

초음파를 이용한 고삼에 포함된 Genistein 및 Formononetin의 추출

김영식 · 이광진†

강원대학교 삼척캠퍼스 화학공학과
245-711 강원도 삼척시 중앙로 1
(2008년 8월 4일 접수, 2009년 2월 24일 채택)

Extraction of Genistein and Formononetin from *Sophoraflavescens Aiton* using Ultrasonic wave

Young Sik Kim and Kwang Jin Lee†

Department of Chemical Engineering, Kangwon National University, 1 Joongang-ro, Samcheok, Gangwon-do 245-711, Korea
(Received 4 August 2008; accepted 24 February 2009)

요 약

본 연구에서는 추출용매 물 100%을 이용하여 다양한 초음파 에너지(35, 72, 170 KHz)와 추출 시간(30, 60 min)에 의한 고삼으로부터 식물성에스트로겐 제니스테인 및 포르모노네틴의 추출량과 일반성분의 영향을 비교하였다. 전처리 단계는 초음파추출, 여과, 농축, 막분리로 구성되었다. 추출된 용액은 역상 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 분석하였다. 이동상 조성은 A는 물/아세트산(99.9/0.1 vol%), B는 아세토니트릴/아세트산(99.9/0.1 vol%)이며, A/B를 80/20~65/35 vol%로 60분 동안 선형적으로 변화시켰다. 실험결과에 의하면 일반성분은 탄수화물(0.255~0.413%)을 제외한 나머지 성분들의 함량은 거의 비슷하게 확인되었다. 또한 주파수 170 KHz, 60 min에서 추출량이 3.17 g으로 추출 수율이 가장 우수하였고 천연물관련 화학 및 생물학 연구에 기초자료로 도움이 될 것이다.

Abstract – In this work, we the effect on extraction amounts and general composition content of phytoestrogen genistein and formononetin extracted from *Sophoraflavescens Aiton* by various ultrasonic waves(35, 72, and 170 KHz) and extraction time(30, and 60 min) were compared using extraction solvent water 100%. The pretreatment step was composed of ultrasonic waves extraction, filtration, concentration, and membrane filtration. The extracted sample was analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC). And the mobile phase applied was linearly changed with A/B of 80/20~65/35 vol% for 60 min(A water/acetic acid, 99.9/0.1 vol%, B acetonitrile/acetic acid, 99.9/0.1 vol%). The experimental results, general composition carbohydrate(0.255 to 0.413%) excepts, other ingredients was confirmed almost similarly. Also, The highest yield of extraction amount 3.17g was obtained by ultrasonic waves with a frequency of 170 KHz and an extraction time of 60 min. This work offers would be useful for chemical and biological studies of natural plants and its products.

Key words: Extraction, Purification, Phytoestrogen, *Sophoraflavescens Aiton*, Ultrasound

1. 서 론

최근 세계적으로 환경오염 및 서구적 식생활 문화에 의한 성인병 발생이 증가함에 따라 질병의 예방과 건강에 대한 관심이 높아지고 있다. 천연식물의 줄기, 뿌리, 열매 등에는 여러 가지 필수적 성분들이 존재하는데, 과거의 화학적 합성품들보다 인체에 자극이 없는 천연의 약재로 쓰이던 생약 등의 선호도가 증가하고 있다[1]. 이 중에서 고삼(*Sophora Radix*)은 콩과(*Leguminosae*)에 속하는 다년생 초본식물로서 강한 쓴맛이 있고 인삼과 같은 효과가 있다는 뜻에서 고삼이라 한다. 고삼의 뿌리와 줄기는 오래 전부터 우리나라와 중국,

일본 등지에서 전통 의약으로 사용되었으며[2], 약리적 특성으로는 해열, 이노, 위장염, 장염, 피부의 화농증, 습진 등의 질환등에 사용되는 생약제이다[3, 4]. 현대 사회는 환경오염 및 식생활문화에 의하여 다양한 질병인 성인병 발생이 증가하고 예방에 따른 건강의 관심이 높아지고 있다. 따라서 천연물로부터 생리활성 물질의 소재 탐색 연구가 많은 연구자로부터 관심을 받고 있다[5].

고삼의 유용 성분을 살펴보면 대부분이 (+)-matrine, (+)-matrine N-oxide, (+)-allomatrine, (+)-isomatrine, (+)-sophoranol, (+)-sophoranol N-oxide, (-)-sophoramine, (-)-N-methylcytisine, (-)-anagryne, (-)-baptifoline과 같은 alkaloid 화합물과[6, 7], 식물성에스트로겐(phytoestrogen)으로 알려진 다이드제인(daidzein), 제니스테인(genistein), 포르모노네틴(formononetin) 등의 이소플라본(isoflavones) 화합물을 포함하

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: cfc0079@empal.com

고 있다[8]. 그 중에서 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)은 일반적으로 동물의 에스트로젠과 유사한 작용을 나타내는데, 유방암, 세포의 성장억제, 심혈관 질환, 골다공증 치료에 동물성 에스트로젠을 대체하여 사용될 수 있다[9]. 고삼으로부터 식물성 에스트로젠을 효율적으로 얻기 위한 추출 방법으로는 일반적인 용매추출법이 있으며, 추출시간을 단축하기 위하여 마이크로웨이브, 초음파에너지를 이용한 추출공정이 많이 연구되고 있다[10]. 초음파 추출공정은 고주파와 저주파의 사용에 따라 캐비테이션(공동화)의 강도는 달라지며, 미세한 공동화현상인 공동(cavity)이 발생되어 시료에 미세부분의 조직까지 쉽게 침투하여 추출효과를 향상시킬 수 있다[11, 12]. 본 연구에서는 초음파 에너지를 이용한 용매추출공정을 구성하여 고삼으로부터 식물성 에스트로젠의 제니스테인 및 포르모노네틴을 추출하고 추출량의 조건을 제시하며 선택적으로 추출할 수 있는 가능성을 제시와 HPLC를 이용하여 추출량을 실험적으로 구하여 비교하였다.

2. 실험

2-1. 재료 및 방법

실험에 사용된 건조된 고삼뿌리는 서울(경동시장)에서 2007년 10월에 건조된 것을 구입하였다. 표준 시료인 제니스테인 및 포르모노네틴을 Sigma사와 Fluka사에서 구입하였다. 시료의 균일성을 위하여 수분조절 용기(Desiccator)에 보관하여 사용하였다. 용매는 HPLC급(99.9%)으로 물, 아세트나이트릴은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, U.S.A.)에서 그리고 아세트산은 동양화학(Incheon Korea)에서 구입하여 사용하였다. Fig. 1에서는 고삼에 함유된 제니스테인 및 포르모노네틴의 구조식을 정리하여 놓았다.

2-2. 추출 및 전처리

추출은 일정한 온도(상온)에서 수행하였으며, 건조된 시료는 푸드믹서(220 W, 1.3 A person Hannil Mixer FM)에서 2 min 동안 분쇄 후 입자를 체 거름(30 μm)으로 분별하여 시료로 사용하였다. 이후, 고삼분말 10 g을 500 ml 비이커에 추출용매 물 100%, 100 ml를 첨가하여 침적 및 초음파 추출시스템을 이용하여 추출하였다. 다양한 추출방법을 적용하기 위하여 초음파에너지(35, 72, 170 KHz, 300 Watt ± 2)를 각각 적용하였으며, 추출 온도는 반응기내 물을 chiller를 통해 순환시켜(25 °C, ±1)를 고정하였다. 초음파추출시간은(30, 60 min)을 각각 적용하였다. 추출물에는 많은 양의 불순물들이 포함되어 있기 때문에 용매 추출 후 여지필터(pore size: 5 μm)에서 감압 여과하여 시료 잔유물과 분리시키고, 시료를 멤브레인 필터(FH-0.2 μm, Waters, Milford, MA, USA)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

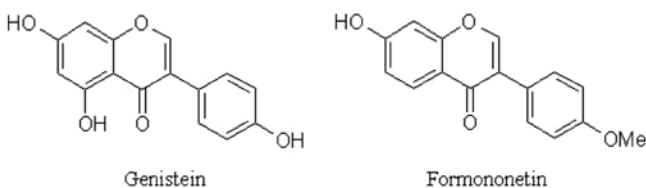


Fig. 1. Chemical structure of genistein and formononetin in *Sophora flavescens* Aiton.

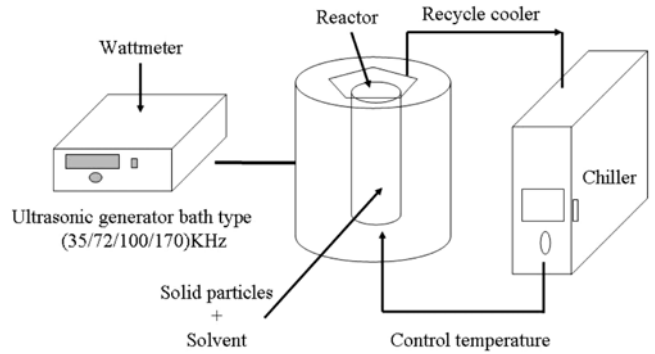


Fig. 2. Experimental device for solid-liquid extraction with ultrasound.

2-3. 초음파 시스템

연구에 사용된 초음파추출시스템은 bath 형이며, 관통형 4주파 초음파 발생 장치로서(220 V, Reactor: 1 L, Mirae Ultrasonic Tech. Co. Korea)이며, (Model No: Flexonic-500/100, 규격 W 382 × L 450 × H 150 mm)의 (Frequency 35, 72, 170 KHz, Intensity max 300 Watt ± 2)로 상부와 하부에 온도 조절을 위한 밸브장착 및 chiller를 설치하여 온도를 일정하게 조절할 수 있다. Fig. 2에서는 초음파 추출시스템을 나타내었다.

2-4. 일반성분 분석

고삼의 일반성분은 분석은 식품공전(참고문헌 삽입)의 방법에 따라 분석하였다. 조지방은 식품공전에 기재된 에테르추출법을 이용하여 무수에테르를 용매로 하여 Soxhlet 추출기로 추출하여 정량하였으며, 수분 함량은 105 °C 상압가열건조법, 조단백질은 마이크로 켈달법으로, 조회분은 550 °C 회화법으로 분석하였고, 탄수화물은 전체에서 수분, 조단백질, 조지방, 회분 함량을 제한 값으로 계산하여 표시하였다. 모든 측정은 3회 반복하여 평균값으로 하였다.

2-5. 기기 및 HPLC 분석

HPLC 급 물(99.9%) 100%를 이용하여 추출된 시료를 농축하기 위해서 회전식 증발기(LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co., Japan)를 사용하였다. HPLC 시스템으로는 Agilent 1200(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)으로 ChemStation(Agilent Technologies)이 부착된 HPLC-DAD를 사용하였다. 각각의 고삼추출물 20 μl를 Agilent 1200 HPLC system에 주입하였다. 데이터처리는 Agilent사의 PC에 설치된 Millennium 3.2를 사용하였으며, 분석에 사용된 컬럼은 5 μm인 물질이 충전된 분석용 RP-HPLC의 컬럼(RS-tech OP C₁₈, 4.6×250 mm)의 사용과 유속은 1 ml/min로 고정, 주입부피는 20 μl로 하였다. UV detector는 DAD의 파장범위는 200~400 nm를 하였으며, 크로마토그래피는 254 nm로 나타내었다. 이동상은 이성분계 A: 물/아세트산(99.9/0.1, vol%), B: 아세트나이트릴/아세트산(99.9/0.1, vol%)을 사용하여(80:20~65:35, A:B vol.%)까지 60 min 동안 선형 기울기용매 용출법으로 실험하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 기능성 물질 탐색 및 소재개발의 생산성활용에 적

용하기 위한 고삼에 포함된 식물성에스트로젠(phytoestrogen)인 제니스테인(genistein) 및 포르모노네틴(formononetin)을 초음파에너지 변화와 추출시간 변화에 따른 추출량을 실험적으로 고찰하였으며, 역상 HPLC로 분석하여 크로마토그램의 각 피크의 면적(mV×sec)을 통해 추출된 유용성분의 추출량을 계산하였다. 제니스테인 및 포르모노네틴의 피크는 표준 시료와의 체류시간을 비교하였고 침적과 초음파 추출에서의 일반성분을 확인하였다. 이 실험조건에서 제니스테인 및 포르모노네틴의 체류시간은 각각 32, 47 min이었다. 고삼에서의 제니스테인 및 포르모노네틴을 추출하기 위하여 침적추출 온도(25 °C)와 초음파에너지(35, 72, 170 KHz, 300 Watt ± 2)를 각각 적용하였으며, 추출 온도는 반응기내 물을 chiller을 통해 순환시켜(25 °C, ±1)를 고정하였고 추출시간은(30, 60 min)으로 각각 적용하였다. 초음파 에너지 변화에 따른 고삼 추출물에서의 조단백질, 조지방, 조회분, 탄수화물의 일반성분 함량을 Table 1에 나타내었다. 일반성분을 비교해 보면 탄수화물을 제외한 나머지 성분들의 함량은 거의 비슷하게 확인되었고, 조단백질(0.104~0.109%)은 침적 > 170 KHz > 72 KHz > 35 KHz 순으로, 조지방(0.038~0.049%)은 35 KHz > 72 KHz > 170 KHz > 침적 순으로, 조회분(0.006~0.018%)은 170 KHz > 침적 > 72 KHz > 35 KHz 순으로 그리고 탄수화물(0.255~0.413%)은 35 KHz > 170 KHz > 72 KHz > 침적순으로 측정되었다. 또한 전처리한 고삼 추출물을 HPLC를 사용하여 제니스테인 및 포르모노네틴을 분석용 컬럼을 사용하여 이동상 1 ml/min, 주입부피 20 µl, 254 nm의 실험조건에서 분석하여 실험적으로 확인하였다. Table 2에서 나타낸 바와 같이 초음파 에너지 변화에 따른 제니스테인의 추출 영향은 추출시간 30 min에서는 170 KHz(175.716) > 72 KHz(153.138) > 35 KHz(150.823) 순으로 60 min에서는 170 KHz(192.476) > 72 KHz(160.635) > 35 KHz(149.650) 순으로 추출되었

다. 하지만 침적에서는 30, 60 min에서 각각(167.842)과 (181.800)으로 35 KHz, 72 KHz보다 미미한 정도의 높은 추출효율을 보였다. 또한 포르모노네틴은 추출시간 30 min에서는 170 KHz(430.131) > 침적(427.961) > 72 KHz(395.744) > 35 KHz(345.440) 순으로 60 min에서는 170 KHz(477.232) > 침적(461.969) > 72 KHz(407.349) > 35 KHz(379.070) 순으로 추출되어 추출효율이 높았다. 일반적으로 저주파의 강한 케비테이션의 영향에 따라 짧은 시간 동안에 높은 추출 효율을 보여주는 천연물 추출의 패턴과 다르게[9, 12]. 고삼에서는 에너지 세기가 저주파에서 고주파로 증가시 추출 효율은 증가하고 추출 시간의 영향은 침적과 비교해볼 때 미미한 것으로 판단되어진다. 또한 시료의 조직에 따라 파장의 침투력이 추출효과를 결정짓는 변수중 하나라 사료된다. 초음파의 추출 영향은 초음파 에너지가 증가하면 액의 분자간 응집력이 파괴되고 미세한 케비테이션(기포가 생성되는 현상)인 공동(cavity)이 발생되며[10], 이러한 충격파에 의해서 단시간 내에 물질의 내부까지 강력한 에너지가 전파되며 추출되어 진다[11-13].

Fig. 3에서는 초음파 에너지 35, 72, 170 KHz, 60 min에서 추출한 크로마토그램을 보여주고 있다. 고삼의 추출물은 낮은 Intensity의 크로마토그램을 보이고 있다. 추출시간 60 min에서의 추출량은 피크면적(mV×sec)에 의한 제니스테인(192.476)과 포르모노네틴(477.232)이 추출되었고 전체 추출량이 3.17 g으로 높았으며 가장 효과적임을 알 수 있었고 이러한 실험은 사실을 실험적으로 입증하는 기초 자료를 제공할 수 있었다. 또한 기존의 여러 연구에서 고삼에는 식물성에스트로젠인 제니스테인 및 포르모노네틴이 미량 존재하는 것으로 보고되고 있다[8]. 일반적으로 추출 시간이 길고 에너지의 세기가 강해지면 유용성분의 구조들이 쉽게 분해(파괴)되어 목적인 유효성분이 일정부분 증가 또는 급격히 감소되는 경우가 많이

Table 1. General composition content of *Sophora flavescens* Aiton

(unit : %, ±1)

Method (KHz)	Time (min)	Composition (%)			
		Crude protein	Crude fat	Crude ash	Carbohydrate
35	60	0.104	0.049	0.006	0.405
72	60	0.105	0.046	0.009	0.413
170	60	0.107	0.042	0.018	0.408
Dipping	60	0.109	0.038	0.010	0.255

Table 2. Total extraction amount in *Sophora flavescens* Aiton by HPLC

Method	Time (min)	Compounds	Retention time (min)	Peak area (mV×sec)	Peak area (%)	Total Amount (g)
35 KHz	30	Genistein	32.68	150.82	0.48	2.62
		Formononetin	47.11	345.44	1.19	
	60	Genistein	32.70	149.65	0.45	2.86
		Formononetin	47.13	379.07	1.14	
72 KHz	30	Genistein	32.70	153.14	0.47	2.77
		Formononetin	47.10	395.75	1.21	
	60	Genistein	32.68	160.64	0.47	2.92
		Formononetin	47.08	407.35	1.19	
170 KHz	30	Genistein	32.59	175.72	0.53	2.91
		Formononetin	47.02	430.13	1.29	
	60	Genistein	32.68	192.48	0.58	3.17
		Formononetin	47.10	477.23	1.43	
Dipping (room temp)	30	Genistein	32.63	167.84	0.48	2.28
		Formononetin	47.02	427.96	1.23	
	60	Genistein	32.73	181.80	0.51	2.53
		Formononetin	47.09	461.97	1.29	

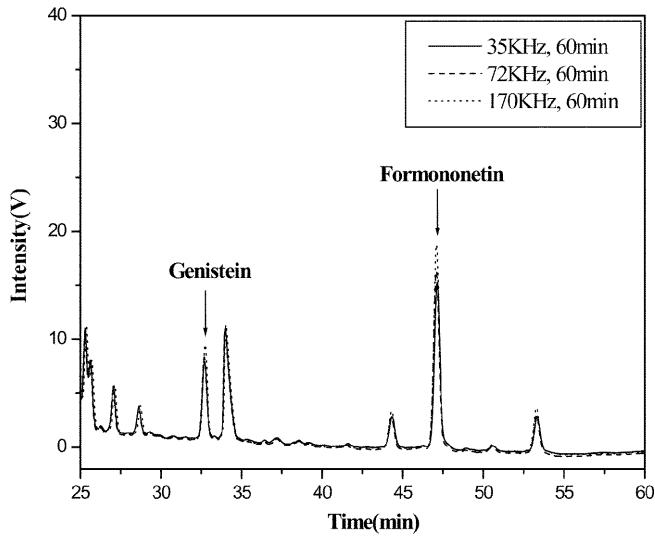


Fig. 3. Analysis of genistein and formononetin in *Sophora flavescens Aiton* by RP-HPLC (mobile phase A: Water 99.0 vol% + AA 0.1 vol%, B: ACN 99.0 vol% + AA 0.1vol%, gradient elution B: 20-35, run time: 60 min, flow rate : 1 ml/min, injection volume : 20 μ l, wavelength : 254 nm).

보고되고 있다[14]. 따라서 실제적인 천연물 추출공정에서도 유용성분의 초음파 추출은 많은 실험을 통하여 확인해야 할 것이며, Ferquency(KHz)와 Intensity(Watt)의 조절, 시간(min)과 온도($^{\circ}$ C) 그리고 시료의 형태에 따라 추출 효율 및 유용성분의 영향은 다양한 변수에 의하여 편차가 클 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 수행되어진 고삼의 추출가공 연구는 식품 및 소재 개발시 기초자료로 이용될 수 있으며 기능성소재 연구에 충분한 가치가 있다고 판단된다.

4. 결 론

고삼으로부터 식물성에스트로젠인 제니스테인 및 포르모노네틴을 효율적으로 얻기 위한 추출 방법으로 침적 및 초음파 에너지의 주파수(35, 72, 170 KHz)와 추출 시간(30, 60 min)의 변화에 따라 추출효율과 일반성분을 비교 확인하였다. 전 처리한 추출액에 포함된 고삼을 이동상 이성분계 A: 물/아세트산(99.9/0.1, vol%), B: 아세톤/나이트릴/아세트산(99.9/0.1, vol%)을 사용하여(80:20~65:35, A:B vol.%)까지 60 min 동안 선형 기울기용매 용출법으로 분석하고 추출조건을 실험적으로 모색하였다. 위 연구결과에 의하면 천연물 추출공정에서도 유용성분의 초음파 추출은 많은 실험을 통하여 확인해야 할 것이며, Ferquency(KHz)와 Intensity(Watt)의 조절, 시간(min)과 온도($^{\circ}$ C) 그리고 시료의 형태에 따라 추출 효율 및 유용성분의 영향은 편차가 클 것으로 사료된다. 실험 결과 일반성분으로 조단백(0.104~0.109%), 조지방(0.038~0.049%), 조회분(0.009~0.018%) 이 함유됨을 확인할 수 있고, 탄수화물(0.255~0.413%)을 제외한 나머지 성분들의 함량은 거의 비슷하게 확인되었다. 또한 주파수 170 KHz, 60 min에서 제니스테인 0.574%, 포르모노네틴 1.425%과 추출량이 3.17 g으로 추출 효율이 가장 우수하였고, 고삼의 추출가공 연구시 기초자료로 충분한 가치가 있다고 판단된다.

감 사

본 연구는 한국과학기술연구원 KIST 강릉분원 천연물소재연구센터와 강원대학교 화학공학연구소에서 수행하였으며, 감사드립니다.

참고문헌

- Ling, J., Zhanf, G. Y., Cui, Z. J. and Zhang, C. K., "Supercritical Fluid Extraction of Quinolizidine Alkaloids from *Sophora Flavescens Ait.* and Purification by High-speed Counter-current Chromatography," *J. Chromatography A*, **1145**(1-2), 123-127(2007).
- Kim, J. S., Kang, S. S. and Won, D. H., "Isolation and Quantitative Determination of Matrine from *Sophorae Radix*," *Kor. J. Pharmacogn.*, **31**(4), 421-425(2000).
- Zhang, L., Xu, L., Xiao, S. S., Liao, Q. F., Li, Q., Ling, J., Chen, X. H. and Bi, K. S., "Charaterization of Flavonoids in the Extract of *Sophora Flavescens Ait.* By High-performance Liquid Chromatography Couple with Diode-array Detector and Electrospray Ionization Mass Spectrometry," *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, **44**(5), 1019-1028(2007).
- Ding, P. L., Liao, Z. X., Huang, H., Zhou, P. and Chen, D. F., "(+)-12 α -Hydroxysophocarpine, A New Quinolizidine Alkaloid and Related Anti-hbv Alkaloids From *Sophora Flavescens*," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **16**(5), 1231-1235(2006).
- Murakoshi, I., Kidoguchi, E., Haginiwa, J. and Ohmiya, S., "Isokuraramine and (-)-7,11-dehydromatrine, Lupin Alkaloids from Flowers of *Sophora Flavescens*," *Phytochemistry.*, **21**(9), 2379-2384(1982).
- Chen, X., Yi, C., Yang, X. and Wng, X., "Liquid Chromatography of Active Principles in *Sophora Flavescens Root*," *J. Chromatography B*, **812**(1-2), 149-163(2004).
- Ha, H., Lee, Y. S., Lee, J. H., Choi, H. and Kim, C., "High Performance Liquid Chromatography Analysis of Isoflavones in Medicinal Herbe," *Arch Pharm Res.*, **29**(1), 96-101(2006).
- Patent: http://www.kipris.or.kr/new_kipris/index.jsp. No 10-2000-0073825, Extract of *Sophorae Radix* for the prevention and treatment of osteoporosis., (2000).
- Lee, K. J. and Um B. H., "Extraction of Useful Component from Natural Plants Using Ultrasound System," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **23**(2), 101-108(2008).
- Vinatoru, M., "An Overview of the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles From Herbs," *Ultrasonics Sonochemistry.*, **8**(3), 303-313(2001).
- Alexei, M., Christian, G. and Bertrand, D., "Ultrasonic Cavitation in Thin Liquid Layers," *Ultrasonics Sonochemistry.*, **12**(6), 415-422(2005).
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D., "Applications and Opportunities for Ultrasound Assisted Extraction in the Food Industry," *Innovative Food Science & Emerging Technologies.*, **9**(2), 161-169(2007).
- Korea Food and Drug Administration. Food code, *Korean Food Industry Association*, Seoul (2008).
- Lee, K. J. and Um, B. H., Extraction of Useful component from Natural plants using Ultrasound system, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **23**(2), 101-108(2008).