

갈근 추출물의 항산화와 수복효과에 관한 연구

신선우 · 신정미 · 육찬남¹ · 나영순² · 백승화*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1:원광보건대학 식품영양과, 2:건양대학교 미용과학과

In Vitro Antioxidant and Repaired Effects of the Extracts from *Pueraria thunbergiana* Roots

Sun Woo Shin, Joung Mi Shin, Chan Nam Yook¹, Young Soon Na², Seung Hwa Baek*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,
1: Department of Food Nutrition, Wonkwang Health Science College,
2: Department of Beauty Science, Konyang University

The antioxidative activity was observed in the ethyl acetate extract (IC₅₀, 119 ± 0.16 µg/mL) from *Pueraria thunbergiana*. The DPPH radical scavenging effect of this extract was comparable with that of synthetic antioxidant, BHA (IC₅₀, 88.39 ± 1.1 µg/mL) × 10⁻³ µM. *Pueraria thunbergiana* extracts against microorganisms were evaluated in terms of the minimum inhibitory concentrations (MIC). In general, *C. albicans* was stronger antimicrobial activity than the other microorganisms. *In vitro* the antitoxic activity of extracts of *Pueraria thunbergiana* on NIH 3T3 fibroblasts was evaluated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) method. Generally, detoxification effect by the extracts of *Pueraria thunbergiana* increased in proportion to the concentrations. When 10 µg/mL of the hexane extract of *Pueraria thunbergiana* was treated it showed the highest antitoxic effects (p<0.01). These results suggest that the crude extract of *P. thunbergiana* has a potential therapeutic activity.

Key words : *Pueraria thunbergiana*, Antimicrobial activity, Cytotoxicity, Minimum inhibitory concentration (MIC)

서 론

취 (*Pueraria species*)은 콩과에 속하는 다년생 덩굴식물로서 우리나라 전역의 산지 및 중국, 일본, 남아메리카, 멕시코 및 미국의 일부에서 야생하는 등 온대 및 열대지방에 널리 자생하는 두과식물 (Leguminosae)이다.

한방에서는 그 뿌리를 갈근이라 부르고 다년생의 낙엽성 활엽 덩굴나무로 뿌리를 건조하여 사용하며, 갈근은 크게 두 종류로¹ 엽계 종(縱)으로 자른 것을 板葛根이라고 하고, 5 mm 정도의 角이 있도록 자른 것을 角葛根이라고 한다.

갈근에는 10 ~15%에 달하는 전분과 9종류의 saponin, 혈관 확장, 혈당치 강하, 해열작용 등을 나타내는 flavonoids, 그리고 isoflavonoids인 daidzin과 근육의 긴장이나 경련을 완화시키는 진경작용을 나타내는 daidzin, 가장 많이 함유된 puerarin 등으로

구성되어 있다.

한의학에서의 갈근은 청량성 발한제로서 상한, 중풍 초, 중기의 두통, 구갈, 이질, 복통, 발열, 무한 등에 활용되고, 또한 설사를 멈추는데 탁효가 있다¹⁾. 갈근 추출물에 대한 MTT의 흡광도는 갈근 추출물의 농도에 의존하여 감소하였으며, 갈근 물추출물의 0.01 mg/mL 농도에서 통계적으로 유의성 (p<0.05 - 0.01) 있는 카드뮴 해독경감효과를 관찰할 수 있었다. 그렇지만 비극성용매로 추출한 헥산 추출물의 경우, 카드뮴에 대한 해독경감효과가 카드뮴의 억제농도인 IC₅₀농도와 비교할 때 0.01 mg/mL 농도에서 가장 큰 차이의 높은 수복율 (19.0%)이 관찰되었다²⁾.

갈근의 크로르포름 추출물, 에틸 아세테이트추출물과 메탄올 추출물에 대한 항진균효과 (MIC, 800 µg/mL)는 효모형 진균인 *C. albicans*에 대한 활성이 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S.aureus*보다 높게 관찰되었으며, 물추출물의 *S. epidermidis* 와 *S. aureus*에 대한 항균효과는 최고억제농도 (MIC, 1,600 µg/mL)로 관찰되었다. 갈근연속추출물에서 에틸아세테이트 추출물의 항산화활성 (IC₅₀, 119.87 ± 0.16 µg/mL)은 가장 좋은 활성을 얻었다³⁾.

* 교신저자 : 백승화, 의산시 신용동 한의학전문대학원 한약자원개발학과

· E-mail : shbaek@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6225

· 접수 : 2006/06/08 · 수정 : 2006/07/05 · 채택 : 2006/07/30

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 칩 (*Pueraria thunbergiana* Benth.)은 2002년 10월에 충남 논산시 노성면 가곡리산에서 채집한후에 음건하여 외부형태를 검정한 후, Blender로 분쇄하여 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과에 보관되어 있다.

2. 기기 및 시약

Rotary vaccum evaporator (EYELA : N-N Series, Swizerland), freezing dryer (-50℃ 이하, vaccum 5 microns Hg 이하 : F. D8510, Ilshin Lb Co.), CO₂ incubator (NUAIRE), ELISA reader (Molecular devices, spectra MAX 340, USA), Microscope (Olimpus, CK2, USA), NMR스펙트럼은 FT/NMR spectrometer, model JEOL-ECP 500을 사용하였으며, Dimethyl sulfoxide-d₆를 용매로 사용하였으며, 내부표준물질로 tetramethyl- silane (TMS)를 기준으로 0 (0.00 ppm)으로 측정하였다. *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol (DAEJUNG)은 재증류하여 사용하였으며, 물은 3차 증류수를 사용하였다.

3. 추출방법

본 연구에 사용된 칩뿌리 (갈근, 5,000 g)를 세절하여 Blender로 분쇄하여 사용하였다. 갈근을 *n*-hexane (3 x 15,000 mL)으로 상온에서 24시간동안 진탕하면서 3회 추출한후, Hexan추출액을 0.4 μm 여과지로 여과하여 35℃에서 감압농축하여 Hexan추출물을 얻었다. 위와같은 방법으로 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메탄올로 추출하여, 클로로포름 추출물, 에틸 아세테이트 추출물, 메탄올 추출물을 얻었다. 위 추출물의 잔사를 80℃ - 85℃에서 4시간동안 진탕하면서 3회 환류추출하여 물 추출물을 얻었다.

4. 사용균주 및 배지

실험에 사용된 균주는 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, JC-2), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*, ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 29213)와 *Candida albicans* (*C. albicans*, KCTC 1940)를 사용하였다. 세균배양에 사용된 배지는 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*는 Brain heart infusion (BHI, Difco)를 사용하였고, *C. albicans*는 Saboroud (증류수 1L에 Bacto-peptone 10 g, Bacto-dextrose 40 g)를 사용하였다.

5. 항균력 측정

항균효과를 파악하기 위하여 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 액체배지 희석법^{4,6)}을 이용하였으며, 96-microwell plate (Nunclon, Denmark)에 각 추출물의 농도를 최고 3,200 μg/mL에서 최저농도 100 μg/mL까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. 각 균주는 단일 콜로니를 액체 배지에 접종하고, 37℃배양기에서 18시간동안 배양한 균주 (10⁵ cells/mL)를 접종하여 37℃ 배양기에서 24시간 배양 한 후,

ELISA (Spectra Max 250, Molecula Devecas, USA)에 의한 흡수광도 630 nm에서 흡광도를 측정하여 배지의 탁도를 확인 하였고, 순수 배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 MIC로 결정하였으며, MIC의 수치가 낮은 것을 항균효과가 높은 것으로 판정하였다.

6. 항산화 측정

칩 뿌리의 추출물로부터 유용활성물질을 탐색하기 위해 항산화 활성을 검정하였으며, 자유 라디칼인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, (DPPH)을 사용한 항산화활성 측정방법을 이용하였다. 실험관에 메탄올을 넣고 시료 화합물을 농도별로 첨가 한다음 상기 DPPH (0.3 mM) 용액을 500 μL 첨가하여 실온에서 30분간 반응시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다⁷⁾.

7. MTT 정량분석법

Mosmann의 방법에⁸⁾ 의하여, NIH 3T3 섬유모세포를 5 × 10⁴ cells/well이 되도록 조절하여 1 mL씩 24 well plate에 분주하고 24 시간 배양하였다. NIH 3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴의 MTT₅₀ (midpoint inhibition value)농도를 결정하였다. 수복실험은 6개군으로 구분하였는데, 배양액만으로 배양한 군을 대조군, MTT₅₀량의 카드뮴과 배양액으로 배양한 군을 MTT₅₀량과 각각의 갈근 추출물의 10.0 μg/mL - 0.01 μg/mL농도를 배양액에 넣어 배양한 군은 실험군으로하여 48시간 배양완료 후, 분석당일 조제한 MTT (Sigma)가 50 μg/mL가 함유된 배양액을 well당 1 mL씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide (DMSO)를 2 mL/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader (Spectra MAX 250, USA, 540 nm)로 MTT의 흡광도를 측정하여 MTT₅₀군과 비교 조사하였다.

8. 세포의 광학현미경적 관찰

광학현미경으로 세포를 관찰하기위하여, NIH3T3 섬유모세포는 MTT정량을 하기전에 도립현미경 (Inverted microscope, Olympus)으로 관찰하고, 사진을 촬영하였다.

9. IC₅₀ 결정

카드뮴의 IC₅₀ 결정은 배양중인 NIH3T3 섬유모세포를 각 배양용기당 5 × 10⁴ cells/mL씩 넣고 24시간 배양한 다음, 산수유 연속추출물의 10.0 μg/mL - 0.01 μg/mL농도를 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT 정량을 하여 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC₅₀을 희귀직선식에 의해 구하였다⁹⁾.

10. 시료의 처리

조제한 시료는 즉시 4℃ 냉장고에 저장하였고, 사용직전에 10% DMSO에 희석하여 실험에 사용하였다.

11. 통계학적 해석

실험결과의 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, p-value가 0.05미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 갈근 연속추출물의 피부염증균에 대한 항균효과와 항산화

최의 뿌리를 유기용매를 사용하여 극성이 낮은 용매로부터 극성이 높은 용매로 상온에서 연속추출하여 얻은 추출물과 그 잔사는 물을 80-85℃에서 4시간동안 추출하여 얻은 결과, 용매의 극성에 따라 추출물의 수득율은 증가함을 볼 수 있었다. 갈근 연속추출물에 대한 항산화효과를 DPPH법을 이용하여 측정한 결과 에틸 아세테이트 추출물에서 가장 활성 (IC₅₀, 119.87 µg/mL) 이 높게 관찰되었으며, 용매의 극성이 증가하는 순서인 메탄올추출물 (IC₅₀, 146.36 µg/mL), 물추출물 (IC₅₀, 171.18 µg/mL)로 항산화활성이 감소하는 경향이 관찰되었으나, 극성이 약한 크로로포름 추출물 (IC₅₀, 220.45 µg/mL)으로 감소하였으며, 헥산 추출물 (IC₅₀, > 1000.00 µg/mL)에서는 항산화활성이 거의 관찰되지 않았다. 갈근추출물에 대한 항산화활성은 에틸 아세테이트추출물 (IC₅₀, 119.87 µg/mL) > 메탄올추출물 (IC₅₀, 146.36 µg/mL) > 물추출물 (IC₅₀, 171.18 µg/mL) > 크로로포름 추출물 (IC₅₀, 220.45 µg/mL) > 헥산 추출물 (IC₅₀, 3,900 µg/mL)순서로 감소되었다. 그러나 기준물질로 사용한 항산화물질인 BHA (IC₅₀, 14.0 µg/mL)과 α-tocopherol (IC₅₀, 12.0 µg/mL)은 에틸 아세테이트추출물에 비하여 높은 활성이 관찰되었다. 그렇지만, 에틸 아세테이트추출물 (IC₅₀, 119.87 µg/mL)의 높은 항산화활성은 synergistic effect에 기인되는 것으로 생각된다 (Fig. 1).

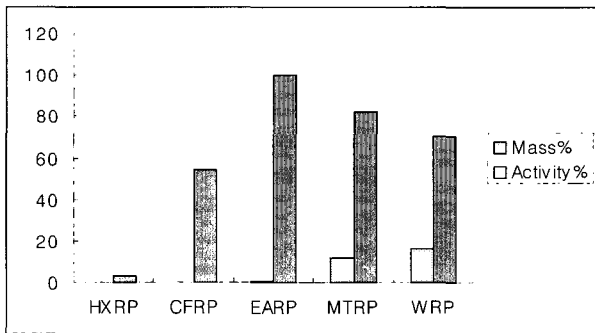


Fig. 1. Mass and antioxidative activity of the extracts of *Pueraria thunbergiana* Benth. roots. Plant extracts: HXRP: n-Hexane extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. CFRP: Chloroform extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. EARP: Ethyl acetate extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. MTRP: Methanol extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. WRP: Water extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth.

연속추출물에 대한 항균효과를 측정한 결과, 극성이 낮은 헥산과 크로로포름용매로 추출한 추출물에 대하여 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*에 대한 최소억제농도는 3,200 µg/mL이상으로 항균활성이 나타나지 않았다. 그러나 *C. albicans*는 크로로포름 추출물에서 최소억제농도가 800 µg/mL으로 항진균활성이 관찰되었다. 에틸 아세테이트 추출물과 메탄올 추출물에 대하여 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*에 대한 최소억제농도는 3,200 µg/mL으로 항균활성이 나타났다. 진균인 *C. albicans*는 헥산 추출물과 물추출물을 제외하고는 모든 추출물에서 최소억제농도가 높은 800 µg/mL으로 항진균활성이 관찰되었으며, 물추출물의

*S. epidermidis*와 *S. aureus*에 대한 최소억제농도는 1,600 µg/mL으로 다른 추출물의 항진균성보다 높게 나타났다. 최뿌리를 연속추출한 크로로포름 추출물, 에틸 아세테이트 추출물과 메탄올 추출물은 효모형 진균인 *C. albicans*에 대한 항진균효과를 함유한 생리활성물질이 포함되어 있으리라 생각된다(Table 1). ¹H-NMR 스펙트럼 분석한 결과에 의하면, A환의 oxygenated pattern 가운데 5번이 oxygenate 안되고 7번만되면 5-H는 C환의 C=O group의 anisotropic effect로 인하여 8번 proton이 6번 proton보다 low field에서 나타나며, 5-H는 7.9~8.2 ppm 근방에서 나타난다. B환 proton은 A환보다는 high field로 나타나며, 3', 5' proton이 2', 6'보다 high field에 나타난다. 3', 5' proton은 6.8 ppm 근방에 나타나며, 2', 6' proton은 C-2, C-3위치에 double bond로 인하여 더욱 low field로 shift됨은 알 수 있었다^{10,11}. Daidzin의 O-glucose는 C-O bond에 기인된 C-1 proton이 5.1 ppm에서 관찰되었으며, puerarin의 C-glucose C-1 proton이 4.8 ppm의 high field에서 나타났다. 이는 C-glucose에 의한 C-C bond의 sp³에 기인된 것이며, 3.1~5.2 ppm에서 관찰된 peak는 glucose의 특징적인 peak로 생각된다. 갈근의 에틸 아세테이트 추출물은 daidzin과 puerarin 화합물에 의하여 항산화활성이 나타나는 것으로 사료된다.

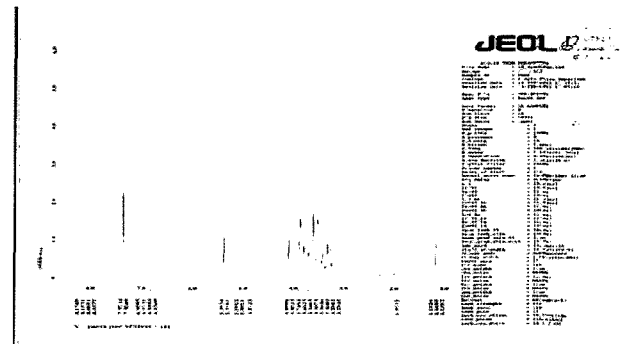


Fig. 2. ¹H-NMR Spectrum of the ethyl acetate extract of *P. thunbergiana* Benth.

Table 1. Antimicrobial effect of the extracts of *Pueraria thunbergiana* Benth. roots.

Tested material	MIC (µg/mL)*			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. epider.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
HXRP	>3,200	>3,200	>3,200	>3,200
CFRP	>3,200	>3,200	>3,200	800
EARP	3,200	3,200	3,200	800
MTRP	3,200	3,200	3,200	800
WRP	>3,200	1,600	1,600	>3,200

*Each extract was examined in triplicate experiments. Plant extracts: HXRP: n-Hexane extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. CFRP: Chloroform extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. EARP: Ethyl acetate extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. MTRP: Methanol extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. WRP: Water extract of the root of *Pueraria thunbergiana* Benth.

2. 갈근 연속추출물의 카드뮴독성에 대한 경감효과

일반적으로, 갈근 추출물에 대한 MTT의 흡광도는 갈근 추출물의 농도에 의존하여 감소하였으며, 갈근 추출물의 10 µg/mL농도에서 통계적으로 유의성 (p < 0.05 - 0.01)있는 카드뮴해독경감효과를 관찰 할 수 있었다. 그렇지만 비극성용매로 추출

한 핵산 추출물의 경우, 카드뮴의 억제농도인 IC₅₀농도와 10 μg/mL농도에서 가장 큰 차이의 카드뮴에 대한 독성경감효과(19.0%)가 측정되었다. 이와같은 연구결과는 갈근 핵산 추출물중에 카드뮴과 착물을 형성하므로 카드뮴독성을 억제할 수 있는 배위화합물이 가장 많이 함유되었음을 시사하고 있으리라 생각된다 (Fig. 3).

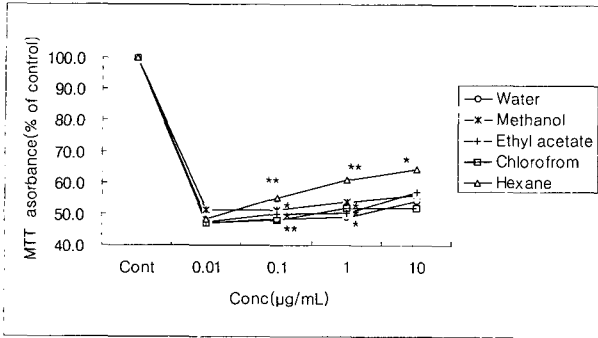


Fig. 3. The MTT absorbance of the solvent extracts from the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. on NIH3T3 fibroblasts treated with cadmium. Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments.

3. 갈근 연속추출물의 NIH 3T3섬유모세포에 대한 세포독성

NIH 3T3 섬유모세포를 갈근 연속 추출물을 10 μg/mL - 0.01 μg/mL농도에서 세포독성을 측정하여, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 μg/mL농도에 대한 흡광도를 비례적으로 측정할 결과, 추출물의 세포독성은 94% - 100% 측정치를 관찰되어 세포독성이 미미한 것으로 사료된다. NIH 3T3섬유모세포에 대한 MTT 정량분석법으로 세포독성의 민감성을 측정할 세포독성은 다음과 순서로 감소되었다. 갈근 메탄올 추출물 (IC₅₀= 9,960 μg/mL) > 갈근 크로로포름 추출물 (IC₅₀= 9,970 μg/mL) > 갈근 물 추출물 (IC₅₀= 9,980 μg/mL) > 갈근 에틸 아세테이트 추출물 (IC₅₀= 10,020 μg/mL) > 갈근 핵산 추출물 (IC₅₀= 11,300 μg/mL) (Fig. 4).

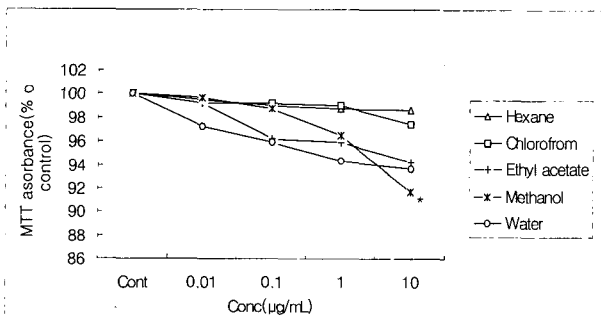


Fig. 4. In vitro cytotoxicity of the solvent extracts from the root of *Pueraria thunbergiana* Benth. on NIH3T3 fibroblasts by the MTT method. These extracts were serially diluted in RPMI-1640 with 10% FBS and mixed with equal volume of NIH 3T3 fibroblasts (5×10^4 cells). The colorimetric assay was performed as described in the materials and methods section. Data are mean values of results obtained from three sets of experiments. Significantly different from the control values: *p<0.05. (Student's t-test).

결론

본 연구에서는 갈근을 유기용매와 물로 연속추출하여 얻은 갈근 연속추출물이 피부염증균에 대한 항균효과와 항산화, 카드뮴독성에 대한 경감효과와 세포독성을 검색하여 다음과 같은 실험결과를 얻었다. 결론적으로 갈근의 크로로포름 추출물, 에틸 아세테이트추출물과 메탄올추출물에 대한 항진균효과 (MIC, 800 μg/mL)는 효모형 진균인 *C. albicans*에 대한 활성이 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*보다 높게 관찰되었으며, 물추출물의 *S. epidermidis*와 *S. aureus*에 대한 항균효과는 최소억제농도 (MIC, 1,600 μg/mL)로 관찰되었다. 갈근연속추출물에서 에틸아세테이트 추출물의 항산화활성 (IC₅₀, 119.87 ± 0.16 μg/mL)은 가장 좋은 활성을 얻었으며, 갈근 추출물에 대한 MTT의 흡광도는 갈근 추출물의 농도에 의존하여 감소하였으며, 갈근 물추출물의 10.0 μg/mL농도에서 통계적으로 유의성 (p<0.05 - 0.01)있는 카드뮴해독경감효과를 관찰할 수 있었다. 그렇지만 비극성용매로 추출한 핵산 추출물의 경우, 카드뮴에 대한 독성경감효과가 카드뮴의 억제농도인 IC₅₀농도와 비교할 때 10.0 μg/mL농도에서 가장 큰 차이의 수복을 (19.0%)이 관찰되었다. 향후 최 연속추출물에 대한 생리활성물질을 분리 및 분석을 통하여, 이들 화합물에 대한 약리효과를 연구하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 원광보건대학 교비연구비에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 이현옥, 김창희, 임진아, 이미희, 백승화. 최 추출물의 구강미생물에 대한 항균효과. 한국치위생과학회 4(1):45-48, 2004.
- 이미희, 임지연, 김연하, 오현주, 백승화. 갈근 추출물이 NIH 3T3 섬유모세포의 카드뮴 독성에 대한 수복효과 (II). J. Cosm Pub. Health, 1(1):19-23, 2005.
- 신정미, 유형원, 이현옥, 이미희, 백승화. Isoflavonoid의 피부염증균에 대한 항균효과와 항산화(III). J. Pharm. Soc. Korea, 50:15-20, 2006.
- Cho, H., Weon, R.S., Yang, J.H. Antimicrobial effect of the extract of *Sophora flavescens* Ait (I). J. Pharm. Soc. Korea. 43:419-422, 1999.
- Kim, K.Y., Chung, D.O., Chung, H.J. Chemical composition and antimicrobial activities of *Houttuynia cordata* Thunb. Korea J. Food Sci. Technol. 29(3):400-406, 1997.
- Chung, B.S., Kim, H.S., Kim, S.K. Susceptibility tests of *Candida* species isolated from vagina. J. Korean Soc. Microbiol., 24(5):523-526, 1989.
- Jang, M.J., Woo, M.H., Kim, Y.H., Jun, D.Y., Rhee, S.J. Effects of antioxidative, DPPH radical scavenging activity and

- antithrombogenic by the extract of sancho (*Zanthoxylum Schinifolium*). Kor. Nut. Soc., 38(5):386-394, 2005.
8. Mosmann, T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and Survival application of proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65:55-63, 1983.
 9. 채영암, 구자욱, 서학수, 이영만. 기초 생물통계학. 향문사. p 179-198, 1991.
 10. Lee, S.J., Baek, H.J., Lee, C.H. and Kim, H.P. Antiinflammatory activity of isoflavonoids from Pueraria radix and biochanin A derivatives. Arch. Pham. Res., 17(1):31-35, 1994.
 11. Kang, S.S. Applications of NMR spectroscopy in analysis of flavonoids. YAKHAK HOEJI, 26(3):139-148, 1982.