

꽃사슴 鹿茸의 生化學的成成分의 組成 및 含量

신국현*, 임순성, 정하숙¹, 백인범²

서울대학교 천연물과학연구소, ¹덕성여대 자연과학대학, ²호범생약

Analysis of the Composition of Biochemical Components in Unossified Antlers

Kuk Hyun Shin*, Soon Sung Lim, Ha Sook Chung¹ and In Bum Baek²

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460,

¹College of Natural Science, Duksung Women's University, Seoul 132-714 and

²Hobum Pharm. Co., Yusan-Ri, 508-11, Hobob-myon, Ichon-si, Kyung gi 467-820, Korea

Abstract – The composition of biochemical components such as lipids, proteins and their amino acid components and inorganic elements in the ashes in unossified antlers from *Cervus nippon* Temminck var. *mantchuricus* grown in Korea were analyzed to obtain fundamental data for quality control. As a result, it was found that total lipids were 20.75% which was approximately similar contents with those of proteins (21.8%). Sixteen amino acids were identified from the hydrolysate of the protein fraction. Three gangliosides with very similar TLC patterns of those such as GM₃, GM₁ and GD_{1a} were identified from the water soluble layer of Folch's partitions. Ash contents were revealed to be much higher in the sponge layer (40.0%) than in the velvet layer (3.7%).

Key words – Unossified antler; *Cervus nippon* Temminck var. *mantchuricus*; biochemical components; lipids; proteins and amino acids; ashes; inorganic elements; gangliosides.

녹용 (*Cervus*)은 梅花鹿 (*Cervus nippon* Temminck, Japanese deer) 또는 馬鹿 (*Cervus elaphus*, Red deer) 및 동속 근연 동물 (사슴과 Cervidae)의 털이 밀생되고 골질화 되지 않은 어린뿔로 정의¹⁾하고 있으나 *Cervus elaphus*는 12 아종이 있고 *Cervus nippon*은 13 아종이 있으며 이들 아종에 대해 중국, 한국, 일본은 모두 서로 다른 범위를 적용하고 있다.

녹용은 강장작용, 성장발육촉진작용, 조혈작용, 신경쇠약치료작용, 심부전증치료작용, 오장육부의 기능향진작용 등 다양한 효능이 있는 것으로 동의보감에 수록되어 있으며, 동물을 이용한 효능에 관한 연구는 백서의 성장촉진작용, 조혈작용, 혈청 cholesterol 저하작용, 단백질합성 촉진작용, 노화방지효과, 백서의 척추신경 효소활성 증가효과, 진통작용, 항피로

효과, 면역활성 증가작용 및 진정작용 등이 있음이 보고되어 있다.²⁻⁶⁾

녹용의 분석법에 관한 연구로는 원 등⁷⁾이 유리아미노산분석과 TLC 패턴분석 등을 보고한 바 있으나 특유성분의 기준 및 분석법이 확립되지 않고 관능적 검사법과 건조감량, 회분, 산불용성 회분 등을 품질관리를 행하고 있는 실정이다.

특히 녹용은 산지와 채취 시기 및 부위에 따라 효능이 크게 차이가 있는 것으로 알려져 있으며 이는 객관적이기보다는 주관적 견해에 의한 것으로 논란의 여지가 많다. 따라서 이들을 보다 객관적인 자료를 위하여서는 각각의 종류에 대하여 체계적인 성분과 그 효능의 연구가 시급히 요구된다.

본 연구에서는 국산 녹용 중 가장 많이 사용되고는 있으나 연구가 많이 이루어지지 않은 꽃사슴 (*Cervus*

*교신저자 : Fax 02-762-8322

nippon Temminck var. *mantchuricus*)을 대상으로 녹용의 구성성분에 대한 기초자료를 얻은 목적으로 녹용에 정상적으로 함유하고 있는 일반성분 (단백질, 아미노산, 회분중의 금속이온, 회분함량, 각종지질 등)의 함량과 조성을 측정 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험 재료 - 호범 생약 농원에서 사육한 꽃사슴 (*Cervus nippon* Temminck var. *mantchuricus*)으로부터 7~8월에 채취한 녹용을 -70°C 에서 냉동한 것을 -50°C , -30°C 및 -20°C 3단계로 1시간씩 냉동하고 0°C 에서 박판으로 절삭한 것이나 -30°C 에서 20시간 동결건조 한 후 $5\sim 50\mu$ 으로 분말화한 것을 실험에 사용하였다.

기기 및 시약 - 녹용의 냉동건조는 Freeze dryer (Eyela, Model FD-550, Max. cooling: -40°C)와 Low Temp. Cabinet (Hot Pack Corp., Chest Model, $0\sim -96^{\circ}\text{C}$)를 녹용의 분말화는 Sample Mill (Fuji Paudal Co. Ltd., $5\sim 50\mu$, 6000~12000 rpm)을 사용하여 실시하였으며 amino acid (AA)분석은 Waters Pico Tag system이 장착된 AA analyzer or Beckman 6300 analyzer를 금속이온의 정량은 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer 306, 기초과학지원센터)를 사용하여 실시하였다.

표준 ganglioside로서 소의 뇌에서 분리한 monosialoganglioside(GM_1), asialoganglioside(GM_1^*), disialoganglioside(GD_{1a}), monosialoganglioside(GM_3) 및 sialic acid(NeuNAc)를 Sigma Chemical Co.로부터, 분석용 시약이나 분리용 시약은 시판 특급시약을 구입하여 사용하였다.

녹용의 분획 - 꽃사슴 녹용의 생화학적 성분을 분석하기 위하여 성분의 종류에 따라 계통분획을 시도하였다. 지질분획은 냉동건조하여 박판으로 절삭한 녹용을 velvet층과 sponge층으로 분리한 후 분말화한 것 각각 2g씩을 Schneider⁸⁾ 및 Schmidt and Thanhauser⁹⁾등의 방법에 준하여 냉산가용성분획, 총지질 및 단백질 분획으로 계통분획 하였다. 즉 5% TCA로 냉침하여 냉산가용성 분획을 제거하고 잔사를 ethanol: ether (1:1)용액으로 3회 추출하여 총지질 분획으로 하였으며 총지질 제거한 잔사를 methanol: H_2O (1:1), acetone 및 ether을 가하여 순차적으로 진탕추출하여 세척한 후, 남은 잔사를 1N- NH_4OH 로 50°C 에서 2회 가온 추출한 다음 원심분리

하여 얻은 상등액을 합한 것을 단백질분획으로 하였다.

총지질분획은 지질계통분획법¹⁰⁾에 의하여 acetone, chloroform, ether 및 pyridine 등으로 단순지질, 복합지질로 분획한 후 상법에 의하여 각 지질성분의 함량을 구하였다. 총단백질의 정량은 Lowry법¹¹⁾에 준하여 실시하였다.

Ganglioside의 분획 및 확인 - 녹용 품질관리의 지표물질로 활용가능성을 검토하기 위하여 녹용에 함유된 ganglioside 분획과 확인을 시도하였다.

즉 녹용으로부터 ganglioside 분획을 얻기 위하여 분말화한 녹용 일정량을 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1) 및 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:2)로 냉침하여 분획을 얻고 다시 Folch의 분배법^{12,13)}에 준하여 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1) 1용, H_2O 1/4 용 및 0.88% KCl으로 분배하여 수층과 CHCl_3 층을 각각 45°C 이하에서 감압 농축 건조하였다. 이와같이 얻은 수층과 CHCl_3 층을 소량의 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:48:47)에 용해시키고 TLC에 점적한 후 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:2.5\text{M NH}_4\text{OH}$ (60:35:8)로 전개한 다음 건조하고 Bial 시약을 분무한 다음 유리판을 덮고 120°C 에서 20분간 가열하여 나타난 자색 spot을 확인하였다. 이때 표준 ganglioside로서 소의 뇌에서 분리한 monosialoganglioside(GM_1), asialo ganglioside(GM_1^*), disialoganglioside(GD_{1a}), monosialoganglioside(GM_3) 및 sialic acid(NeuNAc) 등을 전개시켜 그 TLC pattern을 비교하였다.

단백질의 AA pattern 분석 - 단백질의 AA 조성과 pattern을 분석하기 위하여 녹용의 단백질 분획에 대한 전처리를 실시하였다. 즉, 냉산 가용성 분획과 지질분획을 제거하고 남은 분획으로부터 얻은 단백질분획 일정량을 cap시험관에 취하고 6N-HCl을 가하여 밀봉한 후 110°C 에서 18시간 가수분해한 용액을 감압증류하여 건조한 다음 유도체화 하여(phenyl isothiocyanate), AA analyzer에 주입 chromatogram을 얻었으며 각 AA의 량과 chromatogram의 면적비를 plot하여 검량선을 작성하였다.

회분 및 무기이온의 분석 - 분말화한 녹용 일정량 ($0.5\sim 1.0\text{g}$)을 함량으로 한 crucible에 옮기고 전기로에서 600°C 로 2시간 회화시킨 후 desiccator에서 항량으로한 다음 정량하여 회분량을 구하였다. 회분중의 미량금속이온은 정량하기 위하여 위에서 얻은 회분을 HCl (4:1) 용액에 용해시키고 여과한 다음 여액을 일정량으로 희석한 후 원자흡광도계에 의하여 금속이온을 분석하였다.

Table I. Chemical composition of unossified antlers from *Cervus nippon* Temminck var. *mantchuricus*

Component	Content %(w/w)		Total contents (%)
	Sponge	Velvet	
Total lipid	5.08	15.67	20.75
Neutral(Simple) lipid	0.99	2.82	3.81
Glycerophospholipid	0.36	3.63	3.99
- Lecithin	(0.22)	(3.06)	(3.28)
- Cephalin	(0.24)	(0.47)	(0.71)
Glycolipid	0.21	0.37	0.58
Sphingo phospholipid	0.13	4.65	4.78
Connective lipid	3.38	4.20	7.58
Glucose	0.30	0.44	0.74
Total protein	12.20	9.60	21.80
Ash*	40.00	3.70	43.70(UP:35.1 MP:41.6LP:45.0)
Inorganic elements in Ash(mg/g)			
Mg	3.1	0.3	3.4
P	74.6	3.1	77.7
Ca	33.6	2.5	33.5
Na	7.6	8.5	16.1
K	1.7	3.2	4.9

UP; upper parts, MP; middle parts, LP; lower parts

결과 및 고찰

Table I에 녹용의 velvet층과 sponge층의 각종성분을 분석하고 그 결과를 건조 녹용중량의 백분율로서 종합하여 표시하였다. Table I에서 보는 바와 같이 지질 함량이 건조녹용의 약 20.75%로서 단백질과 유사한 함량 비율을 보였다. 부위별로 보면 velvet층의 지질이 15.67%로서 sponge층에 비해 약 3배로 나타났고 기타 지질성분들도 velvet층에 치우쳐 분포되어 있음을 알 수 있다. 중성지질 속에는 glyceride, sterol, hydrocarbon 및 색소 등을 포함할 것으로 예상되며 중성지질 분석에서 특이성있는 sterol성분이 분리되고 있다.¹⁴⁾

인지질은 그 함량이 약 10%였으며 약효성분으로 예상되는 glycerophospholipid와 sphingo phospholipid가 유사한 함량비를 보였다. 최근 녹용의 phospholipid에 혈압강하작용이 있음이 보고되고 있고¹⁵⁾ 특히 약리작용성분으로 추정되고 있는 lecithin이 높은 함유 비율을 나타내어 다른 약리작용이 phospholipid에서 나타날 것이 예상된다. 산가용성분획의 함량비는 3%내외로서 극히 낮았으며 유리당의 농도는 1%미만이었다. 녹용을 회화시켜서 얻은 총회분의 량

은 그 평균치가 43.7%였으며 상대 : 35.1% 중대 : 41.6% 및 하대 : 45%를 나타내었다. 부위별로는 sponge층이 40%로서 velvet층의 3.7%에 비해 무기질의 대부분을 차지함을 알 수 있다. 회분속에 함유된 각종 무기이온을 분석한 결과 P의 함량이 가장 높았고, 미량 금속이온 중에는 Ca의 함량이 가장 높았으며 Na, K 및 Mg순으로 함량이 낮아졌다.

이상의 실험결과에 의하면 녹용의 sponge층에는 무기질이 velvet층에는 유기질이 많이 분포되어 있으며 특히 지질성분에 여러 가지 약효가 예상되므로 앞으로 녹용의 부위별 약물활성을 체계적으로 검토해야 할 과제로 사료된다.

단백질 중의 amino acid pattern - 단백질은 동물조직 구성성분중 중요성분의 하나임은 주지의 사실이며 조직에 따라 AA조성과 pattern을 달리한다. 녹용의 단백질의 AA 조성과 pattern을 분석하기 위하여 녹용의 단백질분획을 가수분해한 후 AA 자동분석기에 걸어 얻은 전형적인 chromatogram을 Fig. 1에 표시하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 16개의 완전히 분리된 AA들의 특이한 peak pattern을 보였으며 그 peak area와 함량으로 볼 때 glycine이 특이적

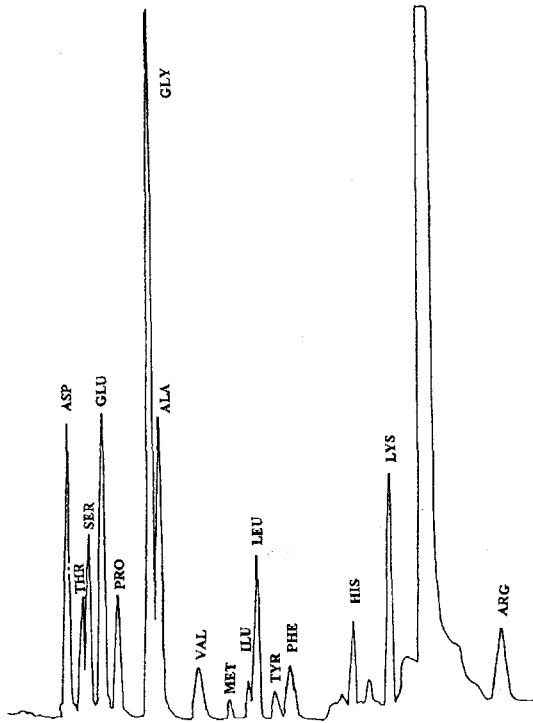


Fig. 1. Chromatograms of amino acids in proteins from antlers. To analyze amino acid contents in protein, the protein fraction was hydrolyzed with 6N hydrochloric acid at 110°C for 18 hrs. An aliquot of the hydrolysate was derivatized with phenyl isothiocyanate and applied acid analyzer. ASP: asparagine; THR: threonine; SER: serine; GLU: glutamine; PRO: proline; GLY: glycine; ALA: alanine; VAL: valine; MET: methionine; ILE: phenylalanine; HIS: histidine; LYS: lysine; ARG: arginine.

으로 큰 값을 보였으며 aspartic acid, glutamic acid, alanine, proline, arginine 등이 비교적 높은 면적비를 나타내었다. isoleucine, tyrosine 및 histidine 등이 가장 낮은 면적비를 보였다. (Table. II)

이상의 결과에 의하면 녹용단백의 AA중에는 cysteine이 검출되지 않는다는 것이 특이하며 그 조성으로 볼 때 주로 collagen의 구성 AA의 pattern과 유사함을 알 수 있다.

Ganglioside의 확인 - Ganglioside는 녹용의 특이성분의 하나로서 품질관리의 지표성분의 가능성이 있으므로 꽃사슴 녹용의 ganglioside종류와 pattern을 규명할 목적의 일환으로 용매분획 및 Folch분배법^{12,13)}에 의해 분획하여 ganglioside분획의 수층과 chloroform층을 얻어 소의 뇌조직에서 분리한 표준

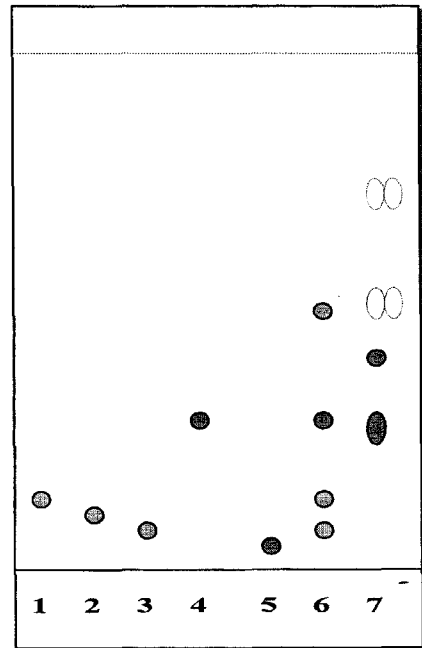


Fig. 2. 2TLC Chromatograms of gangliosides from antlers. Lane 1: monosialoganglioside; Lane 2: asialoganglioside; Lane 3: disialoganglioside; Lane 4: monosialogangliosides; Lane 5: sialic acid; Lane 6: water fraction; Lane 7: chloroform fraction. The developing solvent; chloroform: methanol:2.5M NH₄OH (60:35:8), Chromatosheet; silica gel (F₂₅₄), Detection; Bial-reagent.

ganglioside인 GM₁, GM₁^{*}, GM₃, GD_{1a} 및 NeuA등과 함께 TLC로 전개후 발색시약 (Bial시약)을 분무하여 spot를 확인 그 pattern을 검토한 결과 Fig. 2에 표시한 바와 같이 녹용의 경우 Rf가 0.07, 0.14, 0.32, 0.5등 4개의 뚜렷한 spot를 확인할 수 있었으며 이중 녹용수층(Rf 0.32)의 spot는 표준 ganglioside GM₃와 거의 일치하며 Rf 0.14 및 0.07의 spot는 각각 GM₁와 GD_{1a}의 그것과 유사함을 확인하였다. 이는 전등¹⁶⁾과 김등¹⁷⁾이 매화목에서 분리한 ganglioside들의 거동을 TLC로 확인한 결과와 일치한다.

결론

1. 녹용분말 (꽃사슴)의 지표 성분인 강그리오시드는 TLC에 의해 4종의 Rf가 상이한 강그리오시드가 확인되었으며 이중 3종은 표준 강그리오시드 monosialoganglioside(GM₃)와 disialoganglioside(GD_{1a})또는 asialoganglioside(GM₁)등과 같거나 유사한 구조를 갖는 성

Table II. Amino acid composition in the proteins of unossified antlers

Amino acid	Protein			Content ^{b)} (W/W %)	Contents in antler(%)
	A ^{a)}	B ^{a)}	C ^{a)}		
Aspartic acid	5729.5 ^{c)}	2278.5	1246.0	10.4	1.02
Threonine	1848	763	427	3.44	0.34
Serine	2905	1417.5	808.5	6.08	0.60
Glutamic acid	5869.5	2828	1291.5	11.31	1.11
Proline	3703	1883	1018.5	7.82	0.77
Glycine	8631	3440.5	2723	17.90	1.76
Alanine	3062.5	1053.5	808.5	5.69	0.56
Valine	1792	906.5	532	3.89	0.38
Methionine	2569	1039.5	1043	5.98	0.59
Isoleucine	966	486.5	297.5	2.12	0.21
Leucine	2884	1365	794.5	5.96	0.58
Tyrosine	700	493.5	301	1.96	0.19
Phenylalanine	1536.5	703.5	577.5	3.56	0.35
Histidine	234.5	119	52.5	0.46	0.05
Lysine	2821	1445.5	871.5	6.24	0.61
Arginine	3647	1795.5	1078	7.83	0.77

^{a)}The area ratio of HPLC in the hydrolysate of proteins; A=1, B=0.5, C=0.25

^{b)}AA(%) in proteins.

^{c)} Concentration of AA (ppm) in the hydrolysate of proteins.

분임을 알았다. 지질성분중 glycerophospholipid의 하나인 lecithin의 함량비가 특이적으로 높았다.

2. 녹용분말 (꽃시슴)의 단백질 함량은 21.8%이며 가수분해에 의해 16종의 AA로 구성되어 있음을 확인하였으며 독특한 크로마토그램을 나타냄을 입증하였다. AA중 glutamic acid, proline, arginine, leucine, lysine, isoleucine, histidine 등은 아미노산 정량의 지표성분으로 활용가능함을 알았다.

3. 녹용분말 (꽃시슴)의 회분은 평균 43.7%이며 sponge가 40.0%로서 회분의 대부분을 차지하고 있었다. 금속이온중 Ca의 함량이 가장 높았다.

사 사

본 논문의 연구수행 중 AA분석 및 원소분석은 기초과학연구원센터의 서울분소에서 이루어 졌으며 이에 감사한다.

인용문헌

1. 대한약전 (1992) 6th ed. *Korean Pharmacopoeia*. 한국메디칼인텍스사.
2. 신국현, 이은방, 김재현, 정명숙, 조성익 (1989) 분말

녹용의 약물활성 연구(I). 생약학회지 20: 180-187.

3. 용재의 (1964) 實驗的 家兔貧血에 미치는 鹿茸投與의 影響. 약학회지 8: 6-11.
4. Wang, B., Zhao, X., Qi., Yang, X., Kaneko, S., Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y. (1988) Stimulating effect of deer antler extract on protein synthesis in senescence-accelerated mice *in Vivo Chem. Pharm. Bull.* 36: 2593-2598.
5. Wang, B., Zhao, X., Qi., Kaneko, S., Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y. (1988) Effect of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 2587-2592.
6. 허금, 최숙현, 이희빈, 정규찬, 고돈이(1960) 鹿茸에 관한 研究(第2報): 鹿茸이 實驗用 白鼠의 成長에 미치는 影響에 對하여(其一). 약학회지 5: 10-15.
7. 원도희, 윤태보, 조정희, 홍남두, 허재두 (1985) 국립보건원보 22: 359.
8. Schneider, W. C. (1945) Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.* 161: 293-303.
9. Schmidt, G. and Thannhauser, S. J. (1945) A method for the detection of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal

- tissues. *J. Biol. Chem.* 161: 83-89.
10. 山川民夫 등 (1974) 脂質의 化學. 生化學實驗講座 3: 388-404.
 11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randal, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
 12. Folch, J., Lee, M. and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
 13. Ledeen, R. W., Yu, R. K and Eng, L. F. (1973) Gangliosides of human myelin; sialosylgalactosylceramide (G₇) as a major component. *J. Neurochem.* 21: 829-839.
 14. Hattori, M., Yang, X. W., Kaneko, S., Nomura, Y. and Namba, T. (1989) Constituents of the pi lose antler of *Cervus nippon* var. *mantchuricus*. *Shoyagaku Zasshi* 43(2): 173-176.
 15. Tsujibo, H. (1987) Hypotensive compounds isolated from alcohol extract of the unossified horn of *Cervus elaphus* L. var. *xanthopygus* (Rokujo). I. Isolation of lysophosphatidyl choline study of related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 654-659.
 16. Jhon, G. J., Park, S. Y., Han, S. Y., Lee, S., Kim, Y. and Chang Y. S. (1999) Studies of the chemical structure of gangliosides in deer antler *Cervus nippon*. *Chem. Pharm. Bull.* 47(1): 123-127.
 17. Yoo, Y., Kim, Y., Jhon, G. J. and Park, J. (1993) Separation of gangliosides using cyclodextrin in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 652: 431-439.

(1999년 6월 4일 접수)