

ORAC Assay에 의한 인삼의 항산화 활성 연구

김성환^{1*} · 김영목²

¹충부대학교 식품영양학과, ²플로리다 대학교 식품영양학과

Determination of the Antioxidant Capacity of Korean Ginseng Using an ORAC Assay

Sung-Hwan Kim^{1*} and Young-Mok Kim²

¹Dept. of Food Science & Nutrition, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

²Dept. of Food Science & Human Nutrition, University of Florida, Gainesville FL 32611-0720, U.S.A.

Abstract

This study was performed to investigate the antioxidant activity of Korean ginseng using an ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity) assay. Four fractions each (80% ethanol, ethyl acetate, water saturated 1-butanol, and water) were obtained from different ginseng samples (White Ginseng : ; 6 yrs-, 5 yrs-, ; Cork Ginseng : ; 5 yrs-, 4 yrs-). The saponin content of each fraction was quantified by LC/MS, and the antioxidant capacity of the ginseng was measured by the ORAC assay. The ORAC method, which was recently validated using automatic liquid handling systems, has been adapted for manual handling with the use of a conventional fluorescence microplate reader. Furthermore, the ORAC assay provides a direct measure of hydrophilic chain-breaking antioxidant capacity against peroxy radical, which is the exiting and emission of 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine)-dihydrochloride (AAPH). As a result of our experiments, ginsenosides Rg1 and Rb1 were the two major saponins found in the ginseng samples, and Rc, Rb2, Re, Rd, Rg3, and Rh1 were detected in a small quantities. For the antioxidant capacities of the fractions (80% ethanol, ethyl acetate, butanol, and water), we found that the organic solvent fraction had similar antioxidant capacities, and were higher than the capacity of the water fraction. When determining the similarities in each fraction, only the ethyl acetate fraction showed similarity compared to other fractions ($p>0.05$). The antioxidant capacity of ginseng may come from phenolic compounds and some non-polar saponins. However, based on the results of this study, we hypothesize that some acidic polysaccharides and other biological components may contribute to its antioxidant capacity. Additional research is required to determine other possible biological response modifiers that contribute to the antioxidant capacity of ginseng.

Key words : Ginseng, antioxidant activity, oxygen radical absorbance capacity(ORAC) assay, fluorescence microplate reader.

서론

경제 성장과 의학의 발달로 평균 수명이 연장되고 삶의 질에 대한 가치관이 변화하면서 건강의 중요성을 일깨우게 되었고, 최근에는 의학의 도움과 더불어 자연 식품 섭취를 통해 노화와 암, 당뇨병, 심혈관계 질환 등의 만성 퇴행성 질환에 대한 예방을 통해 건강 유지와 증진을 기대하는 경향이 확대되고 있다. 노화 억제와 관련하여 반응성이 큰 활성 산소(superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, alkoxyl, nitric oxide, nitrogen dioxide, singlet oxygen etc.)에 의한 산화적 손상에 관한 연구와 이에 대한 생체 방어 기전을

담당하는 주요 효소로 superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase는 물론이고 carotenoids, vitamine C, vitamine E, glutathione, polyphenol류 등 약용 또는 식용 자원 중에 존재하는 phytochemical에 대한 항산화 활성에 관한 연구가 활발하다(Jin *et al* 2004, Kang JH 2003, Kim SH 1998a, Kim SH 1998b, Kim SH & Kim ES 1997, Kim *et al* 1995, Sofuni T & Ishidato M Jr. 1984, Harman D 1984, Capel ID & Thorndley AC 1983, Oberley CW & Buettner GR 1979).

버섯(Lee *et al* 2006), 상용 채소(Lim *et al* 2006, Woo *et al* 2005, Yun *et al* 2004, Oh & Lee 2003), 약용 식물 소재(Ju *et al* 2006, Park *et al* 2006, Kim *et al* 2005, Yu *et al* 2005, Kim *et al* 2004), 녹차 및 다류(Oh *et al* 2004, Choi *et al* 2003), 적포도주(Choi *et al* 2006), 해조류(Kim *et al* 2006, Kwak *et al* 2005, Kim *et al* 2005), 흑미 색소 물질(Chung &

* Corresponding author : Sung-Hwan Kim, Tel : +82-41-750-6730, Fax : +82-41-750-6418, E-mail : swkim@joongbu.ac.kr

Lee 2003), 곡류 메밀, 수수, 기장, 울무(Kwak *et al* 2004), 왕겨 추출물(Park *et al* 2005), 대추(kim & Joo 2005), 복분자(Yoon *et al* 2003), 구기자(Park *et al* 2005), 겨우살이와 칩뿌리(Song *et al* 2004), 지충(Choi *et al* 2006), 연잎(Lee *et al* 2006), 백지Lee *et al* 2007), 청미래 덩굴의 뿌리와 잎(Song *et al* 2006, Kim *et al* 2004), 당콩 껍질(Rim *et al* 2005)에 이르기까지 수많은 천연물로부터 항산화 활성 탐색을 비롯하여 각종 생리 활성 물질을 얻기 위한 연구가 시도되고 있다.

상기 실험에서 항산화 활성 측정 방법으로는 DPPH(α, α -diphenyl- β picrylhydrazyl)를 이용한 유리 라디칼 소거 효과 측정을 비롯하여 MDA-BSA conjugation 반응 억제 효과 측정, 지질 과산화 억제 효과 측정, tyrosinase 저해 효과 측정, superoxide dismutase 유사 활성 측정, 아질산염 소거 작용 측정, hydroxy radical 소거능 측정, hydrogen peroxide radical 소거능 측정, 인지질-리포솜을 이용한 항산화 측정, TBA(thiobarbituric acid value)를 이용한 항산화 측정, Thiocyanate 법, ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼을 이용한 측정법, 환원력 측정, lipid peroxide value test, 산패 유도 기간 측정, nitric oxide test, β -caroten-linoleate model system을 이용한 항산화 측정, xanthine oxidase 저해 활성 측정 등이 사용되었다.

전통적으로 우리나라를 비롯하여 동양권에서 자양 강장 효과가 있는 약용 자원으로 사용되어온 인삼은 현대 과학적 연구에 의해 주요 성분인 인삼 사포닌의 중추신경계에 대한 작용(Kim 2005, Jung NP & Jin SH 1996, Saito H & Lee YH 1978), 항 피로 및 항 스트레스 작용(Kim 2005, Jung NP & Jin SH 1996, Kim *et al* 1979), 항암 작용 및 항 당뇨병(Kim 2005, Shon *et al* 2004, Park KS *et al* 2003, Jung NP & Jin SH 1996), 지질 대사 개선 작용(Shon MY *et al* 2004, Jung NP & Jin SH 1996), 고혈압 개선 작용(Kim 2005, Lee *et al* 2003, Jung NP & Jin SH 1996), 항산화 작용(Kim 2005, Kim JH & Kim JK 2006, Lee JW & Do JH 2001, Jung NP & Jin SH 1996) 등 많은 효과들이 알려지고 있으며, 최근에 인삼의 항산화 작용에 대한 연구로는 백삼을 탁주 증자법으로 처리한 것과 장뇌삼 부위별 DPPH(α, α -diphenyl- β picrylhydrazyl)를 이용한 유리 라디칼 소거 효과에 의한 항산화 활성 측정(Kim JH & Kim JK 2006)과 인삼과 꿀이 함께 있는 다류 제품에 대해 superoxide dismutase biosensor를 이용한 항산화력 측정(L. Campanella *et al* 2003), 인삼 추출물의 인간 저밀도 지단백 산화 저해 활성 측정과 DPPH 소거능 측정, 돼지 관상동맥에서 homocysteine에 의해 유도된 내피 기능 장애 차단작용(Zhou W *et al* 2006), 하이드록실 라디칼 제거와 철분 매개 지질 과산화로 유도된 불포화 지방산 파괴 억제 작용 등의 연구(Daxian Zhang 1995), 홍미삼 에탄올 추출 분획의 항산화 활성(Lee JW & Do JH 2001) 등이 있다. 국내 항산화

활성 연구는 주로 DPPH(α, α -diphenyl- β picrylhydrazyl)를 이용한 유리 라디칼 소거 효과에 의한 연구가 대부분이다. 외국의 경우, 전자 전달(an electron transfer)의 이론을 기본으로 한 기존 시험 방법들은 주로 항산화 물질의 환원력, 즉 금속 이온, carbonyl과 라디칼을 환원하기 위한 전자 전달력을 측정하는데 초점을 맞추고 있으며, 수소 전자의 전달 이론(a hydrogen atom transfer reaction mechanism)을 기본으로 하는 ORAC 분석법은 radical chain reaction의 가장 핵심적인 단계인 수소 전자 전달과 관련하여 항산화 물질의 free radical 소거 능력 즉, radical chain breaking antioxidant capacity를 측정하는 방법이다(Huang *et al* 2005). 따라서 전자 전달 이론을 바탕으로 한 실험 방법들은 활성 성분에 의한 환원 작용의 측정에 의한 phenol류 등의 함량을 예측하는데 유효한 반면에 본 연구에서 사용한 ORAC assay는 식품내 존재하는 hydrophobic 성분과 hydrophilic 성분에 모두 반응하기 때문에 응용 범위가 넓다는 장점을 가지고 있다(Prior *et al* 2005, Prior *et al* 2003). 또한, 항산화 대조 물질로 수용성 비타민 E를 사용하고 형광 물질을 결합시킴으로써 반응 감도가 예민하여 정확도를 높일 수 있는 방법이기도 하다. 이상 열거된 이외에 몇 가지의 장점을 많이 가지고 있기 때문에 2004년도 플로리다 올랜도에서 열린 항산화 작용의 표준화를 위한 세계학술대회에서 그 동안 항산화 활성 관련 연구에서 많이 소개되었던 기존의 여러 가지 항산화 작용 측정 방법들의 오류를 없애고 더욱 정확한 결과를 낼 수 있는 항산화 작용의 표준화를 위한 대표적인 방법의 하나로 선정되었다(Prior *et al* 2005).

따라서 본 연구에서는 한국 인삼의 항산화 활성을 알아보기 위해 유기 및 물 용매를 사용하여 한국 인삼 중의 생리 활성을 나타내는 유효 물질을 추출하고, 최근 대표적인 항산화 활성 연구 방법의 하나로 권장되고 있으며, Talcott ST (2003) 등에 의해 새롭게 소개되고 있는 Oxygen Radical Absorbance by Fluorescein 분석법(ORAC Assay)을 이용하여 각 용매 분획별 항산화 활성을 측정하였고, 기존의 인삼 연구의 중심이었던 유기 용매 추출 분획인 인삼 사포닌에 대해서 뿐만 아니라 수용성 성분의 생리 활성에 대한 보다 진전된 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험을 위한 인삼 검체는 충남 금산군에 소재하는 국제인삼센터에서 판매하는 인삼 규격 검사 합격품(2004년도산)을 구입하였으며, 표피를 탈피한 백삼(6년근), 백삼(5년근)과 표피를 탈피하지 않은 피부백삼(5년근), 피부백삼(4년근)을 구입하여 각각 100메쉬 이하로 분쇄하여 사용하였다.

2. 인삼 추출물 조제

분쇄한 인삼 분말들을 각각 100메쉬의 표준체를 통과시켜 얻은 것을 검체로 사용하였다. 이들 검체를 각각 약 5 g씩 환류 냉각 장치를 한 250 mL 플라스크에 취해 수욕상에서 80% 에탄올 용액 50 mL를 가해 1시간 추출한 후 상온에서 방치하여 식힌 후 여과하고 잔류물을 취해 다시 반복하는 조작을 2회 더 하여 총 3회 추출한 여액을 환류 냉각 장치를 한 250 mL 플라스크에 취해 65°C 이하 수욕 상에서 rotary evaporator로 감압 농축한다. 잔류물에 증류수 50 mL를 가해 녹인 후 분획 여두에 넣어 에테르 50 mL를 가하여 진탕한 다음 에테르층을 제거하고 수층을 취하는 조작을 2회 더 반복하여 총 3회 추출·분리하여 얻은 수층을 분액 여두에 옮겨 에틸아세테이트로 3회 반복 진탕·추출하여 에틸아세테이트층을 취한다. 물층에 수포화 부탄올 용액 50 mL를 가해 충분히 진탕한 후 물층과 부탄올층이 완전히 층 분리될 때까지 정치한 다음 분리한다. 다시 분리 조작을 2회 더하여 총 3회 추출한 부탄올층과 물층을 각각 얻고 상기 조작을 통해 얻은 80% 에탄올층과 에틸아세테이트층과 부탄올층은 환류 냉각 장치를 한 65°C 이하 수욕상에서 rotary evaporator로 감압 농축하고 물층은 40°C 이하에서 감압 증발 농축 건조하였다. 상기 조작을 통하여 얻은 각각의 분획들은 인삼 사포닌 함량 분석을 위한 검체와 ORAC Assay를 위한 항산화 활성 실험 검체로 사용하였다.

3. Ginsenosides의 분석

80% 에탄올층 엑기스, 에틸아세테이트층 분획, 수포화 부탄올층 분획, 물층 분획의 건조물을 각각 HPLC용 메탄올에 녹여 멤브레인필터 처리 후 Table 1의 조건으로 LC/Mass를 이용하여 인삼 및 압출 인삼의 사포닌 성분 중 ginsenoside Rg1, Re, Rh1, Rb1, Rc, Rb2, Rd, Rg3 의 함량을 분석하였다.

4. ORAC(Oxygen Radical Absorbancy by Fluorescein) Assay

각각의 유기 용매에 의해 추출한 인삼 분획물의 항산화 활성은 peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율을 측정함으로써 이루어졌다. 과산화 라디칼의 생성을 위해 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(Aldrich Co., 이하 AAPH로 표기)를 사용하였고, Talcott & Lee (2002)가 항산화 활성 측정에 사용한 ORAC (Oxygen Radical Absorbancy by Fluorescein) 분석법을 이용하였다. 본 실험에서 검액 및 표준액의 농도별 희석과 실험용 시액들의 제조에는 중성 phosphate buffer (61.6:38.9 v/v, 0.75 M K₂HPO₄ and 0.75M NaH₂PO₄)를 사용하였다. 검량 곡선을 작성하기 위하여 항산화 활성 비교 표준액으로 Trolox (water soluble

analogue of vitamin E, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchrman-2-carboxylic acid, Aldrich Chem, Inc. Milw. WI)를 인산완충액을 가해 각각 0.0, 1.65, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 uM 농도로 희석하고 Fluorescent 표준 용액은 Ou *et al*(2001)의 방법에 따라 Fluorescent Stock (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 10 µL를 phosphate buffer 50 mL에 용해하여 제조하였고 측정기기는 fmax® fluorescent microplate reader(Molecular Devices Co.)를 사용하여 485 nm에서 전자가 여기 excitation되고 538 nm에서 방출 emission되게 조절하여 본 실험에 적용되었다.

Table 1. Condition of LC/Mass for analysis of ginsenosides

Instrument	: Waters Alliance 2996 PDA, ZQ2000		
Column	: Xterra®MS C18		
Column Temp.	: 40°C		
Eluent	: 0.1% AA 18% ACN, 0.1% AA 80% ACN~0.25 mL/min		
MS condition			
	ZQ	Mass	Dwell
	SIR	799	0.4
		637	0.4
		1108	0.4
		1077	0.4
		946	0.4
		783	0.4
			Cone
			59
			53
			30
			45
			69
			60
Injection volume	: 5 µL		

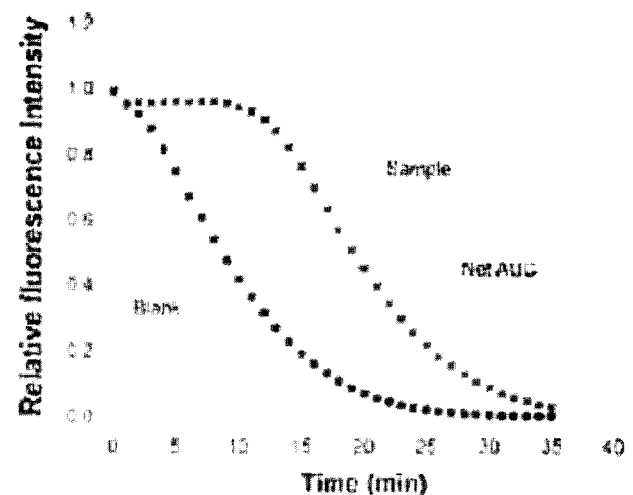


Fig. 1. Antioxidant activity of tested sample expressed as the net area under the curve (AUC).

항산화 활성을 알아보기 위해 각각의 검체들은 phosphate buffer에 의해서 100배 희석된 후에 완전 용해를 위해 10분간 초음파 처리되었고 용해된 샘플들은 50 μ L씩 취해진 후 4.95 mL의 phosphate buffer를 가해 100배 희석된 다음 96 well microplate에 옮겨졌다. 검량 곡선을 작성하기 위해 미리 제조한 각 농도별 Trolox 용액과 검액에 각각 Fluorescent 표준 용액 100 μ L씩 가한 후에 측정기로 분석하기 직전에 측정에서 제조된 peroxy radical 생성 물질인 AAPH 용액(AAPH 400mg을 phosphate buffer 5 mL에 용해시켜 제조)을 표준액과 검액에 multipipet 으로 각각 50 μ L씩 가해 반응시킨 후 즉시 측정을 시작하였다. Fluorescent의 감소 비율은 37°C에서 70분 동안 매 2분 간격으로 fmax® fluorescent microplate reader에 의해 기록되었고, fluorescent 감소 곡선의 영역은 Trolox 표준 검량 곡선과 비교되어 Softmax pro, (Molecular devices, Inc) 에 의해서 기록되었다. 모든 실험은 3회 반복되었으며 그에 의한 ORAC값은 검체 1 g당 μ M Trolox equivalent로 나타내어졌다 (μ M TE/g).

5. 통계학적 분석

실험 결과는 SAS 9.1 통계 프로그램을 이용하여 mean \pm S.E.,

t-test, correlation을 사용하여 각 그룹간의 측정치에 대해 분석하였고 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정하였다(Cody & Smith 2006).

결과 및 고찰

1. 인삼 사포닌 함량

백삼(6년근), 백삼(5년근), 피부백삼(5년근), 피부백삼(4년근)의 80% 에탄올 엑기스, 에틸아세테이트 분획, 수포화 부탄올 분획, 물 분획의 사포닌 함량을 LC/Mass를 사용하여 분석한 결과, 인삼 종류별 각각의 용매 분획 1g 당 ginsenoside Rg1, Re, Rh1, Rb1, Rc, Rb2, Rd, Rg3의 함량은 Table 2에서와 같다. 인삼 중 사포닌은 ginsenoside Rg1과 Rb1이 각 분획들에 주요 성분으로 다량 함유하고 있었으며, Rc, Rb2, Re 등이 뒤를 이었고, 그밖에도 Rd, Rg3, Rh1가 널리 분포하고 있다. 피부백삼 5년근의 경우 에탄올 분획과 수포화 부탄올 분획에서 다른 인삼 분획에 비해 높은 함유량을 보였으나, 일부 인삼 용매 분획에서 피크가 겹쳐 각각의 사포닌 성분 분리가 어려웠으며, 또한 인삼 중 사포닌 모든 성분을 분석할 수 없어 인삼 재배 기간과 인삼 종류별 각각의 분획에 대한 사포

Table. 2 Contents of saponins on each fractions which extracted from several ginseng

(Concentration are in mg/g of ginseng fractions)

Fraction	Ginseng	Rg1	Re	Rh1	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3
EtOH	W(6)	41.32476	40.59073	8.949476	64.19395	19.37621	17.5171	4.128024	0.360403
	W(5)	50.35615	41.84569	14.89158	61.31483	22.04513	21.28946	7.427134	0.11984
	C(5)	62.75241	52.14998	4.987546	76.99505	29.21529	28.78905	9.726045	0.76215
	C(4)	46.28425	39.58595	int ¹⁾	56.76777	22.97113	23.66522	6.952389	0.592794
EtOAc	W(6)	55.82568	17.59424	int	10.62156	int	int	int	2.538601
	W(5)	31.95843	5.365915	13.67115	int	int	int	int	1.846559
	C(5)	77.16767	24.0569	36.47282	15.62906	1.820163	1.275796	1.213755	4.747755
	C(4)	39.6173	8.573441	2.567606	int	int	int	int	2.911992
BuOH	W(6)	85.24972	78.97504	1.736423	110.8754	37.37106	34.54809	9.655203	0.132886
	W(5)	69.2292	63.99759	9.109277	102.0522	40.16723	39.19249	15.80458	0.005422
	C(5)	63.0513	63.21278	int	109.0357	39.7348	41.14449	14.14573	int
	C(4)	114.424	108.2997	1.962586	85.8118	40.82392	36.77863	21.11511	0.833576
H ₂ O	W(6)	0.047553	0.067571	0.002633	0.16231	0.031473	0.032329	0.008516	0.004447
	W(5)	0.382842	0.84007	0.00648	0.807032	0.301392	0.225618	0.231731	0.016118
	C(5)	0.156494	0.24734	0.008073	0.363125	0.093728	0.076352	0.065738	0.02175
	C(4)	0.147694	0.230649	0.005576	0.338001	0.083215	0.068323	0.05849	0.012835

¹⁾ int- interference peaks concentration could not be determine.

닌 함량을 비교하는데 한계가 있었다.

2. ORAC(Oxygen Radical Absorbance by Fluorescein) 실험

인삼의 항산화 활성을 알아보기 위해 백삼(6년근), 백삼(5년근), 피부 백삼(5년근), 피부백삼(4년근)의 80% 에탄올 엑기스, 에틸 아세테이트 분획, 수포화 부탄올 분획, 물 분획을 각각 인산 완충액에 용해하여 AAPH에 의한 peroxy radical의 생성과 소멸에 따른 fluorescent의 감소율을 ORAC Assay에 의해 측정된 결과, 인삼의 각 분획별 항산화 활성은 Table 3과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 백삼(6년근)과 백삼(5년근)의 항산화 값은 에탄올 엑기스의 경우 각각 25.9±4.5, 22.4±2.2이었고, 에틸아세테이트 분획의 경우 17.8±2.8, 15.2±2.5이었고, 부탄올 분획은 21.4±1.6, 21.3±1.2이고, 수층 분획은 14.4±1.4, 13.1±1.9를 나타냈다. 피부백삼(5년근)과 피부백삼(4년근)은 에탄올 엑기스의 경우 각각 27.2±3.0, 26.5±2.5이었고,

Table 3. Antioxidation activity of each fractions which extracted from several ginseng

Fraction	White ginseng 6yrs.	White ginseng 5yrs.	Cork ginseng 5yrs.	Cork ginseng 4yrs.	t-test
EtOH	25.9±4.5	22.4±2.2	27.2±3.0	26.5±2.5	0.3256
EtOAc	17.8±2.8	15.2±2.5	24.6±4.3	21.3±2.6	0.0300*
BuOH	21.4±1.6	21.3±1.2	22.3±4.3	27.2±3.4	0.1234
H ₂ O	14.4±1.4	13.1±1.9	14.7±0.7	19.1±5.3	0.1515

Each value represents Mean±SE. of triplicates.

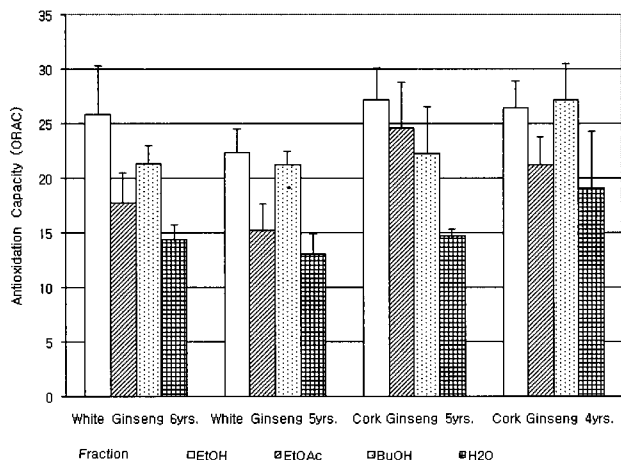


Fig. 2. Antioxidation activity of each fractions extracted from several ginseng.

Each value represents Mean±SE. of triplicates.

에틸아세테이트 분획의 경우 24.6±4.3, 21.3±2.6이었으며 부탄올 분획은 22.3±4.3, 27.2±3.4이고, 수층 분획은 14.7±0.7, 19.1 ± 5.3를 나타냈다.

각 검체 인삼들의 80% 에탄올 엑기스, 에틸아세테이트 분획, 수포화 부탄올 분획, 물 분획들의 각 분획 상호간의 유의성 비교에서는 모든 인삼 검체의 에틸아세테이트 분획에서만 유의성을 나타내었다($p>0.05$). 인삼 중의 유효 성분이 많이 추출·함유되어 있는 80% 에탄올 엑기스에서 유의성이 매우 낮았고 일반적으로 사포닌 성분을 많이 함유한 부탄올 분획이 사포닌이 거의 없는 수층 분획과 비슷했다. 또한, 각각의 용매에 따른 추출물 상호간의 상관관계에 있어서도 Table 4에서 보는 바와 같이 에탄올 엑기스와 에틸아세테이트 분획이 상관성과 유의차($p>0.05$)가 크게 나타났으며, 부탄올 분획과 물 분획, 에탄올 엑기스와 부탄올 분획, 에틸아세테이트 분획과 부탄올 분획 사이에서 유의성을 나타내었다($p>0.05$). 인삼 중의 항산화 활성이 80% 에탄올 엑기스, 에틸아세테이트 분획, 수포화 부탄올 분획, 물 분획 모두에서 나타났고 비교적 전체 유기용매 분획의 값이 비슷하였으며, 수층 분획이 다소 낮은 활성을 보였다. 인삼 중 항산화활성은 에틸아세테이트층으로 이행되는 폴리페놀 계통 성분이나 일부 비극성의 사포닌에 의한 것으로 추측되고 있으나, 모든 분획에서 항산화 활성이 나타난 것으로 미루어 이들 외에 산성 다당체 등 다른 생리 활성 물질에 대한 연구가 요구된다. 재배 연도가 같은 5년근 백삼과 피부백삼간의 항산화 활성을 비교해 본 결과에서 에틸아세테이트 분획에서만 유의성($p>0.05$)과 상관성이 0.95957로 모두 높게 나타내어 백삼과 피부백삼간의 항산화 활성에 대해서는 더 많은 검토가 필요할 것으로 생각된다.

인삼의 항산화 활성 연구와 관련하여 과산화 라디칼 소거능에 대한 직접적인 문헌 보고가 거의 없어 비교가 어려웠다. 국내에서는 Lee & Do(2001)가 홍미삼으로부터 얻은 60% 에탄올 추출 분획을 이용하여 DPPH에 의한 수소 공여능을 실험하였으나, 반응 전 항산화값이 2.00에서 반응 1분 경과 뒤에는 1.80, 10분 경과 뒤에는 1.85를 나타내어 반응 초기에 홍미삼의 항산화 물질이 DPPH와 완만하게 반응한 결과로

Table 4. The correlations of each fractions

	EtOH	EtOAc	BuOH	H ₂ O
EtOH	1			
EtOAc	0.85119***	1		
BuOH	0.62673**	0.58833*	1	
H ₂ O	0.47709	0.41614	0.76439**	1

Each value represents Mean±SE. of triplicates.

인삼은 항산화 활성이 낮은 것으로 판단되었다. 그러나 linoleic acid에 대한 산화 방지 효과는 1,500 ppm에서 약 72.23%를 보였고, LDL에 대한 산화 방지 효과는 220ppm에서 22.52%를 나타내는 것으로 보고하였다. 김과 김(2006)은 장뇌삼 부위별 물 추출물, 80% 에탄올 추출물 80% 메탄올 추출물의 항산화 활성 측정 시 물 추출물의 경우 잎 추출물이 83.82% 뿌리 추출물이 71.18%이었고 80% 에탄올 추출물의 경우 잎 추출물이 89.74% 뿌리 추출물이 79.22%이었고, 80% 메탄올 추출물의 경우 잎 추출물은 88.37%, 뿌리 추출물은 85.67%를 나타내어 장뇌삼의 경우 항산화 활성을 갖는 것으로 추측하였다. 도 등(1989)은 백삼 물 추출물의 갈변 반응 중 비효적 갈변에 의해 환원력이 증가하며 70℃에서는 120시간 열처리 하여도 수소 공여능 증가가 거의 없지만 열 처리 온도가 높고 시간이 길어질수록 갈색도 증가와 항산화능이 거의 비례한다고 하였다. 그밖에 한국 인삼 중 폴리페놀 화합물을 분리하여 이들이 xanthine oxidase 저해 작용과 tyrosinase 저해 작용을 나타냈다는 보고(Choi *et al* 2002)와 Loi *et al*(2003)은 인삼고분단 약물에서 지질 자동 산화계에서 항산화능과 DPPH radical 소거능, xanthine oxidase 저해능, H₂O₂-Fe⁺⁺계에서 지질 과산화 반응 억제 등을 보였다고 하였으나, 인삼을 함유한 약제에 대한 보고로 인삼만의 활성에 대해서는 알 수 없었다. Kim *et al*(1982)과 Kim *et al*(1983)은 백삼의 갈변에 관한 연구로 수삼 건조 중 폴리페놀 화합물 변화와 polyphenol oxidase에 대해 보고하였다. Zhang *et al*(1996)은 H₂O₂-Fe⁺⁺계에서 지질 과산화 억제에 대해 인삼 수용성 엑기스와 비타민 E 등을 여러 농도로 각각 첨가하는 TBA(thiobarbituric acid value)를 이용한 항산화능 측정을 하여 인삼 중의 항산화는 지질 과산화 과정 중 TBARS 형성과 아라키돈산의 감소에 의한 것으로 광범위한 약리작용이라고 보고하였다. Ali M B *et al*(2005)는 인삼의 배양 과정 중 2.5% CO₂농도에서 45일 배양 시 배양 인삼 현탁액 중에 총 페놀 함량이 60%, 플라본노이드 함량이 30%, DPPH에 의한 항산화력이 20%씩 각각 증가한다고 하였다. 이밖에도 Campanella L *et al*(2003)은 시판되고 있는 인삼과 꿀이 함유된 다류에 대해 항산화 활성을 검토하였으며, 본 연구 결과와 비교가 어려웠다.

본 연구에서 사용한 ORAC assay는 2004년도 플로리다 올랜도에서 열린 항산화 작용의 표준화를 위한 세계학술대회(The First International Congress on Antioxidant Method in 2004)에서 기존의 여러 가지 항산화 작용 측정 방법들의 오류를 없애고 더욱 정확한 결과를 낼 수 있는 대처 방안으로 선정된 the oxygen radical absorbance capacity assay(ORAC), the Folin-Ciocalteu method, the trolox equivalent antioxidant capacity assay(TEAC) 중 하나이다. 이밖에도 최근에 많이 사용되고 있는 항산화 작용 측정 방법으로 HAT base -Total radical trapping antioxidant parameter(TRAP), Crocin bleaching

assay, Inhibited oxygen uptake(IOU), Inhibition of linoleic acid oxidation, Inhibition of LDL oxidation, ET base -Ferric ion reducing antioxidant parameter(FRAP), DPPH(α, α -diphenyl- β picrylhydrazyl), Copper (II) reduction capacity 등이 소개되고 있다(Prior *et al* 2005).

Prior *et al*(2005)은 ORAC Assay는 수소 전자의 전달을 기본으로 하여(a hydrogen atom transfer reaction mechanism, HAT) 인체에도 적용이 가능한 가장 적절한 방법으로 소개하고 있으며, Folin-Ciocalteu method는 전자 전달의 이론(an electron transfer, ET)을 바탕으로 주로 환원 작용의 측정에 의한 phenol류의 함량을 측정하는데 사용되고 있고, TEAC assay 역시 Folin-Ciocalteu method와 같이 전자 전달의 이론을 바탕으로 구축되어졌다고 하였다.

Huang *et al*(2005)와 Prior *et al*(2003)에 의하면 전자 전달 이론은 주로 항산화 물질의 환원력, 즉 금속 이온, carbonyl과 라디칼을 환원하기 위한 전자 전달력 측정에 의한 phenol류 등의 함량을 예측하는데 유효한 반면에 본 연구에서 사용한 ORAC assay는 수소전자의 전달을 기본으로 하여 radical chain reaction의 가장 핵심적인 단계인 수소 전자 전달과 관련하여 AAPH에 의해 생성된 free radical에 대한 항산화 물질의 소거 능력, 즉 radical chain breaking antioxidant capacity를 측정함으로써 식품 내 존재하는 hydrophobic 성분과 hydrophilic 성분 모두에 반응하기 때문에 응용 범위가 넓다는 장점을 가지고 있다고 하였다.

또한, 항산화 대조 물질로 수용성 비타민 E의 일종인 Trolox (water soluble analogue of vitamin E, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetra methylchrman-2-carboxylic acid)를 대조 표준액으로 사용하였고, 과산화 라디칼의 생성을 위해 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride(AAPH)를 사용하였으며, 검체 용액과 표준액에 Fluorescent 결합시켜 형광 검출기에 의해 시간 경과에 따른 peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율을 측정하는 방법으로 측정 감도가 예민하여 정확도를 높일 수 있는 방법이기도 하다.

ORAC assay는 쉽게 자동화가 가능하고 자동화에 의한 결과가 매우 효율적이라는 장점을 가지고 있으며, 최근의 연구 결과에 의하면 96 혹은 46 well microplate와 fluorescence microplate reader를 사용한 ORAC assay의 결과가 이전의 방법보다 더욱 효과적이었다는 연구 결과가 나왔다(Huang *et al* 2002, Ou *et al* 2001). 그밖에도 ORAC assay는 온도에 매우 민감한 방법이기 때문에 자동화에 의한 온도 조절 시스템은 정확한 항산화값을 보장해 인체에도 적용이 가능한 가장 적절한 방법으로 소개되고 있다(Prior *et al* 2005). 이와 같은 여러 가지의 장점들 때문에 최근 식품학과 식품산업계에서는 ORAC assay의 결과에 따른 식품의 항산화 작용값과 Folin-Ciocalteu로부터의 total phenol 류의 결과를 함께 보고

하는 경향으로 옮겨 가고 있다.

요 약

인삼의 여러 생리 활성 가운데 항산화 정도를 알아보기 위하여 백삼(6년근), 백삼(5년근), 피부백삼(5년근), 피부백삼(4년근)의 80% 에탄올 엑기스, 에틸아세테이트 분획, 수포화 부탄을 분획, 물 분획을 얻은 후 LC/Mass를 사용하여 사포닌 함량을 조사하고 기존의 여러 가지 항산화 작용 측정 방법들의 오류를 없애고 더욱 정확한 결과를 낼 수 있는 대처 방안으로 선정된 ORAC Assay에 의해 항산화 활성을 검토하였다. 인삼 중 사포닌은 ginsenoside Rg1과 Rb1이 주요 성분으로 다량 함유하고 있었으며, Rc, Rb2, Re 등이 뒤를 이었고, 그밖에도 Rd, Rg3, Rh1가 널리 분포하고 있었다. 피부백삼 5년근의 경우 에탄올 엑기스와 수포화 부탄을 분획에서 다른 인삼 분획에 비해 높은 함유량을 보였으나 실험의 한계상 인삼 재배 기간과 인삼 종류별 각각의 분획에 대한 사포닌 함량 비교는 어려웠다.

인삼의 각 분획별 항산화 활성은 80% 에탄올 엑기스, 에틸아세테이트 분획, 수포화 부탄을 분획, 물 분획 모두에서 나타났고 비교적 전체 유기 용매 분획의 값이 비슷하였으며, 수층 분획이 다소 낮은 활성을 보였다. 검체 인삼들의 각 용매추출 분획 상호간의 유의성 비교에서는 모든 인삼 검체의 에틸아세테이트 분획에서만 유의성을 나타내었다($p>0.05$).

인삼 중 항산화 활성은 에틸아세테이트 층으로 이행되는 폴리페놀 계통 성분이나 일부 비극성의 사포닌에 의한 것으로 추측되고 있으나 모든 분획에서 나타난 것으로 보아 이들 외에 산성 다당체, 당 단백질, 수용성 다당류 등 다른 생리 활성 물질에 대한 연구가 요구된다.

감사의 글

본 연구는 중부대학교 교내 연구비 지원과 교수 해외 연구년 지원 사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

김동현 (2005) 인삼과 건강. 도서출판 효일, 서울. pp 15-85.
 Capel ID, Thomley AC (1983) Lipoperoxide levels, glutathione status and glutathione peroxidase activity in liver and tumors of mice bearing the lewis lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys* 6: 167-172.
 Cerutti A (1985) Prooxidant states and tumor production. *Science* 227: 375-381.
 Choi HJ, Zhang YB, An BJ, Choi C (2002) Identification of

biologically active compounds from panax C. A. Meyer. *Korean J Food Sci Technol* 34: 493-497.
 Choi SY, Kim SY, Hur JM, Choi HG, Sung NJ (2006) Antioxidant activity of solvent extracts from *Sargassum thunbergii*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 139-144.
 Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS (2003) The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 723-727.
 Choi YM, Yu KW, Han NS, Koh JH, Lee JS (2006) Antioxidant activities and antioxidant compounds of commercial red wines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1286-1290.
 Chung YA, Lee JK (2003) Antioxidative properties of phenolic compounds extracted from black rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 948-951.
 Davalos A, Gomez-Cordoves C, Bartolome B (2004) Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J Agric Food Chem* 52: 48-54.
 Zhang D, Yasuda T, Yu Y, Zheng P, Kawabata T, Ma Y, Okada S (1996) Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine* 20: 145-150.
 Do JH, Kim KH, Jang JG, Yang JW (1989) Changes in color intensity and components during browning reaction of white ginseng water extract. *Korean J Food Sci Technol* 21: 480-485.
 Harman D (1984) Free radical theory of aging. *Age* 7: 111-131.
 Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Prior RL (2002) High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* 50: 4437-4444.
 Huang D, Ou B, Prior RL (2005) Reviews, The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53: 1841-1856.
 Jin TY, Park JR, Kim JH (2004) Electron donating abilities, nitrite scavenging effects and antimicrobial activities of smilax china leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 621-625.
 Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ (2006) Antioxidative activity of hot water extras from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 7-14.
 Jung NP, Jin SH (1996) Studies on the physiological and biochemical effects of korean ginseng. *Korean J Ginseng*

- Sci* 20: 431-471.
- Kang JH (2003) Studies on the radical scavenging effects and the inhibitory effects on ace activity of several flavonoids. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1318-1322.
- Kim BM, Jun JY, Park YB, Jeong IH (2006) Antioxidative activity of methanolic extracts from seaweeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1097-1101.
- Kim DI, Lee SH, Her EY, Cho SM, Park HJ (2005) Screening of natural plant resources with acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 427-432.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR (2004) Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 36: 333-338.
- Kim HK, Joo KJ (2005) Antioxidative capacity and total phenolic compounds of methanol extract from *Zizyphus jujuba*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 750-754.
- Kim JH, Kim JK (2006) Antioxidant activity and functional component analysis of Korean mountain ginseng's different sections. *Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1315-1321.
- Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC (2005) Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Ssyela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 937-941.
- Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC (2006) Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela clava* according to the processing methods and solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 278-283.
- Kim ND, Han BH, Lee EB, Kong JY (1979) Studies on ginseng on antistress effects. *Korean J Pharmacog* 10: 61-65.
- Kim ND, Kang SY, Choi WS, Kim SH (1996) Pharmacological actions of ginseng(The endothelium related response). *Korean J Ginseng Sci* 20: 416-430.
- Kim SH (1998a) Nitric oxide production ability and its formation mechanisms in macrophage TIB 71 cell line by polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. *J Korean Soc Food Nutr* 27: 333-337.
- Kim SH (1998b) Studies on anti-microbial and anti-cancer functions of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 27: 1183-1188.
- Kim SH, Kim ES (1997) Studies on the immunomodulating effects of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. on macrophage. *J Korean Soc Food Nutr* 26: 148-153.
- Kim SH, Kim ES, Kim TS (1995) Studies on the polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. *J Korean Soc Food Nutr* 24(1): 147-153.
- Kim YH, Jang JC, Shin HY, Jang YS (1982) Studies on the Browning of Ginseng(IV). Bulletin of Agricultural College Chonbuk National University, 14:84-90.
- Kim YH, Jang JC, Yoo KS (1983) Studies on the Browning of White Ginseng(III). Bulletin of Agricultural College Chonbuk National University, 13:93-99.
- Kwak CS, Kim SA, Lee MS (2005) The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1143-1150.
- Kwak CS, Lim SJ, Kim SA, Park SC, Lee MS (2004) Antioxidative and antimutagenic effects of Korean buckwheat, sorghum, millet and Job's tears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 921-929.
- L. Campanella, A. Bonanni, M. tomassetti (2003) Determination of the antioxidant capacity of samples of different types of tea, or of beverages based on tea or other herbal products, using a superoxide dismutase biosensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32: 725-736.
- Lee JW, Do JH (2001) Antioxidative activity of ethanol extraction fraction from Korean red tail ginseng. *Korean J Food Sci Technol* 33: 497-500.
- Lee KS, Kim MG, Lee KY (2006) Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 182-186.
- Lee SE, Seong NS, Bang JK, Kang SW, Lee SW, Chung TY (2003) Inhibitory effect against angiotensin converting enzyme and antioxidant activity of *Panax ginseng* C. A meyer extracts. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11: 236-245.
- Lee YS, Jang SM, kim NW (2007) Antioxidative activity and physiological function of the *Angelica dahurica* roots. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 20-26.
- Lee YS, Joo EY, Kim NW (2006) Polyphenol contents and antioxidant activity of *Lepista nuda*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1309-1314.
- Lim TS, Oh HI, Do JR, Kim HK (2006) Physiological activities of leek extracts from *Allium tuberosum* and *allium senescens*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 301-306.
- Loi YS, Kweon TM, Park JH, Park SD (2003) Effects of insamgobonwhan and its component groups on antioxidant activities. *Kor J Herbology* 18: 41-50.
- Mohammad BA, Hahn EJ, Paek KY (2005) CO₂-induced total phenolics in suspension cultures of *Panax ginseng* C.A. Mayer roots : role of antioxidants and enzymes. *Plant*

- Physiology and Biochemistry* 43 : 449-457.
- Mohammad BA, Nisha S, Abdullah MS, Hahn EJ, Paek KY (2006) Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science* 171 : 147-154.
- Oberley CW, Buettner GR (1979) Role of superoxide dismutase in cancer. *Review Cancer Res* 39: 151-159.
- Oh JH, Kim EH, Kim JL, Moon YI, Kang YH, Kang JS (2004) Study on antioxidant potency of green tea by DPPH method. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1079- 1084.
- Oh SI, Lee MS (2003) Screening for antioxidative and antimutagenic capacities in 7 common vegetables taken by Korean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1344-1350.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
- Park BH, Cho HS, Kim DH (2005) Antioxidative effects of solvent extracts of *Lycii fructus* powder (LFP) and maejajgwa made with LFP. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1314-1319.
- Park JH, Jin JH, Kim HJ, Park HR, Lee SC (2005) Effect of far-infrared irradiation in the antioxidant activity of extracts from rice hulls. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 131-134.
- Park KS, KO SK, Chung SH (2003) Comparisons of antidiabetic effect between ginseng radix alba, ginseng radix rubra and *Panax quinquefoli radix* in MLD STD-induced diabetic rats. *J Ginseng Res* 27: 56-61.
- Park YM, Kim SJ, Jo KH, Yang EJ, Jung ST (2006) Anticarcinogenic and antioxidant activities from medicinal herbs. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 284-293.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem* 51: 3273-3279.
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
- Rim AR, Jung ES, Jo SC, Lee SC (2005) Effect of far-infrared irradiation and heat treatment on the antioxidant activity of extracts from peanut (*Arachis hypogaea*) shell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1114-1117.
- Ronald P. Cody, Jeffrey K. Smith (2006) Applied Statistics and the SAS Programming Language. Fifth Edition. Pearson Prentice Hall, Pearson Education, Inc. Upper Saddle River, NJ 07458. pp 159-165, pp 183-196.
- Saito H, Lee YH (1978) Pharmacological properties of *Panax ginseng* root. Proc. 2nd Intl. Ginseng Symp. Seoul, Korea. pp 109-114.
- Sofuni T, Ishidato M Jr. (1984) Induction of chromosomal aberration in cultured Chinese hamster cells in a superoxide-generating system. *Mutation Res* 140: 27-31.
- Song HS, Park YH, Jung SH, Kim DP, Jung YH, Lee NK, Moon KY (2006) Antioxidant activity of extracts from *Smilax china* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1133-1138.
- Song HS, Park YH, Kim SK, Moon WK, Kim DW, Moon KY (2004) Downregulatory effect of extracts from mistletoe (*Viscum album*) and pueraria root (*Pueraria radix*) on cellular NF-KB activation and their antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1594-1600.
- Talcott ST, Lee JH (2002) Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of mascadine wine and juice. *J Agric Food Chem* 50: 3186-3192.
- Talcott ST, Percival SS, Jennifer PM, Celoria Charity (2003) Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *J Agric Food Chem* 51: 935-941.
- Woo NRY, Kim TS, Park HW, Park CG, Seong HJ, Ko SB, Jung JW, Kang MH (2005) Comparison of antioxidative activities of *Crotalaria sessiflora* L. extracts from leaves, stem and root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1297-1301.
- Yoon SR, Jeong YJ, Lee GD, Kwon JH (2003) Changes in phenolic compounds properties of *Rubi fructus* extract depending on extraction conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 338-345.
- Yu HE, Leaniza, Bae JY, Lee DH, Park JS, Kwak HS, Kim HK, Lee JS (2005) Screening and extraction condition of antiaging bioactive substances from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1136-1142.
- Yun KA, Park YJ, Bae SJ (2004) Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *Brassica oleracea* L. fractions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 7-15.

(2007년 5월 1일 접수, 2007년 5월 25일 채택)