

알시안블루 色素를 이용한 人蔘多糖體의 含量 分析

한용남 · 김선영* · 이희주* · 황우익** · 한병훈

서울대학교 천연물과학연구소

*덕성여자대학교 약학대학

**고려대학교 의과대학

(1992년 4월 23일 접수)

Analysis of *Panax ginseng* Polysaccharide by Alcian Blue Dye

Yong Nam Han, Sun Young Kim*, Hee Joo Lee*,
Woo Ik Hwang** and Byung Hoon Han

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460

*College of Pharmacy, Dukseung Womans University, Seoul 132-714

**College of Medicine, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received April 23, 1992)

Abstract Polysaccharide contents in *Panax ginseng* roots were evaluated by a spectrophotometry, utilizing the complex formation of ginseng polysaccharide with alcian blue dye in 50 mM ammonium biphosphate, pH 4.2. The polysaccharide content in red ginseng was about three times higher than that in fresh ginseng when both were extracted with water, and increased about two times when red ginseng was extracted with an alkaline solution. The determination of polysaccharide in various parts of ginseng revealed that main roots contained the component more than fine roots. Fresh ginseng sections stained by the dye showed polysaccharide mainly was found in cortex and combium but not in epidermis.

Key words *Panax ginseng* C.A. Meyer, polysaccharide contents, alcian blue dye

서 론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 다당체는 다종 다양하고 또한 여러가지 생물활성이 있는 것으로 보고되고 있다. Hikino 등은 백삼으로부터 혈당강화작용이 있는 21종의 다당체를 분리 정제하였는데, panaxans A~E는¹⁾ homogeneous glucans이며 panaxans F~U²⁾ heterogeneous glycans에 속한다. 그중에서 panaxans R~U는³⁾ peptide 부분이 6.2~27%를 점유하는 peptidolycans이며, panaxans Q~U는 uronic acid가 상당량 함유되어 있고, 특히 panaxan T는 galacturonic acid가 91%를 점유하므로 이 물질은 pectin에 속하는 것으로 생각된다. Kim 등⁴⁾은 백삼의

중성 다당체가 항암작용을, 산성다당체가 면역증강작용을 나타낸다고 보고하였다. 이외에도 인삼의 산성 다당체는 다른 여러가지 생물활성이 있는 것으로 보고되어 있다. 즉 Kong 등⁵⁾은 수삼에서 mitogenic 활성을 갖는 물질을 분리정제하고 이 물질은 glucuronic acid를 함유하는 peptidoglycan임을 밝혔고, Gao 등⁶⁾도 수삼과 인삼잎에서 항보체 활성이 있는 분획이 산성 다당체임을 밝혔다. Lee와 Okuda 등⁸⁾은 홍삼으로부터 독소홀몬 L에 의해 유도되는 지질분해를 저해하는 성분으로서 역시 산성 다당체인 pectin-like α -1, 4-polygalacturonan을 분리한 바 있다.

위에서 살펴본 바와 같이 백삼중에는 20여종의 다당체가 함유되어 있음이 밝혀졌으나, 수삼이나 홍삼

에서는 수종의 산성 다당체가 정제되어 있을 뿐으로 백삼에서와 같은 다당체가 수삼이나 홍삼에도 함유되어 있는지 현재로서는 알 수 없다. 왜냐하면 최근 저자 등⁹⁾은 산약(山藥, *Dioscorea batatas*, *D. japonica*)의 점액물질(mucilage)을 정제한 바 있는데 다당체의 분리에 흔히 사용되는 에탄올 침전법을 사용하였을 때 점액물질이 변성하여 추출효과가 낮아지며, 특히 원료(生材)보다 가공한(steamed and dried) 산약은 mucilage 함량이 매우 낮음을 알게 되었고, 또한 지금까지 인삼다당체를 분리 정제한 연구자들은 모두 에탄올 또는 메탄올 침전법을 활용하였기 때문이다. 그러므로 수삼, 백삼, 홍삼 다당체를 서로 비교하기 위해서 이들 인삼 상호간의 다당체 함량 차이와 다당체의 pattern 분석 등의 연구가 요청된다.

이러한 연구를 수행하기 위해서는 우선 인삼 다당체의 정량분석법이 필요하다. 다당체의 정량분석을 위해 현재 활용하고 있는 방법들은 다당체를 구성하고 있는 hexose, uronic acid를 가수분해한 후 비색 정량하거나 또는 GLC로 분석하기 때문에 인삼중에 함유되어 있는 단당류, 이당류, 소당류, 전분 등도 함께 정량될 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 인삼중에 함유되어 있는 다당체만을 정량하기 위하여 산약 mucilage의 정량에 사용하였던 alcian blue 색소를 이용하여 인삼 다당체 정량법을 수립하였고, 이 방법을 활용하여 수삼, 백삼, 홍삼의 다당체 함량을 정량하고, 수삼의 조직을 염색하여 다당체의 존재 양상을 관찰하였기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 인삼 재료 및 시약

수삼(4년근), 백삼(5년근)은 시중에서 구입하고 홍삼은 한국인삼연초연구소에서 분양받아 사용하였다. 특수시약으로는 alcian blue 8GX(Jassen Chimica, Belgium), Carbazole(Junsei Chem., Japan)을 사용하였고, buffer 시약, methanol 등 일반시약은 특급을 사용하였다.

2. 인삼 다당체의 추출

수삼은 약 5g을 달아 소량의 물을 사용하여 Waring blender로 마쇄하고 물을 가하여 전량이 100 ml로 되도록 하였고, 백삼과 홍삼은 고운 분말로 하여 약 0.5g을 달아 물 100 ml를 가하였다. 이들을 교반하면서

4 °C (overnight), 20 °C (overnight), 55 °C (3시간) 또는 100 °C (1시간)에서 추출한 후 여과지를 사용하여 여과하던지 또는 원심분리하여 여액 또는 상등액을 인삼 다당체 분석용 시료로 하였다. 홍삼을 알칼리로 추출할 때는 분말 약 0.5g에 0.1N NaOH 50 ml로 추출한 후 여기에 0.1 N 초산 50 ml를 가해 중화한 후 이를 여과하여 여액을 다당체 분석용 시료로 하였다.

3. Alcian blue 색소에 의한 인삼다당체의 정량

인삼의 물 추출액 0.5 ml를 취하여 원심분리용 플라스틱 시험관에 넣고 0.1% alcian blue 완충액(50 mM ammonium biphosphate 수용액에 녹인 후 여과하여 사용) 5 ml를 가하고 세게 교반하고 실온에서 2시간동안 방치한 후 형성된 침전을 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 경사하여 버린 후 잔사에 0.1 N 염산 5 ml를 가하여 용해된 alcian-blue dye의 흡광도를 620 nm에서 측정하였다. Alcian blue 색소의 흡광도가 1.0일 때 인삼 다당체의 양을 1.0 unit로 하였다.

4. Uronic acid 분석

검액중 uronic acid 함량은 carbazole법으로 측정하였다.¹⁰⁾ 인삼 검액 1.0 ml를 sodium borate/C-H₂SO₄ 시약 5 ml에 중층시키고 잘 흔들어 섞은 후 10분간 boiling water bath에서 가열하였고, 식힌 후 carbazole/ethanol 시약 0.2 ml를 가하여 15분간 boiling water bath에서 가열 발색시킨 것을 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 glucuronic acid를 사용하였다.

5. 수삼 조직의 염색

0.25% alcian blue 메탄올 용액(ammonium biphosphate로 포화시킨 메탄올에 녹임)중에서 수삼의 절편을 부위별로 잘라 넣어 수시간동안 염색시킨 후 메탄올로 세척하였다.

결과 및 고찰

1. 인삼다당체와 Alcian Blue 복합체 형성의 최적 pH

인삼다당체와 alcian blue와의 complex 형성에 대한 최적 pH 조건을 찾아내기 위해 여러가지 완충액에 색소를 녹인 후 인삼 물추출물과 반응시키고 생성된 complex의 양을 측정한 결과는 Fig. 1 및 Fig. 2, Table 1과 같다. Fig. 1은 citrate 완충액을 사용했을 때의

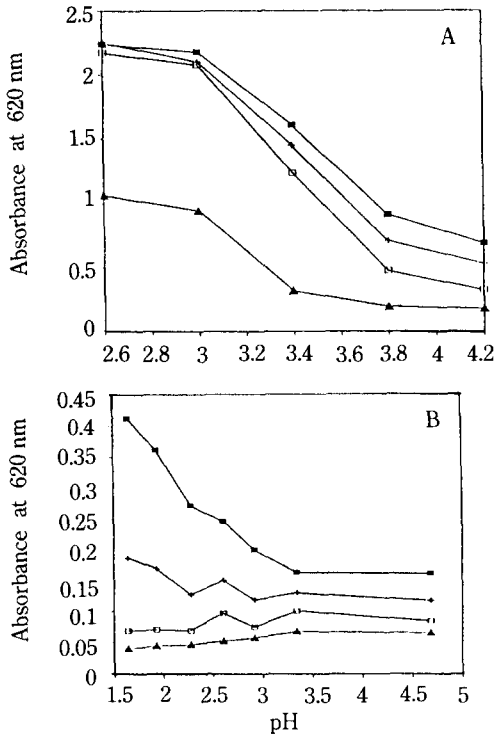


Fig. 1. The pH profiles for the complex formation of alcian blue with ginseng polysaccharide in 0.1 M citric acid/0.2 M Na₂HPO₄(A) and 0.1 M sodium citrate/HCl(B) buffers. One gram of white ginseng powder was added to ten ml of water, and was extracted at 4 °C overnight under stirring. After centrifugation, the supernatant was serially diluted with water. An aliquot (0.5 ml) of each sample solution was taken into a plastic test tube, 5 ml of 0.1% alcian blue buffer solution was added to it, and then mixed. After standing at room temperature for 2 hrs, the complex formed was taken by centrifugation at 3,500 rpm, and was dissolved in 0.1 N HCl(5 ml). Absorbance of a blue solution was measured at 620 nm. Ginseng extract, ■—■; 1/2 diluted, +—+; 1/4 diluted, □—□; 1/8 diluted, ▲—▲; Each data is the mean of duplicate experiments.

결과로써 Fig. 1(A)는 0.1 M citric acid/0.2 M Na₂HPO₄ 완충액(pH 2.6~4.2), Fig. 1(B)는 0.1 M sodium citrate/HCl 완충액(pH 1.5~5.0)에서 각각 complex 형성에 대한 pH profile을 나타낸 것이다. Fig. 1(A)에서 보는 바와 같이 산성이 강해질수록 complex 형성이 많아지다가 pH 3.0~2.6에서 거의 일정한 수치를 나

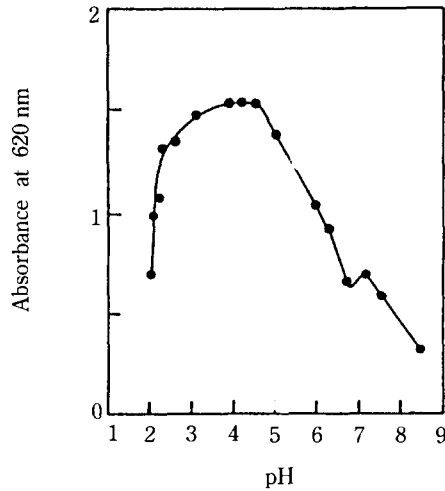


Fig. 2. The pH profile for the complex formation of alcian blue with ginseng polysaccharide in 50 mM sodium phosphate buffer. One gram of white ginseng powder was extracted with 100 ml of water at 4 °C overnight. An aliquot (0.5 ml) of the water extract was taken for polysaccharide assay as described in the legend of Fig. 1.

Table 1. Solubility of alcian blue in various buffers

Buffers (pH range)	Absorbance at 620 nm*
0.1 M Citric acid/0.2 M Na ₂ HPO ₄ (2.6~7.6)	1.48 (pH 3.1)
0.1 M Sod. citrate/HCl (1.1~4.9)	0.59 (pH 3.2)
0.1 M Glycine/0.1 M NaCl/HCl	0.09 (pH 3.1)
0.05 M NaH ₂ PO ₄ (4.5)	2.93 (pH 4.5)
0.05 M NH ₄ H ₂ PO ₄ (4.2)	4.42 (pH 4.2)

* 100 mg of alcian blue was stirred at room temperature overnight in 100 ml of a buffer with pH indicated in parenthesis, and then filtered twice using a filter paper. Absorbance of the filtrate was measured at 620 nm.

타내며, 이 pH 범위내에서 정량성이 있어 보였다. Fig. 1(B)에서도 pH가 낮을수록 complex 형성이 많아지면서 pH 1.5에서 최대치를 나타내지만 Fig. 1(A)의 pH 3.0에서 보다 complex 형성량이 약 1/10밖에 미치지 못하였다.

Fig. 2는 sodium phosphate만을 사용한 완충액 중에서 인삼다당체와 alcian blue와의 complex 생성량을 조사한 pH profile로서 pH 3.8~4.5 범위에서 거의

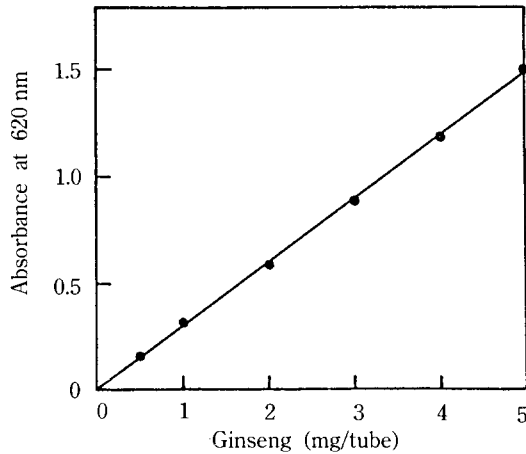


Fig. 3. A calibration curve for ginseng polysaccharide. 0.1% Alcian blue in 50 mM ammonium biphosphate (pH 4.2) was used for precipitating ginseng polysaccharide which was extracted with water at 4 °C overnight. Abscissa: white ginseng powder amounts in the 0.5 ml water extract for one assay.

최대치를 나타내며 pH 3이하에서와 pH 5이상에서 급격히 complex 형성이 떨어짐을 알 수 있었다. 이 결과는 Fig. 1에서의 결과와 매우 다르므로 이는 완충액의 종류에 따른 anion의 종류와 이온 강도의 차이에 기인될 것으로 생각되어 여러가지 완충액 중에서 alcian blue의 용해도를 조사하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 pH 3.1~3.2에서 buffer의 종류에 따라 alcian blue의 용해도(흡광도로 측정)가 1.48~0.09로 현저히 서로 달랐고, 이들 보다도 50 mM NaH₂PO₄ 용액(pH 4.5)에서의 용해도가 컸다. 50 mM NaH₂PO₄ 보다 이온 강도가 적은 50 mM NH₄H₂PO₄(pH 4.2)에서 alcian blue의 용해도가 더욱 크므로, 50 mM NH₄H₂PO₄ 용액(pH 4.2)을 사용한 완충액에서 검량선을 작성한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 이 조건하에서 한 시험관 당 백삼분말 0.5~5 mg에 해당되는 검액 중의 다당체를 정량할 수 있었다.

2. 수삼, 백삼 및 홍삼 중의 다당체 함량

위에서 확립한 alcian blue 색소에 의한 인삼다당체의 분석법(Fig. 3 및 실험방법 항 참조)을 활용하여 수삼, 백삼, 홍삼 중의 다당체 함량을 측정하여 Table 2에 표시하였다. 여기에 산약 중의 mucilage 함량도 함께 나타내었다. 수삼은 일정량(5g)에 소량의 물을 가한 후 Waring blender로 마쇄하고 마쇄액을 물로

Table 2. Polysaccharide contents in *Panax ginseng*, *Dioscorea batatas* and *D. Japonica*

Materials ^{a)}	Contents (units/g dry weight) ^{b)}
<i>Panax ginseng</i> ^{c)}	
Fresh	152.7
White	126.1
Red	451.4
<i>Dioscorea batatas</i> ^{d)}	
Fesh	109.5
Processed ^{e)}	26.1
<i>Dioscorea japonica</i> ^{d)}	
Fresh	111.0
Processed ^{e)}	28.9

^{a)} Extracted with water at 4 °C overnight.

^{b)} One unit was defined as optical density at 620 nm to be one after the complex was dissociated by 0.1 N HCl.

^{c)} Optimal pH for assay: pH 4.2 (50 mM NH₄H₂PO₄).

^{d)} Optimal pH for assay: pH 7.4 (50 mM Tris·HCl).⁹⁾

^{e)} Steamed and dried.⁹⁾

희석하여 100 ml로 한 것이고, 백삼 및 홍삼은 일정량(각각 0.5g씩)에 물 100 ml를 가한 후, 이들 모두 4 °C에서 교반하면서 하루밤 추출한 다음 여과(또는 원심분리)한 후 0.5 ml를 취하여 분석하였다. Polysaccharide의 함량은 건조한 인삼(또는 산약) 1g 당 unit로 표시하였는데 여기서 polysaccharide unit란 표준조건(Fig. 3 및 실험방법 항 참조)에서 polysaccharide와 complex를 형성한 alcian blue를 0.1 N HCl 5 ml로 용해시킨 후 620 nm에서 흡광도가 1일 때를 1 unit로 임의로 정한 것이다.

Table 2에 나타낸 바와 같이 각 인삼의 다당체 함량은 수삼이 건조중량 1g당 152.7 unit로서 백삼(126.1 unit)보다 많았고, 홍삼(451.4 unit)은 수삼보다도 월등히 많았다. 한편 산약⁹⁾의 경우 인삼과는 반대로 생마(yam)보다 가공한(steamed and dried) 산약이 월등히 적었다. 이는 마의 polysaccharide(mucilage)는 가공에 의해 난용화(점도가 저하됨)되지만 인삼의 polysaccharide는 가공(홍삼제조)에 의해 가용화되기 쉬운 상태로 변해 물에 더 많은 양이 추출된 것으로 추정된다.

여기서 또 한가지 더 특기하여야 할 사항은 인삼 다당체의 함량이 홍삼의 경우(451.4 unit) 생마의 다당체 함량(약 110 unit)보다 4배 가량 더 많다는 것이다. 이를 다른 척도로 확인하기 위해 홍삼 다당체

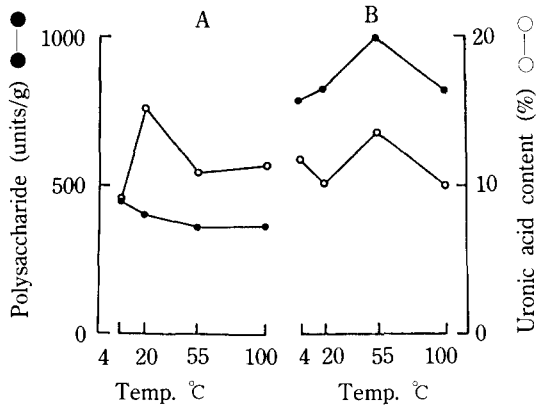


Fig. 4. Extraction of polysaccharide from red ginseng as a function of temperature under neutral and alkaline condition. Each 0.5g of red ginseng powder was extracted with 100 ml of water (a), or 50 ml of 0.1 N NaOH (b) at 4 °C (overnight), 20 °C (overnight), 55 °C (3 hrs), or 100 °C (one hr), and the alkaline extract was neutralized with 50 ml of 0.1 N acetic acid. Assay methods; alcian blue, ●—●; carbazole for uronic acid, ○—○.

중에 함유되어있을 uronic acid의 함량을 분석하였다. Gao 등⁷⁾은 수삼의 산성 다당체를 알칼리로 추출하였을 때 수율이 높다고 하므로 홍삼을 알칼리로도 추출하여 보았다. 이 때 추출온도를 4 °C는 물론 20, 55, 100 °C로 하여 홍삼다당체의 추출량을 비교하였다.

Fig. 4에 나타난 바와 같이 홍삼 다당체를 alcian blue로 정량하였을 때 중성에서 추출할 때 온도가 낮을수록 추출량이 많아지는 경향으로 4 °C에서 가장 추출효율이 좋았으나 알칼리성에서 추출할 때는 온도가 높아질수록 추출량이 많아지다가 55 °C에서 정점에 달한 후 100 °C에서 감소하였다. Uronic acid를 정량하였을 때는 중성의 20 °C에서 추출하였을 때 가장 추출량이 많았으나 액성과 온도 차이에 따라 추출에 큰 변화는 없었다. 여기서 특기할 사항은 alcian blue로 정량되는 다당체는 알칼리성에서 2배 이상 추출되지만 uronic acid를 함유하는 다당체의 추출량은 액성에 거의 관계없다는 것이다. 이는 alcian blue로 염색되는 다당체는 반드시 산성 다당체만이 아니라는 사실을 지적해주고 있다.

3. 인삼의 부위별 다당체의 함량

수삼과 홍삼을 뇌두(rhizome), 주근(main root), 지근(lateral root), 미삼(fine root) 및 표피(epidermis)로

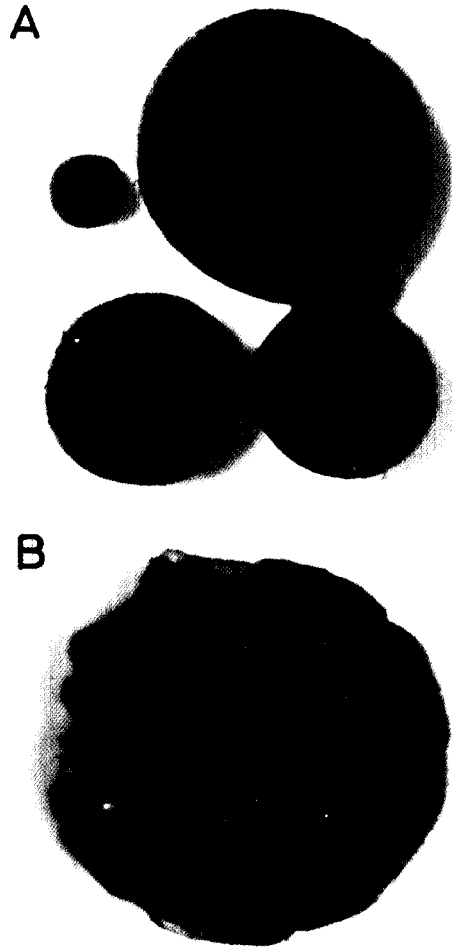


Fig. 5. Photographs of fresh ginseng sections stained by alcian blue dye. A; main, lateral, and fine roots, B: main root near rhizome.

나누어 부위별 다당체의 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 여기서 사용한 홍삼의 주근은 등급이良好的인 것을 사용하였다.

수삼의 경우 다당체의 함량이 주근>뇌두, 지근>미삼의 순이었고 홍삼의 경우는 뇌두>주근>지근, 미삼>표피의 순이었다. 홍삼 다당체의 함량분석 결과는 Lee와 Okuda⁸⁾가 지적한 바와 같이 독소효분 L로 유도한 지질분해를 저해하는 산성 다당체가 주근이 미삼보다 많다는 결과와 일치한다.

4. 수삼 조직의 염색

Alcian blue 색소를 이용하여 수삼을 부위별로 염

Table 3. Polysaccharide contents in various parts of *Panax ginseng*

Parts ^{a)}	Polysaccharide contents ^{b)}	
	Fresh ginseng	Red ginseng
Rhizome	129.5	619.6
Main root	187.1	481.8 ^{c)}
Lateral root	126.6	368.4
Fine root	73.8	361.3
Epidermis	—	252.7

^{a)}Extracted at 4 °C overnight

^{b)}Units per one gram dry weight

^{c)}Grade: Yang sam(良蔘)

색하고 사진기로 촬영한 사진을 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5(A)에서 보는 바와같이 수삼의 주근과 지근에서 내부표층과 형성층이 가장 염색이 잘되었고, 목질부가 거의 없는 미삼에서는 중심부도 염색되었다. Fig. 5(B)에 보인 사진은 뇌두에 가까운 주근 부위로서 중심부도 상당히 염색되었으며, 뇌두의 경우 사진을 제시하지 않았지만 중심부가 가장 진하게 염색되었다. 수삼의 어떤 부위이든지 간에 표피의 경우는 염색되지 않았으며, 이 결과는 홍삼의 표피층에 polysaccharide 함량이 적은 결과(Table 3)와 일치한다.

감사의 말

본 연구는 한국인삼연초연구소에서 제공한 연구비

에 의해 수행되었다. 이에 감사드린다.

인용문헌

1. Konno, C., Sugiyama, K., Kano, M., Takahashi, M. and Hikino, H.: *Planta Medica*, **50**, 443 (1984).
2. Hikino, H., Oshima, Y., Suzuki, Y. and Konno, C.: *Shoyokigaku Zasshi*, **39**, 331 (1985).
3. Konno, C. and Hikino, H.: *Int. J. Crude Drug. Res.*, **25**, 53 (1987).
4. Konno, C., Murakami, M., Oshima, Y. and Hikino, H.: *J. Ethnopharmacol.*, **14**, 69 (1985).
5. Kim, Y.S., Kang, K.S. and Kim, S.I.: *Arch. Pharm. Res.*, **13**, 330 (1990).
6. Kong, Y.-C., Fong, W.-P., Song, M.-E., Ng, K.-H., Ho, D.-D. and Ng, P.-C.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**, 221 (1990).
7. Gao, Q.P., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Yamada, H.: *Planta Medica*, **55**, 9 (1989).
8. Lee, S.D. and Okuda, H.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**, 67 (1990).
9. Han, Y.N. and Hahn, S.H. and Lee, I.R.: *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**, 274 (1990).
10. Elsorn, L.A. and Morgan, W.T.J.: *Biochem. J.*, **27**, 1824 (1933).