

미강의 약리성분 감마-오리지놀의 정량

곽태순*·박희준*

Quantitative Analysis of γ -oryzanol in Rice Bran

Tae - Soon Kwak* and Hee - Juhn Park*

ABSTRACT : Phytochemical analysis on rice bran and its pitch was performed by the tool of TLC, UV- and IR- spectroscopy, so that it was found that they contained γ -oryzanol and free sterol. GC-MS analysis of free sterol revealed that it was composed of β -sitosterol, campesterol and stigmasterol. Successive phytochemical analysis of γ -oryzanol revealed that it was composed of ferulic acid ester of triterpene and sterol, respectively. Triterpene moieties of γ -oryzanol were identified as follows : cycloartanol, cycloartenol, 24-methylenecycloartanol and unknown triterpene; And sterol moieties were found to be identical with free sterols. In addition, characteristic absorption band in UV spectrum (220 - 340 nm) was exclusively due to γ -oryzanol. Thus, it was suggested that rice brans of nearly all species of *Oryza sativa* can be quantitatively analyzed by UV absorption spectrometry, even when water soluble pigments was contained in the rice bran.

서 언

쌀은 한국을 비롯한 동양인의 주곡이 되는 자원으로써 그 생산량의 증대를 위한 농학적 연구가 진행되어 왔다. 더욱이, 쌀의 주된 성분을 차지하는 전분은 생체에너지원으로서의 중요성이 있다고 하겠다. 그러나, 최근에는 인간의 수명이 연장되고 생활수준이 향상됨에 따라 현대인의 건강에 대한 욕구가 증가하여 시대적 요구에 부합하는 벼 품종의 개발이 필요하게 되었다.

쌀의 생리 활성에 관한 연구로는 Hikino 등¹이 미강으로부터 다당체인 oryzabran A, B, C, D 등

을 동정하여 이들이 혈당저하효과를 일으키는 물질로 구명한 바 있다. 미강의 다당체인 hemicellulose는식이성 콜레스테롤 흡수저해작용과 담즙산의 배설작용이 있다고 보고된 바 있고¹, 또한 장내의 Bifidus 균에 대한 증식작용이 알려져 있는데, 그것은 Bifidus 균주가 hemicellulose를 잘 이용하는 반면 부패균은 이를 잘 이용하지 못하기 때문이라고 보고된 바 있다².

미강으로부터 얻은 기름(oil)을 미강유(rice bran oil, oryzanol)라고 하며, 이 중 triterpene alcohol과 sterol의 ferulic acid ester를 특히 γ -oryzanol이라고 한다. γ -oryzanol의 구성 triterpene은 cycloartenol, 24-methylcycloartanol,

* 상지대학교 생명자원과학대학(College of Life Science and Natural Resources Sangji University, Weonju, 220 - 702, Korea) <'97. 2. 28접수>

cycloartanol, 24-methylenecycloartanol 등이고, 구성 sterol은 cholesterol, trimethyltosterol, dihydro- γ -sitosterol, dihydro- β -sitosterol, β -sitosterol, campesterol 및 stigmasterol 등이다⁸⁾. 그러나, γ -oryzanol의 주된 triterpene 및 sterol moiety는 campesterol (16%), β -sitosterol (7%), cycloartenol (30%), 24-methylenecycloartenol (23%) 과 cycloartenol로 구성된다⁷⁾.

그 외에 미강유 중에는 triglyceride, diglyceride, monoglyceride, 유리 지방산 (palmitic acid가 50%), squalene, ferulic acid, sterol, 고급지방족 알코올, 탄화수소, 인지질, lipoprotein, vitamin B₁₅, B₁, E 등이 함유되어 있다⁸⁾.

γ -oryzanol의 생리활성에 관한 보고로서 市丸 등⁴⁾은 이 물질의 항궤양작용을 보고하였고, Shinomiya 등⁷⁾과 Sakamoto 등⁶⁾은 γ -oryzanol의 혈청 지질 저하효과를 보고한 바 있다. Yoshino 등¹⁰⁾의 고지혈증 환자에 적용한 γ -oryzanol의 효과를 밝혀서 이 물질이 완전한 고지혈증에 적용할 수 있는 것으로 보고하였다. Tajima 등⁹⁾은 cytochrome P-450에 의해 발생된 superoxide에 대한 γ -oryzanol의 항산화작용의 기구를 보고한 바 ferulyl기에 기인한 phenoxy radical의 안정성에 기인한다고 하였다.

이와 같이, γ -oryzanol 등과 같은 항산화성 물질이 비의 종자 중에서는 산소와 광선에 대한 항산화작용을 나타내어 종자의 발아능력을 보존하는 것이 목적이지만⁵⁾ 이를 인체에 적용했을 때도 항산화작용 등 여러가지 생리적 기능을 나타낸다.

따라서, 미강에 존재하는 약리 성분인 γ -oryzanol의 함량을 결정하는 것은 건강미의 개발에 중요한 자료를 제시할 것으로 기대되어 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시료

미강 100 g 을 에테르로 Soxhlet 추출하고 건조한 미강유 18.3 g 을 얻었다. 그리고, 미강유의 알칼리 층을 dark유로 한 후 methylester화하여 증류한 증류잔분인 pitch를 얻었다.

기기 및 시약

융점은 Electrothermal digital melting point apparatus를 사용하여 측정하였다. IR spectrum은 Bomem MB-100 FT-IR spectrometer로 KBr disk 법으로 측정하였으며, UV spectrum은 Shimadzu사의 UV-160 vv/vis recording spectrometer를 사용하여 측정하였다. GC-MS 측정 시에는 GC를 Varian 3400으로, MS를 Finnigan Mat TSQ-700으로 접속하여 사용하였다. TLC로 Kieselgel 60 F₂₅₄를 사용하였고 추출용매는 일급시약을 사용하였다.

미강유의 비누화 및 이의 중성부의 GC-MS 측정

미강유를 2N-KOH ethanol 용액으로 비누화하고 그 중성부를 ether로 추출한 후 물로 세척시키고, 에테르를 증류하였다. 이를 2% - acetone 용액으로 하여 2 μ l 를 GC-MS에 주입하여 측정하였다. (FID, glass column 4 mm x 2.00 m, chromosorb 2% SE-30, column temp., 235 $^{\circ}$ C, 시료실 온도 295 $^{\circ}$ C, N₂ 55 ml/min, 감도 10⁻³)

Pitch의 TLC

Pitch를 benzene에 용해시켜서 상법에 의하여 작성한 silica gel G (Merck 사) 0.25 mm의 박층판에 spot하고 전개용매 n-hexane-EtOAc (10 : 1) 로 전개하여 건조 후 황산을 분무하여 발색시켰고 이를 densitometer (pdi 사, The Discovery Series) 로 440 nm에서 측정하였다. 그 결과 R_f 0.12와 0.33에서 반점이 나타났는데 이들을 분취용 TLC (막 두께, 0.5 mm) 를 이용하여 분리하였다. 이들 분리된 물질에 대한 Liebermann-Burchard 반응, UV, IR 및 GC-MS를 측정하였다.

다음으로, R_f 0.33의 물질을 2N-KOH의 알코올 용액으로 분해시켜 분배추출법에 의해서 산성부와 중성부로 각각 나누었다. 산성부는 benzene으로 재결정하여 mp 169 - 170 $^{\circ}$ C의 결정을 얻었으며, 이 물질은 에타놀 용액에 FeCl₃를 가하여 청색으로 된 후 적색으로 변화하였다. 이 결정은 ferulic acid와 혼용하여도 융점강하가 없었다. 중성부는 상기의 경우와 같은 조건에서 TLC하여 R_f 0.12 및

0.24에 반점이 나타났다. 이들을 분취용 TLC에서 분리한 다음 Liebermann - Burchard 반응, UV, IR 및 GC - MS를 측정하였다.

Pitch의 column chromatography

Pitch 20 g을 n-hexane 300 ml에 용해시키고 silica gel(Merck사, 100 mesh) 200 g을 충전한 column(3 x 53 cm)에 가하였다. 시료 흡착 후 2, 200 ml의 n-hexane, 1800 ml의 EtOAc, 7500 ml의 MeOH로 순차적으로 전개하였다. 우선 최초의 전개액 300 ml를 채취하여 용액을 증류하여 증류잔분이 없는 것을 확인한 후 일정량 50 ml씩 채취하고 처음의 채취액부터 fraction number를 정했다. 다음으로 fraction 용매를 증류하고 그 증류잔분을 각각의 fraction에 대하여 UV, IR, TLC 및 GLC로 분석하였다. 그리고, column으로부터의 증류잔분을 TLC로 분리하여 R_f 0.33의 반점의 발색(황산) 농도를 densitometer에 의하여 분석하였다. 다음으로, Fraction No. 10 - 30까지의 증류잔분을 모아서 acetone으로 재결정하여 TLC에서 ferulic acid ester 이외의 물질이 존재하지 않는 것을 확인한 결정 3.8 g(UV 315 nm에서 E_{1%}^{1cm} 356, mp 154 - 157°C)을 얻었다. 이 결정은 UV, IR에서 ferulic acid ester라는 것을 확인했다. 또, 이 결정을 검화분해한 중성부(mp 105 - 110°C)를 GLC로 분석하여 campesterol, stigmasterol, β-sitosterol, cycloartenol, 24-methylenecycloartenol 및 미지의 triterpene을 확인한 반면 cycloartenol은 β-sitosterol과 중첩되어 나타났다. 그러므로, 같은 중성부를 분리용 TLC에서 R_f 0.12와 R_f 0.24의 밴드 중 후자의 것을 분리하여 GLC에서 분석하여 cycloartenol의 존재를 확인하였다.

결과 및 고찰

저자 등은 미강으로부터 미강유를 추출하여 이를 알칼리 가수분해한 중성부를 GC - MS에 의해 cholesterol에 대한 relative retention time(RRT를 1.00)을 구하였는데 RRT 1.00 이상인 피크를 7종 이상을 분리확인하고 그것들의 분자이온으로부터 각 성분을 확인할 수 있었다(Fig. 1, Table 1). 더

Table 1. GC-MS data of the unsaponifiable matter in rice bran oil

Peak No.	compound	mp(°C)	molecular ion	RRT
1	cholesterol	148	(C ₂₇ H ₄₆ O) ⁺	1.00
2	campesterol	158 - 159	(C ₂₈ H ₄₈ O) ⁺	1.33
3	stigmasterol	167 - 168	(C ₂₉ H ₄₈ O) ⁺	1.51
4	β-sitosterol	137 - 138	(C ₂₉ H ₅₀ O) ⁺	1.71
5	cycloartenol	100 - 101	(C ₃₀ H ₅₀ O) ⁺	1.72
6	cycloartenol	111 - 112	(C ₃₀ H ₅₂ O) ⁺	1.93
7	24-methylenecycloartenol	117 - 118	(C ₃₁ H ₅₂ O) ⁺	2.21
8	unknown terpenoid	-	-	2.54

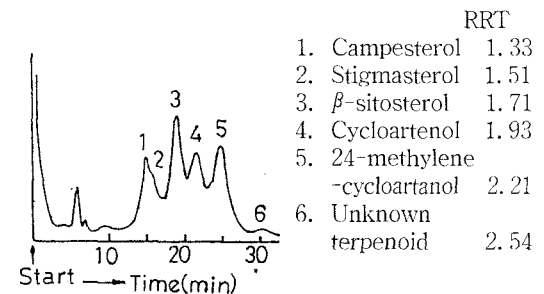


Fig. 1. GC chromatogram of the unsaponifiable matter in rice bran oil.

욱이, 미강유 층을 dark 유(미강유 알칼리 층에 묻은 염산을 가하여 분해한 분리물)라 하고, dark유를 methylester화하여 증류한 잔류물(이하 pitch라 함) 중에 ferulic acid ester가 거의 완전히 농축된 것을 UV로 분석하고, 계속해서 GC - MS로 확인했다. 여기서 이 pitch를 TLC로 분석했을 때 R_f 0.12와 0.33에 spot가 나타났으며(Fig. 2) 이들을 분리용 TLC로 분리하였다. TLC의 R_f 0.12의 물질은 Liebermann - Burchard 반응에 steroid의 정색반응을 나타내었고 IR spectrum에서도 유리 sterol의 존재를 확인할 수 있었다. 즉, IR spectrum에서 스테롤에 존재하는 삼치환 이중결합에 의한 신축진동에 의한 흡수피크가 830 cm⁻¹ 및 790 cm⁻¹에서 나타났으므로 이를 잘 알 수 있었다. 또, GC - MS에 의하여 3종의 sterol을 확인하였는데 그것은 각각

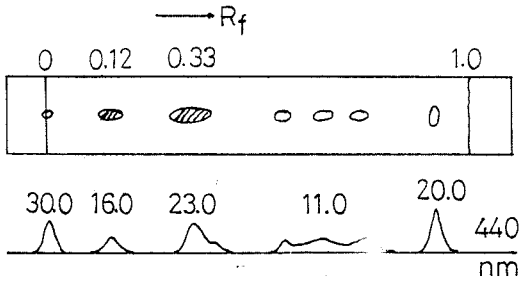


Fig. 2. TLC chromatogram of pitch (upper) and its densitometrical profile.

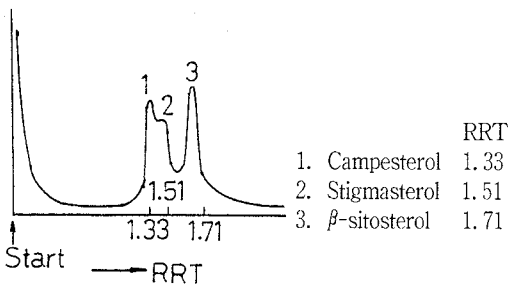


Fig. 3. GC chromatogram of free sterols of rice bran oil.

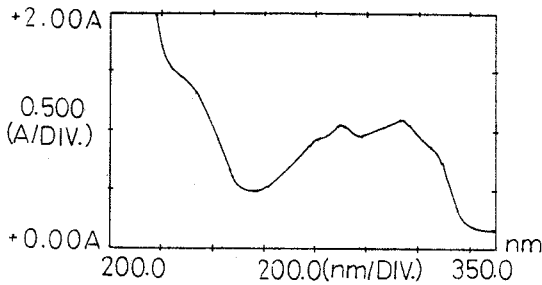


Fig. 4. UV spectrum of rice bran oil in *n*-hexane solvent.

campesterol, stigmasterol 및 β -sitosterol이었다 (Fig. 3). TLC의 R_f 0.33의 물질은 UV에 있어서 *n*-hexane 용매에서 230, 290 및 314 nm에서 흡수극대치를 나타내었다 (Fig. 4). 이러한 UV spectrum에서의 특징은 γ -oryzanol의 feruloyl moiety에 기인하는 것이다. IR spectrum에서는 3600 cm^{-1} 에서 수산기, 1700 cm^{-1} 에서 에스테르 결합, 1625 cm^{-1}

1 방향족 고리의 이중결합 등을 확인할 수 있었다. 이것을 알칼리 가수분해 (검화분해) 한 산성부는 IR spectrum의 측정과 혼용시험에서 ferulic acid가 존재하는 것으로 확인되었다. 즉, 산성부를 재결정하여 얻은 물질은 융점이 $169 - 170^\circ\text{C}$ 이었고, 이의 에탄올 용액에 FeCl_3 를 가하였을 때 청색으로 된 후 적색으로 변화하였다. 이 결정은 ferulic acid와 혼용하여도 융점강하가 없었다. 또, 중성부는 TLC에서 R_f 0.12와 0.24의 두 가지 반점을 나타내었다. 전자의 R_f 0.12의 물질은 Liebermann-Burchard 반응에서 steroid의 정색을 나타내었고 IR spectrum에서도 sterol의 특징적인 흡수 밴드를 확인하였으며, 또한 GC-MS를 측정하였을 때 campesterol, stigmasterol 및 β -sitosterol이 존재함을 알 수 있었다. 또, 후자의 R_f 0.24의 물질은 Liebermann-Burchard 반응에서 triterpene의 정색반응 (황→적)을 나타내었다. 또, UV spectrum에서는 1021 cm^{-1} 및 3039 cm^{-1} 의 cyclopropane 환, 800 , 820 및 840 cm^{-1} 에 삼치환 이중결합을 확인하였다. 계속하여 GC-MS를 측정하였을 때 cycloartanol, cycloartenol, 24-methylene-cycloartanol 및 미지의 triterpene 성분 등 4종의 triterpene으로 구성된 것을 알 수 있었다 (Fig. 5).

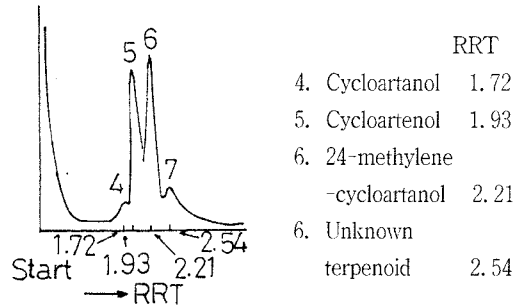


Fig. 5. GC chromatogram of triterpense from alkaline hydrolysis of γ -oryzanol.

상술한 결과를 재확인한 다음 분석에 필요한 시료를 확보하기 위하여 pitch를 column chromatography에서 전개하였고 유출하는 전개용액을 일정량씩 채취하였으며, 그 채취액을 증류한 증류잔분을 소량으로하여 UV, IR, TLC 및 GLC로 분석

하였다. 그 결과, TLC의 R_f 0.35의 UV분석으로 pitch 중의 sterol은 유리형과 ferulic acid ester형으로 존재함을 알 수 있었고 triterpene은 ferulic acid ester로 존재하는 것으로 밝혀졌다. 그러므로, 미강유 중에는 최소한 7 종의 ferulic acid ester가 존재하는 것으로 밝혀졌다.

현미를 도정한 결과 얻어지는 분말을 미강이라 하고, 미강 중에는 oryzanol(rice bran oil, 미강유)을 함유하는 것으로 알려져 있다. 이미 상술한 바와 같이 γ -oryzanol은 미강 중의 triterpene 및 sterol의 ferulic acid ester를 말한다. 비누화성 지방을 제거하고 γ -oryzanol을 보존하는 과정을 거치면 pitch를 얻을 수 있는데 이 중에 γ -oryzanol이 다량 들어 있다.

미강유나 pitch를 column chromatography하면 γ -oryzanol의 분획들만 ferulic acid ester의 흡수 밴드를 나타내고 다른 분획들은 이 파장 영역에서 이와 같은 흡수 피크를 나타내지 않는다(Fig. 4). 이러한 사실은 미강유에서 γ -oryzanol을 제외하면 대부분 monoglyceride, diglyceride 및 유리 sterol 등으로 구성되어 있기 때문일 것으로 추측된다. 또, 미강유를 800 nm까지 scanning하여도 ferulic acid ester에 기인한 흡수 밴드 이외에는 chlorophyll과 같은 색소에 의한 흡수는 나타나지 않았다. 또, 적미나 흑미와 같은 유색미라고 할지라도 이들은 anthocyanin이나 flavonoid와 같은 수용성 색소를 포함하므로 미강유에는 포함되지 않는다. 따라서, 미강유의 220 - 340 nm에서의 흡수 거동은 ferulic acid ester에 기인하는 것으로 추측되기 때문에 γ -oryzanol의 함량을 잘 반영하는 것이라 볼 수 있다. 따라서, ferulic acid의 검량선을 작성하고 미강유의 흡광도를 cycloartenol ferulic acid ester로 환산한다면 γ -oryzanol의 함량을 매우 작은 오차 범위에서 정할 수 있다고 본다.

적 요

미강에 함유된 약리성분인 γ -oryzanol 함량을 검정하여 용도 다양화 연구의 기초 자료를 제공코자 시험을 수행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

Soxhlet 추출장치에서 얻은 미강유에서 유리

sterol과 ferulic acid ester가 분리되었다. 유리 sterol은 GC-MS에 의하여 campesterol, β -sitosterol 및 stigmasterol로 구성되어 있음을 알 수 있었다. ferulic acid ester는 알칼리 가수분해에 의하여 얻어지는 검화분해물을 분리용 TLC로 분리하여 triterpene과 sterol을 얻었다. sterol은 GC-MS 측정으로 유리 sterol과 같은 조성임을 알았으며 triterpene은 cycloartanol, cycloartenol, 24-methylenecycloartanol 및 미지의 triterpene로 구성되었다.

미강유나 pitch 중 ferulic acid ester의 흡광도를 기준으로 γ -oryzanol의 함량을 평가한다면 큰 오차는 없으리라 생각된다.

인 용 문 헌

1. 綾野雄幸, 太田富貴雄, 渡邊幸雄, 三田浩三, 中村強. 1983. 植物纖維 - 食品營養學的 approach, 條原出版 : 201.
2. 青江誠一郎, 太田富貴雄, 陵野雄幸. 1988. 營食誌, 41 : 203 - 206.
3. Ichimaru, Y., Moriyama, M., Ichimaru, M. and Gomita, Y. 1984. Effects of γ -oryzanol on gastric lesions and small intestinal propulsive activity in mice. *Folia pharmacologia japon.* 84 : 537 - 542.
4. Hikino, H., Takahashi, M., Oshima, Y. and Konno, C. 1987. Isolation and hypoglycemic activity of oryzabrans A, B, C and D, Glycans of *Oryza sativa* Bran. *Planta Med.* 49 : 1 - 3.
5. Osawa, T., Ramarathnam, N. Kawakishi, S. and Namiki, M. 1992. Phenolic compounds in food and health. ACS. Washington : 135 - 149.
6. Sakamoto, K., Tabata, T., Shirasaka, K., Inakaki, T. and Nakayama, S. 1987. Effects of γ -oryzanol and cycloartenol ferulic acid ester on cholesterol diet induced hyperlipidemia in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 45 : 559 - 565.
7. Shinomiya, M., Morisaki, N., Matsuoka, N., Izumi, S., Saito, Y., Kumagai, A., Moritani, K. and Morita, S. 1983. Effects of γ -oryzanol

- on lipid metabolism in rats fed high-cholesterol diet. *Tohoku J. exp. Med.* 141 : 191 - 197.
8. 上海科學技術出版社. 1985. 中藥大辭典, 小學館 : 4717.
9. Tajima, K., Sakamoto, M., Okada., Mukai, K., Ishizu, K., Sukurai, H. and Mori, H. 1983. Reaction of biological phenolic antioxidants with superoxide generated by cytochrome P-450 model system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115 (3) : 1002 - 1008.
10. Yoshino, G., Kazumi, T. Amano, M., Tateiwa, M., Yamasaki, T., Takashima, S., Iwai, M., Hatanaka, H. and Baba, S. 1989. Effects of gamma-oryzanol on hyperlipidemic subjects. *Current Therapeutic Research*, 45 (4) : 543 - 552.