

## 인삼 산성다당체의 비색정량 방법과 그 추출조건 및 안정성

도재호 · 이형옥 · 이성계 · 장진규 · 이성동\* · 성현순

한국인삼연초연구소

\*고려대학교 보건전문대학 식품영양과

(1993년 3월 22일 접수)

## Colorimetric Determination of Acidic Polysaccharide from *Panax ginseng*, its Extraction Condition and Stability

Jae-Ho Do, Hyung-Ok Lee, Seong-Kye Lee, Jin-Kyu Jang,  
Sung-Dong Lee and Hyun-Soon Sung

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

\*Department of Food and Nutrition, Junior College of Allied Health Sciences,

Korea University, Seoul 136-703, Korea

(Received March 22, 1993)

**Abstract** □ The method for colorimetric determination of acidic polysaccharide from *Panax ginseng* was investigated. It is possible to apply the method of carbazole-sulfuric acid to determination of pectin, and also to measure the amount of pectin in the mixture of various high molecular compounds such as starch, cellulose and gum, etc. When the method of carbazole-sulfuric acid was applied to determine the amount of acidic polysaccharide, optical density at 525 nm increased linearly with an increase in the concentration of pure acidic polysaccharide. Effective extraction temperature with water for the determination of the amount of ginseng acidic polysaccharide (GAP) was 80°C. In order to separate or concentrate GAP, it was appropriate to precipitate the extract only once with 80% ethyl alcohol. GAP was very stable at 100°C for 4 hrs in aqueous solution and between pH values of 5.0~12.0.

**Key words** □ *Panax ginseng*, acidic polysaccharide, colorimetric determination, carbazole-sulfuric acid, extraction condition, stability.

### 서 론

인삼의 다당체는 약 20~30%를 차지하는 전분외에 혈당 강하성분인 Panaxan A-U 등의 21종이 알려져 있고,<sup>1)</sup> 생체방어기능 활성화 물질을 열수 추출물로부터 분리한 분획 PG-5-1(단백질 함유 다당체)이 있으며<sup>6)</sup> 그밖에 항보체 활성화 다당체 등이 있다.<sup>7,8)</sup>

Okuda group은 간암 또는 난소암 환자의 복수나 악성 임파선 종양환자의 늑막액이 쥐의 지방조직에서의 지방분해를 촉진한다는 사실을 알아내고 이 지

방분해인자를 "toxohormone-L"이라고 명명하였다.<sup>9)</sup> 이 toxohormone-L은 분자량이 약 70,000 정도의 단백질로써 지방분해를 촉진하는 작용 외에 이 물질을 쥐의 lateral ventricle에 주사하면 사료와 물의 섭취량을 감소시켜 식욕중추에도 관여하는 것으로 나타났다. 이러한 toxohormone-L의 지방분해 촉진작용에 대한 저해물질을 홍삼성분으로부터 찾은 결과 ginsenoside-Rb<sub>2</sub>와 산성다당체였으며, ginsenoside-Rb<sub>2</sub>보다 산성다당체가 그 활성이 훨씬 큰 것으로 보고되었다.<sup>10)</sup> 이 산성다당체는 분자량이 34,600의 pectin 유사

물질로써 주성분은 galacturonic acid( $\alpha$ -1,4 linkage)이며 그외 rhamnose, glucose, arabinose 등으로 구성된 hetero polysaccharide이다.<sup>11)</sup> 이러한 활성을 가진 산성다당체를 인삼으로부터 분리 또는 정량하는 방법은 그 과정이 복잡하고 많은 시간이 소요되기 때문에<sup>12,13)</sup> 간편하고 신속, 정확한 정량방법을 강구하고자 하였으며 산성다당체의 추출조건, 안정성 등의 실험을 행하여 그 결과를 보고하는 바이다.

**재료 및 방법**

**1. 홍삼**

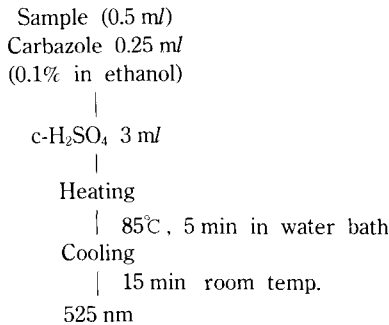
홍삼은 한국담배인삼공사 고려인삼장에서 6년근 수삼으로 제조한 것을 사용하였다.

**2. 산성다당체**

순수 분리한 산성다당체는 일본 Ehime대학의 Okuda 교수로부터 제공받아 사용하였으며, 조산성다당체는 이 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 알콜침전, 투석, 건조하여 사용하였다.

**3. 산성다당체의 비색 측정**

Carbazole-sulfuric acid 방법은 동, 식물체에 함유되어 있는 hexuronic acid나 polyuronide를 구성하고 있는 uronic acid의 양을 측정하는 방법으로 알려져 있다.<sup>14,15)</sup> 고려인삼의 산성다당체는 주로 galacturonic acid의 polymer로서 분자구조상 pectin과 유사한 물질이므로<sup>11)</sup> pectin 정량에 사용되는 carbazole-sulfuric acid 방법으로 Fig. 1과 같이 측정하였으며 blank에는 carbazole 대신에 ethanol을 사용하였다.<sup>16)</sup>



**Fig. 1.** Schematic diagram for determination of pectins or pectin-like substances.

**4. 추출조건**

홍삼분말에 10배량의 증류수를 가하여 추출한 뒤 알콜침전 방법으로 산성다당체 함량을 측정하거나 또는 홍삼분말 물추출물을 사용하여 적정 알콜농도 및 침전회수를 조사하였다.

**5. 열안정성 및 pH 안정성**

인삼에 함유되어 있는 산성다당체의 열안정성은 홍삼분말 물추출물을 사용하여 100°C 에서 4시간 동안 열처리한 뒤, pH 안정성은 80°C 에서 각 pH 조건으로 1시간 처리한 뒤 알콜침전 방법으로 남아있는 산성다당체 양을 조사하였다.

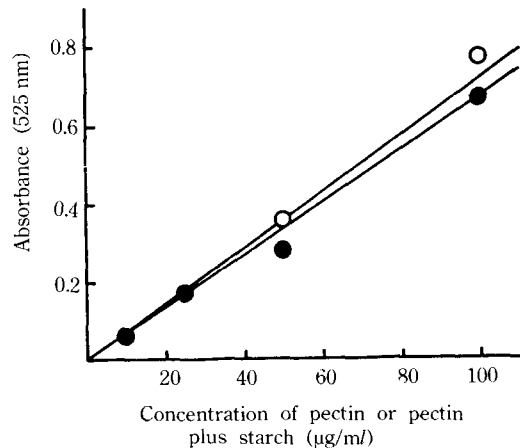
**결과 및 고찰**

**1. Pectin 및 pectin+starch 농도별 발색량**

Pectin이 carbazole-sulfuric acid 방법에 의해 발색되는 정도와 pectin의 한계발색 농도 및 pectin+starch의 농도별 발색정도를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. Pectin과 pectin+starch는 100 µg/ml 농도 이하에서도 비색정량이 가능할 것으로 판단되며 전체적으로 실험결과와 정확도나 재현성 면에서도 매우 우수한 것으로 사료된다.

**2. 고분자 화합물과 공존상태에서의 발색량**

Pectin과 고분자 화합물 특히 고분자 다당류와 공존했을 때 carbazole-sulfuric acid 방법에 의한 발색에

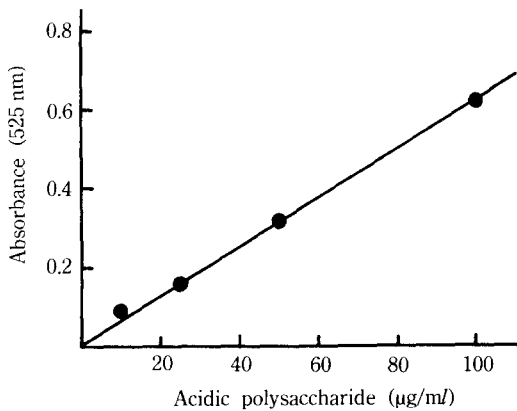


**Fig. 2.** Standard curves of pectin and pectin plus starch. (●-●) pectin; (○-○) pectin plus starch. Final concentration of pectin or starch was 0~100 µg/ml.

**Table 1.** Comparison of absorbance with pectin or pectin plus various high molecular substance

Polymers* (origin)	Absorbance (525 nm)
Pectin (Citrus, Tokyo Kasei)	0.212
Pectin/Soluble starch (Potato, Sigma)	0.227
Pectin/CMC-Na (Sigma)	0.218
Pectin/Amylopectine (Corn, Tokyo Kasei)	0.216
Pectin/Gum arabic (Sigma)	0.231
Pectin/Xylan (Larch wood, Sigma)	0.289
Pectin/Inulin (Merck)	0.306
Pectin/Gum xanthan ( <i>Xanthomonas campestris</i> , Sigma)	0.218
Pectin/Mannan (Baker's yeast, Sigma)	0.193
Pectin/Pullulan ( <i>Aureobasidium pullulans</i> , Sigma)	0.218
Pectin/Laminarin ( <i>Laminaria digitata</i> , Sigma)	0.201
Pectin/Albumin (Bovine, Sigma)	0.172
Pectin/DNA (Salmon testes, Sigma)	0.304
Pectin/Saponin (Red ginseng)	0.187

\*Concentration of each polymer is 25 µg/ml in water.



**Fig. 3.** Standard curve of pure acidic polysaccharide.

미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Xylan, inulin을 제외한 다당류는 pectin과 동량이 공존하여도 발색에 거의 영향을 미치지 않았으며, 당류 이외의 고분자 화합물로서 DNA는 발색정도를 증가시켰고 albumin은 약간 감소시켰다.

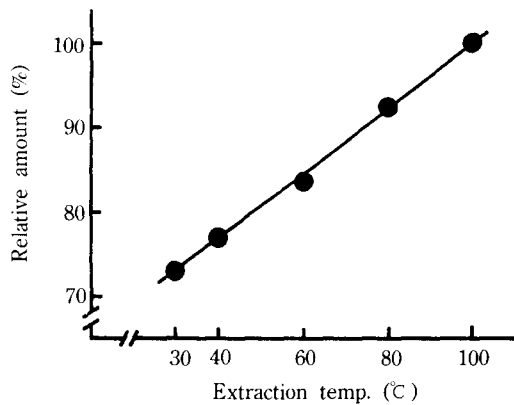
**3. 순수 산성다당체의 표준곡선**

Carbazole-sulfuric acid 방법을 사용하여 순수 산성다당체의 농도에 따른 검량곡선을 작성한 결과는 Fig. 3과 같이 농도에 따른 발색정도가 직선상으로

**Table 2.** Comparison of relative amount of crude acidic polysaccharide in standard curve with pure acidic polysaccharide

Concentration (µg/ml)	Absorbance (525 nm)		Ratio (%)*
	Pure	Crude	
0	0	0	
25	0.162	0.104	64
50	0.319	0.186	58
100	0.621	0.378	61

\*Ratio of crude acidic polysaccharide to pure acidic polysaccharide.

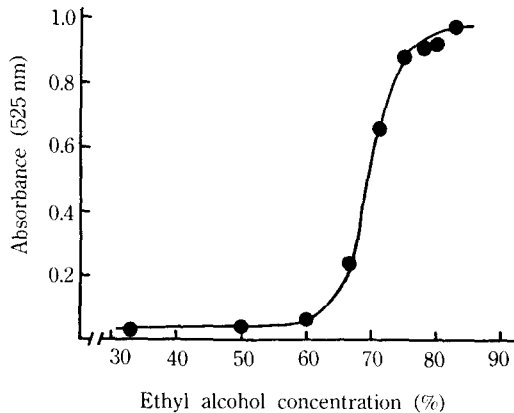


**Fig. 4.** Effect on the amount of acidic polysaccharide by the extraction temperature. 50 ml of distilled water were added to 5 g of red ginseng powder and extracted at each temperature for 1 hr.

나타났다. 이것은 pectin을 표준물질로 사용하였을 때와 유사하며, ethanol 침전, 투석, 건조하여 얻은 조산성 다당체와 순수 산성다당체를 각각 0~100 µg/ml의 농도에서 그 발색정도를 조사한 결과는 Table 2와 같이 조산성다당체의 양은 어느 농도에서라도 순수 산성다당체의 양에 비해 약 60% 정도로 비교적 정확하고 재현성 있는 결과라고 판단되며, 인삼에 함유되어 있는 산성다당체 함량은 carbazole-sulfuric acid 방법으로 비색정량이 가능하다고 판단된다.

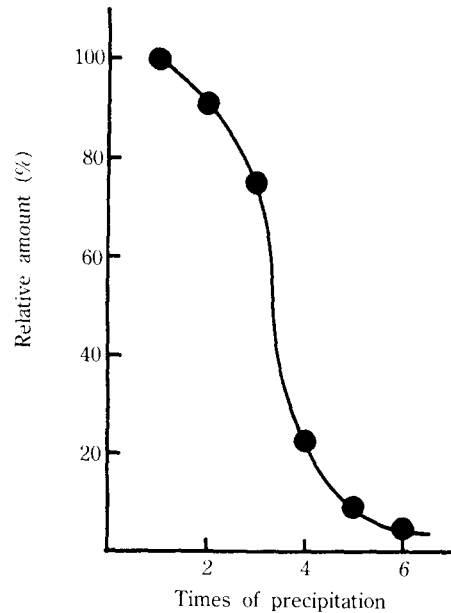
**4. 추출조건**

**추출온도 :** 홍삼분말(2 mm sieve)에 10배량의 증류수를 가한 뒤 30°C 에서 100°C 까지 각 온도에서 1시간 동안 추출하여 냉각한 후 2 ml를 취하여 8 ml의 ethyl alcohol을 가하여 혼합하고 원심분리하였다. 침전물에



**Fig. 5.** Effect of ethyl alcohol concentration on the precipitation of acidic polysaccharide from red ginseng water extract. 300 ml of distilled water were added to 30 g of red ginseng powder and extracted at 4°C for 1 day. The extract was centrifuged at 4°C, 5,900 x g for 30 min. 1~10 ml of ethyl alcohol were added to 2 ml of supernatant and centrifuged. The precipitate was dissolved in 2 ml of distilled water, and diluted 32 fold. Amounts of acidic polysaccharide were determined by carbazole-sulfuric acid method.

다시 2 ml의 증류수를 가하여 완전히 용해시킨 뒤 64 배 희석하여 carbazole-sulfuric acid 방법으로 발색시킨 결과는 Fig. 4와 같다. 발색정도는 추출온도가 높을수록 크게 나타났으며, 온도에 따라 거의 직선적으로 나타나 추출되는 산성다당체의 양은 온도에 비례하여 온도의존성이 매우 큰 것으로 판단되지만 인삼에 함유되어 있는 산성다당체의 함량을 측정하기 위해서 100°C 또는 그 이상의 온도에서 실험을 수행한다는 것은 곤란한 점이 많기 때문에 홍삼분말을 사용하여 산성다당체를 추출할 때에는 80°C에서 행하는 것이 좋다고 생각된다. 한 등<sup>17)</sup>은 홍삼을 물과 0.1 N-NaOH 용액으로 4°C (overnight), 20°C (overnight), 55°C (3 hrs) 및 100°C (1 hr)로 추출하였을 때 추출액중의 uronic acid의 양을 조사하였다. 물추출의 경우 20°C에서 가장 많이 추출되었으며, 0.1 N-NaOH 용액으로 추출하였을 때에는 55°C에서 그 추출량이 가장 많았다. 이것은 추출온도별 추출시간이 다르기 때문에 uronic acid의 양이 추출온도에 따른 일정한 경향이 나타나지 않았으며 각 온도에서 추출된 유리 uronic acid와 polyuronides가 동시에 측정되었을 것



**Fig. 6.** Effect of the times of alcohol precipitation on the amount of acidic polysaccharide. 8 ml of ethyl alcohol were added to 2 ml of water extract and centrifuged.

으로 사료된다.

**산성다당체 침전을 위한 ethyl alcohol 농도 :** 홍삼 분말에 10배량의 증류수를 가한 뒤 4°C에서 24시간 추출하여 4°C에서 5,900 x g로 30분간 원심분리하였다. 산성다당체를 침전시키기 위해서는 어느 농도의 alcohol을 사용하는 것이 바람직한가를 조사하기 위하여 원심분리한 상등액 2 ml에 ethyl alcohol을 1~10 ml를 각각 가하여 혼합하고 원심분리하였다. 각각의 침전물에 다시 2 ml의 증류수를 가하여 완전히 용해시킨 뒤 64배 희석하여 발색시킨 결과(Fig. 5) ethyl alcohol 농도가 60% 이하에서는 침전되는 산성다당체의 양은 매우 적었으며, 60% 이상일 때에는 그 양이 급격히 증가하여 80% 정도에서는 거의 평형에 도달하였다. 이것은 인삼 물추출물에서 산성다당체를 얻기 위해서는 ethyl alcohol을 최소한 80% 정도가 되게 가하여 침전시키는 것이 바람직하다고 판단된다.

**Alcohol 침전회수 :** 인삼에 함유되어 있는 산성다당체를 좀더 순수한 상태로 얻기 위하여 홍삼 물추출물에 ethyl alcohol을 80%되게 가한 뒤 혼합하고 원심분리하여 상등액은 버리고 침전물에 증류수를

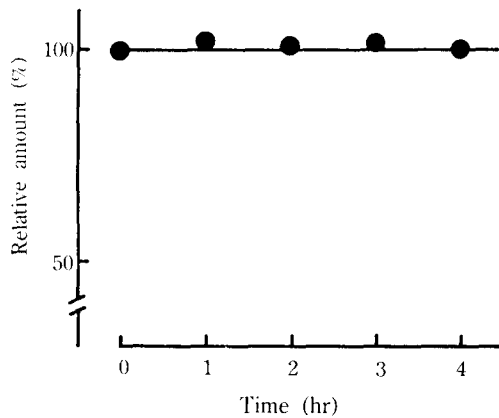


Fig. 7. Heat stability of acidic polysaccharide in red ginseng water extract. Water extract was heat-treated at 100°C for each time. Remaining relative amounts of acidic polysaccharide were determined by the method of carbazole-sulfuric acid.

가하여 완전히 용해시켜 다시 alcohol을 가하였다. 이와 같은 조작을 반복하여 조금이라도 더 순수한 상태에서의 산성다당체 함량을 측정하고자 6회까지 반복 처리하여 침전물중의 산성다당체 양을 조사한 결과(Fig. 6) alcohol 침전을 반복할수록 산성다당체 양은 감소하여 5회 침전시 1회 침전의 10% 정도에 불과하므로 alcohol 침전은 1회가 적합하다고 판단된다.

### 5. 안정성

**열안정성** : 홍삼에 함유된 산성다당체의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 홍삼 물추출물을 100°C 에서 1시간 간격으로 4시간까지 열처리 시키고 난 뒤 분해되지 않고 남아 있는 산성다당체 양을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. Powell 등<sup>18)</sup>이 감귤, 사과, 해바라기 pectin을 0.25 M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 100°C 3시간 가열하여 block polymers를 얻을 수 있었다는 보고와 유사하게 인삼의 산성다당체도 열에 대한 안정성이 매우 크기 때문에 100°C 에서 4시간까지는 거의 분해가 일어나지 않는다는 것을 알 수 있었다.

**pH 안정성** : 산성다당체의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 홍삼 물추출물을 1 N-HCl과 1 N-NaOH로 pH 2~13까지 조정한 뒤 80°C 에서 1시간 동안 처리하여 냉각, alcohol 침전 등의 과정을 거쳐 carbazole-sulfuric acid 방법으로 분해되지 않은 산

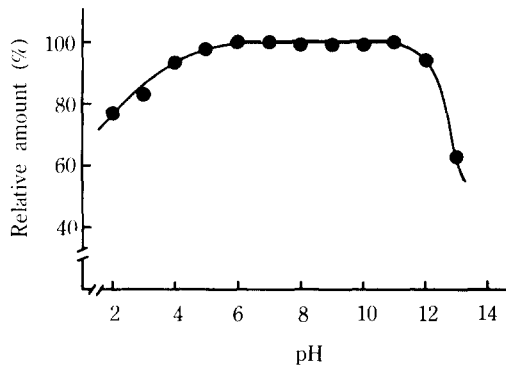


Fig. 8. pH stability of acidic polysaccharide in red ginseng water extract. Each extract in given pH value was heat-treated at 80°C for 1 hr. Remaining relative amounts of acidic polysaccharide were determined by the method of carbazole-sulfuric acid.

성다당체 양을 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. Pectin은 pH 3~4에서 안정성이 가장 크며 강산성에서는 glycosidic linkage가 가수분해되고 알칼리성에서는 ester와 glycosidic linkage가 분해된다고 하였으나<sup>19)</sup> 홍삼에 함유되어 있는 산성다당체는 pH 4~12까지는 비교적 안정한 화합물이며 pH 13에서는 급격히 감소하여 60% 정도에 불과하였다.

### 요 약

암조직에서 분비되는 toxohormone-L에 의한 지방 분해촉진 및 anorexia 증상을 억제하고 개선하는 물질인 인삼의 산성다당체 함량을 비색 정량하는 방법을 조사하였다.

우선 carbazole-sulfuric acid method를 이용하여 pectin을 표준물질로 하여 표준곡선을 작성하였을 때 농도에 비례하였고, 여러 가지 고분자화합물이 공존하였을 때에도 비교적 정량이 가능하였으며, 순수한 산성다당체를 표준물질로 하였을 때에도 재현성이 크게 나타났다. 인삼의 산성다당체 함량 측정을 위한 추출조건으로는 80°C 에서 추출하고, 80% ethyl alcohol 농도로 1회 침전시키는 것이 적합하였다. 산성다당체는 100°C 에서 4시간까지도 안정하였으며, pH 5.0~12.0까지는 매우 안정하였다.

## 인용문헌

1. Konno, C., Sugiyama, K., Kano, M., Takahashi, M. and Hikino, H. : *Planta Medica*, **50**, 434 (1984).
2. Hikino, H., Oshima, Y., Suzuki, Y. and Konno, C. : *生藥學雜誌*, **39**, 331 (1985).
3. Oshima, Y., Konno, C. and Hikino, H. : *J. Ethnopharmacology*, **14**, 255 (1985).
4. Konno, C., Murakami, M., Oshima, Y. and Hikino, H. : *J. Ethnopharmacology*, **14**, 69 (1985).
5. Konno, C. and Hikino, H. : *Int. J. Crude Drug Res.*, **25**, 53 (1987).
6. 大谷和弘, 水谷健二, 笠井良次, 廣瀬久美, 岸 供子, 田中 治, 鳩野俊二, 不破 亨, 周 俊: 第6回 天然藥物の開発と應用 シンポジウム 講演要旨, 80 (1986).
7. Gao, Q.P., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Yamada, H. : *Planta Medica*, **55**, 9 (1989).
8. Gao, Q.P., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Yamada, H. : *Carbohydr. Res.*, **181**, 175 (1988).
9. Okuda, H., Masuno, H. and Lee, S.J. : *Proceedings of the 4th International Ginseng Symposium*, p. 145, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute (1984).
10. Okuda, H., Lee, S.D., Matsuura, Y., Zheng, Y., Sekiya, K., Takaku, T., Kameda, K., Hirose, K., Ohtani, K., Tanaka, O. and Sakata, T. : *Proceedings of International Symposium of Korean Ginseng*, p. 15, The Society for Korean Ginseng (1990).
11. 이성동, 오쿠다 히로미찌 : *고려인삼학회지*, **14**, 67 (1990).
12. Lee, S.D., Kameda, K., Takaku, T., Sekiya, K., Hirose, K., Ohtani, H., Tanaka, O. and Okuda, H. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**, 1 (1990).
13. 이성동, 이광승, 오쿠다 히로미찌, 황우익 : *고려인삼학회지*, **14**, 1 (1990).
14. Dische, Z. : *J. Biol. Chem.*, **167**, 189 (1947).
15. Bitter, T. and Muir, H.M. : *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).
16. Matissek, R., Schnepel, F.M. and Steiner, G. : *Lebensmittelanalytik*, pp. 160-163, Springer-Verlag, Berlin (1989).
17. 환용남, 김선영, 이희주, 황우익, 한병훈 : *고려인삼학회지*, **16**, 105 (1992).
18. Powell, D.A., Morris, E.R., Gidley, M.J. and Rees, D.A. : *J. Mol. Biol.*, **155**, 517 (1982).
19. Belitz, H.D. and Grosch, W. : *Food Chemistry*, p. 244, Springer-Verlag, Berlin (1987).