Spectrophotometric Assay for Determination of Chlorogenic Acid Using Green Pigment Formation and Quantitative Analysis of Chlorogenic Acid in Blueberry Leaf

Dong-Min Chung¹, Young Chul Chung² and Hyo Kon Chun^{1*}¹Bioindustrial Process Center, Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeonbuk 580-185, Korea²Department of Food Nutrition, International University of Korea, Jinju 660-750, Korea

Received January 6, 2011 / Accepted March 1, 2011

We developed a spectrophotometric assay for the quantitative determination of chlorogenic acid based on the formation of green pigment at 50°C under glycine and alkaline conditions in 96-well plates. The formation of green pigment was linear with a series of chlorogenic acid concentration (0-300 µM). Using this method, the content of chlorogenic acid (12.42 mg/g dry weight) in the leaves of blueberry was quantified. This method is high-throughput, cost-effective, rapid, and easy to perform.

Key words : Blueberry leaf, chlorogenic acid, green pigment, amino acid, 96 well plate

서 론

클로로젠산(Chlorogenic acid)은 커피산과 퀴닉산의 에스테르 결합으로 형성된 폴리페놀 화합물의 일종이다. 그것은 주로 커피, 사과, 배, 감자, 고구마, 블루베리, 우엉 및 해바라기 등에 과량으로 함유되어 있다[2]. 클로로젠산은 시험관 내(*In vitro*) 상에서 항산화제 속성을 가지고 있으며, 프리 라디칼 제거, 메탈 이온의 착화합화, 라디칼 및 과산화물 형성을 관여하는 효소를 억제한다고 알려져 있다[1]. 또한, 클로로젠산은 한 용기 내(*In situ*) 상에서 음식을 부패보존제와 향미제로, 생체 내(*In vivo*) 상에서는 산화적인 손상을 원인으로 야기되는 암이나 심장혈관 질병을 예방할 수 있는 가능성을 가지고 있고, 건강 촉진 효능을 가지는 것으로 알려져 있다[5]. 이러한 유익한 효과들로 인하여 클로로젠산의 연구와 관심은 점점 높아지고 있는 추세이다[3].

클로로젠산에 의한 갈변현상과 녹색현상은 오래전부터 알려져 왔고, 클로로젠산이라는 이름도 식물조직을 암모니아로 처리했을 때 클로로젠산이 녹색으로 변한다는 사실을 근거로 명명되어 졌다[4].

제빵 및 튀김과 같은 음식 조제와 요리 과정에서 고구마, 우엉, 해바라기 등에서 짙은 녹색 색소가 형성되는 현상이 일어난다고 한다. 고구마의 경우, 고구마 조각을 첨가한 빵을 만든 다음 오랜 시간 동안 보관을 하면 청녹색으로 변한다. 손상되거나 감염된 고구마에서도 녹색이 많이 형성되며, 특히 알칼리성인 베이킹 파우더를 첨가함으로써 녹색이 만들어지는 것을 관찰할 수 있다. 이러한 반응은 폴리페놀 옥시테아제의 효소활성으로 인해 클로로젠산과 같은 폴리페놀이 산화됨

으로써 야기되는 것으로 추측되며, 아미노산이 존재하는 조건에서도 녹색현상이 야기되는 것으로 알려져 있다[6]. 우엉의 경우, 튀김하는 과정 중에 녹색으로 변하고, 해바라기의 경우도 단백질질을 얻기 위해 알칼리 추출을 할 때 녹색반응이 일어난다고 한다. 이러한 녹색현상은 엽록체와 그 유도체를 제외한 천연 식품 시스템에서 녹색 색깔이 형성되기가 드물기 때문에 매우 흥미로운 사실로 알려지고 있다[7].

지금까지 알려진 클로로젠산의 함량 분석 방법은 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography System, HPLC) 기법을 주로 이용하고 있다. 이러한 HPLC 방법은 고가의 장비와 장시간의 측정시간이 필요로 하며, 대량의 시료를 빠르게 분석하기에는 어렵다. 따라서 새로운 클로로젠산의 함량 분석 방법 구축이 필요한 실정이다.

이에, 본 연구는 HPLC 기법과는 달리 저렴성, 단시간의 측정 및 대량 시료의 빠른 분석 등의 차별성을 고려한 클로로젠산의 함량을 측정하는 방법을 구축하기 위해 연구한 결과, 클로로젠산이 알칼리성 조건 및 글라이신이 있는 조건에서 녹색 색깔을 형성하는 것을 이용하여 클로로젠산에 알칼리성 완충 용액과 글라이신 용액을 첨가하여 반응시킨 후 96 웰 플레이트(well plate)에서 655 nm 파장으로 흡광도를 측정함으로써 클로로젠산의 함량을 측정할 수 있는 방법을 구축하였다. 그리고, 본 연구에서 개발된 흡광도 방법과 HPLC 방법을 이용하여 블루베리 잎에 함유된 클로로젠산의 함량을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 블루베리 잎은 정읍시 소재의 블루베리

*Corresponding author

Tel: 82-63-570-5120; Fax: 82-63-570-5109

E-mail: hkchun@kribb.re.kr

농원에서 구입하여 사용하였다. 표준품으로 사용된 클로로겐산(Chlorogenic acid)는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 물과 메탄올은 Burdick and Jackson (SK Chemicals, Ulsan, ROK)사의 HPLC용 용매를 사용하였고, 트리 플로로 아세트산은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

녹색반응을 이용한 클로로겐산의 함량 측정을 위한 흡광도 방법

클로로겐산 20 μ l를 농도별(10, 30, 100 및 300 μ M, 및 1, 3 및 10 mM)로 10 mM $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 완충용액(pH 9.5) 및 10 mM 글라이신 용액 180 μ l를 혼합하여 96 웰 플레이트(well plate)에서 총량이 200 μ l이 되도록 혼합하였다. 그런 다음 상기 혼합물을 50°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 흡광도 655 nm 파장을 96 웰 플레이트 판독기에서 측정하였다.

블루베리 잎의 전처리

블루베리 잎 1 g을 메탄올 10 ml에 넣고 충분히 흔들어 준 다음, 12시간 정치시킨 후 추출하였다. 추출 과정을 3번 반복한 후, 상등액만을 여과한 다음, 회수하여 원심진공농축기에 넣고 메탄올을 제거한 다음, 메탄올 5 ml에 녹였다. 상기 메탄올로 녹인 용액을 클로로겐산의 함량을 측정하는 시료로 사용하였다. 블루베리 잎의 건조 무게량을 측정하기 위해서 블루베리 잎을 동결건조한 다음 무게를 측정하였다. 상기 건조 무게량은 블루베리 잎 1 g 당 건조 무게량 0.89 g이었다.

HPLC-DAD 분석

HPLC는 Agilent사의 1200 series로서, 분석조건 중 칼럼은 YMC ODS-AM 칼럼(5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm), 유속은 1.0 ml/min, 검출기는 DAD를 이용하여 280, 290, 323, 515 nm 파장에서 측정하였다. A 이동상 용매는 증류수(0.05% 트리 플로로 아세트산)와 B 이동상 용매는 메탄올을 사용하고, 용매 기울기는 일정한 혼합비율(A:B=92:8, 70:30, 및 30:50)로 용출시켰다. 시료 주입량은 10 μ l로 하였다.

결과 및 고찰

녹색현상을 이용한 클로로겐산의 함량 측정 방법

클로로겐산의 함량을 측정하기 위해 클로로겐산의 녹색 현상을 이용했다. Fig. 1은 클로로겐산 농도별로 반응시간 당 흡광도 수치를 그래프에 나타내었고, 50°C에서 30분 동안 반응한 흡광도의 파장값을 그래프에 나타내어 클로로겐산 녹색 현상의 정량곡선을 확인하였다.

그 결과, Fig. 1 및 Fig. 2에서 보는 바와 같이 클로로겐산의 농도 및 반응시간에 따라 흡광도 수치가 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 클로로겐산의 녹색 현상을 이용하여 클로로겐

Fig. 1. Effect of chlorogenic acid concentration on green pigment formation. The greening reaction with different chlorogenic acid concentration, 10 mM glycine and 10 mM $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ buffer (pH 9.5) at 50°C for 2 hr, determined at 655 nm. CHA, chlorogenic acid.

Fig. 2. Standard curve for the determination of chlorogenic acid content in 10 mM $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ buffer (pH 9.5) and 10 mM glycine solution showing a linear relation between O.D. at 665 nm and chlorogenic acid. The reactant was assayed after incubation at 50°C for 30 min.

산의 함량을 측정할 수 있고, 최소 30 μ M의 클로로겐산 농도까지 측정할 수 있음을 알 수 있었다.

블루베리 잎의 클로로겐산 함량 측정

기존에 사용되고 있는 클로로겐산의 함량을 측정하는 방법인 HPLC 기법과 본 연구의 흡광도 방법을 비교하기 위해서, 블루베리 잎에 함유하고 있는 클로로겐산의 함량을 두 가지 방법으로 각각 측정하였다.

그 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 두 가지 방법으로 측정한 클로로겐산의 함량은 각각 HPLC 방법으로 측정한 경우에

Table 1. Concentration of chlorogenic acid in blueberry leaf extract

	Mean concentration (mg/g dry weight)	
	Spectrophotometric assay ¹⁾	HPLC
Chlorogenic acid in blueberry leaf	12.42	12.48

¹⁾ Assay of this study

는 건조 무게당 12.42 mg으로 나타났고, 본 연구의 흡광도 방법으로 측정한 경우에는 12.48 mg으로 나타났다. 즉, 상기 두 가지 방법으로 측정한 클로로겐산의 함량은 유사한 값으로 측정된 것을 알 수 있었다. 따라서, 본 연구에 따른 클로로겐산의 함량 측정방법은 기존에 사용되는 HPLC 방법을 대체할 수 있는 방법으로 이용될 수 있음을 알 수 있다.

References

- Chen, J. H. and C. T. Ho. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2374-2378.
- Clifford, M. N. 2000. Chlorogenic acid and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1033-1043.
- Mateos, R., L. Goya, and L. Bravo. 2006. Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the Human Liver. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8724-8732.
- Politir, J. 1947. Sur une nouvelle methode concernant la localization dans les plantes. *Compt. Rend.* **225**, 954-956.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga. 1996. Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* **20**, 933-956.
- Uritani, I. and K. Muramatsu. Studies on the phytopathological chemistry of black-rotting potato. Part 2. Some factors concerning the color changes of the injured part. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **27**, 781-789, 1953.
- Yabut, G., Y. Koizumi, K. Namiki, M. Hida, and M. Mamiki. 2001. Structure of green pigment formed by the reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) with a primary amino compound. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2121-2130.

초록 : 녹색반응을 이용한 클로로겐산의 함량측정을 위한 흡광도 분석법과 블루베리 잎에 함유된 클로로겐산의 함량분석

정동민¹ · 정영철² · 전효곤^{1*}

(¹한국생명공학연구원 전북분원 생물산업공정센터, ²한국국제대학교 식품영양학과)

본 연구는 클로로겐산의 함량을 측정하기 위한 흡광도 방법을 구축하였으며, 구체적으로는 클로로겐산이 50°C 와 글라이신 및 알칼리 조건하에서 녹색반응이 일어난다는 현상을 이용했다. 녹색형성은 일련의 클로로겐산 농도에 의존성을 가졌다. 본 연구에 따른 클로로겐산의 측정방법을 이용하여 블루베리에 함유된 클로로겐산의 함량을 분석하였다(12.42 mg/g d.w). 이러한 방법은 저가의 비용과 빠른 시간으로 많은 시료를 대량으로 쉽게 클로로겐산의 함량은 측정할 수 있는 효과를 가진다.