK와 3-MeQ를 포함하여 11종의 플라보노이드와 비교한 크로마토그래피를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 손바닥선인장 70% 에탄올 추출물의 주성분은

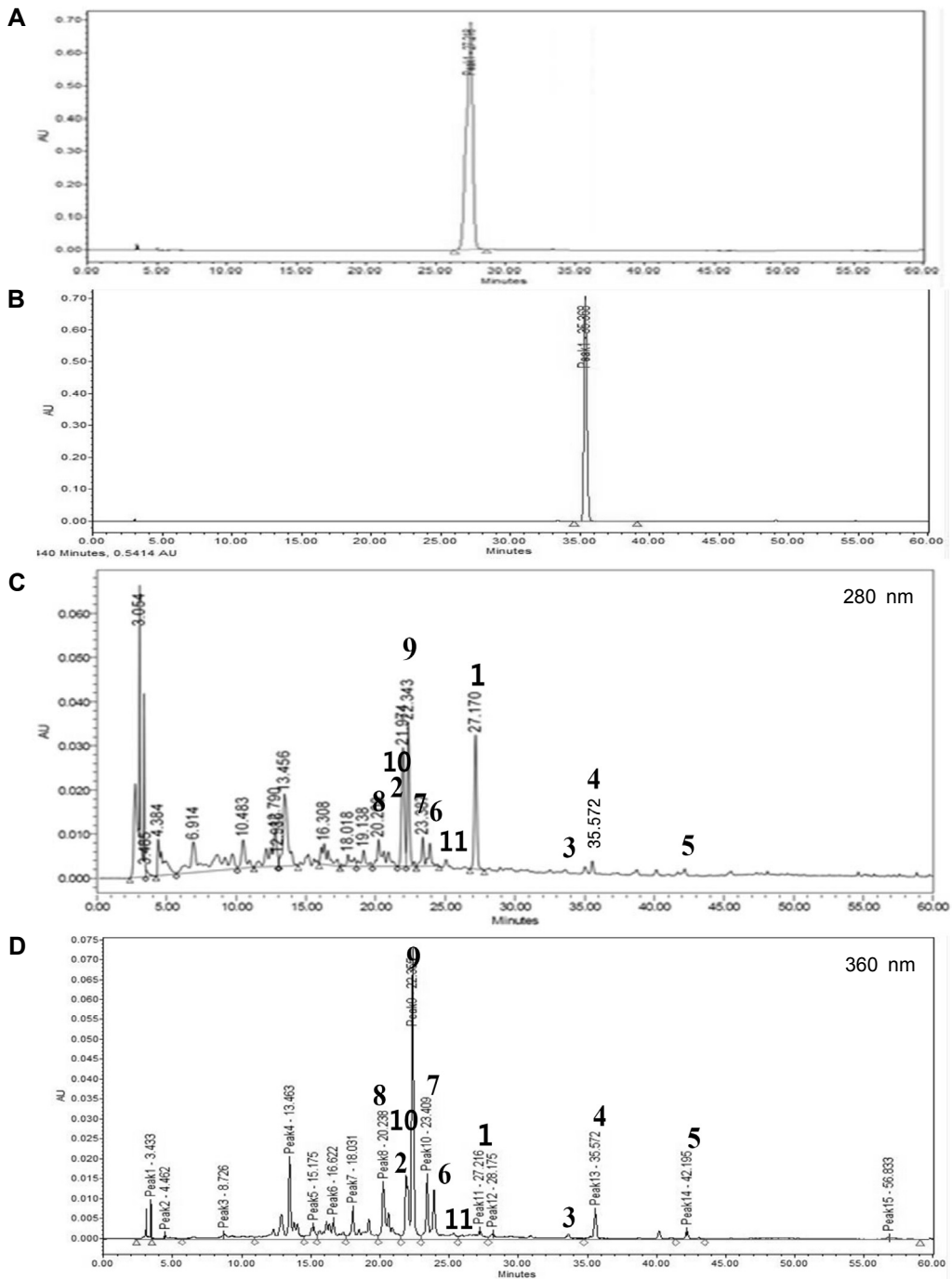


Fig. 3. Chromatogram of (A) DHK, (B) 3-MeQ, (C) OFS70E at 280 nm, and (D) OFS70E at 360 nm.

Table 2. Accuracy and repeatability of DHK and 3-MeQ

Standard	Fortified conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Observed conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area ($\text{V} \times \text{sec}$)		Recovery (%)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
			Mean	SD				
DHK	125	122.9 \pm 1.68	1,285,539	14,343	98.3 \pm 1.34	1.12	1.38	4.18
	62.5	63.0 \pm 0.28	654,008	2,911	100.8 \pm 0.46	0.45		
	31.2	31.6 \pm 0.16	322,515	706	101.0 \pm 0.50	0.22		
3-MeQ	125	125.7 \pm 4.16	2,535,209	84,887	100.5 \pm 3.33	3.35	3.49	10.6
	62.5	60.7 \pm 0.45	1,210,936	9,251	97.2 \pm 0.73	0.76		
	31.2	30.3 \pm 0.52	590,364	10,589	96.9 \pm 1.66	1.79		

Table 3. Accuracy and repeatability of analytical results for DHK and 3-MeQ in calibration standards

	Concentration (µg/mL)	Observed conc. (µg/mL)		Recovery (%)	RSD (%) ¹⁾	RE (%) ²⁾	
		Mean	SD				
DHK	Intra-day ³⁾	500	503.51	10.12	100.7	1.31	0.70
		250	249.84	4.92	99.9	1.36	0.06
		125	121.98	0.82	97.6	0.23	2.41
		62.5	62.85	0.12	100.6	0.31	0.56
		31.2	31.65	0.13	101.3	0.14	1.29
		15.6	17.04	0.34	109.0	0.36	9.02
		7.80	9.05	0.18	115.9	2.08	15.8
	Inter-day ³⁾	500	510.97	0.43	102.2	0.08	2.19
		250	248.10	7.39	99.2	2.99	0.76
		125	123.63	1.52	98.9	1.24	1.09
		62.5	63.05	0.39	100.9	0.63	0.87
		31.2	31.50	0.09	100.8	0.31	0.79
		15.6	17.04	0.35	109.0	2.14	9.05
		7.80	9.00	0.11	115.2	1.34	15.2
3-MeQ	Intra-day	500	498.62	8.78	99.7	1.76	0.28
		250	247.81	1.06	99.1	0.43	0.87
		125	123.64	3.12	98.9	2.55	1.09
		62.5	60.63	0.60	97.0	1.01	2.99
		31.2	30.44	0.62	97.4	2.14	2.59
		15.6	16.47	0.27	105.4	1.76	5.38
		7.80	8.28	0.40	105.9	5.76	5.93
	Inter-day	500	503.08	2.47	100.6	0.49	0.62
		250	252.35	7.48	100.9	2.98	0.94
		125	127.80	2.76	102.2	2.18	2.24
		62.5	60.55	0.49	96.9	0.84	3.11
		31.2	29.98	0.02	95.9	0.09	4.05
		15.6	16.41	0.19	105.0	1.26	5.03
		7.80	8.31	0.44	106.3	6.37	6.34

¹⁾RSD: relative standard deviation. ²⁾RE: relative error.

³⁾Intra- and inter-day: three times per day and two times analysis of DHK and 3-MeQ for two days, respectively.

360 nm 파장에서 최대 피크를 나타내고 있는 narcissin으로 나타났으며, 이는 칼럼으로 분리한 경우에도 가장 높은 함량을 나타내었으나 여러 종의 화합물이 중첩되어 나타나 지표물질로 사용하기에는 부적당한 것으로 생각한다.

손바닥선인장 에탄올 추출물의 항산화 효능 비교

다양한 조건에서 추출한 에탄올 추출물 OFSEs의 항산화 효능검색을 하였다. 대조 약물은 항산화제로 잘 알려진 quercetin, resveratrol, ascorbic acid, Trolox를 사용하여 검색하였으며, 결과는 Table 5에 나타내었다. DPPH 자유라디칼 소거 효능은 에탄올의 함량이 70% 이상 사용한 경우에 우수한 효능을 나타내고 있는데, 70°C에서 70% 에탄올로 6시간 동안 추출한 경우 IC₅₀ 값이 1.19±0.11 mg/mL로 나타나 가장 우수한 소거 효능을 나타내고 있다.

쥐의 간 균질액을 이용하여 검색한 지질과산화 저해 효능은 추출온도와 사용한 추출 용매 간에 효능 차이가 크게 없었으며 IC₅₀ 값이 0.87±0.14~0.99±0.10 mg/mL로 유사하게 나타나고 있다. 다만 50% 에탄올을 사용하여 추출한 추출물은 6시간으로 추출시간이 길어진 경우에 효능이 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 그러므로 50% 에탄올을 사용

할 경우에는 4시간 이내로 추출하는 것이 효율적이라 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 손바닥선인장은 80°C에서 70% 에탄올로 추출한 OFSE가 DHK의 경우 26.42±0.65 mg/OFS 100 g, 3-MeQ의 경우 3.88±0.29 mg/OFS 100 g으로 함량이 높게 측정되었으며, 지표물질의 함량이 높은 추출물에서 우수한 항산화 효능을 보인다. 또한, HPLC-PDA를 이용한 DHK와 3-MeQ 함량 분석 방법이 손바닥선인장 에탄올 추출물의 표준화에 유용할 것으로 생각한다.

요 약

손바닥선인장으로부터 기능성식품 개발을 위하여 최적의 에탄올 추출물 탐색과 HPLC-PDA 분석방법에 의한 validation을 실시하였다. 지표성분으로 dihydrokaempferol (DHK)과 3-O-methylquercetin(3-MeQ)을 선정하여 표준화를 실시하였으며 검출법 확립을 위한 정량분석은 Luna RP-18 칼럼(4.6×250 mm, 5 µm)을 이용하여 1% 인산용액과 아세트니트릴을 전개 용매로 사용하였다. 용출은 1.0 mL/min의 유속으로 기울기 용출(gradient elution) 방법을

Table 4. Yields and contents of DHK and 3-MeQ in the OFSEs

Temp.	Sample	Yields (%)	Dihydrokaempferol		3-O-Methylquercetin	
			% Contents	DHK (mg/OFS 100 g)	% Contents	3-MeQ (mg/OFS 100 g)
70°C	80% EtOH-3h	13.7±0.38	0.02067	20.67±3.18	0.00323	3.23±0.13
	-4h	13.1±0.39	0.02313	23.13±2.86	0.00317	3.17±0.31
	-5h	13.9±0.42	0.02440	24.40±2.22	0.00338	3.38±0.44
	-6h	13.5±0.29	0.02779	27.79±5.40	0.00371	3.71±0.50
	70% EtOH-3h	16.3±0.15	0.02222	22.22±2.80	0.00338	3.37±0.20
	-4h	16.2±0.23	0.02756	27.56±2.46	0.00365	3.65±0.01
	-5h	16.4±0.20	0.02514	25.14±2.68	0.00360	3.60±0.22
	-6h	16.4±0.69	0.02620	26.20±3.76	0.00365	3.65±0.34
	50% EtOH-3h	19.7±0.13	0.02383	23.83±1.10	0.00336	3.36±0.18
	-4h	20.0±0.67	0.02328	23.28±3.93	0.00362	3.62±0.50
	-5h	18.4±0.33	0.02411	24.11±1.50	0.00370	3.70±0.37
	-6h	20.0±0.08	0.02376	23.76±1.44	0.00314	3.14±0.07
80°C	80% EtOH-3h	13.9±1.10	0.02457	24.57±3.37	0.00348	3.48±0.29
	-4h	14.8±0.24	0.02699	26.99±6.21	0.00361	3.61±0.45
	-5h	14.1±0.21	0.02473	24.73±0.83	0.00384	3.84±0.15
	-6h	15.7±0.60	0.02494	24.94±3.17	0.00356	3.56±0.35
	70% EtOH-3h	18.3±0.63	0.02400	24.00±2.18	0.00367	3.67±0.44
	-4h	18.8±0.54	0.02396	23.96±0.37	0.00375	3.75±0.37
	-5h	18.2±1.82	0.02285	22.85±2.43	0.00379	3.79±0.49
	-6h	18.1±0.20	0.02642	26.42±0.65	0.00388	3.88±0.29
	50% EtOH-3h	18.9±0.27	0.01935	19.35±3.12	0.00291	2.91±0.59
	-4h	17.6±0.12	0.02031	20.31±2.79	0.00323	3.23±0.24
	-5h	17.7±0.96	0.02545	25.45±2.57	0.00335	3.35±0.40
	-6h	19.1±0.28	0.01887	18.87±1.12	0.00271	2.71±0.16

Table 5. Antioxidant activities of OFSEs

Sample	IC ₅₀ (mg/mL)	
	Scavenging effects of DPPH radicals	Inhibitory effects of LPO ¹⁾
70°C-50Et-4h	>2.5	1.29±0.10
-6h	>2.5	1.46±0.36
70°C-70Et-4h	1.79±0.43	0.88±0.06
-6h	1.19±0.11	0.89±0.09
70°C-80Et-4h	1.38±0.19	0.98±0.16
-6h	1.27±0.30	0.91±0.13
80°C-50Et-4h	>2.5	0.91±0.38
-6h	>2.5	1.68±0.39
80°C-70Et-4h	1.81±0.66	0.99±0.10
-6h	1.42±0.17	0.87±0.14
80°C-80Et-4h	1.40±0.37	0.87±0.20
-6h	1.38±0.15	0.82±0.23
Positive controls	IC ₅₀ (μM)	
Quercetin	20.69±7.72	4.37±0.24
Resveratrol	124.0±18.6	43.16±0.61
Ascorbic acid	37.88±3.56	NT
Trolox	NT ²⁾	39.49±0.94

¹⁾LPO: lipid peroxidation. ²⁾NT: not tested.

이용하였으며, 280 nm 파장에서는 DHK를, 360 nm 파장에서는 3-MeQ를 검출한 피크 면적을 이용하여 검량곡선을 작성하여 분석하였다. 본 연구에서 확립한 분석법으로 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 회수율을 검색하였다. DHK의

검량선으로부터 상관계수(R^2) 0.9998의 우수한 직선성과 intra-day와 inter-day 분석에서 97% 이상의 회수율과 3% 미만의 RSD를 나타내 정밀성과 정확성을 입증하였다. 3-MeQ의 검량선으로부터 상관계수(R^2) 1의 우수한 직선성과 intra-day와 inter-day 분석에서 95% 이상의 회수율과 7% 미만의 RSD를 나타내 정밀성과 정확성을 입증하였다. DHK의 검출한계는 1.38 μg/mL, 정량한계는 4.18 μg/mL로 나타났다. 3-MeQ의 검출한계는 3.49 μg/mL, 정량한계는 10.6 μg/mL로 나타났다. 손바닥선인장 에탄올 추출물(OFSEs)은 70과 80°C에서 50, 70, 80% 에탄올로 3, 4, 5, 6시간 동안 각각 추출하였으며, 지표물질의 검량곡선을 활용하여 각각의 OFSEs로부터 두 종의 지표물질 함량을 분석하였다. 본 시험법으로 분석한 지표물질의 함량은 80°C에서 추출한 70% OFSE가 DHK 26.42±0.65 mg/OFS 100 g, 3-MeQ 3.88±0.29 mg/OFS 100 g의 함량을 나타내 가장 우수하게 나타났다. 다양한 OFSEs에 대하여 DPPH 자유라디칼 소거효능과 쥐의 간 균질액을 이용한 지질과산화 저해 효능에 대한 항산화 효능은 지표물질의 함량이 가장 높은 70% OFSE에서 우수한 효능을 나타내 본 연구에서 확립한 원료 표준화를 위한 적합한 분석법임이 검증되었다. 따라서 본 연구를 통하여 HPLC-PDA를 이용한 손바닥선인장 에탄올 추출물의 DHK와 3-MeQ의 분석법은 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위한 유용한 자료로 활용될 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 서울시의 재원으로 Seoul R&BD Program(CI 152006)의 지원을 받아 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn DK. 1998. *Illustrated book of Korean medicinal herbs*. Kyohaksa, Seoul, Korea. p 497.
- López AD. 1995. Review: use of the fruits and stems of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.) into human food. *Food Sci Technol Int* 1: 65-74.
- Choi J, Lee CK, Lee YC, Moon YI, Park HJ, Han YN. 2002. Biological activities of the extracts from fruit and stem of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*) II. Effects on dietary induced hyperlipidemia. *Kor J Pharmacogn* 33: 230-237.
- Park EH, Hwang SE, Kahng JH. 1998. Anti-inflammatory activity of *Opuntia ficus-indica*. *Yakhak Hoeji* 42: 621-626.
- Butterweck V, Semlin L, Feistel B, Pischel I, Bauer K, Verspohl EJ. 2011. Comparative evaluation of two different *Opuntia ficus-indica* extracts for blood sugar lowering effects in rats. *Phytother Res* 25: 370-375.
- Kim SH, Jeon BJ, Kim DH, Kim TI, Lee HK, Han DS, Lee JH, Kim TB, Kim JW, Sung SH. 2012. Prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica* var. *saboten*) protects against stress-induced acute gastric lesions in rats. *J Med Food* 15: 968-973.
- Kwon MC, Han JG, Jeong HS, Qadir SA, Choi YB, Ko JR, Lim TI, Lee HY. 2008. Enhancement of immune activities of *Opuntia ficus-indica* L. Miller by ultrasonification extraction process. *Korean J Med Crop Sci* 16: 1-8.
- Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS. 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J Agric Food Chem* 50: 6490-6496.
- Morán-Ramos S, Avila-Nava A, Tovar AR, Pedraza-Chaverri J, López-Romero P, Torres N. 2012. *Opuntia ficus indica* (nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese Zucker (*fa/fa*) rats. *J Nutr* 142: 1956-1963.
- Galati EM, Monforte MT, Tripodo MM, d'Aquino A, Mondello MR. 2001. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. *J Ethnopharmacol* 76: 1-9.
- Lee EB, Hyun JE, Li DW, Moon YI. 2002. Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* stem on gastric damages in rats. *Arch Pharm Res* 25: 67-70.
- Lee NH, Yoon JS, Lee BH, Choi BW, Park KH. 2000. Screening of the radical scavenging effects, tyrosinase inhibition and anti-allergic activities using *Opuntia ficus-indica*. *Korean J Pharmacogn* 31: 412-415.
- Wie MB. 2000. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* and *Saururus chinensis* on free radical-induced neuronal injury in mouse cortical cell cultures. *Yakhak Hoeji* 44: 613-619.
- Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Lee YH, Jin C, Lee YS, Cho J. 2003. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res* 965: 130-136.
- Jung SY, Kim HJ, Lee J, Cho J, Lee YS, Jin C. 2012. Neuroprotective effects of quercetin 3-O-methyl ether, quercetin and (±)-dihydroquercetin in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Bull Korean Chem Soc* 33: 2443-2446.
- Kim JM, Kim DH, Park SJ, Park DH, Jung SY, Kim HJ, Lee YS, Jin C, Ryu JH. 2010. The *n*-butanolic extract of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* enhances long-term memory in the passive avoidance task in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 34: 1011-1017.
- Saleem M, Kim HJ, Han CK, Jin C, Lee YS. 2006. Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Phytochemistry* 67: 1390-1394.
- KFDA. 2004. *Analytical method guideline about validation of drugs and etc*. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. p 1-18.
- Lee JS, Kim HJ, Park H, Lee YS. 2002. New diarylheptanoids from the stems of *Carpinus cordata*. *J Nat Prod* 65: 1367-1370.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Sanz MJ, Ferrandiz ML, Cejudo M, Terencio MC, Gil B, Bustos G, Ubeda A, Gunasegaran R, Alcaraz MJ. 1994. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica* 24: 689-699.
- Jeong SJ, Jun KY, Kang TH, Ko EB, Kim YC. 1999. Flavonoids from the fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Kor J Pharmacogn* 30: 84-86.
- De Leo M, De Abreu MB, Pawlowska AM, Cioni PL, Braca CA. 2010. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC-PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. *Phytochem Lett* 3: 48-52.
- Wang Y, Chen P, Tang C, Wang Y, Li Y, Zhang H. 2014. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L.. *J Ethnopharmacol* 151: 944-950.
- Yeddes N, Chérif JK, Guyot S, Sotin H, Ayadi MT. 2013. Comparative study of antioxidant power, polyphenols, flavonoids and betacyanins of the peel and pulp of three Tunisian *Opuntia* forms. *Antioxidants* 2: 37-51.