

人蔘의 抗酸化 成分에 關한 研究

金萬旭 · 崔康注 · 曹榮鉉 · 洪淳根

高麗人蔘研究所

(1980년 7월 25일 수리)

Study on the Components of the Anti-oxidant Activity of *Panax Ginseng*

Man Wook Kim, Kang Ju Choi, Yung Hyun Cho and Soon Keun Hong

Korea Ginseng Research Institute, Seoul, Korea.

Abstract

The anti-oxidant components in *Panax ginseng*, which were known to have anti-aging effect, were fractionated by various solvents and then isolated by the preparative thin layer chromatography. A developing system with silicagel G using toluene-chloroform-actene (20 : 13 : 13) as mobile phase was applied. The components were investigated the anti-oxidant activity by α , α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) at 517nm. Two effective components were obtained from red ginseng and were indophenol reducing substances.

緒 論

민간경험에 의한 人蔘의 効能은 不老長生, 補血 強壯 및 強精으로 나타나고 있는데 이것은 老化抑制의 効력을 암시해 주고 있다.

生體膜을 형성하는 脂質층에 많은 불포화지방산이 산화변성을 일으켜 생성된 過酸化脂質이 생체막의 구조변화와 그에 따르는 機能變化,¹⁾細胞의 老化^{2,3)}, 動脈硬化⁴⁾, 肝疾患⁵⁾ 및 생체의 抵抗性 減少등을 초래한다. 이러한 과산화지질에 의한 生體異常에 대해 토코페롤, 시스테인등을 투여하면 급격한 脂質過酸化 및 老化가 억제된다고 알려져 있다^{2,6)}.

한편 過콜레스테롤血症에 대해 인삼을 투여하면 動脈硬化와 비슷한 변화나 肝組織에 脂肪沈着 등 病態現像이 감소되며⁷⁻¹⁰⁾ 인삼엑기스가 방사선에 대한 방어효과¹¹⁾가 있다고 보고되어 있다. Han¹²⁾ 등은 水蔘, 紅蔘의 메타놀엑기스가 급성알콜중독

에 의해 생기는 간세포막의 과산화지질을 제거한다고 보고하였다.

이러한 인삼의 藥理効能이 인삼성분의 抗酸化活性物質에 기인한 것으로 저자들은 홍삼 및 백삼에서 항산화활성물질을 검색하고 홍삼의 메타놀엑기스중에서 강력한 활성을 가진 두 물질을 분리하여 indophenol 還元物質임을 확인하였으므로 보고코자 한다.

材料 및 方法

1. 材料

고려인삼장에서 공급받은 6년근紅蔘과 水蔘을 일광건조시켜 만든 白蔘을 시료로 사용하였다.

2. 使用試藥 및 機器

1) 추출용메타놀: 공업용메타놀을 재증류하여 사용하였다.

2) α , α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl(略 DPPH) 溶液¹³⁾: DPPH시약 약 16mg을 에타놀 100ml에

녹이고 적당량의 물로 희석하여 이를 DPPH용액으로 하였다. 이때 가한 물의 용량은 일정량의 DPPH용액과 동량의 盲檢液(blank solution)을 가해 20초간 진탕한 후 517nm에서 吸光度가 0.96이 되도록 하였다.

3) 20% tungstophosphoric acid溶液 : 알콜용액을 사용하였다.

4) 3% ferric chloride溶液 : FeCl₃ 3g을 0.1N 염산 50ml에 녹이고 물을 가해 100ml로 하였다.

5) indophenol溶液 : 2,6-dichlorophenolindophenol sodium염 약 50mg을 에타놀 100ml에 녹여 사용하였다.

본 실험에 쓰인 다른 모든 시약은 市販 特級試藥을 그대로 사용하였다.

6) UV spectrometer는 Shimadzu UV-200s를 썼으며, 高速液體 크로마토그래피(略HPLC)는 Waters Model 440을 사용하였다.

3. 抗酸化 活性物質의 抽出

홍삼 및 백삼 각 3kg을 50°C에서 60%메타놀 9/석으로 3회 추출하고 이를 窒素氣流下에서 농축하였다. Hong¹³⁾ 등은 인삼의 메타놀엑기스를 물과 에테르로 分配시킨 후 水層에 강력한 脂質過酸化 抑制 活性物質이 있음을 확인하였으며 Han¹²⁾ 등은 페놀성 분획에 抗酸化 活性이 있다고 보고하였다. 이에 따라서 백삼 및 홍삼의 메타놀엑기스를 Fig. 1과 같이 분획하고 초산에침출을 fr. 1, 페놀성분획을 fr. 2라 명명하였다. fr. 1과 fr. 2의

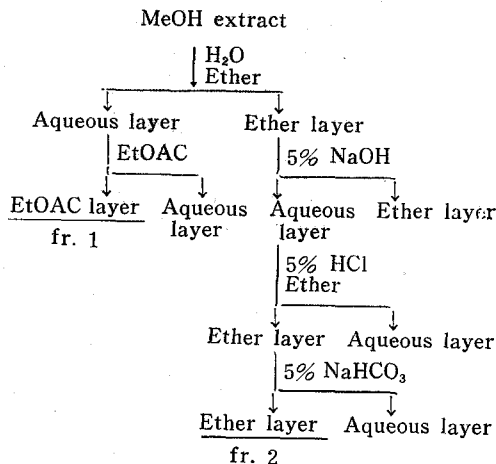


Fig. 1. Fractionation of MeOH extract of Panax ginseng.

收得率은 Table 1과 같고, 이의 최종액의 容量을 25ml로 하여 窒素를 充塡시켜 冷暗所에 보관하였다. fr. 2의 UV spectrum은 λ_{max} 272nm였으며,

Table 1. The yield(%) of fr. 1 and fr. 2 from red and white ginsengs.

	fr. 1	fr. 2
Red ginseng	0.521	0.032
White ginseng	0.497	0.028

NaOH alkali로 처리하면 λ_{max} 327nm로 red shift가 일어나 페놀성 물질이 함유되어 있음이 확인되었다.

4. 抗酸化 活性物質의 檢索 및 分離

平井^{2), 15), 16)}은 rat 뇌의 非蛋白質性 SH基 또는 非蛋白質分劃에 있어서 DPPH反應物質, 즉 抗酸化 活性物質은 老化에 따라 감소된다고 보고하였다. 본 실험에서는 *in vitro*에서 DPPH시약에 의해 인삼 중 抗酸化 活性物質을 검색하였다.

홍삼 및 백삼의 fr. 1과 fr. 2를 冷暗所에서 수일간 방치하여 생성되는 沈澱物을 원심분리하여 제거한 上澄液을 각각 2ml씩 취하여 DPPH용액 2ml

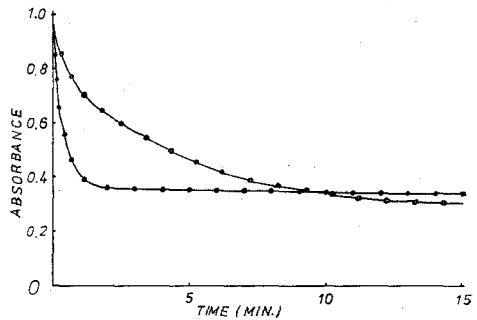


Fig. 2. Changes in DPPH absorbance at 517nm with reaction time between DPPH and fr. 1.

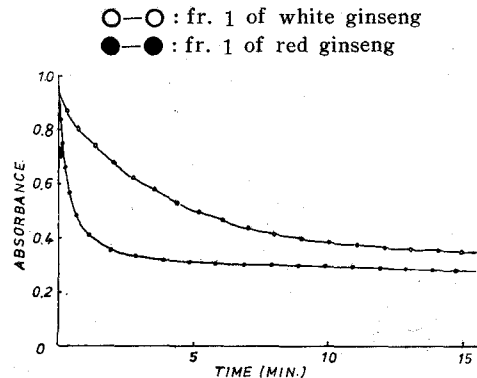


Fig. 3. Changes in DPPH absorbance at 517nm with reaction time between DPPH and fr. 2.

○—○ : fr. 2 of white ginseng
●—● : fr. 2 of red ginseng

를 가하고 20초간 진탕한 후 517nm에서 시간에 따른 흡광도 감소를 抗酸化 活性으로 측정하였다 (Fig. 2 및 Fig. 3).

Fig. 2 및 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 홍삼분획이 백삼분획보다 활성이 강했다. 특히 홍삼의 fr. 1과 DPPH용액의 반응이 1~2분을 경과하면서 거의 완료되는 速効性으로 이는 홍삼의 fr. 1 중에 강력한 抗酸化 活性物質이 있음을 보여주고 있다.

Fig. 4와 Fig. 5는 홍삼과 백삼의 fr. 1 및 fr. 2를 컬럼을 μ Bondapak C₁₈으로 하고 물-초산 (95 : 5)로 展開시킨 HPLC chromatogram이다.

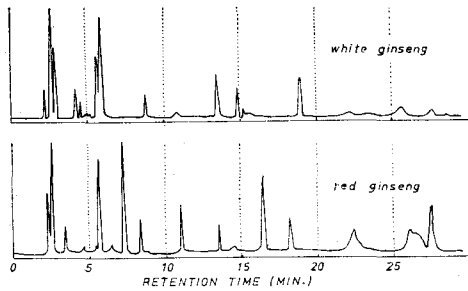


Fig. 4. Liquid chromatograms of fr. 1. column; μ Bondapak C₁₈, solvent; water-acetic acid(95 : 5) flow rate; 1.5ml/min., detector; UV 254nm

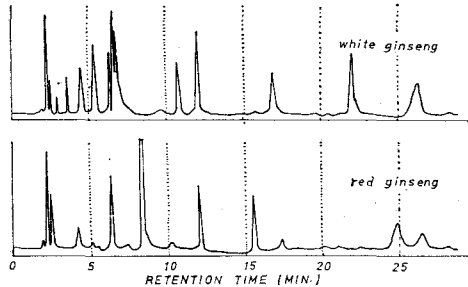


Fig. 5. Liquid chromatograms of fr. 2. column; μ Bondapak C₁₈, solvent; water-acetic acid(95 : 5) flow rate; 1.5ml/min., detector; UV 254nm

抗酸化 活性物質을 검출하는데 2,6-dichloroquinonechlorimide¹⁷⁾, molybdophosphoric acid^{18,19)}, tungstophosphoric acid²⁰⁾, ferric chloride^{21,22)} 등 여러가지 시약이 사용된다. 본 실험에서는 fr. 1과 fr. 2를 silicagel로 직접 薄層크로마토그래피(略 TLC)하여 tungstophosphoric acid로 發色되는 물질을 검색하였으며 전개용매로는 toluene-chloro-

form-acetone(20 : 13 : 13)을 사용하였다. (Fig. 6, Fig. 7).

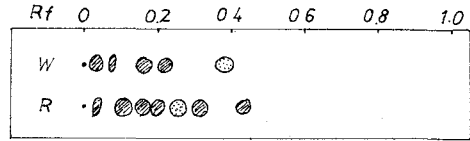


Fig. 6. Thin layer chromatogram of fr. 1
W : white ginseng
R : red ginseng

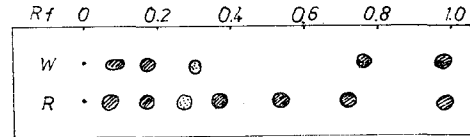


Fig. 7. Thin layer chromatogram of fr. 2
W : white ginseng
R : red ginseng

前述한 바와 같이 홍삼분획에만 존재하는 성분 중 강력한 抗酸化 活性物質이 있는 것으로 추정되어 Fig. 6과 Fig. 7에서 이들을 조사하였다. fr. 1에서는 Rf 0.10, Rf 0.19, Rf 0.31, Rf 0.43, fr. 2에서는 Rf 0.37, Rf 0.54, Rf 0.72에 홍삼에만 존재하는 성분이 검출되었다. 이 물질들이 silicagel GF254에 전개하여 UV254nm에서 모두 검출되는 점을 이용하여 silicagel G254를 써서 preparative TLC에 의해 이 물질들을 捕集하였다. 이때 사용한 TLC plate는 silicagel GF 254(E. Merck제) 30g을 물 60ml에 충분히 현탁시키고 이를 크기 20×20cm²의 plate에 0.25mm의 두께로 입히고 室溫에서 30분간 건조시킨 뒤 105°C에서 1시간동안 活性化시키 제조하였다. 이 plate 3매에 홍삼의 fr. 1 3ml를 streaking하고 同 plate마다 한쪽 끝에 streaking 한 부분과 별도로 fr. 1을 spotting하여 toluene-chloroform-acetone(20 : 13 : 13)으로 2~3중 전개하였다. 이때 tungstophosphoric acid 또는 FeCl₃와 UV lamp(254nm)를 써서 홍삼에만 나타나는 3개의 吸着帶를 굵어 모으고 에타놀-초산에칠(1 : 1) 10ml씩으로 3회 elution시키고 glass filter(TOP No. 4)로 여과하여 窒素氣流로 농축하였다. 이를 재차 plate 1매에 streaking하고 benzene-acetone(40 : 10)으로 전개하여 main band만 굵어 모으고 에타놀-초산에칠(1 : 1)용액 5ml씩으로 3회 elution시키고 3ml로 농축하였다. fr. 2도 같은 방법으로 조작하되 다만 elution용액은 에타놀-에테르(1 : 1)를 사용하였다.

最終液 3ml중 2ml를 취해 DPPH용액 2ml를 가해 517nm에서 10분동안 吸光度의 감소를 측정하여 Table 2에 기록하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 fr. 1의 Rf 0.19인 물질과 fr. 2의 Rf 0.72인 물질이 活性이 컸으며 이를 각각 Spot a,

Table 2. The decrease of DPPH absorbance at 517nm after DPPH reacted on ginseng components for ten minutes.

Component	Decrease of absorbance
fr. 1 Rf 0.10	0.05
Rf 0.19	0.40
Rf 0.31	0.11
Rf 0.43	0.02
fr. 2 Rf 0.37	0.11
Rf 0.54	0.15
Rf 0.72	0.29

spot b라 명명하였다. 이들은 前述한 조건에서 HPLC에 의해 단일 peak로 나타났으며 保持時間은 Spot a가 7분13초, Spot b가 15분3초이었다. spot a와 spot b의 UV spectrum은 Fig. 8 및 Fig. 9와 같고 DPPH용액이 이 물질과 반응하여 흡광도가 감소되는 모형을 Fig. 10에 도시하였다.

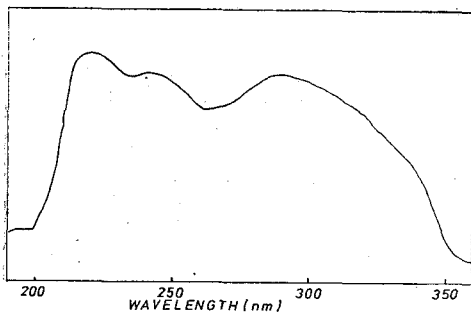


Fig. 8. Ultraviolet absorption spectrum of Spot a.

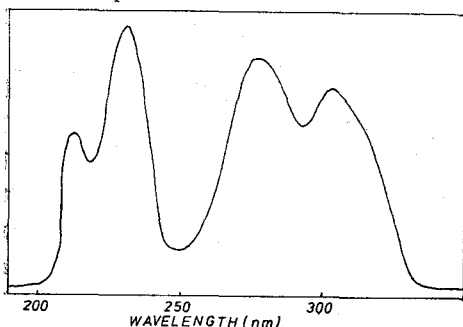


Fig. 9. Ultraviolet absorption spectrum of Spot b.

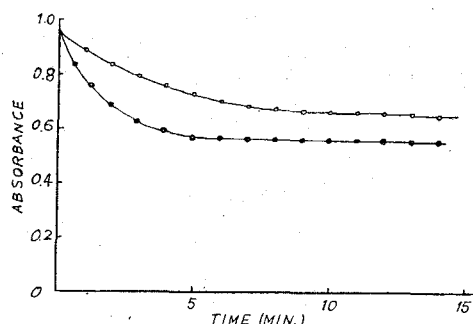


Fig. 10. Changes in DPPH absorbance at 517nm with reaction time between DPPH and spot a, b.

●—● : Spot a ○—○ : Spot b

Spot a와 Spot b 각각 0.5ml씩 취하여 시험관에 넣고 indophenol용액 1ml를 가해 색깔의 변화를 관찰하였다.

fr. 2의 Rf 0.54는 Han¹²⁾ 등이 홍삼에서 분리하여 구조를 밝힌 maltol임을 TLC 및 HPLC에 의해 확인하였다.

結果 및 考察

홍삼과 백삼의 메타놀엑기스의 水溶性物質중 초산에질로 移行되는 分割(fr. 1)과 페놀성分割(fr. 2)에 있어서 홍삼과 백삼에 모두 항산화활성이 있었으나 홍삼 분획에 강하게 나타났다. 이것은 수삼중에 함유된 여러가지 성분, 특히 아미노산과 탄수화물등의 加熱反應에 의해 생성된 물질^{23,24)}들이 抗酸化 活性을 가지기 때문으로 생각된다. 홍삼의 fr. 1과 fr. 2는 Fig. 2와 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 활성이 거의 비슷하나 fr. 1이 fr. 2에 비해 1ml當 重量이 훨씬 적어 fr. 1이 fr. 2보다 比活性(specific activity)이 크다. 백삼에 있어서도 fr. 1이 fr. 2보다 比活性이 크다.

홍삼에서 분리한 Spot a와 Spot b는 Fig. 2, Fig. 3 및 Fig. 10에서 보는 바와 같이 홍삼이 抗酸化 活性을 갖게 하는 主要原因 物質임을 알 수 있다. Spot a는 indophenol용액의 藍色을 脫色시켰고, Spot b는 微紅色으로 변색되어 이들은 indophenol 환원물질임이 판명되었으며 Spot b는 phenolic acid로 추정된다.

要 約

홍삼 및 백삼에서 溶媒抽出法에 의해 fr. 1과 fr. 2를 분리하여 양자의 差異點을 몇가지 観点에서 조사하고 홍삼에서 강하게 나타나는 抗酸化 活性

物質을 單離하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1. fr. 1과 fr. 2에서의 抗酸化 活性은 공히 紅 蔘 分割이 白蔘 分割보다 강했다.

2. 홍삼의 fr. 2에 비해 fr. 1이 比活性이 훨씬 강했다.

3. 홍삼의 fr. 1에서 單離한 Spot a는 강력한 항산화 활성을 가졌으므로 indophenol용액을 脫色 시켰다.

4. 홍삼의 fr. 2에서 單離한 Spot b도 抗酸化 活性物質로서 남색의 indophenol용액을 홍색으로 變色시켰다.

5. 인삼제품으로부터 fr. 1과 fr. 2를 분리하여 TLC 또는 HPLC에 의해 그 패턴을 조사하며 原料蔘이 홍삼인지 백삼인지 識別할 수 있는 指標로 활용할 수 있을 것이다.

參 考 文 獻

1. Artman, N.R.: In 'Advances in Lipid Research,' Vol. 7, Academic Press, N.Y.(1969)
2. 平井俊策 : 日本臨床, 32(1) : 8(1974)
3. 坂本信夫 : 過酸化脂質の問題點, p. 43, 東京田邊製藥編
4. Aoyama, S. and Iwasaki, M.: Japan Heart J. 6 : 128(1968)
5. Masugi, F. and Nakamura, T.: Int'l J. Vit. Nut. Res., 46 : 187(1976)
6. Thomann, H. and Tilling, W.: Klin. Wschr., 40 : 109(1962)
7. 이기녕, 오진섭, 성낙응, 홍사약, 김정진 : 서울大學校논문집(C), 15 : 26(1964)
8. 최택규, 홍사약 : 大韓藥理學雜誌, 4 : 17(1968)
9. 권영소, 오진섭 : 大韓藥理學雜誌, 5 : 1(1969)
10. 박종완 : 中央醫學, 17 : 41(1969)
11. 武田篤彦, 米澤司郎, 加藤智雄 : Radioisotope, 27(11) : 666(1978)
12. Han, B.H., Park, M.H., and Woo, L.K.: Proceedings of the 2nd Int'l Ginseng Symposium, p.13, Korea Ginseng Research Institute, Seoul(1978)
13. 洪淳根, 韓龍男, 崔英淑 : 人蔘研究報告, 1 : 369(1979)
14. Blois, M.S.: Nature(London), 181 : 1199(1958)
15. 平井俊策 : 日老醫誌, 5 : 45(1968)
16. Yoshikawa, M. and Hirai, S.: J. Gerontol., 22 : 162(1967)
17. Sahasrabudhe, M.R.: J. Ass. Off. Chem., 47 : 888(1964)
18. Kritchevsky, D., and Kirk, M.C.: Arch. Biochem. Biophys., 35 : 346(1952)
19. Seher, A.: Fetteu. Seifen Anstrichmitte, 61 : 345(1959)
20. Martin, H.P.: Biochim. et Biophys. Acta, 25 : 408(1957)
21. Han, B.H. and Park, M.H.: Kor. J. Pharmacy., 9(4), 169(1978)
22. Wagner, H., Hoerhammer, L. and Nufer, H.: Arzneimittel-Forsch, 15 : 453(1965)
23. Kato, H. et al.: J. Food Science, 33 : 445(1968)
24. Koehler, P.E.: J. Agr. Food Chem., 17 : 395(1969)