

LC-MS를 이용한 황금추출물의 항균물질 검색

김영록 · 최성길¹ · 조성환^{1†}

경상남도 보건환경연구원, ¹경상대학교 식품공학과 및 농업생명과학연구원

Analysis of Antimicrobial Substance isolated from *Scutellariae Radix* Extract using LC-MS

Young-Rok Kim, Sung-Gil Choi¹ and Sung-Hwan Cho^{1†}

Gyeongsangnamdo Provincial Government Institute of Health & Environment, Changwon 641-825, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Sciences,
Gyeongsang National University, JinJu 660-701, Korea

Abstract

It was carried out for development of natural antimicrobial on *Scutellariae Radix* by measuring the general nutritional composition and mineral contents. This study analyzed it with LC-MS to identify antimicrobial activity substance in the *Scutellariae Radix* extract, its content was analyzed using HPLC. The searching substance was examined antimicrobial activity by disk method. The approximate composition of *Scutellariae Radix* was 8.93% of moisture, 4.13% of crude ash, 15.30% of crude protein, 3.71% of crude fat, 67.93% of carbohydrate, respectively. *Scutellariae Radix* was contained high contents of minerals such as K(12,050 mg/kg), Mg(4,295 mg/kg), remarkably. It was identified that molecular weight 445' peak was baicalin, molecular weight 283' peak was wogonin and molecular weight 269' peak was baicalein on *Scutellariae Radix* extract. Baicalin showed remarkable antimicrobial activity against *V. parahaemolyticus* and *L. monocytogenes* when examined by disk method, which was estimated antimicrobial activity substance in the *Scutellariae Radix* extract. The content of baicalin was 0.75%(with D.W.) and 0.82% (with methanol) in the *Scutellariae Radix* extract using HPLC.

Key words : *Scutellariae Radix* extract, LC-MS, baicalin, wogonin, baicalein

서 론

식품의 변질이나 부패를 억제하여 유통기간을 연장시키고 식품의 안전성을 확보하기 위하여 합성보존료 사용이 허용되고 있으나, 소득향상과 생활수준의 향상과 더불어 보다 신선하고 합성 보존료가 함유되어 있지 않은 식품이 선호되고 있다. 업계와 학계에서는 이러한 소비자의 기호도 변화에 따라 최소 가공된 냉장식품 및 냉동식품의 형태로써 유통과정 중 미생물학적 안전성 및 소비자의 기호도 향상을 위한 다양한 연구들이 수행되어지고 있다. 최근에는 한약재를 이용한 천연항균제의 개발에 대한 연구들도 활발하게 진행되고 있으며(1-3) 저자도 한약재를 이용하여

천연항균제 개발을 위한 연구를 수행한 결과(4)에서 황금(黃芩, *Scutellariae Radix*)의 강한 항균력을 확인할 수 있었다.

황금은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본식물로서 예로부터 환자의 치료를 위한 약재로써 사용되었는데 주요성분으로는 Baicalin, Baicalein, Wogonin 등이 알려져 있으며, 그 밖에도 Wogonoside (wogonin-n-glucuronide), Chrysin, Norwogonin, Scullcapflavone I, Scullcapflavone II (Neobaicalein), Oroxylin A 등의 flavonoids가 있는 것으로 보고되고 있다(5,6). 황금의 약리작용으로는 항allergy작용, 담즙분비촉진작용, 항균작용, 이뇨작용, 혈압강하작용, 고지혈증개선작용 등의 보고가 있지만(7, 8), 약리작용들에 대한 기능성 성분들의 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 황금을 이용한 천연항균제 개발을 위해 황금의 항균성 물질을 분리 동정하고자 황금추출물에 대해

[†]Corresponding author. E-mail : sunghecho@nongae.gsnu.ac.kr,
Phone : 82-55-751-5478, Fax : 82-55-753-4630

서 LC-MS를 이용하여 항균활성물질을 검색하고, 검색되어진 성분들에 대해서는 항균력을 비교함과 아울러, HPLC를 이용하여 그 함량을 측정하였다.

재료 및 방법

일반성분 분석

황금에 대한 일반성분의 분석은 AOAC법(9)에 준하여 수분은 105℃ 상압가열건조법, 조단백질 함량은 semimicro Kjeldahl법으로 측정된 질소량에 질소 계수를 곱하여 산출하였으며, 조지방은 Soxhlet 추출법으로 분석하였고, 조회분은 직접회화법으로 분석하였고 탄수화물은 총 100에서 수분, 조단백질, 조지방, 조회분을 뺀 값으로 계산하여 구하였다.

미량성분 분석

황금에 대한 미량성분의 분석은 AOAC법(9)에 준하여 회화로법으로 전처리한 시료를 1 N 염산용액에 녹여 유도 결합발광광도법(ICP, Inductively coupled plasma JY-138 ULTRACE, France)으로써 분석하였으며 ICP의 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. ICP operating conditions for determining mineral composition on *Scutellariae Radix* extract

Instrument	Inductively coupled plasma (JY-138 ULTRACE, France)
Power	1 KW
Nebulizer pressure	3 bars for meinhard type C
Aerosol flow rate	0.3 L / min
Sheath gas flow	0.2 L / min
Cooling gas	12 L / min

시험용액의 조제

황금추출물의 항균활성물질의 검색을 위한 황금의 메탄올추출물은 건조시켜 분쇄한 황금분말 10 g을 methanol 100 mL로써 상온에서 진탕추출하여 5000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 것을 25 mm Acrodisc syringe filter(pore size : 0.45 µm, PALL Corp. 이하, syringe filter)로 여과한 것을 사용하였고 황금의 물추출물은 열탕추출하여 조제된 분말 1 g을 취하여 methanol 100 mL로써 용해시킨 후, 5000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 것을 syringe filter로 여과하여 시험용액을 이용하였다.

LC-MS를 이용한 항균활성물질의 검색

조제된 시료는 LC-MS(Agilent 1100 LC-MS, USA)를 이용하여 분석하였으며, mass분석은 scan mode로써 황금의 주요성분인 baicalin, baicalein, wogonin의 분석에 적합하다

특 극성(polarity)을 negative로 선택하였고 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 2. LC-MS operating conditions for the analysis of *Scutellariae Radix* extract

Instrument	Agilent 1100 LC-MS, USA	
Column	BDS HYPERSIL C ₁₈ (2.0 × 125 mm)	
Mobile phase	Gradient method H ₂ O / Methanol	
Initial	80% / 20%	
4 min	70% / 30%	
15 min	30% / 70%	
20 min	30% / 70%	
25 min	80% / 20%	
Flow rate	0.2 ml / min	
Column Temp.	40℃	
Injection Vol.	10 µL	
- Mass Condition	Ionization mode	API - ES
	Drying gas flow	10 L / min
	Nebulizer pressure	20 psi
	Drying gas Temp.	350℃
	Capillary voltage	4,000 V
	Fragment Tor	180 V

LC-MS 검색 성분들의 항균력 시험

LC-MS로 검색된 성분들에 대하여 *Listeria monocytogenes* (이하, *L. monocytogenes*)와 *Vibrio parahaemolyticus*(이하, *V. parahaemolyticus*)를 시험균주로 하여 그 농도를 5, 10, 20, 50 ppm으로 달리하여 disk method(10)를 이용하여 항균력을 실험하였다.

HPLC를 이용한 항균활성물질의 정량

LC-MS에서 검색된 baicalin, baicalein, wogonin에 대하여 황금추출물들을 HPLC (TSP, Thermo Separation Products, USA)로써 정량분석 하였다. 항균활성물질의 정량을 위한 표준용액은 baicalin(99.0%, Wako), baicalein(99.0%, Wako), wogonin(98.0%, Wako)을 methanol로써 용해시킨 후, 최종 농도가 각각 450 ppm, 245 ppm, 245.8 ppm이 되도록 희석하여 사용하였고, HPLC의 분석조건은 Table 3과 같다.

Table 3. HPLC operating conditions for the analysis of *Scutellariae Radix* extract

Instrument	HPLC(TSP, Thermo Separation Products, USA)	
Column	Merck RP - 18e 4.5 × 100 mm	
Detector	UV 254 nm	
Mobile phase	95% Acetonitrile / 0.05% Trifluoroacetic acid(50% / 50%)	
Flow rate	1 mL / min	
Column Temp	Room temperature	
Injection Vol.	20 µL	

결과 및 고찰

황금의 일반성분 분석결과

황금의 일반성분을 분석한 결과는 Table 4와 같으며 수분 함량은 8.93%이었고, 조회분 함량은 4.13%이었으며, semimicro Kjeldahl법에 의해 측정된 질소량에 질소 계수 6.25를 곱하여 산출한 조단백질 함량은 15.3%이었고, Soxhlet추출법에 의한 지방의 함량은 3.71%이었으며 탄수화물은 67.93%로 분석되었다.

Table 4. Approximate compositions of *Scutellariae Radix*

Chemical components	<i>Scutellariae Radix</i> (Unit : %)
Moisture	8.93
Ash	4.13
Crude protein	15.30
Crude fat	3.71
Carbohydrate	67.93

황금의 미량성분 분석결과

황금의 미량성분들의 분석을 위해 ICP를 사용하여 측정된 결과는 Table 5와 같으며, 칼륨(12,050 mg/kg)과 마그네슘(4,295 mg/kg)의 함량이 현저하게 높은 것을 볼 수 있었다.

Table 5. Mineral compositions of *Scutellariae Radix*

Chemical components	<i>Scutellariae Radix</i> (Unit : mg/kg)
Sodium	1,315
Calcium	2,000
Potassium	12,050
Magnesium	4,295
Zinc	55.5
Iron	29.0
Copper	12.5
Phosphorous	3,770

LC-MS를 이용한 황금추출물의 항균활성 물질 검색

LC-MS를 이용하여 황금의 메탄올 및 물추출물에서 얻어진 total ion chromatogram의 peak들에 대해서 mass spectrum 분석을 통하여 확인된 물질인 baicalin, baicalein, wogonin의 정성분석 결과는 Fig. 1~4와 같다. 황금의 메탄올 및 물추출물의 분석을 위하여 극성(polarity)은 negative를 선택하여 탈수소화(deprotonation) 되어졌고, 얻어진 total ion chromatogram의 peak들에 대한 mass 분석에서 분자량은 스펙트럼 상에서 [M-H]⁻ 형태로 분석되었다. Flow

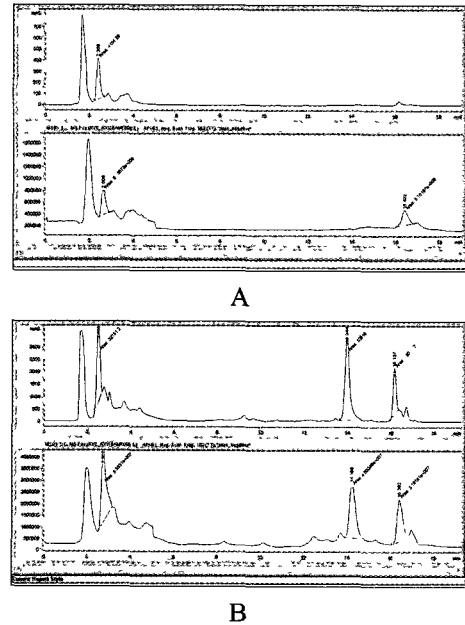


Fig. 1. Total ion chromatogram from *Scutellariae Radix* extract. A · methanol extract, B · DW extract

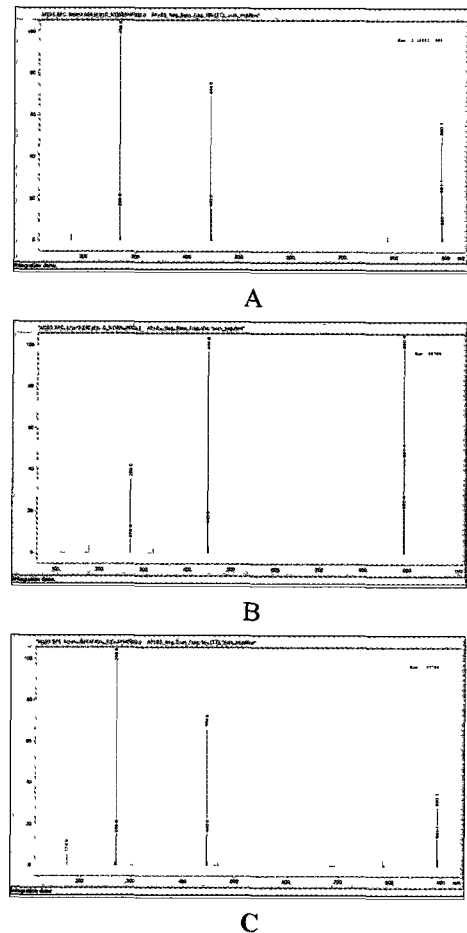


Fig. 2. LC-MS spectrum of peak 1 isolated from *Scutellariae Radix* extract and baicalin standard. A methanol extract, B DW extract, C baicalin standard

injection analysis 방법으로 fragmentor voltage를 변경해가면서 확인된 표준물질들의 최대감도는 fragmentor voltage 180 V에서 나옴을 알 수 있었다. 메탄올추출물은 분자량 445, 269, 283의 mass spectrum을 확인할 수 있었고, 물추출물에 있어서는 분자량 445, 283의 mass spectrum을 볼 수 있었다. 표준물질들의 mass spectrum을 분석한 결과 baicalin은 445, baicalein은 269, wogonin은 283의 분자량을 볼 수 있었다. 메탄올 및 물추출물에 있어서 분자량 445의 peak 1은 baicalin, 메탄올 및 물추출물에 있어서 분자량 283의 peak 3과 2는 wogonin, 메탄올추출물에 있어서 분자량 269의 peak 2는 baicalein으로 확인되었다.

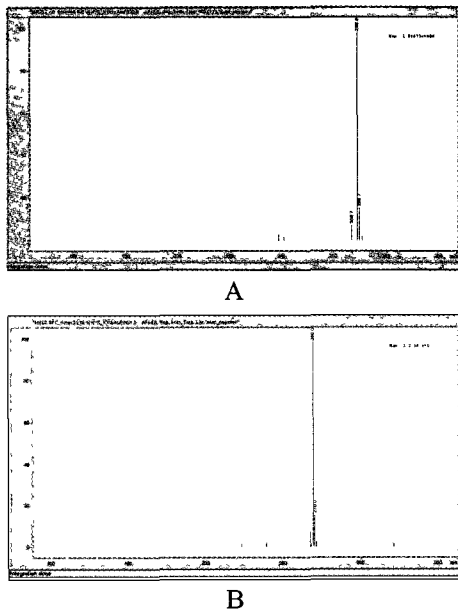


Fig. 3. LC-MS spectrum of peak 2 isolated from *Scutellariae Radix* extract and baicalein standard.

A methanol extract, B . baicalein standard

LC-MS 검색 성분들의 항균력 시험

LC-MS로 동정된 성분들에 대하여 *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*를 시험균주로 하여 그 농도를 5, 10, 20, 50 ppm으로 달리하여 disk method를 이용하여 항균력을 시험한 결과 Fig. 5에서 보듯이 baicalin에서 항균력이 뛰어난 것으로 확인되어져 황금추출물의 항균활성 물질은 baicalin이 원인물질임을 추정할 수 있었다.

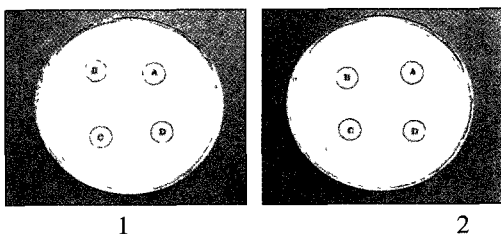


Fig. 5. Inhibitory effect of baicalin on the growth of food-borne infection bacteria.

1 *L. monocytogenes*, 2 *V. parahaemolyticus*,
A 5 ppm, B 10 ppm, C 20 ppm, D 50 ppm

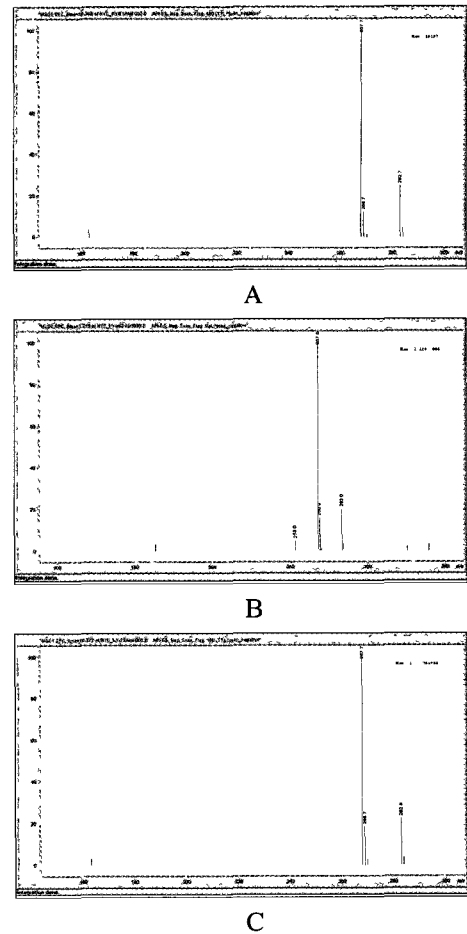


Fig. 4. LC-MS spectrum of peak 3 isolated from *Scutellariae Radix* extract and wogonin standard.

A methanol extract, B DW extract, C wogonin standard

HPLC를 이용한 황금추출물 항균활성물질의 정량

황금의 메탄올 및 물추출물 중에 존재하는 baicalin, baicalein 및 wogonin의 정량을 위한 HPLC 분석결과는 Fig. 6, 7 및 8과 같다. Chromatogram에서 보는바와 같이 baicalin의 함량은 메탄올 및 물추출물에 있어서 큰 차이를 보이지는 않았지만, baicalein과 wogonin에 있어서는 큰 차이가 있는 것을 볼 수 있으며, 이는 LC-MS분석에 있어서 total ion chromatogram에서의 결과와 일치하였다. 항균력 시험 결과 항균활성물질로 추정되는 baicalin에 대한 메탄올 및 물추출물의 함량을 분석한 결과 메탄올추출물은 0.82%이며, 물추출물은 0.75%로써 메탄올추출물의 함량이 약간 높았다. 그러나 식품에 대한 천연항균제로서의 적용에 있어서 추출비용, 추출용매의 잔류, 분말의 조제 등의 가공성을 고려하여 메탄올보다는 물을 추출용매로 이용하는 편이 유리하다고 판단되어졌다. 이(13)는 황금의 유효성분 최적의 추출조건에서 메탄올을 추출용매로 하여 baicalin의 함량을 6.422%, 물에서는 5.369%까지 추출하였다고 보고하였는데, baicalin의 추출효율은 보다 향상시킬 수 있다고 여겨졌다.

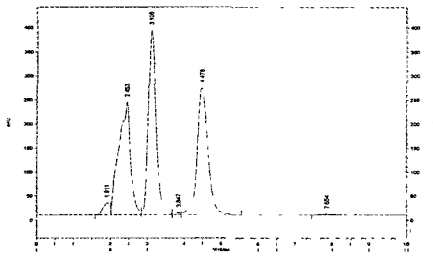


Fig. 6. HPLC chromatogram of standards(baicalin, baicalein, wogonin).

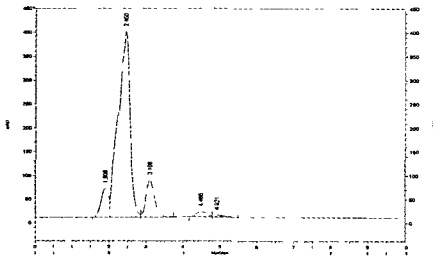


Fig. 7. HPLC chromatogram of *Scutellariae Radix* extract with methanol.

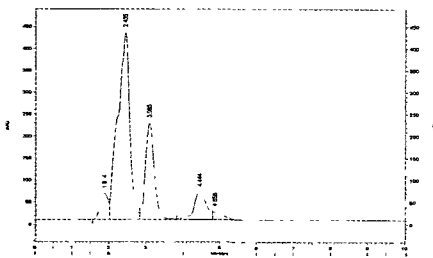


Fig. 8. HPLC chromatogram of *Scutellariae Radix* extract with D.W.

요 약

황금의 천연항균제 개발을 위하여 황금의 일반성분 및 미량물질들을 분석하였으며 항균활성물질의 검색을 위하여 LC-MS를 이용하였고 검색되어진 성분들에 대해서는 항균력 비교시험을 하였으며 항균활성물질들에 대해서는 HPLC를 이용하여 그 양을 정량하였다. 황금의 일반성분으로는 수분 8.93%, 탄수화물 67.93%, 조회분 4.13%, 조단백질 15.30% 및 조지방 3.71% 이었고 미량성분에 있어서는 칼륨 12,050 mg/kg과 마그네슘 4,296 mg/kg의 함량이 현저하게 높았다. LC-MS 분석결과 황금추출물에 있어서 분자량 445의 peak는 baicalin, 분자량 283의 peak는 wogonin, 분자량 269의 peak는 baicalein으로 확인되었다. disk

method를 이용하여 항균력을 시험한 결과 baicalin이 주된 항균물질임을 추정할 수 있었으며, 메탄올 및 물추출물의 baicalin 함량을 분석한 결과 물추출물은 0.75%이었고 메탄올추출물은 0.82%로서 메탄올추출물에 있어서 baicalin 함량이 약간 높은 결과를 얻었다.

참고문헌

1. Oh, D.H., Ham, S.S., Park, B.K., Ahn, C. and Yu, J.Y. (1998) Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms, Korean J. Food Sci. Technol., 30, 957-963
2. Shin, D.W., Kim, M.S. and Han, J.S. (1997) Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-borne bacteria. Korean J. Food Sci. Technol., 29, 808-816
3. Odachi, J., Ishii, E., Fukumoto, A. and Tanaka, M. (1993) Antimicrobial activity of medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Seikatsu Eisei, 37, 15-19
4. Cho, S.H. and Kim, Y.R. (2001) Antimicrobial Characteristics of *Scutellariae Radix* Extract, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30, 964-968
5. 富森毅, 神久徳, 宮一論起範, 豊福信吾, 難波恒雄 (1985) *Scutellaria*屬 植物の成分研究(第六報)黄芩のフラボノイド成分についてその5クロマトグラフィによる定量, 漢藥雜誌, 105, 148-155
6. Tani, T., Katsuki, T., Kubo, M. and Arichi, S. (1985) Histochemistry VII. Flavonoids in *Scutellariae Radix*, Chem. Pharm. Bull., 33, 4894-4900
7. 장상문, 최정, 김종완, 박명윤, 박선동 (1996) 한약자원 식물학 p.273-276, 학문출판(주), 서울
8. 안덕균 (2002) 한국본초도감 p.121, (주) 교학사, 서울
9. A.O.A.C. (1990) Official Methods of Analysis. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., p.40-84
10. Davidson, P. M. and Parish, M E (1989) Methods for testing the efficacy of food antimicrobials, Food Technology, 148-155
11. 이제현 (1995) 황금(*Scutellariae Radix*)의 성분분석 방법 및 정량에 관한 연구, 경희대학교 석사학위논문

(접수 2005년 4월 8일, 채택 2005년 7월 22일)