J. Fd Hyg. Safety 11(1), 41 - 50(1996)

감마선 조사된 홍삼분말의 항산화 효과 및 유전독성학적 안전성

욱홍선 · 김성애 · 조성기* · 변명우*†
*충남대학교 식품영양학과, 한국원자력연구소**

Effect of Gamma Irradiation on the Antioxidative Activity and *In vitro* Genotoxicol Safety of Red Ginseng Powder

Hong-Sun Yook, Seong-Ai Kim, Sung-Kee Jo* and Myung-Woo Byun*†
Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Taejon, Korea
**Department of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Yusung P.O. Box 105, Taejon, Korea*

ABSTRACT — The yields of solvent fractions of irradiated red ginseng powder were increased in the order of petroleum ether(PE)<diethyl ether(DE)<ethyl acetate(EA)<n-butanol (BU)<aqueous fraction(AQ), and did not show any changes in fraction yields by irradiation dose levels. Inhibition activities of lipid peroxide formation were increased in the order of AQ<BU <PE<EA<DE. Inhibition activities of malonaldehyde formation were increased in the order of AQ≦BU<EA<PE<DE. AQ fraction showed little effects on the antioxidative activity and all the activities of the samples did not changed by gamma irradiation. The reverse mutation assay using *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 and TA102) demonstrated that the nonirradiated and irradiated red ginseng powder extract did not have mutagenic activity (presence of S9 mix or not). The chromosomal aberration test in mammalian animal cell (Chinese hamster lung fibroblast, CHL) showed no significant increase in incidence of structural and numerical aberrations, comparing gamma-irradiated red ginseng powder extracts to nonirradiated red ginseng powder extract in the concentration of the sample producing cytotoxicity(presence of S9 mix or not). Therefore, gamma-irradiatied red ginseng powder (upto 10 kGy) could be safe on the genotoxic point of view.

Key words □ Gamma irradiation, Red ginseng powder, Genotoxic point

최근 경제성장과 더불어 국민소득과 생활수준이 날로 향상됨에 따라 건강에 대한 일반국민의 관심이 증가되고 있으며, 특히 약물이 아닌 천연물질로서의 생약에 대한 기호가 높아지고 있는 시점에서 홍삼은 큰 역할을 담당하고 있다. 홍삼 및 그 제품은 현대적인 제조공정과 GMP(Good manufacturing practice) 규격의 위생적인 시설하에서 제조되어 엄격한 품질관리 시스템을 거쳐 국내판매 및 국외로 수출하고 있어 제품의 품질이 균일하다고 볼 수 있다.[1] 그러나, 원료 홍삼의 저장이나 제품의 장기 유통과정에서 해충, 미생물 등에 의한 생물학적 품질저하가 발생될 수 있으며, 이를 방지하기 위한 목적으로 ethylene oxide(EO)훈증제 처리가 사용되었으나, 화학약품의 잔류 및 유독성 물질의 생성 등 그 유해성으로 인해 최근 사용이 국제적으로 금지된 이후[2-4] 효과적인 살균방법의 개발과 이용이 중요한 과제로 부각되고 있는 실정이다. 따라서, 훈증처리가 금지된 이후 인삼제품류의 살균을 위한 적당한 방법이 없는 현 상황에서 이미 국제적으로 안전성과 경제성이 공인되어, 세계 37개국에서 200여종의 식품군에서 산업적으로 사용되고 있는 감마선 조사기법을 이용하여 홍삼제품류의 위생화 기술개발연구를 수행하였다. 앞선 보고[5,6]에서 홍삼분말의 오염미생물에 대한 감마선조사의 살균효과에서는 호기성 전세균은 7.5 kGy, 곰팡이 및 대장균군은 2.5 kGy의 낮은 조사선량에서도 검출한계 이하로 사멸되어 실온에서 6개월 저장까지 모든 미생물의 생육과 증식이 없었다. 또한, 사포닌을 포함한 이화학적 특성 변화에서도 감마선조사의 영향은 무시될 정도였다. 따라서, 본 연구는 감마선 조사가 홍삼분말의 생리활성 중 항산화 효과와 유전독성학적 안전성에 미치는 영향을 조사하였다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

시료 및 방사선 조사

본 실험에 사용된 홍삼분말은 한국인삼연초연구소에서 제조된 제품을 구입하여 시료로 사용하였다. 시료의 방사선 조사는 한국원자력연구소에 소재하는 Co-60 감마선원(10만 Ci)을 이용하여 실온에서 시간당 1 kGy 선량율로 0, 2.5, 5, 7.5, 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 감마선 조사후 감마선 조사시료는 비조사 대조시료와 함께 실온에 보관하면서 실험에 사용하였다.

감마선조사 홍삼분말의 항산화력 시험

홍삼분말의 용매별 획분 조제 – 감마선조사 및 비조사 홍삼분말의 각 획분의 분리는 용매별 항산화물질의 획분방법과 인삼의 항암성분 획분에 관한 연구보고를 참조하여 Fig. 1과 같은 과정으로 용매의 극성차를 이용해 비극성용매획분으로부터 극성 용매 획분으로 각각 분리하였다.[7-11] 즉 감마선조사 및 비조사한 홍삼분말 20 g에 10배량의 80% methanol을 가하여 실온에서 200 rpm 으로 진탕시켜 24시간 추출한 후 여지에 여과하였다. 1차 추출된 잔사를 상기와 같은 조작으로 2회 더 반복 추출후 총 추출여액을 합한 다음 감압 농축하여 80% methanol extract를 얻었다. 이 extract를 물 50 m*l*에 용해시켜 분액깔대기에 넣고 petroleum ether(50 m*l*씩 3회반복)로 추출하여 petroleum ether fraction을 얻었다. 그 수층을 다시 분액깔대기에 넣고 상기와 같은 방법으로 diethyl ether fraction, ethyl acetate fraction, 수포화 n-butanol fraction 및 aqueous fraction으로 각각 획분후 감압농축하여 중량법으로서 각획분의 수율을 구하였다. 각각의 획분 농축물들은 최종적으로 10 m*l*의 100% methanol에, aqueous fraction은 50% methanol에 용해시켜 항산화효과를 조사하였다.

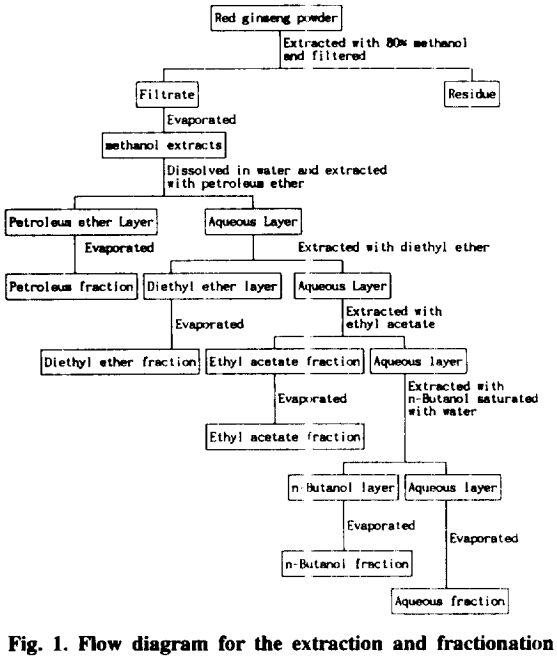

Fig. 1. Flow diagram for the extraction and fractionation of red ginseng powder with various solvents.

과산화물가 측정 – Linoleic acid methyl ester(Nacalai Inc. 3Japan)를 기질로 사용하여 Ando 등의 방법[12]에 따라 측정하였다. 즉 linoleic acid methyl ester 100 μ*l*와 각 획분 시료용액 50 μ*l*를 시험관에 넣고 50°C 항온기에 저장하여 산화를 촉진시킨 다음 chloroform-acetic acid(2:3, v/v) 35 m*l*에 용해시켰다. 이 용액을 공전 삼각 플라스크에 넣고 질소가스로 플라스크내의 공기를 치환시킨 후 포화 KI 수용액 1 m*l*를 첨가하고 1분간 격렬하게 혼합하여 암소에서 5분간 방치시킨 다음 즉시 증류수 75 m*l*와 1% 전분시액 1 m*l*를 첨가 혼합하여 0.01 N $Na_2S_2O_3$ 용액으로 I_2를 역적정하여 과산화물가(POV)를 측정하였다. 이때 POV는 다음과 같은 식으로 산출하였다.

$$\text{POV (meq/kg)} = \frac{(Tv - Bv) \times 0.01 \times 1000 \times F}{W}$$

Tv : 적정에 소비된 0.01N $Na_2S_2O_3$용액의 소비량(m*l*)
Bv : 사용된 기질(linoleic acid methyl ester)의 적정에 소비된 0.01 N $Na_2S_2O_3$용액의 소비량(m*l*)
W : 사용된 linoleic acid ester의 량(g)
F : $Na_2S_2O_3$ 용액의 역가

지질의 말론알데히드 측정 – 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 linoleic acid methyl ester를 첨가하여 기질용액을 조제하였다. 기질용액에 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0), 각 획분시료액을 첨가한 후 shaking incubator(60°C)에서 100 rpm으로 계속 진탕하면서 Mitsuda,[13] Sidwell,[14] 최[15]의 방법에 따라서 경시적으로 TBA(2-thiobarbituric acid)값을 측정하였다. 즉 경시적 반응액에 35% TCA 1.0 m*l*, 0.75% TBA 시약 2.0 m*l*를 가한 다음 vortex mixer로 진탕하여 균질화시킨 후 95°C water bath 에서 40분 동안 반응, 발색시켰다. 반응이 끝난 후 ice bath 상에서 실온까지 냉각시켜 acetic acid 1.0 m*l*, chloroform 2.0 m*l*를 가하고, vortex mixer로 다시 진탕시킨 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 그 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 이를 TBA값으로 하였으며, 대조

군에 해당하는 TBA값과 비교하여 유지에 대한 산화억제 효과를 추정하였다.

감마선조사 홍삼분말의 유전독성학적 안전성 시험

홍삼분말 extract 조제—감마선조사 및 비조사한 홍삼분말을 냉각관이 부착된 1,000 m*l* 삼각플라스크에 넣고 80% ethanol을 가해 60°C water bath에서 8시간씩 2회 반복추출하고 상기 추출액들을 합하여 여과한 후 감압농축하여 85° Brix 의 홍삼 extract를 제조하였다. 제조된 extract는 적당한 농도로 희석한 후 돌연변이원성 및 염색체변이 시험에 사용하였다.

Salmonella typhimurium 복귀돌연변이시험

Ames test 시험용 균주—시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 는 한국국립보건안전연구원으로 부터 분양받았고, 각 균주는 Maron과 Ames의 방법[16]에 따라 histidine 요구성, deep rouph(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이, R-factor에 의한 Ampicillin 또는 Tetracycline 내성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 사용하였다. 각 균주는 -80°C의 DMSO동결보존으로 부터 직접 10 m*l*의 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 12시간 회전식 진탕배양한 후 시험에 사용하였다.

Mutagenicity test를 위한 S9mixture, 배지, 필요한 시약의 조제는 Maron과 Ames[16]의 방법에 따라 행하였으며 Matsushima 등[17]의 방법에 따라 mutagenicity test를 행하였다. 즉, 대사활성물질(S9mix)을 이용하지 않는 경우에 사용한 시험법은 standard plate incorporation test(직접법)로서, 시험관(20 mm × 150 mm, borosilicated glass)에 시험물질을 100 μ*l* 씩 분주한 다음, histidine/biotin 이 첨가된 top agar를 2 m*l*씩 가하여 45°C water bath에 정치시켜 두고, oxoid nutrient broth에서 하룻밤 배양시킨 균배양액을 100 μ*l*씩 가하여 잘 혼합한 후 미리 만들어 놓은 minimal glucose agar plate 상에 부어 평판고화시킨 다음, 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀변이의 집락 수를 계수하였다. 이때 시험물질 대신에 인산완충용액을 넣어 자연복귀변이 수를 측정하기 위한 음성대조군, 시험물질을 녹이는데 사용된 용매를 넣은 용매대조군 및 각 시험용 균주에 따라 원저에 제시된 변이원성물질을 넣은 양성대조군도 포함시켰다. 복귀변이 집락의 수는 음성대조군과 용매대조군은 plate 3매의 평균치, 시험군은 2매의 평균치로 나타내었다.

시험관내 대사활성물질(S9mix)을 이용한 시험법으로는, Standard plate incorporation test의 변형인 preincubation test로서, 시험관(20 mm × 150 mm)에 시험물질을 100 μ*l*씩 가하고, S9mix 0.5 m*l* (S9(-)대조군에는 PBS 0.5 m*l*)를 가하여, 37°C shaking incubator에서 30분간 배양한 다음, 45°C water bath에 미리 정체시켜둔 top agar 2 m*l*를 첨가하여 혼합하고 minimal glucose agar plate 상에 부어 평판고화시킨 다음, 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀변이의 집락수를 계수하였다. 복귀변이집락의 수는 S9(-)대조군과 용매대조군은 plate 3매의 평균치, 시험군과 양성대조군은 2매 평균치로 나타내었다. 돌연변이 유발성의 판정은 원저의 제시에 따라 복귀변이 집락수가 용매대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 가지는 경우를 양성으로 하였다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험[18]

시험에 사용된 Chinese hamster lung fibroblast(CHL) 세포는 염색체가 25개이며, 세포주기는 15시간으로서 염색체이상 시험에 적합한 조건을 갖춘 세포로서 한국국립보건안전연구원에서 분양받았다. 배지는 10% fetal bovine serum, 100 U/m*l* penicilin, 100 μg/m*l* streptomycin, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol 및 20 mM HEPES buffer를 첨가시킨 Eagle's minimal essential medium을 사용하였으며 모두 Gibco BRL, Inc.(U.S.A)에서 구입하였다. 배양은 포화상대습도조건의 5% CO_2를 공급하는 37°C의 CO_2 Incubator에서 수행하였으며, 3~5일마다 0.05% Trypsin-EDTA(Gibco BRL, Inc.)를 사용하여 계대 배양하였다. 시험방법은 예비독성시험에서의 50% 세포증식 억제농도를 최고농도로하고, 이의 1/3 및 1/10 이되는 농도를 시험에 사용하였다. 또한 음성대조군과 이미 확인된 양성대조군을 두었으며, 대사활성 부재 및 존재하에서 시험하였다. 대사활성물질을 이용하지 않는 경우, CHL세포(1.5×10^5개)를 6-well plate에 파종하고 2일간 배양한 후 시험물질을 첨가하고 세포수집 2시간전에 colcemid를 최종농도 2 μg/m*l*로 첨가한 후, 2시간 더 배양하여 총 검체처리시간이 24시간이 되도록 하였다. 0.05% Trypsin-EDTA 처리로 15 m*l* 원심분리관에 세포를 수집하여 10분간 원심분리(200×g) 한 후, 상등액을 버리고 37°C의 0.075 M KCl 용액 10 m*l*를 가하여 37°C water bath에 15분간 정치한 후, 원심분리하여 상등액을 버리고 고정액(methanol:acetic acid, 3:1)으로 3회 고정시킨 후, 청결습윤한 slide에 세포현탁액을 적하하고 공기건조시켜 염색체 표본을 제작하였다. 5% Giemsa 용액으로 15분간 염색하고 광학현미경(1,000배)으로 관찰하였다. 대사활성물질을 이용하는 경우 상기와 같은 방법으로 세포를 배양한 후, 시험물질(혹은 양성대조물질)과 S9mix(배지의 20% 비율)가 포함된 배양액으로 교환하여 6시간동안 배양한 후, 신선한 배지로 교환하여 16시간 더 배양한 다음, colcemid를 처리하고 2시간 후 세포를 수집, 염색체표본을 제작하였다. 양성대조군으로는 대사활성물질을 이용하지 않는 경우

에는 mitomycin C 0.04 μg/ml을, 대사활성물질을 이용한 경우에는 benzo(α)pyrene 0.02 mg/ml를 사용하였다. 결과의 판정은 각 시험당 100개의 세포분열 중기상(metaphase) 세포를 현미경하에서 관찰하여 염색체이상 유무를 판독하였다. 염색체이상은 구조이상과 수적이상으로 대별하고, 그것을 관찰하는 대상은 다음과 같다. 즉 구조이상으로는 염색분체형 gap(ctg), 염색분체절단(ctb), 염색분체교환(cte), 염색체형 gap(csg), 염색체절단(csb), 염색체교환(cse;dicentric, ring 등)을, 숫적이상으로는 배수체를 관찰하였다. 이상의 종류를 1개이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류는 각각 기록하였다. 통상 CHL 세포의 경우 음성대조군에서 염색체이상을 가진 세포의 출현율은 3%를 초과하는 일이 거의 없으므로 시험결과를 다음의 기준에 따라 평가하였다. 즉, 이상세포의 평균 출현율이 5% 미만일때는 음성(-), 5% 이상 10% 미만 일때는 의양성(±), 10% 이상 20% 미만 일때는 양성(+), 20% 이상 50% 미만 일때는 양성(++), 50% 이상 일때는 양성(+++)으로 판정하였다.

결과 및 고찰

용매별 각 획분의 수율

홍삼분말의 80% methanol extract로 부터 얻어진 각 획분의 수율은 Table 1과 같다. 극성이 가장 낮은 petroleum ether 획분의 수율이 가장 낮았고 용매의 극성이 증가되면서 용매별 획분의 추출물도 증가되어 수용성 획분의 수율이 가장 높았다. 각 획분의 수율을 보면, petroleum ether 획분이 0.46~0.48 g 100 g^{-1}, diethyl ether 획분이 0.48~0.50 g 100 g^{-1}, ethyl acetate 획분이 0.74~0.79 g 100 g^{-1}, n-butanol 획분이 9.30~9.58 g 100 g^{-1} 및 수용성 획분이 28.80~28.96 g 100 g^{-1}로 용매 획분별로는 그 함량차가 뚜렷하였으나 비조사군 및 감마선조사군의 선량간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았는데 이는 김[19]의 방사선 조사된 더덕의 생리활성 연구보고에서와 동일한 경향을 보였다.

지질의 과산화물 생성억제 효과

홍삼분말의 용매별 각 획분추출물들의 linoleic acid methyl ester기질에 대한 과산화물 생성 억제 효과를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 홍삼분말의 각 획분별 추출물들의 과산화지질 생성 억제 효과의 크기는 diethyl ether 획분> ethyl acetate 획분>petroleum ether 획분>n-butanol 획분> aqueous 획분의 순이었으며, 수용성 획분을 제외한 각 획분은 각 획분의 용해에 사용된 methanol 및 water-methanol(5:5, V/V) 첨가군(Blank)에 대한 항산화 효과가 인정되었다. 이러한 결과는 최[20]의 홍삼 및 백삼의 각 획분별 항산화 효과시험의 결과와도 잘 일치하였다. 특히 항산화작용이 가장 강하였던 diethyl ether 획분과 ethyl acetate 획분에 함유된 성분들로는 주로 페놀 성분류, 유기산류 및 지방산 일부와 이외에도 많은 성분들이 함유되어 있고, n-butanol 획분은 조saponin의 주요 추출획분이며, petroleum ether 획분에서는 중성지방질류, 당지방질류 및 인지방질류와 유리지방산류, free sterol 류, hydrocarbon 류 등 지용성성분들이 주로 추출되었음을 보고하였다.[19] 한편 추출물중 가장 높은 수율을 보인 수용성 획분에서는 항산화력이 거의 없거나 오히려 산패를 촉진하는 특성을 나타내었다. 이는 수용성 획분의 성분들이 다양한 성분들로 구성되어 있어 단정적으로 말할 수는 없으나 이들 성분상들의 일부는 상당한 환원성을 갖는 반면에 항산화력이 없거나, 또는 항산화 효과가 있음에도 불구하고 공존하는 다른 물질들의 산패촉진 효과가 더 강하여 산패를 촉진하는 쪽으로 작용될 수 있다고 설명될 수도 있을 것이다. 식물체의 가장 주된 성분들인 동시에 대표적인 수용성 성분인 당류와 아미노산, 펩타이드 및 단백질에 대한 항산화 작용의 조사 결과들을 종합해 보면 대체적으로 당류 및 탄수화물[20]은 산패를 촉진하는 반면에 아미노산, 펩

Table 1. Yield of each fraction extracted from nonirradiated and gamma-irradiated red ginseng powder[1]

Fraction	Irradiation dose (kGy)				
	0	2.5	5	7.5	10
Petroleum ether	0.46±0.01	0.46±0.02	0.47±0.01	0.47±0.01	0.48±0.02
Diethyl ether	0.50±0.02	0.49±0.01	0.47±0.03	0.48±0.02	0.48±0.02
Ethyl acetate	0.77±0.03	0.74±0.02	0.79±0.04	0.77±0.03	0.75±0.02
n-Butanol	9.55±0.10	9.13±0.21	9.35±0.20	9.58±0.17	9.14±0.12
Aqueous	28.86±0.20	28.93±0.14	28.96±0.15	28.80±0.11	28.84±0.22

[1]Each sample was analyzed immediately after gamma irradiation and each value is mean±standard deviation of triplicate determinations and expressed as g 100 g^{-1} dry basis.

Table 2. Changes in peroxide value of various fractions extracted from nonirradiated and gamma-irradiated red ginseng powder[1]

Fraction	Irradiation dose (kGy)	Incubation time (hr)				
		24	48	72	96	120
Petroleum ether	Blank	831.66	1773.54	2995.98	2845.68	2565.12
	0	20.04	430.86	1202.40	2424.84	2835.66
	2.5	20.04	450.90	1202.40	2494.98	2865.72
	5	25.06	440.88	1222.44	2384.76	2875.74
	7.5	20.04	460.92	1212.42	2484.96	2815.62
	10	26.06	460.94	1182.36	2444.88	2865.72
Diethyl ether	Blank	831.66	1773.54	2995.98	2845.68	2565.12
	0	15.03	20.04	50.01	60.12	210.42
	2.5	12.02	20.03	60.12	60.12	220.44
	5	5.01	20.04	50.01	60.12	210.42
	7.5	12.02	23.05	60.12	70.14	230.46
	10	15.01	20.04	60.12	70.14	220.44
Ethyl acetate	Blank	831.66	1773.54	2995.98	2845.68	2565.12
	0	30.06	170.34	1182.36	2384.76	2815.62
	2.5	30.06	170.30	1177.35	2374.74	2795.58
	5	30.07	170.34	1207.41	2374.74	2745.48
	7.5	25.05	180.46	1192.38	2344.68	2815.62
	10	25.05	180.36	1182.36	2404.80	2785.56
n-Butanol	Blank	831.66	1773.54	2995.98	2845.68	2565.12
	0	120.24	450.90	1052.10	2785.56	1623.24
	2.5	120.24	480.04	1012.02	2825.64	1643.28
	5	130.26	460.92	1002.00	2795.58	1723.44
	7.5	120.24	470.96	1062.12	2805.60	1663.32
	10	130.26	480.96	1062.12	2805.60	1663.32
Aqueous	Blank	911.82	1773.54	1813.62	2124.24	2775.54
	0	741.48	1523.44	1943.68	2885.76	2535.06
	2.5	711.42	1533.46	1943.68	2905.80	2535.06
	5	741.48	1463.32	1923.64	2905.80	2515.02
	7.5	719.38	1463.32	1933.66	2935.86	2545.08
	10	711.42	1533.46	1953.70	2925.84	2565.12

[1]Each value is the average of triplicate determinations and expressed as meq kg^{-1}.

타이드 및 단백질[21,22]들은 산패를 억제한다고 보고되고 있다. 홍삼 및 백삼의 수용성 획분의 성분중 거의 대부분을 차지하고 있는 당류 및 탄수화물의 함량과 유리아미노산, total-nitrogen 및 단백질의 함량을 보면 질소화합물들에 비하여 당류 및 탄수화물의 함량이 대단히 많은 점을 고찰할 수 있었으며,[21] 따라서 수용성 획분에서 산패를 억제하는 항산화 효과가 거의 없거나 오히려 산패를 촉진하는 작용을 나타낸 것으로 생각된다. 홍삼분말의 감마선조사에 따른 각 획분의 과산화물 생성억제 효과 시험결과는 Table 2와 같다. 항산화 효과가 가장 뚜렷했던 diethyl ether 획분이나 ethyl acetate 획분을 비롯하여 모든 획분에서 비조사군이나 감마선조사군의 선량간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서, 홍삼분말에서 살균선량의 감마선조사는 홍삼에 함유된 항산화물질에 어떠한 변화도 주지 않음을 알 수 있었다. 한편, 천연 항산화물질의 항산화 효과의 기작에 대하여는 많은 보고가 있으며, 특히 그 중 공액방향족환

(conjugated aromatic ring)에 수산기(-OH) 및 산기(-COOH)가 결합된 페놀계 화합물들은 수소공여작용(hydrogen donating activity)에 따른 환원 활성에 의하여 지질의 산화를 억제시키거나 지연시키는 것으로 알려져 있다.[23,24]

지질의 말론알데히드 생성억제 효과

홍삼분말의 용매별 획분 추출물들의 linoleic acid-인산완충액 기질에 대한 malonaldehyde 생성억제 효과는 Table 3과 같다. 각 획분별 추출물의 malonaldehyde 생성억제 효과는 diethyl ether 획분이 가장 컸으며 그 다음으로 petroleum ether 획분, ethyl acetate 획분의 순으로 앞의 과산화물, 생성억제 효과에서와 대체로 비슷한 경향을 나타내었다. 즉, TBA가가 급격히 상승되는 시점을 기질의 자동산화를 위한 유도기간으로 보았을때 diethyl ether 획분은 40시간, petroleum ether 획분은 20시간, ethyl acetate 획분은 10시간을 나타내었다. 한편 n-butanol 획분과 수용성 획분의 경우는 항산화 효과가 없거나 오히려 산패를 촉진하는 효과를 나타내었는데 이는 앞에서도 언급했듯이 이들 획분에는 항산화작용이 있는 성분들이 함유되어 있으나 그 함량내지는 항산화 활성들에 비하여 당류나 탄수화물들의 다량 존재로 산패촉진 효과가 더 강하게 나타나 시간이 경과함에 따라 오히려 산패를 촉진시키는 작용을 한 것으로 생각된다. 감마선조사된 홍삼분말의 용매별 추출물의 각 획분에서 malonaldehyde 생성억제 효과시험 결과는 Table 3과 같다. 모든 획분에서 비조사군이나 감마선조사군의 조사선량간에 항산화 효과에 있어 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 각 획

Table 3. Changes in thiobarbituric acid value of various fractions extracted from nonirradiated and gamma-irradiated red ginseng powder[1]

Fraction	Irradiation dose (kGy)	Incubation time (hr)					
		5	10	20	30	40	50
Petroleum ether	Blank	1.62	7.83	17.45	12.46	10.67	7.90
	0	0.72	0.78	0.87	14.42	18.37	11.42
	2.5	0.65	0.73	0.84	14.55	17.80	11.92
	5	0.71	0.78	0.80	14.22	17.61	11.72
	7.5	0.70	0.72	0.83	14.02	18.29	11.42
	10	0.68	0.75	0.80	14.80	18.30	11.12
Diethyl ether	Blank	1.62	7.83	17.45	12.46	10.67	7.90
	0	0.80	0.86	1.10	1.24	1.68	11.03
	2.5	0.83	0.88	1.09	1.26	1.77	11.87
	5	0.85	0.89	1.06	1.32	1.56	11.90
	7.5	0.79	0.85	0.98	1.23	1.69	12.01
	10	0.76	0.87	0.95	1.22	1.93	12.05
Ethyl acetate	Blank	1.62	7.83	17.45	12.46	10.67	7.90
	0	0.83	1.88	13.20	17.32	10.34	10.20
	2.5	0.78	1.91	12.13	17.38	10.23	10.01
	5	0.84	1.90	12.05	17.47	10.31	10.13
	7.5	0.79	1.85	12.83	17.63	10.52	10.15
	10	0.81	1.88	12.98	17.40	10.58	10.17
n-Butanol	Blank	1.62	7.83	17.45	12.46	10.67	7.90
	0	3.74	12.61	17.56	14.38	13.33	12.13
	2.5	3.62	13.40	17.95	13.75	13.08	12.08
	5	3.30	12.39	17.60	14.54	12.83	12.31
	7.5	3.29	12.48	17.14	14.16	12.85	12.40
	10	3.79	12.43	17.32	14.25	12.99	12.07
Aqueous	Blank	1.86	9.87	17.89	14.50	9.73	8.01
	0	5.39	9.37	17.41	19.55	18.85	18.56
	2.5	5.84	9.10	17.94	19.84	19.12	18.67
	5	5.55	9.74	17.79	19.51	19.00	18.00
	7.5	5.30	8.92	17.97	19.24	18.84	18.39
	10	5.33	8.99	18.00	19.40	18.58	18.42

[1]Each value is the average of triplicate determinations and expressed as O.D at 532 nm × 10

Table 4. Mutagenicity of nonirradiated and gamma-irradiated red ginseng extracts with 80 % ethanol in *S.typhimurium* TA 98

Extract concentration (mg/plate)	S9 mix	Irradiation dose (kGy)		
		0	5	10
0	-	30±2	-	-
0.3	-	26±1	28±1	28±8
1.0	-	34±2	32±2	32±2
3.0	-	33±2	31±0	30±7
10.0	-	33±3	38±2	37±7
30.0	-	43±3	44±2	36±2
NPD[1]	-	3513±123	-	-
0	-	31±1	-	-
0	+	34±1	-	-
0.3	+	33±2	36±6	36±4
1.0	+	31±2	40±5	36±4
3.0	+	35±2	41±2	36±1
10.0	+	41±4	41±0	40±1
30.0	+	44±2	44±4	43±0
2-AF[2]	+	1471±38	-	-

[1]NPD (4-nitro-o-phenylenediamine):20 μg/plate.

[2]2-AF(2-aminofluorene):10 μg/plate.

Each value expressed as number of revertant colonies per plate.

분의 항산화 효과는 앞의 과산화물가 생성억제 효과에서와 동일한 경향을 보였다. 본 실험의 이러한 결과는 한 등[26]의 감마선조사된 백삼의 항산화 활성 비교실험에서 비조사군이나 감마선조사군은 동일한 항산화 활성을 보였다는 보고와 일치하나, 감마선조사된 생더덕의 항산화력 실험에서는 감마선조사군이 비조사군에 비해 다소 항산화력이 저하된다는 김[19]의 보고와는 상반된 결과를 나타내었다.

Salmonella typhymurium 복귀돌연변이 검정

시험용 균주로는 시험물질의 균주 특이적 변이유기에 의한 검출미스의 가능성을 배제하기 위하여 의약품등의 유전독성검색의 목적으로 널리 이용되고있는 TA98, TA100, TA102 의 3개 균주를 선택하였다. 일반적으로 단일성분의 화학물질을 대상으로 한 *S.typhimurium* 복귀돌연변이시험에 있어서는 5 mg 또는 10 mg/plate의 농도를 최고용량으로 하는것이 보편적이나, 본 시험에 있어서는 대상물질이 천연생약재임을 고려하여 0.3~30 mg/plate 범위의 농도를 사용하였다. Table 4, 5 및 6은 감마선조사 홍삼분말로 부터 추출된 extract를 첨가하였을때 *S.typhimurium* TA98, TA100 및 TA102에 대한 음성대조군의 복귀변이 집락수를 조사한 결과이다. TA98의 경우(Table 4) 음성대조군의 복귀변이 집락수는 30개로 문헌치의 30~50개 범위 이내였고[16] 홍삼 extract첨가량의 증가와 함께 다소 집락수가 증가되었음을 보여 최대 첨가량인 30 mg/plate에서는 36~43개 범위였다. 이러한 고용량 첨가군에서 복귀변이 집락수의 증가는 홍삼 extract에 유리아미노산인 histidine의 존재가 증식작용에 기인한 것으로 생각된다. 한편 비조사군 및 감마선조사군의 선량에 따른 복귀변이의 영향은 모든 시험군에서 전 용량단계에 걸쳐 음성대조군과 거의 동일한 복귀변이 집락수를 나타내었다. S9mix를 이용한 대사활성시험에 있어서도 S9mix를 적용하지 않은 직접법과 유사한 결과를 나타내었다. 본 실험에서 양성대조화합물은 S9mix를 첨가한 대사활성화의 경우를 포함하여 각각의 시험용 균주에 대하여 복귀변이 집락수를 현저히 증가시켜 본 실험이 적합하게 행하여 졌음을 알 수 있었다. *S.typhimurium* TA100과 TA102의 경우에도 대사활성법을 적용하지 않은 것이나 적용한 것 모두 앞에서 언급된 TA98과 유사한 경향을 나타내어(Table 5, 6) 홍[27]의 방사선조사 백삼분말의 *In vitro* 유전

Table 5. Mutagenicity of nonirradiated and gamma-irradiated red ginseng extracts with 80 % ethanol in *S.typhimurium* TA 100

Extract concentration (mg/plate)	S9 mix	Irradiation dose (kGy)		
		0	5	10
0	-	200±20	-	-
0.3	-	211±16	200±14	192±13
1.0	-	194±5	199±8	210±7
3.0	-	198±11	199±2	190±0
10.0	-	215±34	212±31	222±17
30.0	-	254±19	261±31	254±13
Sodium azide[1]	-	1307±45	-	-
0	-	211±13	-	-
0	+	196±5	-	-
0.3	+	191±6	194±3	201±14
1.0	+	196±19	195±3	211±21
3.0	+	202±9	198±12	206±12
10.0	+	199±16	196±2	205±0
30.0	+	223±2	206±13	209±7
2-AF[2]	+	583±35	-	-

[1]Sodium azide: 1.5 μg/plate.

[2]2-AF (2-aminofluorene):10 μg/plate.

Each value expressed as number of revertant colonies per plate.

Table 6. Mutagenicity of nonirradiated and gamma-irradiated red ginseng extracts with 80 % ethanol in *S.typhimurium* TA 102

Extract concentration (mg/plate)	S9 mix	Irradiation dose (kGy)		
		0	5	10
0	-	359±11	-	-
3.0	-	366±8	369±2	382±4
1.0	-	378±4	377±3	391±6
3.0	-	387±9	395±3	375±7
10.0	-	321±8	401±10	382±5
30.0	-	352±8	305±9	312±7
Mitomycin C[1]	-	4354±118	-	-
0	-	322±17	-	-
0	+	412±22	-	-
3.0	+	408±3	424±6	425±4
1.0	+	405±22	397±26	439±9
3.0	+	432±18	388±6	400±26
10.0	+	410±1	383±9	432±4
30.0	+	385±31	422±6	415±5
2-AF2	+	564±4	-	-

[1]Mitomycin C:0.5 μg/plate.

[2]2-AF (2-aminofluorene):10 μg/plate.

Each value expressed as number of revertant colonies per plate.

Table 7. Result of chromosomal aberration tests on gamma-irradiated red ginseng powder using a Chinese hamster lung (CHL) cell line in the absence of S9mix[1]

Irradiation dose (kGy)	Extract concentration (mg/plate)	Frequencies of cells with structural aberrations[2]							
		ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	Total	Judge
0	0	1	0	0	0	0	0	1	-
	1.25	1	1	0	0	0	0	2	-
	2.50	2	0	0	0	0	0	2	-
	5.00	1	2	0	0	0	0	3	-
	10.00	1	1	0	0	0	0	2	-
5	1.25	0	1	0	0	0	0	1	-
	2.50	1	1	0	0	0	0	2	-
	5.00	0	2	0	0	0	0	2	-
	10.00	2	1	0	0	0	0	3	-
10	2.25	1	0	0	0	0	0	1	-
	2.50	2	0	0	0	0	0	2	-
	5.00	1	2	0	0	0	0	3	-
	10.00	2	1	0	0	0	0	3	-
MMC[3] 0.04 μg/ml		3	6	12	1	0	0	22	++

[1]Treatment time:recovery time 24hr.
[2]ctg:chromatid gaps including chromosome gaps, ctb:chromatid breaks cte:chromatid exchanges, frg:fragmentation, csb:chromosome breaks cse:chromosome exchanges such as dicentrics and rings.
[3]MMC:mitomycin C

Table 8. Result of chromosomal aberration tests on gamma-irradiated red ginseng powder using a Chinese hamster lung (CHL) cell line in the presence of S9mix[1]

Irradiation dose (kGy)	Extract concentration (mg/plate)	Frequencies of cells with structural aberrations[2]							
		ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	Total	Judge
0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	1.25	0	1	0	0	0	0	1	-
	2.50	2	0	0	0	0	0	2	-
	5.00	0	0	1	0	0	0	1	-
	10.00	1	0	0	0	0	0	1	-
5	1.25	1	0	0	0	0	0	1	-
	2.50	1	0	0	0	0	0	1	-
	5.00	2	0	0	0	0	0	2	-
	10.00	0	1	0	0	0	0		-
10	2.25	1	0	0	0	0	0	1	-
	2.50	1	1	0	0	0	0	2	-
	5.00	0	2	1	0	0	0	3	-
	10.00	1	0	0	0	0	0	1	-
B(α)P[3] 0.02 mg/ml		2	4	14	0	2	1	23	++

[1]Treatment time:recovery time 24hr.
[2]ctg:chromatid gaps including chromosome gaps, ctb:chromatid breaks cte:chromatid exchanges, frg:fragmentation, csb:chromosome breaks cse:chromosome exchanges such as dicentrics and rings.
[3]B(α)P: benzo(α)pyrene

독성시험의 결과와 일치하였다. 일반적으로 돌연변이원성의 판정은 음성대조군 복귀변이 집락수의 2배이상인 경우를 양성으로 하므로[28] 본 실험의 감마선조사 홍삼분말은 대사활성법을 적용하지 않은 경우나 적용한 경우에도 전 시험용 균주에서 복귀변이 집락수의 증가를 인정할 수 없어 감마선조사 홍삼분말이 본 실험조건하에서 직접변이원으로서 뿐만아니라 간접변이원으로서도 작용치 않았음을 나타내었다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 검증

변이원성 시험의 다른 하나의 방법인 포유류 배양세포를 이용하여 감마선 조사된 홍삼분말의 염색체이상 시험을 수행한 결과는 Table 7, 8과 같다. 여기서 우선 결과는 다음과 같이 판정하였다. 즉, 한 시험농도당 100개의 세포분열 중기상을 현미경하에서 판독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. Table 7, 8은 감마선조사 홍삼분말로 부터 추출된 extract를 CHL cell에 첨가하였을때 나타나는 염색체변이시험을 조사한 결과이다. 대사활성 부재 및 존재하에서의 음성대조군에서 1~3% 이하의 염색체이상빈도를 보였고, 모든 시험농도에서도 1~3%의 염색체이상 빈도를 나타내어 음성으로 판정되었다. 이상의 실험결과로 볼 때 이상세포의 평균 출현율이 5% 미만이었으므로 CHL 세포에 대하여 감마선조사 홍삼분말이 본 실험조건하에서 직접변이원으로 뿐만아니라 간접변이원으로서도 작용하지 않았음을 나타내었다.

국문요약

위생화와 장기 안전저장을 위해 감마선 조사된 홍삼분말의 항산화력과 유전독성학적 안전성을 평가한 결과는 다음과 같다. 용매획분별 홍삼분말의 extract 추출율은 극성이 높을수록 추출율이 증가되어 petroleum ether(PE)<diethyl ether(DE)<ethyl acetate(EA)<n-butanol(BU)<aqueous fraction(AQ)의 순이었으며 감마선조사에 따른 추출율의 변화는 없었다. 각 획분별 추출물의 지질과산화물 생성 억제 효과는 DE>EA>PE>BU>AQ의 순이었고, malonaldehyde 생성 억제 효과는 DE>PE>EA>BU>AQ의 순으로 지질과산화물 생성억제효과와 유사한 경향이었다. 특히, AQ 획분에서는 지질의 항산화효과가 거의 없음을 알 수 있었고, 감마선조사에 따른 영향은 전혀 인지되지 않았다. 유전독성학적 안전성 평가로서 *Salmonella typhimurium*(TA98, TA100, TA102)을 이용한 복귀돌연변이시험에서 감마선 조사된 홍삼분말은 대사활성법을 적용한 경우나 적용하지않은 경우 모두 비조사군이나 감마선 조사군의 전 용량단계에서 음성대조군과 동일한 수준의 복귀돌연변이 집락수를 보여 돌연변이 유발성이 없는것으로 나타났다. 포유동물 배양세포(CHL cells)를 이용한 염색체이상 시험에서도 비조사 및 감마선 조사된 홍삼분말은 염색체의 구조적 이상 및 숫적 이상을 보인 세포의 출현율이 평균 5% 미만이었으므로 유전독성학적 측면에서의 안전성이 확인되었다.

참고문헌

1. 한국인삼연초연구원: 고려인삼, 천일인쇄 (주) (1993).
2. Vajdi, M. and Pereire, R.R.: Comparative effects of ethylene oxide, γ-irradiation and microwave treatments on selected spices. *J. Food Sci.*, **38**, 893 (1973).
3. Kwon, J.H., Byun, M.W. and Cho, H.O.: Quality evaluation of ground garlic and onions treated with chemical fumigants and ionizing radiation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 107 (1987).
4. Sung, H.S., Park, M.H. and Lee, K.S.: The effective sterilization of white ginseng powder. *Korean J. Ginseng Sci.*, **6**, 143 (1982).
5. 변명우, 조성기, 조한옥, 육홍선, 김성애, 최강주: 홍삼의 품질개선을 위한 감마선 이용. 한국식품위생안전성학회지, **9**, 151 (1994).
6. 조한옥, 변명우, 조성기, 강일준, 육홍선: 인삼제품의 품질개선을 위한 방사선 이용기술 개발. 과학기술처, KAERI/RR-1442/94 (1995).
7. Choi, K.J., Kim, M.W., Hong, S.K. and Kim, D.H.: Effect of solvent on the yield, brown color intensity, UV absorbance, reducing and antioxidant activities of extracts from white and red ginseng. *J. Kore. Agr. chem. Soc.*, **26**, 8 (1983).
8. Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M.: Studies on antioxidant activity of non-enzymic browning reaction products. Part III. Fractionation of browning reaction solution between ammonia and D-glucose and antioxidant ac-

tivity of the resulting fractions. *J. Agr. Chem. Soc. Japan,* **45**, 292 (1971).

9. Kirigaya, H., Shinkai, T., Kumagi, K. and Morishita, I.: Studies on the amino acid-sugar compounds in cocoa powder and the tobacco smoking quality. *J. Food Sci. and Technol.,* **17**, 35 (1970).
10. Morita, M., Aonuma, T. and Inaba, N.: Antioxidative action of amino acid sugar browning products in the presence of some oxidation catalysts. *Agr. Biol. Chem.,* **40**, 2491 (1976).
11. Nose, M. and Fujino, N.: Antioxidative activities of some vegetable foods and active component of avocado epicarp. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi,* **29**, 507 (1982).
12. Ando, T., Tanaka, O., Shibata, S.: Chemical studies on the oriental plant drugs. XXV, Comparative studies on the saponins and sapogenins of ginseng and related crude drugs. *Syoyakugaku Zasshi,* **25**, 28 (1971).
13. Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Iwami, K.: Antioxidative action of indole components during the autoxidations of linoleic acid. *J. Japanese Soc. Food and Nutrition,* **19**, 60 (1966).
14. Sidwell, C. G., Salwin, H., Benca, M. and Mitchell, J.H. Jr.: The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.,* **31**, 603 (1954).
15. 최진호: 고려인삼의 노화억제작용에 관한 연구, 항산화 작용을 중심으로. 경희대학교 대학원 박사학위논문 (1982).
16. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.,* **113**, 173 (1983).
17. Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M.,: Factors modulating mutagenicity in microbial test., In "Short-term test systems for detecting carcinogens", Norpoth, K.H. and Garner, R.C.(eds.), Springer, Berling, p.273 (1980).
18. IAEA: "Biological Dosimetry; Chromosomal aberration anaylsis for dose assessment. IAEA Technical Report Series No. 260, Vienna (1986)
19. 김창목: 이온화에너지에 의한 더덕의 성분변화와 생리활성에 관한 연구, 경희대학교 대학원 박사학위논문 (1992).
20. 최강주: 홍삼 및 백삼의 지방질 성분의 항산화 성분에 관한 연구, 고려대학교 대학원 박사학위논문 (1983).
21. Yamaguchi, N. and Yamada, A.: Studies on antioxidative activity of brown sugar. *Nippon shokuhin kogyo gakkaishi,* **28**, 303 (1981)
22. Yamaguchi, N., Yokoo, Y. and Fufimaki, M.: Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part II. Antioxidative activities of dispeptides and their synergistic effects on tocopherol. *Nippon shokuhin kogyo gakkaishi,* **22**, 425, (1975).
23. Yamaguchi, N., Yokoo, Y. and Fufimaki, M.: Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part III. Antioxidative activities of soybean protein hydrolyzates and synergistic effect of hydrolyzate on tocopherol. *Nippon shokuhin kogyo gakkaishi,* **22**, 431, (1974).
24. 김영호, 윤환교, 장규섭: 저장 백, 홍삼중의 phenol계 화합물의 함량과 항산화 활성. 충남대농업기술연구보고, **11**, 295 (1984).
25. Belitz, H.D. and Grosch, W.: Food Chemistry, Springer-Verlag, Berlin, p.175 (1987).
26. 한병훈, 한용남, 황우익, 주충노 : 방사선 조사 인삼의 효능 및 성분평가 연구, 과학기술처, p.55 (1992).
27. 홍연탁: 방사선 조사 인삼의 안전성 평가에 관한 연구 (III), 과학기 술처, p.14 (1992).
28. Brusick, D.J.: Mutagenesis and Carcinogenesis in Mammalian Cells, A Guide to General Toxicology, 2nd. revised Ed. Switzerland (1989).