

후박나무 잎 Flavonoid 성분의 분석

金 聖 煥 · 朴 鐘 喆*

(경북보건환경연구원, *순천대학교 한약자원학과)

Analysis of Flavonoid Components from *Machilus thunbergii* Leaves

Kim, Sung Hwan and Jong Cheol Park*

(Kyongbuk Institute of Health and Environment, Daegu and

*Department of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University, Suncheon)

ABSTRACT

Six flavonoid compounds from the ethyl acetate fraction of *Machilus thunbergii* leaves were identified by HPLC. Separation by reversed phase chromatography on u-Bondapak C₁₈ column was achieved by isocratic elution. The contents of the major flavonoids, guaijaverin and quercitrin were about 0.48% (w/w) and 0.98% (w/w) for the methanol extract, respectively.

서 론

후박나무(*Machilus thunbergii*)는 녹나무과에 속하는 상록활엽교목으로 높이는 약 20 m에 달하며 잎은 도란상장타원형으로 밑이 날카롭고, 꽃은 황록색으로 5~6월에 핀다(Chung, 1956; Lee, 1989).

후박나무의 수피는 한방에서 厚朴이라 하며 흉복부 팽만, 복통, 천해 등의 치료에 사용된다. 그러나 중국에서는 복련과 식물인 *Magnolia officinalis*의 수피를 같은 치료 목적으로 사용한다(Namba, 1980). 저자 등은 한국산 후박나무인 *Machilus thunbergii*의 잎에서 flavonoid 성분들을 분리하여 보고한 바 있다(Park et al., 1990a, b).

Flavonoid는 shikimic acid 경로를 거쳐 생성된 C₆-C₃ 화합물에 C₂ 단위가 3개 축합하여 생성된 것이다. Flavonoid는 식물계에 널리 분포되어 있고 곡물, 야채, 과일 등 일상식품에 상당량이 들어 있으며 포유동물에 독작용(poriolide)이 있는 것 외에도 다음과 같은 다양한 활성의 연구가 이루어져 있다. 즉 rutin은 항혈관삼투작용이 있으며, 사하작용(multiflorin A), estrogen 작용(genistein, formonetin), 진경작용(isoliquiritigenin), 살균작용(pisatin), 진정작용(spinosin)이 있는 것이 알려져 있다(Woo, 1984).

이러한 약리효과가 있는 flavonoid성분들을 HPLC로서

분리, 분석하는 연구가 개발되고 있다(Harbone et al., 1982; Kang et al., 1990, 1993). 이에 대한 연구로서 저자 등은 참죽나무 잎 성분을 분석, 정량한 바 있으며(Park et al., 1993) 계속적 연구로서 후박나무 잎에서 이미 분리된 성분을 지표물질로 하여 HPLC를 이용한 간편한 분석법을 인지하였으므로 보고한다.

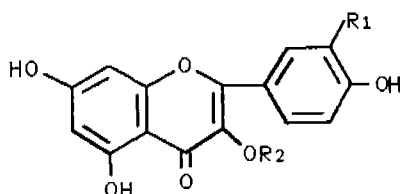
재료 및 방법

실험재료. 후박나무 잎은 1988년 8월 전남 여수시 오동도에서 채집하여 감정 후 음건, 사용하였다. 재료는 순천대 한약자원학과 표본실에 보관 중이다.

시약 및 기기. HPLC 분석기기는 Waters Associate의 분석용 Liquid chromatograph로서 Model 440 detector 및 M 730 data module이 부착된 것을 사용하였다. Column은 Waters의 u-Bondapak C₁₈(3.9×300 mm)을 사용하였다.

분석용 시약은 HPLC용 시약을 사용하였으며 flavonoid 들은 저자 등에 의한 후박나무 잎에서 분리, 구조가 확정된 quercetin, afzelin, guaijaverin, quercitrin, isoquercitrin 및 rutin(Fig.1)을 사용하였다. 내부표준물질로 이용한 luteolin은 금은화에서 분리한 것을 사용하였다.

추출 및 분리. 후박나무 잎을 음건후 세절하여 수욕



	R ₁	R ₂
quercetin	OH	H
afzelin	H	rhamnopyranose
guajaverin	OH	arabinopyranose
quercitrin	OH	rhamnopyranose
isoquercitrin	OH	glucopyranose
rutin	OH	glucopyranosyl(6-1)rhamnopyranose

Fig. 1. Structure of flavonoids isolated from the leaves of *Machilus thunbergii*.

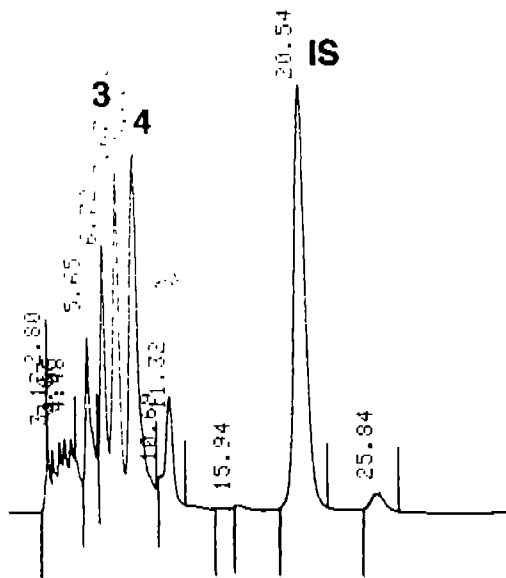


Fig. 2. HPLC chromatogram for MeOH extract from *Machilus thunbergii*. 3, quercitrin; 4, guajaverin; IS, luteolin.

상에서 환류 냉각하면서 MeOH로 3회 추출하였다. 용매를 감압하에서 제거, MeOH 추출물을 얻은 후 10% MeOH에 현탁시킨 후 Fig. 3과 같이 계통분획을 실시하여 CHCl₃, ethyl acetate(EtOAc), n-butanol 및 수층으로 분획하였다. 이 중 EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 실시하여 quercetin, afzelin, guajaverin, quercitrin, isoquercitrin 및 rutin을 분리하였다(Park *et al.*, 1990a, b).
분석조건. Table 1과 같다.

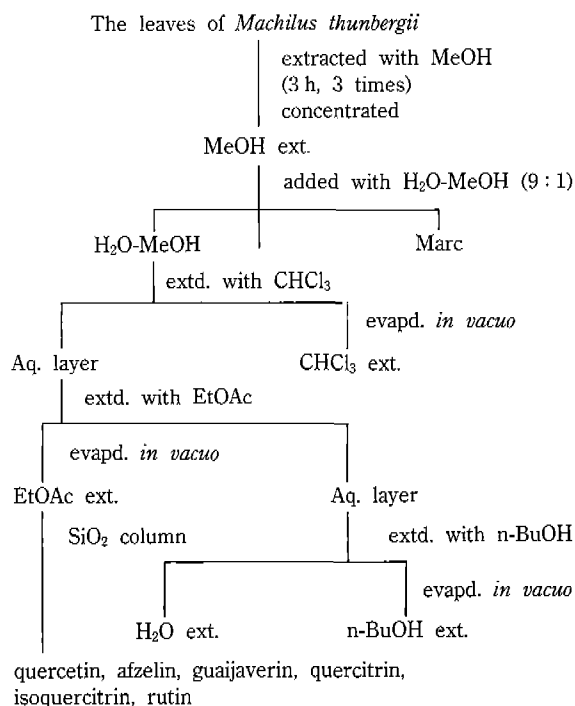


Fig. 3. Extraction and isolation of flavonoid compounds from *Machilus thunbergii*.

Table 1. HPLC analysis condition

Column	u-Bondapak C ₁₈ (3.9×300 mm)
Detector	UV 365 nm, 0.2 AufS
Mobile phase	THF-dioxane-MeOH-HOAc-5%H ₃ PO ₄ -H ₂ O (145 : 125 : 50 : 20 : 2 : 658)
Flow rate	1.0 mL/min
Chart speed	0.25 cm/min

표준검량선의 작성. 표준검량선은 내부표준물질로서 luteolin 14 mg을 정량하여 MeOH 10 mL에 용해시켜 1400 µg/mL의 표준액을 조제하였다. Guajaverin 및 quercitrin은 각각 12 mg으로 정량하여 MeOH 10 mL에 용해시킨 용액을 stock solution으로 해서 이를 일정량씩 취한 후 각각에 MeOH를 가해 0.24, 0.48, 0.72, 0.96, 1.2 mg/mL가 되게 조제하였다. Guajaverin, quercitrin 및 내부표준물질을 각각 1:1:1로 혼합하여 얻은 액 10 µL를 취하여 HPLC를 실시, chromatogram을 얻고 이로부터 평균 area ratio를 구하였다.

지표물질의 함량을 결정하기 위해서 표준검량선을 작성하였다. Guajaverin 및 quercitrin 검량선의 최귀직선방정식은 각각 Y=2.4176X+0.0058, Y=1.7779X+0.0055로서

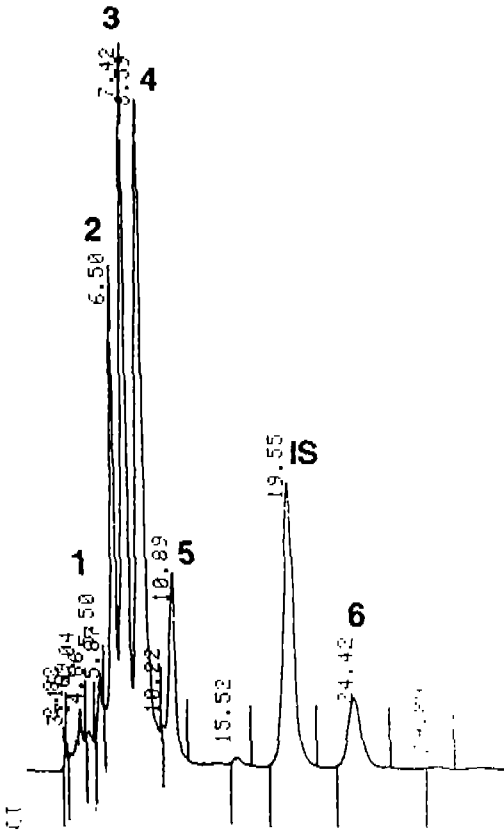


Fig. 4. HPLC chromatogram for EtOAc fraction from *Machilus thunbergii*. 1, rutin; 2, isoquercitrin; 3, quercitrin; 4, guaijaverin; 5, afzelin; 6, quercetin; IS, luteolin.

그 직선성을 검정한 결과 그 상관계수가 각각 0.9997 및 0.9996로서 1.0에 접근하므로 표준물질과 내부표준물질의 중량비(X)와 peak area ratio(Y)간에 직선성이 인정되었다.

MeOH 엑스 중 주성분의 정량. 건조한 MeOH 엑스 1000 mg을 정량하여 이를 MeOH 10 mL에 용해시킨 액을 검액으로 사용하였다. 검액, 내부표준액 및 MeOH를 1:1:1로 혼합한 후 이 혼합액 10 μ L를 취하여 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻고 이로부터 area ratio 값을 구하였다.

결과 및 고찰

후박나무 잎 엑스에서 quercetin, afzelin, guaijaverin, quercitrin, isoquercitrin 및 rutin의 flavonoid 성분을 분리하였다(Park *et al.*, 1990a, b). 이들 성분을 HPLC로서 분석하고 주성분의 함량을 결정하기 위해 건조한 후박나무 잎을 MeOH로 추출해서 계통분획하였다. 그 중 EtOAc

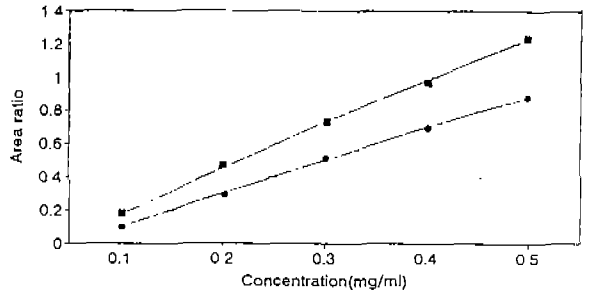


Fig. 5. Calibration curves for guaijaverin (■-■) and quercitrin (●-●).

엑스를 μ -Bondapak C_{18} 을 이용하여 여러가지 용매를 사용한 HPLC를 실시하고 이들의 분리능을 검토한 결과 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H_3PO_4 - H_2O (145:125:50:20:2:658)의 혼합용매를 사용해서 isocratic elution할 때 가장 좋은 결과를 얻었으며 이때의 chromatogram을 Fig. 2에 표시하였다. 또한 이 후박나무 MeOH 엑스를 Fig. 3과 같이 먼저 $CHCl_3$ 분획하고 수층을 EtOAc 및 BuOH로 분획하여 얻은 EtOAc 분획도 같은 조건으로 HPLC를 실시하였다. 이 EtOAc 분획을 silica gel column으로 분리한 성분인 quercetin, afzelin, guaijaverin, quercitrin, isoquercitrin 및 rutin을 사용해서 spike test를 실시, 확인한 결과 Fig. 4에서와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이 chromatogram에서 볼 수 있는 바와 같이 주성분인 guaijaverin 및 quercitrin은 t_R 이 7.42 및 8.59 min에서 강하게 나타나고 다른 성분들과 떨어져서 peak가 나타나므로 이 화합물을 함량분석의 지표물질로 하였다. 내부표준물질(IS)은 각종 화합물들을 동일조건에서 HPLC를 실시한 결과 t_R 19.55 min에서 peak가 나타나는 luteolin이 적합함을 알았다. 지표물질의 함량을 결정하기 위해서 표준검량선을 작성하여 Fig. 5에 표시하였다. 그 직선성을 검정한 결과 표준물질과 내부표준물질(IS)의 중량비(X)와 peak area ratio(Y)간에 직선성이 인정되었다.

MeOH엑스 중의 guaijaverin 및 quercitrin의 함량을 결정하기 위해 실험부에서와 같이 조제한 혼합액 일정량을 취하여 HPLC를 실시하고 이로부터 얻은 평균 area ratio 값은 각각 0.3917 및 0.5860이므로 이를 회귀적선방정식에 대입하여 weight ratio 값을 구하면 MeOH 엑스 중에 guaijaverin 및 quercitrin의 함량은 각각 479 μ g/mL, 980 μ g/mL이다. 따라서 10 mL 중에는 4.79 mg, 9.80 mg 함유되어 있으므로 guaijaverin 및 quercitrin의 함량은 MeOH 엑스 중에 각각 0.49%(w/w), 0.98%(w/w) 함유되어 있음을 알 수 있다.

HPLC는 구조가 유사한 flavonoid 화합물들을 적당한 용매계가 선택되면 신속히 분리 분석할 수 있는 장점이

있어(Harbone *et al.*, 1982), 이와 같은 방법은 자주 이용되고 있다. 따라서 저자 등은 이상의 실험을 행하여 후박나무 잎 flavonoid들을 HPLC로서 분리 분석하고 그 주성분의 함량을 정량하여, 후박나무 잎 중의 flavonoid를 지표물질로 한 간편한 분석법을 확립하였다.

적 요

후박나무(*Machilus thunbergii*) 잎의 ethyl acetate 분획으로부터 분리한 quercetin, afzelin, guaijaverin, quercitrin, isoquercitrin 및 rutin의 flavonoid 성분들은 HPLC에 의한 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H_2PO_4 - H_2O (145:125:50:20:2:658) 용매계에서 양호한 분리능을 나타내었다. 또한 MeOH 엑스 중에서 주성분인 guaijaverin 및 quercitrin의 함량을 산출한 결과 각각 0.48% 및 0.98%임을 알 수 있었다. 따라서 본 실험은 flavonoid의 약리적 중요성에 비추어 이들 성분들을 다른 생약에 적용하여 분리, 확인할 수 있는 분석법과 정량에 기여할 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Chung, T.H. 1956. Korea Flora(I). Changwonsa, Seoul. p. 51.
- Harborne, J.B. and T.J. Mabry. 1982. The Flavonoids: Advanced in Research. Chapman and Hall, New York. p. 4.
- Kang, G.S., J.R. Youm and S.K. Kang. 1993. Seasonal variations of the flavonol glycosides content from *Ginkgo biloba* Leaves. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**: 47-53.
- Kang, S.S., J.S. Kim, W.J. Kwak and K.H. Kim. 1990. Identification and quantitative analysis of flavonol glycosides from *Ginkgo biloba* Leaves by High Performance Liquid Chromatography. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**: 148-152.
- Lee, T.B. 1989. Illustrated Flora of Korea. Hyanmoonsa, Seoul. p. 1512.
- Namba, T. 1980. Coloured Illustrations of Wakan-Yaku(II). Hoikusha, Osaka. p. 146.
- Park, J.C., H.S. Young, H.J. Park and S.C. Park. 1990a. Flavonol glycosides from the leaves of *Machilus thunbergii*. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**: 60-63.
- Park, J.C., B.W. Kim and H.S. Young. 1990b. Futher study on the flavonoids from the leaves of *Machilus thunbergii* in Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**: 197-200.
- Park, J.C., S.S. Chun, H.S. Young and S.H. Kim. 1993. Studies on the chemical components and biological activities of edible plants in Korea (II). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **22**: In press.
- Woo, W.S. 1984. Chunyenmulhwahak Yungubeob. Mineumsa, Seoul. pp. 78-79.

(1993. 7. 13 接受)