

알팔파 사포닌이 흰쥐 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향

曹永守·堀米降男

岡山大學 大学院 自然科學研究科

Effect of Alfalfa Saponin on the Serum Cholesterol Level in Rats

Young-Su Cho and Takao Horigome

The Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Tsushima, Okayama 700, Japan

Abstract

Alfalfa saponin was isolated from the roots of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and incorporated at the level of 0.2% and 0.4% cholesterol-free diets and cholesterol enriched-diets. Wistar male rats weighing approximately 80g were fed with for 21 days. The serum lipids and fecal excretion lipids of the rats were determined and the result obtained are as follows.

1. Alfalfa saponin contained 36.4% medicagenic acid.
2. The feeding of alfalfa saponin increased cholesterol excretion but not bile acid excretion.
3. Alfalfa saponin showed hypocholesterolemic activity at 0.4% level in both the diets with and without cholesterol but the effect was not observed at 0.2% level in a diet.
4. It was indicated that the hypocholesterolemic effect of alfalfa saponin was associated with the decreased absorption of cholesterol from alimentary canal.

서론

사포닌은 steroid 또는 triterpene배당체의 일종으로 식물계에 널리 분포하고 있다. 그 중에서도 알팔파 사포닌의 주된 사포게닌은 Medicagenic acid, Soyasapogenol A, B 및 Lucernic acid의 4종류¹⁾라고 알려져 있지만, 이 중에서 생리작용이 가장 강한것은 Medicagenic acid인것이 알려져 있다.^{2,3)} 따라서 알팔파에는 수종의 사포게닌과 수종의 당이 결합해서, 30종류 전후의 사포닌이 존재하고 있다고 알려져 있지만⁴⁾, 생리작용을 생각하는 경우, 작용이 가장센 Medicagenic acid를 구성원으로 하는 사포닌을 대상으로 하든지, Medicagenic acid 자체를 직접 대상으로 한것이 많다.

한편, 알팔파 사포닌을 급여한 실험동물에서 혈청콜레스테롤 저하작용에 관한 보고는 알팔파잎 건

조분말, 알팔파종자 및 알팔파잎 줄기에서 추출한 사포닌에 의한 것들이 있다.⁵⁻¹⁰⁾ 특히, Malinow등¹¹⁾은 원숭이를 사용한 실험에서 콜레스테롤 함유식에 알팔파 잎에서 추출, 단리시킨 사포닌을 0.6% 혼합했을 경우, 혈청콜레스테롤 저하작용을 보고한바 있다.

저자들은 알팔파 뿌리에서 사포닌을 추출, 단리해서 콜레스테롤 첨가, 무첨가식에 사포닌을 첨가해 흰쥐수컷에 급여, 혈청지질 농도에 관한 것을 검토하였다.

재료 및 방법

사포닌의 추출·단리 및 Medicagenic acid 정량

사포닌 추출, 단리에 사용한 알팔파(*Medicago sa-*

tiva L.)뿌리는 잎, 줄기 부분이 마르고난 11월에 채취, 세척후 65℃에서 열풍건조, 분쇄후 60mesh 채로 쳐서, 일정한 분말 상태의 것을 Morris등¹²⁾의 방법에 따라서 사포닌을 단리, 추출 하였다. 알팔파 뿌리 건조 분말 4kg에서 약12g의 사포닌을 얻었다. 사포닌중 Medicagenic acid정량은 Tencer등¹³⁾의 방법에 따라서 행하였으며 측정 결과 36.4% 함유 하였다.

실험동물 사육조건 및 식이조성

공시동물로서는 7주령의 80g 전후의 Wistar계 (Jcl : Wistar ; Japan clea) 흰쥐수컷을 사용하고 본 실험 시작전 3일간, 시판 사육용 식이(日本Clea, CE-2)로서 예비사육후 개별의 체중을 측정, 각군이 균등하도록 각군 5마리씩 분리시켜, 개별 케이지에서 21일간 실험용 식이로서 사육후, 실험 최종일에 12시간 절식시킨후, 에텔마취하에서 경동맥에서 채혈, 3,000rpm에서 15분간 원심분리에 의해

혈청을 분리, 혈청지질 분석에 사용하였다.

사육환경은 온도22±2℃로 설정시킨 사육실에서 7:00점등, 19:00소등되도록 조명을 설정 시켰다. 음수는 자유섭취, 식이는 자유섭취에 가까운 제한 급여를 행하였다.

실험식이의 조성은 Table 1과 같다. 콜레스테롤 무첨가 식이에 사포닌을 0.2% 및 0.4% 첨가군, 콜레스테롤 첨가식이에 사포닌 0.4% 첨가식이 1군을 각각 설정하였다.

화학분석

혈청 총콜레스테롤 농도는 총콜레스테롤 측정용 시약Kit(스테로자임-545, 富士레비오(株), 東京)로서 효소법에 의하여 측정 하였으며 트리글리세라이드는 triglyceride G- test kit(和光純藥工業(株), 大阪)로서 측정 하였다. 분중 총콜레스테롤은 Katas방법¹⁴⁾에 따라서 추출, 혈청 총콜레스테롤과 같은 방법으로 측정하였으며, 분중 담즙산은 Kalek등¹⁵⁾의

Table 1. Composition of experimental diets(%)

	Dietary group				
	Chlesterol-free diets			Cholesterol-enrich diets	
	Control	Saponin 0.2%	0.4%	Control	Saponin 0.4%
Casein	20	20	20	20	20
Saponin*	—	0.2	0.4	—	0.4
Corn oil	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mixture**	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture***	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cellulose powder	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Cholesterol	—	—	—	0.5	0.5
Lard	—	—	—	9.0	9.0
Sucrose	72.0	71.8	71.4	62.5	62.1

* : Partially purified saponins, prepared from alfalfa roots Morris' method. (medicagenic acid containde as 36.4%)

** : Phillips-Hart's salt mixture.

*** : Oriental vitamin mixture (Oriental vitamin mixture(Oriental Yeast Co., Tokyo) : The mixture contains(per g) ; A acetate 500IU, D₃100IU, B₁HCl 1.2mg, B₂ 4mg, B₆HCl 0.8mg, B₁₂ 0.5mg, C 300mg, E acetate 5mg, K₃ 5.2mg,D-Biotin 0.02mg, Folic acid 0.2mg, Ca pantothenate 5mg, p-Amino benzoic acid 5mg, Nicotinic acid 6mg, Inositol 6mg, Choline chloride 200mg

방법에 따라서 추출, 담즙산 측정용 시약(極東胆汁酸試藥, 極東製藥工業(株), 東京) Kit로서 측정 하였다.

유의차 검정

평균치간의 유의차 검정은 분산분석 F검정을 행 하였으며, 개개의 군간 유의차 검정은 Tukey방법에 의하여 행하였다.

결과 및 고찰

사포닌을 첨가한 식이로서 사육 하였을 때의 식이섭취량, 체중증가량등을 Table 2에 표시하였다. 콜레스테롤 첨가, 무첨가에 관계없이 사포닌 급여에 의한 식이 섭취량에는 차가 없었으며, 체중증가량에도 차가 없었다. 또한, 간습증량에도 차가 없었으나, 콜레스테롤 무첨가식이의 경우, 분 배설량은

Table 2. Food intake, body weight gain, liver weight and fecal weight in rats given a diet including alfalfa saponin

	Dietary group				
	Cholesterol-free diets			Cholesterol-enrich diets	
	Control	Saponin		Control	Saponin
		0.2 %	0.4 %		0.4 %
Food intake(g/21 days)	198 ± 1	199 ± 1	199 ± 1	198 ± 1	198 ± 1
Body weight gain(%)	74.7 ± 1.0	76.8 ± 3.4	76.1 ± 2.7	72.7 ± 1.7	73.3 ± 4.6
Liver weight(g/100gB. W.)	4.6 ± 0.3	4.6 ± 0.2	4.8 ± 0.2	5.5 ± 0.3	5.1 ± 0.2
Fecal output(g/day)	0.33± 0.03 ^a	0.41± 0.09 ^{ab}	0.51± 0.05 ^b	0.36± 0.09	0.38± 0.05

a,b : Values with different superscripts on the same horizontal line of same experiment are significantly different at p<0.05.
(Mean value with its S. D. of five rats/group)

Table 3. Serum and fecal lipids in rats given a diet including alfalfa saponin.

	Dietary group				
	Cholesterol-free diets			Cholesterol-enrich diets	
	Control	Saponin		Control	Saponin
		0.2 %	0.4 %		0.4 %
Serum lipids(mg/100ml)					
Total cholesterol	118.5 ± 7.4 ^b	115.1 ± 8.2 ^{ab}	100.3 ± 7.0 ^a	329.5 ± 36.0 ^b	266.2 ± 27.0 ^a
Triglyceride	277.8 ± 41.5	242.3 ± 37.1	225.5 ± 29.9	233.5 ± 21.0	264.6 ± 59.5
Fecal lipids (mg/day excretion)					
Total cholesterol	0.85± 0.11 ^a	3.36± 0.52 ^b	8.40± 1.71 ^c	6.65± 1.97 ^a	12.97± 1.97 ^b
Bile acid	0.62± 0.12	0.84± 0.22	0.94± 0.20	3.29± 0.76	2.19± 0.69

a,b,c : Values with different superscripts on the same horizontal line of same experiment are significantly different at p<0.05.
(Mean value with its S. D. of five rats/group)

사포닌 첨가에 의해서 증가하는 경향이었다. Ueda 등¹⁶⁾은 카제인-아미노산 혼합품을 단백질원으로 하는 기초식에 알팔파 사포닌(사포닌 19 당 medicagenic acid 41.8mg 함유)을 0.3% 첨가 하였을 때 병아리의 성장발육에는 저해작용이 나타나지 않았다는 것을 보고하고 있다. 한편, Reshef 등¹⁷⁾은 단백질원으로 카제인 20% 함유, 콜레스테롤 무첨가 기본식에 알팔파 사포닌을 0.5% 첨가한 경우, 마우스의 성장에 영향을 미쳤다고 보고 하였다. 이때 사용한 사포닌은 medicagenic acid를 0.145% 함유하고 있는 결과로, 본 실험의 사포닌 0.4% 첨가식이(medicagenic acid 0.146%)와 같은 수준이다. 성장발육에 미친 영향의 차는, 공시동물종류의 차이에 의한 것으로 생각되었다.

Table 3에는 혈청지질 및 분중지질 분석 결과를 표시 하였다. 혈청 총콜레스테롤 농도는 식이중 콜레스테롤 첨가 유무에 관계없이 사포닌 0.4% 첨가에 의해서, 각 첨가군의 대조군보다 유의적으로 저하하는 결과를 나타내었다. 그러나, 콜레스테롤 무첨가 식이의 사포닌 0.2% 첨가에는 저하가 인정되지 않았다. 트리글리세라이드는 콜레스테롤 무첨가군의 경우, 사포닌 첨가량의 증가에 따라 저하하는 경향이었으나 유의차는 인정되지 않았으며, 콜레스테롤 첨가식이의 경우, 사포닌 첨가에 의해 유의차는 인정되지 않고 증가하는 경향이었다. Malinow 등¹¹⁾은 알팔파 잎에서 조제한 사포닌 0.6% 첨가 식이를 원숭이에 급여한 실험에서 원숭이의 혈청 콜레스테롤을 저하시킨다는 것이 입증되었다. 본 실험에서는 사포닌 0.4% 첨가에 의하여 흰쥐 혈청 총 콜레스테롤 저하작용을 나타내었다.

분중의 콜레스테롤 배설량을 보면 콜레스테롤 무첨가 식이의 경우, 사포닌 첨가에 의해 유의로 배설량이 증가 하였다. 그러나, 담즙산 배설량은 콜레스테롤 무첨가, 첨가식이군 함께 사포닌 첨가에 의해 유의차는 인정되지 않았다.

Kritchevsky 등⁶⁾은 알팔파의 콜레스테롤 저하작용은 소장내에서 콜레스테롤과 사포닌이 결합되어져 콜레스테롤 흡수를 방해하여 혈청 콜레스테롤이 저하한다는 보고를 하였으며, 또 Reshef 등⁷⁾은 알팔파사포닌 급여에 의해 마우스의 분중 콜레스테롤 배설량이 증가한다는 보고가 있으며, Malinow 등¹¹⁾

은 알팔파 사포닌을 원숭이에 급여, 분중 콜레스테롤과 담즙산을 조사한 결과, 혈청 총콜레스테롤 저하원인은 소장내에서의 콜레스테롤 흡수저하, 콜레스테롤·담즙산류의 배설량 증가에 의한 것을 보고 하였다. 그 밖에도 사포닌 급여에 의해 분중 중·산성 스테로이드가 증가 한다는 보고가 있다.¹⁸⁾

이상의 결과에서 본 실험의 알팔파 뿌리 사포닌 급여에 의한 혈청 총콜레스테롤 저하작용으로 담즙산의 분중 배설량 증가는 인정되지 않았으나, 분중 콜레스테롤 배설량 증가의 결과, 종래의 보고와 같이, 사포닌의 작용에 의한 소화관내에서의 콜레스테롤 흡수저하에 의한 것으로 추측되어진다. 알팔파 사포닌은 혈청 총콜레스테롤 저하작용은 강했으나, 트리글리세라이드 저하작용은 약한 것이 밝혀졌다.

요 약

알팔파 뿌리에서 사포닌을 추출, 단리하여서, 콜레스테롤 무첨가식이에 0.2% 및 0.4% 첨가군과 콜레스테롤 첨가식이에 0.4% 군을 설정, 80g 전후의 Wistar계 흰쥐수컷에 21일간 급여하였다. 그 결과 혈청지질과 분중지질 배설량을 측정된 결과 다음과 같다.

1. 알팔파 사포닌중 Medicagenic acid 함량은 36.4% 이었다.
2. 알팔파 사포닌 급여에 의하여 분중 콜레스테롤 배설량은 증가하였으나, 담즙산은 증가하지 않았다.
3. 알팔파 사포닌은 콜레스테롤 첨가, 무첨가 식이에서 0.4% 첨가에 의해 혈청콜레스테롤 저하작용을 나타내었지만, 0.2% 첨가에서는 관찰되지 않았다.
4. 사포닌의 혈청 콜레스테롤 저하작용은 소화관내에서의 콜레스테롤 흡수저하에 기인되는 것으로 여겨진다.

문 헌

1. Hanson, C. H., Pederson, M. W., Berrang, B. B., Wall, M. E. and Davis, K. H. : The Saponins in alfalfa cultivars, Antiquality components of forages crop science society of america, Medison. 1 (1974)

2. Horber, E., Leath, K. T., Berrang, B., Marcarian, V. and Hanson, C. H. : Biological activities of saponin componests from Dupuits and Lahontan alfalfa. *Entomol. Exp. Appl.* 17, 410 (1974)
3. Gestetner, B., Henis, Y., Tencer, Y., Rotman, M., Birk, Y. and Bondy, A. : Interaction of lucerne saponins with sterols. *Biochim. Biophys. Acta*, 270, 181(1972)
4. Berrang, B., Davis, K. H., Wall, M. E., Hanson, C. H. and Pederson, M. D. : Saponins of two alfalfa cultivar. *Phytochemistry*, 13, 2253(1974)
5. Cookson, F. B. and Federoff, S. : Quantitative relationships between administered cholesterol and alfalfa required to prevent hypercholesterolemia in rabbits. *Br. J. Exp. Pathol.* 49, 348(1968)
6. Kritchvsky, D. and Story, J. A. : Binding of bile salts in vitro by nonnutritive fiber. *J. Nutr.*, 104, 458(1974)
7. Malinow, M. R., McLaughlin, P., Naitis, H. K., Lewis, L. A. and McNulty, W. P. : Effect of alfalfa meal on shrinkge(regression) of atherosclerotic plaques during cholesterol feeding in monkey. *Atherosclerosis*, 30, 27(1978)
8. Malinow, M. R., McLaughlin, P. and Stafford, C. : Alfalfa seeds, Effects on cholesterol metabolism. *Experimentia*, 36, 562(1980)
9. Malinow, M. R., McLaughlin, P., Papworth, L., Stafford, C., Kohler, G. O., Livingston, A. L. and Cheeke, P. R. : Effect of alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 30, 2061(1977)
10. Cookson, F. B., Altschul, R. and Fedoroff, S. : The effects of alfalfa on serum cholesterol and in modifying or preventing, cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *J. Atherosclerosis Research*, 7, 69(1967)
11. Malinow, W. E., Connor, W. E., McLaughlin, P., Stafford, C., Lin, D. S., Livingston, A. L., Kohler, G. O. and McNulty, W. P. : Cholesterol and bile acid balance in Macaca Fascicularis, Effect of alfalfa saponins. *J. Clin. Invest.*, 67, 156(1981)
12. Morris, R. J., Dye, W. B. and Gisler, P. S. : Isolation, purification, and structural identify of an alfalfa root saponin. *J. Org. Chem.*, 26, 1241 (1961)
13. Tencer, Y., Shany, S., Gestetner, B., Birk, Y. and Bondi, A. : Titrimetric method for determination of medicagenic acid in alfalfa(*Medicago sativa*) *J. Agr. Food Chem.*, 20, 1149 (1972)
14. Katas, H. D., Stellaard, F., Kruls, W. and Paumgartner, G. : Detection of increased bile acid excretion by determination of bile acid content in single stool samples. *Clinica Chimica Acta*, 140, 85(1984)
15. Kalek, H. D., Stellaard, F., Kruls, W. and paumgartner, G. : Detection of increased bile acid excretion by determination of bile acid content in single stool samples. *Clinica Chimica Acta*. 140, 85(1984)
16. Ueda, H. and Oshima, M. : Effects of alfalfa saponin on chick performance and plasma cholesterol level. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 58, 583 (1987)
17. Reshef, G., Gestetner, B., Birk, Y. and Bondi, A. : Effect of alfalfa saponins on the growth and some aspects of lipid metabolism of mice and quails. *J. Sci. Food Agric.*, 27, 63(1976)
18. Okenfull, D. G., Fenwick, D. E. and Hood, R. L. : Effects of saponins on bile acids and plasma lipids in the rat. *Br. J. Nutr.*, 42, 209 (1979)

(Received August 21, 1989)