

백삼의 페놀산 조성과 항산화 활성

최창숙 · 김경임* · 홍희도 · 최상윤 · 이영철 · 김경탁 · 노정해 · 김성수 · 김영찬#

한국식품연구원, *해전대학 외식경영계열
(2005년 12월 5일 접수, 2006년 3월 10일 수리)

Phenolic acid composition and antioxidative activity of white ginseng (*Panax ginseng*, C. A. Meyer)

Chang-Suk Choi, Kyung-Im Kim*, Hee-Do Hong, Sang-Yoon Choi, Young-Chul Lee,
Kyung-Tack Kim, Jeonghae Rho, Sung-Soo Kim, and Young-Chan Kim#
Korea Food Research Institute, *School of Food Service Management, Hyejeon College
(Received December 5, 2005; Accepted March 10, 2006)

Abstract : Phenolic acids of white ginseng were extracted and fractionated into free, esterified, and insoluble-bound forms. The contents of individual phenolic acids in different forms were quantified by gas liquid chromatography. Nine different phenolic acids as free, esterified, and insoluble-bound forms were identified in white ginseng. Total phenolic compounds in different forms of extracts was 0.309% (free form), 0.230% (esterified form) and 0.138% (insoluble-bound form), respectively. Total phenolic acid contents in free, esterified and insoluble-bound form were 889.3, 356.8, 1,176.9 mg/100 g fraction, respectively. Ferulic acid was the predominant phenolic acid, representing 63.7% and 50.9% of total phenolic acids in esterified form and insoluble-bound form, respectively. While caffeic acid was only detected in esterified form. At 10 mg/ml insoluble-bound form quenched 95.9% ABTS free radicals generated from 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). Also, electron donating ability and lipid peroxidation inhibitory activity of insoluble-bound form were higher than other fraction. All phenolic acid fractions scavenged over 80% of hydroxyl radical at 10 mg/ml.

Key words : white ginseng, phenolic acid, antioxidant activity

서 론

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 전 세계적으로 가장 널리 연구되고 있는 생약종의 하나이며, 사포닌, 페놀성 성분, 폴리아세틸렌 성분, 알카로이드 성분, 다당체 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 화학 성분의 조성을 살펴보면 사포닌이 3~5%, 지용성 성분이 1%, 단백질 12~16%, 탄수화물이 50~60%를 차지하며, 이들 성분들이 각각의 생리활성을 나타내지만, 그 중 사포닌 (ginsenoside)에 대한 약물학적, 화학적 연구가 대부분을 차지하고 있다. Brekman²⁾에 의해 인삼 내 유효성분이 사포닌 성분임이 제시된 이후 사포

닌을 중심으로 많은 연구들이 이루어졌고, 중추신경계³⁾, 각종 스트레스⁴⁾, 항당뇨 작용⁵⁾, 간 기능 강화작용⁶⁾, 심혈관계 장애 개선작용⁷⁾ 등에 관한 약리작용이 밝혀졌다. 그러나, 사포닌 이외 인삼 속에 함유된 polyacetylene 성분들이 암세포 증식을 억제하는 것이 밝혀지면서 사포닌 이외 유효성분의 생리활성에 대한 연구가 이루어지게 되었다⁸⁾. 또한, 인삼에서 분리한 순수 사포닌에 대해서는 항산화 효과가 나타나지 않거나 미약한 것으로 보고 되어 있어⁹⁾, 인삼의 항산화 작용들은 사포닌 이외 페놀성 성분에 의한 것으로 인식되고 있다.

인삼의 페놀산 성분은 salicylic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, syringic acid, cinnamic acid, *m*-cumaric acid, *p*-cumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, maltol 등이 존재하는 것으로 보고 되어 있으며¹⁰⁾, TMS (trimethylsilylation) 방법에 따

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-780-9145; (팩스) 031-709-9876
(E-mail) yckim@kfri.re.kr

라 함유량 및 분포가 달라지는 것으로 나타나 있다¹¹⁻¹³⁾ 특히, 인삼 내 주요 페놀산 성분인 ferulic acid는 정상세포에는 무독한 반면 암세포에는 강한 독성을 보이는 것으로 보고 되어 있어 인삼의 항암 효과에 대한 원인 물질로 간주되며¹⁴⁾, 이외에도 대부분의 페놀산 성분들이 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{15,16)}.

인슐린 비의존성 당뇨병자들에게 홍삼을 매일 2.7 g씩 6개월 동안 장기간 투여한 결과 혈청 내 SOD (superoxide dismutase) 활성을 증진시켰고, 홍삼 복용이 노인들의 유산소성 운동 시 발생하는 활성산소로부터 혈청 내 MDA (malondialdehyde) 수준을 저하시키며^{17,18)}, 홍삼 추출액을 500 mg/50 kg B.W/day 복용했을 때 NO (nitric oxide) 생성을 증가시켜줌으로써 혈압을 낮추는 효과가 있었다¹⁹⁾. 또한, 흰쥐에게 백삼추출물을 경구투여 했을 때 홍삼추출물 투여 군에 비해 혈중콜레스테롤 수치의 감소 폭을 유의적으로 높이는 것으로 보고 되어 있다²⁰⁾. 또한, Zhang 등²¹⁾은 arachidonic acid를 기질로 하여 지질산패도를 측정 한 결과, 인삼 추출물액을 첨가시킴으로써 지질의 자동산화로 인해 발생하는 불포화 지방산의 분해도를 효과적으로 억제시키는 것으로 보고하기도

하였다. 백삼과 홍삼에 대한 비교 연구는 대부분 사포닌 함량 분석이나 조추출물 (crude extract)을 실험동물에게 식이를 통해 급여함으로써 나타나는 혈중 지질패턴변화 및 항암연구들이 전부이다. 이²²⁾ 등이 인삼의 뿌리, 잎, 줄기를 이용 부위별 추출물의 항산화 활성을 측정하여 LDL (low density lipoprotein) 산화를 억제하는 것으로 보고하기는 했지만, 아직까지도 *in vitro*에서의 페놀산 분석 및 항산화 활성 검증에 대한 기초적인 실험은 미비한 상황이며, 특히 백삼에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 따라서, 본 연구의 목적은 홍삼에 비해 연구의 폭이 넓지 않았던 백삼으로부터 페놀산 성분을 분리해 내고 각 페놀산 성분들의 항산화 활성을 측정하여, 페놀산 조성과 항산화 활성 간의 상호관련성을 검증하기 위해 실시되었다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

(1) 백삼으로부터 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산 성분들의 분리

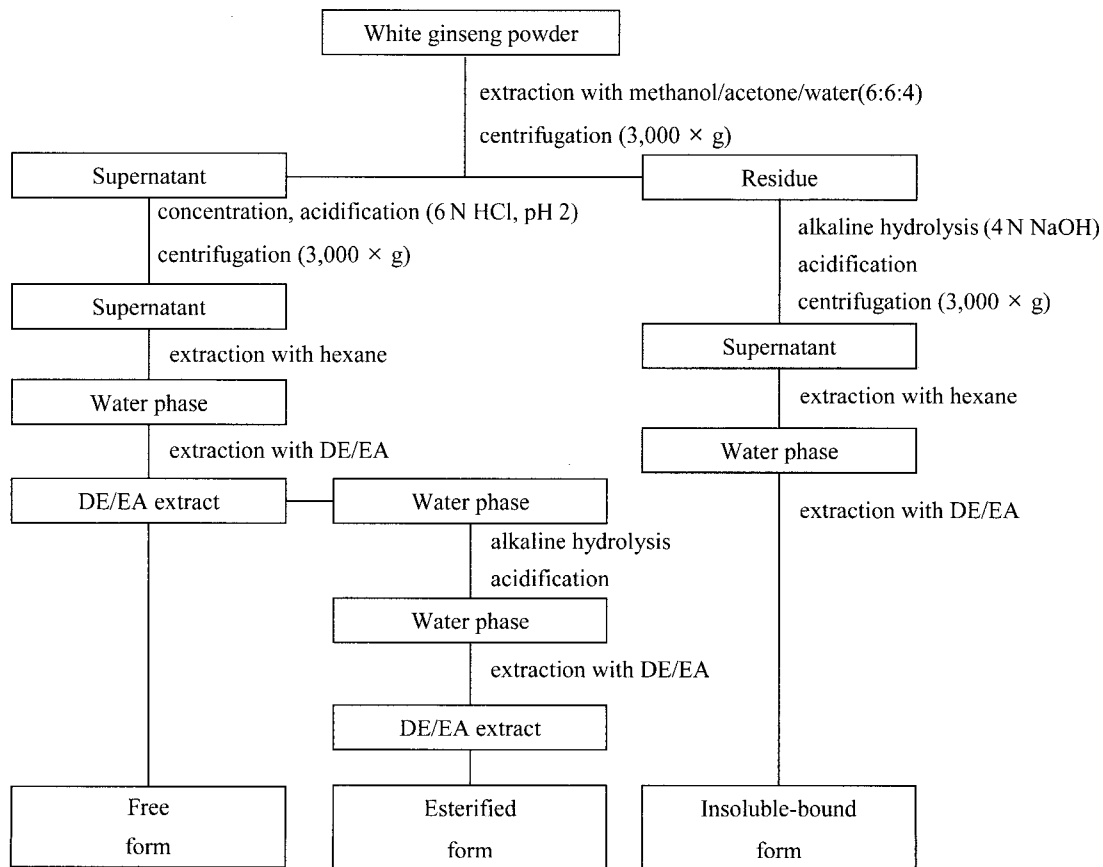


Fig. 1. Procedure for the extraction and separation of free, esterified and insoluble-bound forms phenolic acid from white ginseng. DE/EA means mixture of diethyl ether and ethyl acetate (1 : 1)

백삼으로부터 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산 획분은 Krygier 등²³⁾의 방법에 따라 Fig. 1과 같이 분리하였다. 백삼 분말에 methanol/acetone/water (6/6/4, v/v/v)의 혼합용매를 가하여 상온에서 12시간씩 3회 반복 추출하여 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 상정액은 유리형, 에스테르형 페놀산 분석에 사용하였고, 잔사는 결합형 페놀산 분리 시료로 사용하였다. 위에서 분리한 상정액을 농축하여 6N HCl로 pH 2로 조정하여 여기에 동량의 *n*-hexane을 가하여 3회 세척한 후 diethyl ether/ethyl acetate (1/1, v/v)를 가하여 유리형 페놀산을 추출하였다. 남은 물층은 4 N NaOH를 가하여 4시간 동안 실온에서 가수분해 한 후 6 N HCl로 pH 2로 조정하여 *n*-hexane으로 세척 한 후 에스테르형 페놀산을 diethyl ether/ethyl acetate (1/1, v/v)로 추출하였다. 결합형 페놀산은 원심 분리 후 남은 잔사를 4 N NaOH로 4시간 동안 실온에서 가수분해 후 에스테르형 페놀산과 동일한 방법으로 분리하였다.

(2) 페놀성 화합물 함량

백삼의 페놀산 획분의 phenolic 화합물의 양의 측정하기 위해 Folin-Denis 방법²⁴⁾으로 비색정량 하였다. 건고시료를 메탄올에 10 mg/ml 농도로 녹인 시료 1 ml와 folin 시약 1 ml를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 뒤 10% Na₂CO₃용액 1 ml를 가하여 혼합하여 실온에서 1시간 정치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀산 획분의 phenolic 화합물의 양은 gallic acid를 표준물질로 하여 표기하였다.

(3) GC에 의한 페놀산 분석

건고 시료 1 mg에 BSTFA(bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide)/pyridine(2.5/1, v/v) 1 ml 가하여 80°C에서 30분간 반응시켜 TMS 유도체를 조제하였다. 유도체화된 시료는 ZB-50 capillary column (0.25mm × 30 m, Phenomenex Co., USA)을 사용하여 GC (Hewlett Packard 6890 Series, USA)로 분석하였다. 분석조건은 초기온도 120°C (3분간 유지)에서 250°C 까지 분당 6분씩 승온하고 250°C에서 3분간 유지하였다. 주입구의 온도는 230°C, 검출기 온도는 260°C였으며 flame ionization detector로 검출하였다. 운반가스는 질소를 분당 1 ml로 흘렸으며 split ratio는 1 : 50 이었다. 분리된 페놀산은 표준 페놀산의 retention time과 비교하였으며, 각 페놀산의 함량은 표준 페놀산의 peak area로부터 표준곡선을 작성하였다.

(4) DPPH radical 소거능 시험

DPPH (α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 라디칼에 대한 소

거활성은 Blois 등²⁵⁾의 방법에 따라 시험하였다. 에탄올 적정량에 시험액 0.2 ml와 4×10⁻⁴ M DPPH 용액 0.8 ml를 가하여 10초간 혼합한 후 10분간 실온에서 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.})}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

(5) ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical 소거능

ABTS radical 소거능은 Van den Berg 등²⁶⁾의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 2.0 mM AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane dihydrochloride)를 radical 유도제로 사용하고, 150 μ M ABTS와 혼합하였다. 혼합액은 55°C에서 1시간 동안 반응시키고, 냉각 후 시료액과 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) SOD 유사활성

SOD 유사활성 측정은 Marklund 등²⁷⁾의 방법에 의해 측정하였다. 시료액에 Tris-HCl buffer(pH 8.5)와 24 mM pyrogallol을 첨가하여, 420 nm에서 2분 동안 흡광도의 변화를 측정하였다. 시료액의 활성은 대조구에 대한 pyrogallol의 자동산화 억제율 (%)로 나타났다.

(7) Hydroxyl radical 소거활성 시험

Hydroxyl radical (\cdot OH)소거능은 2-deoxyribose oxidation 법²⁸⁾에 따라 0.1 mM FeSO₄/0.1 mM EDTA·2Na 0.2 ml, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 ml, 시료액 0.2 ml, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2 ml를 혼합한 후 10 mM H₂O₂ 0.2 ml를 가하여 최종부피가 2 ml가 되도록 한 다음 37°C에서 4시간 반응시킨 후 2.8% trichloroacetic acid (TCA)용액 1 ml를 가하여 반응을 중지시키고, 1% thiobarbituric acid (TBA)/50 mM NaOH 1 ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다.

(8) 지질과산화물 생성 억제 시험

Phosphatidylcholine (lecithin)을 chloroform에 녹이고 일정량씩 취해 시험관에 넣은 후 질소가스로 건조시켰다. 여기에 methanol에 녹인 시료액 100 μ l와 2 mM FeSO₄ + 2 mM ascorbic acid/Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시킨다. 5 mM EDTA, 0.7% TBA, 1% phosphoric acid를 첨가하여, 100°C에서 30분간 가열시킨 후

냉각시키고, n-butanol : pyridine = 14 : 1을 넣어 TBA 색소를 추출해 내어 532 nm에서 흡광도를 측정했다. 항산화능은 대조구의 흡광도에서 시료구의 흡광도를 제한 값을 대조구의 흡광도로 나누어 백분율로 나타내었다.

2. 통계처리

모든 실험의 결과는 평균과 표준편차로 산출하였으며, 각 실험치 간의 검증은 SAS를 이용한 ANOVA와 Duncan's multiple range test로 각 군 간의 차이에 대한 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 페놀성 화합물의 함량 및 수율

백삼의 유리형 (free phenolic acid, FPA), 에스테르형 (soluble phenolic acid ester, EPA), 결합형 (insoluble bound phenolic acid, BPA) 페놀산 획분의 수율 및 페놀성 화합물의 총함량은 Table 1과 같다. 백삼의 유리형 페놀산 획분의 수율이 3.082%, 페놀성 화합물의 총 함량은 0.379%로 다른 획분에 비해 높게 나타났다. 또한, 에스테르형이 결합형 페놀산 획분에 비해 수율 및 페놀산 함량이 높았으며, 수율과 페놀성 화합물의 총함량 간에 상관관계를 갖는 것으로 나타났다. 이 등²⁹⁾이 조사한 바에 따르면 국내산 식물성 식품 중 견과물을 기준으로 곡류 0.14~0.98%, 채소류 0.15~1.67%, 과일류의 경우 0.10~4.55%의 페놀성 화합물을 함유한 것으로 보고된 것으로 바탕으로 인삼 내 페놀성 성분은 일반 다른 식물성 식품과 크게 차이가 나지 않았다. 식물체내에 함유되어 있는 페놀성 화합물이 각종 라디칼에 대한 소거작용이 있으며, 페놀성 화합물 함량과 정의 상관관계가 있다는 사실들이 보고 되면서 페놀성 화합물의 함량이 천연물을 이용한 추출물이 갖는 잠재적인 항산화성을 검증하는 일차적인 실험 자료가 될 수 있다³⁰⁾.

Table 1. Total phenolic compound contents and yields of free, esterified and insoluble-bound forms in white ginseng

	Yield (%)	Total phenolic compounds (%)
FPA ¹⁾	3.028	0.379
EPA	1.634	0.230
BPA	0.715	0.138

¹⁾ FPA : Free form, EPA : Esterified form, BPA : Insoluble-bound form

2. GC에 의한 페놀산의 정량

백삼으로부터 분리된 각 페놀산 획분을 TMS 유도체로 만들어 GC로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 유리형, 에스테르

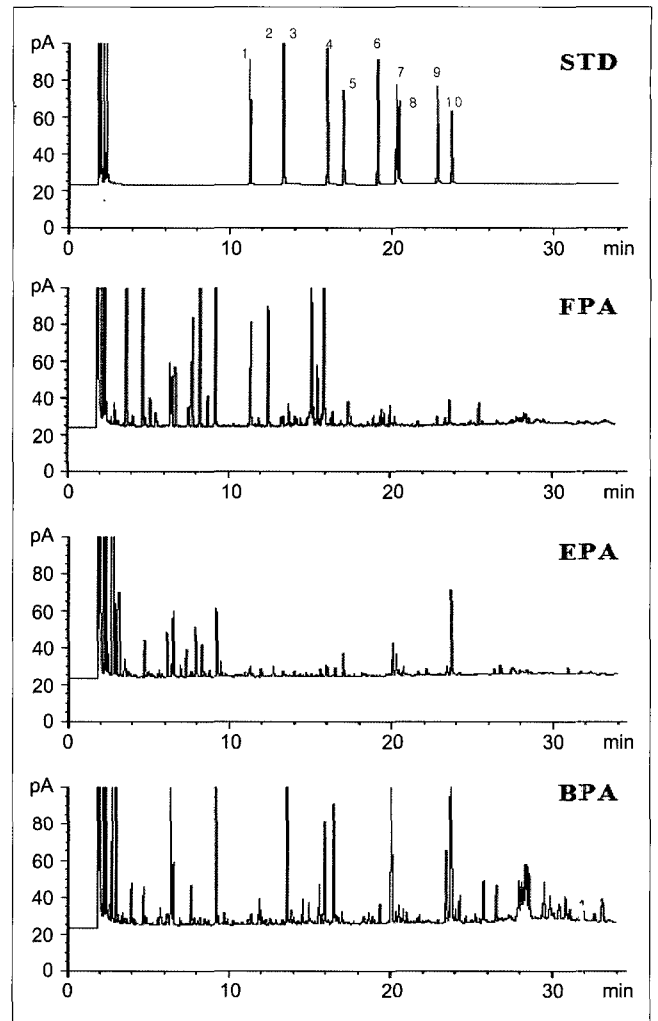


Fig. 2. GC chromatograms of free phenolic acid TMS derivatives (FPA), esterified phenolic acid TMS derivatives (EPA), and insoluble-bound phenolic acid TMS derivatives obtained from white ginseng.

- 1. Salicylic acid, 2. Cinnamic acid, 3. p-Hydroxy benzoic acid, 4. Gentisic acid, 5. Vanillic acid, 6. Gallic acid, 7. p-Coumaric acid, 8. Syringic acid, 9. Caffeic acid, 10. Ferulic acid

형, 결합형 페놀산 획분으로부터 salicylic acid, p-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, vanillic acid, gallic acid, p-coumaric acid, syringic acid, caffeic acid, ferulic acid가 분리되었다. 3가지 형태의 페놀산 획분의 총 함량을 조사한 결과 획분 100 g 당 페놀산 총함량은 결합형 > 유리형 > 에스테르형 순으로 나타났다 (Table 2). 페놀산 중 caffeic acid는 에스테르형 획분에서만 확인되었고, 유리형 분획에는 gentisic acid가 주를 이루며, 에스테르형과 결합형에서는 ferulic acid가 주요 페놀산임을 알 수 있었다. 박 등³¹⁾은 시중에서 판매되고 있는 8종의 인삼 중에 존재하는 페놀산을

Table 2. Phenolic acids contents in phenolic acid fractions

(mg/100 g of fractions)

Phenolic acid	FPA ¹⁾	EPA	BPA	Sum
Salicylic acid	131.6	19.7	30.9	182.2
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	15.3	3.9	105.5	124.7
Gentisic acid	616.3	11.4	99.7	727.4
Vanillic acid	40.8	29.2	20.6	90.6
Gallic acid	19.0	16.1	21.0	56.1
<i>p</i> -Coumaric acid	27.5	27.2	280.4	335.1
Syringic acid	N.D.	8.0	19.9	27.9
Caffeic acid	N.D.	14.1	N.D.	14.1
Ferulic acid	38.8	227.2	598.9	864.9
Sum	889.3	356.8	1,176.9	2,423

¹⁾ See foot note of Table 1.²⁾ N.D. : Not detected.**Table 3.** Phenolic acids contents in white ginseng

(mg/100 g of white ginseng)

Phenolic acid	FPA ¹⁾	EPA	BPA	Sum
Salicylic acid	3.983	0.257	0.177	4.417
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.462	0.051	0.603	1.116
Gentisic acid	18.661	0.149	0.570	19.38
Vanillic acid	1.235	0.382	0.118	1.735
Gallic acid	0.575	0.210	0.120	0.905
<i>p</i> -Coumaric acid	0.832	0.355	1.604	2.791
Syringic acid	N.D.	0.105	0.114	0.219
Caffeic acid	N.D.	0.184	N.D.	0.184
Ferulic acid	1.175	2.969	3.426	7.57
Sum	26.923	4.662	6.732	38.317

¹⁾ See foot note of Table 1.²⁾ N.D. : Not detected.

분석한 결과 ferulic acid와 caffeic acid가 주요 페놀산인 것으로 보고하였고, Jung 등¹²⁾은 백삼과 홍삼으로부터 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산 획분을 얻은 후 GC로 분석한 결과 3가지 형태의 페놀산 획분에서 ferulic acid가 주요 페놀산인 것으로 보고한 것과 달리 본 연구결과에서는 유리형에서는 주로 gentisic acid가 주요 페놀산인 것으로 나타나 다른 경향을 나타냈다. 또한, 건조 백삼 100 g 당 페놀산 함량을 비교한 결과 에스테르형 획분에서 높은 페놀산 함량을 나타낸 것과 달리 본 연구결과에서는 유리형 획분이 전체 페놀산 중 70.3%로 높은 함량을 보였다¹²⁾ (Table 3). Caffeic acid의 경우 공통적으로 에스테르형에서만 검출 가능한 것으로 나타났다. 식물체내에 존재하는 페놀산 분석 시 주로 GC와 같은 기기를 이용하지만, TMS 방식이 실험 간에 차이를 보이고 있어¹³⁾, 시료 전처리 과정에서 발생하는 실험치의 차이로 생각된다.

인삼 중 페놀성 성분은 노화억제 유효 활성성분으로 관심의 대상이 되어 한³²⁾에 의해 생체 내 지질과산화 억제 활성

이 강한 홍삼의 에테르 가용성 산성획분으로부터 maltol이 분리된 이래, 수삼으로부터 salicylic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid가 분리되었고³³⁾, 그 후 위 등^{34,35)}은 DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 소거 활성이 강한 백삼의 에테르 및 에칠아세테이트 가용성 산성획분으로부터 추가로 ferulic acid, caffeic acid, gentisic acid, *p*-hydroxybenzoic acid를 순수 분리하여 보고하였다. 인삼의 페놀산 에스테르형 획분에서만 발견된 caffeic acid는 항암작용³⁶⁾, 항염증작용 및 정균작용³⁷⁾이 있고, 분자구조식이 중금속과 결합이 용이하게 되어 있어 카드뮴 독성에 의한 세포손상을 억제하는 것으로 보고 되어 있다³⁸⁾. Ferulic acid는 죽순, 천궁, 칩 등에 들어 있으며 진통, 진경작용과 평활근 이완작용이 있어서 장관의 경련이나 임신 시 자궁의 수축, 경련을 억제한다고 알려져 있다³⁹⁾. 또한 정상세포와 암세포에 적용한 결과 정상세포에 대하여는 무독성으로 암세포에 대하여는 고독성으로 나타났다¹⁴⁾고 보고되어 있다¹⁴⁾. 따라서, 여러 연구논문들을 통해 밝혀진 인삼의 다양한 생리작용은 주요성분인 사포닌 뿐만 아

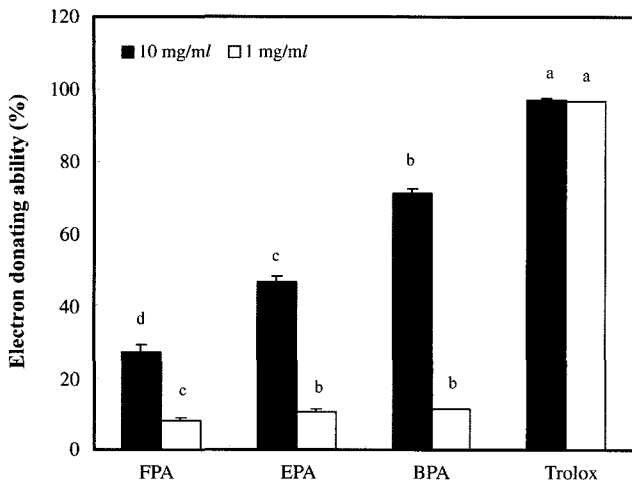


Fig. 3. Electron donating abilities of free, esterified and insoluble-bound forms in white ginseng. FPA: Free form, EPA: Esterified form, BPA: Insoluble-bound form, Trolox: Trolox
Each bar is the mean standard deviations for triplication experiment. Different alphabets in bar show statistically difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

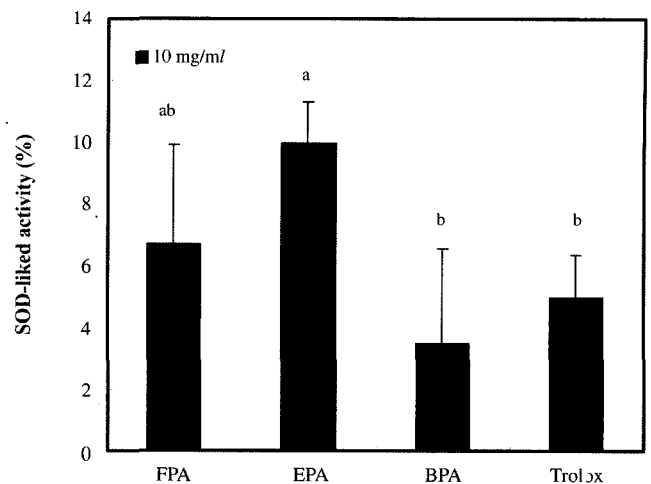


Fig. 5. SOD-like activities of free, esterified and insoluble-bound forms in white ginseng. FPA: Free form, EPA: Esterified form, BPA: Insoluble-bound form, Trolox: Trolox
Each bar is the mean standard deviations for triplication experiment. Different alphabets in bar show statistically difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

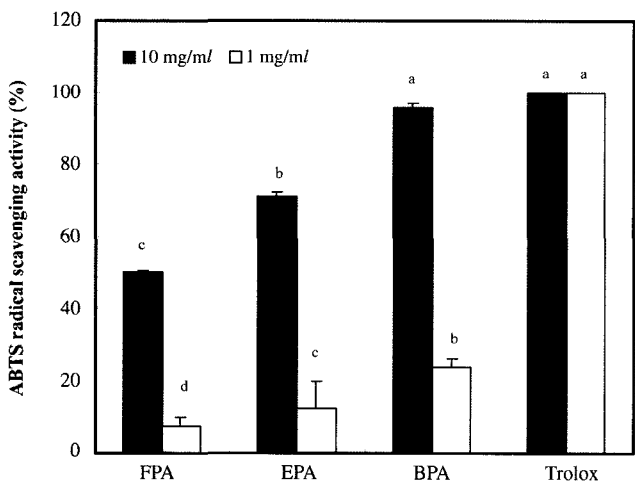


Fig. 4. ABTS radical scavenging activities of free, esterified and insoluble-bound forms in white ginseng. FPA: Free form, EPA: Esterified form, BPA: Insoluble-bound form, Trolox: Trolox
Each bar is the mean standard deviations for triplication experiment. Different alphabets in bar show statistically difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

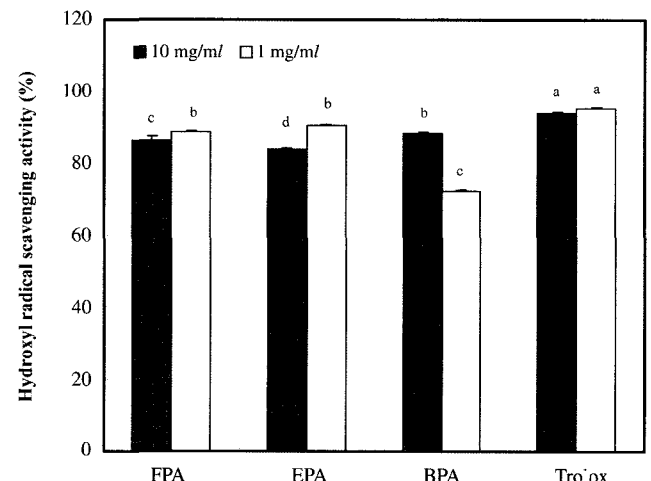


Fig. 6. Hydroxyl radical scavenging activities of free, esterified and insoluble-bound forms in white ginseng. FPA: Free form, EPA: Esterified form, BPA: Insoluble-bound form, Trolox: Trolox
Each bar is the mean standard deviations for triplication experiment. Different alphabets in bar show statistically difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

나라 ferulic acid, caffeic acid, genistic acid와 같은 페놀산 성분들의 작용도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

3. 페놀산 획득의 항산화성

백삼의 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산 획득의 항산화성을 시험한 결과는 Fig. 3-7에 나타내었다. DPPH 라디칼

소거능 활성은 시료의 농도에 의존적으로 활성이 증가되는 것으로 나타났으며, 결합형 > 에스테르형 > 유리형 순이었다. 또한, ABTS 라디칼 소거능 활성에서도 DPPH 라디칼 소거능에서처럼 농도에 의존적으로 활성이 증대되며, 페놀산 획득의 활성도 비슷한 경향으로 나타났다. Zhou 등⁴⁰⁾은 여러 가지 페놀산들의 항산화 활성을 측정했을 때 DPPH 라디칼

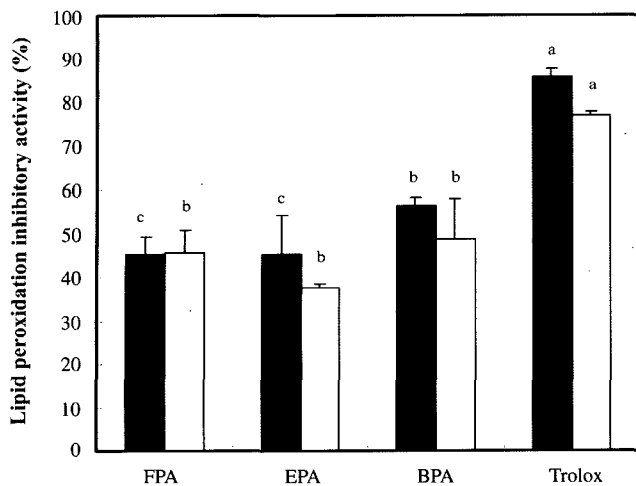


Fig. 7. Lipid peroxidation inhibition activities of free, esterified and insoluble-bound forms in white ginseng. FPA: Free form, EPA: Esterified form, BPA: Insoluble-bound form, Trolox: Trolox
Each bar is the mean standard deviations for triplication experiment. Different alphabets in bar show statistically difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

소거능을 실험한 결과 ferulic acid가 coumaric acid에 비해 활성이 큰 것으로 나타났고, ABTS 라디칼 소거능에서도 ferulic acid의 활성이 caffeic acid, vanillic acid에 비해 높은 것으로 관찰되었다. 따라서, 결합형 및 에스테르형 획분에서 다량 함유되어 있는 것으로 나타난 ferulic acid와 라디칼 소거능 간에 관련성이 있는 것으로 생각된다. 백삼의 페놀산 추출물의 superoxide dismutase (SOD) 유사활성은 Fig. 5에 나타냈다. SOD 유사활성은 pyrogallol이 수용액에서 빠르게 자동산화 (autooxidation)되고, 이러한 자동산화에 superoxide가 관여한다는 원리를 이용한 것이다⁴¹. 즉, superoxide dismutase나 유사활성물질이 존재하는 경우 이의 자동산화가 억제될 수 있고, 억제되는 정도를 비교하여 실험대상 물질의 효능을 비교하는 것이다. 실험결과에서 처럼 대조물질로 사용한 trolox의 활성이 5.0%인데 반해 백삼의 에스테르형과 유리형 페놀산 추출물이 각각 10.0%, 6.7%로 유의적으로 높은 활성을 갖는 것으로 나타났다. 결합형에 비해 에스테르형 분획물의 SOD 유사활성이 유의적으로 높은 것으로 나타나 페놀산 함량과의 관련성을 살펴볼 때 유일하게 검출되는 caffeic acid의 작용 때문인 것으로 사료된다. Caffeic acid는 분자구조식이 중금속과 결합이 용이하여 카드뮴의 해독물질로서 연구되었다³⁶. 따라서, DPPH나 ABTS와 같은 라디칼을 소거하는 활성이 결합형에 비해 낮지만 caffeic acid가 유일하게 발견될 수 있는 획분이므로 백삼의 에스테르형 획분은 중금속 해독작용과 관련된 연구에 사용할 수 있는 추출조건으로 선택 가능할 것으로 생각된다. Hydroxyl 라디칼에 의해 2-deoxyribose

로부터 생성된 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)를 측정할 결과 3종류의 페놀산 획분 모두 80% 이상의 높은 활성을 갖는 것으로 측정되었고, 반응농도와는 관련성이 없는 것으로 나타났다. 1 mg/ml 농도에서는 오히려 결합형에 비해 유리형과 에스테르형의 활성이 높은 것으로 나타났고, 10 mg/ml 농도에서는 결합형 > 유리형 > 에스테르형 순으로 나타났다. 결합형 페놀산 획분은 반응농도와 활성 간에 상관관계가 형성되는 반면, 다른 페놀산 획분은 농도가 증가함에 따라 활성이 감소되는 것으로 나타나 hydroxyl 라디칼 생성을 억제하는데 소요되는 추출물의 농도는 1~10 mg/ml 사이에서 결정될 수 있는 것으로 사료된다. Phosphatidylcholine을 이용한 지질과산화물 생성억제 활성을 조사한 결과 결합형에서 과산화물 생성을 50% 정도 억제하였고, 에스테르형과 유리형은 40%정도 억제하였다. 인삼의 비사포닌계 성분들 중 페놀성 성분들은 인체노화와 관계되는 지질과산화 억제 활성 성분으로서 중요성을 갖고 있으며, maltol, silylic acid, vanillic acid 등과 같은 페놀성 성분은 지질과산화를 유도하는 ferric ion (Fe^{3+})과 안정한 착화합물 (chelates)을 형성하여 Fe^{3+} 를 불활성화시킴으로써 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고되었다⁴². Zhang 등²¹)은 인삼추출액 첨가가 arachidonic acid의 과산화를 억제하여, GC 분석 결과 불포화 지방산 분해가 거의 발생하지 않는 것으로 보고 하였으며, 이 등⁴³)은 인삼추출물과 caffeic acid, vanillic acid, ferulic acid를 비교한 결과 MDA (malondialdehyde) 형성 억제 효과가 같은 농도에서 ferulic acid의 억제율이 높고 인삼추출물을 페놀산 보다 7배 농도를 높였을 때 유사한 활성을 갖는 것으로 보고하였다. 본 연구의 실험 결과에서는 결합형과 에스테르형에 많이 함유된 ferulic acid 양과 비례적으로 활성이 나타나지는 않지만, ferulic acid 양이 높은 결합형과 에스테르형 페놀산 획분에서 지질과산화물 형성 억제 활성이 높게 나타났다. 결합형과 에스테르형의 페놀산 획분은 반응 농도에 상관적으로 활성이 증가되는 반면 유리형 페놀산 획분에서는 농도와 상관없이 약 40% 정도의 지질과산화물 형성 억제를 갖는 것으로 측정되었다. 결합형 획분에는 에스테르형에 비해 ferulic acid 비율이 조금 낮지만 coumaric acid가 높게 함유되어 있어 이 두 페놀산의 항산화 작용으로 생각된다. DPPH 와 ABTS 라디칼 소거능에서는 낮은 활성을 보였던 유리형 페놀산 획분이 deoxyribose나 phosphatidylcholine 산화 반응에서는 다른 페놀산 획분과 유사한 수준의 활성이 나타났는데, 이것은 인삼 중에 다양한 페놀산이 존재하고 이들이 가지는 항산화 활성이 상승작용을 나타낸 것으로 생각되며 향후 인삼내 다양한 성분간의 상호작용에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 백삼으로부터 페놀산 획분을 얻은 후 페놀산 성분들의 조성 및 함량을 조사하고, 이 획분 들의 항산화 활성을 측정하기 위해 실시되었다. 추출수율 및 페놀성 물질의 함유량은 유리형 (FPA) 획분이 가장 높은 것으로 나타났고, GC 분석 결과에서도 페놀산 함유량이 높은 것으로 조사되었다. 그러나, 3종류의 페놀산 획분이 갖는 항산화 활성을 실험한 결과 ferulic acid 함유가 가장 높았던 결합형 (BPA) 페놀산 획분의 라디칼 소거 활성이 유의적으로 높은 것으로 조사되었다. 단, SOD 유사활성에서는 에스테르형 페놀산 획분의 활성이 높은 것으로 나타났는데, 이것은 에스테르형 (EPA) 획분에서만 검출된 caffeic acid에 의한 활성으로 생각된다. 백삼의 페놀산 획분이 홍삼이나 다른 천연물의 추출물에 비해 *in vitro*에서 활성이 낮은 것으로 나타나지만, 동물실험 이나 임상실험에서는 어떠한 결과를 초래할 수 있을 지는 검토해 봐야 할 필요성이 있으므로, 본 연구의 결과는 그동안 사포닌 연구에 비해 많이 이루어지지 않았던 페놀산에 대한 연구뿐만 아니라 후속적으로 이뤄져야 할 임상실험을 위한 기초 자료로서의 가치가 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Park, C. K., Jeon, B. S. and Yang, J. W. : The chemical components of Korean Ginseng. *Food Industry and Nutrition*. **8**, 10-23 (2003).
- Brekhman, I. I. : Gosudarst Isdat et Med. Lit. Leningrad. 1-18 (1957).
- Benishin, C. G., Lee, R., Wang, L. C. and Liu, H. J. : Effect of ginsenoside Rb₁ on central cholinergic metabolism. *Pharmacology*, **42**, 223-229 (1991).
- Kim, N. D., Han, B. H., Lee, E. B. and Kang, J. Y. : Studies on ginseng on antistress effects. *Kor. J. Pharmacog.* **10**, 61-67 (1979).
- Elma, Z. T., Ilian, E. Z. and Christina, I. H. : Effect of ginsenoside Rg₁ on insulin binding in mice liver and brain membrane. *Phytotherapy Res.* **5**, 46-48 (1991).
- Joo, C. N. : The preventive effect on the saponin fraction of *Panax ginseng* C.A. Meyer against ethanol intoxication of rat liver. *Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp.* 63-74 (1984).
- Kang, S. Y., Kim, S. H., Schini, V. B. and Kim, N. D. : Dietary ginsenosides endothelium dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit. *Gen Pharmac.* **26**, 483-487 (1995).
- Hwang, W. I. and Oh, S. K. : Effects of petroleum extract of ginseng root on some enzyme activity in human colon cancer cell. *Korean J. Ginseng Sci.* **10**, 27-35 (1996).
- Han, B. H., Park, M. H., Han, Y. N. and Shin, C. S. : Studies on the antioxidant components of Korean Ginseng (IV) Antifatigue active components. *Yakhak Hoeji.* **28**, 231-235 (1984).
- Shin, J. Y. : New methods for separation and analysis of saponins and fat-soluble non-saponin components in ginseng. Graduate School, Seoul Women's University. Seoul. (2000).
- Park, M. K., Park, J. H., Kim, K. H. and Han, S. B. : Analysis of aromatic acids in *Panax Ginseng* by gas chromatography. *Yakhak Hoeji.* **38**, 389-393 (1994).
- Jung, M. Y., Jeon, B. S. and Bock, J. Y. : Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids in white and red Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Food Chemistry.* **79**, 105-111 (2002).
- Wee, J. J., Heo, J. N. and Kim, M. W. : Analysis of phenolic components in Korean red ginseng by GC/MS. *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 284-290 (1996).
- Yang, H. S. : In vitro evaluation of the cytotoxicity of ferulic acid and vitamin A. *The Korean Journal of oral anatomy.* **27**, 1-10 (2003).
- Cho, J. C. : In vitro evaluation of the cytotoxicity of gallic acid and vitamin A. *The Korean Journal of oral anatomy.* **27**, 83-92 (2003).
- Chun, J. W. : Study on the cytotoxic evaluation of benzoic acid. Graduate School, Wonkwang University. Iksan. (2003).
- Choi, D. S., Kim, Y. K., Park, S. H., Kim, S. J., Choi, K.M. and Choi, J. S. : Effects of red ginseng on the lipid peroxidation of erythrocyte and antioxidant superoxide dismutase (SOD) activity in NIDDM patients. *J Ginseng Korea.* **21**, 153-159 (1997).
- Choi, J. H., Lee, K. M., Kim, C. B. and Kim, H. J. : The effects of red-ginseng intaking on free radical produced during aerobic exercise in the elderly. *The 7th. Fall Congress. J. Kor. Exercise Nutrition.* 21-40 (1999).
- Han, K., Shin, I. C., Choi, K. J., Yun, Y. P., Hong, J. T. and Oh, K. W. : Korea red ginseng water extract increases nitric oxide concentrations in exhaled breath. *Nitric oxide.* **12**, 159-162 (2005).
- Sung, J. H., Jeon, B. H. and Chang, C. C. : Effect of white and red *Panax ginseng* extract on serum lipids level in high-fat-diet fed rats. *J. Ginseng Res.* **28**, 33-38 (2004).
- Zhang, D., Yasuda, T., Yu, Y., Zheng, P., Kawabata, T., Ma, Y. and Okada, S. : Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine.* **20**, 145-150 (1996).
- Lee, S. E., Lee, S. W., Bang, J. K., Yu, Y. J. and Seong, N. S.

- : Antioxidant activities of leaf, stem and root of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **12**, 237-242 (2004).
23. Krygier, K., Sosulski, F. and Lawrence, H. : Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extract and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 330-334 (1982).
 24. AOAC. : Official methods of analysis. 15th ed. Association of official analytical chemists. Washington DC. Cd 8-35 (1990).
 25. Blois, M. S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* **181**, 1199-1200 (1958).
 26. van den Berg, R., Haenen, G. R., van den Berg, H. and Bast, A. : Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* **66**, 511-517 (1999).
 27. Marlund, S. and Marklund, G. : Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474 (1974).
 28. Chung, S. K., Osawa, T. and Kawakishi, S. : Hydroxyl radical-scavenging effect of spice and scavenger from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 118-123 (1997).
 29. Lee, J. H. and Lee, S. R. : Analysis of phenolic substances content in Korean plant food. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**, 310-316 (1994).
 30. Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D. : Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **46**, 4113-4117 (1998).
 31. Park, M. K., Park, J. H., Kim, K. H., Han, S. B. and Han, B. H. : Analysis of aromatic acids in *Panax Ginseng* by gas chromatography. *Yakhak Hoeji.* **38**, 389-393 (1994).
 32. Han, B.H. : Studies on the antioxidant components of Korea ginseng. *Proc. 2nd Int'l Ginseng Symp. Korea Ginseng Research Institute. Seoul, Korea.* 13-17 (1978).
 33. Han, B. H., Park, M. H., Woo, L. K., Woo, W. S. and Han, Y. N. : Studies on the antioxidant components of Korea ginseng. *J. Korean Biochem.* **12**, 33-40 (1979).
 34. Wee, J. J., Park, J. D., Kim, M. W. and Lee, H. J. : Isolation of phenolic antioxidant components from *Panax ginseng*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32**, 44-49 (1989).
 35. Wee, J. J., Park, J. D., Kim, M. W. and Lee, H. J. : Identification of phenolic antioxidant components isolated from *Panax ginseng*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32**, 50-56 (1989).
 36. Huang, M. T., Smar, R. C., Wang, C. O. and Conney, A. H. : Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-tertradecanoyl phorbol-13-acetate. *Cancer Res.* **48**, 5941-5946 (1988).
 37. Chinthalapally, V. R., Dhimant, D., Blpin, K., Shantu, A. and Bandara, S. R. : Effect of caffeic acid ester on carcinogen induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem, Biol. Int.* **84**, 277-290 (1992).
 38. Baek, S. H., Lee, H., Pae, H. O., Ki, Y. O., Kwak, J. S., Yoo, H. G. and Han, D. S. : Development of antitoxic agents from Korean medicinal plants. Part 5. Antitoxic effects of binding of caffeic acid and cadmium on cultured rat neuroglial cells. *Korean J. Toxicol.* **11**, 241-246 (1995).
 39. Park, C.J., Ha, J.O. and Park, K.Y. : Antimutagenic effect of flavonoids isolated from *Oenanthe Javanica*. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 588-592 (1996).
 40. Zhou, K., Yin, J. J. and Yu, L. : ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. *Food Chemistry.* **95**, 46-457 (2006).
 41. Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z. and Gao, X. : Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem. and Bioenerg.* **45**, 41-45 (1998).
 42. Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N. : Studies on the antioxidant components of Korean Ginseng-(V); The mechanism of antioxidant activity of maltol and phenolic acid. *Korean Biochem. J.* **18**, 337-340 (1985).
 43. Lee, H. O. and Park, O. J. : Antioxidant effects of phenolic acids and ginseng extract in aqueous system. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 434-438 (1998).