J Korean Soc Food Sci Nutr
40(12), 1793~1796(2011)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.12.1793

황기와 몽고황기 추출물의 항산화 활성 및 Nitric Oxide 생성능

– 연구노트 –

이광재[1] · 박민희[1] · 박유화[1] · 임상현[1] · 김경희[1] · 김영국[2] · 안영섭[2] · 김희연[1†]

[1]강원도농업기술원
[2]농촌진흥청 국립원예특작과학원

Antioxidant Activity and Nitric Oxide Production of Ethanol Extracts from *Astragali membranaceus* Bunge and *A. membranaceus Bunge* var *mongholicus* Hisiao

Kwang-Jae Lee[1], Min-Hee Park[1], Yu-Hwa Park[1], Sang-Hyun Lim[1], Kyung-Hee Kim[1], Young-Guk Kim[2], Young-Sup Ahn[2], and Hee-Yeon Kim[1†]

[1]*Gangwon Agricultural Research and Extention Services, Gangwon 200-822, Korea*
[2]*National Institute of Horticultural & Herbal Science, R.D.A, Chungbuk 369-873, Korea*

Abstract

The effects of ethanol extracts from *Astragali membranaceus* Bunge (AMB) and *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao (AMBMH) on antioxidant and nitric oxide (NO) production were evaluated. The total polyphenol contents of AMBMH extracts from two, four, and six-year old roots was 45.3, 71.3, and 78.0 mg/g, respectively. These values and those of total flavonoid content were higher than those of AMB extracts. The DPPH radical scavenging activity was the highest in ethanol extracts from four-year old AMBMH roots. The ABTS radical scavenging activity was also higher than those of AMB in ethanol extracts from four- and six-year old AMBMH roots, but not in two-year old roots. The NO production of ethanol extracts from six-year old AMBMH roots was higher than that of two- and four-year old AMBMH roots. However, there is no significant difference in NO production based on the cultivation period of AMB.

Key words: *A. membranaceus* Bunge, *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao, antioxidant activity, nitric oxide production

서 론

황기(Astragali Radix; *Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과에 속하는 다년생 초본식물의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것으로 한국, 중국, 몽골 등 아시아 지역과 유럽 및 아프리카의 일부 지역에 널리 분포하며 한방에서 지산, 이뇨, 강장, 혈압강하 등의 목적으로 이용되어 왔다(1). 황기는 항산화작용, 간 기능 보호작용, 항바이러스작용, 항고혈압작용, 세포성장작용, 이뇨작용, 혈당강하작용, 면역증강작용 및 항종양작용 등 여러 기능성이 보고된 바 있으며, 황기 뿌리에는 식물성유사호르몬(phytoestrogen)으로서 여성호르몬의 천연 대체물질로서 알려져 있는 isoflavone 배당체인 formentin이 존재하며, 그 밖에 triterpenoide glycolside, betaine, choline, β-sitosterol 등의 성분을 함유하고 있다(2-4). 이와 같이 황기가 가지고 있는 다양한 기능성으로 인해 한약재뿐 아니라 식품으로서의 수요가 증가하고 있으며 이에 따른 재배면적 및 약재수입 또한 증가하고 있어, 중국, 일본 및 대만 등에서 약재로 추가되어 있는 몽고황기(*A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao)의 국내시장 혼입유통이 증가하고 있으나(5) 기원식물에 따른 생리활성 연구는 부족한 실정으로, 본 연구에서는 기원식물에 따른 효능 차이를 비교하고자 항산화활성 및 NO 생성능을 측정하였다.

재료 및 방법

시험 재료

실험에 사용된 황기는 강원도 정선에서 재배된 2년근, 4년근 및 6년근을 구입하여 사용하였고, 몽고황기는 중국 흑룡강성 목단강시 특산연구소에서 재배된 2년근, 4년근 및 6년근 시료를 수집하여 사용하였으며, 재배연수에 따라 구분하여 추출물을 제조하였다. 추출물 제조는 수확한 황기 뿌리를 깨끗하게 수세 후 냉풍제습건조기(TJHP-1003, Joogang Precision, Daegu, Korea)에서 건조하여 마쇄한 분말시료 20

†Corresponding author. E-mail: heeya80@korea.kr
Phone: 82-33-248-6520, Fax: 82-33-248-6555

g에 에탄올 200 mL을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 2회 추출한 후 동결건조기(PVTFD 10R, Ilshin Co., Ltd., Yangju, Korea)를 이용하여 제조하였으며(6), -20°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(7)을 응용하여, 각 추출물 1 mg을 95% 에탄올 1 mL에 녹이고 2~10배 희석한 희석액 2 mL에 Folin 시약 2 mL을 첨가하고 잘 혼합하여 5분간 방치한 후 2 mL의 10% Na_2CO_3를 혼합하여 UV/VIS spectrophotometer(DU 730, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였으며, 표준곡선은 gallic acid 최종 농도가 0, 100, 200, 300, 400, 500 μg/mL이 되도록 하여 측정한 값을 사용하여 작성하였다. 총 플라보노이드 함량은 각 추출물 1 mg을 95% 에탄올 1 mL에 용해시키고 diethylenglycol 2 mL, 1 N NaOH 0.02 mL를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다(8). 총 플라보노이드 함량은 naringin(Sigma)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였으며, 표준곡선은 naringin의 최종 농도가 0, 100, 200, 300, 400, 500 μg/mL이 되도록 하여 흡광도를 측정한 후 작성하였다.

DPPH 및 $ABTS^+$ radical 소거활성 측정

추출물에 대한 항산화 활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich) 및ABTS(2,2-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid, Sigma-Aldrich) radical의 소거활성을 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 Blois의 방법(9)을 변형하여 측정하였으며, 각 농도의 황기 추출물 50 μL에 0.2 mM DPPH용액 100 μL를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시키고 microplate reader(UVM 340, ASYS Hitech GmbH, Engendorf, Austria)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. $ABTS^+$ radical 소거활성은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합 후 실온 암소에서 15시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 후 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석된 ABTS용액 0.8 mL에 황기 추출액 0.2 mL을 가하여 실온에서 15분 동안 방치한 다음 microplate reader(UVM 340, ASYS Hitech GmbH, Engendorf, Austria)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다(10). DPPH 및 $ABTS^+$ radical 소거활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타냈으며, 기존의 항산화제인 ascorbic acid (Sigma)를 대조물질로 사용하여 활성을 비교하였다.

Nitric oxide 생성량 및 세포독성 측정

Nitric oxide(NO) 생성량은 한국세포주은행에서 분양받은 RAW264.7 세포주(mouse macrophage cell line)를 이용하여 측정하였다. NO 생성량 측정을 위해 RAW264.7 세포주를 96 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음 황기 추출물을 최종 100 μg/mL의 농도가 되도록 처리하여 24시간 배양 후 NO 생성량을 확인하였다. NO의 정량은 상등액 100 μL를 회수하여 griess reagent(Fluka Chmie AG, Buchs, Switzerland)를 첨가하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 0.1 μg/mL 농도의 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하였다. 세포독성 측정은 RAW264.7 세포주를 1×10^5 cells/well로 96 well plate에 분주하여 배양한 다음, 황기 추출물을 최종 농도가 100 μg/mL이 되도록 처리하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT)용액을 첨가하여 동일한 배양조건에서 4시간 동안 배양한 다음, 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여서 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

$$\text{세포 생존율}(\%)=\frac{\text{시료 처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\times100$$

통계처리

모든 측정값은 평균값±표준편차(mean±SD)로 표시하였고 통계처리는 SAS 9.2 for windows program을 사용하였으며, 유의성 검정은 분산분석(ANOVA) 후 $p<0.05$ 수준에서 Duncan 다중검정법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성

황기 및 몽고황기 각각의 추출물에 포함된 총 폴리페놀 함량을 조사한 결과(Table 1), 몽고황기가 황기에 비해 더 많은 양의 총 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 황기의 총 폴리페놀 함량은 2년근, 4년근 및 6년근에서 각각 46.7 mg/g, 46.0 mg/g 및 44.7 mg/g으로 재배연수에 따른 차이가 나타나지 않았으나, 몽고황기의 경우 2년근이 45.3 mg/g, 4년근이 71.3 mg/g, 6년근이 78.0 mg/g으로 나타나 총 폴리페놀 함량이 4년근에서 급격히 증가하는 것을 확인하였다. 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀 함량 분석 결과와 마찬가지로 황기에 비해 몽고황기가 더 많은 양의 총 플라보노이드를 함유하고 있었다. 특히, 몽고황기 4년근 및 6년근은 11.3 mg/g 및 13.3 mg/g의 총 플라보노이드를 함유하고 있어 동일한 재배연수의 황기에 비해 1.9~2.5배 많았으며, 총 폴리페놀 함량과 같이 4년근을 기준으로 재배연수가 증가할수록 총 플라보노이드 함량이 증가하였다. 이와 같이, 재배연수에 따른 몽고황기(AMBMH)의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석 결과는 총 페놀성 화합물 함량이 재배연수에 비례하여 증가한다고 보고(11)와 일치하였으나 황기(AMB)는

Table 1. Contents of total polyphenol and total flavonoid of ethanol extracts from *A. membranaceus* Bunge and *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao

Samples[1]		Total polyphenol[2] (mg/g)	Total flavonoid[3] (mg/g)
AMB	2 years	46.7±1.2^{c}	5.3±1.1^{b}
	4 years	46.0±0.1^{c}	6.0±0.1^{b}
	6 years	44.7±2.3^{c}	5.3±1.2^{b}
AMBMH	2 years	45.3±2.3^{c}	4.0±0.1^{b}
	4 years	71.3±2.3^{b}	11.3±1.2^{a}
	6 years	78.0±2.0^{a}	13.3±1.2^{a}

[1]AMB: ethanol extract of *A. membranaceus* Bunge, AMBMH: ethanol extract of *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao.
[2]Gallic acid equivalent.
[3]Naringin equivalent.
Values are mean±SD. Different letters (a-c) in the same column mean significant difference at $p<0.05$ levels by Duncan's multiple range test.

재배기간에 따른 페놀성 화합물의 함량 차이가 크게 나타나지 않아, 기원식물에 따라 총 폴리페놀 및 플라보노이드 등 페놀성 화합물의 축적 양상이 다른 것으로 추정된다.

DPPH 및 $ABTS^{+}$ radical 소거 활성능을 이용하여 기원식물별 황기 에탄올 추출물의 항산화활성을 측정한 결과, 황기에 비해 몽고황기가 DPPH radical 소거활성이 높게 나타났으며 재배연수별 항산화활성 측정 결과, 황기는 4년근의 IC_{50}값이 5.81 mg/mL로 가장 높게 나타났고 몽고황기 역시 4년근의 IC_{50}값이 3.54 mg/mL로 가장 높아(Table 2), Yin 등(11) 및 Li와 Rhee(12)가 보고한 재배연수별 황기 추출물의 DPPH radical 소거활성 결과와 유사한 것으로 분석되었다. 기원식물별 $ABTS^{+}$ radical 소거활성은 2년근은 황기(36.27%)가 몽고황기(27.48%)에 비해 다소 높은 활성을 보였으나, 4년근 및 6년근에서는 몽고황기의 $ABTS^{+}$ radical 소거활성이 높았고(Fig. 1), 재배연수별 활성시험 결과, 몽고황기는 4년근의 $ABTS^{+}$ radical 소거활성이 63.52%로 가장 높았으나 황기는 재배연수에 따른 활성 차이가 없었다. 시험결과와 같이, 몽고황기는 재배연수가 증가할수록 활성이 증가하였으나 황기는 재배연수에 따른 활성 차이가 크게 나타나지

Table 2. DPPH radical scavenging activities of ethanol extracts from *A. membranaceus* Bunge and *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao

Samples[1]		IC_{50} (mg/mL)
AMB	2 years	6.00
	4 years	5.81
	6 years	7.01
AMBMH	2 years	4.70
	4 years	3.54
	6 years	4.54
Ascorbic acid		0.02

[1]AMB: ethanol extract of *A. membranaceus* Bunge, AMBMH: ethanol extract of *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao.

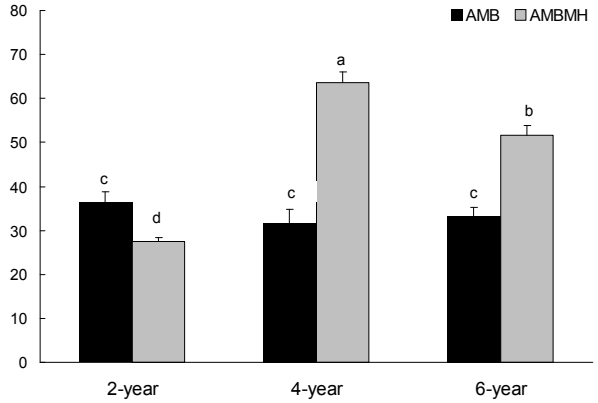

Fig. 1. $ABTS^{+}$ radical scavenging activities of ethanol extracts from *A. membranaceus* Bunge and *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao. AMB: ethanol extract of *A. membranaceus* Bunge, AMBMH: ethanol extract of *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao. Concentrations of all the samples were 10 mg/mL. All values are expressed as mean ±SD of triplicate experiments. Bars with different letters (a-d) are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

않았으며, 이와 같은 결과는 황기와 몽고황기에서의 재배연수별 총 폴리페놀 및 플라보노이드 변화양상과 유사하였다.

Nitric oxide 생성능

Nitric oxide(NO)는 LPS와 같은 자극물질에 의해 활성화된 대식세포에서 분비되는 물질로서, 생체 내에서 다양한 면역반응을 매개하는 것으로 알려져 있다(13). RAW264.7 세포주에서 기원식물별 황기 추출물의 NO 생성에 미치는 영향을 시험한 결과, 각각의 추출물은 100 μg/mL 농도에서 RAW264.7 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았으며(Fig. 2(A)), 기원식물에 따른 NO 생성능은 재배기간이 동일한 경우 황기에 비해 몽고황기에서 NO 생성능이 더 높은 것으로 분석되었다(Fig. 2(B)). 몽고황기는 모든 연근에서 무처리구에 비해 NO 생성량이 많았으며 특히, 6년근 에탄올 추출물의 NO 생성능이 2년근 및 4년근에 비해 높았다. 황기는 2년근, 4년근 및 6년근 에탄올 추출물 모두 몽고황기 추출물에서와 같이 무처리구에 비해 NO 생성량이 증가하였으나, 재배연수에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 황기는 RAW264.7 세포에서 IL-2, IFN-γ 및 IL-10 등 면역반응에 관여하는 cytokine의 발현량을 증가시키며(14), $CD4^{+}$ T세포 증가에 관여하고 선천적, 특이적 면역기능을 증진시키는 등(15) 여러 연구를 통해 면역조절활성이 입증된 바 있으나, 기원식물별, 재배연수별 황기의 면역조절효과에 대한 연구는 거의 이루어지지 않아, 인터루킨류 및 인터페론 등 면역작용에 관련된 주요 인자들의 추가 분석을 통한 구체적인 활성 비교가 더 필요할 것으로 사료된다.

요 약

기원식물별, 재배연수별 황기 에탄올 추출물의 항산화활

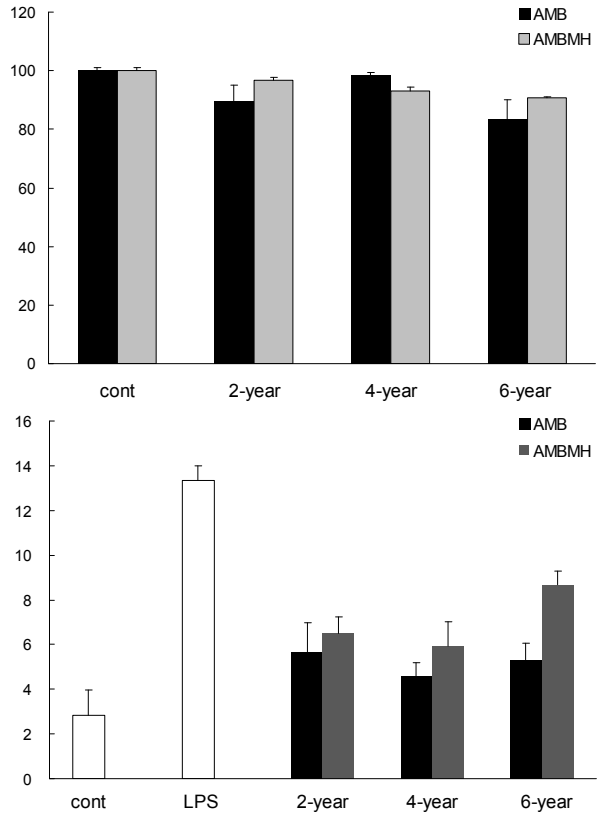

Fig. 2. Effects of ethanol extracts from *A. membranaceus* Bunge and *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao on NO production (A) and cell viability (B) in RAW264.7 cell line. Concentration of all the samples were treated with concentration of 100 μg/mL. AMB: ethanol extract of *A. membranaceus* Bunge, AMBMH: ethanol extract of *A. membranaceus* Bunge var *mongholicus* Hisiao. All values are expressed as mean±SD of triplicate experiments.

성 및 NO 생성능을 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 몽고황기 2년근, 4년근 및 6년근이 각각 45.3 mg/g, 71.3 mg/g 및 78.0 mg/g으로 황기에 비해 더 많은 양이 함유되어 있었으며, 총 플라보노이드 함량 또한 총 폴리페놀 함량과 마찬가지로 몽고황기가 더 많은 양의 총 플라보노이드를 함유하고 있었다. 기원식물별 추출물의 항산화활성 측정 결과, 황기에 비해 몽고황기의 DPPH radical 소거활성이 높았으며, 재배연수별로는 몽고황기 4년근이 가장 활성이 높았고(IC_{50}=3.54 mg/mL), 기원식물별 $ABTS^+$ radical 소거활성은 2년근을 제외한 4년근 및 6년근에서는 몽고황기의 $ABTS^+$ radical 소거활성이 높았다. 기원식물에 따른 NO 생성능은 재배기간이 동일한 경우 황기에 비해 몽고황기에서 NO 생성능이 더 높았다. 몽고황기는 모든 연근에서 무처리구에 비해 NO 생성량이 많았으며 특히, 6년근 에탄올 추출물의 NO 생성능이 2년근 및 4년근에 비해 높았으나, 황기는 재배연수에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 연구비 지원으로 수행된 연구 결과의 일부이며(과제번호: 2009010FT072045283), 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Ma XQ, Duan JA, Zbu DY, Dong TTS, Tsim KWK. 2000. Species identification of *Radix Astragali* (Huangqi) by DNA sequence of its 5S-rRNA spacer domain. *Phytochemistry* 54: 363-368.
2. Riso JL, Waterman PG. 1997. A review of the pharmacology and toxicology of Astragalus. *Phytother Res* 11: 411-418.
3. Kim HJ, Bae YC, Park RW, Choi SW, Cho SH, Choi YS, Lee WJ. 2002. Bone protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 71: 88-94.
4. Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT, Yoon KS. 2004. Anti-wrinkle effect of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract (I). *J Soc Cosmet Scientist Korea* 30: 15-22.
5. Lim JH, Jin DC, Sung JS, Bang KH, Kim OT, Cha SW, Park HW. 2007. Discrimination of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge from *A. membranaceus* (Fisch) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) with SCAR marker. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 51-55.
6. Kwon MC, Han JG, Qadir SA, An JH, Lee DH, Lee HY. 2008. Enhancement of immune-potentiation of *Cichorium endivia* L. by ultrasonification extraction process. *Korean J Medicinal Crop Sci* 16: 1-7.
7. Folin AD, Denis W. 1915 A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J Biol Chem* 22: 305-308.
8. Boo HO, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, Park SU. 2009. Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Monordica charantia* L. according to cultivars. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 15-20.
9. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1202.
10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
11. Yin Y, Heo SI, Jung MJ, Wang MH. 2009. Antioxidant and antidiabetic effects of various sections of *Astragalus membranaceus*. *Kor J Pharmacogn* 40: 1-5.
12. Li CY, Rhee HI. 2004. Antioxidant activity of *Astragalus membranaceus* extract. *J Agric Sci* 15: 103-110.
13. Brune B, Zhou J, von Knethen A. 2003. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int* 84: S22-S24.
14. Shin SW, Lee YS, Park JH, Kwon TK, Suh SI, Kwon YK. 2004. Comparison of immunomodulatory effects of water-extracted *Ginseng radix*, *Pilose asia-bell*, *Astragali radix*, *Astractylodes rhizoma alba* and *Dioscoreae rhizoma*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 18: 1140-1146.
15. Song BK, Lee EJ, Kim HK, Jin SD, Kim SJ, Kim DH. 1998, Effects of *Astragali radix* on the function of murine immunocytes *in vivo* and *in vitro*. *Kor J Herbology* 13: 115-128.

(2011년 10월 24일 접수; 2011년 12월 13일 채택)