

# 흑삼의 항산화 활성

이숙영 · 김동희<sup>1\*</sup> · 우원홍

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1: 대전대학교 한의과대학 한의학과

## Antioxidant Activity of Black *Panax ginseng*

Sook-Young Lee, Dong-Hee Kim<sup>1\*</sup>, Won-Hong Woo

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
1: Department of Herbalogy, College of Oriental Medicine, Daejeon University

This study was performed to investigate the antioxidant activity of extracts of black *Panax ginseng* (BGE) and its crude saponin (BGECS). The antioxidant activities of BGE and BGECS were evaluated for free radical scavenging activity against stable free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) DPPH, nitrite, hydrogen peroxide and superoxide. In addition, the antioxidant activity of BGE and BGECS against peroxy radicals, hydroxyl radicals and peroxy nitrates were determined by the total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) assay. As a result, BGE and BGECS were found to have a strong inhibitory activity with >90% against the DPPH radical at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations. Also, BGE and BGECS exhibited strong inhibitory activity with >80% against hydrogen peroxide at lower concentration (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Moreover, specific TOSC values (405 and 473 TOSC/mM) of BGE and BGECS against peroxy nitrates were higher than GSH (347 TOSC/mM) used a positive control. These results suggest that BGE and BGECS could be useful to develop functional foods against disease related oxidative stress.

Key words : Black *Panax ginseng*, Antioxidant activity, DPPH, TOSC assay

## 서 론

인삼(人蔘)은 다년생 초본류로서 오가피과(Araliaceae) 속에 속하며 한반도를 비롯하여 동아시아로부터 시베리아 동부, 북아메리카 지역에 걸쳐 분포되고 있다<sup>1)</sup>. 이러한 인삼은 건강기능식품으로서 홍삼, 백삼 등으로 가공되어 다양한 형태의 제품으로 이용되고 있다. 따라서 웰빙시대를 맞이하여 인삼의 소비가 점점 증가되고 있는 실정이다. 특히 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 한반도가 원산인 한국의 특산 약용식물로 중국 본초학의 원전인 '神農本草經'에 불로장생의 약효를 지닌 上藥으로 등재된 이래 수천년 간 민간과 한방의학에서 사용되고 있다<sup>2)</sup>.

인삼의 성분에는 인삼사포닌, 산성다당체, 인삼단백질, 페놀성 물질 등이 알려져 있다<sup>3-5)</sup>. 한편, 1957년 러시아의 Brekman에 의하여 사포닌 배당체가 약효의 주성분임을 강조함으로써 사포닌 연구가 집중적으로 시작되어 다양한 인삼사포닌 구조가 밝혀지고 있다. 인삼의 생리활성은 최근 체계적인 약리학적 접근으

로 자양·강장효과, 성기능 및 생식기능 부전 개선 효과, 항고혈압 및 항동맥경화 효과, 조혈기능 향진 및 빈혈치료 효과, 혈당대사 및 당뇨병 개선 효과, 항암효과, 간장기능 부전 개선 효과, 숙취해소 효과, 기생충 감염 방지 효과, 진통·소염 작용 등이 있다<sup>6-10)</sup>.

이와같이 인삼에 대한 약효와 효능이 점점 약리 및 임상학적인 면에서 과학적으로 입증되어 감에 따라 인삼이 의약품으로는 물론 자연건강식품으로서도 널리 인정받게 되었고 수요층의 기호변화에 따라 인삼의 이용과 가공방법도 점차 다양하게 개발되고 있다. 우리나라 식품공전 및 인삼산업법에 따르면 인삼은 수삼, 수삼을 증기 또는 기타 방법으로 쪄서 익혀 말린 홍삼 및 수삼을 물에 익혀 말린 태극삼과 같이 네가지로 분류되어 있다.

최근에는 발효홍삼, 산삼배양근, 조직배양인삼 등 다양한 가공인삼이 개발되고 있다. 이러한 인삼의 프리미엄 시대를 맞이하여 인삼의 본고장인 금산을 중심으로 흑삼이 개발되어 많은 관심을 받고 있다. 최근에 흑삼에 대한 많은 연구가 이루어지고 있어 흑삼의 성분 및 다양한 생리활성에 대한 연구결과가 보고되고 있다<sup>11-14)</sup>. 그러나 흑삼의 항산화 활성에 대한 연구는 미흡

\* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학

· E-mail : dhkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2011/01/10 · 수정 : 2011/02/08 · 채택 : 2011/02/14

한 상황이다.

진핵생물은 세포 내 미토콘드리아에서 ATP를 생산할 때 전자전달계의 최종 전자수용체로서 산소 ( $O_2$ )를 필요로 한다. 하지만 이러한 미토콘드리아의 호흡 과정은 피할 수 없는 부산물로써 superoxide radical ( $O_2^-$ )이나 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )와 같은 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)를 생성하게 된다. 또한 일반적으로 호흡으로 들이마신 산소의 약 1-2%가 산화적 스트레스에 의해서 활성산소로 변하며, 일부는 몸 속에서 저절로 없어지거나 각종 감염을 막는 면역기능도 하지만, 과잉 생산된 활성산소가 문제다. 진핵세포에는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, catalase와 그 밖에 여러 다른 단백질 등이 있어 세포 내에 ROS의 축적을 억제한다.

그러나 오랜 시간에 걸쳐 여러 질병을 비롯한 스트레스, 공해 등 다양한 원인에 의해 세포내 항상성이 깨지면 이러한 과잉의 활성산소는 정상 세포막과 세포를 손상시키며, 피부를 구성하는 콜라겐을 산화시켜 노화를 촉진하고, DNA를 손상시켜 암을 유발하는가 하면 세포막의 불포화지방산을 산화작용을 통해 이 물질로 바뀌 동맥경화, 뇌졸중 등 여러 가지 질병을 야기한다고 알려져 있다<sup>15-18</sup>). 따라서 최근에 천연물을 이용하여 이러한 여러 가지 질병을 야기하는 활성산소를 제거할 수 있는 항산화물질을 개발하는 연구가 활발히 전개되고 있다.

체내에서 생성되는 활성산소의 양을 직접 측정하거나 oxygen free radical 흡수능력을 평가하는 방법이 활성산소 소거능력을 측정할 수 있는 가장 이상적인 방법이지만, 이러한 방법들은 대부분 특별한 장비와 고도의 기술 그리고 많은 시간이 요구되므로 많은 시료의 활성을 측정하는 일반적인 항산화 활성을 평가하는 방법은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay가 대표적이다<sup>19</sup>). DPPH assay 방법은 가장 광범위하게 사용되며 high-throughput system에 적용될 수 있어 시간과 경비를 절약할 수 있는 장점이 있다.

한편, Total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) 법은 DPPH assay 방법과는 달리 실제로 생체내에서 발생하는 peroxy radical, hydroxyl radical 및 peroxynitrite에 대한 개별적인 항산화 활성을 평가하는 방법으로 산화성물질인 alpha-keto-gamma-methiobutyric acid (KMBA)와 반응하여 생성되는 ethylene을 gas chromatography를 이용하여 검출한다<sup>20,21</sup>). 이 방법은 시간에 따른 ethylene gas의 농도를 측정하여 area under the curve (AUC)를 산출하고 이 값을 대조군에서의 AUC와 비교함으로써 TOSC 값을 계산한다. 또한 대표적인 항산화 물질인 glutathione (GSH)를 표준물질로 사용함으로써 정량적으로 항산화 활성을 실험간에 비교할 수 있다. 따라서 이 방법은 실질적인 체내 산화성물질에 대한 항산화 활성을 정량적으로 측정할 수 있다. TOSC assay는 항산화 활성 외에도 조직액이나, 혈장, 혈청 등에서 항산화 활성을 측정하여 산화적 스트레스의 biomarker로 사용되고 있다<sup>21</sup>).

이에 본 연구는 흑삼의 항산화 활성을 측정하고자 DPPH assay 방법뿐만 아니라 TOSC 방법한 이용하여 흑삼의 항산화 활성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 흑삼의 제조

2009년 충남 금산에서 10월에 수확한 신선한 5년근 수삼을 금산인삼농협으로부터 구입하여 흐르는 물에서 3회 세척하고 초음파 세척기에서 3회 세척하였다. 건조기를 이용하여 수삼을 55°C에서 24시간 건조하여 수분이 25-30% 정도로 맞춘 후 송 등<sup>22</sup>)이 보고한 방법으로 흑삼을 제조하였다.

#### 2) 흑삼 조사포닌 추출

제조한 흑삼 500 g을 취하여 70% 에탄올에 넣고 실온에서 하룻밤 방치한 뒤 3시간 환류 추출하여 얻은 용액을 실온까지 냉각시킨 후 용액을 여과하여 감압 농축 시켰다. 동일한 방법으로 총 3회 추출하여 흑삼 에탄올 추출물을 얻었다. 이렇게 얻은 흑삼 에탄올 추출물을 1리터의 물에 현탁시키고, 1리터의 에테르로 3회 추출하여 비극성 물질을 제거하였다. 여기에서 얻은 물층을 물로 포화된 부탄올을 사용하여 3회 추출하여 이로부터 얻어진 수포화된 부탄올 층을 감압건조하여 흑삼 부탄올 추출물을 얻었다. 이렇게 얻은 흑삼 조사포닌 추출물을 항산화 활성을 확인하기 위한 시료로 사용하였다.

### 2. 사용시약

시약으로 사용한 DPPH, GSH, ascorbic acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ferrous ammonium sulfate,  $H_2O_2$ , 2,2'-azobisamidinopropane (ABAP), 3-morpholinolysidnonimine (SIN-1), KMBA, tBHP, tetraethoxypropane (TEPP), diethylenetriaminopentacetic acid (DTNB), NADPH, sodium nitrite, acetic acid, hydrochloric acid, sulfanilic acid, naphthylamine, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, butylated hydroxy-anisole (BHA), nitro blue tetrazolium, xanthine, xanthine oxidase, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, PBS, peroxide 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서, 에탄올은 (주)삼전에서 구입하였으며, 기기로 사용한 GC는 Shimadze사 (Tokyo, Japan)의 GC-2010를 사용하였다.

### 3. 항산화 활성 측정

#### 1) DPPH 라디칼 소거능

DPPH free radical에 대한 소거활성은 Blois의방법<sup>23</sup>)을 변형하여 측정하였다. 각 시료 20  $\mu$ l에 0.1 mM DPPH 180  $\mu$ l를 넣고 vortex한 후, 30분 동안 방치한 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음 식으로 나타내었다.

#### DPPH 라디칼 소거능 (%)

$$= \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{반응군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

#### 2) Nitrite 소거 작용

아질산염 소거작용은 Kato 등<sup>24</sup>)의 방법에 따라 다음과 같이

측정하였다. 즉, 1 mM의 NaNO<sub>2</sub> 용액 30  $\mu$ l에 시료추출물을 60  $\mu$ l를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl 용액 210  $\mu$ l를 가하여 전체를 300  $\mu$ l로 하였다. 그리고 37°C에서 1시간동안 반응시켜 얻은 반응액을 40  $\mu$ l씩 취하고 여기에 2% 초산 용액 200  $\mu$ l를 첨가한 다음 Griess 시약 16  $\mu$ l를 가하여 혼합시켜 실온에서 15분간 방치시킨 후 흡수 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 백분율로 나타내었다. 공시험은 Griess시약 대신 증류수를 가하여 같은 방법으로 행하였다

$$N(\%) = [1-(A-B)/(C-D)] \times 100$$

- N : 아질산 소거능(%)
- A : 시료의 흡광도
- B : 시료 대조군의 흡광도
- C : Control의 흡광도
- D : Control 대조군의 흡광도

### 3) Superoxide anion 소거능

Superoxide anion 소거활성은 Okamura 등<sup>25)</sup>의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 시료 20  $\mu$ l, 2 mM xanthine과 0.1mM NBT 혼합액 160  $\mu$ l를 넣고 0.05 mM EDTA가 포함된 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹인 xanthine oxidase (0.5 unit/ml) 20  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 다음, 여기에 2.5N HCl 80  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 중지시키고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) Hydrogen peroxide 소거능 측정

Hydrogen peroxide 소거활성은 Park 등<sup>26)</sup>의 방법에 따라 96-well microplate에 phosphate buffered saline (PBS) 100  $\mu$ l, 분획물 20  $\mu$ l를 넣고 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하여 5분방치 한 다음, 1.25 mM ABTS 30  $\mu$ l와 PBS에 녹인 peroxidase (1unit/ml) 30  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5) TOSC 방법을 이용한 항산화 활성 측정

TOSC assay는 Winston<sup>27)</sup>에 의해 제안되고 같은 저자들에게 의해 수정된 방법<sup>20,21)</sup>을 사용하여 실시하였다. Peroxyl radical은 2,2'-azobisamidinopropane (ABAP)를 35°C에서 thermal homolysis시켜 발생시켰다<sup>20)</sup>. Hydroxyl radical은 Fe와 ascorbate를 이용한 Fenton reaction으로, peroxyxynitrite는 3-morpholinopyridonimine (SIN-1)의 자발적인 붕괴를 통해 발생시켰다. 발생한 각각의 oxy-radical은 KMBA와 반응하여 ethylene을 발생하며 이때의 TOSC 값은 일정범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로 보고된 바 있다<sup>27)</sup>. 반응은 1 ml의 반응액을 고무마개로 밀폐된 15 ml 용기에 넣어 진행시켰으며 생성된 ethylene은 반응용기의 head space 공기 0.4 ml를 취하여 GC (GC-2010, Shimadze, Tokyo, Japan)로 분석하여 검출하였다. Oven, injector와 flame ionization detector의 온도를 각각 60°C, 180°C로 설정하고 Supelco SPB-1 caillary column(30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m)를 장착한 gas chromatograph 장치를 사용하였다. Carrier gas로는 helium을 사용하였으며 split ratio 30:1로 설정하였다. TOSC 값은 TOSC=100-(SA/CA $\times$ 100)의 식으로 구했다<sup>25)</sup>. SA는 시간에 따른 sample의 적분 값이고, CA는 시

간에 따른 control의 적분 값이다. Control로는 3차 증류수를 사용하였으며 시료로는 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE) 와 흑삼 조사포닌 (BGECS) 외에 양성대조군으로 GSH를 사용하였다. 따라서 oxy-radical scavenging capacity를 전혀 갖지 못하는 시료의  $\int SA / \int CA = 1$ 이 되며 TOSC = 0의 값을 갖는다. 반대로  $\int SA \rightarrow 0$ 일 때는 TOSC 값은 100에 접근한다. Specific TOSC 값은 얻어진 TOSC 값을 시험물질에 농도에 따라 좌표화하고 선형회귀 분석(linear regression analysis)을 통해 기울기를 얻은 후 이 값을 시험물질의 농도로 나누어 구하였다. TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

### 4. 통계 처리

모든 실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시했으며 군간에서 통계적인 유의성은 GraphPad Prism program (version 4.0)을 이용하여 One-way ANOVA-test 후 Dunnett's Multiple Comparison Test로 확인하였다.

## 결 과

### 1. 흑삼의 제조

송 등<sup>22)</sup>의 방법을 이용하여 수삼을 이용하여 흑삼을 제조하였으며 제조한 흑삼의 색깔은 흑갈색이었다.

### 2. 흑삼 조사포닌의 양

흑삼의 조사포닌의 경우 증숙 인삼 500 g 을 사용하여 70% 에탄올 추출물 178.7 g 을 얻고 이것을 일부 사용하여 수포화 부탄올 추출물인 흑삼 조사포닌 23.5 g (4.7%)을 얻었다.

### 3. 항산화 활성

#### 1) DPPH 라디칼 소거능

Free radical로서 비교적 안정한 DPPH를 이용하여 양성대조군으로 사용한 강력한 항산화 활성을 나타내는 합성물질인 BHA와 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE) 와 흑삼 조사포닌 (BGECS)의 free radical 소거활성을 측정하였다. Table 1에서와 같이 양성대조군인 BHA는 250, 125, 62.6, 31.25 및 15.62  $\mu$ g/ml의 농도에서 각각 70.82 $\pm$ 0.67, 42.90 $\pm$ 0.29, 25.65 $\pm$ 0.20, 9.76 $\pm$ 0.17 및 4.64 $\pm$ 0.82와 같이 농도의존적으로 강한 free radical 소거활성을 나타내었다. 이에 비해서 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE)은 양성대조군에 비해서는 약한 활성을 나타내었지만 1000 및 500  $\mu$ g/ml와 같은 높은 농도에서는 97.87 $\pm$ 0.17 및 92.45 $\pm$ 0.77%의 강력한 free radical 소거활성을 나타내었다.

또한 250, 125, 62.5 및 31.3  $\mu$ g/ml 농도에서는 각각 61.76 $\pm$ 1.17, 37.85 $\pm$ 0.41, 21.59 $\pm$ 0.77 및 12.88 $\pm$ 0.50%와 같이 농도의존적으로 비교적 강한 free radical 소거활성을 나타내었다. 한편, 흑삼 조사포닌 (BGECS)의 경우 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE)과 거의 동등한 수준으로 free radical 소거활성을 나타냄을 관찰하였다(Fig. 1).

2) Nitrite 소거 작용

Table 2에서와 같이 양성대조군인 BHA는 25, 12.5, 6.25, 3.12 및 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 92.97 $\pm$ 0.94, 51.08 $\pm$ 0.47, 25.95 $\pm$ 0.94, 10.45 $\pm$ 0.86 및 3.76 $\pm$ 0.94%와 같이 농도의존적으로 강한 nitrite 소거활성을 나타내었다. 특히 DPPH radical 에 대한 소거활성과는 달리 비교적 낮은 농도인 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 90% 이상 강력한 소거활성을 나타냄을 관찰할 수 있었다. 이에 비해서 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE)은 양성대조군에 비해서는 약한 활성을 나타내었지만 312.5 및 156.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 90.4 $\pm$ 1.27 및 81.6 $\pm$ 1.27%의 강력한 nitrite 소거활성을 나타내었다. 또한 78.1, 39, 19.5 및 9.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 각각 58.8 $\pm$ 2.55, 49.3 $\pm$ 1.56, 11.8 $\pm$ 1.56 및 1.5 $\pm$ 1.23%와 같이 농도의존적으로 비교적 강한 nitrite 소거활성을 나타내었다(Fig. 2). 한편, 흑삼 조사포닌 (BGECS)의 경우 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE)에 비해서 약간 강한 수준으로 nitrite 소거활성을 나타냄을 관찰하였다 (Fig. 2).

Table 1. Scavenging activity of BHA on DPPH free radical

Sample	DPPH Radical Scavenging Activity (%)				
	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )				
	250	125	62.5	31.25	15.62
BHA	70.82 $\pm$ 0.67	42.90 $\pm$ 0.29	25.65 $\pm$ 0.20	9.76 $\pm$ 0.17	4.64 $\pm$ 0.82

BHA : Butylated Hydroxy-Anisole, Data are means  $\pm$  S.D. of 5 experiments.

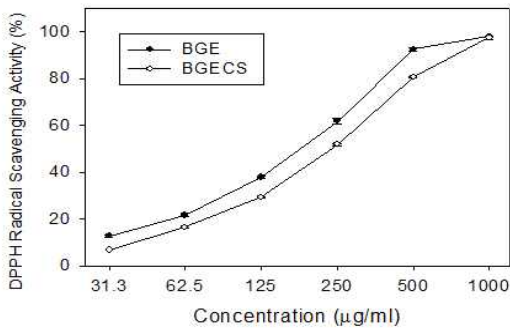


Fig. 1. Scavenging Activity of BGE and BGECS on DPPH Free Radical. BGE : Extract of black ginseng with 70% EtOH, BGECS : Crude saponin of black ginseng extracted with 70% EtOH

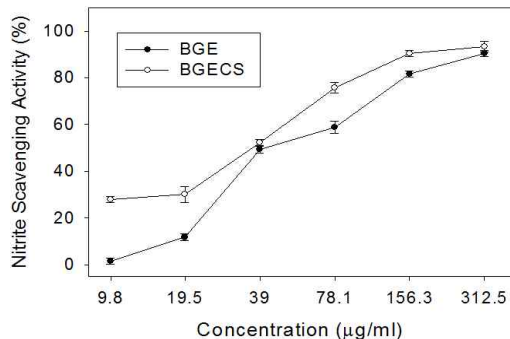


Fig. 2. Scavenging Activity of BGE and BGECS on nitrite. BGE : Extract of black ginseng with 70% EtOH, BGECS : Crude saponin of black ginseng extracted with 70% EtOH

Table 2. Scavenging activity of BHA on nitrites

Sample	Nitrites Scavenging Activity (%)				
	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )				
	25	12.5	6.25	3.12	1.56
BHA	92.97 $\pm$ 0.94	51.08 $\pm$ 0.47	25.95 $\pm$ 0.94	10.45 $\pm$ 0.86	3.76 $\pm$ 0.94

BHA : Butylated Hydroxy-Anisole, Data are means  $\pm$  S.D. of 5 experiments.

3) Superoxide anion 소거능

Table 3에서와 같이 양성대조군인 BHA는 100, 50, 25, 12.5 및 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 96.95 $\pm$ 1.57, 42.13 $\pm$ 1.32, 27.10 $\pm$ 0.52, 12.56 $\pm$ 1.04 및 4.98 $\pm$ 1.34%와 같이 농도 의존적으로 강한 superoxide anion radical 소거활성을 나타내었다. 이에 비해서 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE)은 양성대조군에 비해서는 약한 활성을 나타내었지만 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 높은 농도에서만 59.62 $\pm$ 1.11%의 비교적 약한 superoxide anion radical 소거활성을 나타내었다(Fig. 3). 또한 500 및 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 각각 10% 미만의 미약한 superoxide anion radical 소거활성을 나타내었다(Fig. 3). 한편, 흑삼 조사포닌 (BGECS)의 경우 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE)에 비해서 강한 수준으로 superoxide anion radical 소거활성을 나타냄을 관찰하였다(Fig. 3).

Table 3. Scavenging activity of BHA on superoxide anion radical

Sample	Superoxide anion radical Scavenging Activity (%)				
	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )				
	100	50	25	12.5	6.25
BHA	96.95 $\pm$ 1.57	42.13 $\pm$ 1.32	27.10 $\pm$ 0.52	12.56 $\pm$ 1.04	4.98 $\pm$ 1.34

BHA : Butylated Hydroxy-Anisole, Data are means  $\pm$  S.D. of 5 experiments.

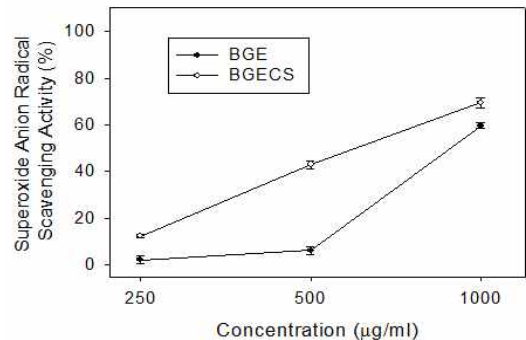


Fig. 3. Scavenging Activity of BGE and BGECS on superoxide anion. BGE : Extract of black ginseng with 70% EtOH, BGECS : Crude saponin of black ginseng extracted with 70% EtOH

4) Hydrogen peroxide 소거능

Table 4에서와 같이 양성대조군인 BHA는 50, 25, 12.5, 6.25 및 3.12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 92.36 $\pm$ 1.76, 68.45 $\pm$ 2.15, 46.87 $\pm$ 0.96, 25.43 $\pm$ 0.99 및 10.75 $\pm$ 1.87%와 같이 농도 의존적으로 강한 hydrogen peroxide 소거활성을 나타내었다. 이에 비해서 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE)은 양성대조군에 비해서는 약한 활성을 나타내었지만 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 89.98 $\pm$ 0.37%의 비교적 강한 hydrogen peroxide 소거활성을 나타내었다(Fig. 4). 또한 62.5 및 31.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 각각 62.87 $\pm$ 0.55 및

36.05±0.10%의 hydrogen peroxide 소거활성을 나타내었다(Fig. 3). 한편, 흑삼 조사포닌 (BGECS)의 경우 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE)에 비해서 거의 동등한 수준으로 hydrogen peroxide 소거활성을 나타냄을 관찰하였다(Fig. 4).

Table 4. Scavenging activity of BHA on hydrogen peroxide

Sample	Hydrogen Peroxide Scavenging Activity (%)			
	Conc. (µg/ml)			
	50	25	12.5	6.25
BHA	92.36 ± 1.76	68.45 ± 2.15	46.87 ± 0.96	25.43 ± 0.99
				3.12 ± 1.87

BHA : Butylated Hydroxy-Anisole, Data are means ± S.D. of 5 experiments

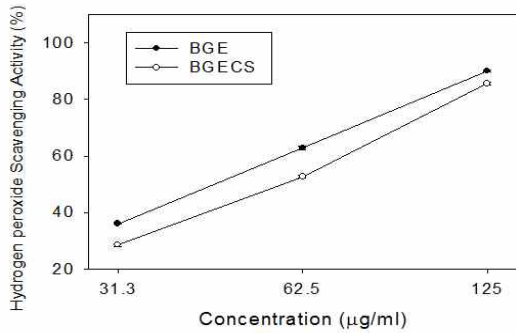


Fig. 4. Scavenging Activity of BGE and BGECS on Hydrogen Peroxide. BGE : Extract of black ginseng with 70% EtOH, BGECS : Crude saponin of black ginseng extracted with 70% EtOH

5) TOSC 방법에 의한 oxy-radical 소거활성

Peroxyl radical, hydroxyl radical 및 peroxynitrite에 대한 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE), 흑삼 조사포닌 (BGECS) 및 양성대조군으로 사용한 GSH의 소거활성을 TOSC 방법을 이용하여 평가하였다(Table 5).

Table 5. Specific TOSC Values of black Panax ginseng and its crude saponin against Peroxyl Radicals, Hydroxyl Radicals and Peroxynitrites

Sample	Peroxyl radicals	Hydroxyl radicals	Peroxynitrites
		TOSC/mM	
GSH	940 ± 19	335 ± 12	347 ± 34
BGE	433 ± 16	198 ± 11	405 ± 39*
BGECS	476 ± 91	312 ± 10	473 ± 23**

GSH : Glutathione, BGE : Extract of black Panax ginseng with 70% EtOH, BGECS : Crude saponin of black ginseng extracted with 70% EtOH. The results are expressed as the means ± SD of 5 experiments. Linear regression was calculated using GraphPad Prism, version 4.0. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 significantly different as compared to positive control(GSH)[One-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test].

먼저, peroxyl radical 소거활성을 측정한 결과 양성대조군으로 사용한 GSH의 specific TOSC는 940±19 TOSC/mM으로 강력한 peroxyl radical 소거활성 나타내었다. 이에 비해서 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE) 과 흑삼 조사포닌 (BGECS)의 TOSC 값은 각각 433±16 및 476±91 TOSC/mM 로써 양성대조군인 GSH보다는 약하였지만 비교적 강한 peroxyl radical 소거활성을 나타내었다.

Hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과 양성대조군으로

사용한 GSH의 specific TOSC는 335±12 TOSC/mM으로 강력한 hydroxyl radical 소거활성 나타내었다. 이에 비해서 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE) 의 specific TOSC는 198±11 TOSC/mM으로 양성대조군으로 사용한 GSH 보다는 약한 소거활성을 나타내었다. 한편, 흑삼 조사포닌 (BGECS)의 TOSC 값은 312±10 TOSC/mM 로써 양성대조군인 GSH와 거의 동등한 수준으로 강력한 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다.

Peroxynitrites 소거활성을 측정한 결과 양성대조군으로 사용한 GSH의 specific TOSC는 347±34 TOSC/mM으로 강력한 peroxynitrites 소거활성 나타내었다. 이에 비해서 흑삼 70% 에탄올 추출물 (BGE) 의 specific TOSC는 405±39 TOSC/mM으로 양성대조군으로 사용한 GSH 보다 유의적으로 강한 소거활성을 나타내었다(P<0.05). 한편, 흑삼 조사포닌 (BGECS)의 TOSC 값은 473±23 TOSC/mM 로써 양성대조군인 GSH 보다 유의적으로 강한 peroxynitrites 소거활성을 나타내었다(P<0.01).

고찰

최근 인삼 실소비자들은 수요층별로 기호 적성에 부합하면서도 차별화가 되는 제품을 요구하고 있다. 즉, 성별, 연령별 및 민족별로 소비자가 원하는 시대적 흐름과 실소비자의 요구 수준에 맞추어 새로운 제형의 제품과 특수용도의 제품을 개발하는 시대를 맞이하였다. 우리나라에서도 최근에 선삼, 효삼, 황삼, 식스플러스 등 다양한 형태의 가공인삼이 개발되고 있으며 이러한 가공인삼을 원료로한 다양한 형태의 인삼제품이 개발되고 있다. 이러한 상황에서 인삼의 본 고장인 금산에서 흑삼이 개발된 것이다. 흑삼은 항암, 뇌기능보호효과 등 다양한 생리활성<sup>11-14)</sup>을 나타내어 많은 관심을 받고 있는 가공인삼이다. 최근에 인삼에서 분리한 사포닌이 항산화 효과를 나타낸다는 보고<sup>28,29)</sup>가 있으나 흑삼의 항산화 활성에 대한 연구가 거의 전무한 상태다. 따라서 본 연구는 아직 연구가 이루어지지 않고 있는 흑삼의 항산화 활성을 검증하고자 하였다.

실험결과 Fig. 1에서와 같이 DPPH free radical 소거활성은 양성대조군인 BHA에 비해서 약하였지만 BGE 및 BGECS의 1,000, 500 µg/ml와 같은 높은 농도에서는 90% 이상의 강력한 소거활성을 나타냈다. 일반적으로 인삼에는 인삼사포닌을 포함하여 산성다당체, 인삼단백질, 페놀성 물질 등<sup>3-5)</sup> 다양한 물질이 존재한다고 알려져 있는데 BGE 및 BGECS의 활성이 거의 동등한 것으로 보아 흑삼의 항산화 활성을 나타내는 물질은 인삼사포닌 일 것으로 판단된다. 마찬가지로 nitrite, superoxide 및 hydrogen peroxide 소거활성 역시 BGE 와 BGECS가 거의 동등한 것으로 보아 흑삼에 존재하는 인삼사포닌이 활성을 나타내는 것으로 판단된다(Fig. 2-4). 특히 BGE 및 BGECS는 DPPH free radical, nitrite, superoxide에 대해서는 비교적 높은 농도에서 소거활성을 나타냈지만, hydrogen peroxide에 대해서는 비교적 낮은 농도인 125 µg/ml에서도 90% 정도 억제함을 관찰하여 여러 가지 산화성 물질 중에서도 hydrogen peroxide에 의해서 유도되는 질병에 흑삼이 유효할 것으로 판단된다(Fig. 4).

한편, 실제로 생체내에서 발생하는 산화성 물질인 peroxy radical, hydroxyl radical 및 peroxynitrite에 대한 개별적인 항산화 활성을 검증하기 위해 Total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) 법을 이용하여 BGE 및 BGECS의 항산화 활성을 측정하였다. 실험결과 peroxy radical에 대해서 BGE는 양성대조군으로 사용한 생체내 강력한 항산화 물질인 GSH에 비해서는 약하였지만 GSH의 50% 정도의 비교적 강한 항산화 활성을 나타내었다 (Table 5). 또한 BGE는 hydroxyl radicals에 대해서 양성대조군인 GSH에 비해서는 약하였지만, BGECS는 거의 동등한 수준의 항산화 활성을 나타내었다 (Table 5). 최근의 연구결과에 따르면 ginsenoside Rg3가 hydroxyl radical에 대한 항산화 효과를 나타낸다는 보고가 있다<sup>30,31</sup>. 일반적으로 흑삼에는 홍삼에 비해서 ginsenoside Rg3의 함량이 10배 이상 증가되므로 BGE와 BGECS가 hydroxyl radicals에 대해서 강한 항산화 활성을 나타낸다고 판단된다. 또한 흑삼의 사포닌인 BGECS는 흑삼 추출물인 BGE에 비해서 강한 항산화 활성을 나타내는 것으로 보아 마찬가지로 흑삼의 항산화 물질은 흑삼에 존재하는 인삼사포닌이라고 판단된다.

한편, BGE 및 BGECS는 peroxynitrites에 대해서 양성 대조군인 GSH에 비해서 강한 항산화 활성을 나타내었다 (Table 5) 일반적으로 체내에서 발생하는 활성산소와 관련된 대표적인 산화성물질은 산소에서 유래된 singlet oxygen, superoxide radical, 과산화수소 (hydrogen peroxide), hydroxyl radical, peroxy radical, alkoxy radical과 질소에서 유래된 nitric oxide와 peroxynitrite 그리고 myeloperoxidase에서 생성되는 hypochlorous acid 등이 있다. 이들 산화성 물질 중에서 superoxide radical과 nitric oxide는 반응성이 낮아 생체의 거대 분자를 산화시키는 능력은 낮으나 두 물질이 반응하여 생성되는 peroxynitrite는 매우 반응성이 강하여 세포에 독성을 유발한다고 알려져 있다<sup>32</sup>. 따라서 BGE 및 BGECS가 다른 여러 가지 산화성물질보다 특히 peroxynitrites에 대한 소거활성이 강하다는 것은 아주 의미 있는 결과라 판단된다.

종합적으로 볼 때 흑삼은 인체 내에서 질병과 노화를 일으키는 원인 물질인 활성산소에 대한 항산화 활성을 강하게 나타냄을 관찰하였으며 항 후 보다 체계적인 연구를 통하여 작용기전은 물론 흑삼을 다양한 형태의 건강기능식품으로 개발할 필요가 있다고 판단된다.

## 결 론

흑삼을 제조하여 여러 가지 oxy-radicals에 대한 항산화 활성을 측정하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

70% EtOH 흑삼추출물 (BGE)는 DPPH 라디칼 소거활성, nitrite 소거활성, superoxide 소거활성 및 hydrogen peroxide 소거활성을 나타내었다. 또한 TOSC 방법을 이용하여 생체내에서 발생하는 산화성 물질인 peroxy radical, hydroxyl radical 및 peroxynitrite에 대해서 강한 항산화 활성을 나타내었다. 또한 70% EtOH 흑삼 조사포닌 (BGECS)이 BGE와 거의 동등하거나

강한 항산화 활성을 나타내는 것으로 보아 흑삼의 항산화 활성을 나타내는 물질은 흑삼 중에 존재하는 ginsenosides일 것으로 판단된다. 특히 흑삼은 강력한 세포독성을 나타내는 peroxynitrites에 대해서 가장 강한 항산화 활성을 나타내었다.

이상의 결과로 부터 흑삼은 산화적 스트레스에서 기인하는 여러 가지 질환에 대해서 효과적일 것으로 판단되며 항 후 고부가가치를 창출할 수 있는 자원으로 농가소득 증대에도 큰 기여를 할 수 있으리라 판단된다.

## 참고문헌

1. 홍문화. 한국인삼사. 상권. 서울, 삼화인쇄주식회사, p 48, 1980.
2. 이상인. 한국인삼사. 하권. 서울, 삼화인쇄주식회사, p 166, 1980.
3. Park, J.D. Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng. Korean J. Ginseng Sci. 20: 389-415, 2006.
4. Sanata, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S. Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginseng-R0, Rb1, Rb2, Rc and Rd. Chem. Pharm. Bull. 22: 421-428, 1974.
5. Kitagawa, I., Taniyama, T., Shibuya, H., Nota, T. and Yoshikawa, M. Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2) ; Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same Panax ginseng root. Yakugaku Zasshi. 107: 495-505, 1987.
6. Lee, D.C., Lee, M.O., Kim, C.Y. and Clifford, D.H. Effect of ether, ethanol and aqueous extracts of ginseng on cardiovascular function in dogs. Can. J. Comp. Med. 45: 182-187, 1981.
7. Jie, Y.H., Cammisuli, S. and Baggiolini, M. Immunomodulatory effects of Panax ginseng C.A. Meyer in the mouse. Agents Actions. 15: 386-391, 1984.
8. Kim, Y.C., Kim, S.R., Markelonis, G.J. and Oh, T.H. Ginsenosides Rb1 and Rg3 protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. J. Neurosci. Res. 53: 426-432, 1998.
9. Joo, C.N., Koo, J.D., Kim, D.S. and Lee, S.J. Biochemical studies of ginseng saponins. XI. The effects of ginseng saponins on alcohol dehydrogenase. Hanguk Saengwha Hakhoechi. 10: 109-120, 1977.
10. Tahara, M., Kono, H., Mune, S. and Odashima, S. Action of ginsenosides on tumor cells. Growth inhibition and redifferentiation of neoplasia. Wakan Yaku Gakkaishi. 2: 170-171, 1985.
11. Nguyen, H.T., Yang, S.Y., Kim, J.A., Song, G.Y., Kim, Y.H. Dammarane-type saponins from the black ginseng.

- Bulletin of the Korean Chemical Society. 31(11):3423-3426, 2010.
12. Lee, M.R., Yun, B.S., Liu, L., Zhang, D.L., Wang, Z., Wang, C.L., Gu, L.J., Wang, C.Y., Mo, E.K., Sung, C.K. Effect of black ginseng on memory improvement in the amnesic mice induced by scopolamine. *Journal of Ginseng Research*. 34(1):51-58, 2010.
  13. Kim, A.J., Kang, S.J., Lee, K.H., Lee, M.S., Ha, S.D., Cha, Y.S., Kim, S.Y. The chemopreventive potential and anti-inflammatory activities of Korean black ginseng in colon26-M3.1 carcinoma cells and macrophages. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 53(1):101-105, 2010.
  14. Sun, B.S., Gu, L.J., Fang, Z.M., Wang, C.Y., Wang, Z., Lee, M.R., Li, Z., Li, J.J., Sung, C.K. Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from Panax ginseng by HPLC-ELSD. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 50(1):15-22, 2009.
  15. Pellegrini, M., Baldari, C.T. Apoptosis and oxidative stress-related diseases: the p66 Shc connection. *Current Molecular Medicine*. 9(3):392-398, 2009.
  16. Bayir, H. Reactive oxygen species. *Crit. Care Med*. 3: 498-501, 2005.
  17. Malle, E., Marsche, G., Arnhold, J., Davies, M.J. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim. Biophys. Acta*. 1761: 392-415, 2006.
  18. Kamat, J.P. Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. *Indian J. Exp. Biol*. 44: 436-447, 2006.
  19. Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A., Kawakami, Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem Mol. Biol. Int*. 42: 361-370, 1997.
  20. Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res*. 54: 419-423, 2002.
  21. Regoli, F., Winston, G.W. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 156: 96-105, 1999.
  22. Lee, J.H., Shen, G.N., Kim, E.K., Shin, H.J., Myung, C.S., Oh, H.J., Kim, D.H., Roh, S.S., Cho, W., Seo, Y.B., Park, Y.J., Kang, C.W., Song, G.Y. Preparation of black ginseng and its antitumor activity. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 20(4):951-956, 2006.
  23. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200, 1958.
  24. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B., Hayase, F. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidines. *Agric. Biol. Chem*. 51: 1333-1338, 1987.
  25. Okamura, H., Mimura, A., Yakou, Y., Niwano, M., Takahara, Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*. 33: 557-561, 1993.
  26. Park, S.W., Chung, S.K., Park, J.C. Active oxygen scavenging activity of luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*. *Korean Soc Food Sci Nutr*. 29: 106-110, 2000.
  27. Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.Jr., Fong, J.H., Blanchard, K.A. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic. Biol. Med*. 24: 480-493, 1998.
  28. Yokozawa, T., Satoh, A., Cho, E.J. Ginsenoside Rd attenuates oxidative damage related to aging in senescence-accelerated mice. *J. Pharm. Pharmacol*. 56(1):107-113, 2004.
  29. Chun, H., David, D.K. Free radical scavenging capacity as related to antioxidant activity and ginsenoside composition of asian and North american ginseng extracts. *JAOCS*. 78(3):249-255, 2001.
  30. Liu, Z.Q., Luo, X.Y., Liu, G.Z., Chen, Y.P., Wang, Z.C., Sun, Y.X. In vitro study of the relationship between the structure of ginsenoside and its antioxidative or prooxidative activity in free radical induced hemolysis of human erythrocytes. *J. Agric. Food Chem*. 51(9):2555-2558, 2003.
  31. Kang, K.S., Kim, H.Y., Baek, S.H., Yoo, H.H., Park, J.H., Yokozawa, T. Study on the hydroxyl radical scavenging activity changes of ginseng and ginsenoside-Rb2 by heat processing. *Biol. Pharm. Bull*. 30(4):724-728, 2007.
  32. Aruoma, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res*. 524: 9-20, 2003.