

장뇌삼 잎의 기능적 특성 구명 및 이를  
이용한 가공식품 개발 연구

Development of Value-added Food Products  
of Korean Wild Ginseng(*Panax ginseng* C. A.  
Meyer) Leaves Based on Their Biofunctional  
Properties

연구 기관  
한국식품연구원

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “장뇌삼 잎의 기능적 특성 구명 및 이를 이용한 가공식품 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 10월 14일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 석 호 문

세부연구책임자 : 전 향 숙

세부연구책임자 : 김 성 란

연 구 원 : 최 인 옥

연 구 원 : 최 희 돈

연 구 원 : 김 윤 숙

연 구 원 : 박 용 곤

연 구 원 : 신 동 빈

연 구 원 : 김 현 정

연 구 원 : 이 부 용

연 구 원 : 정 창 화

연 구 원 : 김 흥 만

참 여 기 업 : 설원농산영농조합법인

# 요 약 문

## I. 제 목

장뇌삼 잎의 기능적 특성 구명 및 이를 이용한 가공식품 개발 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

- 현재까지 적절한 가공방법이 개발되어 있지 않아 산야에 그대로 방치하여 겨울철 낙엽으로 일생을 마감하는 장뇌삼 지상부(잎, 줄기 등)를 채취하더라도 장뇌삼 뿌리에는 영향을 미치지 않는 8-9월경에 채취하여 차류 등 가공식품의 원료로 사용함에 따른 국내산 장뇌삼의 부가가치 극대화
- 장뇌삼 잎의 독특한 향미 특성, 생리기능적 특성 등을 면밀히 조사하여 재배인삼과의 차별화를 유도함에 의해 장뇌삼 잎 가공제품의 고부가가치화 및 대중화에 기여
- 장뇌삼 잎으로부터 유효성분을 분리, 활용할 수 있는 신기술의 개발로 장뇌삼의 효율적 활용 및 이를 통한 참여업체의 경쟁력 제고

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. 장뇌삼 잎의 식품학적 특성 구명
  - 맛 성분 본체 구명
  - 향기성분 본체 구명
  - 폴리페놀화합물 등 이화학적 특성 구명
  - 사포닌의 조성 및 함량 측정

- 활성산소소거능, 전자공여작용, 모델식품계에서 리놀산의 산화방지 효과 등

## 2. 장뇌삼 잎을 이용한 가공식품 개발

- 적정 전처리 조건 및 가공적성 검토
- 차류 등 다양한 가공식품의 적정 가공기술 개발
- 유효성분의 추출, 농축, 건조 기술 개발

## 3. 장뇌삼 잎의 생리기능적 특성 구명

- 부위별 시료에 대한 암 예방 효과 조사
- 채취시기별 시료에 대한 암 예방 효과 조사
- 유효시료에 대한 in vivo 항종양 효과 조사

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제인 “장뇌삼 잎의 기능적 특성 구명 및 이를 이용한 가공식품 개발 연구”는 3개의 세부과제로 이루어 졌으며 각 세부과제별로 연구결과를 구분하여 요약하였다.

### ● 제1세부 연구과제 : 장뇌삼 잎의 식품학적 특성 구명

국내산 장뇌삼(12년 생)의 부위별 중량비를 조사한 바 잎, 줄기 및 뿌리가 각각 18%, 22% 및 60%를 정도로서 지상부인 잎과 줄기가 차지하는 비율이 40% 정도이었다. 장뇌삼과 재배삼 잎의 일반성분, 유리아미노산, 유리당의 조성 및 함량을 조사한 결과 시료 간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 인삼 잎에 함유된 유기산으로서는 oxalic, citric, malic, succinic acid 등이 검출되었고 장뇌삼 잎의 경우에는 oxalic acid의 함량이 높았다.

조 사포닌의 함량을 조사한 결과 장뇌삼의 경우 재배삼에 비해 잎, 뿌리, 뇌두 등 모든 부위에서 재배삼에 비해 함량이 높은 것으로 나타났으며 특히 잎의 경우 건물량으로 17% 수준으로 뿌리의 7%에 비해 월등히 높은 값을 나타내었다. 한편 HPLC로 사포닌을 분리한 결과 장뇌삼 잎은 재배삼에 비해 PD/PT의 비율이 더 높은 것으로 나타났다.

장뇌삼 잎의 페놀성 화합물을 유리형(FPA), 가용성 페놀산 에스테르(SPA) 및 불용성의 결합형 페놀산(IPA) 등 각 형태별로 그 함량을 조사한 결과 총 페놀성 화합물의 함량은 734 mg%로 재배삼에 비해 1.8배 정도 높았다. 또한 장뇌삼 잎의 경우에는 에스테르 상태로 존재하는 SPA가 차지하는 비율이 재배삼에 비해 특히 높았으며 형태별 페놀성화합물의 항산화능을 조사한바 장뇌삼 잎이 재배삼 잎에 비해 더 높은 활성을 나타내었다. 장뇌삼 잎에서 확인된 유리형태의 페놀성 물질로서 protocatechuic acid, vanilic acid, p-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid 등이 검출되었으며 총 함량의 경우 장뇌삼 잎이 재배삼에 비해 4배 이상 높은 것으로 나타났다. 한편 SPA 상태의 페놀성물질로서는 caffeic acid, p-coumaric, ferulic acid 등으로 구성되어 있고 이 또한 장뇌삼 잎이 136 mg%로서 재배삼 잎의 64 mg%에 비해 2배 이상 높은 것으로 나타나 장뇌삼 잎과 재배삼 잎과의 차별화를 나타내는 좋은 결과로 생각된다. 반면 불용성의 결합상태의 페놀성물질에 있어서는 두 시료 사이에 그다지 큰 차이를 나타내지 않았다. 채취시기별 장뇌삼 잎의 이화학적 및 생리활성을 조사한 결과 채취시기에 따른 이들 특성에는 그다지 큰 차이가 없었다.

물, 메탄올, 에탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디에틸에테르 등 극성이 각기 다른 용매를 사용하여 장뇌삼 잎으로부터 추출물을 얻고 이때의 수율, 플라보노이드 등 페놀성물질의 함량을 측정함과 동시에 라디칼 소거능을 측정하여 항산화능을 검토하였다. 그 결과 극성이 클수록 수율이 높았으며 극성용매의 경우에는 에탄올추출물의 것이 항산화성물질의 함량이 높았다. 또한 80% 메탄올 추출물을 대상으로 하여 다시 용매의 극성을 달리하여 분획한 분획물의 DPPH 라디칼 소거능의 경우 에틸아세테이트 분획물의 것이 가장 활성이 높았으며 이들 추출물은 리놀산의 자동산화 및 쥐의 간지질 과산화물 억제효과에도 효과가 있는 것으로 나타났다.

특히 장뇌삼 잎에 함유된 항산화성물질을 실리카겔 칼럼크로마토그래피, TLC, HPLC 등으로 분리·정제하고 이들의 항산화활성을 확인함과 동시에 MS 및 NMR 등을 통하여 항산화활성을 나타내는 물질을 탐색한 결과 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid, chlorogenic acid, kaempferol 및 quercetin과 이들의 배당체가 존재하는 것으로 추정하였다.

또한 장뇌삼 잎에서 분리·정제한 7종의 항산화성물질에 대해 대식세포의 염증관련인자 생성에 미치는 영향을 검토함과 동시에 장뇌삼 잎 열수추출물이 당노를 유발시킨 쥐의 항산화계에 미치는 영향을 조사한 결과 장뇌삼 잎 열수추출물의 급여는 체중감소, 간 및 신장의 무게변화를 억제하며 혈당과 TBARS를 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

## ● 제2세부 연구과제 : 장뇌삼 잎을 이용한 가공식품 개발

튀음온도 180℃에서 1회 2-3분 정도 튀음처리하고 유념하는 조작을 반복하여 조제한 장뇌삼 잎차에서 관능적으로 감지된 향으로서는 해초냄새, 풀냄새, 구수한 냄새, 조미 향 등 4그룹으로 구분되었고 맛으로서는 신맛, 쓴맛, 떼은맛, 단맛, 비린 맛 등 5그룹으로 관능특성을 구분할 수 있었다. 또한 튀음정도에 따른 폴리페놀성 화합물, 사포닌 등 활성성분의 변화를 조사한 결과 13회 이상의 튀음처리에 의해 이들 활성성분은 유의적으로 감소하는 것으로 나타나 튀음처리 10회 정도가 가장 바람직한 것으로 나타났다. 한편 장뇌삼 잎 중량에 대해 3% 정도의 베타-사이클로덱스트린을 첨가하고 튀음처리하는 것은 장뇌삼 잎차의 과도한 쓴맛을 억제하여 향미를 개선할 수 있는 새로운 방법임을 제시하였다.

장뇌삼 잎을 채취 후 일단 증기처리하여 잔존효소를 불활성화시킨 다음 건조시켜 건엽의 형태로 하여 저장성을 부여하였다. 이를 재수화시켜 복원하고 튀음차의 형태로 가공하는 새로운 방법을 개발하였다. 장뇌삼 잎에 함유된 대부분의 사포닌성분과 페놀성 물질들은 이와 같은 공정을 거친 후에도 큰 변화 없이 잔존하는 것으로 나타나 장뇌삼 잎의 경우 건엽을 이용한 튀음차의 제조가 가능함을 확인하였다.

Sepabeads SP-850 수지를 사용함에 의해 장뇌삼 잎의 쓴맛성분을 선택적으로 흡착·탈착시킬 수 있었고 더욱 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피를 통하여 장뇌삼 잎에 함유된 쓴맛성분을 7개의 획분으로 분획할 수 있었으며 각 획분에 대해 쓴맛의 강도를 관능으로 평가한 결과 fraction 1이 가장 쓴맛이 강한 것으로 나타났다.

장뇌삼 잎의 열처리(140-200℃) 및 pH(3.0-6.0)에 따른 안정성을 페놀성물질, 사포닌함량 등을 분석함에 의해 검토하였다. 또한 물, 메탄올, 에탄올 등 추출용매의 극성을 각기 달리하여 장뇌삼 잎차로부터 추출물을 얻고 각 추출물의 수율, 사포닌, 페놀성화합물, 항산화능 등의 특성을 분석함과 동시에 에탄올추출물의

경우에는 에탄올의 농도별(50-100%) 추출물 및 활성성분의 함량을 분석하여 가공을 위한 기초자료를 구축하였다.

또한 장뇌삼 잎차 분말 및 농축액을 이용한 새로운 형태의 가공식품으로서 양갱, 캔디, 껌 및 과립차를 제조할 수 있는 방법을 개발하여 장뇌삼 잎의 활용도를 높일 수 있는 실용적인 방안을 마련하였다.

### ● 제3세부 연구과제 : 장뇌삼 잎의 생리기능적 특성 구명

장뇌삼 및 재배삼 잎의 총 방향성성분을 증기증류와 액-액 연속추출(DRP-LLE)로 분리한 방향성성분을 GC/MS로 분석한 결과  $\beta$ -elemene, trans- $\beta$ -farnesence 등 장뇌삼 잎에서 22종, 재배삼 잎에서 38종의 성분을 확인하였으나 채취시기에 따른 차이는 그다지 없는 것으로 나타났다. 이들 방향성 추출물의 종양세포성장 저해효과를 MTT assay로 조사한 바 이들 성분이 종양세포의 성장을 직접적으로 저해하지는 않았다. 또한 B[a]P 유도 EROD(ethoxyresorotin-O-deethylase) 활성 및 QR(Quinone reductase)활성에 미치는 영향을 살펴본 결과 직접적으로 종양세포의 성장에 대해서는 영향을 보이지 않았으나 B[a]P와 같은 전발암성물질이 발암성물질로 대사되는 과정을 저해하는 것으로 추정되었으며 채취시기에 따른 차이는 그다지 없었다.

장뇌삼 잎의 방향성 추출물이 실험쥐의 유영시간 연장에 의한 항 피로효과를 조사한 결과 투여군 간에 유의적인 차이가 없었으나 부동시간의 감소에 의한 항 우울효과에 있어서는 유의적으로 감소를 나타내어 방향성추출물은 항 피로효과 보다는 항 우울효과를 나타낼 가능성이 높은 것으로 시사되었다.

장뇌삼 잎차의 경구투여는 화학요법제 5-FU에 의해 유발된 독성에 대해 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 미약하지만 EROD 활성을 감소시켰고 고농도 투여군에서는 대조군에 비해 높은 GST 활성이 관찰되었다. 이는 장뇌삼 잎차의 섭취가 독성물질이 활성화되는 것을 저해하거나 체외로 배설되게 하는 해독화과정을 증가시킬 가능성을 보여주는 것으로 판단된다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of Value-added Food Products of Korean Wild Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) Leaves Based on Their Biofunctional Properties

## II. Objectives and Significance

It is widely accepted that wild ginseng produce more powerful medicinal activity than cultivated ginseng. However few studies have been conducted on to compare the pharmacological activities between them. Since most studies have been focused on ginseng roots, scientists are less attracted by ginseng leaves. Group of scientist, however, found that ginseng leaves were also rich in polysaccharides, phenolics, flavonoids and ginsenosides. These studies were conducted to maximize the value of wild ginseng by using leaves from powerful wild ginseng without any influence to root and to compare flavor and physiological properties of wild ginseng leaves with those of cultivated ginseng, and to separate active compounds from wild ginseng leaves for development of new technologies for further utilization.

## III. Scope

1. Physicochemical properties of Korean wild ginseng leaves as food material

- Identification of taste compound
- Identification of flavor compound
- Physicochemical properties including polyphenols
- Quantification of saponins

- Antioxidative activities

## 2. Development of processed food from wild ginseng leaves

- Optimization of pre-treatment conditions
- Process ability test
- Development of various processed food including tea
- Technology development for extraction, concentration and drying procedures

## 3. Physiological functionalities of wild ginseng leaves

- Anti-cancer activities from various parts
- Anti-cancer activities from various harvesting period
- In vivo study for anti-cancer activities

## IV. Results and Application

### ● Physicochemical properties of Korean wild ginseng leaves as food material

Wild ginseng(12 year old) was consisted of over 40% of leaves(18%) and stems(22%) and 60% of root. There were no differences in contents of proximate components, free amino acids, and free sugars between wild and cultivated ginseng. Organic acids such as oxalic, citric, malic and succinic acid were detected from ginseng leaves and oxalic acids were especially high in wild ginseng leaves.

Crude saponin content of wild ginseng were higher than cultivated ginseng for the most parts. crude saponins were higher in leaf than in roots. Wild ginseng had higher ratio of Panaxadiol ginsenoside(PD)/Panaxatriol ginsenoside(PT) than cultivated ginseng.

Content of free phenolic acid, soluble phenolic acid and insoluble phenolic acid from phenolic compounds from wild ginseng leaves were investigated and total phenolic compounds were 734mg%(1.84 times high compared to

cultivated ginseng). SPA of wild ginseng leaves were particularly higher than and showed higher antioxidative activities than cultivated ginseng leaves.

Protocatechuic acid, vanilic acid, p-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid were detected as FPA from wild ginseng leaves and their content were 4 times higher than those of cultivated ginseng leaves.

SPA from wild ginseng leaves consisted of caffeic acid, p-coumaric acid, and ferulic acid and total content was 136mg% which was higher than that of cultivated ginseng leaves (64mg%). That aspect might be useful to differentiate wild from cultivated ginseng leaves. Meanwhile IPA had no significant differences between two samples. Picking period had no influence on the physicochemical properties and physiological activities.

Water, methanol and ethanol extracts of freeze-dried leaves of wild ginseng were examined for their yields, flavonoids and antioxidative activities. Fractions extracted with high polarity solvents gave more yields but ethanol extract contained more antioxidant materials. Ethyl acetate fractions from methanol extract had highest DPPH scavenging activity and most effective in inhibition of liver lipid peroxidation and linoleate oxidation. Ethyl acetate fraction was further purified by silica gel column, TLC, and HPLC and 7 compounds were identified by EI-MS and NMR. Those were 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid, chlorogenic acid, kaempferol and quercetin.

Anti-inflammatory activities of macrophages for 7 compounds purified from wild ginseng leaves were also investigated. Antioxidant activities of wild ginseng leaf hot water extract was tested against streptozotocin-induced diabetic rats. Intake of the extract could inhibit the weight loss, and reduce the organ weight loss and levels of blood sugar and TBARS.

## ● Development of processed food from wild ginseng leaves

Wild ginseng leaf tea was produced by roasting at 180°C for 2~3 mins. Aroma attributes were described as seaweed like, grassy, roasty, umami. Taste attributes were sour, bitter, astringent, sweet, grassy. Over 13 times of roasting significantly decrease active compounds including polyphenols and saponins. The proper number of times of roasting were 10 times. Roasting after addition of 3%  $\beta$ -cyclodextrin to wild ginseng leaves could reduce bitterness and improve flavor of the tea.

Dried wild ginseng leaves with steam blanching could inactivate the enzyme and had storage stability. To produce the tea, the blanched and dried leaves were rehydrated. Active compounds such as saponins and polyphenols were stable with those tea making procedures.

Bitter compounds of wild ginseng leaves were selectively adsorbed and desorbed with Sepabeads SP-850 resin and further fractionated with Sephadex LH-20 into 7 fractions, fraction 1 was found to be most bitter from sensory evaluation.

The effect of heat and pH on the stability of saponins and polyphenols were investigated. Water, methanol and ethanol extraction from wild ginseng leaves were performed to analyse yield, saponin and polyphenol content and antioxidative activity. Ethanol extract were further extracted with different concentrations(50~100%) of ethanol and extractions yield and active compounds were analyzed for make up the basis for further processing need.

Technologies for producing Yang Gaeng(sweet jelly of red beans), candy, chewing gum and granule type tea with wild ginseng leaf tea powder and concentrates were also developed to promote the usage of wild ginseng leaves.

## ● Physiological functionalities of wild ginseng leaves

Aroma compounds from wild ginseng and cultivated ginseng leaves were separated by steam distillation and liquid-liquid extraction(DRP-LLE) and analyzed by GC/MS. 22 compounds including  $\beta$ -elemene, trans- $\beta$ -farnesene

was identified from wild ginseng leaves and 38 compounds from cultivated ginseng leaves. There were no differences from picking periods. Those aroma compounds had no anti-tumor activities when using MTT assay but results from EROD activities and QR activities shows that those aroma compounds may play an important role in inhibition of metabolism regarding carcinogen production from precarcinogens. There was no significant difference from harvesting periods.

There were no significant differences among treatments for anti-stress activities by testing swimming ability of mouse but were significant differences for anti-depression activities.

Oral administration of wild ginseng leaves did not affect the toxicity from chemotherapeutical drug 5-FU but reduce activities of EROD with higher GST activity from high dose treatment compared to control group. This results provide the postulation that consumption of wild ginseng leaves could inhibit the activation of toxic material or could excrete for detoxication.

# CONTENTS

SUMMARY .....	6
<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>15</b>
<b>Chapter 2 Current Status on Domestic and Foreign Technology .....</b>	<b>19</b>
<b>Chapter 3 Experiments and Results .....</b>	<b>23</b>
<b>1. Materials and Methods .....</b>	<b>23</b>
1.1. Physicochemical characteristics of wild ginseng leaves .....	23
1.1.1. Physicochemical characteristics of cultivated and wild ginseng leaves ·	23
1.1.2. Antioxidant activities of various solvent extracts from wild ginseng leaves .....	31
1.1.3. Isolation and purification of antioxidants from wild ginseng leaves .....	34
1.1.4. Effect of phenolic compounds from wild ginseng leaves on pro-inflammatory cytokine expression in macrophase RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide .....	43
1.1.5. Effect of wild ginseng leaves on lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in streptozotocin(STZ) diabetic rats .....	45
1.2. Development of processed food products using wild ginseng leaves .....	48
1.2.1. Development of processing technology for leaf tea using wild ginseng leaves .....	48
1.2.2. Processing adaptability and development of new processed food products using wild ginseng leaves .....	49
1.3. Physiological properties of wild ginseng leaves .....	50
1.3.1. Quantitative and qualitative analysis of aromatic compounds in wild ginseng leaves .....	50
1.3.2. Physiological and functional properties of wild ginseng leaves .....	51
<b>2. Results and Discussion .....</b>	<b>57</b>
2.1. Physicochemical characteristics of wild ginseng leaves .....	57
2.1.1. Physicochemical characteristics of cultivated and wild ginseng leaves ·	57

2.1.2. Physicochemical characteristics of wild ginseng leaves at different collected times .....	75
2.1.3. Antioxidant activities of various solvent extracts .....	93
2.1.4. Separation and characterization of antioxidants from wild ginseng leaves .....	101
2.1.5. Effect of phenolic compounds from wild ginseng leaves on pro-inflammatory cytokine expression in macrophase RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide .....	131
2.1.6. Effect of wild ginseng leaves on lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats .....	137
2.2. Development of processed food products using wild ginseng leaves .....	148
2.2.1. Effects of roasting conditions on physicochemical properties of wild ginseng leaves .....	148
2.2.2. Proper drinking concentration of wild ginseng leaf tea .....	153
2.2.3. Separation of bitter compounds in wild ginseng leaf .....	155
2.2.4. Flavor improving technology of wild ginseng leaf tea .....	157
2.2.5. Development of leaf tea products using dried wild ginseng leaves .....	160
2.2.6. Processing adaptability .....	162
2.2.7. Heat stability of wild ginseng leaf .....	168
2.2.8. Beverage adaptability of wild ginseng leaf extracts .....	171
2.2.9. Application for processed products using wild ginseng leaves .....	176
2.3. Physiological properties of wild ginseng leaves .....	188
2.3.1. Quantitative and qualitative analysis of aromatic compounds in wild ginseng leaves .....	188
2.3.2. Physiological properties of wild ginseng leaves .....	191
<b>Chapter 4. Attainment of Objectives and Contribution .....</b>	<b>209</b>
<b>Chapter 5. Applications of the Results .....</b>	<b>210</b>
<b>Chapter 6. References .....</b>	<b>212</b>

# 목 차

요 약 문 .....	1
SUMMARY .....	6
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	23
제 1 절 재료 및 방법 .....	23
1. 장뇌삼 잎의 식품학적 특성 구명 .....	23
가. 장뇌삼 및 재배삼 잎의 식품학적 특성 비교 .....	23
나. 용매별 장뇌삼 잎 추출물의 항산화활성 .....	31
다. 장뇌삼 잎에 함유된 항산화성 물질의 분리 및 특성 .....	34
라. 장뇌삼 잎 추출물 및 이로부터 정제한 항산화성 물질이 lipopolysaccharide 로 자극된 RAW.264.7 마크로파아지에서 발현하는 항염증관련 사이토카인 에 미치는 영향 .....	43
마. 장뇌삼 잎 추출물의 투여가 streptozotocin(STZ) 유발 당뇨쥐의 항산화계 에 미치는 영향 .....	45
2. 장뇌삼 잎을 이용한 가공식품 개발 .....	48
가. 장뇌삼 잎차의 적정 가공방법 검토 .....	48
나. 가공적성 및 새로운 형태의 가공식품 개발 .....	49
3. 장뇌삼 잎의 생리기능적 특성 구명 .....	50
가. 방향성성분의 분리 및 정성, 정량 분석 .....	50
나. 생리기능적 특성 검토 .....	51
제 2 절 결과 및 고찰 .....	57
1. 장뇌삼 잎의 식품학적 특성 구명 .....	57
가. 장뇌삼 및 재배삼 잎의 식품학적 특성 비교 .....	57
나. 채취시기별 장뇌삼 잎의 식품학적 특성 .....	75
다. 용매별 장뇌삼 잎 추출물의 항산화 활성 .....	93
라. 장뇌삼 잎에 함유된 항산화성 물질의 분리 및 특성 .....	101

마. 장뇌삼 잎 추출물 및 이로부터 정제한 항산화성 물질이 lipopolysaccharide 로 자극된 RWA 264.7 매크로파아지에서 발현되는 항염증관련 사이토카인에 미치는 영향 .....	131
바. 장뇌삼 잎 추출물의 투여가 streptozotocin(STZ) 유발 당뇨병 쥐의 항산화계에 미치는 영향 .....	137
2. 장뇌삼 잎을 이용한 가공식품 개발 .....	148
가. 튀음처리 정도가 잎차의 특성에 미치는 영향 .....	148
나. 장뇌삼 잎차의 적정 음용조건 .....	153
다. 쓴맛성분의 분획 .....	155
라. 장뇌삼 잎차의 향미 개선기술 개발 .....	157
마. 건엽을 이용한 잎차 제조기술 개발 .....	160
바. 가공적성 검토 .....	162
사. 장뇌삼 잎의 열안정성 검토 .....	168
아. 장뇌삼 잎 추출물의 음료가공 적성 .....	171
자. 다양한 가공식품에의 활용기술 개발 .....	176
3. 장뇌삼 잎의 생리기능적 특성 구명 .....	188
가. 방향성성분의 정성, 정량분석 .....	188
나. 생리기능적 특성 검토 .....	191
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>209</b>
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	<b>210</b>
<b>제 6 장 참고문헌 .....</b>	<b>212</b>

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

- 현재까지 적절한 가공방법이 개발되어 있지 않아 산야에 그대로 방치하여 겨울철 낙엽으로 일생을 마감하는 장뇌삼 지상부(잎, 줄기 등)를 채취하더라도 장뇌삼 뿌리에는 영향을 미치지 않는 8-9월경에 채취하여 차류 등 가공식품의 원료로 사용함에 따른 국내산 장뇌삼의 부가가치 극대화
- 장뇌삼 잎의 독특한 향미 특성, 생리기능적 특성 등을 면밀히 조사하여 재배삼과의 차별화를 유도함에 의해 장뇌삼 잎 가공제품의 고부가가치화 및 대중화에 기여
- 장뇌삼 잎으로부터 유효성분을 분리, 활용할 수 있는 신기술의 개발로 장뇌삼의 효율적 활용 및 이를 통한 참여업체의 경쟁력 제고

### 제 2 절 연구의 필요성

인삼(人蔘)은 오갈피나목과(*Araliaceae*) 인삼속(*Panax*)에 속하는 다년생 초본류로서, 한국인삼의 학명은 *Panax ginseng* C. A. Meyer로 어원을 보면 Pan은 □□모든 것□□, Axos는 □□의학□□이라는 뜻으로 □□만병통치□□라는 의미이다. 한방에서는 그 뿌리를 강장(强壯), 강정(强精), 진정, 항 피로, 위장 쇠약에 따른 신진대사 기능저하에 주로 사용하며 그 효과를 세계적으로 인정받고 있는 한국의 대표적 산물이다.

인삼은 재배지에 따라 여러 가지로 나누어지는데 산에 저절로 자란 것을 산삼(야삼), 밭에 심은 것을 재배삼(원삼), 산에 심어 기른 것을 장뇌삼이라고 부르고 있다. 즉 재배인삼은 비 가림으로 농지에서 계획적인 재배가 이루어지고 있는 것

을 말하며, 장뇌삼은 사람이 산에 씨를 뿌려 야생에서 자연적인 성장을 유도한 것이라면 산삼은 사람을 거치지 않고 천연적으로 자란 것을 말한다. 재배인삼은 높이 60 cm 가량으로 가을에 경엽이 지며 7년생 이상이 되면 비대성장은 더디고 체형의 균형이 불량해질 뿐만 아니라 표피는 목질화, 색택은 열변, 내공, 내백화 등으로 품질이 저하되므로 재배인삼은 7년 이상 재배하지 않는다. 반면 장뇌삼은 인삼의 씨앗을 받아 깊은 산속에서 거의 자연 상태와 같은 조건하에서 재배한 것으로 3년이 지나야 잎이 2장 달리고 4년째에는 3장, 5년째에는 4장, 6년이 넘어야 5장이 열리며 12년 이상이 되어야 수확하므로 한 뿌리 당 200달러를 호가하는 값비싼 천연자원이다. 따라서 장뇌삼은 형태와 효능이 산삼에 거의 가까운 것으로 알려져 있다. 즉 장뇌삼 잎의 이면을 보면 은색 같은 일종의 광채를 느낄 수 있으나 재배삼에는 이러한 특징이 없으며, 소엽병과 엽병의 접합부분이 굵고 화경과 경의 비율이 짧은 특징을 나타내는데 이러한 환경적 차이에 따른 특징이 장뇌삼의 독특한 flavor와 화학성분, 생리활성 등을 나타낼 것이라고 추정되어진다.

이 뿌리를 대상으로 진행되어 온바 인삼 지상부인 잎이나 줄기 등의 약리작용이나 식품학적인 특성, 즉 향기성분, 맛 성분, 색깔, 폴리페놀 화합물 등에 대한 체계적이고 실용적인 자료가 미흡한 실정이다. 다만 Saito 등(1973)이 인삼 잎의 조사포닌 분획물에서 중추신경억제작용, 혈압강화작용 등이 있다고 보고한 이래 인삼 잎에도 관심을 갖기 시작하였으며, Tanaka 등(1966)이 잎 사포닌 분획에서 진정 aglycone의 존재를 확인, 보고하자 사포닌 연구에 활기를 띠기 시작하였고, 이 후 조사포닌 분획에서 6종 (Re, Rg1, Rb1, Rb2, Rc, Rd)의 사포닌 성분을 확인하였다(Hou, 1977). 그리고 인삼 잎에는 뿌리 사포닌에 비하여 panaxatriol(Re, Rf, Rg1)계 사포닌이 많이 함유되어 있어 panaxadiol(Rb1, Rb2, Rc, Rd)과 panaxatriol의 비는 0.54-0.75 수준으로 보고되어 있다(김 등, 1987). 최근에는 인삼 잎에서 새로운 사포닌인 Rg4, Rh5, Rh6, Rh7, Rh8, Rh9 및 Rg7로 명명된 사포닌이 분리되었다 (Zhang, et al., 1989; Dou et al., 2001). 인삼 잎에는 뿌리에 비하여 사포닌 함량이 높지만, 최근에는 총 사포닌의 구성 비율이 양적비율 보다는 질적 비율에 의의를 두고 있는 실정인어서 뿌리에 비하여 무시되고 있는 형편이다. 그러나 최근 인삼의 항산화 물질이 사포닌 보다 페놀성 물질에 의한 것이라는 연구가 보고되면서 인삼 잎에 다량 함유되어 있는 페놀성 물질에 대해 관심이 모아지고 있다.

인삼 잎에는 수분함량이 9.98%, 조단백질이 14.96%, 조 지방이 3.43%, 식이섬유가 9.41%, 총 당이 21.5%를 차지하며, 뿌리와 비교할 때 총 당의 함량이 46% 수준으로 낮은 반면, 에탄올과 메탄올 및 기타 유기용매 가용성 획분의 수율은 높은 경향을 나타내고 있다(김 등, 1987).

인삼 뿌리는 그 효과의 우수성에도 불구하고 파종 후 수확까지 최소 4-6년이 소요되는 단점을 가지고 있으나, 인삼 잎의 경우 일 년마다 수확이 가능하다는 장점을 갖고 있으며 그 밖에도 폐자원의 활용이라는 이점도 가지고 있다. 그러나 재배삼 잎의 경우에는 농약 살포와 같은 환경적인 문제로 인하여 소비자들로부터 외면을 받고 있어 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 반면 장뇌삼인 경우는 청정지역에서 생육하므로 잔류농약의 문제가 없고 최근에는 대량재배가 이루어지고 있는 점을 감안할 때 산야에 그대로 방치할 경우 겨울철 낙엽으로 일생을 마감하게 되는 장뇌삼 잎을 뿌리에는 영향을 미치지 않는 8월말-9월초 순경에 채취하여 이에 대한 식품학적 및 기능적특성을 구명하고 가공식품의 원료로 사용할 경우 신 자원 소재의 개발이라는 측면에서도 그 의의가 큰 것으로 사료된다. 현재 국내 장뇌삼 생산농가는 경기 1, 강원 20, 충북 23, 전북 7, 전남 1, 경북 2 농가로 총 54 농가에 달하고 있으며 50만주 이상 장뇌삼을 식재한 대규모 업체도 5~6개소에 이르고 있어 가공용 장뇌삼 잎은 이들 농가로부터 수집 가능한 것으로 판단된다. 또한 장뇌삼의 부위별 중량은 12년생을 기준으로 할 때 뿌리 30g, 잎 10g, 줄기 20g 정도인 것으로 추정되므로 50만주 이상 보유한 대규모 업체로부터 가을철 채취 가능한 장뇌삼 잎의 양은 25,000kg 정도로 추산된다.

따라서 경엽이 지기전인 8월말-9월초 순경에 장뇌삼 지상부(잎, 줄기 등)를 적절히 채취하여 이를 가공식품의 원료로 사용하게 되면 지금까지 그대로 방치, 소제화 되지 못하던 장뇌삼 잎의 부가가치를 극대화시킬 수 있을 뿐만 아니라 국민의 건강증진에도 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

### 제 3 절 연구 범위

1. 장뇌삼 잎의 식품학적 특성 구명 분야에서는 장뇌삼과 재배삼 잎의 맛 관련 유리성분, 향기성분, 폴리페놀화합물, 사포닌, 활성산소 소거능 등의 이화학적 특성을 비교 검토함과 동시에 장뇌삼 잎의 채취시기별 이들 이화학적 특성을 조사하여 장뇌삼 잎의 활용도 제고를 위한 기초자료를 구축
2. 장뇌삼 잎을 이용한 가공식품 개발 분야에서는 장뇌삼 잎차의 제조를 위한 적정 전처리 조건 및 가공적성을 검토함과 동시에 이를 이용한 다양한 가공식품 (과립차, 양갱, 캔디, 김류 등)의 적정 가공기술을 개발
3. 장뇌삼 잎의 생리기능적 특성 구명 분야에서는 장뇌삼 잎의 채취시기별 시료에 대한 암 예방 효과를 조사함과 동시에 동물실험을 통하여 유효시료에 대한 *in vivo* 항종양 효과를 조사함에 의해 차별화할 수 있는 기초자료를 구축

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 재배인삼과 산삼 또는 장뇌삼과의 차이는 분자생물학적인 관점에서 몇 개의 염기서열상에서 차이가 나타난다는 연구 보고가 있을 뿐 시료의 제한성으로 인해 국내·외 연구보고가 거의 없음. 따라서 인삼에 대한 연구의 대부분은 재배인삼에 대한 것임.

### 1. 사포닌 성분 분야

○ 고려인삼은 수 천년동안 불로장수의 영약으로 알려져 왔으나 인삼에 관한 과학적인 연구는 1960대에 와서야 본격적으로 시작되었음. 특히 소련의 Brekhman 등이 사포닌 성분을 인삼의 유효성분으로 강조한 이래 인삼의 주요 약효성분은 사포닌이라는 견해가 공통된 의견이 되어 왔음.

○ 인삼사포닌은 화학구조의 특성에 따라 protopanaxdiol(PD)계, protopanaxatriol(PT)계, oleanane계 사포닌으로 구분하며 현재까지 각각 19종, 10종, 1종의 화합물이 분리정제 되었음. 고려인삼의 사포닌 종류는 모두 30종으로 미국삼 14종, 중국삼 15종에 비해 월등히 많은 종류가 들어있음.

○ 파낙소시드의 종류도 인삼의 자란 해수, 자라는 시기, 부위, 토양조건 등에 따라 변하며 어린 인삼의 뿌리와 잔뿌리에는 올레아놀산과 프로토파낙사디올을 계닌으로 하는 배당체가 오래 자란 인삼의 뿌리와 굵은 뿌리에 비해 상대적으로 많음. 반면 오래 자란 인삼일수록 그리고 뿌리가 굵은 것일수록 프로토파낙사트리올을 계닌으로 하는 배당체가 많음.

○ 인삼 잎은 오랫동안 뿌리에 비해 약학적인 의미가 별로 없어 학자들 간에 관심의 대상이 되지 않았으나 1973년 Saito 들에 의해 잎 사포닌이 신경이완작용, 진통작용, 혈압강하작용 및 atropine유사작용이 있음이 밝혀져 주목을 받게 되었음

○ 또한 Tanaka (1966) 들이 잎 사포닌 분획에서 진정 aglycone의 존재를 확인, 보고하자 사포닌 연구에 활기를 띠기 시작하였고 이후 조사포닌 분획에서 6종의 사포닌 성분인 ginsenoside-Rb<sub>1</sub>, -Rb<sub>2</sub>, -Rc, -Rd, -Re, -Rg<sub>1</sub> 등을 확인하였음.

○ Ginsenoside의 조성 및 함량에서는 잎에서 ginsenoside-Rb<sub>1</sub>, -Rb<sub>2</sub>, -Rc, -Rd, -Re, -Rf, -Rg<sub>1</sub> 등 7종이 분리 정량되었고 이 중 -Rg<sub>1</sub>, -Re, -Rd의 3종이 주된

사포닌 성분임이 밝혀졌음. 그러나 인삼 잎이나 줄기에서 연구자에 따라 서로 큰 차이를 나타낸 것은 인삼의 재배지역, 재배년근, 채굴시기 등의 요인에 따른 함량차이에 기인하는 것으로 추정됨.

○ 이상의 결과를 보면 잎은 총 사포닌의 함량과 ginsenoside-Rg<sub>1</sub>, -Re, -Rd의 함량이 현저히 높고 -Rb<sub>2</sub> 및 -Rc의 함량도 뿌리나 줄기에 비해 높아 이들 ginsenoside의 추출분리용 원료로 가장 적합함을 알 수 있음. 뿐만 아니라 ginsenoside-Rh<sub>2</sub>의 epimer인 20(R)-ginsenoside-Rh<sub>2</sub>가 최근 분리, 동정되었는데 이 화합물은 아직 뿌리에서는 보고되지 않아 주목을 받고 있으며 최근에는 적은 양이지만 인삼 잎에서 ginsenoside-Rh<sub>5</sub>, -Rh<sub>6</sub>, -Rh<sub>7</sub>, -Rh<sub>8</sub>, -Rh<sub>9</sub> and -Rg<sub>7</sub>이 분리되어 각각 3-beta, 6-alpha, 12-beta, 24-zeta- tetrahydroxy- dammar 20(22), 25-diene-6-O-beta-D-glucopyranoside(1), -Rh<sub>6</sub>: 3beta,6alpha12beta, 20(S)-tetrahydroxy- 25-hydroperoxy-dammar-23-ene 20-O-beta-D-glucopyranoside (2), -Rh<sub>7</sub>: 3-beta, 7-beta, 12-beta, 20(S)-tetrahydroxy-dammar-5,24-diene 20-O-beta-D-gluco pyranoside(3), -Rh<sub>8</sub>: 3-beta, 6-alpha, 20(S)-trihydroxy-dammar-24-ene-12-one-20-O-beta-D-glucopyranoside(4), -Rh<sub>9</sub>: 3-beta, 6alpha, 20(S)-trihydroxy-12beta,23-epoxy-dammar-24-ene-20-O-beta-D-gluco pyranoside(5) -Rg<sub>7</sub>: 3-O-beta-D-glucopyranosyl 3-beta, 12-beta,20(S), 24(R)-tetrahydroxy-dammar-25-ene 20-O-beta-D-glucopyranoside(6)로 명명되었음.

## 2. 비사포닌 성분 분야

○ 1980년대에 이르러 인삼의 약효성분으로 사포닌만을 생각하는 것에 대한 문제점이 제기되었음. 즉 ginsenoside 들을 다량 함유하고 있는 인삼의 지상부가 약용으로는 사용되지 않았고, 주근에 비해 ginsenoside 함량이 2배 이상 많은 미삼을 민간이나 한의학에서 약으로 사용하지 않는다는 점, 그리고 *Panax*속 이외의 식물인 돌외에서도 일부 ginsenoside가 분리 보고된 점 등 임. 최근에는 불순 사포닌 분획물에서 분리된 각종 비사포닌 성분들에 대한 약리작용이 보고됨에 따라 인삼 사포닌 이외의 성분들로서 휘발성 테르페노이드, 폴리아세틸렌, 페놀성물질, 리그난, 알칼로이드 등에 대한 관심이 높아지고 있음.

○ 인삼에는 질소함유 화합물로서 단백질, 아미노산, 핵산, 알칼로이드, 지용성성분으로 지방산, 정유, 폴리아세틸렌, 페놀화합물, 파이토스테롤, 테르페노이드 등, 당류로서 단당류와 올리고당, 다당류, 펙틴질 등, 그리고 비타민류와 무기질 등

매우 다양한 성분들이 함유되어 있음.

○ 뿐만 아니라 과산화지질 생성을 억제하는 항산화 활성물질로서 말톨, 살리실산, 바닐린산 등 페놀성 성분이 인삼에서 분리 동정되었으며 인삼에서 순수하게 분리정제된 사포닌 성분에는 항산화 효과가 없다는 보고도 있음.

○ 최근 인삼의 에틸아세테이트 가용성 분획으로부터 새로운 폴리페놀화합물인 permethyl ether를 분리하였는데 현재 화학구조 동정이 진행 중이며 연구검토 할 가치가 높은 것으로 주목받고 있음.

○ 산삼을 옛날에는 방초(芳草)라 불렀는데 이는 향기 나는 풀이라는 뜻임. 산삼의 향기 성분은 파나센이라는 정유물질로 여러 가지 복합성분으로 알려져 있지만 이에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않음. 그러나 산삼의 향기성분은 낙엽이 썩은 부식토와 관련이 깊은 것으로 추정되고 있음. 즉 나뭇잎이 썩어 발효하면서 좋은 냄새를 내뿜는데 산삼의 독특한 향기성분은 피나무, 참나무, 오리나무 등 활엽수들이 썩어 발효할 때 생기는 향기를 흡수한 것으로 추정됨.

○ 지용성성분은 고려인삼근 중 약 1% 정도 밖에 함유되어 있지 않으나 항산화 작용 및 노화억제관련 성분인 페놀계 화합물이나 항암 관련성분으로 추정되는 폴리아세틸렌계 성분, 미량으로서 생리활성이 기대되는 알칼로이드 화합물 및 정유성분이 함유되어 있어 최근 주목을 받고 있음.

○ 인삼 정유의 향기성분으로서 16종의 알코올과 에스테르류가 동정된 바 있으며 terpineol 등 8종의 monoterpene계 화합물을 GLC로 동정한 결과 인삼의 특유한 방향성분이  $\beta$ -elemene 등과 같은 단순한 몇 종류의 성분이 아니라는 것이 시사된 바 있음.

○ 한편 인삼의 에테르가용성 염기성분획에서 향기관련 성분인 피라진계 성분이 보고된 바 있으며 5종의 메톡시피라진계 및 8종의 알킬피라진 유도체를 GC/MS로 확인하였고 최근에는 파나신사놀 및 진세올을 단리하고 그 구조가 밝혀졌음.

○ 인삼 근에는 초산 등 11종의 휘발성 유기산류와 citric acid 등과 같은 비휘발성 유기산류 6종이 존재함이 보고되어 있으나 방향족 유기산에 대해서는 아직 보고된 바 없음.

### 3. 인삼의 효능 분야

○ 홍삼의 특유성분인 ginsenoside-Rh<sub>2</sub>는 수종의 암세포에 대해 세포독성을 나타내어 항암제로서의 가능성이 제시된 바 있고 홍삼이 Ehrlich 복수암세포에 대

해 항암효과를 나타낸다는 연구 및 홍삼이 암세포를 죽일 수 있는 생체 내 자연 살해세포의 활성화증진에 현저한 효과가 있음이 발표된 바 있음.

○ 최근 폐암에 걸린 생쥐를 대상으로 고려홍삼을 투여한 실험결과 홍삼이 암세포를 죽일 수 있는 생체 내 자연살해세포의 활성화증진에 효과가 있음이 밝혀졌으며 소련의 Brekhman박사는 고려홍삼의 항 피로 및 항 스트레스 작용을 보고하면서 인삼의 강장효과에 대한 개념을 “비 특이적 저항력을 증대시키는 현상”으로 구명하였고, 생체의 유해한 환경조건에 대하여 저항력을 증대시킴으로써 방어능력을 비 특이적으로 증진시키므로 이러한 효과를 adaptogen 효과라 하였음.

○ 조직의 퇴행성변화에 중요한 역할을 하는 활성산소종의 유해작용을 홍삼의 비사포닌 성분이 억제한다는 것이 밝혀졌고 홍삼 중의 노화억제 물질로서 수종의 페놀성화합물과 말톨성분의 존재가 알려졌으며 이들 성분은 항 피로효과도 있다는 것이 밝혀졌음.

○ 그밖에도 고려홍삼은 면역기능을 증강시키며 빈혈 치료 작용을 할 뿐 아니라 방사능 방어 작용, AIDS바이러스의 증식억제 및 신체기능의 향상성을 유지시킨다는 연구결과도 있음. 이와 같이 인삼연구의 대부분은 홍삼을 대상으로 하여 항 스트레스 즉 adaptogen 효과 및 항암, 항종양과 관련된 연구가 주종을 이루고 있으나 장뇌삼 지상부인 잎과 줄기의 식품학적 특성 구명에 대한 연구결과는 거의 없음.

#### 4. 인삼의 가공 분야

○ 인삼가공 초기에는 분말제품과 추출물의 농축제품인 인삼정이 주류를 이루었으나 최근에는 복용의 편리성과 소비자의 기호를 충족시키기 위해서 여러 가지 인삼가공제품이 개발되어 있음.

○ 인삼가공품에는 인삼의 형태가 남아있는 제품, 분말제품류, 액기스제품류, 차제품류, 한방이 가미된 액제제품류, 환제품류, 스포츠음료, 과자류, 육류조제품, 기타 등이 있으나 장뇌삼 잎, 줄기 등 지상부를 활용한 가공제품은 인삼엽차를 제외하면 거의 개발되어 있지 않음.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 재료 및 방법

#### 1. 장뇌삼 잎의 식품학적 특성 구명

##### 가. 장뇌삼 및 재배삼 잎의 식품학적 특성 비교

###### 1) 실험 재료

본 실험에 사용한 장뇌삼 잎은 본 연구과제의 참여업체인 설원농산이 보유하고 있는 장뇌삼 식재현장(강원도 인제군 북면 월학리)에서 12년생 이상의 것을 잎을 채취하더라도 뿌리에는 영향을 미치지 않는 8월 중순이후인 8월 17일과 9월 5일 2회에 걸쳐 직접 채취하였다. 재배삼 잎은 경기도 수원시 소재 KT&G 중앙연구원 인삼재배포장에서 5년생 인삼의 것을 9월 말 수확 현장에서 채취하였다. 채취한 잎은 흐르는 물에서 여러 번 세척한 후 동결건조 또는 튀움처리(생엽→선별→유수세척→세절→튀움→유념→건조)하였고 분석용 시료는 분쇄하고 60 mesh 체를 통과한 것을 사용하였다.

###### 2) 일반 성분

수분, 조단백질, 조회분, 조지방의 함량은 AOAC 법에 준하여 측정하였다.

###### 3) 무기질

500℃에서 회화시킨 회분에 염산용액(염산:증류수 = 1:1)을 가하여 무기질을 용해시킨 후 발광플라즈마 분석기(ICP, Jobin Yvon JY38 Plus, France)를 사용하여 측정하였다.

###### 4) 유리아미노산

시료분말 5g에 75% 에탄올을 가하여 90℃ water bath에서 1시간 환류추출을 3회 반복한 후 여과하고 40℃에서 감압농축하여 50 mL로 정용하였다. 농축액에 25% TCA(trichloroacetic acid)를 가하여 단백질을 침전시키고 원심분리(3,000rpm, 20min, 0℃)하였다. 상정액을 취하여 diethyl ether로 TCA를 추출제거

한 뒤 Amberlite IR 120(H<sup>+</sup>)에 통과시켜 아미노산을 흡착시킨 다음 암모니아 용액으로 용출시켰다. 용출액은 감압농축하여 암모니아를 제거한 후 HPLC(Jasco, Japan)를 사용하여 분리, 정량하였다.

## 5) 유리당

### 가) 총당 및 환원당

시료의 전처리는 다음과 같이 실시하였다. 즉, 에탄올로 추출하고 농축한 다음 물로써 50 mL로 정용한 추출액에 10% lead acetate를 가하여 단백질을 제거하고 물로써 50 mL로 정용하고 여과하였다. 여액에 3.2% sodium oxalate를 첨가하여 과잉의 납을 제거한 다음 물로써 100 mL로 정용하였다. 총 당량은 페놀-황산법으로 측정하였다. 즉, 시료 1 mL에 5% 페놀 용액 1 mL를 가한 후 진한 황산(95%) 5 mL를 첨가하여 잘 혼합하고 30분간 방치한 다음 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 무수포도당 용액(0.01-0.1 mg/mL)을 만들어 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다. 한편, 환원당은 알칼리성에서 3,5-dinitrosalicylic acid에 의한 비색법으로 정량을 하였다. 즉, 당용액 1 mL과 시약 1 mL를 가하고 끓는 수욕 중에서 5분간 끓인 다음, 냉각한 후 물을 가하여 5 mL로 채운 뒤 한 시간 이내에 550 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준곡선은 무수포도당 용액(0.2-2.0 mg/mL)을 만들어 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정하여 작성하였다.

### 나) HPLC에 의한 유리당의 조성 및 함량

75% 에탄올 추출 후 농축하고 정용한 용액을 이온교환수지(Amberlite TMD-8)로 처리하여 이온성물질을 제거하고 0.2 μm membrane filter로 여과시킨 시료액을 carbohydrate analysis column(3.9×300mm, Waters, USA)으로 분리, 정량하였다(Table 1).

Table 1. Operating condition of HPLC for free sugars

Instrument	Jasco PU-1580 pump Jasco DG-1580-54 degasser Jasco RI-1580 detector
Column	Carbohydrate analysis column(3.9×300 mm)
Flow rate	0.7 mL/min
Mobile phase	Acetonitrile : Water(75:25)

6) 유기산

75% 에탄올 추출 후 농축하고 정용한 용액을 음이온교환수지(Amerlite IRA-93)에 통과시켰다. 흡착된 유기산을 6N-formic acid로 탈착시키고 감압건고한 다음 증류수에 용해시키고 정밀여과한 것을 HPLC로 분리, 정량하였다(Table 2).

Table 2. HPLC analysis condition for organic acids

Instrument	Jasco PU-1580 pump Jasco DG-1580-54 degasser Jasco UV-2075 plus detector
Detector	Waters Associates, UV/visible(210nm)
Column	Aminex HPX-87H column(7.8×300 mm, USA)
Flow rate	0.4 mL/min
Mobile phase	0.004 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

7) 지방산

시료분말 1 g을 200 mL 삼각플라스크에 정확히 취하고 에틸에테르 100 mL를 가하여 실온에서 약 90분간 150 rpm으로 흔들어 준 다음 Whatman No. 2 여과지로 여과하고 잔사에 에틸에테르 50 mL씩을 2회 가하여 재차 지방을 추출하였다. 추출한 에테르 층을 모아 진공농축기로 40℃ 이하에서 용매를 제거한 다음 이를 지방산 분석시료로 사용하였다. 추출한 지방질을 50 mL의 둥근 플라스크에 취하고 0.5 N NaOH/methanol 용액 5 mL를 가한 다음 잘 섞어주고 15분간 80℃

의 모래반응조에서 환류냉각시키면서 유지를 검화시켰다. 여기에 10% BF<sub>3</sub>/methnol 용액 5 mL를 가하여 80℃에서 15분간 환류냉각시키면서 지방산 메틸에스터 화합물을 만들었다. 메틸에스터 화합물을 추출하기 위하여 5 mL의 헥산을 가하여 1분간 80℃에서 유지한 후 포화식염수를 가하여 헥산 층을 분리시키고 헥산 층을 취하여 무수황산나트륨 층을 통과시켜 얻은 지방산 메틸에스터 화합물 1 µL를 불꽃이온화검출기(FID) 및 모세관칼럼(HP-FFAP, 0.32 mm x 30 m x 0.25 µm film thickness, HP. USA)이 장착된 가스크로마토그래프(Hewlett Packard, USA)에 주입하여 분석하였다. 이때 주입기 및 검출기의 온도는 각각 260℃ 및 280℃로 하였으며 오븐온도는 120℃에서 2분간 유지한 후 분당 4℃씩 260℃까지 상승시켜 260℃에서 10분간 유지하였다. 헬륨을 운반기체로 사용하였으며 유속은 1.5 mL/min로 유지하였고 분할비율은 1:30으로 하였다. 각 지방산의 확인은 표준품의 Rt값으로 확인하였고 함량은 각 지방산의 response factor를 구하여 면적보정법에 따라 산출하였다.

#### 8) 헥산관련물질

시료를 80% 에탄올로 추출 후 농축하고 분액여두에서 에테르로 탈지시킨 다음 물 층을 활성탄으로 충전된 칼럼에 투입하여 1.4% 암모니아수와 50% 에탄올로 구성된 용매로 용출시켰다. 용출액은 일정량으로 정용한 다음 일부를 취해 완전 건조시키고 나서 0.05 M 인산완충용액에 용해시킨 후 HPLC로 분리, 정량하였다 (Table 3).

Table 3. HPLC analysis condition of nucleic acids

Instrument	Jasco PU-1580 pump Jasco DG-1580-54 degasser Jasco UV-2075 plus detector
Detector	Waters Associates, UV/visible(260 nm)
Column	µ-Bondapak C <sub>18</sub> (3.9 × 300 mm)
Flow rate	0.8 mL/min
Mobile phase	Acetonitrile : Water(80:20)

#### 9) 구성다당류의 분획

분말시료 50g에 75% 에탄올을 가하고 열탕 중에서 환류냉각장치를 부착시켜 2시간 추출한 다음 Molish 반응으로 당이 검출되지 않을 때까지 추출을 반복하였다. 추출물은 여과하고 잔사에 무수에탄올, 아세톤, ether로 순차 처리하여 탈수시킨 뒤 40℃ 송풍건조기에서 건조하여 AIS를 얻었다. 얻어진 AIS 10 g에 0.5% ammonium oxalate 100 mL를 가하여 80℃에서 24시간 가열하고 원심분리(5,000 rpm, 10min)하는 조작을 3회 반복하여 얻은 상정액을 증류수에서 하룻밤 투석하고 pH를 3.0으로 조정한 후 3배량의 ethanol을 가하여 펙틴질을 침전시켰다. 원심분리 후 남은 침전물은 100 mL의 10% NaOH에 용해시킨 후 질소기류 하에서 24시간 교반하고 원심분리 하는 조작을 3회 반복하였다. 상정액을 초산으로 중화하고 증류수에 하룻밤 투석한 후 3배량의 ethanol을 가하여 hemicellulose 획분을 얻었으며 조섬유는 hemicellulose 분리 시 남은 침전물을 물로 수세하고 건조시켜 조제하였다(Fig. 1).

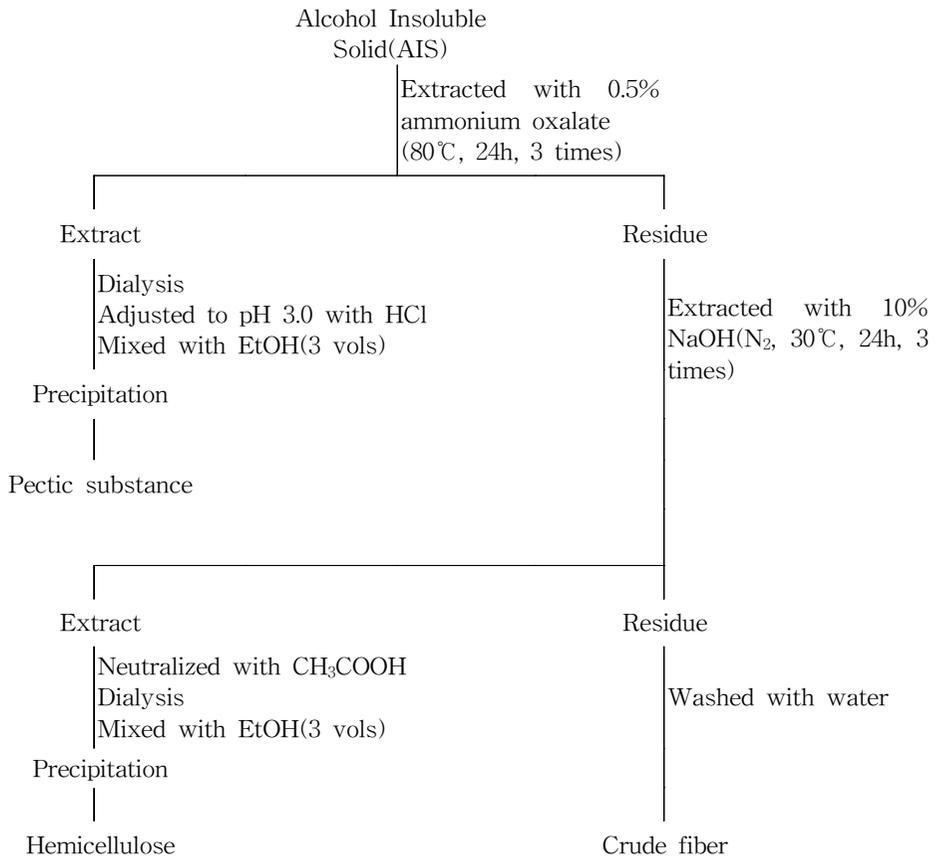


Fig. 1. Fractionation of polysaccharides

#### 10) 사포닌

시료분말 5 g에 80% 메탄올용액을 가하여 80°C water bath에서 2시간 간격으로 3회 환류추출하였다. 여액을 감압농축한 다음 증류수를 사용하여 50 mL로 정용한 뒤 diethyl ether로 세척하고 물층을 n-부탄올 용액 50 mL로 4회 추출하였다. 물 포화 부탄올 층을 합하여 증류수 30 mL로 2회 씻은 다음 부탄올 층을 감압 건조하여 중량을 측정하였다. 한편 농축물은 메탄올에 용해시켜 분석용으로 사용하였다. 조사포닌 추출액은 HPLC(Jasco, Japan)를 사용하여 사포닌을 분리, 정량하였다. 이때 칼럼은 Waters사의  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(3.9×300 mm)을, 이동상은 water(A)와 acetonitrile(B) 혼합액을 사용하여 B용매를 0-16 min 동안 22%,

16-50 min 동안 40%, 50-52 min 동안 22%로 gradient를 주었으며, 유속은 1.5 mL/min, injection volume은 20  $\mu$ L, UV detector(203 nm)를 사용하였다. 표준품은 ginsenoside-Rb<sub>1</sub>, -Rb<sub>2</sub>, -Rc, -Rd, -Re, -Rg<sub>1</sub> 및 -Rg<sub>2</sub>를 사용하였다.

#### 11) 폴리페놀화합물

장뇌삼 잎 분말 0.1 g에 80% 아세톤 40 mL을 가하여 sonication bath에서 25 분간 추출한 다음 3800 × g에서 10분간 원심분리를 하여 상정액을 얻었다. 침전물은 위와 같이 재차 추출하였으며 1차와 2차 추출물을 혼합하여 감압농축 후 일정량으로 정량한 다음 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정하였다. 즉 추출액 1.0 mL에 Folin-Ciocalteu reagent(2배 희석)시약 1.0 mL를 가하고 3분 후 10% sodium carbonate 1.0 mL를 넣어 실온에서 1시간 발색시킨 다음 760 nm에서의 흡광도를 측정하였고 gallic acid를 표준물질로 사용하여 작성한 검량곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다(Singleton과 Lamuela-Raventos, 1999). 한편 추출액 0.5 mL에 2% AlCl<sub>3</sub> 0.5 mL을 첨가한 후 한 시간 반응시키고 나서 420 nm에서 흡광도를 측정하였고, kaempferol를 표준물질로 사용하여 플라보노이드 함량을 구하였다.

플라보노이드 추출은 Hertog 등(1999)의 방법에 따라 추출하였으며, 분석은 Jasco사의 HPLC system을 사용하였다. 칼럼은 Waters사의  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(3.9×300 mm)을, 이동상은 water(A)와 acetonitrile(B) 혼합액을 사용하여 B용매를 0-50 min 동안 20-60%, 50-55 min 동안 60%, 55-60 min 동안 20%로 gradient를 주었으며, 유속은 0.5 mL/min, injection volume은 20  $\mu$ L, UV detector 파장은 370 nm에서 검출하였다. 표준품은 kaempferol과 quercetin을 사용하였다.

#### 12) 형태별 페놀산의 함량

페놀성물질의 추출은 Krygier 등(1982)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 시료분말 2.0 g에 70% methanol과 70% acetone이 1:1(v/v)로 혼합된 용매 100 mL를 가하여 실온에서 1시간 동안 추출하였다(3회 반복). 원심분리(6,000rpm, 20min)하여 얻은 상정액은 45°C 이하에서 감압 농축한 다음 6 N-HCl로 pH 2.0으로 조정하고 다시 원심분리하여 상정액을 얻었다. 이후 hexane(hexane : water phase=1:1)으로 유리지방산을 제거하고, 유리상태의 페놀성 물질들은 diethyl

ether : ethyl acetate 혼합용매(solvent : water phase=1:1)로 6회 추출한 뒤 여과하고 30°C에서 감압 건조시켰다. 한편 물 층에 잔존하는 다당체 등에 ester형태로 결합된 페놀성물질의 추출을 위해 4N NaOH 100 mL를 첨가한 후 질소기류 하에서 4시간 동안 가수분해시켰다. 반응 후 pH 2.0으로 조절하고 hexane으로 유리지방산을 제거한 뒤 물 층에 diethyl ether : ethyl acetate(1:1, v/v) 혼합용매를 사용하여 ester형태의 페놀성 물질을 추출하였다.

### 13) 형태별 페놀산 물질의 HPLC에 의한 분리

HPLC(Jasco, Japan) system을 이용하였으며 칼럼은 Waters사의  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(3.9×300 mm)을 사용하였다. 이동상은 0.05% trifluoroacetic acid(A)와 acetonitrile(B)을 사용하여 B 용매를 0-5 min동안 2%, 5-10 min 동안 6%, 10-50 min 동안 40%, 50-55 min 동안 40%, 55-60 min 동안 0%로 gradient를 주었으며, 유속은 0.5 mL/min, injection volume은 20  $\mu$ L, UV detector의 파장은 280 및 320 nm로 하여 분석하였다.

### 14) 형태별 페놀산 물질의 항산화활성

#### 가) DPPH radical 소거활성

DPPH radical 소거활성은 에탄올에 녹여 농도별로 희석한 시료 0.5 mL에 에탄올로 희석한 0.1 mM DPPH 1.0 mL를 가한 후 실온에서 20분간 반응시킨 다음 525 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 대신 에탄올을 가한 대조구에 대해 시료를 넣었을 때의 흡광도 감소정도를 조사하였다(Brand-Williams 등, 1995).

$$\text{DPPH radical 소거활성 (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub>: 대조구의 흡광도

A<sub>1</sub>: 시료를 첨가한 시험구의 흡광도

#### 나) Hydroxyl radical 소거활성

Hydroxyl radical 소거활성은 Fenton reaction에 의해 OH radical을 발생시켜 이에 대한 소거활성을 측정하였다(Chung 등, 1997). 0.02 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.30 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.15 mL, 10 mM FeSO<sub>4</sub> 0.15 mL, 10 mM EDTA 0.15 mL, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.15 mL, H<sub>2</sub>O 0.525 mL 및 농도별

로 제조된 시료 0.075 mL를 가하고 잘 혼합하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 2.8% TCA 0.75 mL과 1.0 % TBA 0.75 mL을 가한 다음 20분간 끓는 물에서 반응을 시켰다. 반응 후 냉각한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Hydroxyl radical 소거활성 (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub> : 대조구의 흡광도

A<sub>1</sub> : 시료를 첨가한 시험구의 흡광도

다) Superoxide anion radical 소거활성

Xanthine/xanthine oxidase계에서 발생하는 superoxide anion radical과 nitroblue tetrazolium (NBT)의 반응에 의해 발색되어지는데 이때 시료에 의해 superoxide anion radical이 감소하여 반응액의 흡광도가 감소되는 비율을 측정하였다(Nagai 등, 2001). 즉 반응은 0.05 M phosphate buffer 1.0 mL, 3 mM xanthine 0.04 mL, 3 mM EDTA 0.04 mL, 0.15% bovine serum albumin 0.04 mL, 15.0 mM NBT 0.04 mL 및 시료 0.04 mL을 혼합한 후 25°C에서 10분간 반응한 다음 1.5 U/mL xanthine oxidase 0.04 mL을 가하여 25°C에서 20분간 반응시켰다. 20분 후 반응액을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Superoxide anion radical 소거활성 (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub> : 대조구의 흡광도

A<sub>1</sub> : 시료를 첨가한 시험구의 흡광도

## 나. 용매별 장뇌삼 잎 추출물의 항산화 활성

### 1) 실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 장뇌삼 잎은 본 연구의 참여업체인 설원농산이 보유하고 있는 강원도 인제군 소재의 장뇌삼 식재현장에서 12년생 이상의 것을 8월 말 직접 채취하였다. 채취한 잎은 뒤음처리(생엽→선별→유수세척→세절→뒤음→유념→건조) 한 후 분쇄하여 60 mesh 체를 통과한 분말을 사용하였다. 실험에 사용된 페놀산 물질들과 quercetin, kaempferol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), ascorbic acid, 2,6-dichloroindophenol, BHA, BHT, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, 2-deoxy-D-ribose, xanthine, xanthine oxidase 및 ferrozine은

Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 metaphosphoric acid는 Kanto 사(Tokyo, Japan)에서 hydrogen peroxide는 Junsei 사(Tokyo, Japan)에서 구입하였으며 분석 및 추출에 사용된 시약은 특급을 사용하였다.

## 2) 용매별 추출물의 제조

장뇌삼 잎 분말시료 5 g에 20배량의 용매를 가하고 환류냉각관을 부착시켜 80°C water bath에서 2시간 추출한 후 여과한 다음 감압·건고시킨 후 중량을 측정하여 추출수율로 하였다. 사용 용매는 극성에 따라 물, 메탄올, 에탄올, 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 에테르 등 7종의 용매를 사용하였다.

## 3) 총 페놀성물질

시료의 총 페놀성 물질은 Folin & Ciocalteu 시약을 사용하여 측정하였다 (Singleton과 Lamuela-Raventos, 1999). 시료 0.1 g에 80% 아세톤 40 mL을 가하여 sonication bath에서 25분간 추출한 다음 3,800×g에서 10분간 원심분리를 하여 상정액을 얻었다. 이때 침전물은 재차 추출을 하였으며 1차와 2차 상정액을 혼합한 뒤 80% 아세톤으로 100 mL로 정용하였다. 총 페놀성 물질의 측정은 시료 1 mL에 2배 희석된 Folin & Ciocalteu 1 mL을 가하여 잘 혼합한 다음 3분간 반응시키고 나서 10% sodium carbonate 1 mL을 첨가하여 1시간 방치하였다. 반응 후 760 nm에서의 흡광도를 측정한 다음 표준품인 gallic acid의 표준곡선과 대비하여 농도를 구하였다.

## 4) 아스코르브산

시료의 아스코르브산 함량은 Jones와 Hurghes(1983)의 방법에 따라 측정하였다. 시료분말 1.0 g에 6% metaphosphoric acid를 가하여 5분 동안 sonication에 의해 추출한 다음 일정량으로 정용한 후 3,000×g에서 15분간 원심분리를 실시하였다. 상정액 5 mL에 2,6-dichloroindophenol dye로 적정한 후 용액의 적색이 소실되는 시점을 종말점으로 하여 이의 적정량으로부터 아스코르브산을 정량하였다.

## 5) 총 플라보노이드

총 플라보노이드 함량은 비색법을 이용하여 측정하였다(Hertog 등, 1999). 즉

시료분말 0.2 g을 80% 메탄올에서 2시간 추출한 후 3000 g에서 15분간 원심분리를 실시하였다. 상정액을 80% 메탄올로 100 mL로 정용하였다. 추출액 0.5 mL에 2%  $\text{AlCl}_3$ -에탄올 용액 0.5 mL을 가한 후 실온에서 1시간 반응시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 karpferol의 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

#### 6) 플라보노이드 조성 및 함량

플라보노이드의 추출은 Hertog의 방법(1999)에 따라 실시하였다. 시료 0.1 g을 100 mL 용량플라스크에 칭량한 다음 62.5% 메탄올(0.2% BHA) 40 mL에 5분간 ultrasonication을 하였다. 이 용액에 6 M HCl을 가한 다음 질소가스로 1분간 충전한 후 90°C water bath에서 2시간 가수분해를 시켰다. 가수분해 후 냉각한 후 여과한 다음 메탄올을 사용하여 100 mL로 정용하였다. 이 추출액을 0.2  $\mu\text{m}$  filter로 여과한 다음 HPLC 분석에 사용하였다. HPLC 분리 조건은 다음 Table 4와 같다.

Table 4. HPLC analysis condition of flavonoid

Instrument	Jasco PU-1580 pump Jasco DG-1580-54 degasser Jasco LG-1580-04 gradient
Detector	Jasco UV-2075 plus(370 nm)
Column	Waters $\mu$ -Bondapak $\text{C}_{18}$ (3.9×300 mm, USA)
Mobile phase	0.05% trifluoroacetic acid (A)/Acetonitrile (B)
Gradient	0-5min, 2%(B); 5-10min, 6%(B); 10-50min, 40%(B); 50-55min, 40%(B); 55-60min, 2%(B)
Flow rate	0.7 mL/min

#### 7) 항산화활성

DPPH에 대한 전자 공여능은 Brand-Williams 등(1995)의 방법에 따라 측정하였으며, superoxide radical의 생성 저해능은 xanthine/xanthine oxidase system에 의해 생성되는 superoxide radical에 의한 nitroblue tetrazolium (NBT)의 환

원력을 측정하였다(Nagai 등, 2001). Hydroxyl radical 생성 저해능은 Fenton 반응에 의해 생성되는 OH·를 소거하는 능력을 구하여 산출하였고(Chung 등, 1997) 금속결합능력은 Dinis 등(1994)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 추출물에 2 mM FeCl<sub>2</sub> 0.05 mL을 가하고 5 mM Ferozine 0.2 mL을 가하여 잘 혼합한 다음 10분간 암실에서 방치한 후 562 nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 어느 성분이 Fe<sup>2+</sup>와 결합함으로써 ferrozine-Fe<sup>2+</sup>의 형성을 저해함에 따른 흡광도 감소정도로서 나타내었다.

#### 8) 통계처리

실험결과는 SAS 통계프로그램을 이용하였으며 각 실험군의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으며 각 실험군 간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 유의차 검정을 하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 Duncan's multiple range test에 의해 실험군간의 차이를 95% 수준에서 검정하였다.

### 다. 장뇌삼 잎에 함유된 항산화성 물질의 분리 및 특성

#### 1) 실험재료 및 시약

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), epicatechin 및 ascorbic acid는 Sigma사에서 구입하였고, 다른 분석 시약들은 특급을 사용하였다. 실험에 사용된 시료는 장뇌삼 잎차를 ball mill로 분말화 시킨 후 60 mesh 체를 통과한 것을 사용하였다.

#### 2) EtOAC 추출물의 순차분획

잎차 분말에 80% 메탄올을 가하여 환류냉각관이 설치된 80°C water bath에서 2시간 추출한 다음 여과하였으며, 이러한 조작을 3회 반복하였다. 여과액은 일정량으로 감압농축을 한 후 극성에 따라 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, n-부탄올순으로 순차분획을 실시하였다 (Fig. 2). 모든 분획물은 완전 건조시킨 다음 메탄올을 가하여 10 mg/mL 농도가 되게 정용하였다. 각 추출물에 대해 radical 소거능을 측정하였다.

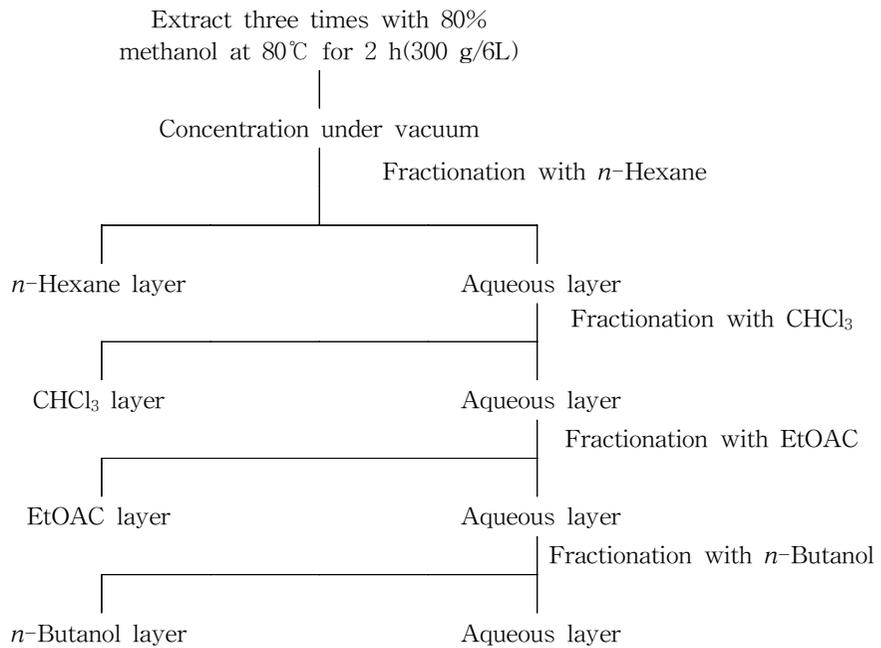


Fig. 2. Flow sheet for fractionation by various solvent

### 3) 항산화활성

DPPH radical 소거활성은 앞선 방법과 동일하며, linoleic acid의 자동산화 저해 활성은 TBARS 방법을 응용하였다(Osawa와 Namiki, 1981). 시료 4 mg을 에탄올 4 mL에 용해시킨 다음 2.5% linoleic acid 4 mL, 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) 4 mL, 증류수 4 mL을 혼합하여 37°C water bath에서 78시간 동안 반응과정을 지켜보면서 시료에 의한 linoleic acid의 산화억제정도를 측정하였다. 산화물의 측정은 TBA법을 이용하였다. 즉, 반응용액 1 mL과 20% TCA 그리고 0.75% thiobarbituric acid 1.0 mL을 혼합한 다음 100°C에서 30분간 반응시키고 나서 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 쥐 간의 지질과산화물 생성억제유무는 쥐 간을 균질화 한 다음 원심분리를 하여 얻은 상정액과 Fenton 반응 후 생성되는 hydroxyl radical에 의한 조직의 손상정도를 TBA법으로 측정하였다(Bishayee와 Balasubramanian, 1971; Ohkawa 등, 1979).

#### 4) pH에 따른 해리성의 차이에 의한 물질분리

항산화 활성이 가장 높은 에틸아세테이트 분획물을 pH에 따라 산성과 중성 분획물로 분리하였다(Fig. 3). 즉, 분액여두에 에틸아세테이트 분획물과 0.2 M 인산 완충용액(pH 8.0)을 가하여 잘 흔든 다음 방치하면 중성물질은 비 해리되면서 유기용매와 친화성이 있기 때문에 에틸아세테이트로 이행되어 에틸아세테이트-중성 분획물을 얻고, 다시 물 층을 1.0 N HCl을 가하여 pH 3.0으로 조정하면 에틸아세테이트로 추출하면 산성물질은 비 해리되면서 에틸아세테이트 층으로 이 행이 되기 때문에 이 과정을 통하여 2개의 분획물로 분리하였다.

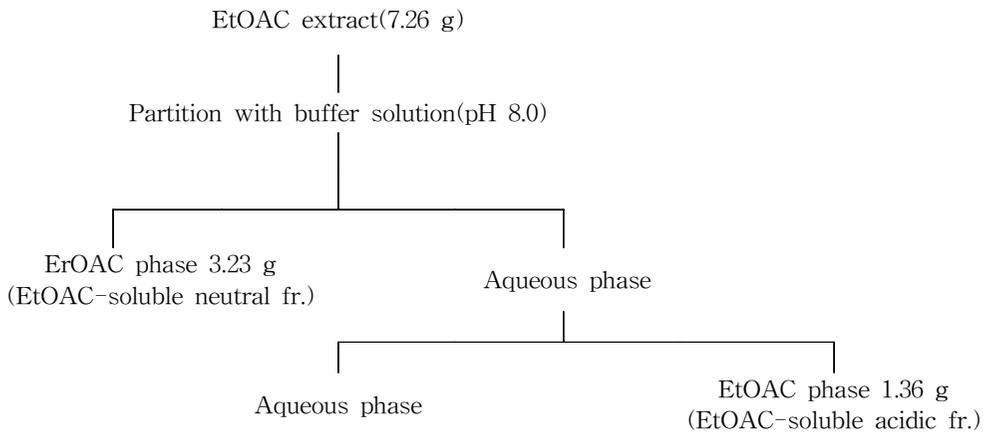


Fig. 3. Fractionation procedure of EtOAC extract.

#### 5) 산성-에틸아세테이트 분획물의 분리

산성과 중성-에틸아세테이트 분획물에서 항산화 성분의 분리정제 방법을 Fig. 4에서 간략히 도식화 하였다.

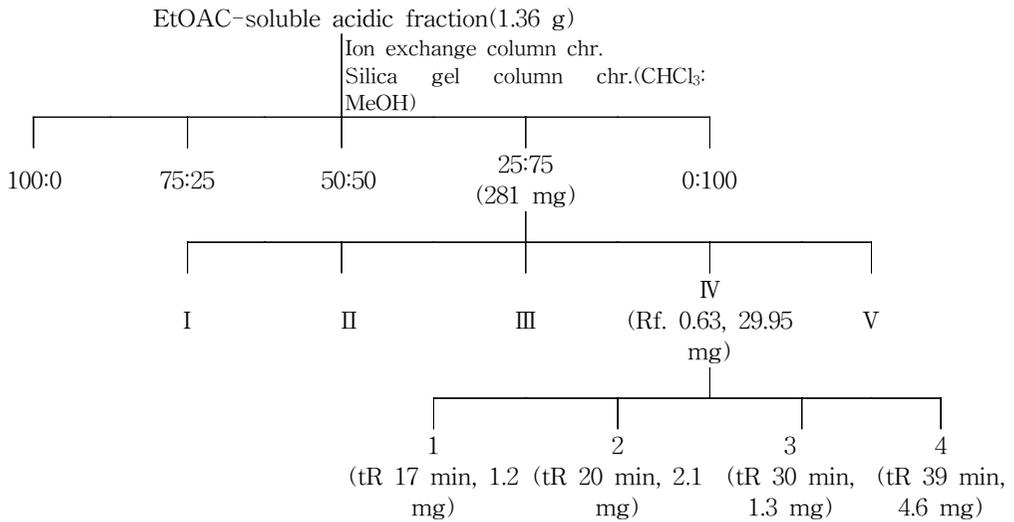


Fig. 4. Purification of antioxidants in EtOAc-soluble acidic extract obtained from extracts of wild ginseng leaves.

가) 이온교환수지 크로마토그래피

산성-에틸아세테이트 분획물을 Sepabeads SP-850(ion exchange resin, Mitsubishi, Tokyo, Japan) 칼럼에 투입한 후 물로 충분히 세척한 다음 흡착된 물질을 75% 에탄올로 탈착시킨 후 완전 감압건고를 시켰다.

나) 실리카겔 흡착크로마토그래피

이온교환수지로 일부 정제된 분획물을 chloroform : methanol(2:1) 용액으로 용해시킨 후 0.45  $\mu$ m filter로 여과한 후 silica gel 칼럼(0.0063-0.20 mm, Merck, Darmstadt, Germany, 3×30 cm)으로 재 정제과정을 실시하였다. 용매는 chloroform과 메탄올 혼합용매를 이용하여 메탄올 농도를 0%에서 100%로 단계적으로 증가시키는 용출 방법으로 분획하였다.

다) TLC

가장 DPPH radical 소거능이 우수한 화합물을 TLC plate(silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, German) 에서 재 정제과정을 실시하였다. 전개용매는

toluene/EtOAc/formic acid(5/4/1, v/v/v)를 사용하였고, 280 nm에서 발광 밴드를 확인한 후 각각 끊어모았다. 모든 발광 밴드에 대해서 DPPH radical 소거능을 측정하였다.

#### 라) Preparative HPLC

가장 활성이 높은 분획물을 HPLC(Jasco, Japan)로 더욱 정제하였다. 칼럼은 Waters사의  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(7.8×300 mm)을 사용하였다. 이동상은 10 mM phosphoric acid(A)와 methanol(B)을 사용하여 B용매를 0-50 min동안 2-50%로 gradient를 주었으며, 유속은 3.0 mL/min, injection volume은 0.1 mL, UV detector의 파장은 280 nm로 하여 분석하였다.

#### 마) EI-MS

EI-Mass 분석은 mass spectrometer JMS-AX 505 WA(Jeol Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다.

#### 6) 중성-에틸아세테이트 분획물의 분리

장뇌삼 잎 메탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 순차 분획한 후 가장 항산화 능력이 뛰어난 EtOAc 추출물을 pH의 해리도에 따라 산성과 중성-에틸아세테이트 분획물로 분리하였다. 이중 중성-에틸아세테이트 분획물을 클로로포름으로 충전한 silica gel(0.063-0.20 mm, Merck, Darmstadt, Germany) 칼럼에 통과시켰다. 이때 사용된 용출 용매는 CHCl<sub>3</sub>/MeOH 혼합액을 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 비율로 순차적으로 용출시켜 5개의 분획물을 획득하였다. 각각의 얻어진 분획물에 대해서는 DPPH radical 소거능을 측정하였고, 활성 물질을 분리·정제하기 위해서 Fig. 5와 같이 분리를 실시하였다.

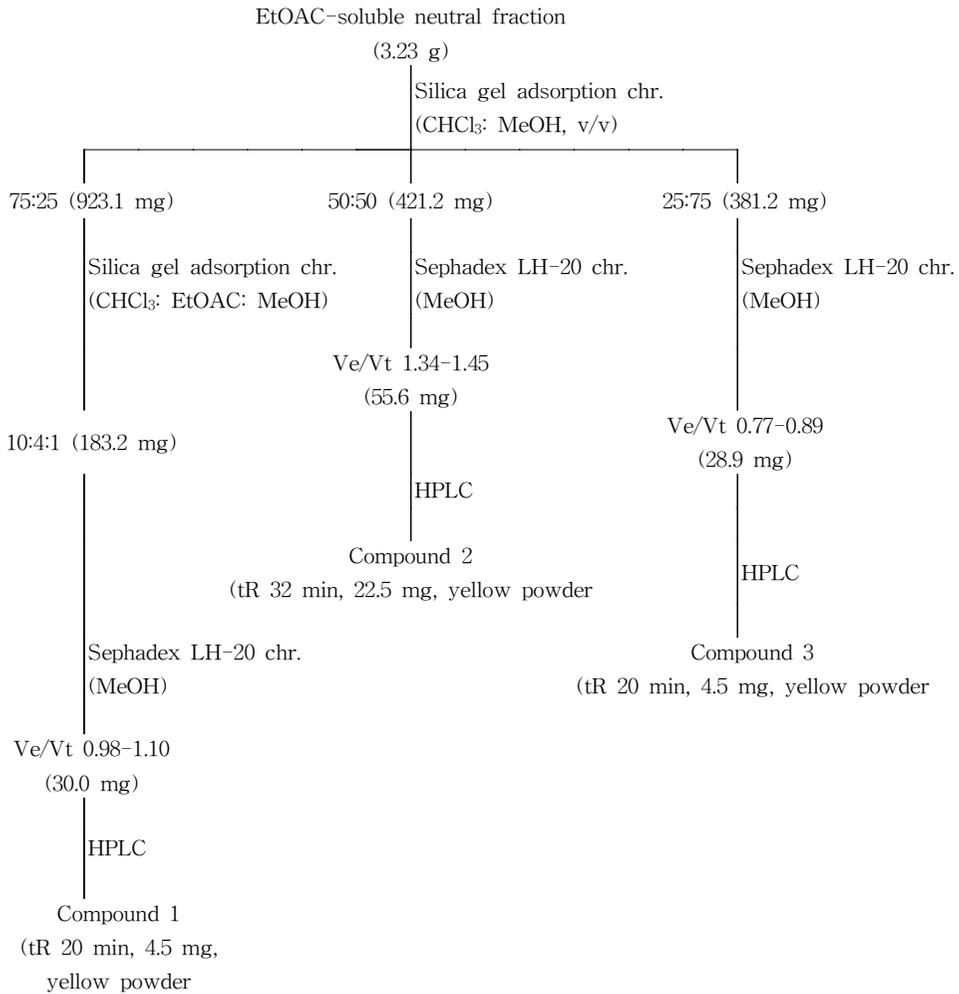


Fig. 5. Purification procedure of antioxidants from EtOAC-soluble neutral fraction of wild ginseng leaves. Ve/Vt: elution volume/total volume. tR: retention time.

가) Compound 1의 분리·동정

① Silica gel 칼럼크로마토그래피에 의한 분리

시료의 20배량에 상당하는 silica gel(0.063-0.20 mm, Merck, Darmstadt, Germany)을 chloroform으로 slurry를 만들어 칼럼에 충전 한 후 chloroform-methanol 용매계를 이동상으로 하여 MeOH 농도를 0, 25, 50, 75,

100으로 단계별로 순차적으로 증가시키는 step-wise 방법으로 용출 분획하였다. 또한 상기의 방법에 따라 silica gel을 slurry를 만들어 칼럼에 충전 시킨 후 chloroform-ethyl acetate-methanol 용매계를 10:4:1, 8:6:1, 6:8:1, 4:10:1, 2:12:1, 0:4:1(v/v) 용매계로 극성을 증가시키면서 용출분획 한 후 항산화 활성을 검정하였다.

② Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피에 의한 정제

EtOAc 가용 산성획분의 실험방법에서 기술한 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피와 동일한 방법으로 실시하였다.

③ HPLC에 의한 정제

활성물질 1은 분취용 HPLC를 이용하여 정제하였다.  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(7.8×300 mm, Waters)을 장착하고, 이동상은 50 mM phosphoric acid(A)와 methanol(B)을 사용하여 A용매를 0-30 min동안 85-50%, 30-35 min 동안 50%, 35-40 min 동안 50-85%로 gradient를 주었으며, 유속은 3.0 mL/min, injection volume은 100  $\mu$ L, UV detector의 파장은 325 nm로 하여 분석하였다.

나) Compound 2의 분리·동정

① Silica gel 칼럼 크로마토그래피에 의한 정제

시료의 20배량에 상당하는 silica gel(0.063-0.20 mm, Merck, Darmstadt, Germany)을 chloroform으로 slurry를 만들어 칼럼에 충전한 후 chloroform-methanol 용매계를 이동상으로 하여 MeOH 농도를 단계별로 순차적으로 증가시키는 step-wise 방법으로 용출 분획하였다.

② Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피에 의한 정제

활성물질 1의 실험방법에서 기술한 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피와 동일한 방법으로 실시하였다.

③ HPLC에 의한 정제

활성물질 1은 분취용 HPLC를 이용하여 정제하였다.  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(7.8×300 mm, Waters)을 장착하고, 이동상은 50 mM phosphoric acid(A)와 methanol(B)

을 사용하여 B용매를 0-30 min동안 30-60%, 30-35 min 동안 60-80%, 35-40 min 동안 80-30%로 gradient를 주었으며, 유속은 3.0 mL/min, injection volume 은 100  $\mu$ L, UV detector의 파장은 365 nm로 하여 분석하였다.

다) Compound 3의 분리·동정

① Silica gel 칼럼 크로마토그래피에 의한 정제

시료의 20배량에 상당하는 silica gel(0.063-0.20 mm, Merck, Darmstadt, Germany)을 chloroform으로 slurry를 만들어 칼럼에 충전한 후 chloroform-methanol 용매계를 이동상으로 하여 MeOH 농도를 단계별로 순차적으로 증가시키는 step-wise 방법으로 용출 분획하였다.

② Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피에 의한 정제

활성물질 1의 실험방법에서 기술한 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피와 동일한 방법으로 실시하였다.

③ HPLC에 의한 정제

활성물질 1은 prep. HPLC를 이용하여 정제하였다.  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(7.8×300 mm, Waters)을 장착하고, 이동상은 50 mM phosphoric acid(A)와 methanol(B)을 사용하여 B용매를 0-25 min동안 30-64.4%, 25-30 min 동안 90%, 30-35 min 동안 90-30%로 gradient를 주었으며, 유속은 3.0 mL/min, injection volume은 100  $\mu$ L, UV detector의 파장은 365 nm로 하여 분석하였다.

7) 분리된 활성물질의 구조해석

정제된 활성물질의 구조해석은 UV spectrophotometer, EI-MS(electron impact mass spectrometer), FAB-MS(fast-atom bombardment mass spectrometer), <sup>1</sup>H-NMR(<sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance) 그리고, <sup>13</sup>C-NMR(<sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance) 등의 기기를 사용하여 수행하였다.

가) UV spectrophotometry

정제된 활성물질의 UV/Vis spectra 특성은 Beckman DU70 spectrometer를 사용하여 200-700nm 범위에서 측정하였다.

## 나) MS

MS(mass spectrometer) 분석은 LC-MS를 이용하여 직접 주입방식의 EI-MS 분석을 하였으며, 이때 사용된 MS의 조건은 Table 5에 나타내었다. FAB-MS 분석은 mass spectrometer 기기(Pro Spec Fisons mass spectrometer)를 사용하였으며, matrix 시약으로 NBA(*meta*-nitrobenzyl alcohol)을 사용하였다.

Table 5. Condition of EI-MS analysis

Instrument	JMS-AX 505 WA(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
Ion source temperature	200°C
Scanning mass range	$m/z$ 50-500
Ionizing voltage	70 eV

## 다) NMR

$^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR 기기분석은 Bruker AMX 500 spectrometer(500 MHz)를, 용매는 deuterium methanol( $\text{CD}_3\text{OD}$ )을 사용하였다.

## 8) 항산화활성

DPPH에 대한 전자 공여능은 Brand-Williams 등(1995)의 방법에 따라 측정하였으며, superoxide radicals의 생성 저해능은 xanthine/xanthine oxidase system에 의해 생성되는 superoxide radical에 의한 nitroblue tetrazolium (NBT)의 환원력을 측정하였다(Nagai 등, 2001). hydroxyl radical 생성 저해능은 Fenton 반응에 의해 생성되는  $\text{OH}\cdot$ 를 소거하는 능력을 측정하였다(Chung 등, 1997).

## 9) 통계처리

실험결과는 SAS 통계프로그램을 이용하였으며 각 실험군의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으며 각 실험군간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 유의차 검정을 하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 Duncan's multiple range test에 의해 실험군간의 차이를 95% 수준에서 검정하였다.

라. 장뇌삼 잎 추출물 및 이로부터 정제한 항산화성 물질이 lipopolysaccharide로 자극된 RAW 264.7 매크로파아지에서 발현되는 항염증 관련 사이토카인에 미치는 영향

1) 실험재료

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin과 streptomycin은 Gibco Life Technologies에서 구입하였으며. COX-2, iNOS, NF- $\kappa$ -B,  $\alpha$ -tubulin monoclonal antibodies와 secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. Prostaglandin E<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  kit는 Assay Designs에서 구입하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), LPS, 및 그 밖의 시약들은 Sigma 사 제품을 구입하여 사용하였다.

2) 시료의 조제

장뇌삼 잎에서 분리한 항산화물질을 대상으로 항염증에 관련된 사이토카인의 변화를 측정하였다. 즉 실험에 사용된 항산화 물질은 대부분 물에 불용성이기 때문에 DMSO에 녹인 후 cell culture medium로 희석하여 최종 DMSO의 농도가 0.1%(v/v)가 넘지 않도록 하였다. 음성 대조구로서는 0.1%의 DMSO를 사용하였다.

3) 세포배양

본 실험에서 사용한 Macrophage RAW 264.7은 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 10% heat-inactivated fetal bovine serum이 첨가된 DMEM(100 U/ml of penicillin A and 100 U/ml of streptomycin) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다.

4) 세포 생존율

시료에 대한 Macrophage RAW 264.7의 생존율은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. MTT 측정은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 함유된 dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 전환되는 양을 측정하는 방법으로 먼저 적절히 배양된 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well 수준으로 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 접종한 다음 24시간

동안 배양하였다. 24시간 후 medium을 제거한 후 DMEM으로 희석된 각 농도별 시료 100  $\mu$ L를 가하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 MTT dye(1 mg/mL in phosphate-buffered saline)를 50 $\mu$ L를 가한 후 2시간 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 이때 MTT에 의해 형성된 formazan crystals을 DMSO로 용해한 후 ELISA micro plate reader로 570 nm에서 측정하였다.

#### 5) Nitrite

배양된 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well 수준으로 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 접종한 다음 24시간 동안 예비 배양 하였다. 24시간 후 medium을 제거한 후 DMEM으로 희석된 각 농도별 시료 100  $\mu$ L를 가하여 1시간 미리 배양한 다음 LPS(1  $\mu$ g/mL)를 처리하여 18시간 후 셀에서 medium으로 분비되어 나온 NO의 양을 Griess 시약을 사용하여 측정하였다. 즉, medium 150  $\mu$ L와 griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in water) 20  $\mu$ L 그리고 증류수 130  $\mu$ L를 가하여 실온에서 30분간 반응 후 ELISA micro plate reader를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

#### 6) PGE<sub>2</sub>와 TNF- $\alpha$

마кро파아지에서 LPS의 자극에 의해 생성된 PGE<sub>2</sub>와 TNF- $\alpha$ 의 농도 측정은 ELISA kits (Assay Design Inc., Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 측정하였다.

#### 7) Western blot

측정하려는 enzyme은 iNOS(120 KDa)와 COX-2(74 KDa)로 7.5% SDS-PAGE 겔을 사용하여 전기영동을 실시하였다. Electrotransfer는 다음과 같이 실시하였다. NC membrane을 transfer buffer에서 5분간 담가준 다음 cassette에 올려놓은 후 transfer할 gel을 transfer buffer로 살짝 적셔주고 membrane 위에 올려놓았다. Gel sandwich를 만들어서 transfer를 준비한 다음 100 V에서 1시간 transfer하였다. Transfer가 끝난 후 장치를 해체하고 transfer가 제대로 되었는지 확인하기 위해 transfer한 gel을 Ponceau S 용액에 5분 정도 침지하여 염색하고 증류수로 씻어서 transfer된 band를 확인하였다. 염색된 Ponceau S는 PBST로 완전 탈색시킨 후 blocking solution에서 1시간(상온) 정도 shaking하여 block시켰다. PBST로 세척한 다음 primary antibody를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤

shaking 한 다음 PBST로 5분간 2회 세척한 후 secondary antibody를 권장 희석 비율(1:2000)에 따라 blocking solution으로 희석한 다음 상온에서 1시간 정도 shaking하면서 반응시켰다. 반응 후 PBST로 3회 세척해준 후 ECL (enhanced chemiluminescence) kit 내의 solution A와 B를 1:1로 섞어 membrane에 골고루 반응시킨 후 detection하였다.

#### 8) 통계처리

실험결과는 SAS 통계프로그램을 이용하였고 각 실험군의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으며 각 실험군간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 유의차 검정을 하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 Duncan's multiple range test에 의해 실험군간의 차이를 95% 수준에서 검정하였다.

### 마. 장뇌삼 잎 추출물의 투여가 streptozotocin(STZ) 유발 당뇨병의 항산화계에 미치는 영향

#### 1) 시약

사포닌 표준품인 Rg1, Rc, Rb1, Re 및 Rd는 Wako(Osaka, Japan)에서 구입하였고, 사포닌 Rb2와 Rf는 Extrasynthese(Genay, France)에서 구입하였다. Streptozotocin과 다른 분석 시약은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

#### 2) 장뇌삼 잎 추출물의 제조

장뇌삼 잎 동결건조 분말을 90℃에서 1시간 열수 추출하였다. 추출물은 여과 후 동결건조하여 동물실험에 사용되었다.

#### 3) 사포닌, 페놀성물질 및 플라보노이드 함량

가항에서 기술한 방법과 동일하게 측정하였다.

#### 4) 실험동물 및 당뇨병유발

실험동물은 평균 체중이 250±10 g이며 6주령의 Sprague-Dawley rat(male)을 구입하여 일반 고형사료와 물을 공급하여 먹이면서 사육환경 1주간 환경에 적응시켜 사용하였다. 사육실의 온도는 20-25℃로 유지하였으며, 명암은 12시 간격으

로 점등 및 소등하였다. 실험동물을 16시간 절식시킨 후 신선한 0.1 M citrate buffer(pH4.5)에 streptozotocin(45 mg/kg, BW)을 용해하여 1 mL/kg으로 만들어 1회 복강에 주사하여 당뇨를 유발하였다. 그리고 당뇨 유발확인엔 streptozotocin 처리 후 48시간 만에 쥐의 안구에서 혈액을 채취하여 비 공복혈당이 280-400 mg/dL 이상인 동물만을 실험에 사용하였다.

#### 5) 동물실험 설계

쥐는 normal group과 당뇨를 유발한 DM군으로 분류하였다. Normal group은 증류수를 투여한 군(N)과 장뇌삼 잎 추출물을 40 mg/kg과 200 mg/kg투여한 군(N+W40과 N+W200)으로 분류하였으며, 당뇨군은 DM, DM+W40과 DM+W200군으로 나누었다. 시험기간 중에 대조군(DM)에는 증류수를, 당뇨유발군에는 장뇌삼 잎 추출물을 강제 경구투여하고 동시에 normal group에는 증류수를 강제 경구 투여하였다.

#### 6) 혈액에서의 glucose 및 TBARS

혈당은 쥐의 안와채혈 후 glucometer kit을 사용하여 측정하였다. 혈액의 과산화지질은 Satoh(1978)의 방법에 따라 측정하였다. 혈장 0.5 mL에 20% TCA 1.0 mL를 가하여 실온에서 10분간 반응 후 4,000 g에서 10분간 원심분리를 실시하였다. 상정액 0.5 mL에 TBA를 가하여 95°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료된 후 실온으로 식힌 후 증류수 1 mL와 butanol : pyridine(15:1) 혼합용액 5 mL를 첨가하여 혼합한 다음 4,000rpm에서 10분간 원심분리 후 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준물질로 사용하여 표준곡선을 작성하고 이것으로부터 malondialdehyde (MDA)의 농도로 환산하였다.

#### 7) 각 조직에서의 TBARS

각 조직 내 과산화 지질의 함량은 Okhwa 등(1979)의 방법에 따라 실시하였다. 간 균질액 0.1 mL에 8.1% SDS 0.2 mL, 20% acetic acid buffer(pH3.5) 1.5 mL, 0.8% TBA 용액 1.5 mL를 넣고 증류수를 넣어 반응용액을 4 mL로 조절한 뒤 95°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 완료된 후 실온으로 식힌 후 증류수 1 mL와 butanol : pyridine(15:1) 혼합용액 5 mL를 첨가하여 혼합한 다음 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,3,3-tetraethoxy

propane을 표준물질로 사용하여 표준곡선을 작성하고 이로부터 malondialdehyde (MDA)의 농도로 환산하였다.

#### 8) 각 조직에서의 항산화계와 관련된 방어효소의 활성 측정

##### 가) Superoxide dismutase(SOD) 활성

Superoxide dismutase (SOD)활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklundm의 방법(1974)에 따라 420 nm에서 측정하였다. SOD의 1 unit는 1분 동안 pyrogallol의 자동산화를 50%까지 억제하는데 요구되는 효소의 양으로 측정하였다. 50 mM Tris-HCl buffer (10 mM EDTA 포함) 1.8 mL과 6.0 mM pyrogallol 0.1 mL 그리고 희석된 조직 상정액을 가하여 최종 부피가 2.0 mL이 되도록 혼합액을 만든 후 반응을 시켰다. 반응정지는 1 N HCl 0.05 mL을 가하여 반응을 종료하였다.

##### 나) Glutathione peroxidase(GSH-Px)활성

Glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성은 Lawrence와 Burk의 방법(1976)에 의해 측정하였다. 즉, 효소활성은 GSH-Px가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하면서 소비된 GSH을 환원형으로 전환시키는데 필요한 NADPH의 양을 340nm에서 측정하였고, GSH-Px 1 unit는 1분간 1 μM NADPH를 산화시키는 효소의 양으로 정의하였다.

##### 다) Catalase(CAT) 활성

Catalase 활성은 Aebi의 방법(1983)에 의해 50 mM phosphate buffer(pH 7.0), 기질로 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액과 시료를 취해 240 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였고, 효소의 활성은 1분 동안 1 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. 효소활성 측정에 필요한 단백질 함량은 Lowry의 방법에 의해 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 측정하였다.

#### 9) 통계처리

실험결과는 SAS 통계프로그램을 이용하였으며 각 실험군의 결과는 평균치와 표준오차로 나타내었으며 각 실험군 간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 유의차 검정을 하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 Duncan's multiple range test에 의해 실험군간의 차이를 95% 수준에서 검정하였다.

## 2. 장뇌삼 잎을 이용한 가공식품 개발

### 가. 장뇌삼 잎차의 적정 가공방법 검토

#### 1) 잎차제조를 위한 전처리 기술

장뇌삼 잎에 함유된 효소의 불활성화를 도모함과 동시에 차로서의 향미를 부여하기 위해 다음과 같은 방법으로 잎차를 조제하였다. 즉 채취한 장뇌삼 생엽을 수세하고 2×2cm 정도의 크기로 세절한 다음 2시간 정도 음건하였다. 이를 180℃ 정도의 온도에서 1차 튀움(2-3분)하고 유념한 다음 10분간 실온에 방치하고 나서 2차 튀움(180℃, 2-3분), 3차 튀움처리(180℃, 2-3분)와 같이 튀움처리 횟수를 반복하였다. 튀움처리가 끝난 장뇌삼 잎은 40-60℃ 정도의 열풍건조기에서 수분함량이 10% 이하가 되게 건조시켰다.

한편 수작업에 의한 튀움차 제조의 경우 대량처리가 곤란하므로 장뇌삼 잎을 일시에 다량 채취할 경우 일단 수증기 처리(98℃, 30초)하여 변질과 관련된 효소를 불활성화시킨 다음 40-60℃의 열풍건조기에서 1차 건조시켜 건엽의 형태로 처리함에 의해 저장성을 부여하고자 하였다. 이와 같은 방법으로 얻어진 장뇌삼 건엽을 수증기로 1차 처리하여 건조 장뇌삼 잎에 수분을 복원시킨 다음 아래와 같은 튀움차 제조공정에 따라 잎차의 형태로 가공처리 하였다.

생잎→ 선별→ 스팀처리(효소 불활성화, 98℃, 30초)→ 열풍건조(40-60℃)→건엽→ 복원(스팀처리, 1분)→ 튀움(180℃)→ 유념→장뇌삼 잎차

#### 2) 장뇌삼 잎차의 향 고정 기술 개발

장뇌삼 잎을 잎차의 형태로 가공 후에도 장뇌삼 잎 특유의 향미를 유지시키기 위한 방안을 강구하였다. 즉 세절한 장뇌삼 생엽을 튀움처리 하기 전 잎의 중량에 대해 말토덱스트린 또는 베타-사이클로덱스트린을 1-7% 첨가, 혼합하고 튀움처리함으로써 가열처리에 의해 휘산되는 향미를 고정시키고자 하였다.

#### 3) 장뇌삼 잎차 분말 및 농축액의 조제

얻어진 장뇌삼 잎차는 cutting mill을 사용하여 1차 분쇄하고 나서 ball mill을 사용하여 150 mesh 이하로 미분쇄하였고 농축액은 다음과 같이 제조하여 사용하였다. 즉 중량비로 장뇌삼 잎차 분말시료에 10배량의 75% 에탄올을 가하고 환류냉각기를 부착시켜 80℃ water bath에서 2시간 추출한 후 여과하고 감압 농축시

켜 60 brix 정도의 농축액을 얻었다.

## 나. 가공적성 및 새로운 형태의 가공식품 개발

### 1) 장뇌삼 잎의 가공적성 검토

#### 가) 추출용매별 추출을 검토

장뇌삼 잎 분말시료 20 g에 10배량의 용매를 가하고 환류냉각관을 부착시켜 80℃ water bath에서 2시간 추출한 후 여과한 다음 감압 건조시켜 중량을 측정하여 추출수율로 하였다. 사용용매는 극성에 따라 water, methanol, ethanol, acetone, ethyl acetate, chloroform, diethyl ether 등 7종의 용매를 사용하였다.

#### 나) 열안정성 검토

장뇌삼 잎을 세척하고 물기를 없앤 다음 140, 160, 180 및 200℃의 오븐에서 20분간 열처리를 한 후 분쇄하여 60 mesh를 통과시킨 분말에 대해 처리온도에 따른 사포닌과 페놀성물질의 함량변화를 조사하여 열안정성을 검토하였다.

#### 다) 추출액의 음료가공 적성

장뇌삼 잎 분말시료를 75% 에탄올로 추출한 뒤 감압농축을 실시한 다음 농축물을 동결건조 하였다. 동결건조한 분말의 조사포닌 함량을 n-butanol법으로 구하여 사포닌 함량이 8% 이상 함유되도록 증류수에 농축물을 0.15-0.45% 수준으로 첨가하고 pH를 3.0-6.0의 범위로 조정하였다. 이후 90℃에서 20분간 가열한 다음 가열처리 전후의 색도, pH, 침전물 형성의 유무 등을 조사함과 동시에 HPLC를 사용하여 사포닌의 변화양상을 조사하였다.

### 2) 쓴맛 성분의 본체 구명

장뇌삼 잎의 쓴맛 성분의 본체를 구명하기 위해 장뇌삼 잎차 분말을 75% 에탄올로 추출한 다음 감압 농축을 하여 일정량으로 물로 희석하였다. 이 추출물을 Sepabeads SP-850 이온 교환 수지가 충전된 칼럼과 Sephadex LH-20 칼럼 및 HPLC를 이용하여 쓴맛 성분을 분리코자 하였다.

### 3) 민트, 코코아 및 스테비오사이드를 베이스로 한 음료가공

장뇌삼 추출물을 첨가한 음료인 경우 쓴맛 성분이 대단히 높아 선정된 패널들

의 기호도가 매우 낮게 측정되었다, 따라서 음료의 쓴맛성분을 줄이기 위한 방안으로 가능성 있는 여러 소재를 선정하였으며 특히 민트, 코코아 및 스테비오사이드가 장뇌삼 특유의 쓴맛을 감소시킬 수 있는 소재로 선정되어 이들 소재를 베이스로 한 음료가공을 실시하였다.

#### 4) 다양한 가공식품에의 활용기술 개발

실험에 사용된 장뇌삼 잎차는 ball mill을 사용하여 조제한 미세한 분말을 사용하였으며, 농축물은 75% 에탄올로 추출한 액을 60 brix로 농축하여 실험에 사용하였다. 장뇌삼 잎이 첨가된 가공식품의 형태로서는 장뇌삼 잎에서 발현되는 쓴맛이 기호적으로 바람직한 결과를 초래할 것으로 예상되던지 또는 과도한 쓴맛을 마스킹 또는 저감화하기에 용이할 것으로 예측된 양갱, 캔디, 껌, 과립차 등의 품목을 대상으로 적용하였고 각 품목의 제조방법을 상법에 따라 실시하였다. 제조한 시험제품의 색도는 Color Quest II (Hunter Lab, USA)를 사용하여 L(명도), a(적색도) 및 b(황색도) 값을 측정하였으며 관능검사는 10명의 훈련된 관능검사 요원을 대상으로 9점 소비자 기호 척도법으로 평가하였다.

### 3. 장뇌삼 잎의 생리기능적 특성 구명

#### 가. 방향성 성분의 분리 및 정성, 정량 분석

장뇌삼 및 재배삼 분말시료를 감압하의 증기증류와 dichloromethane을 용매로 한 액체-액체 연속추출법(DRP-LLE)으로 분리한 추출물의 방향성 성분을 GC/MS와 gas chromatography-flame ionization detector(GC-FID)를 사용하여 정성 및 정량 분석하였다. 즉 건조분말시료에 증류수를 3 L round-bottom flask에 넣고, 감압(55°C, 95 mmHg)하에서 증기증류한 액은 액체-액체 연속추출기를 사용하여 dichloromethane으로 6시간동안 추출하였고, 추출 후 sodium sulfate로 용매에 남아있는 물을 제거한 후 rotary flash evaporator(BUCHI, Switzerland)를 사용하여 약 1 mL로 농축하고 0.4 mL가 될 때까지 질소(N<sub>2</sub>)로 농축하였다.

DRP-LLE에서 얻어진 추출물의 각 성분은 mass spectrometry(MS)에 의해 정성분석하였다. 방향성 성분의 정량분석은 DRP-LLE에서 얻어진 추출물을 GC-FID를 사용하여 분석하였다. 각 실험은 독립적으로 2번 반복하였고, 용매의

detector 반응은 0.2-1  $\mu\text{L}$ 를 주입하여  $R^2$ 값이 0.99인 선형범위에서 측정하였다.

항기성분의 정성 및 정량 분석에 사용된 기기 및 조건은 다음과 같다. 방향성 성분의 정성 분석은 mass selective detector (HP 5973)와  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$  DB-WAX bonded-phase fused-silica capillary column(J&W Scientific, Folsom, CA)이 장착된 Hewlett-Packard(HP) model 6890 gas chromatograph(GC)을 이용하였다. 이때 MS ionization voltage는 70 eV, He의 선형속도는 44 cm/s, injector와 detector 온도는 각각 250 $^{\circ}\text{C}$  및 280 $^{\circ}\text{C}$ 이었고, 추출물은 splitless mode로 주입하였다. Oven 온도는 50-200  $^{\circ}\text{C}$ 로 3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 rate를 주고 holding time은 10분으로 하였다. 방향성 성분의 정량분석을 위해서  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$  DB-WAX bonded-phase fused-silica capillary column(J&W Scientific, Folsom, CA)과 FID가 장착된 HP model 5890 GC를 이용하였다. 이때 injector와 detector의 온도는 각각 200 $^{\circ}\text{C}$  및 250 $^{\circ}\text{C}$ 이었고 He의 선형속도는 41.3 cm/s, split ratio는 0.741:1이었다.

## 나. 생리 기능적 특성 검토

### 1) 시료의 조제

방향성물질에 의한 종양세포 성장저해 효과 등의 생리기능적 특성조사를 위한 시료는 항기성분의 정성 및 정량을 위한 시료 제조방법과 동일하게 제조한 다음 아래와 같이 농도를 산출하여 종양세포 성장저해 효과, 발암원 대사관련 효소활성 조사 및 유영시험에 사용하였다.

$$\text{농도(ppm)} = [\text{추출건고물의 중량} \times \text{GC 피크면적 } \% / 100(\mu\text{g})] \div \text{건조시료의 중량}$$

한편, 항암제 부작용 억제와 텍스트란설페이트(DSS) 유발 장염증 억제 효과를 살펴보기 위해서는 동결건조한 장뇌삼 잎과 잎차를 사용하였다.

### 2) 종양세포 성장저해 효과

종양세포 성장저해 효과를 측정하기 위해 본 시험에서 사용한 세포주(cell lines)는 다음과 같다. 즉 HepG2(hepatoma, human), SNU-1(stomach; adenocarcinoma, human), A549(lung; carcinoma, human), HT-29(colon; adenocarcinoma, human)를 ATCC와 한국 세포주 은행(KCLB, 서울)으로부터 분

양 받아 사용하였다. 각 시료가 종양세포의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 전술한 시료 20  $\mu\text{L}$ 와 세포배양에서 얻은 trypsin 처리 또는 하지 않은 single cell suspension( $2 \times 10^5$  cells/mL)을 96-well에 함께 넣어 4일간 37°C를 유지하면서 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 4일 후 MTT 시약 50  $\mu\text{L}$ 를 넣고 다시 4시간 동안 반응시켰다. 이것을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거하고, DMSO 150  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 용해시킨 후, 540 nm에서의 흡광도를 ELISA reader로 측정하였다.

### 3) 발암원 대사 및 종양세포의 항증식 관련 효소활성 조사

#### 가) Ethoxyresorufin-*O*-deethylase(EROD) 활성

EROD 활성은 전 등의 방법(2001)에 의해 측정하였다. 즉, 세포를 24 well plate에서 배양하면서 80%정도 증식하였을 때 24시간 동안 시료를 처리하고, 다시 24시간 동안 4  $\mu\text{M}$  B[a]P와 시료를 처리하였다. 단세포층으로 증식한 HepG2 세포를 hanks balanced salt solution (HBSS)으로 2회 세척하여 잔존하는 B[a]P와 시료를 제거한 후 3  $\mu\text{M}$  ER과 10 mM decumarol을 함유하는 HBSS를 첨가하여 37°C에서 배양하였다. 15분간 반응시킨 후 동량의 10 mM NaOH를 첨가하여 pH를 7.8 이상으로 유지시킨 다음 excitation length 530 nm 와 emission length 585 nm에서 형광강도를 측정하였다. EROD 활성은 반응물인 resorufin 표준곡선에 의거하여 농도를 계산한 다음 단백질 농도로 보정하여 nmol resorufin/min/mg protein으로 표시하였다. 세포의 단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 사용하여 BCA 법으로 정량하였다.

#### 나) Quinone reductase(QR) 활성

QR 활성의 측정은 Prochaska와 Santamaria의 방법에 의해 실시하였다. 즉, 인체 간세포 모델로 사용한 HepG2 세포에 각 시료를 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 0.8% digitonin과 2 mM EDTA(pH 7.8)를 함유하는 lysis 용액을 넣고 plate를 25°C에서 10분간 교반하였다. 그런 다음 반응액(25 mM Tris · HCl(pH 7.4), 0.67 mg/mL BSA, 0.01% Tween-20, 5 $\mu\text{M}$  FAD, 30 $\mu\text{M}$  NADP, 1 mM glucose-6-phosphate, 2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 0.3 mg/mL MTT)과 50 mM menadione을 1000:1의 비율로 섞은 용액을 각 well에 첨가하였다. 5분 후에 0.3 mM dicoumarol과 5 mM potassium phosphate(pH 7.4) 용액을

첨가하여 반응을 중지시킨 다음 610 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료에 의한 세포독성을 측정하기 위하여 QR활성 측정과 동일하게 각 시료를 첨가하여 48시간 동안 배양한 plate에 0.2% crystal violet용액을 첨가하여 10분 동안 실온에 방치하였다. 그런 다음 증류수로 여액의 crystal violet용액을 세척하고 0.5% sodium dodecyl sulfate와 50% ethanol용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 ELISA reader로 610 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

#### 다) 유영시험(swimming test)

유영시험은 중량 부하 강제 수영시험(weight-loaded forced swimming test)에 의해 실시하였다. 즉, ICR계 웅성 마우스를 군당 11마리씩 3개 군으로 나누고 각 검체를 1일 1회 10일간 경구투여 하였다(100 mg/kg). 최종 투여 24시간 후에 수온 23±1°C의 원형 수조에 체중의 8%에 해당하는(예비시험에 의해 결정) 추를 매단 다음 마우스를 투여군 별로 1마리씩 넣고 강제 유영시켰다. 그런 다음 마우스가 저항 없이 머리만 수면위로 내밀고 물에 떠 있는 부동시간(duration of immobility)과 실험동물이 완전히 피로하여 물에 빠져 10초간 수면위로 떠오르지 않을 때까지 소요된 유영시간(swimming time)을 측정하였다

#### 라) 항암제 부작용억제 동물실험

##### ① 실험 디자인

6주령 된 C57BL/6 마우스 수컷을 대한바이오링크로부터 구입하고 1주일동안 동물사육실 환경에 순응시킨 후 장뇌삼 잎 및 잎차의 항암제 부작용 억제 효능 실험에 사용하였다. 총 60마리의 마우스를 각 10 마리씩 체중에 따른 난괴법으로 분류하여 폴리카보네이트 케이지에 2마리씩 넣은 후 실험기간 동안 22±1°C, 12시간 낮/밤 주기의 환경에서 사육하였고, 고형사료와 음수는 자유롭게 먹도록 하였다. 실험군의 분류는 다음과 같다: 1) 항암제 및 시료를 모두 투여하지 않은 정상 대조군; 2) 5-Fluorouracil(5-FU) 투여군; 3) 장뇌삼 생잎 100 mg/kg 투여군; 4) 장뇌삼 생잎 300 mg/kg 투여군; 5) 장뇌삼 잎차 100 mg/kg 투여군; 6) 장뇌삼 잎차 300 mg/kg 투여군. 실험에 사용된 장뇌삼 잎 및 잎차 시료는 CMC 용액에 골고루 분산시킨 후 homogenizer로 균질화시켜 1일 1회 총 10일 동안 경구투여 하였다. 5-FU는 사용직전에 식염수에 녹여 실험 시작 후 6일째 되는 날에 5-FU를 200 mg/kg 농도로 복강으로 주사하였다. 실험 시작 11일 째 되는 날 마우스

의 체중을 측정하고 혈액분석에 사용될 혈액은 안와채혈을 통해 채혈하여 EDTA가 담긴 tube에 보관하여 혈액응고를 방지하였다. 혈액을 채취한 후 개봉하여 간, 비장, 소장 및 대장의 무게를 측정하였고 골수 조직 관찰을 위해 대퇴부를 적출하여 근육 등을 제거하고 대퇴골을 분리하였다.

## ② 혈중 혈구 분석

채취한 혈액내의 혈소판수, 적혈구수, 헤모글로빈, 백혈구수, 림프구, 단핵구, 과립구, 호산구, 호염구 등의 혈액 지표를 측정하였다. 혈액지표의 측정은 ADVIA 1650 Hematology System(Bayer, USA)을 이용하였다.

## ③ 골수 내 혈구 관찰

골수 조직 관찰을 위해 떼어낸 대퇴골은 10% formalin 고정액에 담가 2-3일간 고정시키고 고정된 골 조직은 염산을 주성분으로 한 Calci-clear Rapid(National Deiagnostics, UK) 용액에 12시간동안 담가두어 탈회시켰다. 탈회된 골 조직은 4  $\mu\text{m}$  두께로 파라핀 조직절편을 만들고 슬라이드 제작하였다. 조직절편은 Hematoxylin-Eosin(H&E)염색을 하고 광학현미경으로 관찰하여 유핵 세포를 관찰하였다.

## ④ 간의 제 1상계(phase I) 및 2상계(phase II) 효소 활성화

### ㉠ Cytosol 및 microsome의 분리

간조직의 3배 부피의 완충용액을 넣고 균질기로 분쇄한 후 10,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하여 침전물은 제거한 후 상정액을 다른 튜브로 옮겨 담고 다시 15,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상정액을 다시 100,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol과 microsome을 얻었다. 얻어진 microsome은 20% glycerol을 포함하는 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.8)에 용해시킨 후 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. Cytosol 및 microsome 분획의 단백질 함량은 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였고 표준물질로서 bovine serum albumin을 사용하였다.

### ㉡ Ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD) 활성화 측정

효소원으로서 간에서 분리한 microsome에 NADPH, glucose 6-phosphate,

glucose 6-phosphate dehydrogenase를 포함하는 phosphate buffer를 넣고 ethoxyresorufin을 15분간 37°C에서 반응시켰다. 동량의 methanol을 첨가하여 반응을 종료시킨 후 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 형광강도를 측정하였다. EROD 활성은 반응물인 resorufin 표준곡선에 의거하여 농도를 계산한 다음 단백질 농도로 보정하여 pmol/mg microsomal protein/min으로 나타내었다.

#### ㉔ Glutathione S-transferase (GST) 활성측정

실험동물의 간에서 분리한 cytosol을 효소원으로 이용하고 기질로서 GSH와 CDNB를 이용한 Habig 법에 따라 측정하였다. GST의 활성은 340nm에서 3분 동안의 흡광도 차이로부터 환산하여 BSA를 기준으로 측정한 단백질 함량으로 보정하여 산출하고  $\mu\text{mol/mg cytosolic protein/min}$ 으로 나타내었다.

#### 마) 장염증 억제 동물 실험

##### ① 실험디자인

7주령 된 Balb/c 마우스 수컷을 대한바이오링크로부터 구입하고 1주일동안 환경에 순응시킨 후 장뇌삼 잎 및 잎차의 장 염증 억제 효능 실험에 사용하였다. 총 32마리의 마우스를 각 8 마리씩 체중에 따른 난괴법으로 분류하여 폴리카보네이트 케이지에 2마리씩 넣은 후 실험기간 동안  $22\pm 1^\circ\text{C}$ , 12시간 낮/밤 주기의 환경에서 사육하였고, 고형사료와 음수는 자유롭게 먹도록 하였다. 실험군의 분류는 대조군(n=8, Con), DSS 단독 투여군(n=8, DSS), DSS+장뇌삼 잎 300 mg/kg 투여군(n=8, DSS+F) 및 DSS+장뇌삼 잎차 300 mg/kg 투여군(n=8, DSS+T)의 4군으로 나누고 매일 체중, 식이 섭취량, 음수섭취량 및 변의 형태를 관찰하였으며, 7일에 희생하여 대장 무게, 대장 길이, TNF- $\alpha$ , IL-6와 같은 장 염증 지표들을 측정하였다.

##### ② TNF- $\alpha$ 측정법

마우스에서 얻은 혈액의 혈청 내 TNF- $\alpha$  함량은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법을 이용하여 측정하였다. 즉, anti-mouse TNF- $\alpha$  단일클론 항체가 코팅된 microtiter plate에 100  $\mu\text{L}$ 의 표준 TNF- $\alpha$ , 또는 완충액과 1:1로 혼합한 100  $\mu\text{L}$  혈청을 주입하고 여기에 50  $\mu\text{L}$ 의 biotin-labeled anti-mouse TNF- $\alpha$ 를 첨가한 후 실온에서 90분 동안 배양하였다. 배양한 plate를

세척용 완충액으로 4회 세척한 다음, 100  $\mu$ L streptavidin-conjugated peroxidase를 첨가하여 실온에서 30분 동안 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 4회 세척한 다음, 여기에 100  $\mu$ L의 기질(tetramethylbenzidine)을 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 100  $\mu$ L의 반응정지액을 첨가한 후 microtiter plate reader(Molecular Device, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 TNF- $\alpha$ 로부터 작성한 표준곡선으로부터 TNF- $\alpha$  함량을 계산하였다.

### ③ IL-6 측정법

마우스에서 얻은 혈액의 혈청 내 IL-6 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법을 이용하여 측정하였다. 즉, anti-mouse IL-6 단일클론 항체가 코팅된 microtiter plate에 100  $\mu$ L의 표준 IL-6, 또는 완충액과 1:1로 혼합한 100  $\mu$ L 혈청을 주입하여 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 4회 세척한 다음, 여기에 100  $\mu$ L의 biotin-labeled anti-mouse IL-6를 첨가하여 실온에서 30분 동안 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 4회 세척한 다음, 100  $\mu$ L streptavidin-conjugated peroxidase를 첨가하여 실온에서 30분 동안 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 4회 세척한 다음, 여기에 100  $\mu$ L의 기질(tetramethylbenzidine)을 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 100  $\mu$ L의 반응정지액을 첨가한 후 microtiter plate reader(Molecular device, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 IL-6로부터 작성한 표준곡선으로부터 IL-6 함량을 계산하였다.

## 제 2 절 결과 및 고찰

### 1. 장뇌삼 잎의 식품학적 특성 구명

#### 가. 장뇌삼 및 재배삼 잎의 식품학적 특성 비교

Saito 등(1973)이 인삼 잎의 조사포닌 분획물에서 중추신경억제작용, 혈압강화 작용 등이 있다고 보고한 이래 인삼 잎에도 관심을 갖기 시작하였으며, Tanaka 등(1966)이 잎 사포닌 분획에서 진정 aglycone의 존재를 확인, 보고하자 사포닌 연구에 활기를 띠기 시작하였고, 이 후 조사포닌 분획에서 6종의 사포닌 성분을 확인 하였다. 그리고, 인삼 잎에는 뿌리 사포닌에 비하여 panaxatriol(Re, Rf, Rg<sub>1</sub>)계 사포닌이 많이 함유되어 있어 panaxadiol(Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd)과 panaxatriol의 비는 0.54-0.75 수준으로 보고되어 있다(Li 등, 1996). 인삼 잎에는 뿌리에 비하여 사포닌 함량이 높지만, 지금까지 총 사포닌의 구성비율이 양적비율 보다는 질적비율에 의의를 두고 있는 실정이어서 뿌리에 비하여 무시되어 왔다. 그러나 최근 인삼의 항산화 물질이 사포닌 보다 페놀성 물질에 의한 것이라는 연구가 보고되면서 인삼 잎에 다량 함유되어 있는 페놀성 물질이 주목되고 있다. 수분함량이 9.98%인 건조인삼잎에는 조단백질이 14.96%, 조지방이 3.43%, 식이섬유가 9.41%, 총당이 21.5%를 차지하는데, 뿌리와 비교할 때 총당의 함량이 46% 수준으로 낮은 반면, 에탄올과 메탄올 및 유기용매의 추출수율은 높은 결과를 나타내고 있다(김 등, 1987).

인삼 뿌리는 그 효과의 우수성에도 불구하고 파종 후 수확까지 최소 4-6년이 소요되는 단점을 가지고 있으나, 인삼 잎의 경우 매년마다 수확이 가능하다는 장점을 갖고 있으며 폐자원의 활용이라는 이점을 소유하고 있다. 그러나 재배삼 잎인 경우는 농약 살포 문제와 소비자의 외면에 의해 대부분 폐기되고 있는 실정인 반면 장뇌삼인 경우는 그 희소가치성 때문에 지금까지는 활용이 이루어진 바 없었으나 최근에는 장뇌삼의 대량 재배가 이루어지고 있다. 그러므로 산야에 그대로 방치하여 겨울철 낙엽으로 일생을 마감하게 되는데 뿌리에는 영향을 미치지 않는 8-9월경에 잎을 채취하여 인삼 뿌리에 상당하는 활성 혹은 새로운 활성을 찾아낼 경우 신자원 소재의 개발이라는 측면에서도 그 의의가 크다고 사료된다. 따라서 장뇌삼 잎의 독특한 향미 특성, 식품학적 특성, 생리적 기능 등을 조사하여 차류 등 가공 식품의 원료로 사용한다면 국내산 장뇌삼의 부가가치를 극

대화 시킬 수 있을 것이라고 생각된다.

본 연구에서는 장뇌삼 및 재배삼 잎을 채취 즉시 덩음 처리하여 효소를 불활성화 시킴과 동시에 증산작용을 막아 더 이상 인삼 잎의 품질저하를 방지하여 저장성을 높이고자 잎차의 형태로 가공 처리하였고 이를 대상으로 이들 시료간의 식품학적 특성을 상호 비교하였다

#### 1) 형태학적 특성

Fig. 6은 재배삼과 장뇌삼 잎의 실제 크기와 모양을 나타낸 것이다. 재배삼 잎이 장뇌삼 잎에 비해 월등히 큰 형태를 보여주고 있다. 즉 잎의 중량을 측정된 결과 장뇌삼 잎의 경우 개당 평균 250 mg 정도인데 비해 재배삼 잎의 경우에는 560 mg 정도로서 그 차이가 대단히 큰 것으로 나타났는데 이는 생육환경의 차이에 따른 결과로 생각된다. Fig. 7은 본 연구에 공시한 장뇌삼의 외형과 식재 현장을 보여주는 것으로 장뇌삼의 전형적인 붉은 과실이 잘 나타나 있는 사진이다. 본 시험에 사용한 생육기간이 12년 정도인 장뇌삼을 기준으로 할 때 장뇌삼의 뿌리, 줄기 및 잎이 차지하는 비율은 중량비로 각각 60%, 22% 및 18% 정도로 지상부인 잎과 줄기가 차지하는 비율은 40% 정도이었는데 이를 활용하지 않고 방치하는 것은 자원의 낭비인 것으로 사료된다.

#### 2) 일반성분

잎차의 형태로 조제한 시료의 일반성분을 비교 분석한 결과 재배삼 잎차의 수분, 조단백질, 조회분, 조지방 함량은 각각 8.11%, 14.26%, 7.95% 및 3.57%였고, 장뇌삼 잎차인 경우는 각각 7.06%, 14.30%, 7.24% 및 2.78%로 두 시료 간에 큰 차이는 없는 것으로 나타났다(Table 6).

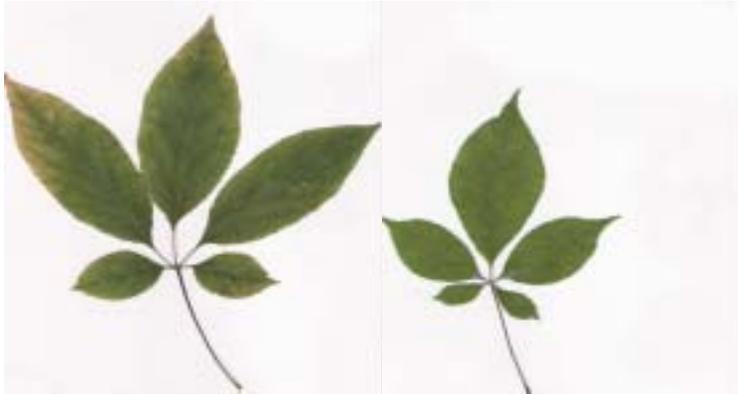


Fig. 6. Appearance of cultivated(left) and wild(right) ginseng leaves.



Fig. 7. Wild ginseng plants bearing typical clusters of red berries.

Table 6. Proximate composition in cultivated and wild ginseng leaves

Composition(g/100 g)	Cultivated	Wild
Moisture	8.11±0.05	7.06±0.05
Ash	7.95±0.02	7.24±0.03
Crude fat	3.57±0.02	2.78±0.04
Crude protein	14.25±0.12	14.30±0.08
Total carbohydrate	73.26±0.06	68.62±0.05

Values are means of triplicate determination ± standard deviation.

Carbohydrates were calculated by subtracting the total percent values of other measurements from 100.

### 3) 무기질

무기질로서 Mg, K, Ca, Fe, Na, P, Se, Ge 등의 함량을 ICP를 사용하여 분석하였다. Ca의 경우 재배삼 잎이 1,800 mg%정도로서 장뇌삼 잎의 1,000 mg%에 비해 높았으나 Fe와 K함량의 경우에는 장뇌삼 잎이 각각 88 mg% 및 1,732 mg% 정도로서 재배삼의 23 mg% 및 1,161 mg%에 비해 높은 것으로 나타났다 (Table 7). 그 밖의 무기질 성분에는 장뇌삼과 재배삼 사이의 큰 차이는 없는 것으로 나타났는데 이와 같은 결과는 재배지의 생육환경 즉 토양환경의 차이에 따른 결과로 사료된다. 한편 Pb, Cu, Cd 등의 중금속을 측정하여 장뇌삼, 재배삼 잎 모두 검출되지 않았고 Ge 역시 함유되지 않은 것으로 나타났다.

Table 7. Mineral contents in cultivated and wild ginseng leaves (mg/100 g, dry basis)

Composition	Cultivated	Wild
Mg	353.22± 6.38	364.40± 7.81
K	1161.27±17.36	1732.33±68.54
Ca	1807.92±24.61	1093.20± 6.89
Fe	23.46± 1.18	88.73± 0.91
Na	73.11± 5.23	80.28±11.67
P	173.18± 2.31	152.41± 0.92
Pb	0.09± 0.01	-
Cd	-	-
Cu	0.92± 0.06	0.83± 0.15
Ge	-	-
Total	3593.23±37.30	3512.19±71.44

Values are means of triplicate determination ± standard deviation.

#### 4) 유리아미노산

유리아미노산은 식품의 맛난 맛에 기여하는 아미노산으로서 장뇌삼 잎차 및 재배삼 잎차의 유리아미노산을 비교한 결과 (Table 8), 총 유리아미노산의 함량은 재배삼 잎차에서 1 mg%, 장뇌삼 잎차에서 3 mg% 정도로 그 함량이 낮기는 하지만 재배삼에 비해 장뇌삼 잎의 경우 그 함량이 높고 aspartic acid(43.6%)와 glutamic acid(23.6%)의 함량이 높은 것으로 나타났다. 유리아미노산은 환원당과 amino-carbonyl 반응을 일으켜 갈변색소를 생성하며, lysine, histidine, arginine 과 같은 아미노산들은 특히 반응성이 큰 물질로 알려져 있어 튀음처리 과정 중 비효소적 갈변반응에 크게 관여한 결과 이와 같은 아미노산류는 검출되지 않은 것으로 사료된다. 그러나 본 시험의 결과는 인삼잎차의 유리아미노산을 분석한 것으로 튀음처리의 정도에 따라 유리아미노산의 함량에는 큰 차이가 있을 것으로 생각된다. 인삼잎차에 잔존하는 유리아미노산의 함량을 조사한 본 시험의 결과 튀음처리한 인삼잎의 경우 잔존하는 유리아미노산은 함량이 낮아 맛에는 그 다지 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 8. The contents of free amino acids of the cultivated and wild ginseng leaf tea (mg%, dry basis)

Amino acids	Cultivated	Wild
Asp	0.19	1.57
Ser	0.05	0.25
Glu	0.11	0.85
Gly	0.06	0.05
His	0.00	0.00
Thr	0.00	0.21
Arg	0.00	0.00
Ala	0.05	0.21
Pro	0.12	0.08
Cys	0.25	0.18
Tyr	0.04	0.00
Val	0.02	0.10
Met	0.13	0.00
Lys	0.00	0.00
Ile	0.01	0.04
Leu	0.03	0.04
Phe	0.02	0.02
Total	1.08	3.60

Values are means of triplicate determination

##### 5) 유리당

장뇌삼과 재배삼 잎차의 유리당 조성을 HPLC로 조사한 결과는 Table 9와 같다. 장뇌삼, 재배삼 잎 모두 유리당으로서 glucose, fructose 및 sucrose로 구성되어 있고 총 유리당의 함량은 장뇌삼이 4,300 mg%, 재배삼이 5,556 mg%로서 재배삼 잎의 경우 더 높았다. 그러나 환원당인 glucose와 fructose의 경우에는 장뇌삼이 재배삼에 비해 2배정도 더 많았고 비환원당인 sucrose에서는 재배삼 잎이 4,550 mg%로서 장뇌삼의 2,082 mg%에 비해 더 높은 값을 나타내었다. 이와 같은 환원당, 비환원당의 함량은 인삼잎차의 맛뿐만 아니라 튀음처리에 의해 생성되는 2차 반응산물의 생성에도 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

Table 9. The contents of free sugars in ginseng leaf tea (mg%, dry basis)

Free sugar	Cultivated	Wild
Glucose	453.0±11.2	1,010.0±35.6
Fructose	442.5±19.5	1,212.5±42.2
Sucrose	4,660.5±69.1	2,082.5±31.2
Total	5,556.0±22.2	4,305.0±25.2

Values are means of triplicate determination ± standard deviation

#### 6) 유기산

HPLC를 사용하여 장뇌삼 및 재배삼 잎차에 함유된 유기산의 조성 및 함량을 조사한 결과는 Table 10 및 Fig. 8과 같다. 인삼 잎에 존재하는 유기산으로서는 oxalic, citric, malic, succinic acid가 검출되었고 장뇌삼인 경우는 특이적으로 oxalic acid의 함량이 높고, 재배삼인 경우는 succinic acid의 함량이 높게 나타났는데 이와 같은 유기산의 조성차이가 인삼잎차의 향미에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 보고된 바 없어 흥미로운 결과로 생각된다.

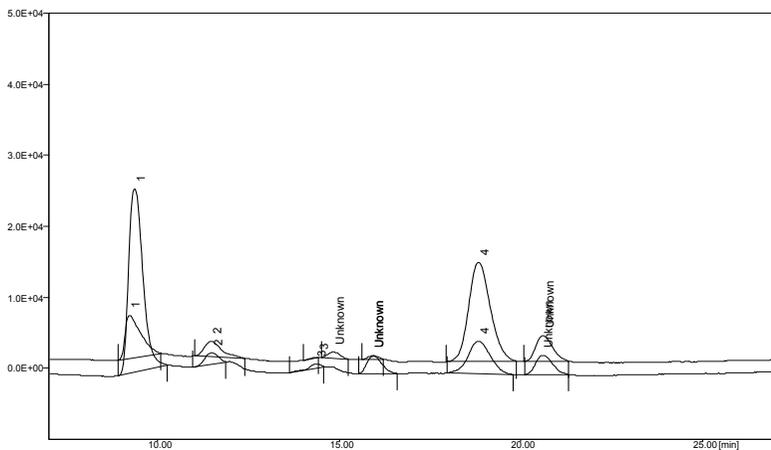


Fig. 8. HPLC chromatogram of organic acids from cultivated and wild ginseng leaf tea. Peaks: A. cultivated; B. wild. (1) oxalic acid; (2) citric acid; (3) malic acid; (4) succinic acid.

Table 10. The contents of organic acids in ginseng leaf tea (mg%, dry basis)

Organic acids	Cultivated	Wild
oxalic acid	5.2	20.1
citric acid	15.8	8.9
malic acid	1.8	4.5
succinic acid	308.5	103.7

Values are means of triplicate determination

### 7) 핵산관련물질

재배삼과 장뇌삼 잎으로부터 에탄올 추출물을 얻고 이로부터 ATP, ADP, AMP, IMP 및 hypoxanthine 등과 같은 핵산관련 물질의 조성 및 함량을 측정하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 장뇌삼 및 재배삼 잎 시료 모두에서 핵산관련 물질로 추정되는 성분을 확인하지는 못하였다. 따라서 인삼잎차 특유의 맛의 경우에는 핵산관련물질은 그다지 영향을 미치지 않으므로 장뇌삼 잎차 맛을 결정하는 중요한 인자는 아닌 것으로 사료된다.

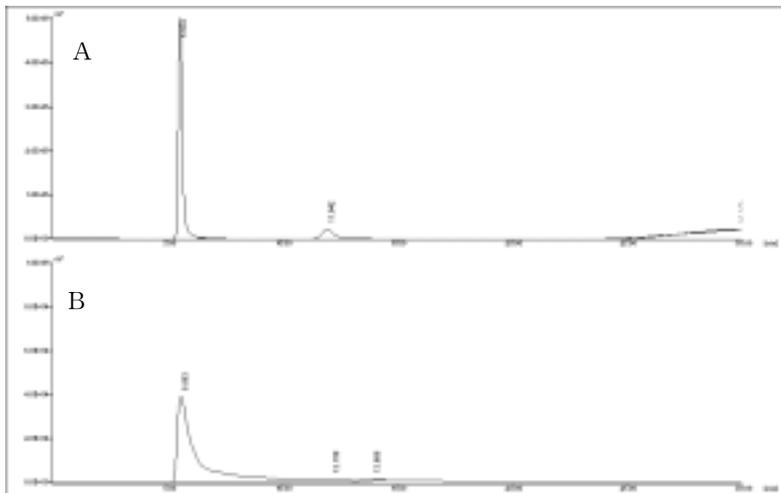


Fig. 9. HPLC chromatogram of nucleotide from cultivated and wild ginseng leaf tea. Peaks: A. cultivated; B. wild.

#### 8) 구성다당류의 분획 및 함량

장뇌삼 및 재배삼 잎의 세포벽을 구성하는 다당류의 조성 및 구성비를 Kaneko의 방법을 이용하여 측정된 결과는 Table 11과 같다. 조섬유, 헤미셀룰로오스 및 펙틴 등 모든 조사항목에 있어 장뇌삼과 재배삼 잎 사이에는 큰 차이를 발견할 수 없었다. 따라서 장뇌삼 및 재배삼 잎을 여러 형태의 가공제품으로 개발할 경우 출처에 따른 가공과정상의 문제는 크지 않을 것으로 사료된다.

Table 11. Polysaccharides of crude cell walls in wild ginseng leaf tea (% dry basis)

Polysaccharides	Cultivated	Wild
Crude fiber	35.78±1.98	35.72±0.72
Hemicellulose	7.21±0.35	7.68±0.34
Pectin	6.95±0.83	7.39±0.38

Values are means of triplicate determination ± standard deviation

#### 9) 사포닌의 조성 및 함량

##### 가) 부위별 조 사포닌의 조성 및 함량

장뇌삼 및 재배삼 잎차로부터 조 사포닌을 추출하고 감압건고시켜 얻은 조 사포닌의 중량을 측정된 결과는 Table 12와 같다. 참고로 장뇌삼 및 재배삼 뿌리의 부위별로 나누어 조 사포닌의 추출율을 함께 비교하였다. 장뇌삼 잎의 조 사포닌 함량은 약 17%로서 재배삼의 16.5%에 비해 높았으며 뿌리의 경우에도 뇌두를 포함한 모든 부위에서 장뇌삼은 재배삼에 비해 조 사포닌의 함량이 높은 것으로 나타났는데 특히 장뇌삼 뇌두의 조 사포닌 함량은 10.23%로서 재배삼의 6.78%에 비해 현저히 높은 값을 나타내었다. 일반적으로 인삼의 경우 잎이 뿌리에 비해 조 사포닌의 함량이 높은 것으로 알려져 있다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 장뇌삼 잎은 사포닌의 좋은 급원이 될 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 12. Yields of crude saponin from various parts of ginseng (g/100g, dry basis)

Parts	Cultivated	Wild
Leaf	16.57±0.24	17.08±0.09
Main root	6.72±0.04	7.57±0.11
Fine root	7.91±0.04	8.13±0.02
Rhizome	6.78±0.02	10.23±0.10

Values are means of triplicate determination ± standard deviation

한편 인삼의 부위별 조 사포닌의 TLC 패턴을 보면(Fig. 10), panaxatriol계인 Rg<sub>1</sub>은 잎이 뿌리에 비해 더 많이 함유되어 있으나 Rf는 확인되지 않았고, 뿌리부위에서 함량이 높은 Rb<sub>1</sub>은 상대적으로 잎에는 적게 함유되어 있는 것으로 나타났지만 Re와 Rd의 경우에는 특히 함량이 높은 것으로 나타났다. 한편 재배삼에 비해 장뇌삼 잎의 경우에는 재배삼에서는 나타나지 않는 비극성인 물질로 추정되는 발색 band를 보이기는 하였으나 재배삼과 장뇌삼 잎차의 TLC 패턴은 서로 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

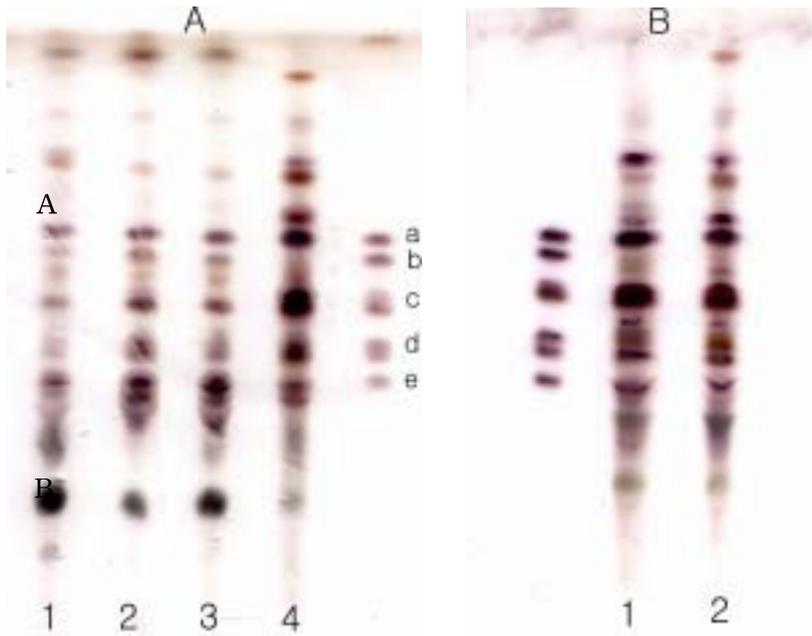


Fig. 10. TLC profiles of crude saponin extracts. A: various parts of wild ginseng, 1:main root, 2: fine root, 3: rhizome, 4: leaf tea. B: cultivated and wild ginseng leaf tea. 1: cultivated ginseng leaf tea, 2: wild ginseng leaf tea. a: Rg<sub>1</sub>, b: Rf, c: Re+Rd, d: Rc+Rb<sub>1</sub>, e: Rb<sub>2</sub>. The concentration of all sample was adjusted to 10 µg.

#### 나) 조 사포닌의 HPLC 분석

장뇌삼과 재배삼을 부위별로 구분하고 각 부위별로 얻은 조사포닌 획분을 HPLC로 분리한 결과는 Fig. 11 및 Table 13과 같다. 총 사포닌 함량의 경우 장뇌삼은 대부분의 부위에서 재배삼에 비해 더 높은 값은 나타내었고 Rf값에 따라 Rg, Re, Rf, Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>e</sub>, Rd 등의 사포닌이 분리되었다. 한편 Rb<sub>1</sub>+Rb<sub>2</sub>+Rc+Rd 을 나타내는 PD(panaxadiol ginsenoside)와 Re+Rf+Rg<sub>1</sub>을 나타내는 PT (panaxatriol ginsenoside)의 비율을 비교한 결과 장뇌삼 잎은 재배삼 잎에 비해 PD/PT의 값이 더 높은 것으로 나타났는데 이는 대단히 흥미로운 결과로 생각된다.

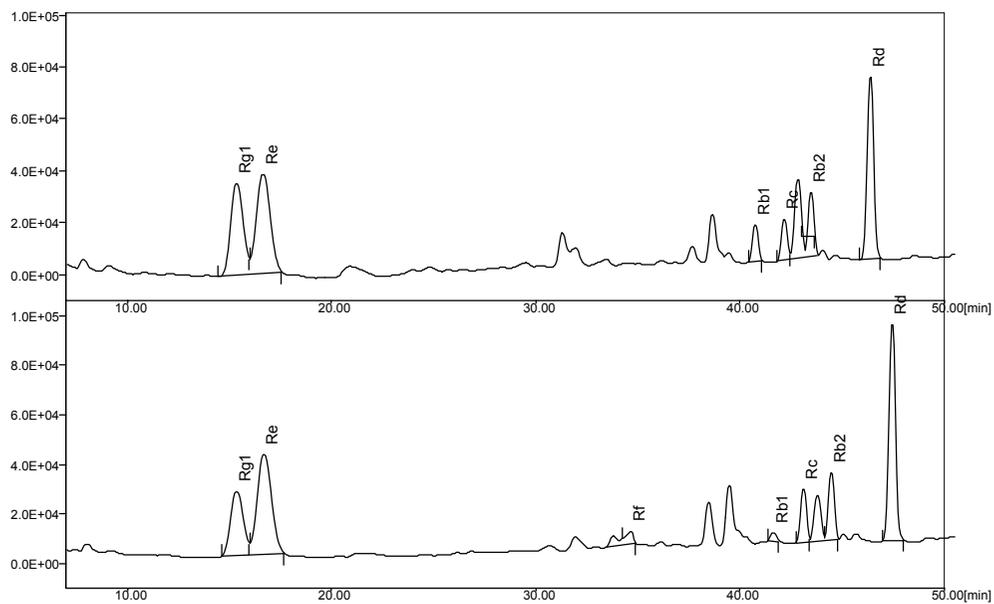


Fig. 11. HPLC chromatogram of the saponin in ginseng leaf tea. A. cultivated; B. wild.

Table 13. Contents of ginsenosides from various parts of ginseng (% on dry basis)

	Cultivated				Wild			
	Main root	Fine root	Rhizome	Leaf	Main root	Fine root	Rhizome	Leaf
Rg <sub>1</sub>	0.22	0.36	0.17	1.21	0.26	0.30	0.49	0.92
Re	0.05	0.47	0.67	1.56	0.08	0.48	0.70	1.79
Rf	0.03	0.08	0.06	-	0.04	0.11	0.11	0.05
Rb <sub>1</sub>	0.17	0.99	0.11	0.24	0.27	0.88	0.68	0.06
Rc	0.05	0.58	0.07	0.24	0.12	0.55	0.31	0.38
Rb <sub>2</sub>	0.05	0.53	0.16	0.42	0.10	0.31	0.26	0.52
Rd	0.01	0.09	0.19	1.54	0.02	0.19	0.01	1.99
Total	0.57	3.10	1.43	5.21	0.89	2.82	2.56	5.71
Ratio (PD/PT)	1.09	2.41	1.77	0.87	1.34	2.16	1.03	1.07

PD(Panaxadiol ginsenoside): Rb<sub>1</sub>+Rb<sub>2</sub>+Rc+Rd

PT(Panaxatriol ginsenoside): Re+Rf+Rg<sub>1</sub>

Values are means of triplicate determination

#### 10) 폴리페놀화합물의 특성

##### 가) 형태별 페놀성물질의 함량

재배삼과 장뇌삼 잎차에서 페놀성물질을 추출하고 free phenolic acid(FPA), soluble phenolic acid esters(SPA) 및 insoluble-bound phenolic acid(IPA) 등 각 형태별 페놀성물질의 함량을 chlorogenic acid를 표준물질로 하여 조사한 결과는 Table 14와 같다.

총 페놀성물질의 함량은 재배삼이 406.5 mg%, 장뇌삼이 734.75 mg%로 장뇌삼 잎차가 약 1.8배의 높은 함량을 나타내었다. 한편 각 형태별로 보면 재배삼 잎차인 경우는 FPA가 241.25 mg%로 가장 높았고, SPA와 IPA는 116.75 mg%, 48.50 mg%의 함량을 나타내었지만 장뇌삼 잎차인 경우는 SPA가 368.75 mg%로 가장 높았고 FPA, IPA가 각각 332.0 mg% 및 34.0 mg%로 나타나 재배삼 잎차와는 달리 SPA가 차지하는 함량이 높게 나타났는데 이는 특기할 만한 것이라

생각된다. 또한 각 형태별 분포비율을 보면(Table 15), 재배삼 잎차는 FPA, SPA 및 IPA가 59.35%, 28.72% 및 11.93%이었고, 장뇌삼 잎차는 45.18%, 50.19%, 4.63%를 나타내어 ester 상태인 SPA가 상대적으로 높은 함량을 나타내었다. 인삼뿌리의 경우 연령이 오래 될수록 그 내부에 포함된 ester 상태의 페놀성성분의 비율이 비례적으로 증가한다는 보고가 있다.

Table 14. Extraction yield and contents of each type of phenolic acids from the extracts of defatted ginseng leaf tea

PA <sup>a</sup> type	Cultivated		Wild	
	Yield (%)	Phenolic acids (mg%)	Yield (%)	Phenolic acids (mg%)
FPA <sup>b</sup>	3.55±0.02	241.25±15.25	4.10±0.05	332.00± 1.50
SPA <sup>c</sup>	3.58±0.01	116.75± 6.75	7.71±0.15	368.75±13.25
IPA <sup>d</sup>	1.48±0.01	48.50± 3.00	2.84±0.25	34.00± 1.00
Total	8.61±0.02	406.50±25.00	14.65±0.06	734.75±15.75

<sup>a</sup>PA: phenolic acid.

<sup>b</sup>FPA: free phenolic acid.

<sup>c</sup>SPA: soluble phenolic acid esters.

<sup>d</sup>IPA: insoluble-bound phenolic acid.

Values are means of triplicate determination ± standard deviation

Table 15. Percentage distribution of phenolics in ginseng leaf tea.

PA <sup>a</sup> type	Cultivated (%)	Wild (%)
FPA <sup>b</sup>	59.35±0.12	45.18±0.21
SPA <sup>c</sup>	28.72±0.23	50.19±0.34
IPA <sup>d</sup>	11.93±0.09	4.63±0.02
Total	100.00±0.04	100.00±0.13

<sup>a</sup>PA: phenolic acid.

<sup>b</sup>FPA: free phenolic acid.

<sup>c</sup>SPA: soluble phenolic acid esters.

<sup>d</sup>IPA: insoluble-bound phenolic acid.

Phenolic content as chlorogenic acid.

Values are means of triplicate determination ± standard deviation

#### 나) DPPH에 대한 전자공여능

재배삼과 장뇌삼 잎차에서 추출한 FPA, SPA 및 IPA 형태의 페놀성 물질의 항산화활성을 전자공여능을 측정하여 비교한 결과는 Table 16과 같다. 각 시료에서 추출한 3가지 형태의 페놀성 물질을 각각 100 µg/mL씩 DPPH용액에 첨가한 후 전자공여능을 측정하여 항산화활성을 비교하였을 경우 장뇌삼이 재배삼에 비해 모든 형태의 페놀성 물질에서 높은 활성을 나타내었지만 특히 FPA가 90.90%로 가장 높은 활성을 보였다.

Table 16. DPPH radical scavenging activity of phenolic acids in ginseng leaf tea

PA <sup>a</sup> type	Cultivated	Wild
	100 µg/mL	100 µg/mL
FPA <sup>b</sup>	83.21	90.90
SPA <sup>c</sup>	45.54	59.31
IPA <sup>d</sup>	67.86	83.37

<sup>a</sup>PA: phenolic acid.

<sup>b</sup>FPA: free phenolic acid.

<sup>c</sup>SPA: soluble phenolic acid esters.

<sup>d</sup>IPA: insoluble-bound phenolic acid.

All values are dry basis. Values are means of triplicate determination

#### 다) 유리상태의 페놀성물질

8종류의 페놀성물질, 즉 protocatechuic acid, vanilic acid, p-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid들에 대해서 재배삼과 장뇌삼 잎차를 비교한 결과는 Fig. 12 및 Table 17과 같다. 재배삼 및 장뇌삼 잎에 함유된 총 FPA의 함량은 각각 49.42 mg% 및 206.83 mg%로서 장뇌삼이 재배삼에 비해 4배 이상 높은 값을 나타내었는데 이는 장뇌삼의 항산화활성이 재배삼에 비해 더욱 높게 나타난 앞서의 결과와 관련이 있는 것으로 추정된다. 따라서 장뇌삼 잎은 향후 여러 가지 형태의 가공식품용 중간소재로서 바람직한 소재가 될 수 있을 것으로 사료되며 이와 같은 차이점들이 장뇌삼 잎이 재배삼 잎과의 차별화를 도모할 수 있는 기초적인 결과의 하나인 것이라 생각된다.

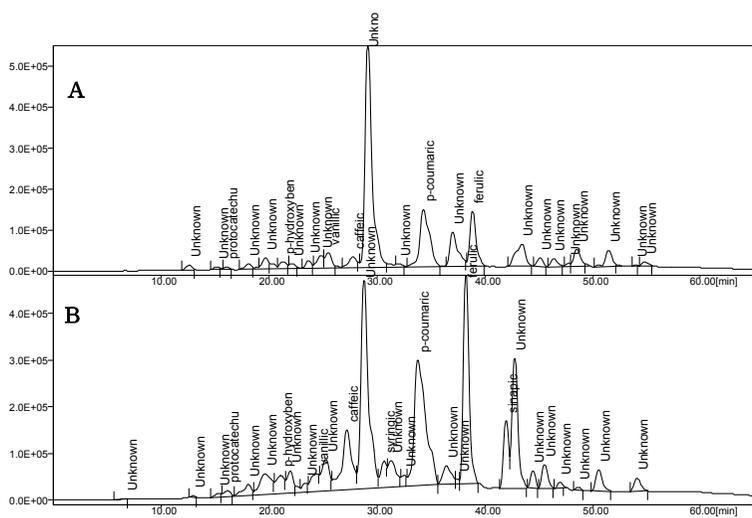


Fig. 12. HPLC chromatogram of free phenolic acids in ginseng leaf tea. A. cultivated; B. wild.

Table 17. Contents of free phenolic acids in ginseng leaf tea

Phenolic compounds	Cultivated	Wild
	mg%	mg%
Protocatechuic acid	1.01±0.02	3.31±0.01
p-Hydroxybenzoic acid	8.63±0.01	26.87±0.04
Vanillic acid	6.33±0.01	10.01±0.03
Caffeic acid	3.60±0.01	23.87±0.02
Syringic acid	–	6.32±0.01
p-Coumaric acid	15.40±0.03	41.04±0.04
Ferulic acid	14.45±0.01	49.18±0.01
Sinapic acid	–	46.23±0.05
Total	49.42±0.01	206.83±0.04

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

라) 가용성 에스테르(SPA) 상태의 페놀성물질

Table 18은 장뇌삼 및 재배삼 잎에 존재하는 SPA상태의 페놀성물질들로서 caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid로 구성되어 있음을 보여주고 있다. 본 결과에서도 특히 장뇌삼 잎(136.86 mg%)은 재배삼 잎(64.14 mg%)보다 2배 이상 높은 함량을 함유하고 있어 다시 한번 장뇌삼과 재배삼 잎 사이의 차별화를 나타내는 좋은 결과로 생각된다.

Table 18. Contents of soluble phenolic acid esters in ginseng leaf tea

Phenolic compounds	Cultivated (mg%)	Wild (mg%)
Caffeic acid	37.41±1.20	87.64±4.87
p-Coumaric acid	15.31±2.35	30.64±1.35
Ferulic acid	11.42±1.23	18.58±1.56
Total	64.14±2.21	136.86±2.12

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

마) 불용성 결합상태의 페놀성물질

장뇌삼과 재배삼 잎차에 함유된 불용성 결합상태의 페놀성물질 역시 caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid로 구성되어 있으며 그 결과는 Table 19에 나타내었다. 불용성 결합상태의 페놀성물질의 경우에는 유리상태 또는 가용성 에스테르상태의 페놀성물질과는 달리 재배삼 잎차의 것이 다소 높은 값을 나타내었고 특히 ferulic acid의 함량이 높았다.

Table 19. Contents of insoluble-bound phenolic acids in ginseng leaf tea(mg%)

Phenolic compounds	Cultivated	Wild
Caffeic acid	13.60±1.00	15.90±2.02
p-Coumaric acid	7.90±1.01	6.20±0.05
Ferulic acid	11.45±0.14	3.85±0.025
Total	32.95±1.00	25.95±1.10

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

## 나. 채취시기별 장뇌삼 잎의 식품학적 특성

장뇌삼은 재배삼보다 뇌두가 긴(장뇌) 특성을 가지고 있는데 산삼의 씨를 인위적으로 산림 속에 파종한 다음 더 이상의 인위적인 재배관리 없이 야생상태로 자라게 한 것으로 재배삼과는 달리 깊은 산속의 청정지역에서만 생육하고 있으므로 농약의 살포나 화학비료 등과 같은 약재로부터 오염될 우려가 없는 친환경적인 유기농산물이다. 지난 30년 동안 한국에서는 산림자원의 극대화 방안의 일환으로서 장뇌삼의 생산량이 크게 증대하게 되었다. 일반적으로 장뇌삼은 생육기간이 최소 10년 이상의 것을 채취하기 때문에 뿌리 당 25만 원선에 판매되고 있는 대단히 값비싼 천연소재의 하나이다. 그러나 장뇌삼의 지상부인 잎은 겨울이 되면 낙엽으로 떨어져 줄기와 함께 고사하게 되지만 그 이듬해 봄이 되면 다시 새잎이 돋아나게 된다. 따라서 이와 같은 장뇌삼 잎을 채취하더라도 뿌리에는 영향을 미치지 않는 8월 중순이후 즉, 낙엽으로 일생을 마감하기 전인 가을철에 채취하여 식품소재로 사용하는 것은 장뇌삼의 부가가치를 크게 높일 수 있는 좋은 방안의 하나로 생각된다. 한편 장뇌삼의 수확 시기는 일정치 않으나 일반적으로 잎이 성숙한 초여름에서 잎이 지기 직전인 가을동안 환경적 요인 및 소비자의 요구에 따라 장뇌삼 뿌리를 채취하고 있다.

따라서 장뇌삼 잎의 채취시기에 따른 이화학적 특성 및 생리활성을 조사함과 동시에 이들의 가공적성을 검토하는 것은 장뇌삼 잎의 부가가치 증대를 위해 필요한 것으로 생각된다. 따라서 채취시기별로 장뇌삼 잎을 채취한 후 바로 동결건조를 한 생잎과 덩음처리를 하여 잎차의 형태로 가공한 시료를 대상으로 이들의 식품학적 특성을 상호 비교하였다.

### 1) 일반성분

시기별로 채취한 장뇌삼 생잎과 이를 잎차의 형태로 조제한 시료의 일반성분을 비교분석한 결과 채취시기별 일반성분의 조성 간에 큰 차이는 없었으며 또한 잎차의 형태로 가공 처리한 연후에도 일반성분에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 20). 즉 장뇌삼 잎의 경우 잎의 생장이 완료되는 6월 이후에는 더 이상 일반성분의 함량에는 큰 차이가 없으므로 장뇌삼 잎은 낙엽이 되기 전인 8월 중순에서 9월 중순 사이에 채취하여 가공용 소재로 사용하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

Table 20. Proximate composition of wild ginseng leaf and its tea product at different collected times (g/100 g, w/w)

Collected time	Moisture	Ash	Crude protein	Crude fat	Total carbohydrate	
Fresh	17 Aug.	8.9±0.1	8.4±1.4	13.8±0.8	4.61±0.8	64.3±1.45
	5 Sep.	8.2±1.3	8.2±0.7	13.0±1.0	5.00±2.3	64.7±2.33
Tea	17 Aug.	8.4±0.3	8.1±0.1	13.3±1.4	4.77±0.7	65.4±0.35
	5 Sep.	8.4±0.5	8.4±0.1	13.3±2.0	4.76±0.4	65.2±0.02

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

## 2) 무기질

무기질로서 Mg, K, Ca, Fe, Na, P, Se, Ge 등의 함량을 ICP를 사용하여 분석하였다 (Table 21). 장뇌삼 잎의 경우 1차 채취한 잎이 2차 채취한 잎에 비해 Mg, K, Ca, Fe의 함량이 다소 높게 측정된 반면 Na와 P의 경우에는 조금 증가하는 경향을 보인 반면 장뇌삼 잎을 잎차의 형태로 가공한 후의 무기질에 있어서는 Fe을 제외한 모든 무기성분이 가열처리에 의해 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 잎차의 볶음처리에 사용한 kettle에서 일부 Fe가 용출된 때문이 아닌가 생각된다. 한편 Pb, Cu, Cd 등의 중금속을 측정된 결과 이들 중금속은 모두 검출되지 않았고 Se, Ge 등의 미량성분도 조사하였으나 이들 무기성분 역시 검출되지 않았다.

Table 21. Mineral contents of wild ginseng leaf and its tea product at different collected times (mg/100g, dry basis)

Collected time	Mg	K	Ca	Fe	Na	
Fresh	17 Aug.	393.0±12.0	2319.4±11.0	1623.9±45.0	51.7±10.0	158.3±22.5
	5 Sep.	379.2±24.0	2123.4±10.2	1403.7±19.9	34.5±0.89	163.5±18.0
Tea	17 Aug.	378.9±12.0	2272.8±32.0	1337.3±42.2	31.4±0.21	165.1±21.2
	5 Sep.	364.4±11.2	1732.3±22.0	1093.2±22.7	88.7±1.09	152.4±16.1

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

### 3) 유리아미노산

유리아미노산은 식품의 맛난 맛에 관여하는 성분들로서 채취시기별 장뇌삼 잎과 이를 잎차로 가공한 경우의 유리아미노산을 비교한 결과는 Table 22와 같다. 가장 큰 특징은 총 유리아미노산의 함량은 생잎에서 잎차로 제조되는 동안 대부분 소실되었음을 확인 할 수 있었다. 장뇌삼 잎의 경우 2차시기에 채취한 잎(393.51 mg%)이 1차시기에 채취한 잎(357.77 mg%) 보다 다소 높은 함량을 나타내었다. 그러나 생잎은 덩름처리에 의해 유리아미노산 함량과 각 조성들이 대폭 감소하였다. 유리아미노산은 환원당과 amino-carbonyl 반응을 일으켜 갈변색소를 생성하며, lysine, histidine, arginine과 같은 아미노산들은 특히 반응성이 큰 물질로 알려져 있는데 이들 아미노산들은 덩름처리 과정 중 비효소적 갈변반응에 관여하여 2차적으로 차로서 바람직한 향미성분을 생성한 때문에 이와 같은 아미노산류는 검출되지 않은 것으로 사료된다. 본 시험의 결과 장뇌삼 잎을 덩름처리한 후에 잔존하는 유리아미노산은 그 함량이 낮아 잎차의 맛에는 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 22. Free amino acid contents of wild ginseng leaf and its tea product at different collected times (mg/100 g, dry basis)

Collected time	Fresh		Tea	
	17 Aug.	5 Sep.	17 Aug.	5 Sep.
Asp	24.25	24.33	1.57	0.98
Ser	34.02	48.66	0.25	0.27
Glu	31.32	32.08	0.85	0.80
Gly	7.60	4.46	0.05	0.04
His	12.30	9.79	-	-
Thr	50.28	31.83	0.21	0.18
Arg	2.20	4.21	-	-
Ala	85.31	107.78	0.21	0.20
Pro	9.58	12.92	0.08	0.09
Tyr	9.99	11.73	-	-
Val	26.27	36.27	0.10	0.15
Met	0.17	0.21	-	-
Lys	11.46	10.96	-	-
Ileu	16.08	19.23	0.04	0.08
Leu	22.04	20.30	0.04	0.05
Phe	14.83	18.75	0.02	0.05
Total	357.77	393.51	3.42	2.89

All values are dry basis. Values are means of duplicates.

#### 4) 유리당

장뇌삼 잎의 유리당은 glucose, fructose 및 sucrose로 구성되어 있었으며 비환원성당인 sucrose가 주종을 이루는 것으로 나타났다. 채취시기별 유리당 함량을 측정된 결과(Fig. 13과 Table 23), 장뇌삼 잎의 유리당 함량은 채취시기에 따라 다소 차이를 보였다. 즉 초기시료의 경우 총 유리당 함량은 6.36% 정도이었으나 이보다 채취시기가 다소 늦은 2차 시료의 경우 6.12%를 보여 채취시기가 늦어짐에 따라 장뇌삼 잎에 존재하는 유리형태의 당류는 다소 감소되는 것으로 나타났다

다. 한편 이들 유리당은 장뇌삼 잎을 덖음처리할 경우 초기함량의 77-85% 정도 잔존하는 것으로 나타났는데 이와 같은 유리당의 감소는 장뇌삼 잎에 함유된 유리아미노산 등의 아미노화합물과의 갈변반응에 의해 소실된 것이라 생각된다. 이와 같은 장뇌삼 잎에 존재하는 유리형태의 환원당, 비환원당의 함량감소는 인삼 잎의 덖음처리에 의해 생성되는 2차 반응산물의 생성에 큰 역할을 할 것으로 사료된다.

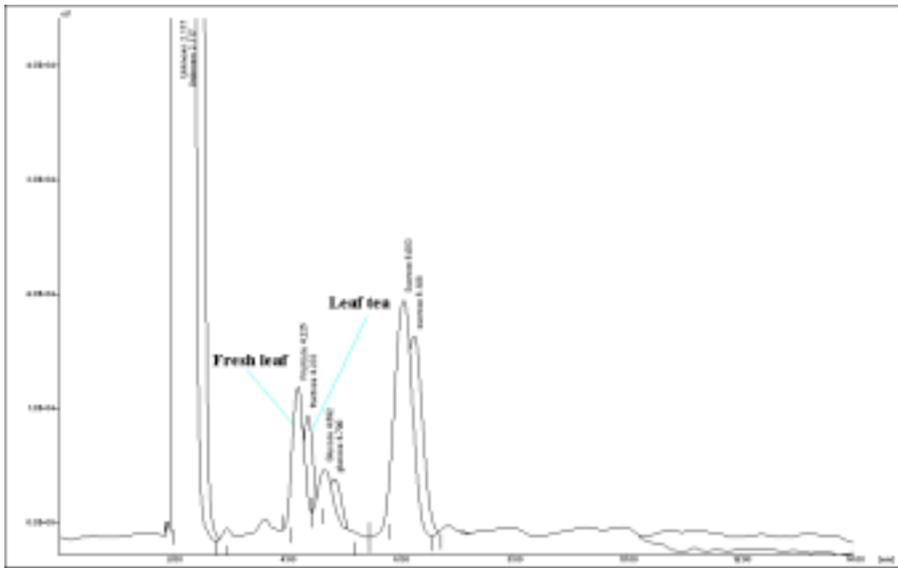


Fig 13. HPLC chromatogram of free sugars in wild ginseng leaf and its tea product.

Table 23. Free sugar contents of wild ginseng leaf and its tea product at different collected times (g/100 g, dry basis)

Collected time	Fructose	Glucose	Sucrose	Total	
Fresh	17 Aug.	1.57±0.08	1.01±0.21	3.77±0.10	6.36±0.07
	5 Sep.	1.58±0.10	1.09±0.92	3.44±0.16	6.12±0.08
Tea	17 Aug.	1.39±0.04	0.89±0.11	3.17±0.14	5.44±0.04
	5 Sep.	1.17±0.12	0.85±0.08	2.66±0.09	4.69±0.03

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

한편 DNS법과 페놀-황산법으로 환원당과 총당의 함량을 측정 한 결과(Table 24), 환원당의 경우에는HPLC에 의한 분리분석 결과와 큰 차이가 없었으며 총당의 경우에도 장뇌삼 인 경우는 6.66-6.76% 정도의 함량을 나타내어 HPLC에 의한 분리분석 결과와 유사한 경향이였다.

Table 24. Reducing and total sugar contents of wild ginseng leaf and its tea product at different collected times (mg/100 g, dry basis)

Collected time		Reducing sugar	Total sugar
Fresh	17 Aug.	2.70±0.05	6.66±0.25
	5 Sep.	2.98±0.03	6.76±0.03
Tea	17 Aug.	2.10±0.05	5.85±0.16
	5 Sep.	2.12±0.02	5.12±0.05

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

#### 5) 유기산

HPLC를 사용하여 채취시기별 장뇌삼 생잎과 잎차에 함유된 유기산의 조성 및 함량을 조사한 결과는 Fig. 14 및 Table 25와 같다. 장뇌삼 잎의 유기산으로서는 oxalic, citric, malic, succinic, fumaric acid가 검출되었고, 함량면에서는 malic acid가 가장 많이 함유되어 있으며 그 다음이 succinic acid와 citric acid이었으며 oxalic acid 와 fumaric acid는 그 함량이 2-3 mg% 정도로 대단히 낮은 값을 나타내었다. 한편 채취시기가 늦어짐에 따라 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 이들 유기산들은 유리당, 유리아미노산의 결과에서와 같이 장뇌삼 잎을 뒤음처리할 경우 감소하는 경향을 나타내었는데 장뇌삼 잎차의 경우 초기함량의 50% 정도 잔존하는 것으로 나타났는데 이와 같은 유기산의 감소 역시 장뇌삼 잎차의 향미에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

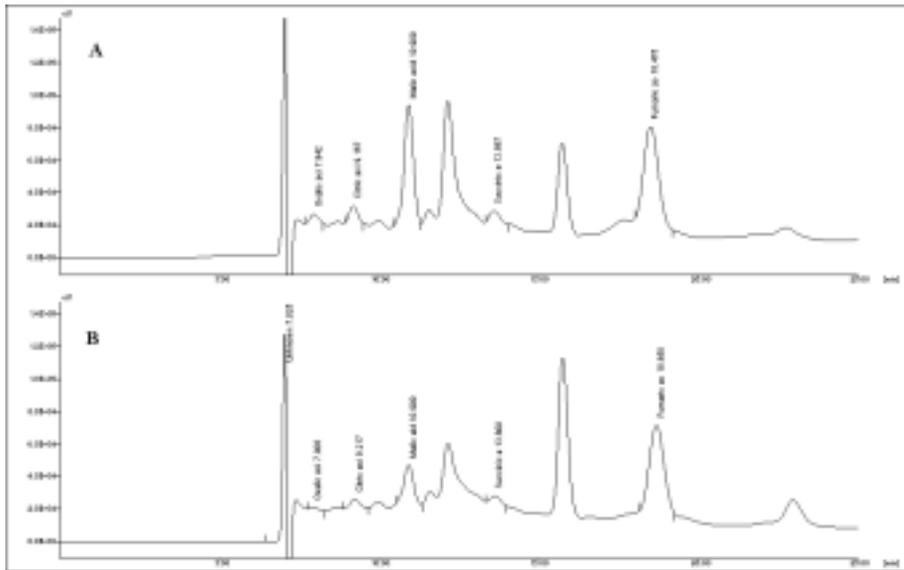


Fig. 14. HPLC chromatograms of organic acids from wild ginseng leaf and its tea product. A. fresh leaf; B. leaf tea.

Table 25. Organic acids contents of wild ginseng leaf and its tea products at different collected times (mg/100 g, dry basis)

Collected time	Organic acids						
	Oxalic	Citric	Malic	Succinic	Fumaric	Total	
Fresh	17 Aug.	3.21	65.56	331.08	121.69	1.76	523.30
	5 Sep.	3.30	30.98	274.58	48.61	2.08	359.55
Tea	17 Aug.	2.12	15.87	207.62	44.27	1.66	271.54
	5 Sep.	2.07	21.48	127.34	39.17	1.92	191.98

All values are dry basis. Values are means of triplicates.

한편 적정법으로 유기산의 함량을 측정된 결과 (Table 26), HPLC에 의한 분리 분석 결과보다 다소 높은 함량을 나타내었는데 이는 각 유기산의 적정계수가 각기 다를 뿐만 아니라 적정에 의한 유기산함량은 다른 공존하는 성분들에 의한 영향도 배제할 수 없기 때문에 나타난 결과로 사료된다.

Table 26. Titratable acidity of wild ginseng leaf and its tea product at different collected times (mg/100 g, dry basis)

Collected time	Fresh		Tea	
	17 Aug.	5 Sep.	17 Aug.	5 Sep.
Acidity	603.00±22.01	454.44±12.33	324.69±16.45	242.33±21.19

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

#### 6) 지방산

채취시기별 장뇌삼 생잎 및 이를 덫음처리하여 얻은 잎차의 지방산조성을 살펴본 결과는 Table 27과 같다. 장뇌삼 잎에 존재하는 불포화 지방산으로서는 linoleic acid, linolenic acid, oleic acid, palmitoleic acid 등과 포화지방산인 arachidic acid, palmitic acid, stearic acid, myristic acid 등으로 구성되어 있었고 채취시기에 따른 지방산조성의 변화양상은 거의 나타나지 않았으나 구성지방산 중 불포화지방산인 linoleic acid와 linolenic acid가 전체 지방산의 78% 이상을 차지하고 있는 점은 다른 연구자의 연구결과와 유사하였다.

Table 27. Fatty acid composition of wild ginseng leaf at different collected times

	Fresh		Tea	
	17 Aug.	5 Sep.	17 Aug.	5 Sep.
Lauric acid(C12)	0.33±0.06	0.30±0.08	0.57±0.06	0.46±0.09
Myristic acid(C14)	1.17±0.06	1.29±0.04	2.37±0.15	1.45±0.10
Palmitic acid(C16)	11.50±0.20	12.05±0.10	9.50±0.20	11.35±0.09
Palmitoleic acid(C16:1)	0.56±0.06	0.48±0.02	trace	trace
Stearic acid((C18)	1.97±0.12	2.02±0.04	2.27±0.12	2.09±0.12
Oleic acid(C18:1)	4.87±0.15	4.69±0.10	3.47±0.15	4.21±0.08
Linoleic acid(C18:2)	30.03±0.35	29.87±0.20	27.87±0.80	28.98±0.22
Linolenic acid(C18:3)	48.10±0.30	49.20±0.21	52.53±0.65	51.23±0.26
Arachidic acid(C20)	0.43±0.06	0.65±0.10	0.63±0.12	0.50±0.11
Behenic acid(C22)	0.47±0.06	0.56±0.07	0.70±0.10	0.67±0.02
Lignoceric acid(C24)	0.57±0.04	0.49±0.05	0.10±0.02	0.23±0.05

Values are means of triplicates ± standard deviation.

### 7) 구성다당류의 분획

장뇌삼 잎의 세포벽을 구성하는 다당류의 조성 및 구성비를 Kaneko의 방법 (1980)을 이용하여 측정된 결과는 Table 28과 같다. 조섬유, 헤미셀룰로오스 및 펙틴 등 모든 조사항목에 있어 채취시기에 따른 큰 차이는 나타나지 않았으나 장뇌삼 잎을 덩음처리하여 잎차로 가공한 경우 crude fiber는 증가한 반면 펙틴의 경우에는 다소 감소경향을 보였는데 이는 가열처리에 따른 펙틴의 가용화에 의한 결과로 사료된다. 따라서 장뇌삼 잎을 여러 형태의 가공제품으로 개발할 경우에도 채취시기에 따른 세포벽 구성성분에 의한 가공과정상의 문제는 그다지 발생하지 않을 것으로 사료된다.

Table 28. Fractionation of polysaccharides in wild ginseng leaf and its tea products at different collected times (g/100 g, dry basis)

Collected time	Polysaccharides				
	Crude fiber	Hemicellulose	Pectin	Total(AIS)	
Fresh	17 Aug.	30.2±0.2	7.9±0.2	13.1±1.1	51.2±0.5
	5 Sep.	30.7±1.3	7.8±0.8	12.3±0.9	50.9±0.4
Tea	17 Aug.	35.7±0.1	7.7±0.5	7.4±0.7	50.8±0.7
	5 Sep.	34.9±0.4	7.3±0.4	7.8±1.0	50.0±0.4

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

### 8) 사포닌의 특성조사

장뇌삼 잎을 시기별로 채취한 후 잎차로 제조한 시료로부터 사포닌을 추출하고 분석, 정량한 결과는 Fig 15와 Table 29와 같다. Table 29에서 보는 바와 같이 총 사포닌 함량의 경우 1차 채취 시료가 3.20 g/100g, 2차 채취 시료가 3.49 g/100g으로 채취시기에 따른 사포닌 함량에는 큰 차이가 없었으며 덩음처리를 하여 잎차로 가공한 후에도 총사포닌 함량은 2.80-3.07 mg/100g 정도를 나타내어 다소 감소를 보이기는 하지만 그 정도는 그다지 크지 않아 본 시험에서와 같은 덩음조건 하에서는 사포닌의 경우 손실면에서 큰 문제가 되지 않는 것으로 나타났다. 한편 인삼 잎의 특징은 panaxatriol계인 Rg<sub>1</sub>과 Re의 함량이 뿌리에 비해 더 많이 함유되어 있으나 Rb<sub>1</sub>은 상대적으로 적게 함유되어 있는 것으로 보고되었다(김 등, 1987).

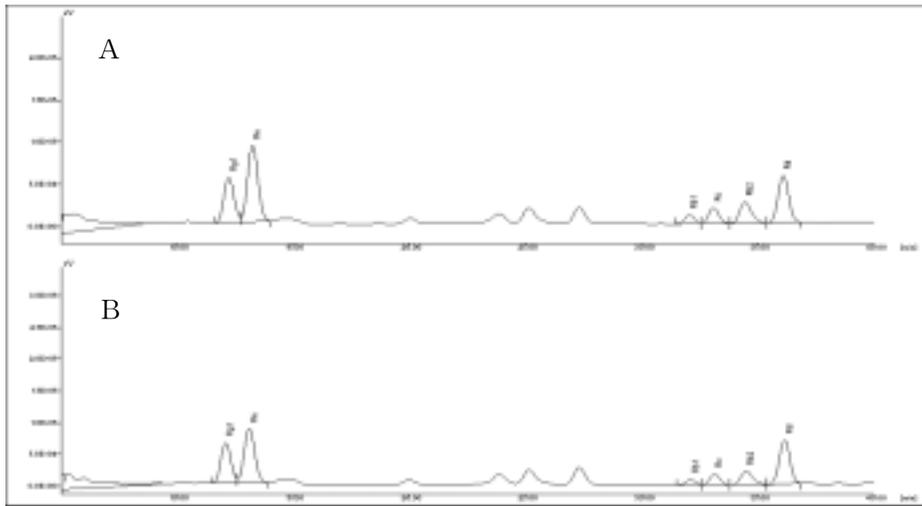


Fig. 15. HPLC chromatograms of ginsenosides in wild ginseng leaf and its tea product. A, fresh leaf; B, leaf tea.

Table 29. Ginsenosides in wild ginseng leaf and its tea products at different collected times (mg/100 g, dry basis)

Ginsenosides	Fresh		Tea	
	17 Aug.	5 Sep.	17 Aug.	5 Sep.
Rg <sub>1</sub>	2.44±0.02	2.75±0.05	2.26±0.07	2.46±0.03
Re	4.06±0.03	3.74±0.02	3.65±0.04	3.64±0.04
Rb <sub>1</sub>	0.10±0.01	0.18±0.02	0.09±0.02	0.11±0.02
Rc	0.72±0.02	0.59±0.02	0.59±0.04	0.56±0.08
Rb <sub>2</sub>	1.05±0.05	0.89±0.02	0.91±0.01	0.86±0.03
Total	3.20±0.03	3.49±0.02	2.80±0.03	3.07±0.06
PD/PT	11.69±0.02	11.61±0.02	10.34±0.03	10.71±0.04

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

### 9) 폴리페놀 화합물의 특성

#### 가) 총 페놀성물질 및 플라보노이드 함량

장뇌삼 잎에 함유된 총 페놀성물질과 플라보노이드 함량의 경우 채취시기에 따른 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다(Table 30). 다만 덩음처리에 의해 페놀성물

질과 플라보노이드 함량은 감소하는 경향을 나타내었으며 페놀성물질의 감소폭이 플라보노이드 보다 다소 높게 나타났다.

Table 30. Total phenolics and flavonoids contents in wild ginseng leaf and its tea product at different collected time (mg/100 g, dry basis)

Collected time	Fresh		Tea	
	17 Aug.	5 Sep.	17 Aug.	5 Sep.
Phenolics	856.6±22.1	617.0±23.3	834.3±45.4	612.2±21.1
Flavonoids	379.9±31.1	336.0±12.4	389.2±12.3	339.9±17.8

All values are dry basis. Values are means of triplicates ± standard deviation.

#### 나) 플라보노이드 물질의 분리

인삼 잎에는 flavonoid 중 flavonols이 다량 함유되어 있다고 보고된 바 있다 (Park 등, 1990). 따라서 인삼잎 추출물을 flavonols의 aglycon 형태로 가수분해한 다음 HPLC를 통해 분리 확인하였으며 그 함량을 채취시기별로 측정하였다. 채취시기에 따른 장뇌삼 생잎 및 잎차의 플라보노이드 물질의 분리분석 결과 (Fig. 16, Table 31), 모든 시료에서 kaempferol과 quercetin이 확인되었으며 특히 플라보노이드 중 kaempferol이 다량 함유되어 있는 것으로 나타났다. 반면 채취시기별 kaempferol과 quercetin의 함량차이는 없었으나 덩음처리에 의해서 두 성분이 소폭 감소하는 것으로 나타났다.

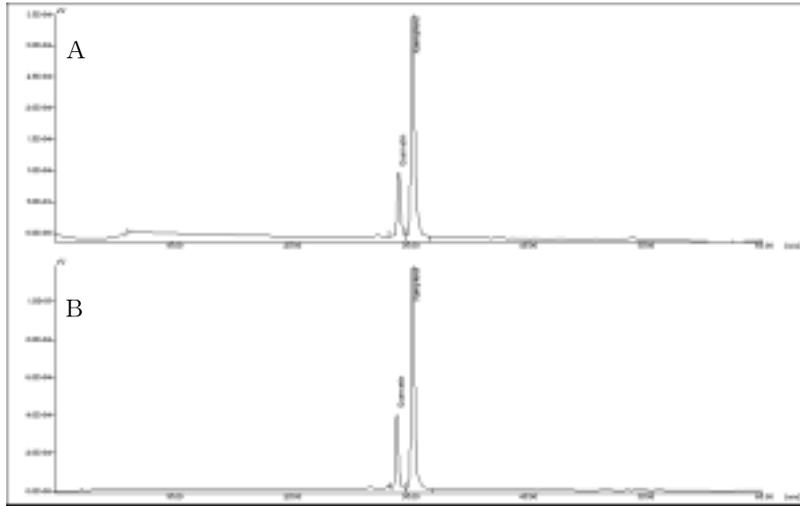


Fig. 16. HPLC chromatograms of flavonoids in wild ginseng leaf and its tea product. A, Fresh leaves; B, tea product.

Table 31. Flavonoid contents of two different kinds of ginseng leaf and its tea products at different collected times (mg/100 g, dry basis)

Collected time	Fresh		Tea	
	17 Aug.	5 Sep.	17 Aug.	5 Sep.
Quercetin	70.0±11.2	69.3±10.1	56.4±9.2	52.01±12.1
Kaempferol	202.7±21.0	199.2±14.2	178.2±7.8	176.09±19.5

All values are dry basis. Values are means of duplicates ± standard deviation.

#### 다) 형태별 페놀산의 함량

장뇌삼 생잎에서 페놀산을 추출하고 free phenolic acid(FPA) 및 soluble phenolic acid esters(SPA)의 형태별로 분리 정량을 실시하였다. 1차시기에 채취한 장뇌삼 잎의 총 페놀산물질의 함량은 9.41 mg%이었으며 각 형태별로 FPA가 5.22 g%, SPA가 4.19 g%로 나타났다(Table 32). 또한 각 형태별 분포비율을 보면, 장뇌삼 잎차는 55.47%, 44.53%를 나타내었는데 이는 재배삼에 비해 상대적으로 높은 함량임을 알 수 있다. 또한 채취시기별 장뇌삼 잎의 형태별 페놀산의 함량은 비슷한 결과를 나타냈으며 뒤음처리에 의해서는 다소 감소하는 경향을 나

타내었다.

Table 32. Contents of phenolic compounds extracted from wild ginseng leaf and its tea products at different collected times (mg/100 g, dry basis)

Type of phenolic acid	g gallic acid equivalents/100 g of leaves			
	Fresh		Tea	
	17 Aug.	5 Sep.	17 Aug.	5 Sep.
Soluble free(FPA)	5.2±0.2	5.13±0.1	4.32±0.5	4.20±0.2
Esterified(SPA)	4.19±0.1	4.01±0.3	3.69±0.1	3.54±0.2

All values are dry basis. Values are means of duplicates ± standard deviation.

라) 유리상태의 페놀산물질

Fig. 17은 표준품인 페놀산의 HPLC chromatogram을 나타낸 것이며, Fig. 18은 장뇌삼 잎에 함유된 유리 페놀산의 HPLC chromatogram을 나타낸 것이다. 9 종류의 페놀산, 즉 procatechuic acid, vanilic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, hydrocaffeic acid, syringic acid, caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid들에 대해서 장뇌삼 잎에 함유된 함량을 조사한 결과는 Table 33과 같다. 장뇌삼 잎에 함유된 총 FPA의 함량은 381.97 mg%이었고 페놀산으로 syringic acid와 sinapic acid가 높은 비율을 차지하는 것으로 나타났다. 덩음처리에 의해 유리상태의 페놀산 조성의 변화는 없었지만 각 함량들은 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 채취 시기별 각 페놀산의 조성 및 함량은 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

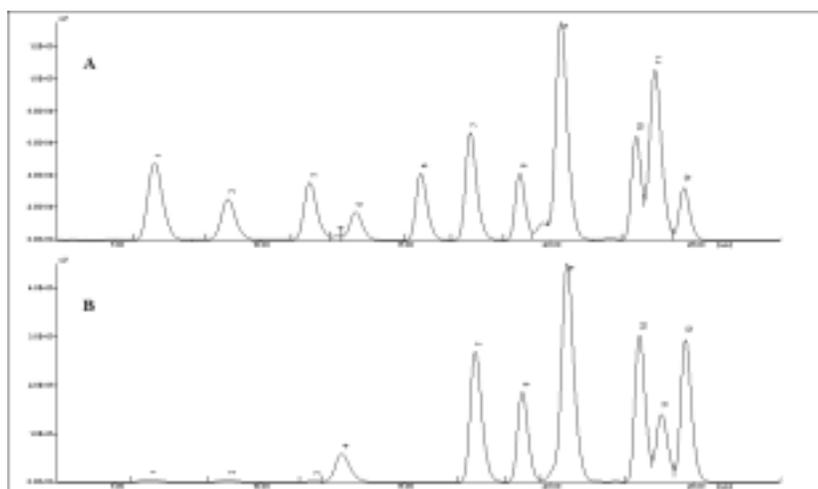


Fig. 17. Chromatogram of authentic phenolic acids at 280 nm (A) and 320 nm (B). Peaks: 1. gallic acid; 2. protocatechuic acid; 3. *p*-hydroxybenzoic acid; 4. gentisic acid; 5. hydrocaffeic acid; 6. vanillic acid; 7. caffeic acid; 8. syringic acid; 9. *p*-coumaric acid; 10. ferulic acid; 11. *o*-coumaric acid; 12. sinapic acid.

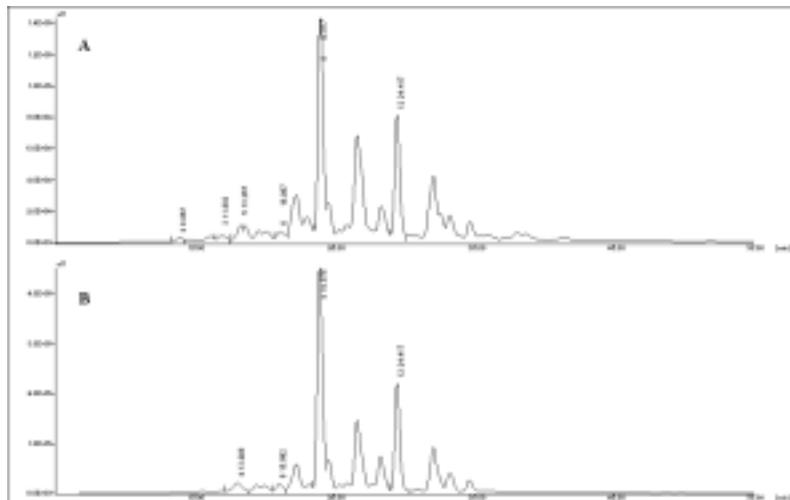


Fig. 18. HPLC chromatogram of free phenolic compounds in wild ginseng leaves at 280 nm (A), and 320 nm (B). Peaks: 2. protocatechuic acid; 3. *p*-hydroxybenzoic acid; 5. hydrocaffeic acid; 6. vanillic acid; 8. syringic acid; 9. ferulic acid; 12. sinapic acid.

Table 33. Free phenolic acids in wild ginseng leaf at different collected times (mg/100 g, dry basis)

	Fresh		Tea	
	17 Aug.	55 Sep.	17 Aug.	5 Sep.
<i>Benzoic acids</i>				
Protocatechuic	1.63±0.01	1.76±0.01	0.98±0.01	0.23±0.02
-Hydroxybenzoic	8.12±0.01	7.81±0.01	3.45±0.01	2.56±0.01
Vanillic acid	23.45±0.02	20.12±0.05	12.34±0.02	10.22±0.02
Syringic	169.40±0.10	156.55±0.11	113.33±0.03	122.22±0.03
<i>Cinnamic acids</i>				
Hydrocaffeic	3.12±0.01	3.87±0.01	1.78±0.01	1.23±0.02
Caffeic	-	-	-	-
<i>p</i> -Coumaric acid	4.98±0.02	5.98±0.01	4.23±0.01	4.89±0.01
Ferulic acid	-	-	-	-
Sinapic acid	171.23±0.04	176.33±0.12	124.33±0.07	126.77±0.05
Total	381.97±0.03	372.42±0.07	260.44±0.03	268.12±0.04

All values are dry basis. Values are means of duplicates ± standard deviation.

마) 가용성 에스테르(SPA) 상태의 페놀산물질

Fig. 19 및 Table 34는 장뇌삼 잎에 존재하는 SPA상태의 페놀산물질들로서 caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid가 주로 구성되어 있음을 보여주고 있다. 본 결과는 채취시기별 장뇌삼 잎의 페놀산 물질들이 190.65 mg%(17 Aug) 및 200.64 mg%(5 Sep.)의 함량으로 존재하고 있는 것으로 나타났으며 덩음처리에 의해 각각 163.24 mg% 및 176.26 mg%로 감소는 경향을 나타냈다. 특히 유리 상태의 페놀산 성분과 비교했을 때 비교적 열에 안정하고 손실이 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 각 페놀산 성분들이 lignin 등과 ester상태로 존재하기 때문인 것으로 추정된다.

Table 34. Soluble esters in wild ginseng leaf at different collected times (mg/100 g, dry basis)

Collected times	Fresh		Tea	
	17 Aug.	5 Sep.	17 Aug.	5 Sep.
<i>Benzoic acids</i>				
Protocatechuic	-	-	-	-
<i>p</i> -Hydroxybenzoic	-	-	-	-
Vanillic acid	2.53±0.01	2.21±0.001	0.23±0.01	0.32±0.02
Syringic	29.47±0.11	20.12±0.11	9.23±0.02	10.24±0.01
<i>Cinnamic acids</i>				
Hydrocaffeic	5.53±0.01	5.01±0.02	4.67±0.01	4.76±0.01
Caffeic	59.47±0.21	65.55±0.05	60.33±0.03	61.23±0.05
<i>p</i> -Coumaric acid	33.88±0.05	45.44±0.05	31.22±0.04	40.55±0.17
Ferulic acid	49.56±0.21	52.33±0.14	48.77±0.12	50.12±1.25
Sinapic acid	10.21±0.24	9.98±0.25	8.79±0.21	9.04±0.09
Total	190.65±0.17	200.64±0.12	163.24±0.20	176.26±0.08

All values are dry basis. Values are means of duplicates ± standard deviation.

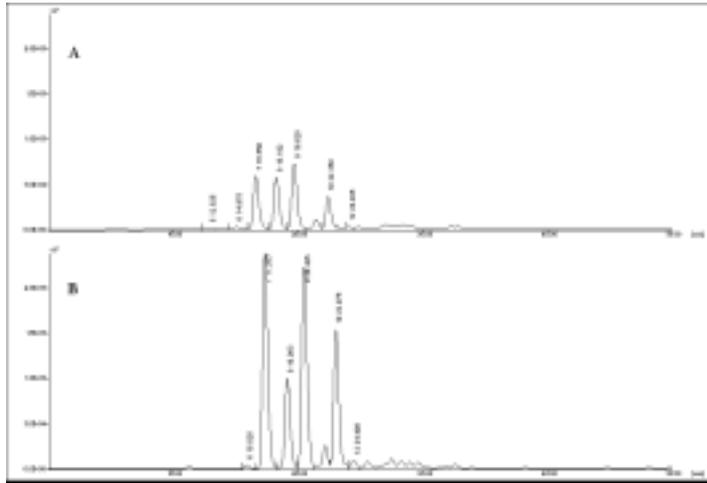


Fig. 19. HPLC chromatograms of phenolic compounds liberated from the soluble esters in wild ginseng leaves at 280 nm (A), 320 nm (B). Peaks: 5. hydrocaffeic acid; 6. vanillic acid; 7. caffeic acid; 8. syringic acid; 9. *p*-coumaric acid; 10. ferulic acid; 12. sinapic acid.

#### 바) 분리된 페놀산(FPA 및 SPA)의 항산화활성

장뇌삼 잎으로부터 분리한 형태별 페놀산 물질에 대한 항산화 성질을 측정 한 결과는 Table 35와 같다. 시료 내에 함유되어 있는 페놀성 물질의 함량비를 형태 별로 비교하여 보면 가용성 에스테르 상태의 페놀산이 유리상태의 페놀산보다 높은 활성을 나타내었으며 채취시기별에 따른 차이는 없었지만 생잎 보다는 뒤 음처리에 의해 제조된 잎차인 경우가 약간 높은 항산화 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 페놀산 물질 중 어떤 물질들이 항산화에 크게 기여하는가를 간접적으로 암시하는 것이다. 즉 유리상태의 페놀산 물질에는 benzoic acids가 높은 비율을 차지하고 있는데 특히 syringic acid 함량이 높았으며, 가용성의 페놀산 물질에는 cinnamic acids가 높은 비율을 차지하고 있고, caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid가 주된 페놀산이었다. 또한 잎차인 경우 생잎 보다 더 cinnamic acids의 비율이 더 높은 결과를 나타내었다. 이와 같은 물질들은 페놀환에 hydroxyl기의 수와 위치에 따라 항산화 능력이 크게 좌우되는데 특히 cinnamic acids가 자유기 소거능이 뛰어나다는 보고로 미루어 볼 때 본 시험결과는 각 형태별 페놀산 물질의 구성비에 따른 구조적 성질에 기인한 것으로 생각된다.

Table 35. Radical scavenging activities of both phenolics in wild ginseng leaf at different collected times.

Collected time		DPPH (ug gallic acid equivalent/mL)	OH · (ug gallic acid equivalent/mL)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (ug gallic acid equivalent/mL)
Fresh	17 Aug. FPA	10.23±0.34	21.96±0.26	119.71±1.00
	SPA	8.01±0.24	17.06±0.21	110.21±0.21
	5 Sep. FPA	10.22±0.67	20.23±0.09	118.23±0.34
	SPA	8.21±0.12	16.87±0.09	111.09±0.65
Tea	17 Aug. FPA	10.89±0.21	21.34±0.21	120.22±0.87
	SPA	7.25±0.09	16.62±0.15	110.27±1.34
	5 Sep. FPA	10.99±0.02	22.23±0.56	119.34±1.09
	SPA	7.89±0.12	16.23±0.87	109.87±0.89
Epicatechin		4.02±0.25	15.02±0.82	54.12±0.56
Ascorbic acid		14.01±0.17	19.12±0.98	88.13±0.09

All values are dry basis. Values are means of three determination. FPA, free phenolic acid; SPA, soluble phenolic acid esters. Each amount was represented as IC<sub>50</sub> value.

## 다. 용매별 장뇌삼 잎 추출물의 항산화 활성

호기성 생물은 공기 중의 산소를 흡수하여 에너지원으로 이용함으로써 생명현상을 유지한다. 체내에 흡수된 산소의 일부는 대사과정 중 활성산소로 변화하여 대식세포의 살균작용, 정보전달, 오래된 단백질의 제거 등 중요한 생리적인 역할을 한다. 그러나 생체 내 활성산소의 농도가 높아지면 그 자체의 구성성분인 지질, 단백질 및 DNA 손상을 야기하여 각종 질환을 일으키는 것으로 알려지고 있다. 따라서 활성산소를 소거하거나 그 작용을 억제시켜주는 항산화 활성물질이 이러한 질병의 치료제 및 노화억제제로서의 효과가 인정되어 주목받고 있다.

인삼 잎에는 플라보노이드 화합물이 존재하여 항산화 활성을 발휘한다는 연구가 보고된 바 있으며 잎에 다량 함유되어 있는 사포닌 성분 역시 체내의 세포대사에서 중요한 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 지금까지 장뇌삼 잎의 항산화 활성 역할에 대해서는 보고된 바 없을 뿐만 아니라 그 기작에 대해서도 보고된 바 없다. 따라서 본 시험에서는 용매별 추출물의 수율, 플라보노이드 등 페놀성물질의 함량을 조사함과 동시에 장뇌삼 잎의 기본적인 항산화 작용, 즉 라디칼 소거능력을 측정하였다.

### 1) 용매별 추출물의 수율

장뇌삼 잎차로부터 추출용매의 극성에 따라 물, 메탄올, 에탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디에틸에테르 등을 사용하여 추출율을 검토한 결과 (Table 36), 극성이 클수록 추출물의 수율이 높았고, 이전의 보고된 결과와 비교했을 때 뿌리에 비해 잎이 상대적으로 높은 추출수율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 잎에 비해 뿌리는 총당과 전분질 함량이 높은 반면 잎에는 알코올류에 잘 추출되는 사포닌의 함량과 chlorophyll 및 crude fat 등과 같은 지용성 성분의 함량이 높기 때문인 것으로 추정된다.

Table 36. Yields of solvent extracts from wild ginseng leaf tea

Solvent	Yield (% , dry weight)
Water	40.45±1.20
Methanol	38.43±2.01
Ethanol	30.63±0.45
Acetone	23.06±0.35
Ethyl acetate	6.56±0.20
Chloroform	4.61±1.00
Diethyl ether	4.07±1.00

Values are means of duplicates ± standard deviation.

2) 용매별 추출물의 아스코르브산, 총 페놀성물질 및 플라보노이드 함량

용매별 추출물 중 추출 수율이 높은 물, 메탄올 및 에탄올에 대해서 아스코르브산, 총 페놀성 물질 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Table 37과 같다. 에탄올 추출물이 총 페놀성 물질(2333.2 mg/100g)과 플라보노이드(1199.1mg/100g) 함량이 물(1932.6과 503.2mg/100g)과 메탄올 추출물(2286.2와 720.1mg/100g)에 비해 높게 측정되었으며 아스코르브산은 물 추출물(57.0mg/100g)이 에탄올(22.2mg/100g)과 메탄올 추출물(15.4mg/100g)에 비해 그 함량이 높은 결과를 나타내었다.

Table 37. Contents of ascorbic acid, phenolic and flavonoid in various solvent extracts of wild ginseng leaves (mg/100g of extracts, dry matter basis)

Components	Water	Methanol	Ethanol
Ascorbic acid	57.0± 0.2	15.4± 3.9	22.2± 0.8
Total phenolics	1932.6±22.4	2286.2±27.2	2333.2±15.3
Total flavonoids	503.2±12.2	720.1±31.7	1199.1±16.2

Values are means of three replicates±standard deviation.

### 3) HPLC에 의한 플라보노이드의 측정

장뇌삼 잎의 항산화에 관련된 플라보노이드의 본체를 확인하고자 플라보노이드 추출물을 산 가수분해하여 HPLC로 확인한 결과(Fig. 20 및 Fig. 21), 두개의 aglycones인 quercetin과 kaempferol을 확인할 수 있었다. 각 추출물 100g 당 quercetin과 kaempferol 함량은 에탄올 추출물에서 가장 높았으며 상대적으로 물 추출물에서 그 함량이 낮게 나타났다(Table 38). 그러나 용매별 추출수율을 고려할 경우 각 추출물간의 실제 함량에는 그다지 큰 차이는 없는 것으로 사료된다.

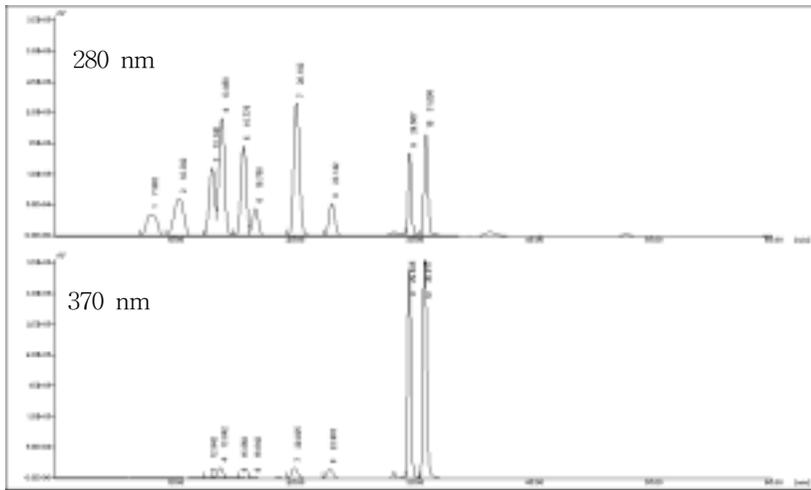


Fig. 20. HPLC chromatograms of the authentic flavonoid and phenolic acid mixture recorded at 280 and 370 nm. Peaks: 1, protocatechuic acid; 2, p-hydroxybenzoic acid; 3, vanillic acid; 4, caffeic acid; 5, syringic acid; 6, p-coumaric acid; 7, ferulic acid; 8, sinapic acid; 9, quercetin; 10, kaempferol.

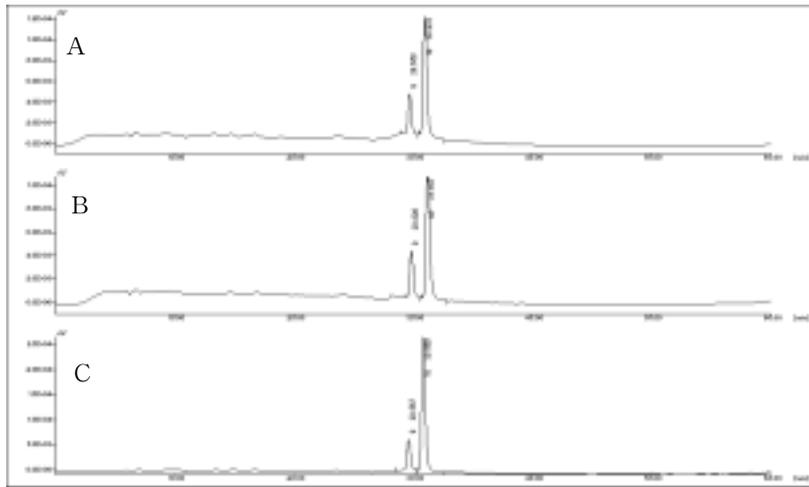


Fig. 21. HPLC chromatograms of various solvent extracts from wild ginseng leaves at 370 nm. A. water; B. methanol; C ethanol extracts. Two main peaks were identified as peak 9 and 10 in Fig. 22.

Table 38. Contents of flavonoid in water, ethanol and methanol extracts of wild ginseng leaves (mg/100g of extracts, dry matter basis)

Components	Water	Methanol	Ethanol
Quercetin	132.33±12.22	148.06±13.13	175.65±9.25
Kaempferol	133.03±11.11	425.30±21.01	514.44±12.33

Values are means of three replicates±standard deviation.

#### 4) DPPH radical 소거활성

용매별 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 20-80  $\mu\text{g/mL}$ 의 범위 내에서 농도의존성을 나타내었다(Fig. 22). DPPH radical 소거능은 에탄올 추출물이 물과 메탄올 추출물 보다 높은 활성을 나타내었다.

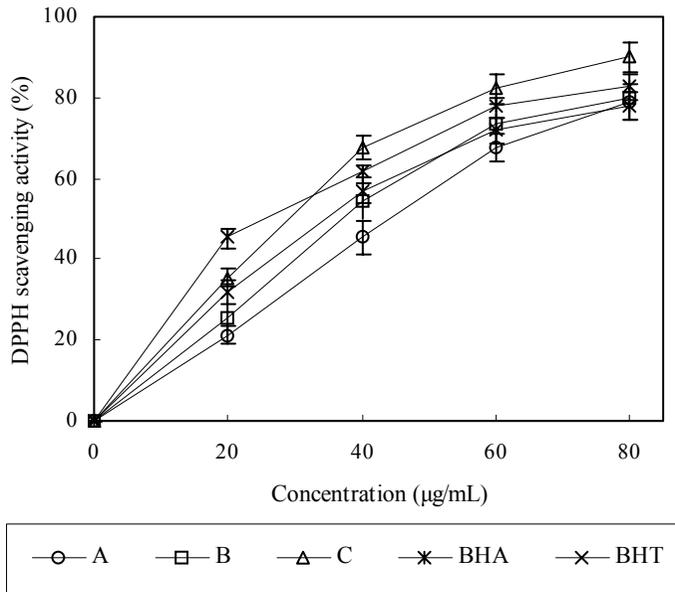


Fig. 22. DPPH radical scavenging activity of various solvent extracts from wild ginseng leaves. A, water; B, methanol; C, ethanol extract.

##### 5) Hydroxyl radical 소거활성

Oxygen radical 중에서 hydroxyl radical의 반응성이 가장 크며 이는 adjacent biomolecules에 심각한 손상을 초래한다. 물, 메탄올, 에탄올 등 극성용매를 사용하여 장뇌삼 잎 추출물을 얻고 이들의 hydroxyl radical 소거활성을 Fenton 반응에 의해 측정된 결과 0.25-2.0 mg/mL 범위에서 농도의존성을 나타내었다(Fig. 23). 용매별 추출물의 농도가 1 mg/mL 이하에서는 53.4-60.4%까지 직선적인 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었으며 각 용매별 추출물간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 에탄올 추출물이 다소 높은 활성을 나타내었다. 한편, 에탄올 추출물 2 mg/mL 농도에서는 BHA의 0.5 mg/mL 농도에 상응하는 활성을 나타내었다.

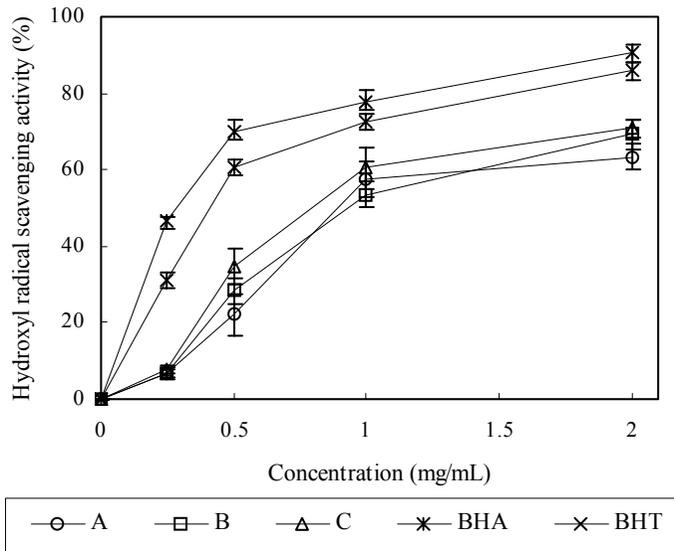


Fig. 23. Hydroxyl radical scavenging activity of various solvent extracts from wild ginseng leaves. A, water; B, methanol; C, ethanol extract.

#### 6) Superoxide anion radical 소거활성

용매별 superoxide anion radical 소거활성은 xanthine-xanthine oxidase계에서 측정하였으며, 0.5-2 mg/mL의 농도에서 생성되는 superoxide anion radical 소거능을 BHA와 BHT를 비교하였다(Fig. 24). 모든 농도 범위에서 superoxide anion radical 소거활성이 BHT와 BHA보다 낮은 활성을 보였지만, 각 추출물 2 mg/mL에서 물, 메탄올 및 에탄올 추출물의 소거활성은 각각 72.3, 62.3, 68.7%를 나타내어 앞서의 실험결과와는 달리 1mg/mL이하의 농도에서 물추출물이 가장 높은 소거활성을 나타내었다. 이러한 결과는 물추출물에 함유되어 있는 페놀성 물질의 개별 함량 또는 아스코르브산의 상대적인 높은 함량에 기인한 것이 아닌가 추정된다.

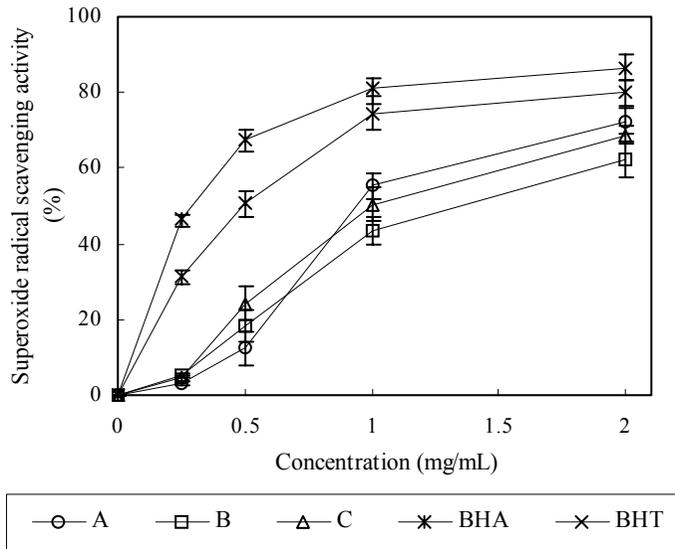


Fig. 24. Superoxide anion radical scavenging activity of various solvent extracts from wild ginseng leaves. A, water; B, methanol; C, ethanol extract.

#### 7) 금속결합능

Ferrozine은  $Fe^{2+}$ 와 정량적으로 complexes을 형성하여 red colour를 나타내고, chelating agents의 존재 하에서는 complexes의 형성을 방해하여 그 색의 흡광도는 감소하게 되는 원리를 이용하여 장뇌삼 잎 용매추출물의 금속결합능을 비교한 결과는 Fig. 25와 같다. 장뇌삼 잎차의 용매별 추출물의 ferrous ion과의 결합능은 0.25 mg/mL의 농도의 경우 5.4%에서 2.0 mg/mL의 농도에서는 25.77%로 증가하는 경향을 나타내었으나, 앞선 라디칼 소거능에 비해 그 효과는 낮은 것으로 나타났다.

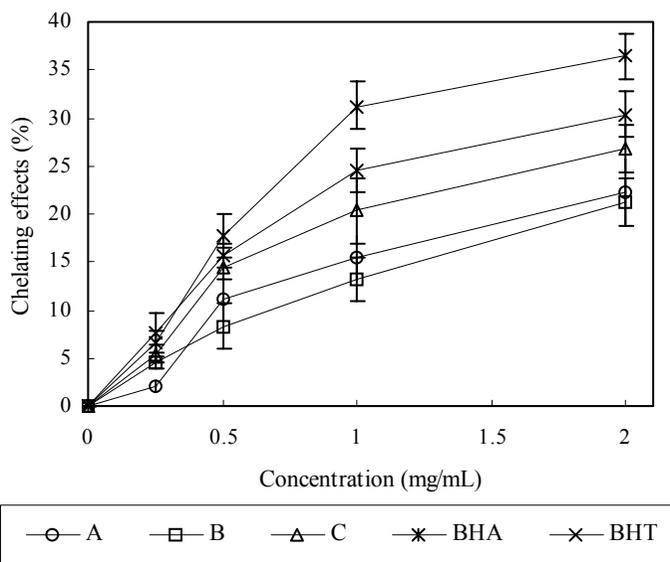


Fig. 25. Ferrous ion chelating activity of various solvent extracts from wild ginseng leaves. A, water; B, methanol; C, ethanol extract.

## 라. 장뇌삼 잎에 함유된 항산화성 물질의 분리 및 특성

현재 진행되고 있는 천연 항산화제의 연구를 살펴보면 다양한 차류와 엽경채류 등의 추출물이 항산화 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 한약 및 생약재에서도 항산화 활성연구가 활발히 진행되고 있다. 즉 쑥, 솔잎, 무잎, 팥대사리 등 주변에서 흔히 볼 수 있는 소재에서 항산화물질을 동정하고 있으며, 널리 식용되고 있는 채소류, 과일 등에서 합성항산화제에 필적할 수 있는 항산화성분의 존재가 보고되고 있다.

최근 인삼 잎에는 플라보노이드 성분 중 kaempferol이 존재한다고 보고된 바 있으나 더 이상의 정확한 물질 구명이 이루어져 있지 않았다. 따라서 본 실험에서는 칼럼 등의 분리방법을 통하여 장뇌삼 잎에 함유되어 있는 항산화물질을 분리, 정제한 후 mass 및 NMR 등 기기분석을 통하여 그 본체를 구명하고자 하였다.

### 1) DPPH 라디칼 소거능

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는데 이 방법은 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 따라서 장뇌삼 잎의 80% 메탄올 추출물을 대상으로 하여 다시 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 얻은 각 분획물의 DPPH 라디칼 소거능의 결과를 Fig. 26에 나타내었다. 각 분획물 중 EtOAc 추출물이 모든 농도에서 가장 높은 활성을 보였으며, 다음으로는 부탄올, 물의 순으로 DPPH 라디칼 소거능이 높게 나타났다. 한편 DPPH를 50% 환원시키는데 필요한 추출물의 첨가 농도를 보면 EtOAc 분획물이 45  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 다른 분획물보다 월등히 우수한 효과를 보여주었으나, 항산화 활성이 뛰어난 epicatechin 보다는 낮은 활성을 나타내었다. 따라서 장뇌삼 잎의 항산화 성분은 ethyl acetate에 잘 용해되는 것으로 추정된다.

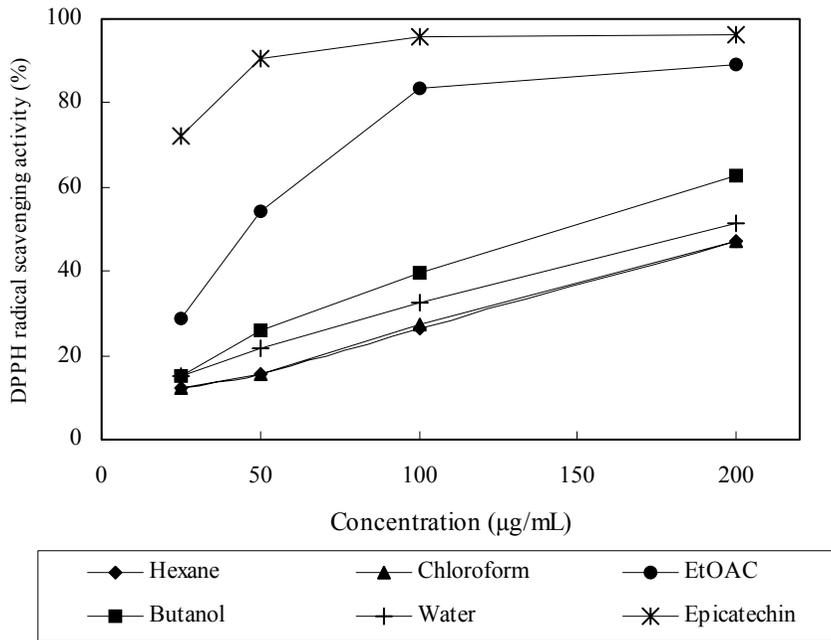


Fig. 26. Changes in DPPH radical scavenging activities according to different concentration of solvent extracts from wild ginseng leaves.

## 2) Linoleic acid에 대한 항산화효과

본 실험에서는 불포화지방산인 linoleic acid를 기질로 하여 장뇌삼 잎의 메탄올 추출물로부터 순차분획한 각 분획물의 항산화효과를 조사하였다(Fig. 27). Linoleic acid를 40°C에서 78시간 incubation 하는 동안 TBARS값은 증가하였으며, 특히 20시간이 지나면서 시료를 투여하지 않은 대조구인 경우는 TBARS가 급격히 증가한 반면, EtOAC 분획물의 첨가로 인해 linoleic acid의 자동산화를 억제하였다. 이는 같은 농도에서 epicatechin보다 더 높은 항산화 효과를 나타낸 결과로서 전자공여능이 높다고 지질과산화 억제가 높은 것은 아닌 것으로 생각된다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 장뇌삼 잎 추출물은 linoleic acid의 산화를 초기단계에서 효과적으로 억제하여 산화의 진행을 상당히 지연시키는 것으로 사료된다.

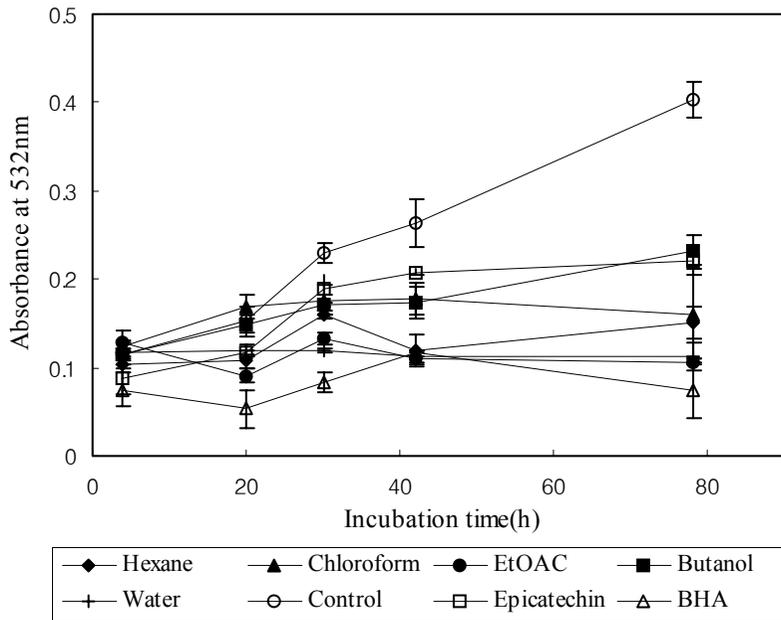


Fig. 27. Changes in autoxidation rate of linoleic acid on EtOAC extract from wild ginseng leaves.

### 3) Rats의 간 지질과산화물 형성에 대한 항산화효과

Rats에서 적출한 간에서의 지질 형성은 ferric chloride와 hydrogen peroxide에 의해 유도하였고 각 처리구에 대한 산화물을 TBA법으로 측정한 결과(Fig. 28), EtOAC 추출물이 간 지질과산화물 생성을 가장 효과적으로 억제하였으며, 다음으로 부탄올 순이었으며, 헥산, 클로로포름 및 물 추출물간의 간 지질과산화물 생성억제율은 유의적인 차이를 보이지 않았다.

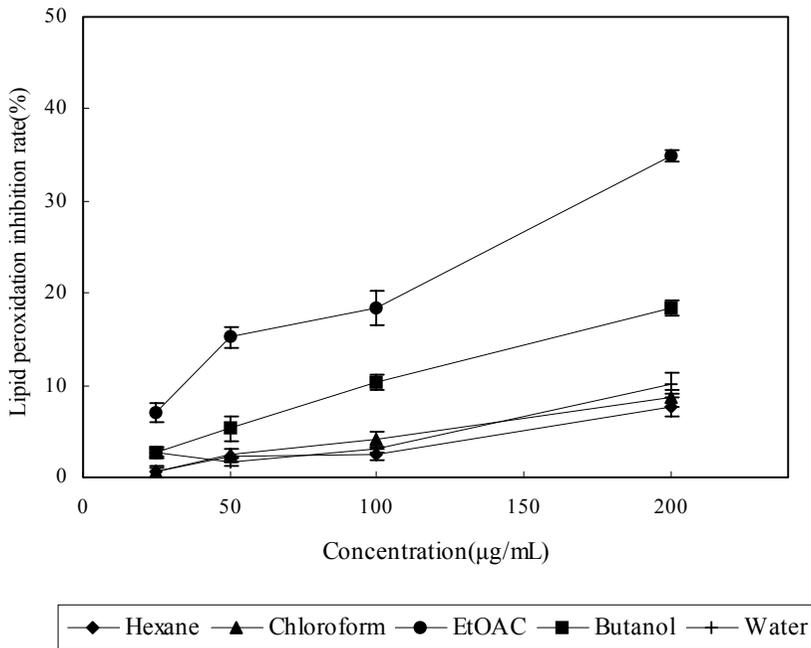


Fig. 28. Changes in lipid peroxidation inhibition activities according to different concentration of EtOAC extract from wild ginseng leaves.

#### 4) 총 페놀성물질과 플라보노이드 함량

페놀성 물질과 플라보노이드의 항산화성은 양보다는 질에 의한 효과를 나타내지만 동일 시료에서 유래된 분획물인 경우는 그 농도와 항산화 활성과는 밀접한 상관관계를 나타낸다. 장뇌삼 잎의 메탄올 추출물로부터 용매의 극성을 각기 달리하여 얻은 각 분획물의 총 페놀성 물질과 플라보노이드 함량은 EtOAC > butanol > 물 순으로 높았으며, 특히 EtOAC 추출물은 플라보노이드와 총 페놀성 물질의 함량이 각각 3.0%와 9.7%의 수준을 보여주었는데 이러한 결과는 앞서의 항산화능 측정결과와 잘 일치하는 경향을 나타내었다(Table 39).

Table 39. Total flavonoid and phenolic contents of various solvent extracts from wild ginseng leaves (g/100 g, dry basis)

	Yield	Flavonoids <sup>a</sup>	Phenolics <sup>b</sup>
n-Hexane	0.21±0.05		0.31±0.03
Chloroform	1.07±0.17	0.08±0.01	0.69±0.23
EtOAC	2.42±0.20	3.03±0.05	9.71±1.01
n-Butanol	17.21±0.82	1.58±0.07	1.31±0.51
Water	13.80±0.40	0.12±0.02	0.83±0.01

Values are means of three replicates±standard deviation. <sup>a</sup>as equivalent to kaempferol. <sup>b</sup>as equivalent gallic acid. , not detected.

#### 5) EtOAC 가용성 산성분획물의 분리 및 항산화효과

가) 칼럼크로마토그래피법에 의한 항산화물질의 분리, 정제

항산화 시험에서 가장 효과가 높았던 EtOAC 추출물을 pH에 따라 산성과 중성분획물로 분리하였으며, 이 중 EtOAC 가용성 산성 분획물을 칼럼크로마토그래피법으로 재차 분리, 정제하였다. 즉 silica gel을 충전한 칼럼에 chloroform-methanol 용매계를 이동상으로 하여 MeOH 농도를 0, 25, 50, 75, 100으로 단계별로 순차적으로 증가시키는 step-wise 방법으로 분획하였다. 이때 각각의 분획물에 대해서 DPPH 라디칼 소거능을 측정할 결과 chloroform-methanol(v/v)이 25:75에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 40).

가장 항산화활성이 높은 분획물(chloroform-methanol = 25:75)을 TLC에 의해서 5개의 분획물을 분리하고 각각에 대해서 항산화 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능이 모든 분획물에서 나타났으나 특히 분획물 IV(Rf 0.63)가 100 µg/ml 첨가 농도에서 81.87%로 가장 높은 활성을 나타내었다.

TLC로 얻어진 활성성분을 µ-Bondapak column을 사용한 HPLC로 재차 분리한 결과(Fig. 29), tR(retention time)이 17.7분, 20.6분, 30.2분과 39.46분에서 peak가 나타났는데 이들 peak를 대상으로 TLC-DPPH법에 따라 항산화 활성을 측정할 결과 4개의 peak 모두 활성이 있는 것으로 나타났다.

Table 40. DPPH radical scavenging activity of separated sub fractions by silica gel column and thin layer chromatography from EtOAc soluble acidic fraction

		DPPH radical scavenging activity (%)
Silica gel column chr. (CHCl <sub>3</sub> : MeOH)	100 : 0	2.21±0.3
	75 : 25	40.97±0.95
	50 : 50	18.76±1.10
	25 : 75	61.81±1.84
	0 : 100	22.45±1.56
TLC	I (Rf 0.05)	9.21±0.36
	II (Rf 0.21)	30.97±0.95
	III (Rf 0.42)	58.76±1.10
	IV (Rf 0.63)	81.87±1.84
	V (Rf 0.70)	42.45±1.56

Concentration of test sample was 100 µg/mL.

Values are means of three replicate ± SD.

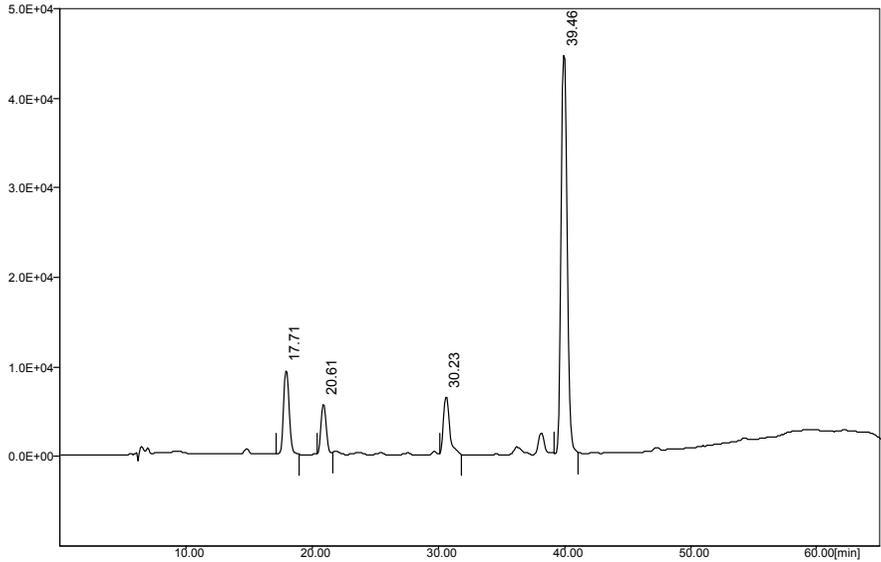


Fig. 29. HPLC chromatogram of the active compounds purified from EtOAC soluble acidic fraction of wild ginseng leaves.

#### 나) 활성물질의 구조해석

활성물질을 구조를 밝히기 위해 EI-MS 분석한 결과, 화합물 1은 분자이온 ( $M^+$ )  $m/z$  154인 것으로 관찰되었고, 그 밖의 fragment ion으로  $m/z$  137, 109, 81이 관찰되었는데 이를 NIST/EPA/MSDC library로 검색한 결과, 3,4-dihydroxybenzoic acid의 EI-MS spectrum과 92% 수준으로 일치하였다. 또한 이 활성물질의 UV/vis spectrum은 표준품과 일치하는 것으로 나타났다(Fig. 30). 화합물 2는  $M^+$  이온이  $m/z$  138로 관찰되었고, 그 이외의 특징적인 fragment ion으로  $m/z$  121, 110, 93, 81 및 65가 검출되었으며, NIST/EPA/MSDC library로 검색한 결과 4-hydroxybenzoic acid의 EI-MS spectrum과 95% 일치하였다(Fig. 31). 활성물질 3과 4 역시 NIST/EPA/MSDC library로 검색한 결과, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid (90%)와 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid로 관찰되었다(Fig. 32 및 Fig. 33).

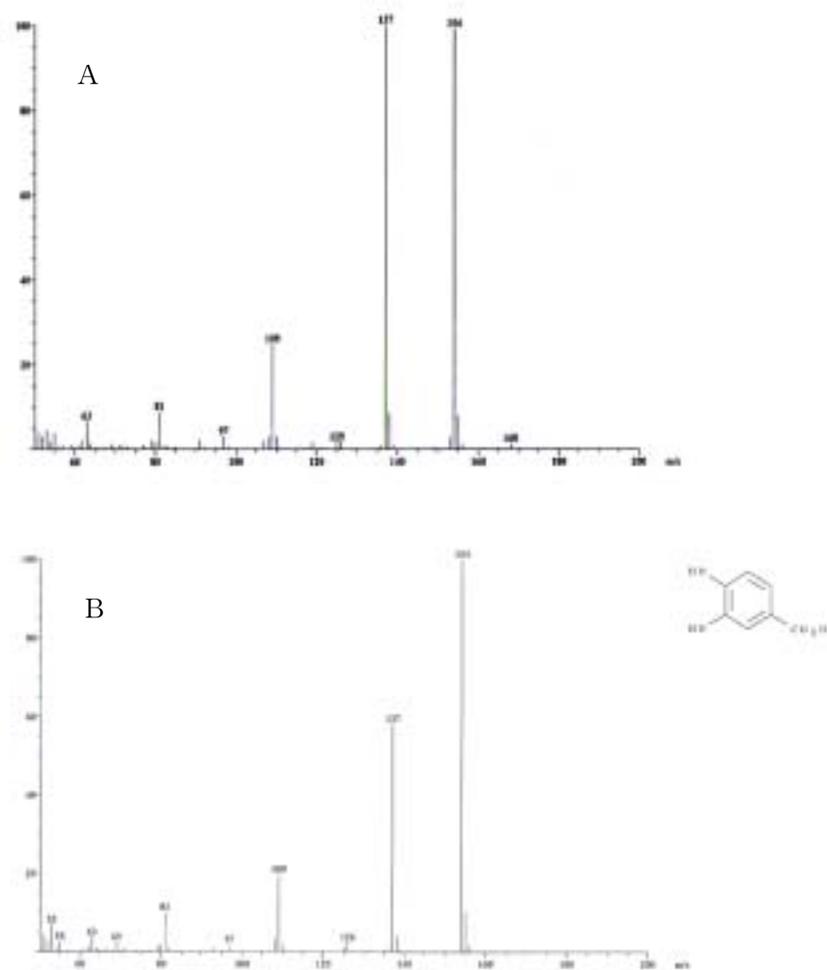


Fig. 30. EI MS spectrum of the active compound 1 (A) and 3,4 dihydroxy benzoic acid (B).

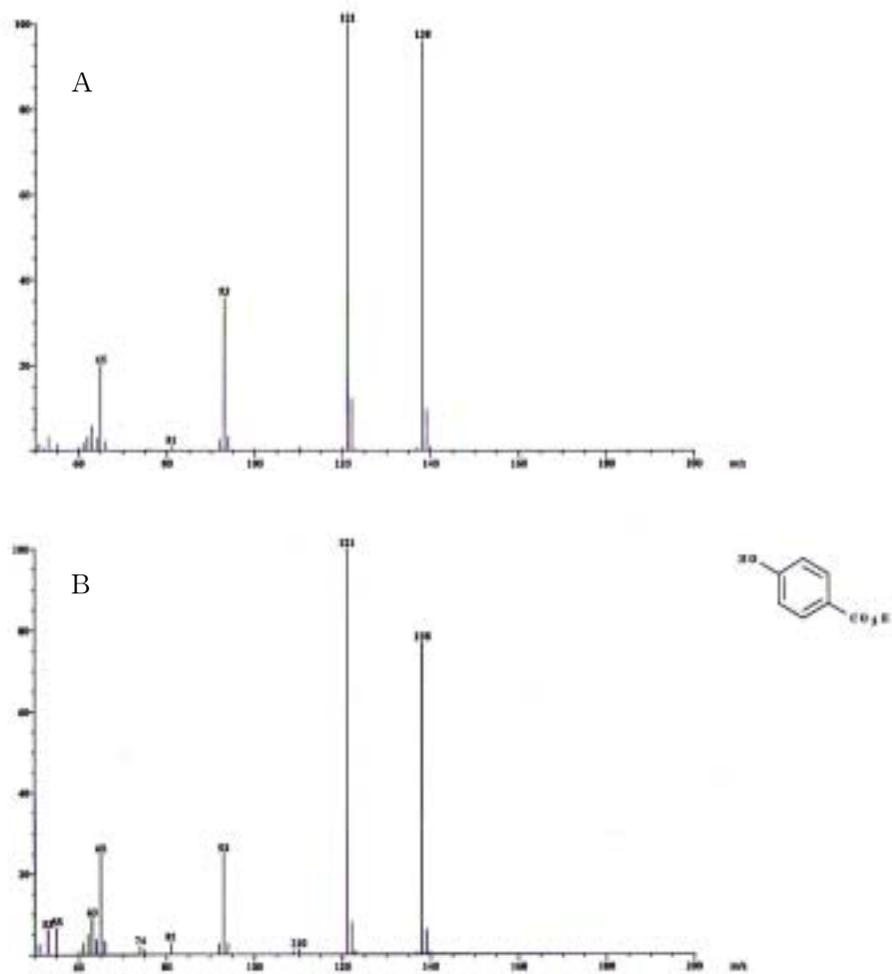


Fig. 31. EI MS spectrum of the active compound 2 (A) and 4 hydroxy benzoic acid (B).

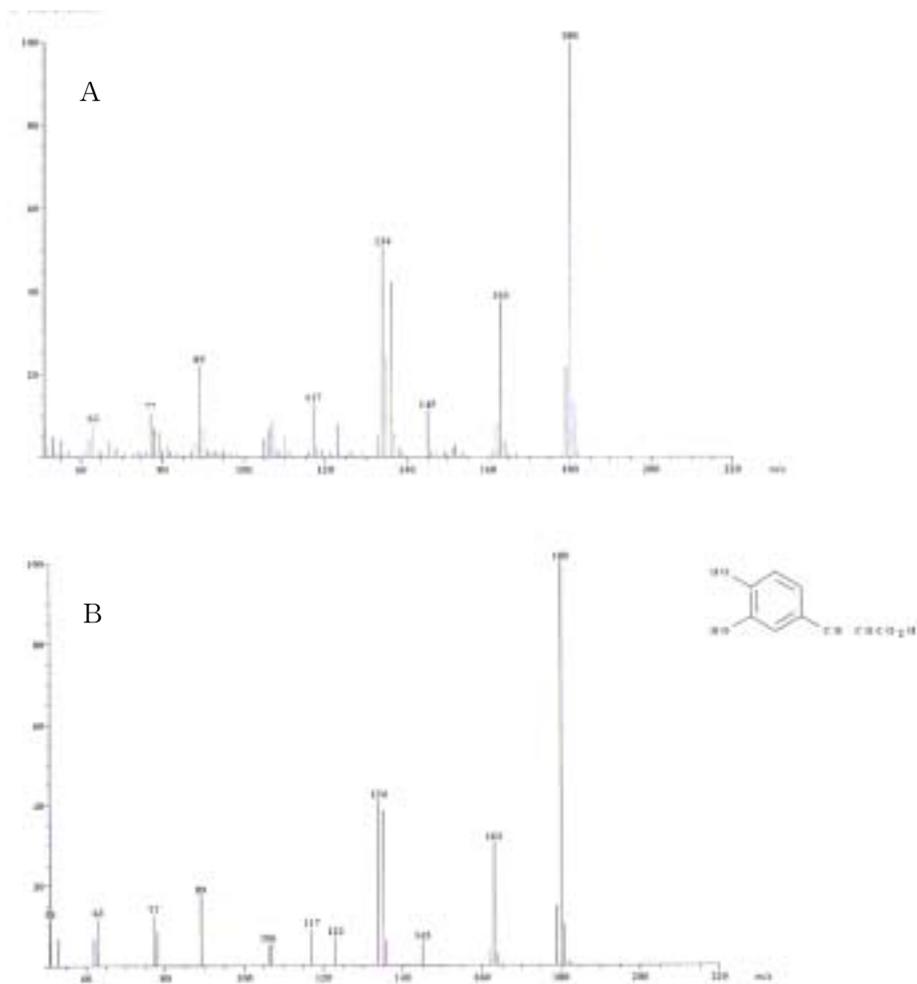


Fig. 32. EI MS spectrum of the active compound 3 (A) and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid (B).

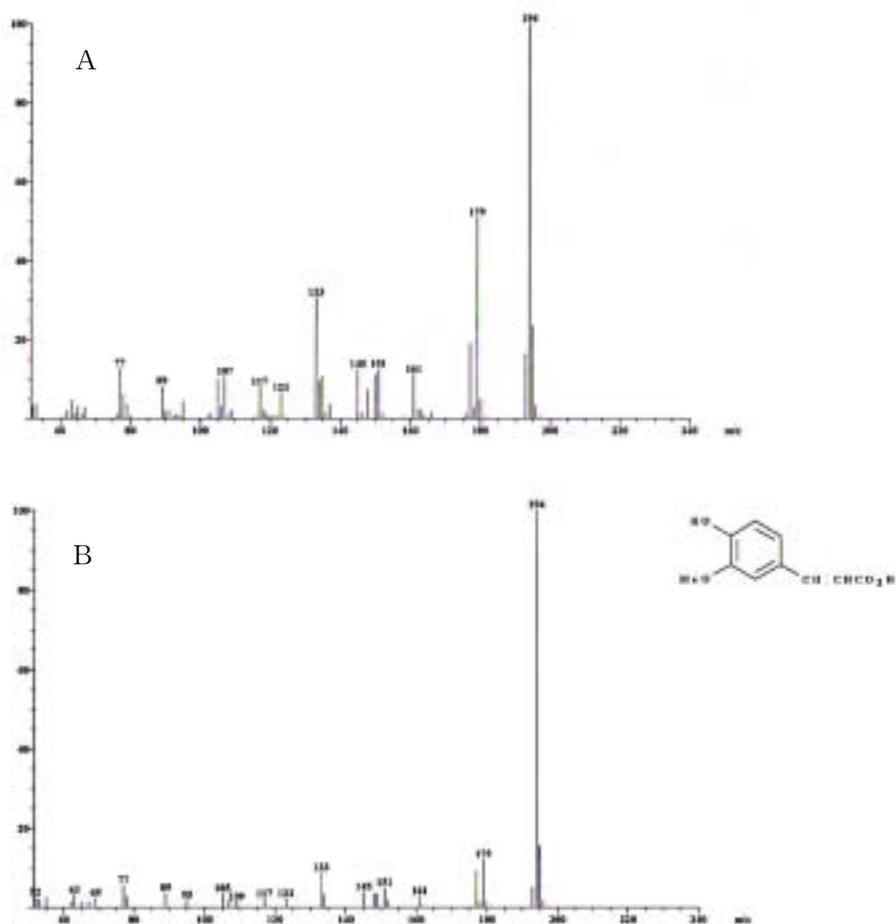


Fig. 33. EI MS spectrum of the active compound 4 (A) and 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (B).

#### 다) 분리된 화합물의 항산화활성

HPLC에 의해 분리, 정제된 화합물의 항산화활성을 측정한 결과는 Table 41과 같다. DPPH 라디칼을 50% 환원시키는데 필요한 농도를 계산한 결과, 화합물 3이 가장 낮은 농도인 0.02 mg/mL에서 매우 높은 소거능을 나타내긴 하였으나 대조구로 사용한 epicatechin과 L-ascorbic acid에 비해서는 낮은 활성을 보였다.

Table 41. DPPH radical scavenging activity of separated compounds from wild ginseng leaves

Fractions	DPPH IC50 (mg/mL) <sup>1)</sup>
1	0.043
2	0.084
3	0.020
4	0.064
Epicatechin	0.010
L Ascorbic acid	0.014

<sup>1)</sup> IC 50 values were obtained signified the concentration of sample necessary to scavenge 50% of DPPH radicals.

#### 6) 중성-에틸아세테이트 분획물의 분리

##### 가) Compound 1의 동정

##### ① Column chromatography에 의한 compound 1의 분리

중성-에틸아세테이트 분획물을 더욱 정제하기 위해 silica gel column chromatography를 실시한 결과 CHCl<sub>3</sub>:MeOH을 75:25(v/v)로 하여 얻은 분획물이 가장 높은 DPPH radical scavenging activity를 나타내었다. 따라서 이 분획물을 CHCl<sub>3</sub>/EtOAC/MeOH의 혼합 조성으로 silica gel column chromatography를 반복 실시하여 CHCl<sub>3</sub>:EtOAC:MeOH=10:4:1(v/v)로 한 경우 가장 활성이 높은 분획물을 얻을 수 있었다. 이 분획물을 Sephadex LH-20 column chromatography를 통하여 5개의 분획물을 각각 얻고(Fig. 34) DPPH radical 소거능을 측정한 결과 subfraction 5(Ve/Vt, 0.98-1.10)가 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 35). 이 활성 분획을 분취용 HPLC를 사용하여 더욱 정제한 결과

retention time이 13.2 min에서 항산화 활성이 있는 화합물을 얻을 수 있었다.

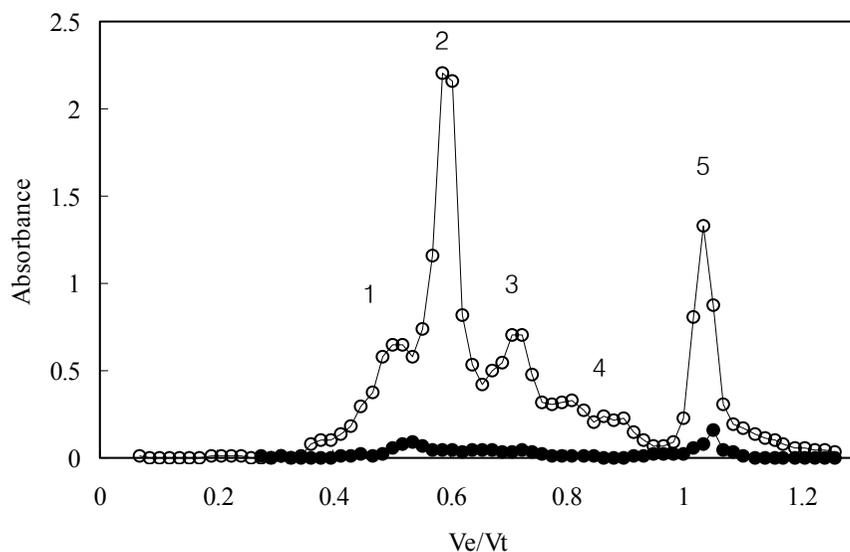


Fig. 34. Sephadex LH-20 chromatogram of active compounds.  $\text{CHCl}_3$ :EtOAc: MeOH=10:4:1; ●: 280 nm; ○: 370 nm.

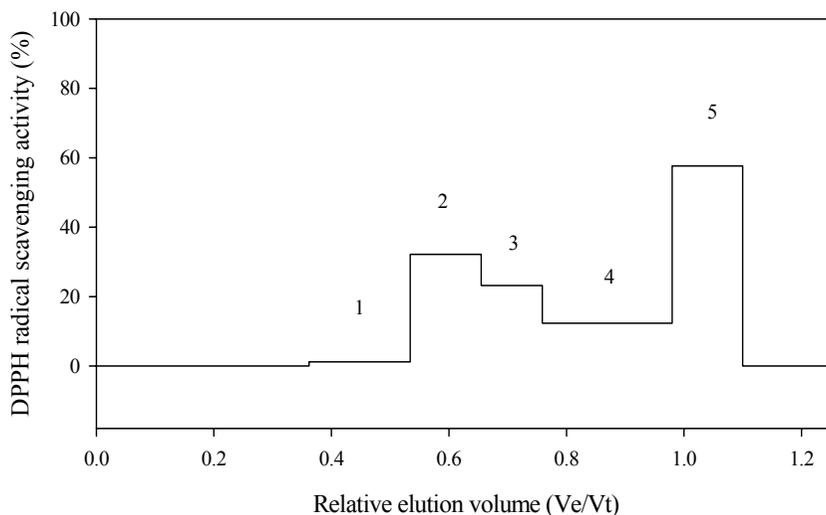


Fig. 35. DPPH radical scavenging activity of eluted fractions by Sephadex-LH 20 chromatography. Concentration of sample was  $50 \mu\text{g/mL}$ .

② Mass와 NMR 분석에 의한 compound 1의 동정

분취용 HPLC로 얻은 백색분말인 compound 1을 FAB-MS로 분석한 결과 분자량이 154인 화합물로 확인되었다 (Fig. 36). 이 화합물을 NMR을 사용하여 1D <sup>1</sup>H spectrum (Table 42), heteronuclear 2D HMQC (Fig. 37) 및 HMBC correlation spectra (Fig. 38)로 분석한 결과 5 caffeoylquinic acid로 확인되었으며, 다른 연구자의 보고(Azuma 등, 1999)와 일치함을 알 수 있었다.

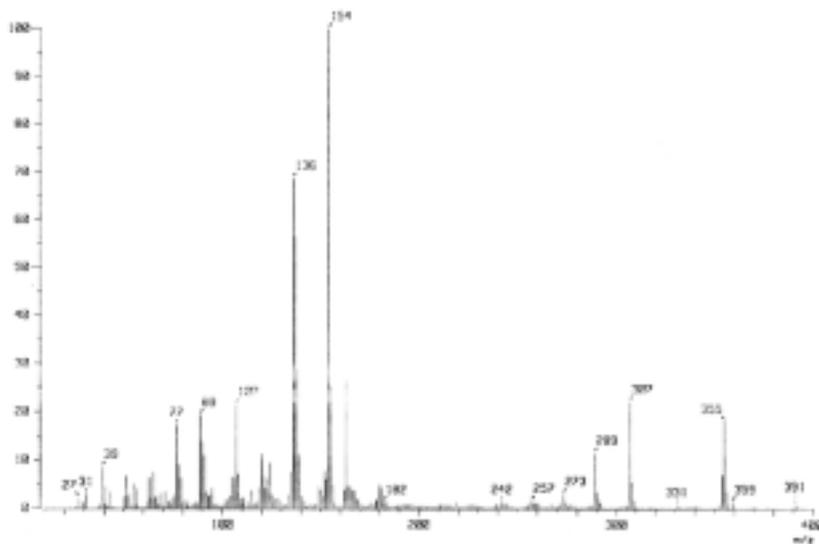


Fig. 36. FAB MS spectrum of compound 1 isolated from EtOAC soluble neutral extract of wild ginseng leaves.

Table 42.  $^{13}\text{C}$  NMR and  $^1\text{H}$  NMR data a of compound 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (JHH in Hz)
1	121.92	
2	115.37	7.06 (1H, d, 1.90)
3	147.23	
4	149.71	
5	116.60	6.79 (1H, d, 8.17)
6	123.13	6.97 (1H, dd, 1.90 and 8.17)
7	146.93	7.57 (1H, d, 15.90)
8	115.32	6.27 (1H, d, 15.90)
9	168.79	
Quinic acid		
1'	76.25	
2'	38.88	2.17 2.25 (2H, m)
3'	71.39	4.19 4.17 (1H, br s)
4'	72.10	3.74 (1H, br d, 11.59)
5'	73.57	5.34 (1H, br d, 4.28)
6'	38.33	2.08 2.10 (2H, br d)
7'	177.15	

a Assignments confirmed by 2D COSY, HMQC and HMBC experiments.

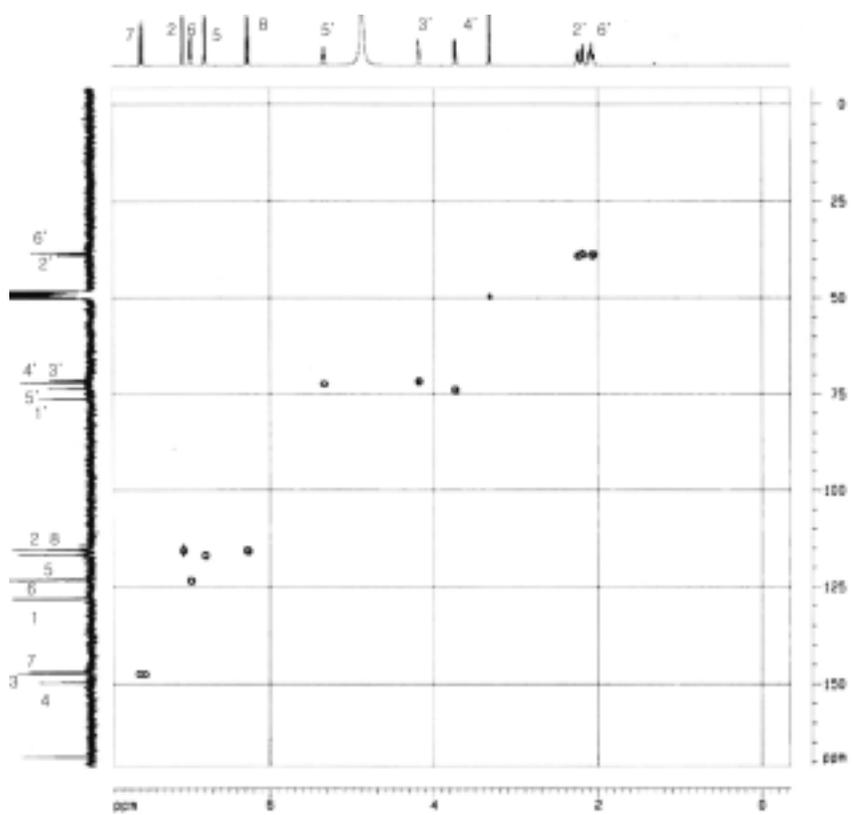


Fig. 37. Selected HMQC correlations of compound 1.

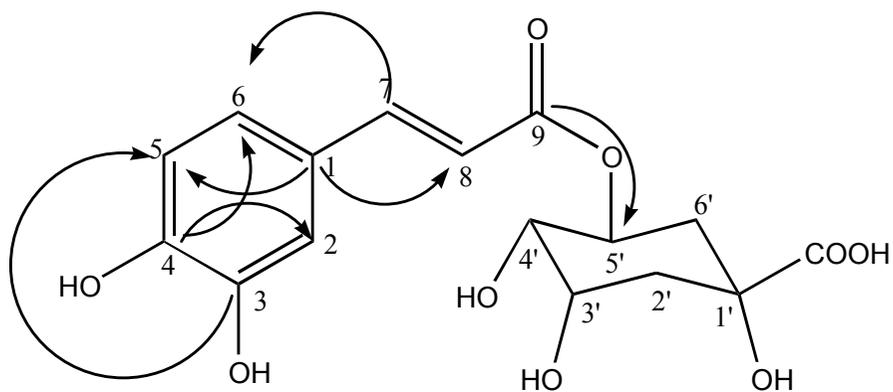
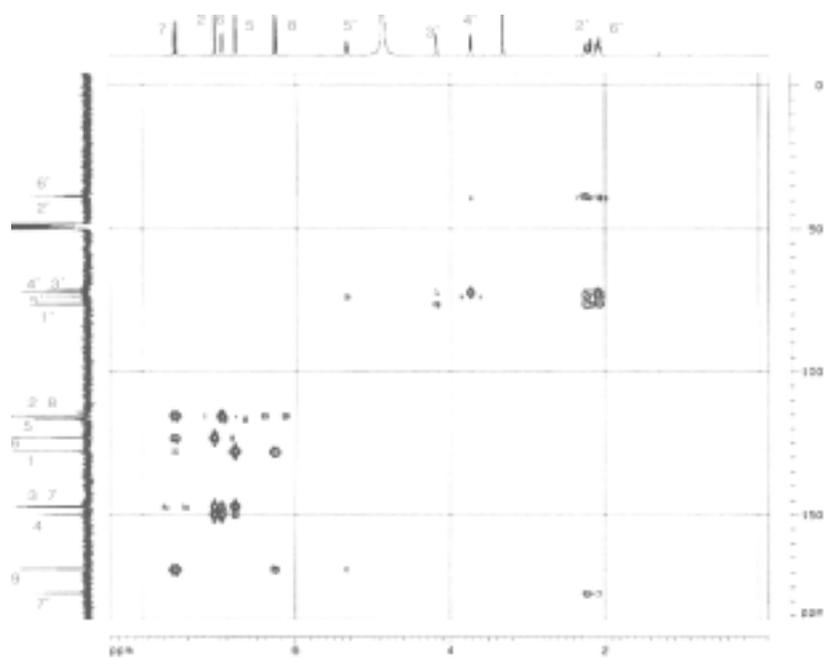


Fig. 38. Selected HMBC correlations (A) and structure (B) of compound 1

나) Compound 2의 동정

① Column chromatography에 의한 compound 2의 분리

장뇌삼 잎의 80% 메탄올 추출물로부터 일부 정제된 중성-에틸아세테이트 분획물을 column chromatography법에 의해 정제를 실시하였다. 클로로포름으로 충전된 실리카겔 컬럼에서  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 50:50$  혼합 용매로 용출시킨 활성 분획물을 Sephadex LH-20 칼럼을 사용하여 9개의 분획물로 재차 분리하였다 (Fig. 39). 분리된 각각의 분획물에 대해서 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 (Fig. 40), 시료첨가량이  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서  $V_e/V_t$ 가 1.34-1.45인 분획물이 가장 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었다. DPPH radical 소거능이 가장 뛰어난 이 분획물을 최종 분취용 HPLC로 더욱 정제하고 DPPH-TLC법으로 항산화 능력을 측정한 결과 retention time 32.5분에서 황색 분말상의 항산화 물질을 얻을 수 있었다 (HPLC not shown).

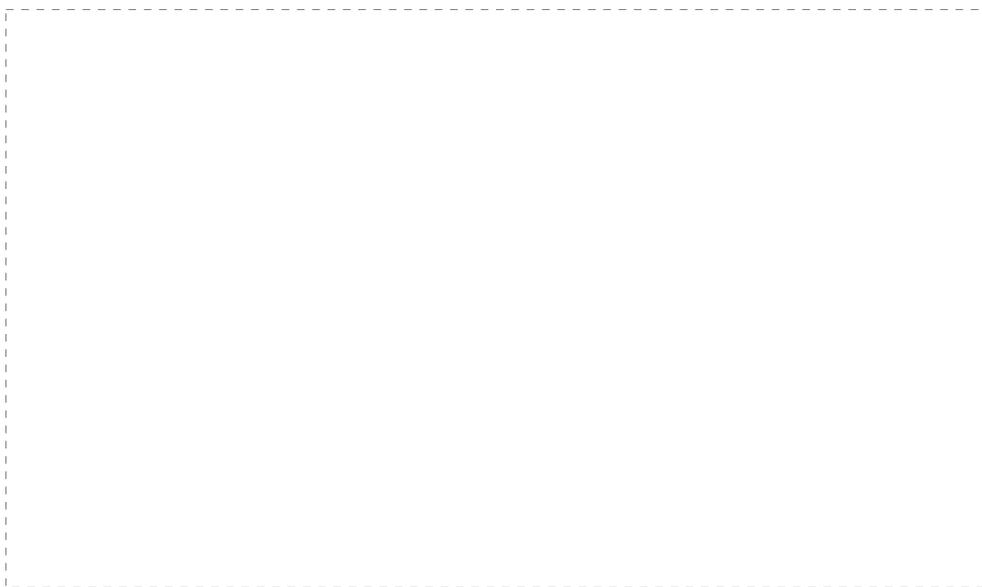


Fig. 39. Sephadex LH 20 column chromatogram of active compounds.  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 50:50$ . ●: 280 nm; ○: 370 nm.

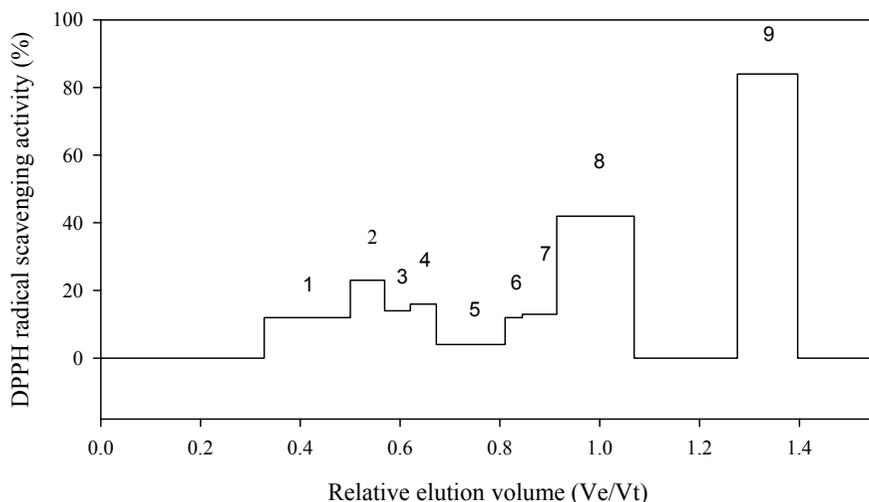


Fig. 40. DPPH radical scavenging activity of eluted fractions by Sephadex LH-20 column chromatography. Concentration of sample was 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

② Mass와 NMR 분석에 의한 compound 2의 동정

활성물질 2의 구조해석을 위해 FAB-MS 및 NMR 분석을 실시하였다. 먼저 FAB-MS (positive) 분석을 행한 결과(Fig. 41),  $[\text{M}+\text{H}]^+$  이온이  $m/z$  287로 관찰되어, 이 활성물질의 분자량은 286임을 알 수 있었다. 이어서 활성물질의 보다 정확한 구조 확인을 위해  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR 분석을 실시한 결과(Table 43, Fig. 42, 43).  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta$  6.18 (1H, s)과  $\delta$  6.40 (1H, s)은 A ring의 H 6 과 8 위치에,  $\delta$  8.10 (1H, d,  $J = 8.82$  Hz, H 2'), 6.92 (1H, d,  $J = 8.83$  Hz, H 3'), 6.90 (1H, d,  $J = 8.83$  Hz, H 5')과 8.08 (1H, d,  $J = 8.82$  Hz, H 6')은 B ring에 4종의 치환기가 있음을 알 수 있었으며 이 물질은 kaempferol인 것으로 시사되었다. 또한 다른 연구자의 보고와 비교한 결과 (Hasan 등, 1995; Xie 등, 2004), proton과 carbon spectrum이 일치하여 활성물질 2는 kaempferol로 동정하였다.

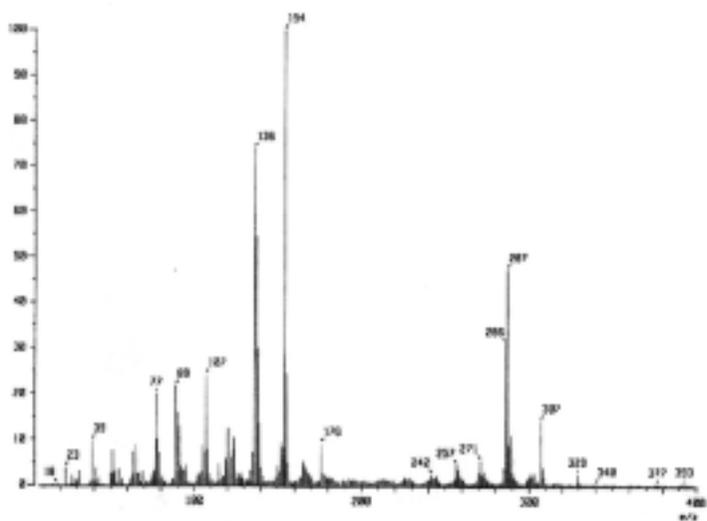


Fig. 41. FAB MS spectrum of compound 2 isolated from EtOAC soluble neutral extract of wild ginseng leaves.

Table 43.  $^{13}\text{C}$  NMR and  $^1\text{H}$  NMR data a of compound 2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (JHH in Hz)
2	148.21	
3	137.30	
4	177.54	
5	158.43	
6	99.44	6.18 (s)
7	165.82	
8	94.62	6.40 (s)
9	162.69	
10	104.82	
1'	123.89	
2'	130.84	8.10 (d, 8.82)
3'	116.46	6.92 (d, 8.83)
4'	160.73	
5'	115.37	6.90 (d, 8.83)
6'	129.72	8.08 (d, 8.82)

<sup>a</sup> Assignments confirmed by 2D COSY, HMQC and HMBC experiments.

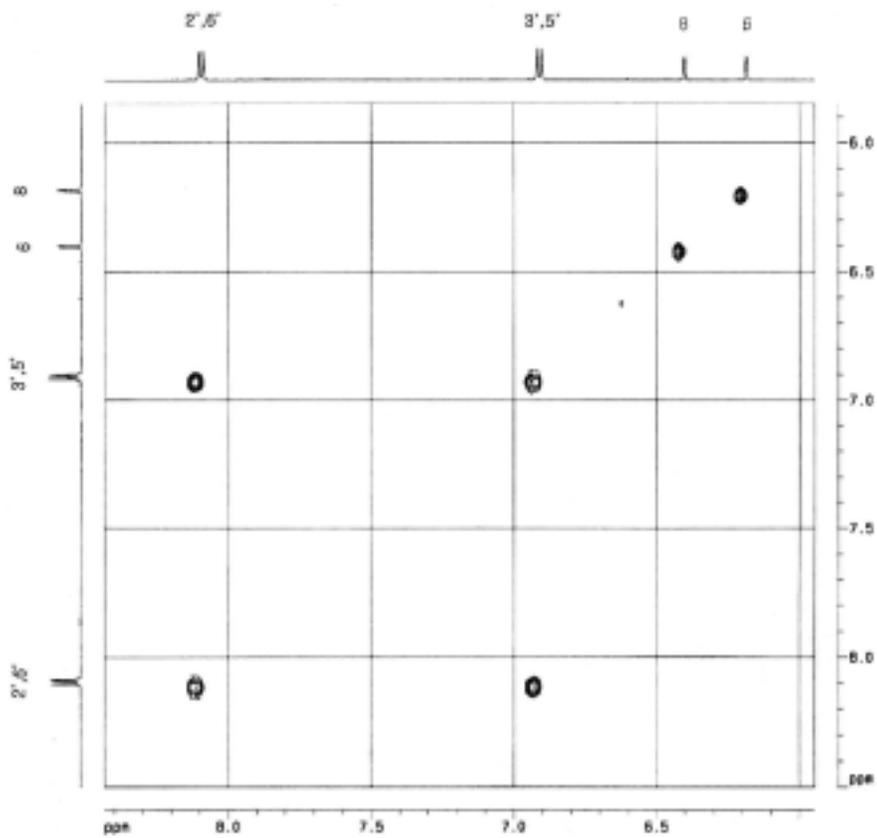


Fig. 42.  $^1\text{H}$   $^1\text{H}$  COSY spectrum of compound 2 isolated from EtOAC soluble neutral extract of wild ginseng leaves.

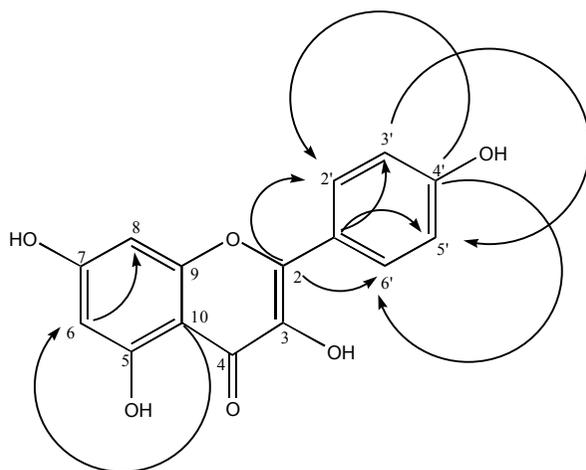
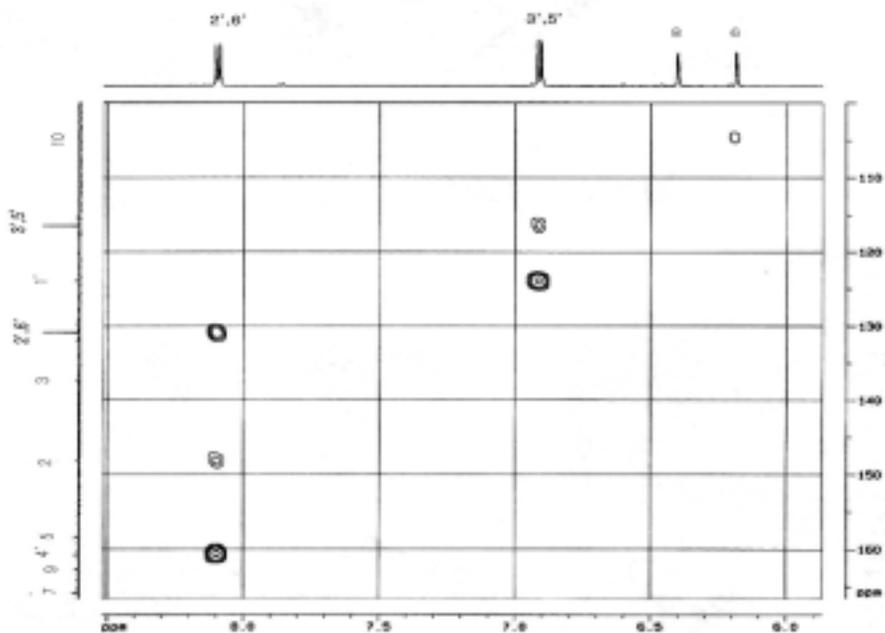


Fig. 43. Selected HMBC correlations (A) and structure (B) of compound 2.

다) Compound 3의 동정

① 칼럼크로마토그래피법에 의한 분리

EtOAc 가용성 중성획분을  $\text{CHCl}_3$  MeOH 용매계의 step-wise 방법으로 silica gel 칼럼크로마토그래피를 실시하여 활성물질을 분획한 다음 DPPH법으로 활성을 검정한 결과,  $\text{CHCl}_3$  MeOH 25:75(v/v)의 용출 획분에서 활성이 나타났다. 활성을 보인 분획물을 methanol로 이동상으로 하여 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피로 분획한 다음 항산화 활성을 측정하였다(Fig. 44, 45). 그 결과 total volume에 대한 elution volume의 비( $V_e/V_t$ )가 0.77-0.89(황색분말)의 용출 획분에서 가장 높은 활성을 나타내었을 뿐만 아니라 TLC 상에서 단일 spot으로 나타나, 이를 HPLC를 사용하여 retention time이 20.1분에서 항산화 활성이 있는 단일 물질을 분리, 정제하였다.

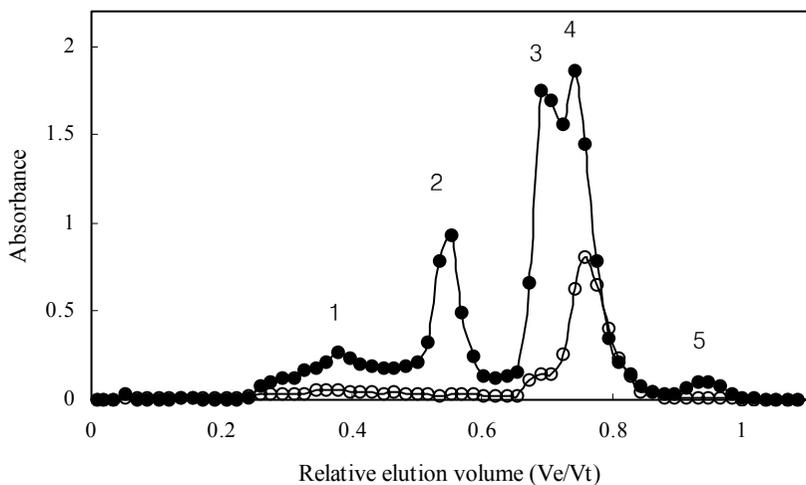


Fig. 44. Sephadex LH 20 chromatogram of active compound.  $\text{CHCl}_3$ :MeOH = 25:75; ●: 280 nm; ○: 370 nm.

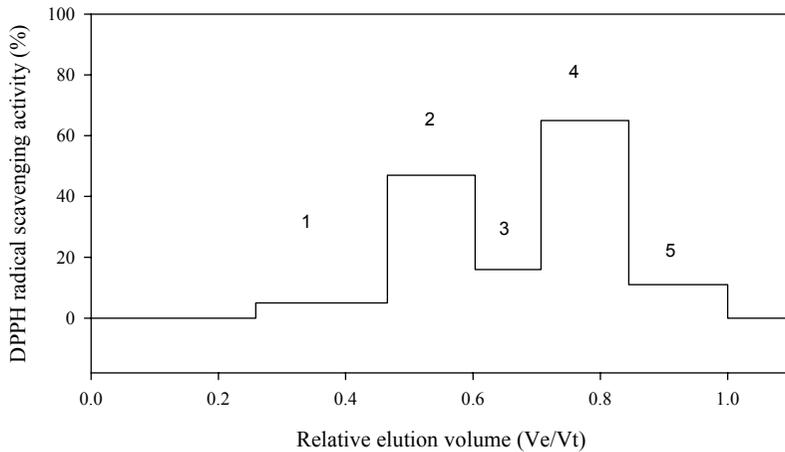


Fig. 45. DPPH radical scavenging activity of eluted fractions by Sephadex LH-20 column chromatography. Concentration of sample was 50  $\mu\text{g/mL}$ .

② Mass와 NMR 분석에 의한 compound 3의 동정

활성물질 3의 구조해석을 위해 FAB-MS 및 NMR 분석을 실시하였다. 먼저 FAB-MS (positive) 분석을 행한 결과,  $[M+H]^+$  이온이  $m/z$  303 (Fig. 46)으로 관찰되어, 이 활성물질의 분자량은 302임을 알 수 있었다. 이어서 활성물질의 보다 정확한 구조 확인을 위해  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR 분석을 실시한 결과(Table 44, Fig. 47).  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta$  7.57 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-2'),  $\delta$  7.57 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-6'),  $\delta$  6.85 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H 5'), 6.40 (1H, s, H 8), 6.18 (1H, s, H 6)의 proton signal로부터 B ring에 3종의 치환기가 존재하는 것으로 나타나 이 물질은 quercetin인 것으로 시사되었다. 또한 관련문헌과 비교한 결과 (Hasan 등, 1995; Xie 등, 2004), proton과 carbon spectrum이 일치하여 활성물질 3은 quercetin으로 동정하였다.

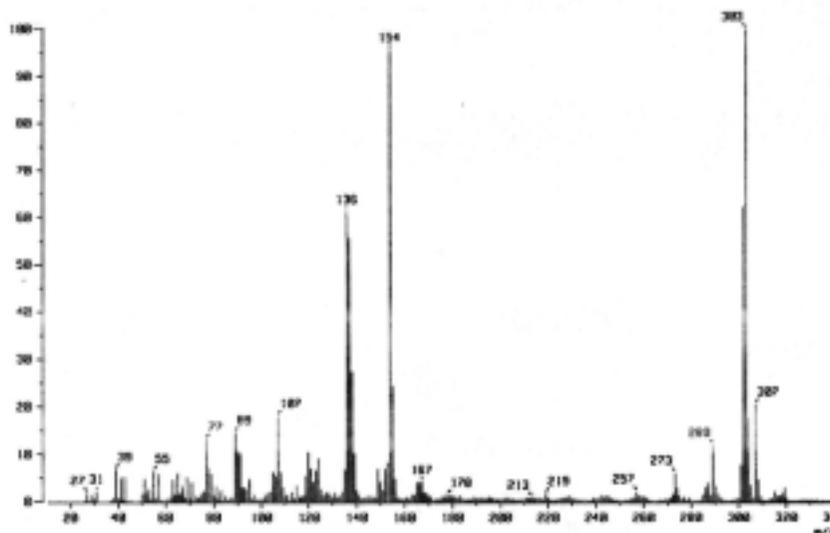


Fig. 46. FAB MS spectrum of compound 3 isolated from EtOAC soluble neutral extract of wild ginseng leaves.

Table 44. <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data a of compound 3 in CD3OD

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (JHH in Hz)
2	148.21	
3	137.30	
4	177.54	
5	158.43	
6	99.44	6.18 (s)
7	165.82	
8	94.62	6.40 (s)
9	162.69	
10	104.82	
1'	123.89	
2'	116.11	7.57 (d, 9.00)
3'	144.46	
4'	148.73	
5'	115.37	6.85 (d, 9.10)
6'	129.72	7.57 (d, 9.00)

<sup>a</sup> Assignments confirmed by 2D COSY, HMQC and HMBC experiments.

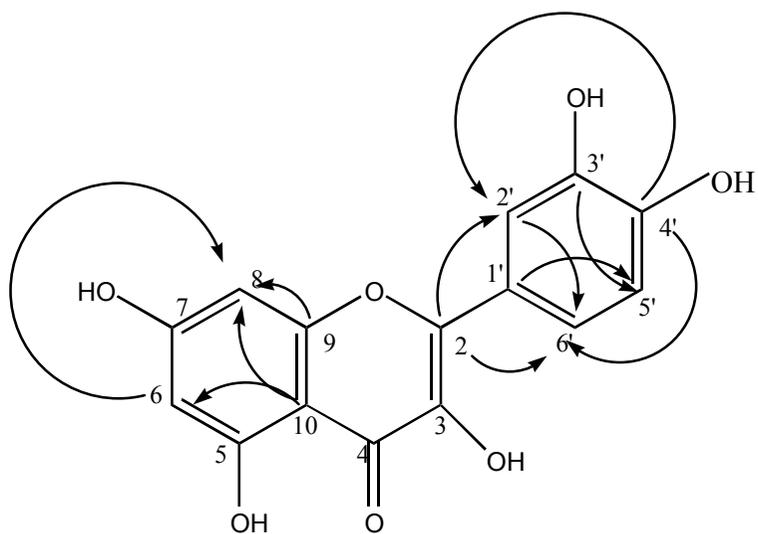
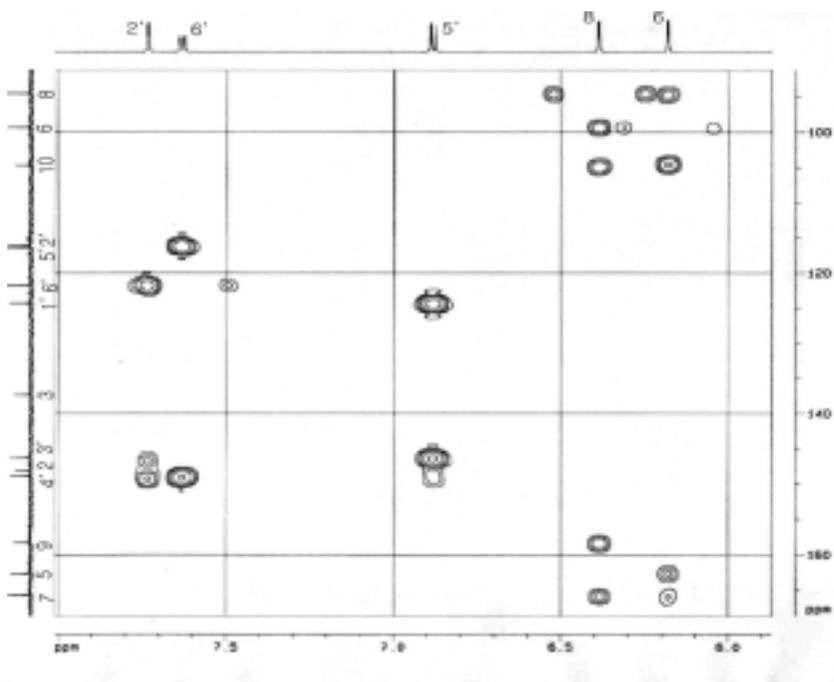


Fig. 47. Selected HMBC correlations (A) and structure (B) of compound 3.

라) 분리·정제된 compound의 항산화 활성

분리·정제하여 얻은 활성성분 1-3을 대상으로 하여 이들의 DPPH 와 superoxide anion radical 소거능을 측정하였다. 즉 분리, 정제된 화합물과 positive control 로서 epicatechin과 L-ascorbic acid를 함께 비교한 결과(Table 45), DPPH 라디칼 소거능은 epicatechin = 3 > L ascorbic acid = 2 > 1 순으로 감소하였으며, DPPH 라디칼을 50% 환원시키는데 필요한 농도는 각각 0.010, 0.010, 0.014, 0.015 및 0.028 mg/mL로 나타났다. 한편 DPPH radical 소거능과 같이 superoxide anion radical 소거능도 compound 3 > 2 > epicatechin > L ascorbic acid > 1 순으로 높은 활성을 보였으며 IC<sub>50</sub> 농도는 0.018, 0.022, 0.025, 0.030 및 0.059 mg/mL이었다.

즉 quercetin이 kaempferol보다 활성이 높게 관측되었는데, 이는 quercetin은 Bring에 catechol 구조를 가지고 있기 때문이라고 생각된다. 또한 chlorogenic acid보다 kaempferol이 항산화 활성이 높은 이유는 A, B, C 환의 hydroxyl기가 치환되었기 때문일 것으로 생각되어진다.

이상의 결과를 종합해보면 장뇌삼 잎의 기능성 소재의 개발의 일환으로 항산화활성을 갖는 물질을 탐색한 결과 장뇌삼 잎에는 3,4-dihydroxy-benzoic acid, 4-hydroxy-benzoic acid, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid, chlorogenic acid, kaempferol 및 quercetin과 이들 배당체 등이 존재하고 있을 것으로 사료되어진다. 따라서 장뇌삼 잎은 이러한 항산화 물질들이 함유되어 있어 항산화 활성이 발현되어지는 것으로 사료되며, 향후 장뇌삼 잎은 기능성식품 소재로서의 이용가능성이 높을 것으로 판단되어진다.

Table 45. DPPH radical scavenging activity of separated compounds from wild ginseng leaves

Compounds	DPPH	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	IC <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>1)</sup>	IC <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>1)</sup>
1	0.028	0.059
2	0.010	0.018
3	0.015	0.022
Epicatechin	0.010	0.025
L-Ascorbic acid	0.014	0.030

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub> values were signified the concentration of sample necessary to scavenge 50% of DPPH radicals.

## 마. 장뇌삼 잎 추출물 및 이로부터 정제한 항산화성 물질이 lipopolysaccharide로 자극된 RAW 264.7 마크로파아지에서 발현되는 항염증 관련 사이토카인에 미치는 영향

대식세포는 골수에서 생산되어 혈관 내에서는 단구로, 조직세포 내에서는 대식세포로 존재하며 미생물 감염에 대한 숙주의 방어와 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 대식세포는 T세포에서 생성되는 lymphokines에 의해 활성화 되어 superoxide( $O_2^-$ )나 hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )와 같은 반응산소 중간물질이나 NO와 같은 반응질소 중간물질을 생성하여 탐식된 이물질을 분해시킨다. 그러나 일산화질소(nitric oxide, NO) 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 과도한 생성은 조직손상, 염증 발현 및 각종 암화를 매개하는 인자로 작용하며, 또한 유도성 cyclooxygenase(COX-2) 및 nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 과다하게 생성된 PGs와 NO 의해 염증반응의 악화 및 암화가 촉진되는 것으로 보고되고 있다.

이와 같이, ROS, PGs 및 NO가 여러 질병 및 암화과정에 밀접한 연관이 있기 때문에 이들을 조절할 수 있는 물질이 각종 질환의 치료제 또는 예방제로서 주목을 받고 있다. 최근 천연물 및 각종 식품류에서 새로운 물질을 탐색하는 방향으로의 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 실제로 차류의 폴리페놀, 콩류의 isoflavone, curcumin, resveratrol등이 암예방제로서 보고되어 있다.

이러한 배경을 바탕으로 하여 본 시험에서는 장뇌삼 잎에서 분리 동정한 7종의 항산화제에 대해서 대식세포의 염증관련인자 생성에 미치는 영향에 대해 검토하였다.

### 1) 장뇌삼 잎에서 분리한 항산화물질이 대식세포 RAW 264.7의 세포증식에 미치는 영향

장뇌삼 잎에서 분리, 정제한 항산화제의 농도별 투여가 대식세포의 세포증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 48과 같다. 대식세포의 생존율은 각각의 항산화제를 100  $\mu$ M까지 투여한 경우에도 세포의 증식에 영향을 미치지 않았으며, 따라서 본 실험에 사용된 농도는 100 $\mu$ M 농도 이하에서 측정하였다.

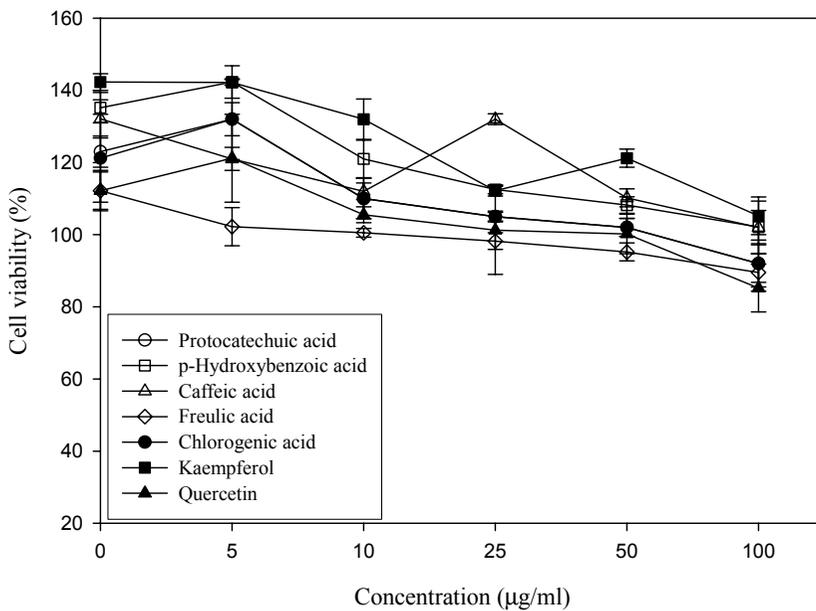


Fig. 48. Cell viability of various antioxidants from wild ginseng leaves on LPS-induced RAW264.7 macrophages. RAW 264.7 Cells were treated with different concentrations of antioxidants for 1 h prior to the addition of LPS, and cells were further incubated for 18 h.

## 2) LPS로 자극된 대식세포의 NO생산에 대한 항산화제의 효과

대식세포주인 RAW 264.7에 장뇌삼 잎에서 분리, 정제한 항산화제를 농도별로 투여한 다음 1시간 미리 배양시키고 나서 LPS(1µg/ml)로 18시간 처리한 후, 배양액 중 대식세포가 생산한 NO의 농도를 측정된 결과(Fig. 49), quercetin, kamepferol 및 caffeic acid가 NO생산을 억제하는 것으로 나타났다.

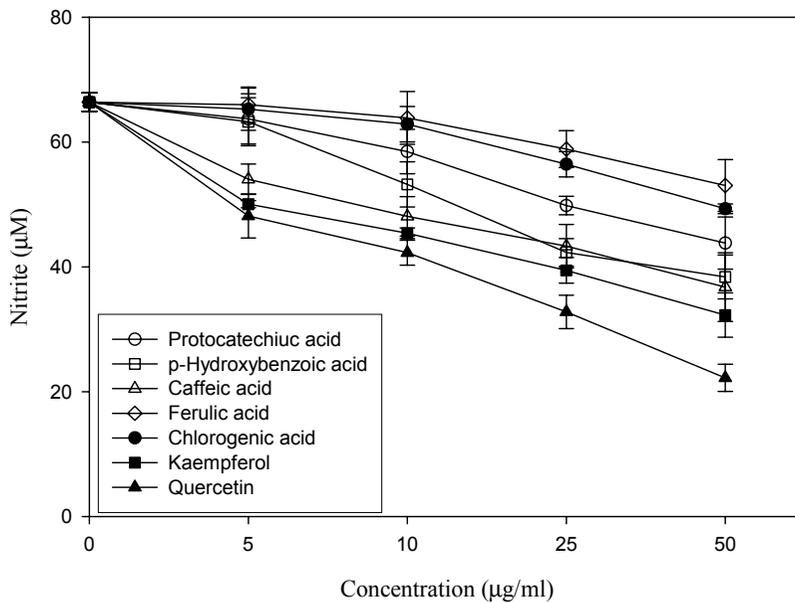


Fig. 49. Effects of various antioxidants on LPS-induced nitrite production in RAW264.7 macrophages. Nitrite production was measured by the griess reaction assay as described in the methods section. The cells were pretreated for 1 h with different concentrations of antioxidants, and then LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) was added and the cells were incubated for 18 h. Each bar represents the means SD from three independent experiments.  $P < 0.01$  vs. LPS alone.

### 3) LPS로 자극된 대식세포의 $\text{PGE}_2$ 및 $\text{TNF-}\alpha$ 생산에 대한 항산화제의 효과

염증 치료에서 항 사이토카인 치료의 기전은  $\text{TNF-}\alpha$  억제제에 의한 효과를 주로 말한다.  $\text{TNF-}\alpha$ 는 염증을 유도하는 물질로 류마티스 관절염에서 질병 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 사이토카인이라는 물질의 한 종류이다. LPS로 유도된 대식세포의  $\text{TNF-}\alpha$  증가는 장뇌삼 잎에서 분리한 항산화제의 처리에 의해 배양액으로부터의  $\text{TNF-}\alpha$ 의 농도를 효과적으로 감소시켰으며 quercetin > kaempferol > caffeic acid > chlorogenic acid 순으로  $\text{TNF-}\alpha$ 의 감소 효과를 나타내었다.

프로스타글란딘(PG)중에 한 성분인  $\text{PGE}_2$ 에 의해서 홍반이나 발열, 통증, 부종을 유발하게 되는데 이러한 프로스타글란딘 생합성의 출발물질인 arachidonic

산은 세포에 미생물의 침입(예, LPS) 또는 물리 화학적 자극이 가해지면 Phospholipidase에 의해 Phospholipid로부터 유리된다. 다시 말해 Arachidonic 산이 유리되면 Cyclooxygenase(Cox)효소가 합성이 되고 이 효소에 의해서 통증유발 인자인 프로스타글란딘이 생성되어진다. LPS로 자극시킬 경우 대식세포에서 COX-2의 발현에 의해 PGE<sub>2</sub>가 배양액으로 유리되어지는데 본 실험에서 사용한 항산화제의 처리에 의해 배양액으로부터의 PGE<sub>2</sub>의 농도를 감소시키는 것으로 확인할 수 있었다. 특히 quercetin, kaempferol 및 caffeic acid가 가장 두드러진 PGE<sub>2</sub>의 감소 효과를 나타내었다(Fig. 50 및 Fig. 51)).

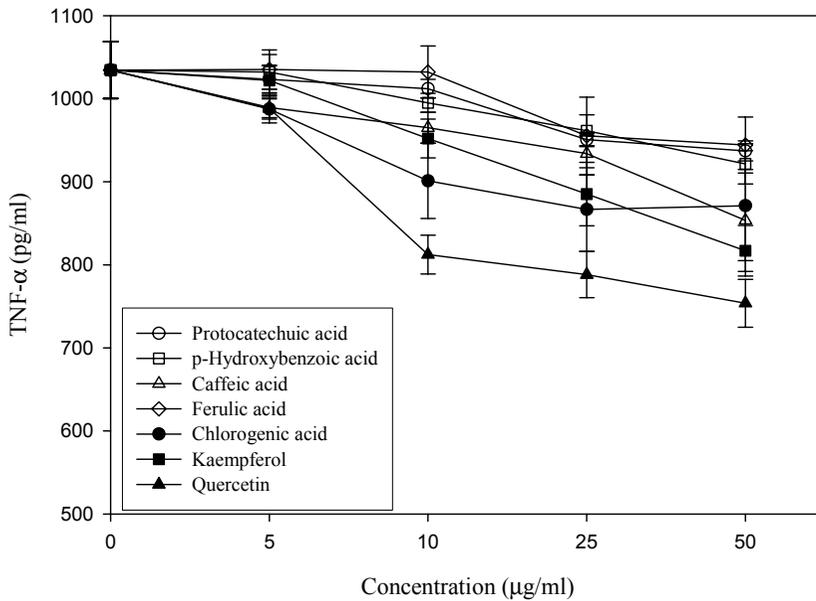


Fig. 50. Effect of various antioxidants on LPS-induced TNF- $\alpha$  synthesis in RAW264.7 macrophages. The cells were pretreated for 1 h with different concentrations of antioxidants, and then LPS (1  $\mu$ g/ml) was added and the cells were incubated for 18 h. Each bar represents the means SD from three independent experiments.  $P < 0.01$  vs. LPS alone.

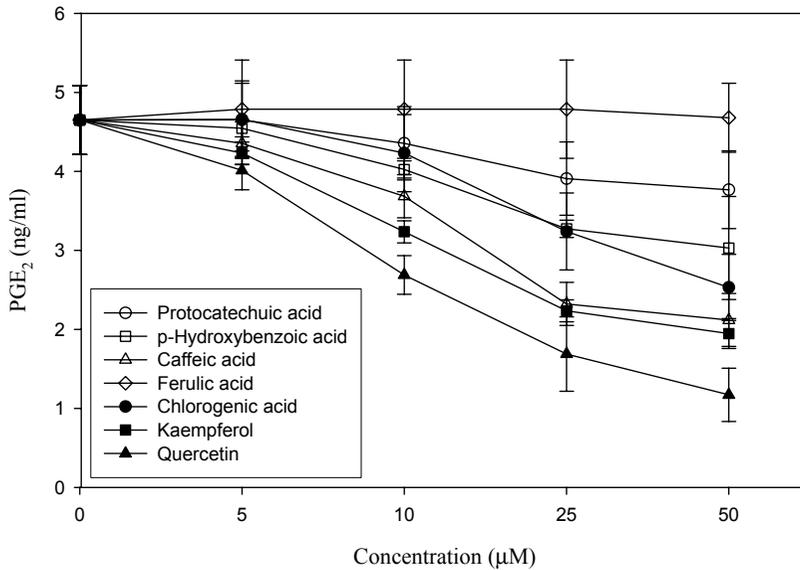


Fig. 51. Effect of various antioxidants on LPS-induced PGE<sub>2</sub> synthesis in RAW264.7 macrophages. The cells were pretreated for 1 h with different concentrations of antioxidants, and then LPS (1 μg/ml) was added and the cells were incubated for 18 h. Each bar represents the means SD from three independent experiments. P<0.01 vs. LPS alone.

#### 4) LPS로 유도된 iNOS 와 COX-2의 발현억제

NO와 PGE<sub>2</sub>의 up-regulator 단백질 중 가장 대표적인 iNOS와 COX-2는 외부 자극에 의해 MAPKs와 JAK-Stat system의 발현을 통하여 활성화 되는 것으로 알려져 있다. 이전 결과는 LPS로 자극된 대식세포가 media로 유리되는 NO와 PGE<sub>2</sub>를 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이전 결과를 통하여 upstream단계에서 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 발현을 억제할 것으로 예상되었으며, 실험 결과 장뇌삼 잎에서 분리된 항산화제 중 일부가 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 억제하는 것이 확인되었다. 특히 quercetin과 kaempferol이 두 단백질 발현을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 52).

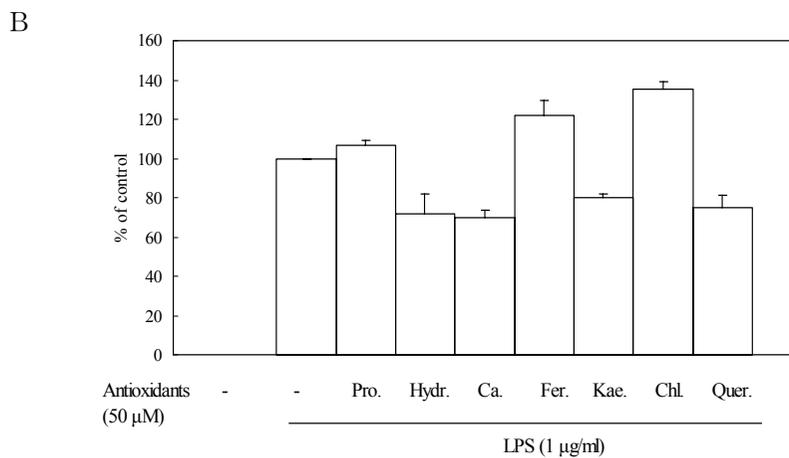
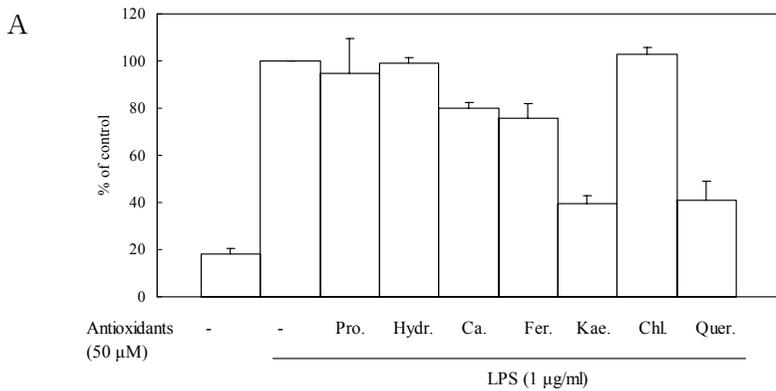
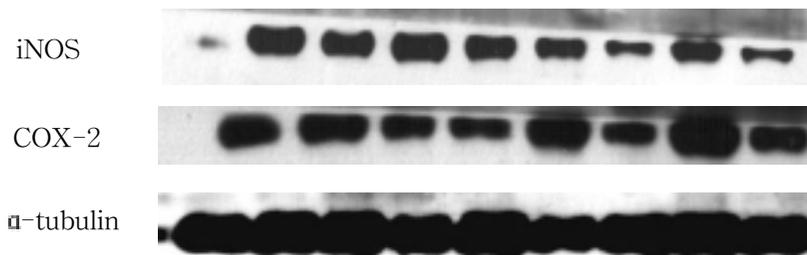


Fig. 52. Inhibitory effect of antioxidants on activation of iNOS (A) and COX-2 (B) in LPS-induced macrophage RAW 264.7 cells. The cells were pretreated for 1 h with different concentrations of RVS extract, and then LPS (1 µg/ml) was added and the cells were incubated for 18 h. Each bar represents the means SD from three independent experiments.  $P < 0.01$  vs. LPS alone.

## 바. 장뇌삼 잎 추출물의 투여가 streptozotocin(STZ) 유발 당뇨병의 항산화계에 미치는 영향

당뇨병의 원인과 합병증의 발생에 활성산소종(reactive oxygen species)과 유리기들(radicals)이 관여하는데 특히, 고혈당에 의한 당대사 이상이 나타나는 당뇨병은 췌장의  $\beta$ -cells 손상과 합병증에 의한 조직의 손상이 ROS와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 고혈당 상태에서는 포도당이 비효소적으로 단백질과 결합하는 당화과정이 진행됨에 따라 구조적, 대사적 이상이 나타나며, 이때 생성되는 유리기들이 체내 세포들을 손상시켜 지질과산화물을 촉진하는 등 체내의 산화적 스트레스를 증가시켜 여러 가지 합병증을 일으킨다.

따라서 최근에는 당뇨와 관련된 합병증의 예방을 위해 천연물로부터 천연 항산화제를 개발하려는 연구가 현재 국내외에서 활발히 진행되고 있다. 최근 국내의 경우 장뇌삼에 대한 관심이 높아져가고 있고, 특히 장뇌삼 지상부(잎, 줄기 등)가 뿌리에 못지않은 식품학적, 생리기능적 기능을 발휘한다면 그 활용가치는 매우 높다고 본다. 본 연구는 이러한 목적의 일환으로 우선 장뇌삼 잎 열수추출물이 당뇨를 유발한 쥐의 항산화계에 미치는 영향을 조사하였다.

### 1) 장뇌삼 잎 추출물의 사포닌, 총 페놀성 물질 및 플라보노이드 함량

장뇌삼 잎 추출물에 있는 각 사포닌 성분을 HPLC로 분석한 결과 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub> 및 Rd 등 6 종의 사포닌성분을 확인할 수 있었고 양적으로는 각각 5.5, 6.9, 0.3, 0.5, 1.1 및 2.5 g/100 g을 함유하고 있었던 것으로 나타났다 (Table 46). 한편 비색법으로 정량한 총 페놀성 물질 및 플라보노이드 함량은 각각 1.67 g/100 g 및 0.95 g/100 g 으로 측정되었다 (Table 47).

Table 46. Contents of ginsenosides in wild ginseng leaf extract (WGLE)

Sample	Ginsenoside (g/100 g)						Total
	Rg <sub>1</sub>	Re	Rb <sub>1</sub>	Rc	Rb <sub>2</sub>	Re	
WGLE	5.5±0.2	6.9±0.3	0.3±0.1	0.5±0.1	1.1±0.2	2.5±0.2	16.9±0.3

All values represents the means SD from three independent experiments.

Table 47. Total phenolic and flavonoid contents in WGLE

Components	g/100 g
Total phenolics	1.67±0.3
Total flavonoid	0.95±0.1

All values represents the means SD from three independent experiments.

2) STZ으로 유발된 당뇨쥐의 생존율

실험에 사용되는 당뇨쥐인 경우 streptozotocin이 강하게 유발되거나 또는 스트레스에 의해 실험 도중 사망하는 일이 발생하기도 한다. 본 실험에서는 일부 양성대조구인 DM 처리구에서 12.5%의 치사율을 나타내긴 하였으나 대부분의 쥐가 실험도중 생존한 것으로 나타났다(Table 48).

Table 48. Survival rate of experimental SD rats

Group	No. of rat	No. of survival	Survival rate (%)
N	8	8	100
N + W 200	4	4	100
DM	8	7	87.5
DM + W40	6	6	100
DM + W200	6	6	100

N: Normal group, no streptozotocin injection.

DM: Diabetes group.

N+W200: Normal group orally fed with WGLE (200 mg/kg day).

DM+W40: Diabetes group orally fed with WGLE (40 mg/kg day).

DM+W200: Diabetes group orally fed with WGLE (200 mg/kg day).

3) 당뇨쥐의 체중과 식이섭취에 미치는 영향

Table 49에서 보는 것처럼 대조구 (N)와 당뇨쥐 (DM, DM+W40 및 DM+W200)의 체중 변화에 유의적인 차이를 나타내었다. 즉, 실험기간 동안 체중이 증가한 대조구 (N)와는 달리 장뇌삼 잎을 급여하지 않은 당뇨쥐 (DM)인 경

우 4주 후 체중이  $-53.26 \pm 0.38$  g이 감소하였다. 한편 장뇌삼 잎 추출물을 급여한 DM+W200 그룹인 경우는  $-24.2 \pm 15.2$ 로 급여하지 않은 DM 그룹보다 유의적으로 체중이 증가하였으며 또한 식이효율 역시 증가하였다. 당뇨가 유발된 쥐는 특징적으로 사료와 물의 섭취가 많지만 체중은 감소하는 경향을 나타내는데 이와 같은 식이 이용효율의 감소는 당뇨로 인한 체내 대사와 퇴행적인 변화 때문인 것으로 보고되고 있는데 본 시험결과와 잘 일치하였다(Chatterjea와 Shinde, 2002).

Table 49. Changes in body weight gains, food intakes and feed efficiency ratios (FER) of WGLE supplement rats

Group	Weight gain (g)	Food intake (g)	FER
During 4 weeks after STZ injection			
N (n=8)	$+78.29 \pm 14.84^a$	$535.62 \pm 85.09^a$	$0.15 \pm 0.02^a$
N+W200 (n=4)	$+88.21 \pm 20.12^a$	$629.35 \pm 28.80^a$	$0.14 \pm 0.06^a$
DM (n=7)	$-53.26 \pm 10.38^c$	$990.42 \pm 70.76^b$	$-0.05 \pm 0.03^c$
DM+W40 (n=6)	$-35.77 \pm 15.86^{bc}$	$1043.50 \pm 46.50^b$	$-0.03 \pm 0.02^{bc}$
DM+W200 (n=6)	$-24.23 \pm 15.21^b$	$1008.13 \pm 8.49^b$	$-0.02 \pm 0.02^b$

FER: Feed efficiency ratio (weight gain/food intake).

All values are mean  $\pm$  SD

Mean values within a column that followed by same letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### 4) 간 무게의 변화

Table 50은 각 처리구의 쥐 체중 100 g당 간의 상대적인 무게 (liver index)를 나타낸 것이다. 장뇌삼 잎 추출물을 농도별로 처리한 DM±W40과 DM±W200 당뇨그룹이 대조구 (N)에 비해 상대적으로 간의 무게가 높지만 시료를 처리하지 않은 DM 그룹에 비해 간의 무게가 유의적으로 감소하였다. Streptozotocin으로 유발된 당뇨 흰쥐에서는 간의 비대 현상이 나타나고 혈당이 감소하였을 때 간의 무게가 가벼워진다고 하였으며 이러한 원인으로 streptozotocin으로 인한 체내 insulin의 저하로 정상적인 당 대사가 원활히 이루어지지 않아 acetyl-CoA에서의 지질 생합성 체계가 형성되어 간장 내에 지질 성분이 축적되기 때문이라고 보고

되고 있다(Goldgerg, 1981).

Table 50. Effects of WGLE on liver weight in STZ induced diabetic rats

Group	Body weight (g)	Liver weight (g)	Liver index (g/100g body weight)
N (n=8)	352.69±17.78	11.44±0.44	3.25±0.11 <sup>a</sup>
N+W40 (n=4)	358.24± 4.62	10.67±0.98	2.98±0.24 <sup>a</sup>
DM (n=7)	210.71±16.04	9.75±0.50	4.65±0.29 <sup>d</sup>
DM+W40 (n=6)	299.12± 2.31	8.84±0.18	3.86±0.16 <sup>b</sup>
DM+W200 (n=6)	246.31±20.86	9.44±0.23	3.86±0.24 <sup>b</sup>

All values are mean ±SD.

Mean values within a column that followed by same letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### 5) 신장 및 비장 무게의 변화

Streptozotocin으로 유발된 모든 당뇨쥐에서 체중에 대한 신장의 무게는 대조구 (N)에 비해 증가하였으며, 장뇌삼 일 추출물을 급여한 당뇨쥐가 시료를 급여하지 않은 DM 그룹보다 신장의 무게가 유의적으로 감소하였다 (Table 51). 한편 비장인 경우는 신장의 결과와는 반대로 당뇨가 유발된 처리구에서 비장의 무게가 증가하였다. 신장의 경우, 당뇨병의 발병 초기에 사구체 여과율의 증가와 함께 크기와 용적이 증가하는 것으로 알려져 있는데(Socoher 등, 1991), 본 실험에서도 유사한 경향을 보였다.

Table 51. Effect of WGLE on kidney and spleen weight in STZ induced diabetic rats

Group	Kidney (g)		Spleen (mg)	
	Weight	K/B.W <sup>1)</sup>	Weight	S/B.W <sup>1)</sup>
N	2.21±0.14	0.63±0.03 <sup>a</sup>	776.25±84.69 <sup>a</sup>	222.34±20.09 <sup>a</sup>
N+W40	2.21±0.12	0.63±0.04 <sup>a</sup>	629.35±28.80 <sup>b</sup>	195.00±20.05 <sup>ab</sup>
DM	2.77±0.16	1.22±0.06 <sup>d</sup>	350.00± 4.67 <sup>d</sup>	172.10±10.02 <sup>b</sup>
DM+W40	2.06±0.03	0.88±0.05 <sup>b</sup>	481.55±31.77 <sup>c</sup>	209.99±20.01 <sup>ab</sup>
DM+W200	2.75±0.26	1.12±0.10 <sup>cd</sup>	436.88±58.22 <sup>c</sup>	176.67±11.11 <sup>b</sup>

All values are mean ± SD.

Mean values within a column that followed by same letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

## 6) 혈당과 TBARS

장뇌삼 잎 추출물의 투여가 당뇨쥐의 혈당과 TBARS의 농도에 미치는 영향을 Table 52와 53에 나타내었다. 당뇨를 유발하지 않은 대조구에서는 장뇌삼 잎 추출물의 투여가 혈당 및 TBARS에 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 당뇨가 유발된 흰쥐인 경우는 실험기간 4주 후 정상군에 비해 혈당 및 TBARS가 유의적으로 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 장뇌삼 잎 추출물의 투여는 당뇨 유발쥐의 혈당과 TBARS를 유의적으로 감소시킴을 확인 할 수 있었다.

당뇨성 합병증의 발생은 당뇨상태에서 증가되어진 산화적 스트레스와 밀접한 관련이 있으며, 혈장과 조직내의 산화적 스트레스 증가에 의한 지질과산화의 증가로 당뇨병 환자에서 가장 흔한 심혈관 질환 합병증이 유발된다고 보고된 바 있다. 특히 관상동맥성 심장질환, 동맥경화증 등의 혈관성 질환의 발병율은 비당뇨인의 2-6배나 높은 것으로 알려져 있다. 당뇨병 동안 지속적인 고혈당은 자당산화와 비효소적 단백질의 당화를 통해 산소유리기의 생성을 증가시키고 산소유리기가 막 인지질의 지질과산화를 초래하여 지질과산화 생성물인 MDA를 증가시키게 된다. 뿐만 아니라 당뇨를 유발하기 위해 사용된 STZ도 superoxide anion과 hydroxyl radical 등의 유리기 생성을 증가시키는 것으로 보고되어 있다. 따라서 당뇨에서의 지질과산화를 억제하는 것은 당뇨에 의한 합병증을 지연시킬 수 있는 좋은 방안의 하나인 것으로 생각된다.

Table 52. Change in blood glucose levels (mg/dL) in WGLE supplemented rats

Group	Initial	Final
N (n=8)	100.38±10.88 <sup>a</sup>	106.00± 4.50 <sup>a</sup>
N+W200 (n=4)	106.73± 7.33 <sup>a</sup>	101.33± 7.11 <sup>a</sup>
DM (n=7)	338.67±32.33 <sup>b</sup>	464.68±72.78 <sup>c</sup>
DM+W40 (n=6)	334.90±19.00 <sup>b</sup>	266.00±45.00 <sup>b</sup>
DM+W200 (n=6)	343.33±13.11 <sup>b</sup>	239.68±71.78 <sup>b</sup>

All values are mean ± SD.

Mean values within a column that followed by same letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

Table 53. Concentration (nmol/mg protein) of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum of WGLE supplemented rats

Group	Initial	Final
N (n=8)	0.114±0.003 <sup>a</sup>	0.114±0.004 <sup>a</sup>
N+W200 (n=4)	0.114±0.002 <sup>a</sup>	0.115±0.005 <sup>a</sup>
DM (n=7)	0.178±0.024 <sup>b</sup>	0.234±0.032 <sup>c</sup>
DM+W40 (n=6)	0.174±0.020 <sup>b</sup>	0.170±0.022 <sup>b</sup>
DM+W200 (n=6)	0.162±0.024 <sup>b</sup>	0.174±0.032 <sup>b</sup>

All values are mean ± SD.

Mean values within a column that followed by same letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### 7) 장기의 TBARS

장기의 과산화 지질의 함량은 세포내 산화적 스트레스의 증가, 즉 활성산소종의 생성 증가 및 항산화적 방어력 약화로 기인한 것으로 추정된다. STZ로 유발된 당뇨 흰쥐의 간, 신장 및 비장의 지질과산화 함량을 측정된 결과는 Fig. 52와 같다. 간에서 당뇨군의 TBARS는 정상군에 비해 증가하였으며, 장뇌삼 잎 추출물의 투여는 간의 TBARS 수치를 유의적으로 감소 시켰다. 또한, 신장과 비장의 경우에도 장뇌삼 잎 추출물의 투여는 DM군에 비해 유의적으로 감소시켰으나 각 시료 농도간의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

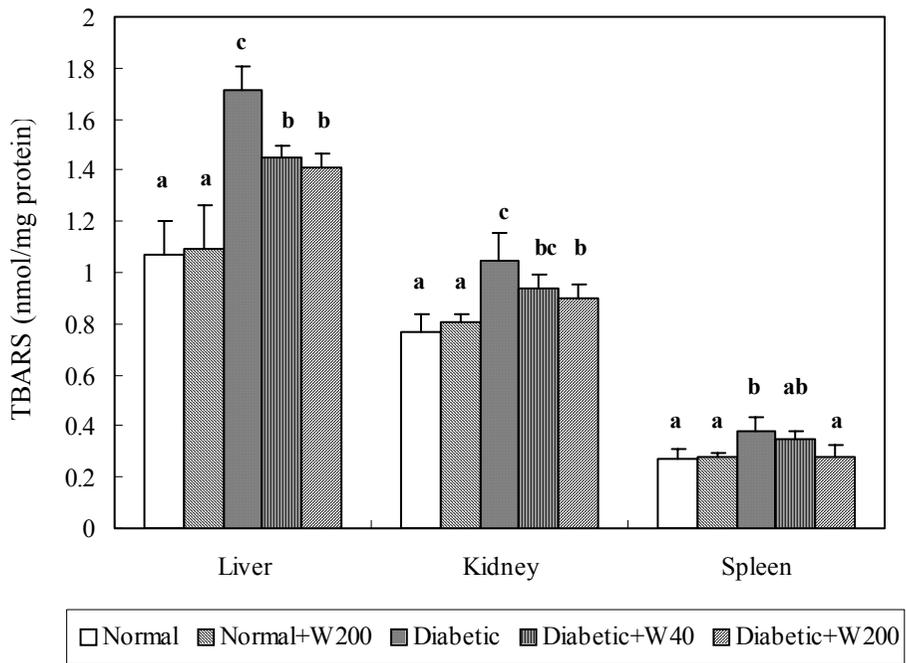


Fig. 52. Changes in TBARS in liver, kidney and spleen of wild ginseng leaf extract (WGLE) supplemented rats. Each bar represents the means  $\pm$  SD. Mean values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

8) 장기의 항산화관련 방어효소

STZ 투여로 당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 정상군에 비해 SOD 활성이 유의적으로 감소하였는데 이는 당뇨 유발로 인해 활성산소를 제거하려는 생리적인 적응 현상에서 활성산소가 현저하게 증가하여 이 활성산소를 제거하기 위해 SOD가 초기에 활성화 되다가 나중에 점점 그 활성이 감소하는 것으로 판단된다(Fig. 53). 그러나 장뇌삼 잎 추출물의 투여는 고갈되는 SOD의 활성을 높여주고 있는 것으로 추정되어진다. SOD는 산화적 스트레스에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여하는 금속이온 효소로서 superoxide anion을 반응성이 약한 hydrogen peroxide로 전환시키는 유리기 제거효소로 알려져 있다.

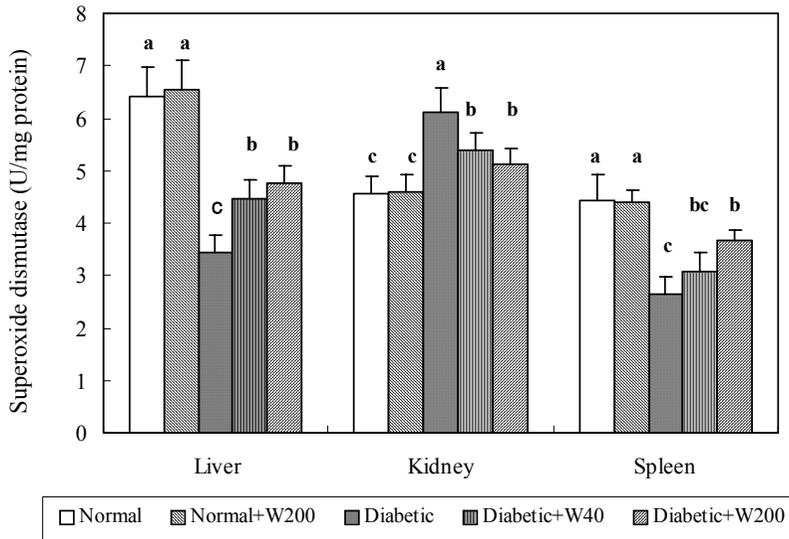


Fig. 53. Activities of superoxide dismutase in liver, kidney and spleen from normal and diabetic rats treated with WGLE. One unit of superoxide dismutase activity is that which produces 50% inhibition of the autoxidation of pyrogallol. Each bar represents the means  $\pm$  SD. Mean values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

한편 CAT(catalase)는 지방의 자동산화와 유기물의 산화 및 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 GSH-Px와 함께 산소나 물로 분해하여 배설시킴으로써 유리기로부터 조직의 손상을 방어하는 효소이다. 장뇌삼 잎 추출물을 투여한 실험쥐의 경우 간에서의 CAT의 활성은 당뇨 대조구에 비해 높은 활성을 나타냈는데(Fig. 54 및 Fig. 55), 그 이유로는 당뇨 유발에 따른 활성산소종의 증가에 의해 방어 효소인 CAT가 고갈되어진 때문인 것으로 사료된다.

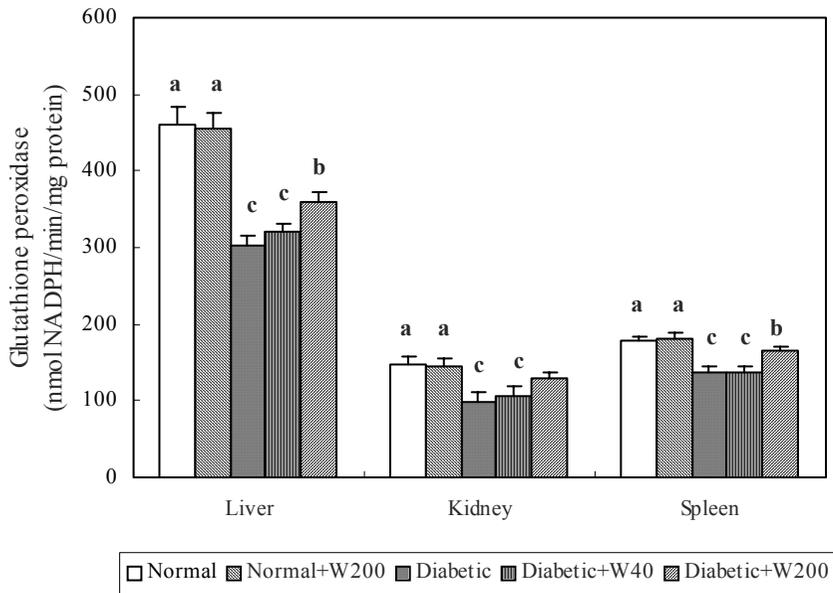


Fig. 54. Activities of glutathione peroxidase in liver, kidney and spleen from normal and diabetic rats treated with WGLE. One unit of glutathione peroxidase activity oxidizes 1 nmol of NADPH/min at 30°C. Each bar represents the means  $\pm$  SD. Mean values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

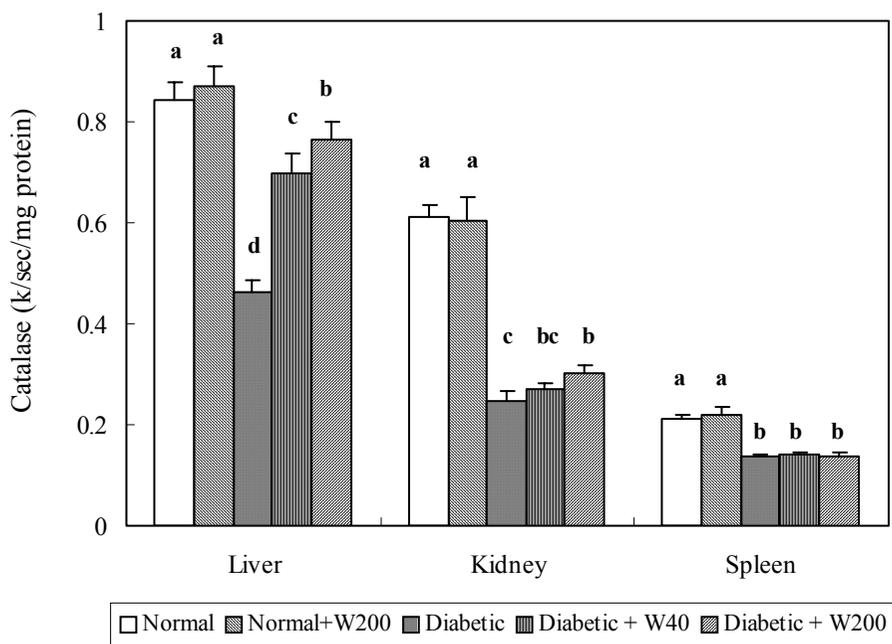


Fig. 55. Activities of catalase in liver, kidney and spleen from normal and diabetic rats treated with WGLE. The enzyme activity was expressed as k/sec/mg protein, where k is the rate constant of a first order reaction. Each bar represents the means  $\pm$  SD. Mean values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 2. 장뇌삼 잎을 이용한 가공식품 개발

최근 들어 건강에 대한 국민의 관심이 날로 높아져가고 있고 식품을 맛있게 섭취하면서도 건강을 유지할 수 있는 기능성 식품에 대한 요구가 증대되고 있는 실정이다. 따라서 현재까지 적절한 가공방법이 개발되어 있지 않아 산야에 그대로 방치하여 겨울철 낙엽으로 일생을 마감하는 장뇌삼 잎을 이용하여 기호성과 기능성이 높은 차류 형태의 가공식품으로 상품화함과 동시에 잎에 다량 함유되어 있는 사포닌, 천연 항산화성분 등 가치 있는 기능성 물질들을 적절히 추출, 분리하여 가공식품의 원료로 활용할 경우 국내산 장뇌삼의 부가가치를 극대화시킬 수 있을 것으로 전망된다.

본 시험에서는 장뇌삼 잎의 볶음정도에 따른 관능특성 및 사포닌 등 활성성분의 변화를 조사하여 장뇌삼 잎 볶음차의 적정 가공방법을 확립함과 동시에 장뇌삼 잎차의 향미개선을 위한 방법으로서 베타-사이클로덱스트린 등의 첨가에 의한 쓴맛 성분을 줄일 수 있는 방안을 모색하였다. 또한 장뇌삼 잎 추출물을 대상으로 하여 열, pH 등에 대한 안정성을 조사하여 가공을 위한 기초자료를 마련함과 동시에 장뇌삼 잎차 에탄올 추출물과 분말을 이용하여 과립차, 양갱, 캔디, 껌 등에 식품소재로 활용할 수 있는 방안을 강구하였다.

### 가. 볶음처리 정도가 잎차의 특성에 미치는 영향

#### 1) 관능특성

장뇌삼 잎을 볶음처리하면 생잎 특유의 풋내와 같은 관능적으로 바람직하지 않은 향미는 감지할 수 없게 됨과 동시에 가열처리에 의해 아미노-카보닐 반응과 같은 갈변반응이 일어나 차로서 바람직한 새로운 향미물질이 생성되지만 가열처리가 과도한 경우 탄 냄새 등 관능적으로 좋지 않은 향미가 생성되므로 가열처리 정도는 볶음차의 관능적 특성에 큰 영향을 미치게 된다. 본 시험에서는 볶음정도를 달리하여 잎차를 조제하고 이들의 관능적 특성을 조사하였다. 즉 장뇌삼 잎을 180℃로 조정된 볶음 솥에서 1회 2분간 볶은 후 유념을 하는 방식으로 각각 5,7,9,11,13회 반복하여 조제한 시료에 대해서 관능평가를 통하여 적정 볶음 조건을 설정하고자 하였다.

장뇌삼 잎차의 가공에 대해서는 지금까지 거의 보고된 바 없어 우선 상기 방법에 따라 조제한 잎차에 대해서 패널요원에 의해 감지된 특성을 완전하게 묘사

하고, 제품의 선호에 중요한 관능적 특성을 결정하는데 기본적인 자료를 제공하며, 특정 원료와 가공조건이 제품의 관능 특성의 변화에 어떻게 영향을 주는지를 알아내는데 도움을 주게 된다. 즉 장뇌삼 잎차에서 감지된 향으로서는 해초냄새, 풀냄새, 구수한 향, 조미향의 4 그룹으로 크게 구분할 수 있었으며, 맛으로는 신맛, 쓴맛, 짙은 맛, 단맛, 비린 맛으로 관능특성을 구분하였다.

장뇌삼 잎차의 경우 Table 54에 나타낸 바와 같이 향의 경우 더움 횟수가 증가하면서 구수한 향이 증가하고 풀냄새와 해초향이 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 54. Changes in aroma of wild ginseng leaf tea at different roasting times

Number of roasting	Grassy	Seaweed	Roasted nutty	Seasoned <sup>NS</sup>
5	3.7 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	1.50 <sup>a</sup>	2.17
7	2.8 <sup>b</sup>	4.0 <sup>a</sup>	2.00 <sup>ab</sup>	1.67
9	2.7 <sup>b</sup>	3.8 <sup>ab</sup>	2.33 <sup>b</sup>	2.17
11	2.5 <sup>b</sup>	3.7 <sup>ab</sup>	2.17 <sup>ab</sup>	2.33
13	2.4 <sup>b</sup>	3.5 <sup>b</sup>	3.33 <sup>b</sup>	2.50

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). NS is not significantly difference.

한편 맛의 경우에 있어서도 더움 횟수의 증가는 장뇌삼 잎차의 쓴맛과 짙은맛을 상대적으로 줄이고 구수한 맛을 증가시키는 역할을 하는 것으로 나타났는데 이는 가열처리 정도가 강해질수록 2차적으로 생성되는 향미성분에 의해 장뇌삼 잎의 쓴맛과 짙은맛이 상대적으로 masking됨에 따른 결과로 해석되며 또 다른 요인으로서 사포닌과 플라보노이드 함량의 감소에 따른 결과로 판단된다.

한편 더움 횟수에 따른 장뇌삼 잎차의 선호도를 조사한 결과 더움 횟수가 증가함에 따라 선호도는 점차 높아지는 경향을 나타내었는데 이는 앞서서도 언급한 바와 같이 더움 처리에 의해 장뇌삼 생잎에서 감지되는 차로서 바람직하지 못한 풀냄새 또는 쓴맛 등의 향미가 감소 또는 masking됨에 따른 결과로 생각된다. 반면 더움 횟수 9-13회 사이에는 선호도에 있어 유의차는 나타나지 않았다.

그러나 사포닌 및 기타 폴리페놀화합물 등 유효성분의 가열처리에 의한 안정성을 고려할 때 9회의 덥음 처리가 가장 바람직한 것으로 판단되었다(Table 55 및 Table 56).

Table 55. Effects of repeating roasting on sensory scores in the wild ginseng leaves

	Sour	Bitter	Astringent	Sweet	Fish flavor	Palatability
5	2.83	6.17 <sup>a</sup>	5.67 <sup>a</sup>	2.17 <sup>a</sup>	2.50 <sup>a</sup>	0.83 <sup>a</sup>
7	3.00	5.33 <sup>ab</sup>	4.17 <sup>b</sup>	2.17 <sup>a</sup>	2.17 <sup>a</sup>	1.33 <sup>a</sup>
9	2.67	4.17 <sup>b</sup>	4.17 <sup>b</sup>	2.67 <sup>ab</sup>	2.17 <sup>a</sup>	1.50 <sup>b</sup>
11	2.33	3.83 <sup>b</sup>	3.33 <sup>c</sup>	3.00 <sup>b</sup>	1.67 <sup>b</sup>	1.33 <sup>a</sup>
13	2.67	3.50 <sup>c</sup>	3.33 <sup>c</sup>	3.00 <sup>b</sup>	1.00 <sup>c</sup>	3.00 <sup>c</sup>

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). NS is not significantly difference.

Table 56. Overall preference of wild ginseng leaf tea by repeating roasting

	5	7	9	11	13
Overall preference	1.3 <sup>a</sup>	2.5 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>	3.8 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

## 2) 사포닌

장뇌삼 잎을 180℃로 조정된 덥음 솥에서 1회 2분간 덥은 후 유념하는 방식으로 5, 7, 9, 11, 13회 반복하여 덥음차를 제조하는 동안에 덥음처리 정도가 사포닌의 성분 변화에 미치는 결과를 조사하였다. 그림은 덥음 횟수에 따른 사포닌의 성분 변화를 HPLC 크로마토그램으로 나타내었으며(Fig. 56), 각 성분의 함량을 측정된 결과는 Table 57과 같다. 11회 덥음처리 동안에는 유의적인 감소는 없었으나 13회를 반복하여 덥은 경우 각 성분들이 유의적으로 감소하는 것으로 나타

나, 장뇌삼 잎차를 제조할 경우 볶음 횟수는 장뇌삼 잎차의 품질에 영향을 미치는 중요한 요소가 될 것으로 사료된다.

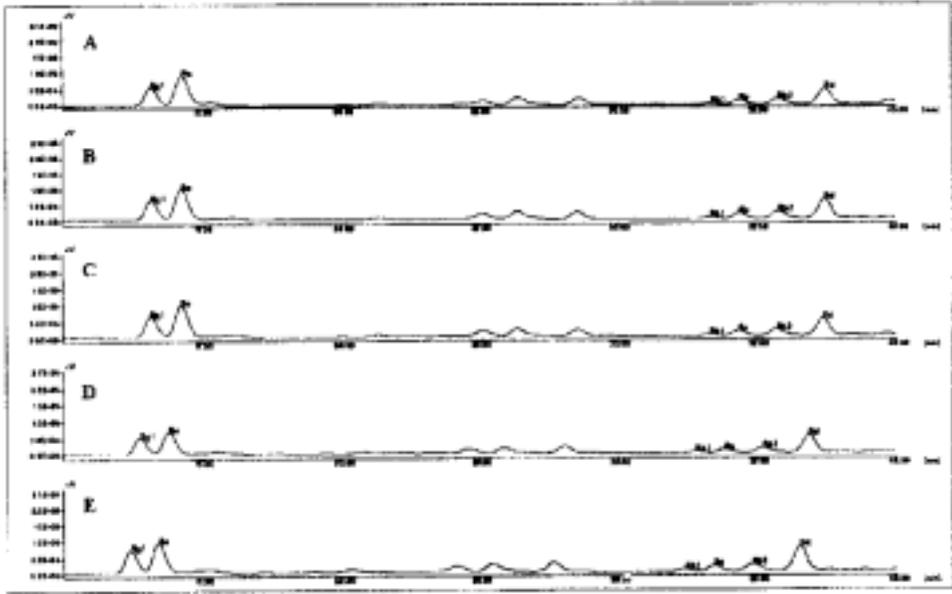


Fig. 56. HPLC chromatogram of ginsenosides in wild ginseng leaves with repeating roasting. fresh leaves (A), roasted 7 times (B), 9 times (C), 11 times (D) and 13 times (E) at 180°C for 2 min.

Table 57. Effects of repeating roasting on the contents of ginsenosides in the wild ginseng leaves.

Ginsenosides	Number of roasting <sup>1)</sup> (% , dry basis)				
	0	7	9	11	13
Rg <sub>1</sub>	2.87±0.11 <sup>a</sup>	2.83±0.01 <sup>a</sup>	2.82±0.03 <sup>a</sup>	2.79±0.13 <sup>a</sup>	2.58±0.08 <sup>b</sup>
Re	5.50±0.13 <sup>a</sup>	5.28±0.10 <sup>b</sup>	5.12±0.18 <sup>b</sup>	5.08±0.18 <sup>bc</sup>	4.89±0.08 <sup>c</sup>
Rf	-	-	-	-	-
Rb <sub>1</sub>	0.29±0.01	0.32±0.03	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.30±0.01	0.29±0.02
Rc	0.81±0.01 <sup>a</sup>	0.93±0.03 <sup>a</sup>	0.96±0.01 <sup>a</sup>	0.90±0.03 <sup>a</sup>	0.82±0.03 <sup>b</sup>
Rb <sub>2</sub>	1.42±0.08 <sup>a</sup>	1.38±0.12 <sup>a</sup>	1.50±0.01 <sup>a</sup>	1.39±0.25 <sup>ab</sup>	1.28±0.02 <sup>b</sup>
Rd	3.35±0.09 <sup>a</sup>	3.15±0.09 <sup>a</sup>	3.21±0.14 <sup>a</sup>	3.11±0.09 <sup>b</sup>	3.08±0.06 <sup>b</sup>
Total	14.23±0.16 <sup>a</sup>	13.87±0.36 <sup>a</sup>	13.91±0.37 <sup>a</sup>	13.56±0.68 <sup>ab</sup>	12.93±0.29 <sup>b</sup>
PD/PT <sup>2)</sup>	0.70±0.02	0.71±0.02	0.75±0.01	0.72±0.02	0.73±0.01

<sup>1)</sup>Roasting was performed at 180°C for 2 min

<sup>2)</sup>PD (panaxadiol ginsenosides), Rb<sub>1</sub>+Rb<sub>2</sub>+Rc+Rd, PT (panaxatriol ginsenoside), Re+Rf+Rg<sub>1</sub>

<sup>a-c</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05), Data are expressed as mean±SD (n=3)

### 3) 페놀성물질

장뇌삼 잎 성분 중 항산화 활성에 영향을 미치는 페놀성물질의 변화를 측정된 결과는 Table 58에 나타난 바와 같이 볶음 횟수의 증가가 페놀성물질에 크게 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 볶음 처리하지 않은 경우 856.6 mg%였던 페놀성물질이 11회 이상 볶음처리를 하는 동안 728.7 mg%로 감소하였으며 13회 이상에서는 690.9mg%로 약 페놀성물질이 200mg% 감소하는 것으로 나타내었다.

Table 58. Effects of repeating roasting on phenolic compounds in the wild ginseng leaves

	Number of roasting <sup>1)</sup> (mg%, dry basis)				
	0	7	9	11	13
Phenolics	856.6±22.2	844.5±21.0	811.2±1.0	728.7±5.1	690.8±20.3

<sup>1)</sup>Roasting was performed at 160°C for 2 min

<sup>a-d</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05). Data are expressed as mean±SD (n=3)

#### 나. 장뇌삼 잎차의 적정 음용조건

관능평가에서 가장 선호도가 높은 것으로 나타난 잎차를 시료로 사용하여 장뇌삼 잎차의 적정 음용농도를 조사하였다. 즉 잎차 1 g에 각 온도별 물 100 mL을 가하여 60-90°C의 온도 대에서 30초, 2분, 4분, 6분, 8분, 10분간 천천히 흔들며 주면서 용출시킨 후 즉시 여과하여 추출액을 얻은 다음 색깔변화, 사포닌의 함량 및 관능평가를 실시하였다.

L값은 각 온도 대에서 시간의 경과와 함께 모두 증가하였고(Table 59), 투과도의 경우 점차 낮아졌으며 온도가 높을수록 그 경향은 더욱 현저하였다(Table 60). 한편 수치로 나타내지는 않았으나 색깔과 맛에 대한 관능평가의 결과 60°C에서 용출시간 4분의 것이 가장 기호성이 높은 것으로 평가되어 장뇌삼 잎차의 경우에는 60°C 정도의 온수로 4분 정도 침출한 후 음용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

한편 침출시간의 경과에 따른 사포닌의 함량을 HPLC로 측정하였으며 90°C에서의 용출결과를 Table 61에 나타내었는데 침출시간의 경과와 함께 용출되는 ginsenoside의 양이 점차 많아짐과 동시에 관능평가에 의한 쓴맛의 감지정도 역시 점차 증가하는 경향이였다.

상기의 결과를 토대로 하여 180°C에서 9회 덩유처리하여 얻은 장뇌삼 잎차를 0.05 g-0.4 g/100 mL의 범위에서 적정음용 수준을 관능검사를 통하여 검토한 결과(Table 62), 0.2 g/100 mL 이상에서는 쓴맛이 과도하게 느껴졌고 0.05 g/100 mL 수준에서는 잎차로서의 향미발현이 미약하였다. 따라서 0.1 g/100 mL 처리구의 것이 가장 선호도가 높은 것으로 나타났다.

Table 59. Color and color difference meter readings of wild ginseng leaf tea during percolating at 90°C

mi \ °C	L				a				b			
	60	70	80	90	60	70	80	90	60	70	80	90
0.5	22.32	46.97	22.38	25.45	-0.88	-3.02	-1.19	-1.50	-1.86	-1.70	-1.64	-1.32
2	24.05	57.78	28.72	26.20	-1.54	-4.56	-2.00	-1.77	-0.85	-0.91	-0.77	-0.08
4	24.63	28.50	23.55	30.28	-1.60	-2.35	-1.98	-2.56	0.38	0.22	1.39	3.80
6	26.38	40.18	22.65	27.86	-1.73	-3.78	-2.12	-2.57	0.64	0.74	2.80	4.29
8	27.98	42.35	26.42	27.86	-2.31	-4.42	-2.82	-2.59	2.66	4.96	6.06	6.08
10	28.47	38.18	28.46	28.27	-2.37	-4.15	-2.71	-2.60	3.34	4.74	6.42	6.41

Table 60. Turbidity (T%) of wild ginseng leaf tea during percolating at 90°C

min \ °C	% T			
	60	70	80	90
0.5	95.66	87.65	85.60	70.61
2	87.09	77.84	78.32	54.17
4	84.59	69.79	70.72	63.04
6	83.45	64.02	61.72	51.17
8	76.58	52.86	52.16	54.36
10	73.71	53.99	48.76	44.10

Table 61. Changes of ginsenosides contents in hot water(90°C) percolate of wild ginseng leaf tea

Time (min)	Ginsenosides (mg/100g of ginseng leaf tea)					
	Rg <sub>1</sub>	Re	Rb <sub>1</sub>	Re	Rb <sub>2</sub>	Rd
2	171.9	338.1	-	70.3	65.7	172.7
6	725.2	1,344.2	22.2	142.1	213.2	505.4
10	1,240.6	1,609.3	47.7	217.9	305.6	651.2

Table 62. Overall preference of wild ginseng leaf tea at various concentration

	Concentrations (g/100 mL of water)			
	0.05	0.1	0.2	0.4
Overall preference	3.8 <sup>b</sup>	4.5 <sup>c</sup>	2.2 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

#### 다. 쓴맛성분의 분획

장뇌삼 잎에서 강하게 발현되는 쓴맛성분의 본체를 구명하고자 쓴맛을 이루는 획분을 칼럼크로마토그래피와 관능평가를 통하여 검토하였다. 즉 장뇌삼 잎을 75% 에탄올로 추출한 후 감압농축을 하여 Sepabeads SP-850 이온교환수지로 충전한 칼럼에 넣고 물로 세척한 다음 75% 에탄올로 흡착성분을 탈착하였다. 이 때 물로 세척된 분획물에서는 쓴맛이 전혀 느껴지지 않았고 75%로 탈착한 분획물에서 강도가 높은 쓴맛을 나타내었다. 따라서 쓴맛 성분이 대부분 함유하고 있는 75%로 탈착한 분획물을 좀 더 세밀하게 분리코자 Sephadex LH-20 컬럼에 투여하여 메탄올로 용출하여 각 화합물간의 분자량과 구조적인 특성에 따라 분리하였다. Fig. 57과 같이 7개의 분획물로 분리하였고 각각의 분획물에 대해 쓴맛 정도를 관능적 특성을 이용하여 측정하였다. 20명의 패널들에 대해서 동일 농도에 대해서 쓴맛의 정도를 5점법으로 표기하도록 한 결과(Table 63), 분획물 1번과 2번에서 쓴맛은 대부분 강하게 느꼈으나 3-7번은 거의 쓴맛을 느끼지 못하였으며 특히 1번 분획물이 가장 강한 쓴맛을 나타내어 이를 HPLC로 재차 분리하였다.

HPLC로 9개의 분획물로 분리되었고(Fig. 58) 각 획분을 농축하고 적절히 물로 써 희석한 다음 쓴맛의 강도를 관능으로 평가하였다(Table 64). 인삼뿌리의 경우 사포닌이 대표적인 쓴맛성분으로 알려져 있다. 장뇌삼 잎의 경우 분획물 2와 3 그리고 6-8은 사포닌의 표준품과 retention time이 일치하는 것으로 나타나 장뇌삼 잎의 경우에도 사포닌 성분들은 쓴맛에 크게 기여하는 것으로 판단된다. 그러나 분획물 1, 4 및 5의 경우 사포닌은 아니지만 이들 역시 강도 높은 쓴맛을 나타내었다. 따라서 장뇌삼 잎에서 발현되는 쓴맛의 본체는 단일물질이 아니라 여

러 가지 화합물의 혼존에 의한 것으로 생각된다. 향후 장뇌삼 잎의 쓴맛성분을 보다 명확히 구명하기 위해서는 이들 분획물을 더욱 정제하고 기기분석을 통한 구조해석을 수행해야 할 것으로 생각된다.

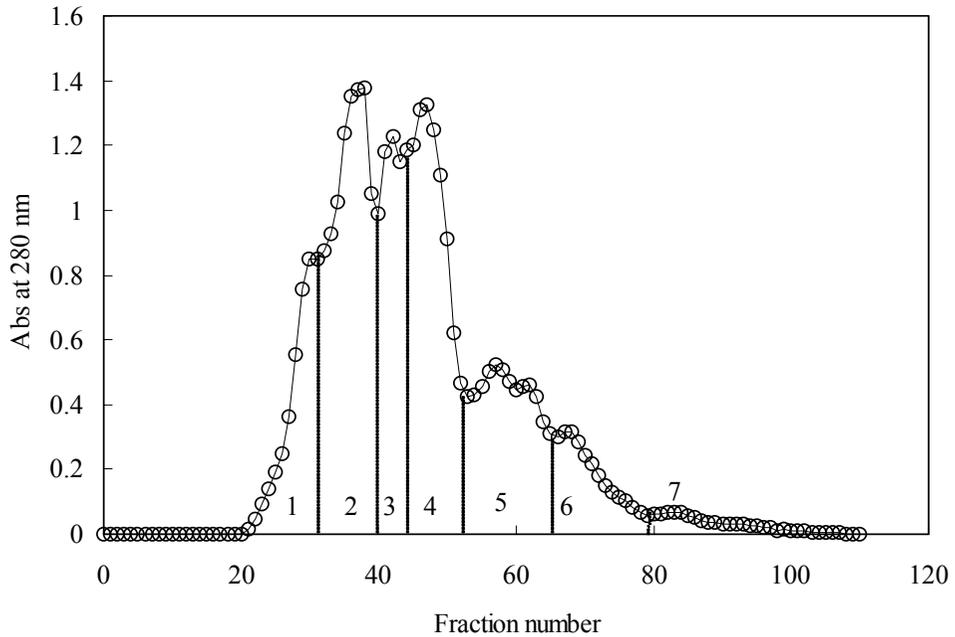


Fig. 57. Separation of bitter fraction by Sephadex LH-20 column chromatography.

Table 63. Intensity of bitter fractions in wild ginseng leaf tea separated by Sephadex LH-20 column chromatography

	Fractions						
	1	2	3	4	5	6	7
Bitter	+++++	+++	+	-	-	-	-

Intensity: very weak (-) ----- very strong (+++++)

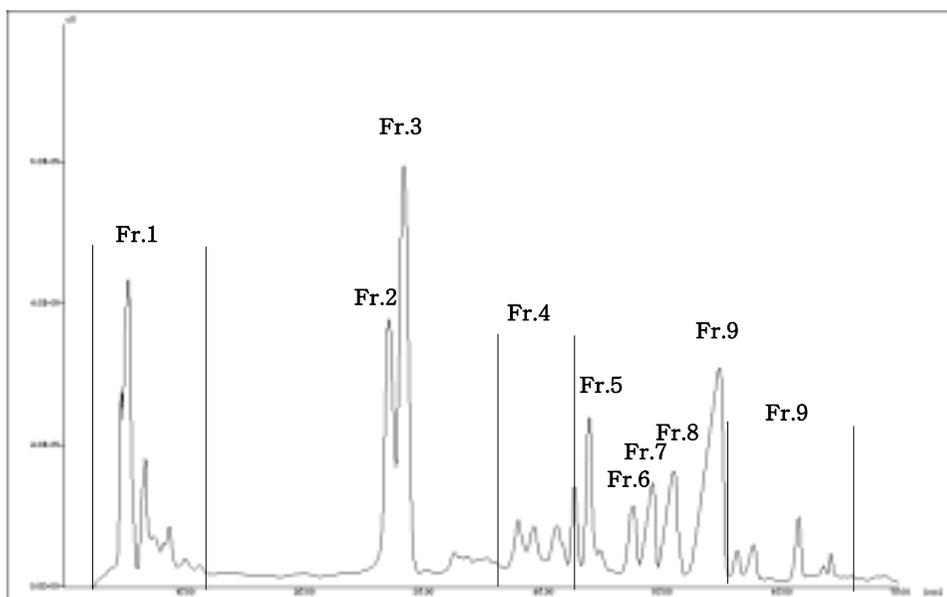


Fig. 58. Separation of bitter compounds in wild ginseng leaf tea by HPLC.

Table 64. Intensity of bitter compounds in wild ginseng leaf tea separated by HPLC

	Compounds								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bitterness	++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	+++	+

Intensity: very weak (-) ----- very strong (+++++)

### 라. 장뇌삼 잎차의 향미 개선기술 개발

장뇌삼 잎차에 대해서 패널요원이 감지된 관능적 특성을 말로 표현하고 이를 수치화할 수 있도록 용어를 선정할 결과 냄새성분으로는 해초냄새, 풀냄새, 구수한 냄새, 조미향의 4그룹으로, 맛 성분으로는 신맛, 쓴맛, 떫은맛, 단맛, 비린 맛을 느끼는 것으로 조사되었다.

이들 중 해초 향, 풀냄새, 그리고 떫은 맛, 비린 맛, 쓴맛 등과 같은 향미가 강

할 경우 식품으로서는 바람직하지 않기 때문에 이를 제거 또는 마스킹 할 수 있는 방안을 검토하였다. 이를 위해 본 시험에서는 장뇌삼 생잎을 덫기에 알맞은 크기(2x2cm)로 세절한 다음 말토덱스트린 또는 사이클로덱스트린을 장뇌삼 잎 중량에 대해 1-7%가 되게 첨가하여 혼합한 다음 180℃에서 덫음과 유념을 반복하여 잎차를 조제하고 이들 소재의 첨가가 장뇌삼 잎차의 향과 맛에 미치는 영향을 훈련된 패널들을 대상으로 9점법으로 관능검사를 실시한 결과는 Table 65 및 Table 66과 같다. 말토덱스트린의 경우 풀냄새와 해초 향 등 차류제품에는 바람직하지 못한 향의 발현은 7% 이상 첨가 시에 약간의 억제효과가 나타난 반면, 장뇌삼 잎차에서 강하게 나타나는 쓴맛과 떼은맛의 제거 또는 마스킹효과는 그다지 크지 않았다. 특히 말토덱스트린의 첨가수준이 7% 이상인 경우 음용시 입안에서의 감촉이 좋지 못한 것도 지적되어 말토덱스트린의 사용은 바람직하지 않을 것으로 판단된다.

Table 65. Sensory characteristics for aroma of maltodextrin added leaf tea

Conc.(%)	Grassy	Seaweed <sup>NS</sup>	Roasted nutty <sup>NS</sup>	Seasoned <sup>NS</sup>
0	2.3 <sup>a</sup>	4.3	1.7	1.7
1	2.2 <sup>a</sup>	3.7	2.7	0.8
3	2.4 <sup>a</sup>	4.5	2.2	1.0
5	2.8 <sup>a</sup>	4.6	2.2	1.2
7	1.6 <sup>b</sup>	3.6	2.2	1.2

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

Table 66. Sensory characteristics of leaf tea by different ratio of maltodextrin additives

Conc.(%)	Sour	Bitter <sup>NS</sup>	Astringent <sup>NS</sup>	Sweet <sup>NS</sup>	Fish flavor
0	2.0 <sup>a</sup>	3.4	4.0	3.2	2.2 <sup>ab</sup>
1	2.8 <sup>b</sup>	3.0	4.4	2.8	2.6 <sup>b</sup>
3	2.2 <sup>b</sup>	3.4	4.6	3.0	1.8 <sup>a</sup>
5	1.8 <sup>a</sup>	3.4	4.0	2.6	2.4 <sup>ab</sup>
7	1.8 <sup>a</sup>	3.2	4.0	2.8	2.4 <sup>ab</sup>

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

따라서 포도당이 환상구조로 이루어진 베타-사이클로덱스트린의 첨가효과를 검토하였다. 사이클로덱스트린은 전분을 기질로 하여 효소(CGTase)에 의해 생성되는 환상의 비환원성 전분유도체(말토올리고당)로서 독성이 없으며 위장간 상부에서는 흡수되지 않지만 대장균에 의해 완전히 자화된다. 사이클로덱스트린은 향미성분 및 기타 불안정한 물질들의 분자캡슐화를 위한 담체로서 주로 식품에 사용되지만 그 밖의 분야에서도 활용도가 점차 개발되어져 가고 있다. 사이클로덱스트린은 분자크기의 “속이 비어있는 캡슐”로 생각할 수 있다. 따라서 향기성분과 사이클로덱스트린의 복합체는 분자크기에서의 캡슐화작용이다. 자몽 또는 만다린 주스의 쓴맛을 나타내는 나린진과 리모닌은 베타-사이클로덱스트린과 안정된 포접복합체를 형성하는데 그 결과 용액에 존재하는 유리형태의 쓴맛성분을 감소시키게 되는 것으로 알려져 있다. 본 시험에서는 사이클로덱스트린이 텁음 앞차의 맛과 향미에 미치는 영향을 혼련된 패널들을 대상으로 관능검사를 실시한 결과(Table 67 및 Table 68), 5% 수준의 사이클로덱스트린의 첨가는 장뇌삼 앞에서 발현되는 해초 향과 풀냄새를 유의적으로 마스킹 할 뿐만 아니라 맛의 경우에는 특히 쓴맛과 떫은맛을 유의적으로 약화시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 67. Effects of  $\beta$ -cyclodextrin concentration on the aroma of wild ginseng leaf tea.

Conc. (%)	Grassy	Seaweed	Roasted nutty	Seasoned
0	2.5 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	2.0	0.8
1	2.8 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>	1.3	1.3
3	2.0 <sup>ab</sup>	4.7 <sup>a</sup>	1.3	1.3
5	1.5 <sup>b</sup>	2.5 <sup>c</sup>	2.2	1.7
7	1.8 <sup>ab</sup>	3.5 <sup>b</sup>	1.2	1.8

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). NS is not significantly difference. Rating scale: from 1 (very bad) to 9 (very good)

Table 68. Effects of  $\beta$ -cyclodextrin on the taste of wild ginseng leaf tea

Conc. (%)	Sour <sup>NS</sup>	Bitter	Astringent	Sweet <sup>NS</sup>	Fish flavor <sup>NS</sup>
0	1.3	5.2 <sup>a</sup>	5.5 <sup>a</sup>	2.7	2.3
1	2.2	4.3 <sup>a</sup>	5.2 <sup>a</sup>	2.6	2.2
3	1.2	3.3 <sup>b</sup>	4.7 <sup>a</sup>	2.3	2.8
5	1.4	2.5 <sup>c</sup>	3.3 <sup>b</sup>	2.5	2.6
7	1.2	2.8 <sup>bc</sup>	3.3 <sup>b</sup>	2.5	1.5

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). NS is not significantly difference. Rating scale: from 1 (very bad) to 9 (very good)

이상의 결과를 종합하여 볼 때 장뇌삼 잎차 제조시 일정량의 사이클로덱스트린을 첨가하는 것은 과도한 쓴맛과 짧은 맛 그리고 차의 향으로서 바람직하지 않은 것으로 평가된 풀냄새와 해초 향 등의 발현을 억제할 수 있는 좋은 방안인 것으로 나타났다.

#### 마. 건엽을 이용한 잎차 제조기술 개발

장뇌삼 생잎의 채취시기가 8월 말-9월 초순경이므로 이때는 아직 한낮의 기온은 높은 상태에 있다. 따라서 장뇌삼 잎을 채취한 당일 모두 덩음차로 대량 처리할 수 없을 경우 장뇌삼 잎은 시간의 경과에 따른 품질저하를 초래하게 된다. 따라서 채취한 장뇌삼 잎은 일단 증기처리 (98℃, 30-180초)하여 잔존해 있는 산화효소를 불활성 시킨 다음 40℃의 열풍건조기에서 건조시켜 건엽의 형태로 처리하여 년 중 가공용 원료로 사용할 수 있도록 저장성을 부여하였다. 이와 같이 하여 얻어진 장뇌삼 건엽을 덩음차로 가공할 경우에는 증기로 재차 처리하여 건조된 장뇌삼을 재수화시킴에 의해 건조된 잎이 가공 중 부서지지 않게 유연성을 부여한 다음 덩음차 제조공정에 따라 다음과 같이 잎차의 형태로 가공처리할 수 있는 새로운 방법을 개발하였다.

Table 69는 건엽을 복원 후 덩음 처리한 시료와 생잎을 덩음 처리한 시료간의 관능적 특성을 비교한 것이다. 훈련된 패널에 의해 각 시료에 대해서 색깔과 장뇌삼 잎차에서 기호도에 크게 영향을 미치는 쓴맛에 대해 관능검사를 실시한 결

과 건엽을 복원한 다음 뒤음 처리를 한 시료가 쓴맛이 약간 감소하였고 전반적인 기호도도 약간 높았지만 두 시료간의 큰 차이는 없었다. 이러한 결과는 장뇌삼 잎을 대량 처리 시 스팀처리 후 건조한 다음 장뇌삼 잎을 장시간 저장하더라도 맛에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

Table 69. Sensory scores of roasted tea after restoration

	Color	Bitter	Overall preference
Rehydrated leaf tea	3.5±0.6 <sup>a</sup>	6.3±0.7 <sup>NS</sup>	5.5±1.2 <sup>NS</sup>
Fresh leaf tea	4.5±0.7 <sup>b</sup>	7.0±1.2 <sup>NS</sup>	4.5±0.7 <sup>NS</sup>

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). NS is not significantly difference.

또한, 건엽을 이용한 잎차 제조 시 시료의 기능성 성분의 변화에 대해서도 측정하였다. 그 결과 증기처리와 건조과정을 거침에 따라 사포닌 성분과 페놀성물질이 다소 감소하는 것으로 확인되었으나 대부분의 사포닌 성분들과 페놀성물질은 이 과정을 거치더라도 대체로 안정된 형태로 존재하는 것을 확인 할 수 있었다(Table 70 및 Table 71).

Table 70. Change in content of ginsenosides of roasted tea after restoration

Ginsenosides	Fresh leaf tea	Rehydrated leaf tea
Rg <sub>1</sub>	2.45±0.13 <sup>a</sup>	2.28±0.08 <sup>b</sup>
Re	4.08±0.18 <sup>bc</sup>	4.09±0.08 <sup>c</sup>
Rb <sub>1</sub>	0.30±0.01	0.21±0.02
Rc	0.90±0.03 <sup>a</sup>	0.72±0.03 <sup>b</sup>
Rb <sub>2</sub>	1.29±0.25 <sup>ab</sup>	1.18±0.02 <sup>b</sup>
Rd	3.21±0.09 <sup>b</sup>	3.08±0.06 <sup>b</sup>
Total	13.56±0.68 <sup>ab</sup>	12.93±0.29 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05), Data are expressed as mean±SD (n=3)

Table 71. Content of phenolics of roasted tea after restoration

	Fresh leaves	Rehydrated leaves
Phenolics	844.53±21.03	728.72±5.06

<sup>a-d</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05). Data are expressed as mean±SD (n=3)

## 바. 가공적성 검토

### 1) 추출용매별 추출수율 및 성분변화

재배삼과 장뇌삼 잎차로부터 추출용매의 극성에 따라 물, 메탄올, 에탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디에틸에테르 등을 사용하여 추출율을 검토하여 본 결과는 Table 72와 같다. Table 72에서 보는 바와 같이 본 실험에 사용된 7종의 추출용매는 극성이 클수록 수율이 높기는 하지만 그 차이는 그다지 크지는 않았다. 그리고 재배삼보다 장뇌삼 잎차에서 추출수율이 높게 측정되었다. 일반적으로 인삼의 경우 뿌리에 비해 잎이 상대적으로 용매에 대한 추출수율이 높은 것으로 보고되어 있다. 이는 잎에 비해 뿌리의 경우 총당과 전분질 함량이 높은 반면 잎에는 알코올류에 잘 추출되는 사포닌과 chlorophyll 및 crude fat 등과 같은 지용성성분의 함량이 높기 때문인 것으로 추정된다.

Table 72. Yields of solvent extracts from ginseng leaf tea

Solvent	Cultivated (%)	Wild (%)
Water	37.50	40.45
Methanol	36.56	38.43
Ethanol	26.17	30.63
Acetone	20.56	23.06
Ethyl acetate	7.48	6.56
Chloroform	4.63	4.61
Diethyl ether	3.74	4.07

한편 장뇌삼 잎의 채취시기에 따른 뚜렷한 성분상의 변화는 나타나지 않았기 때문에 채취시기별 추출수율의 비교는 큰 의미가 없다고 사료되어 채취시기가 다른 장뇌삼 잎을 사용하여 추출용매로서 물, 메탄올, 에탄올 등 3종의 용매로 추출할 경우 기능성성분으로서의 지표물질이 될 수 있는 항산화성분 및 사포닌 함량의 변화를 조사한 결과 채취시기에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다(Table 73).

Table 73. Yields of solvent extracts from wild ginseng leaves.

Solvent	Wild (g/100 g of ginseng leaves, dry basis)	
	17 Aug.	5 Sep.
Water	46.03±1.00	45.76±0.67
Methanol	38.26±1.11	37.56±1.23
Ethanol	34.61±1.80	33.87±1.23

Values are means of three replicates±standard deviation.

한편 각 용매별 추출물의 항산화성분으로서 비타민 C, 플라보노이드 및 총 페놀성물질의 함량을 측정된 결과는 Table 74와 같다. 물 추출물은 비타민 C와 페놀성물질의 함량이 높게 측정 되었으나 플라보노이드 함량은 다른 용매 추출물에 비해 아주 낮게 나타났다.

Table 74. Contents of ascorbic acid, total phenolics, total flavonoids in water, ethanol and methanol extracts of ginseng leaves (mg/100 g of ginseng leaves, dry basis)

Extracts	Ascorbic acid		Total phenolics		Total flavonoids	
	17 Aug	5 Sep	17 Aug	5 Sep	17 Aug	5 Sep
Water	24.0±1.2	25.2±0.9	811.2±12.5	824.8±11.2	85.6± 5.7	94.1± 9.2
Methanol	9.0±1.8	7.4±1.9	753.6±10.9	764.7±21.0	237.4±23.0	228.4±17.2
Ethanol	10.1±0.8	14.0±2.8	644.2±28.2	654.2±22.2	331.1± 5.9	320.9±10.8

Values are means of three replicates±standard deviation.

물 추출물의 경우 수율이 높음에도 불구하고 사포닌 함량은 에탄올과 메탄올 추출물에서 더 높게 나타났다(Table 75). 이와 관련하여 열수 추출물은 수율이 높음에도 불구하고 플라보노이드와 사포닌의 함량이 낮고, 에탄올과 메탄올 추출물은 사포닌과 플라보노이드 함량이 높으나 수율과 다른 항산화 성분이 낮게 측정되었다. 따라서 수율을 극대화하고 유용성분이 보다 많이 추출되도록 하기 위해서는 물과 다른 용매와의 적절한 비율이 바람직한 것으로 판단되어 식품가공용으로 사용이 가능한 에탄올과의 혼합 실험을 수행하였다.

즉 장뇌삼 잎을 각 에탄올의 농도를 각기 달리하여 60, 70, 80, 90℃로 조정된 water bath에서 2시간 추출(2회 반복) 후 감압 건조하고 건조물의 무게를 측정한 결과는 Table 76과 같다. 추출온도가 증가하면서 수율이 소폭으로 증가였으나 80℃ 이상에서는 추출수율은 차이가 없었다. 또한 에탄올 농도에 따른 추출 수율은 100-50%로 낮아지면서 수율이 증가하였으나 70% 이하부터는 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 온도 80℃, 에탄올 농도는 70% 정도에서 추출하는 것이 수율 면에서 바람직하다고 본다.

Table 75. Contents of ginsenosides in water, ethanol and methanol extracts of ginseng leaves at different collected times (g/100 g of ginseng leaves, dry basis).

Extracts	Collected time											
	17 Aug.						5 Sep.					
	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd
Water	1.39	2.65	0.04	0.09	0.11	0.31	1.38	2.66	0.05	0.08	0.12	0.30
Methanol	2.15	2.49	0.31	0.49	0.89	1.95	2.16	2.48	0.29	0.50	0.88	1.96
Ethanol	2.03	2.65	0.30	0.49	0.92	2.00	2.05	2.65	0.30	0.50	0.91	2.02

Table 76. Yields of ethanol extracts from ginseng leaves at different extracting conditions (mg/100 g of ginseng leaves, dry basis)

(%)	Collected time							
	17 Aug				5 Sep			
	60°C	70°C	80°C	90°C	60°C	70°C	80°C	90°C
50	43.2±0.3	44.3±0.2	45.8±0.3	45.6±0.3	42.9±0.5	43.2±0.6	45.8±0.5	45.7±0.3
60	43.7±0.3	44.2±0.2	45.9±0.3	45.3±0.3	43.2±0.3	43.8±0.6	44.7±0.3	45.1±0.4
70	42.4±0.6	43.5±0.8	45.8±0.4	45.7±1.0	42.3±0.2	43.9±0.5	45.6±0.5	45.5±0.8
80	41.9±0.8	42.7±0.7	43.9±0.2	43.6±0.1	41.3±0.4	42.3±0.5	43.5±0.7	44.3±0.5
90	38.3±0.5	39.1±0.8	40.5±1.4	41.3±0.2	37.4±0.5	39.4±0.2	40.2±0.5	40.8±0.4
100	32.4±0.3	32.3±0.4	33.6±0.5	34.5±0.8	31.2±0.7	33.2±0.5	33.7±0.3	34.4±0.6

Values are means of duplicates±standard deviation.

따라서 추출온도를 80°C 고정하고 에탄올의 농도를 각기 달리하여 추출한 경우 각 추출물의 항산화와 관련된 성분의 변화는 Table 77에 나타내었다. 플라보노이드는 100%에서 가장 높았고 비타민 C와 페놀성물질은 에탄올 70% 농도에서 가장 높은 함량을 나타내었는데 이를 종합적으로 고려하면 70% 농도가 가장 바람직한 것으로 판단되었다.

Table 77. Contents of ascorbic acid, total phenolics, total flavonoids in various ethanol extracts from ginseng leaves (mg/100 g of ginseng leaves, dry basis)

Conc. (%)	Collected time					
	17 Aug,			5 Sep,		
	Ascorbic acid	Total phenolics	Total flavonoids	Ascorbic acid	Total phenolics	Total flavonoids
50	27.72	811.45	165.23	27.45	803.34	174.23
60	21.69	816.11	196.93	23.34	812.33	208.98
70	24.36	823.33	289.02	23.76	831.22	280.34
80	20.21	744.12	299.22	21.23	748.99	289.34
90	15.65	754.42	295.33	14.61	723.44	291.23
100	10.21	671.93	318.33	10.82	672.11	308.34

Values are means of duplicates

또한 사포닌함량의 경우에 있어서도 70-80% 에탄올 농도에서 각 사포닌의 성분이 가장 많이 추출되었으며 채취시기에 따른 차이는 그다지 없는 것으로 나타났다(Table 78).

Table 78. Contents of ginsenosides in various ethanol extracts from ginseng leaves (mg/100 g of ginseng leaves, dry basis)

Conc. (%)	Collection time											
	17 Aug						5 Sep					
	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd
50	1.76	2.65	0.31	0.33	0.62	1.70	1.75	2.61	0.31	0.32	0.63	1.71
60	1.84	2.61	0.42	0.36	0.66	1.78	1.82	2.64	0.43	0.35	0.65	1.77
70	2.35	3.47	0.44	0.48	0.90	2.66	2.34	3.45	0.45	0.48	0.92	2.68
80	2.16	3.21	0.38	0.42	0.80	2.42	2.20	3.23	0.39	0.44	0.82	2.45
90	1.92	2.90	0.42	0.42	0.75	2.34	2.14	2.92	0.37	0.43	0.74	2.32
100	2.12	2.51	0.31	0.35	0.62	2.11	2.10	2.54	0.33	0.37	0.64	2.09

Values are means of duplicates

## 2) 추출횟수에 따른 성분변화

장뇌삼 잎에 70% 에탄올 20 배가량 첨가한 후 80℃ water bath에서 추출을 실시하였으며 1차 추출 시 건물량으로 36.82%가 회수 되었으며 2차 추출에서는 7.24%가 추출되어 최소 2회 추출은 전체 수율의 94%이상을 회수할 수 있는 것으로 나타났으며 또한 페놀성물질과 플라보노이드 함량도 92%와 86%의 회수율을 나타내었다(Table 79 및 Table 80).

Table 79. Yields, total phenolics and flavonoids on repeated extraction time of 70% ethanol extracts from ginseng leaves (mg/100 g of ginseng leaves, dry basis)

Ext. time	Yields (%)	Total phenolics	Total flavonoids
1st	36.82±0.30	584.44	140.23
2nd	7.24±0.48	231.44	80.32
3rd	2.16±0.75	56.55	30.02
4th	0.28±0.12	12.11	5.12
Total	46.72±0.36	884.54	255.69

Values are means of duplicates

Table 80. Contents of ginsenosides on repeating extraction of 70% ethanol extracts from ginseng leaves (mg/100 g of ginseng leaves, dry basis)

Ext. time	Collected time											
	17 Aug						5 Sep					
	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd
1	1.99	2.95	0.31	0.54	0.80	2.63	1.89	2.98	0.28	0.54	0.78	2.74
2	0.21	0.29	0.04	0.05	0.10	0.24	0.23	0.27	0.07	0.04	0.13	0.20
3	0.04	0.09	0.01	0.01	0.02	0.05	0.05	0.06	0.01	0.01	0.02	0.05

Values are means of duplicates

#### 사. 장뇌삼 잎의 열안정성 검토

##### 1) 폴리페놀화합물

140-200℃의 온도에서 20분간 가열처리 한 장뇌삼 잎으로부터 폴리페놀성 물질을 추출하고 Sepabead SP 850 수지에 페놀성물질을 흡착시킨 뒤 흡착된 폴리페놀물질을 75% 에탄올로 탈착시키고 감압·농축 후 페놀성물질의 함량을 측정 한 결과는 Table 81과 같다. 가열처리는 장뇌삼에 함유된 폴리페놀성물질의 함량에 영향을 미쳐 가열처리 전 2,766 mg% 정도이던 것이 180-200℃의 가열로 1,600-1,800 mg%의 수준으로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 폴리페놀성물질의 면에서는 가능한 한 낮은 온도의 열처리가공이 바람직한 것으로 생각된다. 한편 장뇌삼 잎 추출물을 Sepabead 수지에 처리하기 전·후의 폴리페놀성 물질의 함량을 비교한 결과 수지처리 후에도 큰 변화가 없는 것으로 나타나 Sepabead SP 850 수지는 장뇌삼 잎에 함유된 폴리페놀성 물질의 선택적 흡착·탈착에 좋은 방법의 하나인 것으로 나타났다.

Table 81. Changes of total polyphenol content in wild ginseng leaf heated at different temperatures

Temp.(°C)	Sepabead(mg%) before	Sepabead(mg%) after
Control	2,766.1±75.7	2,623.8±119.0
140	2,117.2±45.4	1,876.1± 32.3
160	2,127.7±35.4	1,960.0±54.3
180	1,604.6±43.2	1,578.7±43.2
200	1,799.9±34.0	1,434.4±64.3

한편 HPLC에 의한 분리 크로마토그램을 살펴보면(Fig. 59), 온도가 높아짐에 따라 hydrophobic한 물질이 대부분 소실되고 hydrophilic한 물질 중의 특정성분이 증가하는 양상을 나타내었다.

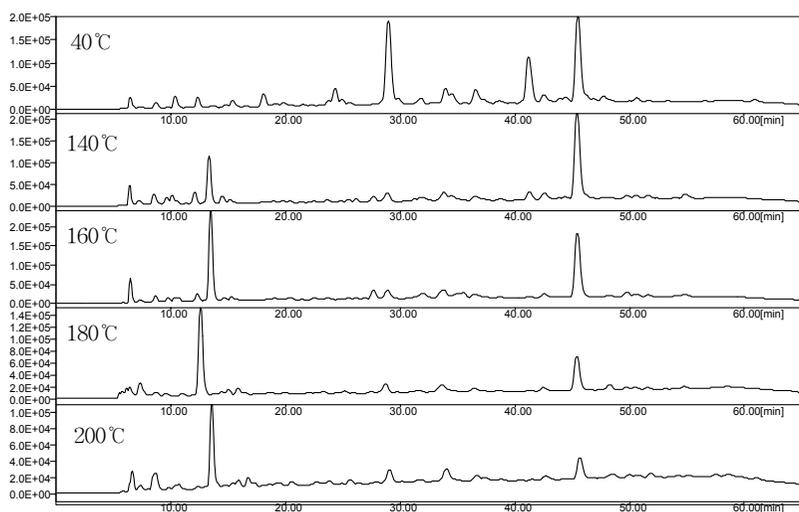


Fig. 59. HPLC chromatograms of polyphenols in wild ginseng leaf at various heating temperatures.

## 2) 사포닌의 조성 및 함량변화

가열처리에 의한 장뇌삼 잎 사포닌 조성의 패턴을 HPLC로 비교한 결과는

Fig. 60 및 Table 82와 같다. 140℃ 가열에서는 대부분의 사포닌 성분이 그대로 잔존하였으나 180℃ 이상의 온도에서는 상당히 소실되는 것으로 나타났으며 특히 200℃에서는 대부분의 사포닌이 검출되지 않았다. 사포닌 중에서도 Rg1, Re, Rd는 비교적 열에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났다.

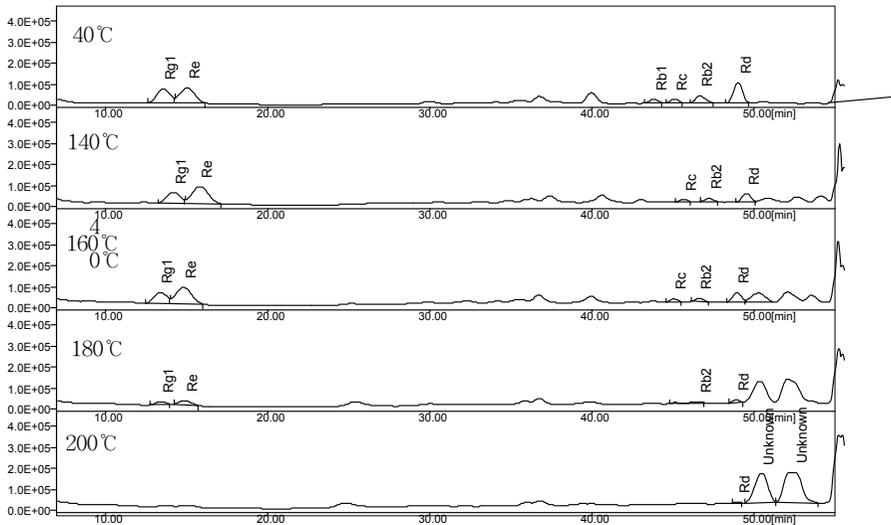


Fig. 60. HPLC chromatograms of saponins in wild ginseng leaf at various heating temperatures.

Table 82. Changes of ginsenosides content in the wild ginseng leaf heated at different temperatures(% on dry basis)

Ginsenosides	Temperature(°C)				
	40	140	160	180	200
Rg <sub>1</sub>	1.61	1.33	1.11	0.33	-
Re	2.79	2.61	2.48	0.63	-
Rf	-	-	-	-	-
Rb <sub>1</sub>	0.35	-	-	-	-
Rc	0.35	0.22	0.12	-	-
Rb <sub>2</sub>	0.89	0.30	0.30	0.20	-
Rd	2.47	0.96	0.91	0.23	0.01
Total	8.46	5.42	4.92	1.39	0.01
Ratio (PD/PT)	0.92	0.38	0.37	0.45	

PD(Panaxadiol ginsenoside): Rb<sub>1</sub>+Rc+Rb<sub>2</sub>+Rd

PT(Panaxatriol ginsenoside): Re+Rf+Rg<sub>1</sub>

#### 아. 장뇌삼 잎 추출물의 음료가공 적성

##### 1) pH에 따른 열안정성

외형이 건전한 장뇌삼 잎의 경우 그대로의 상태로 덩음처리하여 엽차의 형태로 상품화하는 것이 바람직하지만 형태가 불완전한 원료의 경우에는 물 또는 에탄올 등의 용매를 사용하여 사포닌, 폴리페놀성 물질 등의 생리활성물질을 추출한 뒤 이를 농축하여 여러 가지 형태의 제품 또는 가공용 소재로 이용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 그러나 가공시 이들 추출물이 접하게 되는 pH와 가열온도는 최종제품의 특성에 큰 영향을 미치게 된다. 따라서 장뇌삼 잎을 75% 에탄올로 가온추출한 뒤 감압농축을 하여 60 brix로 조정한 결과 농축액의 조사포닌 함량은 약 30%이었고 HPLC 결과 13.3%의 사포닌을 함유하는 것으로 나타났다. 식품공전에 의하면 인삼음료제품의 경우 농축물의 조사포닌 함량이 8% 이상일 때를 기준으로 0.15% 이상 함유되도록 명시되어 있다. 인삼 잎 농축물(60 brix)의 경우 약 30%의 조사포닌을 함유하고 있으므로 농축물이 0.15, 0.30 및 0.45%가 되도록 희석하였고 이때의 pH를 3.0, 4.0, 5.0 및 6.0로 조정하였다. 이후 90℃에서 20분간 가열처리한 다음 색깔의 변화를 측정된 결과(Table 83) pH가 낮아질수록 색의 밝기를 나타내는 L값은 증가한 반면 a값은 감소하였고 b값에는

큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 또한 농축물의 첨가량이 증가할수록 L값과 b 값은 증가하고 a값은 감소하는 경향을 나타내었다.

한편 가열처리 전후에 있어 사포닌 함량의 변화를 나타낸 결과는 Table 84와 같다. 사포닌의 경우 가열처리에 의해 다소 감소하는 경향을 나타내기는 하였으나 이 보다도 pH에 따른 감소경향이 현저하였는데 특히 pH 3.0 이하의 경우 감소의 폭은 대단히 큰 것으로 나타났다. 따라서 장뇌삼 잎 추출물을 이용한 음료의 가공시에는 이와 같은 점을 감안하여 공정을 개발해야 할 필요성이 높은 것으로 시사되었다.

Table 83. Changes in color and color difference meter reading's of wild ginseng leaf drink base at various concentration and pH

Con.(%)	pH	before Heating			after Heating		
		L	a	b	L	a	b
0.15	3.0	19.32	-1.01	-1.33	24.38	-0.98	-1.98
	4.0	18.46	-0.88	-1.56	21.18	-0.88	-1.84
	5.0	17.82	-0.78	-1.48	18.63	-0.79	-1.87
	6.0	17.02	-0.69	-1.34	16.91	-0.70	-1.59
0.30	3.0	25.14	-1.92	-0.01	32.25	-1.81	-1.17
	4.0	23.85	-1.74	-0.24	26.94	-1.65	-0.97
	5.0	21.69	-1.54	-0.45	23.51	-1.54	-1.19
	6.0	20.56	-1.45	-0.36	20.89	-1.41	-0.98
0.45	3.0	29.34	-2.76	1.97	37.83	-2.46	0.46
	4.0	27.69	-2.55	1.54	31.46	-2.29	0.65
	5.0	24.89	-2.24	1.26	26.67	-2.17	0.46
	6.0	23.93	-2.16	1.27	24.28	-2.07	0.57

Table 84. Effects of pH and heating on ginsenosides of wild ginseng leaf extracts

pH	Before heating						After heating					
	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd
2.5	3.19	4.79	0.09	0.10	t	0.88	2.67	3.98	0.02	0.05	t	0.30
3.0	3.30	5.58	0.10	0.14	t	1.02	2.43	4.30	0.04	0.06	t	0.97
3.5	3.55	5.55	0.14	0.12	t	1.01	3.45	5.35	0.12	0.08	t	0.98
4.0	3.56	5.45	0.20	0.12	t	1.02	3.50	5.39	0.18	0.11	t	1.03
5.2	3.68	5.65	0.21	0.16	t	1.06	3.65	5.40	0.20	0.15	t	1.07

Values are means of duplicates, t: trace

## 2) pH에 따른 저장안정성

pH별로 조제한 추출액을 37°C에서 3주간 저장하면서 색깔의 변화를 조사한 결과는 Table 85와 같다. 저장시일의 경과와 함께 L과 b값은 감소하나 a값은 큰 변화가 없었다. 특히 황색도를 나타내는 b값의 감소는 추출액에 함유되어 있던 카로티노이드 또는 플라보노이드의 산화 때문이 아닌가 추정된다.

한편 탁도 및 사포닌 함량의 변화에 대해 조사한 결과는 각각 Table 86 및 Table 87과 같다. 탁도의 경우에 있어서는 저장 전 기간에 걸쳐 큰 변화를 나타내지 않았으나 사포닌 함량의 경우에는 변화의 폭이 상당히 크고 pH에 따른 차이가 심한 것으로 나타났다. 특히 pH 3.0 이하의 산성측에서는 저장 1주 후에는 거의 검출되지 않았는데 이는 용해되어 있던 사포닌성분이 낮은 pH 상태에서 불용성으로 침전되었기 때문인 것으로 추정된다.

Table 85. Changes in color of wild ginseng leaf drink base on various pH during incubation (week)

time (week)	L				a				b			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
pH 2.5	64.59	60.17	56.72	51.04	-4.84	-4.71	-4.61	-4.17	8.90	-1.36	-2.61	-4.06
pH 3.0	52.13	49.12	44.25	46.68	-4.36	-3.94	-3.74	-4.46	5.95	-3.16	-3.41	-4.54
pH 3.5	44.70	39.22	36.82	33.57	-3.52	-3.03	-2.63	-2.67	6.78	-1.68	-2.06	-3.06
pH 4.0	34.80	29.14	27.22	25.67	-2.83	-2.05	-1.96	-1.71	6.42	-0.94	-1.04	-1.54
pH 5.2	28.04	26.76	24.96	26.35	-2.39	-2.03	-1.93	-1.90	6.31	3.05	0.21	0.18

Table 86. Changes in turbidity of wild ginseng leaf drink base on various pH during storage

time (week)	%T			
	0	1	2	3
pH 2.5	45.31	44.60	45.44	43.84
pH 3.0	56.47	58.60	56.55	52.75
pH 3.5	63.39	66.33	66.82	64.36
pH 4.0	70.22	75.51	76.22	69.22
pH 5.2	71.23	76.50	74.96	68.29

Table 87. Changes in ginsenosides of wild ginseng leaf extracts during storage

pH	After 1 week						After 2 week					
	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg1	Re	Rb1	Rc	Rb2	Rd
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.5	0.74	1.38	-	-	-	0.39	-	-	-	-	-	-
4.0	2.72	4.16	0.13	0.10	D	1.00	2.35	3.78	0.12	0.10	D	0.86
5.2	3.31	5.45	0.20	0.12	D	1.05	3.38	4.55	0.17	0.13	D	0.93

Values are means of duplicates

### 3) 쓴맛 개선방안

음료제조를 위한 장뇌삼 잎 농축액의 최적 첨가량을 결정하기 위하여 농축물 함유량을 0.15, 0.30 및 0.45%가 되도록 제조한 후 각각에 대한 기호도를 평가한 결과를 Table 88에 나타내었다. 맛은 0.15% 첨가구에서 기호도가 높은 반면, 색과 향은 첨가량이 증가할수록 선호하는 경향을 나타내었으나 전반적인 기호도는 0.15% 첨가구가 가장 좋은 것으로 나타났다. 그러나 쓴맛이 너무 강해 음료로서 부적합하다는 의견이 다수 있어 이점을 개선하기 위해 쓴맛을 마스킹 또는 저감화 시킬 수 있는 소재를 탐색하였다.

Table 88. Sensory evaluation score of wild ginseng leaf drink base with various concentrations

Conc. (%)	Taste	Color	Flavor	Acceptability
0.15	4.33	4.11	4.33	5.00
0.30	3.33	6.22	5.22	4.78
0.45	1.89	6.22	5.44	3.22

예비실험 결과 민트, 코코아 및 스테비오사이드의 경우 소량 첨가에 의해서도 장뇌삼 특유의 쓴맛을 감소시키는데 큰 효과가 있는 것으로 나타나 이들 소재를 첨가하여 음료를 만든 다음 훈련된 패널들에게 관능검사를 실시하였다. 이 때 음

료에 첨가된 장뇌삼 잎 추출물의 농도는 0.15, 0.30 및 0.45%로 고정하였으며, 민트, 코코아 및 스테비오사이드를 각각 적당한 농도로 첨가한 다음 음료베이스의 쓴맛 정도를 관능적으로 평가하였다. 관능평가 결과 민트를 적당한 농도로 첨가한 경우 가장 쓴맛의 강도가 약하게 측정되었으며, 다음으로 스테비오사이드, 코코아의 순으로 나타났다(Table 89).

Table 89. Intensity of bitterness in wild ginseng leaf drink base with various materials

Conc. (%)	Mint	Cocoa	Stevioside
0.15	1.5	4.7	3.6
0.30	3.2	6.7	4.7
0.45	4.6	7.6	6.7

#### 자. 다양한 가공식품에의 활용기술 개발

##### 1) 양갱

장뇌삼 잎은 특유의 쓴맛 성분에 의해 가공품 소재로서 제한이 되기 때문에 이러한 쓴맛성분을 마스킹 할 수 있는 가공품으로서 양갱을 선정하였고 양갱의 주원료인 양금은 녹두와 팥 양금을 사용하였다.

Table 90은 장뇌삼 잎 분말의 첨가량을 각기 달리하여 녹두양금을 사용하여 양갱을 제조한 경우 양갱의 색도를 나타낸 것으로 장뇌삼 잎 분말의 첨가량이 증가할수록 색의 밝기를 나타내는 L값과 황색도를 나타내는 b값은 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 관능평가에 의한 기호도를 살펴보면(Table 91) 장뇌삼 잎 분말을 0.6% 수준으로 첨가하더라도 전반적인 기호도에는 크게 영향을 미치지 않았으나 첨가량이 높아질수록 후미로서 쓴맛이 감지될 뿐만 아니라 그 맛이 오래 지속되는 것으로 확인되었다.

Table 90. Color difference of mung bean Yang Gaeng with wild ginseng leaf powder

Powder (%)	L	a	b
0.2	27.02	-2.72	7.52
0.4	24.63	-2.48	5.85
0.6	23.62	-2.44	5.06

Table 91. Sensory evaluation of mung bean Yang Gaeng with wild ginseng leaf powder

		Powder (%)		
		0.2	0.4	0.6
Color	green	7.0 <sup>a</sup>	7.5 <sup>ab</sup>	8.0 <sup>b</sup>
	acceptability	5.5	5.0	5.0
Aroma	grassy	5.0 <sup>a</sup>	6.0 <sup>b</sup>	7.5 <sup>c</sup>
	acceptability	6.0 <sup>a</sup>	5.0 <sup>b</sup>	4.5 <sup>b</sup>
	bitter	2.5	3.0	2.5
Taste	chalkiness	4.0 <sup>a</sup>	4.5 <sup>ab</sup>	5.0 <sup>b</sup>
	acceptability	7.0	6.5	6.5

<sup>a-c</sup>Different letters within a row are significantly different ( $P < 0.05$ ). Intensity: from very weak (1) to very strong (9). Acceptability: from very bad (1) to very good (9).

팔랑금을 사용한 경우에도 농도가 증가하면서 쓴맛 성분이 약간 증가하였으나 전반적인 기호도는 장뇌삼 잎 분말 0.4% 첨가에서 가장 높은 효과를 나타내었다 (Table 92). 또한 녹두양금의 결과와 마찬가지로 각 패널들은 장뇌삼 잎 분말의 첨가수준이 높아질수록 후미에서 쓴맛이 다소 감지되는 것으로 응답하였다.

Table 92. Sensory evaluation of red bean Yang Gaeng with wild ginseng leaf powder

	Powder (%)		
	0.2	0.4	0.6
Color	6.7 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>	5.7 <sup>b</sup>
Aroma	1.0 <sup>a</sup>	2.8 <sup>b</sup>	3.4 <sup>c</sup>
Taste	1.4 <sup>a</sup>	3.2 <sup>b</sup>	4.2 <sup>c</sup>
Overall preference	4.6 <sup>a</sup>	5.4 <sup>b</sup>	5.2 <sup>ab</sup>

<sup>a-c</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05). Intensity: from very weak (1) to very strong (9). Overall preference: from very bad (1) to very good (9).

한편 장뇌삼 잎 농축물을 첨가한 양갱의 관능특성을 조사한 결과, 쓴맛의 강도가 농축물 0.1%의 첨가에서도 분말의 경우 0.6% 첨가한 처리구에 상당하는 강도를 나타내었고 장뇌삼 잎 농축물의 첨가량이 많아질수록 전반적인 기호도 역시 감소하는 것으로 나타났다(Table 93).

Table 93. Sensory evaluation of red bean Yang Gaeng with wild ginseng leaf extract

	Extracts (%)		
	0.05	0.1	0.2
Color	7.0	7.0	7.0
Grassy	1.0	1.2	1.4
Bitter	3.2 <sup>a</sup>	6.0 <sup>b</sup>	6.8 <sup>b</sup>
Overall preference	4.6 <sup>a</sup>	4.4 <sup>a</sup>	3.2 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05). Intensity: from very weak (1) to very strong (9). Overall preference: from very bad (1) to very good (9).

이상의 결과를 토대로 하여 장뇌삼 잎 분말을 첨가하여 Table 94와 같은 조성에 따라 장뇌삼 잎 분말의 첨가량을 각기 달리하여 조제한 양갱의 외양은 Fig. 61과 같다.

Table 94. Formulation of Yang Gaeng using wild ginseng leaf powder

Materials	Composition(%)
Precipitate	53.2
Sugar	18.0
Starch syrup	24.0
Agar	1.5
Wild ginseng leaf	0.1-0.6

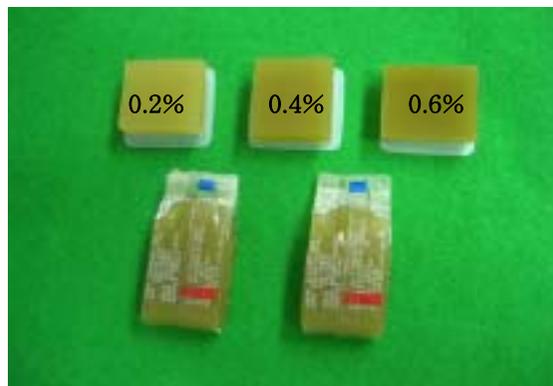


Fig. 61. Appearance of Yang Gaeng made with wild ginseng leaf.

## 2) 캔디

장뇌삼 잎의 관능적 특성으로서 가장 특기할 만한 것은 쓴맛임에 착안하여 장뇌삼 잎이 첨가된 식품의 경우에도 과도한 쓴맛을 경감시킬 수 있는 품목의 하나로 캔디류를 선정하였다. Fudge는 우유가 첨가된 사탕류의 일종으로서 우유의 첨가에 의해 부드러운 맛을 느끼게 한다. 본 시험에서는 장뇌삼 잎 분말 또는 농축물의 첨가량을 달리하여 제조한 Fudge의 관능적 특성을 조사한 결과 분말인 경우는 0.6% 첨가에서도 쓴맛의 강도는 4.83인 반면 농축물의 경우는 0.2% 첨가에서도 쓴맛의 강도는 5.08을 나타내어 쓴맛의 강도가 훨씬 높은 것으로 확인되었는데 이는 양갱의 결과와 유사한 경향이였다. 한편 각 패널들의 기호도를 조사한 결과 분말의 경우에는 0.4% 첨가구의 기호도가 6.50으로 가장 높았으며, 농축물인 경우는 0.1% 첨가구의 것이 5.0으로서 상대적으로 낮은 기호도를 나타내었다(Table 95).

Table 95. Sensory evaluation of Fudge made with powder or extract of wild ginseng leaf

Addition(%)	Bitterness		Acceptability	
	Powder	Extract	Powder	Extract
0.1		3.75 <sup>a</sup>		5.00 <sup>a</sup>
0.2	0.83 <sup>a</sup>	5.08 <sup>b</sup>	5.00 <sup>a</sup>	4.75 <sup>a</sup>
0.3	1.67 <sup>b</sup>	6.33 <sup>c</sup>	5.25 <sup>a</sup>	3.25 <sup>b</sup>
0.4	2.42 <sup>bc</sup>	7.42 <sup>d</sup>	6.50 <sup>b</sup>	1.75 <sup>c</sup>
0.5	3.17 <sup>c</sup>		6.25 <sup>b</sup>	
0.6	4.83 <sup>d</sup>		5.00 <sup>a</sup>	

<sup>a-d</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05). Intensity: from very weak (1) to very strong (9). Acceptability: from very bad (1) to very good (9).

앞서의 양갱시험에서 코코아, 민트, 스테비오사이드 등의 첨가는 장뇌삼 잎의 과도한 쓴맛을 경감시킬 수 있는 좋은 천연소재인 것으로 확인되어 본 시험에서는 초콜릿 및 커피의 첨가효과를 사탕을 대상으로 조사하였다. 우선 예비실험을

통하여 각 패널들의 기호도가 가장 높은 초콜릿을 base로 하고 장뇌삼 잎 분말 0.4% 시료와 초콜릿을 첨가하지 않은 시료간의 관능검사를 조사한 결과 초콜릿 처리구가 쓴맛을 다소 마스킹 하는 것으로 확인 되었으며 농축물의 경우에는 보다 더 큰 차이를 나타내었다(Table 96).

Table 96. Intensity of bitter in wild ginseng leaf Fudge base with or without chocolate

	Powder (0.4%)		Extract (0.2%)	
	without	with	without	with
Bitter	2.60	2.40	7.90 <sup>a</sup>	6.00 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05). Intensity: from very weak (1) to very strong (9).

한편 장뇌삼 잎 특유의 쓴맛을 masking할 것으로 기대되는 커피와 초콜릿을 첨가하여 Fudge를 제조할 경우 쓴맛의 경감정도를 평가하기 위해 관능검사를 실시하였다. 장뇌삼 잎 분말의 첨가수준을 0.6%로 하고 초콜릿과 커피를 각각 일정량 첨가하여 만든 Fudge의 쓴맛 강도의 경우 커피 첨가구와 초콜릿 처리구간에 유의적인 차이는 보이지 않았지만 커피 처리구가 쓴맛의 감소효과가 보다 큰 것으로 나타났다(Table 97). 한편, 장뇌삼 잎 농축물인 경우는 오히려 커피 처리구가 쓴맛의 강도가 더 높게 나타났는데 그 이유로서는 커피의 쓴맛과 장뇌삼 잎 추출물이 상호 상승작용을 한 때문으로 추정된다. 따라서 커피를 첨가할 경우 쓴맛을 최소화하기 위한 적절한 첨가수준의 결정시험이 요구된다.

Table 97. Intensity of bitter in wild ginseng leaf Fudge base with chocolate or coffee

	Powder (0.6%)		Extract (0.6%)	
	Chocolate	Coffee	Chocolate	Coffee
Bitter	5.20	4.75	6.60 <sup>a</sup>	7.30 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05). Intensity: from very weak (1) to very strong (9).

최근 캔디의 경우에도 충치를 발생시키지 않고 열량이 보다 낮은 형태의 제품이 선호되고 있다. 따라서 본 시험에서는 설탕 대신에 말티톨시럽 등의 기능성당류를 사용하여 장뇌삼 잎이 함유된 캔디를 다음과 같은 방법으로 조제하였다. 즉 말티톨시럽을 중불에서 온도가 180℃에 도달할 때까지 농축한다. 농축액에 장뇌삼 잎차 분말 또는 농축액을 일정량(분말의 경우 말티톨시럽 중량대비 0.1-0.8%, 농축물의 경우 0.05-0.4%) 첨가하고 제품에 바삭한 맛을 주기 위해 식물성경화유를 중량대비 0.1-0.8% 첨가한다. 일정한 크기의 성형 틀을 준비한 다음 장뇌삼 잎차분말 또는 농축액이 첨가 혼합된 캔디당액을 주입하고 냉각시켜 캔디를 조제한다. 냉각 후 흡습을 방지하기 위해 방습포장재로 포장하여 제품으로 하였다. 캔디의 경우에도 양갱제조에서와 마찬가지로 초콜릿, 코코아, 분말커피의 첨가량은 0.5-6.0% 정도의 범위로 하였다.

이와 같은 방법으로 조제한 캔디의 외형적 특징을 Fig. 62에 나타내었다. 즉 장뇌삼 잎 분말의 경우에는 첨가된 양이 증가할수록 녹색의 강도가 더욱 짙어지는 것으로 나타내어 기호성이 높아지는 것으로 나타났다.



Fig. 62. Appearance of candy made with wild ginseng leaf. (A), extract 0.1 and 0.2%; (B), powder 0.2 and 0.4%.

### 3) 껌

장뇌삼 잎에서 발견되는 독특한 쓴맛은 츄잉껌의 경우 기호성에 있어 바람직한 방향으로 작용할 것으로 예측되었다. 따라서 장뇌삼 잎 분말인 경우에는 중량 대비 0.1-0.8%, 농축물의 경우에는 0.05-0.4% 수준이 되게 껌 베이스에 첨가하여 다음과 같은 방법으로 코팅껌을 조제하였다. 즉 원부재료를 혼합한 다음 45-50℃에서 20분간 방치한 후 온도를 35-40℃로 조정하고 일정한 형태로 성형하고 나서 20℃, 상대습도 50%의 조건하에서 48시간 숙성시켜 껌의 내부를 조제하였다. 이 후 자일리톨과 껌아라빅을 중량비로 각각 95-97% 및 3-5%가 되도록 혼합한 액을 조제한 껌에 분사하고 혼합, 건조시킨 다음 polishing 과정을 거쳐 건조시키고 나서 코팅껌을 완성하였고 외형은 Fig. 63과 같다.

조제한 장뇌삼 잎 함유 껌의 쓴맛 정도는 10명의 훈련된 관능검사 요원을 대상으로 9점 척도법으로 평가한 결과 껌의 경우에도 장뇌삼 잎 분말은 0.4%, 농축액은 0.2% 정도의 첨가수준이 가장 바람직한 것으로 나타났다.



Fig. 63. Appearance of chewing gum made with wild ginseng leaf. (left), powder; (right), extract.

#### 4) 과립차

장뇌삼 잎 분말과 농축액을 농도별로 혼합하여(농축물 1-3 g에 포도당 49-47 g을 믹서기로 잘 혼합한 다음 과립기를 사용하여 20 mesh 정도의 크기로 과립화하였으며 이때 75% 에탄올을 소량 투입) 과립을 얻은 다음 과립 3 g에 70℃ 정도의 물을 100 mL를 가하여 훈련된 패널 6명을 대상으로 관능검사를 실시하였다. 시험제품의 관능적 특성을 완전하게 묘사하는 것은 제품의 선호를 결정하는데 기본적인 자료를 제공하며 특정 원료와 가공조건이 최종제품의 관능적 특성 변화에 어떻게 영향을 미치는지를 예측하는데 도움을 준다. 따라서 본 시험에서는 과립차에 대해서 패널요원이 감지된 관능적 특성을 말로 표현하고 이를 수치화하여 채점표의 기초를 이루는 용어를 개발한 결과 냄새성분으로는 풀냄새와 단 냄새로 크게 구별하였으며, 맛 성분으로는 쓴맛, 떫은맛, 단맛 등의 용어를 선정하였다.

장뇌삼 잎 분말 또는 농축물을 함유한 과립차의 향 관능검사 결과, 뒤음차인 경우 첨가량에 따른 큰 차이는 보이지 않았으나, 생잎인 경우는 첨가량이 4% 이상에서 풀냄새가 상대적으로 강하게 나타났다(Table 98).

Table 98. Sensory characteristics for aroma of granulated tea

		Conc. extract (%)		
		2	4	6
Fresh leaves	Grassy	3.5 <sup>a</sup>	4.8 <sup>b</sup>	4.8 <sup>b</sup>
	Sugar	2.5	2.3	2.5
Leaf tea	Grassy	3.5	3.5	3.9
	Sugar	2.5	2.5	2.4

<sup>a-b</sup>Different letters within a row are significantly different (P<0.05). Intensity: from very weak (1) to very strong (9).

장뇌삼 잎 추출물을 첨가하여 제조한 과립차의 맛 관능검사 결과, 쓴맛과 떫은맛이 매우 강하였으며, 특히 쓴맛의 강도가 너무 강해 음용하기가 적당치 않다는 의견이 대부분이었다(Table 99). 따라서 장뇌삼 추출물을 이용한 과립차의 맛 개선에는 가장 우선적으로 장뇌삼 고유의 쓴맛을 줄일 수 있는 가공방법이 개발되

어저야 할 것으로 판단된다.

Table 99. Sensory characteristics for taste of granulated tea

		Conc. extract (%)		
		2	4	6
Fresh leaves	Bitter	8.5	8.5	8.5
	Astringent	6.2	6.0	6.4
	Sugar	4.2 <sup>a</sup>	4.5	4.2
Roasted leaf	Bitter	9.0	9.0	9.0
	Astringent	6.5	6.7	6.8
	Sugar	3.4 <sup>b</sup>	3.6	3.6

<sup>a-b</sup>Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Rating scale: from 1 (very weak) to 9 (very strong)

또한, 제조된 과립차의 전반적인 기호도를 측정한 결과, 장뇌삼 잎 추출물 보다는 분말을 첨가하여 제조된 과립차 기호도에서 다소 높은 점수를 얻었지만 장뇌삼 잎의 과도한 쓴맛에 의해 전반적인 기호도는 매우 낮은 것으로 나타났다 (Table 100).

Table 100. Overall preference of granulated tea at various concentration

	Powder (%)			Extract (%)		
	2	4	6	2	4	6
Overall preference	2.60	2.55	1.40	1.70	1.67	1.00

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Rating scale: from 1 (very bad) to 9 (very good)

한편 자몽 또는 만다린 주스의 쓴맛을 나타내는 나린진과 리모닌은 베타-사이

클로텍스트린과 같은 환상구조를 가진 화합물과 혼합하면 안정된 포접복합체를 형성하여 용액에 존재하는 유리형태의 쓴맛성분을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 시험에서는 장뇌삼 잎 농축물 (2%)과 베타-사이클로텍스트린의 비율을 1:1, 1:2, 1:3의 비율로 각각 혼합하여 과립차를 제조하고 사이클로텍스트린의 첨가가 과립차의 맛에 미치는 영향을 조사한 결과, 과립차의 묘사 분석에서 선정된 쓴맛, 떼은맛, 단맛에서 베타-사이클로텍스트린의 첨가는 과립차의 맛에는 직접적인 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Table 101).

Table 101. Sensory evaluation of granulated tea by addition of  $\beta$ -cyclodextrin

		1:0	1:1	1:2	1:3
Aroma	Grassy	2.5	1.5	1.5	1.5
	Sweety	1.2	1.0	1.2	1.3
Taste	Bitter	7.5	7.5	7.2	7.5
	Astringent	5.75	5.0	5.25	5.75
	Sugar	3.25	4.75	4.25	5.25

Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Rating scale: from 1 (very weak) to 9 (very strong)

베타-사이클로텍스트린의 첨가량이 과립차의 선호도에 미치는 영향을 조사한 결과, 앞선 향과 맛의 관능평가와 마찬가지로 각 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 102). 이는 장뇌삼 잎 농축액이 첨가된 과립차에서의 가장 큰 문제점인 쓴맛을 경감시키지 못함에 따라 기호성을 개선하지 못하였기 때문인 것으로 생각되며 향후 과립차에서 발견되는 과도한 쓴맛을 마스킹 또는 경감시킬 수 있는 방법이 모색되어야 할 것으로 사료된다. 따라서 장뇌삼 잎이 첨가된 과립차의 경우 추출액보다는 장뇌삼 잎 분말의 사용이 현실적으로 더 바람직한 방법이 될 것으로 판단되며 장뇌삼 잎 분말 또는 농축액을 첨가하여 제조한 과립차의 외형을 Fig. 64에 나타내었다.

Table 102. Overall preference of granulated tea at various concentration

	1:0	1:1	1:2	1:3
Overall preference <sup>NS</sup>	1.60	1.55	2.20	2.20

<sup>a-b</sup>Mean Values with the different letter in a same column are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ). Rating scale: from 1 (very bad) to 9 (very good)



Fig. 64. Appearance of granulated tea made with wild ginseng leaf. (left), powder; (right), extract.

### 3. 장뇌삼 잎의 생리기능적 특성 구명

#### 가. 방향성성분의 정성, 정량 분석

최근 약용식물에서 분리된 방향성 추출물들은 그 식물체가 가진 고유의 생리 활성 물질과 더불어 항산화효과, 항암효과, 항미생물 효과 등의 여러 가지 유용한 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 따라서 재배삼과 채취별(1차 및 2차) 장뇌삼 잎의 총 방향성 성분을 분석하였다. 그 결과, Table 103과 104 및 Fig. 65와 66에 DB-WAX column에서의 Kovats index와 계산된 농도 및 정성 분석된 향기성분과 대표적인 TIC 크로마토그램을 나타내었다. 재배삼의 경우 38개의 방향성 성분을 확인하였는데, 주요 방향성 성분은  $\beta$ -elemene(127.5 ppm), trans- $\beta$ -farnesene(169.6 ppm), 14- $\beta$ -pregnane(17.2 ppm), germacrene d(105.8 ppm), camphenone(141.6 ppm), 3-Phenyl-1,4(E)-dodecadiene(53.2 ppm), eugenol(23.9 ppm), 4-vinyl-2-methoxy-phenol(65.4 ppm), dodecanoic acid(75.1 ppm), phytol(92.1 ppm), 1,2-benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester(259.8 ppm)이었다. 1차 수확 장뇌삼 잎의 경우 22개의 방향성 성분을 확인하였고, 주요 방향성 성분은  $\beta$ -elemene(138.3 ppm), trans- $\beta$ -farnesene(171.3 ppm), germacrene d(343.6 ppm), germacrene A(147.6 ppm), methyl salicylate(158.1 ppm), eugenol(391.1 ppm), 4-vinyl-2-methoxy phenol(18.4 ppm), eugenol acetate(52.3 ppm), tetramethyl-2(4H)-benzofuranone(76.0 ppm), butylidene phthalide(132.7 ppm), 3N butyl phthalide(249.3 ppm), 1,2-benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester(91.6 ppm)로 나타났다. 2차 수확 장뇌삼 잎의 방향성 성분은  $\beta$ -elemene(140.3 ppm), trans- $\beta$ -farnesene(168.1 ppm), germacrene d(350.2 ppm), germacrene A(156.2 ppm), methyl salicylate(188.3 ppm), eugenol(389.0 ppm), 4-vinyl-2-methoxy phenol(55.4 ppm), eugenol acetate(70.4 ppm), tetramethyl-2(4H)-benzofuranone(102.4 ppm), butylidene phthalide(150.3 ppm), 3N butyl phthalide(261.4 ppm), 1,2-benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester(126.3 ppm)로 1차 채취한 성분과 유사하였다. 이와 같은 결과를 살펴 볼 때 채취시기 별로 방향성성분의 농도는 다소 차이가 있는 것도 있었으나 대체적으로 성분의 종류나 농도의 차이는 크지 않은 것으로 보였다.

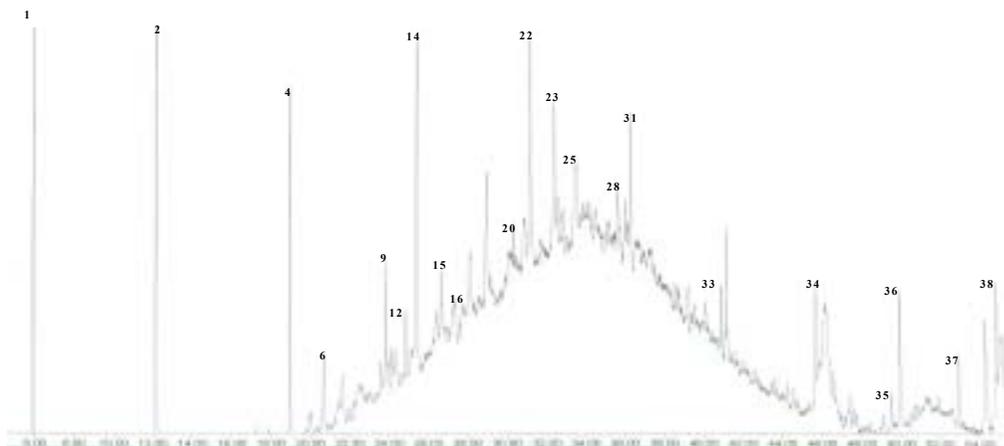


Fig. 65. Typical TIC mass chromatogram of aroma extract isolated from the cultivated ginseng leaf tea.

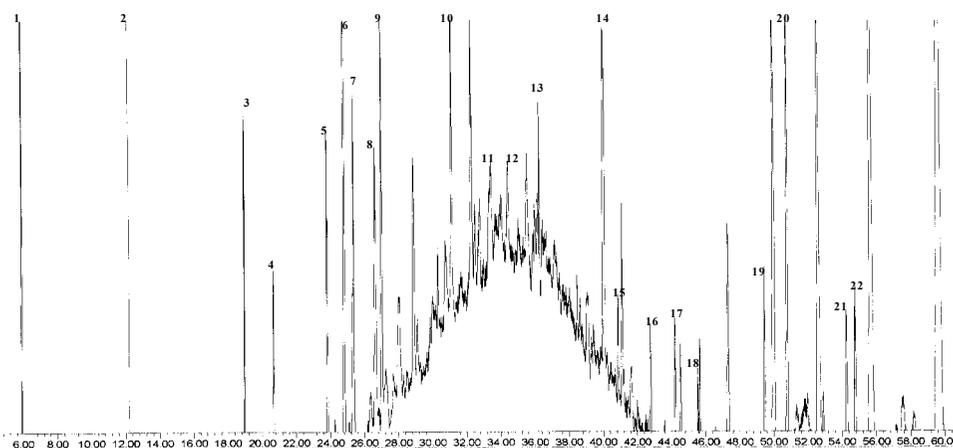


Fig. 66. Typical TIC mass chromatogram of aroma extract isolated from the leaves of wild ginseng leaf tea.

Table 103. Aroma compounds identified in the extract from the leaves of cultivated ginseng leaf tea.

Peak No	I <sup>a</sup>	Concentration(ppm)	<sup>c</sup> Possible compound
1	1160	491.69	Unknown
2	1352	775.16	Unknown
3	1485	3.33	Unknown
4	1528	389.77	Unknown
5	1560	21.58	Unknown
6	1576	127.53	$\beta$ -Elemene
7	1627	47.19	Unknown
8	1653	70.34	Unknown
9	1659	169.63	trans- $\beta$ -Farnesene
10	1664	54.20	Unknown
11	1668	107.18	14- $\beta$ -Pregnane
12	1685	105.78	Germacrene d
13	1693	55.26	Unknown
14	1696	478.01	Unknown
15	1736	141.56	Campherenone
16	1756	172.78	Unknown
17	1768	71.22	Unknown
18	1792	41.22	Unknown
19	1834	53.15	3-Phenyl-1,4(E)-dodecadiene
20	1836	62.80	Unknown
21	1860	172.78	Unknown
22	1864	366.62	Unknown
23	1891	301.01	Unknown
24	1912	68.76	Unknown
25	1933	305.57	Unknown
26	1946	99.99	Unknown
27	1963	94.72	Unknown
28	1991	191.55	Unknown
29	2007	102.09	Unknown
30	2014	33.33	Unknown
31	2016	213.13	Unknown
32	2143	23.86	Eugenol
33	2170	68.41	4-Vinyl-2-methoxy-phenol
34	2331	174.89	Unknown
35	2475	75.08	Dodecanoic acid
36	2484	230.85	Unknown
37	2602	92.09	Phytol
38	2629	259.79	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester

<sup>a</sup>I mean kovats retention index on DB-WAX.

<sup>b</sup>Solvent peak exclude.

<sup>c</sup>Values are on a dried weight of CL in  $\mu\text{g/g}$ .

Table 104. Aroma compounds identified in the extract from the leaves of wild ginseng leaf tea

Peak No	I <sup>a</sup>	Concentration <sup>b</sup> (ppm)	<sup>c</sup> Possible compound
1	1161	359.04	Unknown
2	1354	365.16	Unknown
3	1530	148.84	Unknown
4	1578	138.28	β-Elemene
5	1661	171.27	trans-β-Franesene
6	1687	343.66	Germacrene D
7	1698	224.29	Unknown
8	1737	147.55	Germacrene A
9	1748	182.02	Unknown
10	1866	158.11	Methyl salicylate
11	1935	56.35	Unknown
12	1965	26.69	Unknown
13	2019	48.75	Unknown
14	2145	391.11	Eugenol
15	2173	18.35	4-vinyl-2-methoxy phenol
16	2237	52.27	Eugenol acetate
17	2287	76.00	Tetramethyl-2(4H)-Benzofuranone
18	2334	46.15	Unknown
19	2476	132.72	Butylidene phthalide
20	2526	249.31	3N Butyl phthalide
21	2644	175.35	Unknown
22	2660	91.57	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester

<sup>a</sup>I mean kovats retention index on DB-WAX.

<sup>b</sup>Solvent peak exclude.

<sup>c</sup>Values are on a dried weight of WL in µg/g.

## 나. 생리기능적 특성 검토

### 1) 종양세포의 성장저해 효과

채취시기별 장뇌삼 잎 2종 및 재배삼 잎 시료로부터 얻은 방향성 추출물의 종양세포 성장저해효과를 MTT assay에 의해 조사, 비교하였다. 그 결과는 Table 105와 같이, 100 µg/mL 농도의 채취시기별 장뇌삼 잎(MGL-1 및 MGL-2)과 재배삼 잎(CGL)의 방향성 성분 추출물은 (SNU-1), 간(HepG2), 폐(A549), 대장(HT-29)암 세포의 성장을 저해하지 않았다. 이와 같은 결과로부터 채취시기별 장뇌삼 잎과 재배삼 잎의 방향성 추출물이 종양세포의 성장을 직접적으로 저해하는 효과는 없는 것으로 보인다.

Table 105. Effect of the aroma extracts from the leaves and roots of cultivated and mountain ginseng on the growth of tumor cells

Sample <sup>a</sup>	Concn. of sample(μg/ml)	Relative survival (%)			
		SNU-1	HepG2	A549	HT-29
MGL-1	0	100.0±5.7	100.0±2.5	100.0±2.2	100.0±4.0
	0.1	102.8±4.7	103.7±2.6	98.6±1.2	116.5±1.7
	1	101.4±6.4	100.2±1.7	99.9±2.0	118.9±3.6
	10	103.6±5.7	97.7±3.8	100.3±1.9	123.1±10.7
	100	100.0±6.4	108.6±6.1	112.6±5.8	116.5±14.7
MGL-2	0	100.0±3.2	100.0±3.1	100.0±2.7	100.0±2.9
	0.1	99.5±7.8	104.6±4.8	101.9±1.0	108.8±12.9
	1	109.0±4.0	100.8±6.4	99.2±2.5	118.1±7.2
	10	101.9±2.2	99.9±3.6	100.7±3.1	116.2±12.4
	100	96.6±9.5	107.7±5.5	99.8±11.3	105.7±11.4
CGL	0	100.0±4.0	100.0±2.5	100.0±3.7	100.0±5.0
	0.1	95.7±5.2	103.7±2.6	100.3±2.3	112.8±9.9
	1	102.2±4.6	100.2±1.7	104.4±4.2	113.8±17.1
	10	104.6±5.6	97.7±3.8	105.0±3.7	118.5±16.1
	100	101.0±8.6	108.6±6.1	104.3±5.0	108.1±11.8

<sup>a</sup>Symbols are: MGL-1, aroma extract from the leaves of wild ginseng collected at the first harvest; MGL-2, aroma extract from the leaves of wild ginseng collected at the second harvest; CGL, aroma extract from the leaves of cultivated ginseng. Relative survival(%) = (S/B) × 100, where S is the cell viability of ginseng extracts-treated tumor cells expressed as absorbance at 540 nm, and B is the cell viability of vehicle-treated tumor cells expressed as absorbance at 540 nm. This assay was done at least 3~4 independent experiments.

## 2) 발암원 대사 및 종양세포의 항증식관련 효소활성 조사

### 가) Ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD) 활성

많은 발암물질들이 발암성을 나타내기 위해서는 산화, 환원 등의 반응에 의해

전자친화성 물질로 변환되는 phase I 효소계의 활성화를 거쳐야 하는데, 이러한 반응에는 주로 cytochrome P450 효소계가 관여한다. 이러한 반응은 주로 간세포에서 일어나므로 인간 유래 간세포인 HepG2 세포 모델을 이용하고 효소유도체로서 널리 분포하는 환경오염물질이며 강력한 발암원인 benzo(a)pyrene(B[a]P)을 이용하였다. 채취시기별 장뇌삼 잎과 재배삼 잎으로부터 얻은 방향성 추출물이 B[a]P유도 EROD 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Fig. 67과 같다. 채취시기별 장뇌삼 잎으로부터 얻은 방향성 추출물 MGL-1과 MGL-2는 100 µg/mL 농도에서 각각 35% 및 41%(P<0.01), 200 µg/mL 농도에서 62% 및 64%(P<0.001)로 B[a]P유도 EROD 활성을 억제하였다. 한편 재배삼 잎으로부터 얻은 방향성 추출물(CGL)은 100 및 200 µg/mL 농도에서 각각 10% 및 12%로 B[a]P유도 EROD 활성을 억제하였으나 대조구와 비교할 때 유의적인 차이는 없었다. 이와 같은 결과로부터 채취시기별 장뇌삼 잎으로부터 얻은 방향성 추출물의 B[a]P유도 EROD 활성은 크게 차이가 없었다. 또한 이들 추출물은 직접적으로 종양세포의 성장에 대해서는 영향을 보이지 않으나 B[a]P과 같은 전발암성 물질이 발암성 물질로 대사되는 과정을 저해할 가능성이 높은 것으로 보인다.

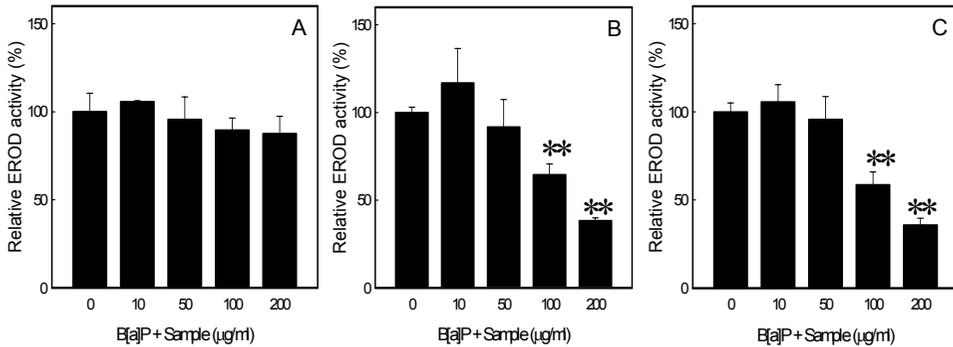


Fig. 67. Inhibitory effect of the aroma extracts from the leaves of cultivated and wild ginseng on benzo[a]pyrene-induced ethoxyresorufin *O*-deethylase activity in human liver cell model.

\*\* :  $P < 0.01$ , compared with control group as analyzed by Student's *t*-test.

A: CGL, aroma extract from the leaves of cultivated ginseng; B: MGL-1, aroma extract from the leaves of wild ginseng collected at the first harvest; C: MGL-2, aroma extract from the leaves of wild ginseng collected at the second harvest.

#### 나) QR 유도활성

많은 암예방 또는 항암 물질이 제 2상계 효소계를 활성화시킨다는 사실에 근거하여 암예방 성분의 검색 또는 활성을 측정함에 있어서 quinone reductase(QR) 효소활성을 측정하고 있다. 재배삼 및 장뇌삼 잎으로부터 얻은 방향성 추출물이 QR 활성화에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Fig. 68과 같다. 장뇌삼 잎으로부터 얻은 방향성 추출물 MGL-1은 50 및 200 µg/ml 농도에서 대조군과 비교할 때 유의적으로 QR 활성의 유도를 증가시켰다( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). 채취시기가 다른 방향성 추출물 MGL-2는 200 µg/ml 농도에서 대조군과 비교할 때 유의적으로 QR 활성의 유도를 증가시켰다( $P < 0.01$ ). 한편 재배삼 잎으로부터 얻은 방향성 추출물(CGL)은 50 및 200 µg/ml 농도에서 미약하나마 QR 활성을 유도하였으나 대조군과 비교할 때 유의적인 차이는 없었다. 이와 같은 결과를 살펴볼 때 B[a]P유도 EROD 활성의 저해나 QR 활성의 증가는 장뇌삼 잎의 방향성 추출물에서만 관찰되었으며 채취시기는 추출물의 활성화에 크게 영향을 주지 않은 것으

로 보인다. 장뇌삼 잎으로부터 얻은 방향성 추출물은 직접적으로 종양세포의 성장에 대해서는 영향을 보이지 않으나 B[a]P과 같은 전발암성 물질이 발암성 물질로 대사되는 과정은 저해하며, 발암성 물질을 체외로 배출시키기 위한 해독화 대사 과정을 증가시키는 것으로 사료된다.

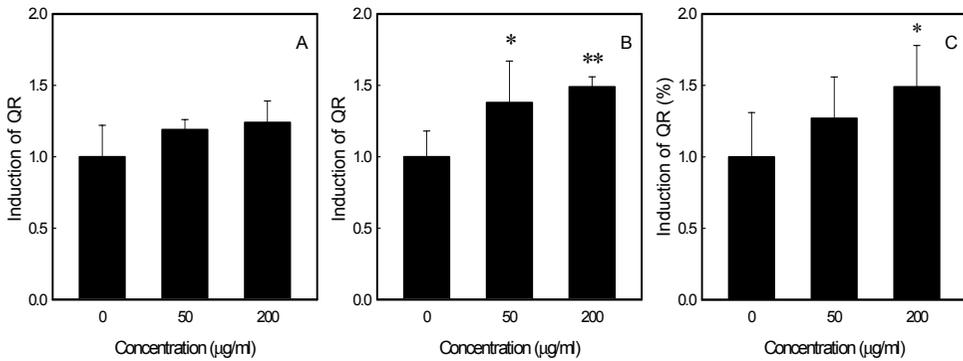


Fig. 68. Quinone reductase activity induced by the aroma extracts from the leaves of cultivated and wild ginseng in human liver cell model.

\*:  $P < 0.05$ , compared with control group as analyzed by Student's t-test.

\*\* :  $P < 0.01$  compared with control group as analyzed by Student's t-test.

A: CGL, aroma extract from the leaves of cultivated ginseng; B: MGL-1, aroma extract from the leaves of wild ginseng collected at the first harvest; C: MGL-2, aroma extract from the leaves of wild ginseng collected at the second harvest

### 3) 유명시험

인삼이 생체에서 비특이적인 저항성을 증가시키는 즉, "adaptogen"으로 작용한다는 보고를 근거로 유명 시험을 실시하였다. Adaptogen이란 개념은 1950년대 말에 처음으로 러시아 과학자들에 의해 제안된 것으로, 부작용 없이 기능장애 (dysfunction)를 '수정함(correcting)'으로써 아프거나 건강한 사람 모두에게 영향을 주는 물질이라는 것이 그 출발점으로서 사용되었다. 그러나 이후 많은 연구 결과, adaptogen이라는 용어는 'placebo effect'와 유사하며, 작용기전에 대한 통찰을 주지 못하기 때문에 사용하지 않아야 한다고 주장하는 의견도 제시되고 있다.

따라서 본 연구에서는 중량 부하 강제 수영 모델을 이용하여 마우스가 완전히 피로하여 물에 빠져 10초간 수면위로 떠오르지 않을 때까지 소요된 수영시간 (swimming time)을 측정함으로써 장뇌삼과 재배삼 잎의 방향성 추출물이 수영 시간 연장에 의한 항피로효과(anti-fatigue)를 나타내는지 조사하였다. 또한 차로서의 활용도를 감안하여 동일 모델에서 마우스가 저항 없이 머리만 수면위로 내밀고 물에 떠 있는 부동 시간(duration of immobility)을 측정하여 부동시간 감소에 의한 항우울 효과(antidepressant-like)를 보이는지 살펴보았다. 먼저 ICR계 응성 마우스를 3개 군으로 나누고 각 검체를 1일 1회 10일간 경구투여 하면서 10일간 사육하였을 때 총체중증가량, 일일 식이 섭취량 및 간 중량을 살펴본 결과는 Table 106과 같다. 즉, 체중 증가량 및 일일 식이 섭취량은 대조군, 장뇌삼(MGL)과 재배삼(CGL) 잎의 방향성 추출물 투여군 간에 유의적인 차이가 없어 추출물의 투여에 의한 영향이 없는 것으로 보였다. 또한 간 독성의 기초 지표로 살펴본 간 중량에서도 대조군, MGL 및 CGL군간의 차이가 없었다( $p < 0.05$ ).

Table 106. Effect of aroma extracts from the leaves of wild(MGL) and cultivated(CGL) ginseng on the total weight gain, daily food intake and liver weight

Experimental group		Total weight gain(g)	Daily food intake(g)	Organ weight(liver)(g)
Control	Mean	2.8 <sup>NS</sup>	5.5 <sup>NS</sup>	1.38 <sup>NS</sup>
	S.D.	1.69	0.4	0.14
	N	11	11	11
CGL	Mean	3.2	5.5	1.39
	S.D.	1.09	0.22	0.09
	N	11	11	11
MGL	Mean	3.2	5.7	1.39
	S.D.	0.93	0.33	0.09
	N	11	11	11

NS: not significant among three experimental groups at  $\alpha=0.05$

한편 장뇌삼과 재배삼 잎의 방향성 추출물 투여가 마우스 유영시간과 부동시간에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 107과 같다. 유영시간의 경우, 장뇌삼(MGL)과 재배삼(CGL) 잎의 방향성 추출물 투여에 의해 유영시간이 증가될 것이라고 가정한 것과는 달리 식염수를 투여한 대조군과 비교하여 장뇌삼과 재배삼 잎의 방향성 추출물을 투여 받은 CGL 및 MGL군의 유영시간이 감소하였다( $p < 0.05$ ). 한편, 부동시간의 경우 대조군과 비교하여 장뇌삼과 재배삼 잎의 방향성 추출물을 투여 받은 CGL 및 MGL군의 부동시간은 유의적으로 감소하였다. 이와 같은 결과를 살펴볼 때 인삼 사포닌 성분이나 인삼근 추출물이 항피로 효과를 보이는 것과는 달리 장뇌삼(MGL)과 재배삼(CGL) 잎의 방향성 추출물은 항피로효과 보다 항우울 효과를 나타낼 가능성이 높다는 것을 시사한다.

Table 107. Effects of CG and WG on Swimming and immobility time of animal in the forced swimming test

Experimental group		Duration of swimming <sup>1</sup> (min)	Immobility time <sup>2</sup> (sec)
NT	Mean	72.9 <sup>a3</sup>	1,980.0 <sup>a</sup>
	S.D.	51.17	1,237.41
	N	11	11
CGL	Mean	28.3 <sup>b</sup>	56.2 <sup>b</sup>
	S.D.	18.81	37.90
	N	11	11
MGL	Mean	24.3 <sup>b</sup>	38.5 <sup>b</sup>
	S.D.	14.68	23.63
	N	11	11

<sup>1</sup>The swimming time from the beginning of swimming with weight until the point at which rats could not again return to the surface of the water 10 s after sinking was measured(Moriura et al. 1996).

<sup>2</sup>A mouse was considered immobile when it remained floating in the water, without struggling, making only very slight movements necessary to keep its head above water(Porsolt et al. 1977).

<sup>3</sup>Values followed by the same letter in the same column are not significantly different( $P < 0.05$ ).

#### 4) 항암제 부작용억제 동물실험

전 세계적으로 막대한 의료·연구비의 투입에도 불구하고 지난 50년간 암으로 인한 사망률은 거의 줄어들지 않고 있다. 약용식물이나 식품성분 가운데에서도 과일 채소의 flavonoids, fish oil, 버섯, 인삼, 특용작물의 고분자 물질 등은 여러 가지 실험 모델에서 항종양효과를 보이는 것으로 보고되고 있다. 그러나 대부분 효능의 정도가 낮고 실제 인체에서 효과가 확인되지 않아 현실적으로 암을 예방하거나 치료하는데 사용을 기대하기가 어려운 실정이다. 한편, 현대의학에 있어서 불치병의 하나인 암의 치료는 조기진단에 의한 수술적 치료나 방사선(radiotherapy) 또는 화학요법(chemotherapy)에 의해 이루어지고 있다. 일반적으로 암은 조기발견에 의한 수술이 효과적인 것으로 알려져 있으나, 암의 크기가 약 1cm 이상이 되어야 쉽게 발견할 수 있다. 이 크기에서도 암세포 숫자는 10억 개를 넘어 조기에 발견하여 수술로 제거했다고 하더라도 모든 암세포를 제거하는 것이 어렵기 때문에 수술 후에도 방사선, 항암제 치료를 병행 실시하고 있는 실정이다. 그러나 화학요법 약제나 방사선 치료 또는 병행 치료는 공통적으로 유리 라디칼을 생성시켜 목적 암세포를 제거하는 것으로 알려져 있으나 특이성이 낮아 조혈세포나 면역세포 등 빠르게 분열, 증식하는 특성을 가진 정상세포에 대해서도 여러 가지 경로(multi-pathway)에 의해 DNA를 손상시킴으로써 조혈기능 억제, 면역기능 저하, 메스꺼움, 구토, 점막궤양 등 여러 가지 부작용(adverse effects)이 초래되고 있다. 이에 많은 연구자들은 현재 사용하고 있는 화학요법 약제나 방사선 치료의 부작용을 최소화하고 유용성을 극대화할 수 있는 방법을 모색하고 있다. 특히 식품은 암환자의 항암요법 과정에서 손상된 세포가 정상적으로 회복되기 위해 기본적으로 요구되는 에너지와 영양소를 공급할 뿐만 아니라, 특정 식품성분은 손상된 골수기능 및 면역기능을 회복 또는 증강시키는데 매우 중요한 역할을 한다는 과학적 증거들이 축적되고 있다. 따라서 본 연구에서는 1) 장뇌삼 추출물이 직접적인 암세포 성장 저해 효과는 없었으며, 2) 분석결과, 장뇌삼 잎은 라디칼 소거효과가 높은 폴리페놀 화합물의 함량이 높았으며, 3) 장뇌삼 잎의 실용화 측면 등을 고려하여 직접적인 항종양 효과를 조사하는 것 보다 화학 요법에 의해 유발된 부작용을 개선하는지의 여부를 살펴보고자 하였다.

C57BL/6 마우스 모델에서 화학요법제 5-FU에 의한 수종 독성 지표를 확인하고 장뇌삼 잎 및 잎차의 투여효과를 조사하였다. 그 결과, Fig. 69와 같이 5-FU 투여군은 대조군에 비하여 유의적으로 체중이 감소하였다. 그러나 5-FU와 장뇌

삼잎 및 잎차를 동시에 투여한 경우에도 마우스 체중에는 유의적인 증가가 관찰되지 않았다. 장기 무게에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 108과 같이, 간 무게는 5-FU 투여에 의해 변화되지 않았으나 비장의 무게는 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 시료의 투여가 5-FU 투여에 의해 감소된 비장 무게에 미치는 영향은 없었다( $P>0.05$ ).

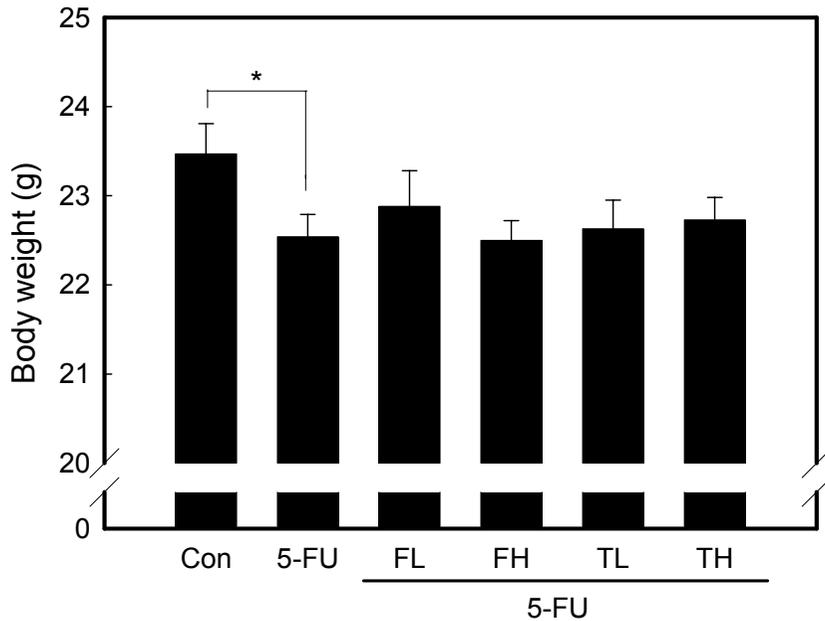


Fig 69. Effects of the wild ginseng leaves(FL and FH) and its tea product(TL and TH) on body weight of 5-FU treated mice. Data are expressed as mean±SEM, \*  $P<0.05$  vs vehicle-treated control. Con: vehicle treated group, 5-FU: 5-fluorouracil treated group, FL: group treated with 5-fluorouracil and 100 mg/kg of wild ginseng leaves, FH: group treated with 5-fluorouracil and 300 mg/kg of wild ginseng leaves, TL: group treated with 5-fluorouracil and 100 mg/kg of wild ginseng tea, TH: group treated with 5-fluorouracil and 300 mg/kg of wild ginseng tea

Table 108. Effects of the wild ginseng leaves(FL and FH) and its tea product(TL and TH) on liver and spleen weight of 5-FU treated mice

Organ	Control	5-FU	5-FU+FL	5-FU+FH	5-FU+TL	5-FU+TH
Liver (mg/g BW)	40.96±0.56	42.37±0.46	43.68±0.83	44.74±0.95	42.63±1.08	45.04±1.31
Spleen (mg/g BW)	2.25±0.05	1.56±0.06	1.56±0.05	1.59±0.04	1.66±0.14	1.61±0.04

5-FU는 조혈 독성 또한 큰 것으로 알려져 있다. 앞서 장기 무게에서도 비장의 무게가 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었는데 혈중 혈구 분석에서도 모든 혈액학적 지표가 대조군에 비하여 현저하게 감소된 바, 특히 백혈구와 혈소판의 감소는 각각 대조군의 50%와 40% 수준으로 감소된 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 장뇌삼 잎 및 잎차의 투여는 감소된 혈구 수를 유의적으로 회복시키지 못하였다. 적혈구의 경우 잎차 고농도 투여군에서 5-FU 대비 약  $0.17 \times 10^6/\mu\text{l}$ 으로 적혈구수가 증가하였으나 유의적이지는 않았다. 장뇌삼 잎차 고농도 투여군의 경우 헤마토크릿, 헤모글로빈 수치가 5-FU 투여군보다 높았으나 통계적 유의성은 없었다(Table 109).

Table 109. Effects of the wild ginseng leaves(FL and FH) and its tea product(TL and TH) on RBC, WBC HCT, Hb and platelet in C57BL/6 mouse

CBC	Control	5-FU	5-FU+FL	5-FU+FH	5-FU+TL	5-FU+TH
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	10.56±0.09	8.84±0.15	8.99±0.16	8.59±0.11	8.90±0.08	9.01±0.16
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	5.64±0.36	2.82±0.23	2.26±0.14	2.77±0.10	2.38±0.19	2.36±0.19
HCT (%)	55.99±0.48	46.66±0.88	47.74±0.85	45.90±0.60	48.16±0.44	48.26±0.64
Hb (g/l)	16.90±0.17	13.79±0.26	13.86±0.22	13.31±0.15	13.97±0.15	13.98±0.19
Platelet ( $\times 10^5/\mu\text{l}$ )	1022±56	405±21	391±18	380±20	381±23	366±14

또한 마우스의 대퇴골로부터 조직절편을 제작하여 H&E 염색 후 골수세포의 밀도를 관찰한 결과는 Fig. 70과 같다. 그 결과, 5-FU의 투여는 현저한 골수세포의 감소를 나타내었으나, 장뇌삼 잎 및 잎차의 투여는 감소된 골수세포의 수에 유의적인 변화를 나타내지 않았다.

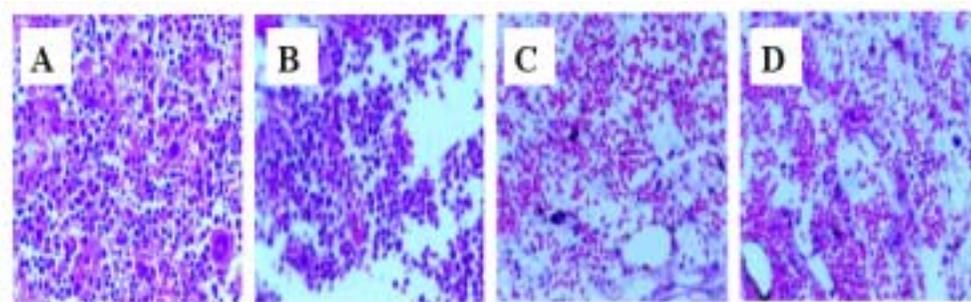


Fig. 70. Morphological changes in bone marrow (x400) A: vehicle-treated control, B: 5-FU treated group, C: 5-FU+FH(300 mg/kg of wild ginseng leaves), D: 5-FU +FT(300 mg/kg of wild ginseng tea)

한편, 앞서 세포 모델을 이용한 결과에서 장뇌삼 추출물은 종양세포의 성장에 대해서 직접적인 영향을 보이지 않았으나 B[a]P과 같은 전발암성 물질이 발암성 물질로 대사되는 과정을 저해하거나 발암물질이 체외로 배설되게 하는 해독화 과정을 증가시킬 가능성이 높은 것으로 시사되었다. 이에 장뇌삼 잎 및 잎차 추출물의 투여가 발암물질 및 약물의 활성화 및 해독화에 관여하는 제1상계 및 2상계 효소에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 Fig. 71과 같이 5-FU의 투여는 대조군과 비교하여 발암물질 및 약물의 활성화에 관여하는 phase I 효소인 EROD 활성화에 영향을 나타내지 않았다. 그러나 장뇌삼 시료 투여군은 전반적으로 EROD 활성을 감소시키는 경향이 관찰되었으나 통계적 유의성은 없었다. 장뇌삼 시료 투여군 중에서는 잎차 투여군 만이 대조군과 비교할 때 EROD 활성이 유의적으로 낮아지는 경향을 보였다. 발암성 물질을 체외로 배출시키기 위한 해독화 대사에 관여하는 GST 활성화에 있어서도 5-FU의 단독 투여는 GST 활성화에 영향을 주지 않았다. 그러나 시료 투여군 중에서 생잎 고농도 투여군의 GST 활성은 대조군과 비교할 때 유의적으로 높은 경향을 나타내었다(Fig. 72).

이와 같은 결과를 살펴볼 때 장뇌삼 잎 및 잎차의 경구투여는 화학요법제

5-FU에 의해 유발된 독성(부작용)에 대해 유의적인 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다. 반면, 장뇌삼 잎 및 잎차의 경구투여는 미약하나마 EROD 활성을 감소시켰을 뿐만 아니라 장뇌삼 잎 고농도 투여군에서는 대조군에 비해 높은 GST 활성이 관찰되었다. 이러한 결과는 장뇌삼 잎 또는 잎차를 섭취할 경우 독성물질이 활성화 되는 것을 저해하거나 체외로 배설되게 하는 해독화 과정을 증가시킬 가능성을 보여주는 것이다. 그러나 장뇌삼 잎 또는 잎차가 독성물질의 활성화 및 해독화에 미치는 효과 유무를 판단하기 위해서는 활성화물질이 농축된 추출물 및 분획물을 사용하여 특정 독성(발암)물질에 대해 효과를 살펴보는 추가적인 연구가 요구된다.

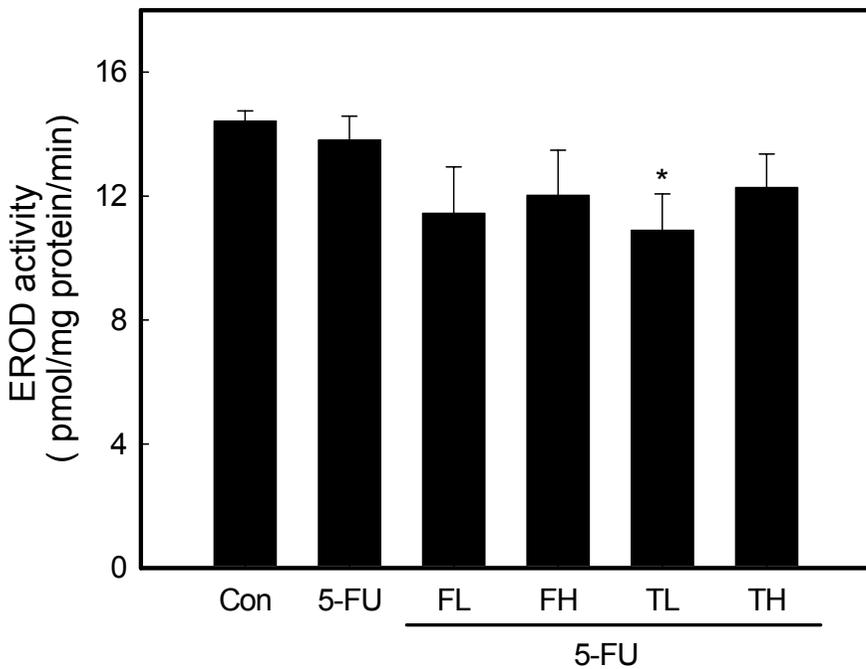


Fig. 71. Effects of the wild ginseng leaves(FL and FH) and its tea product(TL and TH) on the hepatic ethoxyresorufin *O*-deethyase activity in C57BL/6 mouse.  $P < 0.05$ ; control vs TL.

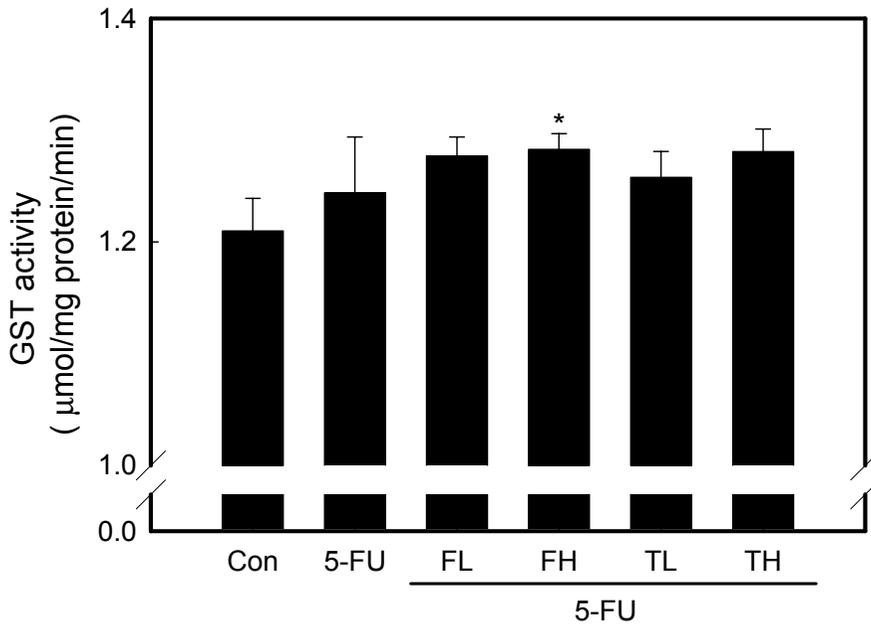


Fig. 72. Effects of the leaves of wild ginseng (FL and FH) and its tea product(TL and TH) on the hepatic glutathione S-transferase activity in C57BL/6 mouse.  $P < 0.05$ ; control vs FH

##### 5) 장염증억제 동물실험

대장암 모델은 크게 자연적 발생모델, 화학적 발암물질을 통한 발암모델과 발암유전자 및 종양억제인자의 유전자적 조절을 통해 발암을 유발하는 모델로 나눌 수 있다. 또한 대장염이 오래 지속될 경우 대장암 환자의 약 5-15%가 대장암으로 발전되기 때문에 최근에는 acetic acid, trinitrobenzene sulfonic acid, formalin, indomethacin, dextran sulfate sodium (DSS) 등의 약제를 이용하거나 면역 유전자 조절을 통해 대장염을 유발한 모델을 이용하여 대장암의 예방측면을 강조하여 연구한 보고가 증가하는 있는 경향이다. 본 연구에서도 당초 화학적 발암물질을 통한 대장암 모델을 사용하여 장뇌삼 잎의 항암효과를 살펴보기 위해 계획하였다. 그러나 본 연구 결과 1) 장뇌삼 추출물의 직접적인 암세포 성장 저해 효과는 관찰되지 않았으며, 2) 항암효과는 향후 최종 인체에서의 효과를 규명하

기가 어려워 실용화 가능성이 매우 낮으며, 3) 본 연구에서 개발하는 제품의 형태가 '차(tea)'라는 점 등을 고려하여 화학적 발암모델에서의 직접적인 항종양/항암 효과를 조사하는 것 보다 장뇌삼 잎 및 차가 DSS로 유발한 장염증 동물모델에서 개선효과를 보이는지의 여부를 조사하는 것이 더 타당하다고 판단되었다. 이에 본 연구에서는 Balb/c 마우스에서 장뇌삼 잎 및 차의 투여가 DSS로 유발한 수종 장염증 지표에 미치는 영향을 살펴보았다.

Balb/c 마우스를 대조군(n=8, Con), DSS 단독 투여군(n=8, DSS), DSS+장뇌삼 잎 300 mg/kg 투여군(n=8, DSS+F) 및 DSS+장뇌삼 잎차 300 mg/kg 투여군(n=8, DSS+T)의 4군으로 나누고 매일 체중, 식이 섭취량, 음수섭취량 및 변의 형태를 관찰하였으며, 7일에 희생하여 장염증 지표들을 측정하였다. 그 결과 Fig. 73과 같이 DSS 투여군은 정상군에 비해 체중이 유의적으로 낮았으나, 장뇌삼 잎 보충시 감소된 체중이 대조군의 수준으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 실험군의 간 중량을 비교하였을 때, DSS 단독이나 장뇌삼 시료의 투여는 간 중량에 영향을 미치지 않았다(Fig. 74). 또한 대장염 동물모델에서 비교적 신뢰성 있는 장염증 지표로 인식되는 대장 중량이나 대장의 길이에 있어서도, DSS 투여에 의해 유의적으로 감소된 대장 중량이나 길이에 대해 장뇌삼 시료의 투여 효과는 관찰되지 않았다(Fig. 75 및 76).

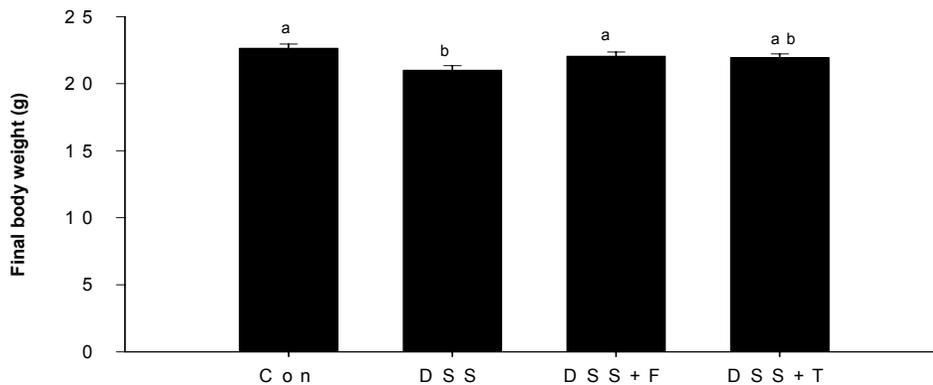


Fig. 73. Effects of the wild ginseng leaves and its tea product on the final body weight of Balb/c mice. Con: control group treated with water, DSS: group treated with 5% DSS, DSS+F: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng leaves, DSS+T: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng tea

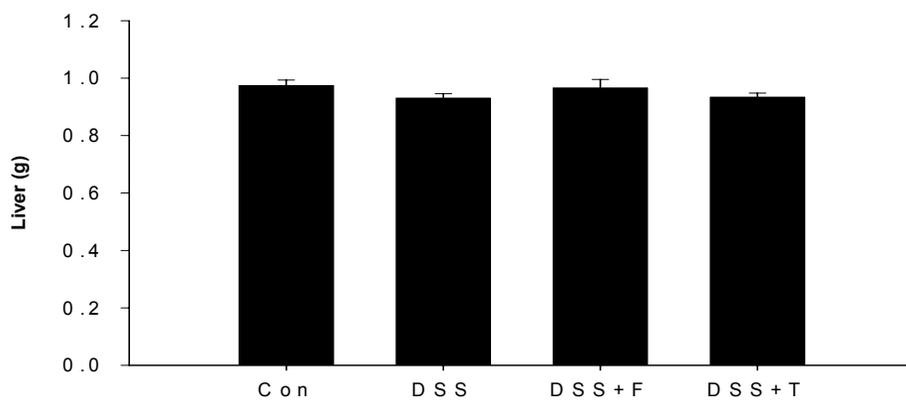


Fig. 74. Effects of the wild ginseng leaves and its tea product on the liver weight of Balb/c mice. Con: control group treated with water, DSS: group treated with 5% DSS, DSS+F: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng leaves, DSS+T: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng tea

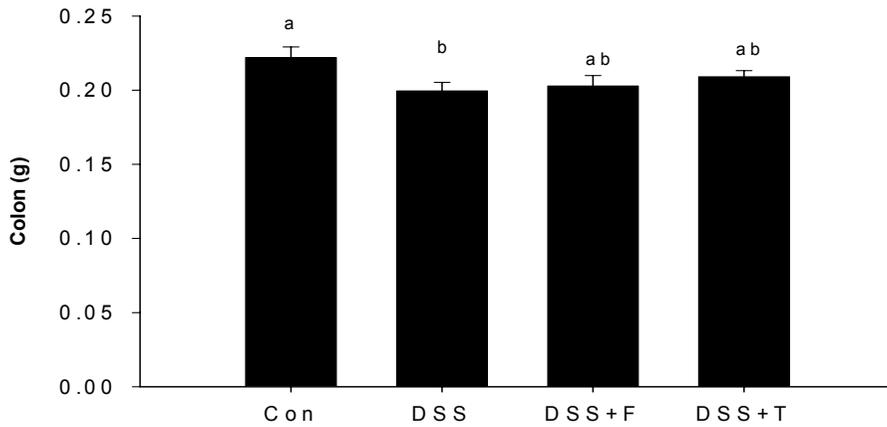


Fig. 75. Effects of the wild ginseng leaves and its tea product on the colon weight of Balb/c mice. Con: control group treated with water, DSS: group treated with 5% DSS, DSS+F: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng leaves, DSS+T: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng tea.

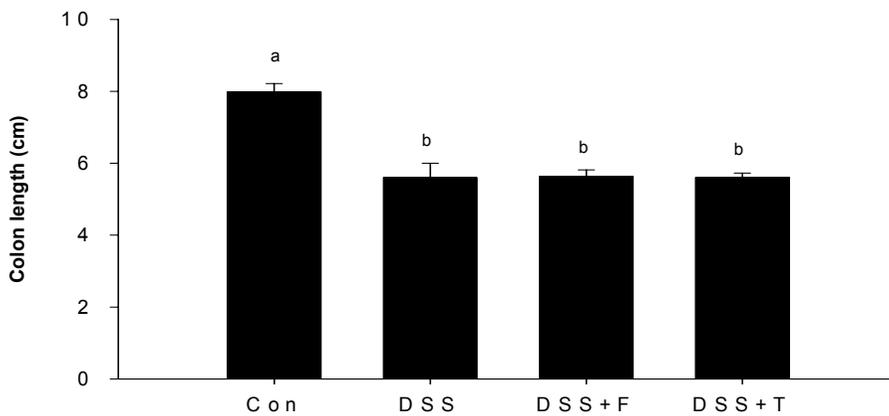


Fig. 76. Effects of the wild ginseng leaves and its tea product on the colon length of Balb/c mice. Con: control group treated with water, DSS: group treated with 5% DSS, DSS+F: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng leaves, DSS+T: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng tea.

한편, 장염증 유발시 증가하는 것으로 알려져 있는 혈청 및 조직중 TNF- $\alpha$ , IL-6와 같은 사이토카인의 변화에 미치는 장뇌삼 시료의 영향을 살펴보았다. 그 결과, Fig. 77 및 78과 같이 DSS 투여에 의해 혈청 TNF- $\alpha$  및 IL-6 농도가 증가하였으나 장뇌삼 시료의 투여는 사이토카인 농도에 유의적인 변화를 나타내지 않았다.

이상의 결과로 보아 장뇌삼 잎 및 잎차의 투여는 DSS에 의해 유발된 장염증에 대해 거의 영향을 나타내지 않은 것으로 보인다. 그러나 본 연구에서 냉동 건조한 장뇌삼 잎과 잎차를 그대로 DSS 유발 장염증 억제 효과를 살펴보기 위한 동물시험에 사용하였기 때문에 활성물질의 농도가 너무 낮아 영향이 나타나지 않았을 가능성을 완전히 배제할 수는 없다고 사료된다.

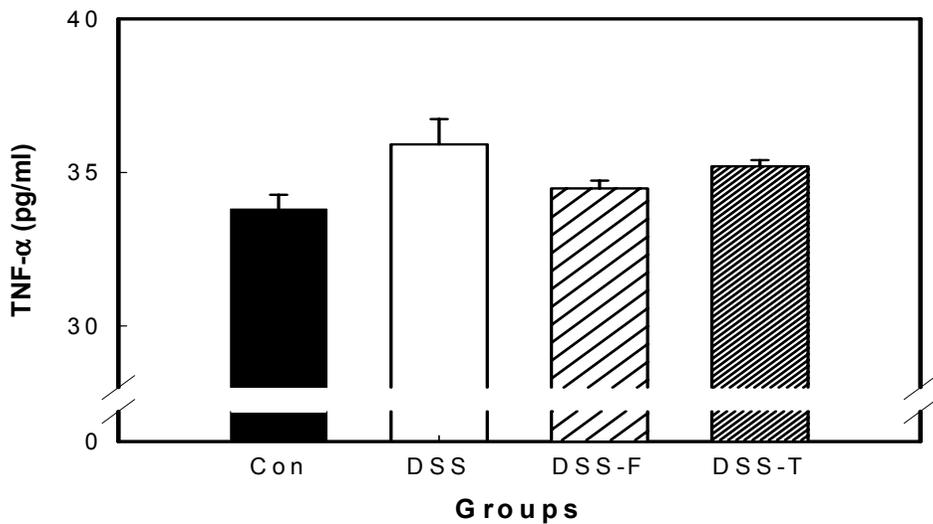


Fig. 77. TNF- $\alpha$  level in serum from mice treated with the wild ginseng leaves and its tea product. Con: control group treated with water, DSS: group treated with 5% DSS, DSS+F: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng leaves, DSS+T: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng tea.

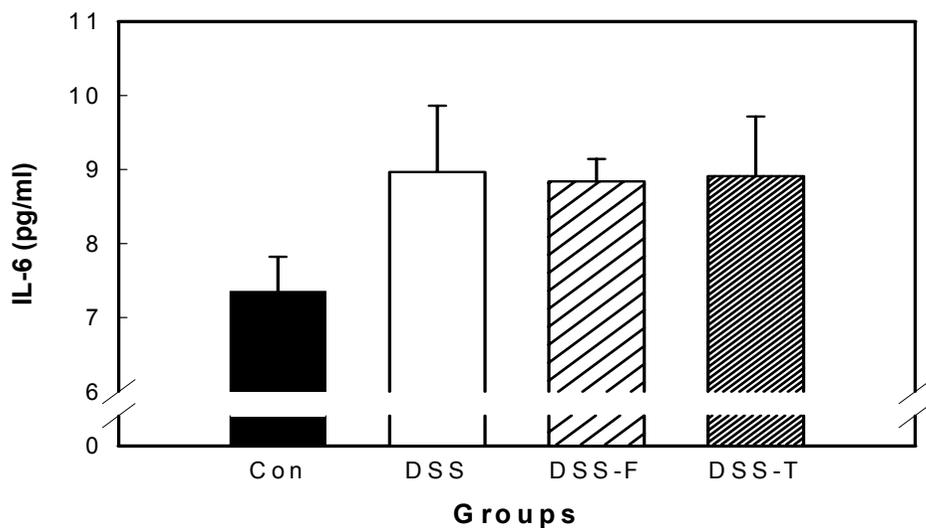


Fig. 78. IL-6 level in serum from mice treated with the wild ginseng leaves and its tea product. Con: control group treated with water, DSS: group treated with 5% DSS, DSS+F: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng leaves, DSS+T: 5% DSS+300 mg/kg of wild ginseng tea

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	달성도 (점수)
1차년도(2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 계획된 방법의 타당성 및 현장적용 가능성</li> <li>○ 계획제품의 시장성</li> <li>○ 연구결과의 체계적이고 효율적인 수행정도</li> </ul>	30  20  50
2차년도(2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발기술의 현장적용시의 용이도</li> <li>○ 개발기술의 경제산업적 파급효과</li> <li>○ 연구결과의 체계적이고 효율적인 수행정도</li> </ul>	30  20  50
3차년도(2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구결과의 활용성 및 현장적용 가능성</li> <li>○ 개발기술 및 제품의 시장성 및 전망</li> <li>○ 연구결과의 체계적이고 효율적인 수행정도</li> </ul>	30  30  40
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구개발기술의 수행결과 및 효용성</li> <li>○ 개발기술의 산업체 이전 및 실용화</li> <li>○ 개발기술의 경제산업적 파급효과</li> </ul>	40  30  30

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 활용방안

본 연구과제의 수행으로 얻은 기초적인 연구결과는 J. Ethnopharmacology, Food Chemistry 등의 국내외 전문학술지에 논문으로 게재하였으며 특히 장뇌삼 잎의 항산화성 등 생리기능적 특성에 관한 연구결과는 향후 신문, 방송 등 홍보매체를 통하여 전파함으로써 장뇌삼 잎의 활용방안 증대 및 이를 통한 국민건강 증진에 기여할 계획임. 또한 제품개발과 관련된 신기술 중 일부는 특허 출원하였고 참여기업을 통하여 장뇌삼 잎 가공식품의 생산에 적극 활용할 예정임.

### 2. 학술지 및 관련 홍보매체에 게재

가. J. Ethnopharmacology, Food Chemistry 등 국내외 저명학술지에 5편 게재 완료, 3편 투고 중

나. 한국식품과학회 등 학술발표회에 참여하여 5편의 연구결과 발표

다. 신기술은 특허출원

라. 신문, 방송 등 홍보매체에 장뇌삼 잎의 우수성에 대한 대국민 홍보예정

마. 학술지 논문게재 실적

1) 정창화, 석호문, 최인욱, 최희돈, 조홍연. Effect of wild ginseng leaves on lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats. J. Ethnopharmacology. 98, 245-250 (2005)

2) 정창화, 석호문, 최인욱, 조홍연. Antioxidant activities of cultivated and wild Korean ginseng leaves. Food Chemistry. 92, 535-540 (2005)

3) 정창화, 석호문, 최인욱, 박미원, 조홍연. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. LWT (2005)

4) 석호문, 정창화, 김윤숙, 박현석. Phenolic acids and antioxidant activities of wild ginseng leaves. Food Sci. Biotechnol, 14, 371-374 (2005)

5) 석호문. 정창화. 최인욱. 최희돈. Changes in contents of ginsenosides and phenolic compounds in wild ginseng leaves during tea processing. Food Sci. Biotechnol. 13, 516-518 (2004)

바. 학회 논문발표 실적

- 1) 석호문, 정창화, 김윤숙. 장뇌삼 잎차의 이화학적 특성. 한국식품과학회 제 70차 학술발표회, 경주 교육문화회관, 2003. 6
- 2) 석호문, 정창화, 최인욱, 전향숙. 장뇌삼 잎에 함유된 항산화성 물질의 분리. 한국식품과학회 제 70차 학술발표회, 경주 교육문화회관. 2003. 6
- 3) 석호문, 정창화, 최인욱. Effects of wild ginseng leaf extracts supplement on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. 한국식품과학회 제 71차 학술발표회, 강원도 용평리조트, 2004. 6
- 4) 석호문, 정창화, 최희돈, 박용곤. 덩음처리가 장뇌삼 잎의 항산화 성분 및 항산화 활성에 미치는 영향. 한국식품과학회 제 71차 학술발표회, 강원도 용평리조트, 2004. 6
- 5) 석호문, 정창화, 최인욱, 김윤숙, 조가영, 송영빈. Effect of methanol extract and its three phenolic compounds from wild ginseng leaves on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. 한국식품과학회 제 72차 학술발표회, 서울 Coex 컨벤션센터, 2005. 6

3. 특허출원

- 가. 장뇌삼 잎 덩음차 및 그의 제조방법(특허출원 제10-2004-79765호, 2004. 10)
- 나. 장뇌삼 잎을 포함하는 혼합 덩음차 및 그의 제조방법(특허출원 제 10-2005-96571호, 2005. 10)

## 제 6 장 참 고 문 헌

Aebi, H. (1983). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105, 121-126.

Adachi I, Watanabe T. (1989). Role of supporting therapy of Juzentaiho-to(JTT) in advanced breast cancer patients. *Japanese J. Cancer & Chemotherapy.* 16, 1538-1543.

Aksoy, N., Vural, H., Sabuncu, T. and Aksoy, S. (2003). Effects of melatonin on oxidative antioxidative status of tissues in streptozotocin induced diabetic rats. *Cell Biochem. Func.*, 21, 121-125.

Alexander, R.J. (1988). *Sweeteners: Nutritive*, St. Paul, MN: Eagan Press.

Anderson, J.W. and Bridges, S.R. (1988). Dietary fiber of selected foods. *American J. Clin. Nutr.*, 47, 440-447.

AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis*, 16th ed.: Association of Analytical Chemists: Arlington, VA.

Arts, I.C.W, Hollman, P.C.H. and Kromhout, D. (1999). Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet.*, 354, 488.

Aruma, O.I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidant. *Food Chem. Toxicol.*, 62, 671-683.

Attele, A.S., Wu, J.A. and Yuan, C.S. (1999). Ginseng pharmacology. *Biochem. Pharmacol.*, 58, 1685-1693.

Azuma, K., Nakayama, M., Koshioka, M., Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Kohata, K., Yamauchi, Y., Ito, H. and Higashio, H. (1999). Phenolic

antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3963–3966.

Baldew GS, van den Hamer CJ, (1989). Los G. selenium-induced protection against cis-diamminedichloroplatinum(II) nephrotoxicity in mice and rats. *Cancer Res.* 49, 3020–3023.

Baxter, J.H. (1995). Free amino acid stability in reducing sugar systems. *J. Food Sci.*, 60, 405–408.

Bhor, V.M., Raghuram, N. and Sivakami, S. (2004). Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin induced diabetic rats. *The International Journal of Biochem. Cell Biol.*, 36, 89–97.

Bishayee, S. and Balasubramanian, A.S. (1971). Lipid peroxide formation in rat brain. *J. Neurochem.*, 18, 909–920.

Brand Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813–820.

Cao, G., Sofic, E. and Prior, R. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3426–3431.

Catherine, A., Rice Evans, C.A., Nicholas, J.M. and George P. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933–956.

Ceriello, A. (2000). Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabol.*, 49, 2729.

Cerutti, P.P. (1991). Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur. J. Clin. Invest.*, 21, 1-11.

Chatterjea, M.N. and Shinde, R. (2002). *Text Book of Medical Biochemistry*. 5th ed. Jaypee Brothers, Medical Publishers (P) Ltd., New Delhi, p. 317.

Chen, X.G., Zhu, Y.G., Wang, X.Z., Zhu, L.A. and Huang, C. (2001). Protective effect of ginsenosides Rg1 on dopamine induced apoptosis in PC12 cells. *Acta Pharmcolo. Sin.*, 22, 673-678.

Chen, X.C., Zhu, Y.G., Zhu, L.A., Chun, H., Chen, Y., Chen, L.M., Fang, F., Zhou, Y.C. and Zhao, C.H. (2003). Ginsenoside Rg1 attenuates dopamine induced apoptosis in PC12 cells by suppressing oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.*, 473, 1-7.

Cheng JH. (1994). Clinical study on prevention and treatment to chemotherapy caused nephrotoxicity with jian-pi yi-qi li-shui Decoction. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih.* 14, 331-333.

Cho, J.Y., Moon, J.H., Eun, J.B., Chung, S.J. and Park K.H. (2004). Isolation and characterization of 3(Z) dodecenedioic acids as an antibacterial substances from *Hovenia dulcis* THUNB. *Food Science and Biotechnology*, 13, 46-50.

Chun HS, Kim HJ, Choi EH. (2001). Modulation of cytochrome P4501-mediated bioactivation of benzo[a]pyrene by volatile allyl sulfides in human hepatoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2205-2212.

Chung, S.K., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1997). Hydroxyl radical

scavenging effects of species and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 118-123.

Conklin KA. (2000). Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: Impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr. Cancer*, 37, 1-18.

Cook, N.C. and Samman, S. (1996). Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.

Cui, K., Luo, X., Xu, K. and Murthy, M.R.V. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 28, 771-799.

Cuvelier, M.E., Richard, H. and Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid phenols: Structure activity relationships. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 324-325.

Das, S., Vasisht, S., Snehalata, Das, N. and Strivastava, M. (2000). Correlation between total antioxidant status and lipid peroxidation in hypercholesterolemia. *Cur. Sci.*, 78, 486.

Dinis, T.C.P., Maderia, V.M.C. and Almerida, L.M. (1994). Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5 aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 315, 161-169.

Donnini, D., Zambito, A.M., Perella, G., Ambesi Impiombat, O. and Curcio, F. (1996). Glucose may induce cell death through a free radical mediated mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 219, 412-417.

Dragsted, L.O., Strube, M. and Larsen, J.C. (1993). Cancer protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxic.*, 72, 116-135.

Edenharder, R., Keller, G., Platt, K.L. and Unger, K.K. (2001). Isolation and characterization of structurally novel antimutagenic flavonoids from spinach (*Spinacia oleracea*). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2767-2773.

Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405, 903-904.

Fan, Z.H., Isobe, K.I., Kiuchi, K. and Nakashima, I. (1995). Enhancement of nitric oxide production from activated macrophages by a purified form of ginsenoside (Rg1). *American J. Chinese Med.*, 23, 279-287.

Food Analysis. (2000). Hakmun Publishing Co., p 657.

Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-880.

Giray, B., Kan, E., Bail, M., Hincal, F. and Basaran, N. (2003). The effect of vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in hemodialysis patients. *Clin. Chim. Acta*, 338, 91-98.

Goldberg, R.B. (1981). Lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care*, 4, 561-572.

Gorinstein, S., Cvikrova, M., Machackova, I., Haruenkit, R., Park, Y.S., Jung, S.T., Yamamoto, K., Ayala, A.L.M., Katrich, E. and Trakhtenberg, S. (2004). Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits. *Food Chem.*, 84, 503-510.

Greggi Antunes LM, Darin JD, Bianchi MD. (2000). Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in

adult rats: A dose-dependent study. *Pharmacol. Res.* 41, 405-411.

Gul, M., Kutay, F.Z., Temocin, S. and Hanninen, O. (2000). Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J. Exp. Biol.*, 38, 625-634.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249. 7130 - 7139.

Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 91, 14-22.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 186, 1-85

Hardman WE, Moyer MP, Cameron IL. (2000). Dietary fish oil sensitizes A549 lung xenografts to doxorubicin chemotherapy. *Cancer Lett.* 14, 145-151.

Hasan, A., Ahmed, I., Jay, M. and Voirin, B. (1995). Flavonoid glycosides and an anthraquinone from *Rumex chalepensis*. *Pytochem.*, 39, 1211-1213.

Hertog, M.G.L, Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. (1999). Dietary antioxidant flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits common consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2379-2383.

Hertog, M.G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A. and Nedeljkovic, S. (1995). Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.*, 155, 381-386.

Hollman, P.C.H., Hertog, M.G..L. and Katan, M.B. (1996). Analysis and health

benefits of flavonoids. *Food Chem.*, 57, 43-46.

Horie T, Nakamaru M, Masubuchi Y. (1998). Docosahexaenoic acid exhibits a potent protection of small intestine from methotrexate-induced damage in mice. *Life Sci.* 62, 1333-1338.

Hou, J.P. (1997). The chemical constituents of ginseng plants. *Comp Med East West*, 5, 123-145.

Husain, S.R., Cillard, J. and Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem.*, 26, 2489-2491.

Jacob, R.A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.*, 15, 755-766.

Jadhav, S.J. and Andrew, W.T. (1977). Effects of cultivars and fertilizers on nonvolatile organic acids in potato tubers. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 10, 13.

Jiang, B., Wang, C., Han, Y., Hu, X., Zheng L., Zhao, Y. (2004) Isolation and identification of minor bioactive saponins from the leaves of *Panax notoginseng*. *Zhong Yao Cai*, 27, 489-491.

Jin, S.H., Park, J.K., Nam, K.Y., Park, S.N. and Jung, N.P. (1999). Korean red ginseng saponins with low ratios of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponin improve scopolamine induced learning disability and spatial working memory in mice. *J. Ethnopharm.*, 66, 123-129.

Johnson, I.T. and Southgate, D.A.T. (1994). *Dietary Fiber and Related Substances*; Chapman and Hall: London, U.K.

Johnson, M.K. and Loo, G. (2000). Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage o cellular DNA. *Mutat. Res.*, 459, 211-218.

Johnston, F.B. and Hammill, M.M. (1968). The nonvolatile organic acids of some fresh fruits and vegetables. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 1, 3-5.

Jones, E. and Hughes, R.E. (1983). Foliar ascorbic acid in some angiosperms. *Phytochem.*, 22, 2493-2499.

Kakkar, R., Mantha, S.V., Radhi, J., Prasad, K. and Kalra, J. (1997). Antioxidant defense system in diabetic kidney: A time course study. *Life Sci.*, 60, 667-679.

Kaneko, K., Kurasawa, H. and Maeda, Y. (1980). Chemical properties of pectic substances and compositions of cell wall polysaccharides from Japanese radishes and their changes during drying and salting. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 27, 298-304.

Kehrer, J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 23, 21-48.

KFDA. (2002). Food Code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.

Kim, J.S., Kim, K.W., Choi, K.J., Kwak, Y.K., Im, K.S., Lee, K.H. and Chung, H.Y. (1996a). Screening of antioxidative components from red ginseng saponin. *Korean J. Ginseng Sci.*, 20, 173-178.

김석창, 최광주, 고성용, 주현규(1987). 인삼의 근, 엽 및 경의 일반성분, 용매별 엑기스 및 사포닌 함량 비교. *고려인삼학회지*, 11, 118-122.

Kim, Y.H., Park, K.H., Rho, H.M., (1996b). Transcriptional activation of the Cu, Zn superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb<sub>2</sub> extracted from a medical plant, *Panax ginseng*. *The Journal of Biological Chemistry*. 271, 24539-24543.

Kobayashi K, Shida R, Hasegawa T, Satoh M, Seko Y, Tohyama C, Kuroda J, Shibata N, Imura N, Himeno, S. (2005). Induction of hepatic metallothionein

by trivalent cerium: Role of interleukin 6. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1859-1863.

Komatsu, M., Tomimori, T. and Makiguchi, Y. (1969). Studies on the constituents of the herb of *Panax ginseng* C. A. Meyer. II. On the flavonoid constituents. *Yakugaku Zasshi*, 89, 122-126.

Kumazawa, S., Hamasaka, T. and Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.*, 84, 329-339.

Kumura Y, Okuda H. (1999). Prevention by chitosan of myelotoxicity, gastrointestinal toxicity, and immunocompetent organic toxicity induced by 5-fluorouracil without loss of antitumor activity in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 765-774.

Kuti, J.O. (2004). Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chem.*, 85, 527-533.

Lawrence, R.A. and Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 952-958.

Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J. and Lee C.Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7292-7295.

Lewis, N.G. (1993). Plant phenolics. In: Alscher, R.G., Hess, J.L., eds. *Antioxidants in Higher Plant*. Boca Raton (pp. 135-169). FL: CRC Press.

Li, T.S.C., Mazza, G., Cottrell, A.C. and Gao, L. (1996). Ginsenosides in roots and leaves of American ginseng. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 717-720.

Lin JQ, Wu DW. (1993). 32 cases of postoperative osteogenic sarcoma treatment by chemotherapy combined with Chinese medicinal herbs. *Chung-Kuo Chung Hsi i Chieh Ho Tas Chih.* 13, 150-152.

Luh, B.S. (1960). Chemical and colour changes in canned tomato ketchup.

Food Technol., 15, 52-55.

Luo, X.D., Basile, M.J. Kennelly, E.J. (2002). Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (Star Apple). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1379-1382.

Mabry, T.J., Markhan, K.R. and Thomas. M.B. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. New York: Springer.

MAFF. (1995). *Manual of Nutriron*, 10th ed., Reference Book 342, HMSO, London, U.K.

Mahady, G.B., Gyllenhaal, C., Fong, H. H.S. and Farnsworth, N.R. (2000). Ginseng: a review of safety and efficacy. *Nutr. Clin. Care.*, 3, 90-101.

Marklund, S. and Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47, 469-474.

Markham, K.R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides. In: Harborne, J.B., ed. *Methods in plant biochemistry*. Vol. 1. Plant phenolics. New York: Academic Press, pp. 197-235.

Michiels, C., Raes, M., Toissaint, O. and Remacle, J. (1994). Importance of S glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 17, 235-248.

Middleton, E. and Kandaswani, C. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.*, 43, 1167-1179.

Mizuno, M., Yamada, J., Terai, H., Kozukue, N., Lee, Y.S. and Tsuchida, H. (1994). Differences in immunomodulating effects between wild and cultivated *Panax ginseng*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 1672-1678.

Mohamed, A.K., Bierhaus, A., Schiekofer, S., Tritschler, H., Ziegler, H. and

Nawroth, P.P. (1999). The role of oxidative stress and NF (B) activation in late diabetic complications. *Biofactors*, 10, 175-179.

Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H. and Suzuki, N. (2001). Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chem.*, 75, 237-240.

Nagata Y, Takata J, Matsushima Y. (1999). Effects of a water-soluble prodrug of vitamin E on doxorubicin-induced toxicity in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 22, 698-702.

Namiki, M. (1990). Antioxidant/antimutagens in food. *Cri. Rev. Food Sci. Nutr.*, 29, 273-300.

Nice, D.J. and Robinson, D.S. (1992). Inhibition of lipid autoxidation by bovine superoxide dismutase. *Food Chem.*, 45, 99-103.

O'Dell, B.L., Sunde, R.A. (1997). Introduction. In *Handbook of Nutritionally Essential Minerals*. O'Dell, B.L., Sunde, R.A., Eds., Marcel Dekker, New York, pp. 1-12.

Ohkawa, H., Oshishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351-358.

Ohkawa K, Tsukada Y, Dohzono H. (1988). The effects of coadministration of selenium and cis-platin(CDDP) on CDDP-induced toxicity and antitumour acidity. *Br. Cancer*, 58, 38-41.

Osawa, T. and Namiki, M. (1981). A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 735-739.

Ozturk, Y., Altan, V.M. and Yildizoglu, A. (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol. Rev.*, 48, 69-112.

Park, S.N., Choi, S.W., Boo, Y.C., Kim, C.K. and Lee, T.Y. (1990). Effects of

flavonoids of ginseng leaves on erythrocyte membranes against singlet oxygen caused damage. *Korean Journal of Ginseng Science*, 14, 191-199.

Park, H.S., Kwak, T.H., Moon, D.G., Kim, J.J. and Chen, J. (2004). Development of the anti cancer immunotherapy for human prostate cancer: in vivo characterization of an immunotropic and anti cancer activities of the new polysaccharide from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Eur. Urol. Suppl.*, 2, 94.

Pietta, P., Mauri, P. and Rava, A. (1986). Improved high performance liquid chromatographic method for the analysis of ginsenosides in *Panax ginseng* extracts and products. *J. Chromatogr.*, 356, 212-219.

Prochaska HJ, Santamaria AB. (1988). Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* 169, 328-336.

Ragunathan, V. and Sulochana, N. (1994). A new flavonol bioside from the flowers of *Hibiscus vitifolius* Linn. and its hypoglycemic activity. *J. Indian Chem. Soc.*, 71, 705-706.

Ramarathnam, N., Ochi, H. and Takeuchi, M. (1997). Antioxidant defense system in vegetable extracts. In F. Shahidi (Ed.), *Natural antioxidant: chemistry, health effects and applications* (pp. 76-87). Champaign, ILL: AOCS press.

Rao, M.V., Paliyath, G. and Ormrod, D.P. (1996). Ultraviolet Band Ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 110, 125-136.

Rice Evans, C., Miller, N.J., Bolwell, G.P., Bramley, P.M. and Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.*, 22, 375-383.

Rice Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biological Medicine*, 20, 933-956.

Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P. and Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.

Rudakewich, M., Ba, F. and Benishin, C.G. (2001). Neurotropic and neuroprotective actions of ginsenoside Rb(1) and Rg(1). *Planta Med.*, 67, 533-537.

Poli, G (1993). Liver damage due to free radicals. *Br. Med. Bull.* 49, 604-620.

Pyo, Y.H., Lee, T.C., Logendra, L. and Rosen, R.T. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chemistry*, 85, 19-26.

Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F. and Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 481-486.

Saito, H., Morita, M., Takagi, K. (1973). Pharmacological studies of *Panax ginseng* leaves. *Japan J. Pharmacology*, 23, 43-56.

Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H. and Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 571-581.

Sardesai, V.M. (1998). *Introduction to Clinical Nutrition*. Marcel Dekker, New York.

Satoh, K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 90, 37-43.

Shahidi, F. and Wanasundara, P.K.J. (1992). Phenolic antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 32, 67-103.

Shahidi, F. and Naczki, M. (1995). Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications; Technomic Publishing: Lancaster, PA, pp. 1-20.

Shetty, K. and McCue, P. (2003). Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: integration of systems biology and biotechnological approaches. Food Biotechnology, 17, 67-97.

Shin, K.S., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and Yamada, H. (1997). Rhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression enhancing polysaccharide. Carbohydrate Research, 300, 239-249.

Shin, K.S., Kiyohara, H., Matsumoto, T., Yamada, H. (1998). Rhamnogalacturonan II dimmers cross linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer are responsible for expression of their IL 6 production enhancing activities. Carbohydrate Research, 307, 97-106.

Shirwaikar, A., Rajendran, K., Kumar, D. and Bodla, R. (2004). Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin nicotinamide type 2 diabetic rats. J. Ethnopharm., 91, 171-175.

Siddhuraju, P. and Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2144-2155.

Sidwell, C.G., Salwin, H., Benca, M. and Mitchell Jr, J.H. (1954). The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation, J. Am. Oil Chem. Soc., 31, 603.

Siebert, K.J. (1999). Modeling of the flavor thresholds of organic acids in beer

as a function of their molecular properties. *Food Qual. Pref.*, 10, 129-137.

Singleton, V.L. and Lamuela Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152-178.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonc, M. and Knez., Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 89, 191-198.

Socoher, M., Kunjara, S., Baquer, N.Z., Mclean, P. (1991). Regulation of glucose metabolism in livers and kidneys of NOD mice. *Diabetes*, 40, 1467-1471.

Stasse Wolthuis, M., Hautvast, J., Hermus, R., Katan, M., Bausch, J.E., Rietberg Brussaard, J.H., Velema, J.P., Zondervan, J.H., Eastwood, M.A. and Brydon, W.G. (1979). The effect of a natural high fiber diet on serum lipids, fecal lipids, and colonic function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 32, 1881-1888.

Sugiyama K, Ueda H, Ichio Y, Yokota M. (1995a). Improvement of cisplatin toxicity and lethality by Juzen-taiho-to in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 53-58.

Suk K, Somers SD, Erickson KL. (1993). Regulation of murine macrophage function by IL-4: IL-4 and IFN-gamma differentially regulate macrophage tumoricidal activation. *Immunology*, 80, 617-624.

Sun, F., Iwaguchi, K. and Shudo, R. (1999). Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin induced diabetes. *Clin. Sci.*, 96, 185-190.

Takenoshita S, Hashizume T, Asao T. (1995). Inhibitory effects of combined administration of 5-FU and Krestin on liver cancer KDH-8 in WKA/H rats. *J. Invest. Surg.* 8, 1-5.

Tanaka, O., Nagai, M., Shibata, S. (1966). Chemical studies on the oriental plant drugs. XVI. The stereochemistry of protopanaxadiol, a genuine saponin of ginseng. *Chemical Pharmacology Bulletin*, 14, 1150-1156.

Tiidus, P.M., Pushkarenko, J. and Houston, M.E. (1996). Lack of antioxidant adaptation to short term aerobic training in human muscle. *Am. J. Physiol.* 271, 832-836.

Tomlinson, K.C., Gardiner, S.M., Hebden, R.A. and Bennett, T. (1992). Functional consequences of streptozotocin induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol. Rev.*, 44, 103-150.

XIE, J.T., WANG, C.Z., WANG, A.B., WU, J., Basila, D., Yuan, C.S. (2005). Antihyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stem of *Panax ginseng*. *Acta Pharmacologica Sinica* 26, 1104-1110.

Waki, I., Kyo, H., Yasuda, M. and Kimura, M. (1982). Effects of a hypoglycemic component of ginseng radix on insulin biosynthesis in normal and diabetic animals. *J. Pharmacobio Dynamics*, 5, 547-554.

Wang, H., Cao, G. and Prior, R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701-705.

Wang, S.Y. and Lin, H. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146.

Wee, J.J., Park, J.D., Kim, M.W. and Lee, H.J. (1989). Identification of phenolic antioxidant components isolated from *Panax ginseng*. *Agric. Chem. Biotech.*, 32, 50-56.

Wilson, C.W., Shaw, P.E. and Campbell, C.W. (1982). Determination of organic acids and sugars in guava (*Psidium guajava* L.) cultivars by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.*, 33, 777-780.

Woisky, R.G. and Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Agric. Res.*, 37, 99-105.

Wolff, S.P. and Dean, R.T. (1987). Glucose autoxidation and protein modification. *Biochem. J.*, 245, 243-250.

Xie, J.T., Mehendale, S.R., Wang, A., Han, A.H., Wu, J.A., Osinski, J. and Yuan, C.S. (2004a). American ginseng leaf: ginsenoside analysis and hypoglycemic activity. *Pharmacol. Res.*, 49, 113-117.

Xie, C., Veitch, N.C., Houghton, P.J. and Simmonds, M.S.J. (2004b). Flavonoid glycosides and isoquinolinone alkaloids from *Corydalis bungeana*. *Phytochem.*, 65, 3041-3047.

Yahara, S., Tanaka, O. and Komori, T. (1976). Saponins of the leaves of *O. panax ginseng* C.A. Meyer. *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 2204-2208.

Yamasaki, K., Murakami, C., Ohtani, K., Kasai, R., Kurokawa, T. and Ishibashi, S. (1993). Effects of standardized Panax ginseng extract G115 on the D glucose transport by Ehrlich ascites tumour cells. *Phyto. Res.*, 7, 200-202.

Yang, J., Lam, E.W., Hammad, H.M., Oberley, T.D. and Oberley, L.W. (2002). Antioxidant enzyme levels in oral squamous cell carcinoma and normal human oral epithelium. *J. Oral Pathol. Med.*, 31, 71-77.

Yokozawa, T., Kobayashi, T., Kawai, A., Oura, H. and Kawashima, Y. (1984). Stimulation of lipid and sugar metabolism in ginsenoside Rb2 treated rats. *Chem. Pharmaceu. Bull.*, 32, 2766-2772.

Yoshizawa Y, Enomoto A, Todah, H, Ametani A, Kaminogawa S. (1993). Activation of murine macrophage by polysaccharide fraction from marine algae (*Phrphyra yezoensis*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 1862-1866.

Zhang, S.L., Chen, Y.J., Cui, C.B., He, G.X., Xu, S.X., Pei, Y.P., Yao, X.S.,

Zhu, T.R. (1989). A new minor saponin from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Yao Xue Xue Bao* 24, 877-879.

Zhang W, Anker L, Law RE. (1996). Enhancement of radiosensitivity in human malignant glioma cells by hypericin in vitro. *Clin. Cancer Res.* 2, 843-846.

Zheng, W. and Wang, S.Y. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 502-509.