

高麗人蔘 褐變物質의 抗酸化效果

金 相 達 · 都 在 浩 · 吳 勳 一

韓國人蔘煙草研究所
(1981년 7월 21일 수리)

Antioxidant Activity of Panax Ginseng Browning Products

Sang-Dal Kim, Jae-Ho Do and Hoon-II Oh

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Seoul, Korea.

Abstract

Products of ginseng browning reaction were investigated to determine the nature of their antioxidant activity using a model system, White Ginseng and Red Ginseng extracts. In the simulated ginseng model system, the brown color was intensified with an increase in the length of reaction time and the antioxidant activity initially increased in proportion the length of reaction time for up to 17 hrs and then leveled off thereafter. Pararell results were obtained manufacturing of Red Ginseng. Comparison of the antioxidant activity of the inner and outer solutions after dialysis of browning solution showed that the outer solution had a stronger antioxidant activity than the inner one. For further analyses, browning reaction products were fractionated into three peaks on Amberlite CG-120 type I ionexchange resin and designated as fractions I, II and III in order of elution. Partial characterization of the fractions revealed that the most intense brown fraction (Fraction II) had the strongest antioxidant activity and also exhibited reducing power for Somogyi-Nelson reagents and ninhydrin positive reaction. Both the browning reaction products and Red Ginseng extracts were found to possess potent reactivity with α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl, whereas White Ginseng extracts showed negligible reactivity.

緒 論

Model system에서 生成된 褐變物質이 油脂成分의 酸敗에 對하여 抗酸化作用이 있다는 것은 잘 알려져 있으나^{1~4)}, 人蔘褐變物質의 抗酸化效果에 對하여는 거의 研究된 바가 없으며 高麗人蔘에 含有된 抗酸化物質에 對하여는 韓⁵⁾, 李⁶⁾ 및 金⁷⁾ 등의 報告에 불과하다.

韓⁵⁾ 등은 水蔘과 紅蔘抽出物에 對한 抗酸化能

을 調査한 結果 水蔘은 ether 分劃에서 抗酸化能 이 인정되었고 紅蔘의 경우 效果의인 抗酸化物質 이 2-methyl-3-hydroxy pyrone(maltol)이라고 報告하였다. 李⁶⁾는 水蔘과 白蔘의 용매추출에 따른 抗酸化能을 比較한 바 95% ethanol 및 ethyl ether抽出物은 강한 抗酸化能을 보였으나 70% ethanol과 물 抽出物은 抗酸化效果가 없음을 觀察 하였다. 최근에 金⁷⁾ 등은 TLC를 利用하여 紅蔘에서 2개의 抗酸化物質을 分離하고 이들이 indophenol還元物質임을 밝혔다.

紅蔘의 褐色化反應은 그 製造過程中 蒸煮하는 紅蔘製造의 特性으로 보아 非酵素의 褐變 특히 amino-carbonyl反應과 polyphenol차동산화로 推定되는 바⁸⁾, 이에 著者들은 人蔘의 褐變反應中 生成되는 褐變物質이 抗酸化效果를 나타낸다는 事實을 究明하였기에 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

京畿道 江華에서 9월에 採掘한 6년근 水蔘을 洗蔘하여 竹刀로 蔘皮를 제거한 후 50°C oven에서 13일간 熱風乾燥하여 製造한 白蔘을 Willy cutting mill(0.5mm sieve부착)로 粉碎하여 使用하였다. 紅蔘은 常法⁹⁾에 따라 製造한 紅蔘을 上記와 같이 粉末로 만들어 使用하였다.

2. 實驗方法

1. 褐色化反應 및 褐色度測定

白蔘粉末 100g에 2배 量의 증류수를 加하고 70°C에서 2시간 抽出한 후 6,700g에서 10分間 원심분리하였다. 褐色度測定은 이 上澄液을 100°C에서 환류냉각기를 달고 褐色化反應을 시키면서 經時的으로 시료를 取하여 Shimazu spectrophotometer를 使用하여 波長 440nm에서 吸光度를 測定하였다. 紅蔘의 경우 粉末試料 2g에 75% ethanol 4ml를 加하고 70°C에서 30分間 抽出한 후 上記와 같이 원심분리하여 褐色度를 測定하였다.

2. 抗酸化能의 測定

褐變物質 1ml에 oleic acid 3ml를 加하고 65°C에서 2일간 自動酸化시켰다. 이 용액 1ml에 0.02 M thiobarbituric acid(TBA)용액 5ml를 加하고 100°C에서 30分間 加熱시켜 發色시킨 다음 流水에서 5分間 냉각시켰다. 이 용액에 n-butanol 5ml를 加하고 강하게 진탕시킨 후 butanol층을 波長 535nm에서 吸光度를 測定하였다.

3. 褐變物質의 分離 및 抗酸化能 測定

濃縮乾燥시킨 褐變物質 100mg을 증류수 100ml에 溶解시켜 Amberlite CG-120type I 이온교환수지 column(1.3×23cm)에 充填한 후 증류수로 세척하고 25% ethanol에서부터 2N-NH₄OH를 含有한 75% ethanol까지 linear gradient하게 流出시켰다. 이때 流速은 1ml/min이었으며, fraction collector를 使用하여 용량법으로 5ml씩 分取하여 各 fraction에 含有된 ethanol과 NH₄OH를 80°C

에서 加熱증발시킨 後 증류수 5ml를 加하였으며 褐色度 및 抗酸化能은 上記와 같은 方法으로 測定하였다.

4. 分離된 褐變物質의 還元力測定

이온交換樹脂로 分離한 各 分劃 1ml에 Nelson-Somogyi A液 1ml를 加하고 100°C에서 10分間 加熱시킨 다음 流水에서 5分間 냉각시켰다. 여기에 Nelson-Somogyi B液 1ml를 加하여 混合한 後 실온에서 20分間 방치한 다음 증류수 7ml를 加하여 540nm에서 比色測定하였다.

5. 分離된 褐變物質의 Ninhydrin溶液과의 反應

1% ninhydrin용액 1ml와 各 分劃 1ml를 混合하여 100°C에서 30分間 加熱시킨 後 流水에서 냉각시켜 570nm에서 吸光度를 測定하였다.

6. DPPH法에 依한 水素供與性 測定

DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 16mg을 100ml ethanol에 溶解한 後 증류수 100ml를 加하고 Whatman filter paper No.1으로 여과하였다. 이 濾液 5ml에 試驗液 1ml를 加하여 混合한 後 528nm에서 吸光度의 減少를 測定하였다.

結果 및 考察

1. 褐變反應時間에 따른 褐色度, 抗酸化能 및 pH의 變化

Amino-carbonyl反應은 紅蔘褐變을 일으키는 주요한 反應중의 하나로 알려져 있는바, 金⁸⁾이 人蔘에서 分析한 各種 糖과 아미노산의 含量을 증류수에 溶解시켜 model system을 만들었다. 이 溶液을 100°C에서 褐色化反應을 진행시키면서 經時的으로 褐色度, 抗酸化能 및 pH의 變化를 調査하

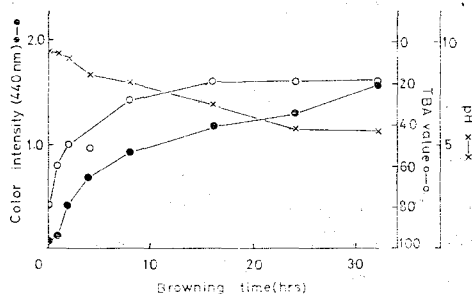


Fig. 1. Effect of browning reaction time on color intensity, TBA value and pH in a simulated ginseng model system.

었다(Fig.1.). 反應時間에 따른 褐色度의 變化는 一種의 hyperbolic curve를 나타냈다. 한편 TBA 價의 減少로 抗酸化能의 變化도 褐色度의 變化와 비슷한 hyperbolic curve를 나타냈으나 反應時間 16時間 이후에는 一定한 수치를 보였다. Kirigaya¹¹⁾ 등은 D-xylose와 glycine을 사용한 model system에서 褐色도가 反應時間에 逆比例적으로 比例하여 增加하였지만 抗酸化能은 反應初期에는 反應時間에 比例적으로 增加하였으나 2時間 後부터는 一定한 level을 유지하였다고 報告하였다. 黃과 金¹²⁾은 効果의인 抗酸化物質이 褐變反應의 초기단계에 形成되며, 反應後期에 形成된 갈색소들이 아니라고 推定하였는 바, 본 實驗의 糖과 amino 酸을 利用한 人蔘 model system에서 얻은 結果는 이들의 主張을 뒷받침하여 주고 있다.

人蔘에는 鹽基性 amino酸이 全體 amino酸의 약 72.3%를 차지하고 있으며 이 중 특히 arginine이 약 68.7% 含有되어 있다. Model system의 反應 溶液 pH가 反應初期에 9.5인 것은 이러한 鹽基性 amino酸을 多量含有한 것에 起因하여 褐變反應이 進行됨에 따라 pH가 점차 降下하여 反應時間 25 時間 후에는 pH가 5.2로 떨어지고 그 후에는 一定한 level을 유지하였다(Fig.1.). 이것은 arginine 등 鹽基性 amino酸이 糖과 결합하여 非酵素的 褐變反應에 관여하므로써 점차 可溶의 鹽基性 amino 酸이 감소된데에 一部 起因하고 또한 褐變反應過程 中 酸性物質이 生成되기 때문에¹³⁾ pH가 降下된 것으로 推定된다.

以上의 人蔘 Model System에서 얻은 結果를 실제 紅蔘製造時와 比較하기 위하여 水蔘을 100°C에서 5時間까지 時間別로 蒸蔘, 乾燥하여 褐色度와 抗酸化能의 變化를 調査한 結果는 Fig. 2와 같

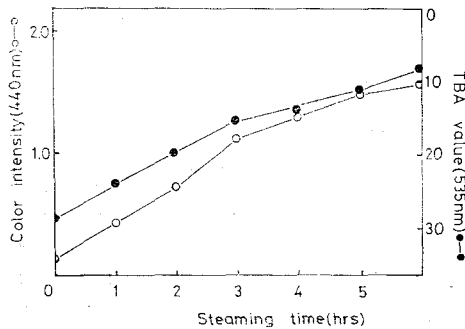


Fig. 2. Relationship between color intensity, antioxidant activity and steaming time on ginseng roots.

다. Model System에서와 마찬가지로 蒸蔘時間이 增加함에 따라 褐色도가 漸次 증가하였으며 抗酸化能은 이 褐色도에 比例하여 增加하였다. 이 結果는 人蔘의 褐變物質과 抗酸化能간에 깊은 연관성이 있다는 것을 強力히 시사하여 주고 있다.

2. 透析에 依한 褐變物質의 分離

山口와 藤卷¹⁴⁾은 還元糖과 amino酸을 使用하여 얻은 褐變物質을 sephadex G-15를 利用하여 分離한 結果, 高分子量의 melanoidin을 含有한 fraction이 강한 抗酸化效果를 보였으나 低分子量의 reductone에서는 抗酸化效果가 弱하다고 報告하였다. 그러나 効果의인 抗酸化作用을 가진 melanoidin色素가 그중에서도 저분자량의 色素들인지 高分子의 色素들인지에 對해서는 아직 확실히 알려져 있지 않다.^{3,14,15)}

本 實驗에서는 이점을 究明하기 위하여 白蔘抽出 褐變物質溶液을 cellophane tube에 넣고 4°C에서 24時間 증류수로 透析하여 內液과 外液으로 分離한 後 同量의 volume으로 조정하여 各各의 褐色度와 抗酸化能을 比較하였다. Table 1에서 보면 褐色도는 內液이 外液보다 약 2배정도 크지만

Table 1. Comparison of antioxidant activity of inner and outer solutions after dialysis of browning solution.

Solution	Color Intensity (440nm)	Antioxidant Activity ¹⁾		
		1day	2days	3days
Inner Soln.	1.585	56	88	114
Outer Soln.	0.824	48	75	95
Water	—	113	162	179

1) Antioxidant activity was determined by TBA method.

抗酸化能은 外液이 약간 컸다. 이것은 褐色도와 抗酸化能간에 직접적인 관계가 없으며 褐變物質中 저분자물질이 고분자물질보다 抗酸化能이 크다는 것을 의미한다. 이러한 해석은 效果의인 抗酸化物質이 褐變反應初期에 形成된다는 model system 에서의 結果(Fig. 1) 및 黃과 金¹²⁾의 結果와 一致 한다.

3. 이온交換樹脂에 依한 褐變物質의 分離 및 特性 調査

白蔘抽出 褐變物質을 Amberlite CG-120 type I

이온交換樹脂(양이온 수지)에 充填한 後 25% ethanol에서 75% ethanol로 linear gradient하게 流出시킨 結果 Fig. 3에서와 같이 3개의 major peak를 얻었으며 各 peak의 流出차레에 따라 fraction I, II 및 III으로 命名하였다.

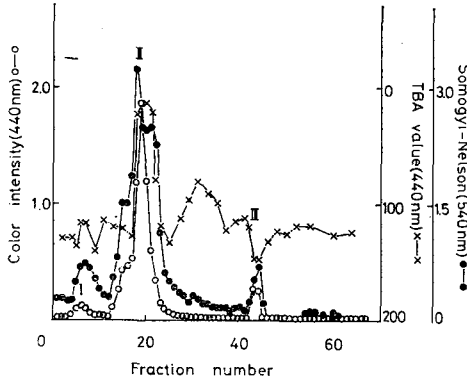


Fig. 3. Fractionation of browning reaction products on Amberlite CG-120 type I, and antioxidant and reducing activity of each fraction. The column (1.3cm dia.×23) was eluted with linear gradient of ethanol(25%→75%) containing 2N-NH₄OH. Flow rate was maintained at 1ml/min. Five-ml fractions were collected and the absorbance read at 440nm.

大部分의 褐變物質은 fraction II(全體 absorbance unit의 80.7%)에 나타났으며 이 部分은 강한 抗酸化作用을 나타냈다. 이것은 褐色도가 높은 fraction이 linoleic acid의 自動酸敗에 대하여 가장 강한 抗酸化效果를 나타냈다는 出口 및 藤卷의 結果¹⁴⁾와 一致한다. fraction I은 全體 peak의 7.6%(Table 2)로 抗酸化能을 微弱하게 나타냈지만 Fraction III은 오히려 酸化促進效果가 있었다.

이 結果는 人蔘의 褐變物質이 抗酸化能이 있는 大部分의 物質과 一部 酸化促進效果가 있는 物質의 複合體로 構成되어 있다는 것을 시사한다. 한편 Somogyi-Nelson法으로 各 分割의 還元能을 調査한 바 褐變物質의 流出 pattern과 거의 類似하였으며(Fig. 3) 또한 prussian blue(1% K₃Fe(CN)₆ : 2% FeCl₃=1 : 1)에 依한 還元能(figure not shown)도 Somogyi-Nelson法에 依한 pattern과 비슷한 점으로 미루어 보아 人蔘의 褐變物質이 還元能을 가진 物質인 것을 알 수 있다.

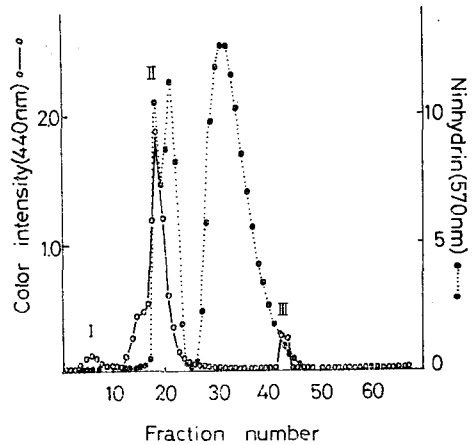


Fig. 4. Fractionation of browning reaction products on Amberlite CG-20 type I, and reaction of each fraction with ninhydrin solution.

分離된 各 分割의 ninhydrin溶液과의 反應은 Fig. 4에 나타난 바와 같이 fraction I은 ninhydrin溶液과 反應하지 않았으며 fraction III은 매우 弱한 反應을 보였다. 그러나 主된 褐變 peak (Fraction II)와 fraction number 32를 中心으로 ninhydrin反應에 陽性인 매우 큰 peak가 나타났

Table 2. Characteristics of browning reaction products.

Fraction Number	Fractions Collected	Percentage of Total Abs.	Distribution of Color ¹⁾ Constituents(%)			Chromatography(Rf) ²⁾		
			Yellow tone	Red tone	Blue tone	Forestal ³⁾ 2% acetic acid	2% acetic acid	BAW (4:1:5)
I	4-9	7.64	74.7	20.2	5.1	0.67	0-0.54	0
II	17-24	83.59	74.3	22.9	2.8	0.71	0-0.90	0
III	42-45	8.77	77.8	17.8	4.4	0.61	0-0.52	0

1) Yellow, red and blue tones were measured at 440, 520 and 630nm, respectively.

2) Spots were detected under UV light and/or with spraying with 1% ninhydrin solution.

3) Forestal denotes acetic acid: conc. HCl: water=30 : 3 : 10(V/V)

다. fraction II 부근의 ninhydrin 陽性 peak는 人蔘褐變物質中의 질소化合物에서 由來된 것으로 推定되며 fraction number 32를 中心으로 한 ninhydrin 陽性 peak는 人蔘褐變物質中의 amino酸과 저분자 peptide등이 resin에 吸着되었다가 늦게 流出된 것으로 생각된다. 各 fraction의 color constituents分布를 살펴보면 Table 2에서와 같이 yellow tone은 fraction III > II > I의 順으로 强하였고 red tone은 fraction I > III > II의 順으로 强하여 各 fraction의 color tone 分布가 달랐다. 한편 各 fraction의 化學的性質을 調査하기 위한 일환으로 3가지 용매에 依한 silica gel thin layer chromatography를 한 結果 forestal 전개용매에서는 fraction II의 Rf value가 0.71, fraction I이 0.67, fraction III이 0.6이였으며 이들 spots는 UV light에서 yellow-blue의 强한 형광을 나타내었다. 2% acetic acid 전개용매에서는 各 fraction 共히 tailing 현상이 관찰되었으며 이와 대조적으로 butanol: acetic acid: water(BAW, 4:1:5) 전개용매에서는 褐變物質이 전혀 이동하지 않았다. 人蔘褐變物質은 可視部에서는 極大吸收(λ_{max})

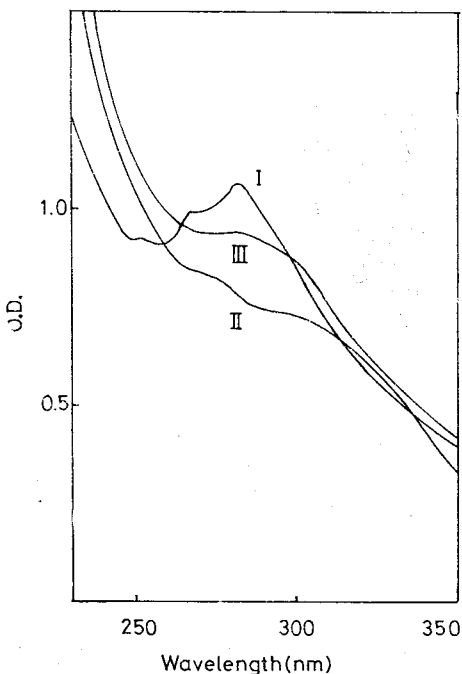


Fig. 5. UV absorption spectra of browned products after fractionation on Amberlite CG-120 type I.
(I) Fraction I (II) Fraction II
(III) Fraction III

를 나타내지 않았으나 紫外部에서는 Fig. 5에서 보이는 바와같이 260~280nm 사이에서 完滿한 吸收極大를 보였다. fraction I은 280nm에서 명확한 極大吸收를 보였으나 fraction II 및 III은 極大吸收가 불분명하였다.

4. DPPH法에 依한 水素供與性的 測定

褐變反應 生成物의 抗酸化性에 對하여 Hodge 등은 Hexose와 제 2 amine鹽類에 依한 Maillard 反應溶液에서 amino-hexose-reductone을 分離한 後 이것에 各種 植物油를 添加하여 本 結果 植物油의 酸化防止에 有效하다고 報告하였다¹⁷⁻¹⁹⁾.

抗酸化物質의 가장 特徵的인 역할은 oxidative free radical과 反應하는 것으로 이점을 利用하여 抗酸化能을 測定할 수 있다²⁰⁾.

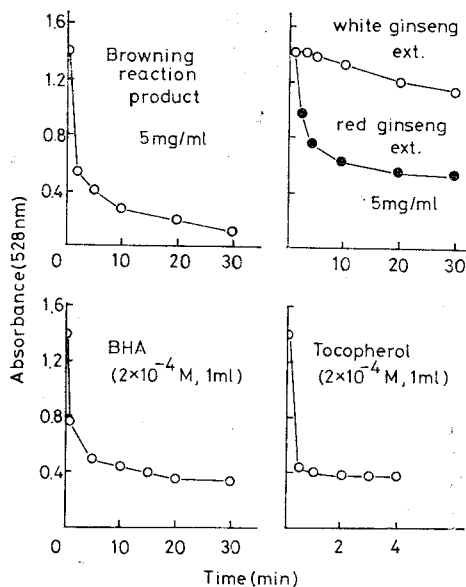


Fig. 6. Reactivity of antioxidants as measured by absorbance change of DPPH at 528nm.

本 實驗에서는 free radical인 α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH)를 利用하여 人蔘褐變物質과 白蔘 및 紅蔘의 70% ethanol抽出物에 對한 水素供與性을 測定하였다. 市販되고 있는 酸化防止劑인 BHA(Buthylated hydroxyl anisole)과 tocopherol을 對照區로 하였을 때 白蔘抽出物은 DPPH에 依한 水素供與性이 거의 없었으나 이에 반하여 紅蔘抽出物은 水素供與性이 强하였다. 특히 褐變反應物質은 5mg/ml의 濃度를 使用하였을 때 BHA와 같은 level의 水素供與性을 보였다. 이

DPPH는 安定한 free radical로 cystein, glutathion 과 같은 含硫黃 amino酸과 ascorbic acid, toco-pherol, polyhydroxy aromatic compounds(hydroquinone, pyrogallol, etc), aromatic amines (*p*-phenylene diamine, *p*-aminophenol, etc) 등에 依해서 還元되어 脫色되므로 抗酸化物質의 抗酸化能을 測定할 때 이 DPPH法이 편리한 方法으로 알려져 있다²⁰⁾. 이상의 結果로 白蔘抽出物은 抗酸化能이 거의 없으나 紅蔘抽出物은 抗酸化效果가 強하다는 것을 알 수 있으며 특히 人蔘의 인위적 褐變物質의 경우 抗酸化效果가 매우 強하게 나타남을 알 수 있다.

抄 錄

紅蔘의 特徵이라고 할 수 있는 褐色化反應에 依해서 生成된 褐變物質의 抗酸化效果와 여러가지 基本的인 性質을 調査하였다.

人蔘 model system을 利用하여 褐變反應을 시킨 結果 褐色度는 反應時間에 比例하여 增加하였으나 抗酸化效果는 反應時間 17時間까지 褐色도에 比例하여 增加하였으나 그 이후에는 一定한 level을 유지하였다. 蒸蔘時間別로 實際 紅蔘을 製造하여 褐色度 및 抗酸化能을 調査한 바 model system에서 얻은 結果와 類似하였다. 透析에 의해서 分離된 人蔘褐變反應物質은 外液이 內液보다 褐色도가 낮았지만 더 強한 抗酸化效果를 보였다. 人蔘褐變物質을 Amberlite 이온交換樹脂를 使用하여 3개의 peak로 分離하였으며 流出차폐에 따라 fraction I, II 및 III으로 命名하였다. 가장 褐色도가 強한 fraction II는 全體 peak의 80.7%로 強한 抗酸化效果를 나타냈으며 Somogyi-Nelson試藥에 對하여 還元能을 보였고 ninhydrin反應에 陽性이었다. 人蔘褐變反應物質과 白蔘 및 紅蔘의 75% ethanol 抽出物이 DPPH에 對한 水素供與性을 測定한 바 白蔘은 水素供與性이 거의 없었으나 紅蔘抽出物은 水素供與性이 強하였다. 특히 人蔘褐變反應物質은 5mg/ml의 濃度에서 BHA와 같은 level의 水素供與性을 나타냈다.

參 考 文 獻

1. Kawashima, K., Itoh, H. and Chibata, I.: J. Agri. Food Chem., 25 : 202(1977).
2. Kato, H.: Shokuhin Eiseigaku. Zasshi, 14 : 343(1973).
3. 山口直彦, 藤卷正生: 日本食品工業學會誌, 21 : 13(1974).
4. Itoh, H., Kawashima, K. and Chibata, I.: Agri. Biol. Chem., 39 : 283(1975).
5. 韓秉勳, 韓龍男, 朴明煥: 大韓藥學會誌, 21 : 223(1974).
6. 李熙鳳: 忠北大學論文集, 17 : 232(1978).
7. 金萬旭, 崔康注, 曹榮鉉, 洪淳根: 韓國農化學會誌, 23 : 173(1980).
8. 金銅淵: 韓國農化學會誌, 16 : 60(1973).
9. Sidwell, C.G., Salwin, H., Benca, M.F. and Mitchel, J.H., Jr.: J. Amm. Oil Chem. Soc., 31 : 603(1954).
10. 專賣廳: 紅蔘製造教範(1978)
11. Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M.: Agri. Biol. Chem., 32 : 287(1968).
12. 黃迪仁, 金東勳: 韓國食品科學會誌, 5 : 84 (1973).
13. Saunders, J. and Jervis, F.: J. Sci. Food Agri., 17 : 245(1966).
14. 山口直彦, 藤卷正生: 日本食品工業學會誌, 17 : 136(1970)
15. 山口直彦, 藤卷正生: 日本食品工業學會誌, 20 : 507(1973).
16. 山口直彦, 藤卷正生: 日本食品工業學會誌, 21 : 6(1974)
17. Hodge, J.E. and Rist, C.E.: J. Am. Chem. Soc., 75 : 316(1953).
18. Evans, C.D., Moser, H.A., Cooney, P.M. and Hodge, J.E.: J. Am. Oil Chem. Soc., 35 : 84 (1958).
19. Cooney, P.M., Hodge, J.E. and Evans, C. D.: J. Am. Oil Chem. Soc., 35 : 167(1958).
20. Blois, M.S.: Nature, 181 : 1199(1958).