Korean J. Food Preserv.
Vol. 14, No. 3. pp. 332-335, June 2007

사단법인 한국식품저장유통학회
THE KOREAN SOCIETY OF FOOD PRESERVATION

연구노트

야관문(*Lespedeza cuneata*) 종자의 열수 및 Ethanol 추출물의 항산화 효과

김선재† · 김두운
전남대학교 식품공학 · 영양학부

Antioxidative Activity of Hot Water and Ethanol Extracts of *Lespedeza cuneata* Seeds

Seon-Jae Kim† and Du-Woon Kim
Division of Food Technology and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu, 550-749, Korea

Abstract

Hot water and 95% (v/v) ethanol extracts were prepared from dried *Lespedeza cuneata* seeds and antioxidant compounds were isolated by solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and preparative HPLC. Antioxidant activity was measured using DPPH radical scavenging activity. The 80% (v/v) ethanol and ethylacetate fraction of *Lespedeza cuneata* seed extracts had stronger antioxidant effects than did the n-hexane fraction. The active antioxidant compounds obtained from hot water and 95% (v/v) ethanol extracts may be identical, based on analysis by Sephadex LH-20 column chromatography and preparative HPLC.

Key words : *Lespedeza cuneata* seed, antioxidative activity

서 론

인간의 신체는 끊임없이 반응성이 강한 산소화합물(reactive oxygen species; ROS)과 유리기를 생성함으로써, 산화물질(pro-oxidation)을 축적한다. 또한 이에 대한 방어기전으로 산화억제물질(antioxidants)을 형성하여 산화물과 균형을 이루어 건강을 유지하게 한다(1-4). 그러나 현대인들은 스트레스, 환경오염, 약물, 유전적요인 등에 의해 생성되는 산화물에 노출되어 있기 때문에 산화와 항산화물간의 동적 평형상태를 유지하지 못하고 있다. 그 결과 심혈관계 및 만성 퇴행성 질환, 동맥경화증, 백내장, 노화, 암 등 각종 생활습관병의 질환 발병률이 점점 증가하고 있다. 따라서 산화물을 제거하고 더 이상 산화 진행을 막아주는 항산화물의 중요성과 필요성이 더욱 높아지고 있다(5,6). 이러한 항산화제들은 생리활성를 나타내는 2차대사산물로서 어느 특정 생물에 분포되어 있어 식물체의 생합성과정 중 소량씩 생성되는데 flavonoid, terpenoid, steroid, alkaloid, quinone, tannin, indole, coumarin 및 plant sterol 등이 그 대표적인 성분들이다. 이 생리활성 성분들은 매우 적은 양으로도 고유의 생리활성을 나타내며, 분자량은 2,000 dalton 이하의 저분자물질로부터 수만 이상의 고분자 물질로 구분되며, 이러한 성분들은 여러 가지 생약재를 대상으로 연구가 보고되고 있다(7,8).

야관문(*Lespedeza cuneata*)은 콩과의 여러 해살이 식물로 비수리, 삼엽초 등의 여러 가지 이름으로 불리며, 우리나라와 일본, 중국, 대만 등지에 분포하고 있다. 황폐지의 지피물 조성과 지력증진 식물로 널리 이용되는 흔한 식물이지만, 예로부터 민간에서는 음위증이나 조루, 유정, 기침, 천식 등의 치료에 효능이 있는 약제로 쓰여 왔으며, 야관문의 생리활성물질로는 pinitol, flavoloid, phenol 성분, tannin 및 β-sitosterol을 함유하며, flavonoid 중에서도 quercetin, kaempferol, vitexin, orientin 등이 분리되어 있음이 보고되었다(9,10).

본 연구에서는 야관문의 종자가 시중에 생약재로서 건조품으로 판매되어 약탕기 또는 주정으로 용출하여 음용하고

†Corresponding author. E-mail : foodkims@chonnam.ac.kr,
Phone : 82-61-659-3214, Fax : 82-61-659-3219

있어, 야관문의 열수 및 ethanol추출조건에 따른 항산화활성의 변화를 비교 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

본 연구에 사용되는 야관문 종자는 전남생약농업협동조합(진남 화순군 소재)에서 구입하여 건체 종자의 이물질을 송풍으로 제거하고 실험재료로 사용하였다.

야관문 종자의 추출

야관문 종자로부터 항산화물질의 추출은 열수 추출 및 ethanol 추출조건으로 나누어 실시하였다. 야관문 종자 100g을 약탕기(DWP-5000M, Daewoong Co., Korea)에 약 3배량의 증류수를 가하여 2시간 열수 추출하였다. 추출액을 glass filter로 여과하여 여액과 잔사를 얻었고, 이 잔사를 증류수로 2회 반복하여 추출·여과하였다. 얻어진 여액을 cooling aspirator(CCA-1110, EYELA, Japan)가 장착된 진공농축기(N-1000, EYELA, Japan)로 60℃에서 감압 농축하여 열수 추출물을 얻었다. 이어 야관문 100 g을 0-95% ethanol 용액으로 추출하고 얻어진 ethanol 여액을 상기와 동일한 방법으로 농축한 후 ethanol 추출물을 얻었다.

항산화 활성의 측정

야관문 종자의 항산화활성 측정은 DPPH(α,α-diphenyl-picrylhydrazyl) radical- scavenging에 의한 항산화 활성을 측정하였다. DPPH ethanol 용액(20 μM) 2,900 μL 에 열수 추출물 및 ethanol 추출물 10 μL를 가하여 혼합한 후, 암소에서 30분간 반응시켜 517 nm에서 UV/Vis spectrophotometer (Optizen 2120 UV, Mecasys Co., Korea)로 흡광도를 측정하였다. DPPH radical이 완전히 scavenging 되어진 가장 저농도 시료의 흡광도 값을 기준으로 각 시료의 흡광도 값을 백분율로 환산하여 radical-scavenging activity(%)로 표시하였다.

항산화물질의 분리 및 정제

야관문 종자의 조 추출물은 Kim 등(11)의 방법에 의하여 먼저 80% ethanol과 *n*-hexane을 이용하여 용매분획하고 활성이 인정된 80% ethanol층을 얻었다. 얻어진 80% ethanol 층에 대해서 ethylacetate와 buffer(0.2 M Na_2HPO_4-NaH_2PO_4, pH 7.5)를 사용하여 용매분획하고 활성이 집중된 ethylacetate 획분을 얻었다. Ethylacetate 획분의 항산화활성 물질은 silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography 그리고 HPLC를 이용하여 분리 및 확인하였다. Silica gel adsorption chromatography는 silica gel(300 g, 20-230 mesh, column chromatography용, Merck사)을 chloroform으로 slurry를 만들어 column에 충진시키고, chloroform-methanol 용매계를 이동상으로 하여 methanol 농도를 0~100% 씩 증가시키는 step-wise 방법으로 용출분획하였다. Sephadex LH-20 (25-100 mesh, Sigma사, USA)을 methanol-chloroform (4:1, v/v) 용매계로 하여 column(bed volumn 250 mL)에 충진하여 동 용매계로 용출분획하였다. HPLC는 먼저 시료를 sep-pak(C_{18})으로 전처리하고 여과지(Gelman Acrodisc LC 13 PVDF, 0.22 μm)로 여과한 후 Tsk-gel ODS-100Z column (4.4 mm × 25 cm, 50% MeOH)을 이용하여 야관문 종자의 열수 추출물 및 ethanol 추출물의 항산화 활성물질의 비교 확인하였다.

결과 및 고찰

추출물의 항산화 활성 비교

야관문 종자의 열수 추출물 및 ethanol 추출물의 항산화 효과 그리고 용매분획과정에서의 항산화 효과의 비교는 Table 1에 나타냈다. 야관문 종자의 열수추출물을 80% ethanol과 n-hexane으로 용배분획하여 얻어진 추출물을 각각 100 mL로 정용하여 5.0과 10.0 μg에 상당하는 건조중량의 양으로 DPPH-radical scavenging 효과를 측정하였는데, 각각 24.3-39.5 % 그리고 2.8-4.84..%로 나타났다. 활성이 집중된 80% ethanol 획분을 농축하고 ethylacetate와 buffer(pH 7.5)로 용매분획하여 DPPH-radical scavenging 효과를 측정하였는데, 각각 29.9-49.9 % 그리고 3.6-10.9.%로 나타났다. 야관문 종자의 ethanol 추출물을 80% ethanol과 n-hexane으로 용배분획하여 얻어진 추출물을 각각 100 mL로 정용하여 5.0과 10.0 μg에 상당하는 건조중량의 양으로 DPPH-radical scavenging 효과를 측정하였는데, 각각 92.9-95.3 % 그리고 7.7-8.2.%로 나타났다. 활성이 집중된 80% ethanol 획분을 농축하고 ethylacetate와 buffer로 용매분획하여 DPPH-radical scavenging 효과를 측정하였는데, 각각 92.7-95.1% 그리고 43.1-43.7%로 나타났다.

Table 1. Antioxidative activity of extract fractionated from solvent fractionation of *Lespedeza cuneata* seeds

(unit: %)

Condition	80% Ethanol		*n*-Hexane		Ethylacetate		Buffer	
	5[1)]	10	5	10	5	10	5	10
Water(100℃)[2)]	24.3	39.5	2.8	4.8	29.9	49.9	3.62	10.95
Ethanol(95%)	92.9	95.3	7.7	8.2	92.7	95.1	43.7	43.2

[1)]Extract of μg dry weight eq. was added to 20 μM DPPH solution.
[2)]Extracting condition of *Lespedeza cuneata* seed.

상기의 결과로 미루어보아 야관문에 존재하는 항산화물질은 열수추출조건에 비해 ethanol 추출조건에서 용매분획과정 중에서 항산화 성분이 잘 이행되었고, 열수추출조건에서는 상대적으로 활성이 낮게 나타났다.

생약재의 열수 추출 및 용매 추출에 대한 연구를 검토해 보면, Lim 등(12)은 왕대나무 줄기 에탄올 추출물이 열수추출물 보다 항산화활성이 우수하다고 하였고, Na 등(13)은 생약재 추출물의 생리활성을 효과 측정 시 5종의 생약재중 두충 등 3종류는 알코올 추출물의 항산화활성이 우수하였으나 나머지 감초 등 2종류의 경우는 열수추출물의 경우가 활성이 우수하게 나타났다고 보고하였다. 상기의 보고들로 미루어 보면 생약재는 각각의 성분들이 수용매계 또는 유기용매계에서 용출의 경향이 다르게 나타남을 알 수 있고 따라서 항산화물질을 구명함에 있어 사전에 다양한 용매계를 사용하여 검토할 필요성이 있다고 판단되었다.

항산화물질의 정제 및 활성

야관문 종자의 용매분획 과정에서 활성이 집중된 ethylacetate 획분을 대상을 silica gel adsorption chromatography를 행한 결과는 Fig. 1에 나타냈다. 용출은 chloroform-methanol의 용매계로 하여 methanol 함량을 0-70%로 step-wise 용출분획하면서 얻어진 각각의 획분에 대해 DPPH-radical scavenging 효과를 측정한 결과, 열수추출한 경우는 Fig-A에 나타낸 것처럼 chloroform-methanol의 용매계에서 methanol함량이 50% 부근을 중심으로 활성이 나타났다. 반면 ethanol 추출물은 methanol함량이 50-60% 부근을 중심으로 활성이 나타나, 열수 추출물과 ethanol 추출물의 항산화활성 물질의 성질은 약간의 차이를 나타냄을 알 수 있었다.

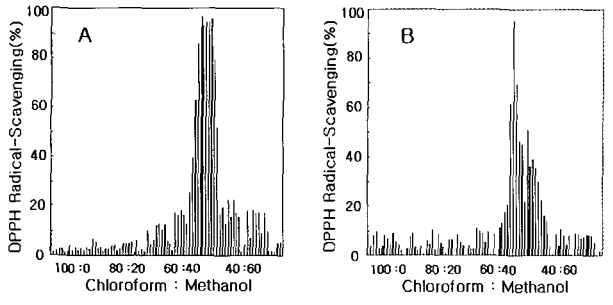

Fig. 1. Elution profiles of *Lespedeza cuneata* seed extract by silica gel column chromatography.

Extracted condition of *Lespedeza cuneata* seed. A: ethanol(95%), B: water(100℃).

Kim 등(14), Wee 등(15) 및 Cho 등(16)의 silica gel column chromatography에 의한 물질 분석의 예를 참고하여 보면, 야관문 종자의 ethanol 추출 보다 열수 추출의 항산화물질이 더 극성물질일 것으로 추정되며, 향후 HPLC 등의 수법을 사용하여 분석한다면 두 조건에서의 항산화물질의 분포를 잘 파악할 수 있으리라 생각되었다.

Silica gel adsorption chromatography에서 얻어진 활성획분을 methanol-chloroform 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration(bed volumn 250 mL)으로 분획하고 DPPH -radical scavenging 효과를 측정한 결과, bed volumn에 대한 elution volumn의 비(Ve/Vt)가 1.25-1.52의 용출범위(1.1-2.2 g)에 활성이 인정되었다. Sephadex LH-20 chromatography의 용출양상(14)으로 보아 야관문 종자에 존재하는 항산화물질은 저분자이며 분자량은 200 dalton 정도인 것으로 추정되었다.

HPLC상 항산화물질의 거동

야관문 종자를 ethanol로 추출, 용매분획하여 얻어진 ethylacetate 획분의 항산화 활성성분을 silica gel column chromatography와 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하면서 정제하였다. Sephadex LH-20 column chromatography 항산화 활성성분을 더욱 정제하기 위하여 HPLC를 행하였고 그 결과는 Fig. 2에 나타냈다. Fig. 2-A는 야관문 종자를 열수 추출하여 얻어진 항산화 활성물질의 peek이며, Fig. 2-B는 야관문 종자를 ethanol추출하여 얻어진 peak로 항산화 활성물질의 HPLC retention time은 각각 7.25분 그리고 7.41분으로 나타났지만 두 peak의 HPLC상의 거동이 일치하여 동일한 성분일 것으로 추정하였다.

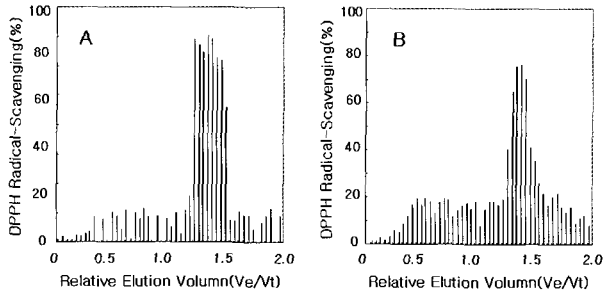

Fig. 2. Elution profiles of *Lespedeza cuneata* seed extract by Sephadex LH-20 column chromatography.

Extracted condition of *Lespedeza cuneata* seed. A: ethanol(95%), B: water(100℃).

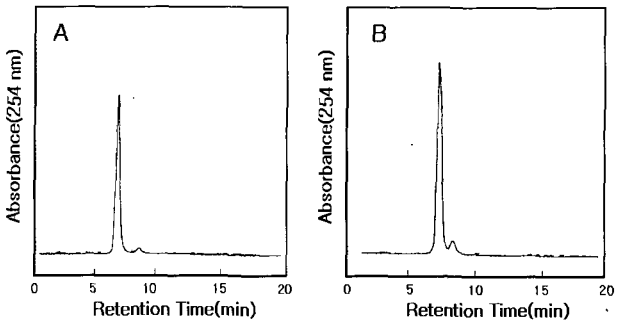

Fig. 3. HPLC chromatogram of *Lespedeza cuneata* seed extract by Sephadex LH-20 column chromatography.

Extracted condition of *Lespedeza cuneata* seed. A: ethanol(95%), B: water(100℃).

일반적으로 생약재의 항산화성분으로는 flavonoid, terpenoid, steroid, alkaloid, quinone, tannin, indole, coumarin 및 plant sterol 등이 함유되어 있어 생체에 존재하는 free radical을 제거하여 주는데(7,8), 야관문의 생리활성물질로 밝혀지고 있는 것은 pinitol, flavoloid, phenol 성분, tannin 및 β-sitoaterol등이 있으며, flavonoid 중에서도 quercetin, kaempferol, vitexin, orientin 등이 분리되어 있음이 보고되었다(9,10). 따라서 본 연구결과의 HPLC상의 단일성분의 동정이 요구되며, 현재 LC-MS, NMR등의 수법을 이용하여 야관문 종자의 항산화 활성물질의 본체구명이 진행되고 있다.

요 약

본 연구에서는 야관문의 열수 및 ethanol추출조건에 따른 항산화활성의 변화를 비교평가 하고자 하였다. 야관문에 존재하는 항산화물질은 용매분획 과정 중에서 열수추출조건에 비해 ethanol 추출조건에서 항산화 성분이 잘 이행되었고, 열수추출조건에서는 상대적으로 활성이 낮게 나타났다. Silica gel adsorption column chromatography 상의 chloroform-methanol의 용매계에서 각 획분에 대해 DPPH-radical scavenging 효과를 측정한 결과, 열수 추출한 경우는 methanol함량이 50% 부근을 중심으로 활성이 나타났다. 반면 ethanol 추출한 경우는 methanol함량이 50-60% 부근을 중심으로 활성이 나타나, 열수 추출물과 ethanol 추출물의 항산화활성 물질의 성질은 약간의 차이를 나타냄을 알 수 있었다. Sephadex LH-20의 gel filtration으로 분획한 결과 두가지 처리조건 모두 bed volumn에 대한 elution volumn의 비(Ve/Vt)가 1.25-1.52의 용출범위(1.1-2.2 g)에 활성이 인정되었다. 열수추출 및 ethanol 추출 조건의 경우 항산화 활성물질은 HPLC retention time은 각각 7.25분 그리고 7.41분으로 나타났지만 두 peak의 HPLC상의 거동이 일치하여 동일한 성분일 것으로 추정하였다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 전남대학교 학술지원비의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB J., 1, 358-364
2. Ames B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticariogens. Science, 221, 1256-1263
3. Price, A. and Hendry, A. (1991) Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. Plant Cell Environ., 14, 477-484
4. Lee, Y., Haward, L.R. and Villalon, B. (1995) Flavonoids and antioxidants activity of fresh pepper(*Capsicum anmuum*) cultivars. J. Food Sci., 3, 473-476
5. Yokozawa, T., Lee, K.I., Kashiwagi, H., Cho, E.J. and Chung H,Y. (1999) Antioxidant activity of herbal teas available on the Korean market. J. Food Sci. Nutr., 4, 92-96
6. Yasuda, M., Kondo, M., Sonda, T., Takedomi, K. and Eguchi, A. (2004) The effects of tea manufacturing methods on the contents of chemical components and antioxidantive activity in tea infusions. Food Sci. Biotechnol., 13, 156-161
7. Jung, S.J., Lee, J.H., Song, H.N., Seong, N.S., Lee, S.E. and Baek, N.I. (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 47, 135-140
8. Kim, S.M., Cho, Y.S. and Sung S.K. (2001) The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. Korean J. Food Sci. Technol., 33, 626-632
9. Hideyuki, S., Nomi, S. and Eiichi M. (1990) Bioactive substances from *Lespedeza cuneata* L. G. Don and their biologica activities. Tetrahedron, 46, 383-394
10. Atsushi, N. and Kazuko H. (1980) C-Glycoylfalavones in *Lesoedeza cuneata*. Chem. Pharm. Bull., 28, 964-965
11. Kim, S.J. and Park, K.H. (1996) Antimicrobial substances in Leek(*Allium tuberosum*). Korean J. Food Sci. Technol., 28, 604-608
12. Lim, J.A., Na, Y.S. and Beak, S.H. (2004) Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of ethanol extract from *Phyllostachys bambusoides*, Korean J. Food Sci. Technol., 36, 306-310
13. Na G.M., Han H.S., Ye S.H. and Kim H.K. (2004) Physiological activity of medicinal plant extracts. Korean J. Food Preserv., 11, 388-393
14. Kim S.J., Park Y.M. and Jung S.T. (2005) Anticariogenic effects and inhibition of glucosyltransferase activity of *Chrysanthemun indicum* L. extracts. Korean J. Food Culture, 20, 341-345
15. Wee, J.H., Moon, J.H. and Park, K.H. (2004) Isolation and Identification of Pratensein with Antimicrobial Activity from the Peanut Shells Korean J. Food Sci. Technol., 36, 643-647
16. Cho, J.Y., Moon, J.H., Kim, H.K., Ma, S.J., Kim, S.J., Jang, M.Y., Kawazoe, K., Takaishi, Y. and Park K.H. (2006) Isolation and structural elucidation of antimicrobial compounds from bluckwheat hull. J Microbiol. Biotechnol., 16, 538-542

(접수 2007년 3월 12일, 채택 2007년 5월 18일)