J. Korean Soc. Food Nutr.
21 (4), 381 ~ 385 (1992)

한국영양식량학회지

인지질 Liposome에 미치는 대두 Saponin의 항산화효과

신미옥 · 배송자† · 김남홍

부산여자대학교 식품영양학과

Antioxidant Effect of Soyasaponin on the Liposomal Phospholipid Membrane

Mee-Ok Shin, Song-Ja Bae† and Nam-Hong Kim

Dept. of Food and Nutrition, Pusan Women's University, Pusan 607-737, Korea

Abstract

The effect of antioxidant activity of soyasaponin on the liposomal phospholipid membrane were investigated by spectrophotometry. The oxidation index and oxidation rate of α-tocopherol containing egg phosphatidylcholine (EPC) liposomes were markedly decreased in the presence of soyasaponin relative to those of pure phospholipid liposmes. α-Tocopherol containing liposomes delayed the oxidation of liposomes. Especially soyasaponin stimulated the antioxidant activity of α-tocopherol in liposomes. These results indicate that soyasaponin in liposomes had some additive effect on antioxidant activity of α-tocopherol toward liposomes.

Key words : soyasaponin, antioxidant activity, spectrophotometry, liposomes, oxidation index, oxidation rate, α-tocopherol

서 론

최근, 천연물로 부터 사포닌의 분리동정이 활발히 진행되어 그 구조규명 및 이들이 가지는 생물활성에 대한 연구가 관심의 대상이 되고있다.

Tschesche와 Wulff[1], Shibata 등[2]이 발표한 사포닌의 생물활성에 대한 총설에서 용혈작용, 혈구응집작용, 감염억제작용 및 항종창 활성작용 등이 알려져있고, Glauert 등[3,4]의 세포막 침투에 미치는 콜레스테롤의 상호작용, Bae 등[5]의 인지질 모델막에 미치는 크로바사포닌의 막유동성변화 등도 보고되고 있다.

우리나라 식생활의 주요 곡물중 하나인 대두에서 추출된 대두사포닌은 그 성분으로서 soyasaponin Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ[6], A1 및 A2 와 이들의 aglycone 성분으로 soyasapogenin A, B, C, D 및 E 등[7]의 5종이 보고되고 있다.

이중 soyasaponin Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ이 혈중 과산화지질 생성을 억제하므로써 성인병 예방제로서의 개발이 기대된다는 보고와 crude saponin이 불포화지방산이 많은 salad oil의 과산화를 억제하고, 과산화되어진 oil로 인한 쥐의 간장해를 예방한다는 연구보고[8] 및 혈청지질 개선작용에 관한 연구들이 있어 대두 사포닌이 체내 대사 및 세포막에 미치는 생물학적 활성 등의 연구검토가 기대되어 진다.

일반적으로 생체막은 세포와 조직을 보호하고 체내 이온수송, 호르몬, 효소대사 영양물 교환 등의 체내 중요 생리기능을 다양하게 수행하고있다. 그러나 생체막의 복잡한 구조와 특이성 때문에 생체막을 이용한 여러물질과의 상호작용을 규명하기란 어려운 실정이므로 세포막의 주요성분인 인공 인지질막 즉 liposome을 만들어 이 막을 통과하는 대사산물, 영양물 등의 투과

†To whom all correspondence should be addressed

및 막의 침투성연구에 많이 이용되고있다[9~13].

본 실험에서는 인지질 liposome을 만든후 대두에서 추출한 조대두사포닌 (crude soyasaponin)을 이들 liposome에 가함으로써 인지질막의 물리적 성질에 미치는 영향을 검토하고저 egg phosphatidylcholine (EPC)으로 EPC liposome을 만들고, 대두 사포닌이 인지질 liposome자체의 산화에 미치는 영향과 liposome 내 존재하는 α-tocopherol의 항산화 작용에 미치는 영향을 분광광도법으로 측정하였다.

재료 및 방법

재 료

Egg phosphatidylcholine (EPC)과 α-tocopherol은 Sigma사 (St. Louis, Mo, USA)의 특급을 사용하였으며, 실험에 사용되어진 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

대두사포닌(soyasaponin)은 상법[6,7]에 따라 추출하였고 soyasaponin Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, A_1, A_2, A_3의 복합물인 조대두사포닌을 사용하였다.

조대두 사포닌(crude soyasaponin)의 추출

실험에 사용한 사포닌은 Fig. 1과 같이 추출용매분획법으로 분리하였다. 시료(powdered soybean)를 70~80°C에서 methanol로 3회 반복하여 1회에 5시간씩 가열환류하여 추출한 후, 전 methanol추출물을 감압농축하여 methanol extract로 만들고 H_2O : butanol (1 : 1) 용액으로 분리시킨후 butanol층만을 취하여 감압농축하여 butanol extract를 얻었다. 이를 소량의 methanol에 녹인 후 다량의 ether에 교반하면서 적하하여 생긴 침전을 여과하고 ethanol에 농축하여 조대두사포닌을 얻었다.

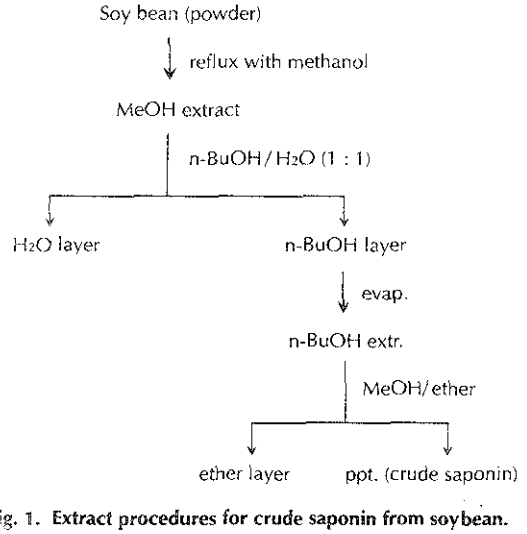

Fig. 1. Extract procedures for crude saponin from soybean.

Liposome 제조[14, 15]

일정량의 인지질 (EPC, 최종8μM)을 $CHCl_3$에 녹인 후 감압증류시키고, N_2 gas를 흘려보내면서 잔류 $CHCl_3$을 날려보내어 건조피막 (dried thin film)을 만들었다.

한편, α-tocopherol을 함유한 liposome도 인지질 (EPC)에 일정량 (최종 4μM)의 α-tocopherol을 가한후 같은 방법으로하여 건조피막을 만들었다. 이렇게 만든 인지질 건조피막에 10mM Tris-buffer (pH 7.4) 용액을 5ml 가하여 생체온도인 37°C에서 1분간 방치, 1분간 진탕의 과정을 5회 반복하여 다중층 liposome (multilamellar vesicle ; MLV)을 만들었다. 이 liposome에 여러농도 (7μM, 22μM, 37μM) 의 soyasaponin을 첨가하여 liposome에 미치는 항산화효과를 알아보았다.

항산화효과 (산화지수)측정

EPC liposome 에 인위적으로 산화제인 Fe^{++}과 H_2O_2를 가하여 과산화물을 생성시킨 후, 지질 고유 흡수대인 215nm에서의 흡광도를 측정하고, 산화시킨 후 생성된 과산화물의 정도를 측정하기위해 과산화지질 흡수대인 233nm에서의 흡광도를 측정하여 그 흡광도비 (233nm/215nm)를 산화지수 (oxidation index)[16]로 하여 비교 검토하였다. 대두사포닌과 항산화제인 α-tocopherol을 첨가한 liposome의 산화지수도 측정하였으며, 5일 동안 방치하여 24시간 마다 경시변화를 5회 관찰하여 평균값을 취하였다. 산화지수 측정에서 spectrophotometer는 Uvikon 860 (USA)을 이용하였다.

결과 및 고찰

항산화 효과

Fig. 2는 A215nm와 A233nm에서의 인지질 liposome의 흡광곡선을 나타낸 것이다. Klein에 의한 산화지수 (oxidation index)는 지질 고유 흡수대인 215nm

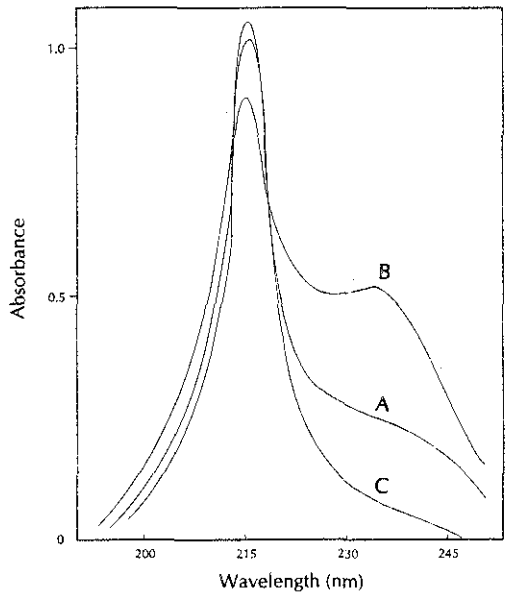

Fig. 2. Part of the UV absorption spectrum of EPC liposomes (A), the oxidized liposome (B) and the oxidized liposomes incorporated with 4μM α-tocopherol (C).
The oxidation index is 0.31 (A), 0.52 (B), and 0.1 (C).

에서의 흡광도에 대한 conjugated diene, hydroperoxide및 peroxide 등의 과산화지질 흡수대인 233nm의 흡광도 비(A233nm/A215nm)를 나타낸 것으로써, EPC liposome(A)의 경우 그 산화지수는 0.31, 인위적으로 Fe^{++}(30μM)과 H_2O_2 (50μM)를 가하여 산화시킨 EPC liposome(B)은 0.52 및 일정량의 α-tocopherol (4μM)을 가한 EPC liposome(C)의 경우 0.1을 나타내어 EPC liposome에 비하여 Fe^{++} (30μM)과 H_2O_2 (50μM)를 가하여 산화시킨 EPC liposome의 산화지수가 높아짐을 알 수 있었고, EPC liposome에 일정량의 α-tocopherol을 가한 경우는 EPC liposome만의 경우보다 그 산화지수가 현저히 낮아지므로써, 이미 항산화제로 알려진 α-tocopherol에 대한 항산화효과를 다시 확인할 수 있었다.

Table 1은 EPC liposome과 대두사포닌(22μM)을 가한 EPC liposome, α-tocopherol(4μM)을 가한 EPC liposome, 그리고 α-tocopherol과 대두사포닌을 함께 가한 EPC liposome의 5일동안의 산화 정도를 산화지수와 산화속도로써 나타낸 것이다.

전반적으로 시간이 지날수록 산화지수가 서서히 증가되는 현상을 볼 수 있었고 EPC liposome에 α-tocopherol을 가한 경우 그 산화지수가 EPC liposome의 경우인 0.85에 비해 0.67로 낮아졌으며, 대두사포닌을 함께 가한 경우 그 산화지수가 0.53으로 더욱 낮아졌다.

그리고 산화속도율도 EPC liposome의 경우 0.155에 비해 EPC liposome에 α-tocopherol을 가한 경우 0.122로 다소 낮아졌으며, α-tocopherol을 함유한 EPC liposome에 대두사포닌을 함께 가한 경우 산화속도율이 0.105로 현저하게 낮아지는 것으로 보아 대두사포닌이 EPC liposome에 미치는 α-tocopherol의 항산화작용에 대한 상승효과가 있으리라 사료된다.

Fig. 3은 산화된 EPC liposome과 여러 농도의 대두사포닌이 첨가되어진 EPC liposome의 흡광곡선으로써, 각 산화지수는 EPC liposome(A)의 경우 0.53이었고 EPC liposome에 7μM, 22μM 및 37μM의 대두사포닌이 첨가되어진 경우 0.33(B), 0.24(C), 0.16(D)를 나타내어 대두사포닌의 농도가 증가함에 따라 산화지수가 감소함을 알수 있었다.

Table 1. Oxidation of EPC liposomes, EPC liposomes incorporated with α-Tocopherol and EPC liposomes incorporated with α-tocopherol and soyasaponin, measured by the oxidation index and the oxidation rate

Liposomes	Oxidation index**					Oxidation rate (day^{-1})
	1	2	3	4	5	
*EPC	0.23	0.37	0.53	0.68	0.85	0.155
EPC+Soyasponin	0.19	0.33	0.45	0.55	0.70	0.128
EPC+α-Toco	0.18	0.29	0.42	0.53	0.67	0.122
EPC+α-Toco+Soyasaponin	0.11	0.20	0.31	0.43	0.53	0.105

*EPC : Egg phosphatidylcholine (8μM) + Fe^{++} (30μM) + H_2O_2 (50μM)
α-Toco : α-Tocopherol (4μM)
Saponin : Soyasaponin (22μM)
**Absorbance at 233nm/Absorbance at 215nm

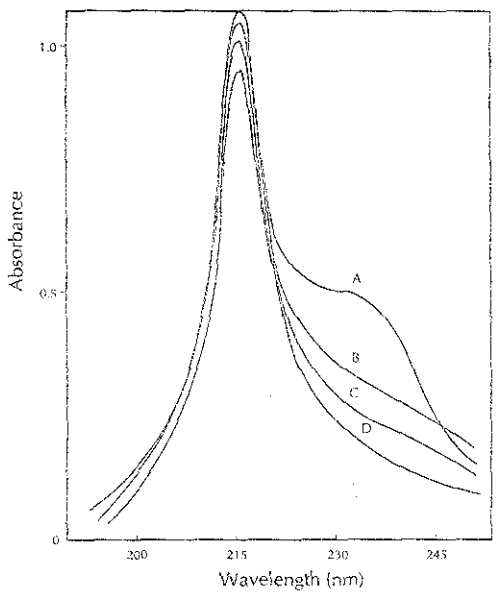

Fig. 3. Part of the UV absorption spectrum of the oxidized EPC liposomes (A) and the oxidized liposomes incorporated with 7μM-soyasaponin (B), 22μM-soyasaponin (C), 37μM-soyasaponin (D).
The oxidation index is 0.53 (A), 0.33 (B), 0.24 (C), 0.16 (D).

Table 2는 산화된 EPC liposome과 각 농도별로 대두사포닌이 첨가되어진 EPC liposome의 5일동안의 산화정도를 산화지수와 산화속도로써 나타낸 것이다. 산화지수는 첨가되어진 대두사포닌의 농도에 비례하여 점차 감소하였고, 산화속도율도 대두사포닌을 포함한 EPC liposome의 경우 EPC liposome의 산화속도율 0.155보다 전반적으로 감소되었으며, 대두사포닌의 농도가 7μM, 22μM, 및 37μM로 증가함에 따라 그 산화속도율이 0.145, 0.133 및 0.125로 감소되었다.

이 결과 대두사포닌은 그 자체만으로는 α-tocopherol의 항산화 효과보다는 미약하나, 항산화 효과에 영향을 미치는것으로 사료된다.

요 약

Egg 인지질 liposome에 미치는 대두 saponin의 항산화 작용에 대한 영향을 흡광분석법으로 검토하였다. α-tocopherol이 함유된 egg 인지질 liposome의 산화지수와 산화속도가 순수 egg 인지질 liposome의 산화지수와 산화속도에 비하여 현저하게 감소되었다. Liposome내 함유된 α-tocopherol은 순수 egg 인지질 liposome의 산화를 지연시켰다. 특히 대두 saponin은 egg 인지질 liposome에 대한 α-tocopherol의 항산화 효과를 촉진시켰다. 이러한 결과로 보아 대두 saponin이 egg 인지질 liposome에 대한 α-tocopherol의 항산화 작용에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

문 헌

1. Tschesche, R. and Wulff, G. : *Fortschritte der chemie organicher naturstoffe*. Herz, W., Griesenbach, H. and Kirby, G. W. (eds.), Vienna-New York, Springer, p.462 (1973)
2. Shibata, S. : *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Wagner, H. and Wolff, P. (eds.), Springer-Verlag Berlin Heiderberg, New York, p.177(1977)
3. Glauert, A. M., Dingle, J. J. and Lucy, J. A. : Action of saponin on biological cell membrane. *Nature*, **196**, 193(1962)
4. Segal, R. and Milo-Goldzweig, J. : The susceptability of cholesterol depleted erythrocytes to saponin and

Table 2. Oxidation of EPC liposomes, EPC liposomes incorporated with soyasaponin, measured by the oxidation index and the oxidation rate

Liposomes	Oxidation index**					Oxidation rate (day^{-1})
	1	2	3	4	5	
*EPC	0.23	0.37	0.53	0.68	0.85	0.155
EPC+Soyasaponin (7μM)	0.22	0.35	0.50	0.63	0.80	0.145
EPC+Soyasaponin (22μM)	0.19	0.33	0.45	0.55	0.72	0.133
EPC+Soyasaponin (37μM)	0.18	0.30	0.42	0.52	0.68	0.125

*EPC : Egg phosphatidylcholine (8μM) + Fe^{++}(30μM) + H_2O_2 (50μM)
**Absorbance at 233nm/Absorbance at 215nm

223(1978)
5. 배송자, 한석규, 임광식, 김남홍 : 세포막 인지질에 미치는 크로바 사포닌의 열역학적 성질 연구. 약학회지, **11**(3), 181 (1988)
6. Kitagawa, I., Yoshikawa, M. and Yosioka, I. : Saponin and sapogenol XIII. Structures of three soybean saponins : soyasaponin Ⅰ, soyasaponin Ⅱ, soyasaponin Ⅲ. *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo), **24**, 121 (1976)
7. Kitagawa, I., Yoshikawa M., Hayashi, T. and Taniyama, T. : Characterization of saponin constituents in soybeans of various organs and quantitative analysis of soyasaponins by gas-liquid chromatography. *Yakugaku Zasshi*, **104** (2), 162 (1984)
8. 大南宏治, 奥田拓道, 兵井, 藤雅次郎, 北川 勲, 吉川雅之, 有地 滋. : 肝障害に及ぼす大豆サポニンの作用. 營養と食糧, **34**, 105 (1981)
9. Yamamoto, Y., Niki, E., Kamiya, Y. and Shimasaki, H. : Oxidation of lipid. *Biochim. Biophys. Acta*, **795**, 332(1984)
10. Bangham, A. D. : Properties and uses of lipid vesicles ; An overview, liposome and their uses in biology and medicine. New York Acad., p.2 (1978)
11. Viani, P., Gervato, G., Fiorilli, A., Rigamoni, E. and Cestaro, B. : Studies on peroxidation processes of model membranes and synaptosome ; role of phosphatidic acid. *Chemistry Physics Lipid*, **52**, 49 (1990)
12. Lang, J., Vigo-Pelfrey, G. and Martin, F. : Liposomes composed of partially hydrogenated egg phosphatidylcholine ; fatty acid composition, thermal phase behavior and oxidative stability. *Chemistry Physics Lipids*, **53**, 91 (1990)
13. Gregoriadis, G. : *Liposomes, drug carries in biology and medicine*. Academic Press, New York, p.287 (1979)
14. Barenholz, Y., Gibbes, D., Litman, B. J., Goll, J., Thompson, T. E. and Calson, F. D. : A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochem.*, **16**, 2806 (1977)
15. Huang, C. and Lee, L. : Diffusion studies on phosphatidylcholine vesicles. *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 234(1973)
16. Gregory, G. : Liposome technology. CRC Press, **1**, 139(1984)

(1992년 4월 16일 접수)