J Korean Soc Food Sci Nutr
46(8), 929~936(2017)

한국식품영양과학회지
https://doi.org/10.3746/jkfn.2017.46.8.929

재배지역별 단삼의 성분 분석 및 생리활성 비교

양은주 · 선유경 · 서예슬 · 신보연
(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터

Component Analysis and Comparison of Biological Activities of *Salvia miltiorrhiza* Bunge from Different Cultivation Regions

Eun Ju Yang, Yoo Kyung Seon, Ye-Seul Seo, and Bo Yeon Shin
Food Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation

ABSTRACT The purpose of this study was to compare the chemical components and biological activities of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (SMB) from different cultivation regions (Gochang, Yeongyang, Jangheung, and China). Proximate compositions and contents of total polyphenols and flavonoids were measured. Depending on the cultivation region, proximate composition of SMB showed significant variations. Total polyphenol and total flavonoid contents were highest in Yeongyang SMB and Gochang SMB, respectively. We prepared hot water and 75% ethanol extracts of SMB from different cultivation regions and also investigated the biological effects of extracts on anti-oxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities. Extracts of Yeongyang SMB were the most effective at scavenging DPPH and ABTS free radicals, and hot water extract showed better scavenging activity than 75% ethanol extract. We observed that extracts of Yeongyang SMB exhibited the best antibacterial activity against *Bacillus cereus*, and 75% ethanol extract showed better antibacterial activity than water extract. Anti-inflammatory activities of SMB extracts from different cultivation regions were investigated through evaluation of their inhibitory effects on production of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharides-induced RAW 264.7 cells. At 50 μg/mL, extract of China SMB showed the highest NO inhibitory activity of 34% among water extracts, and extract of Gochang SMB showed the highest NO inhibitory activity of 68% among 75% ethanol extracts. Salvianolic acid B level was the highest in extract of Yeongyang SMB with values of 110.59 mg/g for water extract and 111.93 mg/g for 75% ethanol extract.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, anti-oxidant, antibacterial activity, anti-inflammatory, salvianolic acid B

서 론

단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 약용식물로 적삼, 자단삼, 대홍포, 활혈근이라고도 불리며 굵은 뿌리의 표피에 적색 색소가 침착되어 있으므로 단삼이라고 한다. 원산지는 중국으로 봄이나 가을에 채취한 뿌리를 건조하여 약재로 사용하고 있으며, 한방에서 부인의 생리불순, 생리통, 산후복통, 어혈성의 심복부동통, 타박상의 치료, 불면증, 피부발진 등의 약재로 쓰인다(1). 단삼의 주요 성분으로는 tanshinone Ⅰ, ⅡA, ⅡB, cryptotanshinone, dihydrotanshinone, isotanshinone Ⅰ, ⅡB, isocryptotanshinone 등을 포함한 지용성 diterpene 화합물과 tanshinol, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid A, B 등을 포함하는 phenolic 화합물, baicaline, β-sitosterol, ursolic acid, vitamin E 및 tannin 등이 알려져 있다(2,3).

단삼의 생리활성으로는 동맥경화 개선(4), 항염증(5), 항당뇨(6), 항산화(7), 항균(8), 항암(9), 뇌세포 보호 효과(10), 면역조절 활성(11) 등의 기능성이 보고되었다. 그러나 대다수 논문이 중국산 단삼을 이용한 중국 연구팀의 연구결과들이다. 국내에서도 20여 년 전부터 한약재로써 단삼의 생리활성과 기능 성분 분석에 대한 여러 연구결과가 보고되고 있다. 단삼 추출물의 항균 활성(12), 단삼 메탄올 추출물의 항혈전 및 항산화 효과(13), 단삼으로부터 tanshinone ⅡA 추출(2), 단삼 표준화 시료의 급성독성(14), 단삼 추출물의 미백 효과(15) 등의 연구보고가 있으나 대부분이 중국산 단삼을 이용한 연구이며, 국내산 단삼을 이용한 연구는 2015년에 보고된 효소 처리에 따른 단삼 추출물의 이화학적 특성(16)과 단삼과 황금의 추출방법을 달리한 세포증식 효과 및 항산화 활성효과 연구(17) 등 극소수에 불과하다.

최근까지 단삼은 전량을 중국 수입에 의존해 왔으나 농약 잔류성 등 안전성 문제와 중국의 물가 상승으로 국내산 단삼의 수요가 증가하면서 2010년부터 국내 적응 사업을 시작하여 2012년 국내 생산이 성공하면서 재배생산 기반을 확립하

Received 7 June 2017; Accepted 28 June 2017
Corresponding author: Eun Ju Yang, Food Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation, Naju, Jeonnam 58275, Korea
E-mail: rootage@hanmail.net, Phone: +82-61-339-1251

였다. 그러나 국내산 단삼에 대한 연구 자료가 미비하여 중국산 단삼과의 비교 자료 및 국내산 단삼의 산업적 활용을 위한 기초 자료가 부족한 실정이다.

본 연구는 단삼의 원산지에 따라 국내산 원료 3종 및 중국산 원료의 일반성분, 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량을 비교하였다. 또한, 산업적 활용을 위한 기초 자료로서 원산지별 단삼의 열수 추출 및 에탄올 추출을 시행하여 각 추출물의 항산화 활성, 항균 활성, 항염증 활성을 측정하고, 단삼의 주요 성분 중 하나인 salvianolic acid B의 함량을 비교하였다.

재료 및 방법

재료 및 단삼 추출물 제조

본 실험에 사용한 단삼은 2016년 수확하여 건조된 중국산 및 국내산 3종(전북 고창, 경북 영양, 전남 장흥)을 (주) EFC(Gwangyang, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 각 시료는 50 mesh 크기로 분쇄하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 단삼의 열수 추출은 단삼 분말 50 g에 950 mL의 물을 가하여 95°C에서 2시간 동안 추출하였다. 에탄올 추출은 단삼 분말 50 g에 950 mL의 75% 에탄올을 가하여 70°C에서 2시간 동안 추출한 후 감압 농축기를 이용하여 용매를 휘발시켰다. 각각의 추출액은 55 μm bag filter로 여과한 후 동결 건조(PVTFD 10R, IlShin Lab Co., Ltd., Dongducheon, Korea)하여 본 실험의 평가 시료로 사용하였다. 추출물의 수율은 추출 전 시료에 대한 추출물의 완전 건조 후 중량 백분율(%)로 계산하였으며, 열수 추출 수율은 고창 단삼 67.8%, 영양 단삼 57.2%, 장흥 단삼 59.8%, 중국산 단삼 52.1%, 75% 에탄올 추출 수율은 고창 단삼 58.5%, 영양 단삼 45.5%, 장흥 단삼 52.0%, 중국산 단삼 47.1%로 측정되었다.

일반성분 분석

단삼의 일반성분은 AOAC 방법(18)에 의하여 분석하였다. 수분 함량은 105°C 상압건조법, 회분 함량은 550°C에서 직접 회화법을 이용하여 분석하였다. 조단백질 함량은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet 추출법으로 분석하였으며, 탄수화물 함량은 시료 100 g에 수분, 회분, 조단백질, 조지방 값을 감하여 산출하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

단삼 분말 1 g에 50% 에탄올 50 mL를 가하여 40°C에서 30분간 초음파 추출하였다. 추출액은 1,650×*g*에서 30분간 원심분리 하고 0.45 μm syringe filter(Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 시료를 준비하였다. 총 폴리페놀 함량은 시료 100 μL에 2% Na_2CO_3 용액 2 mL와 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.1 mL를 차례로 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 작성하였으며, 총 폴리페놀 함량은 mg gallic acid equivalents(GAE)/g으로 나타내었다. 총 플라보노이드의 함량은 시료 0.5 mL에 10% aluminium nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 80% 에탄올 4.3 mL를 차례로 혼합하여 실온에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 quercetin(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 작성하였으며, 총 플라보노이드 함량은 mg quercetin equivalents(QE)/g으로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

단삼의 열수 및 75% 에탄올 추출물 10 μL에 0.1 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 190 μL를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었으며, 소거율이 50%에 해당하는 시료의 농도를 SC_{50} 값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거능 측정

7 mM ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), Wako Pure Chemical Industries]와 2.45 mM potassium persulfate를 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS 양이온을 형성시킨 후 사용 직전 734 nm에서 흡광도가 0.80±0.02가 되도록 조정하였다. 단삼의 열수 및 75% 에탄올 추출물 10 μL에 ABTS 용액 190 μL를 혼합하여 실온에서 6분 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었으며, 소거율이 50%에 해당하는 시료의 농도를 SC_{50} 값으로 나타내었다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

항균 활성 측정

재배지역별 단삼 추출물의 항균 활성은 paper disc diffusion 법으로 측정하였다(19). 지시균인 *Bacillus cereus* KCCM 11204를 LB broth(Luria-Bertani broth, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에서 37°C, 16시간 배양한 후 LB 평판배지에 1×10^6 CFU/plate로 도말하였다. 항균 활성 측정을 위한 시료로 열수 추출물과 75% 에탄올 추출물을 각각 물과 75% 에탄올에 녹여 40 mg/mL 농도로 준비한 후 8 mm paper disc(Advantec, Tokyo, Japan)에 50 μL를 loading 하였다. 시료가 처리된 disc의

용매를 휘발시킨 후 지시균이 도말된 LB 평판배지 위에 올리고 37°C, 16시간 배양한 후 생육 저해환을 측정하였다. 대조군으로 75% 에탄올을 사용하였다.

Nitric oxide(NO) 생성 억제능 측정

실험에 사용한 마우스 대식세포주 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 세포배양은 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO_2 세포배양기에서 계대 배양하였다. 세포로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을 5×10^6 cells/well 농도로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 재배지역별 단삼의 열수 및 75% 에탄올 추출물 50 μg/mL와 LPS(lipopolysaccharides, Sigma-Aldrich Co.) 1 μg/mL를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액에 동량의 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 5% phosphoric acid)를 혼합하여 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, sodium nitrate로 표준곡선을 작성하여 NO 함량을 산출하였다.

Salvianolic acid B 분석

단삼의 열수 및 75% 에탄올 추출물에서 유효 성분인 salvianolic acid B의 함량은 HPLC(Agilent Technologies 1100 series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)를 이용하여 분석하였다. 분석 칼럼은 Atlantis dC_{18} (4.6×250 mm, 5 μm, Waters Corp., Milford, MA, USA)을 사용하였으며, UV detector 280 nm의 파장에서 검출하였다. 이동상 A는 1% formic acid를 함유한 deionized water, 이동상 B는 1% formic acid를 함유한 acetonitrile/methanol(75:25)을 사용하였다. 용매 B는 처음에 25%로 시작하여 15분에 40%로 증가시킨 후 25분까지 유지하였으며, 0.5 mL/min의 유속으로 분석하였다. HPLC 분석 시 salvianolic acid B 표준품(Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 작성한 표준검량곡선을 통해 시료 중의 함량을 측정하였다.

통계분석

모든 실험은 독립적으로 3회 반복 실시하여 실험결과를 SPSS 프로그램(Statistical Package for Social Science, version 17, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 실험군 간 평균과 표준편차를 계산하였다. 단삼 추출물의 재배지역별 차이 유무는 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 $P<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검증하였고, 열수 추출물과 75% 에탄올 추출물 간의 차이 유무는 $P<0.05$ 수준에서 Student's *t*-test로 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

일반성분

재배지역별 단삼의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같이 재배지역에 따라 큰 차이를 보였다. 수분은 3.20~11.52%, 회분은 4.11~5.42%, 조단백질은 7.37~15.50%, 조지방은 1.66~2.67%, 탄수화물은 66.73~83.36% 범위의 함량을 나타내었다. 고창 단삼은 탄수화물 함량이 83.36%로 다른 지역에 비해 가장 높은 함량을 나타냈지만 수분, 조단백질, 회분 함량은 가장 낮은 함량을 나타내었다. 영양 단삼은 지역별 단삼 중 조지방 함량이 2.67%로 가장 높았으며, 회분 함량도 5.24%로 비교적 높은 함량을 나타내었다. 장흥 단삼은 수분과 조단백질 함량에서 각각 11.52%와 15.50%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 탄수화물은 66.73%로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 중국산 단삼은 회분 함량에서 5.42%로 가장 높았고 조단백질 함량도 14.30%로 비교적 높았으나, 조지방은 1.66%로 지역별 단삼 중 가장 낮은 함량을 나타내었다. 재배지역별 단삼의 일반성분 분석에서 중국산과 국내산 원료 간에 특이적인 차이는 나타나지 않았으나, 재배지역에 따라 각 일반성분의 함량이 상당한 차이를 나타내어 재배 환경에 따른 영향이 큰 것으로 생각된다. 국내 세 지역의 연평균기온과 강수량을 기상청 데이터(www.kma.go.kr, 2001~2010년)로 비교하였을 때 연평균기온은 고창(13.1°C), 장흥(12.4°C), 영양(9.7°C) 순으로 높았으며, 강수량은 영양과 고창이 각각 1,359 mm와 1,329 mm로 유사한 수준이지만 장흥은 1,612 mm로 큰 차이를 보였다. 이들 지역의 농경지 화학성을 흙토람(www.soil. rda.go.kr) 시스템에서 비교하였을 때 고창은 pH 분포가 고른 편이었으

Table 1. Proximate compositions of *Salvia miltiorrhiza* Bunge from different cultivation regions (%)

Compositions	Gochang	Yeongyang	Jangheung	China
Moisture	3.20±0.25[d1)]	8.24±0.06[b]	11.52±0.30[a]	7.37±0.26[c]
Ash	4.11±0.10[c]	5.24±0.04[a]	4.50±0.07[b]	5.42±0.19[a]
Crude protein	7.37±0.11[d]	8.62±0.08[c]	15.50±0.28[a]	14.30±0.05[b]
Crude lipid	1.96±0.08[b]	2.67±0.05[a]	1.75±0.13[c]	1.66±0.03[c]
Carbohydrate	83.36±0.10[a]	75.24±0.11[b]	66.73±0.66[d]	71.24±0.37[c]

Values are expressed as the mean±SD (n=3).
[1)]Means with different letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

나 장흥은 절반 이상이 pH 5.1~6.0 범위이며, 영양은 절반 이상이 pH 6.1 이상으로 차이를 나타내었다. 또한, 유기물 함량에서도 고창과 영양은 토지의 절반 이상이 11~20 g/kg 범위로 나타났으나, 장흥은 11~40 g/kg의 범위로 더 높은 함량을 나타내었다. 이들 지역의 기후와 토양의 차이는 단삼의 성분 및 생리활성의 차이에 영향을 줄 것으로 생각된다. Kim 등(16)은 경북 봉화에서 재배된 단삼의 일반성분을 분석한 결과 수분 6.83%, 탄수화물 64.17%, 조단백질 16.0%, 조지방 0.0%, 회분 4.1 %로 측정되어 본 실험에서 분석한 국내산 단삼들과 비교할 때 탄수화물과 조지방은 비교적 낮으며, 조단백질은 약간 더 높은 함량을 나타내었다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

폴리페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있으며 분자 내에 2개 이상의 hydroxyl기를 가지고 있는 방향족 화합물로 체내 활성산소를 제거하고 항산화, 항암, 항알레르기 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있다(20). 재배지역별 단삼의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정하여 Table 2에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 영양 단삼이 76.20 mg/g으로 가장 높았으며, 고창 단삼 73.04 mg/g, 장흥 단삼 68.80 mg/g, 중국산 55.25 mg/g 순으로 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 고창 단삼이 5.30 mg/g으로 가장 높았으며, 영양 단삼 5.10 mg/g, 장흥 단삼 4.39 mg/g, 중국산 2.41 mg/g 순으로 함량을 나타내었다. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 분석 결과 중국산보다 국내산 단삼의 함량이 비교적 높은 것으로 나타났으며, 국내산 원료 중 영양과 고창 단삼의 함량이 우수하였다. Yang 등(13)은 중국산 단삼을 80% 메탄올로 추출하여 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 분석한 결과 각각 77.58 mg/g(tannic acid equivalent)와 5.11 mg/g(quercetin equivalent)을 나타내어 본 연구에서 측정된 중국산 원료의 함량보다 높은 결과를 보였으나, 이러한 결과는 추출 용매와 측정 방법의 차이에서 기인하는 것으로 생각된다. 폴리페놀 화합물의 함량이 높은 것으로 알려진 녹차의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 62.2 mg/g(tannic acid equivalent), 17.8 mg/g(naringin equivalent)으로 보고되었으며(21), 블루베리는 각각 42.26 mg/g(tannic acid equivalent), 26.39 mg/g(naringin equivalent)으로 보고되어(22), 이들 결과와 비교할 때 단삼은 높은 함량의 폴리페놀 화합물을 함유하는 것을 알 수 있다.

항산화 활성

폴리페놀 화합물은 항산화 활성과 높은 상관관계를 나타내므로(23) 총 폴리페놀 함량이 우수한 단삼을 열수 및 75% 에탄올로 추출하여 용매별 추출물에서 재배지역에 따른 원료의 항산화 활성을 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 평가를 통해 비교하였다. 재배지역에 따른 단삼 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Table 3에 나타내었으며, 모든 시료에서 추출물의 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거 활성이 유의적으로 증가하였다. 재배지역별 단삼 추출물의 항산화 활성

Table 2. Total polyphenol and total flavonoid content of *Salvia miltiorrhiza* Bunge from different cultivation regions

	Gochang	Yeongyang	Jangheung	China
Total polyphenol (mg GAE/g)	73.04±1.75$^{b1)}$	76.20±0.94^{a}	68.80±0.51^{c}	55.25±0.20^{d}
Total flavonoid (mg QE/g)	5.30±0.09^{a}	5.10±0.04^{a}	4.39±0.23^{b}	2.41±0.09^{c}

Values are expressed as the mean±SD (n=3).
1)Means with different letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test (P<0.05).

Table 3. DPPH radical scavenging activity of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extracts from different cultivation regions

Solvent	Concentration (μg/mL)	DPPH radical scavenging activity (%)			
		Gochang	Yeongyang	Jangheung	China
Hot water	12.5	23.07±0.72$^{b1)}$	26.46±1.83^{a}	24.07±0.53^{b}	20.54±0.46^{c}
	25	45.66±1.92^{b}	50.17±2.42^{a}	47.45±1.47^{ab}	40.87±0.81^{c}
	50	75.35±1.22^{a}	74.42±0.30^{a}	74.29±1.90^{a}	68.58±2.01^{b}
	75	79.27±0.20^{a}	77.01±0.12^{b}	79.74±0.12^{a}	77.15±0.75^{ab}
	100	79.21±0.12^{b}	76.35±0.30^{d}	79.94±0.23^{a}	77.35±0.12^{c}
	SC_{50} (μg/mL)	28.65±1.46^{b}	24.91±1.40^{c}	27.38±1.85^{bc}	33.24±0.34^{a}
75% ethanol	12.5	21.81±0.70^{b}	26.39±2.44^{a}	20.54±1.02^{b}	17.16±0.64^{c}
	25	41.01±1.69^{b}	47.28±0.99^{a}	41.41±0.85^{b}	34.30±0.50^{c}
	50	69.91±0.60^{b}	75.02±0.90^{a}	71.50±0.80^{b}	61.14±1.44^{c}
	75	79.14±0.61^{ab}	77.41±0.12^{b}	79.87±0.20^{a}	72.36±0.75^{c}
	100	79.87±0.00^{b}	78.01±0.12^{d}	80.27±0.20^{a}	78.34±0.12^{c}
	SC_{50} (μg/mL)	32.78±1.26^{b*}	27.45±1.55^{c}	32.14±1.18^{b*}	39.62±0.80^{a*}

Values are expressed as the mean±SD (n=3).
1)Means with different letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test (P<0.05).
*P<0.05; significantly different by Student's t-test between the extraction solvents in the SC_{50}.

을 DPPH 라디칼을 50% 저해하는 시료의 농도인 SC_{50} 값으로 비교했을 때 열수와 75% 에탄올 추출물 모두 영양 단삼(24.91 μg/mL, 27.45 μg/mL)이 가장 우수하였고, 다음으로 장흥 단삼(27.38 μg/mL, 32.14 μg/mL)과 고창 단삼(28.65 μg/mL, 32.78 μg/mL)은 유사한 활성을 나타내었으며, 중국산 단삼(33.24 μg/mL, 39.62 μg/mL)의 활성이 가장 낮게 측정되었다. 고창, 장흥, 중국산 단삼에서 DPPH 라디칼 소거능은 열수 추출물이 75% 에탄올 추출물보다 더 우수한 결과를 나타내었다. 재배지역에 따른 단삼 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 Table 4에 나타내었으며, 모든 시료에서 추출물의 농도가 증가할수록 ABTS 라디칼 소거 활성이 유의적으로 증가하였다. ABTS 라디칼을 50% 저해하는 시료의 농도인 SC_{50} 값을 구하여 재배지역별로 비교했을 때 열수와 75% 에탄올 추출물 모두 영양 단삼(22.53 μg/mL, 25.74 μg/mL), 고창 단삼(27.87 μg/mL, 27.96 μg/mL), 장흥 단삼(28.80 μg/mL, 31.17 μg/mL), 중국산 단삼(30.60 μg/mL, 35.39 μg/mL) 순으로 항산화 활성이 우수하여 DPPH 라디칼 소거능 결과와 유사하였다. 추출 용매에 따른 ABTS 라디칼 소거능은 고창 단삼에서 열수와 75% 에탄올 추출물이 유사한 결과를 보였으나, 나머지 지역에서는 모두 열수 추출물의 활성이 더 우수하였다. Kim 등(16)은 국내산 단삼의 열수 추출물의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 평가한 결과 55 μg/mL 농도에서 각각 70%와 60% 수준의 소거능을 나타내어 본 연구와 DPPH 라디칼 소거능은 유사한 수준이었으며, ABTS 라디칼 소거능은 더 낮은 결과를 보였다. Ju 등(24)은 16종의 한약재 열수 추출물의 DPPH에 대한 전자공여능을 측정한 결과 단삼의 전자공여 효과가 가장 우수한 것으로 나타나 천연 항산화제로서 단삼의 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

항균 활성

단삼의 주요 성분 중 tanshinone Ⅰ, tanshinone ⅡA, cryptotanshinone, dihydrotanshinone Ⅰ의 tanshinone 화합물들은 항균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(1, 8). Han(1)은 단삼에서 분리한 cryptotanshinone과 dihydrotanshinone Ⅰ의 항균 활성을 평가한 결과 그람 음성 세균에 대한 활성은 나타나지 않았지만, 그람 양성 세균에 대한 저해 활성은 우수한 결과를 보였다. Mok 등(12)은 단삼 에탄올 추출물의 세균과 효모균에 대한 항균 활성을 조사한 결과 그람 음성 세균이나 효모에 대한 저해 활성은 약하나 그람 양성 세균에 대한 저해 활성은 상당히 우수하며, 특히 *Bacillus* 속에 대한 MIC는 3.13 μg/mL로 강한 항균 활성을 나타내었다. 본 연구에서 재배지역에 따른 단삼의 항균 활성을 비교하기 위해 열수 및 75% 에탄올 추출물을 이용하여 *B. cereus*에 대한 생육 저해환을 측정하였다(Table 5). 열수 추출물의 항균 활성은 영양 단삼(15.84 mm)이 가장 우수하였으며 고창(11.59 mm)과 장흥(10.59 mm) 단삼 순으로 활성이 낮아졌으나, 중국산 단삼은 항균 활성이 검출되

Table 4. ABTS radical scavenging activity of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extracts from different cultivation regions

Solvent	Concentration (μg/mL)	ABTS radical scavenging activity (%)			
		Gochang	Yeongyang	Jangheung	China
Hot water	12.5	24.38±0.40$^{b1)}$	26.43±1.59^{a}	24.26±1.05^{b}	23.09±0.25^{b}
	25	45.67±0.33^{b}	55.79±2.64^{a}	45.34±0.38^{bc}	42.91±0.78^{c}
	50	83.27±1.92^{b}	89.08±0.70^{a}	82.06±1.31^{b}	77.75±1.07^{c}
	75	94.31±0.07^{a}	94.06±0.07^{b}	94.02±0.07^{b}	94.23±0.00^{ab}
	100	94.23±0.00^{a}	94.19±0.07^{a}	94.19±0.07^{a}	93.89±0.48^{a}
	SC_{50} (μg/mL)	27.87±0.10^{b}	22.53±0.15^{c}	28.80±0.98^{b}	30.60±0.45^{a}
75% ethanol	12.5	23.04±0.19^{ab}	24.68±2.40^{a}	21.04±0.88^{b}	18.74±0.57^{c}
	25	45.71±0.19^{b}	48.89±1.05^{a}	41.41±0.82^{c}	37.77±0.98^{d}
	50	81.97±1.01^{b}	86.53±0.07^{a}	76.20±1.92^{c}	67.21±1.01^{d}
	75	94.27±0.07^{a}	94.06±0.07^{a}	94.10±0.13^{a}	91.47±1.70^{b}
	100	94.23±0.00^{a}	94.23±0.00^{a}	94.02±0.36^{a}	94.06±0.40^{a}
	SC_{50} (μg/mL)	27.96±0.17^{c}	25.74±0.77^{d*}	31.17±0.67^{b*}	35.39±0.83^{a*}

Values are expressed as the mean±SD (n=3).
1)Means with different letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test (P<0.05).
*P<0.05; significantly different by Student's t-test between the extraction solvents in the SC_{50}.

Table 5. Antibacterial activity of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extracts from different cultivation regions against *Bacillus cereus*

Solvent	Inhibition zone diameter (mm)			
	Gochang	Yeongyang	Jangheung	China
Hot water	11.59±0.26$^{b1)}$	15.84±0.11^{a}	10.59±0.28^{c}	ND$^{2)}$
75% ethanol	16.40±0.19^{b}	19.77±0.14^{a}	16.71±0.13^{b}	11.77±0.14^{c}

Values are expressed as the mean±SD (n=3).
1)Means with different letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test (P<0.05).
2)ND: not detected.

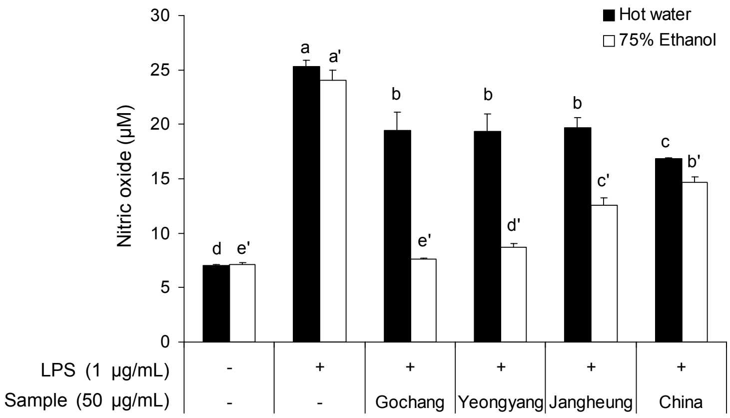

Fig. 1. Effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extracts from different cultivation regions on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with sample (50 μg/mL) and LPS (1 μg/mL) for 24 h. The amount of NO in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as the mean±SD of triplicate determinations. Different letters above the bars of the same extraction solvent are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

지 않았다. 75% 에탄올 추출물은 열수 추출물보다 항균 활성이 더 우수하였으며, 열수 추출물 결과와 유사하게 영양 단삼(19.77 mm)에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 장흥과 고창 단삼의 75% 에탄올 추출물은 각각 16.40 mm와 16.71 mm의 생육 저해환을 나타내어 유사한 항균 활성을 나타내었으며, 중국산 단삼은 11.77 mm의 생육 저해환으로 가장 낮은 항균 활성을 나타내었다. 재배지역에 따른 항균 활성의 차이는 단삼의 항균 물질 종류 및 함량의 차이로 추정되어 다음에 이에 대한 추가 연구가 필요하다. 추출 용매에 따른 항균 활성의 차이는 Mok 등(12)의 보고와 유사하게 물보다는 에탄올 추출 조건에서 우수하며, 이러한 결과는 단삼 내 항균 활성을 나타내는 성분인 tanshinone 화합물들의 용매 친화도와 연관성이 있을 것으로 생각된다.

Nitric oxide 저해 활성

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서 L-arginine을 기질로 하여 nitric oxide synthase에 의해 생성되며, 신경계, 면역계, 심장 혈관계에 있어서 중요한 전달 물질로 신경독성 및 신경 보호성의 기능을 동시에 나타낸다. 그러나 병리적 조건에서 다량의 NO 증가는 세포의 염증 및 조직의 손상을 일으킨다(25). NO 생성 저해에 대한 단삼 추출물의 효과를 평가하고 재배지역에 따른 항염증 활성을 비교하기 위하여 RAW 264.7 대식세포에 LPS로 NO 생성을 유도한 후 재배지역별 단삼의 열수 및 75% 에탄올 추출물을 무독성 농도인 50 μg/mL로 처리하여 생성된 NO의 양을 측정하였다(Fig. 1). 시료 무처리군에 비해 단삼 추출물 처리군 모두 NO 함량이 유의적으로 감소하였다. NO 생성량은 시료 무처리군 대비 열수 추출물이 23~34% 억제되었으며 75% 에탄올 추출물은 39~68% 억제되어 에탄올 추출물에서 더 우수한 결과를 보였으나, 용매별 추출물에서 재배지역에 따른 경향은 다르게 나타났다. 열수 추출물에서 국내산 단삼의 NO 저해율은 22~24% 범위였으나, 중국산 단삼은 34%로 더 높은 저해율을 나타내었다. 반면 75% 에탄올 추출물에서 NO 저해율은 고창 단삼 68%, 영양 단삼 64%, 장흥 단삼 48%, 중국산 39%로 나타나 열수 추출물 결과와 다른 경향을 나타내었다. Yeo 등(26)은 단삼 열수 추출물의 NO 저해 활성을 평가한 연구에서 추출물 125 μg/mL 농도에서 시료 무처리군 대비 12% 저해율을 나타내는 결과를 보고하였으며, Yun 등(27)은 단삼 메탄올 추출물을 100 μg/mL 처리하였을 때 시료 무처리군 대비 49.64%의 저해율을 나타냄을 보고하였다. 본 연구에서는 열수보다 에탄올 추출물의 NO 저해 활성이 우수하고, 고창 단삼의 75% 에탄올 추출물의 항염증 활성이 가장 우수함을 확인하였다.

Salvianolic acid B 분석

Salvianolic acid B는 단삼의 주요 페놀화합물로서 건조 단삼의 3~5%를 차지할 만큼 함량이 매우 높다(7). Salvianolic acid B의 주요 생리활성으로는 심장 보호, 산화적 스트레스에 대한 보호 효능, 혈관신생작용(angiogenesis) 및 골수세포의 alkaline phosphatase 활성을 증강하는 약리작용이 보고되고 있다(28,29). 본 연구에서 재배지역에 따른 단삼의 salvianolic acid B 함량을 열수 및 75% 에탄올 추출 분말로 각각 분석하여 비교하였다(Table 6). 열수 추출분말에서 salvianolic acid B는 영양 단삼이 110.59 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타냈으며, 장흥과 고창 단삼은 각각 69.07 mg/g, 68.97 mg/g으로 유사한 함량을 나타내었다.

Table 6. Salvianolic acid B contents of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extracts from different cultivation regions

Solvent	Salvianolic acid B content (mg/g extract)			
	Gochang	Yeongyang	Jangheung	China
Hot water	68.97±0.93$^{b1)}$	110.59±0.82^{a}	69.07±0.58^{b}	40.50±0.32^{c}
75% ethanol	76.34±2.29^{c}	111.93±2.26^{a}	85.24±1.52^{b}	54.49±1.08^{d}

Values are expressed as the mean±SD (n=3).
[1)]Means with different letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

중국산 단삼의 열수 추출분말에서 salvianolic acid B의 함량은 40.50 mg/g으로 측정되어 영양 단삼과 비교하였을 때 2.7배가 낮은 결과를 보였다. 75% 에탄올 추출분말의 salvianolic acid B 함량도 영양 단삼(111.93 mg/g)에서 가장 높게 측정되었으며, 장흥 단삼 85.24 mg/g, 고창 단삼 73.34 mg/g, 중국산 54.49 mg/g의 함량을 나타내었다. 단삼 추출물에서 salvianolic acid B는 열수 추출보다 에탄올 추출 조건에서 좀 더 높은 함량을 나타내었으며, 에탄올 추출물을 기준으로 단삼 원료의 중량에 따른 salvianolic acid B의 함량(w/w)은 영양 단삼 6.3%, 고창 단삼 4.7%, 장흥 단삼 4.4%, 중국산 2.6%로 분석되었다. Hu 등(30)은 중국 7개 지역 단삼들의 표준물질 함량을 분석한 결과 salvianolic acid B는 단삼 중량의 4.4~6.7% 범위로 나타났다. Li 등(31)은 건조 조건에 따른 단삼의 주요 성분 함량을 분석한 결과 salvianolic acid B는 단삼 중량의 1.1~4.0% 범위로 나타났다. 단삼의 salvianolic acid 함량의 차이는 추출 용매에 따라 영향을 받으나, 본 연구에서 동일한 용매로 추출한 경우 중국산보다는 국내산 단삼의 함량이 더 높은 것으로 평가된다.

요 약

재배지역에 따른 단삼의 성분 및 생리활성 비교를 위하여 고창, 영양, 장흥 지역의 국내산 단삼 3종과 중국산 단삼에 대한 일반성분, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석하고, 열수 및 75% 에탄올 추출을 시행하여 단삼 추출물의 항산화, 항균, 항염증 활성 평가와 salvianolic acid B 함량을 측정하였다. 단삼의 일반성분은 재배지역에 따라 상당한 차이를 보였으며, 총 폴리페놀 함량은 영양 단삼이 가장 높고, 총 플라보노이드 함량은 고창 단삼에서 가장 높은 결과를 보였다. 재배지역별 단삼의 열수 및 75% 에탄올 추출물을 이용하여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과 영양 단삼의 항산화 활성이 가장 우수하였으며, 75% 에탄올 추출물에 비해 열수 추출물의 항산화 활성이 더 우수하였다. *B. cereus*에 대한 지역별 단삼 추출물의 항균 활성은 영양 단삼이 가장 높았으며, 열수에 비해 75% 에탄올 추출물의 항균 활성이 더 우수하였다. LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 지역별 단삼 추출물을 처리하여 NO 저해율을 비교한 결과 열수 추출물에서는 중국산 단삼이 34% 저해율로 가장 높았으나, 75% 에탄올 추출물에서는 고창 단삼이 68% 저해율로 가장 우수한 결과를 나타내었다. 재배지역별 단삼 추출물에서 주요 성분인 salvianolic acid 함량을 비교한 결과 영양 단삼 추출물의 함량이 가장 높았으며, 열수에 비해 75% 에탄올 추출물의 함량이 좀 더 높은 결과를 보였다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지역주력산업육성 기술개발사업(R0005664)으로 수행한 연구의 일부로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Han WS. 2004. Isolation of antimicrobial compounds from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Korean J Med Crop Sci* 12: 179-182.
2. Wan X, Jung YA, Row KH. 2008. Solvent extraction of tanshinone ⅡA from *Salvia Miltiorrhiza Bunge*. *Korean Chem Eng Res* 46: 660-664.
3. Chen F, Li L, Tian DD. 2017. *Salvia miltiorrhiza* roots against cardiovascular disease: consideration of herb-drug interactions. *BioMed Res Int* 2017: 9868694.
4. Fang ZY, Lin R, Yuan BX, Yang GD, Liu Y, Zhang H. 2008. Tanshinone ⅡA downregulates the CD40 expression and decreases MMP-2 activity on atherosclerosis induced by high fatty diet in rabbit. *J Ethnopharmacol* 115: 217-222.
5. Tang S, Shen XY, Huang HQ, Xu SW, Yu Y, Zhou CH, Chen SR, Le K, Wang YH, Liu PQ. 2011. Cryptotanshinone suppressed inflammatory cytokines secretion in RAW 264.7 macrophages through inhibition of the NF-κB and MAPK signaling pathways. *Inflammation* 34: 111-118.
6. Huang M, Xie Y, Chen L, Chu K, Wu S, Lu J, Chen X, Wang Y, Lai X. 2012. Antidiabetic effect of the total polyphenolic acids fraction from *Salvia miltiorrhiza* Bunge in diabetic rats. *Phytother Res* 26: 944-948.
7. Zhao GR, Zhang HM, Ye TX, Xiang ZJ, Yuan YJ, Guo ZX, Zhao LB. 2008. Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *Food Chem Toxicol* 46: 73-81.
8. Zhao J, Lou J, Mou Y, Li P, Wu J, Zhou L. 2011. Diterpenoid tanshinones and phenolic acids from cultured hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activities. *Molecules* 16: 2259-2267.
9. Gong Y, Li Y, Lu Y, Li L, Abdolmaleky H, Blackburn GL, Zhou JR. 2011. Bioactive tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* inhibit the growth of prostate cancer cells *in vitro* and in mice. *Int J Cancer* 129: 1042-1052.
10. Liu T, Jin H, Sun QR, Xu JH, Hu HT. 2010. The neuroprotective effects of tanshinone ⅡA on β-amyloid-induced toxicity in rat cortical neurons. *Neuropharmacology* 59: 595-604.
11. Liu L, Jia J, Zeng G, Zhao Y, Qi X, He C, Guo W, Fan D, Han G, Li Z. 2013. Studies on immunoregulatory and anti-tumor activities of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Carbohydr Polym* 92: 479-483.
12. Mok JS, Park UY, Kim YM, Chang DS. 1994. Effects of solvents and extracting condition on the antimicrobial activity of Salviae miltiorrhizae radix (*Salvia miltiorrhiza*) extract. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 1001-1007.
13. Yang SA, Im NK, Lee IS. 2007. Effects of methanolic extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on *in vitro* antithrombotic and antioxidative activities. *Korean J Food Sci Technol* 39: 83-87.
14. Chang BY, Oh BR, Sohn DH, Kim SY. 2008. Single oral toxicity study on the standardized extract of *Salvia miltiorrhiza*. *Kor J Pharmacogn* 39: 352-356.
15. Park TS, Kim DH, Son JH. 2015. Whitening effect of *Salvia miltorrhiza* Bunge water extract in human epidermal melanocyte. *J Appl Biol Chem* 58: 333-338.
16. Kim SH, Hwang IW, Chung SK, Seo YJ, Kim JS, Jeong YJ, Kim MY. 2015. Physicochemical properties of *Salvia miltiorrhiza* Bunge following treatment with enzymes. *Ko-*

rean J Food Preserv 22: 699-707.
17. Jeon KM, Park KH, Pyo AJ. 2015. A research on cell proliferation effect and antioxidant activity of extracts based on different extraction methods of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and *Scutellaria baicalensis*. *Kor J Aesthet Cosmetol* 13: 495-502.
18. AOAC. 2005. *Official methods of analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
19. Yang EJ, Chang HC. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35: 339-346.
20. Mattila P, Hellström J. 2007. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J Food Comp Anal* 20: 152-160.
21. Kim MG, Oh MS, Jeon JS, Kim HT, Yoon MH. 2016. A study on antioxidant activity and antioxidant compound content by the types of tea. *J Food Hyg Saf* 31: 132-139.
22. Chung HJ. 2014. Comparison of total polyphenols, total flavonoids, and biological activities of black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1349-1356.
23. Pandey KB, Rizvi SI. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longey* 2: 270-278.
24. Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 7-14.
25. Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916.
26. Yeo IH, Lee CK, Lee EY. 2014. Effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* hot aqueous extract on nitric oxide and prostaglandin E2 production and on 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical scavenging in macrophages. *J Pharmacopuncture* 17: 7-12.
27. Yun HJ, Heo SK, Yun HJ, Park WH, Park SD. 2007. Anti-inflammatory effect of *Salviae Miliorrhizae* Radix. *Kor J Herbol* 22: 65-73.
28. Ho JH, Hong CY. 2011. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *J Biomed Sci* 18:30
29. Shim KM, Kim SE, Kang SS. 2010. Effect of water extract of danshen on bone regeneration of rat calvarial defect model. *Korean J Vet Res* 50: 171-177.
30. Hu P, Luo GA, Zhao Z, Jiang ZH. 2005. Quality assessment of Radix Salviae Miltiorrhizae. *Chem Pharm Bull* 53: 481-486.
31. Li XB, Wang W, Zhou GJ, Li Y, Xie XM, Zhou TS. 2012. Production of salvianolic acid B in roots of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) during the post-harvest drying process. *Molecules* 17: 2388-2407.