

Gas Chromatography法에 의한 Quercetin의 微量分析에 관한 研究

李淑淵·金成璟

淑明女子大學校 藥學大學·서울大學校 藥學大學

(Received February 12, 1982)

Sook Youn Lee and Sung Kyeong Kim

College of Pharmacy, Sook Myeong Women's University, Seoul 140 and

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Microquantitative Analysis of Quercetin by Gas Chromatography

Abstract: This investigation was intended to develop the quantitative gas liquid chromatographic method for quercetin. The method involves derivatization of the sample with trimethylsilylimidazole containing cholesterol as an internal standard and injection into a gas chromatograph with 3% OV-17 column. The calibration curve for the quercetin was linear over a sample in the range of 4~16 μ g. The minimum detectable amount using FID in 1.6×10^{-10} a.f.s. was determined to be 6.64×10^{-10} mol.

Quercetin은 bisflavonoid의 일종으로 植物界에 널리 分布¹⁻¹⁴⁾하고 있으며 한때 放射性元素의 精製에 이용된적도 있다. 또한 生物學的인 效果도 커서 ascorbic acid에 대한 synergistic effect¹⁵⁾, adrenalin autoxidation의 억제 效果, hyaluronidase에 대한 억제 작용, 血管壁의 脆弱防止작용, histidine carboxylase의 억제에 의한 radiation injury의 protecting effect 및 kidney phosphatase 억제에 의한 利尿作用등이 있어 生化學的으로 重要性을 지니는 活性物質로 광범위하게 利用되어 왔다. 종래 이 物質에 대한 定量은 重量法과 TLC 및 spectrophotometry를 利用한 定量법¹⁶⁾이 있으며 生化學的인 重要性이 제기되어 微量定量法의 確立이 기대되어 왔다. G.C.에 의한 多種의 flavonoid를 분석한 많은 보고가^{17,18)} 있으나 本研究은 좀 더 신속하고 精確한 微量分析法을 확립 하리는데 그 목적이 있다.

Quercetin은 용점이 높고 그 化學構造에 水酸基가 많아 極성이 높고 그 자체로는 GC의 적용이 不可能하므로 TMS化 하여 휘발성을 높이고 熱에 대하여 安定하고 極성이 낮은 유도체로 만들어 3% OV-17 boron silicate glass column을 사용하여 240°C 항온에서 분석한 결과 만족스러운 結果를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

實驗方法

試藥—Quercetin 標準品은 日本 半井化學藥品(株) 製品

Trimethyl silylating agent로는 BSA 즉 N,O-bis (trimethyl silyl) acetamide (Sigma Chem. Co.)와 trimethyl silyl imidazole을 사용하였고 기타 시약은 市販特級品을 사용하였다.

Table I-Chromatographic condition.

Gas chromatograph	Shimadzu GC-4BM
Detector	F.I.D.
Column	U Type glass 2m
Stationary phase	3% OV-17
Support material	Shimalite W 80/100
Flow rate	N ₂ 50ml/min H ₂ 0.85Kg/Cm ² Air 1.05Kg/Cm ²
Temperature	Injector 330°C Column 240°C Detector 330°C
Sensitivity	1.6 × 10 ⁻¹⁰ a.f.s.
Chart speed	5mm/min

Table II-The relation between column temperature and retention time.

Temperature (°C)	Retention time (min)
220	25:00
240	9:30
260	5:00

Table III-The relation between flow rate and height of peak.

Flow rate (ml/min)	Rt. (min)	Ht. of peak	Area of peak
30	17:00	3	17.8
40	12:30	24	105.2
50	9:45	70	262
60	9:40	66	250
70	7:10	52	146.8

標準操作—Quercetin과 内部標準物質인 cholestrol을 각각 microbalance에서 1mg씩 精秤하여 teflon으로 sealing된 5ml culture tube에 넣어 TMSI 0.5ml에 용해시켜 恒溫槽에서 80°C로 20分間 反應시키고 室溫에서 放置 冷却시킨 다음 GC用 micro syringe로 各 sample 2μl를 주입하였다. 이때의 GC 조건은 요약하면 Table I과 같다.

結果 및 考察

Column의 條件과 retention time—본 실험에서 使用한 column은 3% OV-17 Shimalite 80~100 mesh를 특별한 前處理를 하지않고 사용전 270°C에서 N₂ gas 50ml/min의 流速으로 1時間 aging 시킨다음 TMSI를 주입하여 極性物質을 우선 제거한후 使用하였다. Column의 온도를 80°C에서 5°C/min의 속도로 점차 昇溫시켜 270°C로한 chromatogram과 240°C 恒溫으로 한것과를 比較하였던 바 恒溫으로 한것이 peak의 分理가 뚜렷하여 240°C 恒溫이 本實驗에서는 適合하다는것을 確認하였다.

Column 조건과 retention time은 Table II와 같다.

N₂ Flow rate의 決定—本實驗에 적합한 N₂ flow rate 조건을 찾기 위해 240°C의 column溫度下에서 flow rate를 各各 30, 40, 50, 60, 70ml/min로 변화시켜가며 가장 適合한 조건을 모색하였던바 peak height가 가장 높고 peak area의 면적이 가장 큰 50ml/min의 유속이 가장 적합하였고 Table II에서 보는 바와 같이 N₂의 流速이 너무 느리면 retention time이 길어지는 峰단이 있을뿐 아니라 peak의 出現이 鈍해지고 反對로 N₂ gas의 流速이 빠르면 retention time이 짧아지고 peak의 出現도 예리해짐을 볼 수 있다. 따라서 retention time이 가장 적절하것은 N₂ gas의 流速을 50ml/min으로 조정하는것이 가장 適合한 條件임을 確認하였다.

内部標準物質의 選擇—操作에 있어서 器機에 대한 條件의 變化에 따라 수반되는 誤差를 減少시키기 위해서 적절한 内部標準物質을 선택하기 위한 별도의 실험을 실시하였다.

内部標準物質의 條件은 純粹한 物質이어야 하며 일고자 하는 物質의 peak와 完全히 分離된 peak을 얻을수 있어야 하고 melting point 및 molecular weight도 類似한 物質이어야 한다.

본 실험에서는 scopolamine, glucose, maltose, rhamnose, cholesterol에 대해 그 適合與否를 실험한 결과 각각의 retention time은 Table IV와 같다. 따라서 内部標準物質로서는 cholesterol을 선택하였고 quercetin과 cholesterol의 basic chromatogram은 Fig. 1과 같다.

Table IV-Retention time of various organic compounds.

Sample	Rt. (min)
Scopolamine	9
Glucose	26
Maltose	13
Rhamnose	11
Cholesterol	7:30

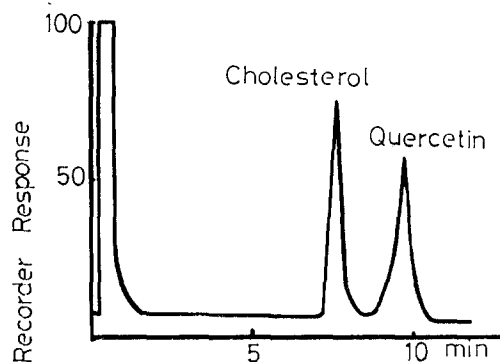


Fig. 1-Basic chromatogram of silylated quercetin and cholesterol.

TMS化에 適合한 反應溶媒의 選擇—Cholesterol은 油溶性인 반면에 quercetin은 水溶性인 것으로 TMS化 하기전에 우선 이들 物質이 녹을 수 있는 용매를 선택하는 것이 매우 중요하다.

本實驗에서는 溶媒로서 TMSI, BSA, chloroform, pyridine, acetonitril등을 사용하여 조사한 결과 chloro form에는 Quercetin이 난용이고 pyridine에 용해하기는 하나 TMS化 가 일어나지 않았으며 BSA로는 Quercetin의 TMS化가 역시 진행되지 않음을 확인하였다. Acetonitril에 이들 두 물질을 용해시켜 이 용액에 대해 TMS化의 진행여부를 조사하였던바 TMS化는 일어났으나 만족할만한것은 아니었으므로 本實驗에서는 두물질을 잘 용해시키고 TMS 효과도 양호한 TMSI를 適合溶媒로 選擇하였다.

TMS化劑의 反應時間 및 反應溫度—Quercetin의 TMS化에 있어서 適合한 溶媒는 TMSI가 가장 효과적임을 확인하였으나 완전한 TMS化 반응을 위해서는 적절한 反應時間 및 反應溫度條件 등이 필요하다. 그러므로 適合한 反應溫度를 究明하고자 室溫, 60°C, 80°C, 100°C에서 각각 30分間 反應시켜 TMS 化의진행을 조사하였다. 그 진행의 결과는 해당 peak의 면적에서 이를 확

Table V-Effect of silylation temperature.

Reaction temp.(°C)	Height of peak	Area of peak
Room temp.	38	17.21
60	62	27.7
80	63	27.2
100	50	21.53

Table VI-Effect of silylation time.

Reaction time(min)	Height of peak	Area of peak
20	84	34.74
30	79	30.04
50	76	28.76
60	76	28.02

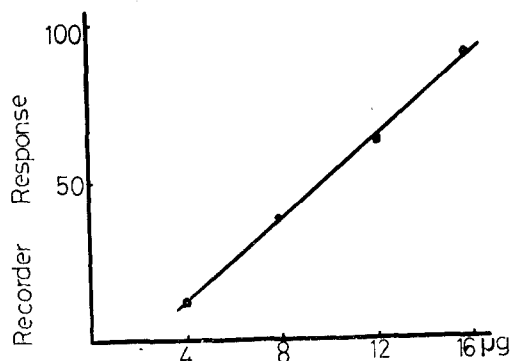


Fig. 2-Calibration curve of quercetin,

인한바 80°C의 경우가 가장 적합한 반응온도로 확인되었고 그 결과는 Table V과 같다.

또한 반응시간을 선택하기 위해 80°C의 反應溫度에서 그 反應時間을 각각 20, 50, 60分에서 檢索하였던 바 反應時間 20分의 경우 peak height 84, peak area 34.74로서 가장 높은 것임을 확인하였다.

各溫度에서의 결과를 요약하면 Table VI와 같다.

相對物感度比의 設定—본실험에서 실시한 quercetin에 대한 gas chromatography法에 따른 定量的인 계산을 위해서는 peak area를 오히려 그 중이의 무게를 微量定量하여 다음과 같은 式에 의해 相對物感度比를 算出하였다.

Relative molar response(이하 R.M.R.) 산출공식은 다음과 같다.

$$\text{R.M.R.} = \frac{\frac{\text{Area(Q)}}{\text{Grams(Q)/M.W.(Q)}}}{\frac{\text{Area(C)}}{\text{Grams(C)/M.W.(C)}}} = \frac{\frac{\text{Area(Q)}}{\text{mol(Q)}}}{\frac{\text{Area(C)}}{\text{mol(C)}}}$$

R.M.R. (Q/C): cholesterol에 對한 quercetin의 R.M.R.

Area (Q): weight of chromatographic peak for quercetin

Area (C): weight of chromatographic peak for cholesterol (Internal standard)

M.W.: molecular weight

Quercetin과 internal standard인 cholesterol의 농도를 각각 1:1, 2:1, 3:1, 4:1로 변화시켰을 때의 相對物感度比는 그 比率이 2:1 以上이 되면 약간씩 증가하는 경향이 있으므로 가장 효율적인 精량을 위해서는 시료 quercetin의 농도와 비슷한 내부표준물질을 가해주는것이 가장 적절한 것임을 확인하였고 이러한 結果를 도시하면 Fig. 3와 같다.

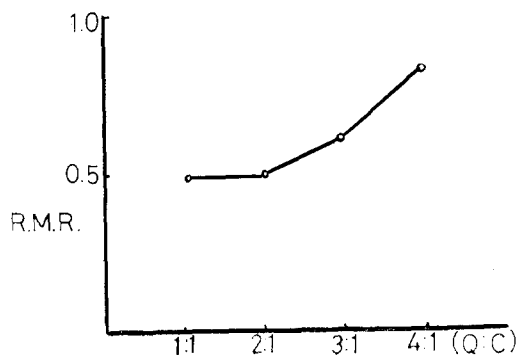


Fig. 3-Relative molar response.

Table VII-The retention time of TMS derivatives of some naturally occurring compounds at experimental condition.

Compound	Retention time(min:sec)
Quercetin	9:30
Daidzein	5:20
Biochanin	5:50
Morin	6:20
Kaemferol	7:30
Chlorogenic acid	8:40
Myricetin	17:00

共存物質의 影響—自然界에 存在하는 quercetin의 分析에는 여러 共存物質과 유사한 구조의 化合物이 影響을 미칠것을 고려하여 daidzein, biochanin, morin, kaemferol, chlorogenic acid, myricetin 공존下에서 같은 조작을 하였다. Quercetin과 위의 6개물질을 각각 0.5mg씩 精평하여 test tube에 넣고 TMS를 가해 TMS化 시켜 그 retention time을 측정된 결과는 Table VII와 같다.

위의 물질 공존하에서 quercetin의 retention time에는 影響이 없었고 recovery test를 실시하여 98.5%의 회수율을 얻었다.

結 論

1) Quercetin의 silylating agent로서 TMSI가 적절하며 column 온도는 240°C 항온이 승온보다 peak의 분리 및 정량감도가 양호하다.

2) N₂ flow rate는 50ml/min의流速일때가 가장 좋은 결과를 나타내었으며 retention time은 9分 30秒였다.

3) 内部標準物質로서는 cholesterol이 적합하였고 silylation의 反應溶媒는 TMSI, 反應溫度 및 시간은 80°C, 20分이 적합하였다. 分析에 必要한 内部標準物質의 R.M.R.은 未知檢體와 같은 mol 수로 농도를 조정하는것이 적절하다.

4) 共存物質은 quercetin의 retention time에 영향을 주지 않았으며 98.5%의 회수율을 얻었다.

5) 以上の 內容에 따라 檢量線을 作成하여 再現性이 있음을 確認하였으니 6.61×10⁻¹⁰ Mol까지 定量이 可能하였다.

이 연구는 1981년도 문교부 학술연구조성비 지급에 의하여 이루어지 것이며, 이에 당국에 감사하는 바이다.

文 獻

1. A. Zürst *et al.*, *Helv.*, **43**, 1074 (1960).
2. Strzelecka, Haliana *et al.*, *Acta, Pol. Pharm.*, **29**, 351 (1972).
3. 內藤謙一, 日農化, **42**, 450 (1968).
4. Dhar Durga *et al.*, *Curr. Sci.*, **43**, 479 (1974).
5. Szostk Henryki *et al.*, *Herba Pol.* **15**, 66 (1969).
6. A.G. Perkin *et al.*, *J. Chem. Soc. London*, **69**, 1295 (1896).
7. A.G. Perkin *et al.*, *ibid.*, **75**, 837 (1879).
8. W.B. Dunstan *et al.*, *ibid.*, **73**, 209 (1898).
9. J. Herzig. *Monatsh. Chem.*, **6**, 889 (1885).
10. A.G. Perkin, *J. Chem. Soc. Lodon*, **77**, 426 (1900).
11. F.B. Power *et al.*, *ibid.*, **97**, 231 (1910).
12. 長谷川浩, 日農化, **7**, 1036 (1931).
13. 中沖太七郎, 藥學雜誌, **52**, 499 (1932).
14. Rangaswami *et al.*, *Proc. Indian Acad. Sci.*, **56**, 239 (1962).
15. Shrikhande, A.J. and F.J. Francis, *J. Food Science*, **39**, 104 (1974).
16. L.E. Dowd, *Anal. Chem.*, **31**, 1184 (1959).
17. Breto, M., Alberola, J., Casas, A., *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.* **14**, 405 (1974).
18. K. Vande casteel, H. DE Pooter. *J. Chromat.*, **121**, 49 (1976).