

칠틈리의 항균활성과 Isoflavonoid 화합물에 관한 연구

신수철, 강성구, 장미정
순천대학교 농과대학 식품공학과

A Study on the Screening of Antimicrobial Activity and the Isoflavonoids in Korean Arrowroot

Soo Cheol Shin, Seong Koo Kang and Mi Jeong Jang
Dept. of Food Science & Technol., Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

ABSTRACT

The experiments were carried out to investigate the antimicrobial activity and the content of isoflavonoids each fraction of the methanol extract from Korean arrowroots. The strongest antimicrobial fraction of the methanol extract was the ethylacetate fraction and the other fraction was not detected antimicrobial activity. The yield of the ethylacetate fractionation was 7~9% of the methanol extract of Korean arrowroot. TLC was carried out using silical gel plate and CH₂Cl₂- CH₃OH(7 : 3) and puerarin, daizin were detected by spraying 10% H₂SO₄ and R_f was 0.60 and 0.69, respectively. Puerarin, daidzin and daidzein contents were determined of the ethylacetate fraction of the sample. Puerarin and daidzin contents were abundant in the samples of November, while daidzein content was abundant in the sample of February.

Key Words : puerarin, daidzin, daidzein

서 언

전보(신, 1997)에서 저자는 우리나라 산야에 대단히 많이 분포하고 있는 칠틈리를 가공식품으로 개발하는데 가공제품 생산의 기초자료로 이용하기 위하여 필요한 자료를 얻은 목적으로 채취시기별, 형태별로 몇가지 영양성분을 분석하여 보고하였다. 그런데 칠틈리는 주로 차의 원료와 약초로 이용되어 왔는데(육, 1989), 약용관련 연구보고로는 항산화 작용

(오, 1990), 약리적 영향(Masatoshi, 1975), antivirus, 항혈액응고, 고혈압 등의 약리작용(Junei 등, 1987; Takashi 등, 1992)이 있고, 몇가지의 flavonoid 화합물(Koichi 등, 1982; Junko 등, 1984; Yukio 등, 1988; Yoshimi 등, 1988; Takaaki 등, 1993)과 방향족 화합물(Junei 등, 1985; Toshihiro 등, 1993)에 대한 연구보고가 있다. 그래서 칠틈리를 이용한 가공식품이 가능성을 갖는 건강식품으로 개발 가능성을 탐색하고자 먼저 항균활성과 항산화작용 등이 밝혀진 isoflavonoid 화합물을 분석하였다.

Corresponding author: 신 수 철, 우.540-742, 전남 순천시 매곡동 315 순천대학교 식품과학부 식품공학과
E-mail: ssc5557@sunchon.ac.kr

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 칩은 전남 구례군 월전리에서 7월말, 11월초, 2월말 3회, 형태별로(암칩, 수칩)수집하여 가볍게 수세한 후 세절하여 냉동저장한 재료를 일정량의 methanol로 추출여과하고 여액을 감압진공농축기(Mitamura Co., Japan)로 농축하여 얻은 methanol 추출물을 냉동저장하면서 시료로 사용하였다.

방법

Methanol 추출물의 용매분획

각 시료들의 methanol 추출물을 분획여두로 hexane, ethylacetate, 수포화 butanol순으로 용매분획하고 약 40℃에서 감압농축하여 항균력과 isoflavonoid계 화합물의 검색에 이용하였다.

항균력 검색

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 그람양성균으로 Bacillus cereus, 그람음성균으로 Escherichia coli와 Salmonella typhimurium 3균주를 선정하여 사용하였으며 배지는 nutrient 한천배지를 사용하였다.

항균력 측정

추출된 시료의 항균력 검정은 한천배지 확산법(Disc plate method)으로 측정하였다. 즉 0.45µm membrane filter로 시료를 여과하여 제균하고 멸균된 8mm filter paper disc에 고형물 함량으로 0.8mg/disc 흡수시킨 후 추출용매를 완전히 날려 보내고 평판배지 표면에 놓아 밀착시키고 4℃냉장고에서 1시간 동안 방치후 incubator에서 30℃로 48시간 동안 배양하여 disc 주변의 clear zone의 직경(mm)을 측정하여 항균력을 비교하였다.

Isoflavonoid 화합물의 분석

분리 및 Thin layer chromatography (TLC)

Methanol 추출물을 용매분획하여 얻은 에틸아세테이트층을 silical gel column chromatography를 행하여 다시 여러개의 subfraction으로 분리하였다. 용출용매는 dichloromethane과 methanol을 사용한 step-wise용출법을 사용하였고 얻어진 분획물들은 TLC로 분리를 확인하였다. TLC는 Kiesel gel 60 F 254(Merk) 판상에 CH₂Cl₂-CH₃OH = 7 : 3의 전개용매를 사용하고 spot는 UV(254nm, 375nm) 하에서 관찰하고 10%-H₂SO₄ 발색시약을 분무하여 확인후 Rf 값을 측정하였다.

HPLC에 의한 분석

얻어진 획분들을 농축하여 90% methanol로 정용한 다음 오 등(1990) 방법에 따라 HPLC로 분석하였으며, 정량은 표준품의 peak면적에 대한 각 peak면적비로 계산하였고 분석조건은 표 1과 같다.

Table 1. The condition of HPLC for analysis of isoflavonoids

Instrument	: Waters associate model 990
Column	: ODS (4.6 × 250nm)
Solvent	: 18% CH ₃ CN with 1% acetic acid
Flow rate	: 1 ml/min
Detector	: UV detector(254nm)
Injection volume	: 5 µl

결과 및 고찰

Methanol 추출물의 항균활성

각 시료의 methanol추출물을 용매분획하여 분획물들의 생육저지환을 측정하여 각 균주에 대한 억제효과를 검색한 결과는 표2와 같다.

용매분획물중 에틸아세테이트 분획물에서만 항균활성이 나타나고 다른 분획물에서는 항균활성이 나타나지 않았다. 칩의 종류별로는 암칩의 추출물보다 수칩의 추출물에서 항균력이 큰 것으로 나타났고 균주는 그람음성균인 E. coli와 S. typhimurium가 그람양성균인 B. cereus보다 높은 활성을 나타내었다.

Table 2. Antimicrobial activities of subfraction from the methanol extracts of Korean arrowroot against several microorganisms

strains	Clear zone on plate ^(mm) ^{a)} (0.8mg/disc)							
	n-Hexane extract		Ethylacetate extract		Butanol extract		Water extract	
	A	B	A	B	A	B	A	B
B. cereus	- ^{b)}	-	14	10	-	-	-	-
E. coli	-	-	16	12	-	-	-	-
S. typhimurium	-	-	16	12	-	-	-	-

a) : Diameter, b) No inhibitory zone was formed

A : male , B : female

Isoflavonoid 화합물의 분리 및 박층크로마토 그래피

취의 methanol 추출물을 용매분획하여 얻은 추출물의 조성은 표 3과 같다.

Table 3. The extract yield of solvent fractions from the methanol extracts of Korean arrowroot (%)

	July		November		February	
	A	B	A	B	A	B
Methanol extracts	11.6	11.8	11.22	11.5	11.1	11.6
Hexane fraction	0.58	0.64	0.42	0.52	0.50	0.48
Ethylacetate fraction	0.98	0.84	1.14	0.52	0.98	0.82
Butanol fraction	7.78	7.38	6.52	6.92	7.20	7.94
Water fraction	2.32	2.94	3.14	3.54	2.46	2.32

A : male, B : female

각종 시료의 비슷한 methanol 추출물을 용매분획한 결과 butanol 획분이 58~68%이었고 수용액 획분이 20~30%이었고 에틸아세테이트 획분이 7~9%이었으며 나머지 4~5%가 hexane획분으로 나타났다. 이들 획분중 항균활성이 강한 에틸아세테이트 획분은 11월 수취에서 많은 양이 얻어졌고 반면에 11월 암취에서 가장 적은 양이 얻어졌으며 시기에 관계없이 수취에서 많은 양으로 나타났으며 7월과 2월 채취 시료는 비슷한 함량을 나타내었다. 또한 에틸아세테이트 분획물을 dichloromethane과 methanol을 이용한 단계적 용출법으로 silica gel chromatography

를 행하여 얻은 여러개의 sub-fraction을 TLC 하였는데 전개용매를 CH₂Cl₂ -CH₃OH = 7 : 3 으로 한 결과 isoflavonoid 화합물중 취에 함유된 daidzin은 Rf 0.69를 그리고 puerarin은 Rf치 0.60을 나타내었다. 이러한 결과는 Junko 등(1984)의 결과와 비슷하였다. 그리고 subfraction중에 puerarin과 daidzin의 분포는 용출용매 CH₂Cl₂-CH₃OH 의 비율이 8 : 2의 뒷부분에서부터 7 : 3과 5 : 5의 용출용매에 유출되었다.

Isoflavonoid 화합물의 함량

취의 methanol 추출물을 용매분획하여 얻은 에틸아세테이트 분획물을 HPLC로 분석한 결과 표 4와 같다.

취뿌리에 함유된 isoflavonoid 화합물중 3 종류를

Table 4. Contents of isoflavonoids in methanol extracts of Korean arrowroot (mg/g)

	July		November		February	
	A	B	A	B	A	B
Puerarin	24.15	24.76	26.86	29.69	16.10	28.47
Daidzin	15.58	16.26	10.99	18.29	8.45	12.71
Daidzein	2.13	2.77	1.60	4.92	1.25	3.69

A : male, B : female

정량하였는데 채취시기와 종류에 관계없이 puerarine 이 가장 많은량 함유되었으며 daidzin 그리고 daidzein 이 가장 소량 함유되었고 11월 채취한 취뿌리에 다량 함유되었으며 종류별로는 암취에 다량 함유된 것으로 나타났다. 3가지 화합물의 함량의 결과는 오 등(1990)의 함량보다는 낮은 함량을 나타냈으며 Junko 등(1984)의 결과와는 비슷한 경향을 보였으며 Takaaki 등(1993)의 한방탕액의 1일 함량중 puerarin 은 50~130mg으로 보고하여 본 시료에 충분하고 daidzin과 daidzein의 함량은 거의 비슷한 함량을 나타내어 섭취하기에 적합한 함량으로 판단되었다.

· 적 요 ·

칠틈뿌리를 이용한 건강식품의 개발 가능성을 탐색 하고자 항균활성과 isoflavonoid 화합물을 분석한 결과는 다음과 같다. 항균활성은 칠틈뿌리의 methanol 추출물의 용매분획물중 에틸아세테이트 분획물에서 나타났으며 암칠틈보다는 슛칠틈에서 활성이 높고 그람 음성균에서 활성이 크게 나타났다. 그리고 ethylacetate분획물은 7~9% 수율로 얻어졌고 silical gel TLC에서 CH₂Cl₂ : CH₃OH = 7 : 3 전개용매로 puerarin 은 Rf치 0.60 daidzin은 Rf치 0.69를 나타내었으며 isoflavonoid중 purearin의 함량이 가장 많고 daidzin 그리고 daidzein은 소량 함유된 것으로 나타났으며 이들의 함량은 슛칠틈보다 암칠틈에서 높게 나타났다.

인용문헌

- Junei. K., Junichi F., Junko B and Toshihiro N 1987. Studies on the constituents of Pueraria lobata Ⅲ. Chem. Pharm. Bul. 35(12) : 4846-4850
- Junei K., Junichi F. and Toshihiro N. 1985. Two novel aromatic glycosides, Pueroside-A and B, from Pueraria radix. Tetrahedron Letters. 26(49) : 6101-6102
- Junko H. Naoki N. and Keiichi U. 1984. Studies on Physical and Chemical quality evaluation of crude drugs preparations. Yakugaku Zasshi. 104(1) : 50-56
- Koichi T. and Hideji I. 1982. Isoflavonoids and the Other constituents in Callus Tissue of Pueraria Lobata. Chem. Pharm. Bul. 30(4) : 1496-1499
- 육창수, 1989, 원색 한국약용식물도감, 아카데미 p 301
- Masatoshi. H. and Koichi. U.1975.Pharmacological studies on Pueraria root. Chem. Pharm. Bul. 23(8) : 1798-1805
- 오만진, 이가순, 손화영, 김성렬, 1990. 칠틈뿌리의 항산화 성분, 한국식품과학회지, 22(7) : 793-798
- 신수철, 1997, 칠틈뿌리의 유리당 및 아미노산 조성에 관한 연구
- Takaaki Y., Noriko M. and Keisuke O. 1993. A simultaneous determination of Daidzin and Puerarin and determination of daidzein in oriental pharmacological decoctions containing puerariae radix by ion-pair HPLC. Yakugaku zasshi 113(12) : 881-889
- Takashi S., Akihiko K. and Tatsuzo F(1992) Mechanism of Antioxidant Action of Pueraria glycoside and mangiferin. Chem Pharm .Bul. 40(3) : 721-724
- Toshihiro N., Junei K., Ichiro. Y. and Manki K. 1993. Bult-2-enolides from Pueraria lobata and revised structures of Pueroside A, B and sophoroside A. Phytochemistry 33(5) :1207-1210
- Yoshimi K., Michiko S. and Yutaka Y. 1988. Analysis of isoflavone derivatives in Kuzu starch by TLC-densitometry. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 35(3) : 141-146
- Yukio O., Toru O. and Shoji S. 1988. Isolation and HPLC of isoflavonoids from the Pueraria root. Planta medica : 250-254

(접수일 1999. 8. 4)

(수리일 2000. 3. 1)