

한국산 식용식물의 화학성분 및 생리활성에 관한 연구(II) - HPLC에 의한 참죽나무 잎중 Flavonoid 성분의 확인 및 정량 -

박종철[†] · 전순실* · 양한석** · 김성환***

순천대학교 한약자원학과, *식품영양학과

**부산대학교 약학대학

***경북보건환경연구원

Studies on the Chemical Components and Biological Activities of Edible Plants in Korea (II)

- Isolation and Quantitative Analysis of Flavonoids from the Leaves of *Cedrela sinensis* A. Juss. by HPLC -

Jong-Cheol Park[†], Soon-Sil Chun*, Han-Suk Young** and Sung-Hwan Kim***

Dept. of Oriental Medicine Resources, and *Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University,
Suncheon 540-742, Korea

**College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

***Kyongbuk Institute of Health and Environment, Daegu 702-702, Korea

Abstract

Five flavonoids isolated from the ethyl acetate fraction of *Cedrela sinensis* A. Juss. were identified by high performance liquid chromatography. Separation was achieved by reversed phase chromatography on μ -bondapak C₁₈ column with isocratic elution method. The content of the major flavonoid, quercitrin was about 9.48%(w/w) and 37.06%(w/w) for the methanol extract and ethyl acetate fraction, respectively.

Key words : *Cedrela sinensis*, Meliaceae, analysis of flavonoid, HPLC, quercitrin

서 론

참죽나무(*Cedrela sinensis* A. Juss.)는 멀구슬나무과에 속하는 식물로서 이의 순을 "참죽"이라 하는데 대나무처럼 순을 먹는다 하여 붙여진 이름이다. 참죽을 먹는 풍습은 우리나라와 중국뿐이며 이른 봄에 참죽나무 순이 돌아날때는 붉은색을 나타내므로 매우 아름다우며 맛과 향과 색이 조화를 이루는 귀한 산채이다. 또한 참죽을 따 대쳐서 무친 것을 참죽나무이라하여 봄의 맛있는 미각으로 손꼽는다. 한방에서는 참죽나무의 잎을 춘엽이라 하여 장염, 이질, 개선 등의 치료에 이용되기도 한다^{1,2)}.

저자 등은 한국산 참죽나무 잎에서 flavonoid성분을 분리하여 화학구조를 결정, 보고한 바 있다³⁾.

Flavonoid는 2개의 방향족환과 3개의 탄소로 이루어진 탄소 15개로 된 일련의 C₆-C₃-C₆ 화합물로서 식물체에 널리 분포되어 있다. Flavonoid의 생리 및 약리활성에 관한 많은 연구로는 지금까지 알려진 작용으로 항 virus⁴⁾, 항 혈액응고 및 급성간염억제⁵⁾, 고혈압 및 당뇨병성 백내장 등의 예방⁶⁾, angiotensin-converting enzyme activity 억제⁷⁾, 이노, 사하, 모세혈관투과성 억제, 항산화⁸⁾, 항염⁹⁾, 진경, 혈압강하, 살충작용 등¹⁰⁾이 알려져 있다. Flavonoid성분의 약리작용에 대한 관심이 증대됨에 따라서 치료목적으로 사용할 flavonoid생약에 대한 평가에 있어서도 좀더 정확하고 재현성이 높은 분석방법의 개발로 분석법의 표준화가 요구되고 있다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

지금까지의 flavonoid의 분석방법은 Ultraviolet spectroscopy (UV)를 이용하는 것이 주를 이루었으나 근래에는 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 이용하는 방법이 많이 개발되고 있다^{11,12}. 저자들은 한국산 참죽나무 잎에서 존재하는 flavonoid를 분리, 이들 성분을 지표로 하여 HPLC chromatogram상에 나타난 각각의 피크를 확인한 후 이를 이용한 분석법을 개발하였으므로 보고한다.

재료 및 방법

실험재료

참죽나무 잎은 1991년 5월 13일 경남 산청군 생초면에서 채집하여, 음건, 세절하여 사용하였다. 재료는 순천대 한약자원학과 표본실에 보관중이다.

시약 및 기기

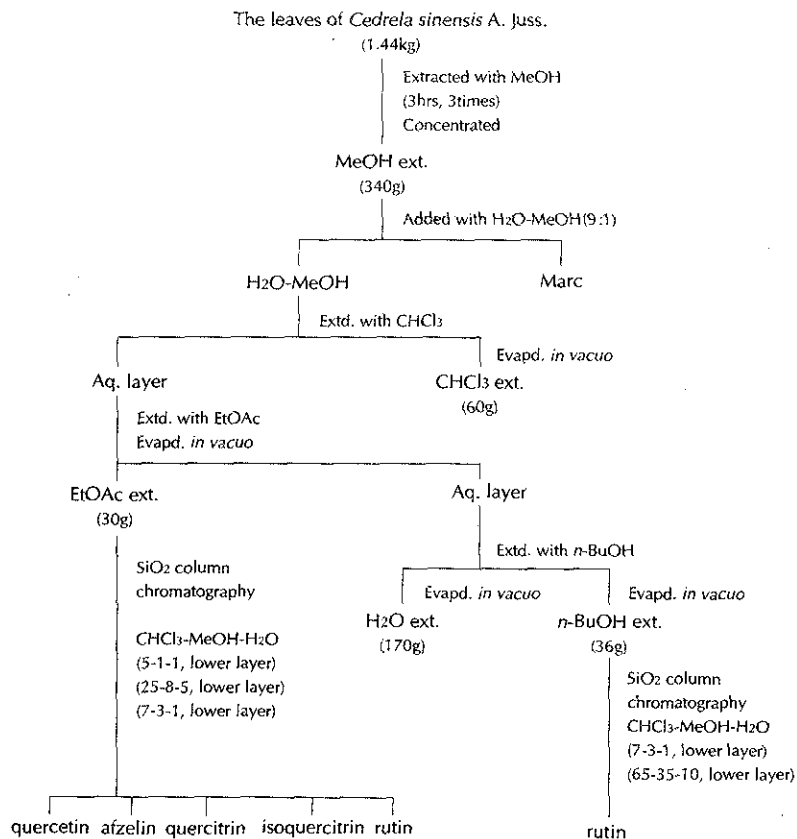
HPLC 분석기기는 Waters Associate의 분석용 Liquid

chromatograph로서 Model 440 detector 및 M730 data module이 부착된 것을 사용하였다. Column은 Waters의 μ -bondapak C18 (3.9mm×300mm)을 사용하였다.

분석용 시약은 HPLC용 시약을 사용하였으며 사용한 flavonoid들은 저자 등에 의해 참죽나무 잎에서 분리, 구조가 확정된 순수화합물들을 사용하였다. 내부 표준물질로 사용한 leuteolin¹³은 고들빼기에서 분리한 것을 사용하였다.

추출 및 분리

전보³에서 처럼 참죽나무 잎 (1.44kg)을 음건후 세절하여 수욕장에서 환류냉각하면서 MeOH로 3회 추출하였다. 용매를 감압하여 제거, MeOH 추출물을 얻은 후 10% MeOH에 현탁시킨후 Scheme 1과 같이 계통분획을 실시하여 CHCl₃, ethyl acetate (EtOAc), *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH) 및 수층으로 분획하였다. 이중 EtOAc 분획 및 *n*-BuOH분획을 silica gel column chromatography를 실시하여 quercetin, afzelin, quercitrin, iso-

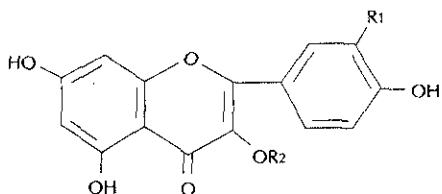


Scheme 1. Extraction and isolation of flavonoid compounds from *Cedrela sinensis*.

quercitrin 및 rutin (Fig. 1)의 flavonoid성분을 분리하여 HPLC의 표준물질로 사용하였다.

분석조건

이동상으로는 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5%



	R1	R2
quercetin	OH	H
afzelin	H	rhamnopyranose
quercitrin	OH	rhamnopyranose
isoquercitrin	OH	glucopyranose
rutin	OH	glucopyranosyl(6-1) rhamnopyranose

Fig. 1. Structures of flavonoids isolated from *Cedrela sinensis*.

H₃PO₄-H₂O(145 : 125 : 50 : 20 : 2 : 658)을 사용해서 isocratic elution 시켰다. 분석은 실온에서 실시하였으며 용매의 유속은 1.2ml/min, UV detector는 365nm를 사용하였고 감도는 0.1 AUs, chart speed는 0.25cm/min으로 하였다.

표준검량선의 작성

표준검량선은 내부표준물질로서 luteolin 14mg을 정량하여 MeOH 10ml에 용해시켜 1400µg/ml의 표준액을 조제하였다. Quercitrin은 20mg으로 정량하여 MeOH 10ml에 용해 시킨용액을 stock solution으로 해서 이를 일정량씩 취한후 각각에 MeOH를 가해 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0mg/ml가 되게 조제하였다. Quercitrin 및 내부표준물질을 각각 1 : 1로 혼합하여 얻은액 5µl를 취하여 HPLC를 실시 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 area ratio를 구하였다.

지표물질의 함량을 결정하기 위해서 표준검량선을 작성하여 Fig. 4에 표시하였다. Quercitrin 검량선의 회귀직선 방정식은 Y=0.2561X+0.0073로서 그 직선성을 검정한 결과 그 상관계수가 0.9998로서 1.0에 접근하므로 표준 물질과 내부표준물질의 중량비(X)와 peak area ratio(Y)간에 직선성이 인정되었다.

MeOH엑스 및 EtOAc 분획중 주성분의 정량

건조한 MeOH엑스 100mg 및 EtOAc 분획 50mg을 정량한 후 이를 MeOH에 녹여 total volume을 10ml로 한 액을 검액으로 사용하였다. 검액, 내부 표준액을 1 : 1로 혼합한 후 이 혼합액 5µg를 취하여 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻고 이로부터 area ratio값을 구하였다.

결과 및 고찰

참죽나무 잎 엑스중 flavonoid 성분들을 순수분리하고 이들의 화학구조를 화학반응 및 spectral data를 종합해서 결정하여 보고 한 바 있다³⁾. 건조한 참죽나무 잎을 MeOH로 추출해서 얻은 참죽나무 엑스를 µ-bondapak C18을 사용하여 여러가지 용매를 사용해서 HPLC를 실시하고 이들의 분리능을 검토한 결과 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H₃PO₄-H₂O의 혼합용매를 사용해서 isocratic elution할때 가장 좋은 결과를 얻었으며 이때의 chromatogram을 Fig. 2에 표시하였다. 참죽나무 엑스를 먼저 CHCl₃분획하고 수층을 EtOAc 및 BuOH로 분획하여 얻은 EtOAc분획도 같은 조건으

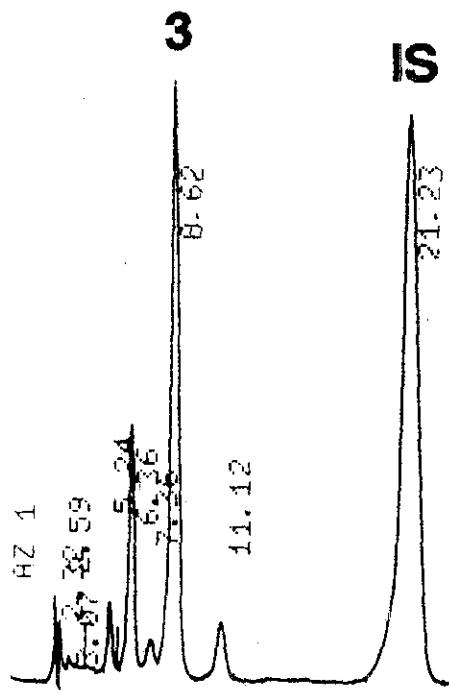


Fig. 2. HPLC chromatogram for MeOH extract from *Cedrela sinensis*.
3 : quercitrin
IS : luteolin

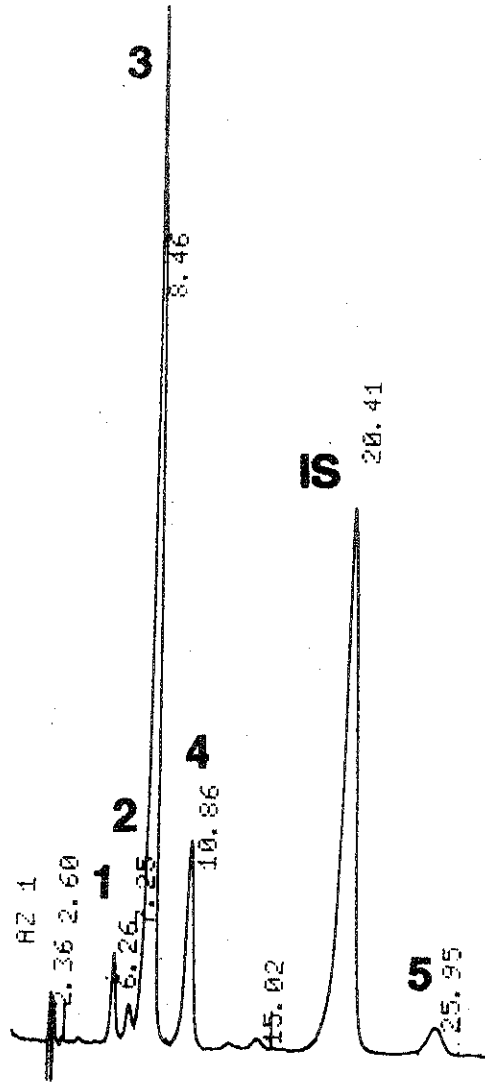


Fig. 3. HPLC chromatogram for EtOAc fraction from *Cedrela sinensis*.

- 1 : rutin 2 : isoquercitrin 3 : quercitrin
- 4 : afzelin IS : luteolin 5 : quercetin

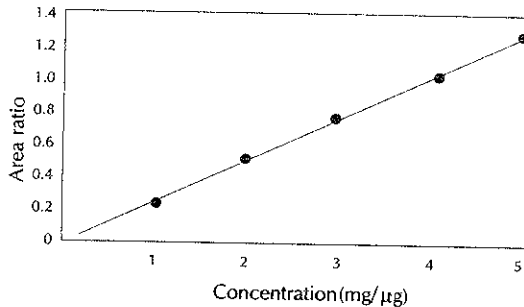


Fig. 4. Calibration curve for quercitrin.

로 HPLC를 실시하였다. EtOAc분획에 대부분의 flavonoid가 이행되며 따라서 이들 flavonoid를 분석하기에는 EtOAc분획이 가장 적합함을 알았으며 이 EtOAc분획을 HPLC를 실시해서 얻은 chromatogram상에 나타나는 각 peak들을 참죽나무 엑스에서 얻은 flavonoid의 표준물질 (quercetin, afzelin, quercitrin, isoquercitrin, rutin)을 사용해서 spike test를 실시하여 확인한 결과 Fig. 3에서와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이 chromatogram에서 볼 수 있는 바와 같이 주성분인 quercitrin은 tr이 8.46min에서 강하게 나타나고 다른 성분들과 떨어져서 peak가 나타나므로 이 화합물을 함량분석의 지표물질로 하였다. 내부표준물질 (IS)을 설정하기위해 각종 화합물들을 동일 조건에서 HPLC를 실시한 결과 tr 20.41min에서 peak가 나타나는 luteolin이 적합함을 알았다. 지표물질의 함량을 결정하기 위해서 표준 검량선을 작성하여 Fig. 4에 표시하였다. 그 직선성을 검정한 결과 그 상관계수가 0.9998로서 1.0에 접근하므로 표준물질과 내부표준물질의 중량비 (X)와 peak area ratio (Y) 간에 직선성이 인정되었다.

MeOH엑스와 EtOAc분획중의 주성분인 quercitrin의 함량을 결정하기 위해 실험부에서와 같이 조제한 혼액 일정량을 취하여 HPLC를 실시하고 이로부터 얻은 평균 area ratio (Y)값은 각각 0.6145 및 1.1936이므로 이를 회귀직선방정식에 대입하여 weight ratio (X)값을 구하면 MeOH엑스와 EtOAc분획중에는 9.48mg, 18.53mg 함유되어 있으므로 quercitrin의 양은 MeOH엑스중에는 9.48% (w/w), EtOAc분획중에는 37.06% (w/w) 함유되어 있음을 알 수 있었다.

이상의 실험결과 저자 등은 참죽나무 잎 flavonoid들을 HPLC를 이용하여 확인하고, 그 주성분의 함량을 정량하였으며, 참죽나무 잎중의 flavonoid를 지표물질로 한 새로운 분석법을 확립, 이들 성분의 HPLC에 의한 분리, 확인 및 참죽나무 잎의 품질평가에도 기여하리라 기대된다.

요 약

참죽나무 (*Cedrela sinensis* A. Juss.) 잎의 ethyl acetate분획으로부터 분리한 5종의 flavonoid성분들을 HPLC에 의한 용매계 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H₃PO₄-H₂O (145 : 125 : 50 : 20 : 2 : 658)에서 양호한 분리능을 나타내었다. 또한 주성분인 quercitrin의 함량은 MeOH엑스 및 EtOAc 분획에서 각각 9.48% (w/w) 및 37.06% (w/w) 함유되어 있음을 알 수

있었다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 연구비 지원(과제번호 : 931-0600-015-2)에 의한 결과의 일부이며 저자중 박종철은 이에 깊이 감사드립니다.

문헌

1. 최영전 : 산나물 재배와 이용법. 오성출판사, 서울, p. 206(1992)
2. 강소신의학원 : 중약대사전. 소학관, 동경, p.3717 (1985)
3. 박종철, 양한석, 유명법, 이종호 : 한국산 식용식물의 화학성분 및 생리활성에 관한연구(1), 참죽나무 잎에서 phenol성 화합물의 분리. 약학회지, **37**(3), 306 (1993)
4. Veckenstedt, A. and Horn, M. : Testing of antiviral compounds against Mengo virus infection of mice. A 2-step procedure of *in vivo* screening. *Z. Allg. Microbiol.*, **16**, 37 (1976)
5. Hladovec, J. : Antithrombotic effects of some flavonoid alone and combined with acetylsalicylic acid. *Arzneim. Forsch.*, **27**, 1989 (1977)
6. Swallow, D. L. : Antiviral agent. In "Progress in drug research" Jucker, E. (ed.), Birkhauer Verlag Basel und Stuttgart, Vol. 22, p.312 (1978)
7. Kameda, K., Takeshi, T., Okuda, H. and Kimura, Y. : Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J. Natural Products*, **4**, 680 (1987)
8. Toshimitsu, H., Kazuko, S., Kawasaki, M., Munehisa, A., Shimizu, M. and Morita, N. : Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Natural Products*, **51**, 345 (1988)
9. Kim, C. J., Su, S. K., Joo, J. H. and Cho, S. K. : Pharmacological activities of flavonoids(Ⅱ). Relationships of anti-inflammatory and antigranulomatous actions. *Yakhak Hoeji*, **34**, 407 (1990)
10. 柴田承二 : 生理活性天然物化學. 醫藥出版社, 東京, p.425 (1970)
11. Kang, S. S., Kim, J. S., Kwak, W. J. and Kim, K. H. : Identification and quantitative analysis of flavonol glycosides from *Ginkgo biloba* leaves by high performance liquid chromatography. *Kor. J. Pharmacogn*, **21**(2), 148 (1990)
12. Kang, G. S., Youm, J. R. and Kang, S. S. : Seasonal variations of the flavonol glycosides content from *Ginkgo biloba* leaves. *Kor. J. Pharmacogn*, **24**(1), 47 (1993)
13. Young, H. S., Im, K. S. and Choi, J. S. : The pharmacological study on the plant of *Ixeris* spp. 2. Flavonoid and free amino acid composition of *Ixeris sonchifolia*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**(3), 296 (1992)

(1993년 6월 21일 접수)