

## 황기의 추출조건 및 유효성분의 HPLC 분석법 평가

김금숙\*<sup>†</sup> · 이대영\* · 이승은\* · 노형준\* · 최재훈\* · 박춘근\* · 최수임\*\* · 홍승재\*\*\* · 김승유\*

\*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, \*\*(주)와이디생명과학연구소, \*\*\*경희의료원

### Evaluation on Extraction Conditions and HPLC Analysis Method for Bioactive Compounds of Astragali Radix

Geum Soog Kim\*<sup>†</sup>, Dae Young Lee\*, Seung Eun Lee\*, Hyung Jun Noh\*, Je Hun Choi\*, Chun Geun Park\*, Soo Im Choi\*\*, Seung Jae Hong\*\*\* and Seung Yu Kim\*

*\*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.*

*\*\*YD Life Science Research Institutes, YD Life Science Co. Ltd., Seoul 139-743, Korea.*

*\*\*\*Kyung Hee University Medical Center, Seoul 130-872, Korea.*

**ABSTRACT :** This study has been conducted to establish the optimal extraction process and HPLC analysis method for the determination of marker compounds as a part of the materials standardization for the development of health functional food materials from Astragali radix. Five extraction conditions including the shaking extraction at room temperature and the reflux extraction at 85 °C with 30%, 50% and 95% ethanol were evaluated. Reflux extraction with 50% ethanol showed the highest extraction yield as 27.27 ± 2.27%, while the extraction under reflux with 95% ethanol showed significantly the lowest yield of 10.55 ± 0.24%. The quantitative determination methods of calycosin-7-O-β-D-glucoside and calycosin as marker compounds of Astragali radix extracts were optimized by HPLC analysis using a Thermo Hypersil column (4.6 × 250 mm, 5 μm) with the gradient elution of water and acetonitrile as the mobile phase at the flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup> and a detection wavelength of 230 nm. The HPLC/UV method was applied successfully to the quantification of two marker compounds in Astragali radix extracts after validation of the method with the linearity, accuracy and precision. The contents of calycosin-7-O-β-D-glucoside and calycosin in 50% ethanol extracts by reflux extraction were significantly higher as 1,700.3 ± 30.4 and 443.6 ± 8.4 μg g<sup>-1</sup>, respectively, comparing with those in other extracts. The results indicate that the reflux extraction with 50% ethanol at 85 °C is optimal for the extraction of Astragali radix, and the established HPLC method are very useful for the evaluation of marker compounds in Astragali radix extracts to develop the health functional material from Astragali radix.

**Key Words :** Astragali Radix, Calycosin, Calycosin-7-O-β-D-glucoside, Extraction Condition, HPLC Analysis

## 서 언

황기 (Astragali radix)는 대한약전의 기원식물에 대한 정의에 따르면, 콩과의 식물인 *Astragalus membranaceus* Bunge (황기) 또는 *Astragalus membranaceus* Bunge var. *mongholicus* Hsiao (몽골황기)의 뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거한 것을 말한다 (Ministry of Food and Drug Safety, 2013). 황기 식물은 주산지인 한국, 중국, 몽골 등 아시아 지역에 주로 분포하는

것으로 알려져 있으며 한국에서는 최근 충북 제천, 강원도 정선에서 주로 재배하고 그 외 강원도 영월, 경북 봉화 등지에도 재배하고 있다. 한국에서는 식품과 한약재로서 황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge.)를 주로 재배하고 있으며, 그 뿌리는 원뿌리가 곧게 뻗으며 외피는 황갈색이나 잘라 보면 들레는 유백색이고 속살은 황백색을 띤다. 황기뿌리 (Astragali radix)는 독성이 없어 안전하면서도 다양한 약리효능이 있기 때문에 식용과 약용으로 모두 사용되는 주요 약초

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5582 (E-mail) kims@rda.go.kr

Received 2013 October 23 / 1st Revised 2013 November 10 / 2nd Revised 2013 November 15 / 3rd Revised November 26 / Accepted 2013 Revised November 27

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이다. 우리가 주로 식품원료로 사용하는 황기는 1년생 황기의 주피를 거의 벗긴 뿌리이다.

황기는 전통적으로 피로, 식욕감퇴, 자연발한, 호흡곤란 등의 증세를 치료하고 쇠약해진 기운을 회복시켜주는 용도로 많이 사용되어 왔으며 (Kim and Leung, 2007), 이외에도 항염증 및 항고혈압 (Zhang *et al.*, 1984, 2003), 간장보호 (Dong *et al.*, 2003), 항산화 (Wang *et al.*, 2000), 항바이러스 (Kajimura *et al.*, 1996), 심장혈관보호 (Lee *et al.*, 2003), 면역증진활성 (Du *et al.*, 2012), 항노화 (Lei *et al.*, 2003) 등의 효능이 보고된 바 있다. 최근에는 새로운 cycloartane-type saponin 물질의 항염증효과 (Lee *et al.*, 2013)를 비롯해 항암효과 (Cho *et al.*, 2007), 골다공증 개선 (Kim *et al.*, 2012a) 및 관절연골 분해 억제효과 (Choi *et al.*, 2005) 등에 대하여 보고되기도 하였다. 이러한 다양한 활성은 황기가 triterpenoid glycosides, flavonoid 및 polysaccharide와 같은 다양한 생리활성 화합물들을 함유하고 있기 때문이다 (Liu *et al.*, 2011). 특히 황기의 flavonoid 성분은 다양한 생리활성의 주요 활성물질로 평가되고 있다 (Kim and Kim, 1997; Kim *et al.*, 2002). 황기의 주요 triterpenoid glycosides로는 astragalosides 화합물이 알려져 있으며, 연근별, 수확시기별 astragalosides 함량변이가 보고되기도 하였다 (Kim *et al.*, 2012). 그러나 본 연구에서는 항관절 효능과 관련된 flavonoid 성분을 대상으로 연구를 진행하였다.

최근 우리사회는 노령화가 심각한 사회적 이슈가 되고 있어, 특히 퇴행성 질환에 대한 예방 및 개선을 위한 건강기능식품 등에 관심이 높아지고 있다. 한국 뿐 아니라 주요 선진국들이 2025년경에 65세 이상 인구가 전체인구의 20% 이상을 차지하는 초고령화 시대에 진입할 것으로 예측되고 있는 가운데 식약처의 2013년 10월 기준의 ‘건강기능식품 개별인정 원료의 기능성 인정현황’에 대한 발표에서, ‘관절뼈 건강’ 기능성 원료가 50 품목으로 ‘체지방감소 (79 품목)’ 다음으로 두 번째로 많았다. 이로써 ‘관절뼈건강’ 개선 건강기능식품에 대한 수요는 점차 증가되고 있음을 알 수 있다. 우리는 식약처에서 안전성을 인정하여 식품원료로 분류한 황기를 대상으로, 황기의 항염증 및 연골보호 효능평가 선행연구 결과에 기초하여 (Choi *et al.*, 2005) 황기 추출물을 이용한 관절건강 개선 기능성 원료의 개발을 추진하고 있다. 본 연구에서 황기의 적정 추출물 제조방법 평가 및 지표성분의 분석법 검증을 통해 원료 표준화의 기초자료를 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 분석시료

황기 추출조건의 검토를 위한 황기시료는 주피가 벗겨진 1년 근 건시료로서 2011년 제천에서 재배하여 가을에 수확한

것을 2011년 12월에 한국생약협회를 통해 구입하였다. 또한 주피를 벗긴 황기시료와 주피를 벗기지 않은 황기시료의 지표 성분 정량분석을 위한 시료는 제천 농가에서 재배하여 건조한 1년근 황기를 구입하여 사용하였다. 황기의 기원확인을 위해 식물분류 전문가인 농촌진흥청 국립원예특작과학원의 이정훈 박사가 본 실험에 사용한 황기 시료에 대한 정확한 식물 분류 동정을 하였다. 황기 건시료는 절편 모양으로 약 2~4 mm 정도의 굵기로 절단되어 포장되어 있었다. 시제품을 생산하거나 대량으로 추출물을 제조하는 경우와 유사한 추출조건을 설정하기 위해 황기 건시료를 조분쇄하지 않고 구입상태인 수확후 1차 가공건조된 절단 건시료를 에탄올 (EtOH)로 추출 하였다.

### 2. 시약 및 기기

황기 추출물의 성분분석에 사용한 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside, calycosin 및 formononetin 성분은 (Fig. 1) ChromaDex사 (ChromaDex®, Inc., USA)로부터 구입하여 사용하였다. Acetonitrile은 HPLC급 용매 (J. T Baker®, Nederland)를 사용하였고 그 외 황기의 추출에는 주정 (대한수정라이프, 한국)을 사용하였다. 황기 지표성분 정량 분석에는 Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, USA)을 사용하였다. 그 외 기타 시약은 Sigma Chemical Co. (USA)나 Junsei Chemical Co. (Japan)의 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

### 3. 추출조건

황기 기능성 원료 개발을 위한 추출물 제조공정의 추출조건을 검토하기 위해 주피를 벗긴 황기 건재 시료에 30, 50, 95% 주정을 사용하여 상온추출과 환류추출로 진행하였다. 상온추출은 절단된 황기 건시료 200 g에 2 L의 주정을 삼각 플라스크에 넣고 상온에서 5일 동안 100 rpm에서 진탕추출 하였다. 추출물은 여과지로 여과하였으며, 잔사에 2 L의 주정을 다시 넣고 각각 동일한 조건으로 4일씩 2, 3회 추가로 추출 및 여과를 하였다. 여과한 황기 주정 추출물은 모두 감압 농축한 후 총 수율을 계산하고 건조 추출물은 지표성분 정량 분석용 시료로 사용하였다. 환류추출은 절단된 황기 건시료 200 g에 2 L의 주정을 둥근 플라스크에 넣고 85°C에서 4시간 동안 환류관을 연결하여 환류추출하였다. 환류추출도 상온추

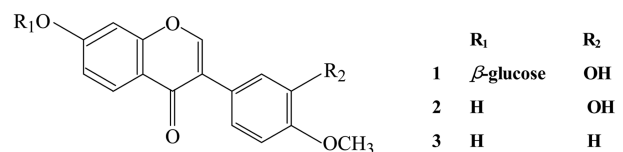


Fig. 1. The chemical structures of flavonoid compounds of *Astragali radix*. 1; calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside, 2; calycosin, 3; formononetin.

출과 마찬가지로 1회 환류추출과 동일한 방법으로 총 3회 4 시간씩 추출한 후 여과하여 감압농축하고 총수율을 계산하였다. 준비된 각각의 건조 추출물은 10 mg을 1 mL의 50% MeOH에 녹여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다. 한편, 주피를 벗긴 황기와 벗기지 않고 건조한 황기 시료에서의 지표성분 함량을 단순 비교하기 위해 50% MeOH를 사용하여 초음파 추출하였다. 이때 황기는 분쇄한 분말시료를 사용하였는데, 60 mg에 50% MeOH 1.5 mL를 EP tube에 넣고 50°C에서 30분 동안 초음파 추출을 하였다. 추출물은 4°C에서 10,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 얻고, 이 상등액은 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

#### 4. HPLC 분석

HPLC 분석은 Thermo Scientific사의 Thermo Hypersil (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) 컬럼을 사용하여 30°C에서 실시하였다. 이동상은 0-30분: 15  $\rightarrow$  55% acetonitrile, 30-35분: 55  $\rightarrow$  100%, 35-40분: 100  $\rightarrow$  15% acetonitrile, 40-45분: 15% acetonitrile의 조건으로 기울기 용리하였다. 이때 유속은 0.8 mL min<sup>-1</sup>으로 하고, UV 검출기의 230 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5. 정량분석법 검증 (Validation)

MeOH와 DMSO를 혼합하여 50% DMSO 용액을 만들어, 표준정량곡선 작성을 위한 지표성분들의 표준용액을 제조하였다. Calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside는 50-40,000 ng mL<sup>-1</sup>, calycosin은 25-10,000 ng mL<sup>-1</sup> 농도범위에서 HPLC 분석을 하여 회귀식을 구하고 linearity를 검증하였다. 하루 동안 3종의 농도조건에서 지표성분 표준품에 대하여 5회 분석하여 intra-day precision를 평가하고, 또 5일 동안 반복적으로 분석하여 inter-day precision를 각각 평가하여 정밀도 (precision) 및 정확도 (accuracy)를 조사함으로써 분석법의 재현성 (reproducibility)을 검증하였다.

#### 6. 통계분석

추출조건별 수율 및 성분 정량분석은 3회 반복으로 실시하고, 모든 값은 mean  $\pm$  SD 값으로 나타내었다. 실험값의 통계 처리 및 유의성 검정은 SAS (Statistical Analysis System) 프로그램을 사용하여 분산분석 (ANOVA)과 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였으며, 각 처리구간의 최소유의차 ( $p < 0.05$ ) 수준에서 통계처리하였다.

### 결과 및 고찰

추출조건별 황기 추출물의 수율을 조사한 결과 (Table 1),

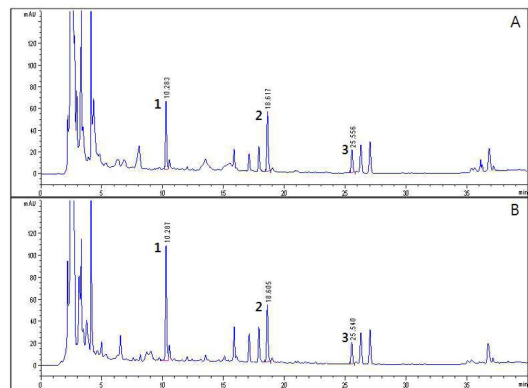
**Table 1.** The yield of ethanol extracts by different extraction conditions.

Extraction condition	Yield (%)
30% EtOH, RT***	25.58 $\pm$ 5.13**a*
50% EtOH, RT	24.15 $\pm$ 2.70a
30% EtOH, RF****	24.26 $\pm$ 2.61a
50% EtOH, RF	27.27 $\pm$ 2.27a
95% EtOH, RF	10.51 $\pm$ 0.37b

\*Means within a column followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test ( $p < 0.05$ ).

\*\*All values are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

\*\*\*RT; Shaking Extraction at Room Temperature, \*\*\*\*RF; Reflux Extraction at 85°C.



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of the dried ethanol extracts from *Astragal radix*. A; 50% EtOH extract from shaking extraction at room temperature, B; 50% EtOH extract from reflux extraction at 85°C, 1; calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, 2; calycosin, 3; formononetin.

95% 주정 환류 추출을 제외한 추출방법에서는 유의적인 차이가 인정되지 않았지만 50% 주정으로 환류추출한 것이 27.27  $\pm$  2.27%로서 추출수율이 가장 높은 경향이었다. 그 외 추출조건에서는 추출수율이 24.15-25.58%로서 유사한 경향이 있으나 특히 95% 주정으로 환류추출한 경우는 10.51  $\pm$  0.37%로서 가장 낮은 수율을 나타내었다. 이것은 다른 추출용매와 비교하여 가장 비극성인 95% 주정이 극성이 높은 다른 용매 조건보다 황기의 다당류를 많이 추출하지 못한 결과로 해석된다.

황기의 주요성분을 정량하기 위한 HPLC 분석조건을 검토한 결과에서는 Thermo Hypersil (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) 컬럼을 사용하여 HPLC 분석할 때, Fig. 2에서와 같이 calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, calycosin, formononetin 등 주요 isoflavonoid 성분의 RT값이 각각 10.3, 18.6, 25.6분으로 분리능이 양호하였다. 본 연구에서는 추출조건별 황기 주정추출물에 대한 주요성분의 함량을 분석하기 위해 calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, calycosin 두 성분만 지표성분으로 최종 설정하여 표준정량곡선을 작성하였다. 한약재 평가기술 과학화 연

**Table 2.** Calibration data for two marker compounds.

Compounds	Calibration curves	Correlation coefficient ( $r^2$ )	Concentration range (ng mL <sup>-1</sup> )	LOD** (ng mL <sup>-1</sup> )		LOQ* (ng mL <sup>-1</sup> )	
				Conc.	S/N	Conc.	S/N
1 <sup>†</sup>	$y = 75.2785x + 0.3098$	0.9999	50 ~ 40,000	50	3.4	150	13.3
2 <sup>‡</sup>	$y = 108.2533x - 4.7271$	0.9999	25 ~ 10,000	50	3.5	125	13.0

\*LOQ; Limit of Quantification, \*\*LOD; Limit of Detection.

<sup>†</sup>1; calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside, <sup>‡</sup>2; calycosin.

**Table 3.** Accuracy and precision data for HPLC analysis of two marker compounds in the dried ethanol extracts from Astragali radix.

Compounds	Spiked conc. (ng μL <sup>-1</sup> )	Intra-day precision (n = 5)			Inter-day precision (n = 5)		
		Measured (ng μL <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Accuracy (%)	Measured (ng μL <sup>-1</sup> )	RSD** (%)	Accuracy* (%)
1 <sup>‡</sup>	5.00	5.12 ± 0.01	0.19	102.40	5.05 ± 0.03***	0.62	101.00
	20.00	20.28 ± 0.03	0.13	101.40	20.16 ± 0.09	0.44	100.82
	40.00	40.46 ± 0.03	0.09	101.15	40.36 ± 0.22	0.54	100.89
2 <sup>†</sup>	2.50	2.51 ± 0.03	1.10	100.26	2.50 ± 0.01	0.32	99.95
	5.00	5.05 ± 0.02	0.41	100.90	5.05 ± 0.05	0.84	101.06
	10.00	10.13 ± 0.01	0.14	101.34	10.16 ± 0.07	0.71	101.57

\*RSD; Relative Standard Deviation, \*\*Accuracy (%) = [Mean measured value/Nominal value (spiked amount)] × 100.

\*\*\*All values are means ± SD, <sup>†</sup>1; calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside, <sup>‡</sup>2; calycosin.

구 데이터베이스에는 Luna pheny-hexyl (4.6 × 150mm, 5 μm) 컬럼을 사용하여 calycosin-7-O-β-D-glucoside, isomucronulatol-7-O-β-D-glucoside, formononetin 성분들을 대상으로 분석조건이 제시되어 있다. 본 연구의 주요 목표 중 하나는 향후 황기의 기능성 원료를 개발한 후 황기 원료의 건강기능식품에 대한 품질관리를 위한 적절한 지표성분의 설정이다. 지표성분은 원료의 특이 대표성분 또는 활성과 분석상의 경제성 타당성을 고루 고려하여 설정할 필요가 있다. Calycosin-7-O-β-D-glucoside에 대해서는 항염증 및 골관절염 억제효과 (Choi *et al.*, 2005, 2007) 및 류마티스 관절염과 연관된 HAase 효소의 활성억제 효과 (Lee *et al.*, 2005) 등이 이미 보고된 바 있어 관절건강 개선 기능성 원료 개발의 좋은 지표물질로 활용할 수 있다. 그러나 isomucronulatol-7-O-β-D-glucoside은 아직까지 시중에서 구입이 용이하지 않은 점과 230 nm에서 HPLC 분석시 황기 추출물 시료중 calycosin이 formononetin 보다는 더 peak 면적이 큰 주요성분으로 검출되는 점을 고려하여 본 연구에서는 calycosin-7-O-β-D-glucoside과 calicosin 두 물질이 관절건강 개선을 위한 황기 기능성 원료의 주요 기능성 물질로 적합하다고 판단하여 품질 관리를 위한 지표성분으로 설정하였다 (Fig. 1). 최적의 HPLC 분석조건하에서 얻어진 표준정량곡선에서는 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside, calycosin 성분이 각각 50-40,000 ng mL<sup>-1</sup>, 25-10,000 ng mL<sup>-1</sup> 농도 범위에서 회귀식이 각각  $y = 75.2785x + 0.3098$ ,  $y = 108.2533x - 4.7271$  이고, 상관계수 ( $r^2$ ) 값이 각각 0.9999, 0.9999로서 피크면적

(y)과 성분들의 농도 (x) 사이에 고도의 직선성을 확인할 수 있었다 (Table 2).

두 지표성분의 검출한계농도 (LOD, S/N > 3)는 모두 50 ng mL<sup>-1</sup> 로서 매우 감도가 높았다. 또한 Calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside와 calycosin 성분의 정량한계농도 (LOQ, S/N > 10)는 각각 150, 125 ng mL<sup>-1</sup>로 측정되었다.

분석법의 재현성을 검증하기 위한 지표성분에 대한 하루 동안의 5회 반복 분석 (intra-day)과 5일 동안의 매일 반복 분석 (inter-day) 정밀도의 평가 결과를 Table 3에 나타내었다. Intra-day와 inter-day 정밀도는 RSD값으로 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside는 각각 0.09-0.19%, 0.44-0.62%였으며, calycosin은 0.14-1.10%, 0.32-0.84%로 나타났다. Intra-day와 inter-day 정확도는 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside는 각각 101.2-102.4%, 100.8-101.0%였으며, calycosin은 100.3-101.3%, 99.9-101.6%로 나타났다. 이러한 결과는 이 HPLC 분석법이 황기 추출물의 두 지표성분의 함량분석을 위한 정확도와 정밀도가 높은 방법임을 검증하는 것이다. 따라서 이러한 검증된 HPLC 방법으로 황기 추출물의 지표성분을 분석하여, 최적의 황기 추출조건을 설정하는 데 활용하였다. Kim 등 (2007)은 Astragali radix의 70% ethanol 추출물에서 주요 isoflavonoid 성분으로 calycosin-7-O-β-D-glucoside, isomucronulatol-7-O-glucoside, formononetin를 제시하고 HPLC/UV 분석 조건을 대해 보고한 바 있다. 그러나 이 보고에서 제시된 HPLC chromatogram과 본 연구의 HPLC chromatogram을 비교하면

**Table 4.** The contents of two marker compounds in the ethanol extracts from *Astragali radix* in different extraction conditions.

Extraction conditions	1 <sup>‡</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD (%)	2 <sup>†</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD <sup>1)</sup> (%)
30% EtOH, RT <sup>2)</sup>	731.9 ± 27.3d	3.7	403.1 ± 6.5**c*	1.6
50% EtOH, RT	1,041.0 ± 21.4c	2.1	460.3 ± 15.6b	3.4
30% EtOH, RF <sup>3)</sup>	1,738.2 ± 108.7a	6.3	403.4 ± 6.5c	1.6
50% EtOH, RF	1,700.3 ± 30.4a	1.8	443.6 ± 8.4b	1.9
95% EtOH, RF	1,152.1 ± 37.6b	3.3	932.1 ± 12.4a	1.3

<sup>1)</sup>RSD; Relative Standard Deviation, <sup>2)</sup>RT; Shaking Extraction at Room Temperature, <sup>3)</sup>RF; Reflux Extraction at 85°C.

\*Means within a column followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test ( $p < 0.05$ ).

\*\*All values are means ± SD ( $n = 3$ ).

<sup>‡</sup>1; calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, <sup>†</sup>2; calycosin.

**Table 5.** The contents of two marker compounds in the methanol extracts from *Astragali radix* with or without root bark.

<i>Astragali radix</i>	1 <sup>‡</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD (%)	2 <sup>†</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD* (%)
Without root bark	142.2 ± 7.1	5.0	118.9 ± 2.4**	2.1
With root bark	91.4 ± 2.4	2.7	47.2 ± 1.9	3.9

\*RSD; Relative Standard Deviation, \*\*All values are means ± SD ( $n = 3$ ).

<sup>‡</sup>1; calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, <sup>†</sup>2; calycosin.

두 연구에서 추출용매가 각각 70% ethanol, 30~95% ethanol로서 모두 ethanol 추출물임에도 불구하고 다소 상이한 주요성분 조성 패턴을 나타내고 있다. 이것은 Kim 등 (2007) 이 사용한 황기 시료가 국내에서 주로 재배되는 *Astragalus membranaceus* Bunge가 아니고, *Astragalus membranaceus* Bunge var. *mongholicus* Hsiao (몽골황기) 또는 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. (막협황기)으로서 기원식물이 다르기 때문인 것으로 판단된다. 한편, Lv (2011) 등은 *A. mongholicus*의 뿌리로부터 flavonoid 성분의 정량을 위해 photodiode-array detection (DAD) 및 electrospray (ESI)-mass spectrometry (MS) 검출과 결합된 HPLC 분석법을 제시하였는데, 260 nm에서 HPLC-DAD profile를 보면 calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside, calycosin, formononetin, isomucronulatol 등이 주요 성분으로 검출되고 있고, *A. membranaceus*에서 추출한 추출물도 유사한 flavonoid 성분을 함유한다고 보고하고 있어 Kim 등(2007)의 보고와는 다소 다른 HPLC 패턴을 보이고 있다. 이상의 결과로 보아, *Astragali radix*의 기원식물을 명확히 분류하고 동정하여 연구재료로 사용하는 것이 매우 중요하며, 향후 중국의 *A. mongholicus*에 대해서도 시료를 구입하여 본 연구에서 최적화된 HPLC 분석 조건으로 주요 flavonoid 성분을 비교분석함으로써 기원식물별 지표성분 설정을 검토할 필요성이 있다고 판단된다.

주정의 비율과 추출방법을 달리하여 황기의 추출물 제조 후 각 추출물의 지표성분 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같았다. 추출수율이 가장 높았던 50% 주정 환류 추출물 중 calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside, calycosin 함량은 각

각 1,700.3 ± 30.4, 443.6 ± 8.4  $\mu\text{g g}^{-1}$  이었다. Calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside 함량은 30, 50% 주정 환류 추출물에서 각각 1,738.2 ± 108.7, 1,700.3 ± 30.4  $\mu\text{g g}^{-1}$ 로서 30, 50% 주정 상온 추출물 및 95% 주정 환류 추출물의 731.9 ± 27.3, 1,041.0 ± 21.4, 1,152.1 ± 37.6  $\mu\text{g g}^{-1}$ 보다 유의성 있게 높은 경향이였다.

이러한 경향은 calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside 성분의 추출에 95% 주정보다는 극성이 더 높은 30% 혹은 50% 주정이 더 적합한 추출용매이며, 30% 혹은 50% 주정 추출을 할 때는 상온 추출보다는 가온하여 환류추출하는 것이 calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside 성분 용출에 더 용이함을 시사하고 있다. 동일한 가온 환류추출 조건에서 95% 주정 환류 추출물이 30, 50% 주정 추출물보다 calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside 성분 함량이 낮은 것은 배당체 성분의 추출에는 95% 주정 보다는 극성도가 더 높은 30, 50% 주정이 추출효율을 더 증진시켰기 때문인 것으로 해석된다. Calycosin의 함량은 95% 주정 환류 추출물이 932.1 ± 12.4  $\mu\text{g g}^{-1}$ 로서 가장 높았으며, 50% 주정으로 상온, 환류 추출한 것이 30% 주정으로 상온, 환류 추출한 것보다 유의성 있게 calycosin 함량이 높았다. 이것은 calycosin의 추출효율이 추출온도 보다는 추출용매의 극성에 더 큰 영향을 받으며, 비극성도가 커질수록 추출수율이 높아짐을 의미한다. 즉 calycosin이 calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside 성분과는 달리 비극성 용매에서 더 많이 추출된 결과이다. 이상의 결과를 토대로 추출수율과 지표성분의 함량을 고려할 때, 황기시료에 대한 최적의 추출조건은 50% 주정을 이용한 환류추출인 것으로 판단된다.

한편, 식품으로 유통되는 일반적인 1년근 황기 건재는 대부분 주피를 벗긴 황기뿌리인데, 일부 주피를 벗기지 않은 황기 건재를 제품에 사용하는 경우가 있어 지표성분 함량을 비교하여 Table 5에 나타내었다. 주피를 벗긴 황기 미세분말시료를 초음파 추출한 것이 calycosin-7-O-β-D-glucoside, calycosin 지표성분 함량이 각각  $142.2 \pm 7.1$ ,  $118.9 \pm 2.4 \mu\text{g g}^{-1}$ 으로서 주피를 벗기지 않은 황기 추출물보다 더 함량이 높았다. 인삼의 경우 triterpenoid 성분인 진세노사이드 화합물이 근피에 많이 존재하기 때문에 근피비율이 높은 세근이 동체보다 단위중량당 진세노사이드 함량이 높게 측정되는 것을 감안하면, 황기의 astragalosides 성분과 같은 triterpenoid 성분은 주피를 벗기지 않은 황기에서 더 많이 검출될 가능성도 있으므로 향후 이러한 triterpenoid 사포닌 성분 분석도 황기 품질평가를 위해 필요할 것이다. 우리가 주로 식품원료로 사용하는 황기 (*Astragali radix*)는 1년생 황기의 주피를 거의 벗긴 뿌리인데, 일부 제품에서는 주피를 벗기지 않은 황기를 사용하는 경우도 있다. 한편, 한약재나 생약으로 사용되는 황기는 주로 다년생 3년근을 껍질을 벗긴 것과 껍질을 벗기지 않은 것 모두를 사용 가능하도록 되어 있다. 황기를 식품으로 대량 사용할 경우에는 인체 독성이나 안전성이 더욱 중요해지는데, 약효성분들이 근피 (뿌리 껍질)에도 많이 분포하는 경우가 있으므로 황기의 뿌리를 벗기거나 벗기지 않은 시료에 대한 성분 및 효능, 안전성에 대한 검토도 향후 필요할 것을 판단된다.

식약처의 2013년 ‘건강기능식품의 기능성원료 인정 현황’ 보고 (Ministry of Food and Drug Safety, 2013)에 의하면, 식약처장이 별도로 인정한 원료 또는 성분 중에서 ‘관절 건강에 도움’의 가능성 원료는 ‘가시오갈피등 복합추출물’을 비롯해 2012년 12월 기준으로 11종이다. 이 중에서 식물추출물 원료는 5종이다. 앞으로 고령화의 가속화나 건강증진에 대한 관심급증 등으로 건강기능식품의 수요가 증가될 것을 예상될 뿐 아니라 안전성이 인정되어 식품원료로 사용가능한 약용식물이 건강기능식품의 원료로 점차 각광을 받을 것으로 전망되고 있다. 황기는 골관절염을 억제하는 효능물질을 함유하고 있고, 식품으로서 안전성이 인정되고 있을 뿐 아니라 국내 GAP 작물로서 국내 생산량도 많은 작물이다. 2013년 6월 발표된 농림축산식품부의 ‘2012년 특용작물생산실적’에 의하면 황기의 생산량은 859톤이므로 (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2013) 안정적인 원료공급에 유리하여 관절 건강 개선 기능성 원료로서 개발이 매우 유망하다고 할 수 있다. 다만, 인체적용시험을 통해 그 유효성이 입증되어야 기능성 원료로서 인정이 가능하다. 본 연구에서 확립하고 검증한 최적의 황기 추출방법과 HPLC 분석법은 관절건강 개선 기능성 원료 개발을 위한 인체적용시험용 식품 (건조 추출물 분말) 제조를 위한 제조공정 설정 및 원료표준화를 위한 기초 자료로서 활용 가치가 높을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 농업현장실용화기술개발 과제(PJ008465)의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Cho WCS and Leung KN.** (2007). In vitro and in vivo anti-tumor effects of *Astragalus membranaceus*. *Cancer Letters*. 252:43-54.
- Choi S, Park SR and Heo TR.** (2005). Inhibitory effect of *Astragali radix* on matrix degradation in human articular cartilage. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15:1258-1266.
- Choi SI, Heo TR, Min BH, Cui JH, Choi BH and Park SR.** (2007). Alleviation of osteoarthritis by calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside(CG) isolated from *Astragali radix*(AR) in rabbit osteoarthritis(OA) model. *Osteoarthritis and Cartilage*. 15:1086-1092.
- Dong TTX, Ma XQ, Clarke C, Song ZH, Ji ZN, Lo CK and Tsim KWK.** (2003). Phylogeny of *Astragalus* in China: Molecular evidence from the DNA sequences of 5S rRNA spacer, ITS, and 18S rRNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:6709-6714.
- Du XG, Zhao B, Li JY, Cao XH, Diao MK, Feng HB, Chen XB, Chen ZY and Zeng XY.** (2012). *Astragalus polysaccharides* enhance immune responses of HBV DNA vaccination via promoting the dendritic cell maturation and suppressing Treg frequency in mice. *International Immunopharmacology*. 14:463-470.
- Kajimura K, Takagi Y, Ueba N, Yamasaki K, Sakagami Y, Yokoyama H and Yoneda K.** (1996). Protective effect of *Astragali radix* by intraperitoneal injection against Japanese encephalitis virus infection in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 19:855-859.
- Kim JH, Park SY, Lim HK, Park AY, Kim JS, Kang SS, Youm JR and Han SB.** (2007). Quantitative evaluation of *Astragali radix* through the simultaneous determination of bioactive isoflavonoids and saponins by HPLC/UV and LC-ESI-MS/MS. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 28:1187-1194.
- Kim JS and Kim CS.** (1997). A study on the constituents from the roots of *Astragalus membranaceus* Bunge (II). *Korean Journal of Pharmacognosy*. 28:75-79.
- Kim JS, Kim YT and Kim CS.** (2002). A study on the constituents from the roots of *Astragalus membranaceus* Bunge (III). *Korean Journal of Pharmacognosy*. 31:109-111.
- Kim SH, Jun YM, Lim JJ, Kim SH, Chung IM and Kim EH.** (2012). Variation of astragalosides contents in cultivated *Astragalus membranaceus*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:372-380.
- Kim SP, Kim SM, Ryu HS, Shin JC, Lee DG, Lee OJ, Lee JH and Kim JH.** (2012a). The effects of *Astragali radix* pharmacopuncture at CV<sub>12</sub> on osteoporosis of senescence accelerated mice(SAM) P6. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society*. 29:59-71.

- Lee DY, Noh HJ, Choi J, Lee KH, Lee MH, Lee JH, Hong Y, Lee SE, Kim SY and Kim GS.** (2013). Anti-Inflammatory cycloartane-type saponins of *Astragalus membranaceus*. *Molecules*. 18:3725-3732.
- Lee YM, Choi SI, Lee JW, Jung SM, Park SM and Heo TR.** (2005). Isolation of hyaluronidase inhibitory component from the roots of *Astragalus membranaceus* Bunge(Astragali radix). *Food Science and Biotechnology*. 14:263-267.
- Lee YS, Han OK, Park CW, Suh SI, Shin SW, Yang CH, Jeon TW, Lee ES, Kim KJ, Kim SH, Yoo WK and Kim HJ.** (2003). Immunomodulatory effects of aqueous-extracted Astragali radix in methotrexate-treated mouse spleen cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 84:193-198.
- Lei H, Wang B, Li WP, Yang Y, Zhou AW and Chen MZ.** (2003). Anti-aging effect of astragalosides and its mechanism of action. *Acta Pharmacologica Sinica*. 24:230-234.
- Liu J, Zhao ZZ and Chen HB.** (2011). Review of Astragali radix. *Chinese Herbal Medicines*. 3:90-105.
- Lv YW, Hu W, Wang YL, Huang LF, He YB and Xie XZ.** (2011). Identification and determination of flavonoids in Astragali radix by high performance liquid chromatography coupled with DAD and ESI-MS detection. *Molecules*. 16:2293-2303.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA).** (2013). Production report of industrial crops in 2012. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Sejong, Korea. p.85.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2013). The Korean pharmacopoeia. Ministry of Food and Drug Safety. Osong, Korea. p.1228.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2013). The functional ingredients recognized status of health functional food. Ministry of Food and Drug Safety. Osong, Korea. p.5.
- Wang XJ and Feng P.** (2000). Antioxidant activity of Qizhu tang. *Acta Pharmacologica Sinica*. 21:1141-1144.
- Zhang WJ, Hufnagl P, Binder BR and Wojta J.** (2003). Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappa B activation and adhesion molecule expression. *Thrombosis and Haemostasis*. 90:904-914.
- Zhang YD, Wang YL and Shen JP.** (1984). Effect of astragaloside IV on inflammatory and hypertension. *Acta Pharmacologica Sinica*. 19:333-337.