

은행(*Ginkgo biloba L.*)의 잎으로부터의 Flavonoids 화합물의 선택적 흡착

윤성용·최원재·박종문
포항공과대학교 화학공학과

Selective Adsorption of Flavonoids Compounds from the Leaf of *Ginkgo biloba L.*

Sung Y. Yoon, Won Jae Choi, and Jong Moon Park[†]

GREAT Lab., Department of Chemical Engineering, POSTECH, Pohang, Kyungbook 790-600, Korea

ABSTRACT

Selective adsorption of plant metabolites from a polar dilute solution onto a polycarboxyl ester sorbent (XAD-7) was investigated. Experimental results demonstrated that neutral resins could selectively concentrate specific flavonoids from dilute aqueous mixtures. Adsorption was dependent on the pH of medium, dosage of the resins and medium composition. Especially the medium composition was a key factor for the selective adsorption and it was found that the selective adsorption was dependent on specific sorbent-sorbate-medium characteristics. Under the optimum condition, selectivity increased up to 85% and the yield of recovery was approached to 98%. It was also found that XAD-7 adsorbed flavonoids in the order of hydrophobicity.

서론

식물체가 생산하는 이차 대사산물은 의약, 염료, 화장품, 향료의 주요 원료로서 인류 생활과 밀접한 관련을 맺어왔다. 최근 들어서는 환경과 건강에 대한 관심의 고조와 함께 이러한 천연물들이 더욱 각광을 받으면서 이에 대한 연구 역시 활발히 이루어지고 있다. 이미 다수의 천연 대사산물이 상품화되어 생산, 판매되고 있는데 본 연구에서 대상 식물체로 선정한 은행나무(*Ginkgo biloba L.*)의 대사산물도 이러한 예에 속한다. 은행나무는 예로부터 민간 한방 처방에 많이 사용되어 왔으며 잎에 함유되어

있는 flavonoids, diterpene, polyphenol, sesquiterpene 등의 수많은 화합물들이 여러 가지의 약리 작용을 하는 것으로 알려져 있다(1). 특히 이러한 화합물들 중 flavonol glycoside 계열의 화합물들은 전체 함유 물질의 30% 이상을 차지하고 있으며 그 중에서도 kaempferol, quercetin, myricetin 등의 glycoside 화합물류가 가장 많이 함유되어 있다. kaempferol은 혈류의 증가, 혈관 내 노폐물의 용해에 효과가 있고 quercetin은 혈액 순환 촉진, 혈관의 확장 등에 약리작용을 하여 혈액 순환제로 이용되고 있다(2).

이러한 물질들의 대량 생산을 위하여 세포 배양과 조직 배양 등의 다양한 방법(3, 4)이 시도되고 있으나 현재까지는 은행잎으로부터의 직접 추출에 비해

[†] Corresponding Author

생산 수율이 크게 떨어지고 있는 실정이다. 국내에서 생산되는 은행잎 추출물을 이용한 혈액순환제 역시 전통적인 용매추출법에 의해 은행잎으로부터 추출되어지고 있다. 그러나, 일반적으로 대부분의 대사산물은 식물체 내에 미량으로 여러 가지 다른 화합물들과 혼재되어 있어 추출물 내 다른 물질과의 분리가 매우 어렵다. 따라서 천연물의 분리는 불가피하게 다단계의 공정을 거칠 수밖에 없으며 그 과정에서 환경에 유해한 유기용매의 대량 사용 역시 불가피한 실정이다. 또한 이로 인한 생산 비용의 증가는 제품의 전체 생산비 중 70% 이상을 차지하고 있는 것으로 알려지고 있다. 따라서, 분리 공정에 소요되는 경비와 유기용매 사용의 감소는 생산비용의 절감과 환경보호 차원에서 필수적이라 할 수 있다.

선택적인 흡착을 이용한 식물체로부터의 유용물질 분리 및 회수 연구 역시 그러한 맥락에서 여러 학자들에 의해 연구되어져 왔다. 용매 추출법에 응용되는 흡착 공정에서는 주로 이온교환수지나 활성탄 등을 이용하고 있으나 선택도에 있어 큰 문제점을 안고 있다. 그 외에도 친화도(affinity)를 이용한 흡착 분리 공정의 경우 선택적 분리가 탁월하게 이루어지기는 하지만 공정에 소요되는 경비가 과다하여 일반 공정으로의 scale-up에는 많은 문제가 따른다. 그런데, 1976년 Stockigt 등(5)은 중성 고분자 물질인 Amberlite XAD-4를 이용하여 indole alkaloid의 흡착을 시도하였으며 Schuler와 Payne(6)은 Amberlite XAD-7과 XAD-4를 이용하여 indole alkaloid의 선택적인 흡착결과를 보고하였다. 이들의 보고 외에도 중성 고분자 물질을 이용한 흡착에서 여러 가지의 주변 환경 요소들을 적절히 조절해 주면 대상 물질을 선택적으로 흡착, 분리할 수 있다는 가능성을 제시해 주는 보고가 다수 있으며 현재에도 이 분야의 연구가 활발히 진행 중이다(7-11). 그러나 이들의 실험은 모두 standard compound를 이용하고 있어 실제 식물체로부터의 대상 물질 분리system에서도 이와 같은 결과를 나타내는 지에 대해서는 아직 연구가 미미한 실정이다.

본 연구에서는 standard compound가 아닌 은행나무의 잎에서 얻어진 실제 추출물을 이용하여 중성 고분자로의 선택적 흡착의 가능성을 시험해 보고자 하였으며 아울러서 XAD-7으로의 식물 대사산물의 흡착 기작을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

추출 및 흡탈착 방법

포항공과대학교 내에 자생하는 은행나무(*Ginkgo biloba L.*)의 잎을 6월경에 채취하여 3개월 동안 음지에서 건조하였다. 완전히 건조된 재료를 homogenizer로 분쇄한 후 desicator 안에 보관하였다.

시료를 메탄올로 24시간 이상 추출한 후 filtering (Wattman #1)과 감압농축과정을 거쳐 소량의 추출물 용액을 얻었다. 이를 적당량의 distilled 물과 혼합한 후 흡착제 (Amberlite XAD-7; Sigma)를 첨가하여 약 130rpm의 속도로 교반시켜 주었다. 약 10시간 경과 후 회수하여 흡착제와 수용액을 분리하고 흡착제를 다시 메탄올에 넣어 12시간 동안 탈착시켰다. 메탄올을 다시 감압농축시켜 얻어진 sample을 HPLC로 분석하였다.

분석 방법

추출된 flavonoid의 양은 HPLC(Waters M510 pump, Waters 996 Photodiode array detector, Millenium HPLC I/O software) 방법에 의해 분석하였다. 분석 column은 C18 column(300mm×3.9mm I.D.; Waters m Bondapak C₁₈)을 이용하였다. eluant는 물과 메탄올을 70:30(v/v)에서 30:70(v/v)으로 변화시켜주었으며 이와 같은 gradient mode로 70분간 분석을 실시하였다(12, 13). 유속은 1.6ml/min이었고 UV 260nm에서 PDA detector의 분석결과를 기준으로 하였으며 UV 200~600nm까지의 흡광도를 standard 물질과 비교하여 검색의 정확도를 기하였다. 분석에 이용된 standard ginkgo-flavonoids물질은 quercetin-3-p-a-coumaroyl glucosyl rhamnoside(QGR)와 kaemferol-3-p-a-coumaroyl glucosyl rhamnoside(KGR)이었으며 (주)선경인더스트리로부터 기증받아 사용하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서의 모든 분석 결과는 메탄올로 추출하여 얻어진 추출물의 분석 결과를 기준으로 하였다. 이 분석 결과에 따르면 은행잎 내의 QGR은 약 0.12%(건조 질량 기준), KGR은 약 0.08%가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 또한 전체 peak area에 대한 flavonoids들의 area비로 나타낸 selectivity는 약 30~40% 정도였고 QGR과 KGR은 약



Fig. 1. Scanning electron microphotograph of raw XAD-7.

2.5~2.8%였다.

메탄올로 추출된 추출물에 distilled 물을 첨가하면 colloid 형태의 용액이 형성된다. 추출물 중에서 극성을 갖는 화합물들은 수용액에 용해되어 1차적으로 극성 물질 분리가 이루어지고 XAD-7을 첨가하여 교반을 시키면서 대상물질 flavonoids 화합물과 지용성 물질, polyphenol류 화합물과의 분리가 이루어지게 된다. 이 과정에서의 흡착에 영향을 미칠 수 있는 요소로서 흡착제의 양, 용액의 pH 그리고 물과 메탄올의 조성을 고려하여 선택적 흡착의 최적 조건을 알아 보았다.

흡착제의 양에 따른 영향

Amberlite XAD-7은 polymethacrylate로 이루어져 수용액 내에서는 swelling에 따른 구조적 변화가 없는 비교적 안정적인 macroreticular 흡착제이며 Fig. 1에 나타난 바와 같이 침상구조를 이루고 있고 그 안에 diameter 90Å의 수많은 pore들이 존재하는 것으로 알려지고 있다(14-17). 여러 연구자들이 언급한 바와 같이 XAD-7은 비극성 용액 내에서는 수소 결합을 형성하여 흡착을 하지만 수용액과 같은 극성 용액 내에서는 물이 수소 결합을 약하게 만들고 대신 hydrophobic interaction에 의해 물리

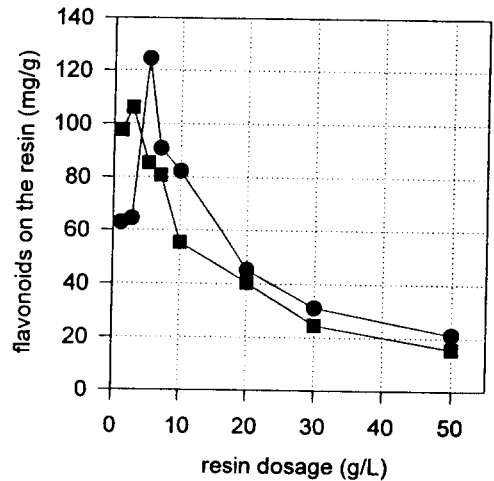


Fig. 2. Amount of flavonoids adsorbed onto the surface of XAD-7 1.0g.

—●—QGR, —■—KGR.

적 흡착을 하는 것으로 알려지고 있다(10).

흡착제의 양을 1g/L에서 50g/L까지 다양한 농도로 첨가하여 흡착되는 양을 비교해 보았더니 XAD-7 1g당 최고 120mg 정도의 QGR과 110mg 정도의 KGR을 흡착할 수 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는 유기용매 추출로 얻어지는 대부분의 flavonoids들을 흡착할 수 있다는 것을 의미한다. Fig. 3과 4에 나타난 QGR과 KGR의 흡착 등은 곡선을 살펴보면 약간 다른 경향을 나타내고 있다. KGR의 경우에는 표준 흡착 등은 곡선 중 Gibbs model과 유사하여 수용액 내의 흡착제의 양이 적은 경우 즉 제한된 흡착 표면적의 조건에서도 안정되게 흡착이 이루어지는 것으로 보인다. 하지만 KGR보다 극성인 QGR의 경우에는 7g/L 이상의 흡착제가 용액 내에 있어야만 안정된 흡착을 이루어졌다. 이것으로 보아 XAD-7으로의 흡착이 추출물 내의 성분들 간에 경쟁적 흡착(6)이어서 비극성 화합물이 우선적으로 흡착되어지는 기작을 예상할 수 있다. 다른 flavonoids 화합물들의 흡착 등은 곡선들도 상기의 경쟁적 흡착 기작을 뒷받침해 주었다.

메탄올에 의해 추출된 flavonoids들의 양을 기준으로 하여 흡착량을 비교해 보면 Fig. 5와 같다. 흡착제의 농도가 30g/L에 이르면 QGR과 KGR의 거의 모든 양이 XAD-7에 흡착되는 것으로 나타났으며 기타 flavonoids 물질들도 약 90% 가량 흡착되는 결과를 보여 주었다.

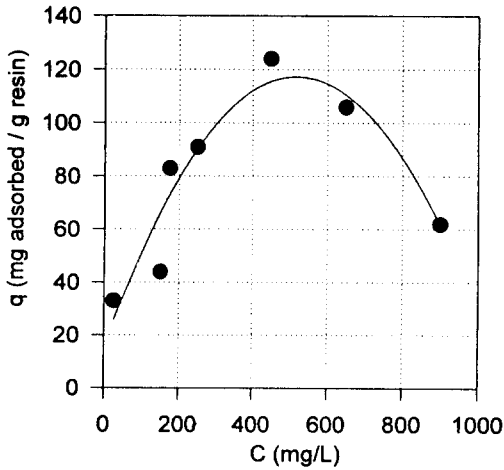


Fig. 3. Adsorption isotherms of QGR with XAD-7.

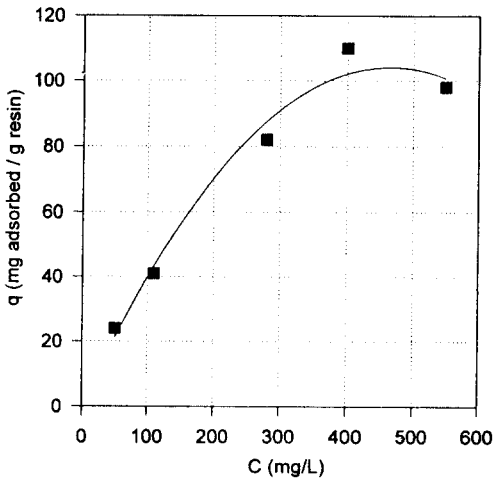


Fig. 4. Adsorption isotherms of KGR with XAD-7.

수용액의 pH 에 따른 영향

pH의 영향을 알아 보기 위해 물과 메탄올의 혼합 용액(4:1(v/v))의 pH를 3에서 12까지 변화시키면서 이에 따른 흡착량을 비교해 보았다. 그 결과 pH 값이 10을 초과하면 흡착이 거의 일어나지 않는 것을 Fig. 6에서 확인할 수 있었다. 그러나, 대부분의 alkaloids나 terpenoids인 식물의 이차 대사산물들은 pH가 높아지면 화학구조가 여러 반응에 의해 해리된다. 따라서 pH의 증가가 flavonoids 화합물들의 흡착제로의 이동에 영향을 준 것이 아니라 flavonoids 화합물들이 수용액 내에서 완전히 해리되어 흡착제로의 이동이 일어나지 않는 것으로 보여진다.

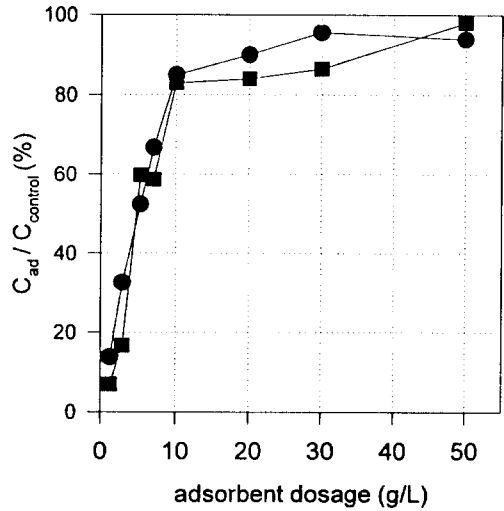


Fig. 5. Comparison of the adsorbate on the adsorbent to that in organic solvent extracts as a function of adsorbent dosage —●— QGR —■— KGR.

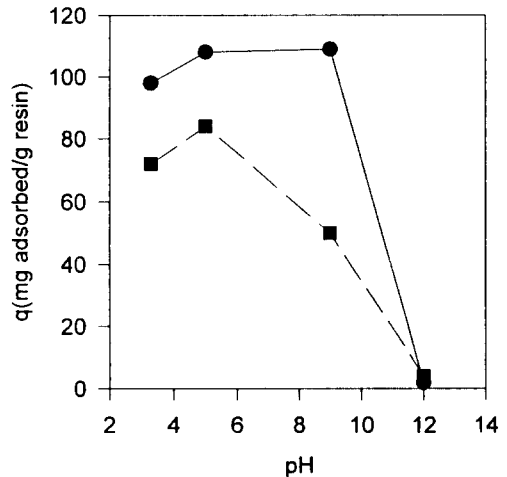


Fig. 6. Resin loading of QGR and KGR as a function of pH —●— QGR —■— KGR.

실제로 standard 물질로의 확인 실험 결과도 낮은 pH의 산성 수용액에서는 용해되지 않고 염기성 수용액에서는 완전히 해리되어 용해되었다. HPLC peak area%로 나타낸 selectivity도 pH 값이 7보다 증가하면 65% 이하로 감소되었다(Fig. 7). 이는 pH가 7 이상이 되면 이미 부분적으로 해리되어 수용액 속으로의 용해가 시작되어진 것으로 보여진다.

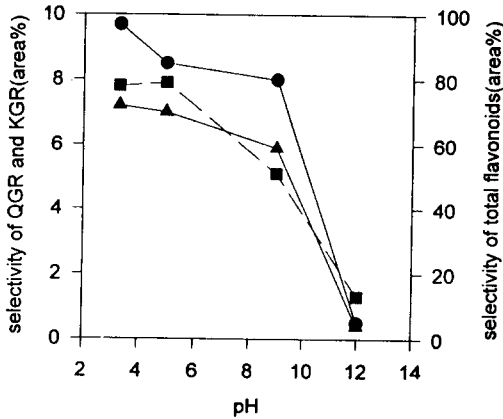


Fig. 7. Selectivities of QGR, KGR and total flavonoids with pH. Selectivities is a ratio of the peak area percentage of target material to the sum of all the HPLC peak areas —●— QGR —■— KGR —▲— total flavonoids.

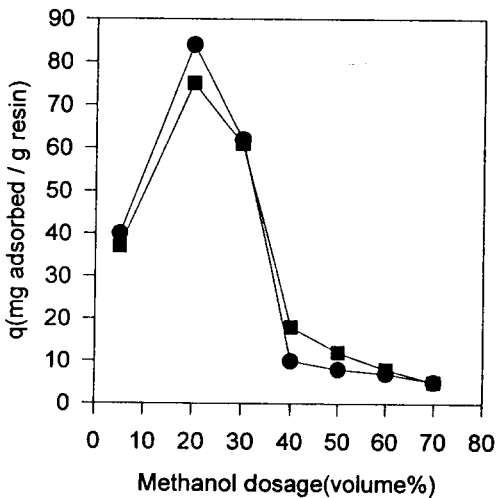


Fig. 8. Resin loading of QGR and KGR at the various composition of the medium solution —●— QGR —■— KGR.

따라서 본 실험에서는 최적 pH를 5.0으로 정하여 이후의 실험을 진행하였다.

용액의 조성에 따른 영향

메탄올 추출물에 첨가하는 물의 양은 Fig. 8에 나타난 바와 같이 선택적 흡착에 결정적인 영향을 미치

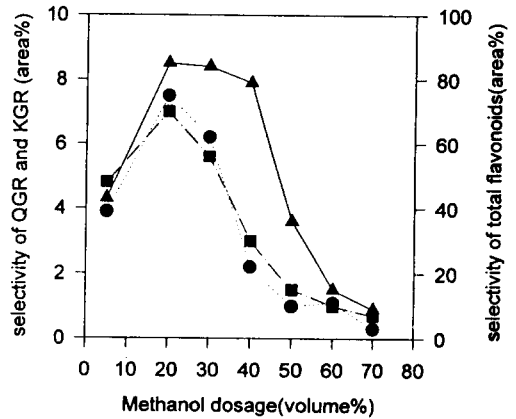


Fig. 9. Selectivities of QGR, KGR and total flavonoids with the various composition of the medium solution ...●... QGR —■— KGR —▲— total flavonoids.

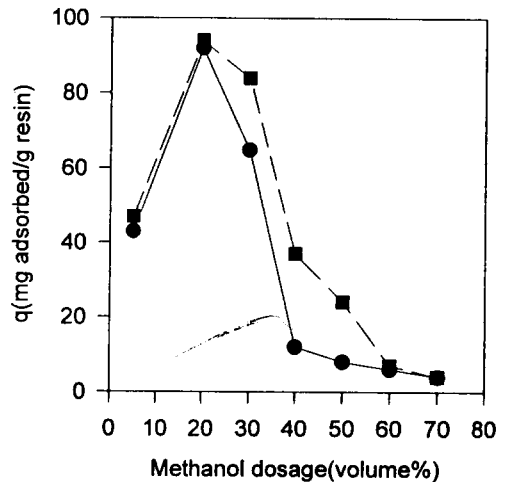


Fig. 10. Comparison of the adsorbate amount adsorbed on the adsorbent to that organic solvent extracts as a function of medium composition —●— QGR —■— KGR.

는 것으로 나타났다. 메탄올의 첨가량이 많아질수록 용액의 극성이 감소하여 상대적으로 비극성인 화합물들이 흡착되는 것으로 보여진다. 메탄올의 양이 일정 농도 이상이 되어 수용액이라고 보기 어려운 경우에는 비극성 화합물들도 용액 속으로 용해되어 졌다.

HPLC 분석 시 체류시간이 70분 가까이에 이르는 비극성물질들은 흡착제를 첨가하면 수용액 내에서

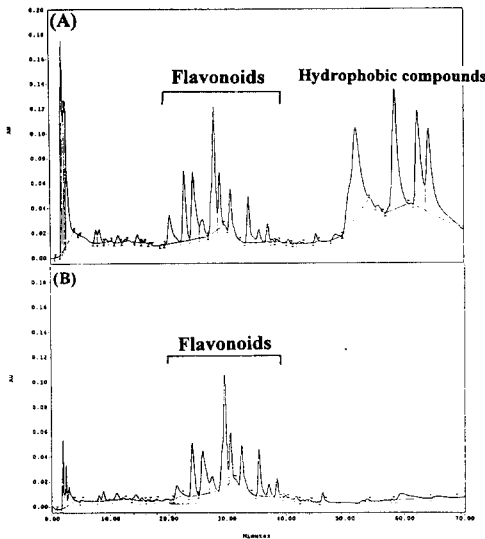


Fig. 11. HPLC analysis results of (A) solvent extracts from Ginkgo leaves and (B) extracts after selective adsorption.

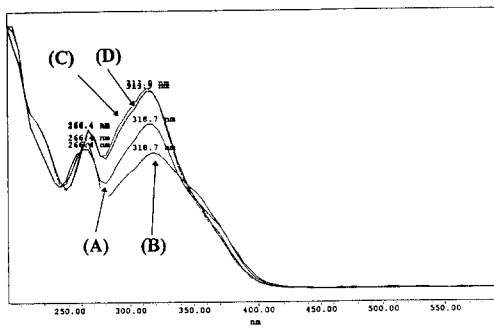


Fig. 12. Scanning UV absorbance result from 200 to 600nm of the QGR and KGR from the standards and adsorbents (A) standard QGR, (B) QGR from ginkgo leaves, (C) Standard KGR, (D) KGR from ginkgo leaves.

응집되어 석출되기 시작한다. 흡착제를 첨가하지 않은 경우에는 시간이 지나도 비극성 화합물들이 석출되어지는 현상을 전혀 볼 수 없었다. 이와 같은 현상은 흡착제로의 흡착이 이루어지면서 지용성 물질들간의 hydrophobic attraction이 더욱 강해지고 빈번

해지기 때문인 것으로 해석된다. 이러한 자연적 분리 현상에 의해 선택적 흡착에 장애가 될 수 있었던 지용성 물질들 대부분이 흡착되지 않았고 따라서 전체 flavonoids의 selectivity가 80% 이상으로 증가하게 되었다(Fig. 9). 수용액 내의 메탄올이 20%인 경우 QGR과 KGR이 모두 90% 이상의 흡착율을 보였으며 30% 이상이면 흡착율이 점점 감소하였다(Fig. 10).

이상에서 얻어진 최적 조건을 이용하여 흡착을 시행한 후 메탄올로 탈착시킨 시료의 HPLC 분석 결과를 Fig. 11과 Fig. 12에 나타내었다. 유기용매 추출 결과와 비교해 보면 체류시간 20~35분을 나타내는 flavonoids 화합물만이 흡착되는 결과를 보여주고 있다.

요 약

은행나무(*Ginkgo biloba* L.)의 잎으로부터 flavonoids 화합물들을 Amberlite XAD-7으로 흡착시키는 최적 조건에 대한 연구를 수행하였다. 흡착제의 투입량, 수용액의 pH, 수용액의 조성 등의 흡착 조건을 달리 하면서 flavonoids 화합물들의 흡착 경향을 조사한 결과 20%의 메탄올이 첨가된 pH 5.0의 수용액에 XAD-7이 15g/L의 양으로 투입된 경우 가장 선택적인 흡착이 이루어졌다. 이 경우 유기용매 추출에 비해 약 98% 이상의 flavonoids 화합물이 XAD-7에 흡착되었으며 selectivity도 약 50% 이상 증가된 85%를 나타내었다. 잎 내에 존재하는 여러 가지 화합물들 중 극성인 물질들은 수용액 내에 용해되어 분리가 이루어졌고 flavonoids 화합물에 비해 비극성인 지용성 물질들과 polyphenol류 등은 흡착제가 투입되면 hydrophobic attraction에 의해 aggregation을 이루면서 석출이 되었다. 이로 인해 flavonoids 화합물들만이 흡착제로 이동하게 되었다. 이와 같은 흡착 공정은 기존의 유기용매 추출법에 비해 공정에 소요되는 경비와 시간을 크게 감소시켜 새로운 분리 방법의 지표를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 교육부 학술연구 조성 지원비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. W. K. Lee, Y. W. Ryu, S. Y. Byun, and H. G. Chung(1993), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 55.
2. G.-S. Kim, Y.-W. Paek, K.-M. Ko, S.-J. Hwang, Y.-J. Kim, S.-J. Chung, and B. Hwang(1996), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1, 1.
3. M. H. Jeon, S. H. Sung, H. Huh, and Y. C. Kim(1995), *Plant Cell Rep.*, **14**, 501.
4. D. J. Carrier, N. Chauret, M. Mancini, P. Coulombe, R. Neufeld, M. Weber, and J. Archabault(1991), *Plant Cell Rep.*, **10**, 256.
5. J. Stockigt, J. Treimer, and M. H. Zenk (1976), *FEBS Lett.*, **70**, 267.
6. G. F. Payne and M. L. Schuler(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 922.
7. G. F. Payne, N. N. Payne, Yuko Ninomiya, and M. L. Schuler(1989), *Sep. Sci. Technol.*, **24**, 5 & 6, 457.
8. R. A. Garcia-Delgado, L. M. Cotoruelo-Minguez, and J. J. Rodriguez(1992), *Sep. Sci. Technol.*, **27**, 7, 975.
9. R. A. Garcia-Delgado, L. M. Cotoruelo-Minguez, and J. J. Rodriguez(1992), *Sep. Sci. Technol.*, **27**, 8 & 9, 1065.
10. G. F. Payne and Yuko Ninoyama(1990), *Sep. Sci. Technol.*, **25**, 11 & 12, 1117.
11. J.-W. Choi, D.-Il Yoo, W.-H. Lee, and Henrik Pedersen(1996), *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 1, 47.
12. Annelise Lobstein-Guth, Francoise Braincon-Scheid, and Robert Anton(1983), *J. Chromatogra.*, **267**, 431.
13. Piergiorgio Pietta, Pierluigi Mauri, Annamaria Bruno, and Angelo Rava(1991), *J. Chromatogr.*, **553**, 223.
14. Federico Mijangos and Ana Navarro(1995), *J. Chem. Eng. Data.*, **40**, 875.
15. Nirmalya Maity, G. F. Payne, and J. L. Chipchosky(1991), *Ind. Eng. Chem. Res.*, **30**, 2456.
16. A. A. Garcia and C. J. King(1989), *Ind. Eng. Chem. Res.*, **28**, 204.
17. John Paleos(1969), *J. Colloid Interface Sci.*, **31**, 7.
18. J. Hearn, P. L. Smelt, and M. C. Wilkinson (1989), *J. Colloid Interface Sci.*, **133**, 284.
19. W. G. Rixey and C. J. King(1989), *J. Colloid Interface Sci.*, **131**, 2, 320.