

식용식물자원으로부터 활성물질의 탐색 -XI. GC를 이용한 상추(*Lactuca sativa* L.)의 품종별 Phytol 함량 분석

송명종 · 이진희 · 방면호 · 김지영 · 정대균 · 배동근¹ · 김인호² · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹안양대학교 식품영양학과, ²한국식품개발연구원

(2004년 9월 24일 접수; 2004년 11월 23일 수리)

Key words: 상추, phytol, GC

서 론

Acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase(ACAT, EC2.3.1.26)는 동맥에서 cholesterol ester 축적¹⁾과 장으로부터 cholesterol 흡수 및 간에서 lipoprotein 형성²⁾에 중요한 역할을 하는 효소이다. 따라서, 약리기전상 동맥경화증과 고지혈증 치료제로 약효의 우수성과 안전성이 기대되는 ACAT inhibitor에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

상추는 식용으로 뿐만 아니라, 한방에서는 와거(경엽)와 와거자(종자)라 하여 약용으로도 이용해 왔으며, 음종, 하혈에 대하여 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다.³⁾ 저자 등은 상추(*Lactuca sativa* L.)로부터 ACAT 억제활성이 높은 phytol을 분리하였다.⁴⁾ 우리나라에서 고기를 먹을 때 함께 먹게 되는 상추가 ACAT 활성을 억제하는 phytol을 함유하고 있다는 것은 매우 의미가 있다고 할 수 있다. 따라서, 다양한 품종의 상추에 대하여, 각 품종별 phytol의 함량을 알아봄으로써, phytol 함량이 높은 품종을 선별 섭취하여 동맥경화나 고지혈증의 예방효과를 기대할 수 있을 것이다.

본 연구에서 저자 등은 gas chromatography(GC)를 이용하여 상추 중에 함유되어 있는 phytol의 정량분석법을 확립하였고, 이를 적용하여 각 5품종 상추의 phytol 함량을 분석함으로써, phytol 함량이 많은 품종을 선별하고자 하였다.

적치마 만추대 품종인 적토마가 생체 100g당 99.7mg의 함량으로 가장 높은 값을 보였으나, 상추의 색과 모양, 또는 추대시기에 따른 품종 간의 일정한 상관관계는 보이지 않았다.

재료 및 방법

기기 및 시약. Phytol의 TMS화에는 *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamide 95%(ACROSS, USA)를 사용하였다. 분석용 시료액의 여과에는 Supelclean LC-Si SPE Tubes 3 ml(SUPELCO; Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다. GC는 GC-14B(Shimadzu, Japan)로, GC-MS는 HP 6890(Hewlett-Packard, USA)이 부착된 mass spectrometer

(HP 5973, Hewlett-Packard Alto, CA, USA)로 측정하였다.

실험재료. 본 실험에서 사용한 상추(*Lactuca sativa* L.)은 2003년 8월 경기도 평택시의 세미니스 코리아 평택 농장에서 재배한 것으로, 채집 당시 판매가 가능할 정도의 성숙단계였으며, 초장(뿌리 포함)은 약 20-30 cm 정도였다. 색과 주름의 정도에 따라, 청치마(청치마, blue smooth, BS), 적치마(여름적치마, red smooth-1, RS-1), 적토마, red smooth-2, RS-2, 만추대, 적측면(삼선적측면, red rough-1, RR-1), (산불꽃측면, red rough-2, RR-2, 만추대)과 같이 3가지로 분류된 5종의 품종을 실험에 사용하였다.

Phytol 및 Phytol 함유분획물의 제조. Phytol 은 저자 등의 방법⁴⁾으로 분리하여 사용하였다. 위에서 채집한 5개 품종의 생체시료 각 100 g을 80% MeOH 용액(500 ml×3)로 24시간, 3번 추출하였다. 얻어진 각 추출물을 감압농축하고, 얻어진 농축액을 EtOAc(100 ml×2)와 H₂O(100 ml)로 분배 추출하였다. 이중 phytol을 함유하는 EtOAc 분획을 감압 농축하였다.

GC 분석용 시료의 제조. 각 분획으로부터 각각 25 mg씩을 취하여, *n*-hexane-EtOAc = 3 : 1(6 ml)의 용매로 녹인 후 SPE(Supelclean LC-Si SPE 3 ml tube)로 여과하고 농축하였다. 각 농축액에 {*N,O*-Bis(trimethylsilyl) acetamide, 95%} 100 µl를 가한 후, 60°C의 oven에서 50분 동안 반응시켰다. 여기에 CHCl₃, 100 µl(HPLC grade)를 첨가하여 분석용 시료로 사용하였다.

GC를 이용한 phytol 함량 측정. 각 시료액 3 µl씩을 취하여 GC(GC-14B, Shimadzu, Japan)로 분석하였다. 검출기는 flame ionization detector(FID)를 사용하였고, column은 DB-5(30 m×0.32 mm ID×0.25 µm, J&W, Folsom, CA, USA)을 사용하였다. 오븐 온도는 200°C에서 10분간 유지한 후에, 10°C/min씩 상승시켜 최종온도 320°C에서 5분간 유지하였으며, injector와 detector의 온도는 모두 340°C로 유지하였다. 위의 조건으로 GC를 측정했을 때, phytol의 TMS 유도체의 retention time은 7분 42초였다. Phytol의 동정을 위하여 GC/MS로 분석하였는데, column(HP-5, 30 m×0.53 mm ID×1.5 µm, USA) 이외의 모든 분석 조건은 GC 조건과 동일하였다. 이온화는 electron ionization(EI)법을 사용하였으며, 70 eV에서 수행하였다. GC에서 분리된 각 peak 성분은 GC/MS의 library(Wiley/NBS)를 사용하여 최종적으로 확인하였다. 각 실험은 3반복으로 수행하였다.

*연락처

Phone: 82-31-201-2661, Fax: 82-31-201-2157

E-mail: nibaek@khu.ac.kr

Table 1. Phytol content in each variety of *Lactuca sativa*

Sample*	BS	RS-1	RS-2	RR-1	RR-2
EtOAc layer** (mg)	369 ± 27	255 ± 31	236 ± 18	531 ± 44	202 ± 21
Phytol content*** mg/100 g sample	46.2 ± 2.1	19.3 ± 0.9	99.7 ± 3.1	78.9 ± 3.2	10.4 ± 0.7
mg/100 ± mg EtOAc extracts	12.5 ± 0.1	7.6 ± 0.1	42.2 ± 0.2	14.9 ± 0.1	5.1 ± 0.1

The condition of phytol analysis is as the followings; GC (GC-14B, Shimadzu, Japan); detector: FID; column: DB-5 (30 m×0.32 mm ID×0.25 μm, J&W, Folsom, CA, USA); initial temp.: 200°C (10 min); increasing temp.: 10°C/min; final temp.: 320°C (5 min); r.t. of phytol-TMS: 7' 42".

*BS: blue smooth (Cheongchima); RS-1: red smooth-1 (Yoreumjeokchima); RS-2: red smooth-2 (Jeoktoma); RR-1: red rough-1 (Samseonjeogchukmyon); RR-2: red rough-2 (Sinbulkotchukmyon).

**The experiments were carried out in duplicate. The data indicates mean ± S.D.

***The experiments were carried out in triplicate. The data indicates mean ± S.D.

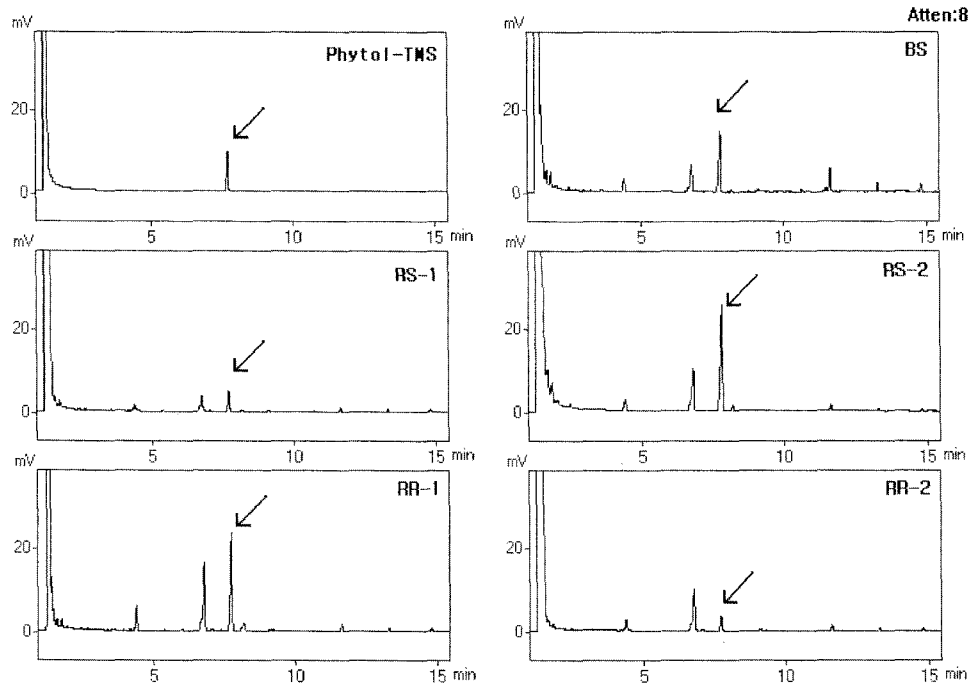


Fig. 1. GC chromatogram of each variety of *Lactuca sativa*. GC (GC-14B, Shimadzu, Japan); detector: FID; column: DB-5 (30 m×0.32 mm ID×0.25 μm, J&W, Folsom, CA, USA); initial temp.: 200°C (10 min); increasing temp.: 10°C/min; final temp.: 320°C (5 min); r.t. of phytol-TMS: 7' 42". BS: blue smooth (Cheongchima); RS-1: red smooth-1 (Yoreumjeokchima); RS-2: red smooth-2 (Jeoktoma); RR-1: red rough-1 (Samseonjeokchukmyon); RR-2: red rough-2 (Sinbulkotchukmyon).

결과 및 고찰

Phytol의 GC 분석시의 검량선 작성. Phytol을 TMS화 시킨 후, 위에서 기술한 조건으로 GC 분석했을 때, 7분 42초에서 peak가 나타났다. Phytol의 양(x)과 GC에서의 peak 면적(y)과의 사이에서의 회귀식은 $y = 23,055x + 33,502$ 로 나타났고 회귀계수 (r^2)은 0.9987로 높게 나타났다.

GC를 이용한 상추 품종별 phytol 함량 분석. Phytol은 탄소 20개로 이루어진 사슬형 diterpene 화합물로 수산기 1개와 이중 결합 1개를 가지고 있다. 따라서 상추의 MeOH 추출물에 대하여 물과 EtOAc로 분배추출하였을 때 100% EtOAc 층으로 이행하였다. Phytol 함유 분획인 EtOAc 분획의 양을 품종에 따라 비교한 결과 Table 1에서 처럼 최저 202 mg에서 최고 531 mg 까지 매우 다르게 나타났다.

한편 얻어진 EtOAc 분획을 TLC로 검토한 결과 phytol보다 극성이 높은 화합물들이 다량 함유되어 있었다. 극성 화합물들

을 제거하기 위하여 순상 흡착제인 silica gel로 이루어진 여과 tube(SPE, Supelclean LC-Si SPE 3 ml/ tube)로 여과하였다. *n*-Hexane과 EtOAc 혼합용매의 비율을 달리해 가며(*n*-hexane-EtOAc=1:0, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 0:1) 여과액을 검토한 결과 3:1 혼합용매를 silica gel의 양(3 ml)의 2배량인 6 ml를 사용하여 여과했을 때, phytol이 전량 회수되며 극성 혼합물의 대부분이 제거되는 것으로 나타났다. 시료에 따라 다소 다르게 나타났으나, EtOAc 분획물의 75-84%가 제거되었다(Data 미제시). 이렇게 얻어진 phytol 함유분획을 GC로 분석했을 때, phytol이 주위의 다른 peak들과 전혀 겹치지 않는 것으로 나타나(Fig. 1), 위에서 확립한 전처리 과정은 매우 유용한 것으로 판단되었다. GC를 이용하여 분석한 phytol의 함량도 품종에 따라 차이가 매우 커서 Table 1과 Fig. 1에서처럼 생체 100 g중에 최저 10.4±0.7 mg에서 최고 99.7±3.1 mg까지로 나타났다.

상추의 색에 따른 phytol 함량을 비교해 보면 녹색을 나타내

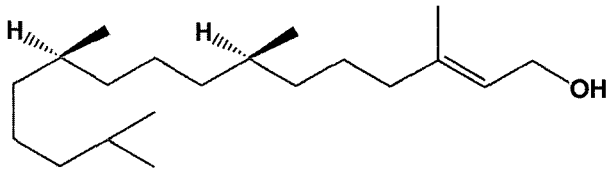


Fig. 2. The chemical structure of phytol isolated from the leaves of *Lactuca sativa* L.

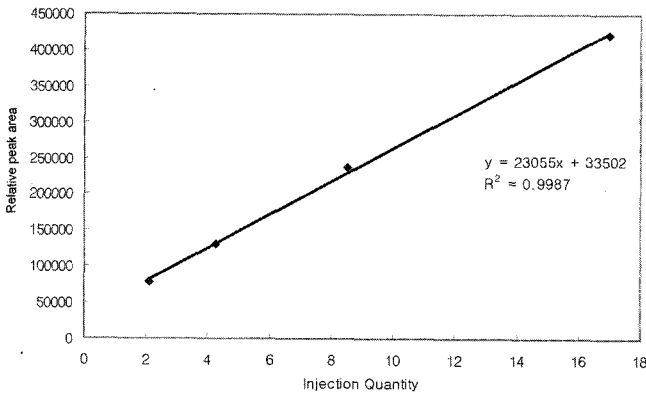


Fig. 3. Regression curve in the GC analysis of phytol.

는 청치마(BS)가 생체 100 g당 46.2±2.1 mg 함유하고 있는데 비해, 자주색을 나타내는 다른 4종의 상추에서는 신불꽃측면(RR-2)에서 최저값인 10.4±0.7 mg을, 적토마(RS-2)에서 최고값인 99.7±3.1 mg을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 상추의 색에 따른 phytol 함량에 있어서의 일정한 경향은 보이지 않았다.

상추의 주름여부에 따른 phytol 의 함량에 있어서도, 주름이 없는 품종인 청치마(BS), 여름적치마(RS-1), 적토마(RS-2)와 주름이 있는 품종인 삼선적측면(RR-1)과 신불꽃측면(RR-2)을 비교해 보아도 일정한 경향을 발견할 수 없었다. 추대시기에 따른 phytol 함량의 차이를 비교하였다. 적치마와 적측면 품종에 대하여 각각 추대시기가 이른 품종과 추대시기가 늦은 품종의 함량을 비교해 보면 적치마의 경우에는 추대가 늦은 품종인 적토마(RS-2)가 추대가 이른 품종인 여름적치마(RS-1)에 비해 5 배 이상의 높은 함량을 나타냈다. 하지만 적측면의 경우에는 이와는 반대로 추대가 빠른 품종인 삼선적측면(RR-1)이 만추대 품종인 신불꽃측면(RR-2)보다 7배 이상의 높은 함량을 갖는 것

으로 나타났다. 따라서, 추대시기에 따라 phytol 함량을 구분하기는 어려운 것으로 나타났다.

상기의 결과에서 알 수 있듯이 일반적으로 기호도가 높다고 여겨지는 적측면의 상추가 phytol을 많이 함유하고 있지는 않았다. 또한, 잎의 색과 주름모양에 따른 차이가 분명하지도 않았다. 적치마의 만추대 품종인 적토마(RS-2)가 99.7 mg/100 g으로 가장 높은 phytol 함량을 보였다. 따라서, 상추에 포함된 phytol을 보다 많이 얻기 위한 품종의 선발에 있어서, 잎의 색이나 주름모양에 따른 일정한 기준을 제시할 수는 없었다. Phytol 함량이 높은 상추를 선발하기 위해서는, 각 품종에 대하여 직접적으로 GC를 이용하여 phytol을 분석하는 것이 현재로서는 가장 적절한 방법이라고 할 수 있다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업 및 농림부 농림 기술개발연구사업(202056-03-1-CG000)에서 지원하는 연구비로 수행되었기에 감사드립니다. 또한 본 연구를 위하여 기꺼이 5종 품종의 상추 시료를 제공해 주신 세미니스 코리아 평택 농장의 이형주 박사님에게도 충심으로 감사 드립니다.

참고문헌

1. Bell, F. P. (1986) In Pharmacological control of Hyperlipidemia, Arterial cholesterol esterification by acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, its possible significance in atherogenesis and its inhibition by drugs. Science Publishers, pp. 409-422.
2. Heider, J. G. (1986) In Pharmacological control of Hyperlipidemia, Agent which inhibit cholesterol esterification in the intestine and their potential value in the treatment of hypercholesterolemia. Science Publishers, pp. 423-438.
3. Jung, E. B. and Shin, M. K. (1990) In Hyangyak-Daesajeon, Younglimsa, 7th edition, Seoul, Korea, p. 1060.
4. Jang, T. O., Bang, M. H., Song, M. C., Hong, Y. H., Kim, J. Y., Chung, D. K., Pai, T. K., Kwon, B. M., Kim, Y. K., Lee, H. S., Kim, I. H. and Baek, N.-I. (2003) Deveolpment of biologically active compounds from edible plant sources-V. Phytol, ACAT (Acyl-CoA;Cholesterol Acyltransferase) inhibitory diterpenoid from the leaves of *Lactuca sativa* L. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 267-270.

Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources-XI. Analysis of Phytol Content in Several Varieties of *Lactuca sativa* L. by gas chromatography

Myoung-Chong Song, Jin-Hee Lee, Myun-Ho Bang, Ji-Young Kim, Dae-Kyun Chung, Tong-Kun Pai¹, In-Ho Kim² and Nam-In Baek* (*Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, KyungHee University, Suwon, 449-701; ¹Department of Food & Nutrition, Anyang University, Anyang, 430-714; ²Korea Food Institute, Sungnam, 463-746, Korea*)

Abstract: An easy, sensitive and rapid method for the analysis of phytol, a strong ACAT (Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase) inhibitory diterpenoid, was established. The pre-treatment of sample for GC analysis of phytol includes *aq.* MeOH extraction, partition of the extracts between EtOAc and water, and filtration of organic phase through Supelclean LC-Si SPE tube. The GC analysis of phytol for a variety of *Lactuca sativa* was carried out on DB-5 capillary column with flame ionization detector (FID). The consistency in phytol contents according to each variety was not shown. Especially, Jeoktoma, as RS-2 type, showed the highest phytol content.

Key words: *Lactuca sativa* L., phytol, GC

*Corresponding author