

추출농도에 따른 오미자 및 구기자를 첨가한 한방약술의 품질특성

오성천[†]

[†]대원대학교 제약품질관리과

(2018년 12월 2일 접수; 2019년 3월 28일 수정; 2019년 3월 29일 채택)

Quality Properties of Herbal Wine containing *Schizandra chinensis* and *Lycium chinense* according to Extract Concentration

Sung-Cheon Oh[†]

[†]Dept. of Pharmaceutical Quality Control, Daewon University College, Jecheon 27135, Korea
(Received December 2, 2018; Revised March 28, 2019; Accepted March 29, 2019)

요약 : 본 연구에서는 한약재의 활용도를 높이기 위한 연구로 추출물 농도에 따른 생리활성물질의 용출량을 측정하기 위해 한방약술의 품질 특성과 Glutathione S-transferase의 활성 저해능을 측정한 결과는 다음과 같다. 한방약술의 pH결과는 4.4로 발효 전의 대조구 3.9보다 증가하였다. 이러한 변화는 알코올 발효과정 중 발효부산물 및 유기산 때문으로 사료된다. 한방약술의 산도는 0.55%로 발효 전의 대조구 0.09%보다 약 6배 증가하였다. 이런 결과는 유기산이 알코올 등과 결합하여 ester와 같은 향미 형성 등에 이용되는 것을 알 수 있다. 한방약술 15%의 glutathione S-transferase의 활성 저해능 5.1±0.3, 한방약술 20%는 저해능 6.5±0.5, 한방약술 25%는 7.6±0.6, 한방약술 30%는 8.4±0.2, 최대 농도인 35%에서의 저해능은 9.7±0.7로 나타내었다. 추출 농도별로 glutathione S-transferase의 활성 저해능은 통계학적으로 유의한 차이가 있음을 보였다 ($p<0.05$).

주제어 : 한방약술, Glutathione S-Transferase, 한약재, 추출농도, 향산화

Abstract : In this study, the following is the result of measuring the quality characteristics of herbal wine and the active inhibition of Glutathione S-transferase in order to measure the release of physiological active substances according to the concentration of extracts. The pH level of herbal wine was 4.4, up from 3.9 before fermentation. These changes are attributed to fermentation and organic acids during alcoholic fermentation. The acidity of herbal wine was 0.55%, about six times higher than the pre-fermentation control of 0.09%. These results show that organic acids are used for flavor formation, ether, in combination with alcohol. The inhibitory activity of glutathione S-transferase were 5.1±0.31 in herbal wine 15%, 6.5±0.6 in herbal wine 20%, 7.6±0.6 in herbal

[†]Corresponding author
(E-mail: osc5000@mail.daewon.ac.kr)

wine 25%, 8.4 ± 0.2 in herbal wine 30% and 9.7 ± 0.7 in herbal wine 35%. As the extract concentration was increased the inhibitory activity of glutathione *S*-transferase were significantly increased (<0.05).

Keywords : herbal wine, Glutathione *S*-Transferase, herbal medicine, extract concentration, antioxidant

1. 서론

현대인의 생활수준의 향상과 식 생활의 서구화에 따른 영양의 과잉섭취, 운동부족 및 과도한 스트레스로 인하여 만성질환이 발생하여 개인의 삶 전체에 양적, 질적 저하를 초래하고 사회적 및 경제적으로 많은 부담을 수반하고 있다[1]. 특히 활성 산소 종은 몸속에서 세포, 단백질, 지질, 핵산 등을 공격하여 산화적 스트레스를 주므로 각종 심혈 관계 질환, 암 및 노화 등을 촉진하며 [2] 인체 내의 대사과정에서 발생한 활성산소에 의한 산화적 스트레스는 여러 가지 질병과 노화를 유발하는 것으로 알려져 있다[3]. 활성산소 종들은 세포막 분해라든지 DNA 합성 억제 의한 생리적 장애를 주는 것으로 밝혔으며[4], 심한 경우 세포사멸이 일어나기도 한다[5].

이에 활성산소를 저하시켜서 건강에 도움을 줄 수 있는 한약재가 첨가된 한방 약술을 개발이 필요하다. 오미자(*Schizandra chinensis*)는 약용 및 식용식물체로 식품, 기호음료, 한방, 의약 면에서 널리 통용되고 있으며[6], 진정, 진해, 해열 등의 효과가 있는 것으로 알려져 왔다[7]. 구기자(*Lycium chinense*)는 달고 성질이 차며, 간과 신장에 작용하여 시력을 개선하고 몸이 허약하여 생기는 병을 다스리는 것으로 알려져 있다[8]. 지방간 치료 및 예방에 효과적인 베타인 성분이 풍부할 뿐만 아니라 간 해독 효능이 뛰어나다[9]. 또한 체내에 콜레스테롤 지방이 축적되는 것을 막아주며 염증을 예방하는 효과도 있다[10]. 이러한 생약재를 이용한 항산화[11], 항염증 및 해독 작용 등이 연구되어 왔다.

글루타티온 전달효소의 주요기능은 알킬, 에폭사이드 등과 같은 친전자성화합물과 글루타티온과의 포합반응을 촉매 하는 것으로 외래성 이물질들에 대한 해독작용을 주 기능으로 하는 다기능 단백질로서 각종 질병과 연관이 되 있다.

본 연구는 한약재로 한방약술을 제조하여 생리

활성물질의 용출량을 측정하고 추출물의 농도에 따른 Glutathione *S*-Transferase가 저해제로서 역할을 하는지 규명하고자 하였으며 한방약술의 품질특성을 분석하여 한약재의 활용도를 높이는 데 기여하고자 했다.

2. 실험

2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 한방약술은 백미를 재도정하여 세척 및 증자, 제국, 사입 및 발효공정을 거쳤으며 증류 후 한약재인 오미자와 구기자를 첨가하여 침출하였다. 한약재를 20일간 추출한 것을 일액으로 사용하였으며 제성, 정제 및 여과 과정을 거쳐 사용하였다. 한방 약술을 만들기 위하여 특수한 방법인 감압증류 방법으로 증류주 얻어 이것을 탈취, 탈색을 시켜 여과하여 깨끗한 40% 증류주를 한약재 침출용으로 사용하였다. 한방약술은 알콜 농도별로 정치하여 추출하는 방법으로 사용하였으며 추출물의 농도는 15%, 20%, 25%, 30%, 35%의 5가지로 하여 실험하였다.

2.2. 시약 및 실험기구

글루타티온 전달 효소의 기질로 사용된 1-chloro-2,4-dinitro-benzene(CDNB), 1,2-dichloro-4-nitrobenzene(DCNB), 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propane(EPNP), ethacrylic acid (ETA), cumene hydroperoxide(CP), 4-nitrophenethyl bromide(4-NPB), glutathione 저해제로 사용된 *S*-hexyl-GSH, hematin은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. Potassium phosphate(monobasic), potassium phosphate(dibasic)은 Kanto Chemical Co.(Tokyo, Japan) 제품을, sodium chloride는 Duksan Pure Chemical Co.(Kyönggi, Korea) 제품을, potassium chloride는 Daejung(Incheon,

Korea) 제품을 사용하였다. 그 외 buffer를 만들기 위한 시약과 사용한 모든 시약은 일급 및 특급 시약을 사용하였다.

Vortex Mixer는 Thermolyne(Iowa, USA)사의 Type 37600Mixer를 이용하였다. 기질과의 특성 조사를 위해서 Hitachi사(Tokyo Japan) U-2000 UV/VIS Spectrophotometer를 이용하였다

2.3. 실험방법

2.3.1. 수분 정량

상압건조법[12]에 따라 시료를 105°C의 드라이 오븐에서 2~3시간 가열하고 데시케이터에서 30분간 방냉한 다음 무게를 반복 측정하였다.

2.3.2. 회분 측정

AOAC법의 직접 회화법[12]에 따라 시료를 550~600°C 회화로에서 5~6시간 회화하여 데시케이터에서 식힌 다음 무게를 재어 조회분량을 산출하였다.

2.3.3. 조지방 정량

Soxhlet법[13]에 따라 분말 시료 5~10 g을 원통 여과지에 넣어 탈지면으로 막고 100~105°C 건조기에서 2~3시간 건조하여 데시케이터에서 방냉하고 Soxhlet 추출관에 넣고 60~65°C 수욕에서 8~16 시간동안 에테르 추출한 다음 수기의 에테르를 날려 보내고 무게를 재서 조지방 양으로 하였다.

2.3.4. 조단백질 정량

Kjeldahl법[14]에 따라 Kjeldahl 장치(Foss, Sweden)로 시료를 황산으로 가열분해하여 단백질 중의 질소를 황산암모늄으로 분해시킨 후 황산암모늄에 수산화나트륨을 가하여 알칼리성으로

하고, 유리된 암모니아를 수증기 증류하여 희황산으로 포집하여 수산화나트륨으로 적정하여 구한 질소 양에 질소 계수를 곱하여 조단백질 양을 산출하였다.

2.3.5. 탄수화물 정량

시료 전체를 100%로 하여 수분, 조단백질, 조지방, 회분의 함량을 뺀 나머지를 탄수화물 함량(%)으로 하였다[15].

2.3.6. pH 측정

여과 전에 사입, 증류한 것과 증류 액에 한약재를 침출시킨 후 제성, 정제 여과한 최종 한방약술을 취하여 pH meter(Model 320, Orion, Japan)를 이용하여 측정하였다.

2.3.7. 총산도 측정

산도 측정은 Yi의 방법을 변형하여 측정하였다. 10배로 희석한 시료 10 ml를 채취하여 1% phenolphthalein 지시약을 0.2 ml 떨어뜨린 후 0.1 N NaOH로 중화 적정 한 다음 소비된 양(ml)을 기록하고 다음 식에 의하여 산도를 계산하였다.

$$\text{산도(\%)} = [0.009 \times \text{NaOH 소비량(ml)} \times \text{NaOH 역가}(1.002) \times 100 \times \text{희석배수}(10)] / \text{시료부피(ml)}$$

2.3.8. GST(Glutathione S-transferase) 활성도 측정

포합 반응에 대한 초기 속도 측정에는 1,2-dichloro-4-nitrobenzene(DCNB)를 사용하였다. 측정 방법은 적정 용매와 기질, 글루타티온(GSH) 효소를 혼합한 뒤 340 nm에서 UV/ VIS spectrophotometer를 이용해서 1 분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다. 효소 활성 단위는 1 분당

Table 1. Measurement method of activity on the substrate

Substrate	Buffer (500 μ l)	pH	GSH ^a (mM)	Substrate ^a (mM)	ϵ ^b (mM ⁻¹ ·cm ⁻¹)
CDNB (340 nm)	200 mM KPB ^c	6.5	50	50	9.6

a : GSH and substrate concentration refer to final concentration

b : ϵ - molecular absorption coefficient

c : KPB refers to potassium phosphate buffer

1 μmol 의 생성물 형성을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다. 기질에 대한 활성화도 측정 방법은 Table 2에 나타내었다. 그리고 효소의 최적 pH와 최적 온도는 각각 9.0과 55°C 인 것으로 나타났다[16], GST 효소 활성 저해와 관련한 실험 조건은 Cho HY[17]가 밝힌 기질 농도의 영향, pH 영향, 온도의 영향 등을 참조하였다.

먼저 1 ml vial에 500 μl 의 0.2 M KPB(pH 7.0)와 420 μl 의 증류수를 넣고 잘 혼합시킨 후에 20 μl 의 50 mM GSH와 20 μl 의 GST를 넣고 강하게 혼합시킨다. 잘 혼합된 용액에 20 μl 의 50 mM CDNB를 넣고 강하게 혼합시킨 후에 340 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(Model U-2000, Hitachi, Japan)를 이용해서 1분 동안의 흡광도 변화를 측정하여 기본 포합반응으로 하였다. 위와 동일한 조건의 혼합물에서 추출한 시료 20 μl 를 혼합하여 강하게 저어준 다음에 340 nm에서 1분 동안의 흡광도 변화를 측정하였고, 기본 포합반응의 흡광도와 비교하여 한방약술이 GST 저해제로서 상관관계를 규명하려고 하였다.

2.3.9. 통계처리

모든 실험결과는 Statistical Package for the Social Science Program(SPSS, version 21)을 사용하여 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 실험군 간의 유의성은 Duncan multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였으며, 모든 실험 3회 반복해서 실행한 평균 \pm 표준편차로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 일반성분

본 실험에 사용한 오미자(*Schizandra chinensis*)와 구기자(*Lycium chinense*)의 일반성분 분석결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Proximate composition of *Schizandra chinensis* and *Lycium chinense*(%)

Components	Moisture	Crude protein	Crude fat	Ash	Carbohydrate
<i>Schizandra chinensis</i>	12.1 \pm 0.1	16.3 \pm 0.2	6.8 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1	60.9 \pm 0.2
<i>Lycium chinense</i>	12.5 \pm 0.2	14.6 \pm 0.1	10.7 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	57.1 \pm 0.3

오미자의 수분 함량은 12.01%, 조단백질, 조지방은 각각 16.3%, 6.8%이었으며 회분과 탄수화물 함량은 각각 3.9%, 60.9%로 분석되었으며 구기자의 경우 수분 함량은 12.5%, 조단백질, 조지방은 각각 14.6%, 10.7%이었으며 회분과 탄수화물 함량은 각각 5.1%, 57.1%로 탄수화물 함량이 비교적 높은 것을 알 수 있다.

3.2. pH

본 연구에서는 사용한 한방약술의 pH결과는 Table 3과 같다. 한방약술의 pH는 4.4로 발효 전의 대조구 3.9보다 증가하였다. 이러한 변화는 알코올 발효과정 중 발효부산물 및 유기산 때문으로 사료된다.

Table 3. pH of Herbal drug Wine

pH	result
Control	3.9 \pm 0.2
Herbal Drug Wine	4.4 \pm 0.1

3.3. 총산도

본 연구에서는 사용한 한방약술의 산도의 결과는 Table 4와 같다. 한방약술의 산도는 0.55%로 발효 전의 대조구 0.09%보다 약 6배 증가하였다.

Table 4. Total acidity of Herbal Drug Wine

Total acidity	result
Control	0.09 \pm 0.0
Herbal Drug Wine	0.55 \pm 0.1

3.4. GST(Glutathione S-transferase) 활성화도

첨가된 한약재 추출물의 농도에 따른 glutathione S-transferase 저해능 실험의 결과는 Table 5에 나타내었다. Table 5에서 보는 바와 같이 한방약술 15%의 glutathione S-transferase의 활성 저해능 5.1 \pm 0.3%, 한방약술 20%는 저해

Table 5. Inhibition ability of herbal drug wine depending on glutathione S-transferase

Extraction concentration of herbal wine	Inhibition ability
herbal wine 15%	5.1±0.3 ^a
herbal wine 20%	6.5±0.5 ^b
herbal wine 25%	7.6±0.6 ^c
herbal wine 30%	8.4±0.2 ^d
herbal wine 35%	9.7±0.2 ^e
F value	42.641 [*] (0.000)

1) Each value is mean±S.D. of triplicate determination (n=3).

* Means with different letters (a~e) within a column are significantly different at $p<0.05$

농 6.5±0.5%, 한방약술 25%는 7.6±0.6%, 한방약술 30%는 8.4±0.2%, 최대 농도인 35%에서의 저해능은 9.7±0.7로 나타내었다. 추출농도별로 glutathione S-transferase의 활성 저해능은 통계학적으로 유의한 차이가 있음을 보였다($p<0.05$). Oh SC[18]의 선행 연구에서 총 폴리페놀 함량 측정의 결과와 유사하게 35% 추출물에서 glutathione S-transferase의 활성 저해능이 가장 높게 나타났고, 15%추출물에서 가장 낮은 저해 능을 보였다. 추출물의 총 폴리페놀 함량과 glutathione S-transferase의 활성 및 저해능과의 상관성에 대한 연구가 필요하다고 사료된다. Lee & Park[19]의 연구에서 양파 추출물의 유기용매별 glutathione S-transferase(GST)에 대한 활성 저해 능은 methanol, ethanol, ethyl acetate로 용출한 분획의 GST 활성 저해에 유의성이 있는 것으로 나타나, 본 연구의 결과와 유사한 것으로 나타났다. 항암제 내성을 설명하기 위해 제안된 하나의 mechanism은 정상세포에 비해서 내성세포에서 GST 분자 종들의 발현이 증가하는 것이다. Batist[20] 등은 adriamycin-resistant human breastcancer cell line(AdrRMCF-7)의 발생과정에서 내성세포에서는 일반 세포에 비해서 GST 활성이 45배 증가되었고, 이 증가된 활성 중 90%이상이 일반 세포에서는 정상적으로 발견되지 않는 Pi GST 분자종이라고 보고하였다.

또한 Fahl 등[21]은 배양시킨 mammalian cell에서 GST 분자종들을 발현시켰더니 항암제인 chloram butil, melphalan, cisplatin에 의한 내성이 크게 강화되었다고 보고하였다. Glutathione S-transferase는 외래성 이 물질들에 대한 해독작용을 주 기능으로 하는 다기능 단백질로서 각종

화합물과 비 공유결합을 하여 세포내 저장과 운반에 관여하는 것으로 알려져 있다.

4. 결론

본 연구에서는 한약재의 활용도를 높이기 위한 연구로 추출물 농도에 따른 생리활성물질의 용출량을 측정하기 위해 한방약술의 품질 특성과 Glutathione S-transferase의 활성 저해능을 측정 한 결과는 다음과 같다. 한방약술의 pH결과는 4.4로 발효 전의 대조구 3.9보다 증가하였다. 이러한 변화는 알코올 발효과정 중 발효부산물 및 유기산 때문으로 사료된다. 한방약술의 산도는 0.55%로 발효 전의 대조구 0.09%보다 약 6배 증가하였다. 이런 결과는 유기산이 알코올 등과 결합하여 ester와 같은 향미 형성 등에 이용되는 것을 알 수 있다. 한방약술 15%의 glutathione S-transferase의 활성 저해능 5.1±0.3, 한방약술 20%는 저해능 6.5±0.5, 한방약술 25%는 7.6±0.6, 한방약술 30%는 8.4±0.2, 최대 농도인 35%에서의 저해능은 9.7±0.7로 나타내었다. 추출 농도별로 glutathione S-transferase의 활성 저해능은 통계학적으로 유의한 차이가 있음을 보였다 ($p<0.05$).

감사의 글

본 연구는 대원대학교 2018년 교내 학술 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. I. S. Choi, K. Y. Kim, J. E. Yim and Y.S. Kim, "Calorie restriction and obesity under the regulation of SIRT1". *Korean J. Obes.* Vol.20, pp. 170-176, (2011).
2. J. Y. Mok, H. J. Kang, J. K. Cho, I. H. Jeon, H. S. Kim, J. M. Park, S. I. Jeong, J. S. Shin and S. I. Jang, "Antioxidative and antiinflammatory effects of extracts from different organs of *Cirsium Japonicum* var. *ussuriense*". *Kor J. Herbology*, Vol.26, pp. 39-47, (2011).
3. J. R. Jang, S. Y. Hwang and S. Y. Lim, "Inhibitory effect of extracts of *Platycodon grandiflorum* on oxidation and nitric oxide production". *Korean J. Food Preserv.* Vol.18, pp. 65-71, (2011).
4. P. A. Cerutti, "Prooxidant states and tumor promotion", *Science*, Vol.227, pp. 375-381, (1985).
5. D. Juze and M. Van Montagu, "Oxidative stress in plants", *Curr Opin Biotechnol.* Vol.6, pp. 166-172, (1995).
6. H. Y. Hsu, Y. P. Chen, S. J. Shen, C. S. Hsu, C. C. Chen and H. C. Chang, "Oriental material Medica. Oriental healing Art Institute", California USA. pp. 624, (1986).
7. M. Zhu, K. F. Lin, R. Y. Yeung and R. C. Li, "Evaluation of the protective effects of *Schizandra chinensis* on phase I drug metabolism using a CCl₄ intoxication model", *J. Ethnopharmacol.* vol.67, pp. 61-68, (1999).
8. J. D. Mellor, "Fundamentals of freeze drying. Academic press", London, England, pp. 244-250, (1978).
9. S. I. Choi, Y. M. Lee and T. R. Heo, "Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity in vitro of traditional herbal medicine extract". *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol.18, pp. 282-288, (2003).
10. K. M. Kim, J. K. Hwang, K. M. H. S. and J. H. Song, "Detoxicating effects of oriental herbs extract mixtures on nicotine and dioxin". *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.35, pp. 980-987, (2003).
11. H. K. Kim, Y. E. Kim, J. R. Do, Y. C. Lee and B. Y. Lee, "Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medical plants". *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol. 27, pp. 80-85, (1995).
12. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Int.16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA (1995).
13. *Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* Food nutrition experiment handbook. Hyoil, pp. 124-126, (2000).
14. AOAC. Official Methods Analysis 13th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. USA. pp. 125-132, (1990).
15. Korean Food Standards Codex. 7. General experiment. 2-1 General composition experiment. pp. 18, (2012).
16. H. Y. Cho and K. H. Kong, "Molecular cloning expression and characterization of a phi-type glutathione S-transferase from *Oryza sativa*". *Pestic Biochem Phys.* Vol.83, pp. 29-36 (2005).
17. H. Y. Cho, "Studies on the biochemical characterization and the application of plant-specific rice glutathione S-transferase". Ph.D. Thesis, Chung Ang Univ. Seoul, Korea.
18. S. C. Oh, "Antioxidant Effects of Herbal Wine containing *Acanthopanax sessiliflorus*, *Lycium chinense*, *Schizandra chinensis*, *Cuscutae semen*, *Rubus coreanum* and *Plantaginis semen*". *J. of Korean Oil Chemists Soc.* Vol.33(4), pp. 693-697, (2016).
19. K. S. Lee and K. S. Park. "A study of glutathione S-transferase inhibitors obtained from *Allium cepa* var. *cepa* extract". *Korean J Food & Nutr.*, Vol.26, pp. 725-730, (2013).
20. G. Batist, B. K. Sinha and A. G. "Katki, Differential formation of hydroxyl radicals

- by adriamycin in sensitive and resistant MCF-7 human breast tumor”, *Cells Biochem.*, Vol.26, pp. 3776-3780, (1987).
21. W. E. Fahl, R. L. Schecter and M. A. Alaoui-Jamali, “Expression of a rat glutathione S-transferase complementary DNA in rat mammary carcinoma cells: Impact upon alkylation induced toxicity”. *Cancer Research* Vol.53, pp. 4900 (1993).