2003 춘계학술발표회 논문집
한국원자력학회

감마선 조사 생약재의 성분 및 항산화 효능의 안정성 검토

Study on Stability of Components and Antioxidative Activity of a ã-ray Irradiated Herb

정일윤, 이주상, 정우희, 변명우, 조성기*

한국원자력연구소
대전광역시 유성구 덕진동 150

요 약

식품 및 가공산업에서 널리 이용되고 있는 생약재에 대한 방사선 조사 위생화 기술의 적용 가능성 검토를 위하여 감마선 조사 시료의 화학적 안정성 및 항산화 효능의 변화 유무를 평가하였다. 감마선 조사 및 비조사 시료에 대해 HPLC로 성분의 화학적 변화를 비교 분석하였으며, DPPH 라디칼 소거 시험과 지질 과산화 시험을 실시하여 항산화 효능을 평가하였다. 공시 재료는 감마선 조사 (10 kGy) 및 비조사의 황기로 하여 각각의 95% 에탄올 추출물의 EtOAc 분획물을 시료로 하였으며, 표준 물질은 단일 주성분인 calycosin으로 하였다. HPLC 분석 결과에서 표준 물질인 calycosin의 $_tR$ (머무름 시간)=15.11, 조사 시료는 $_tR$= 15.07, 비조사 시료는 $_tR$= 15.09로서 거의 같은 위치에 각각 나타났으며, 성분의 화학적 변화는 거의 없음을 알 수 있었다. 항산화 효능 비교 실험에서도 감마선 조사 및 비조사 시료는 각각 DPPH 라디칼에 대해 거의 동등한 EDA (전자공여능) 값을 보였고 지질 과산화 억제 시험에서도 유사한 활성을 나타냈다. 이는 감마선 조사 시료의 화학적 안정성과 효능의 유지를 시사한 결과로 생각되며, 더 많은 연구를 통하여 생약재의 감마선 조사 위생화 기술이 실용화될 수 있을 것이다.

Abstract

This study was performed to investigate the stability of components and antioxidative activities of a gamma-irradiated herb, *Astragalus membranaceus* Bunge (AMB). The chemical components of gamma-irradiated and non-irradiated AMB were analyzed by HPLC, and their antioxidative activities were also evaluated in scavenging of DPPH radical and inhibition of lipid peroxidation. For HPLC analysis, calycosin, a major component, was isolated as a standard material, and EtOAc fractions were prepared from irradiated (10 kGy) and non-irradiated AMB. HPLC profile of the two EtOAc fractions showed almost same pattern. One major peak was detected during retention times ($_tR$) at 15.07 min in irradiated sample, and at 15.09 min in non-irradiated sample, compared with calycosin (15.11 min). In the experiment of antioxidative effects, gamma-irradiated and non-irradiated samples also showed the same level of EDA value and lipid peroxidation inhibitory activity. These results suggest that chemical components and biological activities of AMB were not affected by gamma irradiation.

1. 서 론

생약재는 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라 기능성 식품소재로서 그 유통량이 급증하고 있다. 생약재의 유통을 위한 위생화 기술로서 지금까지 사용되어 온 화학적 처리법은 화학물질 잔류 등의 문제로 점차 금지되고 있는 추세이다. 따라서 그 대체기술로 방사선 조사 위생화 기술이 산업체로부터 요구되고 있다.

본 연구에서는 식품 및 가공 산업에서 유통량이 많은 생약재인 황기를 재료로 감마선 조사 생약재의 성분 및 효능의 변화 유무를 검토하고자 하였다.

황기 (Astragali Radix; *Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과 (Leguinosae)에 속하는 다년생 초본으로 한국, 중국 등 아시아 지역과 러시아, 불가리아 등 널리 유럽까지 분포되어 활용되고 있는 식물이다. 황기는 우리나라 한방에서 그 뿌리가 강장제, 이뇨제, 지한제 등 약용 목적의 민간약으로 사용되며, 보중익기, 탁독 등의 효과가 있다고 알려져 많은 한방 처방에 인삼 다음으로 쓰이는 보기약의 하나이다 [1-3].

본 시험에서는 감마선 조사에 대한 황기의 화학적 안정성 및 항산화 효능을 평가하였다. 이를 위해 HPLC (고성능 액체 크로마토그래피) 분석을 통하여 화학적 성분 변화를 관찰하였으며, 아울러 항산화 활성 분획인 EtOAc 분획으로부터 chromatography를 이용하여 2종의 유효 주성분을 분리하였고 그 화학구조를 규명하였다. 또한 항산화 효능을 측정하기 위해 DPPH 라디칼 소거 시험과 rat의 liver로부터 적출한 microsome에 대한 지질 과산화 시험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 황기는 서울 경동 시장에서 구입하여 실온에 보관하면서 시료로 사용하였다. DPPH 및 DMSO는 Sigma Chemical Co.의 제품을 사용하였고 물질 분리를 위한 column chromatography 용 silica gel은 Kiesel gel 60 (70-230 mesh, Merck)을 MCI gel은 Mitsubishi Co.의 제품을 사용하였다. 기타 용매 및 시약류는 특급 제품을 사용하였다.

감마선 조사

시료의 감마선 조사는 ^{60}Co-ã선을 20 Gy/min의 선량율로 10 kGy의 감마선을 조사하였다.

조추출물의 제조 및 용매분획

건조 세절한 황기 (600 g)에 5배 가량의 95% 에탄올을 가하여 실온에서 4일간 침지시켜 여과한 후 가압 농축하여 조추출물 (41 g)을 얻었다. 조추출물을 물에 해리시킨 후 EtOAc 용매로 분액하여 얻은 분획물을 농축하여 -70°C에서 동결 건조시켜 시료로 사용하였다.

유효성분 분리 및 구조분석

유효성분의 분리를 위해 column chromatography의 충진제로서 MCI gel 및 silica gel을 사용하였고 구조분석을 위한 ^{1}H NMR과 ^{13}C NMR은 DMSO 용매내의 TMS을 내부 기준 물질로 하여 Bruker AW-500 spectrometer를 사용하였다. 질량 분석은 JEOLJMS-700 mass spectrometer를 이용하였다.

HPLC에 의한 정성분석

감마선 조사 및 비조사 황기의 성분 분석 비교는 HPLC를 이용하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Conditions of HPLC analysis

Item	Method
Column	Symmetry C18, 5 ㎛, 3.9 x 150 ㎜
Temperature	22℃
Mobile phase	A= 0.1% phosphoric acid in H_2O
	B= acetonitrile
Gradient elution	10 to 50% B (28 min)
	hold at 50% B (2 min)
Flow rate	1.0 ㎖/min
Standard concentration	1.0 ㎎/㎖
Injection volume	10 ㎕
Detector	Waters 996 PDA detector, UV@254 ㎚

DPPH 라디칼 소거 시험

각종 화합물이 DPPH radical에 전자를 공여(donating)함으로써 라디칼을 소거하는 효과를 측정한 Blois의 방법에 따라 시료의 전자공여능(Electron donating ability, EDA)을 측정하였다[4]. 시료 용액(0.2 mL)에 4×10^{-4} M DPPH/MeOH 1.8 ㎖을 가한 후 10초간 강하게 진탕한 다음 30분간 방치 후 분광광도계(Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 517 ㎚에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 전자공여능은 아래 식에 따라 계산하였다.

$$EDA\ (\%) = \left(1- \frac{Abs}{Abc}\right) \times 100$$

Abc : Absorbance of control treatment at 517 ㎚

Abs : Absorbance of sample treatment at 517 ㎚

Rat liver microsome의 분리

Microsome은 Sprague-Dawley rat (180-200 g)의 간으로부터 차등 원심분리법으로 분리하였다. 즉 Rat로부터 간을 적출하여 얼음으로 냉각된 생리 식염수에 넣고 2-3회 세척한 후 간 1 g 당 9배 가량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 조직분쇄 하였다. 4℃, 9,000 g에서 20분간 원심분리한 후 다시 상등액을 4℃, 105,000 g에서 60분간 초원심 분리하여 microsome 분획을 얻었다. 이것을 50 mM Tris-buffer (pH 7.5)로 희석시키고 Bio-Rad protein assay kit을 사용하여 단백질 정량을 하였다.

지질 과산화 억제시험

Fe^{2+}/ascorbate 반응계에 의하여 최종 생성된 hydroxyl radical은 지질원인 microsome을 산화시켜 malondialdehyde (MDA)가 생성되는데, 이것을 thiobarbituric acid (TBA)와 반응시켜

분광학적으로 정량하였다. 즉, Microsome (10 mg protein/ml) 50 ㎕, 50 mM Tris-buffer (pH 7.5) 750 ㎕, 5 mM sodium dodecyl sulfate 50 ㎕와 1 mM ascorbic acid 혼합액 100 ㎕넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액에 3 M TCA-2N HCl (1:1) 혼합용액 250 ㎕를 가하여 반응을 정지시킨 후 3000 rpm에서 10 분간 원심분리 시켰다. 상등액 1 ml을 취해 0.67% TBA 용액 250 ㎕를 가하고 100°C에서 10 분간 끓인 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 과산화물 생성 억제능은 아래 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Lipid peroxidation inhibitory activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs}}{\text{Abc}}\right) \times 100$$

Abc : Absorbance of control treatment at 532 nm

Abs : Absorbance of sample treatment at 532 nm

3. 결과 및 고찰

유효성분 분리 및 구조분석

황기의 에탄올 추출물의 EtOAc 분획물로부터 유효성분을 분리하였다 (Fig. 1). 즉 EtOAc 분획물 (2.36 g)을 Silica gel column에 loading한 후 TLC로 monitoring을 병행하면서 클로로포름과 메탄올의 혼합용액(30:1)으로 용출시켜 AMBI과 AMBII의 분획물로 구분하였다. 다시 AMBI은 C-18 prep TLC에 의하여 단일 유효성분인 formononetin (AMBI-1)으로 재 정제되었으며, AMBII는 MCI gel 크로마토그래피를 이용하여 순수 단일물질인 calycosin으로 분리되었다. 구조분석은 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR 및 질량 분석법에 의하여 동정하였다.

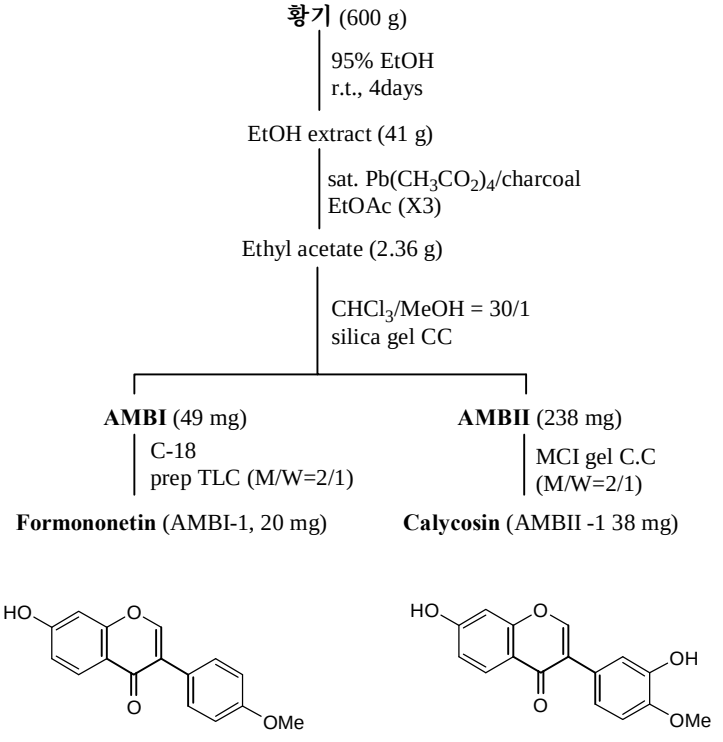

Fig. 1. Isolation of Formononetin (AMBI-1) and Calycosin (AMBII-1) from *Astragalus membranaceus* Bunge (AMB).

HPLC 분석

감마선 조사 및 비조사 황기의 HPLC 분석 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 표준 물질인 calycosin의 $_tR$ (Retention time, 머무름 시간)은 15.11 분에서 감지되었으며 감마선 조사 및 비조사 시료는 각각 15.07과 15.09 분대의 $_tR$값을 나타냈다. 또한 화학적 성분 변화의 차이는 관찰되지 않았다.

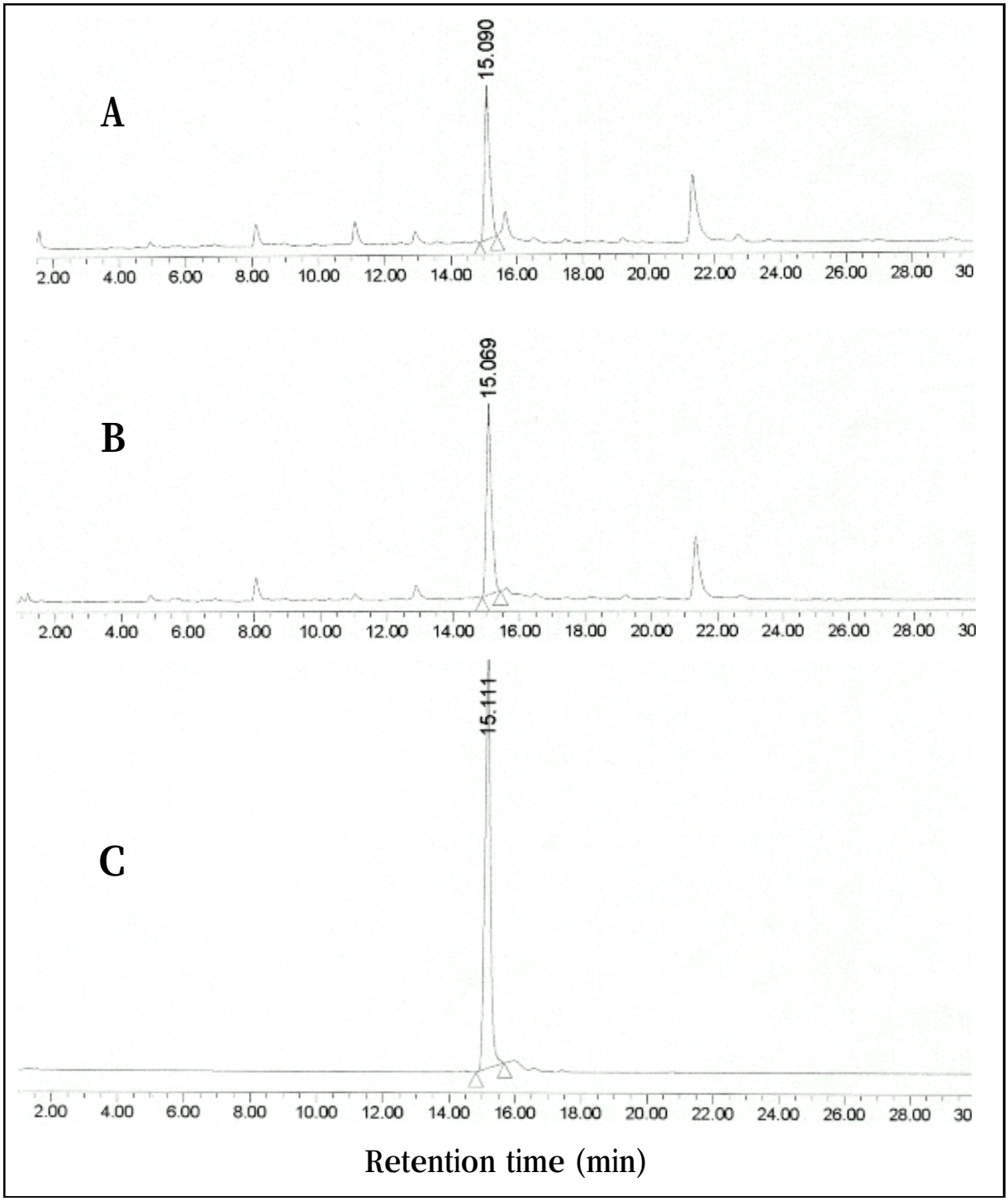

Fig. 2. HPLC chromatograms of *Astragalus membranaceus* Bunge (AMB). (A) EtOAc fraction fractionated from non-irradiated AMB; (B) EtOAc fraction fractionated from gamma-irradiated (10 kGy) AMB; (C) Calycosin isolated from non-irradiated AMB

DPPH 라디칼 소거활성

감마선 조사 및 비조사 황기의 EtOAc 분획물과 분리된 유효 주성분에 대한 DPPH 라디칼 소거활성 시험 결과를 Fig. 3과 4에 나타냈다. 감마선 조사 및 비조사 황기의 EtOAc 분획물에 대한 DPPH 소거능은 큰 차이를 보여 주지 않았으며 농도의 증가에 따라 라디칼 소거활성도 증가하는 경향을 보였다. 분리된 2종의 유효 주성분 중 calycosin이 formononetin보다 5-8배 정도의 높은 활성도를 보였다.

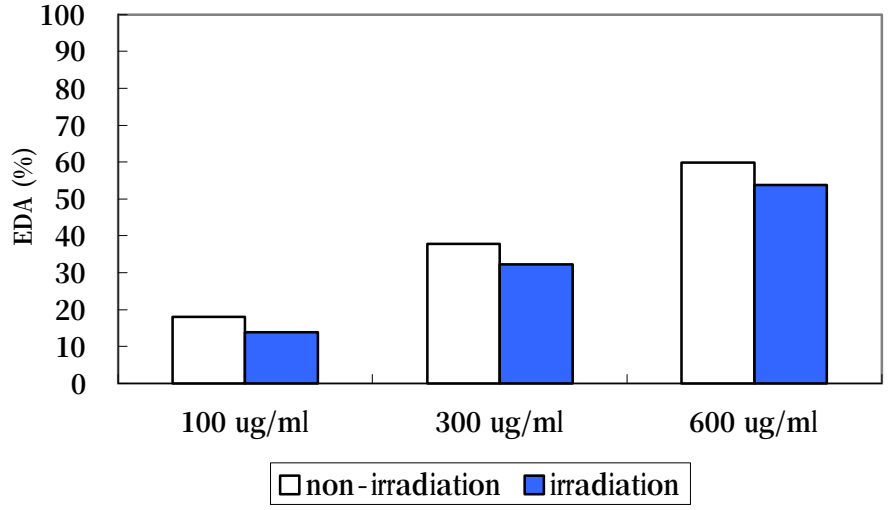

Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of EtOAc fractions fractionated from non-irradiated and gamma-irradiated AMB.
EDA: Electron donating ability

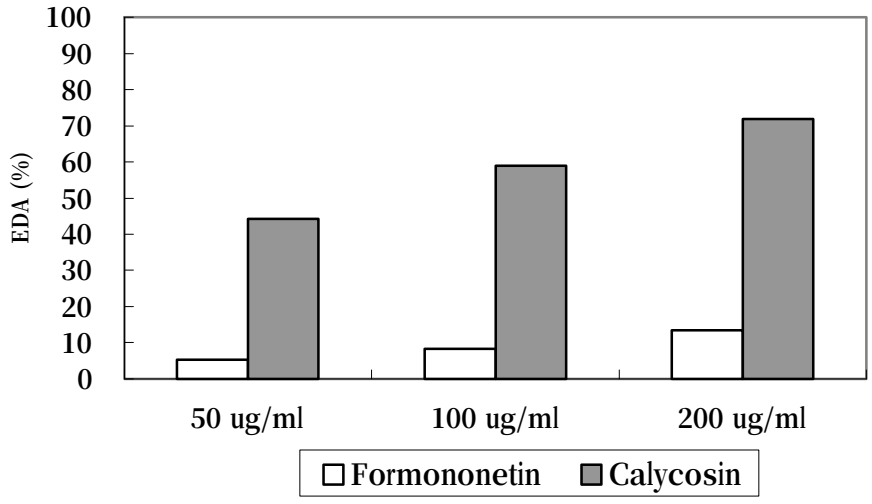

Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of Formononetin and Calycosin isolated from non-irradiated AMB.

지질 과산화 억제활성

감마선 조사 및 비조사 황기의 EtOAc 분획물과 분리된 유효 주성분에 대한 지질 과산화 시험 결과를 Fig. 5와 6에 나타냈다. 감마선 조사 및 비조사 EtOAc 분획물은 농도의 변화에도 거의 동등한 억제활성을 보였으며 낮은 농도에서도 높은 활성을 나타냈다. 분리된 유효 주성분인 formononetin 및 calycosin은 각각 농도 의존적인 억제활성을 보였으며 전자의 DPPH 라디칼 소거능에서 높은 활성을 나타낸 calycosin이 1, 5, 및 20 ìg/ml의 농도에서 더 높은 억제활성을 나타냈다.

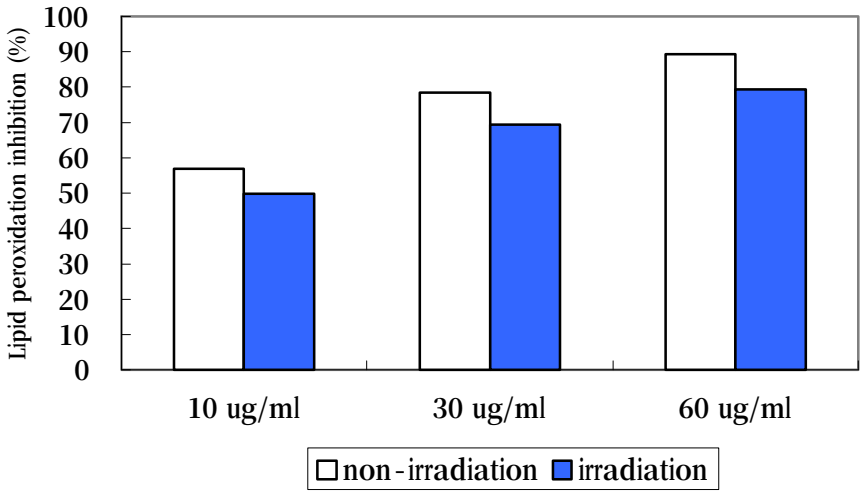

Fig. 5. Lipid peroxidation inhibitory activity of EtOAc fractions fractionated from non-irradiated and gamma-irradiated AMB.

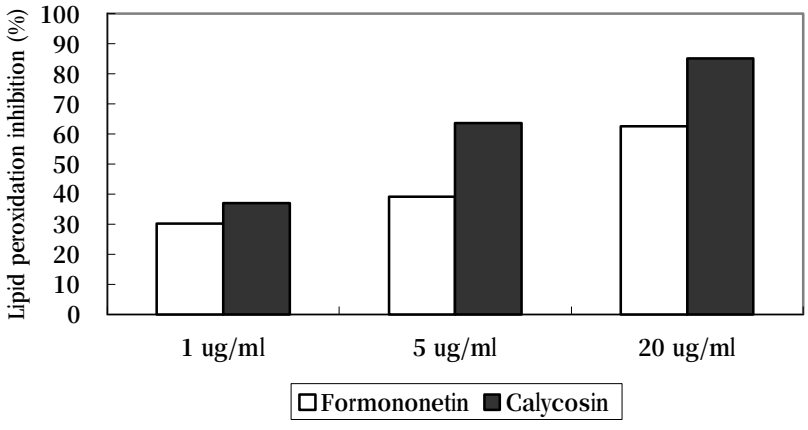

Fig. 6. Lipid peroxidation inhibitory activity of Formononetin and Calycosin isolated from AMB

4. 결론

황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge)의 감마선 조사에 대한 화학적 안정성 및 항산화 효능 변화 유무를 비교 분석하고자 하였다. 이를 위해 조사 및 비조사 황기의 에탄올 추출물로부터

분액한 EtOAc 분획물을 시료로 하여 HPLC 분석을 통해 화학적 성분 변화를 관찰하였으며 표준 물질은 감마선 비조사 황기의 EtOAc 분획물로부터 분리한 calycosin을 사용하였다. 또한 감마선 조사 및 비조사 황기의 EtOAc 분획물과 2종의 유효 주성분으로 분리된 formononetin 및 calycosin에 대한 항산화 효능이 평가되었다. 감마선 조사 및 비조사 황기의 EtOAc 분획물에 대한 HPLC 분석 결과에서 화학적 성분 변화는 거의 나타나지 않았으며 $_tR$ (Retention time, 머무름 시간)값도 거의 동등한 시간에서 감지되었다. 항산화 효능 평가에서도 감마선 조사 및 비조사 시료는 DPPH 라디칼 소거 및 지질 과산화 시험에서 거의 유사한 항산화 활성을 보였으며 특히, 유효 주성분인 calycosin은 formononetin 보다 높은 항산화력을 나타냈다. 이는 감마선 조사 시료의 화학적 안정성과 효능의 유지를 시사한 결과로 생각되며, 더 많은 연구를 통하여 생약재에 대한 감마선 조사 위생화 기술이 실용화 될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행된 연구의 결과이며, 그 지원에 감사드립니다

5. 참고 문헌

[1] 정보섭, 신민교 (1985) 도해 향약 (생약) 대사전 (식물편). 662-664. 영림사, 서울.

[2] 김진숙, 김연태, 김정숙 (1996) 황기 (Astagalus membbranaceus Bunge) 뿌리의 연구 (I). 생약학회지 27: 336-341.

[3] Zhang, Y.D., Shen, J.P., Zhen. S.H., Huang, D.K., Ding, Y. and Zhang, X.L. (1992). Effects of Astragalus (ASI, SK) on experimental liver injury. Acta Pharmaceutica Sinica 27: 401-406.

[4] Blois, MS. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.