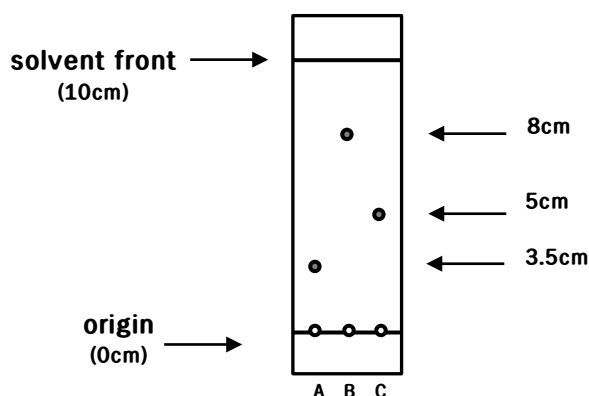


TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용한 flavonoids 성분분석

크로마토그래피(chromatography)란 화학에서 가장 기본이 되는 분석 방법으로 그 응용분야 또한 광범위하다. 크로마토그래피란 두 가지 이상의 성분으로 된 물질을 단일성분으로 분리하는 기법으로써 분리하고자 하는 물질의 각 성분은 두 종류의 상, 즉 고정상(stationary phase)과 이동상(mobile phase)에 다르게 분포하는데, 이 분포의 차이에 근거하여 분리가 이루어지는 것이다.

크로마토그래피 방법 중 TLC(박층크로마토그래피)는 어떤 물질이 단일성분인지 혼합물인지를 쉽고 빠르게 알 수 있는 분석 방법으로, 특히 아주 적은 양으로도 시료를 분석할 수 있는 점이 장점이다. TLC의 고정상은 유리판이나 플라스틱 판에 실리카겔, 셀룰로오스 분말, 산화 알루미늄 등과 같은 얇은 막을 입힌 것을 사용한다. 고정상에 적당한 전개용매(developing solvent)를 흘려주면 TLC판에 spotting된 물질은 이동상의 용해도와 고정상과의 흡착 정도가 달라서 물질의 이동이 된다.



이동 거리는 고정상과 이동상에 따라 물질마다 고유의 값을 갖는데, 이런 변화는 이동상에 의해 조절된다. 특정한 실험조건에서 물질의 이동거리는 R_f (retention factor)값으로 정량적으로 표현한다. R_f 는 물질의 이동거리 (D_1)를 전개용매가 이동한 거리(D_2)로 나눈 값으로 정의한다. 또한, 1D(one-dimensional)-TLC와 2D(two-dimensional)-TLC로 분석할 수 있는데, 각각의 용매로는 분리 할 수 없는 시료를 두 용매를 함께 사용하여 시료를 쉽게 분리할 수 있다.

$$R_f \text{ (retention factor)} = \frac{\text{물질의 이동거리 } (D_1)}{\text{전개용매의 이동거리 } (D_2)}$$

1. 실험재료

- 미지의 시료(A,B,C,D)
- TLC plate : DC-Plastikfolien Cellulose F (Merck, Germany)
- 전개용매 : 6% HOAc : acetic acid-H₂O (6:94, v/v), TBAW : *tert*-BuOH-HOAc-H₂O (3:1:1, v/v/v)
- 발색제 : vanillin-HCl-EtOH reagent (4.8:12:480, w/v/v)

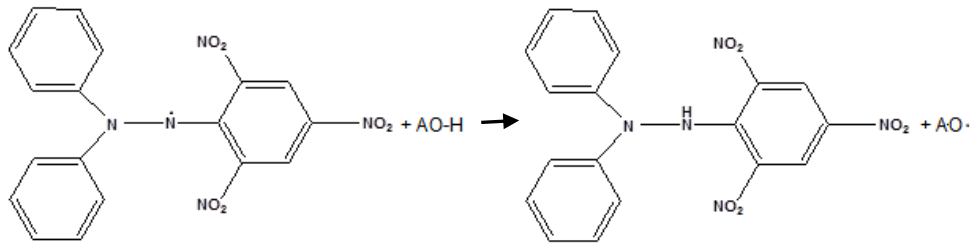
2. 실험방법

- ① 1D-TLC판 2개 (4×7 cm)와 2D-TLC판 1개 (7×7 cm)를 준비한다.
(※ TLC판은 꼭 가위로 자르며, 손으로 문지르지 않도록 주의해야 한다.)
- ② 각 방향으로 바닥에서 1 cm 가량 선을 긋고 모세관(capillary tube)을 이용하여 화합물을 spotting한다.
- ③ Spotting한 TLC판을 6% HOAc와 TBAW chamber에서 각각 전개시킨다.
- ④ 드라이기로 건조한 후 UV lamp로 spot을 관찰한다.
- ⑤ vanillin 발색제를 분무한 후, 화학물의 이동거리와 전개용매의 이동거리를 측정하여 R_f 값을 계산한다.

DPPH radical scavenging activity (항산화 활성 측정법)

인간을 포함한 생물은 호흡이라는 과정을 통하여 에너지를 얻고 신진대사를 하는 과정에서 흡입된 산소의 약 2%를 "산소 독"이라고 불리는 **활성산소**(Reactive Oxygen Species, ROS)로 변환시켜 지니고 있게 된다. 활성산소는 superoxide radical (O_2^-), hydroxy radical($HO\cdot$)등과 같은 free radical의 형태로 존재하며, 이러한 활성산소는 불안정한 성격을 띠고 있어 주위의 물질과 반응성이 강해 세포 내 단백질이나 지질분자는 물론이고 유전정보를 함유한 DNA에 까지도 산화적 손상(oxidative stress)을 입히며 결과적으로 세포에 치명적인 피해 입혀 다양한 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. **항산화제**는 이러한 **활성산소를 조절하거나 제거**할 수 있는 물질로 토코페롤, 카로티노이드 등과 같은 **천연항산화제**와 가격이 저렴하고 대량생산이 가능한 BHT 등과 같은 **합성항산화제**로 구분한다. 그러나 합성항산화제의 경우에는 발암성 등과 같은 부작용이 알려지면서 그 사용이 제한되고 있다. 따라서, 산림자원으로부터 유용한 물질을 분리하여 기능성 식품이나 약용으로 사용하듯이, 산림자원을 고차원적으로 이용하려는 노력이 계속 되고 있다.

DPPH assay는 가장 오래된 **항산화 활성 측정법**으로 그 자체가 매우 안정한 **free radical**로서 517nm에서 특징적인 광 흡수를 나타내는 **자색**의 혼합물이다. 이 radical은 alcohol 등의 유기용매에서 매우 안정하며, 특히 여러 가지 anti-oxidative mechanism 중 proton radical scavenger에 의하여 hydrazyl의 질소 원자가 수소 원자를 받아들여 DPPH-H의 형태로 되어 **황색**으로 탈색된다.



$$\text{※ DPPH radical scavenging (\%)} = (1 - \text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

1. 실험재료

- 측정 sample(농도별), DPPH 용액(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), UV spectrometer

2. 실험방법

- ① 시료를 농도에 따라 ethanol에 용해시켜 제조한다.
- ② DPPH를 0.1mM의 농도로 100mL 제조한다(DPPH 분자량 : 394.32g/mol($C_{18}H_{12}N_5O_6$)).
(0.1 mM DPPH : DPPH 3.943 mg을 ethanol 100 mL에 용해시켜 제조한다)
- ③ 농도에 따른 각각의 시료용액 1ml에 0.1 mM DPPH 1ml를 혼합한다(비율 1:1).
- ④ 본 실험의 control은 negative control을 사용하며, ethanol 1ml와 DPPH 1ml를 혼합한다.
- ⑤ 혼합된 용액은 호일을 싸고 상온에서 30분 동안 반응시킨다(빛 차단).
- ⑥ UV spectrometer로 517nm에서 흡광도를 측정하여 radical 소거능을 계산한다.

3. Report - 8 (참고한 문헌 및 사이트가 있으면 references (참고문헌) 반드시 표기)

- ① 미지의 시료 4 개의 R_f 값을 구하여라.
- ② Flavonoid 를 구조에 따라 분류하고, 각각에 속하는 대표적인 화합물의 구조를 그리시오.
- ③ 실험 시 사용했던 시료 (+)-catechin 류와 Quercetin 류의 효능에 대해 조사하시오.
- ④ 실험 시 측정했던 시료의 DPPH radical scavenging 을 구하시오.
- ⑤ Flavonoid 가 갖는 효능을 측정하기 위한 생리활성 평가 법에 대해 조사하시오.

※ 기타문의사항 연락처 : ① 6203 호 박세영, ② parksy319@snu.ac.kr ③ 010-3841-0166