creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사학위논문

인삼의 다당체 분석

Analysis of Polysaccharides of Ginseng

2017년 2월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

추 상 한

인삼의 다당체 분석

Analysis of Polysaccharides of Ginseng

지도교수 권 성 원

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2016년 12월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

추 상 한

추상한의 석사학위논문을 인준함

2016년 12월

위 원 장	박 정 일	(인)
부 위 원 장	송 준 명	(인)
위 원	권 성 원	(인)

국 문 초 록

인삼 다당체는 인삼 내 단당체의 중합체로, 구성 당에 따라 산성 다당체 또는 중성 다당체라고 한다. 최근 다당체가 Macrophage 및 Natural killer cell 등을 활성화 시켜 면역 증가 효과를 나타낸다고 보고되고 있다. 하지만 다당체의 큰 분자량으로 인해 분석연구에 어려움이 있어 인삼의 다당체 성분 연구는 사포닌 연구에 비해 아직 부족한 실정이다.

그리하여, 본 연구에서는 인삼 다당체에 많이 함유되어 있으면서도 효능이 있다고 알려진 산성당 Galacturonic acid 와 중성당 Glucose 를 각각의 표준품을 이용해 부위별 함량비교를 진행하였다. 인삼을 주근 내부, 주근 외부, 주근, 지근, 뇌두, 세미 등의 부위들로 나누었고, 인삼의 부위별 다당체 성분 정량을 위해 두 가지 비색분석법인 페놀황산법과 카바졸황산법, 그리고 추가적으로 GC-MS 를 이용하여 정성분석을 하여 성분들의 종류 및 함량들을 알아보고자 하였다. 인삼으로부터 인삼의 다당체를 확보하고, 가수분해를 통해 단당체를 얻어 GC-MS 에 맞는 전 처리 후 분석하여 당의 성분 분석을 진행하였다.

그 결과, 인삼의 부위별 총당 함량은 주근이 가장 많았던 반면 뇌두에서 가장 적었다. 그리고 산성당의 함량은 세미에서 가장 많이 나왔고, 오히려 주근에서 가장 적었다. 이를 토대로 각 부위별 총 당 함량별 산성당 비율 비교를 하였더니 뇌두에서 높이 나왔고, 주근에서 가장 적었다. 총 당 함량은 주근이 가장 많았으나, 산성당의 함량은 특별히 세미에서 많다는 새로운 사실을 알아냈다.

본 연구를 통해 인삼의 부위별 다당체 성분을 확인하여 함량 비교를 할 수 있었고, 차후 추가적인 인삼의 다당체 분석 연구뿐만 아니라 활성에 대한 활발한 연구가 이루어져 선진화된 품질관리법이 제안되길 기대된다.

주요어: 인삼 (Ginseng), 다당체 (Polysaccharides), 비색정량 (Colorimetry), 페놀황산법 (Phenol-sulfuric acid method), 카바졸황산법 (Carbazole-sulfuric acid method), 기체크로마토그래프 질량분석 (GC-MS), 성분 분석

학번: 2015-21905

목 차

국문초록.....i

목차.....iii

List of Figures.....v

List of Tables.....vi

I. 서론.....1

II. 실험.....3

1. 실험 재료.....3

2. 시약 및 기기.....3

2-1. 시약 및 용매.....3

2-2. 실험 기구.....5

2-3. 분석 기구.....7

3. 실험 방법.....8

3-1. 인삼 가루로부터 수용성 다당체 추출.....7

3-2. 페놀황산 비색분석법을 이용한 총당 함량 측정.....11

3-3. 카바졸황산 비색분석법을 이용한 산성당 함량 측정 13

3-4. GC-MS를 이용한 다당체 정성분석.....16

III. 결과 및 고찰.....18

1. 페놀황산 비색분석법을 이용한 총당 함량 측정.....15

2. 카바졸황산 비색분석법을 이용한 산성당 함량 측정 22

3. 총당 내 산성당의 비율.....26

4. GC-MS를 이용한 다당체 정성분석.....27

IV. 결론.....29

V. 참고문헌.....30

Abstract.....35

List of Figures

Figure 1. 인삼 가루로부터 수용성 다당체 추출과정.....10

Figure 2. 총당 함량 측정을 위한 페놀황산 비색분석법 과정.....12

Figure 3. 산성당 함량 측정을 위한 카바졸황산 비색분석법 과정.....15

Figure 4. GC-MS를 이용한 인삼의 다당체 정성 분석.....17

Figure 5. 표준품 Glucose의 직선식과 일정한 농도의 WGP 시료를 첨가하였을 때의 직선식.....19

Figure 6. 페놀황산 비색분석법으로부터 얻은 각각의 부위에 따른 흡광도 값 (n=5).....20

Figure 7. 각각의 부위에 따른 총당 함량 비율 (n=5).....21

Figure 8. 표준품 Galacturonic acid의 직선식과 일정한 농도의 WGP 시료를 첨가하였을 때의 직선식.....18

Figure 9. 카바졸황산 비색분석법으로부터 얻은 각각의 부위에 따른 흡광도 값 (n=5).....23

Figure 10. 각각의 부위에 따른 산성당 함량 비율 (n=5).....24

Figure 11. 총당 내 산성당의 비율 (n=5).....26

Figure 12. 각 부위별 GC-MS 크로마토그램; 주근, 지근, 세미, 뇌두 (n=5).....27

List of Tables

Table 1. GC-MS 분석 조건.....17

I. 서론

인삼은 오래 전부터 한국의 대표적인 생약들 중에 하나로 알려져 있다. 많은 연구와 가공을 거쳐 현재 많은 형태의 인삼류가 존재하고 있고, 많은 사람들은 다양한 종류의 인삼류 제품을 접하고 있다. 대표적으로 기본 형태인 인삼, 가공을 거친 홍삼, 흑삼 등이 있다.[1,2)]

인삼에는 많이 알려진 진세노사이드 말고도 다양한 화합물들인 다당체, 펩타이드, 페놀 화합물 등이 존재한다. 물론, 각각의 다른 화합물들은 다른 활성들을 보이고 있다고 알려져 있다. 먼저, 진세노사이드의 대표적인 활성은 항염증, 항피로, 학습능력개선, 항암작용 등이 있다.[3~6)] 두 번째로 다당체의 대표적인 활성은 면역증강작용, 항피로, 항산화작용 등이 있다고 알려졌다.[7~9)] 펩타이드와 페놀 화합물의 알려진 활성은 항암작용이 있다.[10~12)] 이렇게 많은 화합물들이 존재하고 각기 다른 활성들도 보이고 있지만, 실질적으로 인삼을 관리하는 기준은 진세노사이드만을 사용하고 있다.

대한민국 약전 제 11개정에 따르면 진세노사이드 Rg1은 0.10%이상, Rb1은 0.20%이상 함유하고 있어야 하고[13)], 건강기능식품의 기능성 원료에서는 하루 섭취량으로 Rg1과 Rb1을 합해 0.8 ~ 34 mg/g의 기준을 두고 있다.[14)] 대한민국약전외한약(생약)규격집은 대한민국 약전과 같은 기준을 두고 있고[15)], 식품공전 해설서에서는 음료를 제작할 때 인삼의 진세노사이드만 유효성분으로서 언급이 되어있다.[16)] 이렇게 인삼의 품질관리를 진세노사이드로만 진행하게 된 것은 비교적 많은 함량의 존재와 활성, 그리고 가장 큰 이유인 타 식물과 차별화를 둘 수 있기 때문이다.[1)] 하지만 앞서 언급한 것 처럼 다른 화합물들의 활성도 밝혀지고 있고, 인삼의 진세노사이드로만 품질관리를 하기에는 한계가 있다고 판단하였다.

그리하여 최근 주목 받고 있는 인삼의 다당체를 이용하여 인삼의 선진화된 품질관리법으로 관리 할 수 있다고 생각하였다.

1966년 Ovodov에 의해 발표된 논문에 따르면 인삼 내 다당체 함량은 무게비율로 약 40%가 존재한다고 하였다.[17] 그리고 인삼의 다당체는 구성당에 따라 산성당과 중성당으로 나뉘는데, 발표된 논문에 따르면 산성당의 활성이 중성당의 활성보다 더 좋다고 알려져 있다.[18] 논문들을 바탕으로 다당체 분석을 위해 총 다당체와 산성다당체에 대한 분석을 하였다.

본 연구에서는 총당 함량을 정량분석 하기 위해 대표적인 표준품 Glucose와 페놀황산 비색분석법[19~22]을 적용하였고, 산성당 함량을 정량분석 하기 위해 표준품 Galacturonic acid와 카바졸황산 비색분석법[23~25]을 사용하였다. 또한, 인삼의 다당체 안에 중성당 Glucose와 산성당 Galacturonic acid의 존재를 확인하기 위해 GC-MS를 이용하여 정성분석 하였다.

Ⅱ. 실험

1. 실험 재료

6년근 인삼은 서울 동대문구에 소재하고 있는 경동시장에서 구입하였다. 각각의 인삼을 부위별(주근 내부, 주근 외부, 주근, 지근, 뇌두, 세미)로 절단한 후, 오븐에서 건조하고 분쇄기를 이용하여 가루 형태로 만들어 사용하였다. n수는 인삼 부위 별로 각각 총 5 그룹으로 만들었다.

- ✓ 주근 내부 가루(n=5)
- ✓ 주근 외부 가루(n=5)
- ✓ 주근 가루(n=5)
- ✓ 지근 가루(n=5)
- ✓ 뇌두 가루(n=5)
- ✓ 세미 가루(n=5)

2. 시약 및 기기

2-1. 시약 및 용매

인삼 가루로부터 수용성 다당체를 추출하기 위해 다음과 같은 시약 및 용매를 사용하였다.

- ✓ Water (J. T. Baker, USA)
- ✓ Ethyl Alcohol (Samchun, Korea)
- ✓ n-Butanol (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Chloroform (J. T. Baker, USA)

인삼 가루로부터 얻은 수용성 다당체를 가지고 페놀황산 비색분석법을 적용하여 총당 함량을 측정하기 위해 다음과 같은 시약 및 용매를 사용하였다.

- ✓ Water (J. T. Baker, USA)
- ✓ Glucose (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Sulfuric acid (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Phenol (Sigma-Aldrich, USA)

인삼 가루로부터 얻은 수용성 다당체를 가지고 카바졸황산 비색분석법을 적용하여 산성당 함량을 측정하기 위해 다음과 같은 시약 및 용매를 사용하였다.

- ✓ Water (J. T. Baker, USA)
- ✓ Galacturonic acid(Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Sulfuric acid (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Carbazole (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Ethyl alcohol (Samchun, Korea)

인삼 가루로부터 얻은 수용성 다당체를 가지고 GC-MS를 활용하여 정성 분석을 진행하기 위해 다음과 같은 시약 및 용매를 사용하였다.

- ✓ Hydrochloric acid (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Water (J. T. Baker, USA)
- ✓ Glucose (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Galacturonic acid (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ Methoxyamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA)
- ✓ N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane (1% TMCS) (Sigma-Aldrich, USA)

2-2. 실험 기구

- ✓ Straw cutter

- ✓ Drying oven (FO-600M, JEIO TECH)
- ✓ Laboratory Blender (Wonder Blender, WB-1, Japan)
- ✓ Conical tube (15 mL, 50 mL, SPL Life Sciences Co. Ltd)
- ✓ Electronic scale (XPE205, Mettler Toledo)
- ✓ Adjust pipette (0.5~10 ㎕, 20~200 ㎕, 100~1000 ㎕, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- ✓ Pipette tips (0.5~10 ㎕, 20~200 ㎕, 100~1000 ㎕, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- ✓ Water bath (SB-100, Tokyo Rikakikai Co., LTD., Japan)
- ✓ Vortex mixer (Vortex Genie 2)
- ✓ Ultrasonicator (Sonics & Material, Inc., USA)
- ✓ Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- ✓ Nitrogen Purge (EYELA MG-2200)
- ✓ Eppendorf tube (1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL, 5.0 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- ✓ Micro tube mixer (MT-360, Tomy Seiko Co., LTD., Japan)
- ✓ 96 well plate (Nunclon Delta Surface, Thermo Scientific)
- ✓ Glass vial (4 mL, 20 mL)
- ✓ Oven (OV-01, JEIO TECH)
- ✓ Drying Oven (C-DO, CHANG SHIN SCIENTIFIC CO.)

- ✓ Dry Block Bath (MG-2200, Tokyo Rikakikai Co., LTD., Japan)
- ✓ GC-MS Glass vial (2 mL Crimp vial, Agilent Technologies, USA)

2-3. 분석 기구

- ✓ Multi reader (Molecular devices, SpectraMax M5)
- ✓ GC-MS-QP2010 (Shimadzu, Japan)
- ✓ Columns: DB-5MS (0.25 ㎛, 0.25 mm X 30.0 m)

3. 실험 방법

3-1. 인삼 가루로부터 수용성 다당체 추출

이 실험을 본격적으로 진행하기 위해 앞서 인삼을 가루로 만들고, 그 가루로부터 수용성 다당체를 추출하였다. 수용성 다당체를 추출하기 위해 2009년도에 발표된 Zhang의 논문을 참고하였다.[26)]

인삼 가루를 부위별(주근 내부, 주근 외부, 주근, 지근, 뇌두, 세미)로 각각 400 mg을 잰 후 15 mL conical tube에 넣고 각각의 tube에 물 10 mL를 넣었다. 그리고 tube들을 water bath에 넣고 90℃에서 3시간 중탕하였다. 상온에서 식힌 후, 원심분리기(3000 rpm, 10분)를 이용하여 상층액인 물 추출액과 남아있는 인삼 가루를 분리하였다. 물 추출액에서 1 mL를 취하고, ethyl alcohol 4 mL을 넣어 하얀 침전물을 생성하였다. 원심분리기(3000 rpm, 10분)를 이용하여 상층액과 침전물을 분리하였다. 침전물에 물 4 mL를 넣어 녹인 후, n-butanol : chloroform(1:4)혼합액 1 mL를 넣어 liquid-liquid extraction을 진행하였다. 전체적으로 잘 섞은 후, 원심분리기(3000 rpm, 10분)를 이용하여 상층액인 물 층을 취하고 건조하여 인삼 가루로부터 얻은 수용성 다당체의 침전물인 WGP(White Ginseng Polysaccharides)를 얻었다 (Figure 1).

- ✓ 주근 내부의 WGP(n=5)
- ✓ 주근 외부의 WGP(n=5)
- ✓ 주근의 WGP(n=5)

- ✓ 지근의 WGP(n=5)
- ✓ 뇌두의 WGP(n=5)
- ✓ 세미의 WGP(n=5)

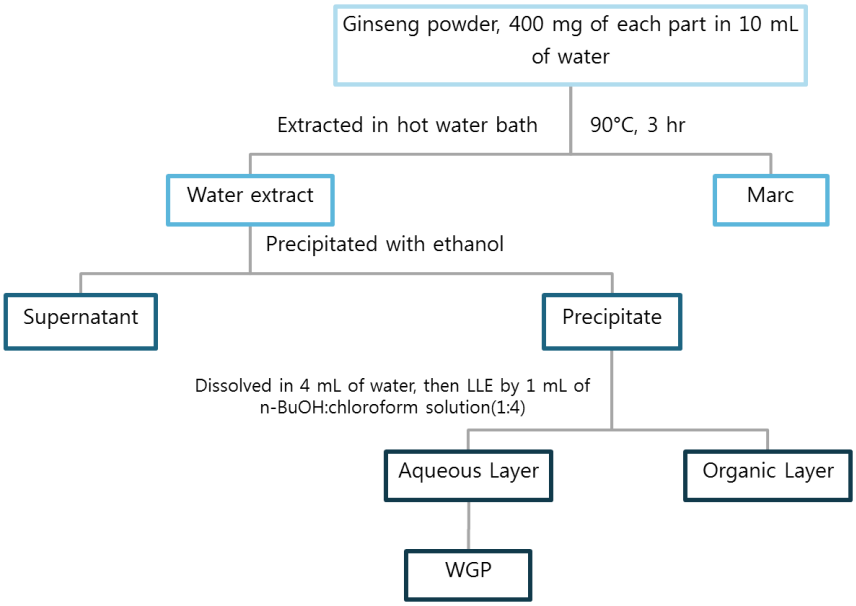

Figure 1. 인삼 가루로부터 수용성 다당체 추출과정

3-2. 페놀황산 비색분석법을 이용한 총당 함량 측정

앞에서 얻은 각각의 부위별 WGP를 다시 물 4 mL을 넣고 ultrasonicator와 vortex를 이용하여 녹였다. 따로 Glucose 표준품과 물을 이용하여 농도가 1000 mg/L인 표준액을 만들었다. 그리고 그 표준액을 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 그리고 500 mg/L으로 희석하여 만들었다.

페놀황산 비색분석법을 진행하기에 앞서, 샘플들의 흡광도를 함량으로 바꾸어 줄 수 있는 표준품 직선식과 분석법의 정확도를 시험하기 위해 표준품 첨가법의 직선식을 그리기 위해 실험을 진행하였다.

표준품 직선식은 5개의 표준액 농도 각각 100 ㎕, 5% phenol 60 ㎕, sulfuric acid 300 ㎕를 2.0 mL Eppendorf tube에 넣어 고르게 섞은 후, 오븐 90℃에서 20분동안 반응을 시켰다. 오븐에서 꺼낸 후, 96 well plate에 200 ㎕씩 옮기고 multi reader로 490 nm에서 검출하였다.

표준품 첨가법의 직선식은 5개의 표준액 농도 각각 100 ㎕, 인삼으로부터 얻은 WGP 검액 10 ㎕, 5% phenol 60 ㎕, sulfuric acid 300 ㎕를 2.0 mL Eppendorf tube에 넣어 고르게 섞은 후 오븐 90℃에서 20분동안 반응을 시켰다. 오븐에서 꺼낸 후, 96 well plate에 200 ㎕씩 옮기고 multi reader로 490 nm에서 검출하였다.

본격적으로 각각의 부위별 WGP의 총당 함량을 측정하기 위해 실험을 하였다. 각각의 검액 10 ㎕, 물 90 ㎕, 5% phenol 60 ㎕, sulfuric acid 300 ㎕를 2.0 mL Eppendorf tube에 넣어 고르게 섞은 후 오븐 90℃에서 20분동안 반응을 시켰다. 오븐에서 꺼낸 후, 96 well plate에 200 ㎕씩 옮기고 multi reader로 490 nm에서 검출하였다 (Figure 2).

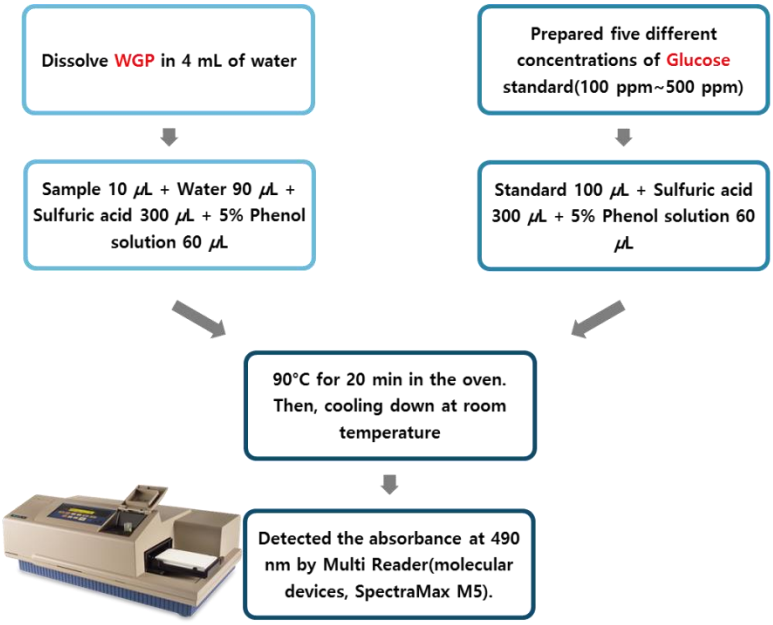

Figure 2. 총당 함량 측정을 위한 페놀황산 비색분석법 과정

3-3. 카바졸황산 비색분석법을 이용한 산성당 함량 측정

페놀황산 비색분석법과 마찬가지로, 앞에서 얻은 각각의 부위별 WGP를 다시 물 4 mL을 넣고 ultrasonicator와 vortex를 이용하여 녹였다. 따로 산성당 측정을 위해 Galacturonic acid 표준품과 물을 이용하여 농도가 1000 mg/L인 표준액을 만들었다. 그리고 그 표준액을 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 그리고 500 mg/L으로 희석하여 만들었다.

카바졸황산 비색분석법도 페놀황산 비색분석법과 동일하게, 샘플들의 흡광도를 함량으로 바꾸어 줄 수 있는 표준품 직선식과 분석법의 정확도를 증명하기 위해 표준품 첨가법의 직선식을 그리기 위한 실험을 먼저 진행하였다.

표준품 직선식은 5개의 표준액 농도 각각 20 ㎕, 물 80 ㎕, 0.1% carbazole-ethanol 50 ㎕, sulfuric acid 600 ㎕를 2.0 mL Eppendorf tube에 넣어 고르게 섞으면서 반응을 시켰다. 96 well plate에 200 ㎕씩 옮기고 multi reader로 525 nm에서 검출하였다.

표준품 첨가법의 직선식은 5개의 표준액 농도 각각 20 ㎕, 인삼으로부터 얻은 WGP 검액 50 ㎕, 물 30 ㎕, 0.1% carbazole-ethanol 50 ㎕, sulfuric acid 600 ㎕를 2.0 mL Eppendorf tube에 넣어 고르게 섞으면서 반응을 시켰다. 96 well plate에 200 ㎕씩 옮기고 multi reader로 525 nm에서 검출하였다.

본격적으로 각각의 부위별 WGP의 총당 함량을 측정하기 위해 실험을 하였다. 각각의 검액 20 ㎕, 물 80 ㎕, 0.1% carbazole-ethanol 50 ㎕, sulfuric acid 600 ㎕를 2.0 mL Eppendorf tube에 넣어 고르게 섞으면서 반응을 시켰다. 96 well plate에 200 ㎕씩 옮기고 multi reader로 525

nm에서 검출하였다 (Figure 3).

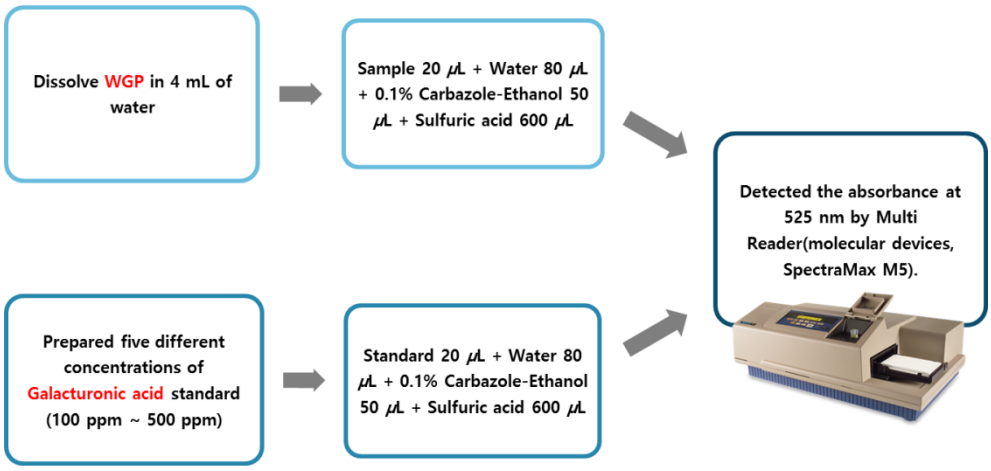

Figure 3. 산성당 함량 측정을 위한 카바졸황산 비색분석법 과정

3-4. GC-MS를 이용한 다당체 정성분석

먼저 GC-MS를 이용해 다당체 내에 Glucose와 Galacturonic acid의 존재를 확인하기 위해 주근, 지근, 뇌두, 세미로부터 얻은 다당체 WGP를 산 가수분해를 통해 단당체로 만드는 과정은 다음과 같다. 인삼의 각 부위로부터 얻은 수용성 다당체 WGP를 1 mg씩 glass vial에 넣고 4 mL의 5 M hydrochloric acid를 넣었다. 그리고 오븐 100℃에서 3시간 반응을 시켰다. 상온에서 식힌 후, nitrogen purge를 이용하여 건조하여 단당체를 만들었다.

GC-MS에서 검출하기 위한 유도체화 과정은 다음과 같다. 앞서 얻은 단당체에 농도 20 mg/mL의 methoxyamine hydrochloride 100 ㎕를 넣고 37℃에서 90분동안 반응시켰다. 그리고 100 ㎕의 BSTFA를 넣고 65℃에서 25분간 반응시켰다. 상온에서 식힌 후, GC-MS용 glass vial에 넣어 GC-MS 정성 분석을 위한 샘플을 만들었다 (Figure 4).

GC-MS는 Shimadzu-QP1020을 사용하였고, 칼럼은 DB-5MS (0.25 ㎛, 0.25 mm X 30.0 m)를 사용하였다. MS는 scan 모드로 진행하였고, 범위는 m/z 40.0~500.0로 지정하였다. 자세한 GC-MS 조건은 Table 1에 명시되어있다.

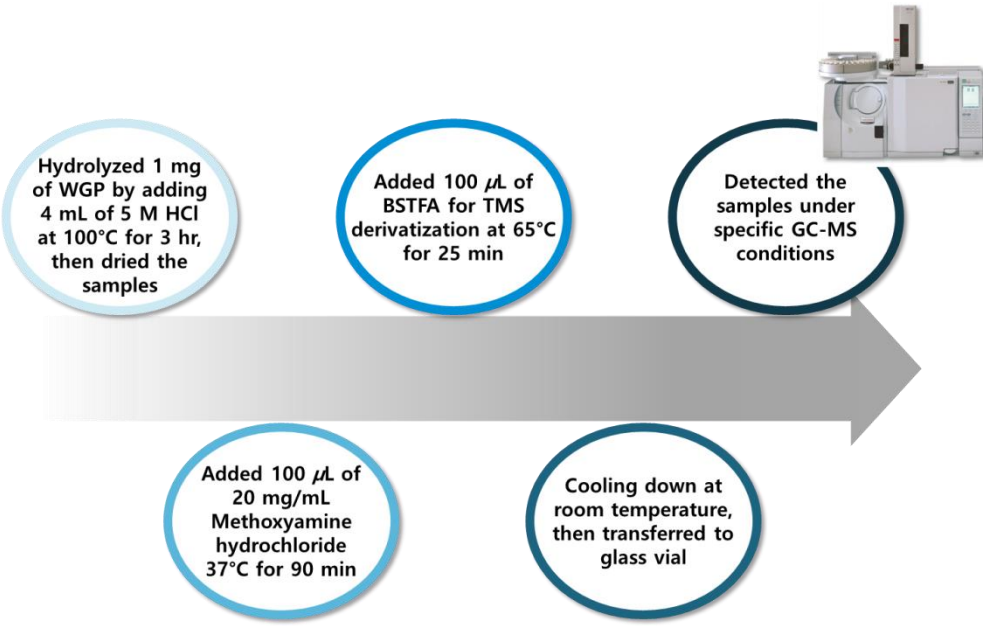

Figure 4. GC-MS를 이용한 인삼의 다당체 정성 분석

GC conditions	
Column	DB-5MS(0.25 μm, 0.25 mm x 30.0 m)
Column oven temperature	80℃
Injection temperature	300℃
Carrier gas	Helium gas
Total flow rate	4.0 mL/min
Column flow rate	1.0 mL/min
Gradient	150.0℃(hold for 1 min) → 150.0℃(hold for 3 min) → 200.0℃(hold for 1 min) → 300.0℃(hold for 2 min)
MS conditions	
Ion source temperature	200℃
Interface temperature	300℃
MS mode	Scan
Scan m/z range	40.0 ~ 500.0
Scan time range	4.00 ~ 50.50 min

Table 1. GC-MS 분석 조건

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 페놀황산 비색분석법을 이용한 총당 함량 측정

먼저, 페놀황산을 이용한 비색분석법의 정확도를 측정하기 위해 표준품 Glucose를 이용하여 진행하였다. 표준액 농도 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 그리고 500 mg/L으로 직선식을 그렸을 때, $y=3.69 \times 10^{-3}x-0.0619$이었다. R^2값은 1에 가까울수록 이 분석법이 정확하게 수행될 수 있다고 말할 수 있는데 여기서 얻은 값은 0.9906이었다. 또한, 동일한 표준액의 농도에 동일한 WGP 시료 검액을 넣었을 때 직선식이 평행하게 움직이는 지를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 그 결과, 직선식은 $y=3.42 \times 10^{-3}x+1.4219$이었고 유사한 기울기 값을 보여주고 있다. 여기서 R^2값은 0.9682이었다 (Figure 5). 이 두 가지의 직선식을 통해 페놀황산 비색분석법은 인삼의 다당체 분석 중에 총당 함량 분석하기에 쓰일 수 있다고 판단된다.

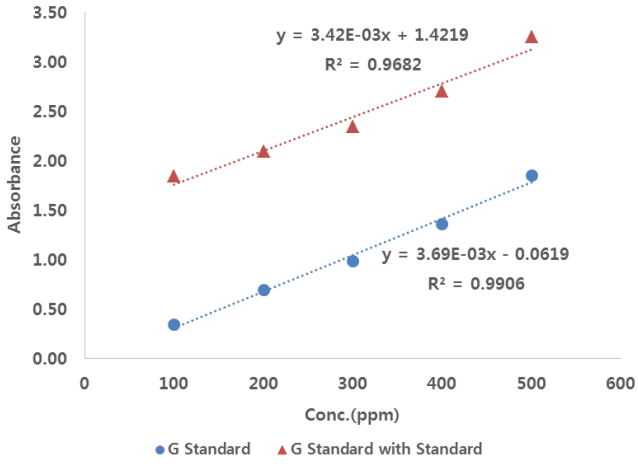

Figure 5. 표준품 Glucose의 직선식과 일정한 농도의 WGP 시료를 첨가하였을 때의 직선식

인삼을 주근 내부, 주근 외부, 주근, 지근, 뇌두, 세미로 나누어 분석을 진행하여 흡광도를 측정한 결과, 각 부위의 평균값으로 Figure 6를 그렸을 때, 주근의 내부와 외부의 총당 함량은 거의 유사한 것으로 보여졌다. 나머지 네 부위의 측정된 흡광도를 비교해보면 주근에서 가장 높은 흡광값을, 뇌두가 가장 낮은 흡광값을 보여주고 있다. Figure 6(b)에서 각 그래프 위에 알파벳은 같은 알파벳끼리의 *p*값이 0.05보다 작다는 것을 표시하였다.

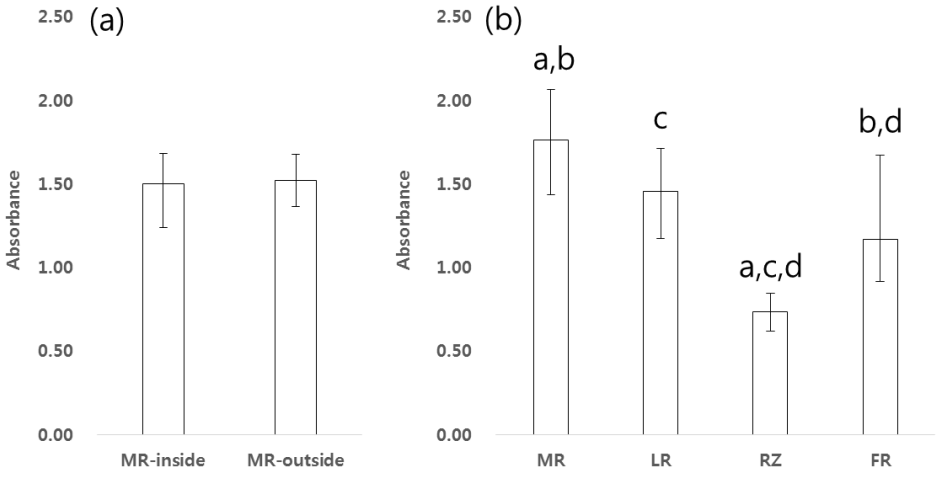

Figure 6. 페놀황산 비색분석법으로부터 얻은 각각의 부위에 따른 흡광도 값 (n=5) (a) 주근 내부(MR-inside)와 주근 외부(MR-outside) (b) 주근(MR), 지근(LR), 뇌두(RZ), and 세미(FR), $p<0.05$, a(주근과 뇌두), b(주근과 세미), c(지근과 뇌두), d(뇌두와 세미)

앞서 얻은 표준품의 직선식과 각각의 부위의 흡광도 값을 가지고 계산을 한 후 실제 이용된 샘플의 농도로 나누었을 때, 샘플 내 총당 함량 비율을 계산 할 수 있었다. 그 결과를 토대로 그린 그림이 Figure 7이다. Figure 7은 Figure 6와 동일한 패턴의 그래프가 그려졌다. 먼저, 주근의 내부(42.26%)와 외부(42.77%)의 함량 비율 차이는 거의 나지 않음을 확인할 수 있었다. 주근의 총당 함량 비율(49.31%)이 가장 많았고, 지근(41.04%), 세미(33.29%), 뇌두(21.58%) 순이었다.

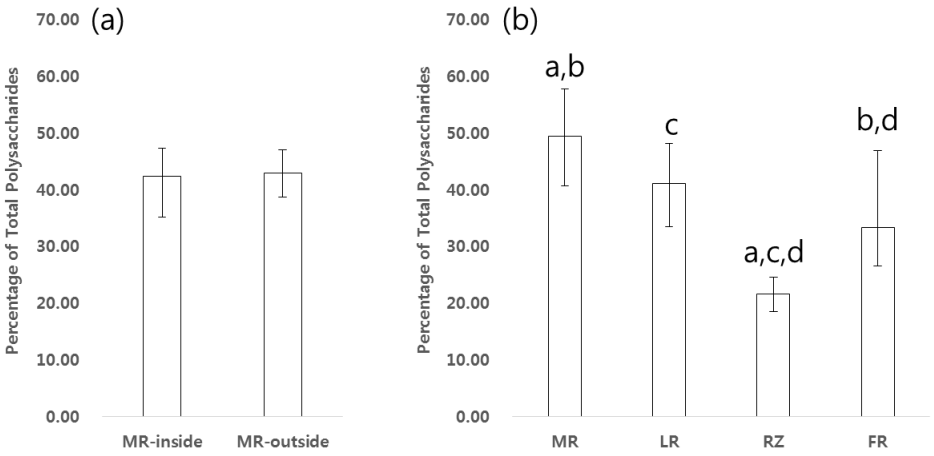

Figure 7. 각각의 부위에 따른 총당 함량 비율 (n=5) (a) 주근 내부 (MR-inside)와 주근 외부(MR-outside) (b) 주근(MR), 지근(LR), 뇌두(RZ), and 세미(FR), $p<0.05$, a(주근과 뇌두), b(주근과 세미), c(지근과 뇌두), d(뇌두와 세미)

발표된 논문들에 따르면 현 연구에서 페놀황산을 이용한 비색분석법은 유사한 결과가 보여지고 있음을 알 수 있었다. 2013년도에 발표된 Cho등에 따르면 인삼 내 총당 함량 비율은 36.5%라고 언급하였다.[27] 이것은 본 연구에서 주근, 지근, 뇌두, 그리고 세미에서 얻은 총당 함량 비율의 평균값인 36.3%와 상당히 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 1992년도에 Han등이 발표한 논문과 2005년도에 Jang등이 발표한 논문에 따르면 가장 많은 양의 총당을 포함하고 있는 부위는 주근이라고 언급하였다.[28,29] 이것 또한 현 연구에서 얻어낸 결과와 일치하는 것을 확인 할 수 있었다.

2. 카바졸황산 비색분석법을 이용한 산성당 함량 측정

페놀황산을 이용한 비색분석법에서와 마찬가지로 카바졸황산 비색분석법의 정확도를 알아보기 위해 표준품 Galacturonic acid를 이용하여 두 가지의 직선식을 그렸다. 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 그리고 100 mg/L의 표준액 직선식은 $y=2.44 \times 10^{-3}x+0.0236$이고, R^2값은 0.9854이었다. 그리고 같은 농도의 표준액에 동일한 농도의 WGP 시료 검액을 첨가하여 직선식이 평행이동을 하는지를 확인하는 실험을 진행하였다. 그리하여 얻은 직선식은 $y=2.35 \times 10^{-3}+0.1587$이고, R^2값은 0.9514이었다. 두 직선식의 기울기 값을 비교해보면, 두 번째 그려진 직선식이 시료 검액의 첨가로 인하여 평행하게 이동했다는 것을 확인할 수 있었다. 다시 말하자면, 카바졸황산 비색분석법 또한 인삼 내 산성당 함량 측정에 적합한 분석법이라고 할 수 있다 (Figure 8).

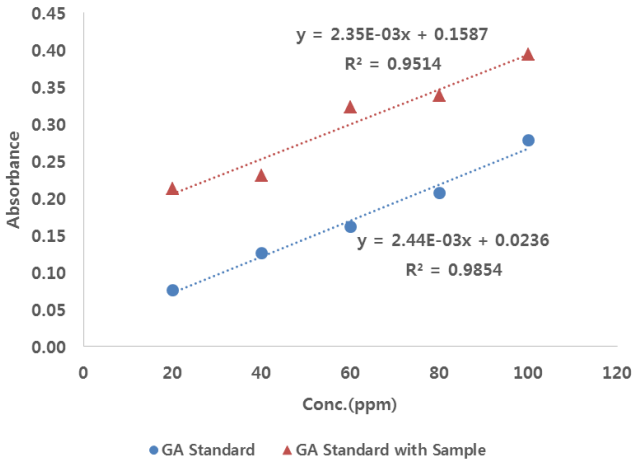

Figure 8. 표준품 Galacturonic acid의 직선식과 일정한 농도의 WGP 시료를 첨가하였을 때의 직선식

카바졸황산 비색분석법을 이용하여 얻은 흡광도 값으로 그린 Figure 9를 보면, 인삼의 주근 내부와 외부의 흡광도 값의 차이는 유의할 정도로 크게 차이가 나지 않음을 확인할 수 있었다. Figure 9(b)에 따르면 세미가 가장 높은 흡광도 값을 보이고 있고 주근이 가장 낮은 흡광도 값을 보이고 있는 것을 확인해 볼 수 있었다.

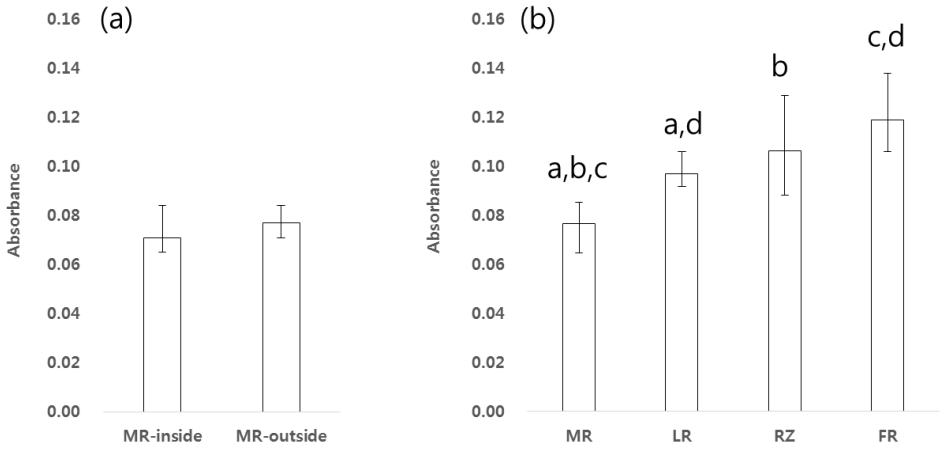

Figure 9. 카바졸황산 비색분석법으로부터 얻은 각각의 부위에 따른 흡광도 값 (n=5) (a) 주근 내부(MR-inside)와 주근 외부(MR-outside) (b) 주근(MR), 지근(LR), 뇌두(RZ), and 세미(FR), $p<0.05$, a(주근과 지근), b(주근과 뇌두), c(주근과 세미), d(지근과 세미)

Figure 10은 표준품 Galacturonic acid를 이용한 직선식과 각각의 부위별 흡광도 값을 이용해 계산하여 얻은 샘플 내 산성당 함량 비율을 나타내는 그림이다. Figure 9에서 언급했던 것처럼 주근 내부(0.97%)와 외부(1.09%)의 큰 차이는 없었다. 나머지 네 부위의 산성당 함량 비율은 흡광

도 값을 가지고 그린 그림과 같은 패턴을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 세미에서 가장 많은 산성당의 함량 비율(1.95%)을, 뇌두(1.69%), 지근(1.50%), 주근(1.08%) 순이었다.

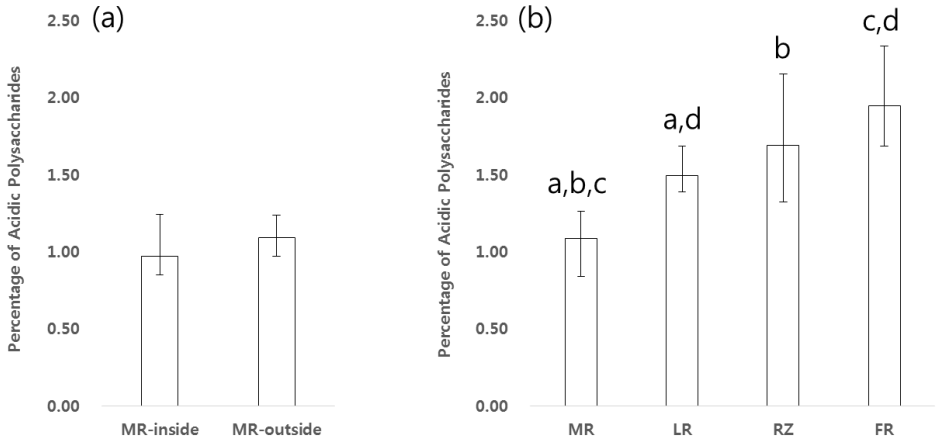

Figure 10. 각각의 부위에 따른 산성당 함량 비율 (n=5) (a) 주근 내부(MR-inside)와 주근 외부(MR-outside) (b) 주근(MR), 지근(LR), 뇌두(RZ), and 세미(FR), $p<0.05$, a(주근과 지근), b(주근과 뇌두), c(주근과 세미), d(지근과 세미)

본 연구에서 얻은 결과를 토대로 발표된 논문들을 비교해보면 다른 결과가 나왔음을 확인하였다. 2014년도에 발표된 Cho등에 따르면 인삼 내 산성당 함량 비율은 4.3%라고 발표하였고[30], 본 연구에서는 네 부위의 산성당 함량 비율 평균은 1.6%인 것을 확인하였다. 산성당 함량 비율에 약간의 차이가 있는 것은 Cho등에 의해 발표된 논문에 정확히 언급되지 않은 산성당의 추출과정이나 카바졸황산 비색분석법에서의 차이가 있다고 판단된다. 또한, 여태까지 발표된 논문들 중 2005년도 Ha등과 2005년

도 Nam에 따르면 산성당은 세미보다는 주근에 더 많다고 언급하였지만[31,32], 본 연구에서는 반대의 결과인 세미에서 산성당 함량이 더 많은 것을 밝혀내었다. 이 또한 정확한 추출과정이나 비색분석법 과정이 언급돼 있지 않아 실험과정에서의 차이와 샘플 시료에서의 차이가 있다고 생각이 된다.

3. 총당 내 산성당의 비율

앞에서 얻은 인삼 내 총당 함량 비율에서 산성당 함량 비율을 확인해 보고자 그린 그래프가 Figure 11이다. Figure 11(a)를 보면 주근 내부와 외부의 총당 함량 비율의 차이가 크게 나지 않음을 다시 한번 확인할 수 있었고, 산성당 함량 비율 또한 유사한 것을 알 수 있었다. Figure 11(b)에서는 부위별 총당 내 산성당의 비율을 확인해 볼 수 있었다. 뇌두는 가장 적은 양의 총당 함량 비율이지만 두 번째로 많은 양의 산성당 함량 비율을 가지고 있어서 총당 내 산성당의 비율(7.83%)이 가장 높은 부위인 것을 또한 확인하였고, 세미(5.85%), 지근(3.65%), 주근(2.20%) 순이었다.

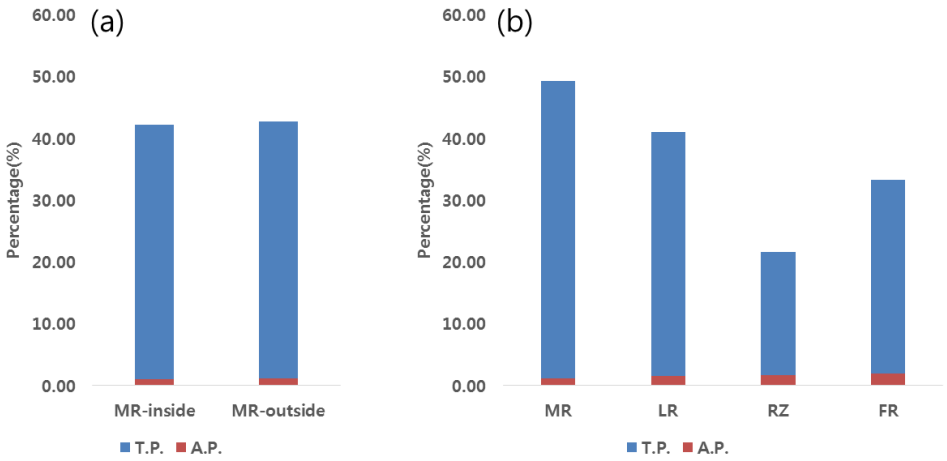

Figure 11. 총당 내 산성당의 비율 (n=5) (a) 주근 내부(MR-inside)와 주근 외부(MR-outside) (b) 주근(MR), 지근(LR), 뇌두(RZ), and 세미(FR)

4. GC-MS를 이용한 다당체 정성분석

각각의 인삼 부위별 다당체 내 특정 성분들이 존재하는지 확인하기 위해 GC-MS를 이용하여 정성분석을 진행하였다. 대표로 표준품 Glucose와 Galacturonic acid를 이용하여 각각 총당과 산성당의 정성분석을 진행하였다. WGP는 다당체의 형태이기 때문에 단당체인 Glucose와 Galacturonic acid의 존재를 확인하려면, 다당체에서 단당체로 만들기 위해 산을 이용한 가수분해를 진행하였다. 그 결과, 시료 검액들의 GC 크로마토그램의 유지시간과 MS 스펙트럼을 표준품들과 비교하여 일치하는 것을 확인하였고, 총당을 대표하는 Glucose와 산성당을 대표하는 Galacturonic acid의 존재를 확인할 수 있었다 (Figure 12).

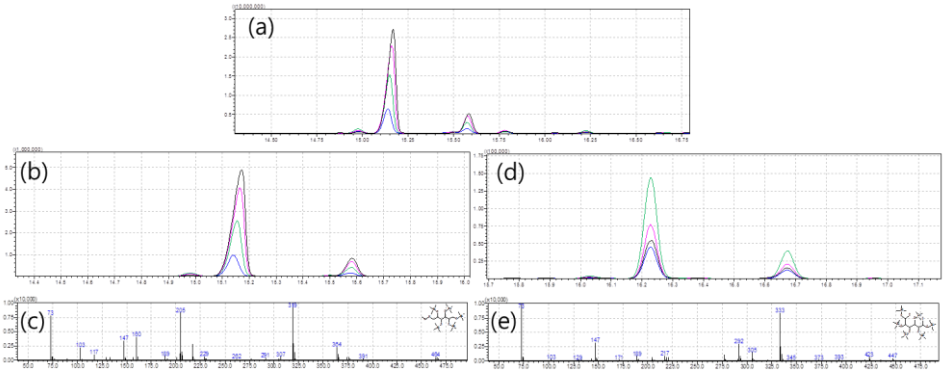

Figure 12. 각 부위별 GC-MS 크로마토그램; 주근, 지근, 세미, 뇌두 (n=5) (a) 각 부위별 Scan mode 크로마토그램 (b) SIM mode; *m/z* 319 (c) 표준품 Glucose의 MS 스펙트럼 (d) SIM mode; *m/z* 333 (e) 표준품 Galacturonic acid의 MS 스펙트럼

GC-MS를 이용하여 정량분석 또한 진행 할 수 있었지만, 다당체에서 단당체로 만들기 위한 산 가수분해 조건인 산의 농도, 가수분해의 온도, 가수분해의 시간에 따라 단당체의 양이 달랐음을 확인하고 정확한 존재 유무를 판단할 수 있는 정성분석만 진행하였다.

Ⅳ. 결론

본 연구에서는 현재 인삼의 품질관리를 인삼 내 많은 화합물들 중에 오직 진세노사이드로만 사용하여 관리한다는 실정을 파악하여 선진화된 인삼의 품질관리법을 제안하고자, 최근 활성이 좋다고 알려져 각광받고 있는 다당체를 인삼의 부위별로 나누어 분석하였다. 정량분석을 위해 페놀황산 비색분석법과 카바졸황산 비색분석법을 적용하였고, 정성분석을 위해 GC-MS를 사용하였다.

먼저, 주근의 내부와 외부의 총당(42.26%와 42.77%)과 산성당(0.97%와 1.09%)의 차이는 크게 나지 않음을 확인하였다. 네 부위들 중 가장 많은 총당 함량을 포함하고 있는 부위는 주근(49.32%)이고, 가장 적은 함량을 포함하고 있는 부위는 뇌두(21.58%)이다. 그리고 가장 많은 산성당 함량을 포함하고 있는 부위는 세근(1.95%)이고, 가장 적은 함량을 포함하고 있는 부위는 주근(1.08%)이다. GC-MS 정성분석을 통하여 이 부위들이 Glucose와 Galacturonic acid를 존재함을 확인하였다.

본 연구를 진행하면서 두 가지의 비색분석법들의 정확도를 확인해보고자 표준품 직선식과 표준품 첨가 직선식을 이용하여 증명하였고, 이 방법들을 사용하여 다당체를 활용한 인삼의 품질관리법을 더 구체화된 검증을 거쳐 제안할 수 있다고 판단된다.

V. 참고문헌

1. Nam K.Y., Ko S.R., Choi K.J. Relationship of Saponin and Non-saponin for the Quality of Ginseng. *J. Ginseng Res.* 1998; 22(4):274-283.

2. Sun Y. Structure and biological activities of the polysaccharides from the leaves, roots and fruits of Panax ginseng C.A. Meyer: An overview. *Carbohydr Polym.* 2011; 85:490-499.

3. Park J.S., Park E.M., Kim D.H., Jung K.S., Jung J.S., Lee E.J., Hyun J.W., Kang J.L., Kim H.S. Anti-inflammatory mechanism of ginseng saponins in activated microglia. *J. Neuroimmunol.* 2009; 209:40-49.

4. Tang W., Zhang Y., Gao J., Ding X., Gao S. The Anti-fatigue Effect of 20(R)-Ginsenoside Rg3 in Mice by Intranasally Administration. *Biol. Pharm. Bull.* 2008; 31(11):2024-2027.

5. Mook-Jung I., Hong H.S., Boo J.H., Lee K.H., Yun S.H., Cheong M.Y., Joo I.S., Huh K., Jung M.W. Ginsenoside Rb1 and Rg1 Improve Spatial Learning and Increase Hippocampal Synaptophysin Level in Mice. *J. Neurosci. Res.* 2001; 63:509-515.

6. Shibata S. Chemistry and Cancer Preventing Activities of Ginseng Saponins and Some Related Triterpenoid Compounds. *J Korean Med Sci.* 2001; 16(Suppl):S28-37.

7. Kang S.W., Min H.Y. Ginseng, the 'Immunity Boost': The Effects of Panax ginseng on Immune System. *J. Ginseng Res.* 2012;

36(4):354-368.

8. Wang J., Li S., Fan Y., Chen Y., Liu D., Cheng H., Gao X., Zhou Y. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from Panax Ginseng C. A. Meyer. *J Ethnopharmacol*. 2010; 130:421-423.

9. Luo D., Fang B. Structural identification of ginseng polysaccharides and testing of their antioxidant activities. *Carbohydr Polym*. 2008; 72:376-381.

10. Kim S.H., Kim J.Y., Park S.W., Lee K.W., Kim K.H., Lee H.J. Isolation and Purification of Anticancer Peptides from Korean Ginseng. *Food Sci. Biotechnol*. 2003; 12(1):79-82.

11. Lee L.S., Cho C.W., Hong H.D., Lee Y.C., Choi U.K., Kim Y.C. Hypolipidemic and Antioxidant Properties of Phenolic Compound-Rich Extracts from White Ginseng (Panax Ginseng) in Cholesterol-Fed Rabbits. *Molecules*. 2013; 18:12548-12560.

12. Choi C.S., Kim K.I., Hong H.D., Choi S.Y., Lee Y.C., Kim K.T., Rho J.H., Kim S.S., Kim Y.C. Phenolic acid composition and antioxidative activity of white ginseng (Panax ginseng, C.A. Meyer). *J. Ginseng Res*. 2006; 30(1):22-30.

13. 대한미국약전 제 11개정. 식품의약품안전처.

14. 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황. 식품의약품안전처.

15. 대한민국약전외한약(생약)규격집. 식품의약품안전처.

16. 식품공전 해설서. 식품의약품안전처.

17. Ovodov Y.S., Solov' eva T.F. Polysaccharides of Panax Ginseng. *Khim Prir Soedin*. 1966; 2(5):299-303.

18. Kim Y.S., Kang K.S., Kim S.I. Study on Antitumor and Immunomodulating Activities of Polysaccharide Fractions from Panax ginseng: Comparison of effects of neutral and acidic polysaccharide fraction. *Arch. Pharm. Res*. 1990; 13(4):330-337.

19. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem*. 1956; 28(3):350-356.

20. Asghari F.S., Yoshida H. Acid-Catalyzed Production of 5-Hydroxymethyl Furfural from D-Fructose in Subcritical Water. *Ind. Eng. Chem. Res*. 2006; 45:2163-2173.

21. Albalasmeh A.A., Berhe A.A., Ghezzehei T.A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr Polym*. 2013; 97:253-261.

22. Holzman G., MacAllister R.V., Niemann C. The Colorimetric Determination of Hexoses with Carbazole. *J. Biol. Chem*. 1947; 171:27-35.

23. Bitter T., Muir H.M. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Anal. Biochem*. 1962; 4:330-334.

24. Bowness J.M. 5-Formylfuroic Acid and the Carbazole Reaction for Uronic Acids and Acidic Polysaccarides. *Biochem J*. 1958; 70(1):107-110.

25. Yapo B.M. On the Colorimetric-Sulfuric Acid Analysis of Uronic Acids in Food Materials: Potential Sources of Discrepancies in Data and How to Cricumvent Them. *Food Anal. Methods.* 2012; 5:195-215.

26. Zhang X., Yu L., Bi H., Li X., Ni W., Han H., Li N., Wang B., Zhou Y., Tai G. Total fractionation and characterization of the water-soluble polysaccharides isolated from Panax ginseng C. A. Meyer. *Carbohydr Polym.* 2009; 77:544-552.

27. Cho C.W., Kim Y.C., Kang J.H., Rhee Y.K., Choi S.Y., Kim K.T., Lee Y.C., Hong H.D. Characteristics study on the chemical components Korean curved ginseng products. *J. Ginseng Res.* 2013; 37(3):349-354.

28. Han Y.N., Kim S.Y., Lee H.J., Hwang W.I., Han B.H. Pattern-Analysis of Panax ginseng Polysaccharide. *Korean J. Ginseng Sci.* 1992; 16(3):217-222.

29. Jang S.A., Moon S.K. Analysis of Total Sugar by Extraction Condition and Material to Develop the Extraction Process of Ginseng Polysaccharide. *Korean J. Food Preserv.* 2005; 12(4):367-371.

30. Cho C.W., Kim Y.C., Rhee Y.K., Lee Y.C., Kim K.T., Hong H.D. Chemical composition characteristics of Korean straight ginseng products. *J. Ethn Foods.* 2014; 1:24-28.

31. Ha D.C., Ryu G.H. Chemical Components of Red, White and Extruded Root Ginseng. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* 2005;

34(2):247-254.

32. Nam K.Y. The Comparative Understanding between Red Ginseng and White Ginsengs Processed Ginsengs (Panax Ginseng C. A. Meyer). *J. Ginseng Res*. 2005; 29(1):1-18.

Abstract

Ginseng polysaccharides is a polymer of monosaccharides of Ginseng and can be either acidic polysaccharides or neutral polysaccharides depending on components. Recently, many researches mentioned about the activity of ginseng polysaccharides, which is an improvement of immunity system by activating macrophage and natural killer cells. However, due to a huge molecular weight of polysaccharides, its analysis was difficult to be performed. Then, this led to be lack in the number of researches about polysaccharides compared to the researches about ginsenosides.

Therefore, in this study, acidic polysaccharides with its representative standard Galacturonic acid and total polysaccharides with its representative standard Glucose were quantified by different parts of ginseng. Ginseng was separated into several different parts: Main root inside, Main root outside, Main root, Lateral root, Rhizome, and Fine root. The quantification analysis was proceeded by two different methods, Phenol-sulfuric acid method and Carbazole-sulfuric acid method. Additionally, the qualification analysis was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The polysaccharides were extracted from ginseng, and then they were hydrolyzed and derivatized before analyzing by GC-MS.

As a result, for total polysaccharides, the main root contains the most abundant amount, and the rhizome contains the least amount. For acidic polysaccharides, the fine root contains the most abundant amount, and the main root contains the least amount. On the basis of the results, the highest ratio of acidic polysaccharides to total polysaccharides belongs to the rhizome, and the lowest ratio belongs to the main root.

Through this research, the polysaccharides of ginseng were analyzed by both quantification and qualification. Hopefully, newly developed quality control for ginseng would be suggested in the near future by

actively performed analysis not only of polysaccharides but also of their activity.

Keywords: Ginseng, Polysaccharides, Colorimetry, Phenol-sulfuric acid method, Carbazole-sulfuric acid method, Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Student ID: 2015-21905