

재배 조건에 따른 바위솔의 Flavonol Glycoside 함량 변화

장상훈* · 강동민* · 강진호** · 박종철*** · 이상경* · 신성철*†

*경상대학교 자연과학대학, **경상대학교 생명과학연구원, ***순천대학교 자연과학대학

Changes in Flavonol Glycoside Contents of *Orostachys Japonicus* a. Berger according to Cultivation Conditions

Sang Hun Jang*, Dong Min Kang*, Jin Ho Kang**, Jong Cheol Park***, Sang Gyeong Lee*, and Sung Chul Shin*†

*Dept. of Chemistry & Research Institute of Life Sci., Gyeongsang Natl. Univ., Chinju, 660-701, Korea.

**College of Agriculture & Research Institute of Life Sci., Gyeongsang Natl. Univ., Chinju, 660-701, Korea.

***Dept. of Oriental Medicine Resorces, Suncheon Natl. Univ., Suncheon, 660-701, Korea.

ABSTRACT : The contents of flavonol glycosides, kaempferol-3-O-β-D-glucoside (1), kaempferol-3-O-β-D-galactoside (2), kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside (3), quercetin-3-O-β-D-glucoside (4) and quercetin-3-O-α-L-rhamnoside (5) in the houseleeks controlled by night-break, day-length control, and temperature during overwintering were determined to be compared with those in wild one. The contents of the flavonol glycosides 1-5 in the houseleeks were decreased roughly with warming during overwintering, and increased with longer light duration under the day-length control experiments. While warming functioned negatively on the production of the flavonol glycosides in the houseleek, longer light irradiation did positively during overwintering.

Key words : *Orostachys japonicus*, polyphenol, phenolic acid, flavonol, folk medicine, anti-cancer activity

서 언

식물의 이차 대사산물인 폴리페놀(polyphenol)은 한 개 이상의 하이드록시기가 치환되어 있는 방향족 고리 화합물들이다. 폴리페놀에는 페놀산(phenolic acid)과 같은 간단한 분자로부터 탄닌과 같은 고분자화합물들이 포함된다. 이들은 주로 당잔기의 하이드록시기에 연결되어 있는 콘주게이션의 형태로 존재한다. 비콘주게이트형 폴리페놀도 식물에서 발견된다(Harborne *et al.*, 2000). 이들 중 특히 플라본 계열의 화합물들은 항산화작용(Frankel *et al.*, 1993; Rice-Evans *et al.*, 1996), 항암작용(Harborne *et al.*, 2000), 혈관 확장제로서의 활성(Cheng *et al.*, 1993) 및 혈전용해 작용(Gryglewski *et al.*, 1987)을 보여준다. 면역학적 연구에 의하면 플라본 계열 화합물의 섭취량이 증가하면 심혈관질환(Hertog *et al.*, 1993, 1995, 1997)과 암 발병률이 감소된다(Hertog *et al.*, 1994, 1995).

한편 바위솔(*Orostachys japonicus* a. Berger)은 암 치료를 위해 한국 사람들이 오랫동안 이용해온 식물 중의 하나이다. 최근 암 환자의 증가와 함께 바위솔의 소비도 증가하고 있다.

일부 독농가에서는 비닐하우스를 이용하여 바위솔을 재배하고 있으며 그들의 중요한 소득원이 되고 있다. 그러나 농가에서 재배된 바위솔과 야생 바위솔의 출하기간이 중복되기 때문에 안정적인 가격을 유지하지 못하고 단가가 급락하게 된다. 이러한 가격 폭락을 막기 위하여는 재배 바위솔의 출하기간을 임의로 조절할 필요가 있다(Kang *et al.*, 1995, 1996; Shin *et al.*, 1994).

최근 Kang 등은 일장조절, night-break 처리 및 월동온도 조절을 통해서 일임성 식물인 바위솔의 개화를 억제하여 출하기간을 조절하는 시험에 성공하였다(Kang *et al.*, 1995, 1996, 1997). 그들의 연구 결과를 이용하면 출하시기를 조절할 수 있으므로 홍수출하에서 오는 가격의 폭락을 막아 경제적 이득을 극대화할 수 있다. 그러나 개화시기가 인위적으로 조절된 바위솔이 가치를 가지려면 유효 약리성분의 함량이 야생 바위솔과 같거나 비슷해야 할 것이다. Hertog 등의 연구에 의하면(Hertog *et al.*, 1994, 1995) 유효 약리성분 중 플라본 계열 화합물들이 바위 솔의 항암작용과 적어도 부분적인 관련이 있을 수 있다. 이와 관련하여 출하기간을 변동시키고자 시도되는 일장조절, night-break 및 월동온도 조절에 따른 폴리

†Corresponding author: (Phone) +82-55-751-6022 (E-mail) scshin@nongae.gsnu.ac.kr
Received August 22, 2005 / Accepted December 30, 2005

폐놀계의 중요한 부류인 flavonol glycosides의 함량변화를 추적하고자 본 연구가 실시되었다.

재료 및 방법

1. 시료 재배

자연산 시료는 2004년 9월 17일 진주 중앙시장에서 구입하였다. 2004년 5월 31일 경남 사천시 사천읍 두량리 바위솔 농장에서 분양 받은 유묘를 경상대학교 부속농장의 비닐하우스의 pot에 이식하였다. 각각의 모종은 흙과 비료 (2:1)의 비로 혼합된 흙으로 채워진 직경 18 cm의 플라스틱 용기에 정식되었다. 시험 중에는 2~3일 간격으로 충분히 물을 공급하였으며, 시험기간 중 병해충의 방제를 위한 농약은 살포하지 않았다. 시험기간 중 온실의 온도를 실외와 비슷하게 유지하고 빗물이 직접 pot에 떨어지지 않도록 하기 위해 천장만 비닐을 설치하고 측면은 완전히 개방하였다.

2. 일장조절 시험

바위솔을 3개 시료 군으로 나눈 다음 암막을 이용하여 각 시료에 10/14, 13/11 및 16/8 시간 (낮/밤)의 일장조절을 하였다. 광도 $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 백열등을 광원으로 사용하였다. 낮 길이 10, 13 및 16 시간은 각각 오전 8시부터 오후 6시, 오전 6시 30분부터 오후 7시 30분까지 와 오전 5시부터 오후 9시까지였다. 바위솔 시료는 개화 직후에 채집되었다. 즉, 낮/밤 시간이 10/14, 13/11 및 16/8의 시료들은 각각 9월 22일, 10월 22일 및 11월 4일에 채집되었다.

3. Night-break 시험

바위솔을 세 시료 군으로 나눈 다음 각 시료에 6월 30일, 7월 28일 및 8월 25일에 night-break 실험을 실시하였다. 백열등을 광원으로 사용하여 오후 11시부터 오전 1시까지 $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 빛을 두 시간 동안 각 시료에 조사하였다. 개화 직후에 바위솔 시료를 채집하였다. 즉, 8월 25일의 시료는 10월 6일에, 6월 30일과 7월 28일의 시료는 11월 4일에 채집하였다.

4. 월동가온 시험

월동가온 시험은 10월 15일에 시작하였다. 월동가온 시험에서 10°C와 20°C의 조건에서 재배한 바위솔은 11월 17일 채집하였으며 무가온은 11월 4일 채집하였다.

5. 약품

Flavonol-3-O-D-lyxoside (8)와 용매들은 Sigma-Aldrich Korea (Yongin, Korea)에서 구입하였으며 모든 용매는 HPLC 급을 사용하였다. 공동저자 중의 한 사람인 순천대학교 박종철 교수의 연구실에서 바위솔로부터 분리하여 저장하고 있는

Flavonol glycoside들, kaempferol-3-O-β-D-glucoside (1) 및 kaempferol-3-O-β-D-galactoside (2), kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside (3), quercetin-3-O-β-D-glucoside (4) 및 quercetin-3-O-α-L-rhamnoside (5)를 표준시료로 사용하였다.

6. 추출

Price 등의 방법을 수정하여 추출하였다 (Price *et al.*, 1998). 즉, 냉동 건조된 바위솔 2.0 g을 70% 메탄올 (100 ml)에 넣고 균질화기 (AM-7 homogenizer, Nihonseiki Kaisha Ltd, Japan)를 사용하여 25°C에서 5,000 rpm의 2분씩 3회 균질화하였다. 균질화된 시료를 여과지 (Whatman No. 1)을 사용하여 감압하에서 여과하였다. 여과액을 감압하의 30°C에서 약 15 ml로 농축한 다음 메탄올을 가하여 부피를 20 ml로 조절하였다.

7. HPLC 분석

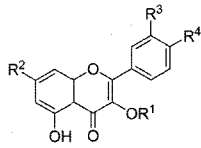
Glycoside 성분들의 함량은 ChemStation software, model G1322 A 기체제거기, G1312A 두 상 가울기 펌프, a model G1329/1330A의 열 자동시료 채취기, a model G1316 컬럼 오븐, 다이오드 배열 흡광 검출기가 장착된 Agilent HPLC, series 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany)를 사용하여 분석되었다. 사용된 컬럼은 4.0 20 mm i.d. C18 ODS 보호 컬럼이 장착된 T150 3.0 i.d. 4-m C18 Hydro-Synergi (Phenomenex, Torrance, CA)이었으며 컬럼 온도는 25°C이었다. 1% 포름산을 포함한 20% 아세토나이트릴 수용액을 이동상으로 사용하였다. 검출파장은 365 nm, 흐름속도는 1 ml/min.이었으며 분석시간은 30분이었다.

8. 정량분석

바위솔에 포함된 flavonol glycoside 성분들은 365 nm의 검출파장에서 얻은 HPLC 크로마토그램과 표준물질들을 첨가함으로써 크로마토그래피상의 피이크의 변화를 관찰하는 공크로마토그래피 (cochromatography) 기법으로 동정하였다. 화합물들의 함량은 표준 검량곡선을 토대로 HPLC 크로마토그램 상에 기록된 피이크 면적의 변화로부터 계산되었다. 모든 실험은 신뢰도를 확보하기 위해 3번 반복한 다음 얻어진 데이터들의 평균값을 구하였다. Flavonol glycoside 성분들의 함량은 각각의 표준물질 1-5의 HPLC 피이크 면적과 바위솔 추출물의 HPLC 피이크 면적을 비교함으로써 추적하였다.

결과 및 고찰

바위솔에서 분리된 flavonol glycoside 들에는 kaempferol-3-O-β-D-glucoside (1), kaempferol-3-O-β-D-galactoside (2), kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside (3), quercetin-3-O-β-D-glucoside



- 1: R¹ = β-D-glucosyl, R² = OH, R³ = H, R⁴ = OH (kaempferol-3-O-β-D-glucoside)
- 2: R¹ = β-D-galactosyl, R² = OH, R³ = H, R⁴ = OH (kaempferol-3-O-β-D-galactoside)
- 3: R¹ = α-L-rhamnosyl, R² = OH, R³ = H, R⁴ = OH (kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside)
- 4: R¹ = β-D-glucosyl, R² = R³ = R⁴ = OH (quercetin-3-O-β-D-glucoside)
- 5: R¹ = α-L-rhamnosyl, R² = R³ = R⁴ = OH (quercetin-3-O-α-L-rhamnoside)
- 6: R¹ = α-L-rhamnosyl, R² = α-D-glucosyloxy, R³ = H, R⁴ = OH (3-O-α-L-rhamnosyl-7-O-α-D-glucosylkaempferol)
- 7: R¹ = H, R² = α-D-glucosyl, R³ = R⁴ = OH (quercetin-7-O-β-D-glucoside)
- 8: R¹ = α-D-lyxosyl, R² = R³ = R⁴ = H (flavonol-3-O-α-D-lyxoside)

Fig. 1. Structures of flavonol glycosides in houseleek.

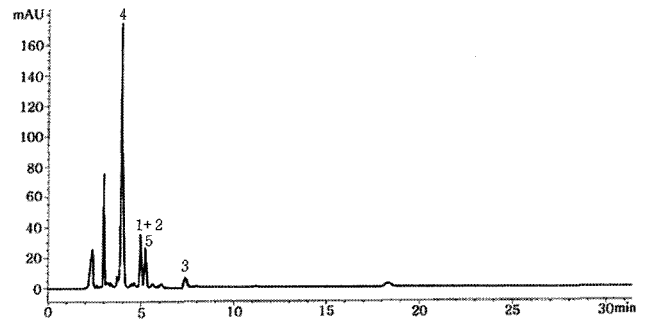


Fig. 3. HPLC Chromatogram of wild houseleek extract (detecting wavelength: 365 nm).

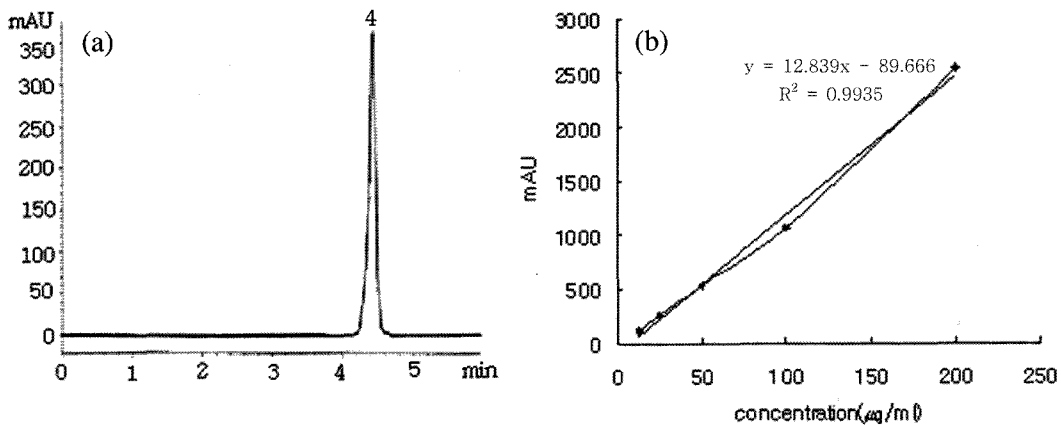


Fig. 2. HPLC chromatogram (2a) and Standard curve (2a) of quercetin-3-O-β-D-glucoside (4).

(4), quercetin-3-O-α-L-rhamnoside (5) 3-O-α-L-rhamnosyl-7-O-β-D-glucosylkaempferol (6) 및 quercetin-7-O-β-D-glucoside (7), flavonol-3-O-D-lyxoside (8)의 8종이 있다 (Fig. 1).

본 연구에서는 바위솔에 함유되어 있는 것으로 알려져 있는 8종의 플라보놀 배당체 화합물들 중 표준물질을 확보할 수 있었던 1-5의 5종의 함량을 추적하였다. 먼저 추출 방법, HPLC 이동상 및 컬럼을 변화시키면서 최적화된 분석조건을 조사하였다. 최적화된 추출조건은 25°C에서 균질화기의 회전속도 5,000 rpm에서 2분씩 3회 추출하는 것이었다. HPLC 조건은 acetonitrile/1% formic acid in water (20 : 80) 이동상에서 ZORBOX SB-C18 4.6×250 mm의 컬럼을 사용하는 것이 가장 효과적이었다. Flavonol glycoside 화합물들의 신뢰도 높은 함량 데이터들을 얻기 위해 1-5의 표준 검량곡선을 작성하고 이로부터 R² 값을 계산하였다. R² 값을 모두 0.9935 이상의 이상적인 범위 내에 포함시킴으로써 측정의 신뢰도를 확보하였다. 표준물질의 대표적인 예로써 4의 HPLC 크로마토그램과 표준검량곡선을 도시하면 Fig. 2a 및 2b와 같다. 표준물질 1-5와 시료를 공크로마토그래피함으로써 피이크를 동정하고 표준물질의 HPLC 피이크 면적을 기준으로 함량을 조사하였다.

Flavonol aglycon의 일반적인 π-공존제이션 흡수 파장 대인 365 를 검출파장으로 사용하였다. 얻어진 데이터를 100 g당 mg의 단위로 종합하면 Table 1과 같다. 대표적인 예로써 자연산 바위솔에 포함된 플라보놀들의 HPLC 크로마토그램을 도시하면 Fig. 3과 같다. Flavonol-3-O-D-lyxoside (8)은 바위솔에 포함되어 있는 것으로 알려져 있으나 Aldrich 사에서 구입한 표준물질과의 비교 시험으로부터 바위솔에는 8이 포함되어 있지 않은 것으로 밝혀졌다. 자연산 바위솔과 재배조건을 달리 한 시료들을 대상으로 1-5의 함량변화를 비교하면 다음과 같다. 1-5의 총량은 낮/밤 시간이 13/11과 16/8을 제외한 모든 조건에서 얻어진 시료에서 낮은 분포도를 보여준다. Night break 시험에서는 1-5의 함량은 자연산보다 낮은 함량을 보여준다. 일장조절 시험에서는 1-3은 자연산보다 조금 낮은 함량분포를 보여준다. 4는 낮/밤 시간이 13/11과 16/8에서 자연산 바위솔과 비슷한 함량 분포를 보여주고 5는 높은 분포를 보여준다. 월동가는 시험에서는 10°C와 20°C의 조건에서 월동 가운한 바위솔에서는 flavonol glycoside 3이 검출되지 않았다. 10°C와 20°C의 조건에서 월동 가운한 바위솔에서 4의 함량이 자연산 보다 특히 낮았다. 1-5 모든 성분의 함량은 가

Table 1. Distributions of flavonol glycoside 1-3, 5 and 6 in various houseleek depending on cultivation conditions

Classification phenolic acid	Natural Product	Seedling	7/3 [†]	7/30 [‡]	8/25 [‡]	Natural condition	10°C [‡]	20°C [‡]	10/14 [§]	13/11 [§]	16/8 [§]
1+2	0.50	0.54	0.51	0.35	0.45	0.55	0.35	0.31	0.39	0.50	0.45
3	0.28	0.24	0.29	0.24	0.22	0.24	¶	¶	0.23	0.22	0.27
4	4.82	2.58	3.12	2.38	3.22	3.55	1.53	1.27	2.87	4.75	4.56
5	1.05	1.68	0.71	0.72	0.70	1.07	0.60	0.61	1.02	1.56	1.34
Total	6.93	5.31	4.91	3.94	4.87	5.70	2.74	2.44	4.81	7.25	6.94

[†]Night-break experimental day one; [‡]warming during winter; [§]Day length control (day/night); [¶]Not detected; unit (mg/100 g).

은하지 않은 조건보다 가온한 조건에서 크게 낮은 것으로 분석되었다. Table 1에 종합된 데이터를 분석한 결과 가온 조건은 조사된 모든 바위솔 flavonol glycoside 성분의 생성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 가온하지 않았으며 일장이 낮/밤 시간이 13/11과 16/8의 조건에서 flavonol glycosides 1-5 성분의 총 함량 (각각 7.29와 6.94 mg/100 g)이 자연산 (6.93 g/mg)보다 높다는 결과는 flavonol glycosides 성분의 생성에 빛이 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

우리는 최근 일장조절 및 night-break 실험을 통해 빛의 조사량이 많으면 바위솔에 포함된 polyphenol의 한 부류인 phenolic acid와 flavonol aglycon 성분의 함량이 일반적으로 증가한다는 결과를 얻은 바 있다. 이 결과와 본 시험결과로부터 바위솔이 재배되는 동안 받은 빛의 양과 polyphenol 성분의 함량사이에 밀접한 관계가 있는 것으로 분석되었다.

적 요

Night-break, 일장조절, 월동가온 실험으로부터 얻어진 바위솔에 포함된 flavonol glycoside, kaempferol-3-O-β-D-glucoside (1), kaempferol-3-O-β-D-galactoside (2), kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside (3), quercetin-3-O-β-D-glucoside (4) 및 quercetin-3-O-α-L-rhamnoside (5)의 함량이 분석되었으며 자연산 바위솔의 함량과 비교되었다. 월동가온 시험에서 얻은 flavonol glycoside 1-5의 함량은 자연산보다 감소하였으며 일장조절 실험 및 night-break 시험에서 얻은 flavonol glycoside 함량은 조사한 빛의 양이 증가함에 따라 증가하였다. 월동가온은 flavonol glycoside의 생성에 부정적으로 작용하는 반면 조사되는 빛의 양의 증가와 같은 경작조건은 flavonol glycoside의 생성에 유리하다.

사 사

농림부에서 시행한 농림기술개발사업 (204042031SB010)의 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Cheng JT, Hsu FL, Chen HF (1993) Antihypertensive principles from the leaves of *Melastome candidum*. *Planta Med.* 59:405-407.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341:454-457.
- Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J (1987) On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 36:317-321.
- Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.
- Hertog MGL, Feskens EJM (1993) Feskens Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342:1007-1011.
- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH (1994) Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study. *Nutr. Cancer* 22:175.
- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* 155:381-384.
- Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D (1997) Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. *Am. J. Clin. Nutr.* 65:1489.
- Kang JH, Park JS, Kim JW (1995) Effect of long-day and night-break treatments on growth and anthesis of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Korean J. Crop Sci.* 40(5):600-607.
- Kang JH, Ryu YS, Kang SY, Shim YD, Kim DI (1997) Effect of night-break timing on growth, bolting and anthesis of *Orostachys japonicus*. *Korean J. Crop Sci.* 42(5):597-603.
- Kang JH, Ryu YS, Cho BG (1996) Effect of night-break period on growth and anthesis of *Orostachys japonicus*. *Korean J. Crop Sci.* 41(2):236-242.
- Lee SR, Young HS, Park HJ, Park JC (1989) Chemical study on the herbs of *Orostachys japonicus*. *Pusan Bull. Pharm. Sci.* 23(1):1-7.
- Park HJ, Young HS, Park KY, Rhee SH (1991) Flavonoids from the whole plants of *Orostachys japonicus*. *Arch. Pharm. Res.* 14:167-171.
- Park JG, Park JC, Hur JM, Park SJ, Choi DR, Shin DY, Park KY, Cho HW, Kim MS (2000) Phenolic compounds from *Orostachys japonicus* having anti-HIV-1 protease activity. *Natural Product Sci.* 6:117-121.

Price KR, Casascelli F, Colquhoun IJ, Rhodes MJC (1998)
Composition and content of flavonol glycosides in broccoli
florets (*Brassica olearacea*) and their fate during cooking.
Journal of the Science of Food and Agriculture 77:468-472.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-
antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic
acids. Free Radic. Biol. Med. 20:33-95.