

최        중  
연구보고서

인삼 Prosapogenin 성분을 이용한 당뇨 및 대사증후군 개선 기능성식품 개발  
(Development of functional food on anti-diabetic and improvement of metabolic  
syndrome using ginseng prosapogenin)

세 명 대 학 교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “인삼 Prosapogenin 성분을 이용한 당뇨 및 대사증후군 개선 기능성식품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 세명대학교  
총괄연구책임자 : 고 성 권  
세부연구책임자 : 고 성 권  
협동연구기관명 : 경희대학교  
협동연구책임자 : 정 성 현  
협동연구기관명 : 포천중문의대  
협동연구책임자 : 이 부 용  
협동연구기관명 : (주) 유 유  
협동연구책임자 : 이 경 희

# 요 약 문

## I. 제 목

인삼 Prosapogenin 성분을 이용한 당뇨 및 대사증후군 개선 기능성식품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리 농산물의 부가가치를 높이기 위해서는 기능성을 극대화한 제품을 개발함으로써 세계화가 가능하고, 고부가가치 기능성식품의 개발은 우선적으로 안전성이 확보된 가공방법과 생리활성 연구를 통한 유효성의 확보가 반드시 필요함.

인삼제품의 수출 촉진과 고부가가치 인삼제품을 개발하기 위해서는 강력한 생리활성을 나타내는 특정성분을 고농도로 함유하게 하는 가공기술과 이와 관련한 유효성의 입증 필요함. 본 연구진은 예비실험을 통하여 인삼류 생약에 식용 양조식초를 처리(인삼사포닌 배당체의 당을 일부분 유리시켜서 Prosapogenin으로 함.) 하여 홍삼특유성분(Ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rh<sub>1</sub>)을 고농도(일반 홍삼제제의 10배이상, 식초처리 인삼제제에 5% 이상)로 함유하는 제조방법을 개발하여 국내 및 국제특허를 출원(국내특허출원번호 : 2003-41914, 국제특허 PCT 출원번호 : PCT/KR/01660)하였고, 예비 생리활성시험으로 고지방식이에 의해 유도된 당뇨 흰쥐를 대상으로 식초처리 인삼제제의 항당뇨작용을 국내특허(국내특허 출원번호 : 2004-27284)로 출원하였음.

이와 같은 가공방법에 의한 식초처리 인삼제제를 이용하여 21세기 세계 인구의 1/4이 발병하게 될것으로 예측되고 있는 당뇨 및 대사증후군 개선 기능성식품을 개발하므로써 우리나라 인삼산업의 혁신적인 발전과 인삼재배자의 소득 증대에 기여하고자 함.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 인삼 prosapogenin을 이용한 제제에 대하여 원료표준화연구, 제제화연구, 성분분리분석, 식품가공연구, 표준품개발과 건강기능식품 등록에 필요한 효력시험 및 독성시험등의 전임상시험을 실시하여 특정질환군에 대한 기능성식품으로 개발하고자 함.

1차년도에서는 성분분리 및 생리활성시험 분야로서 인삼사포닌 표준품 분리와 더불어 당

노 및 대사증후군 약효평가를 실시하고, 식품가공 및 제제개발분야로는 유효성분 대량생산 시스템 확립, 유효성분 액상소재화 공정 확립, 원료 추출 및 제조법 연구, 제제 설계 및 평가를 실시하며, 안전성연구로는 일반독성시험을 실시한다.

2차년도에서는 activity guided separation의 방법으로 항당뇨 및 대사증후군 생리활성물질을 탐색 분리하고, 화학구조를 동정하며, 또한, 당뇨약효 및 기전연구를 실시한다. 가공기술 연구로서 부재료 선정 및 최종배합비 시험, 드링크형 기능성식품 개발, 시제품생산 및 활성 시험, 안정성 연구, 제조공정 연구를 시행하며, 안전성연구로는 유전독성시험을 실시하여 기능성식품 허가를 위한 기초자료로 한다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 과제로부터 얻어진 인삼 prosapogenin 고농도 함유 항당뇨 기능성식품이 세계 10대 상품에 진입할 수 있도록 언론 및 국외 홍보에 주력해 주었으면 좋겠습니다.

## SUMMARY

Korean ginseng(*Panax ginseng*) contains more than 30 different ginseng saponins which have various physiological activities, polyacetylenes which known to have antitumor activities on various cancers, phenolic compounds have antioxidant activities, proteins have radioprotective activities on victims of an atomic air raid, and acidic polysaccharides have immune controlling activities in mouse model experiment.

The ginseng saponin known as the main pharmacological component of Korean ginseng is called ginsenoside. The Shibata Group of Tokyo University has identified the chemical structure of ginsenoside. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> is not found in raw and white ginseng, particularly, the red ginseng contains a small amount of ginsenoside Rg<sub>3</sub> generated during the steam-dried process. Ginsenosides Rg<sub>3</sub> was found to have a anticancer activity on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-kappaB activation and tumor promotion. The purpose of this study was to develop anti-diabetic functional food with the high concentration of ginsenoside Rg<sub>3</sub>, the special component in red ginseng.

# CONTENTS

chapter I	A summary of research and development -----	7
chapter II	The present state of technical development on the inside and outside of the country -----	10
chapter III	Results and contents of research and development -----	11
chapter IV	Achievement of a target and contribution of relation fields -----	144
chapter V	Application plan on results of research and development -----	146
chapter VI	Science technology information of foreign countries was achieved from research and development -----	171
chapter VII	Reference -----	173

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황	10
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	11
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	144
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	146
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	171
제 7 장	참고문헌	173

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구목표

우리 농산물의 부가가치를 높이기 위해서는 기능성을 극대화한 제품을 개발함으로써 세계화가 가능하고, 고부가가치 기능성식품의 개발은 우선적으로 안전성이 확보된 가공방법과 생리활성 연구를 통한 유효성의 확보가 반드시 필요함.

인삼제품의 수출 촉진과 고부가가치 인삼제품을 개발하기 위해서는 강력한 생리활성을 나타내는 특정성분을 고농도로 함유하게 하는 가공기술과 이와 관련한 유효성의 입증 필요함.

본 연구진은 예비실험을 통하여 인삼류 생약에 식용 양조식초를 처리(인삼사포닌 배당체의 당을 일부분 유리시켜서 Prosapogenin으로 함.) 하여 홍삼특유성분(Ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rh<sub>1</sub>)을 고농도(일반 홍삼제제의 10배이상, 식초처리 인삼제제에 5% 이상)로 함유하는 제조방법을 개발하여 국내 및 국제특허를 출원(국내특허출원번호 : 2003-41914, 국제특허 PCT출원번호 : PCT/KR/01660)하였고, 예비 생리활성시험으로 고지방식이에 의해 유도된 당뇨 흰쥐를 대상으로 식초처리 인삼제제의 항당뇨작용을 국내특허(국내특허 출원번호 : 2004-27284)로 출원하였음.

이와 같은 가공방법에 의한 식초처리 인삼제제를 이용하여 21세기 세계 인구의 1/4이 발병하게 될것으로 예측되고 있는 당뇨 및 대사증후군 개선 기능성식품을 개발하므로써 우리나라 인삼산업의 혁신적인 발전과 인삼재배자의 소득 증대에 기여하고자 함.

### 제 2 절 연구내용 및 범위

본 연구에서는 인삼 prosapogenin을 이용한 제제에 대하여 원료표준화연구, 제제화연구, 성분분리분석, 식품가공연구, 표준품개발과 건강기능식품 등록에 필요한 효력시험 및 독성시험등의 전임상시험을 실시하여 특정질환군에 대한 기능성식품으로 개발하고자 함.

1차년도에서는 성분분리 및 생리활성시험 분야로서 인삼사포닌 표준품 분리와 더불어서 당뇨 및 대사증후군 약효평가를 실시하고, 식품가공 및 제제개발분야로는 유효성분 대량생산 시스템 확립, 유효성분 액상소재화 공정 확립, 원료 추출 및 제조법 연구, 제제 설계 및 평



가를 실시하며, 안전성연구로는 일반독성시험을 실시한다.

2차년도에서는 activity guided separation의 방법으로 항당뇨 및 대사증후군 생리활성물질을 탐색 분리하고, 화학구조를 동정하며, 또한, 당뇨약효 및 기전연구를 실시한다. 가공기술 연구로서 부재료 선정 및 최종배합비 시험, 드링크형 기능성식품 개발, 시제품생산 및 활성 시험, 안정성 연구, 제조공정 연구를 시행하며, 안전성연구로는 유전독성시험을 실시하여 기능성식품 허가를 위한 기초자료로 한다.

## 제 3 절 연구개발에 대한 기대성과

### 1. 기술적 측면

- 천연물에 존재하는 배당체를 안전성이 확보된 가공방법으로 비당체나 당기가 일부 유리된 형태로 전환시킬 수 있다면, 생리활성 즉 기능성을 높인 제제개발이 가능하다고 사료됨.
- 본 연구는 안전성이 확보되어 식용하는 식초를 이용하여 인삼사포닌 배당체(ginsenosides)를 일부분의 당기를 가수분해시켜 생리활성이 높은 Prosapogenin 형태의 홍삼특유성분(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>2</sub>)을 대량으로 산생시키므로써, 고 기능성식품을 개발할 수 있음.
- 또한, 원료의 규격화 연구를 통하여 당뇨병 및 대사증후군 효능 기능성식품으로 최초허가 등록하고, 표준추출조건 및 분석 연구를 통한 원재료의 추출 및 표준화 기술을 확보하며 제형연구를 수행하여 연조 및 건조 엑스 변형기술을 확보함.
- 이와 같은 연구는 다른 특용작물(도라지, 오가피, 오미자, 산수유 등)에도 같이 적용할 수 있는 기술로서 앞으로 지속적이고, 체계적인 접근으로 특용작물의 고부가가치화에 혁신을 가져올 것으로 사료됨.

### 2. 경제 · 산업적 측면

- 기능성식품으로 적합한 원료생산, 품질관리, 제제화 및 판매가 모두 국내에서 조달될 경우 선진기술에 의한 수입품과 달리 외국으로의 royalty 지출이 없으므로 상당한 규모의 수입 대체효과 및 화기삼이 우세한 세계시장에의 수출도 기대할 수 있음.
  - 제안하는 기술은 아직 기능성식품으로서 등록뿐만 아니라 시판품은 없으며, 국내외 개발 동향이나 기술수준으로 보아 개발기술은 전무한 편임.
- 또한 국내외적으로 시장을 잃어가고 있는 고려인삼의 입지를 지키기 위한 인삼 종주국인 한

국뿐 아니라 세계최초 당뇨병 치료 효능 기능성식품이 될 것으로 기대함.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

1966년 발표된 시바타(Shibata) 논문에 의하면 사포닌을 초산 등 약산으로 가수분해하면 C-20의 글루코시드 결합(진세노사이드 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd)만 가수분해되고 프로사포게닌(20(R&S)-진세노사이드 Rg<sub>3</sub>)이 얻어진다는 사실이 발표되었으나, 이는 단지 표준품을 만드는데 그쳤다. 한편, 홍삼특유성분 고농도 함유 인삼제제에 대한 제품 개발은 현재 물리적인 반응인 고온처리 혹은 생화학적 반응인 효소처리하는 방법 등을 사용하고 있다.

고온처리하는 방법으로 예를 들면 인삼을 고온에서 가열처리함으로써 약효가 증강된 가공인삼에 관한 것으로 인삼을 120 내지 180 °C의 고온에서 0.5 내지 20시간동안 가열처리하여 진세노사이드 (Rg<sub>3</sub>+Rg<sub>5</sub>)/(Rc+Rd+Rb<sub>1</sub>+Rb<sub>2</sub>)의 비율이 1 이상이 되도록 약효성분을 증가시킨 가공인삼제품 및 이 가공식품이 함유하는 음료조성물에 관한 특허(대한민국특허 제 192678호)와 사포닌 글루코사이드 분해효소를 이용하여 인삼 사포닌의 당기를 가수분해하여 희소한 항암사포닌(Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>)을 제조하는 방법에 관한 특허(대한민국특허 제329259호)등이 있으며 현재 시중에 제품으로는 선삼 그리고 신삼으로 시판되고 있다.

그러나, 물리적인 방법은 약효가 증가되나, 제조시간이 많이 걸리거나 고압 가열기 등 특수장비가 필요하고 특허, 통상의 가공 온도보다 고온으로 가열 처리해야 하므로 대량 제조할 때 인삼이 탄화되는 경우가 발생하는 등 제조공정의 운영상 어려움이 많다.

이와 같은 인삼제제는 아직 식품으로 시판되고 있고 기능성식품으로 허가를 취득하더라도 자양강장, 피로회복, 면역증진이라고 하는 기능성 식품법의 인삼의 효능 표기의 한계를 벗어나지 못하고 있다.

또한, 생리활성물질에 대한 체계적인 소재개발 연구가 이루어지지 않고 있는 실정으로 보다 전문화된 인삼제품으로 개발이 이루어지지 않고 있다. 따라서, 본 연구는 홍삼특유성분 고농도 함유 인삼제제(식초처리 인삼제제)에 대한 기능성 소재를 탐색 분리 동정하여 고 기능성식품 개발을 위한 기초자료로 하여, 인삼의 항당뇨작용을 극대화하고, 대사증후군에 대한 효능을 부가한 고부가가치 기능성 식품을 개발하고자 한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발의 목표 및 내용

#### 1. 연구개발 목표와 내용

- 본 연구에서는 prosapogenin을 이용한 인삼제제에 대하여 원료표준화연구, 제제화연구, 성분분리분석, 식품가공연구, 표준품개발과 건강기능식품 등록에 필요한 효력시험 및 독성 시험등의 전임상시험을 실시하여 특정질환군에 대한 기능성식품으로 개발하는것이 최종목표임.
- 식초처리 인삼제제의 표준화를 위하여 표준 제조법연구, 엑스의 관리기준 설정 및 이에 수반하는 정성, 정량분석법 기술을 확립하고자 함.
- 식초처리 인삼제제의 기능성식품 등록에 필요한 효능의 검증을 위하여 당뇨병 및 X-증후군에 대한 효력시험을 실시하고 독성시험을 통해 기능성식품으로 사용시의 용량 및 이에 따른 안전성 데이터를 확보함.
- 또한 본 연구를 통하여 고려인삼종주국으로서 표준화된 식초처리 인삼제제를 기능성 식품의 원료화하여 당뇨병 및 X-증후군 효능의 우수성과 안전성을 지닌 신 기능성식품을 개발하게 되며, 이를 통해 도출된 생약추출기술과 기능성식품등록 노하우를 향후 타 농산물제제에 확대시켜서 국내 농산물산업의 기술력 강화 및 국제경쟁력을 높이는 것을 목표로 함.

#### 나. 연차별 연구개발 목표와 내용

##### (1) 1차년도

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
제1 세부과제 (식초처리 인삼제제의 성분 분리 및 동정)	인삼사포닌 분리	용매 분획 및 Column chromatography법을 이용한 인삼사포닌 (ginsenoside Rb <sub>1</sub> , Rb <sub>2</sub> , Rc, Rd, Re, Rf, Rg <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , Rg <sub>3</sub> , Rg <sub>5</sub> , Rh <sub>1</sub> , Rh <sub>2</sub> , Rh <sub>4</sub> , Rk <sub>1</sub> ) 분리 연구
	인삼사포닌 동정	물리화학적 성상과 기기분석적(PMR, CMR, HMBC, HMQC, Mass, UV, IR) 방법을 통한 화학구조 동정 연구
제1 협동과제 (당뇨, 대사성 증후군에 대한 생리활성시험)	약효 평가	시험관내 기전연구 OGTT 시험 인슐린 저항성 질환 동물모델 실험 당뇨병 및 X-증후군에 대한 약효평가
제2 협동과제 (액상형 기능성 소재화 가공 및 기능성식품 개발)	유효성분의 액상소재화 확립	공정 유효성분 대량분리조건에 적합한 생산시스템 및 공정 확립 액상소재의 적정 여과 및 농축 시험
제3 협동과제 (원료표준화 및 고형제 건강기능 식품 제형개발)	자료조사	원료 추출법, 분석법 자료 및 특허조사
	원료추출 및 제조 법 연구	최적의 prosapogenin을 이용한 인삼제제 표준화 제조공정 Validation 연구
	분석법 연구 (원료, 제제)	원료- 유효 성분조사를 통해 최적의 유효 표준물질 선정 주성분에 대한 정확성, 정밀성, 직선성이 확보되는 분석법 개발 제제- 주성분 분리정량이 가능한 기기분석 시험법을 개발 하여 회수율 97%이상을 목표로 함
	안정성 연구 (원료, 제제)	원료- 가속조건(40℃, 75%RH)에서 6개월간 안정성시험을 하였을 때 함량의 변화가 초기 대비 5%이내의 변화를 갖 는 안정한 원료 확정 제제- 가속조건(40℃, 75%RH)에서 6개월간 안정성시험을 하였을 때 함량의 변화가 초기 대비 5%이내의 변화를 갖 는 안정한 처방 확립
	Pre- formulation 연구	기초물성 및 부형제와의 상호작용을 연구
	제제 설계 및 평 가	적절한 제형결정을 위한 연구
위탁과제 (독성시험)	단회투여시험	설치류 및 비설치류에서의 개략적인 치사량을 구함.

(2) 2차년도

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
제1 세부과제	인삼 pro-sapogenin 성분 분리	용매 분획 및 Column chromatography법을 이용한 생리활성물질 분리 연구
	인삼 pro-sapogenin 성분 동정	물리화학적 성상과 기기분석적(PMR, CMR, HMBC, HMQC, Mass, UV, IR) 방법을 통한 화학구조 동정 연구
	인삼 pro-sapogenin 성분 함량분석	HPLC법 및 정량분석에 의한 함량 분석 연구
제2 협동과제	적정 부재료 선정 및 최종 배합 시험	기호성 향상 위한 부재료 배합비 설정 시험 최적 배합비 설정
	드링크형 기능성식품 개발	관능검사: Panel discussion 방식에 의한 배합 시험 적정 여과 조건 시험, 적정 살균 조건 설정, 저장성 시험
	시제품제조	주요 대량 생산 공정 검토: 배합 및 여과공정 검토, 충전 공정, 살균 및 냉각 공정 검토 시제품 제조
제3 협동과제	제제 분석법 연구	주성분 분리정량이 가능한 기기분석 시험법을 개발하여 회수율 98% 이상을 목표로 함
	안정성 연구 (원료 및 제제)	원료- 실온조건(25℃, 60%RH)에서 1년간 안정성시험을 하였을 때 함량의 변화가 초기 대비 5%이내의 변화를 갖는 안정한 원료 확정 제제- 실온조건(25℃, 60%RH)에서 1년간 안정성시험을 하였을 때 함량의 변화가 초기 대비 5%이내의 변화를 갖는 안정한 처방 확립
	Scale-up 제조공정연구	시작품생산 및 Scale-up에 대비한 제조공정 최적화 연구
	시작품생산	시험용 시작품 제작
	포장용기 선정	가혹조건에서의 영향을 받지 않는 포장용기 선정 (수출용 포장재)
	건강기능식품 허가등록	건강기능식품 등록을 위한 허가자료제출
	위탁과제	유전독성시험

## 2. 연구개발 방법 및 설계

### 가. 제1 세부과제 - 식초처리 인삼제제의 성분 분리 및 동정

과제	연구개발 방법 및 설계
1) 표준품의 분리 및 동정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 실험재료 : 식초 처리 인삼제제 및 인삼 엑스</li> <li>○ 실험방법 : 엑스의 Ether 처리 인삼 수가용부의 Diaion column 흡착 H<sub>2</sub>O→100% MeOH로 전개 인삼사포닌 분획의 silica gel 및 C18 column 분리, 분광학적인 구조분석 인삼사포닌(ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>, Rh<sub>4</sub>, Rk<sub>1</sub>)을 확인 동정</li> </ul>
2) 인삼 prosapogenin 성분 분리 및 동정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 실험재료 : 식초 처리 인삼제제</li> <li>○ 실험방법 : Activity guided separation에 의한 탐색 분리, 엑스의 용매 분획 활성분획의 Column chromatography법(silica gel, C18, sephadex LH-20, diaion column)에 의한 성분 분리, 분광학적인 구조분석</li> </ul>
3) HPLC법 및 정량법에 의한 인삼 prosapogenin 성분 함량 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 실험재료 : 식초 처리 인삼제제</li> <li>○ 실험방법 : 시료를 세말로 한 다음 각각 10 g을 정밀히 달아 MeOH을 넣고 수욕상에서 가열, 추출한 다음 여과하여 감압 농축함. 다음 H<sub>2</sub>O를 넣어 녹이고 Ether를 넣어 탈지한 후 수층을 취하여 감압농축한 후 10 mg을 취하여 MeOH 1 ml를 가한 것을 검액으로 한다. 분리된 활성물질표품(각종 ginsenoside)을 각각 1 mg씩 정밀히 달아 에펜돌프 튜브에 넣고 MeOH 1 ml을 넣어 용해시킨 것을 표준액으로 함. HPLC 장치는 Gilson 305 system(Gilson, 프랑스)이며, 컬럼은 μ-Bondapak C<sub>18</sub>(Waters, 3.9×150mm, 미국)을 사용함. 이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %에서 33 %, 60 % 그리고 80 %로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절함. 전개온도는 실온, 유속은 분당 1.0 ml, 크로마토그램은 uv/vis 검출기(Gilson 118, 프랑스)를 이용하여 210nm에서 검출함.</li> </ul>

### 나. 제1 협동과제 - 당뇨, 대사성 증후군에 대한 생리활성시험

과제	연구개발 방법 및 설계
1) 시험관내 기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>㉔ RIN5mF cell line을 이용하여 시료 및 ginsenoside들의 인슐린 분비 촉진능을 검색 위 cell line에서 인슐린 분비 촉진능이 확인된 시료에 대해서는 rat islet primary cell로 재차 확인하고 인슐린분비 기전을 규명함</li> <li>㉕ H4IIE hepatoma cell line을 이용하여 시료들의 hepatic glucose production에 억제 활성이 있는지를 검색함. 당신생과정에 억제활성을 나타내는 시료에 대해서는 인슐린에 의해 조절을 받는 효소인 PEPCK, G6Pase 등의 유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 살펴봄</li> <li>㉖ 텍사메타존, IBMX로 3T3L1 fibroblast cell을 지방세포로 분화한 후 인슐린저항성과 관련하여 PPAR-gamma activity를 촉진시키는 활성이 있는지를 검색함. PPAR-gamma 표적물질들인 adiponectine, aP2, LPL 등의 발현에 미치는 영향을 검토함.</li> <li>㉗ 소장에서 탄수화물 대사에 관여하는 효소인 alpha-glycosidase 억제 활성 유무를 살펴보기 위해 in vitro, in vivo에서 maltose, sucrose, lactose, starch 투여후 혈당 상승에 대한 억제 활성 유무를 아카보즈와 비교 관찰함.</li> </ul>

2) Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)	실험 시작 30분전에 준비된 시료를 경구 투여한 후 0분의 시점에서 각 군마다 glucose (1.5g/kg)를 투여하고 투여와 동시인 0분에서 안와 채혈을 하고 계속해서 30분, 60분, 90분, 120분에 채혈을 하여 혈당을 측정해 봄으로써 혈당 변화를 관찰함. 그룹간 곡선하 면적 (Area Under the Curve, AUC)을 측정 비교함으로써 포도당 부하에 의한 혈당상승에 억제활성이 있는지 유무를 관찰함.
3) 유전적 인슐린저항성 질환 동물모델 시험	ob/ob mouse 혹은 ZDF rat를 이용하여 시료 투여에 의한 인슐린저항성(HOMA법) 개선 및 항비만 효과 검색 및 기전 연구
4) 약효 및 기전 규명	㉔ 시료의 장기 투여에 의한 약효평가 (HbA1c, weight gain 등에 미치는 영향) ㉕ 용량의존시험을 통해 유효용량범위(최소-최대량)를 결정하여 임상시험 시 투여용량에 대한 아이디어 제공 ㉖ 시료의 각 장기(간, 근육, 지방, 췌장 등)에 미치는 영향을 평가하여 약효발현 기전을 규명함으로써 임상시험 시 적용 대상 환자군을 선정하는데 기초 자료 제공

#### 다. 제2 협동과제 - 액상형 기능성 소재화 가공 및 기능성식품 개발

과제	연구개발 방법 및 설계
유효성분의 액상소재화 공정 확립	유효성분 대량분리조건에 적합한 생산시스템 및 공정 확립 - 침전, 조여과, 농축 등의 최적 대량 공정시스템 확립 액상소재의 정밀 여과 및 농축 시험 - 최종배합전 정밀여과 및 유효성분 함량의 표준화를 위한 농축조건 시험
적정 부재료 선정 및 최종 배합 시험	기호성 향상 위한 부재료 배합비 설정 시험 - 적정 감미료 선정 시험: 액상 올리고당류, 아세설팜 K 등 - 적정 산미료 선정 시험: 산수유, 오미자, 감식초, 구연산 등 - 적정 비타민류 배합시험: Vit B1, B2, B6, Vit C 등 최적 배합비 설정 : 주요 추출물간의 관능적 기호성, 저장성, 대량 생산 공정 적합성 등을 종합적으로 고려함.
드링크형 기능성식품 개발	관능검사: Panel discussion 방식에 의한 배합 시험 적정 여과 조건 시험 - 조여과 시험: 카트리지 여과 - 정밀여과 시험: 카트리지 여과 적정 살균 조건 설정 : Hot filling 시험, 저장성 시험 : 가속 시험
시제품제조	주요 대량 생산 공정 검토 : 배합 및 여과 공정 검토, 충전 공정, 살균 및 냉각 공정 검토 시제품 제조



라. 제3 협동과제 - 원료표준화와 정제 및 캡슐형 기능성 식품 개발

연구과제	연구개발 방법 및 설계
1) 분석법 연구	<p>① 조사포닌 분석</p> <p>㉠ 검체 약 7.0g을 100ml의 농축플라스크에 취하고 감압농축 건조한 후 몰포화부탄올 50ml를 가하여 환류 냉각기를 붙여 수욕 중에서 70~80℃로 약 1시간 가열 추출한 다음 냉각한 후 여과하고 잔류물에 대하여 같은 조작을 계속 2회 반복</p> <p>㉡ 여지는 몰포화부탄올 10ml로 세척하고 여액 및 세액을 합하여 250ml 분액 깔대기에 넣고 물 20ml로 잘 진탕시켜 수세.</p> <p>㉢ 몰포화부탄올추출액 전액을 미리 항량으로 한 농축플라스크에 옮겨 수욕중에서 감압농축하여 부탄올을 제거한 다음 그 잔류물에 에테르 50ml를 넣고 환류냉각기를 붙여 수욕중에서 36℃로 30분간 가열하여 탈지시킨 후 에테르를 제거.</p> <p>㉣ 잔류물은 105℃에서 20분간 건조하고 무게를 달아 조사포닌의 양을 구함.</p> <p>② 총사포닌 (UV) 측정법</p> <p>㉠ 검체 1.0g (총 백삼배당체로서 약 100mg 해당량)을 정밀히 달아 물에 녹여 정확히 25ml로 하고 이 액 5ml를 정확히 취하여 증발건조하고 n-부탄올몰포화용액에 녹여 100ml로 함.</p> <p>㉡ 이 액 25ml를 취하여 증발건조하고 초산에 정확히 녹여 정확히 10ml로 하여 검액으로 함.</p> <p>㉢ Rg<sub>1</sub> 표준품을 50mg을 달아 10ml 용량플라스크에 넣고 초산 10ml에 녹여 표준액으로 함.</p> <p>㉣ 검액 및 표준액 각각 2ml를 정확히 취하여 15% 삼염화안티몬시액 8ml 를 넣고 넣고 60℃에서 30분간 가열하고 식힌액을 파장 525nm에서 검액 및 표준액의 흡광도 A<sub>r</sub> 및 A<sub>s</sub>를 측정.</p> <p>③ 진세노사이드 분석 (HPLC)</p> <p>인삼엑스내의 유효성분인 진세노사이드, 즉, 배당체인 Rb1, Rg1 등과 또한 홍삼의 특이성분으로 알려진 prosapogenin Rg3, Rg5, Rh1 등에 대한 분석법을 개발하고 특이성, 정확성, 정밀성, 회수율, 직선성, 시료내 분석물질의 안정성, 감도 등에 대한 analytical method validation을 수행함.</p> <p>④ 파낙사디올, 트리올 분석 (GC분석)</p> <p>㉠ 검체 및 표준품(Rg1, Rb1) 일정량(검체는 5mg 해당량, 표준품은 각각 5mg)을 평저플라스크에 넣고 에탄올성 황산(H<sub>2</sub>O:EtOH=3:1)용액을 가하여 전체농도가 5% 황산용액이 되도록 하고 6시간 수욕상에서 환류(약 90℃)시킨 후 45% NaOH용액을 가하여 중화시킴.</p> <p>㉡ Cholesterol 표준용액 500<math>\mu</math>l 가하고 (cholesterol 0.5mg 해당량) 에탄올을 날려 보낸 후 4% NaOH용액 40ml 가함.</p> <p>㉢ 이 액을 300ml 분액 여두에 옮긴 후 평저 플라스크를 소량의 물로 2~3회 세척하여 합침.</p> <p>㉣ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100ml로 3회 추출하고 추출액을 모아 농축하여 100ml가 되게 하여 분액여두로 옮김.</p> <p>㉤ 4% NaOH용액 100ml 와 증류수 100ml로 차례로 세척.</p> <p>㉥ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층을 삼각플라스크에 옮긴 후 무수망초로 탈수시킴.</p> <p>㉦ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 날려 보낸 후 잔사를 TMS화 용기에 옮기고 질소기류 하에 용매를 날려보냄.</p> <p>㉧ MSTFA 200<math>\mu</math>l와 EtoAc200<math>\mu</math>l를 가하여 80℃에서 40분간 반응시킨 용액을 분석용 시료로 함.</p>
2)인삼제제 및 원료표준화 연구	<p>최적의 추출 표준조건을 위하여 다음과 같이 추출 조건을 변화시키며 실험을 함.</p> <p>일정성분을 함유하는 인삼엑스에 각각의 식초(양조, 현미, 감, 2배식초 등)를 4배에서 10배까지 넣고 추출함. 추출시 추출온도를 70, 80, 90, 100, 110, 120℃등으로 변화시켜가며 농도별, 온도별, 시간별, 용매별 추출조건을 설정함. 또한 각 추출조건이 식초인삼엑스의 구성성분과 수율 및 이화학적 특성에 미치는 영향을 조사하여 최적의 추출조건을 확립함.</p>

3) 제제화 연구	<p>① 기초물성 연구 : 주성분과 부형제와의 상호작용을 연구하기 위하여 인삼엑스와 적당한 부형제를 1 : 1 비율로 섞어 건조상태의 분말과 5% 가수한 상태의 분말을 4주 동안 온도 25℃와 40℃에서 보관하여 시험개시 때와 2주, 4주 경과 후의 성상과 주성분의 함량을 시험함.</p> <p>② Preformulation : 각각의 원료와 혼합분말 및 과립의 입도, 비용적, 압축도, 안식각 등을 측정하여 물성을 평가함.  (가) 안식각 : Powder tester의 operating manual에 준함.  (나) 압축도 : Powder tester의 operating manual에 준하여 Aerated bulk density와 packed bulk density를 측정하고 다음 식에 의하여 계산함.  <math display="block">C = 100(P-A)/P</math> (C=compressibility(%), P=Packed bulk density, A=Aerated bulk density)  (다) 입도 : 80, 140, 200호의 표준망체를 이용하여 분말의 입도를 측정함.  (라) 비용적 : Powder tester의 operating manual에 준하여 Aerated bulk density와 packed bulk density를 측정하였고 g/ml 로 나타냄.</p> <p>③ 제제설계 및 최적처방검토 : 다양한 제형 중 주성분에 적합한 제형을 선정하여 주성분에 적당한 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제 등을 첨가하여 습식 및 건식과립 조제 또는 직타법으로 타정 하고 중량편차, 경도, 마손도, 붕해도, 용출률 등을 측정하고 최적 첨가제의 종류와 분량을 결정하여 최적처방을 확정함.</p>
4) 안정성 연구	<p>식품의약품안전청고시 제 2000-7호 '의약품 등의 안정성시험기준'에 준하여 실험함.</p> <p>① 가속시험 : 40(±2)℃, 75(±5)%RH 조건으로 실험함.  ② 장기보존시험 : 25±2℃, 60±5%RH 조건으로 실험한다. 12개월 이상을 원칙으로 하며 적어도 설정한 사용기간 이상 실험함.</p>

마. 위탁과제 - 독성시험

연구과제	연구개발 방법 및 설계														
1) 단회투여독성시험 (설치류)	<p>① 시험목적 : 설치류에서의 시험물질에 대한 개략적인 치사량을 구하며 반복투여시험의 용량설정을 위한 정보를 얻는 것을 목적으로 함.</p> <p>② 시험계 : Rat, SD ③ 투여경로 : 경구 ④ 관찰기간 : 투여 후 14일</p> <p>⑤ 군당마리수/군수</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 예비시험 : 암컷2마리(2,000mg/kg 또는 한계용량 5,000mg/kg)</li> <li>- 본시험 : 5 마리/군당(설치류), 암수 각 20마리, 대조군(1군), 시험물질투여군(1-3군)</li> </ul> <p>Ex.) Rat</p> <table border="1" data-bbox="446 689 1289 817"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Group</th> <th rowspan="2">Dose level (mg/kg body wt.)</th> <th colspan="2">No. of animals (animal ID)</th> </tr> <tr> <th>Male</th> <th>Female</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>G1 Control</td> <td>0</td> <td>5 (M01-M05)</td> <td>5 (F01-F05)</td> </tr> <tr> <td>G2 Treatment</td> <td>저용량</td> <td>5 (M06-M10)</td> <td>5 (F06-F10)</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 사망례가 관찰되면 투여용량을 낮추어 재설정</p> <p>⑥ 관찰항목</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반증상관찰 : 투여당일은 투여후 30분, 8시간까지 매시간 관찰하고, 투여 다음날부터 14일째까지는 매일 1회씩 일반증상 및 동물의 사망 유무를 관찰</li> <li>- 체중변화측정 : 투여직전, 투여 후 1, 3, 7일 및 14일</li> <li>- 부검시 육안소견 관찰 : 마취시켜 외관검사를 실시한 후 육안적 장기/조직 이상소견 검사</li> <li>- 필요시 조직병리학적 검사 : 부검시 육안소견이 관찰된 장기</li> </ul> <p>⑦ 평가 : 개략의 치사량</p>	Group	Dose level (mg/kg body wt.)	No. of animals (animal ID)		Male	Female	G1 Control	0	5 (M01-M05)	5 (F01-F05)	G2 Treatment	저용량	5 (M06-M10)	5 (F06-F10)
Group	Dose level (mg/kg body wt.)			No. of animals (animal ID)											
		Male	Female												
G1 Control	0	5 (M01-M05)	5 (F01-F05)												
G2 Treatment	저용량	5 (M06-M10)	5 (F06-F10)												
2) 단회투여 독성시험 (비설치류)	<p>① 시험목적 : 비설치류에서의 시험물질에 대해 개략적인 치사량을 구함.</p> <p>② 시험계 : Dog, Beagle ③ 투여경로 : 경구 ④ 투여 및 관찰기간 : 1회 투여 후 14일</p> <p>⑤ 군설정 : 2 마리/군당, 암수 각 4마리/ 대조군(1), 시험물질 투여군(1)</p> <p>Ex.) Beagle</p> <table border="1" data-bbox="446 1243 1300 1384"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Group</th> <th rowspan="2">Dose level (mg/kg body wt.)</th> <th colspan="2">No. of animals (animal ID)</th> </tr> <tr> <th>Male</th> <th>Female</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>G1 Control</td> <td>0</td> <td>2 (M01-M02)</td> <td>2 (F01-F02)</td> </tr> <tr> <td>G2 Treatment</td> <td>2,000(or 5,000)</td> <td>2 (M03-M04)</td> <td>2 (F03-F04)</td> </tr> </tbody> </table> <p>⑥ 관찰항목</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반증상관찰 : 투여당일은 투여후 30분, 8시간까지 매시간 관찰하고, 투여 다음날부터 14일 까지는 매일 1회씩 일반증상 및 동물의 사망 유무를 관찰</li> <li>- 체중변화측정 : 투여직전, 투여 후 1, 3, 7일 및 14일</li> <li>- 부검 : 특이 증상이 발견되지 않으면 부검을 실시하지 않음. 투여기간 동안 특이소견시 마취시켜 외관검사를 실시한후 육안적 장기/조직 이상소견 검사수행</li> <li>- 조직병리학적검사 : 부검시 육안소견이 관찰된 장기에 대하여 실시함</li> </ul> <p>⑦ 평가 : 개략적인 치사량</p>	Group	Dose level (mg/kg body wt.)	No. of animals (animal ID)		Male	Female	G1 Control	0	2 (M01-M02)	2 (F01-F02)	G2 Treatment	2,000(or 5,000)	2 (M03-M04)	2 (F03-F04)
Group	Dose level (mg/kg body wt.)			No. of animals (animal ID)											
		Male	Female												
G1 Control	0	2 (M01-M02)	2 (F01-F02)												
G2 Treatment	2,000(or 5,000)	2 (M03-M04)	2 (F03-F04)												

<p>3) 유전 독성시험</p>	<p>(1) 복귀돌연변이시험</p> <p>① 시험목적 : In vitro에서 염기쌍치환과 후레임쉬프트 형질균주를 이용하여 시험물질의 유전자 돌연변이의 가능성을 검토하기 위하여 실시</p> <p>② 시험계 : TA100, TA98, TA1535, TA 1537, WP2uvrA</p> <p>③ 시험군구성 : 음성대조군, 용량대조군 1-5(5군), 양성대조군</p> <p>④ 시험방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 예비시험(농도결정시험) : TA100균주에 대해서만 시험물질의 5단계 농도로 시험하여 본시험의 최고농도를 결정.</li> <li>- 본시험 : S9 mix 무처리시 (S9 mix-), S9 mix 처리시 (S9 mix+)</li> </ul> <p>각 균주마다 음성대조군, 용량군1-5, 양성대조군을 시험물질 투여후 48일째에 콜로니 형성을 관찰.</p> <p>⑤ 관찰항목 : 콜로니 형성능 및 계수, 자료의 통계처리 (시험물질이 양성의 경향을 나타낼 경우)</p> <p>(2) 염색체이상시험</p> <p>① 시험목적 : In vitro에서 포유류 균주를 이용하여 숫적이상과 구조적이상에 대한 시험물질의 염색체이상 유발의 가능성을 검토하기 위하여 실시</p> <p>② 시험계 : CHL/IU cell</p> <p>③ 시험군구성 : 음성대조군, 저용량군, 중용량군, 고용량군, 양성대조군</p> <p>④ 시험방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 예비시험(농도결정시험):대조군, 시험물질군(약10단계)으로 실험하여 본시험의 최고농도를 결정.</li> <li>- 본시험 : 6+18 hr (S9 mix-), 6+18 hr (S9 mix+), 24+0 hr (S9 mix-)</li> </ul> <p>음성대조군, 저용량군, 중용량군, 고용량군, 양성대조군을 시험물질 투여후 1~2일째에 세포를 수거해서 슬라이드 검체를 제작. 제작된 검체에서 염색체이상 유무를 판독함.</p> <p>⑤ 관찰항목 : 세포독성, 검체 판독, 자료의 통계처리</p> <p>(3) 소핵시험</p> <p>① 시험목적 : 염색체 이상시험의 In vitro 시험으로서 설치류에서 Hematopoietic cells을 이용하여 시험물질의 염색체이상 유발의 가능성을 검토하기 위하여 실시.</p> <p>② 동물 중(성별), 주령 : ICR Mouse, 7-8 주령</p> <p>③ 시험군구성 : 음성대조군, 저용량군, 중용량군, 고용량군, 양성대조군</p> <p>④ 시험방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 예비시험 (농도결정시험): 시험물질군(5단계)으로 시험물질 투여후 일반증상 관찰 및 최고농도 결정</li> <li>- 소핵유발빈도시험 : 일정농도에 대한 시험물질 투여후 16, 24, 48, 72시간 별로 골수를 채취하여 본시험에서의 골수채취시간 결정</li> <li>- 본시험 : 음성대조군, 저용량군, 중용량군, 고용량군, 양성대조군을 시험물질 투여후 소핵유발 빈도시험에서 결정된 시간에 골수를 채취하여 슬라이드 검체를 제작. 제작된 검체에서 소핵형성 유무를 판독함.</li> </ul> <p>⑥ 관찰항목 : 일반증상, 검체 판독, 자료의 통계처리</p>
-------------------	--

## 제 2 절 성분 분리 및 동정

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 인삼사포닌 분리

##### 1) 실험재료

백삼 (*Panax ginseng*)

##### 2) 실험방법

Scheme I 에서 보는바와 같이 백삼 2.7 kg을 메탄올로 2시간씩 2회 반복 추출하여 감압 농축하고 동결건조 하여 메탄올엑스 1 kg을 만든 후, 얼은 엑스를 증류수에 현탁하고, 분획 깔데기를 사용하여 에테르 10회 처리하여 에테르 층을 제거한 후, 수포화 부탄올로 5회 처리하여 감압농축하여 조사포닌 분획을 얻은 각 분획을 silica gel column chromatography 법을 이용하여 ginsenosides를 분리한다.

#### 나. 인삼사포닌의 이화학적 검정

##### 1) TLC (Thin layer chromatography) 법에 의한 확인

Fig 1에서 보는바와 같이 silica gel TLC plate (Kieselgel 60 F254, Merck)를 이용하여 전개용매  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 65 : 35 : 8$  (v/v)로 전개하여 검토했다.

#### 나. 인삼사포닌의 화학구조 동정

분리한 성분을 물리화학적 성상과 기기분석적(NMR, Mass) 방법을 통한 화학구조 동정하였다.

##### 1). ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 물리화학적 성상

white powder (n-BuOH/EtOH), mp 197 ~ 198 °C,  $[\alpha]_D^{20} : +12.4^\circ$  (c=1.5, CH<sub>3</sub>OH), pos. FAB-MS (m/z) : 1110 (M+1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>54</sub>H<sub>92</sub>O<sub>23</sub> : C, 58.45 ; H, 8.36 ; Found C,

58.38 ; H, 8.39,  $^{13}\text{C}$ -NMR : Table I

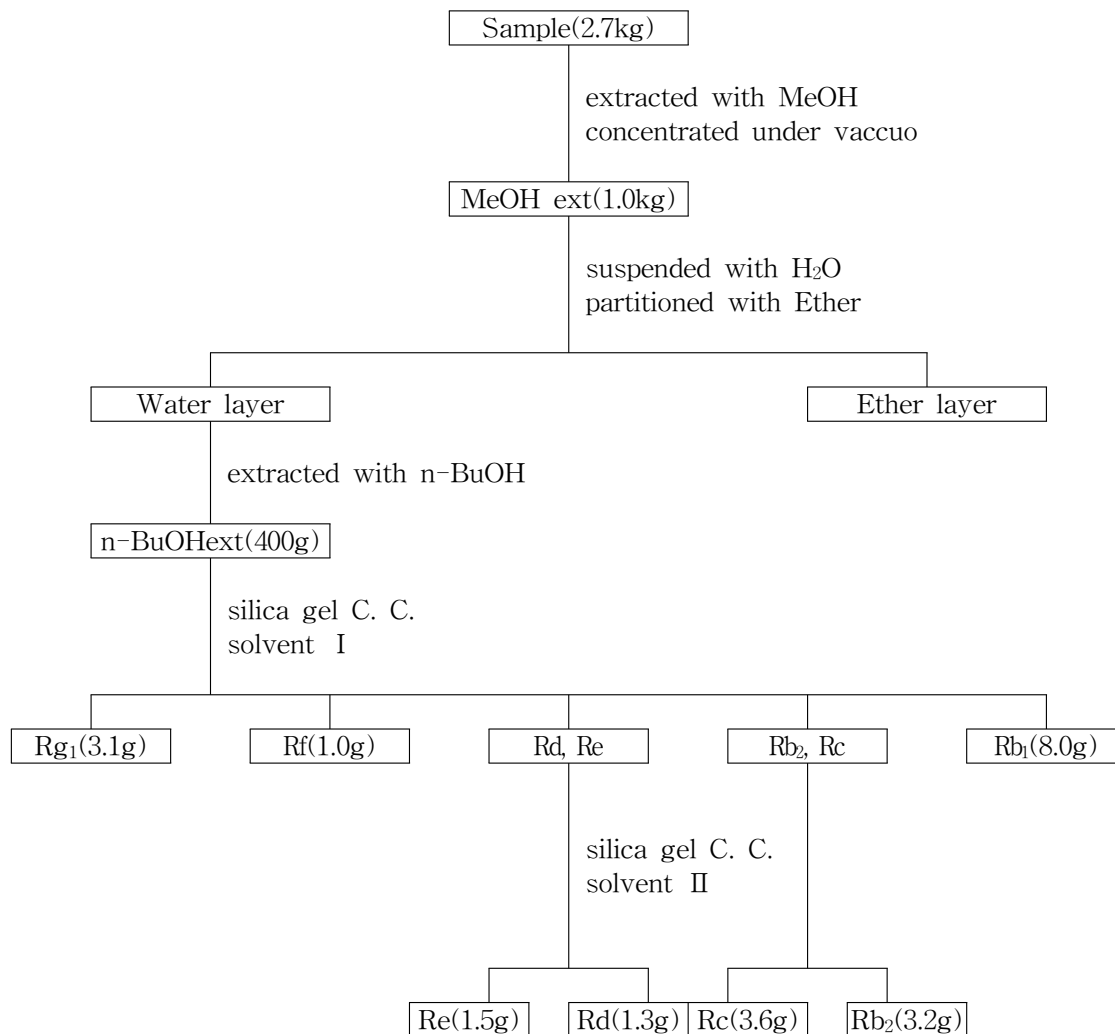
**2) ginsenoside Rb<sub>2</sub>의 물리화학적 성상**

white powder (n-BuOH/EtOH), mp 200 ~ 203 °C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  : +3.1° (c=1.5, CH<sub>3</sub>OH), pos.  
FAB-MS (m/z) : 1080 (M+1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>53</sub>H<sub>90</sub>O<sub>22</sub> : C, 58.97 ; H, 8.41 ; Found C,  
58.92 ; H, 8.39,  $^{13}\text{C}$ -NMR : Table I

**3) ginsenoside Rc의 물리화학적 성상**

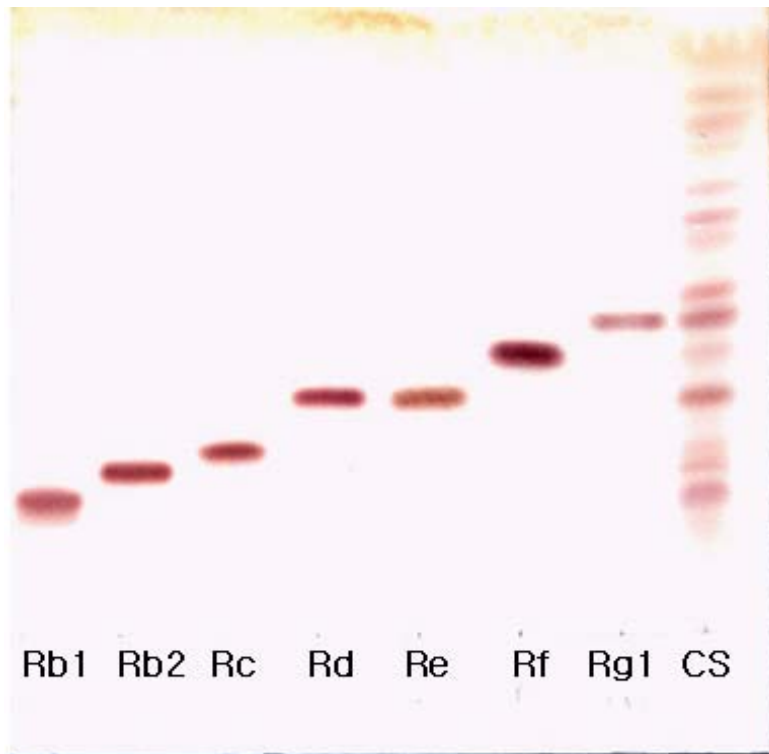
white powder (n-BuOH/EtOH), mp 199 ~ 201 °C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  : +2.0° (c=1.5, CH<sub>3</sub>OH), pos.  
FAB-MS (m/z) : 1080 (M+1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>53</sub>H<sub>90</sub>O<sub>22</sub> : C, 58.97 ; H, 8.41 ; Found C,  
58.95 ; H, 8.44,  $^{13}\text{C}$ -NMR : Table I

Scheme I. Extraction and Isolation Ginsenosides from Ginseng Radix alba



\* solvent I :  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 7 : 3 : 1$  (v/v), solvent II :  $\text{n-BuOH}/\text{ethyl acetate}/\text{H}_2\text{O} = 15 : 1 : 4$  (v/v)

Fig. 1. TLC of ginsenosides



4) ginsenoside Rd의 물리화학적 성상

white powder (n-BuOH/ethy acetate), mp 206 ~ 209 °C,  $[\alpha]_D^{20}$  : +19.3° (c=1.5, CH<sub>3</sub>OH), pos. FAB-MS (m/z) : 948 (M+1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>48</sub>H<sub>82</sub>O<sub>18</sub> : C, 60.85 ; H, 8.73 ; Found C, 60.91 ; H, 8.75, <sup>13</sup>C-NMR : Table I

5) ginsenoside Re의 물리화학적 성상

colorless needles (50% CH<sub>3</sub>OH), mp 201 ~ 203 °C,  $[\alpha]_D^{20}$  : -1.0° (c=1.5, CH<sub>3</sub>OH), pos. FAB-MS (m/z) : 948 (M+1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>48</sub>H<sub>82</sub>O<sub>18</sub> : C, 60.85 ; H, 8.73 ; Found C, 60.91 ; H, 8.75, <sup>13</sup>C-NMR : Table II

6) ginsenoside Rf의 물리화학적 성상



white powder (acetone), mp 197 ~ 198 °C,  $[\alpha]_D^{20}$  : +7.0° (c=1.5, CH<sub>3</sub>OH), pos. FAB-MS (m/z) : 802 (M+1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub> : C, 62.96 ; H, 9.06 ; Found C, 62.87 ; H, 9.11, <sup>13</sup>C-NMR : Table II

#### 7) ginsenoside Rg<sub>1</sub>의 물리화학적 성상

white powder (n-BuOH/ethy acetate), mp 194 ~ 196 °C,  $[\alpha]_D^{20}$  : +32.0° (c=1.5, pyridine), pos. FAB-MS (m/z) : 802 (M+1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub> : C, 62.96 ; H, 9.06 ; Found C, 62.15 ; H, 9.14, <sup>13</sup>C-NMR : Table II

**Table I. Chemical shifts of protopanaxadiol type ginsenosides in  $^{13}\text{C}$ -NMR**

	Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd
C-1	39.00	38.98	38.94	38.94
C-2	26.44	26.55	26.53	26.41
C-3	88.82	88.80	88.78	88.77
C-4	39.51	39.49	39.48	39.48
C-5	56.18	56.16	56.14	56.17
C-6	19.38	18.22	19.36	18.20
C-7	34.94	34.92	35.55	35.53
C-8	39.84	39.81	39.79	39.79
C-9	50.01	49.99	49.96	49.95
C-10	36.70	36.68	36.67	36.66
C-11	30.48	30.52	30.53	30.56
C-12	69.99	70.00	70.05	70.03
C-13	49.29	49.24	49.19	49.20
C-14	51.21	51.20	51.20	51.20
C-15	30.48	29.83	30.53	30.56
C-16	26.66	26.44	26.53	26.53
C-17	51.42	51.44	51.41	51.47
C-18	16.09	16.08	16.09	16.09
C-19	15.82	15.80	15.77	15.74
C-20	83.30	83.32	83.12	83.12
C-21	22.20	22.10	22.15	22.22
C-22	35.58	35.97	35.92	35.87
C-23	23.04	23.01	22.96	23.05
C-24	125.77	125.73	125.82	125.72
C-25	130.91	130.94	130.87	130.74
C-26	25.66	25.63	25.62	25.59
C-27	17.80	17.70	17.69	17.59
C-28	27.91	27.89	27.88	27.88
C-29	16.43	16.41	16.40	16.39
C-30	17.23	17.19	17.16	17.14
3-Glc 1	105.17	104.91	104.91	104.89
2	83.15	83.10	83.17	83.12
3	77.75	77.73	77.90	77.89
4	71.42	71.51	71.38	71.29
5	78.14	77.92	77.70	77.70
6	62.47	62.45	61.52	62.55
-Glc 1	105.81	105.77	105.78	105.76
2	76.95	76.92	76.91	76.89
3	79.07	79.00	79.01	79.00
4	71.30	71.40	71.85	71.38
5	77.94	78.13	78.09	78.09
6	62.59	62.64	62.42	62.43

-Glc :  $\beta$ -D-glucopyranosyl.

**Table I. (continued)**

	Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd
20-Glc 1	97.90	97.91	97.87	98.06
2	75.05	74.68	74.81	74.92
3	78.21	78.13	78.09	78.09
4	71.48	71.42	71.38	71.38
5	76.87	76.55	76.35	78.09
6	71.48	69.00	68.27	62.61
-Glc 1	104.94			
2	74.67			
3	78.14			
4	71.42			
5	78.14			
6	61.54			
-Ara 1		104.53	109.91	
2		71.94	83.22	
3		73.94	78.59	
4		68.47	85.75	
5		65.52	62.62	
6-Glc 1				
2				
3				
4				
5				
6				
-Rha 1				
2				
3				
4				
5				
6				

-Glc :  $\beta$ -D-glucopyranosyl, -Ara :  $\alpha$ -L-arabinopyranosyl, -Rha :  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl,

Table II. Chemical shifts of protopanaxatriol type ginsenosides in <sup>13</sup>C-NMR

	Re	Rf	Rg <sub>1</sub>
C-1	39.43	39.24	39.53
C-2	27.50	27.56	27.66
C-3	78.35	77.92	78.44
C-4	39.77	40.03	40.16
C-5	61.52	61.23	61.18
C-6	74.33	79.71	77.94
C-7	45.75	44.86	44.88
C-8	40.96	40.97	41.06
C-9	49.32	49.96	49.78
C-10	39.17	39.47	39.45
C-11	60.60	31.07	30.09
C-12	70.04	70.85	70.06
C-13	48.80	48.06	48.88
C-14	51.20	51.50	51.16
C-15	30.61	31.91	29.90
C-16	26.42	26.66	26.75
C-17	51.52	54.57	51.38
C-18	17.32	17.44	17.56
C-19	17.46	17.24	17.34
C-20	83.08	72.25	83.11
C-21	22.15	26.83	22.16
C-22	35.77	35.64	35.86
C-23	23.26	22.84	23.06
C-24	125.75	126.16	125.74
C-25	130.74	130.65	130.77
C-26	25.60	25.70	25.61
C-27	17.59	17.24	17.60
C-28	31.99	31.57	31.55
C-29	17.06	17.55	16.18
C-30	17.00	16.62	16.07

**Table II. (continued)**

	Re	Rf	Rg <sub>1</sub>
6-Glc 1	101.63	103.2	103.65
2	79.18	79.5	79.36
3	78.13	78.7	78.48
4	72.05	71.7	71.52
5	78.06	79.8	79.71
6	62.82	62.9	62.71
-Rha 1	101.69		
2	72.32		
3	72.21		
4	73.91		
5	69.26		
6	18.55		
-Glc 1		103.2	
2		45.9	
3		78.4	
4		72.3	
5		79.8	
6		63.3	
20-Glc 1	98.06		98.03
2	74.95		74.92
3	78.94		79.02
4	71.28		71.30
5	78.20		78.09
6	62.55		62.56

-Glc :  $\beta$ -D-glucopyranosyl, -Rha :  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl

## 제 3 절 인삼 prosapogenin 성분 분리 동정

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 인삼의 제조 및 분리

##### 1) 인삼 제조

백삼엑스 1kg에 양조식초 8ℓ를 가하여 90℃에서 3시간 처리하여 얻은 반응액을 스프레이 건조하여 제조하였고, 표본(VG-1)은 세명대학교 한방영양학부에 보관하였다.

##### 2) 기기 및 조건

<sup>1</sup>H-NMR spectrometer : Bruker AMX-200, 200 MHz (Germany)

<sup>1</sup>H-NMR spectrometer : Bruker AMX-500, 500 MHz (Germany)

<sup>13</sup>C-NMR spectrometer : Bruker AMX-200, 200 MHz (Germany)

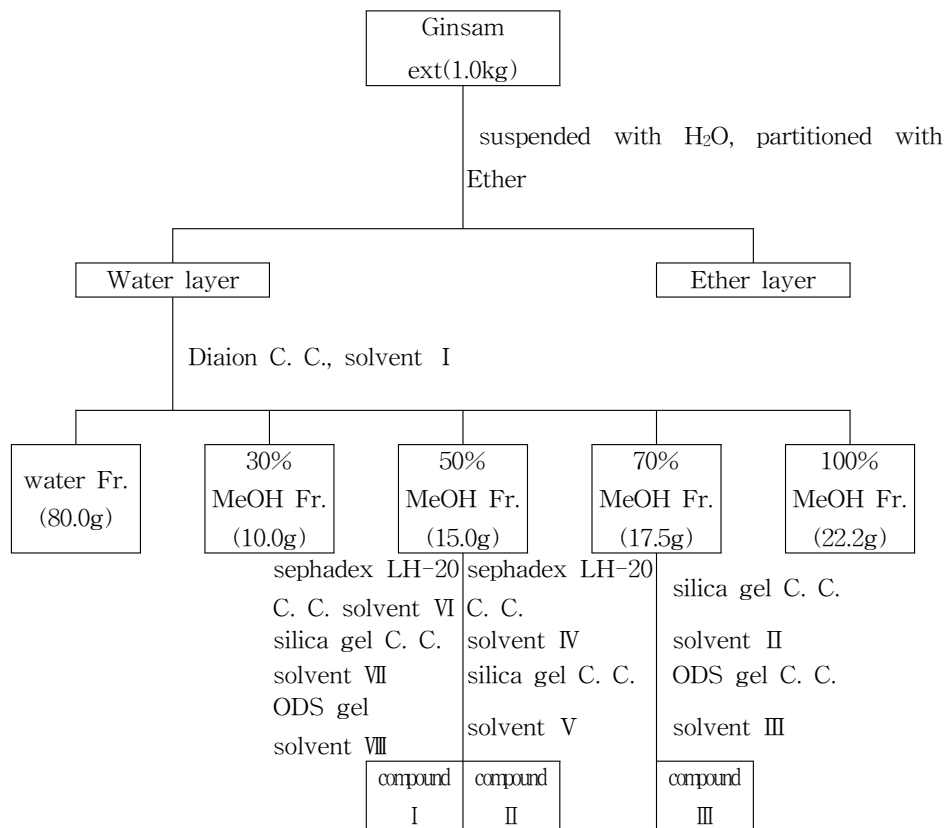
<sup>13</sup>C-NMR spectrometer : Bruker AMX-500, 500 MHz (Germany)

FAB-MS : JEOL JMS-700 D

##### 3) 인삼으로부터 인삼 prosapogenin 분리

Scheme I에서 보논바와 같이 인삼 1 kg에 분획 깔데기를 사용하여 에테르 10회 처리하여 에테르 층을 제거한 후, Diaion 오픈칼럼을 이용하여 증류수로부터 100% MeOH까지 점차 gradient 하여 H<sub>2</sub>O, 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH, 100% MeOH 분획을 얻었고, 얻은 각 분획을 column chromatography 법을 이용하여 prosapogenin을 분리하였다.

**Scheme I. Extraction and Isolation Ginsenosides from Ginsam**



\* solvent I : 100% H<sub>2</sub>O → 100% CH<sub>3</sub>OH, solvent II : CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 12 : 3 : 1 (v/v), solvent III : CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30, solvent IV : CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 50 : 50, solvent V : CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30 : 4, solvent VI : CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 50 : 50, solvent VII : CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30 : 4, solvent VIII : CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 80 : 20

#### 4) Compound의 단리

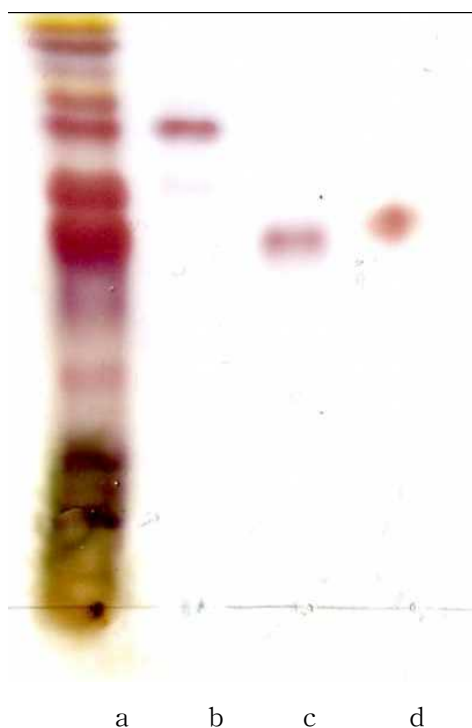
##### 가) Compound I의 단리

Scheme I의 방법으로 처리하여 얻은 50% 분획을 sephadex LH-20 column chromatography(5cm  $\phi$   $\times$  100cm, CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 50 : 50)와 silica gel column chromatography(5cm  $\phi$   $\times$  100cm, CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30 : 4) 그리고 ODS gel column chromatography(5cm  $\phi$   $\times$  100cm, CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 80 : 20)를 실시하여 감압농축한 후 재결정하여 흰색 분말상 결정 compound I (70mg)을 얻었다.

Compound I의 물리화학적 성상

white powder (ethanol),  $[\alpha]_D^{20}$  : +20.5° (c=0.88, CH<sub>3</sub>OH), pos. FAB-MS (m/z) : 639 (M+1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>9</sub>·3/2H<sub>2</sub>O : C, 62.80 ; H, 9.22 ; Found C, 62.36 ; H, 9.22, <sup>13</sup>C-NMR : Table I

**Fig. 1. TLC chromatogram of Ginsam and prosapogenin compounds**



a : Ginsam, b : compound I, c : compound II, d : compound III



solvent condition : chlorform : methanol : water = 65 : 35 : 8

#### 나) Compound II의 단리

Scheme I의 방법으로 처리하여 얻은 50% 분획을 Sephadex LH-20 gel column chromatography(5cm  $\phi$   $\times$  100cm, CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 50 : 50)와 silica gel column chromatography(5cm  $\phi$   $\times$  100cm, CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30 : 4)를 실시하여 감압농축한 후 ethanol로 재결정하여 mp mp. 187~189 °C의 흰색 분말상 결정 compound II(100mg)을 얻었다.

Compound II의 물리화학적 성상

colorless needles (ethanol), mp. 187~189 °C,  $[\alpha]_D^{20}$  : -13.5° (c=1.5, methanol), pos. FAB-MS (m/z) : 784 (M-1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>: C, 64.24 ; H, 9.25 ; Found C, 64.35 ; H, 9.30, <sup>13</sup>C-NMR : Table II

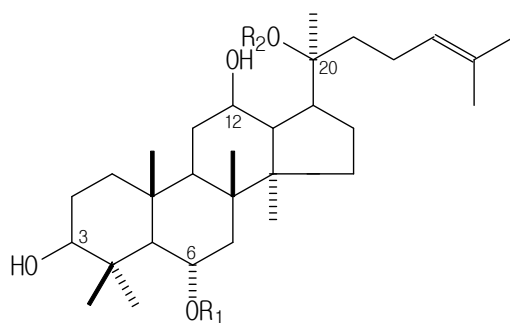
#### 다) Compound III의 단리

Scheme I의 방법으로 처리하여 얻은 70% 분획을 silica gel column chromatography(5 cm  $\phi$   $\times$  100cm, CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 12 : 3 : 1)와 ODS gel column chromatography(5cm  $\phi$   $\times$  100cm, CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30)를 실시하여 감압농축한 후 90% ethanol로 재결정하여 mp mp. 299~303 °C의 흰색 분말상 결정 compound III(100mg)을 얻었다.

Compound III의 물리화학적 성상

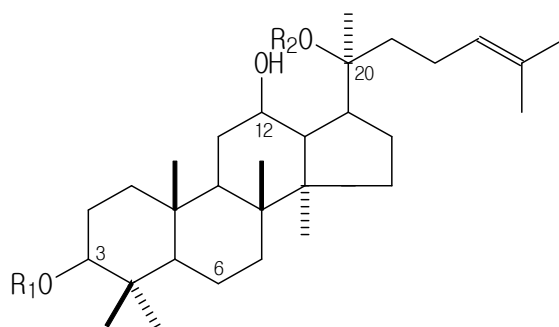
colorless needles (CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH), mp. 299~303 °C,  $[\alpha]_D^{20}$  : -14.0° (c=0.28, methanol), pos. FAB-MS (m/z) : 784 (M-1)<sup>+</sup>, Anal. Calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub> : C, 62.24 ; H, 9.25 ; Found C, 64.18 ; H, 9.29, <sup>13</sup>C-NMR : Table III

Fig. 2. Chemical structures of compound I, II and III



		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
compound I	20(S)- ginsenoside-Rh <sub>1</sub>	-glc	-H
compound II	20(S)- ginsenoside-Rg <sub>2</sub>	-glc(2→1)rha	-H

rha : α-L-rhamnopyranosyl      glc : β-D-glucofuranosyl



		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
compound III	20(R)-ginsenoside-Rg <sub>3</sub>	-glc(2→1)glc	-H

glc:β-D-glucofuranosyl

## 2. 결과 및 고찰

홍삼은 열에 의해 생성되어 소량 존재하는 ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>와 같은 특이성분이 암 예방 및 암예방작용, 암세포성장 억제작용, 혈압강하 작용, 뇌신경세포 보호작용, 항혈전작용, 항산화작용이 있다고 하여 홍삼만의 특·장점으로 주목받고 있다.

이러한 이유로 최근에 들어 인삼의 성분 중 우수한 효과를 갖는 진세노사이드 Rg<sub>3</sub>를 다량 함유한 인삼제제를 만들기 위한 방법들도 시도되어지고 있다. 고 등은 ginsenoside Rg<sub>3</sub>를 고농도로 함유하는 인삼제제를 식용식초를 이용하여 제조하는데, 성공하였으며, 이 제제의 생리활성성분을 탐색 확인하고자 column chromatography법을 이용하여 Scheme I에서 보는바와 같이 50% fraction에서 compound I, compound II, 70% fraction에서 compound III를 분리하였다.

### 가. Compound I

Compound I의 TLC Rf값은 0.39(CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 65 : 35 : 8/kieselgel 60 F254 Merk)이고, UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 묽은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며, FAB-MS에서 molecular (M+1)<sup>+</sup>이 639에서 나타났으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 0.808ppm으로부터 δ 1.677ppm까지 8개의 methyl signal이 나타나고 있으며, δ 3.542에서의 doublet은 H-3의 anomeric proton이고, δ 4.532의 broad singlet은 H-6의 signal이며, δ 3.856과 δ 4.436에서의 doublet은 당으로부터 기인하는 singnal로 나타났으며, δ 5.328의 signal은 H-24의 olefinic signal임을 알 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 C-24와 C-25가 126.3ppm과 130.7ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 C-1'가 106.0ppm에서 확인되었고, C-3는 78.7ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 홍삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 (20S)-ginsenoside Rh<sub>1</sub>의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, Compound I은 (20S)-ginsenoside Rh<sub>1</sub>으로 동정하였다.

Table I.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data of Compound I

	compound I
C-1	39.6
C-2	27.1
C-3	78.7
C-4	40.3
C-5	61.4
C-6	78.0
C-7	45.1
C-8	41.1
C-9	50.2
C-10	39.5
C-11	32.0
C-12	71.0
C-13	48.3
C-14	51.6
C-15	31.2
C-16	27.0
C-17	54.7
C-18	17.4
C-19	17.5
C-20	73.0
C-21	26.8
C-22	35.8
C-23	23.0
C-24	126.3
C-25	130.7
C-26	25.8
C-27	17.7
C-28	31.5
C-29	16.4
C-30	16.8
3-Glc 1	106.0
2	75.4
3	80.0
4	71.9
5	79.6
6	63.2

-Glc :  $\beta$ -D-glucopyranosyl,

## 나. Compound II

Compound II의 TLC Rf값은 0.50(CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 65 : 35 : 8/kieselgel 60 F254 Merk)이고, UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 묶은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며, FAB-MS에서 molecular (M-1)<sup>+</sup>이 783.7에서 나타났으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 0.968ppm으로부터 δ 2.145ppm까지 8개의 methyl singnal이 나타나고 있으며, δ 3.502에서의 doublet은 H-3의 anomeric proton이고, δ 4.817와 4.333에서의 doublet은 당으로부터 기인하는 singnal로 나타났으며, δ 5.293의 singnal은 H-24의 olefinic signal임을 알 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 C-22가 36.3ppm의 고자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 6번 glucose의 C-1이 102.3ppm에서 확인되었고, rhamnose의 C-1이 102.4ppm에서 확인되었으며, C-25는 131.2ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 홍삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 (20S) ginsenoside Rg<sub>2</sub>의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, mp 187~189 °C, 분자식 C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>인 Compound II는 20(S) ginsenoside Rg<sub>2</sub>로 동정하였다.

Fig. 3.-1 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound II

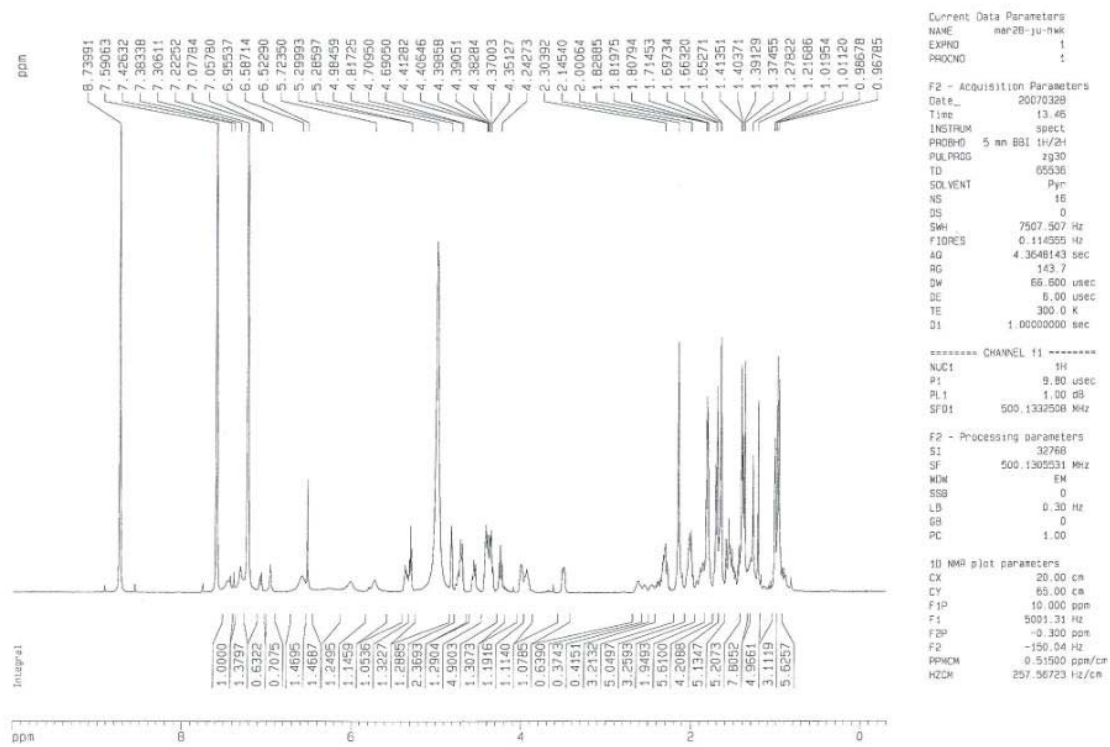


Fig. 3-2 <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound II

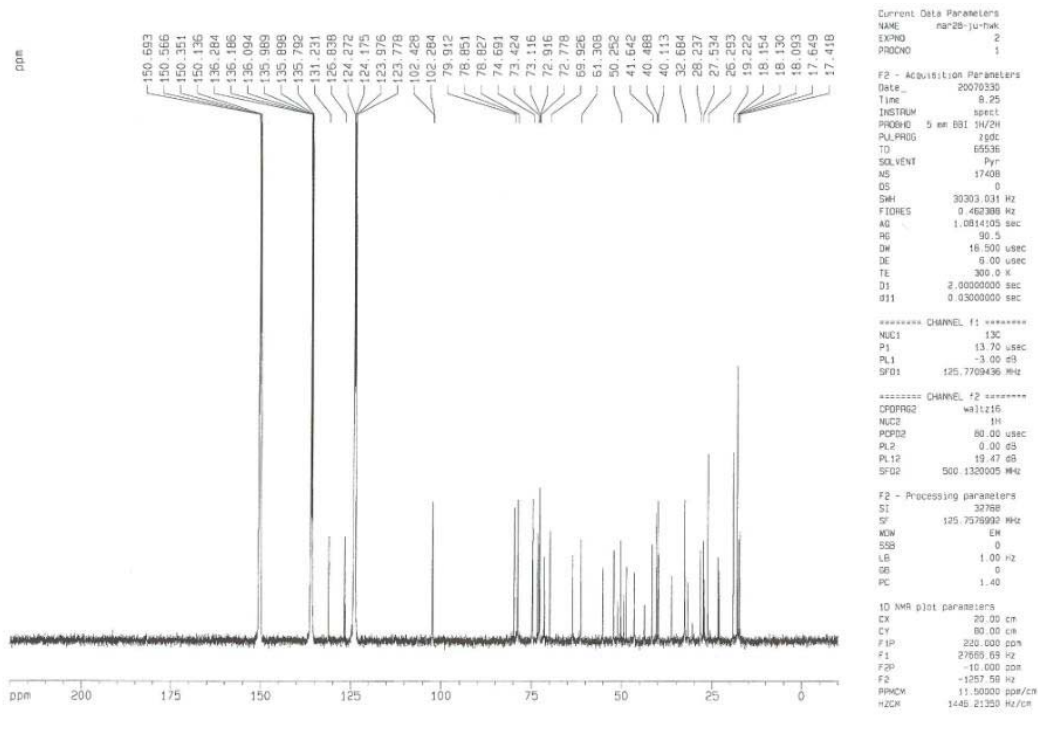


Table II. <sup>13</sup>C-NMR spectral data of Compound II

	compound II		compound II
C-1	40.1	6-Glc 1	102.3
C-2	27.5	2	79.9
C-3	79.1	3	78.8
C-4	40.5	4	73.1
C-5	61.3	5	78.9
C-6	74.8	6	63.6
C-7	46.6	-Rha 1	102.4
C-8	41.6	2	72.9
C-9	50.3	3	72.8
C-10	39.9	4	74.7
C-11	31.8	5	69.9
C-12	71.5	6	19.2
C-13	48.7		
C-14	52.2		
C-15	32.6		
C-16	27.3		
C-17	55.2		
C-18	18.2		
C-19	18.1		
C-20	73.4		
C-21	23.5		
C-22	36.3		
C-23	23.5		
C-24	126.8		
C-25	131.2		
C-26	26.3		
C-27	18.2		
C-28	32.7		
C-29	17.4		
C-30	17.7		



#### 다. Compound III

Compound III의 TLC Rf값은 0.53(CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 65 : 35 : 8/kieselgel 60 F254 Merk)이고, UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 묶은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며, FAB-MS에서 molecular (M-1)<sup>+</sup>이 783.7에서 나타났으며, 그 밖에 m/z

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 0.856ppm으로부터 δ 1.728ppm까지 8개의 methyl singnal이 나타나고 있으며, δ 3.316에서의 doublet은 H-3의 anomeric proton이고, δ 3.958의 doublet은 H-12의 singnal이며, δ 4.960와 5.399에서의 doublet은 당으로부터 기인하는 H-1'과 H-1''의 singnal로 나타났으며, δ 5.351의 singnal은 H-24의 olefinic signal임을 알 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 C-24와 C-25가 126.4ppm와 131.2ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 C-1', C-1''가 105.5ppm, 106.5ppm에서 확인되었고, C-3는 89.2ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 홍삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 (20R) ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, mp 299~303 °C, 분자식 C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>인 Compound III은 (20R) ginsenoside Rg<sub>3</sub>로 동정하였다.

Fig. 4-1  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound III

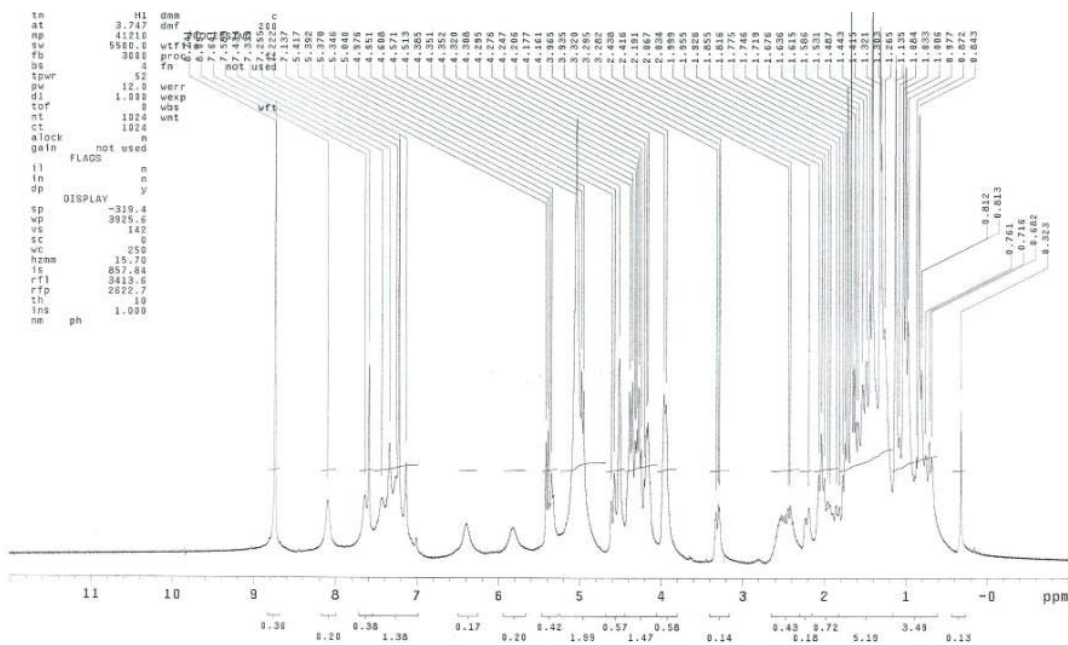


Fig. 4-2  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound III

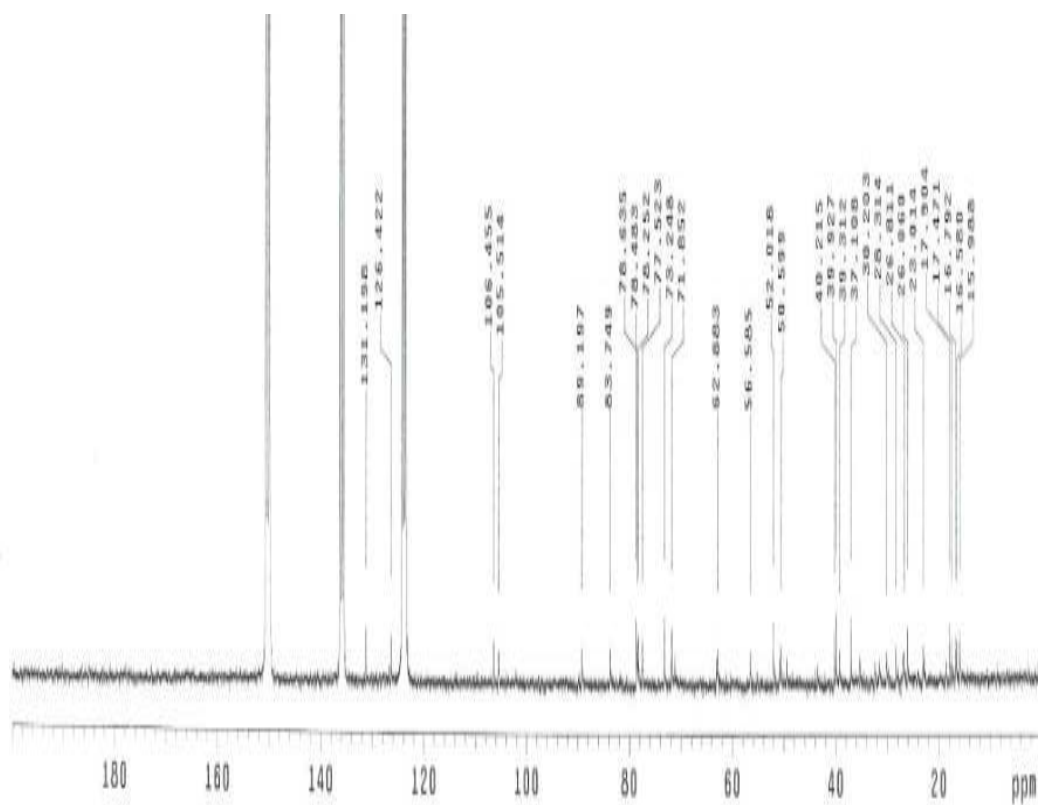


Table III.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data of Compound III

	compound III		compound III
C-1	39.3	3-Glc 1	105.5
C-2	28.2	2	83.8
C-3	89.2	3	78.4
C-4	40.2	4	71.9
C-5	52.0	5	78.3
C-6	17.9	6	56.6
C-7	35.6	-Glc 1	106.5
C-8	37.1	2	77.5
C-9	49.5	3	78.5
C-10	39.9	4	73.2
C-11	32.0	5	78.6
C-12	62.9	6	62.9
C-13	43.8		
C-14	50.6		
C-15	30.2		
C-16	26.8		
C-17	50.9		
C-18	16.8		
C-19	16.6		
C-20	73.5		
C-21	26.1		
C-22	32.6		
C-23	22.9		
C-24	126.4		
C-25	131.2		
C-26	23.0		
C-27	17.5		
C-28	28.3		
C-29	16.0		
C-30	16.8		

-Glc :  $\beta$ -D-glucopyranosyl

### 3. 결론

항암작용을 비롯한 다양한 생리활성을 갖는 진세노사이드 Rg<sub>3</sub>를 고농도로 함유한 긴삼의 생리활성성분을 분리 동정하기 위하여 column chromatography법을 사용하여 50% fraction에서 compound I, compound II, 70% fraction에서 compound III를 분리하였다. 분리된 화합물을 대상으로 물리화학적 접근과 기기분석적 소견(NMR, Mass)을 종합하여 compound I 은 (20S)-ginsenoside Rh<sub>1</sub>, compound II는 (20S) ginsenoside Rg<sub>2</sub>, compound III는 (20R) ginsenoside Rg<sub>3</sub>로 화학구조를 확인 동정하였다.

## 제 4 절 인삼 prosapogenin 함량 분석

### 1. 실험 방법

가. 실험재료 : 긴삼 (Venegar processed ginseng, Ginsam)

1) 인삼사포닌의 HPLC 분석 : 긴삼엑스를 고 등의 조건을 응용, 분석을 상법에 따라 표품과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 분석하였다. 표품은 중앙대학교 인삼산업연구소에서 정제한 순품 사포닌과 Wako Chemical(일본)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside들 이었다.

2) HPLC 장치 및 조건 : Alltech Binary Gradient HPLC system Model 627 (Alltech Associates, Inc, 미국)이였으며, 컬럼은 Prevail Carbohydrate ES column(Alltech Associates, Inc, 4.6×250 mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile, isopropylalcohol, Water (HPLC급, JT Baker, 미국)을 사용하였으며, Solvent A는 (ACN : Water : IPA = 80 : 5 : 15), Solvent B는 (ACN : Water : IPA = 67 : 21 : 12)이였고, Solvent B의 비율을 10%에서 85%, 80%, 75%, 90%, 100%, 그리고 25 %로 순차적으로 변화시켜 주고 마지막으로 다시 10%로 조절하였다. 전개온도는 실온이였고 유속은 분당 0.8 ml이였다. 크로마토그램은 ELSD detector(Alltech Associates, Inc, 미국)를 이용하여 검출하였다.

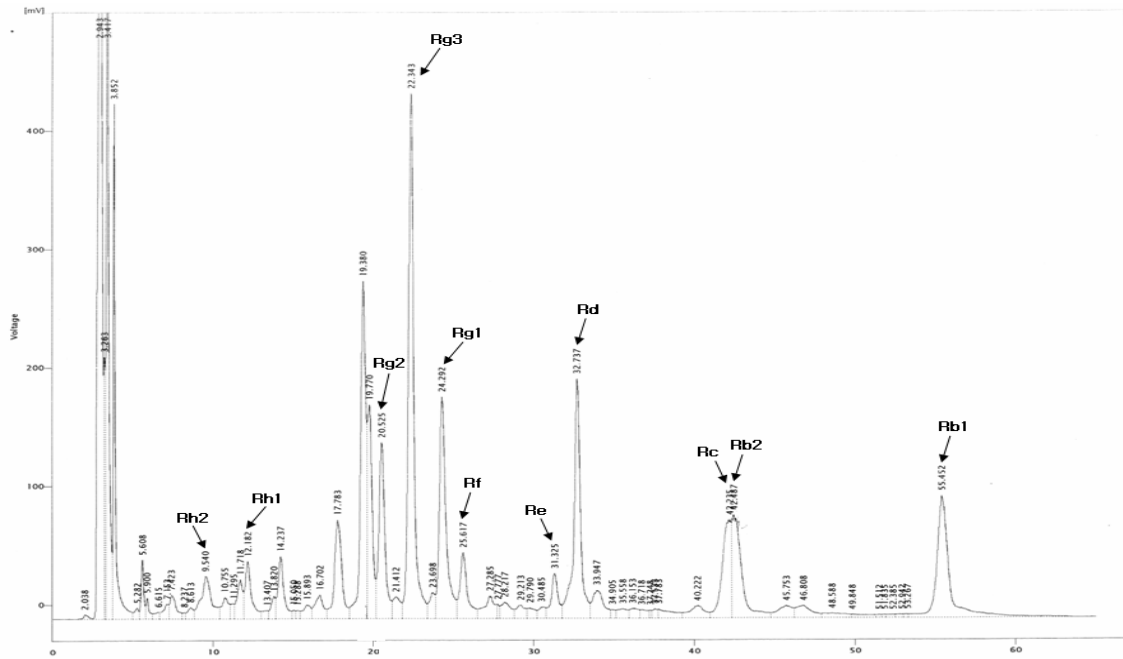
### 나. 결과

긴삼에 대한 ginsenoside 함량을 분석한 결과, Table III에서 보는 바와 같이 protopanaxadiol계 prosapogenin 성분인 ginsenoside Rg<sub>3</sub>를 4.12 % 함유하였고, ginsenoside Rh<sub>2</sub>도 1.63 % 함유하였다. 또한, protopanaxatriol 계 prosapogenin 성분인 ginsenoside Rg<sub>2</sub>, ginsenoside Rh<sub>1</sub>도 3.19 %, 1.55 % 함유하였다.

Table IV. Ginsenosides content of Ginsam

(% ,w/w)	
Ginsenosides	Ginsam
Rb <sub>1</sub>	1.280±0.006
Rb <sub>2</sub> + Rc	0.086±0.057
Rd	2.250±0.018
Re	0.087±0.056
Rf	0.589±0.023
Rg <sub>1</sub>	1.470±0.059
Rg <sub>2</sub>	3.190±0.008
Rg <sub>3</sub>	4.120±0.035
Rh <sub>1</sub>	1.550±0.158
Rh <sub>2</sub>	1.630±0.134

Fig. 5. HPLC profiles of ginsenosides detected from the Ginsam





## 제 5 절 약효 평가

### 1. 시험관내 기전 연구

#### 가. 실험방법

##### 1) Rat pancreatic islets 분리와 세포배양

Pancreatic islets는 Sprague-Dawley rat의 췌장 담도관에 collagenase가 포함된 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)을 주입하여 분리하였다. 분리한 islets을 37°C water bath에서 10분 동안 배양시킨 후 5%의 FBS가 포함된 차가운 HBSS에 옮겨 islets를 잘 풀어주었다. Ficoll을 농도 기울기(1.037, 1.069, 1.085, 1.10)로 islets에 가하여 2000 rpm 에서 20분 동안 원심분리를 하고 1.069와 1.085 층을 HBSS에 옮겨 1500 rpm에서 3분 동안 원심분리를 하여 최종적으로 islets을 얻었다. 얻어진 islet에 10% fetal bovine serum과 1% pencillin/streptomycin이 첨가된 RPMI-1640 배지를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 의 조건으로 1-2일 동안 배양시켰다.

##### 2) 인슐린 분비능 측정

Pancreatic islets에 Krebs-Ringer buffer(KRB)로 2번 수세한 후 37°C에서 30분 동안 preincubation 시킨 후 KRB를 제거하였다. 그리고 11.1 mM glucose와 11.1 mM glucose를 포함한 백삼 (GRA: 250, 100, 50 ug/ml), 긴삼 4% (GS4: 250, 100, 50 ug/ml), 긴삼 8% (GS8: 10, 5 ug/ml)을 농도별로 가하여 37°C에서 60분 동안 배양 후 상등액을 3000 rpm 4°C 에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심 분리하여 얻은 상등액을 eppendorf tub에 옮겨 rat insulin 측정 kit (Shibayagi, Japan)를 이용하여 ELISA reader로 450 nm에서 측정하였다.

##### 3) 간세포 배양

간세포인 H4IIE 세포주는 2.5% fetal calf serum, 2.5% newborn calf serum과 100 U/ml의 항생제가 포함되어 있는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 37°C 온도 유지와 5% CO<sub>2</sub> 공급 조건하에 배양하였다. 세포는 24 well plate에 well 당 4x10<sup>4</sup> 씩 분주하며 시료를 처리하기 16시간 전부터 serum이 들어있지 않은 배지에서 배양하였다.

PEPCK 와 G6Pase 유전자의 발현을 유도하기 위하여 0.1 mM cAMP와 500 nM dexamethasone을 처리하였다. 백삼(GRA: 50, 100 ug/ml), 긴삼 4% (GS4: 50, 100 ug/ml) , 긴삼 8% (GS8: 50, 100 ug/ml)는 cAMP/Dex와 함께 처리한 후 4 h동안 배양하여 RNA를 아래와 같이 분리하여 두 유전자의 발현억제 활성을 확인하였다.

#### 4) RNA 분리 및 RT-PCR

총 RNA는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform 분리 방법을 이용하였다 (Chomczynski and Sacchi, 1987). 물 층에 있는 총 RNA는 이소프로판올을 이용하여 침전시켜 분리한 후 260nm와 280nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 총 RNA 1  $\mu$ g을 Moloney murine leukemia virus transcriptase와 Oligo-dT primer를 이용하여 역전사하여 cDNA를 만든 후 PCR (Polymerase chain reaction) 하였다. PCR을 수행하기 위하여 사용한 Primer의 서열은 다음과 같다. PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 주형사 서열은 ATG CCT CCT CAG CTG CAT A 비주형사 서열은 TTA CAT CTG GCT GAT TCT CTG TT; G6Pase (Glucose-6-phosphatase)의 주형사 서열은 ACC CTG GTA GCC CTG TCT TT, 비주형사 서열은 GGG CTT TCT CTT CTG TGT CG; CPN(Cyclophilin)의 주형사 서열은 ATG GTC AAC CCC ACC GTG, 비주형사 서열은 TTA GAG TTG TCC ACA GTC GGA GA 이다. Primer는 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dNTP, 5  $\mu$ l cDNA 그리고 2.5 unit의 Taq DNA polymerase가 포함되어 있는 25  $\mu$ l의 반응 용액에 최종 농도가 0.5 uM이 되도록 첨가하였다. PCR 조건은 95 °C에서 1분 동안 변성, 55°C에서 1분 동안 붙임 그리고 72 °C에서 2분 동안 연장을 하여 총 30회 반복하였다. PCR 산물은 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel을 이용하여 100V에서 전기영동 하였다. CPN은 증폭된 유전자들의 대조군으로써 사용되었다. PCR 산물은 GS-700 이미지 농도계를 이용하여 발현 정도를 수치화하여 CPN과의 비로 표현하였다.

#### 5) 3T3-L1 지방 세포 배양 및 분화 조건

세포는 100 U/ml penicillin A와 streptomycin을 첨가하고 10 % heat-inactivated calf serum을 포함한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 5% CO<sub>2</sub>와 37°C 조건하에 배양을 하였다. 분화를 유도시키기 위해서, 3T3-L1 preadipocyte는 80% 정도 자라면 분화 유도 배지(5% fetal bovine serum (FBS), 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 1 mM dexamethasone 그리고 10  $\mu$ g/ml insulin가 포함된 DMEM)로 교환하여 2일

간격으로 교환하고 총 4일 동안 배양한 후 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin가 포함된 DMEM으로 교환하여 2일을 더 배양하였다. 그런 후 FBS만 포함된 DMEM으로 2일 배양하여 총 8일 동안 분화를 유도하였다.

#### 6) Oil red O staining

분화 유도는 위의 방법과 동일하며 처음 2일 동안 백삼 (GRA: 100, 250  $\mu\text{g/ml}$ ), 긴삼 4% (GS4: 100, 250  $\mu\text{g/ml}$ ) 그리고 긴삼 8% (GS8; 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 각 시료를 첨가시켜 6 well plate에서 분화를 유도 시켜 총 8일 동안 배양한 세포를 PBS로 2번 수세한 후 10% 포르말린을 포함한 PBS로 1시간 동안 실온에서 세포를 고정시켰다. 그 후 0.3% Oil red O가 포함된 60% 이소프로판올을 2 시간 동안 실온에서 착색시켰다. 착색 후 3차 증류수로 남은 Oil red O 용액을 제거한 후 37°C에서 20 분 동안 남아 있는 물기를 제거 한 후 100% 이소프로판올로 탈 염색하여 540 nm에서 triacylglyceride 농도를 측정하였다.

#### 7) Glucose uptake assay

12 well plate에 분화 유도한 세포를  $2.5 \times 10^5$ 씩 분주하여 하루 동안 배양한 후 serum이 포함되어 있지 않은 저 용량 glucose DMEM 배지로 2번 수세한 후 GRA (100, 250  $\mu\text{g/ml}$ ), GS4 (100, 250  $\mu\text{g/ml}$ ), GS8 (50, 100  $\mu\text{g/ml}$ )과 DMEM 배지로 12 시간 동안 배양한 후 Krebs-Ringer-Hepes (KRP) 용액으로 2번 세척 후 같은 양의 약물과 KRP 용액으로 1시간 동안 배양하였다. 그리고 1 또는 50  $\text{ng/ml}$ 의 인슐린을 첨가하여 30분 동안 배양하고 0.1  $\mu\text{Ci}$  2-deoxy-D- $^3\text{H}$  와 5 mM glucose를 첨가하여 10분 동안 반응시켰다. 이 반응은 차가운 PBS로 3번 세척하므로 중결시킨 후 0.5 N NaOH로 세포를 용해시킨 후 scintillation counter로 측정하였다

### 나. 실험 결과

1) Rat pancreatic islets에서 백삼, 긴삼 4%, 긴삼 8%의 인슐린 분비능을 측정한 결과 그림 1에서 보는바와 같이 백삼, 긴삼 4%, 긴삼 8%는 100, 100, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 11.1 mM glucose만 준 대조군에 비하여 인슐린 분비를 4.4, 1.8, 5.8배 증가시켰음을 확인 할 수 있었다. 또한 백삼, 긴삼 4%, 긴삼 8%의 용량 의존적 인슐린분비 촉진 활성을 확인 한 결과 그림 2에서와 같이 백삼 250  $\mu\text{g/ml}$  농도를 제외하고 백삼, 긴삼 4%와 긴삼 8% 시료는 용량 의존적으로 인슐린 분비를 촉진함을 알 수 있었다.. 이 결과로 긴삼 8%는 백삼, 긴삼

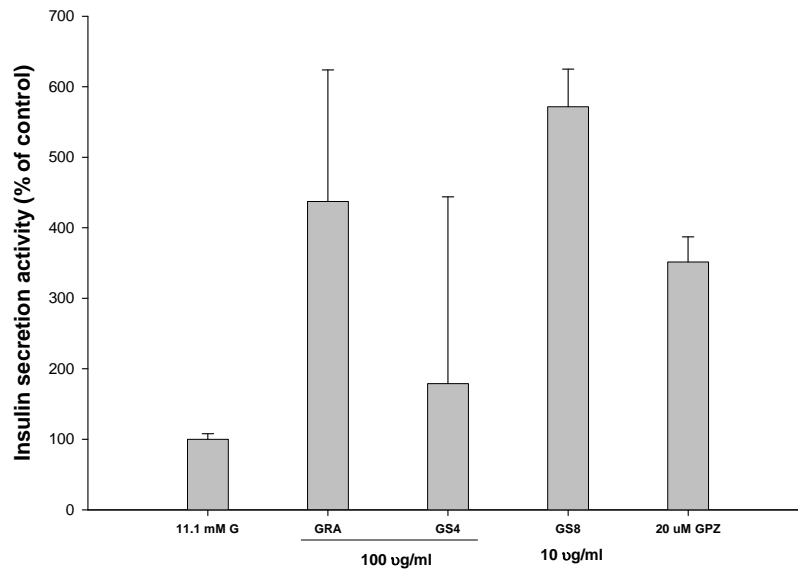
4%와 비교 시 10배 낮은 저용량에서도 인슐린 분비를 촉진하는 효과가 큰 것으로 사료되며, 긴삼 8%의 경우 10 ug/ml 농도는 기존의 인슐린분비 촉진 약물인 glipizide보다도 더 큰 인슐린분비 촉진 활성을 나타내었다. 긴삼의 인슐린분비 촉진 활성은 ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel 차단효과에 기인하며 이는 세포닐요소계 당뇨약들과 같은 기전인 것으로 사료된다. 긴삼의 인슐린분비 촉진 기전이 칼슘 의존적인지 혹은 아닌지에 대해서는 현재 실험이 진행 중에 있다.

- K<sup>+</sup> channel opener인 diazoxide 존재 하에 인슐린분비 활성 검색
- cAMP 분해 효소인 PDE inhibitor (IBMX)와 칼슘채널봉쇄제인 nitrendipine 존재 하에 인슐린분비 활성 검색

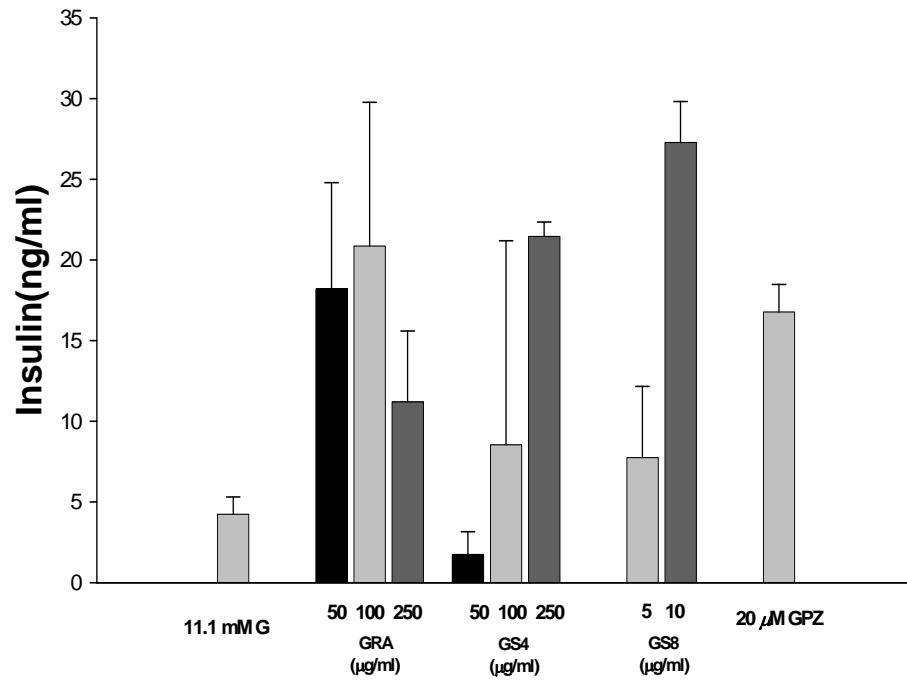
2) 간에서 당신생에 관여하는 효소중 rate-limiting enzyme에 해당하는 PEPCCK와 G6Pase 유전자 발현을 cAMP/Dex을 처리하여 유도한 후 백삼, 긴삼 4%, 긴삼 8%의 발현억제 활성을 대조군 (cAMP/Dex 만을 처리한 군)과 비교한 결과 그림 3에서 보는바와 같이 이들 시료는 모두 PEPCCK 유전자 발현을 오히려 증가시키는 것으로 나타났다. 반면 G6Pase 유전자 발현의 경우는 그림 5에서 보듯이 각 시료 100 ug/ml의 농도에서 50% 이상 억제되었다. 또한 G6Pase의 발현억제 효과는 그림 6과 같이 용량의존적으로 나타났고 그 억제 크기는 같은 용량 범위에서 백삼과 긴삼 8%가 비슷한 크기로 G6Pase의 발현을 억제하였으며 긴삼 4%의 경우는 앞의 두 시료보다는 작은 활성을 나타내었다.

3) 그림 7 그리고 8에서와 같이 지방세포 분화는 백삼과 긴삼 8%는 촉진하였으며 긴삼 8%가 2배 낮은 저용량에서 백삼보다 더 촉진하는 것을 확인하였다. 반면 긴삼 4%는 3T3-L1 세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제하는 효과를 보여주었다. 또한 인슐린 자극에 의한 glucose uptake 실험에서는 그림 9에서 보는 바와 같이 100 ug/ml 농도에서 백삼, 긴삼 4% 그리고 8% 모두 저 용량의 인슐린(1 nM) 보다 증가시킴을 확인하였으나 시료 간 유의한 차이는 발견할 수 없었다.

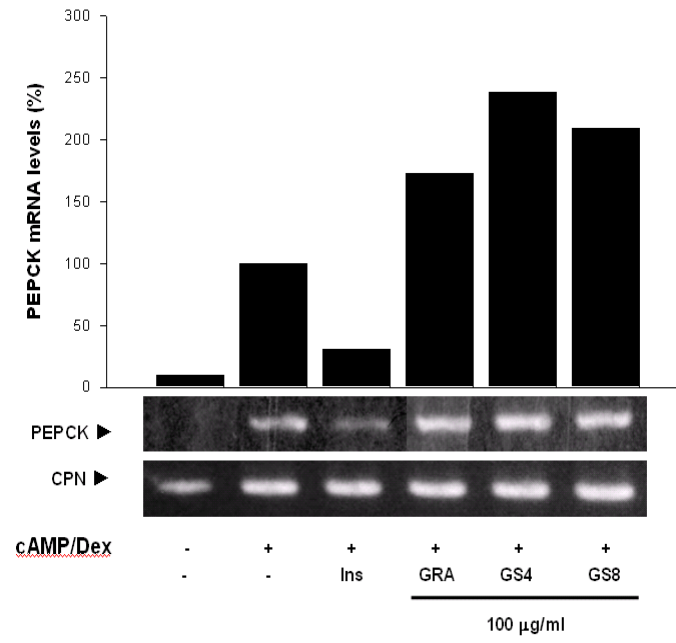
[Fig. 1]



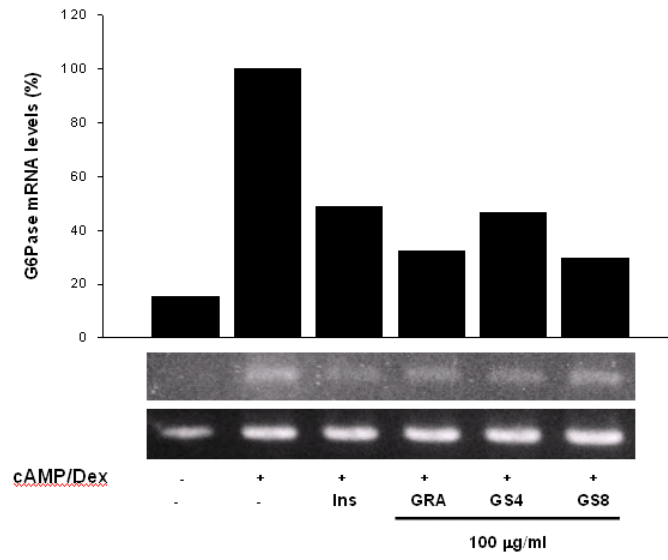
[Fig. 2]



[Fig. 3]

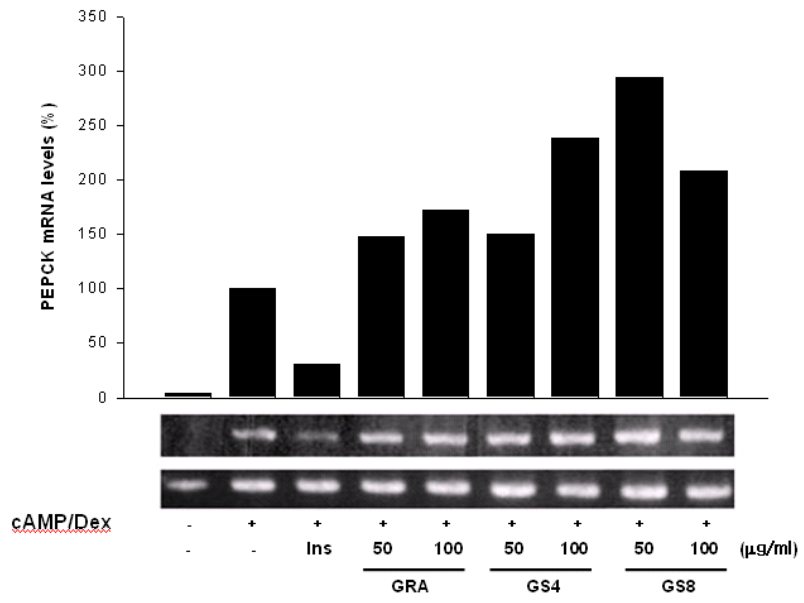


[Fig. 4]

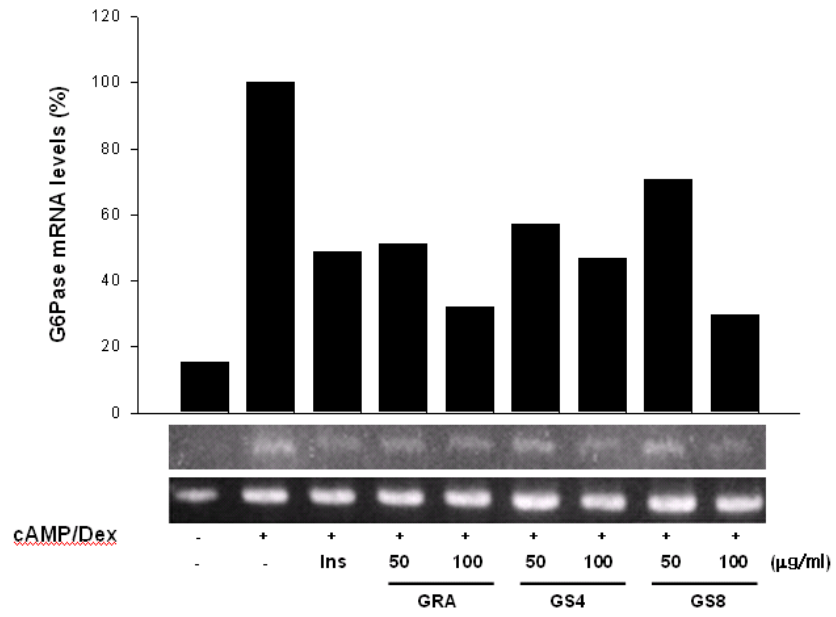




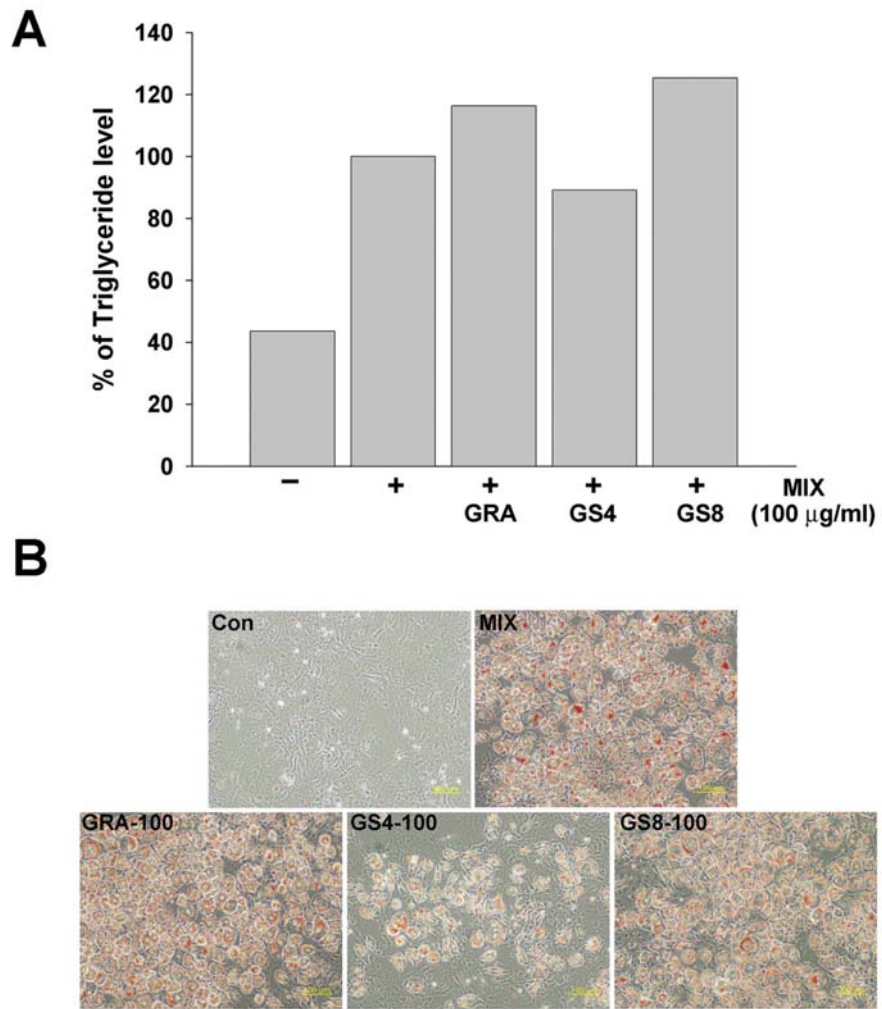
[Fig. 5]



[Fig. 6]

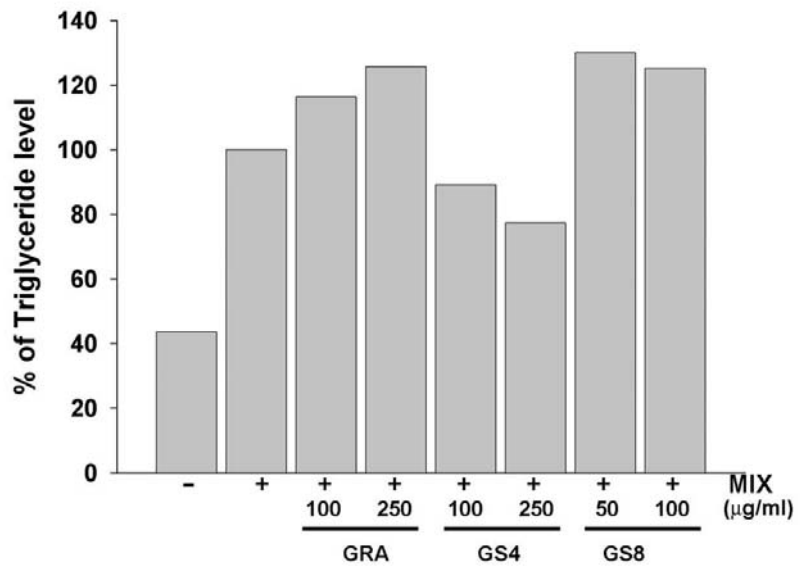


[Fig. 7]

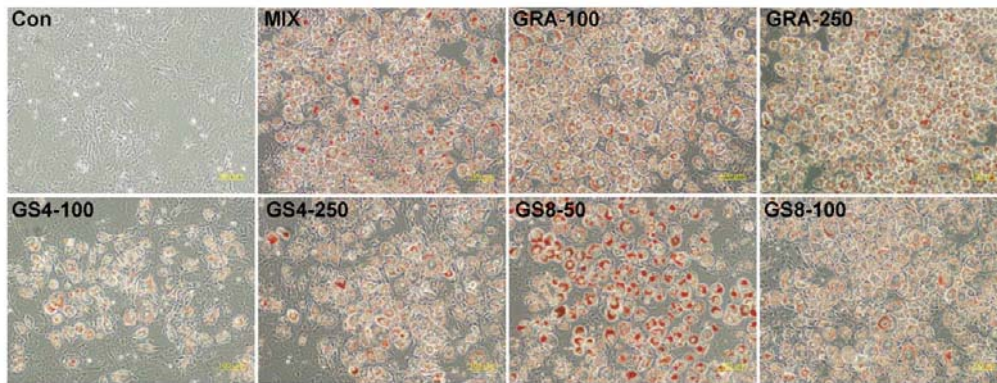


[Fig. 8]

**A**

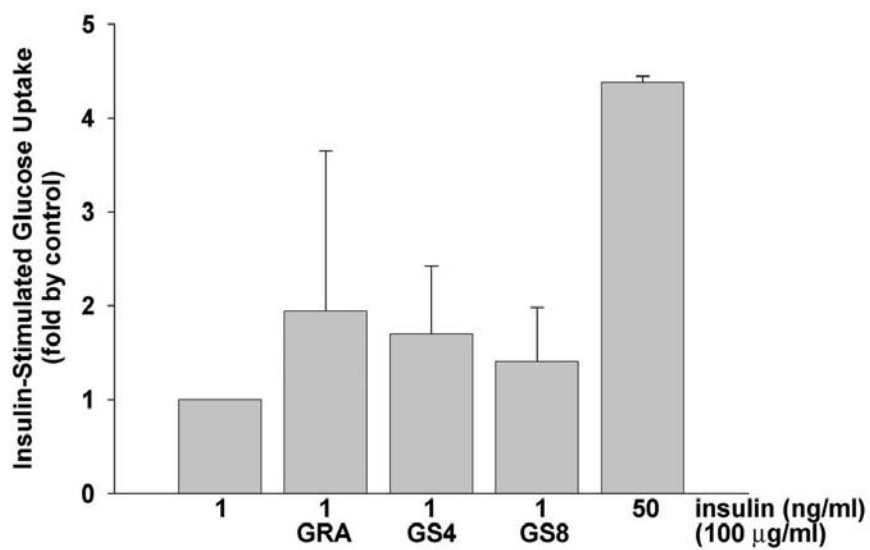


**B**

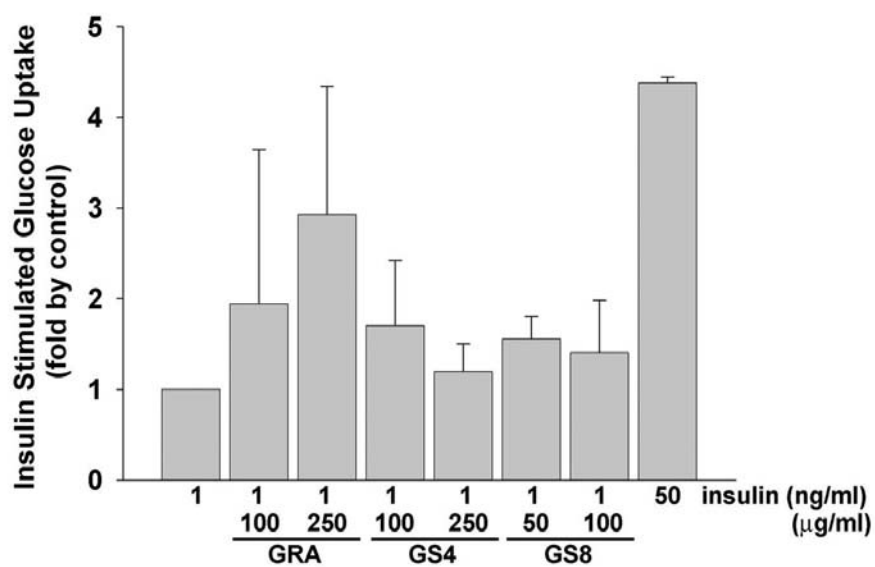


[Fig. 9]

**A**



**B**



## 제 6 절 인슐린 저항성 질환 동물모델 실험

### 1. 실험 방법

#### 가. 실험 동물

C57BL/6J db/db 8주령의 마우스를 중앙실험동물로부터 구입하였으며 2주 동안 적응 기간 후 각 그룹마다 10마리씩 분주하였으며 그룹은 다음과 같다. 증류수 투여 군 (Diabetic control, DC), 백삼 (GR), 긴삼 (GS)은 각각 150 mg/kg 용량으로 5주 동안 경구 투여하였다. 또한 양성대조약물로 metformin (MET)을 300 mg/kg 용량으로 경구 투여하였다. 이때 체중과 혈당은 매주 측정하였다.

#### 나. 혈액지표 분석

혈액 지표 분석을 위한 혈액 채취는 12시간 절식 후 실시하였다. 안와 정맥을 통해 얻어진 전혈을 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 혈장을 사용하였다. 혈중 포도당 농도는 glucose oxidase method로 측정하였으며 흡광도 측정은 UV Spectrophotometer (U-3210, HITACHI; Japan)를 사용하였다. 혈중 인슐린 농도는 마우스insulin ELISA Kit (Shibayagi, Japan)를 구입하여 ELISA reader (Labsystems, Finland)로 측정하였다. 혈중 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 그리고 비에스테르화 지방산(NEFA)은 영동제약에서 각 kit를 구입하여 측정하였다.

#### 다. 간에서 글리코겐 함량 측정

간에서 글리코겐 함량은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 간 50 mg을 30% KOH 1 ml을 첨가하여 100°C에서 30 분 동안 포화시켰다. 포화액의 500  $\mu$ l에 20% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l와 에탄올 1.2 ml를 첨가하여 -20°C에서 12 시간 동안 침전시켰다. 5,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리시키고 상층액을 제거하였다. 70% 에탄올 250  $\mu$ l를 이용하여 수세과정을 거친 후 1시간 동안 상온에서 건조시켰다. 여기에 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200  $\mu$ l를 첨가하고 100°C에서 10분 동안 끓여준 후 4 N NaOH 200  $\mu$ l를 가하여 중화시키고 glucose 측정 kit을 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 라. 간, 근육 그리고 지방 조직에서 중성지방 함량 측정

간, 근육 그리고 지방 조직 50 mg을 혼합 용매 (CHCl<sub>3</sub> : methanol = 2:1) 4 ml에서 분쇄기를 이용하여 균질화한 후 50 mM NaCl 0.8 ml을 첨가하여 교반한 후 4 °C에서 12시간 동안 반응시켰다. 1,300 g에서 5분동안 원심분리하여 유기층에서 200  $\mu$ l를 질소가스로 4시간 동안 건조 시킨후 0.1% Triton X 100이 포함된 PBS를 첨가하여 녹인 후 중성지방 측정 시액을 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 마. 조직의 형태학적 관찰

쥐에서 적출한 조직을 10% neutral buffered formalin을 사용하여 고정하였다. 이후 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하고 두께 5  $\mu$ m의 관상 절편으로 제작한 후 xylene으로 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화시켰다. 염색

방법으로는 Hematoxylin-Eosin 염색으로 탈수 과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입하고 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

#### 바. 조직으로부터 RNA 추출 및 RT-PCR

총 RNA는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform 분리 방법을 이용하였다 (Chomczynski and Sacchi, 1987). 물층에 있는 총 RNA는 이소프로판올을 이용하여 침전시켜 분리한 후 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 총 RNA 1 $\mu$ g을 Moloney murine leukemia virus transcriptase와 Oligo-dT primer를 이용하여 역전사하여 cDNA를 만든 후 PCR(Polymerase chain reaction) 하였다. PCR을 수행하기 위하여 사용한 Primer의 서열은 다음과 같다. PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 주형사 서열은 ATG CCT CCT CAG CTG CAT A 비주형사 서열은 TTA CAT CTG GCT GAT TCT CTG TT; G6Pase (Glucose-6-phosphatase)의 주형사 서열은 ACC CTG GTA GCC CTG TCT TT, 비주형사 서열은 GGG CTT TCT CTT CTG TGT CG; CPN(Cyclophilin)의 주형사 서열은 ATG GTC AAC CCC ACC GTG, 비주형사 서열은 TTA GAG TTG TCC ACA GTC GGA GA 이다. Primer는 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dNTP, 5  $\mu$ l cDNA 그리고 2.5 unit의 Taq DNA polymerase가 포함되어 있는 25  $\mu$ l의 반응 용액에 최종 농도가 0.5 uM이 되도록 첨가하였다. PCR 조건은 95  $^{\circ}$ C에서 1분 동안 변성, 55 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 붙임 그리고 72  $^{\circ}$ C에서 2분 동안 연장을 하여 총 30회 반복하였다. PCR 산물은 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel을 이용하여 100V에서 전기영동 하였다. CPN은 증폭된 유전자들의 대조군으로써 사용되었다. PCR 산물은 GS-700 이미지 농도계를 이용하여 발현 정도를 수치화하여 CPN과의 비로 표현하였다.

#### 사. 데이터 분석 및 통계 처리

모든 실험 결과는 mean standard error로 나타내었다. 대조군 (DC)와 비교하여 통계적 유의성을 Student t-test로 처리하였으며  $p < 0.05$  이하인 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

## 2. 실험 결과

### 가. 체중과 체중 변화

표 1은 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 체중과 체중의 변화를 나타내었다. 대조군에 비해 GS 군의 체중과 체중 변화가 가장 많았으나 간 그리고 지방 조직의 무게는 모든 군에서 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

Table 1. Effects of GR and GS on body weight, weight gain, liver and fat weight

Groups	Weight (g)					
	Body	weight gain (g)	Liver	Liver/Body	Fat	Fat/Body

DC	53.4±1.6	6.1±2.3	2.9±0.4	5.5±0.8	3.4±0.5	6.5±0.9
GR	54.9±3.8	7.4±3.1	2.8±0.3	5.5±0.6	3.1±0.2	6.0±0.2
GS	57.9±2.5	9.4±1.4	2.8±0.4	5.0±0.5	3.5±0.4	6.3±0.6
MET	54.6±3.4	8.7±4.5	3.0±0.6	5.9±1.1	2.5±1.2	5.9±0.4

Values represent the mean ± SD (n=10)

#### 나. 혈당, 인슐린 그리고 인슐린저항성 지수

표 2는 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 혈당과 인슐린 그리고 인슐린 저항성에 대한 효과를 나타내었다. 대조군에 비해 5주 동안 약물 투여군에서 혈당의 증가폭이 낮았다. GR 그리고 GS는 대조군에 비해 35, 31% 감소하였으며 양성대조약물인 MET는 시작할 때보다 오히려 혈당을 감소시켜 대조군에 비해 77% 감소하였다. 인슐린은 GR 투여군에서 대조군에 비해 33% 감소하는 경향을 보였으나 variation이 커서 유의적인 효과는 없었다. GS 투여군은 대조군과 큰 차이는 없었으나 3% 감소하는 경향을 보였다. 인슐린저항성 지수는 MET 투여군에서 인슐린 수치는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나 혈당이 큰 폭으로 떨어져 그 결과 90% 감소하는 경향을 보였다. GR 투여군은 혈당과 인슐린 농도가 대조군에 비해 감소하였으므로 79% 감소하였다. 반면 GS 투여군은 혈당은 GR 투여군과 큰 차이가 없이 감소하였으나 인슐린 농도가 대조군과 비슷하여 인슐린 저항성 지수에서는 각각 35, 45% 감소하는 경향을 보였다.

Table 2. Effects of GR and GS on plasma glucose, insulin and HOMA- IR

Groups	Glucose (mM)		insulin (mU)	HOMA-IR
	Initial	Final		
DC	10.0±0.6	14.5±1.1	254.5±5.1	163.6±10.5
GR	10.2±1.0	10.7±1.0*	190.3±36.9	91.2±21.6**
GS	9.4±0.8	11.0±2.7	246.5±2.0	120.4±29.1*
MET	10.1±1.7	8.2±0.7***	235.8±6.8	86.3±9.3***

Values represent the mean ± SE (n=10). Plasma glucose and insulin were analyzed in plasma samples obtained from blood of 12 h mice. Homeostasis Model Assessment was



used to calculate an index of insulin resistance as insulin (mU/ml) X glucose (mM) / 22.5. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. DC.

#### 다. 혈중 지질 농도에 대한 효과

표 3은 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 혈액 내에 존재하는 지질의 양을 나타내었다. GR 투여군은 triglyceride에서 대조군에 비해 33% 감소하였으며 GS 투여군은 NEFA, Triglyceride 그리고 LDL 콜레스테롤에서 대조군에 비해 각각 46, 60, 37% 감소시켰다. 이 결과를 통해 혈중 지질 농도에 GS 투여군이 탁월한 효과를 보임을 알 수 있었다.

Table 3. Effects of GR and GS on plasma lipid levels

Groups	NEFA(mg/dl)	Triglyceride(mg/dl)	Totalcholesterol(mg/dl)	HDLcholesterol(mg/dl)	LDLcholesterol(mg/dl)
DC	1816.5±146.4	115.3±11.9	174.2±10.0	69.9±4.3	81.3±7.6
GR	1596.8±255.5	86.0±5.5	167.6±8.8	76.3±7.3	74.2±3.2
GS	1245.0±145.0	71.9±6.8*	154.9±9.6	81.3±2.2	59.2±9.2
MET	1499.3±224.3	87.4±10.6	172.0±14.0	76.3±5.7	78.2±8.0

Values represent the mean ± SE (n=10). Non-esterified fatty acid (NEFA), triglyceride, total cholesterol, and HDL-cholesterol were determined in plasma after mouse are killed. LDL-cholesterol (mg/dl) = Total cholesterol - HDL cholesterol-triglyceride/5.

#### 라. 간의 glycogen 함량

그림 1은 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 간 조직 내의 glycogen 함량을 나타내었다. 약물 투여 후 혈당 변화가 대조군에 비해 감소하는 경향은 간으로 uptake된 포도당 양이 증가했을 것으로 추정하여 조직 내의 glycogen 함량 감소를 기대하였으나 대조군과 비교하여 metformin 투여군을 제외한 군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 이 결과로부터, 간 조직으로 유입된 포도당은 글리코젠 합성 외에 해당 과정 혹은 hexose monophosphate pathway로 이용될 가능성을 배제할 수 없다.

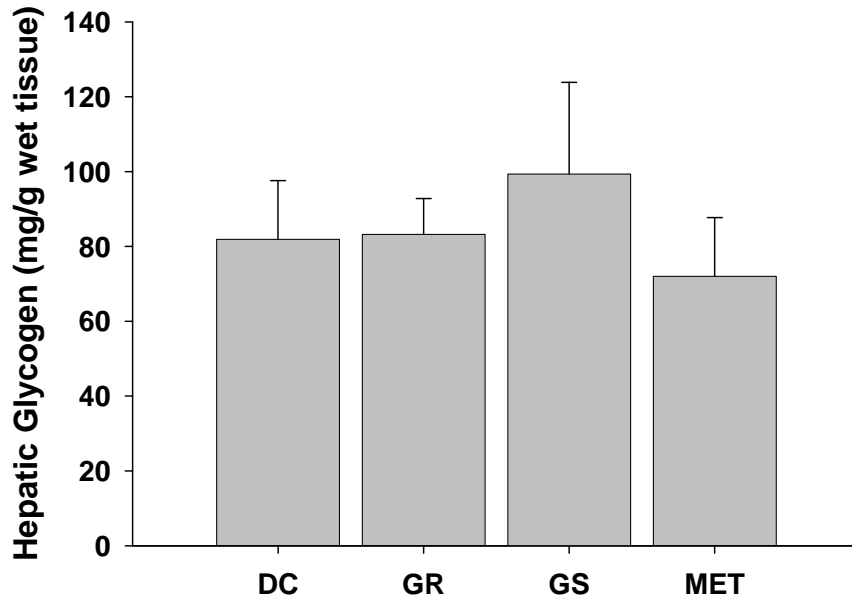


Fig 1. Hepatic glycogen contents. Values represent the mean  $\pm$  SE (n=10)

#### 마. 조직 내 중성 지방 함량

그림 2는 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 조직 내 중성 지방 함량을 나타내었다. GR 투여군은 간, 지방 조직에서 중성 지방 함량은 대조군에 비해 각각 70%, 12% 증가한 반면 근육 조직에서는 79% 감소하였다. GS 투여군의 중성 지방 함량은 GR 투여군과 달리 간 조직에서만 대조군에 비해 57% 증가하였으며 지방 조직과 근육 조직에서는 각각 61%, 44% 감소하였다. 또한 positive control인 MET 투여군의 중성 지방 함량은 간 조직에서는 141% 증가한 반면 지방과 근육 조직에서는 각각 33%, 73% 감소하는 경향을 나타내었다. GS 투여군이 지방 조직에서 중성 지방 함량 감소에 탁월한 효과가 있음을 확인하였다.

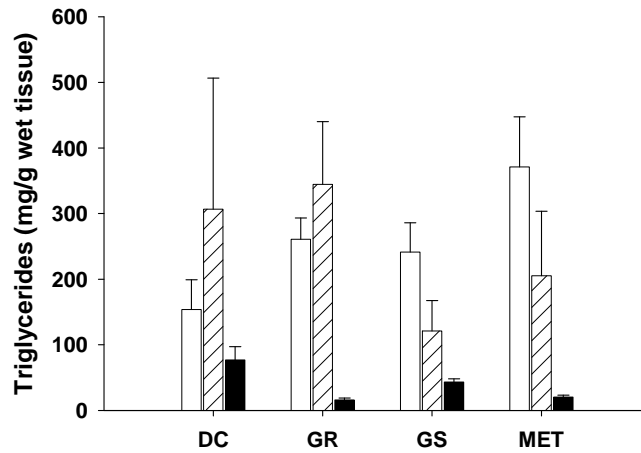


Fig 2. Effects of GR and GS on contents of triglyceride in the liver (□), periepididymal fat (▨) and skeletal muscle (■). Values represent the mean  $\pm$  SE (n=10)

#### 바. 지방 조직에서 lipogenesis 와 lipolysis

그림 3은 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 지방 조직에서 lipogenesis 와 lipolysis 관련 유전자의 mRNA 발현을 나타내었다. GR 투여군에서 lipogenesis 관련 mRNA 중 SCD1는 대조군과 큰 차이는 없지만 감소하는 경향은 보이거나 FAS 는 오히려 증가하는 경향을 보였다. 반면 SREBP1a mRNA는 80% 이상 감소하는 효과가 있다. 반면 GS 투여군은 lipogenesis 관련 mRNA 중 SCD1, FAS 그리고 SREBP1a 각각 25%, 80%, 90% 감소시키는 탁월한 효과를 나타내었다. 또한 lipolysis 관련 유전자의 mRNA는 GR과 GS 투여군 모두 대조군에 비해 현저하게 증가시키는 경향을 나타내었다. 이를 통해 GR과 GS 투여군은 lipogenesis 관련 유전자는 감소시키고 lipolysis 관련 유전자는 증가시키는 효과가 있으며 특히 GS 투여군은 GR 투여군에 비해 lipogenesis 관련 유전자 억제 활성이 뛰어난 것을 알 수 있었다.

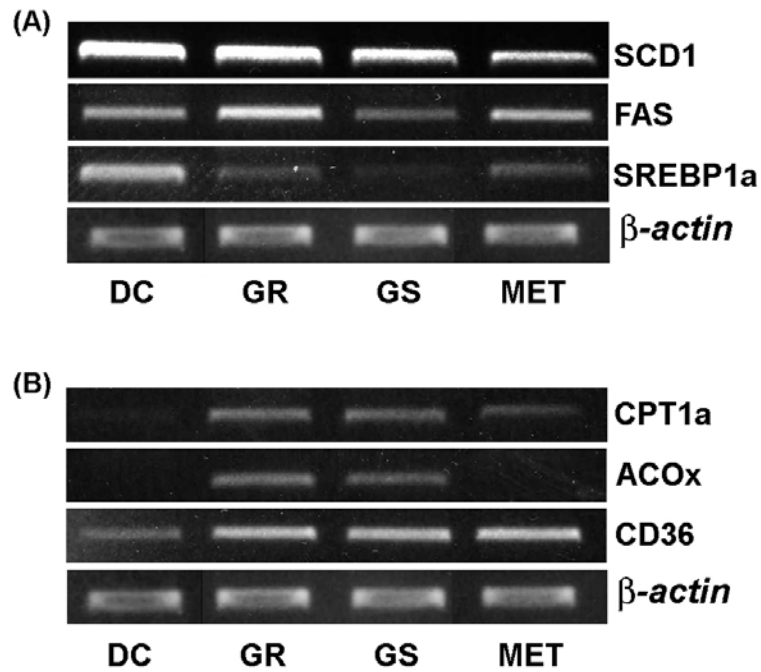


Fig 3. Effects of GR and GS on lipogenesis (A) and lipolysis (B) in the periepididymal fat.

#### 사. 간 조직에서 lipogenesis 와 lipolysis

그림 4는 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 간 조직에서 lipogenesis와 lipolysis 관련 유전자 mRNA 발현을 나타내었다. GR과 GS 투여군은 lipogenesis와 관련된 유전자의 발현에는 대조군과 큰 차이는 없으나 감소하는 경향을 나타내었다. 반면 lipolysis 관련 mRNA 중 CD36은 대조군에 비해 현저하게 증가하였으나 대조군의 내재성 control인 CPN의 값이 다른 투여군에 비해 그 양이 적으므로 그 값의 차이가 크지 않다.

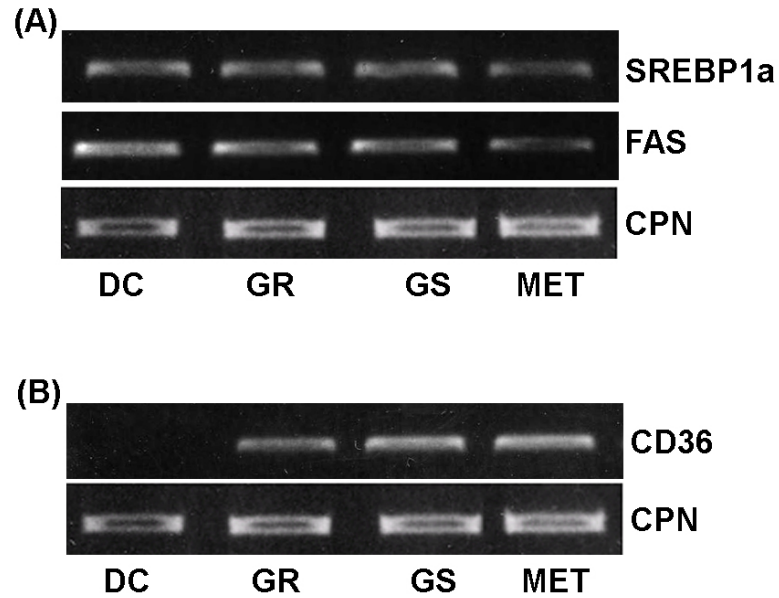


Fig 4. Effects of GR and GS on lipogenesis (A) and lipolysis (B) in the liver.

#### 아. 췌장의 형태학적 관찰

그림 5는 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 췌장 조직의 형태를 나타내었다. 당뇨로 인해 췌장 islet의 형태가 대조군(DC군)에서 부분적으로 파괴된 반면 MET, GR, GS 투여군은 그 형태를 유지할 뿐 아니라 GS 투여군은 특히positive 대조군(MET)에 비해 islets의 크기도 크고 형태도 잘 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 GS 투여군은 췌장 베타 세포 사멸로 인해 인슐린 분비가 감소되는 현상을억제할 수 있다고 추측할 수 있다.

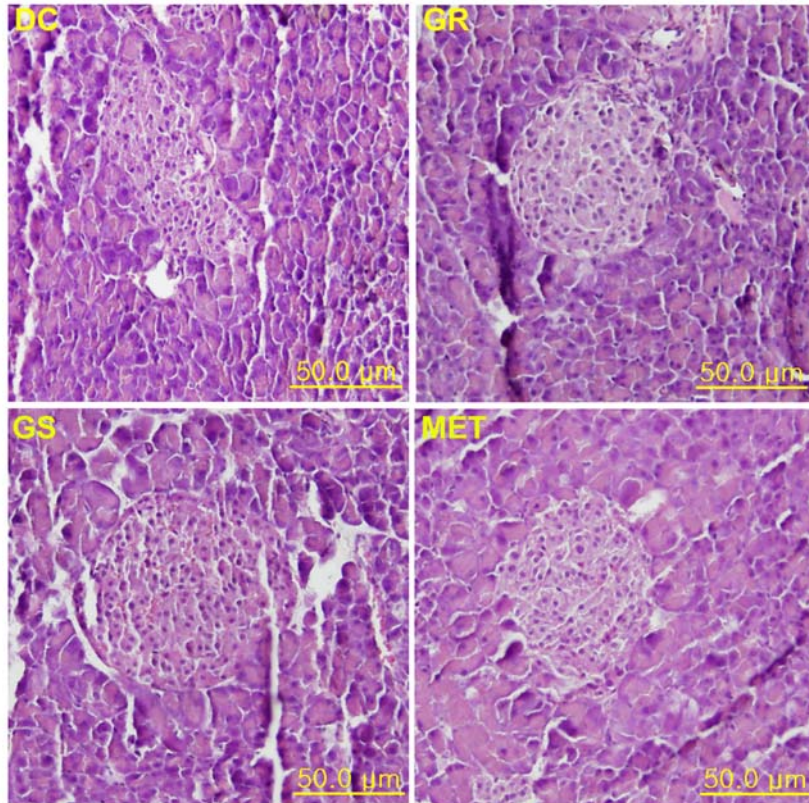


Fig 5. Effects of GR and GS on pancreatic islets morphology stained by hematoxylin and eosin. Magnification of histological sections X200.

#### 자. 지방 조직의 무게와 형태학적 관찰

표 4는 지방조직의 무게 및 그림 6의 지방세포 크기를 직경 및 면적의 수치로 나타낸 표이다. 표 4에서와 같이 각 군마다 지방 조직의 무게는 큰 차이가 없어 체중 변화에 큰 차이가 없었던 것과 비슷한 경향을 나타내었으나, 흥미로운 사실은 직경의 지름과 면적에는 대조군과 큰 차이가 나타내었다. 직경은 대조군과 비교하여 GR과 GS는 각각 30%, 32% 감소시켰으며 면적의 경우는 각각 68%, 86% 감소시켰다.

Table 4. Effects of GR and GS on area and diameter periepididymal fat fad

Groups	Mass (g)	Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Area ( $\mu\text{m}^2$ )
DC	3.4 $\pm$ 0.5	132.0 $\pm$ 10.6	14725 $\pm$ 1928

GR	3.1±0.2	101.2±6.3**	8749±631.1***
GS	3.5±0.4	100.2±8.3**	7908±547.8***
MET	2.5±1.2	112.7±7.9	11367±1373

Values represent the mean ± SE (n=10). \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.001 vs. DC.

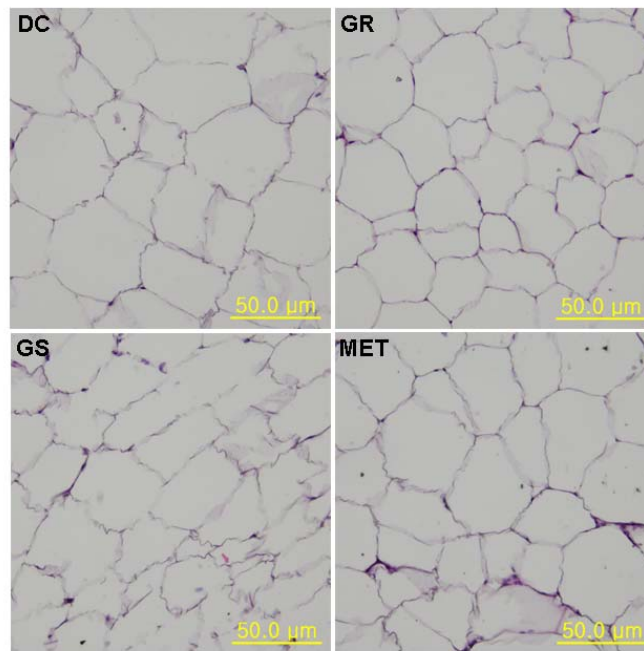


Fig 6. Effects of GR and GS on periepididymal fat morphology stained by hematoxylin and eosin. Magnification of histological sections X200.

#### 차. 근육 조직에서 Glut4 mRNA 발현

그림 7은 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 근육 조직에서 glucose uptake에 관여하는 glucose transporter 4 (Glut4) 유전자의 발현 정도를 나타내었다. 대조군은 Glut4의 발현을 확인할 수 없는 반면 positive control인 MET 투여군은 대조군에 비해 발현량이 3배 증가하였으며 GS 투여군은 발현량이 10배 증가하는 경향을 보였다. 반면 GR 투여군은 Glut4에 영향이 없는 것으로 나타났다. 이 결과로부터, GS 및 metformin 투여군의 혈당강화 효과는 근육 조직 표면의 GLUT4 mRNA 발현량을 증가시켜 포도당의 유입을 증가시킨 결과라 해석할 수 있다.

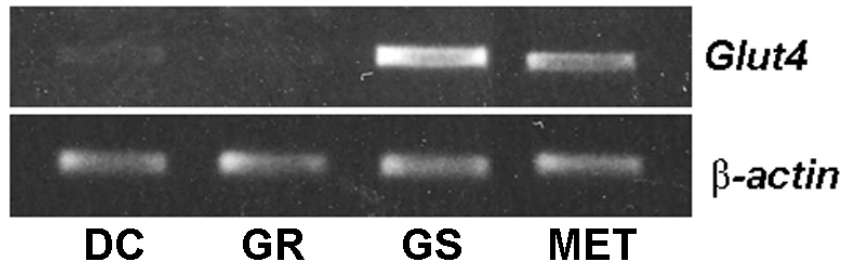


Fig 7. Effects of GR and GS on Glut4 mRNA expression levels in the skeletal muscle.



### 카. 지방 조직에서 PPAR-g 그리고 Glut4 mRNA 발현

그림 8은 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 지방 조직에서 glucose가 지방 조직 안으로 유입되는 신호 전달 glucose transporter의 작용에 관여하는 PPAR-g 와 Glut4의 mRNA 발현을 나타내었다. PPAR-g 유전자 발현은 대조군에 비해 positive control 투여군(MET)은 4배 증가하였으며 GR 그리고 GS 투여군은 각각 10, 7배 증가하였다. 반면 Glut4 유전자 발현의 경우 GS 투여군은 근육 조직에서와 마찬가지로 대조군에 비해 10배 정도 증가함을 확인하였다. 이 결과를 통해 GS 투여군의 PPAR-g 의 발현은 Glut4의 발현에 영향을 미쳐 근육 조직뿐만 아니라 지방 조직으로 glucose의 유입을 증가시킴으로써 혈당 강하 효과를 나타냈다고 추론할 수 있다. 반면 GR투여군은 PPAR-g 유전자 발현은 크게 증가하였으나 Glut4 발현에는 별다른 영향을 미치지 못한 것으로 보아 PPAR-g sensitive 유전자들(LPL, ap2, GK, PEPCK) 발현에 영향을 미쳐 혈당 강하 활성을 나타낼 수 있음을 배제할 수 없다.

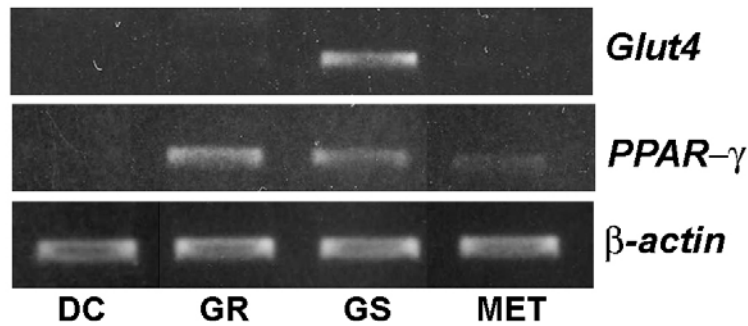


Fig 8. Effects of GR and GS on PPAR-g and Glut4 mRNA expression levels in the periepididymal fat.

### 타. 간 조직에서 PEPCK 그리고 G6Pase mRNA 발현

그림 9는 5주 동안 약물을 경구 투여한 후 간에서 당 신생에 관여하는 효소 중 대표적인 PEPCK, G6Pase의 발현억제 활성을 확인한 결과이다. PEPCK와 G6Pase mRNA 발현은 GR투여군에서 대조군에 비해 각각 20%, 30% 억제 활성을 나타내었다.

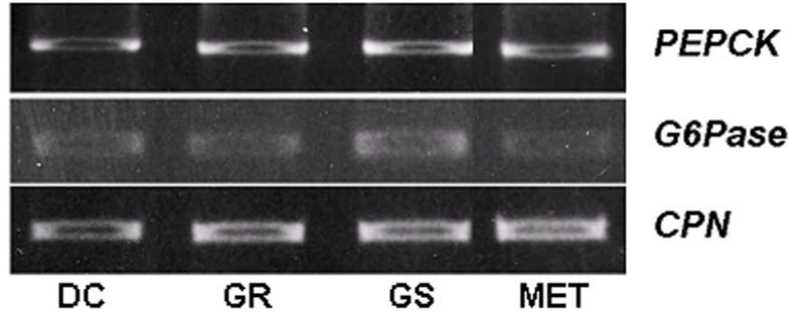


Fig 9. Effects of GR and GS on PEPCK and G6Pase mRNA expression levels in the liver.

### 3. 결론

- 가. GR과 GS 투여군에서 혈당과 인슐린 저항성 지수에 대해 개선 효과가 탁월하다.
- 나. GS 투여군에서 지방 조직 내 중성 지방의 함량을 감소 시켰으며 근육 조직 내의 중성 지방은 GR과 GS 투여군에서 탁월하게 감소시키는 경향을 보였다. 근육에서 인슐린 저항성을 일으키는 물질로 알려진 중성지방의 감소는 GS의 인슐린 저항성 개선 활성과도 관련이 있다.
- 다. GS 투여군에서 지방 조직의 lipogenesis 관련 유전자 발현은 감소시키고 lipolysis 관련 유전자 발현은 증가시켜 지방 조직 내의 중성 지방 함량을 감소시켰다고 보여짐. 반면 간 조직에서는 lipolysis 유전자 중 CD36만 증가시키는 경향을 나타내었다.
- 라. 대조군은 췌장의 베타 세포 사멸이 진행되었으나 GR과 GS 투여군은 세포 사멸을 억제 시켰으며 또한 그 형태도 유지되었다.
- 마. GS 투여군은 대조군에 비해 지방 조직의 무게는 큰 차이가 없었으나 직경과 면적은 감소시키는 효과를 보였다.
- 바. GS의 경우 지방 조직에서 PPAR- $\gamma$ 의 발현을 증가시킨 결과 근육과 지방 조직에서 GLUT4 발현이 증가하여 혈당 강하 활성을 나타내었다.
- 사. 위의 결과를 토대로 GS는 혈당과 인슐린 저항성 지수를 개선시키고 혈중의 지질 농도를 감소시키고 지방과 근육 조직 내의 GLUT4 유전자 발현을 증가시키며 lipolysis를 촉진하고 lipogenesis를 억제하는데 탁월한 효과가 있었으므로 GR과 비교 시 항당뇨 활성이 크다고 결론을 지을 수 있다.

## 제 7 절 액상형 기능성 소재화 가공 및 기능성식품개발

### 1. 드링크타입의 음료에 적합한 유효성분의 소재화 전체 공정

#### 가. 전체적인 소재화 제조 공정 흐름

원료준비->예열->교반->반응->냉각->여과->농축->분무건조

#### 나. 각 공정 단계별 최적화

##### 1) 원료준비

인삼엑스분말 1 part당, 2배 양조식초 4 part를 미리 무게를 측정하여 준비한다. 이때 2배 양조식초의 총산도(Total acidity)는 14% 정도이고, 원료로 사용된 인삼엑스분말의 총사포닌 함량은 20-22%, 조사포닌 함량은 22-24% 이었다.

표. 원료인삼엑스분말의 사포닌 조성

Saponin	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rf	Rg1	기타
Content(%)	2.42	2.59	2.09	2.41	2.94	0.24	1.17	-

##### 2) 예열

먼저 2배 식초를 반응기에 넣은 후 95 C로 가열 시킨다.

##### 3) 교반

미리 준비해둔 인삼엑스분말을 예열된 반응기에 투입하고 임펠러로 잘 혼합한다.

단, 저농도의 유효성분이 함유된 소재를 제조하고자하는 경우에는 인삼엑스분말 1 part당 2배 양조식초 9 part를 혼합한다.

#### 4) 반응

인삼엑스분말을 투입하고 5시간 이상 교반하면서 반응을 시킨다.  
이때 반응기 온도는 90 -95 C로 유지시킨다.

#### 5) 냉각

반응이 끝난 후 반응물을 상온으로 방냉시킨다.

#### 6) 여과

Watmann filter paper No.1으로 1차 조여과 후, 0.45mico-meter membrane filter(nylon)로 2차 정밀여과를 실시한다. 여과된 반응물의 관능적 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.



그림. 여과된 반응물

표. 반응후 반응물의 관능적 특성변화

관능적 특성	반응물 원액	5배 희석액	10배 희석액	20배 희석액
색	진한 흑갈색	진한 흑갈색	갈색	연한 황갈색
맛과 향	강한 식초향과 맛으로 음용 불가. 큼직한 이취가 매우 강함. 인삼향은 느껴지지 않음.	역시 강한 식초향과 맛으로 음용 불가. 큼직한 이취가 강함.	식초향은 약해졌으나 신맛은 아직도 강함. 인삼향이 조금 느껴짐. 아직도 큼직한 이취가 상당함.	식초향과 신맛이 매우 약해졌음. 인삼향이 느껴짐. 아직도 큼직한 이취가 꽤 느껴짐.

표에서 보듯이 반응물 원액은 물론이고 20배로 희석시켜 감미등을 하여도 음료로서의 적성이 매우 부족하였다.

표. 식초반응후 인삼엑스의 사포닌 조성

Saponin	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rf	Rg1	Rg3
Content(%)	0.00	0.08	0.04	0.30	0.03	0.12	0.00	4.37

한편 반응후 반응물의 사포닌 함량은 원료 인삼엑스분말과 별 차이가 없는 것으로 조사되었지만, 사포닌 조성은 크게 다르게 나타났다. 특히 원료에서는 검출되지 않았던 Rg3의 함량이 매우 높게 나타났다.

## 7) 농축

여과된 반응물을 진공농축기를 사용하여 50-55 C에서 30-40 Brix 정도로 농축을 시킨다. 농축시 이취 성분들이 약간은 제거되는 것으로 판단됨.

한편 30-40 Brix 내외로 적절하게 진공농축을 시킨후 다시 희석하여 음료배합을 실시하여도 큼직한 이취가 약간만 제거될 뿐 음료로서 적합한 관능적 특성을 나타내지는 못하였다.

따라서 반응물의 이미 이취를 제거시켜 드링크타입의 음료소재로서 적합한 관능적 특성을 갖도록 하며, 음료배합시 성분함량을 일정하게 조절하기에 유리한 분말소재로 소재화 가공을 실시하는 것이 필요하다. 또한 반응물을 분말로 소재화 시키면 원료소재의 보관 및 취급

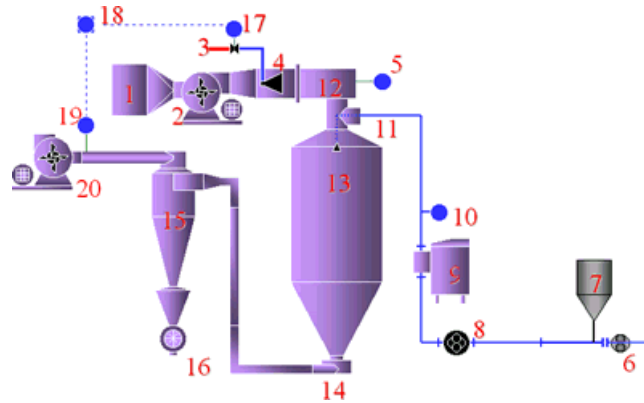
이 용이해져 최종 드링크 타입의 음료제조시 전체적인 공정의 품질관리가 용이해지는 장점이 있다.

### 8) 분무건조

30-40 Brix로 진공농축 시킨 반응농축액을 분무건조시켜 분말소재를 제조하였다. 이때 분무건조조건은 다음과 같다.

표. 반응농축액의 분무건조 조건

	분무건조조건
원료투입형태	노즐타입
투입원료량	1.5L/hour
Inlet Temp.	220-250 C
Outlet Temp.	180-185 C



1. Inlet Filter System, 2. Inlet Supply, 3. Heater Fuel Train, 4. Heater Unit, 5. Temperature Probe, 6. Liquid Feed Transfer Pump, 7. Batch Feed Tank, 8. Booster Pump, 9. High Pressure Feed Pump, 10. Feed Line Pressure Monitor, 11. Atomiser

Assembly, 12. Inlet Air Header, 13. Drying Chamber, 14. Powder Conveying Line, 15. High Efficiency Cyclone Collector /Bag Filter Options Available, 16. Rotary Valve / Blow Seal, 17. Fuel Control Valve, 18. Temperature Controller, 19. Exhaust Temperature Probe, 20. Exhaust Air Fan

그림. 분무건조기의 일반적 구조



그림. 분무건조된 분말소재

반응물 농축액을 분무건조시킨 분말을 다시 증류수에 용해시켜 음료소재로서의 적합성을 조사하였다.

표. 반응물 분말 소재의 특성

	분말소재의 용해시 특성
용해도	완전용해
색	0.5 % 용액의 경우. 황갈색
향	0.5% 용액의 경우. 약간의 한약향이 남.콤콤한 이취가 없음. 식초냄새와 같은 부정적인 냄새도 거의 나지 않음
맛	0.5% 용액의 경우. 이미가 없음. 단맛과 쓴맛이 배합된 한약 맛이 남. 신맛과 같은 부정적인 맛은 거의 없음.

최초에는 액상소재화로 계획하고 소재화 시험을 진행하였으나, 위의 결과들을 종합적으로 판단할 때 드링크 타입의 음료용 소재를 제조하는데 적합한 소재화 제조공정은 원료인 삼엑스분말을 반응후 그대로 액상으로 소재화 하는 것 보다 30-40 Brix 로 농축시켜 분무 건조하는 과정을 거쳐 분말형태로 소재화하는 것이 관능적 특성이 좋아지며, 배합과 품질관리 등의 음료제품 제조 공정관리시에 효율성이 높아질 것으로 판단된다.



## 제 8 절 액상형 기능성 소재화 가공

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 재료

본 실험에 사용한 ginsam 분말의 소재화 제조 공정도는 다음<Ginsam 분말의 소재화 공정, 각 공정 단계별 최적화>과 같았고 원료인삼 분말과 ginsam 분말의 사포닌 조성은 Table 1과 같았다. 음료제조를 위한 주.부재료들 중 ginsam 분말은 (주)유유에서 제공받아 사용하였고 감미료로 팔라티노스(Palatinose), 피브룰로오즈(Fibrulose F97) 및 슈크랄로즈(Sucralose)는 (주)크레마 코리아로부터, 프락토올리고당(Fructooligosaccharide, 제품명: 썬올리고)은 삼양 제넥스 것을 구입하여 사용하였다. 산미료로 사용된 무수구연산(남영상사, 제품명: Refined anhydrous citic acid) 및 구연산 나트륨(남영상사), 비타민 C(제품명: Ascorbic acid)를 포함한 비타민 B<sub>1</sub>(제품명: Thiamine hydrochloride), 비타민 B<sub>2</sub>, 비타민 B<sub>6</sub>(제품명: Pyridoxine hydrochloride), 비타민 B<sub>12</sub>(제품명: Cyanocobalamin)와 엽산(Folic acid)은 Roche것을 (주)크레마 코리아로부터 구입하여 사용하였다. 그 밖의L-카르니틴(L-Carnitine)은 Lonza Biotech., 산화아연(Zinc oxide)은 Dr. Paul Lohmann, 잔탄검(Xanthan Gum)은 Archer Daniels Midland Company, 젖산칼슘(제품명: Fermented lactic acid calcium)은 Kawai, 황산망간(Manganese Sulfate)은 덕산약품, Taurine은 H.K. Song것을 각각 구입하여 사용하였다. 메틸헤스페리딘(methyl hesperidin, 제품명: 스위트 메이트)은 (주)크레마 코리아로부터 구입하여 사용하였고 홍삼향(H-5030)은 아로마월드(Aroma World Co. LTD.) 제품을 구입하여 사용하였다.

#### <Ginsam 분말의 소재화 공정>

원료준비 → 예열 → 교반 → 반응 → 냉각 → 여과 → 농축 → 분무건조

#### <각 공정 단계별 최적화>

##### 1) 원료준비

인삼엑스분말 1 part당, 2배 양조식초 4 part를 미리 무게를 측정하여 준비한다. 이때 2배 양조식초의 총산도(Total acidity)는 14% 정도이고, 원료로 사용된 인삼엑스분말의 총사포닌 함량은 20-22%, 조사

포닌 함량은 22-24% 이었다.

## 2) 예열

먼저 2배 식초를 반응기에 넣은 후 95 C로 가열 시킨다.

## 3) 교반

미리 준비해둔 인삼엑스분말을 예열된 반응기에 투입하고 임펠러로 잘 혼합한다.

단, 저농도의 유효성분이 함유된 소재를 제조하고자하는 경우에는 인삼엑스분말 1 part당 2배 양조식초 9 part를 혼합한다.

## 4) 반응

인삼엑스분말을 투입하고 5시간 이상 교반하면서 반응을 시킨다.

이때 반응기 온도는 90 -95 C로 유지시킨다.

## 5) 냉각

반응이 끝난 후 반응물을 상온으로 방냉시킨다.

## 6) 여과

Watmann filter paper No.1으로 1차 조여과 후, 0.45 mico-meter membrane filter(nylon)로 2차 정밀 여과를 실시한다. 여과된 반응물의 관능적 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

Table 1. 원료인삼분말 및 ginsam 분말의 사포닌 조성

Saponin	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rf	Rg1	Rg3
원료인삼 분말(%)	2.42	2.59	2.09	2.41	2.94	0.24	1.17	-
Ginsam 분말 (%)	0.00	0.08	0.04	0.30	0.03	0.12	0.00	4.37

## 나. Ginsam 음료의 적정 배합비 결정 시험

감미료(Palatinose, Fibrulose, Fructo-oligosaccharide, Sucralose)는 음료제조 후 적당한 가용성 고형분량과 당도가 되도록 첨가하였고 pH는 저장 및 살균 특성을 고려하여 4.0미만으로 조절하고자 하였다. 먼저 각각의 재료에 대한 특성을 조사하고자 각각의 재료들을 적정비율로 증류수에 녹여 시음한 후 각각의 재료에 대한 관능적 특성(Organoleptic Characteristics)을 10명으로 구성된 평가원 토의(panel discussion) 방식에 의해 기본적인 관능적 특성을 묘사하는 평가를 실시하였다(Table 2). 이 평가를 바탕으로 아래의 예시된 주요 배합비들에 대하여 평가원 토의 방식에 의해 관능평가를 실시한 후 Ginsam 음료에 대한 최적의 적정 배합비를 결정하였다.

Table 2. Ginsam 음료 재료용 주.부재료 배합에 따른 기초적 관능적 특성변화 묘사

원료	함량 (%)	관능적 특성
Ginsam	0.3	침전물량 적음
	0.5	침전물량 중간, 쓴맛 중간
	1.0	침전물량 많음, 쓴맛이 강함
모두 ginsam 특유의 맛과 향이 낮음. 적당한 ginsam의 느낌을 위해 0.5% 내외가 적당한 것으로 사료됨. Brix 0.4 / pH 4.9 / 비중 1.02g/ml, 배합시 기포가 많이 발생함		
Sucralose	0.001	쓴 맛 중화시킴
	0.005	쓴 맛 중화, 인공적 감미의 맛 느껴짐
	0.01	쓴 맛 중화, 인공적 감미의 맛 크게 느껴짐
프락토올리고당	0.5	초중반의 부드러운 단맛 느껴짐
	1.0	초반의 강한 단맛 느껴짐
	1.5	초반 강한 단맛과 끝의 부족한 맛 느껴짐
기본적인 단맛을 만들어 내기 위해 두 시료를 이용. Sucralose는 적은 양으로 인공적인 감미의 맛이 안 느껴지도록, 프락토올리고당은 부드러운 단맛이 나도록 함. Sucralose 0.001%, 프락토올리고당 0.5% 이용		
Palatinose : Fibulose (1:1)	6.0 (3:3)	중반의 단맛이 있지만, 부족한 느낌 있음
	8.0 (4:4)	중반의 부드러운 단맛 느껴짐
	12.0 (6:6)	중반 이후 강한 단맛 느껴짐
각 원료를 1:1비율로 혼합하여 첨가. 12.0% 이상시 단맛이 강하게 났고, 8.0%에서 이질감 없고 부드러운 단맛이 느껴졌다. Brix 7.9 / pH 4.4 / 비중 1.048g/ml		
폴리텍스트로오스	4.0	brix 11.7 / 약간 부족한 맛 느껴짐
	6.0	brix 13.2 / 약간 부족한 맛 느껴짐
	8.0	brix 15.4 / 부족한 맛 없음
폴리텍스트로오스의 함량으로 Brix 값 변화를 나타냄. 처음 예상 brix 13.4 보다 높지만, 부족한 맛은 상대적으로 줄어듬. 폴리텍스트로오스는 첨가하지 않아도 어느정도의 body감이 느껴지므로 첨가하지 않기로 결정함.		
잔탄검	0.05	침전물 소, 액상 점도 중
	0.10	침전물 소, 액상 점도 중상
	0.30	침전물 소, 액상 점도 상, 이질감 느껴짐
잔탄검은 ginsam 원료 자체로 인하여 발생한 침전물을 줄여주기 위해 증점안정제로 사용. brix나 pH에 큰 영향 미치지 않는다. 잔탄검 0.05%		
비타민C	0.02	상대적으로 큰 차이 없음, 부족한 맛 느껴짐
	0.06	상대적으로 상큼한 맛 느껴짐
	0.10	상대적으로 신맛 느껴짐
타우린	0.05	상대적으로 큰 차이 없음
	0.10	약간의 시원한 맛 느껴짐
	0.15	시원한 맛 느껴짐
원료 중 맛에 크게 영향을 미치는 두 원료인 비타민C와 타우린을 넣은 결과, 비타민C는 0.06%, 타우린은 0.15%에서 적당한 맛을 나타내었다. 나머지 원료의 경우 맛에 큰 영향을 미치지 않았다.		
구연산+구연산나트륨 (9:1)	0.03	pH 3.7±0.2 나타냄
	0.05	pH 3.4±0.2 나타냄
	0.10	pH 3.0±0.2 나타냄
제품의 산도를 일정하게 나타내기 위하여 구연산과 구연산나트륨을 혼합하여 이용. 처음 제품 예상 pH를 맞추기 위하여 구연산+구연산나트륨(9:1)을 0.05% 첨가하였다.		

1) 배합비 1

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.50	산 미 료	Citric acid	0.045
감 미 료	Palatinose	4.00		Sodium citrate	0.005
	Fibrulose	4.00	기 타 부 재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	0.50		Manganase sulfate	0.010
	Sucralose	0.001		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.001		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.001	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.001	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.00001	D.W(정제수)	90.57489	
<b>합계</b>				<b>100.00</b>	

배합비 1은 전체적으로 음료의 정상(색, 맛)은 갖추었으나 음료의 질감(Body감)이 떨어지고 인삼의 향이나 단맛, 신맛 등이 부족하였다. 또한 음료의 적절한 body감 형성 및 겨울철 실외 저장 및 운반과정 중의 동파 방지효과 등을 고려해 볼 때 ginsam 음료의 적정 고형분(Brix) 함량은 13-14 brix 이상 이어야만 하나, 배합비 1의 ginsam 음료는 약 10.0 Brix로 고형분 함량을 부족한 것으로 평가되었다. 따라서 ginsam 음료의 고형분 함량을 전체적으로 증가시키기 위하여 ginsam의 함량, 감미료 및 산미료의 함량을 증가시키기로 하였다. 또한 감미료와 산미료를 제외한 부재료들은 한국인의 1일 영양권장량에 근거하여 1일 섭취량에 준하는 양으로 조절하여 보정하였다. 이때 배합비 1의 Brix는 약 10.0이었고 pH는 4.1이었다.

2) 배합비 2

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.75	산 미 료	Citric acid	0.045
감 미 료	Palatinose	6.00		Sodium citrate	0.005
	Fibrulose	6.00	기 타 부 재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.01		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	85.8228	
<b>합계</b>					<b>100.00</b>

배합비 2는 배합비 1에 비하여 전체적으로 음료의 body감이 증가되었고 단맛도 어느정도 보정되었다. 그러나 단맛의 증가로 인해 신맛이 상대적으로 적게 느껴져 신맛의 보정이 필요하였다. 음료제조시 ginsam에 의한 거품형성이 관찰되었고 ginsam의 수용화가 다른 재료에 비해 조금 더딘 현상을 보였다. Ginsam의 비율이 크게 증가되어 쓴맛이 강하게 느껴졌고 쓴맛으로 인하여 단맛과 신맛이 잘 느껴지지 않기도 하였다. 처음의 단맛이 오래 지속되지 못하고 쓴맛이 끝맛으로 강하게 남는 느낌이었다. 따라서 신맛을 보정하여 전체적인 음료의 맛을 변화시켜 보기로 하였다. 이때 배합비 2의 Brix는 약 13.2이었고 pH는 4.0이었다.

### 3) 배합비 3

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.75	산 미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	6.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기 타 부 재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.01		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	85.7928	
<b>합계</b>					<b>100.00</b>

배합비 3은 배합비 2에 비하여 신맛이 전체적으로 상승하여 감미료를 첨가 비율을 배합비 2에 비하여 증가시키지 않았음에도 불구하고 단맛도 상승작용을 나타내어 단맛이 증가한 것 같은 느낌이 들었다. 단맛과 신맛의 상승작용으로 쓴맛은 조금 감소한 것 같지만 음료를 마신 후 남는 땀은 쓴맛은 여전히 강하게 느껴져 음료가 전체적으로 쓰게 느껴졌다. 배합비 3에서 ginsam의 함량을 0.5%로 낮추어 쓴맛을 줄여 보기로 하였고 이때 배합비 3의 Brix는 약 13.2이었고 pH는 3.6이었다.

4) 배합비 4

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.50	산미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	6.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기타 부재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.01		Calcium lactate	0.05
Vitamin C	0.10	Xanthan gum		0.05	
비 타 민 류	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015	Folic acid	0.001	
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	86.0428	
<b>합계</b>					<b>100.00</b>

배합비 4는 배합비 3에 비하여 쓴맛이 많이 감소하였으나 음료가 전체적으로 조금 싱거운 것 같은 반응이었다. 단맛과 신맛은 어느정도 조화를 이루지만 배합비 2에 비해 body감도 약간 떨어지는 것 같은 반응이었다. 지금까지 배합비 중에서 배합비 3이 가장 좋았으며 배합비 3을 base로 하여 복숭아향, 인삼 herb향 및 홍삼향을 각각 첨가하여 관능적 특성 평가에서 보기로 하였다. 이때 배합비 4의 Brix는 약 12.9이었고 pH는 3.6이었다.



5) 배합비 5

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.75	산미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	6.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기타 부재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfat	0.001
	Sucralose	0.01		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	85.7928	
Peach Flavor		(0.05%)	<b>합계</b>		<b>100.00</b>

배합비 5는 배합비 3을 기초로 하여 복숭아 향을 0.05% 첨가하여 평가원 토의를 한 결과, 복숭아향과 ginsam이 혼합되어 쓴맛이 매우 강하다는 반응이었고, 복숭아 향 첨가로 인해 단맛이 줄어든 것 같은 느낌을 주어 부정적으로 평가되었다. 이때 배합비 5의 Brix는 약 13.1이었고 pH는 3.6이었다.

6) 배합비 6

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.75	산 미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	6.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기 타 부 재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.01		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	85.7928	
Ginseng herb flavor		(0.05%)	<b>합계</b>		<b>100.00</b>

배합비 6은 배합비 3을 기초로 하여 인삼허브 향을 0.05% 첨가하여 평가원 토의를 한 결과, 인삼허브 향은 음료의 맛을 어느정도 향상시키는 것으로 평가되었으며 인삼향이 매우 강하게 느껴져 본래의 ginsam맛이 줄어든 것 같은 느낌이 들었다. 평소에 맛보았던 인삼 음료의 향과 비슷한 느낌이 들어서 신선함은 떨어진다는 반응이었다. 단맛과 신맛의 비율은 어느정도 조화를 이루었다. 이때 배합비 6의 Brix는 약 13.1이었고 pH는 3.6이었다.

7) 배합비 7

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.75	산 미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	6.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기 타 부 재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.01		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	85.7928	
Red ginseng flavor		(0.05%)	<b>합계</b>		<b>100.00</b>

배합비 7은 배합비 3을 기초로 하여 홍삼 향을 0.05% 첨가하여 평가원 토의를 한 결과, 홍삼향이 ginsam의 맛과 가장 잘 어울렸으며 ginsam에 함유된 사포닌의 성분(Rg 3)이 인삼보다는 오히려 홍삼의 주요 사포닌 성분과 어울려 제품의 concept를 잘 표현한다는 반응이었다. 홍삼향 자체의 쓴맛으로 ginsam의 쓴맛과 서로 상호보완 되는 기능도 나타낸다는 반응이었다. 지금까지의 여러 배합을 통해 얻은 평가원들의 결과는 ginsam의 쓴맛을 감소시키기 위해 ginsam의 함량을 0.7%로 낮추고 감미료의 함량을 증가시켜 단맛으로 ginsam의 쓴맛을 masking해 보기로 하였다. 이때 배합비 7의 Brix는 약 13.1이었고 pH는 3.6이었다.

8) 배합비 8

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.70	산 미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	10.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기 타 부 재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	2.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.01		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	80.8428	
<b>합계</b>					<b>100.00</b>

배합비 8은 단맛이 많이 증가하였고 반면 신맛이 상대적으로 조금 줄어들었다는 반응이 있었다. 음료가 전체적으로 Body감이 살아나 좋은 흐름성을 보였다. 하지만 여전히 쓴맛이 강하게 남는다는 반응으로 ginsam의 함량은 조금 더 줄여 보기로 하였다. 또한 감미료로 ginsam의 비율에 맞게 조금 줄여 배합해 보기로 하였다. 이때 배합비 8의 Brix는 약 18.6이었고 pH는 3.6이었다.

9) 배합비 9

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.50	산미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	8.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기타 부재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.01		Calcium lactate	0.05
Vitamin C	0.10	Xanthan gum		0.05	
비 타 민 류	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015	Folic acid	0.001	
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	84.0428	
<b>합계</b>					<b>100.00</b>

배합비 9는 단맛이 조금 감소하였고 반면 신맛이 상대적으로 조금 증가한 것 같은 반응을 보였다. 쓴맛은 많이 감소하여 전체적으로 음용하기 좋은 상태가 되었다. 하지만 음료를 마신 후 슈크랄로즈에 의한 합성감미료 맛의 이미가 느껴져 슈크랄로즈의 함량을 줄이고 대신에 palatinose의 함량을 늘려 단맛의 정도를 조정해 보기로 하였다. 이때 배합비 9의 Brix는 약 14.8이었고 pH는 3.51이었다.

10) 배합비 10

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.50	산 미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	12.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기 타 부 재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.008		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	80.0448	
<b>합계</b>					<b>100.00</b>

배합비 10은 감미료의 변화로 단맛은 전체적으로 좋다는 반응이었으나 슈크랄로즈로 인해 끝에 남는 이미가 아직도 남아 있다는 반응이었다. 슈크랄로즈의 끝에 남는 이미지를 제거하기 위해서 스위트 메이트로 사용되고 있는 메틸 헤스페리딘을 슈크랄로즈와 동량, 5배 및 10배를 첨가하여 맛의 변화를 측정하기로 하였다. 이때 배합비 10의 Brix는 약 18.5이었고 pH는 3.51이었다.

11) 배합비 11

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.50	산미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	12.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기타 부재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.008		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	80.0448	
Methyl hesperidin		(0.008~0.08)	<b>합계</b>		<b>100.00</b>

배합비 11은 슈크랄로즈의 이미를 제거하기 위하여 스위트 메이트를 첨가하여 음료의 관능적 특성을 평가한 결과, 스위트 메이트 0.008%의 첨가로도 슈크랄로즈의 이미를 거의 제거 시킬 수 있었다. 혹시 살균중의 스위트 메이트 파괴되거나 감소되는 것을 염려하여 슈크랄로즈의 5배에 해당하는 양(0.04%) 첨가하기로 결정하였으며 배합비 11에 홍삼향을 0.025% 및 0.015%로 각각 첨가하여 관능평가 하기로 하였다. 이때 배합비 11의 Brix는 약 18.5이었고 pH는 3.49이었다.

12) 배합비 12

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.50	산 미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	12.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기 타 부 재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.008		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	80.0448	
Methyl hesperidin		(0.04)			
Red ginseng flavor		(0.015~0.025)	<b>합계</b>		<b>100.00</b>

배합비 12는 배합비 11에 홍삼향을 0.015% 및 0.025%로 각각 첨가하여 관능평가를 실시한 결과, 홍삼향을 0.015% 첨가한 ginsam 음료 보다는 0.025%를 첨가한 ginsam 음료가 전체적으로 음료와 향의 조화가 잘 이루어진다는 반응이었다. 스위트 메이트의 사용으로 슈크랄로즈의 이미도 거의 제거되었고 전체적으로 음료로서 좋은 맛을 나타내었다. 홍삼향의 첨가량의 경우, ginsam 음료를 살균 및 포장 공정에서 가열공정으로 인한 홍삼향의 손실율을 감안하여 0.025%보다 조금 더 많은 양인 0.035% 정도의 홍삼향을 첨가하는 것이 바람직한 것으로 평가되었다. Ginsam 음료 개발에 있어서 평소 인삼의 쓴맛에 어느정도 익숙해져 있는 장년의 소비자 층을 위하여 hard한 타입의 ginsam 음료가 적당할 것으로 사료되며 평소 인삼의 쓴맛을 접해볼 기회가 적은 젊은 연령층에는 soft한 타입의 ginsam 음료가 적당할 것으로 사료되었다. 이때 배합비 12의 Brix는 약 18.7이었고 pH는 3.47이었다.



13) 배합비 13

원료명		(%)	원료명		(%)
Ginsam		0.50	산 미 료	Citric acid	0.072
감 미 료	Palatinose	12.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	6.00	기 타 부 재 료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.008		Calcium lactate	0.05
비 타 민 류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	80.0448	
Methyl hesperidin		(0.04)			
Red ginseng flavor		(0.035)	<b>합계</b>		<b>100.00</b>

배합비 13은 전체적으로 ginsam 음료의 당, 산비 및 flavor가 서로 어우러져 조화를 이루고 ginsam 음료로서 좋은 반응을 나타내었다. 홍삼향의 첨가량은 ginsam 음료를 살균 및 포장 공정에서 가열공정으로 인한 홍삼향의 손실율을 감안하여 0.035%로 결정되었다. 하지만 ginsam 음료가 전체적으로 여전히 쓴맛이 오래 남고 ginsam의 쓴맛으로 인하여 감미료의 첨가량이 비례적으로 많아져 음료로서 좀 걸쭉한 성상을 나타낸다는 의견이 많았다. 이에 본 연구진은 음료의 쓴맛을 줄이고 감미료의 전체적인 비율을 줄여보기로 결정하였다. 이때의 배합비 13의 Brix는 약 18.7이었고 pH는 3.47이었다.

14) 배합비 14

최종적으로 제시하는 Ginsam 음료 배합비 14와 같다.

원료명		(%)	원료명	(%)	
Ginsam		0.40	산미료	Citric acid	0.072
감미료	Palatinose	10.00		Sodium citrate	0.008
	Fibrulose	4.00	기타부재료	Taurine	0.15
	Fructo oligosaccharide	1.00		Manganase sulfate	0.001
	Sucralose	0.008		Calcium lactate	0.05
비타민류	Vitamin C	0.10		Xanthan gum	0.05
	Vitamin B <sub>1</sub>	0.0015		Folic acid	0.001
	Vitamin B <sub>2</sub>	0.0015	Zinc oxide	0.010	
	Vitamin B <sub>6</sub>	0.0020	L-Carnitine	0.0001	
	Vitamin B <sub>12</sub>	0.0001	D.W	84.1098	
Methyl hesperidin		(0.04)			
Red ginseng flavor		(0.035)	<b>합계</b>		
			<b>100.00</b>		

배합비 14는 ginsam 음료의 최종 배합비로서 음료의 기능성 및 인삼 고유의 맛을 결정 짓는 ginsam 분말의 최적 배합비는 0.40%가 적당하였고, 음료의 단맛 및 body감 형성, 물성 등에 영향을 미치는 감미료의 최적 배합비는 palatinose 10.0%, fibrulose 4.0%, sucralose 0.008%, Fructo-oligosaccharide 1.0%가 가장 적당하였다. 또한 음료의 신맛 및 저장성등에 영향을 미치는 산미료의 최적 배합비는 비타민 C 0.10%, 구연산 0.072%, 구연산나트륨 0.008%가 가장 적당하였다. 이때의 홍삼향 첨가량은 0.035%가 적당하였다. 이상의 최적 배합비에 따라 제조한 배합비 14의 ginsam 음료는 홍삼음료와 같은 진한 인삼의 향과 맛을 가지며, 적당한 단맛과 신맛이 어우러져 ginsam 음료로서 가장 좋은 맛을 나타내었으며, 음료의 물성, body감등도 기존의 다른 인삼 음료에 비해 좋은 것으로 나타났다. 기타부재료로 첨가된 L-카르니틴, 산화아연, 젖산칼슘, 황산망간, 타우린 등에 의하여 ginsam 음료가 한단계 upgrade된 부드러운 맛을 갖게 되었으며 소비자에게 건강기능성 음료로서 어필 할 수 있는 기능성 제품으로 평가되었다.

## 다. Ginsam 음료에 사용된 주.부재료들의 당뇨 관련 기능적 특성들

### 1) 팔라티노스(Palatinose)

팔라티노스는 체내 흡수시 느린 혈당상승으로 혈당 및 인슐린 분비의 조절 효과를 가지며 뇌의 유일한 에너지원인 glucose를 지속적으로 뇌로 공급하여 집중력과 기억력을 강화/지속시키는 것으로 알려져 있다. 또한 낮은 GI(Glycemic Index, 44)지수 당으로서 체내 지방축적을 억제하여 비만발생을 감소시키며 구강세균인 *Streptococcus mutans*로부터 이용을 받지 않기 때문에 충치 발생을 억제하는 기능도 가지고 있다. 하지만 팔라티노스는 설탕에 비해 상대적 감미도가 낮은 단점을 가지고 있다<sup>(1-3)</sup>.

### 2) 피브룰로즈(Fibrulose)

치커리에서 추출한 천연의 수용성 식이섬유로서 난소화성이며 혈당량과 혈중 인슐린 수치를 증가시키지 않는 저 GI 식품이다. 피브룰로즈는 다른 식이섬유와 같이 변비개선 효과 및 대장내 비피더스균의 증식에 도움을 주며, 혈중콜레스테롤의 저하, 결장암등에 대한 방어효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>(4)</sup>.

### 3) 비타민 C

비타민 C가 부족하면 당뇨병자에게서 혈관문제로 이어 질 수 있으므로 비타민 C를 섭취하여 당뇨에서 발생할 수 있는 합병증을 느리게 하거나 방지할 수 있는 기능을 가지고 있다<sup>(5-6)</sup>.

### 4) 비타민 B group과 엽산(Folic acid)

당뇨병성 신경장애의 방지에 필요하다<sup>(5)</sup>.

### 5) 타우린(Taurine)

인슐린의 방출을 돕는 능력을 갖는다<sup>(5)</sup>.

### 6) L-카르니틴(L-Carnitine)

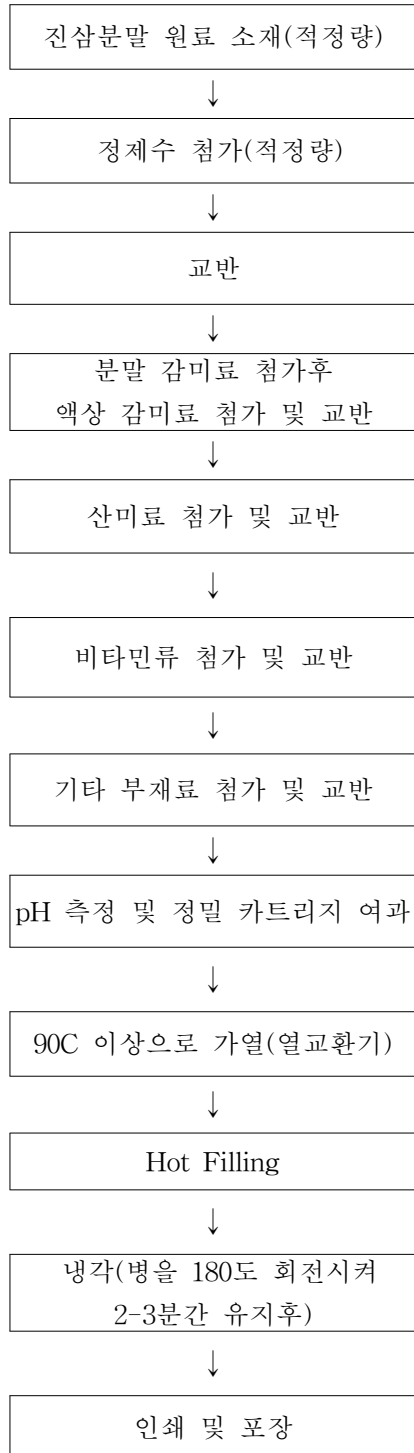
지방을 동원해서 연소시키는 능력을 갖는다<sup>(5)</sup>.

### 7) 황산망간(Manganase sulfate)과 산화아연(Zinc oxide)

체장의 재생에 필요하며 포도당 대사의 중요한 효소의 보조인자이다. 일반적으로 당뇨병자는 망간이 부족하므로 이를 보충해 주어야 한다<sup>(5-6)</sup>.

라. 최적의 배합비에 따른 진삼음료 대량생산 공정도

진삼음료의 대량배합 제조공정도는 아래와 같다.



## Fig.1. 진삼음료 대량배합 제조 공정도

### 마. 진삼음료의 여과 및 살균 처리

0.2  $\mu\text{m}$  카트리지 필터로 정밀여과하여 상등액을 이용하였다. 또한 최종배합비로 제조한 배초향음료의 살균은 95°C에서 15초간 가열후 가열된 상태에서 병에 충전시켰다. 최종배합비로 제조한 진삼음료의 pH가 3.5내외의 산성 상태이므로 위와 같은 가열조건으로 hot filling하여도 음료내에 함유되어 있던 영양세포는 모두 사멸되고 저장중 포자형태의 미생물로 인한 품질 변화는 발생하지 않을 것으로 판단된다. 포자형성균까지 멸균시키기 위해서 더 높은 온도에서 오랜시간 동안 열처리를 하면 갈변이나 탄맛, 생리활성의 저하 등 음료제품의 품질이 매우 열화되므로 비효율적인 것으로 평가되었다.

### 바. 진삼음료의 저장성 시험

제조된 드링크 타입의 진삼음료는 25°C에 180일간 저장하면서 20일 간격으로 시료를 채취하여 미생물, 색도, pH, 산도, 관능적 변화 등의 5가지 항목을 계속 조사하였고 결과는 Table 3과 같다.

#### 1) 미생물

25°C에 저장중인 진삼음료를 10~10<sup>3</sup>배로 희석하고 이를 시료로 하여 미생물중 대장균, 대장균군, 호기성 세균, 효모, 곰팡이에 대해서 각각의 petrifilm(Microbiology Products 3M Health Care, Petrifilm™)에 접종하여 2~3일간 37°C incubator에서 배양후 미생물의 여부 및 총 생균수를 조사하였다.

#### 2) 색도

25°C에서 저장중인 진삼음료에 대하여 색차계(Color difference meter, color QuestII HunterLab, USA)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 측정하고 색의 변화를 조사하였다. 이때 사용된 표준백색판의 명도, 적색도, 황색도는 각각 92.68, 0.81, 0.86이었다.

#### 3) pH 및 적정산도

pH meter(pH/ION Meter DP-880, 동우메디칼 시스템(주))로 25°C에서 저장중인 음료의 pH를 각각 측정하고 적정산도는 시료 25 mL을 취하여 0.1N NaOH로 pH가 8.4가 될 때까지

지 적정하여 소비량을 citric acid(mg)로 환산하였다.

$$\text{적정산도(\%)} = \frac{0.1\text{N NaOH소비량(mL)} \times \text{factor} \times 6.4(\text{mg})}{\text{시료채취량(mL)}} \times 100$$

#### 4) 관능 검사

혼련된 관능요원들을 대상으로 저장중 음료에 대해 이미, 이취 등의 변화를 비교 평가하였다.

Table 3. 25℃ 저장중 진삼음료의 이화학적 특성변화

검사항목	저장기간(일)									
	20	40	60	80	100	120	140	160	180	
대장균	- <sup>1)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
대장균군	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
미생물 (CFU/ml)	호기성	-	-	-	-	-	-	-	-	
	세균	-	-	-	-	-	-	-	-	
	곰팡이	-	-	-	-	-	-	-	-	
	효모	-	-	-	-	-	-	-	-	
색도	L	50.25	43.92	43.18	42.15	42.13	41.39	40.53	39.80	39.17
	a	15.74	15.78	16.05	15.29	14.80	14.35	13.57	13.30	12.16
	b	30.02	26.54	26.03	26.70	26.25	25.90	24.70	23.85	22.62
pH	3.49	3.51	3.53	3.51	3.53	3.52	3.54	3.53	3.54	
산도(%)	0.215	0.217	0.275	0.220	0.215	0.220	0.230	0.215	0.215	
관능적 특성	* <sup>2)</sup>	*	*	*	*	*	*	*	*	

1) not detected

2) 변화없음

따라서 위의 대량 제조공정도에 따라 제조된 진삼음료는 25C에서 6개월간 저장하여도 미생

물학적, 화학적, 관능적 특성의 변화가 거의 없는 안전하고, 안정된 음료로 판단되었다.

#### 아. 참고문헌

- 1) Arai H, Mizuno A, Matsuo K, Fukaya M, Sasaki H, Arima H, Matsuura M, Taketani Y, Doi T, Takeda E., Effect of a novel palatinose-based liquid balanced formula (MHN-01) on glucose and lipid metabolism in male Sprague-Dawley rats after short- and long-term ingestion. *Metabolism*. 53: 977-983 (2004).
- 2) Kawai K, Okuda Y, Yamashita K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. *Endocrinol Jpn*. 32: 933-936 (1985).
- 3) Baek NJ, Kang JK, Kim JH, Kim DH, Chun YJ, Kim JH., In Vitro Mutagenicity Tests on Palatinose and Palatinose Syrup. *Korean J. Food Sci. Tech*. 29: 800-803 (1997)
- 4) Perrin S, Fougnyes C, Grill JP, Jacobs H, Schneider F., Fermentation of chicory fructo-oligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerization by three strains of bifidobacteria. *Can J Microbiol*. 48: 759-763 (2002).
- 5) 광재욱, 민경희저. 자연요법 원리와 영양치료 처방집. 언두출판사 2004년
- 6) 광재욱저. 질환별 영양치료학. 도서출판 신일상사. 2005년



## 제 9 절 원료표준화 및 고형제 건강기능식품 제형개발

### 1. 원료추출 및 제조법 연구

#### 가. 추출 및 제조법 연구

예비실험을 통해 확인해 보았던 홍삼의 특이성분을 강화시키기 위한 최적의 추출조건인 제조법(2배 양조식초를 이용하여 90℃에서 4~5시간 추출)을 검증하고 여러 인삼류에서의 홍삼특이성분 함량 추이를 확인해 보았다.

#### 1) 식초 종류와 유기산별 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량변화

Table 1에서 보는바와 같이 백삼에 감식초 처리 때보다 양조식초 처리의 경우가 ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 함량이 2.763%로 가장 높았고, 유기산의 경우는 수율이 극히 낮았다.

Table 1. The composition of ginsenoside in the white ginseng extracts processed with various brewing vinegars and organic acids

Samples	Ginsenosides (%)								
	Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rf	Rg <sub>1</sub>	Rh <sub>1</sub>	Rg <sub>3</sub>
VG2-1 <sup>1)</sup>	0.360±0.124 b	0.327±0.085 b	0.283±0.042 b	0.743±0.058 b	0.027±0.007 b	0.137±0.009	0.077±0.003	0.840±0.105	2.763±0.173 <sup>b</sup>
VG2-2 <sup>2)</sup>	0.640±0.093 c	0.553±0.103 c	0.510±0.096 c	0.960±0.080 c	0.127±0.049 b	0.127±0.019 c	0.097±0.024	0.830±0.181	2.363±0.100 <sup>a</sup>
VG3-1 <sup>3)</sup>	1.850±0.196	1.887±0.207	1.603±0.154	1.670±0.078	1.870±0.139	0.180±0.021	0.570±0.135	0.550±0.025	0.280±0.031
VG3-2 <sup>4)</sup>	0±0 <sup>e</sup>	0±0 <sup>e</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0±0 <sup>b</sup>	0.070±0.006 b	0±0 <sup>e</sup>	0.057±0.003	0.207±0.012 b	0.333±0.134

<sup>1)</sup>VG2-1: white ginseng extract processed with brewing vinegar.

<sup>2)</sup>VG2-2: white ginseng extract processed with persimmon vinegar.

<sup>3)</sup>VG3-1: white ginseng extract processed with citric acid solution.

<sup>4)</sup>VG3-2: white ginseng extract processed with glacial acetic acid.

Values represent the mean±S.E. (n=3)

<sup>a</sup> P <0.001 vs. VG3-1, <sup>b</sup> P <0.01 vs. VG3-1, <sup>c</sup> P <0.05 vs. VG3-1.

## 2) 식초 종류 및 처리 시간별 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량변화

Table 2에서 보듯이와 같이 반응결과 2배식초 이용시 양조식초 및 감식초 이용시보다 높은 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량을 갖는 인삼제제를 얻을 수 있었음. 또한 결과에서 ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 함량이 9시간 까지 계속 늘어나고 있음을 알 수 있다.

**Table 2. The composition of ginsenoside in the white ginseng extracts processed with various brewing vinegars as time passes**

Ginsenosides	GRA <sup>1)</sup>	Twice brewing vinegar			Brewing vinegar			Persimmon vinegar		
		3 h (VG5-1)	6 h (VG5-2)	9 h (VG5-3)	3 h (VG6-1)	6 h (VG6-2)	9 h (VG6-3)	3 h (VG7-1)	6 h (VG7-2)	9 h (VG7-3)
Rb <sub>1</sub> (%)	2.257±0.03	0.980±0.98 <sup>a</sup>	0.455±0.005 <sup>a</sup>	0.200±0.01 <sup>a</sup>	1.550±0.03 <sup>a</sup>	1.100±0.02 <sup>a</sup>	0.825±0.015 <sup>a</sup>	1.690±0.01 <sup>a</sup>	1.475±0.005 <sup>a</sup>	0.710±0.53 <sup>c</sup>
Rb <sub>2</sub> (%)	2.547±0.02	1.010±0.005 <sup>a</sup>	0.465±0.005 <sup>a</sup>	0.200±0.01 <sup>a</sup>	1.610±0 <sup>a</sup>	1.310±0.16 <sup>b</sup>	0.860±0.02 <sup>a</sup>	1.790±0.06 <sup>a</sup>	1.525±0.005 <sup>a</sup>	1.280±0.04 <sup>a</sup>
Rc(%)	2.073±0.02	0.690±0.01 <sup>a</sup>	0.335±0.025 <sup>a</sup>	0.275±0.005 <sup>a</sup>	1.090±0.005 <sup>a</sup>	0.805±0.025 <sup>b</sup>	0.630±0.02 <sup>a</sup>	1.180±0.01 <sup>a</sup>	1.065±0.005 <sup>a</sup>	0.890±0 <sup>a</sup>
Rd(%)	1.960±0.03	1.310±0.03 <sup>a</sup>	0.900±0.02 <sup>a</sup>	0.420±0.02 <sup>a</sup>	1.690±0.01 <sup>b</sup>	1.360±0.13 <sup>b</sup>	1.305±0.095 <sup>b</sup>	1.760±0.025 <sup>c</sup>	1.695±0.015 <sup>b</sup>	1.540±0.05 <sup>b</sup>
Re(%)	2.920±0.07	0.560±0.02 <sup>a</sup>	0.130±0 <sup>a</sup>	0.050±0 <sup>a</sup>	1.290±0.01	0.600±0.01 <sup>b</sup>	0.270±0.02 <sup>a</sup>	1.970±0.045 <sup>b</sup>	0.605±0.505 <sup>b</sup>	0.550±0.01 <sup>a</sup>
Rf(%)	0.237±0.03	0.210±0.005	0.140±0.01	0.125±0.005 <sup>c</sup>	0.190±0.01	0.165±0.005	0.160±0.01	0.190±0.005	0.180±0	0.170±0.01
Rg <sub>1</sub> (%)	1.227±0.06	0.220±0.01 <sup>a</sup>	0.035±0.035 <sup>a</sup>	0.015±0.015 <sup>a</sup>	0.510±0.01 <sup>b</sup>	0.130±0.01 <sup>a</sup>	0.065±0.015 <sup>a</sup>	0.700±0.025 <sup>b</sup>	0.380±0.02 <sup>b</sup>	0.260±0.02 <sup>a</sup>
Rh(%)	0.203±0.01	1.150±0.02 <sup>a</sup>	1.120±0.03 <sup>a</sup>	1.105±0.075 <sup>a</sup>	1.070±0.01 <sup>a</sup>	1.255±0.025 <sup>a</sup>	1.315±0.085 <sup>a</sup>	0.860±0.02 <sup>a</sup>	1.105±0.005 <sup>b</sup>	1.180±0.03 <sup>a</sup>
Rg <sub>3</sub> (%)	0.200±0.03	2.230±0.02 <sup>a</sup>	3.405±0.025 <sup>a</sup>	3.745±0.015 <sup>a</sup>	1.280±0.025 <sup>a</sup>	2.090±0.01 <sup>a</sup>	2.615±0.095 <sup>a</sup>	0.840±0.025 <sup>a</sup>	1.350±0 <sup>a</sup>	1.685±0.005 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>GRA: white ginseng extract. <sup>a</sup> <sup>b</sup> <sup>c</sup>

Values represent the mean±S.E. (n=3)

<sup>a</sup> P <0.001 vs. GRA, <sup>b</sup> P <0.01 vs. GRA, <sup>c</sup> P <0.05 vs. GRA.

## 3) 2배 식초의 처리 시간별 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량

Table 3에서 보는 바와 같이 시간에 따른 ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 생성도 변화를 관찰하기위해 인삼엑스와 2배식초를 반응시켜 12시간까지의 결과를 검토한 결과, 4-5시간 이후 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량은 4%이상을 유지하며 큰 변화가 없음을 알 수 있었다.

**Table 3. The ginsenoside composition of the white ginseng extracts processed**

with twice brewing vinegar as time passes

Ginsenosides	GRA <sup>1)</sup>	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h
		(VG8-1)	(VG8-2)	(VG8-3)	(VG8-4)	(VG8-5)	(VG8-6)	(VG8-7)	(VG8-8)	(VG8-9)	(VG8-10)
Rb <sub>1</sub> (%)	2.257±0.03	0.670±0.104 <sub>b</sub>	0.457±0.087 <sub>b</sub>	0.277±0.062 <sup>b</sup>	0.187±0.047 <sup>a</sup>	0.097±0.048 <sup>a</sup>	0.073±0.023 <sub>a</sub>	0.050±0.02 <sup>a</sup>	0.023±0.009 <sup>a</sup>	0.023±0.009 <sup>a</sup>	0.023±0.009 <sup>a</sup>
Rb <sub>2</sub> (%)	2.547±0.02	0.723±0.098 <sub>b</sub>	0.503±0.079 <sub>b</sub>	0.313±0.064 <sup>a</sup>	0.217±0.043 <sup>a</sup>	0.120±0.047	0.097±0.022 <sub>a</sub>	0.070±0.02 <sup>a</sup>	0.047±0.012 <sup>a</sup>	0.047±0.012 <sup>a</sup>	0.040±0.01 <sup>a</sup>
Rc(%)	2.073±0.02	0.857±0.078 <sub>b</sub>	0.703±0.06 <sup>cb</sup>	0.557±0.032 <sup>a</sup>	0.493±0.023 <sup>a</sup>	0.423±0.034 <sup>a</sup>	0.420±0.015 <sub>a</sub>	0.387±0.007 <sub>a</sub>	0.377±0.013 <sup>a</sup>	0.353±0.007 <sup>a</sup>	0.350±0.015 <sup>a</sup>
Rd(%)	1.960±0.03	1.040±0.107 <sup>c</sup>	0.843±0.094 <sub>b</sub>	0.627±0.073 <sup>b</sup>	0.507±0.071 <sup>b</sup>	0.343±0.103 <sup>b</sup>	0.320±0.06 <sup>cb</sup>	0.247±0.057 <sub>a</sub>	0.173±0.028 <sup>a</sup>	0.163±0.044 <sup>b</sup>	0.140±0.05 <sup>a</sup>
Re(%)	2.920±0.07	0.417±0.114 <sub>b</sub>	0.227±0.057 <sub>b</sub>	0.123±0.028 <sup>a</sup>	0.100±0.01 <sup>a</sup>	0.070±0.012 <sup>a</sup>	0.080±0.006 <sub>a</sub>	0.073±0.003 <sub>a</sub>	0.067±0.003 <sup>a</sup>	0.070±0.001 <sup>a</sup>	0.063±0.009 <sup>a</sup>
Rf(%)	0.237±0.03	0.267±0.102	0.160±0.006	0.147±0.003	0.133±0.007	0.120±0.01	0.128±0.003	0.113±0.003	0.103±0.003 <sup>c</sup>	0.107±0.009	0.103±0.009
Rg <sub>1</sub> (%)	1.227±0.06	0.090±0.015 <sub>b</sub>	0.050±0.01 <sup>b</sup>	0.033±0.003 <sup>b</sup>	0.030±0 <sup>b</sup>	0.027±0.003 <sup>b</sup>	0.030±0 <sup>b</sup>	0.030±0 <sup>b</sup>	0.030±0 <sup>b</sup>	0.030±0 <sup>b</sup>	0.030±0 <sup>b</sup>
Rh <sub>1</sub> (%)	0.203±0.01	1.440±0.067 <sub>b</sub>	1.273±0.11 <sup>c</sup>	1.347±0.028 <sup>a</sup>	1.293±0.047 <sup>b</sup>	1.113±0.007 <sup>a</sup>	1.197±0.041 <sub>b</sub>	1.060±0.035 <sub>a</sub>	0.990±0.068 <sup>c</sup>	1.077±0.052 <sup>b</sup>	0.947±0.042 <sup>a</sup>
Rg <sub>3</sub> (%)	0.200±0.03	3.627±0.185 <sub>b</sub>	4.157±0.148 <sub>a</sub>	4.173±0.127 <sup>a</sup>	4.303±0.182 <sup>a</sup>	4.403±0.139 <sup>a</sup>	4.49±0.035 <sup>a</sup>	4.447±0.099 <sub>a</sub>	4.303±0.058 <sup>a</sup>	4.533±0.109 <sup>a</sup>	4.44±0.064

<sup>1)</sup>GRA: white ginseng extract.

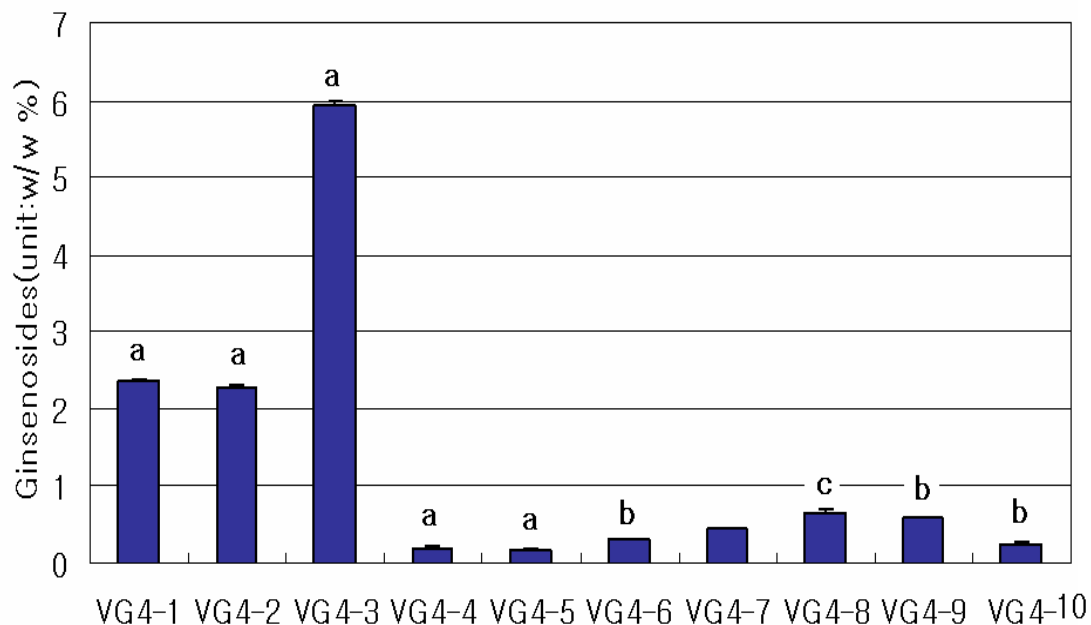
Values represent the mean±S.E. (n=3)

<sup>a</sup> P <0.001 vs. GRA, <sup>b</sup> P <0.01 vs. GRA, <sup>c</sup> P <0.05 vs. GRA.

4) 식초 및 유기산의 처리 온도별 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량

Fig. 1에서 보는바와 같이 처리 온도별 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량을 검토한 결과, 양조식초로 90℃에서 처리한 체제가 가장 높은 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량을 나타냈다.

Fig. 1. The ginsenoside Rg<sub>3</sub> content of the white ginseng extracts processed with various brewing vinegars and organic acids by the temperatures

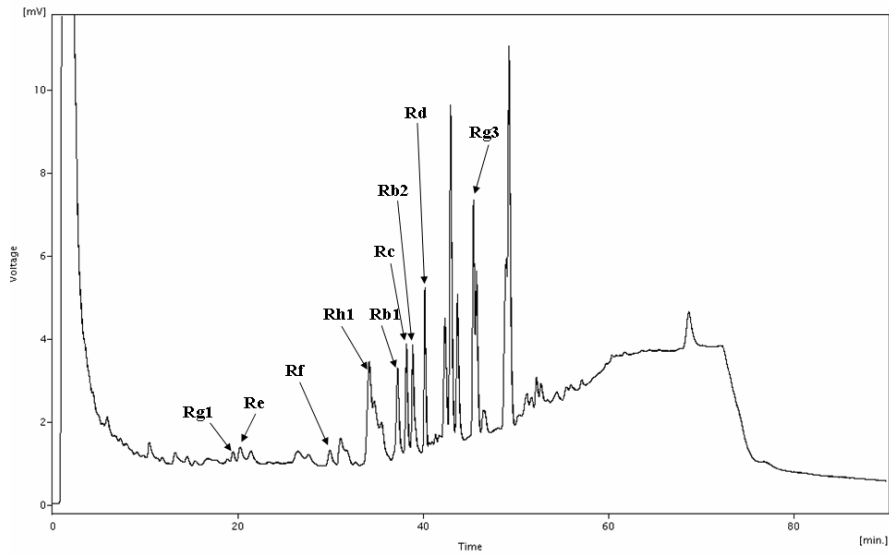


VG4-1: persimmon vinegar at 90°C, VG4-2: persimmon vinegar at 120°C, VG4-3: brewing vinegar at 90°C, VG4-4: persimmon vinegar at 60°C, VG4-5: citric acid solution at 60°C, VG4-6: glacial acetic acid at 60°C, VG4-7: citric acid solution at 90°C, VG4-8: glacial acetic acid at 90°C, VG4-9: citric acid solution at 120°C, VG4-10: glacial acetic acid at 120°C.

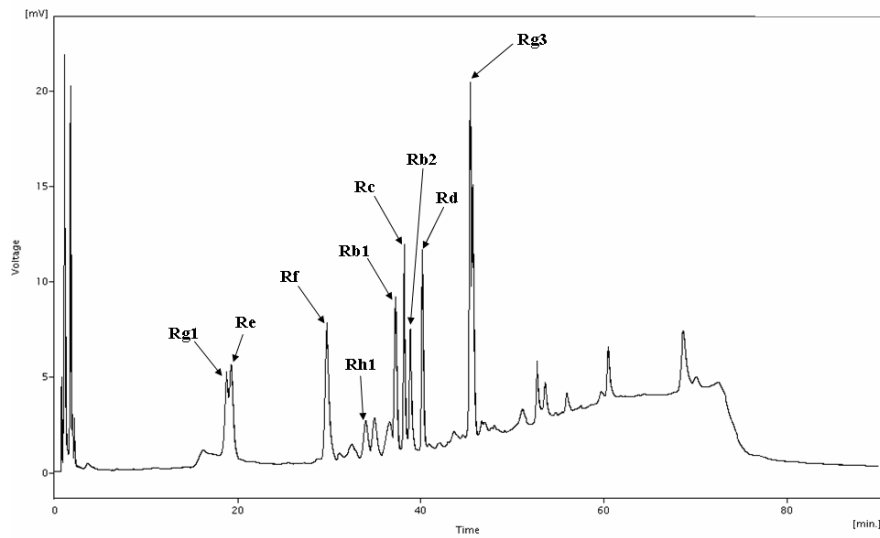
Values represent the mean±S.E. (n=3)

<sup>a</sup> P <0.001 vs. VG4-7, <sup>b</sup> P <0.01 vs. VG4-7, <sup>c</sup> P <0.05 vs. VG4-7.

**Fig.2. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the vinegar processed ginseng, VG8-3 and compared with chromatogram of the ginsenoside standards.**



[VR8-3]



[Standard]

5) 산도에 따른 Rg3 함량변화

인삼 10g에 pH 1.0 용액(0.1N-염산), 2배 사과식초, pH 4.5 용액( $5 \times 10^{-5}$ N-염산)을 각기

100ml 가하여 90℃에서 5시간 추출한 후 추출물을 건고하고 메탄올 100ml 로 3회 수욕상에서 추출한 후 물에 현탁시키고 에테르 100ml 씩 3회 추출하였다. 에테르 층을 제거한 후 남은 수층을 부탄올 100ml 로 3회 추출한 다음 부탄올 분획을 농축시켜 얻은 사포닌 분획 추출물을 HPLC로 분석하였다.

Table 4. 인삼 1g 중의 각 진세노사이드 함량 (mg)

	pH 1.0 (0.1N-염산)	pH 2.3 (2배 사과식초)	pH 4.5 (0.00005N-염산)
ginsenoside Rg1	0.000	0.006	1.634
ginsenoside Re	0.000	0.036	0.964
ginsenoside Rf	0.000	0.166	0.502
ginsenoside Rb1	0.000	0.020	2.152
ginsenoside Rc	0.000	0.118	1.684
ginsenoside Rb2	0.000	0.012	0.852
ginsenoside Rd	0.000	0.022	0.242
ginsenoside Rh1	0.092	0.442	0.238
ginsenoside Rg3	0.464	2.312	0.642
홍삼특이성분 합량	0.556	2.754	0.880

위 표에서 알 수 있듯이 예비실험에서의 결과와 같이 pH 2.3을 나타내는 2배 사과식초에서 홍삼특이성분의 함량이 2.754mg으로 가장 높은 결과를 나타냈으며 특히 Rg3의 함량은 2배 사과식초에서 2.312mg으로 pH 1.0 용액의 0.464mg 보다 약 5배, pH 4.5 용액의 0.642mg 보다 약 3.5배 높은 함량을 나타냈다. 이는 pH가 너무 낮을 경우에는 홍삼특이성분이 생성됨과 동시에 분해가 예상되며, pH가 높을 경우에는 홍삼특이성분의 생성이 충분히 일어나지 못함을 알 수 있다. 따라서 2배 식초를 이용하는 것이 가장 최적의 제조법이라고 판단된다.

**6) 원료 중 ginsenoside 함량 별 Rg3 함량 비교자료** 각 인삼엑스 원료(ginsenoside를 7%, 15%, 30% 함유하고 있는 인삼엑스와 인삼엽엑스) 100g씩 2배식초 400ml에 투입하고 90℃에서 5시간 추출한 후 추출물(2배식초 엑스, 이하 진삼엑스)을 HPLC로 분석하였다.

Table 5. 각 진세노사이드 함량 (%)

엑스의 종류		인삼 엑스	진삼 엑스	인삼 엑스	진삼 엑스	인삼 엑스	진삼 엑스	인삼엽 엑스	진삼 엑스
규격	HPLC 함량 (ginsenoside )	7%		15%		30%		40%	
	g1	1.25	0.00	1.31	0.01	6.16	0.31	6.93	0.05
	e	2.57	0.00	3.15	0.03	12.86	0.43	11.33	0.31
	f	0.06	0.05	0.22	0.15	0.10	0.06	0.06	0.04
	<b>triol 합</b>	<b>3.87</b>	<b>0.05</b>	<b>4.97</b>	<b>0.19</b>	<b>19.13</b>	<b>0.80</b>	<b>18.32</b>	<b>0.40</b>
	b1	0.72	0.03	2.47	0.05	1.25	0.28	3.32	0.06
	b2	0.89	0.02	1.79	0.05	2.95	0.95	4.78	1.32
	c	0.76	0.10	2.25	0.58	2.10	0.60	3.35	0.80
	d	1.19	0.15	2.13	0.27	6.09	2.99	7.02	3.88
	<b>diol 합</b>	<b>3.57</b>	<b>0.30</b>	<b>8.64</b>	<b>0.95</b>	<b>12.39</b>	<b>4.82</b>	<b>18.47</b>	<b>6.06</b>
	<b>g3</b>	<b>0.27</b>	<b>1.92</b>	<b>0.79</b>	<b>3.91</b>	<b>0.69</b>	<b>6.79</b>	<b>0.71</b>	<b>11.05</b>
	<b>총 합량</b>	<b>7.71</b>	<b>2.28</b>	<b>14.41</b>	<b>5.04</b>	<b>32.21</b>	<b>11.61</b>	<b>37.50</b>	<b>17.51</b>

Table 5에서 볼 수 있듯이 ginsenoside Rg3의 함량은 ginsenoside 함량이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였으며 특히 인삼엽엑스를 이용한 진삼엑스에서는 ginsenoside Rg3의 함량이 11.05% 까지 증가함을 알 수 있다. 따라서 본 실험을 통하여 모든 인삼류에서 홍삼특이성분의 함량을 극대화 할 수 있는 제조법을 확립하였다.

#### 나. 표준 제조 공정

다양한 제조법 연구를 통해 다음과 같은 표준제조공정을 확정하였다.

##### 1) 칭량

인삼엑스 및 2배 식초를 칭량한다. (질량비 1 : 4)

##### 2) 가온

식초를 반응기에 넣은 후 90도씨 이상으로 가온 (90~95도씨 유지)

##### 3) 투입

칭량한 인삼엑스를 반응기에 투입

##### 4) 반응

인삼엑스를 투입한 후 4~5시간이상 교반하면서 가열

##### 5) 냉각

상온으로 냉각

##### 6) 건조

분무건조기를 이용하여 건조

건조 방법은 식초와 혼합된 상태의 인삼엑스에 대한 안정성 확보를 위해 감압건조기가 아닌 분무건조기와 동결건조기를 검토하였으나 최종 제품의 수분함량, 경제성 및 제조단위 등의 문제를 고려하여 분무건조기로 결정하였다. 합습이 쉬운 인삼엑스의 특성상 수분제거가 보다 용이한 노즐타입의 분무건조기를 이용하였으며 최적의 건조상태를 나타낼 수 있는 inlet, outlet 온도조건을 확정하였으며, 주입속도는 1.5L/h로 운전하여 시간당 평균 350g 의 엑스를 제조할 수 있었다.

## 2. 제제화 연구

### 가. 기초물성연구

주성분과 부형제와의 상호작용을 연구하기 위하여 진삼엑스와 적당한 부형제를 적절한 비율로 섞어 건조상태의 분말과 5% 가수한 상태의 분말을 4주 동안 온도 25℃와 40℃에서 각각 보관하여 시험개시 때와 2주, 4주 경과 후에 성상과 주성분의 함량 변화여부를 시험하였다.

No	성분명	혼합비율	함량 (Initial 함량 100% 대비)							
			실온(25℃, 60%RH)				가속(40℃, 75%RH)			
			dry		5% of water		dry		5% of water	
			2주	4주	2주	4주	2주	4주	2주	4주
0	진삼엑스	-	99.8	99.5	97.5	97.0	100.2	100.3	101.7	101.2
1	유당	1:1	100.7	100.5	100.5	100.3	100.1	100.5	99.8	99.5
2	미결정셀룰로오스	1:1	97.4	98.2	99.5	99.2	99.7	99.1	99.0	98.5
3	콜로이드성이산화규소	10:1	99.5	99.4	99.3	99.4	99.1	98.5	98.2	98.8
4	스테아린산마그네슘	10:1	101.8	100.5	100.0	99.3	100.2	100.0	100.3	100.5
5	글리세릴베헤네이트	10:1	99.7	99.5	99.4	98.5	98.0	99.2	99.5	99.2
6	히드록시프로필메칠셀룰로오스	1:1	98.7	98.7	99.4	99.1	99.5	98.7	99.3	99.7
7	전분글리콜산나트륨	1:1	98.9	98.5	99.2	99.5	100.2	99.5	98.7	99.2
8	크로스카멜로스나트륨	1:1	100.5	99.5	99.1	99.0	99.0	99.0	98.5	99.1
9	옥수수전분	1:1	101.3	99.9	100.3	99.4	99.1	98.7	98.7	98.5

모든 시료에서 함량의 변화는 없었으나 성상면에서 5% 가수한 크로스카멜로스나트륨 및 옥수수전분을 넣은 샘플에서 시료가 단단히 굳는 현상이 발생하였다. 이에 분석시 시료를 분쇄하여 재혼합 후 채취하는 과정을 거쳐서 분석하였다. 또한 HPLC 분석 시 히드록시프로필메칠셀룰로오스를 넣은 샘플은 전처리 용매인 30% acetonitrile 넣었을 때 용액과 혼합이 되지 않는 막이 형성되어 다른 샘플 보다 초음파 추출을 통상 30분보다 긴 1시간을 해야 했



다. 전체적으로는 모든 시료에 대해서 Incompatibility는 보이지 않으므로 부형제로 선택하여도 무방하다고 사료된다.

#### 나. 제제설계 및 평가

정제, 경질캡슐제, 연질캡슐제 로의 제형화를 위하여 preformulation 및 제제설계 및 평가 실험 등을 실시하였다.

#### 1) 실험결과

##### 가) Tablets

##### (1) 원료약품 분량

원료명		1정 중 함유량 (mg)					
		실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4	실시예 5	실시예 6
주성 분	진삼엑스	250.0	250.0	250.0	250.0	250.0	250.0
부형 제	microcrystalline cellulose	Avicel PH102	120.0			100.0	25.0
		Vivapur 12		42.1	42.1		
부형 제	lactose	Lactose powder				50.0	50.0
		Spherolac 100	59.75	130.0	130.0		
부형 제	corn starch				70.75	25.0	
붕해 제	sodium starch glycolate	13.5		22.5	22.5		
	crosspovidone					20.0	20.0
	croscarmellose sodium		22.5				
활택 제	colloidal silicon dioxide	2.25	0.9	0.9	2.25	1.5	1.5
	magnesium stearate	4.5	4.5	4.5	4.5	3.5	3.5
나정 총 중량 (mg)		450.0	450.0	450.0	450.0	350.0	350.0
제조방법		직타법	직타법	직타법	습식과 립	습식과 립	습식과 립

##### (2) 과립물성 검토

시험항목		실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4	실시예 5	실시예 6
비용적(g/mL)	bulk density	0.33	0.55	0.55	0.56	0.48	0.44
	tapped density	0.46	0.72	0.73	0.71	0.62	0.56
압축도 (%)		20.3	23.6	24.7	21.1	22.6	21.4
안식각		40.8	42.1	41.4	36.6	38.4	37.1
수분함량 (Karl Fisher, %)		2.41	2.58	2.61	2.15	2.23	2.38
입도분포 (%)	14 mesh	0.68	0.00	0.00	0.20	0.20	0.00
	20 mesh	0.49	0.00	0.00	0.20	1.78	0.57
	35 mesh	0.49	0.21	0.20	26.39	9.50	2.66
	50 mesh	1.07	0.39	0.40	17.26	4.75	5.69
	80 mesh	6.91	17.92	17.73	18.06	30.89	41.94
	100 mesh	11.20	17.01	16.73	2.78	16.83	20.11
	140 mesh	14.31	20.41	20.12	13.10	15.25	13.85
	200 mesh	14.90	18.07	18.33	9.33	12.67	10.63
pan		49.95	25.99	26.49	12.70	8.12	4.55

※ 실시예 1의 경우 비용적이 너무 작아 타정 시험은 제외함.

### (3) 정제물성 검토

시험항목	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4	실시예 5	실시예 6
두께 (mm)	-	4.8	4.8	4.9	4.1	4.1
직경 (mm)	-	10.6	10.6	10.9	10.6	10.6
평균중량(mg) ± 표준편차	-	452.9±4.21	453.1±3.38	452.8±6.22	352.8±8.19	352.5±5.46
경도 (kp)	-	9.5	9.3	7.3	8.0	9.9
마손도 (%)	-	0.1	0.1	0.2	0.15	0.1
붕해 (분)	-	10	11	15	7	9
비고	-	타정성 양호	타정성 양호	타정성 양호	타정성 양호	타정성 양호

각 실시예 검토 결과 실시예 2의 경우 경도, 마손도, 붕해등의 시험결과가 우수하고 제조공정이 간단하여 정제 검토시 가장 적합한 처방으로 사료된다.

### 가) 경질캡슐제

#### (1) 원료약품 분량

원료명		1 capsule 중 함유량 (mg)		
		실시예 1	실시예 2	실시예 3
주성분	진삼엑스	250.0	250.0	250.0
부형제	microcrystallinecellulose	50.0		25.0
부형제	lactose	Lactose powder	50.0	50.0
		Spherolac 100	25.0	
부형제	corn starch		25.0	
붕해제	sodium starch glycolate	20.0		
	croscopovidone		20.0	20.0
	croscarmellose sodium			
활택제	colloidal silicon dioxide	1.5	1.5	1.5
	magnesium stearate	3.5	3.5	3.5
capsule 내용물 총 중량 (mg)		350.0	350.0	350.0
제조방법		혼합	습식과립	습식과립

## (2) 물성 검토

시험항목		실시예 1	실시예 2	실시예 3
비용적(g/mL)	bulk density	0.37	0.48	0.44
	tapped density	0.48	0.62	0.56
압축도 (%)		22.9	22.6	21.4
안식각		42.0	38.4	37.1
수분함량 (Karl Fisher, %)		2.19	2.23	2.38
입도분포 (%)	14 mesh	0.11	0.20	0.00
	20 mesh	0.15	1.78	0.57
	35 mesh	0.51	9.50	2.66
	50 mesh	1.21	4.75	5.69
	80 mesh	5.89	30.89	41.94
	100 mesh	9.74	16.83	20.11
	140 mesh	12.38	15.25	13.85
	200 mesh	15.42	12.67	10.63
pan		54.59	8.12	4.55

※ 실시예 1의 경우 비용적이 너무 작아 캡슐제 물성검토시험에서는 제외함.

## (3) 캡슐제 물성 검토

시험항목	실시예 1	실시예 2	실시예 3
공캡슐 (호)	-	0 호	0 호
평균중량(내용물, mg) ± 표준편차	-	350.9±5.98	351.6±5.79
붕해 (분)	-	5	5
비고	-	충전성 양호	충전성 양호

각 실시예 검토 결과 실시예 2, 3 모두 평균중량, 충전성 및 봉해 시험결과가 우수하여 경질 캡슐 검토시 가장 적합한 처방으로 사료된다.

#### 나) 연질캡슐제

원료명		1 capsule 중 함유량 (mg)			
		실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4
주성분	진삼엑스	250.0	250.0	250.0	250.0
부형제	콩기름	492.3	470.3	426.3	382.3
현탁화제	레시틴	13.7	13.7	13.7	13.7
점도조절제	황납	11.0	16.5	27.5	38.5
점도조절제	경화유(야자)	33.0	49.5	82.5	115.5
캡슐기제	호박산젤라틴	262.0	262.0	262.0	262.0
캡슐기제	디-소르비톨액	35.0	35.0	35.0	35.0
캡슐기제	농글리세린	81.0	81.0	81.0	81.0
차광제	산화티탄	1.0	1.0	1.0	1.0
착색제	산화철	1.0	1.0	1.0	1.0
Total		1180.0	1180.0	1180.0	1180.0
액상성분 중 황납비율 (%)		2 %	3 %	5 %	7 %
cut off		양호	양호	부적합	부적합
충전성		양호	양호	부적합	부적합
층분리 상태		분리됨	분리되지 않음	분리되지 않음	분리되지 않음

각 실시예 검토 결과 실시예 2에서 cut off, 충전성, 층분리상태 등의 시험결과가 우수하여 연질캡슐 검토시 가장 적합한 처방으로 사료된다.

위의 결과와 같이 정제 및 캡슐제(경질캡슐 및 연질캡슐)에 제제검토 결과 각 제형에서 최적의 처방을 설계하였고 최종적으로 본 과제에서는 상기 실시예 중 과립 및 제제의 물성(경질캡슐의 경우 각 처방에 따른 물성의 차가 크게 나타나지 않음), 생산용이성 및 경제성 등을 고려하여 경질캡슐제 실시예 2를 최적 처방으로 설정하였다.

#### 다. 분석법 연구

##### 1) 조사포닌법을 이용한 분석

##### 가) 실험방법

(건강기능식품의기준및규격제정(04.1.31) 중 홍삼제품의 홍삼성분 함량시험법에 준함)

검체 약 7.0g을 100ml의 농축플라스크에 취하고 감압농축 건고한 후 물포화부탄올 50ml를

가하여 환류냉각기를 붙여 수욕중에서 70~80℃로 약 1시간 가열 추출한 다음 냉각한 후 여과하고 잔류물에 대하여 같은 조작을 계속 2회 반복한다. 여지는 물포화부탄올 10ml로 세척하고 여액 및 세액을 합하여 250ml 분액 깔대기에 넣고 물 20ml로 잘 진탕 수세한다. 물포화부탄올 추출액 전액을 미리 항량으로 한 농축플라스크에 옮긴 후 수욕중에서 감압농축하여 부탄올을 제거한 다음 그 잔류물에 에테르 50ml를 넣고 환류냉각기를 붙여 수욕중에서 36℃로 30분간 가열하여 탈지시킨 후 에테르를 제거한다. 잔류물은 105℃에서 20분간 건조하고 다시 데시케이터에서 30분간 식혀 무게를 달아 다음식에 따라 홍삼성분(조사포닌)의 양을 구한다.

$$\text{홍삼성분(mg/g)} = (A-B)/S$$

A : 물포화부탄올층을 농축 건조한 후 플라스크의 무게(mg)

B : 항량으로 한 빈 플라스크의 무게(mg), S : 검체의 채취량

#### 나) 실험결과

sample	홍삼성분 (mg/g)	SD
진삼엑스	194	2.08
인삼엑스	201	3.51

(n=3)

#### 1) 총사포닌법을 이용한 분석

##### 가) 실험방법

(의약품기준및시험방법제2개정(식품의약품안전청고시 제1998-127호, 98.12.28)에 준함)

검체 1.0g (총 인삼배당체로서 약 100mg 해당량)을 정밀히 달아 물에 녹여 정확히 25ml로 하고 이 액 5ml를 정확히 취하여 증발건조하고 n-부탄올물포화용액에 녹여 100ml로 한 후 이 액 25ml를 취하여 증발건조하고 초산에 정확히 녹여 정확히 10ml로 하여 검액으로 한다. Rg<sub>1</sub> 표준품을 50mg을 달아 10ml 용량플라스크에 넣고 초산 10ml에 녹여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 각각 2ml를 정확히 취하여 15% 삼염화안티몬시액 8ml 를 넣고 넣고 60℃에서 30분간 가열하고 식힌액을 파장 525nm에서 검액 및 표준액의 흡광도 A<sub>T</sub> 및 A<sub>S</sub>를 측정한다.

$$\text{총인삼배당체의양(mg)} = \text{총백삼배당체표준품의양(mg)} \times (A_T / A_S)$$

$A_T$  = 검액의 흡광도,  $A_S$  = 표준액의 흡광도

#### 나) 실험결과

sample	총인삼배당체의 양 (mg/g)	SD
진삼엑스	236	6.03
인삼엑스	243	5.03

(n=3)

#### 1) HPLC를 이용한 분석

##### 가) 원료의 분석

##### (1) 표준액의 조제

진세노사이드 Rg3 표준품 1mg 을 정밀히 달아 20ml 용량플라스크에 넣고 30%Acetonitrile 용액(Acetonitrile:Water=30:70, v/v) 10ml을 넣어 완전히 녹인 후 같은 용매로 표선을 채워 표준액으로 한다.

##### (2) 검액의 조제

진삼엑스 100mg을 정밀히 취해 100ml 용량플라스크에 넣고 30% Acetonitrile용액 50ml 를 넣어완전히 녹인 후 같은 용매로 표선하여 검액으로 한다.

##### (3) HPLC 조건

검액 및 표준액을 다음 조건으로 분석한다.

- 컬럼 : BDS HYPERSIL C18, 250×4.6 (5 $\mu$ m)
- 유속 : 1.0ml/min
- 이동상 : A - Water, B - Acetonitrile
- 검출기 : UV 203nm
- 주입량 : 50 $\mu$ l

##### (4) 정밀성

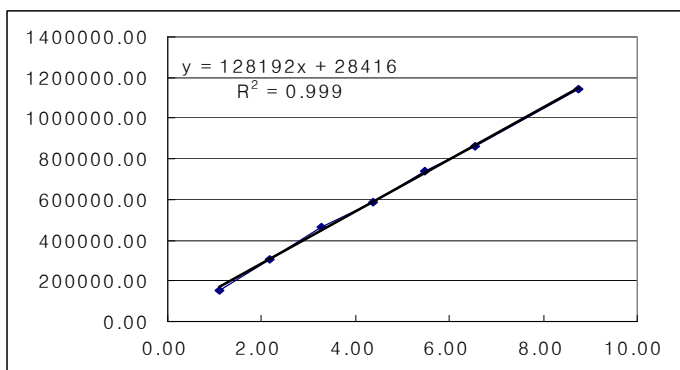
sample	Rg3 함량 (mg/ml)				SD	RSD
	x1	x2	x3	평균		
1	4.33	4.29	4.33	4.32	0.025	0.586
2	4.48	4.40	4.45	4.45	0.037	0.844
3	4.37	4.32	4.38	4.36	0.031	0.710
4	4.47	4.51	4.44	4.47	0.030	0.676
5	4.45	4.41	4.45	4.43	0.019	0.438
$X_{avg}$				4.41	0.030	0.680

(5) 정확성

농도 (mg/ml)	상대함량 (%)	Rg3 함량 (mg/ml)				deviation (%)	RSD
		x1	x2	x3	평균		
3.50	80	3.48	3.46	3.49	3.48	-0.57	0.439
4.37	100	4.33	4.35	4.32	4.33	-0.92	0.400
5.24	120	5.20	5.25	5.23	5.23	-0.19	0.481
$X_{avg}$						-0.56	0.440

(6) 직선성

농도 (mg/ml)	상대함량 (%)	Rg3 peak area				SD	RSD
		x1	x2	x3	평균		
1.09	25	153968.49	156237.03	155288.03	155164.52	1139.30	0.71
2.19	50	303673.30	309118.92	306142.91	306311.71	2726.73	0.89
3.28	75	466113.88	468405.95	467477.91	467332.58	1152.93	0.25
4.37	100	588569.91	589972.10	588789.24	589110.42	754.25	0.13
5.46	125	738862.03	738952.02	736199.97	738004.67	1563.57	0.21
6.56	150	865435.25	861538.20	852875.25	859949.57	6428.94	0.75
8.74	200	1136082.42	1156955.74	1140379.72	1144472.63	11022.15	0.96



HPLC를 이용하여 주성분인 ginsenoside Rg3를 분석한 결과 정밀성과 정확성 그리고 직선성이 뛰어나 본 분석조건은 ginsenoside Rg3를 분석하기에 좋은 방법으로 나타났다.

#### 가) 제제의 분석

##### (1) 표준액의 조제

진세노사이드 Rg3 표준품 1mg 을 정밀히 달아 20ml 용량플라스크에 넣고 30% Acetonitrile용액(Acetonitrile:D-Water=30:70, v/v) 10ml을 넣는다. 진탕하여 완전히 녹인 후 같은 용매로 표선을 채워 표준액으로 한다.

##### (2) 검액의 조제

캡슐의 내용물 10개 이상을 유발에 넣고 균질 혼합한 후 진삼엑스로서 100mg 해당량을 정밀히 취해 100ml 용량플라스크에 넣고 30% Acetonitrile용액 50ml 를 넣는다. 진탕하여 완전히 녹인 후 같은 용매로 표선하여 검액으로 한다.

##### (3) HPLC 조건

검액 및 표준액을 다음 조건으로 분석한다.

- 컬 럼 : BDS HYPERSIL C18, 250×4.6 (5 $\mu$ m)
- 유 속 : 1.0ml/min
- 이 동 상 : A - Water, B - Acetonitrile
- 검 출 기 : UV 203nm
- 주 입 량 : 50 $\mu$ l

##### (4) 제제시험 결과

sample	weight (mg)	content	recovery (%)
1	140.2	4.31	98.57
2	140.1	4.25	97.18
3	140.3	4.31	98.52
4	139.8	4.28	97.87
5	140.0	4.36	99.73
평균		4.30	98.37
SD		0.04	0.94

※ 캡슐 내 제제 채취량은 진삼엑스로서 100mg 해당량



HPLC를 이용한 분석법은 제제분석에서 회수율이 98.37%, 표준편차가 0.94로 진삼엑스의 주 성분인 ginsenoside Rg3를 분석하는 데 적합한 분석조건으로 사료된다.

## 라. 안정성 연구

### 1) 원료

가속조건(40℃, 75%RH)에서 6개월간 안정성시험을 하였을 때 함량의 변화가 초기 대비 5%이내의 변화를 갖는 안정한 원료를 확정하였다.

시험항목	기준	Initial	2개월		4개월		6개월		Initial 대비 변화 비율
함량	함량변화비율	100	99.2	99.2	98.7	98.7	97.8	97.9	-2.1 %
	5%이내		99.1		98.2		97.5		
	(Rg3 함량 4.37%)		99.4		99.1		98.5		

### 2) 제제

가속조건(40℃, 75%RH)에서 6개월간 안정성시험을 하였을 때 함량의 변화가 초기 대비 5%이내의 변화를 갖는 안정한 처방을 확립하였다.

시험항목	기준	Initial	2개월		4개월		6개월		Initial 대비 변화 비율
함량	함량변화비율	100	98.8	98.8	98.2	98.3	97.3	97.3	-2.7%
	5%이내		99.1		98.7		97.6		
	(Rg3 함량 4.37%)		98.6		98.1		97.0		

표준제조공정에 의해 제조된 진삼엑스 원료 및 제제처방을 통해 확정된 제제 모두에서 가속 조건시 6개월 후 초기함량대비 5% 이내의 원료와 제제임을 확인하였다.

## 마. 단회투여독성시험

### 1). 진삼의 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

#### 가) 시험목적

본시험은 랫드를 이용하여 진삼을 경구로 단회 투여시 나타나는 독성을 평가하고 개략의 치사량을 구하기 위해 실시하였다.

#### 나) 시험방법

(1) 시험군구성

	군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/kg)	동물수 (개체번호)	
				수컷	암컷
G1	대조군	0	5	5(1M01~1M05)	5(1F01~1F05)
G2	시험물질투여군	2000	5	5(2M06~2M10)	5(2F06~2F10)

본 시험의 예비시험(B05451P)으로 2000mg/5ml/kg을 수컷 2마리에 단회 투여한 결과 시험물질투여에 기인한 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서 2000mg/kg의 단일 시험물질 투여군을 설정하였고, 대조군은 부형제인 주사용수를 투여하였다. 개체별 투여액량은 5ml/kg이며, 절식 후 체중을 기준으로 산출하였다.

(2) 투여 : 시험물질의 예상임상적용경로가 경구이므로 경구로 투여하였다.

다) 시험결과

No	항목	관찰 및 검사내용	결과
1	사망률 및 일반증상	투여 당일은 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 8시간째 관찰하였고 투여 다음 날부터 14일째까지는 매일 1회이상 일반증상 및 동물의 사망 유·무를 관찰하였다.	-사망률 : 관찰기간 동안 암·수 대조군 및 시험물질투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. -일반증상 : 관찰기간동안 암·수 대조군 및 시험물질투여군에서 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 투여 후 8시간째에 수컷 시험물질투여군에서 연변 1례가 관찰되었으나, 투여 후 1일 부터는 관찰되지 않았다.
2	체중	체중은 투여직전(투여당일), 투여 후 3, 7일째 및 부검당일에 측정하였다.	관찰기간동안 암·수 대조군 및 시험물질투여군은 순조로운 체중증가가 관찰되었다.
3	부검	관찰기간 종료 후 생존동물에 대하여 부검을 실시하여 육안적 이상소견을 관찰하였다.	계획부검 결과 암·수 대조군 및 시험물질투여군 모두에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다.

라) 고찰 및 결론

사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검에서 특이한 소견은 발견되지 않았으며 이에 따라 개략의 치사량은 암·수 각 2000mg/kg 이상으로 판단된다.

## 1). 진삼의 비글견을 이용한 단회 경구투여 독성시험

### 가) 시험목적

본시험은 비글견을 이용하여 진삼을 경구로 단회 투여시 나타나는 독성을 평가하고 개략의 치사량을 구하기 위해 실시하였다.

### 나) 시험방법

#### (1) 시험군구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1	대조군	0→0	5	2(1M01~1M02) 2(1F01~1F02)
G2	시험물질투여군	1,000→2,000	5	2(2M03~2M04) 2(2F03~2F04)

시험물질인 진삼의 1,000mg/kg을 첫단계의 투여용량으로 설정하였고, 2,000mg/kg을 2차 증가된 투여용량으로 설정하였으며, 대조군에는 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

#### (2) 투여

시험물질의 예상임상적용경로가 경구이므로 경구로 투여하였다.

#### (3) 시험결과

No	항목	관찰 및 검사내용	결과
1	사망률 및 일반증상	투여 당일은 투여 후 30분, 1, 2, 3 및 4시간째 관찰하였고 투여 다음날부터 14일째까지 매일 1회 이상 관찰하였으며, 빈사나 사망 동물의 유무를 확인하였다.	-사망률 : 관찰기간 동안 암·수 대조군 및 시험물질투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. -일반증상 · 1차 투여시 : 수컷 1례(2M04)에서 30분이내에 소량 구토발생하였다. · 2차 투여시 : 암·수 모든 개체에서 60분 이내에 구토증상 발생하였으며, 특히 암컷 1례(2F04)에서는 투여 후 5분부터 여러차례의 구토증상을 보였다. · 1차 및 2차 투여 후 모든 개체에서 시험동물의 혼입변이 관찰되었다.
2	체중	체중은 균분리시, 매번 투여일, 투여 후 1일째 및 최종 투여 후 1, 3, 7, 및 14일 째에 측정하였다.	실험기간 동안 암·수 시험물질투여군은 대조군과 비슷한 체중변화를 보였다.
3	부검	외관검사 실시 후 펜토탈소디움으로 마취시켜 방혈치사 시킨 후 아래와 같이 장기조직에 대한 육안검사를 실시하였다. - 체표 및 모든 체공 - 두개강 및 뇌표면 - 흉강, 복강 및 골반강과 포함 장기 - 경부 장기조직	실험종료 시에 실시한 부검에서는 대조군 및 시험물질투여군 모두에서 육안적 이상변화는 관찰되지 않았다.

#### (4) 고찰 및 결론

(가) 실험기간 동안 대조군 및 시험물질 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

(나) 1차 1,000mg/kg 투여 후 단 수컷 1례에서만 나타난 소량의 구토는 그 증상이 경미하여 시험물질에 의한 영향으로 판단하기에는 어려운 것으로 사료된다.

(다) 2차 2,000mg/kg 투여 후에는 암·수 모든 개체에서 구토증상이 나타났으며, 특히 그 중 암컷 1례에서는 심한 구토증상을 보여 이는 시험물질의 투여에 의한 것으로 판단된다.

(라) 체중변화에서는 대조군과 비교시 어떠한 차이도 관찰되지 않았다.

(마) 실험종료시의 부검에서는 어떠한 육안소견도 관찰되지 않아 이미 회복되었거나 아니면 장기조직에 대한 육안적 변화는 초래하지 않는 것으로 여겨진다.

(바) 이상의 결과로 보아 진삼을 비글견에 단회 경구투여 시 2,000mg/kg의 용량에서 구토

증상이 관찰되어 암·수 비글견에 대한 확실중독량은 2,000mg/kg 이고, 개략의 치사량은 그 이상인 것으로 판단된다.

## 제 10 절 안정성 확립 및 시약품 제작

### 1. 제제 분석법 연구

#### 가. 실험방법

1) 표준액의 조제 : 진세노사이드 Rg3 표준품 1mg을 정밀히 달아 20ml 용량플라스크에 넣고 30% Acetonitrile용액(Acetonitrile:D-Water=30:70, v/v) 10ml을 넣는다. 진탕하여 완전히 녹인 후 같은 용매로 표선하여 표준액으로 한다.

2) 검액의 조제 : 캡슐의 내용물 10개 이상을 유발에 넣고 균질 혼합한 후 진삼원료로서 100mg 해당량을 정밀히 취해 100ml 용량플라스크에 넣고 30% Acetonitrile용액 50ml 를 넣는다. 진탕하여 완전히 녹인 후 같은 용매로 표선하여 검액으로 한다.

#### 3) HPLC 조건

검액 및 표준액을 다음의 조건으로 분석한다.

가) 컬 럼 : BDS HYPERSIL C18, 250×4.6 (5 $\mu$ m)

나) 유 속 : 1.0ml/min

다) 이 동 상 : A - Water, B - Acetonitrile

라) 검 출 기 : UV 203nm

마) 주 입 량 : 50 $\mu$ l

#### 나. 실험결과

sample	weight (mg)	content (%)
1	140.2	4.31
2	140.1	4.25
3	140.3	4.31
4	139.8	4.28
5	140.0	4.36
평균		4.30
SD		0.04

※ 캡슐 내 제제 채취량은 진삼원료로써 100mg 해당량

## 2. 안정성 연구 (원료 및 제제)

### 가. 실험방법

1차년도에 수행한 원료 추출 및 제조법 연구를 통해 제조된 원료와 제제설계 및 평가연구에서 최적의 제형으로 결정된 경질 캡슐제의 최적 처방에 따라 충전한 예비 캡슐제를 가지고 실온(25℃, 60% RH)조건에 보관하면서 12개월 동안 3개월마다 시험을 실시하였다. (식품의약품안전청고시 제 2000-7호 '의약품 등의 안정성시험기준'에 준하여 실시)

### 나. 실험 결과

#### 1) 원료의 안정성 시험

실온조건 (25℃, 60% RH)에서 12개월간 안정성 시험을 실시하여 원료의 안정성을 확인하였다. 안정성 시험에 이용한 샘플은 원료 추출 및 제조법 연구를 통해 제조한 시료를 이용하였다.

시험항목	기준	Initial	3개월	6개월	9개월	12개월
함량	함량변화비율 Initial의 5% 이내 (Rg3 함량 4.37%)	100.0	99.7	99.5	99.1	98.8
			99.6	99.4	99.0	98.8
			99.9	99.5	98.9	98.9
			99.7	99.5	99.0	98.8

함량 변화가 초기 대비 5%미만(-1.2%)임을 확인하여 안정성을 확인하였다.

#### 2) 제제의 안정성 시험

제제의 안정성 시험에 이용한 샘플은 경질 캡슐의 최종 확정처방인 실시예 2 처방을 기준으로 제조한 샘플을 이용하였다. (n=3)

시험항목	기준	시험기간				
		Initial	3개월	6개월	9개월	12개월
성상	진한갈색의가루가 든 밝은 황색의 경질캡슐	좌동	좌동	좌동	좌동	좌동
붕해	20분 이내	5분	6분	5분	5분	6분
질량편차	10% 내외	적합	적합	적합	적합	적합
함량	함량변화비율 Initial의 5% 이내 (Rg3 함량 4.37%)	100.0%	100.2%	99.6%	99.3%	98.9%

경질캡슐의 실시예 2 처방을 최적의 처방으로 확정하여 생산한 후 실온조건(25℃, 60% RH)에서 12개월간 시험을 진행한 결과, 성상 변화가 없었을 뿐만 아니라 확인, 봉해 및 함량시험 등에서 별다른 변화를 보이지 않고 안정하였다. (Initial 대비 함량 변화 비율 : -1.1%) 현재 허가용 자료제출 및 유통기간 전체에서의 안정성 확보를 위해 실온 보관조건에서 24개월 동안의 안정성 시험을 진행 중이다.

### 3. Scale-up 및 시작품 생산

#### 가. 원료의 Scale-up 연구

원료 추출 및 제조법 연구에서 확정한 제조공정의 대량생산 가능성 여부를 판단하기 위하여 원료 인삼 엑스 10kg 생산 scale로 제조를 실시하였다. 추출 및 건조 과정에 대한 평가를 실시하였으며 본 연구를 통해 제조한 진삼원료는 제제의 scale-up 연구 및 시작품 생산의 원료로 사용하였다.

#### 1) Scale-up 공정 내용

No	공정명	내용
1	칭량	인삼엑스 10kg, 양조식초 : 40L
2	가운	식초를 반응기에 투입한 후 90℃ 이상으로 가운
3	투입	칭량한 인삼엑스를 반응기에 투입
4	추출	인삼엑스를 투입한 후 6시간 동안 교반하면서 추출
5	냉각	상온으로 냉각
6	건조	Spray Dryer를 이용하여 건조

#### 2) 실험 결과

##### 가) 함량

시험항목	방법	결과
성상	육안으로 관찰	미황색의 미세한 가루, 쓴맛 있음
수분	Karl-Fisher	2.25 %
함량 (G-Rg3, w/w)	HPLC	4.05 %



나) 수율

투입량 (kg)	생산량 (kg)	수율 (%)
10	6.2	62.0%

다) 고찰

함량시험 결과 진삼원료 규격에 적합 (Ginsenoside Rg3 함량: 4% 이상)하였으며 수율 면에서도 우수해 향후 본 공정은 생산시설로의 적용이 가능한 공정으로 판단된다.

#### 나. 제제의 Scale-up 및 시작품 생산

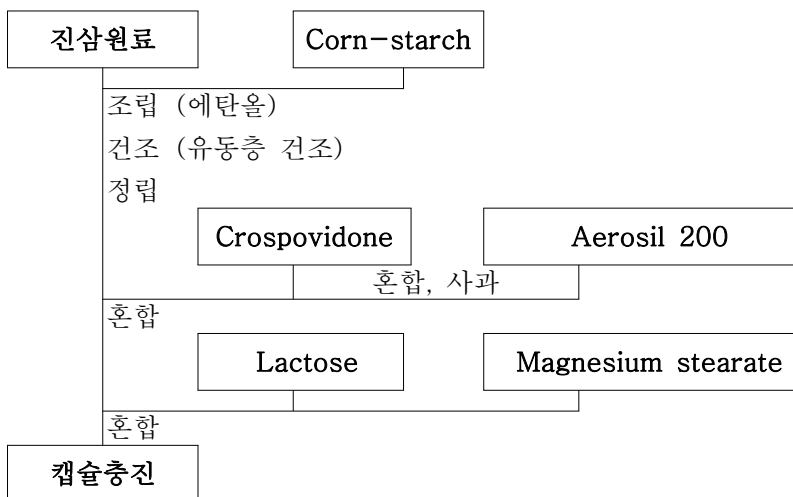
1) 실험방법

원료의 Scale-up 연구에서 생산한 진삼원료를 이용하여 주성분을 250mg 함유하는 제형을 제제 설계 및 평가 시 캡슐제의 실시예 중 가장 우수한 물성 및 생산성을 나타낸 실시예 2의 처방을 이용하여 대량 생산 시 적용가능성 여부를 검토하였다.

2) 실험결과

가) 제조단위 : 10,000 캡슐

나) 제조방법 : 습식법



다) 원료약품 분량

원료 명		1 capsule 중 함유량 (mg)
주성분	진삼원료	250.0
부형제	Lactose powder	50.0
부형제	Corn starch	25.0
붕해제	Crospovidone	20.0
활택제	Colloidal silicon dioxide	1.5
	Magnesium stearate	3.5
capsule 내용물 총 중량 (mg)		350.0
제조방법		습식과립

라) 과립물 물성검토

시험 항목		결과
비용적(g/mL)	Bulk density	0.44
	Tapped density	0.58
압축도 (%)		24.1
안식각 (°)		39
수분함량 (Karl Fisher, %)		2.81
입도분포 (%)	14 mesh	0.10
	20 mesh	0.16
	35 mesh	4.88
	50 mesh	6.09
	80 mesh	15.74
	100 mesh	8.74
	140 mesh	21.04
	200 mesh	15.49
	pan	27.76

마) 캡슐제 물성검토

시험 항목	결과
공캡슐(호)	0 호
평균중량(mg) ± 표준편차	351.43 ± 0.94
붕해 (분)	5
비고	충진성 양호

캡슐제 제제검토 실시예 2의 처방을 이용하여 10,000캡슐 분량으로 Scale-up 제조한 결과 캡슐제의 제조공정에 문제점이 발생하지 않았으며, 제조 후 물성 또한 우수한 결과를 얻어 경질 캡슐제 실시예 2의 처방 및 제조공정은 대량 생산 설비에 적용이 가능할 것으로 사료된다.

[Scale-up 및 시작용품 제작에서 제조한 진삼 원료 및 제제 샘플]



<원료 Scale-up sample>



<제품 Scale-up 및 시작용품 샘플>

4. 포장용기선정

진삼원료를 주성분으로 하는 캡슐제는 원료의 특성상 인습에 의한 봉해지연, 성분함량의 저하 등 그 품질이 크게 저하될 수 있기 때문에 타제제보다 인습 방지를 위한 포장설계가 더욱 절실히 요구된다. 따라서 본 연구에서는 진삼을 유통과정 중에 안정성을 최적의 조건으로 유지할 수 있는 포장용기를 선정하고자 PE(Polyethylene), PP(polypropylene), glass 용기 및 PTP 포장을 검토하였다. 각각의 방법으로 포장한 경질캡슐을 가속조건에서 6개월간 시험개시일 및 2개월 마다 함량, 인습율, 봉해도 시험을 실시하였고, 6개월간의 시험자료를 토대로 경질캡슐의 포장용기로서 가장 적합한 재질 및 포장방법을 확립하고자 하였다.

가. 실험방법

1) PE(polyethylene), PP(polypropylene), glass

가) 포장방법

필름 코팅정 시작용품 50 Cap.씩을 각각의 용기에 넣고 실리카겔과 에너비닐을 넣은 후 뚜껑

을 닫는다.

나) 실험방법

각각의 용기별로 4병씩을 가속조건(40℃, 75%RH)에서 6개월간 보관한 후 시험개시일 및 2개월마다 함량, 인습율, 봉해도 시험을 실시하였다.

2) PTP 포장

가) 포장방법

(1) PTP 재질 : PVC - PVC

(2) 사용기계 : PTP machine (Maruho, 일본)

(3) 접착온도 : 예열 ; 120 ℃, 접착 ; 170~180 ℃

나) 실험방법

각각 포장한 4개의 PTP 포장 Sheet를 가속조건(40℃, 75%RH)에서 6개월간 보관한 후 시험개시일 및 2개월마다 함량, 인습율, 봉해도 시험을 실시하였다.

나. 시험 결과

1) 함량시험 결과

시험 항목	기준	포장 용기	Initial	시험기간		
				2개월	4개월	6개월
Ginsenoside Rg3의 함량 (%)	함량변화 비율 5% 이내	glass	100.0 ±0.46	99.37 ±0.19	98.95 ±0.19	98.61 ±0.29
		PE		99.02 ±0.14	98.38 ±0.41	97.05 ±0.40
		PP		99.11 ±0.39	98.48 ±0.68	97.46 ±0.05
		PTP		99.37 ±0.56	98.67 ±0.50	98.13 ±0.60

(n=3)

2) 인습방지 효과

시험 항목	기준	포장 용기	Initial	시험기간		
				2개월	4개월	6개월
수분함량%	함량변화 비율 5% 이내	glass	3.10±0.05	3.23±0.12	3.32±0.15	3.53±0.22
		PE		3.42±0.11	3.72±0.33	4.21±0.28
		PP		3.34±0.25	3.62±0.42	4.13±0.35
		PTP		3.28±0.05	3.58±0.25	4.09±0.28

(n=3)

다. 포장용기의 기준 및 규격설정

6개월간의 가속보관조건에서 Ginsenoside Rg3는 함량변화는 2~3% 미만으로 나타나났다. 인습방지 효과는 유리용기가 가장 우수하였고 PE용기에 비하여 PP용기가 더 우수한 것으로 나타났다. 포장용기시험 결과 유리용기가 함량 및 인습방지효과가 가장 큰 것으로 나타났으나 PTP 포장과 비교해 볼 때 큰 차이점은 아닌 것으로 판단되어, 복용 및 휴대가 편리할 뿐만 아니라 물리적인 성질 (성형수축율, 인장강도, 굽힘강도 등)이 뛰어난 PTP 용기를 제품의 포장용기로 선정하였다.

5. 유전독성 시험

가. 복귀돌연변이 시험

1) 시험실시의 개요

가) 시험제목 : 진삼의 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험

나) 시험목적 : 히스티딘 요구성 살모넬라균과 트립토판 요구성 대장균을 이용하여 시험물질인 진삼의 복귀돌연변이 유발성 여부를 평가하기 위하여 시험을 실시하였다.

다) 시험기관 및 시설 : (주) 바이오톡스텍

2) 시험의 요약

본 시험에서는 시험물질인 진삼의 복귀돌연변이 유발성에 대해서, 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 및 대장균 (WP2uvrA(pKM101))을 이용하여 대사활성화 및 비대사활성화의 경우에서 변이원성 시험을 실시하였다.

3) 용량단계 결정시험

용량설정시험은 최고용량을 5000 $\mu$ g/plate로 설정하고 그 이하 공비2로 최고용량을 포함한 5 단계 용량에서 실시하였으며, 용량설정시험의 결과, 대사활성계 적용유무에 관계없이 사용한 모든 시험군주에서 생육저해 및 시험물질의 침전은 관찰되지 않았다.

따라서, 본 시험은 대사활성계 적용유무에 관계없이 모든 시험군주에서 5000 $\mu$ g/plate를 최고 용량으로 설정하고 그 이하 공비 2로 최고용량을 포함한 5 용량의 시험물질군을 설정하였다. 그리고 음성대조군 및 양성대조군을 별도로 설정하였다.

#### 4) 시험실시

용량설정시험 및 본시험 모두 프리인큐베이션법으로 대사활성계 적용 및 비적용의 2계열로 실시하였다.

#### 5) 시험 방법 및 결과

##### 가) 처리방법

시험물질 조제액(음성대조물질용액, 시험물질용액, 양성대조물질용액) 100 $\mu$ L 및 대사활성계 비적용일 때에는 0.1mol/L 인산완충액 (pH7.4) 500 $\mu$ L를, 대사활성계 적용일 때에는 S9 mix 500 $\mu$ L를, 이미 건열 멸균된 시험관(13 $\times$ 100mm)에 넣고, 균현탁액 100 $\mu$ L를 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C 진탕배양기에서 20분간 선회배양한 다음, 45 $^{\circ}$ C에 보관된 top agar (연한천 용액) 2mL를 첨가하여 잘 혼합한 후 Vogel-Bonner 최소 Glucose 한천평판배지 위에 중층 하였다. 용량설정시험에서는 음성대조군, 시험물질군 및 양성대조군 각각 2매의 페트리디쉬를 사용하였고, 본시험에서는 각각 3매의 페트리디쉬를 사용하였다.

##### 나) 시험결과

시험균주	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 $uvrA$
시험용량	312.5, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu$ g/plate
관찰 및 측정	① 복귀변이콜로니수의 계측                      ② Background lawn의 관찰
결과의 판정	대사활성계의 유무에 관계없이 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비해 한개 이상의 용량에서 명확히 증가하고, 2배 이상이면서 용량의 존성을 가지며 재현성이 인정될 경우, 양성으로 판정한다.
시험결과	① 시험물질군은 모든 균주에서 대사활성계의 유무에 관계없이 복귀 변이콜로니수가 용량의존적으로 증가하지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 2 배 이상의 증가를 보이지 않았다. ② 양성대조군은 각 균주의 특성을 확인할 수 있도록 복귀변이콜로 니수가 확실히 증가하였다.

#### 6) 고찰

용량설정시험 결과, 대사활성계 적용유무에 관계없이 단시간처리법 및 연속처리법 모두에서 시험균주의 생육저해 및 시험물질의 침전은 관찰되지 않았다 따라서, 본시험의 용량은 대사활성계 적용유무에 관계없이 사용한 모든 시험균주에서 5000 $\mu$ g/plate를 최고용량으로 설정하고, 그 이하 공비 2로 최고용량을 포함한 5용량의 시험물질군과 음성대조군 및 양성대조군으로 실시하였다. 본시험의 결과, 모든 시험균주에서 시험물질에 의한 복귀변이콜로니수는 대사활성계의 적용유무에 관계없이 용량의존적으로 증가되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 2배 이상의 증가를 보이지 않았다. 또한, 시험물질에 의한 균주의 생육저해 및 시험물질의 침전은 관찰되지 않았다. 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균이 Historical control data의 범위에 속하였으며, 양성대조군은 각 균주의 특성을 확인할 수 있도록 해당농도에서 확실히 증가하였다. 또한, 용량설정시험 및 본시험에서 실시된 오염여부의 확인에서 오염은 확인되지 않았다.

이상의 결과로부터, 해당 시험조건에서 시험물질인 진삼의 복귀돌연변이 유발성은 음성으로 판정되었다

#### 나. 염색체이상시험

##### 1) 시험실시의 개요

가) 시험제목 : 진삼의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

나) 시험목적 : 시험물질인 진삼의 염색체이상 유발성을 검색하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 이용한 염색체이상시험을 실시하였다.

다) 시험기관 및 시설 : (주) 바이오톡스텍

## 2) 용량단계

시험물질의 용량을 설정하기 위해 0, 4.9, 9.8, 19.6, 39.1, 78.2, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 12 단계 용량으로 세포증식억제시험을 실시하였다. 세포증식억제시험의 결과에 따라서 세포독성지표인 50% 세포증식억제농도 (Inhibition concentration 50% : IC50)를 구한결과, 단시간처리법의 비대사활성화 및 연속처리법의 경우에는 430 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 단시간처리법의 대사활성화의 경우에는 380 $\mu\text{g}/\text{mL}$  이었다. 따라서, 본시험의 용량은 50% 세포증식억제농도 (Inhibition concentration 50% : IC50)를 최고용량으로 하고, 그 이하 공비 2 로 최고용량을 포함한 3 단계 용량의 시험물질군을 설정하였다. 그리고, 음성대조군 및 양성대조군을 별도로 설정하였다.

## 3) 시험물질 처리법

가) 단시간 처리법-시험물질이 첨가된 배지에 6시간 배양 후, 신선한 배지로 교환하여 18시간 더 배양한 후 관찰

연속처리법- 시험물질이 첨가된 배지에 24시간 배양 후, 관찰

나) 대사활성계열 -SD rat으로부터 추출한 S9 mix를 첨가하여 최종농도가 5%가 되도록 한다. <S9 mix (+)>

비대사활성계열- S9 mix와 동일한 양의 0.1mol/L 인산완충액 (pH7.4)를 첨가한다. <S9 mix (-)>

## 4) 시험 방법

가) 사용세포 및 배양조건

염색체이상시험에는 검출감도가 높은 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포주를 사용한다. 세포는 EMEM을 사용하여 온도 37 $^{\circ}\text{C}$ , 습도 95%, CO<sub>2</sub> 농도가 5%인 인큐베이터에서 배양한다.

나) 세포증식억제 시험

75cm<sup>2</sup>세포배양용 플레이트 (Nunc, USA)에 계대배양된 세포부유액의 세포수를 혈구계수판



을 이용하여 계수한 후  $5 \times 10^4$  cells/mL의 세포농도로, 96 well plate(Nunc, USA)에 200  $\mu$ L 씩 분주하고 배양한 후 3계열(단시간처리법의 비대사활성화, 대사활성화 및 연속처리법)로 구분하였다. 각 용량당 4개 well을 사용하였다.

각 계열의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 5% CO<sub>2</sub>로 설정된 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다 24시간 배양한 후 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetra-zolium bromide (MTT, 5 mg/mL Phosphate Buffered Saline(PBS)) 50 $\mu$ L씩 분주하여 4시간 더 배양하였다. 배양 종료 후 배양액을 버리고 PBS로 세척하여 건조시킨 후 DMSO (150 $\mu$ L/well)를 첨가하여 침전물을 용해시킨 다음, ELISA reader (VERSA mat™, Molecular Devices, USA)을 이용하여 540nm에서 OD를 측정하였다. 얻은 결과를 그래프로 표시하고, 분산분석에 의해 50% 세포증식억제농도(IC50)를 구하였다

#### 다) 염색체이상시험

75cm<sup>2</sup>세포배양용 플레이트(Nunc, USA)에 계대배양된 세포부유액의 세포수를 혈구계수관을 이용하여 계수한 후  $5 \times 10^4$  cells/mL의 세포농도로 60mm 세포배양용 페트리디쉬(Nunc, USA)에 5mL씩 분주한 다음, 3계열(단시간처리법의 비대사활성화, 대사활성화 및 연속처리법)로 구분하였다. 시험군은 음성대조군, 시험물질군 및 양성대조군으로 나누었고, 각 시험군은 각각 2매의 페트리디쉬를 사용하였다

#### 라) 관찰

각 슬라이드중에서 잘 흩어진 100개(1 개 용량당 200개)의 분열중기상을 1000배의 현미경 (BX51, OLYMPUS, Japan)에서 관찰하였다. 염색체이상의 분류는 수적 이상은 배수체 (polyploidy; pol), 구조이상은 염색분체형절단(chromatid break; ctb), 염색분체형 교환 (chromatid exchange; cte), 염색체형 절단(chromosome break; csb), 염색체형 교환 (dicentric, ring 등: chromosome exchange; cse) 및 기타(o)로 분류하였다.

염색분체형의 갭(chromatid gap; ctg) 또는, 염색체형의 갭(chromosome gap; csg)에 대해서는 별도로 기록하였다. gap(g)의 판단기준은 염색분체의 넓이보다도 좁은 비염색성 부위의 것으로 하였다. 그 외 1 개의 분열중기세포에 다수의 gap, 절단 등이 있는 경우는 단편화 (frg)로 기록하였다. 이러한 이상을 1 개라도 가지는 세포를 이상세포 1 개로 기록하였다. 수적 이상은 배수성(pol)이상의 종류를 1 개 이상 갖는 세포를 이상세포 1 개로 계수하고 그 종류를 각각 기록하였다.

#### 마) 결과의 판정

염색체 이상을 가진 분열중기상의 세포수의 출현율이 음성대조군에 비하여 확실히 증가하고 또, 용량 의존성이 인정되는 경우, 또한 한 개의 용량에서 확실히 증가되고 재현성이 인정되는 경우는 양성으로 판정하고 그 외는 음성으로 판정하였다.

gap 에 대해서는 구조이상에 포함하지 않는 결과로 표기하고 종합판단에도 gap을 포함시키지 않고 결과를 평가하였다. 시험물질의 염색체이상유발성에 대한 최종판정은 Toshio Sofuni 등(4)의 판정기준에 따라 염색체이상을 가지는 세포의 빈도가 5% 미만을 음성, 5% 이상 10%미만을 양성, 10%이상을 양성으로 하였다.

#### 5) 결과

구분	단시간처리법/S9mix(-)	단시간처리법/S9mix(+)	연속처리법/S9mix(-)
시험 농도	107.5, 215, 430 $\mu\text{g/mL}$	95, 190, 380 $\mu\text{g/mL}$	107.5, 215, 430 $\mu\text{g/mL}$
시험 결과	1) 모든 시험에서 시험물질을 첨가하였을 경우, 구조이상 및 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 증가하지 않았다. 2) 양성대조군에서는 구조이상 및 수적이상을 가진 세포의 출현빈도가 확실히 증가하였다.		

#### 6) 고찰 및 결론

가) 시험물질 진삼의 염색체이상 유발성 여부를 검색하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU)배양세포를 이용하여 염색체이상시험을 수행하였다.

나) 세포증식억제시험 결과에 따라서, 세포독성지표인 50% 세포증식억제농도 (Inhibition concentration 50% : IC50)를 구한결과, 단시간처리법의 비대사활성화 및 연속처리법의 경우에는 430 $\mu\text{g/mL}$ , 단시간처리법의 대사활성화의 경우에는 380 $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

다) 본시험은 단시간처리법 및 연속처리법의 경우 대사활성계 적용유무에 관계없이 50% 세포증식억제농도 (Inhibition concentration 50% : IC50)를 최고용량으로 설정하고, 그 이하 공비 2로 최고용량을 포함한 3단계 용량의 시험물질군과 음성대조군 및 양성대조군으로 실시하였다. 그 결과, 모든 용량에서 구조이상 및 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 단시간처리법 및 연속처리법의 경우 대사활성계 적용여부에 관계없이 음성대조군과 비교하여 증가되지 않았다.

라) 이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질인 진삼은 단시간처리법 및 연속처리법의 경우 대사활성계 적용여부에 관계없이 Chinese Hamster Lung (CHL/IU)배양세포에 대해 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

#### 다.소핵시험

##### 1) 시험실시의 개요

가) 시험제목 : 진삼의 마우스를 이용한 소핵시험

나) 시험목적 : 시험물질인 진삼의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발성 유무를 평가하기 위하여 시험을 실시하였다.

다) 시험기관 및 시설 : (주) 바이오독스텍

##### 2) 시험군 구성

군구성	투여용량 (mg/kg)	투여경로	투여액량 (mL/kg)	투여회수 (회)	개체수 (개체번호)
G1 음성대조군	0	P.O.	10	1	5(1101~1105)
G2 저용량군	500	P.O.	10	1	5(1201~1205)
G3 중용량군	1000	P.O.	10	1	5(1301~1305)
G4 고용량군	2000	P.O.	10	1	5(1401~1405)
G5 양성대조군	2	I.P.	10	1	5(1501~1505)

\* 125, 250, 500, 1000, 2000mg/kg의 용량으로 독성예비시험을 실시한 결과, 모든 투여군에서 특이한 일반증상 및 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험은 2000mg/kg를 최고용량으로 하여 그 이하 공비 2로 하여 시험을 진행하였다.

##### 3) 시험방법 및 결과

No	항목	관찰 및 검사내용	결과
1	일반증상 및 사망률	투여기간동안 1일 1회 이상 모든 시험 동물에 대하여 실시하며, 일반상태의 변화, 운동성, 외관, 자율신경계 등의 일반 증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.	모든 시험군에서 특이한 일반 증상 및 사망동물이 관찰되지 않았다.
2	체중	투여전과 골수세포 채취 직전에 체중을 측정하여 기록하였다.	시험 기간 내에 유의성 있는 체중변화가 관찰되지 않았다.
3	소핵 시험	① 각 군에서 24, 48 및 72시간에 골수세포를 채취하여 소핵이 증가하는 시간대를 본시험에서의 골수세포 채취시간으로 결정하였다. ② PCE 2000개를 계수하여 이 중, 소핵다염성적혈구 (MNPCE)의 비율을 구하여 그 비율이 용량 의존적으로 증가하거나 적어도 1개 용량 이상에서 통계적으로 유의한 재현성이 관찰될 때 양성으로 판정하였다.	① 모든 시간대에서 소핵이 증가되지 않아 일반적으로 사용하는 24시간대를 골수세포 채취시간으로 결정하였다. ② 음성 대조군과 비교하였을 때, 모든 시험물질 투여군에서 유의적 변화 관찰되지 않았다. 반면, 양성대조군은 MNPCE 유발빈도가 현저하게 증가하였다.
		세포독성의 지표로 PCE와 (PCE+NCE)의 비를 관찰하여 용량 의존적으로 증가하는지의 여부를 확인하였다.	모든 투여군에서 음성 대조군과 비교하였을 때, 유의성있는 차이가 나타나지 않았다.

#### 4) 결론

시험물질인 진삼의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발성 유무를 평가하기 위하여 시험을 실시하였다.

본시험에서는 8주령의 수컷 마우스를 각 군당 5 마리씩 사용하였고, 시험물질군은 독성예비 시험의 결과에 따라서 2000 mg/kg을 최고용량으로 하고 공비를 2로 하여 1000, 500 mg/kg의 3단계 용량으로, 음성대조군에는 주사용수를 10 mL/kg의 투여액량으로 1회 경구 투여하였다. 양성대조군에는 Mitomycin C를 2 mg/kg 용량으로 1회 복강 투여하였다. 골수세포는 음성대조물질, 시험물질 및 양성대조물질을 최종 투여한 후 24시간 후에 도살하여 대퇴골로부터 채취, 도말하였다. 골수검체는 5% 진삼액으로 염색하여 소핵유발여부를 검정하였다.

시험결과, 시험물질군 모두에서 다염성적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구(Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현율은 음성대조군과 비

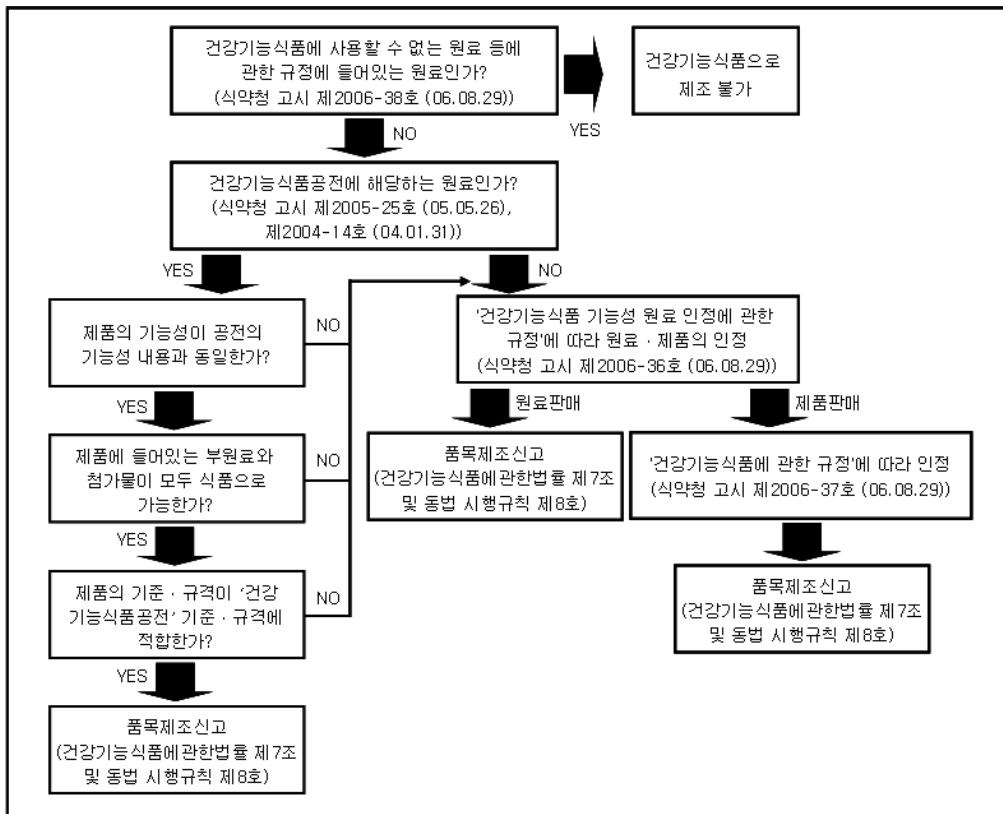
교시 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았으며, 시험물질군 모두에서 총 적혈구 중 다염성적 혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다. 한편, 양성대조군의 소핵유발빈도는 음성대조군과 비교하여 현저한 증가가 인정되었다.

이상의 결과로 진삼은 본 시험의 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

#### 4. 건강기능식품 허가 등록

현재 식품의약품안전청의 건강기능식품에 관한 규정 등에 의한 건강기능식품 품목제조신고를 위한 절차는 아래와 같다.

##### [건강기능식품의 품목제조신고 절차]



진삼의 경우 인삼제품에 속하나 그 규격 및 기능성 내용의 차이가 있어 개별인정형 건강기능식품으로의 허가를 신청하고자 한다.

**[진삼과 인삼제품(농축액 분말)의 규격 및 기능성 내용 비교]**

구분	내용	인삼제품	진삼
규격	성상	고유의 색택과 향미를 가지며, 이미·이취가 없어야 한다.	고유의 색택과 향미를 가지며, 이미·이취가 없어야 한다.
	인삼성분함량	20.0mg/kg 이상 (조사포닌법)	Rg3 4% 이상 (HPLC법)
	인삼성분 확인	Rb1 및 Rg1 확인	Rg3 확인
	수분	7.0 이하	7.0 이하
	카라멜색소	불검출	불검출
	세균수	1g 당 100 이하	1g 당 100 이하
	대장균군	음성	음성
	잔류농약	기준량 이하 (건강기능식품 공전 인삼 및 홍삼제품의 잔류농약시험 참조)	기준량 이하 (건강기능식품 공전 인삼 및 홍삼제품의 잔류농약시험 참조)
기능성내용	원기회복, 면역력 증진, 자양강장에 도움	제2형 당뇨 및 대사증후군 개선	

**가. 기능성 원료 인정신청**

1) 관련규정

건강기능식품에 관한 법률 제15조 제2항 및 “건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정” (식약청 고시 제2006-36호)

2) 구비서류

가) 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서(전자문서로 된 신청서 포함)

나) 제출자료 2부 (원본 1부 포함)

[ 제출자료 목록 ]

(1) 제출자료 전체의 총괄 요약본

(2) 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

- (3) 제조방법 및 그에 관한 자료
- (4) 원료의 특성에 관한 자료
- (5) 기능성분(또는 지표성분)에 관한 자료
- (6) 유해물질에 대한 규격 및 그 설정에 관한 자료
- (7) 안전성에 관한 자료
- (8) 기능성 내용 및 그에 관한 자료
- (9) 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- (10) 보존기준, 유통기간 및 그 설정에 관한 자료
- (11) 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

다) 제출자료를 수록한 CD 1개

라) 검사시료(원료의 특성 및 기준·규격을 검사할 수 있는 적당량) 5개 및 표준물질

주식회사 유유에서는 2005년 4월부터 2007년 4월까지 시행한 농림기술개발연구과제 “인삼 prosapogenin 성분을 이용한 당노 및 대사증후군 개선 기능성식품 개발” 과제를 통해 연구한 내용을 바탕으로 위의 제출자료를 작성하였으며 2006년 4월 중 진삼의 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 자료를 제출할 예정에 있다.

## 나. 건강기능식품 인정 신청

### 1) 관련규정

건강기능식품에 관한 법률 제14조 제2항 및 “건강기능식품 인정에 관한 규정”(식약청 고시 제2006-37호)

### 2) 구비서류

가) 건강기능식품 인정 신청서(전자문서로 된 신청서 포함)

나) 제출자료 2부 (원본 1부 포함)

[ 제출자료 목록 ]

- (1) 제출자료 전체의 총괄 요약본
- (2) 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- (3) 사용원료의 명칭, 기준·규격, 함량 및 그에 관한 자료
- (4) 제조방법 및 그에 관한 자료

- (5) 제품의 기준·규격 및 그 설정에 관한 자료
- (6) 보존기준, 유통기간 및 그 설정에 관한 자료

다) 제출자료를 수록한 CD 1개

라) 완제품으로 최소 포장단위 검사시료 5개 및 표준물질

주식회사 유유에서는 진삼의 건강기능식품으로의 제품 개발을 위해 4월 중 제출예정인 원료에 대한 기능성 인정 자료에 허가를 받은 후 건강기능식품 인정을 위한 자료를 제출하여 당료 및 대사증후군 개선을 위한 건강기능식품의 성공적인 발매를 수행할 예정이다.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 평가의 착안점 및 달성도

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도	
1차 연도	2005	인삼사포닌 배당체 성분 분리 및 동정	5.0 %	인삼사포닌 분리	100%	
			5.0 %	인삼사포닌 동정	100%	
		약효평가	10.0 %	시험관내 기전연구	100%	
			10.0 %	Oral glucose tolerance test (OGTT)	100%	
			10.0 %	유전적 인슐린저항성 질환 동물모델	100%	
		유효성분의 액상소제화 공정 확립	5.0 %	유효성분 대량 생산시스템 확립	100%	
			5.0 %	액상소제화 공정 확립	100%	
		원료표준화 및 고품제 건강기능식품 제형개발	6.0 %	원료추출 및 제조법 연구	100%	
			6.0 %	분석법 연구(원료, 제제)	100%	
			6.0 %	안정성 연구(원료, 제제)	100%	
			6.0 %	Preformulation 연구	100%	
				6.0 %	제제 설계 및 평가	100%
		단회투여시험	20.0 %	단회투여시험	100%	
2차 연도	2006	인삼 prosapogenin 성분분리 및 분석	3.0 %	인삼 prosapogenin 성분 분리	100%	
			3.0 %	인삼 prosapogenin 성분 동정	100%	
			4.0 %	인삼 prosapogenin 성분 함량 분석	100%	
		드링크형 기능성식품 개발	3.0 %	적정 부재료 선정 및 최종 배합 시험	100%	
			3.0 %	드링크형 기능성식품 개발	100%	
			4.0 %	시제품 제조	100%	
		안정성 확립 및 시작용기 제작	6.0 %	안정성 확립 연구 (원료 및 제제)	100%	
			6.0 %	Scale-up 제조공정 연구	100%	
			6.0 %	시작용기 생산	100%	
			6.0 %	포장용기 선정	100%	
			6.0 %	건강기능식품 허가신청	100%	
유전독성시험	25.0 %	유전독성시험	100%			
최종 평가		성분 분리 및 동정	10.0 %	인삼사포닌 분리 동정	100%	
		약효평가	15.0 %	생리활성시험(in vitro, in vivo)	100%	
		드링크형 건강기능식품 개발	10.0 %	액상소제화 공정 확립	100%	
		고형제 건강기능식품 개발	30.0 %	표준화 및 시작용기 제작	100%	
		독성시험	35.0 %	단회 및 유전 독성시험	100%	

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

최종목표	내용	기여도
성분 분리 및 동정	인삼사포닌 분리 동정	인삼 prosapogenin 분리방법 현장지도
약효평가	생리활성시험	인삼 prosapogenin 항당뇨 작용 세계 최초 보고
드링크형 건강기능식품 개발	액상소재화 공정 확립	액상제제 가공방법 현장지도
독성시험	유전 독성시험	인삼 prosapogenin 제제 안전성 세계 최초 보고

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 연구성과활용

#### 1. 산업재산권

본 과제 관련 특허를 참여기업인 (주) 유유에 2건의 기술을 공여하여 출원 등록시킴으로써 항당뇨 기능성식품 개발의 원천 기술로 하고자 한다.

별첨 : 특허 등록증 및 결정서

#### 기술이전 특허 등록 현황

구분 (발명특허, 실용신안 등)	명칭(기술명)	출원국가	출원번호 (출원일)	출원인	등록번호 (등록일)	등록인
발명특허	식초를 이용한 인삼제제 및 이의 제조방법	한국	10-2003-41914 2003년 6월 26일	(주) 유유	10-0635025 2006년 10월 10일	(주) 유유
발명특허	식초가공 인삼제제를 이용한 제2형 당뇨병과 대사증후군의 예방 및 치료용 조성물	한국	10-2004-00272 84 2004년 4월 20일	(주) 유유	10-0635025 2007년 2월 14일	(주) 유유

#### 2. 학술지 게재

본 과제로부터 얻어진 학술적 정보를 SCI급 학술잡지 및 국내잡지에 투고하여 출판됨으로써 본 연구성과를 국내외에 홍보하고자 한다.

별첨 : 게재 학술지

#### 학술지 게재 현황

연구자	연구제목	학술지명	통권, 호	년, 월	발행기관(국명)	SCI 계재여부
윤세나의 3인	Vinegar-Processed Ginseng Radix Improves Metabolic Syndrome Induced by a High Fat Diet in ICR Mice	Arch. Pharm. Res.	30(5)	2007. 5.	대한약학회 (한국)	SCI-E
양병욱의 2인	Quantitative Analysis of Ginsenosides in Red Ginseng Extracted under Various Temperature and Time	Kor. J. Pharma cogn.	37(4)	2006. 12.	한국생약학회 (한국)	등재지

### 3. 학술대회 발표

본 과제로부터 얻어진 학술적 정보를 국내외 국제 학술대회에 투고하여 출판됨으로써 본 연구성과를 국내외에 홍보하고자 한다.

별첨 : 학회 요약집

#### 학술대회 발표 현황

발표자	발표제목	학술대회명	인쇄물 명칭, 통권, 호	년, 월, 일	장소, 국명
고성권의 6인	The Change of Ginsenoside Composition in Ginseng Extract by the Vinegar Process	한국식품과학회	The 73rd Annual Meeting of KoSFoST	2006. 6. 15.	제주, 한국
정성현의 3인	Vinegar-processed ginseng extract prevents the development of metabolic syndrome	국제 약학회	Pharmaceutical Sciences World Congress	2004. 5. 29.	쿄토, 일본

### 4. 산업체 이전활용 계획

본 과제의 전임상자료를 바탕으로 기술이전 참여기업인 (주) 유유(대표, 유승필)는 서울대학교 의과대학 분당병원에 임상시험에 대비한 항당뇨 예비시험을 실시하여 긍정적인 임상시험 데이터를 얻었다.

이를 기반으로 2007년 중반 중에 기업자체 비용으로 서울대학교 의과대학병원에 기능성식

품 개발을 위한 임상시험의 실시를 위한 계약을 체결할 예정이며, 얻어진 임상시험자료를 확보한 2008년 초반에 항당뇨 기능성식품의 허가 및 출시를 목표로 하고 있다.

### 산업화 계획

업체명 (대표자 및 연락책임자)	전화 번호	업체현황 (설립시기, 직원수 등)	산업화시기 (예정)	기업활용유형 (신제품명 및 특성, 공정개선등)
(주) 유유 (유승필, 홍준기)	031-472 -9497	1941. 2. 28. 340명	2008년 상반기	Ginsam(긴삼) 항당뇨 기능식품

#### 5. 교육 및 지도활용

본 과제로부터 도출된 연구개발 결과 및 개발방향을 사회 교육을 통하여 홍보하고자 한다.

#### 교육 및 지도활용 현황

교육명칭	교재명	일시	장소	참석 대상	인원	주요내용	기대효과
생활한방	생활한방	07. 2	제천	시 민	100	인삼 기능성식품 개발	인삼제제 홍보
인삼전문 가과정	우리인삼 의 이해	07. 3	안성	시 민	50	고려인삼의 한방적 효능과 우수성 확인	고려인삼의 우수성 확인

## Vinegar-Processed Ginseng Radix Improves Metabolic Syndrome Induced by a High Fat Diet in ICR Mice

Se Na Yun, Sung Kwon Ko<sup>1</sup>, Kyung Hee Lee<sup>2</sup>, and Sung Hyun Chung

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Oriental Medical Food & Nutrition, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea, and <sup>2</sup>Research Center, Yuyu Inc., Seoul 100-828, Korea

(Received July 9, 2006)

Ginseng has made a successful transition from the world of traditional tonic remedies to conventional medicine, and since the 1920s ginseng root has been documented to be effective in diabetes, hypertension, dyslipidemia and obesity. Based on this wide spectrum of activity we wondered whether ginseng root extract might also be effective in metabolic syndrome (MetSyn). In a series of investigations to develop a potential anti-MetSyn agent, we prepared a vinegar-processed form of ginseng radix (ginsam, GS) and compared its anti-MetSyn effects to those of non-processed ginseng radix (GR) in an ICR mouse model of MetSyn induced by a high fat diet. GR- and GS-treated mice (500 mg/kg/day for 8 weeks) had an 81% and 90% decrease in insulin resistance respectively, compared to the high fat diet (HFD) control. White adipocyte size was dramatically reduced by 67% and 80% in GR- and GS-treated groups respectively, compared to the HFD fed control. This result was reflected by a marked inhibition of weight gain in GS-treated mice (GR vs. GS, 53% vs. 86%). Analysis of ginsenoside composition indicated that prosapogenin Rg<sub>3</sub> might be responsible for the anti-MetSyn activity of GS. In conclusion, Vinegar-processed ginseng radix (GS) was found to have a significantly greater anti-MetSyn effect than ginseng radix, and we suggest that ginsam should be subjected to clinical trials in the future, and that the role of prosapogenin Rg<sub>3</sub> in the anti-MetSyn effect of ginsam should be confirmed.

**Key words:** Vinegar-processed ginseng radix, Metabolic syndrome, High fat diet, Ginsenoside

### INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MetSyn) is a constellation of inter-related risk factors that identify individuals at increased risk of developing type 2 diabetes mellitus (T2DM) and cardiovascular disease (CVD) (Grundey *et al.*, 2004; Gazi *et al.*, 2004). Insulin resistance is believed to be the major underlying metabolic abnormality of MetSyn (Reaven, 2005), and is closely associated with abdominal obesity (McFarlane *et al.*, 2001). The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) identified the components of MetSyn and considered the "obesity epidemic" as mainly due to the rising prevalence of this syndrome (Adult Treatment Panel III Final report, 2002). Recently, the International Diabetes Federation (IDF) proposed a new definition of MetSyn for use in clinical practice and epidemiological studies (The IDF Consensus

Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome, 2005). Central obesity (as estimated by waist circumference) is a prerequisite risk factor for a diagnosis of MetSyn according to this new definition. A diagnosis of MetSyn can be made when central obesity plus two of the other four criteria (raised triglycerides, reduced high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), raised blood pressure, and elevated fasting plasma glucose) are present. Moreover, this new definition, if adopted, is expected to substantially increase the prevalence of MetSyn (Athyros *et al.*, 2005).

The primary goals of treating MetSyn are the prevention of T2DM and CVD. Treatment of MetSyn should be aggressive and multifaceted so as to simultaneously address all the underlying metabolic abnormalities and coexistent risk factors. The most effective therapeutic intervention in patients with MetSyn should be focused on weight reduction and regular physical exercise as well as on drug therapy if therapeutic lifestyle changes are insufficient. Although lipid lowering statins, angiotensin converting enzyme inhibitors, aspirin and some anti-diabetic agents including acarbose and metformin can be used to achieve the recommended

Correspondence to: Sung Hyun Chung, Pharmacology and Clinical Pharmacy Lab, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea  
E-mail: suchung@khu.ac.kr

goals, an agent with therapeutic effects on all the individual components of MetSyn is urgently needed in the clinical setting.

Ginseng, a shade-loving perennial herb cultivated mainly in Korea and China, has been used as a tonic remedy in traditional Chinese medicine for several thousand years (Chevallier, 2000). Moreover, the anti-diabetic, anti-hypertensive, anti-dyslipidemic and anti-obese activities of ginseng root have been documented since the 1920s (Wang, 1965; Sotaniemi *et al.*, 1995; Vuksan *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2001; Yun *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 2000; Kim and Park, 2003; Attele *et al.*, 2002). Based upon these multifaceted activities, we considered that ginseng root is likely to have an anti-MetSyn effect. In a series of investigations to develop a potential anti-MetSyn agent, we prepared a vinegar-processed ginseng radix (ginsam) and compared its anti-MetSyn effects to those of ginseng radix using a high fat diet-induced ICR mouse model of MetSyn.

## MATERIALS AND METHODS

### Ginseng extracts preparation

Ginseng radix (GR) of *Panax ginseng* C.A. Meyer was purchased from Geumsan on August of 2005, and botanically identified by Dr. Chang S. Yook at the Department of Oriental Pharmaceutical Science, Kyung Hee University. A voucher specimen of ginseng radix (registration number 111) was deposited at the Medicinal Plants Herbarium of the School of Pharmacy, Kyung Hee University. 500 g GR powder was extracted twice with 2.5 L 50% ethanol and refluxed at 80–90°C for 4 h.

The vinegar-processed ginseng radix (ginsam, GS) sample was prepared as follows: 8 volumes of fermented vinegar purchased from the market located in Seoul, pH 2.3, was added to 100 ml GR ethanol extract, and then incubated at 90°C for 6 h. Each extract was filtered through filter paper (WHATMAN, England), and the filtrates were combined and concentrated with a vacuum rotary evaporator under low pressure. The residues were freeze-dried and stored in a deep freezer until use.

### Ginsenoside analysis

Standard ginsenosides were bought from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), and the ginsenoside composition of GR and GS were analyzed against calibration curves for the standards. In order to obtain standard calibration curves, 1 mg of each standard ginsenoside was dissolved in 1 mL of methanol. 10 mg of GR or GS extract was dissolved in 1 mL of 40% acetonitrile for HPLC analysis. A Shiseido Nanospace SI-2 HPLC system was used with a reverse-phase BDS Hypersil C-18 column (250×4.6 mm); a mobile phase of deionized

water and acetonitrile; a flow rate of 1.0 mL/min and a diode-array detector.

The standard deviation for triplicate injections was less than 1.0%. The areas corresponding for 250, 500 or 1000 ppm of each ginsenoside were used to analyze ginsenoside profiles of GR and GS.

### Animals and treatment

Five-week-old male ICR mice were purchased from Biogenomics (Seoul, Korea) and acclimatized for 1 week before being randomly assigned to the experimental groups. The animals were housed in individual cages with free access to water in a temperature-controlled facility with a 12:12 h light-dark cycle. The animals were weighed periodically. During the acclimatization period, each animal was fed a regular diet (Dyets Inc., Bethlehem, PA) *ad libitum*. At six weeks old, the ICR mice were randomly divided into five groups; two control and three treatment groups. The control mice continued to receive either a regular diet (RD) or a high-fat diet (HFD), and the treatment groups were fed a high-fat diet together with 500 mg/kg GR, GS or metformin for an 8 week period. Metformin is an anti-diabetic drug that was used as a positive control. The MetSyn induction diet was purchased from Dyets Inc. (AIN-76 diet #101772, Bethlehem, PA, U.S.A.). The nutritional content of the high fat diet was similar to that of the regular diet except for low carbohydrate levels and the addition of beef tallow (Table I). Body weights were determined weekly, and every other week blood was collected for blood glucose analysis. At the end of the study, blood was also collected for the determination of plasma insulin and lipid levels, after which the mice were killed and

Table I. Composition of the diets

Ingredient	Regular diet (g/kg diet)	High fat diet (g/kg diet)
Casein	200	200
DL-Methionine <sup>1</sup>	3	3
Com Starch	150	150
Sucrose	500	150
Cellulose	50	-
Com oil	50	-
Beef tallow	-	400
Mineral mixture <sup>1</sup>	35	35
Vitamin mixture <sup>1</sup>	10	10
Choline bitartrate	2	2
Energy (kJ/g)	0.91	1.30
Protein (% kcal/kg)	13.3	13.3
Carbohydrate (% kcal/kg)	47.4	19.8
Fat (% kcal/kg)	8.0	65.7
Fiber (% kcal/kg)	8.0	-
Other	23.3	1.3

<sup>1</sup> AIN 76A rodent purified diet

brown and white adipose tissues were immediately removed from interscapular and periepididymal fats respectively, for morphological examination.

#### Blood sampling and plasma assay

Blood was withdrawn from the orbital venous plexus every other week, using a heparinized capillary tube without anesthesia. The blood samples were placed on ice, centrifuged, and the plasma stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assaying. The plasma glucose concentration was determined using a glucose oxidase method (Youngdong Pharmaceutical Co, Korea). The plasma insulin concentration was measured according to the protocol described by the manufacturer of the mouse insulin ELISA kit (Shibayagi Co., Japan). Plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C) and non-esterified fatty acid (NEFA) concentrations were determined using commercially available kits (Asan and Youngdong Pharmaceutical Co., Korea).

#### Oral glucose tolerance test

An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at the end of the treatment. On the test day, animals fasted for 9 h, and glucose (1.5 g/kg) was then orally administered. Blood glucose and insulin levels were determined from the orbital venous plexus at 0 (before glucose challenge), 30, 60 and 120 min after glucose administration.

#### Blood pressure measurement

The systolic and diastolic blood pressures (SBP and DBP) were recorded 2 h following the last administration of samples. SBP and DBP were measured in conscious mice using an indirect tail-cuff method, using an electro-sphygmomanometer and a pneumatic pulse transducer (Debiomed Inc., Barcelona, SPAIN). The animals were kept at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 min before measurements were performed. An average of five consecutive readings was used for blood pressure evaluation.

#### Adipose tissue histology

Wedges of periepididymal and interscapular fats from representative mice in each group were fixed overnight in buffered formalin, embedded in paraffin, cut into thin sections (6  $\mu\text{m}$ ) and mounted on glass slides. Hematoxylin

and eosin staining was performed to demonstrate general fat morphology.

#### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, and ANOVA was conducted using the program STATVIEW (Abacus Concepts, Berkeley, CA). When a significant F ratio was obtained ( $P < 0.05$ ) a post hoc analysis was conducted between groups by using a multiple comparison procedure with a Bonferroni/Dunn correction of means (ANOVA) or a Dunnett's post hoc comparison.  $P$  values  $< 0.05$  were considered significant.

## RESULTS

#### Induction of Metabolic syndrome

Obesity, hyperglycemia, hypertension and hypertriglyceridemia developed in ICR mice after 8 weeks on a high fat diet (Table II). Body weights, fasting blood glucose, SBP/DBP, and TG levels of HFD control mice were significantly elevated by 12 g, 83.8 mg/dl, 34/54 mmHg, and 74.5 mg/dl, respectively, versus RD control mice ( $P < 0.001$ ). Since our MetSyn model was developed by feeding a high fat diet to ICR mice based upon NCEP ATP III criteria, these mice were used to investigate the anti-MetSyn effects of GR and GS.

#### Weight gain, food intake and feed efficiency

Body weight and food intake were determined weekly. The body weights of the normal mice in the RD group gradually increased with age over the first 3 weeks and then stabilized. In contrast, the body weight of animals fed HFD rapidly increased during the 8 weeks (Fig. 1). Weight gains in the RD and HFD control groups during the 8 week period were  $11.5 \pm 0.3$  g and  $23.4 \pm 0.4$  g respectively (Table III). Mice fed the HFD together with GR or GS showed gradual increases in body weight, but these were significantly lower than those observed in the HFD control group despite continuous access to the high fat diet. The total weight gain in the GR and GS groups was 53% and 86% respectively of that of the HFD control group. Feed efficiencies, calculated by dividing weight gain by total food intake over the 8 week period, were compared in order to determine the relationship between food intake and weight gain. As shown in Table III, weight gain of

Table II. Metabolic characteristics of regular and high fat diet-induced mice

Group	BW (g)	BG (mg%)	BP (mmHg)		Lipid (mg%)	
			SBP	DBP	TG	HDL-C
RD	$37.0 \pm 1.3$	$122.6 \pm 2.2$	$115 \pm 2$	$59 \pm 2$	$106.4 \pm 2.1$	$84.7 \pm 1.8$
HFD	$49.0 \pm 1.4^{***}$	$206.4 \pm 2.9^{***}$	$149 \pm 3^{***}$	$113 \pm 4^{***}$	$180.9 \pm 2.7^{***}$	$38.8 \pm 1.2^{***}$

Values represent the mean  $\pm$  SE (n=8).  $^{***}P < 0.001$  vs. RD



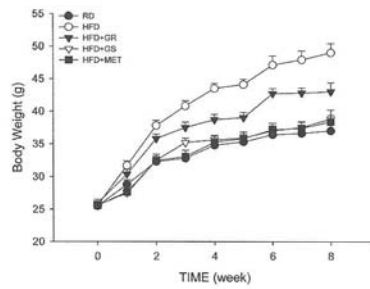


Fig. 1. Effects of GR and GS on body weight gain induced by high fat diet during an 8 week period. Values represent the mean  $\pm$  SE (n=8). GR, 500 mg/kg of ginseng radix; GS, 500 mg/kg of vinegar-processed ginseng radix; MET, 500 mg/kg of metformin.

HFD control mice was found to be due to increased food intake, but the body weights of GR and GS fed mice were found to be significantly lower despite the fact that their food intakes were similar to that of the HFD control mice. The feed efficiency of the GS fed group was 5.6, which was lower than the feed efficiency of both the RD control and the metformin treated groups, indicating that GS may have the potential to allow patients with high food intake and low levels of physical activity to lose weight. On the other hand, the body weights of metformin fed mice were similar to those of RD fed mice, which was probably due to a significant reduction in food intake compared to the HFD control mice.

#### Plasma glucose and insulin levels and insulin resistance indices

Plasma glucose levels were determined every other week from week 1 throughout the 8 week experiment period and compared between groups. Plasma glucose levels were barely elevated in the RD fed control group, but showed a marked increase after the 4<sup>th</sup> experimental

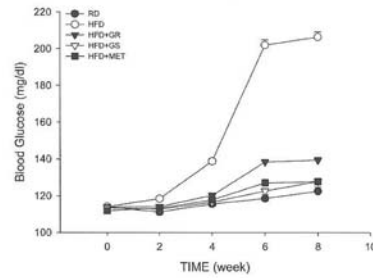


Fig. 2. Effects of GR and GS on plasma glucose level during the 8 week period. Values represent the mean  $\pm$  SE (n=8). GR, 500 mg/kg of ginseng radix; GS, 500 mg/kg of vinegar-processed ginseng radix; MET, 500 mg/kg of metformin.

week in HFD mice (Fig. 2). However, GR and GS mice had significantly lower blood glucose levels (80% and 94% reduction, respectively) than HFD control mice (Table IV). The mean insulin resistance index, calculated as insulin (mU/mL)  $\times$  glucose (mM)/22.5, of the HFD control group was 3.3 times greater than that of the RD group, whereas

Table IV. Effects of GR and GS on plasma insulin and glucose levels, and homeostasis model assessment values for insulin resistance (HOMA-IR)

Group	Dose (mg/kg)	Insulin (IU/ml)	Plasma glucose (nmol/l)	HOMA-IR
RD	-	76.3 $\pm$ 1.7	6.81 $\pm$ 0.12	23.1
HFD	-	147.3 $\pm$ 2.4 <sup>***</sup>	11.47 $\pm$ 0.16 <sup>***</sup>	75.1 <sup>***</sup>
HFD+GR	500	95.1 $\pm$ 2.0 <sup>***</sup>	7.74 $\pm$ 0.08 <sup>***</sup>	32.7 <sup>***</sup>
HFD+GS	500	89.7 $\pm$ 1.9 <sup>***</sup>	7.11 $\pm$ 0.07 <sup>***</sup>	28.3 <sup>***</sup>
HFD+MET	500	86.5 $\pm$ 1.9 <sup>***</sup>	7.10 $\pm$ 0.10 <sup>***</sup>	27.3 <sup>***</sup>

Values represent the mean  $\pm$  SE (n=8). Homeostasis Model Assessment was used to calculate an index of insulin resistance as insulin ( $\mu$ U/mL)/glucose (mM) / 22.5. <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001 vs. RD, <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001 vs. HFD

Table III. Effects of GR and GS on weight gain, food intake and feed efficiency

Group	Dose (mg/kg)	Initial	Final	Weight gain (g / 8wk)	Food intake (g / 8wk)	Feed efficiency ( $\times 10^{-3}$ )
RD	-	25.5 $\pm$ 0.6	37.0 $\pm$ 1.3	11.5 $\pm$ 0.3	1770	6.5
HFD	-	25.6 $\pm$ 0.6	49.0 $\pm$ 1.4 <sup>***</sup>	23.4 $\pm$ 0.4 <sup>***</sup>	2483 <sup>***</sup>	9.4 <sup>***</sup>
HFD+GR	500	25.9 $\pm$ 0.7	43.0 $\pm$ 0.8 <sup>***</sup>	17.1 $\pm$ 0.1 <sup>***</sup>	2440	7.0 <sup>***</sup>
HFD+GS	500	25.6 $\pm$ 0.6	38.8 $\pm$ 0.8 <sup>***</sup>	13.2 $\pm$ 0.1 <sup>***</sup>	2340	5.6 <sup>***</sup>
HFD+MET	500	25.6 $\pm$ 0.1	38.4 $\pm$ 0.9 <sup>***</sup>	12.8 $\pm$ 0.1 <sup>***</sup>	1800	7.1 <sup>***</sup>

Values represent the mean  $\pm$  SE (n=8). Feed efficiency = [weight gain (g / 8wk)] / [food intake (g / 8wk)]

<sup>\*\*\*</sup>P < 0.001 vs. RD, <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001 vs. HFD

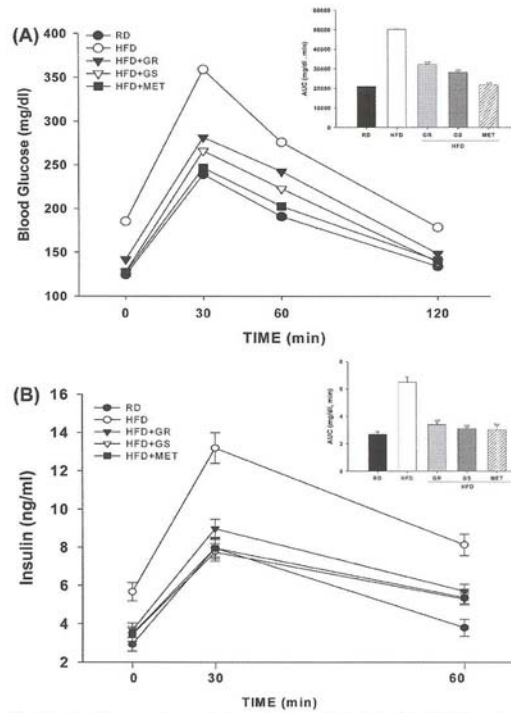


Fig. 3. Plasma glucose (A) and insulin (B) responses to an oral glucose challenge (1.5 g/kg) after 9 h of food deprivation at week 8 in high fat and regular diet fed mice. Values represent the mean  $\pm$  SE (n=8). \*P<0.001 vs. HFD. The inset on the upper right corner shows the area under the curve. GR, 500 mg/kg of ginseng radix; GS, 500 mg/kg of vinegar-processed ginseng radix; MET, 500 mg/kg of metformin.

the mean insulin resistance indices of the GR and GS groups were significantly lower (by 82% and 90%, respectively) than that of the HFD control group. Moreover, the improvement of insulin resistance observed in the GS fed group was significant and comparable to that observed in the metformin treated group.

**Oral glucose tolerance test (OGTT)**

OGTT was performed after administering GR or GS for 8 weeks. Glucose challenge dramatically increased the blood glucose levels of HFD fed mice compared to those of RD fed mice, whereas the GR and GS treated groups

showed significantly lower blood glucose level rises than HFD control mice, especially at the 30 and 60 min OGTT time points (Fig. 3A). When areas under the curve (AUC) were compared between groups, the GR- and GS-treated groups showed 61% and 75% reductions, respectively, in the AUC compared to the HFD control mice. Insulin responses during OGTT were considerably elevated in HFD control mice compared to RD control mice, indicating the presence of insulin resistance (Fig. 3B). Plasma insulin levels in the GR and GS-treated groups were also markedly lower than in the HFD control group by 69% and 89%, respectively.

### Plasma lipid levels

Effects of GR and GS on plasma lipid levels were examined at the end of the treatment. Plasma lipid levels in HFD fed mice were dramatically higher than in RD fed mice except for HDL-C levels (Table V). In the HFD control group, TG was increased by 1.7-fold (106 to 181 mg/dl), LDL-C by 4.2-fold, NEFA by 2.0-fold and TC by 1.9-fold compared to the RD group, and these were associated with an increase in LDL-C concentration. However, GR- and GS-treated groups showed considerably lower levels of TG, TC, LDL-C and NEFA (55%, 79%, 77% and 85% inhibition in the GS group), and increased levels of HDL-C versus the HFD control (179% in the GS group). Metformin also remarkably improved high fat diet induced dyslipidemia, and lipid levels in metformin treated mice were comparable to those in RD fed mice.

### Blood pressure

As shown in Table VI, SBP, DBP and mean blood pressure (MBP) values in HFD fed mice markedly increased by 1.30, 1.91 and 1.62-fold respectively, compared to RD control mice. All parameters in the GR-, GS- and metformin-treated groups were significantly lower than in HFD control group ( $P < 0.001$ ).

Table V. Effects of GR and GS on plasma lipid levels

Group	Dose (mg/kg)	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	NEFA ( $\mu$ Eq/dl)
RD	-	106 $\pm$ 2	162 $\pm$ 4	85 $\pm$ 2	56 $\pm$ 3	695 $\pm$ 5
HFD	-	181 $\pm$ 3 <sup>***</sup>	308 $\pm$ 4 <sup>***</sup>	39 $\pm$ 1 <sup>***</sup>	233 $\pm$ 5 <sup>***</sup>	1362 $\pm$ 8 <sup>***</sup>
HFD+GR	500	160 $\pm$ 2 <sup>**</sup>	218 $\pm$ 2 <sup>**</sup>	62 $\pm$ 1 <sup>**</sup>	124 $\pm$ 4 <sup>**</sup>	949 $\pm$ 5 <sup>**</sup>
HFD+GS	500	140 $\pm$ 2 <sup>**</sup>	193 $\pm$ 2 <sup>**</sup>	70 $\pm$ 1 <sup>**</sup>	96 $\pm$ 3 <sup>**</sup>	794 $\pm$ 6 <sup>**</sup>
HFD+MET	500	116 $\pm$ 3 <sup>**</sup>	172 $\pm$ 3 <sup>**</sup>	78 $\pm$ 1 <sup>**</sup>	71 $\pm$ 2 <sup>**</sup>	724 $\pm$ 4 <sup>**</sup>

Values represent the mean  $\pm$  SE (n=8). TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, HDL-cholesterol; LDL-C, LDL-cholesterol; NEFA, nonesterified fatty acid. LDL-C (mg/dl) = TC-HDL-TG / 5. <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$  vs. RD, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.001$  vs. HFD.

Table VI. Effects of GR and GS on blood pressures

Group	Dose (mg/kg)	Blood pressure (mmHg)		
		SBP	DBP	MBP
RD	-	115 $\pm$ 2	59 $\pm$ 2	77 $\pm$ 3
HFD	-	149 $\pm$ 3 <sup>***</sup>	113 $\pm$ 4 <sup>***</sup>	125 $\pm$ 2 <sup>***</sup>
HFD+GR	500	118 $\pm$ 1 <sup>**</sup>	65 $\pm$ 3 <sup>**</sup>	82 $\pm$ 1 <sup>**</sup>
HFD+GS	500	116 $\pm$ 4 <sup>**</sup>	64 $\pm$ 3 <sup>**</sup>	81 $\pm$ 2 <sup>**</sup>
HFD+MET	500	115 $\pm$ 3 <sup>**</sup>	60 $\pm$ 2 <sup>**</sup>	78 $\pm$ 1 <sup>**</sup>

Values represent the mean  $\pm$  SE (n=8). SBP, Systolic blood pressure; DBP, Diastolic blood pressure; MBP, Mean blood pressure; MBP = DP + 0.33 (SBP-DBP). <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$  vs. RD, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.001$  vs. HFD.

Table VII. Effects of GR and GS on adipose tissues and liver masses

Group	Dose (mg/kg)	Adipose Tissue		Liver
		Epididymal fat	Interscapular fat	
RD	-	0.67 $\pm$ 0.16	0.13 $\pm$ 0.07	1.86 $\pm$ 0.27
HFD	-	2.08 $\pm$ 0.29 <sup>***</sup>	0.23 $\pm$ 0.10 <sup>***</sup>	2.35 $\pm$ 0.31 <sup>***</sup>
HFD+GR	500	1.40 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup>	0.21 $\pm$ 0.09	2.19 $\pm$ 0.30
HFD+GS	500	1.12 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup>	0.15 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>	2.08 $\pm$ 0.29 <sup>**</sup>
HFD+MET	500	0.98 $\pm$ 0.13 <sup>**</sup>	0.15 $\pm$ 0.06 <sup>**</sup>	1.89 $\pm$ 0.26 <sup>**</sup>

Values represent the mean  $\pm$  SE (n=8). <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$  vs. RD, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$  vs. HFD.

### Fat mass and morphology

HFD fed mice increased their body weight by 32% compared to RD fed mice over the 8 week study. Notably, 3.1- and 1.8-fold increases in the masses of white and brown adipose tissues of HFD mice were observed compared to RD control. The mean liver mass of HFD fed mice was also 1.26-fold higher than that of RD fed mice (Table VII). Histological analyses of white and brown adipose tissues further confirmed the above results, and indicated that increases in white and brown adipocyte sizes in HFD fed mice (4.9- and 7.2-fold in diameter) resulted mainly from the accumulation of lipids. Areas of brown adipocytes were reduced by 58% in GS-treated mice compared to HFD control mice (Fig. 4D).

### Ginsenoside composition

Ginsenoside profiles of GR and GS extracts were compared (Table VIII). Whereas GR, an Asian ginseng radix, had a typical ginsenoside profile (a Rb<sub>1</sub>:Rg<sub>1</sub> or Rb<sub>2</sub>:Rc ratio of <3 or >1), the amounts of protopanaxadiol and protopanaxatriol ginsenosides in GS extract were significantly lower, although Rg<sub>3</sub> was not. It is known that the treatment of ginsenoside with heat or diluted acid (e.g., acetic acid) causes the formation of prosapogenins such as Rg<sub>3</sub> by hydrolyzing the glycosidic bond at the 20<sup>th</sup> carbon of the dammarane structure. We compared the ratio of Rg<sub>3</sub> to Rb<sub>1</sub>+Rb<sub>2</sub>+Rc+Rd for GR and GS, and found that this ratio was much higher for GS than for GR.

### DISCUSSION

MetSyn, also termed insulin resistance syndrome or syndrome X, is a prevalent pre-diabetic condition in which certain physiologic and metabolic abnormalities cluster together as a consequence of insulin resistance. MetSyn was originally described by Reaven (Reaven, 1998) as consisting of hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. Each of those components is well recognized as an independent risk factor for cardiovascular morbidity

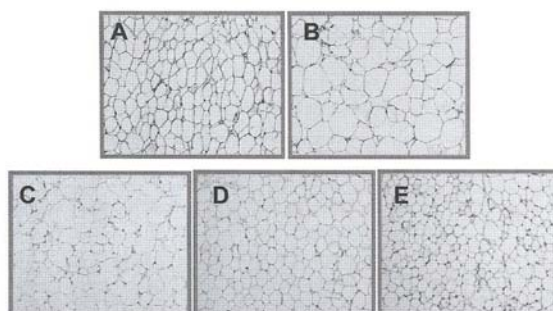


Fig. 4. Morphology of interscapular fat pad. Hematoxylin and eosin-stained paraffin sections of liver from RD (A), HFD (B), GR (C), GS (D), and MET (E). Magnification x 400.

Table VIII. Composition of ginsenosides in ginseng radix (GR) and vinegar-processed ginseng radix (GS)

Samples	Ginsenosides (%)									R'
	Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rc	Rd	Re	Rf	Rg <sub>1</sub>	Rg <sub>3</sub>	R'	
GR	2.42	2.59	2.09	2.41	2.94	0.24	1.17	0.24	0.025	
GS	0.02	0.19	0.41	0.40	0.07	0.11	0.06	4.05	3.971	

R: Rg<sub>3</sub>/Rb<sub>1</sub>+Rb<sub>2</sub>+Rc+Rd

and mortality (Sheu *et al.*, 2000). The inconvenience of treating each of the components of MetSyn with different therapeutic agents would be avoided with the development of a novel agent having multiple modes of action.

*Panax ginseng* has been used to treat several diseases for about a thousand years. Ginsenosides are one of the most active constituents of ginseng radix, and are also responsible for its characteristic odor. Ginseng radix was recently reported by our group to prevent weight gain (Yun *et al.*, 2005), and it has already been established that it reduces cardiovascular risks by lowering blood pressure, improving the lipid profile, and by its anti-atherosclerotic and anti-coagulating properties. Moreover, anti-oxidative and free radical trapping mechanisms are believed to underlie these health-promoting activities.

Several studies have used MetSyn animal models induced by fructose (Hwang *et al.*, 1987; Oron-Herman *et al.*, 2005), a high fat diet (Dyson *et al.*, 2006), or by hydrocortisone supplementation (Chen *et al.*, 2005), and others have used spontaneous models like ZDF rats or ob/ob mice. The purpose of the present study was to develop an animal model of MetSyn and to study the efficacy of a vinegar-processed ginseng radix (GS) in

terms of minimizing the cardiovascular risks associated with metabolic pre-diabetic syndrome. ICR mice were fed a regular diet (RD) or a high fat diet (HFD) for 8 weeks. Compared to RD fed mice, HFD fed mice developed metabolic disturbances similar to those seen in MetSyn, in that they were 32% overweight, had a 68% higher fasting plasma glucose, a 93% higher plasma insulin, 30% and 92% higher SBP and DBP respectively, a 70% higher plasma triglyceride and a 54% lower plasma HDL-C level (Table II). Taken together, mice fed a high fat diet showed the cardinal features of MetSyn, and thus indicated that this model could be used to examine the anti-MetSyn effects of GR and GS.

The results presented here confirm that GS is a powerful new anti-MetSyn agent. The preventive effects of GS on weight gain were similar to those obtained by an equal dose (500 mg/kg) of metformin (Table III). GS was also found to reduce fasting plasma glucose and insulin concentrations, resulting in a marked improvement in insulin resistance (Table IV). TG and NEFA concentrations were also significantly reduced in GS mice compared to HFD control mice (Table V), suggesting that reductions in insulin levels may enhance TG reduction. Alternatively TG levels may be reduced by enzymes participating in TG synthesis, but this speculation needs further study. Blood pressure (both SBP and DBP) was also remarkably lower in the GR- or GS-treated groups, and these effects were comparable to those obtained by administering metformin (Table VI).

As shown in Table VIII, ginsenoside profiles in GR and GS extracts were quite different and therefore differential effects were expected. Metabolic prediabetic syndrome was more significantly improved by treatment with GS

than by treatment with GR. The reason for this difference is unclear, but a compelling possibility is that the ginsenoside compositions of the extracts are responsible. This possible influence of ginsenosides is supported by the findings of many groups (Sievenpiper *et al.*, 2003; Sievenpiper *et al.*, 2004). Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub> and Rc give rise to Rd by hydrolyzing the glycosidic bond of glucose (61) hexose at the 20<sup>th</sup> carbon, and sequentially Rg<sub>3</sub> is formed by removing a residual glucose at the 20<sup>th</sup> carbon. Although many plausible explanations for the differential efficacies of GR and GS may exist, the ratio (Rg/Rb<sub>1</sub>+Rb<sub>2</sub>+Rc+Rd) or the Rg<sub>3</sub> concentration *per se* might play significant, independent roles.

Our findings suggest that GS integrates the specific features of anti-hyperglycemic, anti-hypertensive, triglyceride-lowering, and possibly weight reducing effects that are necessary for a potential cardiovascular protecting agent. Based on the results obtained in the present study, further investigations are required in order to evaluate the influence of GS on other important inflammatory markers clustering in this syndrome. If GS has a positive influence on these important parameters, this would enhance the potential of GS to serve as a commercial drug in the future. Investigations are also required to identify the mechanistic pathways underlying the effects of GS.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This Study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

#### REFERENCES

- Adult Treatment Panel III. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *Final report. Circulation*, 106, 3143-3421 (2002).
- Athyros, V. G., Ganotakis, E. S., Elisaf, M., and Mikhailidis, D. P., The prevalence of the metabolic syndrome using the National Education Program and International Diabetes Federation definitions. *Curr. Med. Res. Opin.*, 21, 1157-1159 (2005).
- Attele, A. S., Zhou, Y. P., Xie, J. T., Wu, J. A., Zhang, L., Dey, L., Pugh, W., Rue, P. A., Polonsky, K. S., and Yuan, C. S., Antidiabetic effects of Panax ginseng berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes*, 51, 1851-1858 (2002).
- Chen, M., Zhao, L., and Jia, W., Metabonomic study on the biochemical profiles of a hydrocortisone-induced animal model. *J. Proteome Res.*, 4, 2391-2396 (2005).
- Chevallier, A., *Encyclopedia of herbal medicine*. New York: DK Publishing (2000).
- Chung, S. H., Choi, C. G., and Park, S. H., Comparisons between white ginseng radix and rootlet for antidiabetic activity and mechanism in KK<sup>Y</sup> mice. *Arch. Pharm. Res.*, 24, 214-218 (2001).
- Dyson, M. C., Alloosh, M., Vuchetich, J. P., Mokolke, E. A., and Sturek, M., Components of metabolic syndrome and coronary artery disease in female Ossabaw swine fed excess atherogenic diet. *Comp. Med.*, 56, 35-45 (2006).
- Gazi, I., Liberopoulos, E., Mikhailidis, D. P., and Elisaf, M., Metabolic syndrome: clinical features leading to therapeutic strategies. *Vas. Dis. Prev.*, 1, 243-253 (2004).
- Grundy, S., Brewer, B., Cleeman, J., Smith, S., and Lenfant, C., Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific definition. *Circulation*, 109, 433-438 (2004).
- Hwang, I. S., Ho, H., Hoffman, B. B., and Reaven, G. M., Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*, 10, 512-516 (1987).
- Jeon, B. H., Kim, C. S., Kim, H. S., Park, J. B., Nam, K. Y., and Chang, S. J., Effect of Korean red ginseng on blood pressure and nitric oxide production. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 21, 1095-1100 (2000).
- Kim, S. H. and Park, K. S., Effects of Panax ginseng extract on lipid metabolism in humans. *Pharmacol. Res.*, 48, 511-513 (2003).
- McFarlane, S. I., Banerji, M., and Sowers, J. R., Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 716-718 (2001).
- Oron-Herman, M., Rosenthal, T., Mirelman, D., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., and Sela, B. A., The effects of S-allylmercaptocaptopril, the synthetic product of allicin and captopril, on cardiovascular risk factors associated with the metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, 183, 238-243 (2005).
- Reaven, G. M., Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37, 1595-1607 (1998).
- Reaven, G. M., The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin. Chem.*, 51, 931-938 (2005).
- Sheu, W. H., Jeng, C. Y., Young, M. S., Le, W. J., and Chen, Y. T., Coronary artery disease risk predicted by insulin resistance, plasma lipids, and hypertension in people without diabetes. *Am. J. Med. Sci.*, 319, 84-88 (2000).
- Sievenpiper, J. L., Aronson, J. T., Leiter, L. A., and Vuksan, V., Variable effects of American ginseng: a batch of American ginseng with a depressed ginsenoside profile does not affect postprandial glycemia. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 57, 243-248 (2003).
- Sievenpiper, J. L., Aronson, J. T., Lawrence, A., Leiter, L. A., and Vuksan, V., Decreasing, null and increasing effects of eight popular types of ginseng on acute postprandial glycemic indices in healthy humans: the role of ginsenosides. *J. Am. Coll. Nutr.*, 23, 248-258 (2004).
- Sotaniemi, E. A., Haapakoski, E., and Rautio, A., Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes*

- Care, 18, 1373-1375. (1995).
- Sung, J., Han, K. H., Zo, J. H., Park, H. J., Kim, C.H. and Oh, B. H., Effects of red ginseng upon vascular endothelial function in patients with essential hypertension. *Am. J. Chin. Med.*, 28, 205-216 (2000).
- The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, [http://www.idf.org/webdata/doc/IDF-Metasyndrome\\_definition.pdf](http://www.idf.org/webdata/doc/IDF-Metasyndrome_definition.pdf) (2005).
- Vuksan, V., Stevenpiper, J. L., Xu, Z., Wong, E. Y., Jenkins, A. L., and Beljan-Zdrakovic, U., Konjac-mannan and American ginseng: emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.*, 20, 370S-380S (2001).
- Wang, B. X., Advances in study of pharmacology of ginseng. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 12, 477-486 (1965).
- Yun, S. N., Moon, S. J., Ko, S. K., Im, B. O., and Chung, S. H., Wild ginseng prevents the onset of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice. *Arch. Pharm. Res.*, 27, 790-796 (2005).

## 홍삼의 추출 시간 및 온도에 따른 Ginsenosides 함량 비교분석

양병욱 · 한성태<sup>1</sup> · 고성권<sup>2\*</sup>

중앙대학교 생명공학과, <sup>1</sup>KT&G 중앙연구원, <sup>2</sup>세명대학교 한방식물영양학부

### Quantitative Analysis of Ginsenosides in Red Ginseng Extracted under Various Temperature and Time

Byung Wook Yang, Sung Tai Han<sup>1</sup>, and Sung Kwon Ko<sup>2\*</sup>

Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea

<sup>1</sup>KT&G Central Research Institute, Daejeon 350-803, Korea

<sup>2</sup>Department of Oriental Medical Food & nutrition, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

**Abstract** – This study compared the contents of ginsenoside according to the extract conditions of red ginseng to provide basic information for developing functional food using red ginseng. According to the result, the content of crude saponin was highest in 72 hours of extraction at 87°C (RG-823). The content of prosapogenin (ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>) was highest in 48 hours of extraction, and followed by 72 and 24 hours at 82°C. And at 93°C the prosapogenin contents were highest in the order of 48 hours, and next in 24 and 72 hours. In addition, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc and Re were not detected in 72 hours of extraction at 93°C (RG-933) presumably due to hydrolysis, but ginsenoside Rd, Rf and Rg<sub>1</sub> were detected as long as 72 hours of extraction. These results show that protopanaxatriol group is relatively more resistant to heat than protopanaxadiol group.

**Key words** – ginsenoside, red ginseng, prosapogenin, protopanaxadiol, protopanaxatriol

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 한반도가 원산인 한국의 특산 약용식물로 2000이년 전부터 동북아시아에서 보편적으로 사용되어 온 중요한 한약 중의 하나이다. 동양에서 가장 오래된 문헌서인 신농본초경에 인삼은 오장을 보하고, 원기를 보충한다고 기록되어 있다.<sup>1)</sup> 인삼의 생리활성은 체계적인 약리학적 접근으로 심혈관계,<sup>2)</sup> 면역계,<sup>3)</sup> 신경계<sup>4)</sup>에 대한 효능과 폐독작용,<sup>5)</sup> 항암작용<sup>6)</sup> 그리고 항당뇨작용<sup>7)</sup> 등이 보고되었다.

인삼의 주요한 생리활성물질은 인삼사포닌(ginsenosides), polyacetylenes, 산성다당체, 인삼단백질, 레놀성 유질 등이 알려져 있다.<sup>8-10)</sup> 그 중에서 인삼사포닌은 Shibata 등<sup>11)</sup>의 연구에 의해서 그 화학구조가 명확히 확인되었고, 항당뇨 활성<sup>12)</sup>을 비롯하여 항암작용, 항산화작용, 동맥경화 및 고혈압의 예방, 간 기능 촉진 및 숙취제거효과, 항 피로 및 알 스테레스 작용, 노화방지 작용, 두뇌혈류 촉진작용, 항염화성, 알레르기성 질환치료, 단백질합성능력의 촉진 등이 보고되

었다.<sup>13)</sup>

특히, 수삼을 써서 건조한 홍삼은 열에 의해서 생성되는 홍삼 특유 성분인 ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub> 등이 알려 발작용, 입세포성장 억제작용,<sup>14,15)</sup> 혈압강하 작용,<sup>16)</sup> 뇌신경 세포 보호작용,<sup>14)</sup> 항혈전작용,<sup>15)</sup> 항산화작용<sup>11)</sup>이 있다고 하여 홍삼만의 특·장점으로 주목받고 있다.

또한, 홍삼 특유 성분은 인삼사포닌 배당체가 열에 의해서 가수 분해 되어 생성되는 prosapogenin 형태의 인중물인데, 최근에 열이나 압력과 같은 물리적인 방법<sup>17)</sup>과 효소를 이용한 생화학적인 방법<sup>18,19)</sup>에 의해서 고농도 인삼 prosapogenin 체계가 개발되고 있다. 그러나, 인삼을 가공하는 데는 추출 농도를 불하여 진행되는 것이 일반적인데, 인삼가공 추출조건에 따른 생리활성성분의 변화에 대한 체계적인 연구가 되어 있지 않은 점에 착안하여 본 연구는 홍삼 제조기술을 이용하여 홍삼의 추출 시간 및 온도에 따른 인삼 사포닌의 함량을 비교분석함으로써 홍삼의 최적 생리활성 고농도 함유체계의 전문화된 인삼 기능성 식품의 개발에 필요한 기초 자료를 제공하고자 한다.

\*교신저자(E-mail): skko@semyung.ac.kr  
(FAX): 043-649-1759

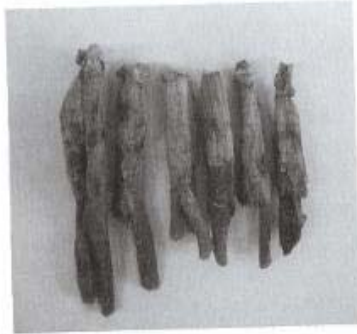


Fig. 1. Figure of red ginseng.

### 재료 및 방법

**실험재료** - 실험재료로 Fig. 1에서 보는바와 같이 15지 6년근 홍삼으로 K사 제품을 서울약령사에서 구입하여 사용하였고, 표본은 세명대학교 한방식품영양학부 천연물연구실에 보관하고 있다.

**추출 및 엑스의 조제** - 추출은 홍삼 건조기 KG-7000(고려파낙스, 한국)을 이용하였고 추출용매는 증류수로 하였으며, 섭씨 82 및 93도에서 24시간, 48시간, 72시간 각각 추출하여 여과한 후, 감압 농축하여 분석용 엑스를 조제하였다. 분석엑스의 시료번호는 RG-821-3, 931-3이다.

**기기 및 조건** - HPLC 장치는 Gilson 305 system (Gilson, 프랑스)이었으며, 컬럼은 Prevail™ Carbohydrate ES 5 μm (250×4.6 mm, Alltech, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile (ACN), isopropyl alcohol (IPA), water (HPLC급, JT Baker, 미국)을 사용하였으며, Solvent A는 (ACN:Water:IPA=80:5:15), Solvent B는 (ACN:Water:IPA=67:21:12)이었고, Solvent B의 비율을 10%에서 85%(28분), 80%(35분), 75%(45분), 90%(50분), 100%(51분), 그리고 25%(57분)로 순차적으로 변화시켜 주고 마지막으로 다시 10%(58분)로 조절하였다. 전기온도는 실온이었고 유속은 분당 0.8 ml이었다. 크로마토그램은 ELSA detector(Alltech, 미국)를 이용하여 검출하였다.

**조 사포닌(crude saponin)의 조제** - 검체 7.0 g을 100 ml의 농축플라스크에 취하고 감압농축 건조한 후 수포화 부탄올(n-butanol) 50 ml를 가하여 환류 냉각기를 붙여 수욕 중에서 70-80°C로 약 1시간 가열 추출한 다음 냉각한 후 여과하고 잔류물에 대하여 같은 조작을 계속 2회 반복하였다. 여지는 수포화 부탄올(n-butanol) 10 ml로 세척하고 여액 및 세척액을 합하여 250 ml 분액깔때기에 넣고 물 20 ml로 잘 진탕시켜 수세하였다. 수포화 부탄올 추출액 전액을 미

리 향량으로 한 농축플라스크에 옮겨 수욕 중에서 감압 농축하여 부탄올을 제거한 다음 그 잔류물에 에테르 50 ml를 넣고 환류냉각기를 붙여 수욕 중에서 36°C로 30분간 가열하여 탈지시킨 후 에테르를 제거하였다. 잔류물은 105°C에서 20분간 건조하고 다시 디시케이티에서 30분간 석회 부재를 담아 다음 식의 공식에 따라 조사포닌 양을 구하였다.<sup>19)</sup>

$$\text{조 사포닌 양(mg/g)} = (A - B)S$$

A : 수포화 부탄올 증류 농축 건조한 후의 플라스크의 무게(mg)

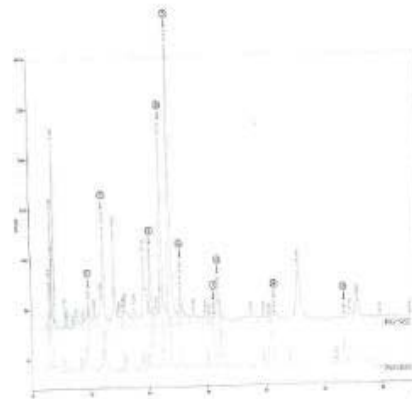
B : 향량으로 한 빈 플라스크의 무게(mg)

S : 검체의 채취량(g)

**HPLC 분석** - 위에서 얻은 시료한 Ko 등<sup>20)</sup>의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표준과 직접 비교하여 ginsenoside의 함량 및 조성을 Fig. 2와 같이 분석하였다. 표준은 Wako Chemical(일본)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside들이었다.

### 결과 및 고찰

현재 우리나라에서 시판되고 있는 K사 6년근 홍삼(300g, 15지)을 대상으로 추출시간 및 온도에 따른 조 사포닌(crude saponin) 및 총 사포닌(total saponin)량과 개별 ginsenosides의 함량 분포를 조사·비교함으로써 추출조건에 따른 시포



① Ginsenoside-Rh<sub>2</sub>, ② -Rh<sub>1</sub>, ③ -Rg<sub>2</sub>, ④ -Rg<sub>1</sub>, ⑤ -Rg<sub>3</sub>, ⑥ -Rf, ⑦ -Re, ⑧ -Rd, ⑨ -Rb<sub>2</sub> + -Rc, ⑩ -Rb<sub>1</sub>

Fig. 2. HPLC profiles of ginsenosides detected from the RG-932, and compared with chromatograms of the standard authentics.



**Table I.** Saponin contents in red ginseng extracted under various conditions (%)

Extracts	82°C			93°C		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
C.S.	7.6	7.2	8.0	5.9	7.9	6.1
T.S.	3.3	2.4	2.1	2.3	3.2	2.0

C.S.: crude saponin, T.S.: total saponin(sum of individual ginsenosides content)

닌 함유량을 중심으로 차이점을 검토하였다. 추출 조건에 있어서는 홍삼제품 생산현장에서 일반적으로 80°C에서 95°C 사이에서 추출하고 있으므로 82°C와 93°C를 설정하여 추출 시간 별로 검토하였다.

Table I에서와 같이 최용공전법에 따라 1회씩 실시하여 추출한 조 사포닌 함은 82°C에서는 72시간 추출한 RG-823가 8.0%로 높은 함량을 나타내었고, 93°C에서는 48시간 추출한 RG-932가 7.9%로 가장 높은 함량을 나타냈다. 또한, 본 실험한 ginsenosides의 총합인 총 사포닌 함에 있어서는 82°C에서 24시간 조건에서 추출한 RG-821이 3.3%로 높은 함량을 나타내었고, 93°C에서 48시간 조건에서 추출한 RG-932가 3.2%로 가장 높은 함량을 나타냈다. 따라서, 82°C의 조건에 있어서 조 사포닌은 72시간, 총 사포닌은 24시간 추출시 가장 높은 함량을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었고, 93°C의 조건에 있어서 조 사포닌과 총 사포닌 공히 48시간 추출시 가장 높은 함량을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다. 최대 총 사포닌 함량을 나타낸 82°C에서 24시간 조건에서 추출한 RG-821의 함량은 비<sup>1)</sup> 등이 보고한 홍삼의 총사

포닌 함인 1.3%보다 2.6배 높은 함량을 나타냈다.

또한, 홍삼을 증숙할 때 생성되는 홍삼 특유성분으로 항암 및 항진이 억제활성<sup>11,12)</sup>을 나타내는 prosapogenin(ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>)의 함량에 있어서는 Table II에서 보는바와 같이 82°C와 93°C에서 공히 48시간 추출시 1.3%, 1.4%로 가장 높은 함량을 나타냈다. 특히, 93°C 조건에서는 48시간 추출시 1.4%이었으나, 72시간 추출시 0.7%로 현저히 함유량이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 최대 prosapogenin 함량을 나타낸 93°C에서 48시간 조건에서 추출한 RG-932의 함량은 비<sup>1)</sup> 등이 보고한 홍삼의 prosapogenin 총합인 0.04%보다 32배 정도 높은 함량을 나타냈다.

한편, protopanaxadiol group 사포닌 해당체 성분(PDG, Rh<sub>1</sub>+Rh<sub>2</sub>+Rc+Rd)과 protopanaxatriol group 사포닌 해당체 성분(PTG, Re+Rf+Rg<sub>2</sub>)의 비율(Diol, G/Triol, G)에 있어서는 Table II에서 보는바와 같이 82°C와 93°C에서 공히 추출 시간이 길어지면서 낮은 비율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 93°C에서 72시간 조건에서 추출한 RG-932에 있어서는 ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>, Rc와 Re는 함량이 측정되지 않았으나, ginsenoside Rd, Rf와 Rg<sub>2</sub>는 함유량이 측정되었다. 이와 같은 결과는 인삼 사포닌(ginsenosides) 즉, dammarane group triterpenoid saponin의 두 종류의 골격군(PDG, PTG) 중에서 PDG가 PTG에 비하여 열처리에 의해 서 보다 쉽게 가수 분해된다고 판단되며, PTG가 열에 보다 안정한 골격군으로 해석된다. 그러나, PDG 중 ginsenoside Rd와 PTG 중 ginsenoside Re는 두 dammarane group이 나타내는 공통적인 특징과는 다른 경향을 나타냈다. 이와 같은 결과는 홍삼 추출물의 응용에 있어서 최적의 생리활성

**Table II.** Ginsenoside contents in red ginseng extracted under various conditions (% w/w)

Ginsenosides	82°C			93°C		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Rh <sub>1</sub>	0.485±0.005	0.127±0.011	0.048±0.029	0.184±0.009	0.017±0.114	Trace
Rh <sub>2</sub> +Rc	0.296±0.046	0.075±0.089	0.026±0.009	0.092±0.112	0.048±0.006	Trace
Rd	0.153±0.007	0.102±0.038	0.125±0.071	0.085±0.091	0.152±0.139	0.151±0.035
Re	0.194±0.036	0.055±0.006	0.021±0.008	0.069±0.037	0.016±0.069	Trace
Rf	0.188±0.078	0.163±0.011	0.150±0.011	0.150±0.008	0.273±0.009	0.149±0.014
Rg <sub>1</sub>	0.933±0.038	0.641±0.007	0.595±0.006	0.581±0.122	1.254±0.117	1.033±0.017
Rg <sub>2</sub>	0.152±0.008	0.180±0.178	0.166±0.119	0.190±0.061	0.234±0.039	0.106±0.178
Rg <sub>3</sub>	0.487±0.029	0.499±0.126	0.390±0.128	0.458±0.124	0.464±0.108	0.139±0.134
Rh <sub>1</sub>	0.325±0.121	0.488±0.049	0.433±0.038	0.434±0.014	0.585±0.183	0.333±0.038
Rh <sub>2</sub>	0.084±0.132	0.098±0.122	0.117±0.024	0.087±0.063	0.144±0.059	0.074±0.056
Diol, G/Triol, G <sup>2)</sup>	0.710	0.404	0.260	0.451	0.141	0.128
Prosapogenin <sup>1)</sup>	1.048	1.265	1.106	1.169	1.427	0.652

<sup>2)</sup>Ginsenoside Rh<sub>1</sub>+Rh<sub>2</sub>+Rc+Rd/Rf+Rf+Rg<sub>2</sub>

<sup>1)</sup>Ginsenoside Rg<sub>1</sub>+Rg<sub>2</sub>+Rh<sub>1</sub>+Rh<sub>2</sub>

Values represent the mean±S.E. (n=3)

고농도 함유물에 대한 정보를 주는 것이며, 홍삼을 가공해서 고농도 홍삼 함유 성분이 함유된 기능성 인삼 제품 개발에 기초정보를 제공하는 절차라 사료된다.

## 결 론

홍삼을 대상으로 추출 조건에 따른 ginsenosides의 함량에 미치는 영향을 검토한 결과, 조 사포닌의 함량은 82°C 72시간 추출 조건에서 가장 높은 함량을 나타냈고, prosapogenin량은 82°C에서는 48시간 추출 조건에서 가장 높은 함량을 나타냈고, 72시간, 24시간의 순이었고, 93°C에서도 48시간 추출 조건에서 가장 높은 함량을 나타냈고, 24시간, 72시간의 순이었다. 결론적으로, 홍삼 특유성분인 prosapogenin을 가장 많이 함유하게 하는 추출조건은 82°C와 93°C 중, 48시간이었고, 조 사포닌 함에 있어서는 82°C의 추출 조건에서 보다 높은 함량을 보여주었다.

## 사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 인용문헌

- Nambu, T. (1980) The Encyclopedia of Wakan-Yaku with Color Pictures (I), 1-5, *Hokkaido*, Osaka.
- Lee, D. C., Lee, M. O., Kim, C. Y. and Clifford, D. H. (1981) Effect of ether, ethanol and aqueous extracts of ginseng on cardiovascular function in dogs. *Can. J. Comp. Med.*, **45**: 182-187.
- Jie, Y. H., Cammisuli, S. and Baggolini, M. (1984) Immunomodulatory effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer in the mouse. *Agents Actions*, **15**: 386-391.
- Kim, Y. C., Kim, S. R., Markelaris, G. J. and Oh, T. H. (1998) Ginsenosides Rb<sub>1</sub> and Rg<sub>1</sub> protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.*, **53**: 426-432.
- Joo, C. N., Koo, J. D., Kim, D. S. and Lee, S. J. (1977) Biochemical studies of ginseng saponins. XI. The effects of ginseng saponins on alcohol dehydrogenase. *Hangjuk Saenghwa Hakhoeschi*, **10**: 109-120.
- Tahara, M., Kono, H., Mura, S. and Odashima, S. (1985) Action of ginsenosides on tumor cells. Growth inhibition and redifferentiation of neoplasia. *Wakan Yaku Gakkaishi*, **2**: 170-171.
- Yokozawa, T., Kobayashi, T., Oura, H. and Kawashima, Y. (1985) Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb<sub>1</sub> in streptozotocin-diabetic rats. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**: 869-872.
- Park, J. D. (1996) Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng. *Korean J. Ginseng Sci.*, **20**: 389-415.
- Sanata, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S. (1974) Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginseng-R<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rg<sub>1</sub> and Rd. *Chem. Pharm. Bull.*, **22**: 421-428.
- Kitagawa, L., Tanizawa, T., Shibuya, H., Noto, T. and Yoshikawa, M. (1987) Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2): Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *Jokugoku Zasshi*, **107**: 495-505.
- Keum, Y. S., Park, K. K., Lee, J. M., Chun, K. S., Park, J. H., Lee, S. K., Kwon, H. and Surh, Y. J. (2000) Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett.*, **150**: 41-48.
- Kim, S. E., Lee, Y. H., Park, J. H. and Lee, S. K. (1999) Ginsenoside-Rs<sub>1</sub>, a new diol-type ginseng saponin, selectively elevates protein levels of p53 and p21WAF1 leading to induction of apoptosis in SIC-HIEP-1 cells. *Anticancer Res.*, **19**: 487-491.
- Kim, W. Y., Kim, J. M., Han, S. B., Lee, S. K., Kim, N. D., Park, M. K., Kim, C. K. and Park, J. H. (2000) Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J. Nat. Prod.*, **63**: 1702-1704.
- Bao, H. Y., Zhang, J., Yeo, S. J., Myung, C. S., Kim, H. M., Kim, J. M., Park, J. H., Cho, J. S. and Kang, J. S. (2005) Memory enhancing and neuroprotective effects of selected ginsenosides. *Arch. Pharm. Res.*, **28**: 335-342.
- Jung, K. Y., Kim, D. S., Oh, S. R., Lee, I. S., Lee, J. J., Park, J. D., Kim, S. I. and Lee, H. K. (1998) Platelet activating factor antagonist activity of ginsenosides. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**: 79-80.
- Kwon, S. W., Han, S. B., Park, I. H., Kim, J. M., Park, M. K. and Park, J. H. (2001) Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. *J. Chromatogr.*, **921**: 335-339.
- Hasegawa, H., Sung, J. H., Matsumiya, S. and Uchiyama, M. (1996) Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. *Planta Med.*, **62**: 453-457.
- Hasegawa, H., Sung, J. H. and Benno, Y. (1997) Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing ginseng saponins. *Planta Med.*, **63**: 436-440.
- Korea Food and Drug Administration. (2001) Code of Korea Food Regulation 2001, 396-398, Seoul.
- Ko, S. K., Lee, K. H., Hong, J. K., Kang, S. A., Sohn, U. D., Im, B. O., Han, S. T., Yang, B. W., Chung, S. H. and Lee, B. Y. (2005) The Change of Ginsenoside Composition in Ginseng Extract by the Vinegar Process. *Food Sci. Biotechnol.*, **14**: 509-513.

(2006년 7월 31일 접수)

## Change of Ginsenoside Composition in Ginseng Extract by Vinegar Process

Sung Kwon Ko, Kyung Hee Lee<sup>1</sup>, Jun Kee Hong<sup>1</sup>, Sung An Kang<sup>1</sup>, Uy Dong Sohn, Byung Ok Im, Sung Tai Han, Byung Wook Yang, Sung Hyun Chung<sup>2</sup> and Boo Yong Lee<sup>3\*</sup>

Korea Ginseng Institute, Chung Ang University, Ansung, Gyeonggi 456-756, Korea

<sup>1</sup>YiYu Co. Ltd. Central Research Institute, Anyang, Gyeonggi 430-804, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

<sup>3</sup>Graduate School of Complementary Alternative Medicine, Pochon CHA University, Seongnam, Gyeonggi 463-836, Korea

**Abstract** The purpose of this study was to develop a new preparation process of ginseng extract using high concentrations of ginsenoside Rg<sub>3</sub>, a special component in red ginseng. From when the ginseng saponin glycosides transformed into the prosapogenins chemically, they were analyzed using the HPLC method. The ginseng and ginseng extract were processed with several treatment conditions of an edible brewing vinegar. The results indicated that ginsenoside Rg<sub>3</sub> quantities increased over 4% at the pH 2-4 level of vinegar treatment. This occurred at temperatures above 90°C, but not occurred at other pH and temperature condition. In addition, the ginseng and ginseng extract were processed with the twice-brewed vinegar (about 14% acidity). This produced about 1.5 times more ginsenoside Rg<sub>3</sub> than those processed with regular amounts of brewing vinegar (about 7% acidity) and persimmon vinegar (about 3% acidity). Though the white ginseng extract was processed with the brewing vinegar over four hr, there was no change for ginsenoside Rg<sub>3</sub>. However, the VG8-7 was the highest amount of ginsenoside Rg<sub>3</sub> (4.71%) in the white ginseng extract, which was processed with the twice-brewed vinegar for nine hr. These results indicate that ginseng treated with vinegar had 10 times the quantity of ginsenoside Rg<sub>3</sub>, compared to the amount of ginsenoside Rg<sub>3</sub> in the generally commercial red ginseng, while ginsenoside Rg<sub>3</sub> was not found in raw and white ginseng.

**Keywords:** ginseng, brewing vinegar, ginseng saponin, prosapogenin, ginsenoside Rg<sub>3</sub>

### Introduction

Korean ginseng (*Panax ginseng*) is listed as a medicinal herb in the reputable article of *Shennong Bencaojing*, the representative Chinese herbal dictionary. As a special medicinal herb, Korean ginseng has a sweet taste, warms up the body slightly, and is known to be effective in maintaining the health of the lungs and spleen (1). Korean ginseng contains more than 30 different ginseng saponins, which produce various physiological activities (2, 3). These include polyacetylenes, which are known to produce anti-tumor activities on various cancers (4); phenolic compounds produce antioxidant activities (5), proteins, which produce radio-protective activities on victims of nuclear attacks (6), and acidic polysaccharides, which have immune controlling activities in various tests using mouse experimental model (7).

Ginsenosides, or ginseng saponin as it's called, is known as the main pharmacological component of Korean ginseng. The Shibata Group of Tokyo University has identified the chemical structure of ginsenoside (8). Ginsenosides are classified in two groups: protopanaxadiols and protopanaxatriols. The main component of the protopanaxadiols is ginsenoside Rb<sub>1</sub>, which suppresses the overall activity of the central nervous system (CNS). The main component of the protopanaxatriols is ginsenoside Rg<sub>1</sub>, which stimulates the CNS and is important component for explanation of adaptogen activity theory of

Korean ginseng.

Red ginseng (*Ginseng Radix rubra*) refers to the steam-dried ginseng, while white ginseng (*Ginseng Radix alba*) refers to natural-dried ginseng. The ginseng was first dried under sunlight after being skinned and the removal of very fine roots called fine ginseng root (*Ginseng Radix palba*).

Ginsenoside Rg<sub>3</sub> is not found in raw and white ginseng, but it located in red ginseng, which contains a small amount of ginsenoside Rg<sub>3</sub> generated during the steam-dried process. Ginsenosides Rg<sub>3</sub> were found to have produced anticancer activity on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-kappaB activation and tumor promotion (9). Rg<sub>3</sub> also lowered blood pressure by endothelium-dependant relaxation in response to ginsenosides in rat aorta (10). Rg<sub>3</sub> in methanol extract of heat-processed ginseng provided antioxidant and anti-tumor promoting activities (11). But the steam-dried process to prepare red ginseng is expensive and has a low Rg<sub>3</sub> yield. Therefore, to produce more specialized and functionalized ginseng preparation with high concentrations of special components such as Rg<sub>3</sub>, it is essential to develop a lower priced yet more efficient ginseng preparation process. For this reason, many attempts have been made recently to produce a ginseng preparation having high concentrations of ginsenoside Rg<sub>3</sub>.

According to Shibata's 1966 report (8), by hydrolyzing saponin with a weak acid such as acetic acid, the C-20 of glucoside bond (ginsenosides Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, and Rd) is hydrolyzed and only prosapogenin [20(R & S)-ginsenoside Rg<sub>3</sub>] is obtained. However, this process produced only a very small pure standard substance. Meanwhile, to produce a ginseng preparation with high concentrations of

\*Corresponding author: Tel: 82-31-725-8371; Fax: 82-31-725-8350

E-mail: bylee@cha.ac.kr

Received March 24, 2005; accepted July 14, 2005



## 2nd World Congress of the Board of Pharmaceutical Sciences of FIP

### The Global Translation of Science into Drug Development in Advancing Therapy

May 30 - June 3, 2004

Kyoto International Conference Hall, Japan



Sponsored by:  
International Pharmaceutical Federation (FIP)  
American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)  
Association de Pharmacie Galenique Industrielle (APGI)  
Australasian Pharmaceutical Sciences Association (APSA)  
Academy of Pharmaceutical Sciences of Great Britain (APSGB)  
Academy of Pharmaceutical Science and Technology, Japan (APSTJ)  
Controlled Release Society (CRS)  
European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS)  
Pharmaceutical Society of Japan (PSJ)



## Poster presentation at a glance

	Monday, May 31		Tuesday, June 1		Wednesday, June 2	
	Event Hall	Annex Hall	Event Hall	Annex Hall	Event Hall	Annex Hall
Core Topic 1 Analytical Pharmaceutical Chemistry/Physico-pharmaceutical Chemistry		P1A-I-001 P1A-I-029	P2E-I-001 P2E-I-031		P3E-I-001 P3E-I-030	
Core Topic 2 Drug Metabolism/Molecular Pharmacokinetics and -dynamics		P1A-II-001 P1A-II-086	P2E-II-001 P2E-II-101			P3A-II-001 P3A-II-064
Core Topic 3 Biochemical Pharmacology/ Receptor	P1E-III-001 P1E-III-029		P2E-III-001 P2E-III-055			P3A-III-001 P3A-III-020
Core Topic 4 Drug Delivery/Drug Targeting	P1E-IV-001 P1E-IV-098			P2A-IV-001 P2A-IV-085		P3A-IV-001 P3A-IV-093
Core Topic 5 Medicinal Chemistry, Natural Products and Drug Design		P1A-V-001 P1A-V-056	P2E-V-001 P2E-V-048		P3E-V-001 P3E-V-058	
Core Topic 6 Biotechnology/Drug Development	P1E-VI-001 P1E-VI-011			P2A-VI-001 P2A-VI-012	P3E-VI-001 P3E-VI-011	
Core Topic 7 Formulation Research/ Pharmaceutical Research	P1E-VII-001 P1E-VII-043			P2A-VII-001 P2A-VII-031	P3E-VII-001 P3E-VII-057	
Core Topic 8 Genomics Proteomics-based Drug Discovery/Biochemistry and Molecular Biology	P1E-VIII-001 P1E-VIII-026			P2A-VIII-001 P2A-VIII-017	P3E-VIII-001 P3E-VIII-036	
Core Topic 9 Bioavailability/Bio-equivalence	P1E-IX-001 P1E-IX-010			P2A-IX-001 P2A-IX-010	P3E-IX-001 P3E-IX-010	
Core Topic 10 Clinical Pharmaceutical Sciences	P1E-X-001 P1E-X-020			P2A-X-001 P2A-X-021	P3E-X-001 P3E-X-027	
Core Topic 11 Regulatory Affairs	P1E-XI-001 P1E-XI-003			P2A-XI-001	P3E-XI-001 P3E-XI-003	

**P3E-V-028 Rational design and synthesis of novel inhibitors of HIV-1 integrase: implication for binding to two metal ions on the active site of integrase**

Neuri Neamati<sup>1</sup>, Ya-Qiu Long<sup>2</sup>, Xiao-Hua Jiang<sup>2</sup>, Raveendra Dayam<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dept. of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Univ. of Southern California, USA; <sup>2</sup>Shanghai Inst. of Materia Medica, Shanghai Inst. for Biological Sciences, China

**Purpose:** Discovery of diketocacid containing compounds as HIV-1 integrase (IN) inhibitors played a major role in validating this enzyme as an important target for the development of therapeutics against HIV infection. S-1360, the first clinically used IN inhibitor containing a triazole ring as a bioisostere of a carboxylic acid moiety belongs to this class of compounds. In order to understand the role of divalent metal-chelating in the inhibition of IN (J. Med. Chem. 2002, 45, 5661-5670), we designed and synthesized a series of novel dimeric diketo containing compounds with the notion that such dimeric compounds may simultaneously bind to two divalent metal ions on the active site of IN. We rationalized that the two diketo subunits separated by uniquely designed linkers can potentially chelate two metal ions that are either provided from one IN active site or two active sites juxtaposed together in a higher order tetramer.

**Methods:** Using the X-ray structure of IN core domain we designed and synthesized a series of novel diketocacid containing compounds with the potential to chelate divalent metal ions important for the catalytic activities of IN. The activities of all compounds were tested against purified wild type and mutant enzymes as well HIV-1 infected CEM cells.

**Results:** All the new compounds were highly potent against purified IN with varied selectivity for strand transfer, and that some of the analogs exert potent inhibition of the cytopathic effect of HIV-1 in infected CEM cells.

**Conclusions:** We have successfully designed and synthesized a series of novel diketo containing compounds to target two metal ions on the active site of IN. Our docking studies indicated that one of the diketo groups of dimers interacts with Mg<sup>2+</sup> ion, while the second diketo moiety occupies an area near E152. Our study shows that the selectivity for strand transfer is important for antiviral activity but not essential. Moreover, the free carboxylic group is not essential for activity neither against purified IN nor for in cell-based assays. This study represents the first attempt to rationally target two divalent metal ions on the active site of IN, and may have potential implications for the design of second generation diketocacid-containing class of inhibitors.

**P3E-V-030 Tea polyphenols inhibit of acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (a key enzyme in PAF biosynthesis) and PAF-induced platelet aggregation**

Junko Sugatani, Nana Fukazawa, Kouichi Yoshinari, Ikuo Abe, Hiroshi Noguchi, Masao Miwa  
 School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Shizuoka, Japan

**Purpose:** Tea extracts have anti-allergic and anti-inflammatory actions in rats and mice. However the mechanism through which tea polyphenols act *in vivo* are still incompletely understood. We found inhibitory effects of black tea extracts on FMLP-induced aggregating response in a rabbit polymorphonuclear leukocyte (PMN) - platelet system.

**Methods:** To elucidate whether 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF) production in PMNs and/or PAF-stimulated platelet activation were inhibited, the effects of tea polyphenols were investigated on the enzyme activity of acetyl-CoA:1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (EC2.3.1.67), PAF biosynthesis in A23187-activated rabbit PMNs, and rabbit platelet aggregation. By comparing the inhibitory effects of 31 galloyl esters and gallic acid, the structure-inhibitory activity relationship was characterized.

**Results:** Theaflavin and its galloyl esters and pentagalloylglucose were found to be potent inhibitors of the acetyltransferase (IC<sub>50</sub> = 28 - 58 μM) and the PAF biosynthesis as well as (-)-epicatechin-3-O-gallate (IC<sub>50</sub> = 72 ± 13 μM) and (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (IC<sub>50</sub> = 46 ± 6 μM). On the other hand, flavan-3-ols without galloyl group at C-3 and gallic acid did not show significant enzyme inhibition. In addition, theaflavin and its galloyl esters (IC<sub>50</sub> = 32 - 77 μM) and geranyl gallate, farnesyl gallate and geranyleranyl gallate (IC<sub>50</sub> = 6.4 - 7.6 μM) were found to be potent inhibitors of PAF- and TPA-induced rabbit platelet aggregation but not A23187-induced aggregation.

**Discussion:** Theaflavin and its galloyl esters in black tea extract, and isoprenyl gallates were potent inhibitors of PAF synthesis and platelet aggregation and these activities may be relevant to the claimed therapeutic effects of tea extracts.

**P3E-V-029**

Withdraw

**P3E-V-031 Vinegar-processed ginseng extract prevents the development of metabolic syndrome**

Sunghyun Chung<sup>1</sup>, Sena Yun<sup>1</sup>, Kyunghye Lee<sup>2</sup>, Sungkwon Ko<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Coll. of Pharmacy, Kyung Hee Univ., Korea; <sup>2</sup>Research Center, Yuyu Inc., Korea; <sup>3</sup>Korea Ginseng Inst., Chung Ang Univ., Korea

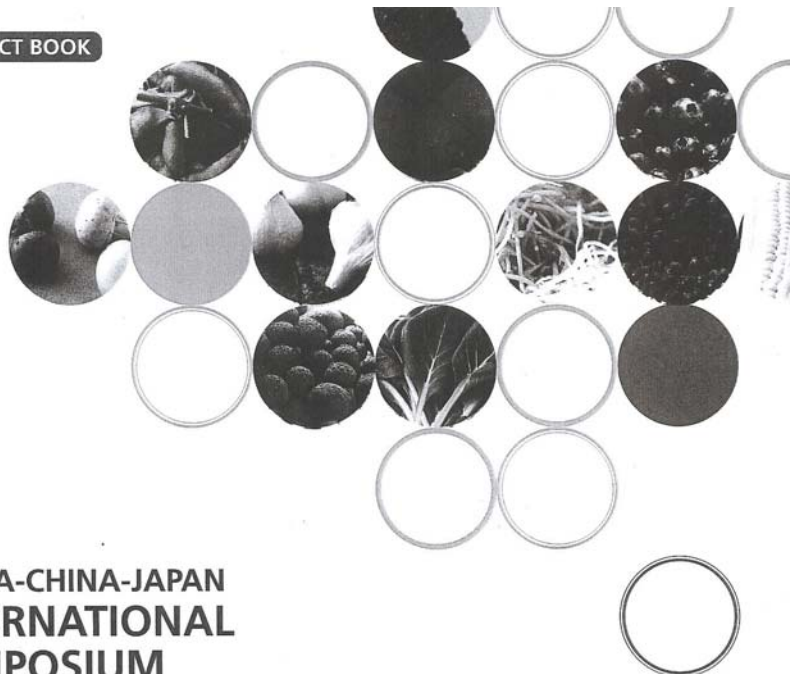
**Purpose:** The constellation of disturbed carbohydrate metabolism, together with truncal obesity, dyslipidemia and hypertension, is referred to as the "metabolic syndrome". Despite engaging in nutrition therapy and exercise, many people having metabolic syndrome need neuropeptide or medication to prevent cardiovascular diseases. Although ginseng has been claimed to have antidiabetic and hypocholesterolemic activities, there appear to be no prior reports on the *in vivo* test of ginseng to modify progressive metabolic syndrome. This study focuses on vinegar-processed ginseng (VPG) extract that could result in better-tolerated anti-metabolic syndrome with multiple actions.

**Methods:** We investigated the prevention of progressive metabolic syndrome by feeding a VPG extract during the course of high fat diet (HFD)-induced metabolic syndrome in ICR mice.

**Results:** Insulin resistance index of VPG extract-treated mice was markedly reduced by 68% compared to HFD control (268.9 vs. 85.3). VPG extract also significantly reduced the plasma triglyceride, cholesterol, LDL-cholesterol and free fatty acid levels by 23%, 37%, 59% and 42%, respectively. In oral glucose tolerance test performed at 9th week after VPG extract administration, VPG extract-treated mice showed much lower glucose and insulin levels compared to those in HFD control group, and VPG extract- and corresponding unprocessed ginseng extract-treated mice showed 44% and 38% lower AUC values (blood glucose level vs. time) compared to the HFD control group, respectively. VPG extract also significantly reduced the area and diameter of adipose tissues, epididymal and interscapular fats, and prevents the differentiation of preadipocytes to adipocytes in a concentration dependent manner.

**Conclusions:** VPG extract has a potential as a preventive agent for metabolic syndrome and deserves clinical trial in future.

ABSTRACT BOOK



**KOREA-CHINA-JAPAN  
INTERNATIONAL  
SYMPOSIUM**


Asian summit for world foods

**2006  
한국식품과학회  
제 73차 학술대회 및 정기총회**

June 14-16, 2006 Jeju ICC

주최  **한국식품과학회**  
Korean Society of Food Science & Technology

후원  **농림부**

 **KFIA 한국식품공업협회**



 **한국과학기술단체총연합회** **한국학술진흥재단**

- P1-001 경인지역 유통식품 중 타르색소 실태조사-학교주변 어린이 기호식품을 중심으로- 김희연, 남해선\*, 이희정, 김서영, 최민정, 이진하, 조수열, 임철주 경인지방식물의약품안전청, 이행신 한국보건산업진흥원
- P1-002 논유립이의 부위별 일반성분 및 아미노산의 정량분석 오병태\*, 강성원, 김병철, 최성길, 조성환 경상대학교 식품공학과·농업생명과학연구원, 최철용 전주국세대학교 식품과학부, 조수현 경상남도농업기술원
- P1-003 전차코를 이용한 두유의 주요 휘발성 성분과 여러종류의 cyclodextrin과의 결합정도 분석 윤애리\*, 노봉수 서울여자대학교 식품과학부
- P1-004 건조 무정 추출물의 생리활성 물질 탐색 구정영, 이정아\* 한국식품연구원
- P1-005 황태의 일반성분분석 및 항산화, 숙취해소활성에 미치는 영향 김준\*, 김재광, 이지현, 김은영, 홍보경, 정원석, 유정연, 김영조 강원대학교 생물자원공학부, 함승식 강원대학교 BT특성과학부
- P1-006 사중 유통 고품추출물의 당함량 박영애\*, 이상미, 김우희, 김남준, 신지영, 김경연 서울보건전문대학연구원
- P1-007 Phytoncides의 휘발성 향기성분에 관한 연구 이경정\*, 이숙중, 윤성원, 이철호 고려대학교 식품공학과
- P1-008 녹차의 재엽시기와 가공 방법에 따른 휘발성 향기성분의 변화 이주연, 박승국\* 경희대학교 식품생명공학과, 황미비, 이법진, 최지영, 백주원 태평양기술연구원
- P1-009 소금의 종류에 따른 풍미 원장의 이화학적 성분 및 isoflavone 함량 특성 김선재\*, 김두운 전남대학교 식품공학과·영양학부, 전종현 대성식품(주), 양은경, 이경희, 마승진, 김학범, 정순태, 함정석 목포대학교 식품공학과 및 천일염생명과학연구소
- P1-010 감귤추출물을 이용한 가공염 제조 및 특성 송현우\*, 조광호, 유영주, 이태훈, 정순태 목포대학교 식품공학과, 장성국, 오현주, 윤수경 목포대학교 식품산업기술연구원, 박인태, 박정숙 진라남도해당바이오산업연구원, 김선재 전남대학교 해양식품공학전공
- P1-011 감귤 메탄올 추출물중 항산화활성 물질의 분리 송현우\*, 조광호, 유영주, 이태훈, 정순태 목포대학교 식품공학과, 장성국, 오현주, 윤수경 목포대학교 식품산업기술연구원, 박인태, 박정숙 진라남도해당바이오산업연구원, 김선재 전남대학교 해양식품공학전공
- P1-012 Effect of the Combination of Individual Phenolics on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) Assay Using ABTS Radicals Kyung-Ryum Park\* and Dae-Ok Kim Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University
- P1-013 GC/MS 및 LC/MS를 이용한 전류농약 신속검사항 개발 김희연\*, 박인선, 윤상현, 박형준, 문형진, 홍혜미, 이진하 경인지방식물의약품안전청 시험분석센터
- P1-014 전조 해조류의 중금속 함유량 조사 박종석\*, 권기태, 차유근, 김영옥, 김혜경, 태형찬, 정종화, 김영훈, 김원 경상남도보건환경연구원
- P1-015 환우유과 요주산 우유의 이화학적 성분, 향기성분 및 비타민에 관한 연구 양승윤\*, 임상봉, 김형봉, 황전봉, 이남희, 전기봉, 김민지, 권신애 한국식품연구원
- P1-016 근적외선 분석기술을 이용한 현미내 결합 함량 측정에 관한 연구 김경화\*, 김효, 이세은, 김동철 한국식품연구원
- P1-017 Used Field Gradient (PFG) NMR을 이용한 콩 내부의 수분 이동과 분포에 관한 연구 김나희\*, 홍영서, 이철호 고려대학교 생명공학원
- P1-018 ICP-MS를 이용한 식품중 알루미늄함량 분석 장영미\*, 이철영, 강우석, 박수현 (주)농심
- P1-019 HPLC 및 LC/MS를 이용한 안식향산 및 피산화벤조일 동시 분석 이종호\*, 이철영, 강우석, 박수현 (주)농심
- P1-020 시판 유당 처리된 한과류의 산해도 평가 이성복\*, 박진용, 장민수, 최영희, 김은희, 태정호, 조남준 서울시보건환경연구원 식의약품부
- P1-021 Sodium chloride와 sodium carbonate 첨가에 따른 밀가루의 특성변화 김순태\* 세종대학교 조리외식경영학과, 박영서, 장학길 강원대학교 생명공학과, 한국표준미생물은행
- P1-022 숙성시간에 따른 yellow alkaline noodle sheet의 색도 변화 김순태\* 세종대학교 조리외식경영학과, 박영서, 장학길 강원대학교 생명공학과, 한국표준미생물은행
- P1-023 Sodium chloride 및 sodium carbonate 첨가에 따른 yellow alkaline noodle sheet의 색도 변화 김순태\* 세종대학교 조리외식경영학과, 박영서, 장학길 강원대학교 생명공학과, 한국표준미생물은행
- P1-024 Dough sheet의 두께에 따른 yellow alkaline noodle sheet의 색도 변화 김순태\* 세종대학교 조리외식경영학과, 박영서, 장학길 강원대학교 생명공학과, 한국표준미생물은행
- P1-025 호밀가루 첨가 bagel의 숙성 및 저장 시간에 따른 texture 및 노화 특성 이남훈\*, 유석형, 박영서, 장학길 강원대학교 생명공학과, 한국표준미생물은행
- P1-026 숙성시간에 따른 호밀가루 첨가 bagel의 관능 특성 유석형\*, 박영서, 장학길 강원대학교 생명공학과, 한국표준미생물은행
- P1-027 친환경농산물의 잔류농약 및 중금속 모니터링 사용법, 황선봉, 허우덕, 남명태, 하재호, 신동민, 최경애 한국식품연구원
- P1-028 국내 전통약주에 대한 항산화능 탐색 정재욱\*, 이광근 동국대학교 식품공학과, 이형구 (주)한국발효기술
- P1-029 Determination of Flavonoids from *Allium victorialis* var. *platyphyllum* and Its Expression of Gap Junctional Intercellular Communication Eun-Young Hong\*, Eun-Jin Kang, Eun-Sook Lee and Gun-Hee Kim Dept. of Food and Nutrition, Daksung Women's University
- P1-030 Fresh-cut 채소제품의 품질인자 도출 및 품질실태 분석 박수연\*, 김진희 덕성여자대학교 식품영양학과, 김동만 한국식품연구원
- P1-031 The Change of Ginsenoside Composition in Ginseng Extract by the Vinegar Process Sung Kwon Ko\* Dept. of Oriental Medical Food and nutrition, Semyung University, Kyung Hee Lee, Jun Kee Hong and Sung An Kang Yellu Co. Ltd. Central Research Institute, Sung Tai Ham KT&G Central Research Institute, Byung Wook Yang Dept. of Biotechnology, Chung-Ang University, Boo Yong Lee Graduate School of Complementary Alternative Medicine, Pechon CHA University
- P1-032 꽃향유 추출물의 총 flavonoids 및 apigenin 함량 분석에 관한 연구 임혜진\*, 김진희 덕성여자대학교 식품영양학과
- P1-033 HPLC를 이용한 식품 중의 항생제 분석 이경민\*, 이광근 동국대학교 식품공학과
- P1-034 잠재적 발암물질인 퓨란의 인체 내 분포조사 이윤경\*, 이광근 동국대학교 식품공학과, 박영석 고려대학교 생명공학원, 이상준 고려대학교 식품과학부
- P1-035 순장지역에서 전통 방식으로 제조한 장아찌 제품들의 이화학적 특성 비교 정도영\*, 정성태, 정은경, 선동화 전북대학교 식품공학과, 김용석 전북대학교 바이오식품 소재개발 및 산업화 연구 센터



PI-031

The Change of Ginsenoside Composition in Ginseng Extract by the Vinegar Process

Sung Kwon Ko\* Dept. of Oriental Medical Food and nutrition, Seomyung University, Kyung Hee Lee, Jun Kee Hong and Sung An Kang JiWi Co. Ltd. Central Research Institute, Sung Tai Han KT&G Central Research Institute, Byung Wook Yang Dept. of Biotechnology, Chung-Ang University, Boo Yong Lee Graduate School of Complementary Alternative Medicine, Pochon CHA University

The purpose of this study was to develop a new preparation process of ginseng extract with the high concentration of ginsenoside Rg3, the special component in red ginseng. Chemical transformation from the ginseng saponin glycosides to the prosapogenin was analyzed by the HPLC. The ginseng and ginseng extract were processed with the several treatment conditions of the edible brewing vinegar. This result showed that the quantity of ginsenoside Rg3 increased over 4% at the pH 2-4 of vinegar treatment and at the temperature of above 90°C than other pH and process temperature. In addition, the ginseng and ginseng extract processed with the twice brewing vinegar (about 14% acidity) produced more ginsenoside Rg3 (about 1.5 times) than those processed with the brewing vinegar (about 7% acidity) and persimmon vinegar (about 3% acidity). Though the white ginseng extract was processed with the brewing vinegar over 4 hours, there was no change in the amount of ginsenoside Rg3. However, the VC8-7 was the highest amount of ginsenoside Rg3 (4.71%) in the white ginseng extract processed with the twice brewing vinegar for 9 hr. This result indicated that the ginseng treated with vinegar had the quantity of the ginsenoside Rg3 over 10 times with compared to the amount of the ginsenoside Rg3 (was not found in raw and white ginseng) in the generally commercial red ginseng.

PI-032

HPLC를 이용한 식품 중의 항생제 분석

이정민\*, 이광근 동국대학교 식품공학과

현대 축·수산업의 형태가 대규모 집단화 됨에 따라 예방을 위한 항생제의 사용이 급증되고 있다. 동물용 의약품에는 항생물질, 항생항균제, 호르몬 물질 등이 있는데 이 중 동물에 대한 항생제 사용의 과용은 각종 질병을 유발하여 흔히 항생제라고 부른다. 국민소득수준의 향상으로 축산물의 소비가 날로 늘어나고 있고 수입자유화로 인한 외국 축산물의 수입이 급증하고 있는 현실에서 이들 축산물 내에 중금속의 오염을 예방하고 가축의 생산성을 향상시키기 위해 사육 시부터 먹는 항생제의 잔유량을 과학적으로 모니터링 하기 위해서는 무엇보다 이들 항생제에 대한 간편하고 신속한 검정방법이 요구된다. 현재 우리나라 식품중 잔류 항생제 분석방법으로는 한국이나 일본과 마찬가지로 항생제별로 개별분석방법으로 분석한다. HPLC를 이용한 분석방법의 연구에 있어서 서로 유사한 정도 있지만 대상 항생제의 종류에 따라 분석기기, 자외선 흡수과, 이동상 용액, 펌프 등의 선정에 따른 기기별의 조건과 다양한 시료준비법 그리고 최종과정에서의 역·액 분배 또는 흡착 및 고상기질체의 사용 등에 따른 시료용액의 조제에서 많은 차이점을 보여주고 있다. 본 시험에서는 각 시료를 추출액으로 만들고 후, solid-phase extraction/ liquid-liquid extraction을 거친 후, 특정 이동상에 녹인 것을 HPLC에 주입한다. 항생제 별 색소검출법은 달리 하였으며, 흡착과 이동상을 변동시켰다. 시료는 자체구입 350종에 대해 HPLC로 분석하였는데, 13개의 시료에서 항생제가 검출되었고, 그 중 7개의 시료는 항생제 검출량에 이차로 분석되었다. 검출량에 이차로 검출된 항생제는 5종의 시료(제지, 소진, 장이진 글)에서 oxytetracycline, tylosin, ampicillin 등 3종의 항생제가 검출되었다. Oxytetracycline과 tylosin은 식품공전의 규제의 기준치 이하로 검출되었으나, ampicillin은 장이진 글에서 0.4와 0.32 ppm이 검출되었다. 현재 수산업에 대한 ampicillin의 규제치가 없으므로 시급히 설정되어야 한다고 판단된다.

PI-033

순장지에서 전통 방식으로 제조한 장아찌 제품들의 이화학적 특성 비교

정도영\*, 정성태, 정은성, 신동화 전북대학교 식품공학과, 김용석 전북대학교 바이오식품 소재개발 및 산업 연구 센터

전통 순장에서 전통 방식으로 제조되고 있는 장아찌를 대상으로 제품 표본화를 위하여 고추장민속마을의 10 품목 30개 제품을 수거하여 이화학적 특성을 조사하였다. 10개 품목 중 원장명인의 pH는 평균 5.36로 가장 높았고, 매실장아찌는 pH 3.03로 가장 낮았으며, 간, 무, 오이, 디더, 마늘, 울의, 된장고추, 간장고추 장아찌는 pH 3.94-4.78을 나타냈다. 총산은 매실장아찌가 1.69%, 된장 명이 1.43%로 높게 나타났으며, 오이장아찌는 0.69%로 낮게 나타났다. 간장고추와 원장명인의 당도는 22.70, 28.79 Brix로 비교적 낮았으며 다른 장아찌의 경우 36.41-55.53 Brix로 높게 나타났다. 염도는 9.15%로 높게 나타났다. 수분은 경우 울의가 70.25%로 높게 나타났으며, 정도는 마늘장아찌가 1577.96 g으로 높게 나타났다. 분석 결과, 전통식으로 제조된 장아찌의 당도(22.70-55.53 Brix)와 염도(3.56-9.15%)가 상당히 높은 것으로 나타나 장아찌 제조 시 염과 열의 농도를 낮출 필요성이 제기되었다.

150

2006년 한국식품과학회

PI-034

꽃향유 추출물의 총 flavonoids 및 apigenin 함량 분석에 관한 일례전\*

김진희 덕성여자대학교 식품영양학과

꽃향유(Eicholtzia splendens)는 국내 전역에 넓게 분포하는 Eicholtziaceae의 자생방향성 식물로서 꽃이 달린 어린잎은 식용으로, 때, 민간에서는 개파기에 전초를 생약으로 사용하는데 발한, 해열, 이종 등에 효력이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 꽃향유의 총 flavonoids 함량과 꽃향유의 주요 flavonoids인 apigenin을 조사하고자 하였다. 꽃향유의 부위별 총 flavonoids 함량을 조사해 결과 3.75 mg/g, 잎(3.00 mg/g), 줄기(0.81 mg/g), 뿌리(0.57 mg/g) 순으로 꽃과 잎이 줄기와 뿌리보다 높은 함량을 보였다. HPLC를 apigenin의 함량조사 결과는 33.27 mg/g, 잎(0.06 mg/g), 줄기(0.02 mg/g), 뿌리(0.02 mg/g) 순으로 조사 되었다. 특히 꽃부위에서 유익으로 함유하고 있는 것으로 조사되었다. Apigenin은 항염, 항근 등의 생리작용으로 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis)에 유효한 성분으로 지 있으며 꽃향유를 이용한 관련 건강기능식품으로서 활용에 대한 더 진행되어야 할 것으로 기대한다.

PI-035

잠재적 발암물질인 퓨란의 인체 내 분포조사

이윤경\*, 이광근 동국대학교 식품공학과, 박형식 고려대학교 생명과학부 이광근 고려대학교 식품공학과

퓨란(Furan)은 여러 퓨란 유도체들의 기본 골격을 이루는 무극성 휘발성 유기화합물이며 식품의 열처리 시 발생하는 자연 생성 화합물로 알려져 있다. 본 연구에서는 새로운 잠재적 발암물질로 의심되고 있는 잠재적 발암인 퓨란의 인체 위해성을 파악하기 위해 인체 시료에 존재하는 퓨란 농도를 관찰하였다. 다양한 인체조직을 대상으로 남녀 성비를 고려하여 자를 선정하고 시료(노, 혈액)를 확보하였다. 정확한 퓨란 분석을 SPME-GCMS분석법을 실시하였다. 노에서는 총 시료 100개 중 4개만(SD: not detected)의 시료 수는 44개이며 가장 높은 퓨란의 시료는 3.14 ppb였고, 혈액 시료에서는 총 시료 100개 중 검출되지 않은 시료는 79개이며 가장 높은 퓨란의 농도는 17.86 ppb였다. 인체 시료 중 퓨란 농도를 연령과 성별로 구분하여 계산한 결과 노 시료에서는 여자보다 약간 높은 값을 보였고, 혈액의 경우 퓨란 농도가 노 시료에 비해 3.2배, 여자는 3.96배 이상 많이 검출되었다. 따라서 노와 혈액 시료가 여자보다 약간 높게 검출되는 것을 알 수 있었다.

PI-036

Quantitative Analysis of Functional Phytochemicals by GC Spectroscopy

Hyun-Jung Cho\*, Dong-Chan Yoo, Hee-Joon Kim and Kwang-Hwan Dept. of Applied Chemistry, Kumoh National Institute of Technol. Kong-Won Khang and Ho Soon Jung Chophitos Corp. Seun-Ah Yang In-Seun Lee Keimyung University

It has been elucidated that the oriental herbs have potent functions for many diseases and also have capabilities for skin and hair care. We performed quantitative analysis of nine phytochemicals (maltol, adenosine, beta-menthone, pulegone, limonene, anethole, estragole, fenchone), which had reported their functionalities. Among many oriental herbs we chose six medicinal herbs, Red Ginseng, Artemisia capillaris Thunb, Schizonepeta tenuifolia Briq, Foeniculum vulgare Mill, and Biota orientalis Limb because they are popular and plants indigenous to Korea. Extracts were obtained various extraction methods with 100% distilled water, 70% isopropanol, isopropanol, ethyl ether, methanol, benzene, 1-butanol, chloroform. phytochemicals were detected and analyzed quantitatively by GCMS spectrometry. Ethyl ether was a good solvent to extract menthene and estragole in Schizonepeta tenuifolia Briq and Foeniculum vulgare Mill. Menthene, pulegone, and estragole were detected concentration-methanol and ethanol extraction with Schizonepeta tenuifolia

첨부(특허 등록증 및 결정서)

**특 허 증**  
CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-0635025 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2003-0041914 호
	출원일 (FILING DATE: YY/MM/DD)	2003년 06월 26일
	등록일 (REGISTRATION DATE: YY/MM/DD)	2006년 10월 10일


발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
석초를 이용한 인삼 제제 및 이의 제조방법


특허권자 (PATENTEE)  
주식회사 유유 ( 134111-0\*\*\*\*\* )  
충청북도 제천시 왕갈동 983

발명자 (INVENTOR)  
고성권 ( 570526-1\*\*\*\*\* )  
서울특별시 강남구 삼성동 102-2 금호어울림아파트 107동

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록  
되었음을 증명합니다.  
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN  
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2006년 10월 10일

 **특 허 정**  
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 인삼 항당뇨 논문 현황

- 1) Effects of ginseng saponin on the metabolites and enzymes of normal and alloxan-intoxicated rats. Rhee et al., Korean J Ginseng Sci 5, 56 (1981)
- 2) Comparative studies on the effects of total, protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins of ginseng: their effects on lipid and glucose content in rat serum. Lim et al., Korean J Ginseng Sci 5, 41 (1981)
- 3) Isolation and Hypoglycemic activity of Panaxans A, B, C, D and E, glycans of Panax ginseng roots. Konno et al., Planta medica 50(5), 434 (1984)
- 4) Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb2 in STZ-diabetic rats. Yokozawa et al., Chem Pharm Bull 33(2), 869 (1985)
- 5) Isolation and hypoglycemic activity of panaxans I, J, K and L, glycans of Panax ginseng roots. Oshima et al., J Ethnopharm 14(2-3), 255 (1985)
- 6) Isolation and hypoglycemic activity of quinquefolans A, B, and C, glycans of Panax quinquefolium roots. Oshima et al., J Nat Prod 50, 188 (1987)
- 7) Study on the hypoglycemic action of ginseng saponin on streptozotocin induced diabetic rats (I). Joo CN and Kim JH, Korean J Ginseng Sci 16, 190 (1992)
- 8) Study on the hypoglycemic action of ginseng saponin on streptozotocin induced diabetic rats (II). Joo et al., Korean J Ginseng Sci 16, 198 (1992)
- 9) Interactions of ginseng extract, ginseng separated fractions, and some triterpenoid saponins (Rb1) with glucose transporters in sheep erythrocytes. Hasegawa et al., Planta Med 60, 153 (1994)
- 10) Effect of Ginseng Radix on GLUT2 protein content in mouse liver in normal and epinephrine-induced hyperglycemic mice. Ohnishi Y et al., Biol Pharm Bull 19(9), 1238 (1996)
- 11) Effects of ginseng radix on sugar absorption in the small intestine. Onomura et al., Am J Chi Med 27, 347 (1999)

- 12) Comparisons between white Ginseng Radix and Rootlet for antidiabetic activity and mechanism in KKAY mice. Chung et al., Arch Pharm Res 24(3), 214 (2001)
- 13) Antidiabetic effects of Panax Ginseng berry extract and the identification of an effective component (Re). Yuan et al., Diabetes 51(6), 1851 (2002)
- 14) Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. Sotaniemi et al., Diabetes Care 18, 1373 (1995)
- 15) American ginseng reduces postprandial glycemia in nondiabetic subjects and subjects with type 2 diabetes mellitus. Vuksan et al., Arch Intern Med 10. 1009 (2000)
- 16) Similar postprandial glycemic reductions with escalation of dose and administration time of American ginseng in type 2 diabetes. Vuksan et al., Diabetes Care 23, 1221 (2000)
- 17) Konjac-Mannan and American ginseng: emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus. Vuksan et al., J Am Coll Nutr 20, 370S (2001)
- 18) American ginseng attenuates postprandial glycemia in a time-dependent but not dose-dependent manner in healthy individuals. Vuksan et al., Am J Clin Nutr 73, 753 (2001)
- 19) Variable effects of American ginseng: A batch of AG with a depressed ginsenoside profile does not affect postprandial glycemia. Vuksan et al., Am J Clin Nutr (in press)
- 20) Comparisons of antidiabetic activities between white ginseng ethanol extract and IH-901 in streptozotocin-induced diabetic rats : Sung Kwon Ko, Jong Hwan Sung, Yong Eui Choi, Chung Ryul Lee, Kyeong Soo Park, Sung Hyun Chung, Yakhak Hoeji, 47(1), 52-55
- 21) Anti-diabetic effects of mixed water extract from Ginseng radix rubra, Acanthopanax cortex, and Cordyceps : Sung Kwon Ko, Jae Soo Kim, Yong Eui Choi, Seung Jung Lee, Kyeong Soo Park, Sung Hyun Chung, Kor. J. Pharmacogn. 33(4), 337-342
- 22) Comparison of antidiabetic effect between Ginseng Radix alba, Ginseng Radix rubra and Panax Quinquefoli Radix in MLD STZ-induced diabetic rats. Kyeong Soo Park, Sung Kwon Ko, Sung Hyun Chung, J. Ginseng Res. 27(2), 56-61

## 제 7 장 참고문헌

1. Namba T. The encyclopedia of Wakan-Yaku with color pictures, Hoikusha. Osaka, Japan (1980)
2. Park JD. Recent studies on the chemical constituents of Korean Ginseng (Panax ginseng C.A.Meyer). Korea J. Ginseng Sci. 20: 389-415 (1996)
3. Yokozawa T, Kobayashi T, Oura H, Kawashima Y. Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb<sub>2</sub> in streptozotocin-diabetic rats. Chem. Pharm. Bull. 33: 869-872 (1985)
4. Matsunaga H, Katano M, Yamamoto H, Mori M, Takata K. Studies on the panaxytriol of Panax ginseng C. A. Meyer Isolation, determination and antitumor activity. Chem. Pharm. Bull. 37(5): 1279-1281 (1989)
5. Suh DY, Han YN, Han BH. Maltol, an antioxidant component of Korean red ginseng, show little prooxidant activity. Arch. Pharm. Res. 19(2): 112-115 (1996)
6. Kim CM, Han GS. Radioprotective effects of ginseng proteins, Yakhak Hoeji. 29(5): 246-252 (1985)
7. Jie YH, Cammisuli S, Baggiolini M. Immunomodulatory effects of Panax ginseng C.A. Meyer in the mouse. Agents Actions. 15: 386-391 (1984)
8. Shibata S, Tanaka T, Ando T, Sado M, Tsushima S, Ohsawa T. Chemical studies on oriental plant drugs (XIV). Protopanaxadiol, a genuine sapogenin of ginseng saponins. Chem. Pharm. Bull. 14: 595-600 (1966)
9. Keum YS, Han SS, Chun KS, Park KK, Park JH, Lee SK, Surh YJ. Inhibitory effects of the ginsenoside Rg<sub>3</sub> on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-kappaB activation and tumor promotion. Mutat Res. 523: 75-85 (2003)
10. Kim ND, Kang SY, Park JH, Schini-Kerth VB. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> mediates endothelium-dependant relaxation in response to ginsenosides in rat aorta : role of K<sup>+</sup> channels. Eur. J. Pharmacol. 367(1): 41-49 (1999)
11. Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. Cancer Lett. 150(1): 41-48 (2000)

12. Kwon SW, Han SB, Park IH, Kim JM, Park MK, Park JH. Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. *J. Chromatogr. A.* 921(2): 335-339 (2001)
13. Ko SK, Lee CR, Choi YE, Im BO, Sung JH, Yoon KR. Analysis of ginsenosides of white and red ginseng concentrates. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 35(3): 536-539 (2003)
14. Lee CR, Whang WK, Shin CG, Lee HS, Han ST, Im BO, Ko SK. Comparison of ginsenoside composition and contents in fresh ginseng roots cultivated in Korea, japan, and China at various ages. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 36(5): 847-850 (2004)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.