

## 인삼중의 항산화물질에 관한 연구

제 1 보 : 인삼의 각종 용매 추출물의 항산화작용

백 태홍 · 홍 정태 · 홍 순영

한양대학교 화학과

(1982년 2월 2일 수리)

## Studies on the Antioxygenic Substances in *Panax ginseng* Roots

### I. The Antioxidative Action of Various Solvent Extracts of *Panax ginseng* Roots

Tai Hong Paik, Jeong Tai Hong and Soon Yoog Hong

Department of Chemistry, Hanyang University, Seoul 133

(Received February 2, 1982)

#### Abstract

The antioxidative action of petroleum ether, chloroform, chloroform-methanol (2:1, v/v), methanol and methanol-water extracts of *Panax ginseng* roots in the autoxidation of mixed methyl esters of unsaturated fatty acids (MEUFA) was investigated *in vitro*.

All of the extracts of *Panax ginseng* roots possessed antioxidative activity and inhibited the formation of hydroperoxides in the autoxidation of mixed methyl esters of unsaturated fatty acids (MEUEA). The induction period in the autoxidation of MEUFA was extended by the addition of each extract. The antioxidative activity was more prominent with chloroform and chloroform-methanol (2:1, v/v) extracts than with other extracts. The antioxidative activity of each extract estimated by Olcott's oven test and the measurement of peroxide value (POV) showed a similar tendency. From the results obtained, it was concluded that extracts of *Panax ginseng* roots had remarkable antioxidative activity in the autoxidation of MEUFA *in vitro*.

#### 서 론

인삼의 각종 성분에 대한 생화학적 및 약리학적 작용에 관하여는 현재 많은 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 사포닌(saponin)은 유효성분으로서 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있다.

최근에 이르러서는 사포닌 이외에도 항암작용이 있는 것으로 알려진 석유에테르(petroleum ether) 추출물, insulin과 같은 작용을 갖는 펩티드(peptide), 케놀계 항산화성 물질들이 인삼에서 추출된 것으로 보고되고 있어서 인삼 사포닌과 더불어 유효 성분으로서 크게 기대된다. 특히 한 등<sup>(1)</sup>은 인삼에서  $\gamma$ -pyrone 유도체를 추출하여 이것이 *in vivo*에서 항산화 작용을 나타

덤으로서 인삼은 노화방지에 효능이 있으리라고 보고한바 있으며 또한 한 등<sup>(2)</sup>은 인삼의 부단을 추출물이 노화 억제작용효과가 현저하며 인삼 사포닌은 superoxide desmutase의 활성을 *in vitro*에서 증가시켰다고 한다. 그리고李<sup>(3)</sup>는 인삼의 에탄올 및 에틸에테르 추출물에 항산화작용이 있다고 하였으며 金 등<sup>(4)</sup>은 홍삼이 백삼에 비하여 항산화작용이 강하다고 보고하였다. 한편 崔 등<sup>(5)</sup>과 吳 등<sup>(6)</sup>은 수삼과 홍삼의 수용성 추출물의 감색화반응과 반응생성물의 항산화작용을 보고한바 있다.

그러나 인삼의 항산화물질의 본태를 파악하기에는 아직도 많은 연구가 기대된다.

저자들은 인삼의 각종 용매 추출물중의 항산화물질의 존재와 항산화정도를 검토하기 위하여 인삼의 각종 추출물들이 혼합 불포화지방산 메틸에스테르(MEUF A)의 자동산화에 미치는 영향을 *in vitro*에서 실험하기에 보고한다.

재료 및 방법

인삼의 추출 금산산 백삼(6년근, 시판) 분말 100 g을 환류병각기를 부착한 500 ml의 둥근바닥 플라스크 내에서 Fig. 1과 같이 석유에테르, 에틸에테르, 클로로포름, 클로로포름-메탄올(2 : 1, v/v), 무수메탄올, 메탄올-물(1 : 1, v/v), 물 순으로 40°C에서 3시간씩 3회 반복하여 추출하였다. 즉 처음에는 석유에테르 300 ml를 가하여 40°C에서 3시간 추출하여 여과하고 잔사를 다시 석유에테르 300 ml씩을 가하여 2회 반복 추출하였다. 석유에테르 가용성 물질을 제거한 잔사는 계속하여 상기한 각 용매를 사용하여 위와 같은 방법으로 추출하였다. 각 추출물들은 40~90°C에서 감압 농축하고, 진공하에서 건조하여 시료로 사용하였다.

MEUF A의 제조 수원 근교에서 공채한 해바라기 씨를 망으로 갈아 과피를 벗긴 후 약절구로 분쇄한 해바라기씨 300 g을 취하여 환류병각기를 부착시킨 2 l의 둥근바닥 플라스크에 클로로포름-메탄올(2 : 1, v/v) 용매 1200 ml를 가하여 40°C에서 3시간씩 3회 반복 추출하였다<sup>(7)</sup>. 이 추출물에 400 ml의 메탄올과 720 ml의 물을 가하여 클로로포름-메탄올-물의 부피의 비가 1 : 1 : 0.9(v/v/v)가 되도록 방치한 후 메탄올-물 층과 클로로포름 층을 분리하여 그 중 지질가용성 부분인 클로로포름층을 감압하에서 농축하고, 진공에서 해바라기씨 기름을 얻었다<sup>(8)</sup>.

이것을 다음과 같이 methanolysis시켰다. 즉, 둥근바닥 플라스크에 무수메탄올 65 ml를 넣고 Na금속 0.9 g을 소량씩 가하여 sodium methoxide를 조제하고

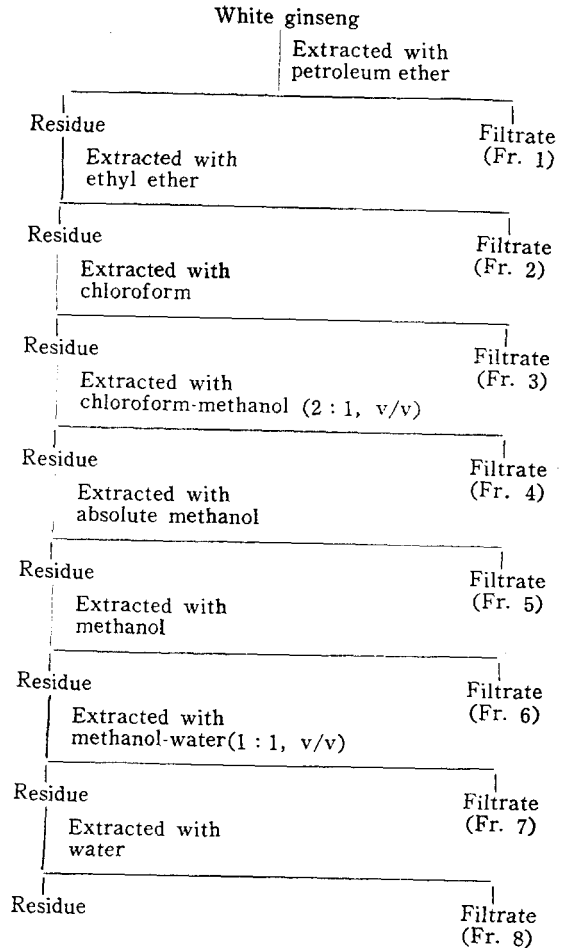


Fig. 1. Extraction of *Panax ginseng* roots

이것을 70°C로 가열한 후 위에서 얻은 해바라기씨 기름 300 g을 가하여 70°C에서 2시간 환류가열하여 methanolysis시켰다. 이것을 3 l의 분별갈대기에서 상층을 분리하고 씻은 물이 맑게 될 때까지 뜨거운 물로 계속하여 세척하였다. 그 후 무수황산나트륨을 적당량 가하여 하루밤 탈수하고 여과한 후 2 mmHg에서 진공 증류하여 180~216°C의 분획물을 얻어 혼합 불포화지방산 methyl ester(MEUF A)를 제조하였다<sup>(9)</sup>(Fig. 2).

얇은막 크로마토그래피 Siliea gel G(type 60, Merck) 5 g에 물 12 ml를 가하여 분산시켜 micro slide (가로 2.5 cm, 세로 7.5 cm)에 일정한 두께로 발라 얇은막 판을 만들고 이것을 110°C에서 1시간 활성화시킨 후 메시케이터안에서 냉각시켜 사용하였다. 전개액으로는 클로로포름-메탄올-물(65 : 40 : 9, v/v/v)과 석유에테르-에틸에테르-1% 아세트산 (74 : 15 : 1, v/v/v)을 사용하였고, 검출시약으로는 5% 황산에탄올 용액을 분무하여 가열 탄화시켜 검출하였다<sup>(10)</sup>(Fig. 3).

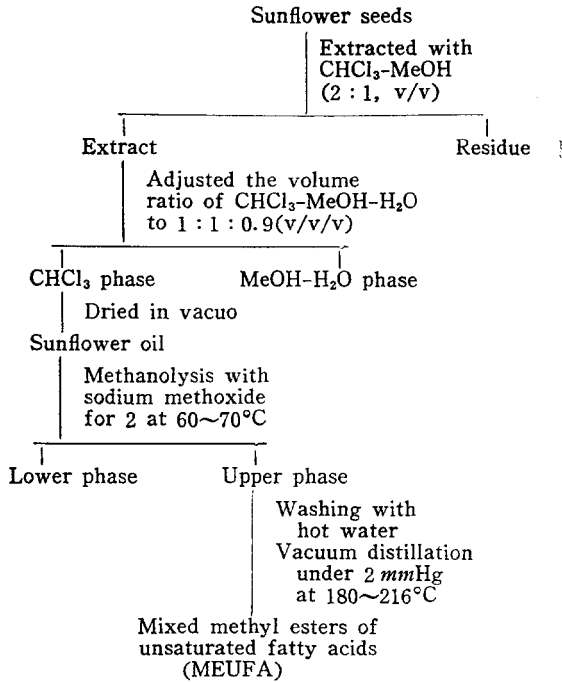


Fig. 2. Preparation of mixed methyl esters of unsaturated fatty acids from sunflower seeds (MEUFA)

각 추출물의 항산화성 측정

가. 시료의 조제

시료는 Marcuse<sup>(11)</sup>의 방법을 참고로 하여 다음과 같이 조제하였다. MEUFA를 10 ml 비이커에 넣고 여기에 인삼의 석유에테르, 클로로포름, 클로로포름-메탄올(2:1%), 메탄올, 메탄올-물(1:1, v/v)의 각 추출물과 물 그리고 유화제로써 Tween 60을 가하여 유화시켰다. 각 추출물들은 최종 농도가 1%가 되도록 첨가하였다. 비교군에는 인삼 추출물을 첨가하지 않고 동일하게 조제하였다.

나. Olcott 등의 oven test에 의한 무게변화의 측정

Olcott 등<sup>(12)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 앞의 가.에서 조제한 각 시료 1 g을 10 ml 비이커에 넣고, 각 비이커의 무게를 ±0.1 mg까지 정확히 측정한 후 46±1°C의 항온기 내에서 항온 처리하여 산소 흡수에 의한 무게의 증가를 24시간 간격으로 ±0.1 mg까지 정확히 16일간 매일 측정하였다. 무게를 측정할 때마다 항온기에서 꺼낸 비이커는 데시케이터 내에서 15분간 실온으로 냉각시킨 후 10분 이내에 무게를 측정하였다.

다. Lea법에 의한 POV의 측정

앞의 가.에서 조제한 시료를 oven test 때와 같이 처리하여 Lea법<sup>(13,14)</sup>에 의하여 POV를 측정하였다. 즉 250 ml의 마개 달린 삼각플라스크에 시료 0.1~1 g을

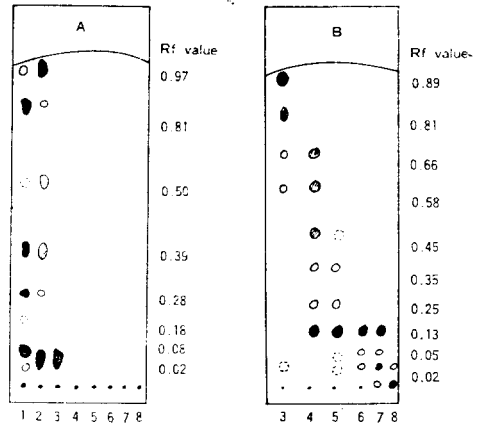


Fig. 3. Thin layer chromatograms of ginseng extracts

Absorbent: Silica gel G  
Indicator: Charring with 5%-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ethanol solution

Solvents:

- A. Petroleum ether-ethyl ether-1% acetic acid(74 : 15 : 1, v/v/v)
- B. Chloroform-methanol-water (65 : 40 : 9, v/v/v)

Fractions:

- 1. Petroleum-ether extract; 2. Ethyl ether extract; 3. Chloroform extract; 4. Chloroform-methanol(2 : 1, v/v) extract; 5. Absolute methanol extract; 6. Methanol extract; 7. Methanol-water (1 : 1, v/v) extract; 8. Water extract

정확히 달아 넣고 클로로포름 10 ml를 가하여 조용히 흔들어 시료를 녹이고 여기에 15 ml의 빙초산과 포화 KI용액 1 ml를 가하여 1분간 흔들어 혼합한 후 어두운 곳에 방치한다. 그후 75 ml의 증류수를 가하고 심하게 흔들어 섞은 후 1% 녹말용액을 지시약으로 하여 0.01 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 용액으로 적정하여 무색이 되었을 때를 종말점으로 하였다.

라. Rhodan철법에 의한 POV 측정

를 9.45 ml와 MEUFA 0.15 ml, Tween 60 0.2 ml에 인삼의 석유에테르, 클로로포름, 클로로포름-메탄올(2:1, v/v) 및 메탄올 추출물을 최종농도가 1% 되도록 첨가하여 유화시켰다.

상기 시료를 각 1 g 취하여 10 ml의 비이커에 넣고 40±1°C의 항온기 속에서 산화시켰다. 각 시료의 나머지 부분은 시험관에 넣어 질소가스로 충전하고 병창고에 보존하여 바탕실험용으로 사용하였다. 생성된 지질 과산화물의 양은 Mitsuda 등의 방법<sup>(15)</sup>에 따라 다음과 같이 측정하였다. 각 비이커를 데시케이터에서 15분간 실온으로 냉각시킨 후 시험관에 시료를 0.1 ml

를 각각 취하여 95% 에탄올 4.7 ml에 녹이고 30% ammonium thiocyanate 용액 0.1 ml, 5% ferrous ammonium sulfate(Mohr 염)의 3.5% HCl용액 0.1 ml를 가하여 혼합하고 3분간 방치하였다가 10초 이내에 분광광도계(Spectronic 20)를 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 각 시료를 135시간 산화시킨 후 Lea법에 의한 POV도 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**각 추출물의 수율과 얇은막 크로마토그래피**

인삼의 각종 용매 추출물들의 수율은 Table 1과 같다. 그 중에서 무수 메탄올 추출물은 6.45%로 가장 수율이 높았으며 전체수율의 20.1%에 달하였다. 그리고

**Table 1. Yield of materials extracted from ginseng roots with various solvents**

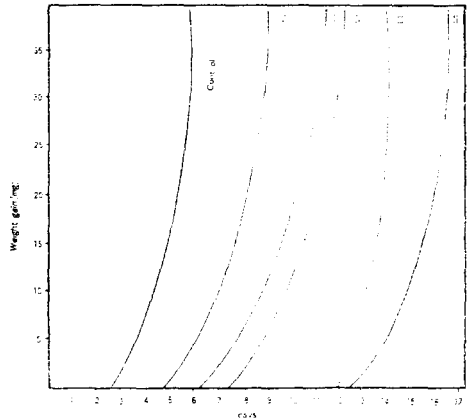
Solvent	Yield (%)
Petroleum ether	1.80
Ethyl ether	0.27
Chloroform	0.61
Chloroform-methanol (2 : 1, v/v)	2.86
Absolute methanol	6.45
Methanol	1.15
Methanol-water (1 : 1, v/v)	3.12
Water	3.81

각 추출물의 얇은막 크로마토그래피는 Fig. 3과 같다. 석유에테르, 에틸에테르, 클로로포름 추출물들은 A plate와 같이 지질이 주성분이었으며 특히 에틸에테르와 클로로포름 추출물은 극성지질의 함량이 많았다. 사포닌은 plate B에 나타난바와 같이 클로로포름-메탄올(2 : 1, v/v), 무수메탄올, 메탄올, 메탄올-물(1 : 1, v/v) 추출물에 함유되어 있었으며 물 추출물은 Rf값이 0인 극성물질이었다.

**각 추출물의 항산화작용**

기질인 MEUFA의 자동산화에 따르는 산소 흡수에 의한 무게의 변화를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 인삼의 각종 용매 추출물의 첨가군은 모두 항산화작용을 나타내어 MEUFA만을 사용한 비교군에 비하여 산소 흡수에 의한 무게의 증가가 억제되었고, MEUFA의 자동산화의 유도시간은 연장되었다. 항산화작용의 세기는 클로로포름과 클로로포름-메탄올 추출물이 가장 강하였으며 메탄올-물 추출물은 그 작용이 매우 약하였다.

Oven test에서 나타난 무게의 증가가 MEUFA의 자



**Fig. 4. Change in weight increased by autoxidation of MEUFA emulsions containing one percent of each ginseng extract during incubation at 46°C**

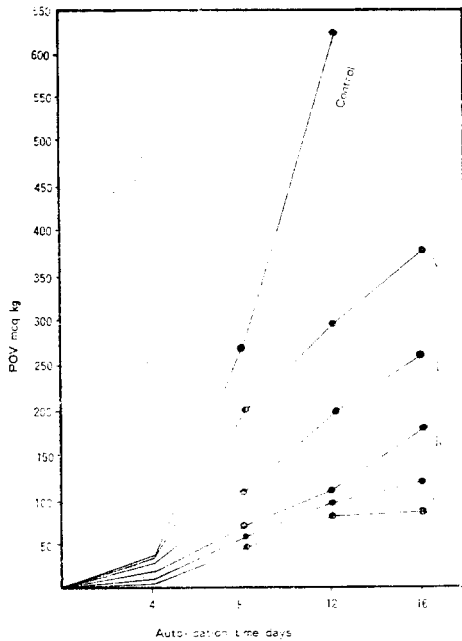
The MEUFA emulsions were made with MEUFA (63.6%), water (33.1%) and Tween 60 (2.3%).

Control MEUFA emulsion only;

- I. MEUFA emulsion containing petroleum-ether extract;
- II. MEUFA emulsion containing chloroform extract;
- III. MEUFA emulsion containing chloroform methanol (2 : 1, v/v) extract;
- IV. MEUFA emulsion containing methanol extract;
- V. MEUFA emulsion containing methanol water (1 : 1, v/v) extract

동산화 생성물인 지질 과산화물의 생성에 의한 것인가를 확인하기 위하여 Lea법에 의하여 POV를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 각 추출물의 첨가는 MEUFA의 자동산화를 억제하여 비교군에 비하여 POV가 적었으며, 시간이 경과함에 따라 POV는 크게 증가하였다. MEUFA의 자동산화에 의한 무게의 증가와 POV의 증가는 잘 일치되었다. 이 결과로부터 MEUFA의 무게의 증가는 MEUFA의 자동산화 생성물인 지질 과산화물의 형성임을 확인할 수 있었고 또한 각 추출물은 MEUFA의 자동산화를 억제하여 유도시간을 연장시키는 *in vitro*에서 확인되었다.

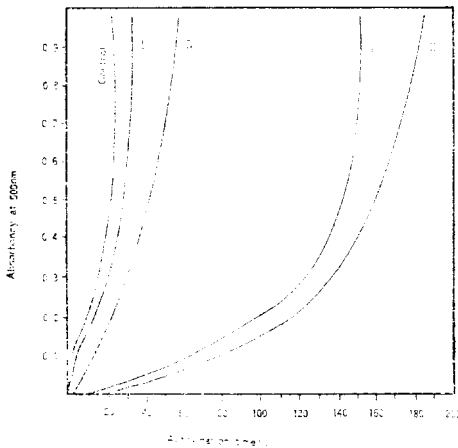
각 추출물의 항산화작용의 정도를 재확인하기 위하여 분광학적 방법인 Rhodan철법에 의하여 POV를 측정된 결과는 Fig. 6과 같이 인삼의 클로로포름과 클로로포름-메탄올 추출물의 1% 첨가군이 다른 군에 비하여 강한 항산화력을 나타내었다. 또한 135시간 경과한 후 POV를 Lea법에 의하여 측정된 결과는 Fig. 7과 같이 비교군이 POV 82.6 meq/kg인데 비하여 클



**Fig. 5. Variations of peroxide values on autoxidation of MEUFA emulsions containing one percent of each ginseng extract**

The MEUFA emulsions were made as described in Fig. 4. Incubated at 60°C.

I, II, III, IV, V : refer to Fig. 4



**Fig. 6. Antioxidative effect of ginseng extracts on autoxidation in MEUFA emulsions (0.15 ml/9.65 ml), in water and with addition of 0.2 ml of Tween 60**

The samples were incubated at 40±1°C and peroxide values were measured by Rhodan method.

I, II, III, IV : refer to Fig. 4.

Ginseng extract % solution	12	24	36	48	60	72	84	POV meq/kg
Linearalcohol	[Bar chart showing increasing POV]							61.8
Petroleum ether extract	[Bar chart showing increasing POV]							78.0
Chloroform extract	2.4	[Bar chart showing increasing POV]						
Chloroform-methanol (1:1 v/v) extract	2.8	[Bar chart showing increasing POV]						
Methanol extract	12.3	[Bar chart showing increasing POV]						

**Fig. 7. Change in peroxide values in the autoxidation of MEUFA-water emulsions (0.5 ml/9.65 ml) and with 0.2 ml of Tween 60 after 135 hours incubated at 40±1°C**  
Each extract was added at a level of 1.0 wt% of substrate emulsions.

로로포름 추출물과 클로로포름-메탄올 추출물의 첨가근은 POV가 각각 2.4 meq/kg, 2.8 meq/kg으로 적은 값을 나타내어 강한 항산화작용이 있음이 재확인 되었다. 이 값은 Lea법으로 측정된 결과와도 잘 일치되었다.

이상의 결과로부터 인삼의 석유에테르, 클로로포름, 클로로포름-메탄올, 메탄올, 메탄올-물 추출물들은 모두 항산화성 물질을 함유하고 있음이 *in vitro*에서 확인되었다. 그 중에서도 클로로포름, 클로로포름-메탄올 추출물들이 보다 강한 항산화작용을 갖고 있었다.

본 실험에서는 인삼의 각 추출물들이 모두 MEUFA의 자동산화의 억제작용을 갖고 있음이 확인되었으나 이러한 자동산화의 억제작용이 과산화물 형성시 생성되는 유리기의 제거에 기인되는 것인지는 확인되지 않았다.

**요 약**

인삼중에 함유되어 있는 항산화물질의 본태를 파악하기 위하여 인삼의 각종 용매(petroleum ether, chloroform, chloroform-methanol, methanol 및 methanol-water) 추출물들이 혼합 불포화지방산 메틸에스테르(MEUFA)의 자동산화에 미치는 영향을 *in vitro*에서 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 인삼의 각종 용매 추출물들은 모두 항산화작용을 나타내어 MEUFA의 자동산화에 의한 지질 과산화물의 형성을 억제하였다. 그 중에서도 클로로포름 및 클로로포름-메탄올(2:1, v/v) 추출물들이 보다 강한 항산화작용을 나타내었다.

2. Olcotte 등의 oven test에 의한 무게의 증가는 MEUFA의 자동산화에 의한 과산화물의 형성에 기인함이 확인되었다.

3. 인삼의 각 추출물들은 MEUFA의 지질 과산화물 형성의 유도기간을 연장시켰다.

4. 각 추출물들의 항산화작용에 있어서 Olcott 등의 oven test에 의한 무게의 측정, Lea법과 Rhodan 철법에 의한 POV 측정 등의 결과에서 추정되는 작용은 상호간 잘 일치되었다.

이상의 결과로부터 인삼중에는 항산화물질들이 인삼 성분으로서 함유되어 있음이 *in vitro*에서 확인되었다.

## 문 헌

- Han, B. H., Park, M. H., Woo, L. K., Woo, W. S. and Han, Y. H.: *Korean Biochem. J.*, **12** (1), 33 (1979)
- 韓龍男, 林昌珍, 張辰奎: 人蔘研究報告, 高麗人蔘研究所, p. 207 (1979)
- 李熙鳳: 忠北大論文集, **17**, 232 (1978)
- 金萬旭, 崔康注, 曹榮鉉: 人蔘研究報告, 高麗人蔘研究所, p. 347 (1979)
- 崔康注, 金東勳: *Korean J. Ginseng Sci.*, **5**(1), 8 (1981)
- 吳勳一, 金相達, 都在浩, 李松載, 盧惠媛: 人蔘研究報告, 高麗人蔘研究所, p. 19 (1979)
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H.: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1953)
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: *Canadian J. Biochem. and Physiol.*, **37**(8), (1959)
- Keppler, J. G., Sparreboom, S., Stroink, J. B. A. and Von Mikusch, T. D.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **36**, 308 (1959)
- Paik, T. H. and Joo, C. N.: *Res. Work Grad. School, Han-yang Univ.*, **6**, 308 (1972)
- Marcuse, R.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **39**, 97 (1963)
- Olcott, H. S. and Finset, E.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **35**, 161 (1957)
- Lea, C. M.: *Proc. Roy. Soc.*, **108**, 175 (1931)
- Olcott, H. S. and Dolev, A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **114**, 820 (1964)
- 滿田六輝, 安本教傳, 岩見公和: 榮養と食糧, **19** (3), 60 (1966)