

## 인삼으로부터 페놀성 항산화 성분의 분리

위재준 · 박종대 · 김만옥 · 이형주\*

한국인삼연초연구소, 서울대학교 식품공학과\*

### Isolation of Phenolic Antioxidant Components from *Panax ginseng*

Jae-Joon Wee, Jong-Dae Park, Man-Wook Kim and Hyong-Joo Lee\*

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon

\*Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,  
Seoul National University, Suwon, Korea

#### Abstract

To isolate new antioxidants from *Panax ginseng*, methanol extract of *Panax ginseng* was fractionated into several subfractions and their antioxidant activities were measured by using  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH). Four compounds were isolated from two subfractions that showed high DPPH quenching activities by silica gel,  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> or Sephadex LH-20 column chromatography. The four compounds were confirmed to be phenolic substances by color reaction and UV spectral analysis.

#### 서 론

인삼은 예로부터 불로장생, 보혈강장의 영약으로 알려져 왔다. 그동안 인삼 효능의 연구는 주로 인삼의 강장효과에 집중되어 노화억제효능에 대한 연구는 다소 미흡한 실정이다. 노화의 기작의 하나로서, 식균작용<sup>1)</sup> 또는 마이토콘드리아 및 마이크로솜의 전자전달계 등 정상적인 대사과정<sup>2)</sup> 뿐만 아니라 자외선에 의해<sup>3)</sup> 또는 약물중독등<sup>4)</sup> 병적 상태에서 생성되는 O<sup>·</sup>, OH<sup>·</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등의 활성산소종이 고도불포화 지방산이 풍부한 생체막에서 자유라디칼 반응에 관여함으로써 야기되는 과산화지질 생성등의 유해효과가 생체내에 축적되어 세포노화의 한 원인이 된다고 생각되고 있다.

최근 한 등<sup>5,6)</sup>은 급성알콜 중독에 의한 간조직 중 과산화지질 생성을 억제하는 항산화활성 물질로서 인삼에서 maltol, salicylic acid, vanillic acid 등 페놀성 성분을 분리동정한 바 있고 윤<sup>7)</sup>은

간조직 마이크로솜 분획에서 각각 다른 기작으로 형성되는 자유라디칼 반응계에서 maltol의 지질과산화 억제효과를 재검정하였다. 이제까지 인삼에서 분리동정된 항산화활성 물질로는 위에서 언급한 몇가지 페놀성분에 불과하고 TLC 상에서 검출되는 많은 또 다른 페놀성 물질들이 아직도 분리동정되지 못하고 있다. 따라서 저자들은 전보<sup>8)</sup>에 이어 인삼의 데타놀 추출물을 용매극성에 따라 또는 silica gel column chromatography를 이용하여 여러 성분 분획으로 나눈 후 유기 radical인  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH) 소거활성을 이용하여 항산화활성 분획을 선별하고 그 중 4종의 페놀성성분을 순수분리하였기에 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

##### 인삼 시료

본 실험에 사용한 인삼은 한국인삼연초연구소 증평시험장에서 1984년 9월에 채굴한 6년근 수삼을 수분함량 10% 내외로 건조한 것(이하 인삼이라 칭함)을 사용하였다.

1988년 10월 26일 수리

Corresponding Author: J.J. Wee



추출 및 분획분리

인삼 500g을 향온수조에서 메타놀 2l로 3시간씩 3회 환류추출한후 여과 농축하여 메타놀 추출물을 얻어 물 1l에 용해시킨 다음 Fig. 1과 같은 방법으로 분획하였다. 분획 여두에서 석유 에틸 1l씩 3회 추출 농축하여 Fr. Pe, 8.1g을 얻었고 계속해서 같은 방법으로 수층을 에테르, 에칠아세테이트, 수포화 부타놀로 추출 농축하여 Fr. Et, Ea, Bu 및 최종 수층을 농축한 Fr. W를 각각 4.5g, 2.2g 36g 및 45g을 얻었다. 에테르 분획 Fr. Et는 전보<sup>9)</sup>와 같은 방법으로 에테르 200ml에 용해한 후 2N-HCl 수용액 100ml씩 2회 추출하고 이 수층은 conc-NH<sub>4</sub>OH로 pH 9로 한 후 CHCl<sub>3</sub> 200ml로 3회 추출 농축하여 염기성 분획 Fr. Ba, 0.18g을 얻었다. 남은 에테르층은 계속해서 5% NaHCO<sub>3</sub> 수용액 100ml씩 2회 추출하고 이 수층은 6N-HCl로 pH 2로 한 후 에테르 200ml씩 3회 추출 농축하여 산성분획 Fr. A, 0.41g을 얻었다. 남은 에테르층은 5%-NaOH 수용액으로 위와 같은 방법으로 추출하여 페놀성 분획 Fr. Ph, 1.0g을 얻었고 최종 에테르층을 농축하여 중성분획 Fr. N, 2.7g을 얻었다.

에칠아세테이트 분획 Fr. Ea는 silica gel column (φ2×35cm, 70~230mesh, Merck)을 이용하여 세분획으로 나누었다. 2% MeOH/CHCl<sub>3</sub>(v/v) 250ml로 용출시켜 Fr. I, 0.7g, 계속해서 10% MeOH, 10% n-BuOH/CHCl<sub>3</sub>(v/v) 250ml 및 20% MeOH, 30% n-BuOH/CHCl<sub>3</sub>(v/v) 250ml로 용출시켜 Fr. II, 0.9g, Fr. III, 0.4g을 얻었다. Fr. I 및 Fr. II는 Fr. Et에서와 같은 방법으로 각각 5% NaHCO<sub>3</sub> 수용액으로 추출하여 산성 및 중성분획으로 나누어 Fr. IA, Fr. IN 및 Fr. IIA, Fr. IIN으로 하였다. 위에서 얻은 각 분획들은 모두 dimethylsulfoxide에 1mg/ml 되게 녹여 DPPH 소거활성 시료액으로 사용하였다.

항산화 활성 측정

위에서 얻은 각 분획 시료액의 항산화 활성을 Blois<sup>9)</sup>의 방법에 준하여 DPPH를 이용하여 측정하였다. DPPH 약 20mg을 메타놀 150ml에 녹여 DPPH 용액으로 하였다. DPPH 용액 600μl에 dimethylsulfoxide 250μl를 가하고 적당량의 메타놀로 희석한 후 10초간 진탕하여 516nm에서 대조군의 흡광도가 0.93~0.97이 되게 하였다. 같은 방법으

로 각 시료액 250μl에 대한 DPPH 반응 생성물의 흡광도를 10분 후에 측정하여 대조군에 대한 흡광도의 감소치를 DPPH 소거활성으로 나타내었다.

활성 분획의 대량 분리

각 성분 분획의 유리기소거활성 비교 시험에 따른 활성 분획중 성분을 분리하기 위하여 인삼 50kg을 앞에서의 방법에 준하여 추출 및 분획하여 Fr. A, 25g, Fr. Ph, 16g, Fr. IA, 6.3g 및 Fr. IIA, 5.2g을 얻었다.

활성 분획중 성분 분리

silica gel column chromatography(SGCC)의 충전제는 Silica gel 60(70~230mesh, Merck), column은 φ2×76cm 또는 φ1.2×95cm glass column, 유속은 0.7~1.2ml/min로 하였고 10ml씩 분획하였다. 용출된 각 분획은 TLC(precoated silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck)로 검출하였다. TLC plate는 UV 254, 375nm에서 관찰하고 2% FeCl<sub>3</sub>/0.5N-HCl 또는 0.5% FeCl<sub>3</sub> - 0.5% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>(1:1) 용액으로 정색반응을 보았다. 이때 전개용매는 SGCC 용매계를 그대로 사용하거나 조성만을 바꾸어 사용하였다. SGCC에 사용한 용매계는 다음과 같다.

- S-1 : Toluene-EtOAc-HCOOH(7 : 3 : 1, v/v)
- S-2 : CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O-HCOOH  
(8 : 2.66 : 3 : 1, v/v, lower phase)
- S-3 : CHCl<sub>3</sub>-MeOH-EtOAc-H<sub>2</sub>O  
(2 : 2 : 4 : 1, v/v, lower phase)
- S-4 : CHCl<sub>3</sub>-MeOH-HOAc-H<sub>2</sub>O  
(85 : 15 : 10 : 3.5, v/v)
- S-5 : CHCl<sub>3</sub>-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO-MeOH-HOAc  
(80 : 10 : 5 : 1, v/v)

C<sub>18</sub> reverse phase column chromatography(RPCC)의 충전제는 Waters사 prep-LC 용을, column은 φ2.25×50cm stainless steel column(Alltech)을 사용하였고 유속은 2ml/min로 하고 6ml씩 분획하였다. 검출은 UV detector로 254nm에서 검출하였다.

RPCC의 용매계는 두대의 pump A, B와 solvent programmer를 이용한 농도 구배법을 사용하였다. R-1 : 용매 A는 5%-aqueous acetic acid, 용매 B는 MeOH이고 용매 B의 초기혼합 비율을 25%(v/v)로 하고 120분 동안 80%로 증가시켰다(이하 25-120-80으로 표시). R-2 : 용매 A는 5% aqueous acetic acid, 용매 B는 EtOH(30-30-70). Sephadex

LH-20 column chromatography(LHCC)의 충전제는 'Sephadex LH 20-100(25-100 $\mu$ , Sigma)을 사용하였고 분리조건은 용매계를 제외하고는 RPCC와 같다. LHCC의 용매제도 RPCC와 같이 농도 구배법을 사용하였다.

L-1 : 용매 A, CHCl<sub>3</sub>; 용매 B, MeOH; 5-210-50

L-2 : 용매 A, H<sub>2</sub>O; 용매 B, MeOH; 50-240-100

L-3 : 용매 A, CHCl<sub>3</sub>; 용매 B, MeOH; 15-180-50

RPCC 및 LHCC를 할 때 얻어지는 chromatogram에 나타난 피크별로 분획물을 합친 후 농축하여 각각을 다시 TLC 하여 FeCl<sub>3</sub>에 양성인 분획을 얻었다.

위와 같은 요령으로 Fr. A 약 11g을 용매계 S-1으로 SGCC 하여 Fr. A-1을 얻고 다시 S-2로 SGCC 하여 Fr. A-1-1과 Fr. A-1-2를 얻었다. Fr. A-1-1은 S-3으로 SGCC 한 다음 R-1으로 RPCC 하여 Compound I 을 분리하였다. Fr. A-1-2는 L-1 및 L-2로 2회 LHCC 한 후 최종 R-2로 RPCC 하여 Compound II를 얻었다. 또한 Fr. IIA 5.2g을 S-4 및 S-5로 2회 SGCC 하여 Fr. IIA-1을 얻은 다음 계속해서 S-1으로 SGCC 하여 Fr. IIA-1-1과 Fr. IIA-1-2를 얻었다. Fr. IIA-1-1은 재결정하여 Compound III을 얻었다. Fr. IIA-1-2는 L-3으로 LHCC 하여 Compound IV를 얻었다.

분리된 각 성분의 melting point는 Fisher Johns Melting Point Apparatus를 사용하여 측정하였고 UV 분석은 에타놀에 녹여 Shimadzu Model 200S double beam spectrometer를 사용하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 각 분획의 항산화 활성 특성

백삼의 메타놀 추출물을 Fig. 1과 같이 분획한 다음 최종 농도를 1mg/ml로 하여 먼저 1차 분획

물인 석유 에텔(Fr. Pe), 에테르(Fr. Et), 에칠아세테이트(Fr. Ea), 부타놀(Fr. Bu) 및 물분획(Fr. W)의 DPPH 소거 활성을 비교해 본 결과 Table 1과 같았다. 표에서 Fr. Et와 Fr. Ea의 활성이 각각 0.24, 0.22로 비교적 높았는데 이는 최의<sup>10)</sup> 결과와 일치하는 경향이다. Fig. 1과 같은 방법으로 Fr. Et 및 Fr. Ea를 더 세분하여 활성을 비교해 본 결과 Table 1과 같이 활성의 세기가 Fr.A>Fr. Ph>Fr.Ba>Fr.N 및 Fr.IA>Fr.IIA>Fr.IN>Fr. III>Fr.IIN 순으로 나타났다. 따라서 에테르 및 에칠아세테이트 추출 분획 성분중 5% NaHCO<sub>3</sub> 또는 5% NaOH 수용액층으로 이행되는 산성 물질 중에 항산화 활성 물질이 많이 포함되어 있음을 예측할 수 있다. 이것은 한 등<sup>11)</sup>의 결과와도 일치하는 경향이다.

#### 항산화 활성 분획에서의 성분 분리

항산화 활성이 상대적으로 높았던 Fr. A 및 Fr. IIA로부터 절습한 바와 같이 silica gel, Sephadex LH-20 또는  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>을 충전제로 사용하여 column chromatography 또는 HPLC 하여 항산화 활성 성분으로 페놀성 성분으로 추정되는 FeCl<sub>3</sub>에 양성인 4종의 단일성분을 분리하였다. 즉, Fr. A는 silica gel column chromatography (SGCC)를 반복하여 Fr. A-1-1과 Fr. A-1-2로 나누었고 Fr. A-1-1을 C<sub>18</sub> reverse phase column chromatography (RPCC)한 결과 Fig. 2와 같았다. 그림에서 fraction number 56~68을 합쳐 농축한 후 CHCl<sub>3</sub>-Pet. ether에서 재결정하여 백색침상결정 Compound I (mp. 132°C), 2mg을 얻었다. Fr. A-1-2는 Sephadex LH-20 column chromatography (LHCC)를 반복한 후 최종 RPCC하여 Fig. 3과 같은 chromatogram을 얻었다. 그림에서 보는 바와 같이 두 개의 피크가 얻어졌으며 이 중

Table 1. Free radical quenching activity of ginseng fractions: Two hundred and fifty  $\mu$ l of each fraction(1mg/ml) was added to 600 $\mu$ l of DPPH solution of A<sub>516</sub>. 0.93~0.97 and the decrease in absorbance was recorded ten minutes later

Fractions	Decrease in A <sub>516</sub>	Fractions	Decrease in A <sub>516</sub>	Fractions	Decrease in A <sub>516</sub>
Fr. Pe	0.14	Fr. Ba	0.17	Fr. IA	0.89
Et	0.24	A	0.53	IN	0.72
Ea	0.22	Ph	0.39	IIA	0.86
Bu	0.13	N	0.06	IIN	0.40
W	0.13			III	0.59

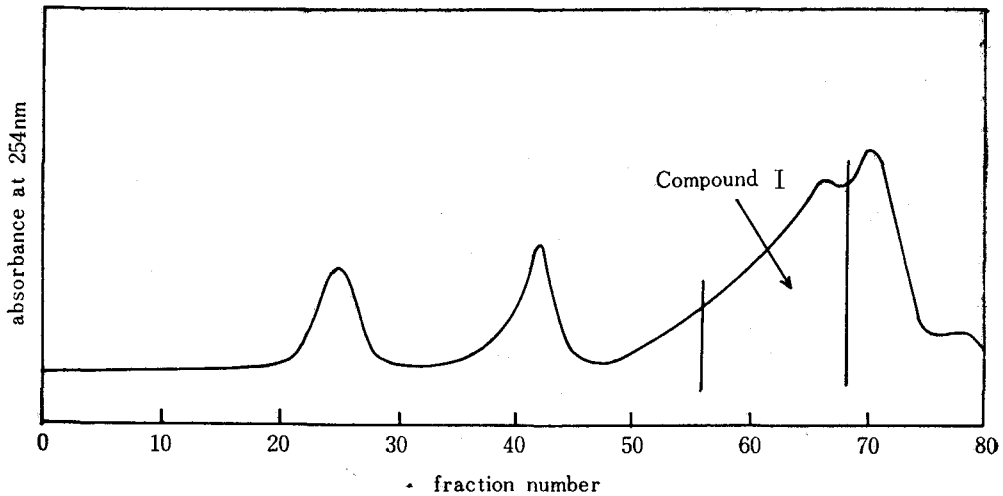


Fig. 2. Isolation of Compound I from Fr. A-1-1 by  $C_{18}$  reverse phase column chromatography

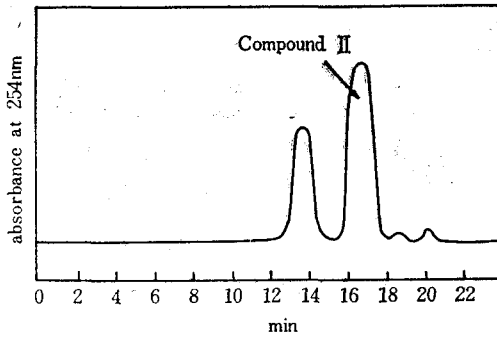


Fig. 3. Isolation of Compound II from Fr.A-1-2 by  $C_{18}$  reverse phase column chromatography

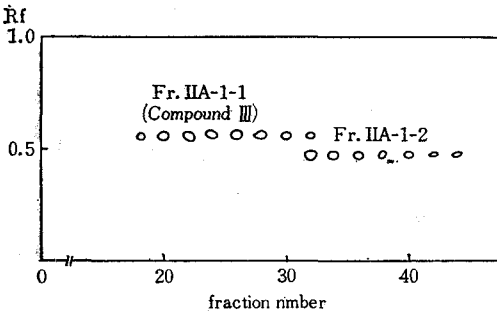


Fig. 4. Isolation of Compound III from Fr. IIA-1-1 by silica gel column chromatography

retention time이 16min인 피크를 포집하여 농축한 후  $H_2O$ -MeOH에서 재결정한 결과 백색침상결정 20mg이 얻어졌으며 이를 Compound II (mp.  $196^\circ C$ )라 하였다. Fr. IIA 역시 SGCC를 반복하여 Fr. IIA-1을 얻은 다음 이것을 다시 SGCC하여 Fig. 4와 같은 chromatogram을 얻었다. 그림

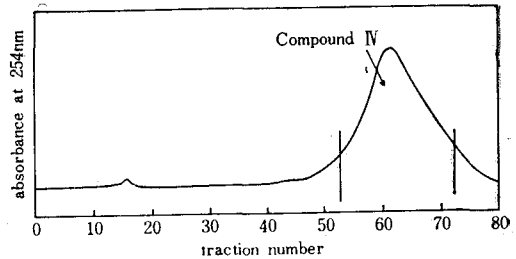


Fig. 5. Isolation of Compound IV from Fr. IIA-1-2 by Sephadex LH-20 column chromatography

에서 보는 바와 같이 fraction number 18~29를 합쳐서 Fr. IIA-1-1, 32~44를 합쳐서 Fr. IIA-1-2를 얻었으며 Fr. IIA-1-1은 바로  $H_2O$ 에서 재결정하여 Compound III (mp.  $187^\circ C$ ), 9.7mg을 얻었고 Fr. IIA-1-2는 다시 LHCC 한 결과 Fig. 5와 같았다. 그림에서 fraction number 53~72를 합쳐서 농축한 후  $H_2O$ -MeOH에서 재결정한 결과 미황색 침상결정 3mg이 얻어졌으며 이를 Compound IV (mp.  $167^\circ C$ )라 하였다.

#### 분리된 성분의 정색반응 및 UV 흡수특성

위에서 분리한 성분들은 항산화활성 분획 Fr. A 및 Fr. IIA를 chromatography 하는 과정에서  $FeCl_3$ 에 발색되는 분획물들을 모아서 계속 정제하고 최종 재결정하여 얻은 것들로서 페놀성 성분으로 추정되었다. 페놀성 성분의 발색제로는  $FeCl_3$  외에  $FeCl_3$ 와  $K_3Fe(CN)_6$ 의 혼합용액, Folin-Ciocalteu, 2,6-dibromoquinonechloroimide(Gibb's reagent),

Table 2. Rf values,color reaction and spectral properties of isolated compounds

	Rf <sup>a)</sup> values in solvent		Color reaction with reagent		Fluorescence	UV $\lambda_{max}$ , nm	
	A	B	C	D		EtOH	EtOH+NaOH
Compound I	0.52	0.38	PP	YL <sup>b)</sup>	BL	235,304	242,312
Compound II	0.42	0.61	BR	f-VL	—	310	323
Compound III	0.36	0.23	BL	BR	BL	338	348
Compound IV	0.29	0.36	d-GR	PP	BL	307,330	310,338

a) Rf values were measured on precoated silica gel TLC plate (Merck)

b) The color developed very slow

A : Toluene-EtOAc-HCOOH (5 : 4 : 1, v/v), B : CHCl<sub>3</sub>-Methoxy EtOH-n-BuOH-HOAc (80 : 20 : 1 : 0.5, v/v), C : 2% FeCl<sub>3</sub> in 0.5N-HCl, D : diazotized sulphanic acid (Pauly's reagent), PP : purple, YL : yellow, BL : blue, BR : brown, f-VL : faint-violet, d-GR : dark gray.

diazotized p-nitroaniline, 또는 diazotized sulph-anilic acid (Pauly's reagent) 등이 있다.<sup>12)</sup> 본 연구에서는 분리된 성분의 FeCl<sub>3</sub> 및 Pauly's reagent 에 대한 정색반응을 보았고 또한 페놀성 성분의 특징으로서 UV 흡수극대가 알칼리 존재하에 이동<sup>13)</sup>하는지를 조사한 결과 Table 2와 같았다. 표에서 보는 바와 같이 Compound I은 FeCl<sub>3</sub>에는 자주색, Pauly's reagent에는 매우 서서히 황색으로 발색되었고 UV를 찍었을 때 청색 형광을 나타내었으며, 또한 에타놀용액에서의 UV 흡수극대는 235,304nm이었으나 1% NaOH 메타놀 용액을 3~4방울 첨가하였을 때 242, 312nm로 장파장 쪽으로 이동하였다.

이와 같이 Compound I은 페놀성 성분의 특성을 잘 나타내었다. 이와 마찬가지로 Compound II, III 및 IV 역시 FeCl<sub>3</sub> 및 Pauly's reagent에 갈색, 청색 또는 보라색 등으로 발색되었고 UV 흡수극대가 알칼리 첨가로 장파장 쪽으로 이동되는 것으로 보아 페놀성 성분임을 알 수 있었다.

### 초 록

인삼중 새로운 항산화 성분을 분리하기 위하여 인삼의 메타놀 추출물을 여러 성분 분획으로 나누는 다음  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH)을 이용하여 각각의 항산화 활성을 측정하였다. DPPH 소거 활성이 비교적 큰 두 분획을 silica gel,  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 또는 Sephadex LH-20 column chromatography 하여 4종의 단일성분을 분리하였고 이들은 정색반응 및 UV 분석을 통해 모두 페놀성 성분으로 확인되었다.

### 참 고 문 헌

1. Fantone, J.C. and Ward, P.A.: Am. J. Path., 107 : 397(1982)
2. Nohl, H. and Hegner, D.: Eur. J. Biochem., 82 : 563(1978)
3. Bodaness, R.S. and Chan, P.C.: J. Biol. Chem., 252 : 8554(1977)
4. Trush, M.A., Mimnaugh, E.G. and Gram, T.E.: Biochem. Pharmacol., 31 : 3335(1982)
5. Han, B.H., Park, M.H., Woo, L.K., Woo, W.S. and Han, Y.N.: Proc. 2nd Int'l Gin. Symp., Seoul, Korea, pp.13~21(1978)
6. Han, B.H., Park, M.H. and Han, Y.N.: Arch. Pharm. Res. (Korea), 4 : 53(1981)
7. 윤여규 : 지질과산화에 대한 Maltol의 항산화 효과에 관한 연구, 서울대학교, 박사학위논문 (1986)
8. Kim, M.W., Wee, J.J., and Park, J.D.: Kor. J. Food. Sci. and Technol., 19 : 392(1987)
9. Blois, M.S.: Nature, 181 : 1199(1958)
10. 최강주 : 홍삼 및 백삼의 지방질 성분의 항산화 성분과 관한 연구, 고려대학교, 박사 학위 논문(1983)
11. Chang, H.M., Yeung H.W. Tso, W.W. and Koo, A.: Advances in Chinese Medical Materials Research, World Scientific, p.486 (1985)
12. Stahl, E.: Thin Layer Chromatography, Springer-Verlag Berlin, p.866(1969)
13. Harbone, J.B.: Phytochemical Methods, Chapman and Hall, Ltd., London, p.34(1973)