

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000202-01

Ginsenoside Rg₅, Rk₁을 고농도로 함유한
인지기능 개선 표준화 기능성식품 개발

Development of standardized functional food possessing
anti-demented properties mediated by high levels of
Ginsenoside Rg₅ and Rk₁

고려인삼연구주식회사

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Ginsenoside Rg5, Rk1을 고농도로 함유한 인지기능 개선 표준화 기능성 식품 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 7 월 30 일

주관연구기관명 : 고려인삼연구(주)
주관연구책임자 : 신 왕 수
협동연구기관명 : 세명대학교
협동연구책임자 : 고 성 권
협동연구기관명 : 강원대학교
협동연구책임자 : 김 형 춘
협동연구기관명 : CHA의과학대학교
협동연구책임자 : 이 부 용

요 약 문

I. 연구개발의 목적 및 필요성

- 흑삼의 고농도 특유성분 중 ginsenoside Rg₅, Rk₁를 분리 화학구조를 확인 동정하고, 생리활성물질을 탐색 분리하여 기존 홍삼과 차별화
- Ginsenoside Rg₅, Rk₁를 고농도로 함유하는 흑삼을 알츠하이머 치매의 동물모델에 응용하여 장단기 기억력, 주의집중력, 학습능력, 운동수행능력, 정서기능 등의 부활 효능을 확인함으로써 치매증 개선 기능식품을 개발
- 인지기능/치매증 개선 기능성을 강화한 명품 흑삼제품을 개발하여 인삼제품의 수출 촉진에 기여하고, 우리 인삼산업의 혁신적 발전에 기여

II. 연구개발 내용 및 범위

- 흑삼 제조 표준화 및 제조공정 최적화
- 특유성분 ginsenoside Rg₅, Rk₁ 및 생리활성성분을 분리 분석하고 그 화학구조를 동정
- 특유성분 고농도 함유 소재 개발
- 특유성분 고농도 함유 흑삼 및 ginsenoside Rg₅, Rk₁에 대한 인지기능 개선 효력시험
- 식품 소재화 가공 및 적정 포장법 개발

Ⅲ. 연구개발결과

- Ginsenoside Rg₅ 및 Rk₁이 고농도로 함유된 제품의 제조방법 표준화 및 제조공정 최적화를 위한 연구가 진행되었으며 그 결과로 4종의 시제품 및 본제품이 생산되었다.
- 특유성분 ginsenoside Rg₅, Rk₁ 및 생리활성성분을 분리 분석하고 그 화학구조를 동정하여 보다 정확한 성분의 정보를 파악하고 아울러 특유성분을 고농도 함유할수 있는 방법을 개발하여 특허출원을 하였고 실용화 추진중이다.
- 특유성분 ginsenoside Rg₅, Rk₁에 대한 일련의 인지기능 개선 효력시험을 통해서 효능을 검증하였다.
- 식품 소재화 가공 및 적정 포장법 개발을 통해서 본제품의 생산에 있어서 효율적이고 적절한 원부자재를 사용할 수 있었고 성공적으로 생산하였다.

Ⅳ. 연구성과 및 성과활용 계획

- Ginsenoside Rg₅, Rk₁을 고농도로 함유하는 차별화된 기능성 강화 흑삼 제품을 개발하여 우리 흑삼제품을 명품화
- 2008년 5,800억원의 국내시장 뿐만 아니라 1,152억달러의 세계 인삼 시장에 명품 흑삼제품을 출시
- 세계 인삼시장에서 3% 정도의 미미한 한국산 인삼제품의 마켓쉐어를 획기적으로 전환하는 계기 마련

SUMMARY

(영문요약문)

I . Purpose & Necessity of Research and Development

- Differentiation with existing red ginseng with identification of the chemical structure by separating ginsenoside Rg₅ and Rk₁ out of highly-concentrated unique components of the black ginseng and with exploration and separation of the bioactive substance
- Development of functional food to improve dementia by applying the black ginseng which include highly-concentrated ginsenoside Rg₅ and Rk₁ to an animal model of alzheimer's dementia to identify recovery effects such as short/long-term memory, concentration, learning ability, exercise ability and emotional function
- Contribution to promoting export of ginseng products and innovative development Korean ginseng industry by developing luxurious black ginseng products with fortified improvement function for cognitive function/dementia

II. Details & Scope of Research and Development

- Standardization of black ginseng production and optimization of production process
- Identification of the chemical structure by separating and analyzing unique components such as ginsenoside Rg₅ and Rk₁, and the bio-active substance
- Development of material containing high-concentrated unique components
- Activity test for improvement of the cognitive function with the black ginseng containing the highly-concentrated unique components, and ginsenoside Rg₅ and Rk₁
- Development of processing and packaging methods for using it as a food material

III. Progress of Research and Development

- Research has been conducted to standardize and optimize the production method for the products containing high-concentrated ginsenoside Rg₅ & Rk₁, and as a result, 4 prototypes and products have been produced
- By separating and analyzing the unique components, ginsenoside Rg₅ and Rk₁, and the bioactive substance identifying the chemical structure to understand more precise component information and to develop a method to contain highly-concentrated unique substance, a patent has been applied and the commercialization is under process
- Effectiveness validation through an activity test for improvement of a set of cognitive function with unique components of ginsenoside Rg₅ and Rk₁
- Through development of processing and packaging methods for using it as a food material, it was able to use efficient and appropriate raw and subsidiary materials to produce products in a successful manner

IV. Research Outcome & Utilization Plan

- Branding our black-ginseng products as luxurious goods by developing differentiated and functionally fortified black ginseng products containing highly concentrated ginsenoside Rg₅ and Rk₁
- Release of luxurious black ginseng products in Korean market with the volume of KRW 580 billion in 2008 as well as in global ginseng market with the volume of USD 115.2 billion
- Arrangement of innovative increase in the market share of Korean ginseng products that only have 3% of the market now

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Overview of research and development9

Chapter 2. The current status of national and international research
and development10

Chapter 3. Contents and results of research and development12

Chapter 4. Achivement and devotion119

Chapter 5. Application plans of research results121

Chapter 6. Foreign information collected128

Chapter 7. The current status of research installation and equipment128

Chapter 8. References129

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	10
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	12
제1절	흑삼 제조 표준화 및 제조공정 최적화	12
1.	흑삼 증숙조건 최적화 연구	
2.	HP-20 resin을 이용한 인삼사포닌 분리 추출 최적화	
3.	원료 및 제제의 안정성 분석 및 확립	
4.	기초물성 및 부형제와의 상호작용 연구	
5.	시제품 및 본제품 개발 및 생산	
제2절	특유성분 분리 분석 및 소재 개발	52
1.	흑삼으로부터 흑삼특유 사포닌 분리 I	
2.	흑삼 특유성분 고농도 함유 인삼 조성물 개발	
3.	흑삼으로부터 흑삼특유 사포닌 분리 II	
4.	단계별 제조 흑삼의 벤조피렌 함량분석	
5.	생리활성성분 대량 분리 동정	
제3절	인지기능 개선 효력시험	92
1.	알츠하이머 치매의 동물모델에서 인지기능 개선 약리효과 평가	
가.	장단기 기억력 평가	
나.	주의 집중력 평가	
다.	잠재학습능력 평가	
라.	운동수행능력 평가	
마.	정서능력 평가	
2.	APP/PS-1 이중발현 생쥐에서 약리효능 평가	
가.	장단기 기억력 평가	
나.	주의 집중력 평가	
다.	잠재학습능력 평가	

- 라. 운동수행능력 평가
- 마. 정서능력 평가

- 3. Acetylcholine system에 대한 약리효과
- 4. 항산화 관련 지표
- 5. 항염증 관련 지표
- 6. 기타 in vivo 실험 결과

제4절 식품 소재화 가공 및 적정 포장법 개발110

- 1. 유효성분의 추출 및 소재화 공정
- 2. 각 공정 단계별 최적화
- 3. 흑삼 제조 및 건조
- 4. 흑삼의 미세 분쇄화 조건
- 5. 대량추출공정 확립
- 6. 대량 건조 및 분쇄 공정 확립
- 7. 적정 대량 포장법 검토

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도119

제1절 연구개발 목표 달성도

제2절 인삼산업 발전에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획124

제1절 연구논문 발표 및 지적재산권 확보

제2절 사업화 방안

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보128

제 7 장 연구시설·장비 현황128

제 8 장 참고문헌129

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 본 연구는 흑삼에서 유래한 Ginsenoside Rg5 및 Rk1에 대하여 원료표준화연구, 제제화연구, 성분분리분석, 식품가공연구, 표준품 개발과 건강기능식품 등록에 필요한 효력시험 등의 전 임상시험을 실시하여 특정질환군에 대한 기능성식품으로 개발하는 것이 최종목표이다.
- 흑삼 제제의 표준화를 위하여 표준 제조법연구, 엑스의 관리기준 설정 및 이에 수반하는 정성, 정량분석법 기술을 확립하고자 한다.
- 흑삼 제제의 기능성식품 등록에 필요한 효능의 검증을 위하여 치매증에 대한 효력시험을 통해 기능성식품으로 사용시의 유효성과 용량에 대한 데이터를 확보하고자 한다.
- 또한 본 연구를 통하여 고려인삼종주국으로서 표준화된 흑삼제제를 기능성 식품의 원료화하여 치매증 개선 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 한다.
- 현재까지 노인성 치매에 대한 근본적인 치료제는 아직 나와있지 않으며 현재 임상적으로 사용되고 있는 약물들은 단지 진행 속도를 늦추어 줄 뿐이며 강력한 약리 작용 만큼 그 부작용도 있어 소화 및 대사 기능이 떨어지는 노인 대상으로 장기 투여하는데 적절하지 못한 측면이 있다. 이를 효과적으로 보완해줄 수 있는 것이 치매증 기능성 식품으로 그 약리적 작용이 비록 약하다 하더라도 안전성이 보장되고 소화 및 흡수 등 순응성이 좋은 경우 실질 효용 면에서 더 효과적일 수도 있다고 본다.
- 본 연구는 흑삼 특유성분 분리 분석 및 소재 개발은 세명대학교에서 수행하며, 인지기능, 운동수행능력, 정서기능 등의 부활 및 항치매효과 시험은 강원대학교 약학대학에서 수행하고, 식품 소재화 가공 실험 및 디자인은 CHA의과학대학교에서 수행하며, 흑삼 제조 표준화 및 제조공정 최적화는 고려인삼연구(주)에서 수행한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 2006년 NBJ(Nutrition Business Journal) 보고에 따르면세계 기능성식품 시장은 2004년 기준 약 2,000억 달러이며 미국이 708억 달러의 매출로 해외 전체시장의 35%를 차지하고 있다.
- 유럽은 647억 달러로 32%, 일본은 364억 달러로 18%를 차지했다. 세계시장 의 85%를 미국, 일본, 유럽등이 차지함으로써 해외 기능성식품시장은 기능성소재 산업 활성화된 선진국 중심으로 발달되고 있음을 알 수 있다. 그러나 우리나라는 약 10억 달러로 0.5%를 차지하고 있다.
- 한국은 1990년대 중반까지 세계 인삼 시장에서 30%대의 높은 시장 점유율을 자랑했다. 고려 인삼이라는 브랜드로 세계에 그 위상을 각인시켰던 한국 인삼의 위력은 충분히 세계 시장에서도 군림할 수 있는 동인으로 작용했다.
- 한국 인삼은 90년대 말을 기점으로 급격하게 추락하기 시작, 이제는 세계 시장 점유율만 놓고 따진다면 존재 자체가 미미해질 정도로 위상이 하락했다. 최근 10년간 세계 인삼 시장은 물량 면에서 5배, 금액 면에서 2.4배가 증가하는 등 홍삼의 세계 시장은 초고속 성장을 거듭하고 있다. 특히 인삼의 효능에 대한 의학적 효과가 입증되고 세계적인 식품이라는 인식이 확대되면서 세계 인삼 시장 규모의 성장은 세계적인 추세로 자리매김 하고 있다.
- 1995년 세계 인삼 수출 시장에서 한국은 무려 38%의 시장 점유율을 차지하였으나 이후 급격히 쇠퇴, 미국과 중국에 훨씬 뒤처지는 상황으로 전락했다. 세계 인삼류 주요국의 수출 시장 규모는 1995년 기준으로 약 368백만 달러로 추정되고 있는데 건조 인삼이 278백만 달러로 전체시장의 75.5%를 차지하고 있으며, 이중 우리나라는 수출 금액 기준('95)으로 세계 교역량의 약 38% 차지를 차지했다.
- 세계 홍삼 시장은 매년 급격한 성장세를 기록, 98년부터 2001년 사이에 시장 규모가 두 배로 늘어났다. 특히 미국 시장의 성장세가 두드러지며 미국은 광활한 토지를 활용, 세계 최대의 인삼 공급 국가로 성장했다. 무려 한국 시장의 100배 가까운 규모를 자랑하면서 세계 인삼 강국으로서의 위치를 확고히 하고 있다. 2001년 기준으로 약 445억 달러 규모로 단연 세계 최고의 시장입니다. 미국에 이어 중국과 일본이 큰 시장을 형성하고 있으며 최근 독일 시장규모가 100억 달러를 넘어서면서 유럽 시장의 확대가 두드러진 특징으로 자리잡고 있다.

○ 2000년도에는 저가격 인삼인 북미 삼과 중국 삼이 전체 교역 규모의 96%를 차지했는데 비해 우리나라 인삼은 3%를 넘지 못하는 참담한 상황이 되었다. 한국은 결론적으로 새로운 수출 활로 모색을 통해 인삼 중주국으로서의 위상을 되찾아야 한다.

○ 국내 관련특허 현황

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
색도 및 유동성이 증가된 홍삼농축액 과립의 제조방법(A method for producing red ginseng extracts with increased chromaticity and fluidity)	주식회사 케이티앤지	한국/1020090095861
원심분리 코팅 방식을 이용한 홍삼농축액 환제 제조방법(Methods for manufacturing pills of red ginseng using Centrifugal Coating)	주식회사 케이티앤지	한국/1020090061529
팽화 발효 홍삼농축액의 제조방법(Manufacturing method of treated puffing and fermentation red ginseng concentrate)	(주)그린바이오	한국/1020110024187
감미 및 제조수율이 개선된 홍삼농축액의 제조방법(Methods for producing red ginseng extracts with improved sweetness and production yield)	주식회사 케이티앤지	한국/1020090119157
쓴 맛이 감소된 홍삼 함유 건강식품 조성물 및 그 제조방법(Red ginseng containing food composition which has reduced bitterness and manufacturing method of the same)	(주)아모레퍼시픽	한국/1020060131795
진세노사이드 Rg3 및 Rh2가 강화된 홍삼농축액 제조방법(A process for preparing an red ginseng extract enriched with ginsenoside Rg3 and Rh2)	대동고려삼 주식회사	한국/1020110072609
유산균 및 효소의 2단계 발효를 이용한 홍삼액의 제조방법(Red ginseng liquid using two step fermentation of lactic acid bacteria and enzyme)	김재광	한국/1020110011180
유산균 2단계 발효를 이용한 홍삼액의 제조방법(Red ginseng liquid using two step fermentation of lactic acid bacteria)	주식회사 누리심	한국/1020110067521
홍삼농축액을 이용한 건강보조식품 및 그의 제조방법(A healthful food using red ginseng extract, and amethod for preparing thereof)	주식회사 케이티앤지	한국/1020010068354
용해성이 우수한 인삼 또는 홍삼 농축액 분말 과립의 제조방법(Methods for Preparing Ginseng or Red Ginseng Granules with an Excellent Solubility)	주식회사 케이티앤지	한국/1020080114112
홍삼농축액의 제조방법(Preparation method of red ginseng extracts)	박희춘	한국/1020090075628
홍삼으로부터 홍삼 추출농축액을 효율적으로 제조하는 신규한 제조방법(New process technology for effective manufacture of red-ginseng extraction and concentration)	최성근	한국/1020120101298
홍삼농축액 제조방법(METHOD FOR MANUFACTURING CONCENTRATED FLUID OF RED GINSENG)	김정호	한국/1020070122450
진세노사이드 Rg3 함량을 증대시킨 홍삼추출물을 유효성분으로 포함하는 항스트레스 조성물(Anti-Stress Composition Comprising Red Ginseng Extract Increased Concentration Of Ginsenosides Rg3)	강은균	한국/1020100037157
진세노사이드의 강화방법(Methods for Enrichment of Ginsenosides)	주식회사 아리바이오	한국/1020110054692

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 흑삼 제조 표준화 및 제조공정 최적화

1. 흑삼 증숙조건 최적화 연구

가. 재료 및 방법

(1) 실험재료

본 연구에 사용한 수삼은 Fig. 1에서 보는바와 같이 경상북도 풍기에서 2009년 9월에 5년근 수삼 10kg을 수집하였고, 얻은 시료를 대상으로 증숙조건별 흑삼제조후, 인삼의 사포닌함량을 비교 검토하였다. 각각의 제품표본은 고려인삼연구(주)에 보관하고 있다.

(2) 증숙조건별 흑삼엑스 조제

수삼 각각 200g씩을 98 °C에서 2시간씩 1번에서 9번까지 증숙하였고, 60 °C 건조기에서 건조하였다. 얻은 흑삼을 세말하여 시료 8g에 에탄올250ml을 넣어 2시간 환류추출후 여과를 2회 반복하고, 감압농축하여 흑삼 엑스를 제조한다.

(3) 조사포닌(crude saponin) 조제

Scheme. 1에서 보는바와 같이 흑삼 엑스 각 2g에 diethylether 50ml를 가하여 1시간씩 3회 초음파 세정기(고도기업, 4020P, 한국)로 추출한후, 원심분리하여 상등액을 제거한다. 얻은 잔사에 수포화 butanol 50ml를 가하여 2시간씩 3회 추출하고, 원심분리하여 상등액을 취하여 여과하고, 감압농축을 하여 조사포닌을 얻는다.

(4) HPLC-ginsenoside의 분석

위에서 얻은 조사포닌을 고 등의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표준과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표준은 Chromadex (U.S.A.)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside를 사용하였다.

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system (Waters, 미국)이며, 컬럼은

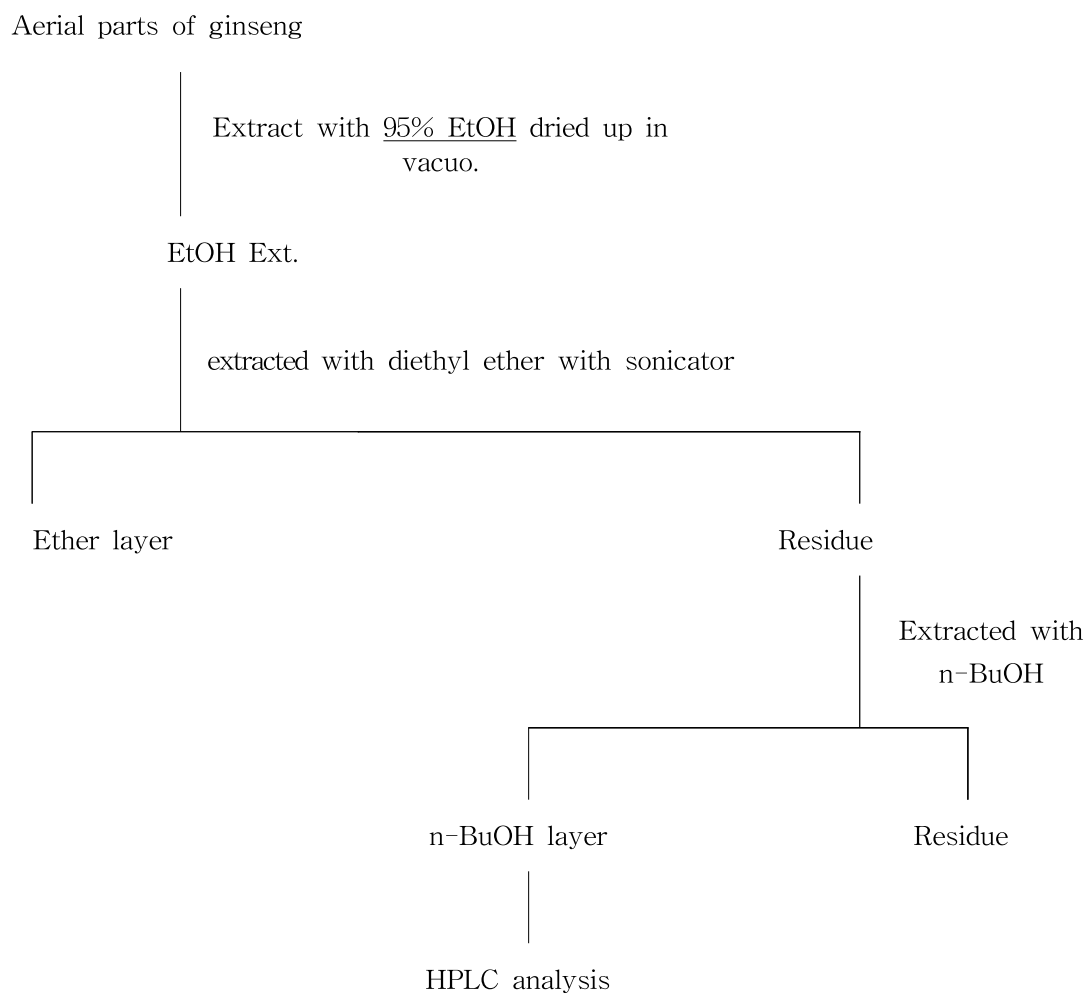
Eurospher 100-5 C18 (250*3mm)을 사용하였다.

이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17%(0 min)에서 30%(35 min), 40%(60 min), 60%(100 min), 80%(110 min)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다.

전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.



Fig. 1. Red Ginseng Portfolio



Scheme. 1. Fractionation of crude saponin

Table 1. HPLC gradient elution on the separation for each of ginsenoside standards

Time	Flow	A% (ACN)	B% (Water)
0	0.8	17.0	83.0
35	0.8	30.0	70.0
60	0.8	40.0	60.0
100	0.8	60.0	40.0
110	0.8	80.0	20.0
120	0.8	80.0	20.0
125	0.8	100	0
135	0.8	100	0
140	0.8	17.0	83.0
150	0.8	17.0	83.0

1) Mobile phase :

Solvent A - ACN

Solvent B - water

2) Flow rate : 0.8 ml/min

3) Column : Eurospher 100-5 C18((Knauer, 3×250mm, Germany)

4) Detector : Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters, U.S.A.)

(5) 단계별 증속 흑삼의 일반적 특성 분석

1) Total sugar (Lane-Eynone Method)

Bertrand 법의 순서를 역으로 하여, 끓고 있는 Fehling용액에 환원당액을 적가하면 적가량에 따라서 아산화동(Cu_2O)이 석출된다. 이때 미량의 methylene blue를 지시약으로 가해 놓으면, 환원당은 2가의 구리(Cu^{2+})가 남아 있을 때는 그것을 환원하고, 2가의 구리(Cu^{2+})가 완전히 아산화동(Cu_2O)으로 되면 그때는 methylene blue를 환원시켜 용액은 청색이 무색으로 변하게 한다. 따라서 구리량을 정확하게 아는 일정량의 Fehling 용액을 적정하면, 환원당용액의 적정치로부터 그당용액의 농도가 구해진다. 이 방법은 시료당용을 뷰렛에 넣어서 사용해야 하는 불편이 있으나, Bertrand 법과 같은 여과조작이 없을 뿐만 아니라, 정확도가 크고 재현성이 높기 때문에 Bertrand 법에 대신해서 널리 이용되고 있다. 그러나 구리와 당의 반응이 이온반응과 같이 순간적으로 진행되지 않음에도 불구하고, 한편으로는 당의 과분해가 일어날 염려가 있기 때문에 적정할 때 끓여 주는 시간을 3분 이내로 제한하고 있다. 이 때문에 적정에 앞서 예비적정을 행해서 대체적으로 적정량을 알아둘 필요가 있다. 이 방법에서도 반응은 화학양론적으로 보아 약간 벗어나기 때문에 경험적으로 Lane-Eynone 당류정량표로부터 개별적으로 당량을 산출한다.

당액 의 소요 량 ml	전 화 당		포 도 당		과 당		맥 아 당		유 당	
	전화당	당액100	포도	당액100	과 당	당액100	맥아당	당액100	유당	당액
	계수	mg	계수	mg	계수	mg	계수	mg	계수	mg
15	50.5	336	49.1	327	52.2	348	77.2	515	64.9	432
16	50.6	316	49.2	307	52.3	327	77.1	482	64.8	405
17	50.7	293	49.3	289	52.3	308	77.0	453	64.8	381
18	50.8	282	49.3	274	52.4	291	77.0	427	64.7	359
19	50.8	267	49.4	260	52.5	276	76.9	405	64.7	340
20	50.9	254.5	49.5	247.4	52.5	262.5	76.8	383.8	64.6	323.0
21	51.0	242.9	49.5	235.8	52.6	250.6	76.7	365.1	64.6	307.6
22	51.0	231.8	49.6	225.5	52.7	239.6	76.6	348.1	64.6	293.6
23	51.1	222.2	49.7	216.1	52.7	229.1	76.5	332.5	64.5	280.6
24	51.2	213.3	49.8	207.4	52.8	220.0	76.4	318.3	64.5	268.8
25	51.2	204.8	49.8	199.3	52.8	211.3	76.4	305.4	64.5	258.0
26	51.3	197.4	49.9	191.8	52.8	203.3	76.4	293.4	64.5	248.0
27	51.4	190.4	49.9	184.9	52.9	196.0	76.2	282.2	64.4	238.5
28	51.4	183.7	50.0	178.5	53.0	189.3	76.1	271.8	64.4	230.0
29	51.5	177.6	50.0	172.5	53.1	183.1	76.0	262.2	64.4	222.2
30	51.5	171.7	50.1	167.0	53.2	177.2	76.0	253.3	64.4	214.7
31	51.6	166.3	50.2	161.8	53.2	171.7	75.9	244.9	64.4	207.8
32	51.6	161.2	50.2	156.9	53.3	166.5	75.9	237.2	64.4	201.3
33	51.7	156.6	50.3	152.4	53.3	161.6	75.8	229.8	64.4	195.0
34	51.8	152.4	50.3	148.0	53.4	157.0	75.8	229.9	64.5	189.7
35	51.8	147.9	50.4	143.9	53.4	152.6	75.7	216.2	64.5	184.3
36	51.8	143.9	50.4	140.0	53.5	148.6	75.6	210.0	64.5	179.2
37	51.9	140.2	50.5	136.4	53.5	144.7	75.6	104.3	64.5	174.3
38	51.9	136.6	50.5	132.9	53.6	140.9	75.5	198.7	64.5	169.8
39	52.0	133.3	50.6	129.6	53.6	137.3	75.5	193.6	64.5	165.4
40	52.0	130.1	50.6	126.5	53.6	134.0	75.4	188.6	64.5	161.2
41	52.1	127.1	50.7	123.6	53.7	130.9	75.4	184.3	64.6	157.6
42	52.1	124.2	50.7	120.8	53.7	127.9	75.3	179.4	64.6	153.8
43	52.2	121.4	50.8	118.1	53.8	125.1	75.3	175.1	64.6	150.2
44	52.2	118.7	50.8	115.8	53.8	122.4	75.2	171.0	64.6	147.0
45	52.3	113.7	50.9	113.0	53.9	119.8	75.1	167.1	64.7	143.7
46	52.3	113.7	50.9	110.6	53.9	117.2	75.1	163.4	64.7	140.6
47	52.4	111.4	51.0	108.4	53.9	114.7	75.1	159.9	64.8	137.8
48	52.4	109.2	51.0	106.2	54.0	112.4	75.1	156.5	64.8	135.0
49	52.2	107.1	51.0	104.1	54.0	110.2	75.0	153.1	64.8	132.2
50	52.5	105.1	51.1	102.2	54.0	108.0	75.0	150.1	64.9	129.8

Fig. 2. Lane-Eynone 당류정량표

1. 계수= Fehling 용액 10ml 에 상당하는 각 당류의 mg수
2. 각 당류는 어느 것이나 무수물

2) Crude ash

(1) 회화용기의 항량

깨끗한 회화용기를 전기로 또는 가스버너에서 600℃ 이상으로 여러 시간 강하게 가열한 후 데시케이터에 옮겨 실온으로 식힌 다음 곧 화학천칭으로 칭량한다. 다시 2시간 강하게 가열하여 건조 칭량하고 이 조작을 항량이 될 때까지 반복한다.

(2) 검체의 전처리

검체를 회화용기에 정밀히 달아 넣고 필요하면 회화에 앞서 다음의 전처리를 한다.

① 전처리가 필요하지 아니한 검체

곡류, 두류, 기타 ② 이하의 항에 포함되지 않는 것

② 미리 건조하여야 하는 검체

수분함량이 많은 동물성식품은 건조기 내에서 될 수 있는 대로 건조시킨다. 액상식품과 액상음료는 수욕상에서 증발 건조시킨다.

③ 예비 탄화시켜야 할 검체

회화할 때 팽창하는 검체로서 당류 및 당함량이 많은 식품, 정제전분, 계란의 흰자위 및 일부의 어육이 속한다. 이들 검체는 버어너의 약한 불로 주의하면서 탄화하든가 또는 열판상에서 적외선램프를 조사하면서 300°C 이하에서 탄화한다.

④ 연소시켜야 할 검체

유지류는 가급적 수분을 제거하고 이것을 과열 또는 점화하여 불꽃이 약해질 때까지 연소시키고 적당한 뚜껑을 덮어 불을 끈다.

(3) 회화

위와 같이 전처리가 끝나면 용기를 그대로 회화로에 옮겨 550 ~ 600°C 에서 여러시간 가열하여 백색 ~ 회백색의 회분이 얻어질 때까지 계속한다.

회화가 끝난 후, 가열을 그치고 그대로 식혀 온도가 약 200°C 로 되었을 때 데시케이타에 옮겨 식힌 후 칭량한다. 만일, 회화에 있어서 대량의 탄소가 남아 회백색의 회분을 얻을 수 없는 검체일 경우에는 얻은 흑회색의 회분을 식힌 다음 약 15 mL의 물을 가하여 탄 덩어리를 유리봉으로 부수어 수욕상에서 잘 가온하여 가용분을 침출하여 정량 여과지로 작은 비이커에 여과하고, 잔류물은 다시 물로 씻어, 씻은 액은 비이커에 넣는다. 여과지상의 잔류물은 여과지와 같이 먼저의 회화용기에 옮겨 건조후 550 ~ 600°C 에서 회화시킨다. 비이커의 액은 수욕상에서 농축하여 잔류물을 회화한 먼저의 회화용기에 옮기고 소량의 물로 비이커를 씻고, 씻은 액도 회화용기에 넣는다. 다시 회화용기를 수욕상에서 증발 건조하고, 500 ~ 600°C 에서 2시간 가열하면 탄소가 함유되지 아니한 회분을 얻는다.

회화한 다음 데시케이타에 옮겨 식히고 실온으로 되면 곧 칭량하여 검체의 회분량(%)을 다음식에 따라 산출한다.

$$\text{회분(\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W_0 : 항량이 된 회화용기에 무게(g)

W_1 : 회화 후의 회화용기와 회분의 무게(g)

S : 검체의 채취량(g)

3) Crude protein(Semi-micro kjeldahl method)

(1) 장치 및 시약

그림과 같은 장치를 쓴다. 전체가 경질유리를 사용하여야 하며, 접촉부위는 잘아 맞춘 것으

로 하여도 좋다. 장치에 쓰는 고무는 수산화나트륨시액속에서 10 ~ 30분간 끓이고, 다음에 물에서 30 ~ 60분간 끓인 다음 물로 충분히 씻어서 쓴다(다만, 동시시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다).

A : 킬달플라스크

B : 수증기 발생기로서 황산 2~3방울을 넣은 물을 넣고 갑자기 끓는 것을 피하기 위하여 비등석을 넣는다.

C : 알칼리용액을 넣는 깔때기

D : 수증기 유도관

E : 내용물이 튀어 올라오는 것을 막는다.

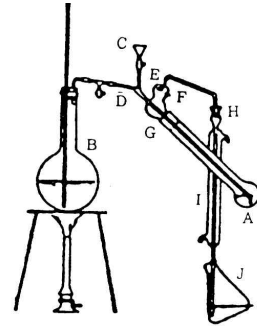
F : 작은 구멍(관의 안지름과 거의 같다.) G, H : 같이 맞춘 접속부위

I : 냉각기(바깥지름 200 mm, 안지름 350 mm, 아래 끝은 약 5 mm)

J : 흡수용플라스크

분해 촉진제 : CuSO_4 , K_2SO_4 (1 : 4)

부런스위크(Brunswik)시액 메틸레드 0.2 g 및 메틸렌블루 0.1 g 을 에탄올 300 mL에 녹여서 여과하여 사용하고 갈색병에 보존한다.



세미마이크로킬달장치

(2) 조작법

(가) 검체의 분해

㉓ 통상적으로 질소(N) 함량이 2 ~ 3 mg에 해당하는 양의 검체를 정밀히 취하여 킬달플라스크에 넣고 여기에 분해촉진제 약 0.5 g을 넣은 후 플라스크 내벽을 따라 황산 3 ~ 5 mL를 넣은 다음 플라스크를 흔들어 주면서 30% 과산화수소 1 mL를 조금씩 조심하여 넣는다.

플라스크를 금망상에서 천천히 가열하고 검체의 탄화물이 보이지 않을 때까지 온도를 높여 끓이고 분해액이 투명한 담청색이 되면 다시 1 ~ 2시간 가열을 계속한다.

분해액을 냉각시킨 후 물 20 mL를 주의하여 가한 후 이 플라스크를 증류장치에 연결한다.

㉔ 비교적 많은 검체(예 : 건조된 식품류)를 취할 필요가 있는 경우에는 질소(N)함량이 약 20 ~ 30 mg에 해당하는 양의 검체를 정밀히 취하여 250 ~ 300 mL 킬달분해플라스크에 넣고 이에 분해촉진제 1 ~ 2 g 및 황산 20 ~ 30 mL를 가하여 가열분해 시킨다.

분해액을 냉각시킨 후 물 약 100 mL를 가하고 200 mL 메스플라스크에 옮겨서 냉각후 물을 가하여 전량을 200 mL로 채워 그 20 mL를 세미마이크로 킬달분해플라스크에 취하여 증류장치에 연결한다.

㉕ 질소(N)함량이 적어서 다량의 검체(예 : 사탕류, 엿류 등)를 취할 필요가 있는 경우에는 질소(N)함량 2 ~ 3 mg에 해당되는 검체를 정밀히 취하여 상기 ㉔의 조작과 같이 가열 분해하고 냉각후 물 20 mL를 주의하여 가하고 킬달분해플라스크를 증류장치에 연결한다.

(나) 증류 및 적정

증류장치의 흡수플라스크에 0.05N 황산 10.0 mL를 취하여 이에 부런스위크시액 2 ~ 3방울

을 떨어뜨려서 냉각기의 끝부분을 액면 밑에 담그고 작은 깔때기로부터 30% 수산화나트륨 용액 25 mL를 가한다.

다음에 수증기 발생기로부터 수증기증류를 하여 증류액 약 100 mL를 받은 후 냉각기의 끝을 액면에서 조금 떼어 다시 유액 수 mL를 유취하여 다시 냉각기의 끝을 소량의 물로 수기내에 씻어 넣는다. 수기내에 들어 있는 유액을 0.05N 수산화나트륨액으로 부런스위크 시액이 녹색으로 변할 때까지 적정한다. 따로 같은 방법으로 공시험을 한다.

$$0.05N \text{ 황산 } 1 \text{ mL} = 0.7003 \text{ mgN}$$

(다) 계 산

$$\text{질소(\%)} = 0.7003 \times (a-b) \times \frac{100}{\text{검체의 채취량(mg)}}$$

a : 공시험에서 중화에 소요된 0.05N 수산화나트륨액의 mL수

b : 분시험에서 중화에 소요된 0.05N 수산화나트륨액의 mL수

계산식은 검체의 분해액을 전부 사용해서 적정했을 때의 식이므로 분해액의 일부를 사용할 때는 그 계수를 곱한다.

여기서 얻은 질소량에 다음 표에 의한 질소계수를 곱하여 조단백질의 양으로 한다.

$$\text{조단백질(\%)} = N(\%) \times \text{질소계수}$$

Table 2. 조단백질을 산출하는 질소 계수

식 품 명	질 소 계 수
소맥분(중등질경질·연질·수득률(100 ~ 94%)	5.83
소맥분(중등질·수득률(93 ~ 83%)또는 그 이하)	5.70
쌀	5.95
보리·호밀·귀리	5.83
메밀	6.31
국수·마카로니·스파게티	5.70
낙화생	5.46
콩 및 콩제품	5.71
밤·호도·깨	5.30
호박·수박 및 해바라기의 씨	5.40
유·유제품·마아가린	6.38
위 이외의 모든 식품	6.25

4) Crude fat (Soxhlet method)

(1) 장치 및 시약

Soxhlet 지방추출기를 사용한다. 시료를추출관에 넣고 ether를 수기에 넣어 가열하면 에테르는 증발되어 위의 냉각기에서 응축되어 시료 중에 침지되며 사이폰(siphon)작용에 의해 수기에 다시 돌아와 연속적으로 추출된다.

(2) 조작법

분말이 잘되는 시료 5-10g을 정확히 칭량하여 원통여지에 넣는다. 시료가 원통여지로부터 누출되지 않게 하기 위해서 시료 위에 탈지면으로 가볍게 막는다. 이것을 적당한 비커에 세워서 95-100℃의 건조기에 넣고 2-3시간 건조한 후에 데시케이터에 옮겨 냉각시킨 후 추출관에 넣는다. 다음에는 수기(受器)를 미리 95-100℃의 건조기로 건조시켜 냉각 후 칭량하고 이것을 반복하여 항량으로 한 것에 에테르를 약 1/2-2/3정도로 넣고 냉각기, 추출기, 수기를 연결해서 60-70℃의 전기항온수조 위에 고정시켜 가온한다. 수기 중에 에테르는 증기로 되어 측관을 통해 올라가며, 냉각기에서 응축되어 원통여지 내의 탈지면 위에 떨어진다. 추출관에 에테르가 점차로 고여 시료 중의 지방이 용출된다. 에테르가 추출관의 사이폰(siphon)의 높이까지 고이면 사이폰의 원리에 의해서 지방을 녹인 에테르는 대부분 수기에 다시 돌아온다. 수기 중의 지방을 포함한 에테르는 지방질을 남기고 재차 증발하여 응축되며, 시료 중의 지방을 용출한다. 이렇게 해서 에테르는 반복, 순환하여 시료 중의 지방을 용출하고, 그 지방을 수기에 모은다. 8~16시간이 되면 시료 중의 지방은 모두 용출되기 때문에 속히 냉각기를 분리하여 추출관 속의 원통여지를 긴 핀셋으로 꺼내어, 원통여지는 비커에 세우고 바로 냉각기를 원래대로 추출관에 연결시켜 항온수조 위에서 가온한다. 수기 중의 에테르가 전부 추출관에 모여지면 수기만을 분리해서 끓는 항온수조 중에 담그어 에테르를 완전히 증발시킨다. 수기의 외측을 깨끗한 형겅으로 닦아서 95-100℃의 건조기에 넣고 약 한 시간 가량 건조시켜 데시케이터 중에서 칭량한다. 항량이 될 때까지 즉, 중량이 점차 감소, 또는 재차 증가할 때까지 건조, 방냉, 칭량을 반복한다. 조지방의 양은 다음 식에 따라 산출한다.

$$\text{조지방(\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W_0 : 받는 그릇의 무게(g)

W_1 : 조지방을 추출하여 건조시킨 받는 그릇의 무게(g)

S : 검체의 채취량(g)

나. 결과 및 고찰

본 연구에서는 흑삼을 동일한 기원의 5년근 수삼으로 가공한 것을 대상으로 개별 ginsenoside의 함량 분포를 조사·비교함으로써 사포닌함유 패턴을 중심으로 하는 차이점을 검

토하여 흑삼의 증숙조건에 따른 ginsenoside의 함량에 대한 기초정보를 제공하고자 한다.

분석한 인삼 사포닌은 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rg₆, Rh₁, Rh₄, Rk₁, Rk₃, Rg₅, F₁, F₄ 이었으며 이들은 Fig. 2과 같이 HPLC를 통하여 표품과 직접 비교·확인하고 평균을 통계 처리하여 계산하였다. 국내 인삼 주 생산지인 경상북도 풍기의 5년근 삼포의 수삼을 채굴하여 (주) 고려인삼연구에서 가공하였으며, 이를 대상으로 saponin 함량을 비교 분석하였다.

(1) 조 사포닌(crude saponin) 함량

Table 3에서 보는바와 같이, 조 사포닌 함량은 8차 증숙삼이 8.506%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 5차 증숙(7.561%), 9차 증숙(7.528%), 6차 증숙(7.191%), 7차 증숙(6.934%), 4차 증숙(6.808%), 3차 증숙(6.422%), 2차 증숙(5.836%), 1차 증숙(5.289%)의 순으로 확인되었다.

(2) 증숙조건에 따른 ginsenoside 함량

Table 4에서 보는바와 같이, 흑삼의 주 Prosapogenin(ginsenoside Rg₂, Rg₃, Rg₅, Rg₆, Rh₁, Rh₄, Rk₁, Rk₃, F₁, F₄)의 함량은 8차 증숙(1.148%), 9차 증숙(1.045%), 6차 증숙(0.976%), 5차 증숙(0.956%), 7차 증숙(0.940%), 4차 증숙(0.856%), 3차 증숙(0.750%), 2차 증숙(0.706%), 1차 증숙(0.426%)으로 가장 적은 함량을 나타낸 1차 증숙삼보다 8차 증숙삼이 약 2.7배 많은 함량을 나타내었다.

또한 ginsenoside Rk₁, Rg₅의 함량은 4차 증숙(0.434%), 8차 증숙(0.364%), 9차 증숙(0.351%), 7차 증숙(0.295%), 6차 증숙(0.243%), 5차 증숙(0.168%), 3차 증숙(0.105%), 2차 증숙(0.059%), 1차 증숙(0.028%)로 가장 적게 함유된 1차 증숙삼보다 4차 증숙삼이 약 16배 많은 양을 보였다.

한편, 항암 등 생리활성(10-12) 물질인 ginsenoside Rg₃의 경우, 8차 증숙삼은 0.275%로 가장 많은 함량을 보였고, 9차 증숙(0.272%), 7차 증숙(0.199%), 6차 증숙(0.169%), 4차 증숙(0.142%), 5차 증숙(0.140%), 3차 증숙(0.108%), 2차 증숙(0.051%), 5차 증숙(0.022%)순으로 확인되었다.

인삼을 1번에서 9번까지 증숙하는 동안 총 prosapogenin의 성분함량을 비교분석하여 확인해본 결과 8차 증숙삼에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 따라서, prosapogenin 고농도 함유 고기능성 흑삼제품을 개발하기 위해서는 9번 증숙삼보다 8차 증숙삼을 사용하는 것이 최적 증숙 조건이라고 사료된다.

따라서, 흑삼의 증숙조건에 따라서 인삼 prosapogenin 성분(ginsenoside Rg₂, Rg₃, Rg₅, Rg₆, Rh₁, Rh₄, Rk₁, Rk₃, F₁, F₄)을 고농도로 함유하는 고기능성 흑삼을 제조할 수 있다.

Table 3. Contents of crude saponins in Red ginseng.

(%)

samples	<u>Amount ratio of crude saponins</u> [Composition of crude saponins]
RG-1	5.289
RG-2	5.836
RG-3	6.422
RG-4	6.808
RG-5	7.561
RG-6	7.191
RG-7	6.934
RG-8	8.506
RG-9	7.528

* RG-1 : Red ginseng steamed once, RG-2 : Red ginseng steamed twice, RG-3 : Red ginseng steamed three times, RG-4: Red ginseng steamed four times, RG-5 : Red ginseng steamed five times, RG-6 : Red ginseng steamed six times, RG-7 : Red ginseng steamed seven times, RG-8 : Red ginseng steamed eight times, RG-9 : Red ginseng steamed nine times

Table 4. Composition of ginsenosides in the Red ginseng extracts processed under differing steam conditions

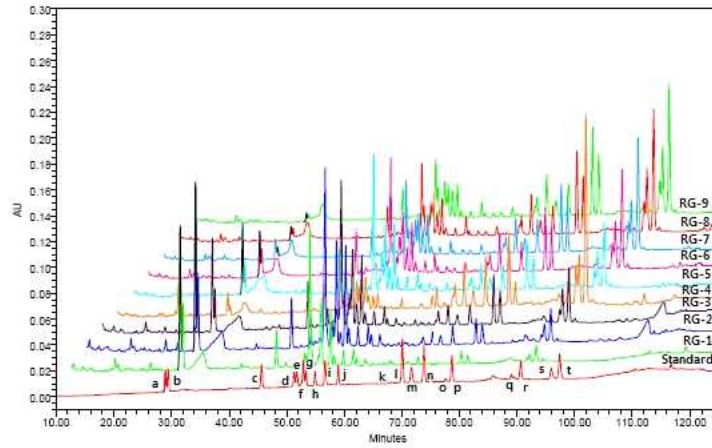
(% ,w/w)

Ginsenosides	Red Ginseng								
	RG-1	RG-2	RG-3	RG-4	RG-5	RG-6	RG-7	RG-8	RG-9
Rb ₁	0.033± 0.004	0.024± 0.014	0.047± 0.035	0.010± 0.001	0.018± 0.002	0.052± 0.004	0.020± 0.001	0.044± 0.003	0.016± 0.003
Rb ₂	0.134± 0.006	0.275± 0.023	0.206± 0.021	0.050± 0.001	0.248± 0.020	0.172± 0.003	0.149± 0.015	0.158± 0.009	0.131± 0.017
Rc	0.214± 0.008	0.288± 0.024	0.235± 0.026	0.042± 0.001	0.266± 0.027	0.259± 0.050	0.152± 0.013	0.212± 0.028	0.130± 0.015
Rd	0.031± 0.005	0.038± 0.004	0.039± 0.004	0.025± 0.002	0.046± 0.003	0.048± 0.001	0.036± 0.004	0.056± 0.003	0.041± 0.007
Re	0.100± 0.007	0.120± 0.014	0.069± 0.009	0.019± 0.001	0.067± 0.007	0.052± 0.002	0.020± 0.002	0.029± 0.005	0.012± 0.003
Rf	0.050± 0.004	0.075± 0.007	0.075± 0.009	0.051± 0.000	0.094± 0.008	0.087± 0.001	0.062± 0.006	0.075± 0.005	0.070± 0.012
Rg ₁	0.237± 0.015	0.299± 0.026	0.176± 0.022	0.052± 0.001	0.175± 0.015	0.106± 0.001	0.049± 0.005	0.037± 0.001	0.022± 0.006
Rg ₂	0.347± 0.033	0.503± 0.040	0.417± 0.057	0.080± 0.001	0.472± 0.031	0.371± 0.008	0.249± 0.018	0.272± 0.013	0.207± 0.032
(20S) Rg ₃	0.014± 0.001	0.030± 0.003	0.064± 0.008	0.107± 0.001	0.084± 0.008	0.101± 0.002	0.118± 0.014	0.163± 0.010	0.160± 0.024
(20R) Rg ₃	0.008± 0.001	0.021± 0.007	0.044± 0.007	0.035± 0.000	0.056± 0.005	0.068± 0.001	0.081± 0.009	0.112± 0.006	0.112± 0.016
Rg ₅	0.023± 0.001	0.050± 0.005	0.087± 0.009	0.364± 0.006	0.136± 0.010	0.197± 0.003	0.239± 0.027	0.296± 0.016	0.285± 0.042
Rg ₆	0.002± 0.001	0.007± 0.001	0.013± 0.003	0.032± 0.001	0.015± 0.003	0.020± 0.002	0.020± 0.002	0.027± 0.003	0.026± 0.004
Rh ₁	0.004± 0.006	0.032± 0.003	0.050± 0.004	0.057± 0.001	0.073± 0.005	0.076± 0.022	0.078± 0.011	0.098± 0.025	0.082± 0.013
Rh ₄	0.001± 0.000	0.011± 0.001	0.012± 0.001	0.041± 0.001	0.021± 0.002	0.024± 0.000	0.030± 0.003	0.028± 0.001	0.030± 0.004
Rk ₁	0.005± 0.000	0.009± 0.001	0.018± 0.002	0.070± 0.001	0.032± 0.002	0.046± 0.001	0.056± 0.007	0.068± 0.004	0.066± 0.010
Rk ₃	0	0.007± 0.001	0.008± 0.001	0.017± 0.001	0.013± 0.001	0.013± 0.000	0.015± 0.002	0.017± 0.001	0.017± 0.002
F ₁	0.017± 0.001	0.025± 0.002	0.019± 0.002	0.003± 0.000	0.025± 0.001	0.020± 0.000	0.013± 0.002	0.015± 0.001	0.012± 0.002
F ₄	0.006± 0.000	0.010± 0.001	0.017± 0.002	0.049± 0.001	0.030± 0.003	0.041± 0.001	0.040± 0.004	0.052± 0.003	0.049± 0.007
Rg ₃	0.022	0.051	0.108	0.142	0.140	0.169	0.199	0.275	0.272
Rk ₁ +Rg ₅	0.028	0.059	0.105	0.434	0.168	0.243	0.295	0.364	0.351
Prosapogenin ^{a)}	0.426	0.706	0.750	0.856	0.956	0.976	0.940	1.148	1.045
Total saponin ^{b)}	1.226	1.825	1.598	1.103	1.870	1.752	1.427	1.760	1.466

a) Ginsenosides Rg₂+Rg₃+Rg₅+Rg₆+Rh₁+Rh₄+Rk₁+Rk₃+F₁+F₄

b) Sum total of individual ginsenoside contents

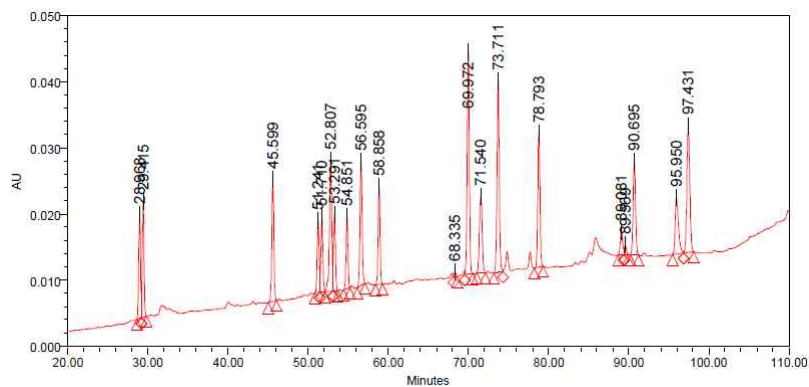
Values represent the mean±S.E. (n=3)



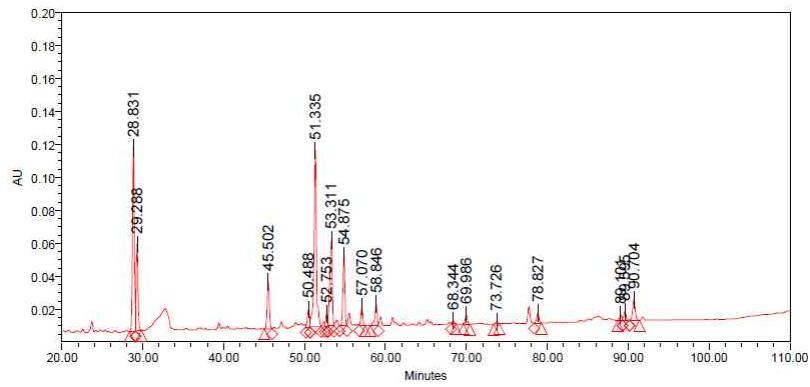
- * a : Ginsenoside Rg₁ , b : Ginsenoside Re, c : Ginsenoside Rf,
 d : Ginsenoside Rb₁, e : Ginsenoside Rg₂, f : Ginsenoside Rh₁,
 g : Ginsenoside Rc, h : Ginsenoside Rb₂, i : Ginsenoside F1,
 j : Ginsenoside Rd, k : Ginsenoside Rg₆, l : Ginsenoside F4,
 m : Ginsenoside Rk₃, n : Ginsenoside Rh₄ , o : (20S) Ginsenoside Rg₃
 p : (20R) Ginsenoside Rg₃ q : Ginsenoside Rk₁, r : Ginsenoside Rg₅

Fig. 3. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the Red ginseng as compared with the chromatogram of the ginsenoside standards.

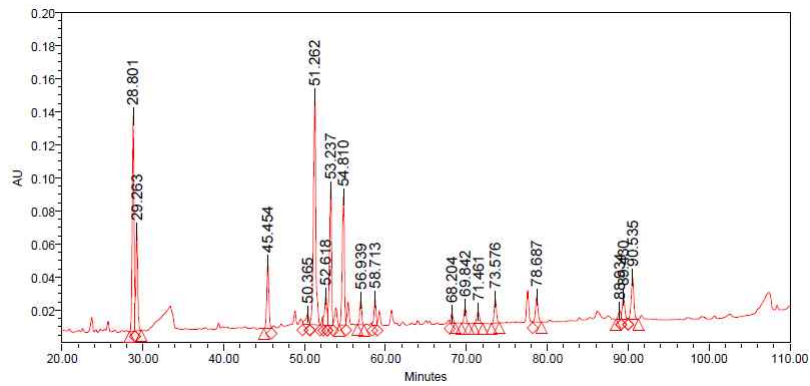
표준품 HPLC chromatogram



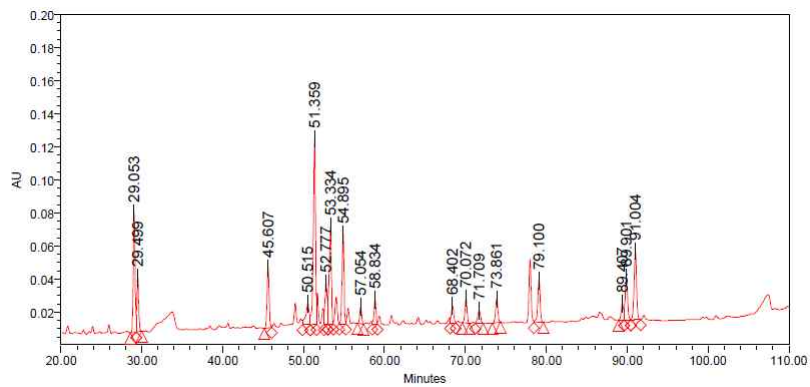
1차 증속삼 HPLC chromatogram



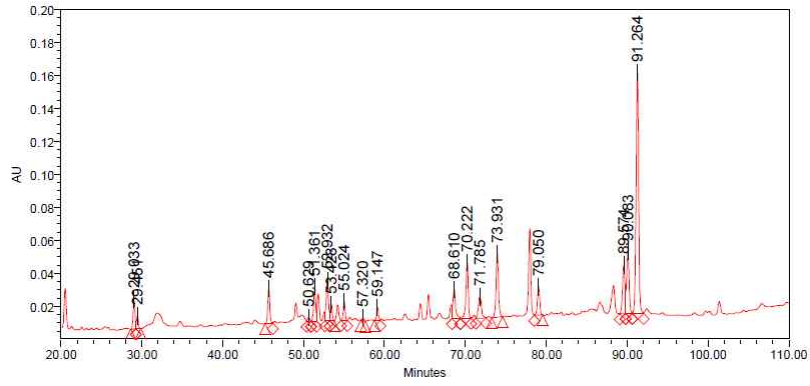
2차 증속삼 HPLC chromatogram



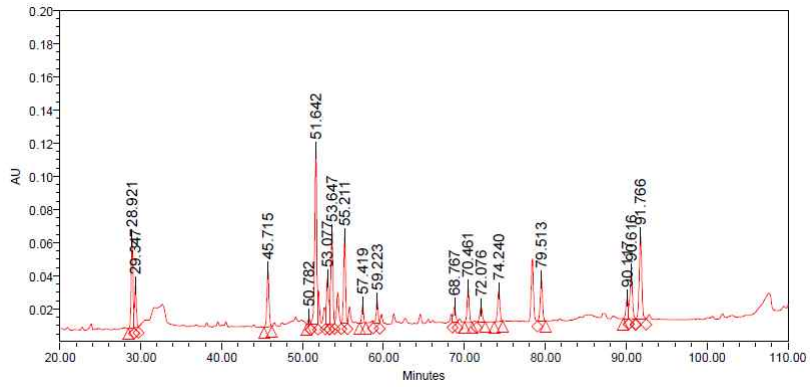
3차 증속삼 HPLC chromatogram



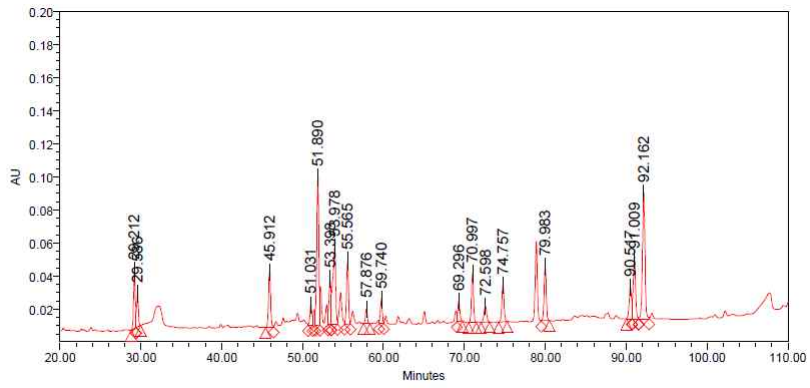
4차 증속삼 HPLC chromatogram



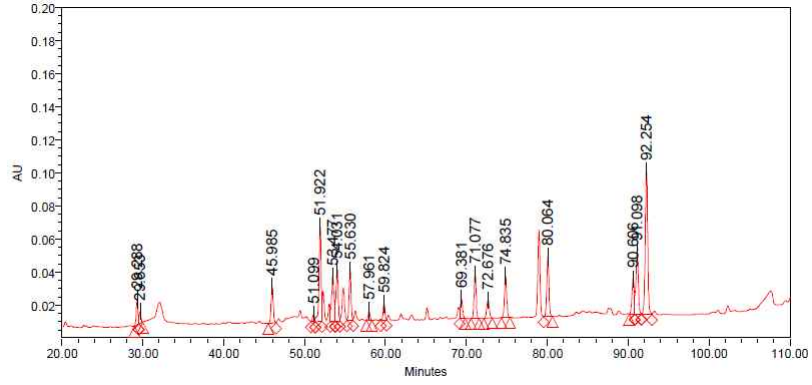
5차 증속삼 HPLC chromatogram



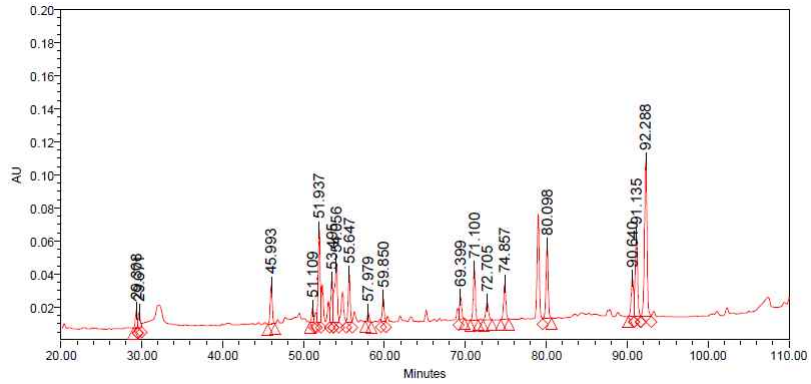
6차 증속삼 HPLC chromatogram



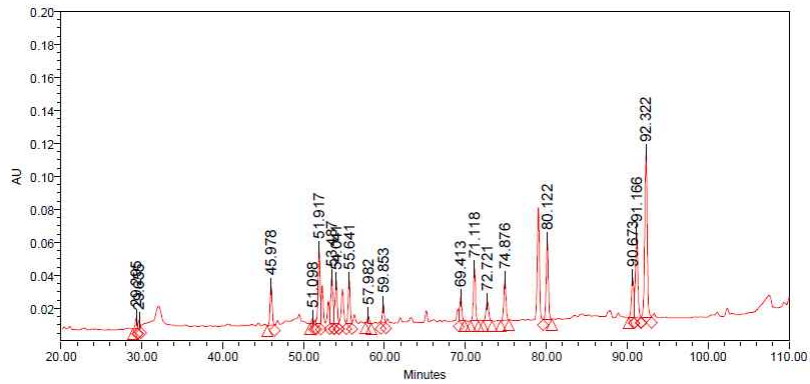
7차 증속삼 HPLC chromatogram



8차 증속삼 HPLC chromatogram



9차 증속삼 HPLC chromatogram



(3) 단계별 증숙 흑삼의 일반적 특성 분석

증숙 차수별 흑삼의 일반성분을 분석한 결과(Fig. 5), 흑삼에는 당 성분이 많이 있는 것을 확인할 수 있었고 조단백, 조회분, 조지방 순이었다. 일반적으로 알려져 있는 인삼의 일반 성분 함량과 비슷한 결과로 분석되었고 증숙 차수 별로 일정한 패턴은 나타나지 않았다. 이를 SAS 통계 처리하여 분석한 결과, 각 일반 성분 간의 증숙차수별 유의차가 없는 것을 확인할 수 있다. 증숙 차수별 성분의 함량 차이는 각 인삼이 가지고 있는 고유의 일반 성분 함량의 차이로 생각 된다.

Fig. 5. 단계별 증숙 흑삼의 일반적 특성 분석

Step	Total sugar(%)	Crude ash(%)	Crude protein(%)	Crude fat(%)
1	69.60 ±2.644a*	3.26 ±0.09b	17.58 ±4.06a	1.20 ±0.4ab
2	67.23 ±0.714a	4.19 ±1.33ab	16.08 ±2.02a	0.80 ±0.4ab
3	58.38 ±2.384a	5.07 ±1.04a	20.51 ±0.01a	0.93 ±0.23ab
4	50.66 ±0.314a	4.29 ±1.36ab	16.90 ±2.26a	0.67 ±0.46ab
5	52.21 ±1.274a	4.46 ±0.05ab	14.24 ±2.38a	0.93 ±0.61ab
6	54.12 ±0.134a	4.27 ±0.04ab	16.97 ±2.14a	1.47 ±1.15a
7	60.68 ±1.744a	3.87 ±0.09ab	15.95 ±5.14a	0.40 ±0.04b
8	64.63 ±1.834a	3.85 ±0.09ab	13.49 ±4.46a	1.33 ±0.23ab
9	60.68 ±0.074a	4.50 ±0.16ab	18.54 ±2.38a	1.47 ±0.24a

* Means with the same letter are not significantly different. (P<0.05)

2. HP-20 resin을 이용한 인삼사포닌 분리추출 최적화

인삼사포닌을 분리 및 정량하기 위하여 기존에 사용되어 온 대표적인 방법은 부탄올을 사용한 방법이다. 이때 부탄올과 수층과의 계면분리, 추출횟수, 부탄올 농축에 많은 시간이 소요되는 등의 문제가 있다. 따라서 근래에 고순도의 사포닌조제 방법으로 수지흡착법이 이용되고 있다. 이는 기존의 부탄올 추출법에 비하여 조사포닌의 수율, 조성 및 개별 인삼사포닌의 함량등에서 유리하다고 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 Diaion HP-20 수지흡착법을 이용하여 고순도 인삼사포닌을 분리 및 추출하는 조건을 확립하고자 한다.

가. 재료 및 방법

(1) 실험재료

본 연구에 사용한 수삼은 강원도 홍천에서 2010년 9월에 6년근 수삼 10kg을 수집하였고, 얻은 시료를 대상으로 동결건조 후 분말화하여 인삼사포닌 분리추출에 사용하였다. 분말시료는 고려인삼연구(주)에 보관하고 있다.

(2) 실험방법

분말화 된 인삼 100g을 10배의 70%에탄올로 환류냉각하여 3회 추출하여 모은 후, 이를 Watman No.2 filter paper를 이용하여 여과 후, 감압농축하고 100ml 증류수에 현탁하여 사용한다. HP-20 수지 1L를 4L 용량 glass filter에 넣고, 메탄올 1L 씩 4회 수지를 세척하고, 메탄올이 빠져 내려간 다음, 물 1L 씩 5회 수지를 세척하여 수지를 활성화 한다. 추후 사용한 HP-20 수지는 모아두었다가 5% 탄산소다(Na_2CO_3) 용액으로 세척하여 무색의 세척액이 나올때까지 세척하고, 그 후 증류수로 수지를 세척하여 사용한다. 활성화된 수지 100ml을 Open column에 취하고 100ml 증류수에 현탁한 인삼추출물을 주입한다. 100% 증류수부터 점차적으로 에탄올을 함량을 늘려가면서 100% 에탄올까지 용출하여 용출된 시료를 각각 TLC 및 HPLC로 분석하여 분리추출이 가장좋은 용매조건을 탐색한다. HPLC 분석조건은 Table 6 과 같다.

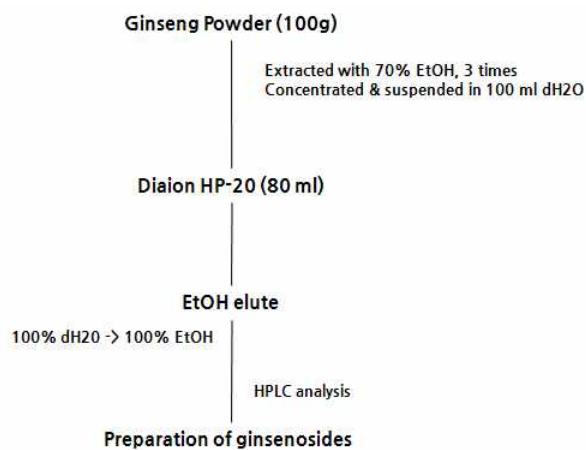


Fig. 4. Separation of crude ginsenosides using diaion HP-20 resin

Table 6. Analysis condition of HPLC

Instrument Column	Prevail Carbohydrate ES 5 μ , 250 \times 4.6mm (Alltech, USA)
Column Temp.	35 $^{\circ}$ C
Pump	Alltech pump 627 (Alltech, USA)
Detector	ELSD 2000ES (Alltech, USA)
Mobile phase	A : Acetonitrile : Water : IPA = 80 : 5 : 15 B : Acetonitrile : Water : IPA = 67 : 21 : 12
Gradient	Time : 0 / 28/ 35/ 45/ 50/ 51/ 57/ 58/ 65 %B : 10/ 85/ 80/ 75/ 90/ 100/ 25/ 10/ 10
Flow rate	0.8 mL/min
Injection volume	20 μ L

나. 결과

HP-20 수지흡착법을 사용하여 인삼사포닌 분리추출을 위한 용매조건을 알아본 결과 TLC 상에서 나타나듯이 30% 에탄올부터 70% 에탄올로 용출할 때 대부분의 사포닌을 분리할 수 있었고, 이 중 HPLC 결과를 토대로 60%에서 70% 에탄올로 용출했을때 가장좋은 수율을 보였다. 따라서 HP-20 수지를 이용하여 인삼에서 사포닌만을 선택적으로 분리추출하기 위해서는 인삼추출물을 HP-20 수지에 흡착시킨 후, 60% 내지 70% 에탄올로 용출하면 효과적으로 분리추출이 가능하다고 사료된다.

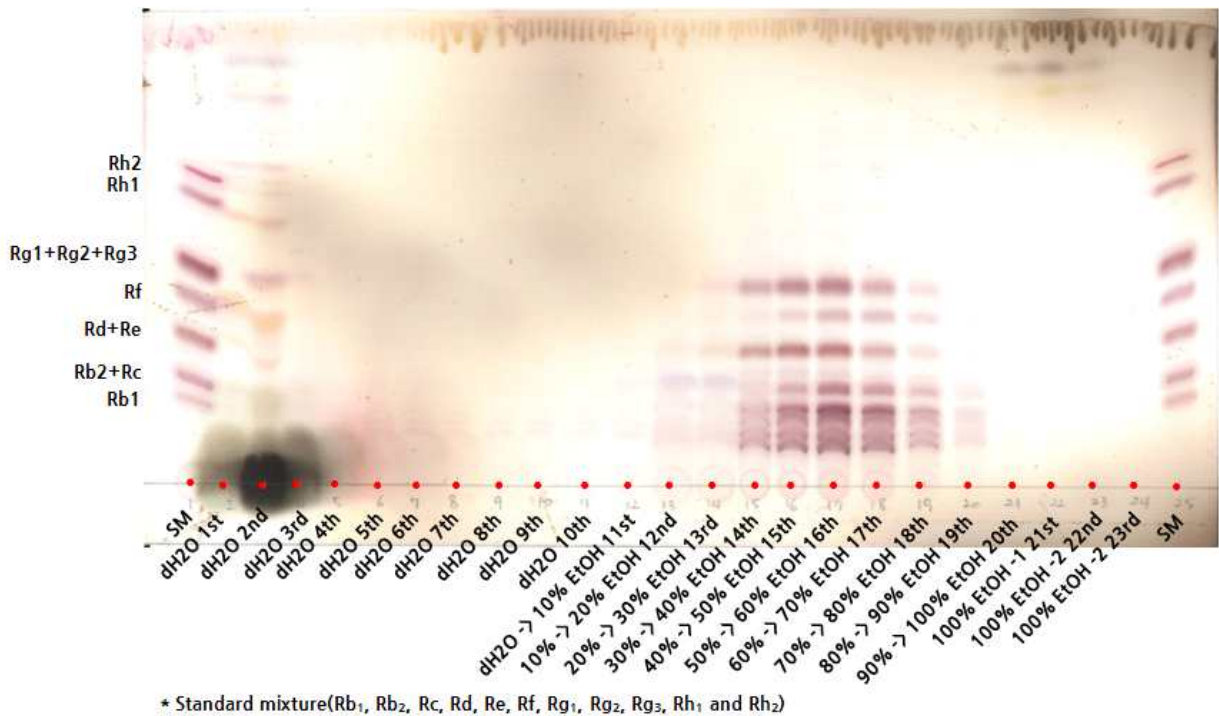


Fig. 5. TLC separation of ginseng saponin using HP-20 resin

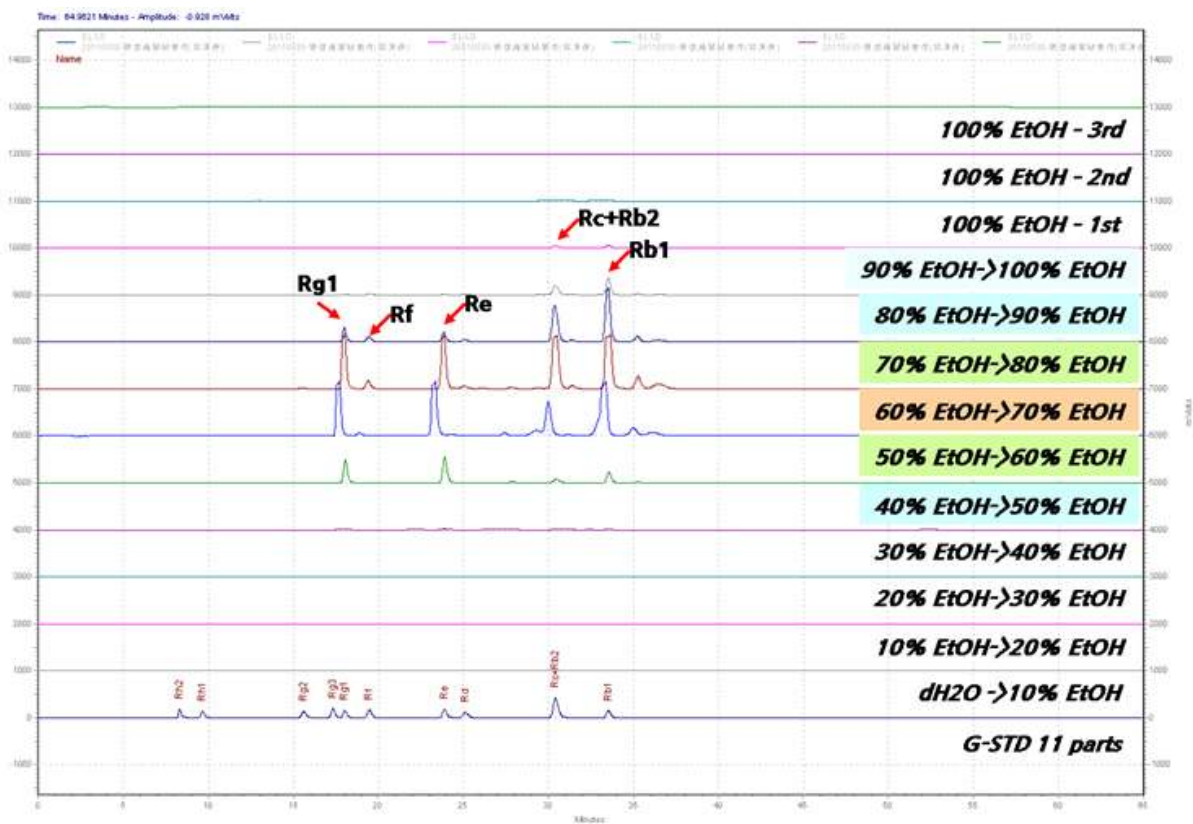


Fig. 6. HPLC chromatograms of ginseng saponin separation using HP-20 resin

3. 원료 및 제제의 안정성 분석 및 확립

가. 온도 안정성 분석

온도에 따른 안정성 분석법은 소정의 온도조건(-20, 10, 25, 60℃)에서 7개월간 보관하면서 15일 주기로 샘플링하여 경시적 변화에 따른 상태변화를 분석하였다.



그림 1 분석용 샘플(2011.09.01. - 2012.04.15.)

(1) 수분함량 변화 측정

- 원료 및 제제화 할 농축액의 보관에 따른 수분손실량을 측정하기 위하여 수분함량은 수분 측정기(ML-50, A&D company Ltd., Japan)로 측정하였다.

(2) pH 변화 측정

- pH 측정은 Corning (pH meter 440, Corning, NY, USA)사의 pH meter를 이용하였으며, 상온으로 온도를 상승 혹은 하강시켜 pH를 측정하였다. 측정하기 전에 유리전극은 미리 pH 4와 7인 완충액으로 보정한 후 검출부를 증류수로 잘 씻어 가볍게 닦아 낸 다음 측정하였다.

(3) 점도 변화 측정

- 점도 측정은 Brookfield viscometer (Brookfield LV, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 실험에 사용된 농축액은 점성이 강한 액체이므로 T-bar spindle을 사용하였으며 No. 64를 택하여 6 rpm에서 30초간 측정하였다. 기포의 영향을

줄이기 위하여 제조시 탈포하였다. 모든 샘플은 상온으로 온도를 상승 혹은 하강하여 측정하였고, 3회 반복하여 결과값을 얻었다.

(4) 변색 및 변취 관찰

- 흑삼농축액을 각 온도 구간별로 보관하면서 측정 전 상온으로 온도를 보정하여 변색여부 및 이취 등을 육안으로 관찰하였다.

(5) Ginsenoside Rg1, Rb1 함량변화 분석

- 각 온도구간에서 보관하는 동안 Major saponin인 Ginsenoside Rg1과 Rb1의 함량을 측정하여 분석하였다. 분석법은 현행 식품의약품안전청 건강기능식품 기준 및 규격 중 ‘진세노사이드 Rb1과 Rg1’의 분석방법을 응용하여 진행하였다.

i) 농축액 시험용액 제조

- 시료 약 2g($\pm 10\%$)을 정밀히 달아 증류수 50 mL에 완전히 용해한 다음 증류수와 메탄올로 전처리된 Sep-Pak cartridge에 1mL을 통과시킨 후 메탄올(HPLC grade) 3mL로 용출하고 여과(PTFE, 0.45 μ m) 시험용액으로 함.

ii) 표준용액 제조

- 진세노사이드 Rb1 및 Rg1 표준품 각각을 메탄올에 녹여 여과(0.45 μ m)하여 각각 표준원액을(1mg/mL) 만들고, 표준원액을 메탄올로 희석하여 표준액을 만듦.

iii) 분석조건

- System : HPLC HP1100 series (Agilent, U.S.A)
- Column : GraceSmart RP 18 5u (250 * 4.6 mm. 5um, U.S.A)
- Column Temp.: 40 °C
- Detector : UV 203 nm
- Flow rate : 1.2 ml/min
- Gradient condition

Time	Flow	A% (dH ₂ O)	B% (ACN)
0	1.2	80	20
10	1.2	80	20
42	1.2	70	30
67	1.2	60	40
70	1.2	53	47
90	1.2	30	70
95	1.2	30	70
96	1.2	30	20
116	1.2	80	20

나. 온도구간별 안정성 분석 결과 및 고찰

(1) 수분함량 변화 측정

- 총 7개월간 수분함량의 변화를 측정한 결과 -20℃(냉동)에서 보관하는 동안 초기 42.0%의 수분함량이 7개월 후 39.8%로 변화하였다. 10℃(냉장)에서 보관하는 동안 초기 42.0%의 수분함량이 7개월 후 41.6%로 거의 변화하지 않았다. 25℃(상온)에서 보관하는 동안 초기 42.1%의 수분함량이 7개월 후 41.4%로, 10℃(냉장)에서 보관 할때와 마찬가지로 거의 변화하지 않았다. 60℃(가온조건)에서 보관하는 동안 초기 42.1%의 수분함량이 7개월 후 39.1%로 약 1%의 수분함량이 감소하였다. 종합해보면 온도구간별 수분함량의 변화는 최고 1% 내외의 감소량을 보였으며 거의 변화가 없었다.

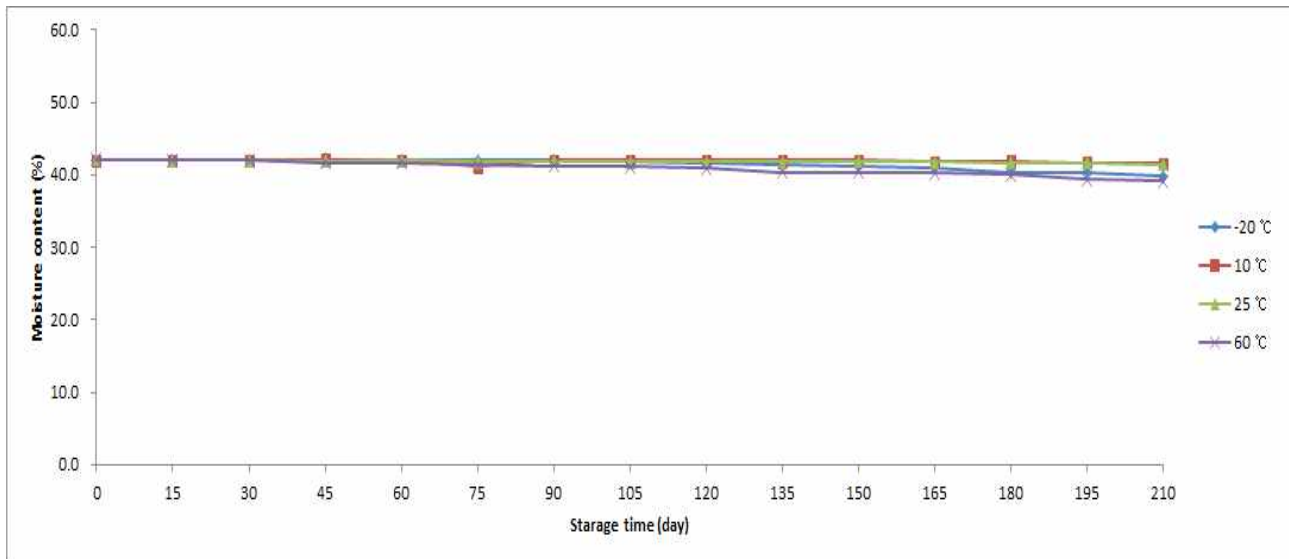


그림 2 Moisture content change of Black Ginseng Extract according to storage time

*Value are mean \pm SD, n = 3

② pH 변화 측정

- 각 온도구간별로 초기조건과 7개월 후 pH측정 결과 pH 값은 6.1에서 6.4을 유지하였다.

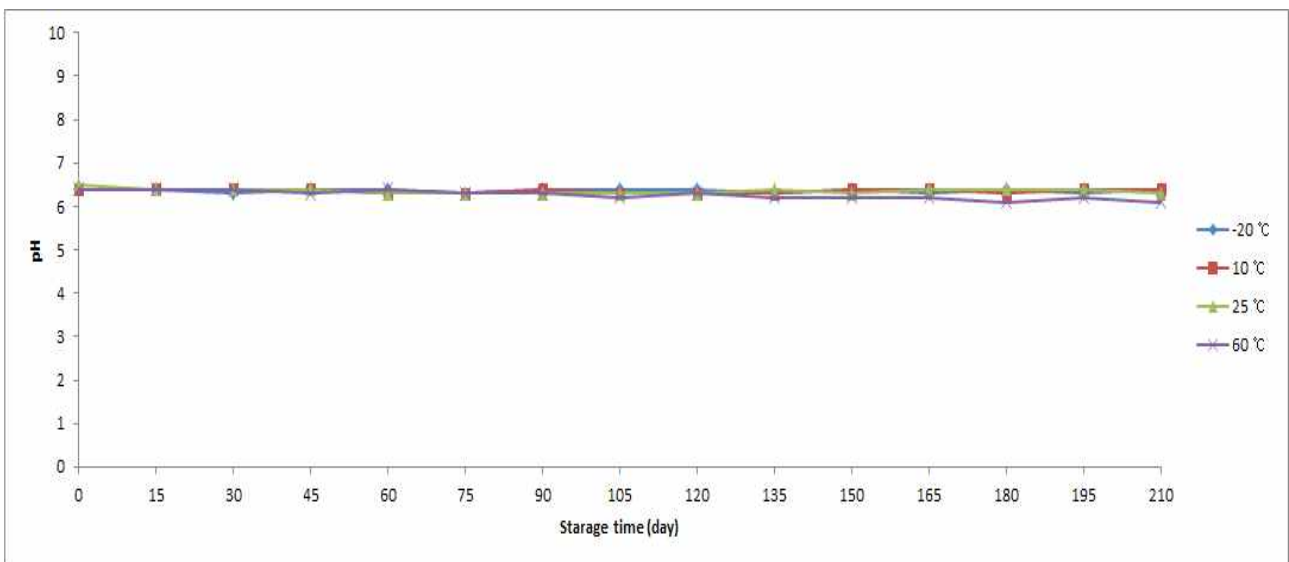


그림 3 pH change of Black Ginseng Extract according to storage time

*Value are mean \pm SD, n = 3

③ 점도 변화 측정

- 각 온도구간별로 초기 점도는 약 154,000 cPs으로 시간이 지남에 따라 -20℃ 보관에서는 154,000 cPs에서 157,000 cPs로 점도가 증가하였다. 10℃와 25℃ 온도구간에서는 다소 감소하였으나 거의 같은 점도를 유지하였다. 하지만, 60℃ 온도구간에서는 초기 154,000 cPs에서 7개월 후 134,000 cPs까지 점도가 낮아졌다. 이는 고온으로 인해 이화학적 변성이 일어난 것을 판단된다.

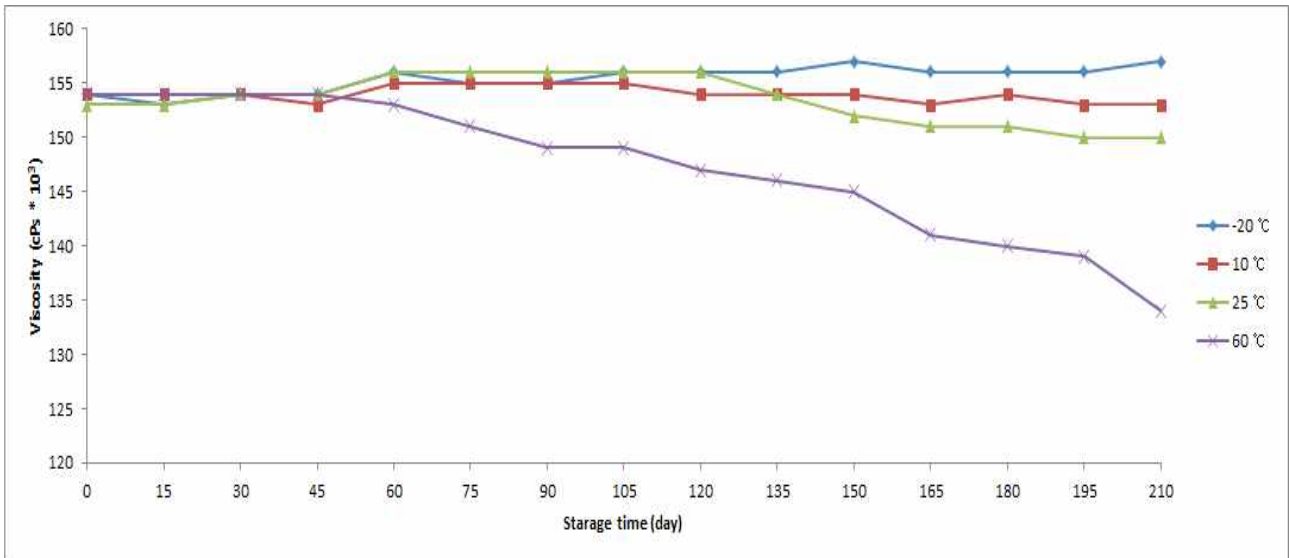


그림 4 Viscosity change of Black Ginseng Extract according to storage time

*Value are mean \pm SD, n = 3

④ 변색 및 변취 관찰

- 각각의 온도구간별로 7개월 210일 동안 색상과 냄새를 관찰한 결과 색상변화 및 특이취는 관찰되지 않았다. 또한 각각의 상태변화 정도를 측정할 때 상온으로 온도를 조정하였을 때 응집과 같은 현상도 일어나지 않았다.

⑤ Ginsenoside Rg1, Rb1 함량변화 분석

- 각 온도구간별로 Major saponin인 Rg1(Protopanaxatriol Group)과 Rb1(Protopanaxadiol Group)의 변화정도를 측정하였다. 일반적으로 인삼사포닌은 열 가수분해를 통해 Major saponin이 Minor saponin으로 전환된다고 알려져 있으므로, 품질관리를 위하여 성분 함량의 변화없이 보관하는 온도가 중요하다. 그 결과 Rg1과 Rb1 모두 -20℃(냉동), 10℃(냉장), 25℃(상온) 구간에서는 함량의 변화가 거의 없거나 다소 낮아지는 경향을 보였으나 60℃(가온조건)에서는 Rg1의 경우 초기 0.629 mg/g이 7개월 후 0.552 mg/g으로 약 11.4% 감소하였고, Rb1의 경우에는 초기 5.465 mg/g이 7개월 후 5.072 mg/g으로 약 7.7% 감소하였다. 이는 가온조건에서 Rg1과 Rb1이 일부 열 가수분해되어 그 함량이 낮아진 것으로 판단되며, 보관 혹은 운반중 열에 노출되면 그 함량이 변하게 됨을 밝힐 수 있었다.

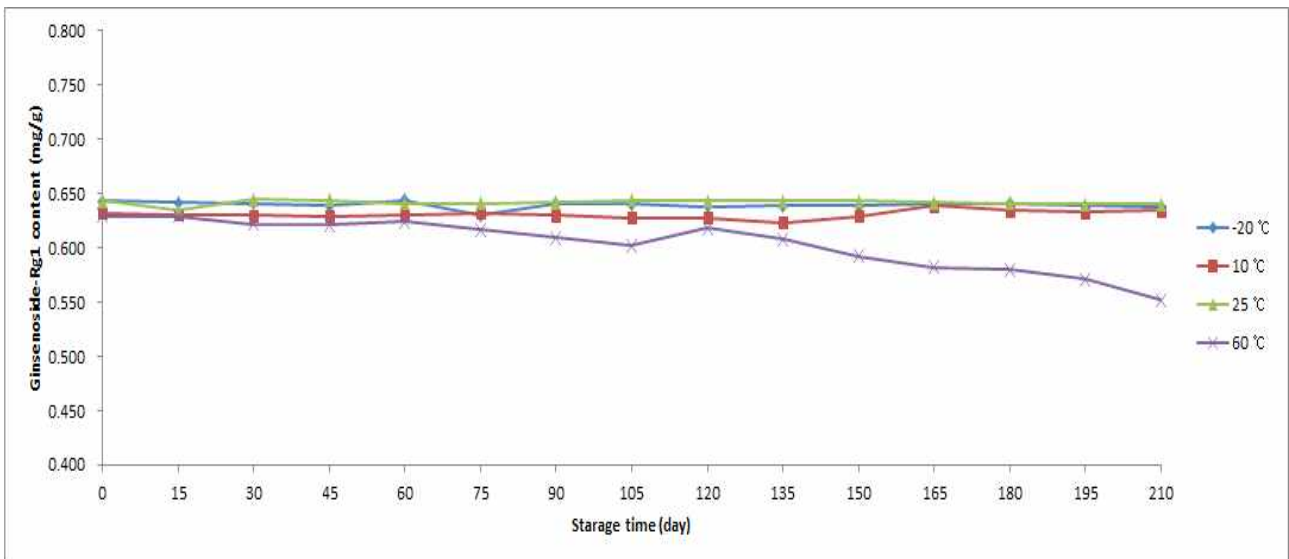


그림 5 Ginsenoside Rg1 content change of Black Ginseng Extract according to storage time, *Value are mean \pm SD, n = 3

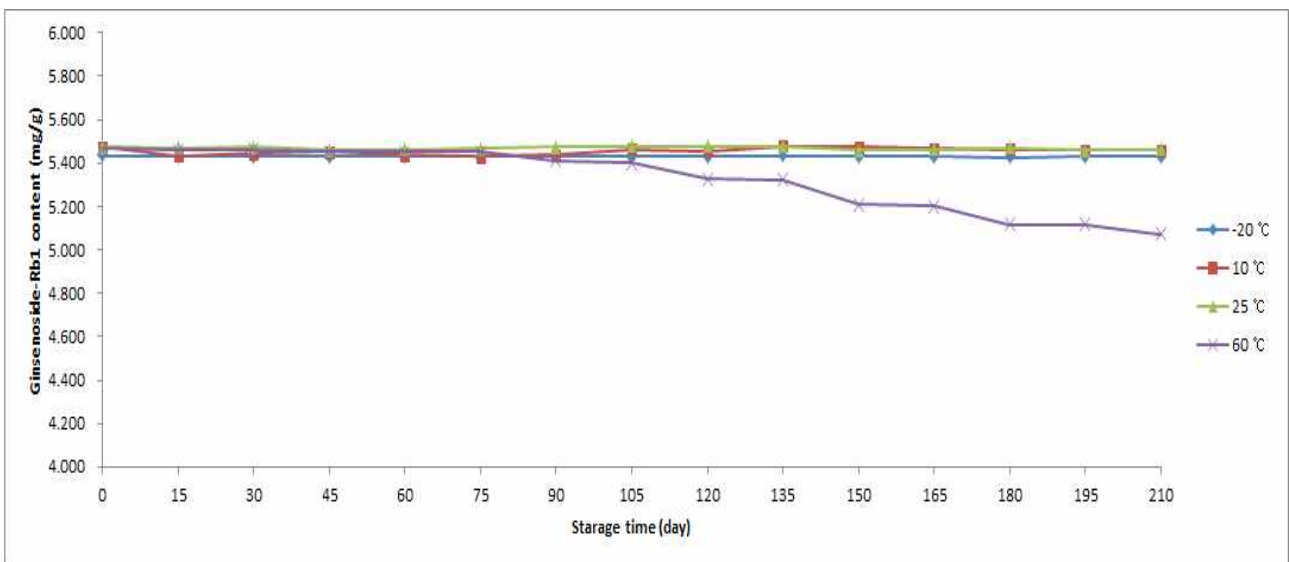


그림 6 Ginsenoside Rb1 content change of Black Ginseng Extract according to storage time, *Value are mean \pm SD, n = 3

4. 기초물성 및 부형제와의 상호작용 연구

가. 부형제와의 상호작용 분석

- 환(Pills) 제형 제조의 경우 흑삼 농축액 및 분말에 쌀(맷쌀)가루, 옥수수전분, 유당, 프락토올리고당(액), 결정셀룰로오스, CMC칼슘, CMC나트륨, 벌꿀 등이 첨가되어 제환기를 통해 성형을 한다. 하지만 이때, 각 부형제의 함량에 따라 성형물의 강도가 틀려져 쉽게 부서지거나 또는 너무 딱딱해지는 경우가 발생한다. 각각의 부형제의 함량을 최적화하여 적절한 강도의 성형물의 제작을 위하여 우선, 흑삼 농축액 및 분말을 제외하고(일정량의 ginsenosides 함량을 유지하기 위하여 함량을 바꿀 수 없음) 쌀가루(20%), 옥수수전분(7%) 및 유당(2%)의 기준함량에서 각각 조절하여 환제형 제조조건을 최적화를 수행하였다.



그림 7 Pills of Black Ginseng

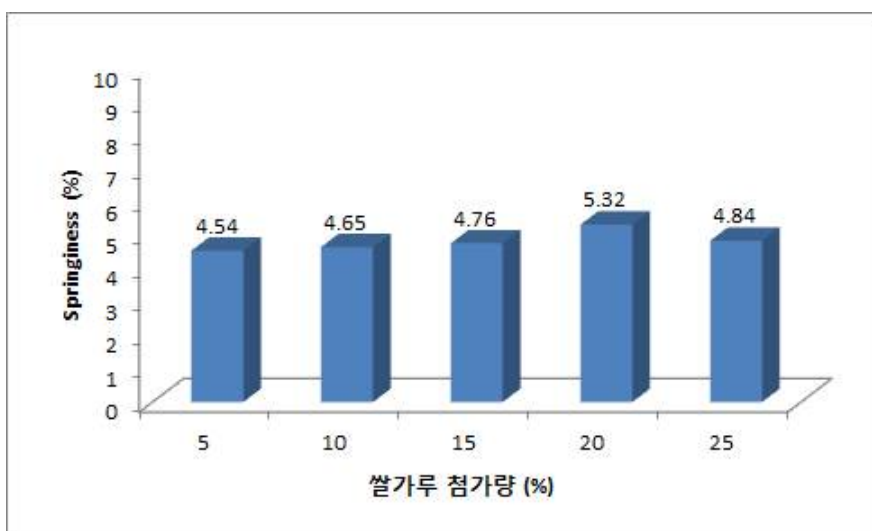
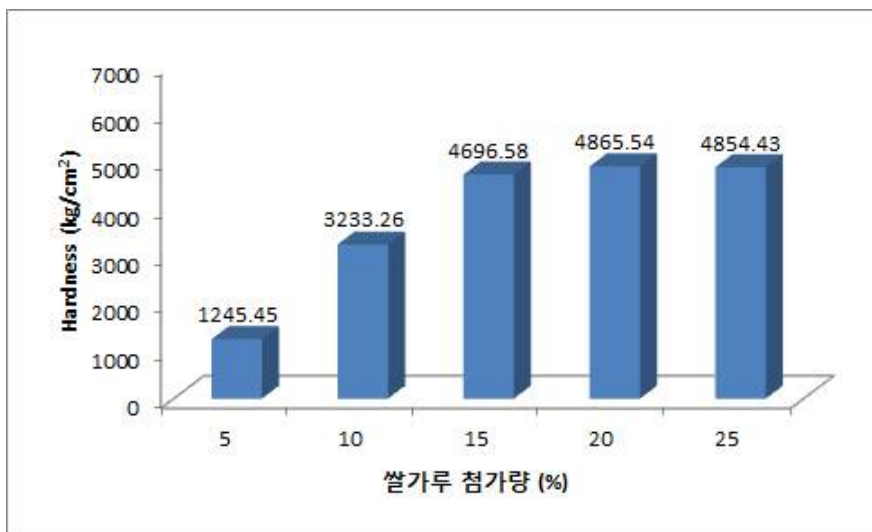


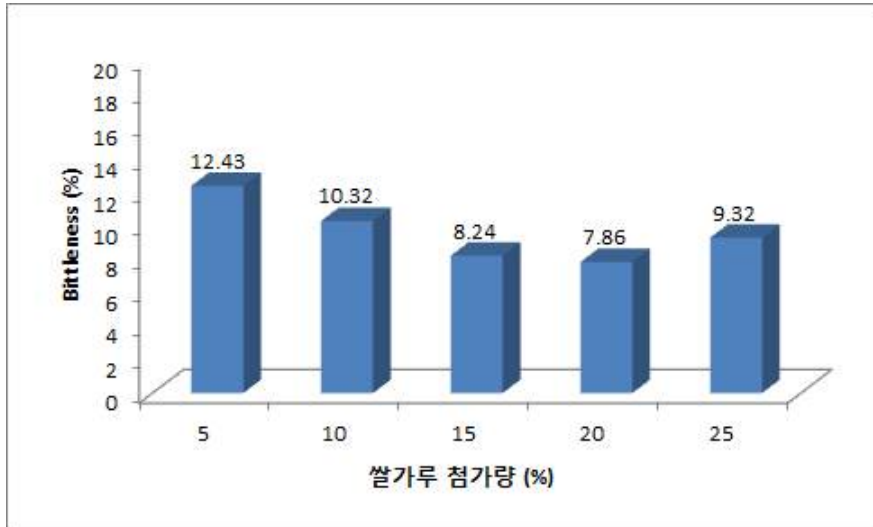
- 흑삼환(Pills of Black Ginseng)의 제조 최적화를 위하여 부형제로 사용되는 쌀가루, 옥수수 전분 및 유당의 첨가량을 달리하여 texture analysis를 실시하였다. texture는 rheometer (Compac-100, Sun science Co. Ltd., Japan)을 이용하여 mastication test를 실시하였고 plunger diameter 10 mm, table speed 60mm/min, sample height 10 mm, loadcell 20 g의 조건으로 시료 당 3회 반복 측정하여 평균치를 나타내었다. 시료는 성형 완료된 환을 개별로 분석하였고, 견고성(hardness), 탄력성(springiness), 부서짐성(brittleness)을 측정하였다.

나. 부형제와의 상호작용 분석 결과 및 고찰

(1) 쌀가루 함량에 따른 환의 texture 분석

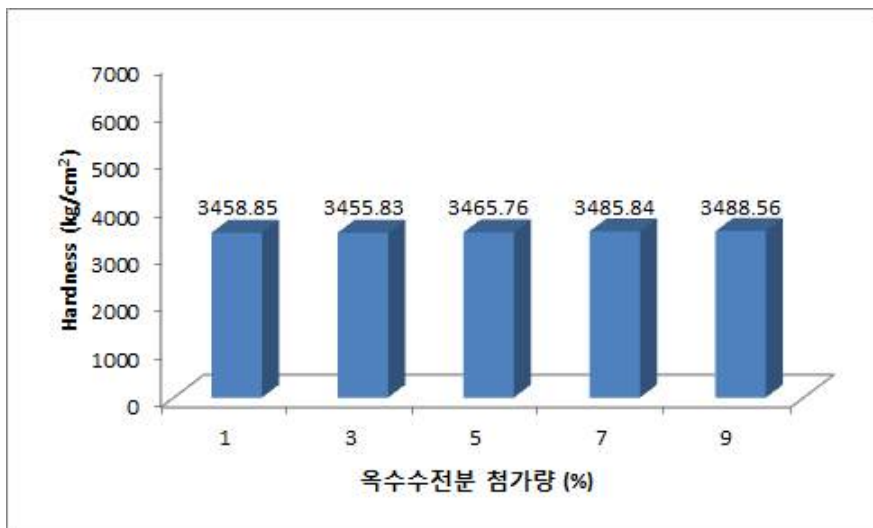
- 쌀가루 첨가량을 달리하여 흑삼환을 제조하였을 때 견고성(hardness)는 첨가량 20% 일 때 가장 높았고, 탄력성(springiness) 역시 20% 첨가시 가장 높은값을 나타내었다. 또한, 부서짐성(brittleness)은 20% 첨가량에서 가장 낮은 값을 나타내었는데 15%에서 25%의 구간을 더욱 세분화하여 측정해 볼 필요가 있다.

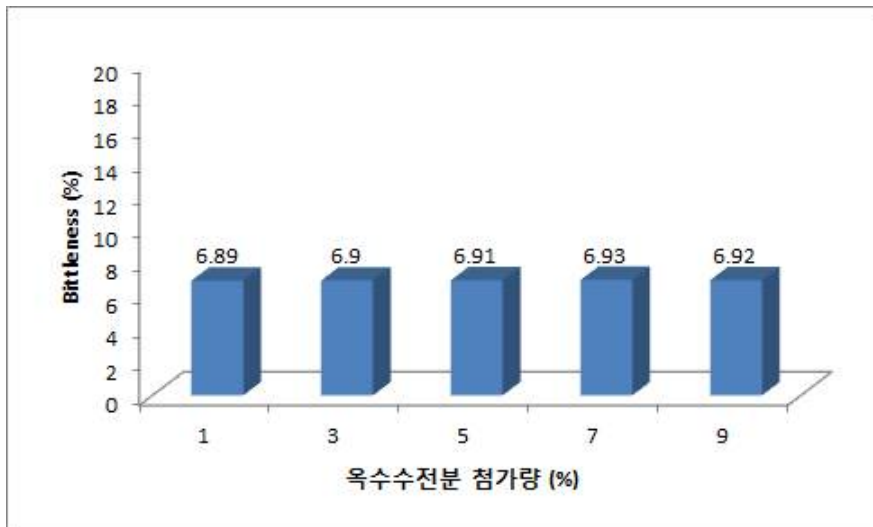
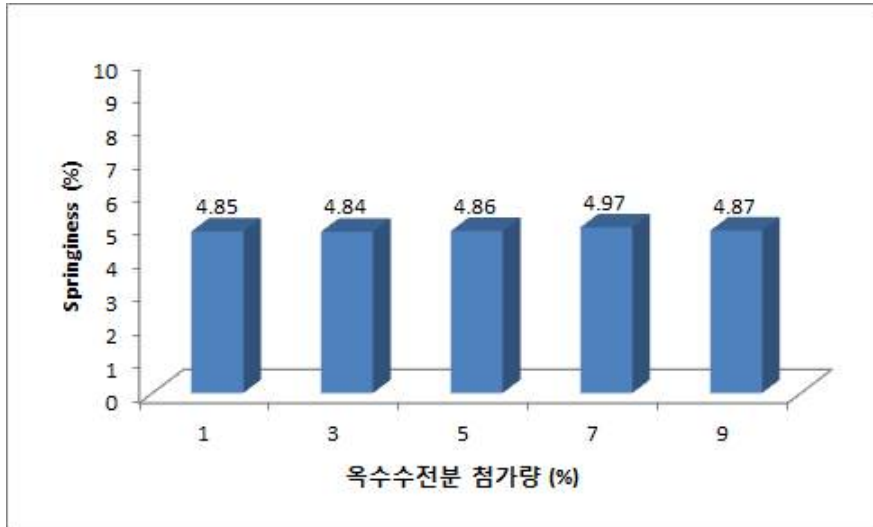




(2) 옥수수전분 함량에 따른 환의 인장강도 분석

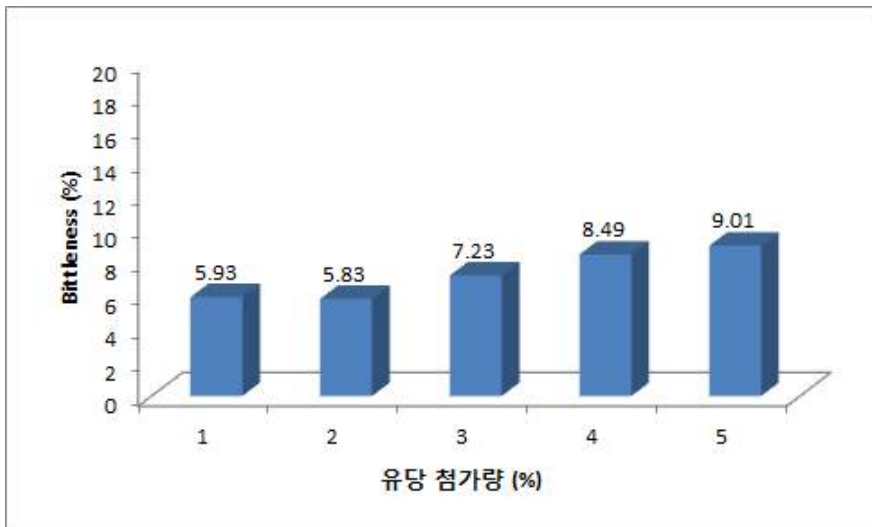
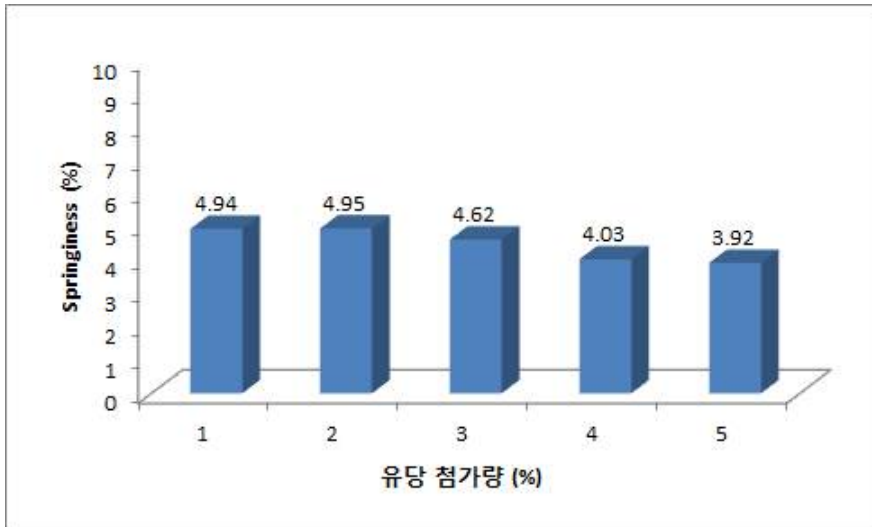
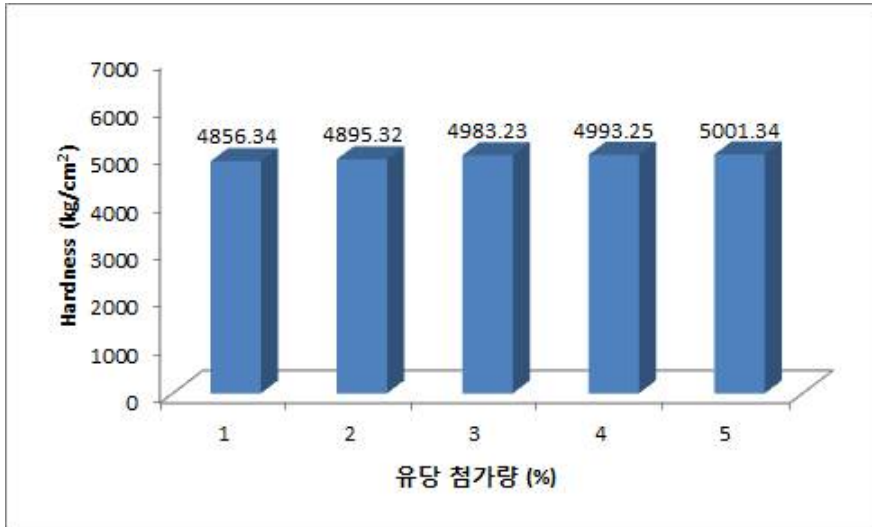
- 옥수수전분의 첨가량에 따른 견고성(hardness), 탄력성(springiness), 부서짐성(brittleness)의 변화는 거의 나타나지 않았다. 따라서 옥수수전분의 첨가량은 흑삼환의 정도에 영향을 미치지 않는다고 사료된다.





(3) 유당 함량에 따른 환의 인장강도 분석

- 유당의 함량에 따른 견고성(hardness)의 차이는 보이지 않았으나, 유당의 첨가량이 증가할수록 탄력성(springiness)은 떨어졌고, 부서짐성(brittleness)은 증가하였다.



5. 시제품 및 본제품 개발 및 생산

(1) Main design



(2) 신왕수흑삼 고려흑삼정골드



제품사양 및 표기내용

제품유형	건강기능식품
원재료명	흑삼농축액(진세노사이드Rb1+Rg1의 함 2.5mg/g, 고형분 70%이상, 국산) 100%
포장단위	150g/240g
포장재질	유리병
섭취방법	1일 3회, 1일 1g을 직접또는 냉,온수에 타서 잘 저어 드십시오. 기호에 따라 감미료를 적당히 넣어 드셔도 좋습니다.
보관방법	습기와 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관하시고 개봉 후에는 제품이 변질 될수 있으므로 마개를 꼭 닫아 보관하십시오
유통기한	제조일로부터 24개월

(3) 신왕수흑삼 고려흑삼액골드



제품사양 및 표기내용

제품유형	홍삼음료
원재료명	흑삼추출액(고형분 2% 이상)-100% 국산
포장단위	50mlx30포, 50mlx60포
포장재질	폴리프로필렌
섭취방법	성인 1일 2회 1회 1포를 드십시오.
보관방법	직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관하십시오
유통기한	제조일로부터 24개월

(4) 신왕수흑삼 고려현탁액골드



제품사양 및 표기내용

제품유형	홍삼음료
원재료명	흑삼추출액(홍삼성분함량2.8mg/g 고형분 2%이상-국산) 80.267% 원료삼 배합비율 : 흑삼 (흑삼근류 70%, 흑미삼류 30%) 식물혼합농축액(남) [오자농축액, 대추농축액, 프락토올리고당, 복분자농축액, 숙지황농축액, 흑마늘농축액, 산약농축액, 오디농축액, 산수유농축액, 영지농축액, 맥문동농축액, 두충엽농축액, 복령농축액, 원지추출분말, 하수오농축액분말, 미카추출분말], 밀크씨슬, 시클로덱스트린, 이소말토올리고당, 구아검, 폴리덱스트로스, 헛개나무 추출분말, 글리신, L-아르기닌, 타우린, 멀티비타민 미네랄믹스, V-B1염산염, 자몽중자추출물, L-멘톨
포장단위	20mlx50포
포장재질	폴리프로필렌
섭취방법	성인 1일 1~2회 1회 1포(20ml)를 드십시오.
보관방법	직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관하십시오. 개봉 후에는 변질될 수 있으므로 바로 드십시오
유통기한	제조일로부터 24개월

(5) 신왕수흑삼 고려현탁액골드



제품사양 및 표기내용

제품유형	홍삼제품
원재료명	흑삼농축액 (진세노사이드Rb1+Rg1+Rg3의 합8mg/g, 고형분 60% 이상) 10% 원료삼 배합 비율 - (흑삼근70%, 흑미삼30%/원산지:국산) 포도당, 유당
포장단위	3gx100포(300g)
포장재질	폴리에틸렌(PE)
섭취방법	성인1일 3회 1회1포를 직접 또는 냉온수에 타서 드십시오.
보관방법	직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관하십시오.
유통기한	제조일로부터 24개월

제 2 절 특유성분 분리 분석 및 소재 개발

1. 흑삼으로부터 흑삼특유 사포닌의 분리 I

가. 흑삼으로부터 사포닌 분획의 추출

흑삼 95% EtOH 엑스 1080g을 증류수에 현탁하여 분획 깔때기에 넣고 Diethyl Ether넣어 shaking 하여 진탕하고 방치한 후 Ether층을 제거한다. 이 방법을 10회 처리하여 Diethyl Ether 분획(45g), 물 분획(998g)을 얻었다.

표본은 세명대학교 한방식품영양학부에 보관하고 있다.

나. 흑삼으로부터 사포닌 분획과Compound I (ginsenoside Rk₁)의 분리

위의 수가용성 분획을 증류수에 현탁하여 Diaion column에 흡착시킨 후 30% methanol 분획, 50% methanol 분획, 70% methanol 분획, 100% methanol 분획을 하였고, 100% methanol 분획 10g을 silica gel column에 전개용매 C:M:W /80:15:1로 전개하여 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH, 100% MeOH 순차적으로 치환하면서 전개하여 F1-F7를 얻었다. 위에서 얻은 F3로 ODS gel column에 전개 용매 [ACN 60%]로 전개하여 0.6g Compound I (ginsenoside Rk₁)를 얻었다. (scheme. 1.)

다. 흑삼으로부터 주 사포닌의 화학구조 동정

(1) 기기 및 조건

¹H-NMR spectrometer : 모델명-VNS, 제조회사-varian, 600MHz (미국)

¹³C-NMR spectrometer : 모델명-VNS, 제조회사-varian, 600MHz (미국)

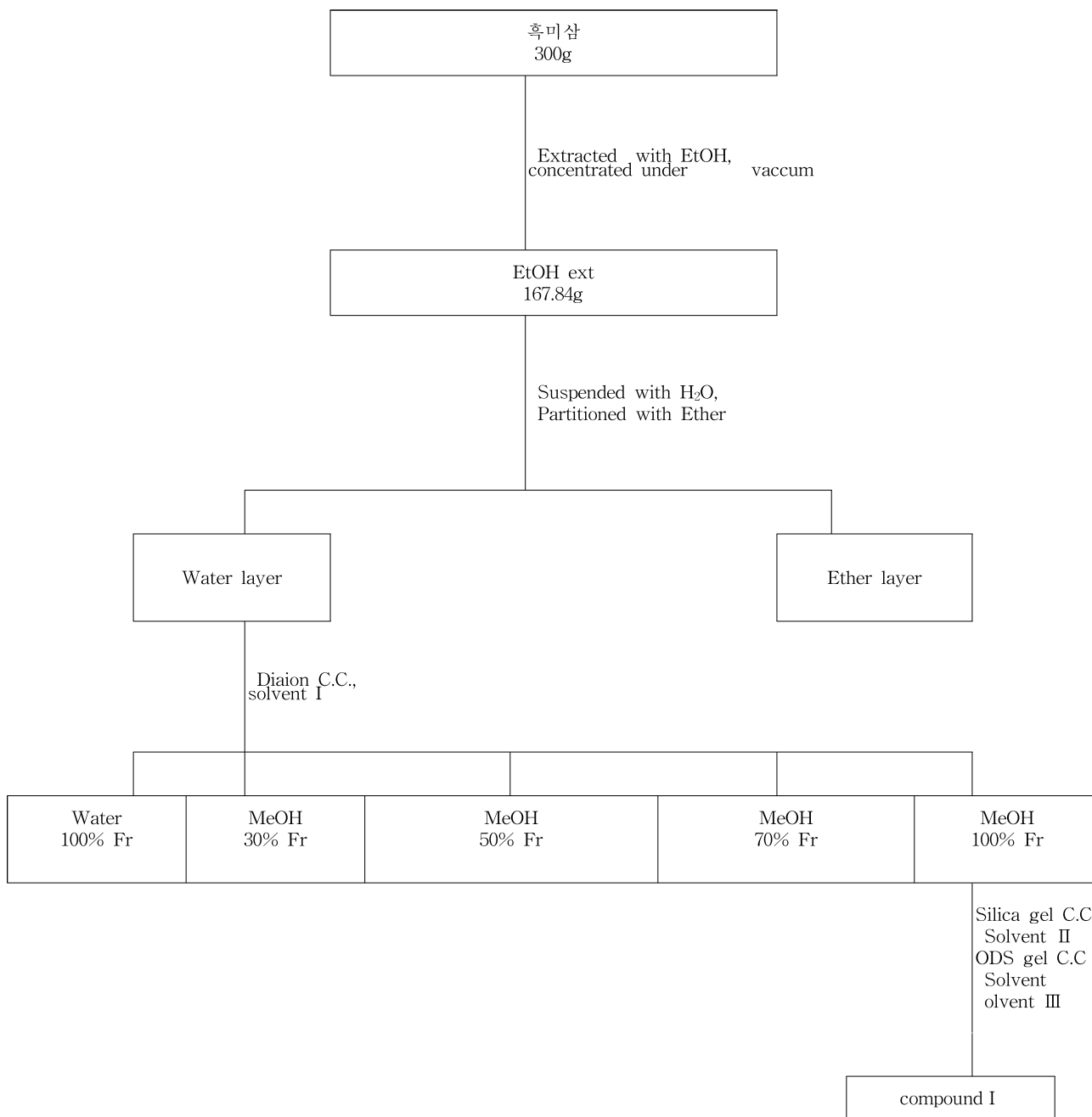
FAB-MS : JEOL JMS-700 D

(2) Compound I의 단리 및 물리 화학적 성상

¹³C-NMR : DMSO-d₆, δ ppm (Table. 1, Fig. 2.)

¹H-NMR : (Fig. 3.)

FAB-MS (m/z) : (Table. 4, Fig. 4)



Scheme 1. Extraction and Isolation ginsenoside Rk1

*Solvent I : 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH, 100% MeOH 순차적으로
치환

*Solvent II : $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 80:15:1$ v/v

*Solvent III : 50% ACN

Fig. 1. TLC chromatogram of Black ginseng extract and compound I and ginsenoside Rg5, Rk1



* a : Black ginseng ethyl alcohol extract, b : 30% MeOH fraction(F-1), c : 50% MeOH fraction(F-2), d : 70% MeOH fraction(F-3), e : 100% MeOH fraction(F-4), f : Rg₅+Rk₁, g : Rg₅+Rk₁(standard)

* a : Black ginseng ethyl alcohol extract, b : F-4-1, c : F-4-2, d : F-4-3, e : F-4-4, f : F-4-5, g : F-4-6, h : Rg₅+Rk₁, i : Rg₅+Rk₁(standard)

Fig. 2. ^{13}C -NMR spectra of compound I (d_5 -Py)

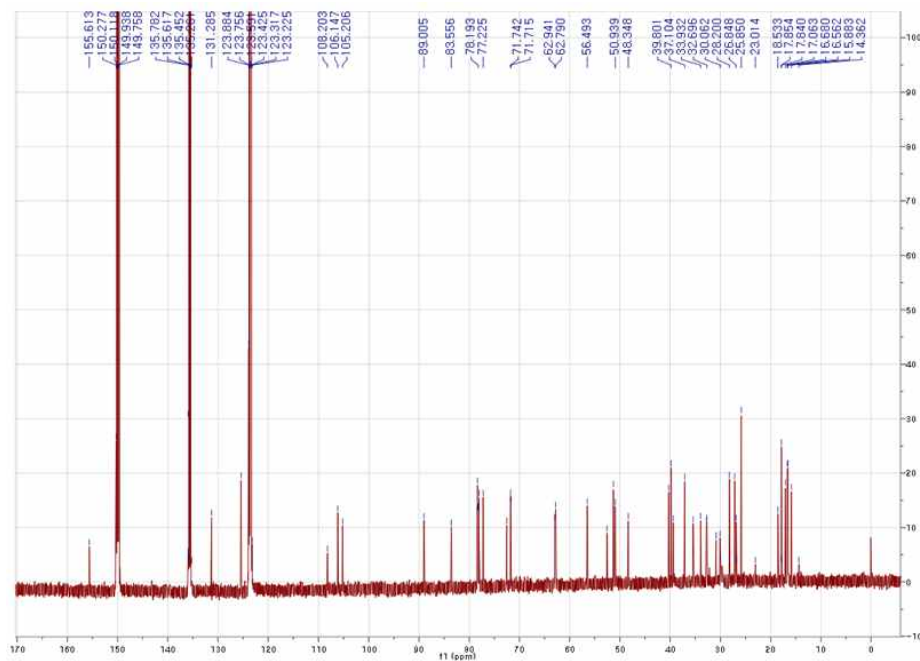


Fig. 3. ^1H -NMR spectra of compound I (d_5 -Py)

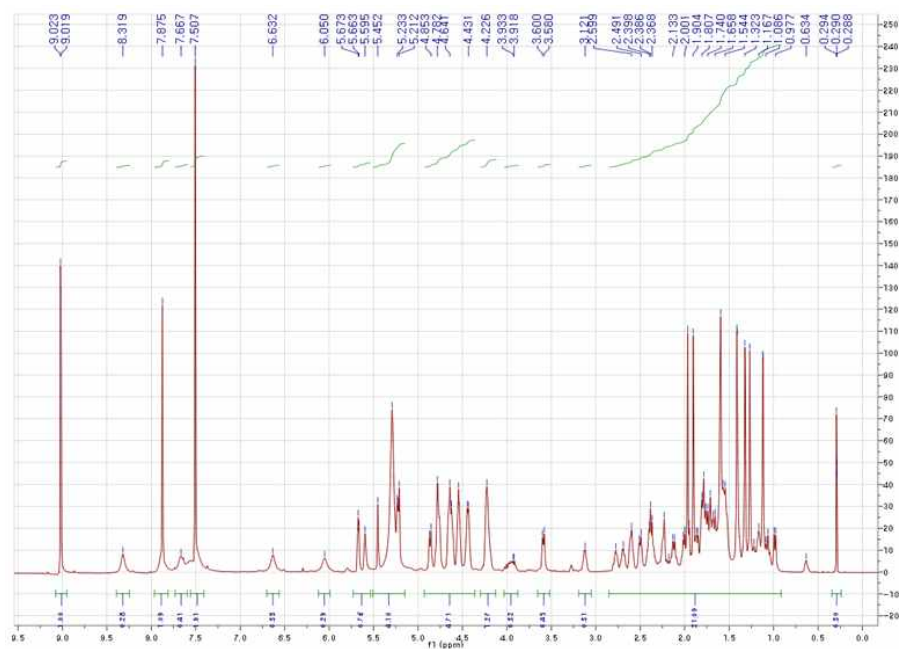
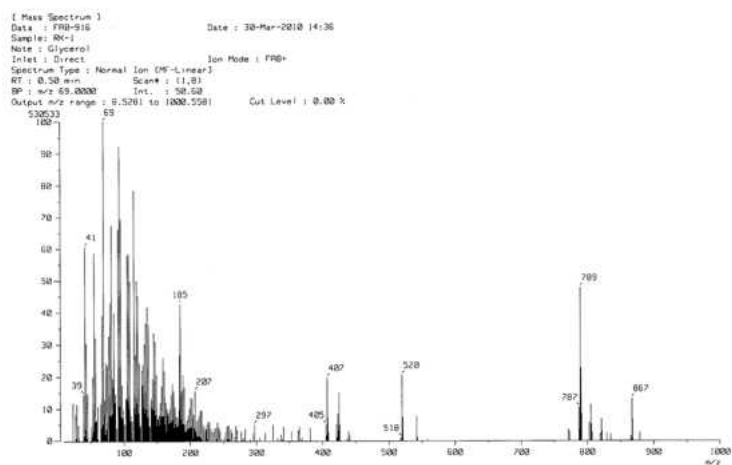


Table. 1. Chemical shifts of ginsenosides in ^{13}C -NMR

	ginsenoside Rk ₁	compound I
1	40.4	39.306
2	27.4	26.794
3	91.4	88.946
4	40.7	39.747
5	57.7	56.436
6	19.4	18.476
7	36.2	35.377
8	41.3	40.228
9	48.6	48.290
10	38.1	37.050
11	32.9	32.636
12	74.1	72.471
13	53.2	52.513
14	52.3	51.242
15	33.4	32.732
16	31.7	30.803
17	52.0	50.882
18	16.8	16.503
19	16.2	15.825
20	156.3	155.565
21	107.7	107.5
22	35.0	33.880
23	27.9	27.094
24	125.9	125.364
25	132.3	131.226
26	26.0	25.783
27	17.9	17.775
28	28.5	28.147
29	17.0	16.625
30	17.2	17.005
1'	104.6	105.154
2'	81.2	83.523
3'	78.4	78.278
4'	71.7	71.669
5'	77.8	77.993
6'	63.0	62.744
1	105.5	106.108
2	76.4	77.183
3	78.6	78.376
4	72.0	71.701
5	78.0	78.145
6	63.2	62.892

Fig. 4. FAB-MS of compound I (ginsenoside Rk₁)



2. 흑삼 특유성분 고농도 함유 인삼 조성물 개발

가. 실험재료

본 연구에 사용한 미삼(Ginseng Radix palva, *Panax ginseng*)은 Fig. 1에서 보는바와 같이 충청남도 금산 금산인삼사(대표 : 김상수)에서 2010년 8월 20일에 10kg을 구입하였고, 얻은 시료를 대상으로 조건별 초음파 처리후, 인삼의 사포닌함량을 비교 검토하였다. 각각의 제품 표본은 세명대학교 한방식품영양학부에 보관하고 있다.



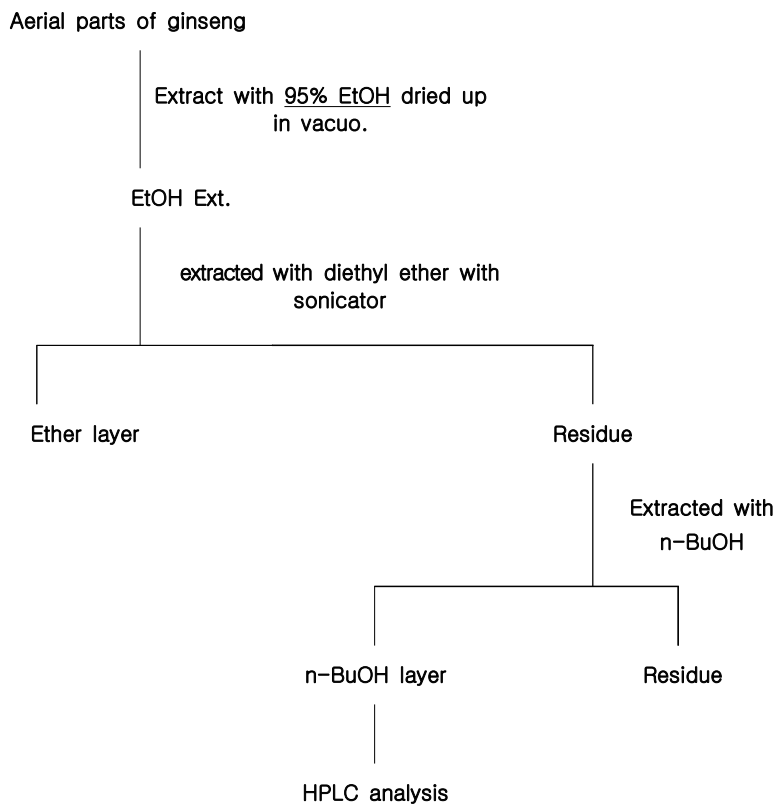
Fig 1. Figure of Ginseng Radix palva

나. 미삼 초음파 처리 조성물 조제

미삼 각각 500g에 Ethyl alcohol 2,500ml를 가하여 4회 환류 추출후 여과하여 감압농축하여 Ethyl alcohol 엑스를 얻었다. 얻은 에탄올 엑스 1g에 2배식초 200ml를 넣고, 초음파를 이용하여 5, 10, 15, 20, 25 그리고 30분씩 초음파 처리를 각각 1회씩 시행하였다.

다. 조사포닌(crude saponin) 조제

Scheme. 1에서 보는바와 같이 초음파 처리 조성물 각 2g에 diethylether 50ml를 가하여 1시간씩 3회 sonicator (고도기업, 4020P, 한국)로 추출한 후, 원심분리하여 상등액을 제거한다. 얻은 잔사에 수포화 butanol 50ml를 가하여 2시간씩 3회 추출하고, 원심분리하여 상등액을 취하여 여과하고, 감압농축을 하여 조사포닌을 얻는다.



Scheme. 1. Fractionation of crude saponin

라. HPLC-ginsenoside의 분석

위에서 얻은 엑스를 고 등의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표준과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표준은 Chromadex (U.S.A.)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside를 사용하였다.

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system (Waters, 미국)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18P (250*3mm)을 사용하였다.

이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율은 17%(0 min)에서 25%(20 min), 42%(38 min), 60%(85 min) 그리고 80%(95 min)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다.

전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

Table 1. HPLC gradient elution on the separation for each of ginsenoside standards

Time	Flow	A% (ACN)	B% (Water)
0	0.8	17.0	83.0
20	0.8	25.0	75.0
38	0.8	42.0	58.0
85	0.8	60.0	40.0
95	0.8	80.0	20.0
105	0.8	80.0	20.0
115	0.8	100	0.0
125	0.8	100	0.0
130	0.8	17.0	83.0
140	0.8	17.0	83.0

1) Mobile phase :

Solvent A - ACN

Solvent B - water

2) Flow rate : 0.8 ml/min

3) Column : Eurospher 100-5 C18P (Knauer, 3×250mm, Germany)

4) Detector : Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters, U.S.A.)

마. 결과 및 고찰

(1) 초음파 처리 미삼 조성물의 인삼 사포닌(Ginsenoside) 함량 비교 분석

본 연구에서는 인삼지상부에 2배식초를 가하여 초음파 처리 가공한 것을 대상으로 개별 ginsenoside의 함량 분포를 조사·비교함으로써 사포닌함유패턴을 중심으로 하는 차이점을 검토하여 ginsenoside Rg₃, Rg₅, Rk₁, Rh₁ 등의 흑삼 특유 prosapogenin을 고농도로 함유하는 제제를 개발하고 이의 이화학적인 기초정보를 제공하고자 한다.

분석한 인삼 사포닌은 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rg₅, Rg₆, Rh₁, Rh₄, Rk₁, Rk₃, F₁, F₄ 이었으며 이들은 Fig. 4~11과 같이 HPLC를 통하여 표품과 직접 비교·확인하고 평균을 통계 처리하여 계산하였다. 미삼은 충청남도 금산에서 수집하였으며, 이를 대상으로 Saponin 함량을 비교 분석한 결과, 미삼 초음파 처리 조성물에서는 Table 4에서와 같이 조 사포닌의 양이 MGRP-25이 25.67%이었으며 MGRP-15는 25.29%이었으며, MGRP-10은 25.23%로서 초음파 25분 처리 미삼 조성물의 조 사포닌 함량이 높게 측정되었다.

각 ginsenoside의 총합인 총 사포닌(total saponin) 함량에 있어서는 Table 4에서 보는 바와 같이 MGRP-25이 6.7154%이었으며 MGRP-5은 6.2554%이었으며, MGRP-10은 4.8267%로서 초음파 25분 처리 미삼 조성물의 총 사포닌이 높은 함량을 보여주었다.

열(heat)이나 산(acid)에 의해서 가수분해되어 생성되는 인삼 prosapogenin 성분은 천연에 존

재하는 인삼사포닌 배당체(glycoside)보다 체내의 흡수력이 좋아서 약리효능이 강화되는 것으로 알려져 있다.

홍삼 가공시 쪄 때 열에 의해서 생성되는 인공물(artifact)이며, 인삼의 대표적인 홍삼특유성분으로 암 예방 및 암예방작용, 암세포성장 억제작용, 혈압강하 작용, 뇌신경세포 보호작용, 항혈전작용, 항산화작용을 나타내는 ginsenoside Rg₃의 경우, MGRP-25이 3.2945%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, MGRP-5(3.2154%), MGRP-10(2.4431%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

또한, 또다른 열 가수분해물인 ginsenoside Rg₅ 와 Rk₁의 경우, MGRP-25이 1.7535%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, MGRP-5(1.3809%), MGRP-15(1.2019%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 반면에 미삼 엑스(MGRP)에는 0.1226%로 낮은 함량을 보여주었다.

따라서, 홍삼 특유 성분이며, 생리활성 물질인 ginsenoside Rg₃, Rg₅, Rk₁ 등의 활성 사포닌이 5% 이상 고농도로 함유되는 하는 인삼 조성물은 미삼 엑스에 초음파 25분 처리가 최적 조건임을 확인할 수 있었다.

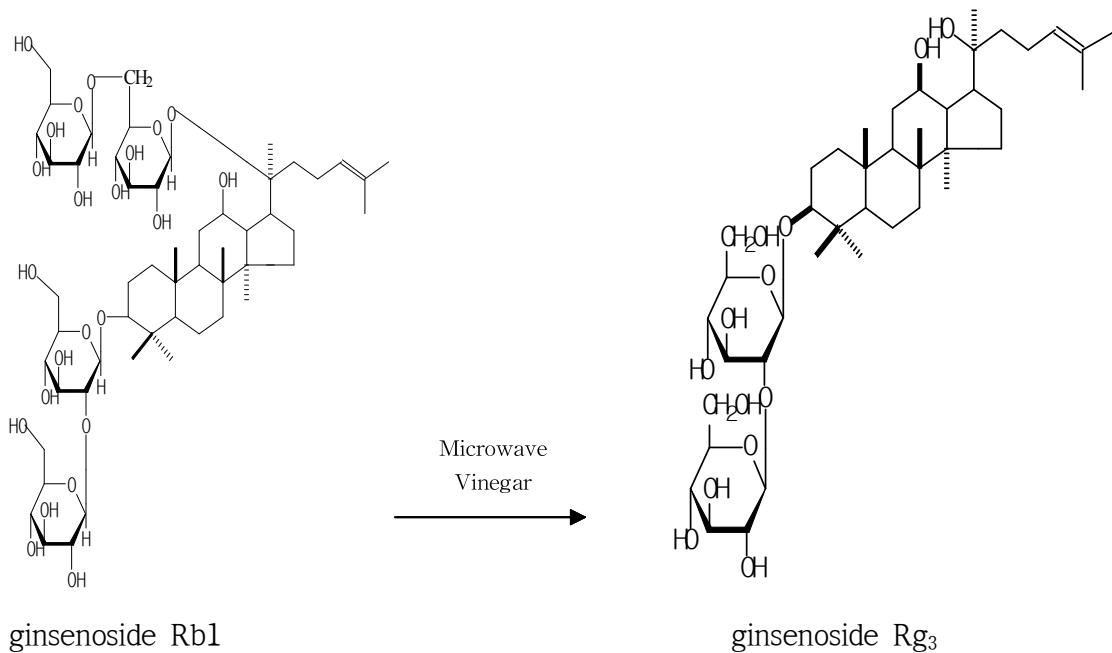


Fig. 2. Transformation of protopanaxadiol saponin ginsenoside Rb₁ to ginsenoside Rg₃

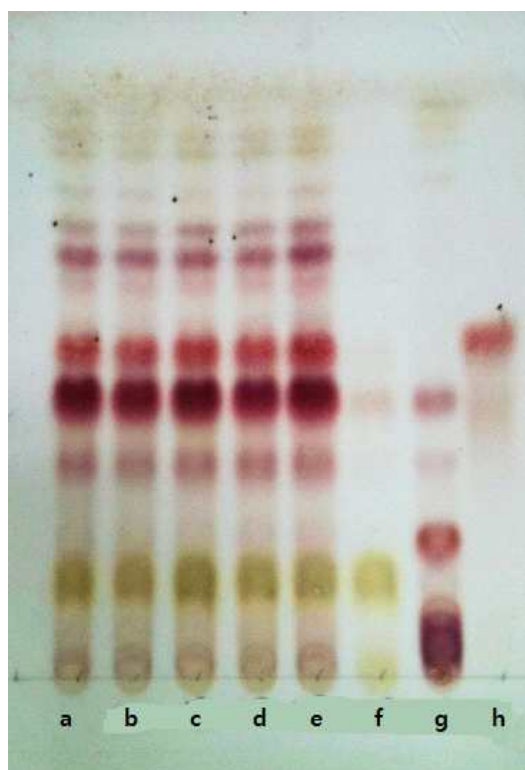


Fig 3. TLC chromatogram of ginsenosides detected from the Ginseng Radix palva extract processed with ultrasonication

a : MGRP-5, b : MGRP-10, c : MGRP-15, d : MGRP-20, e : MGRP-25, f : MGRP-30, g : MGRP, h : ginsenoside Rk₁+Rg₅

Table 2. The processing conditions of various ultrasonication on the Ginseng Radix palva extract

samples	Times (minute)
GRP ^{a)}	0
MGRP-5 ^{b)}	5
MGRP-10 ^{c)}	10
MGRP-15 ^{d)}	15
MGRP-20 ^{e)}	20
MGRP-25 ^{f)}	25
MGRP-30 ^{g)}	30

(%)

* a : (GRP, Ginseng Radix palva), b : (MGRP-5, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 5 minutes), c : (MGRP-10, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 10 minutes), d : (MGRP-15, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 15 minutes), e : (MGRP-20, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 20 minutes), f : (MGRP-25, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 25 minutes), g : (MGRP-30, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 30 minutes)

Table 3. Content of Crude Saponins in the Ginseng Radix palva extract processed with ultrasonication

(%)

samples	crude saponins
GRP ^{a)}	85.88
MGRP-5 ^{b)}	23.95
MGRP-10 ^{c)}	25.23
MGRP-15 ^{d)}	25.29
MGRP-20 ^{e)}	22.67
MGRP-25 ^{f)}	25.67
MGRP-30 ^{g)}	24.17

* a : (GRP, Ginseng Radix palva), b : (MGRP-5, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 5 minutes), c : (MGRP-10, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 10 minutes), d : (MGRP-15, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 15 minutes), e : (MGRP-20, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 20 minutes), f : (MGRP-25, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 25 minutes), g : (MGRP-30, Ginseng Radix palva processed with ultrasonication for 30 minutes)

Table 4. The ginsenoside composition of the Ginseng Radix palva extracts processed with ultrasonication as time passes

(%,w/w)

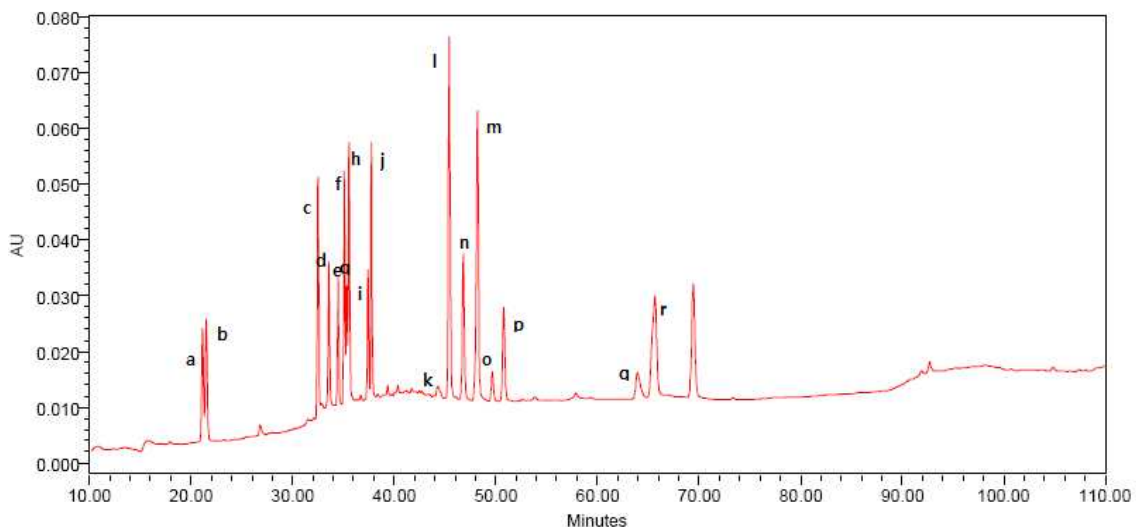
Ginsenosides	Ginseng fruits processed with ultrasonication						
	GRP	MGRP-5	MGRP-10	MGRP-15	MGRP-20	MGRP-25	MGRP-30
Rb ₁	4.8397± 0.0918	-	-	-	-	-	-
Rb ₂	3.8781± 0.0371	0.2977± 0.0312	0.1825± 0.0266	0.1951± 0.0099	0.1655± 0.0025	0.2865± 0.0287	0.1062± 0.0010
Rc	-	-	-	-	-	-	-
Rd	0.3598± 0.0036	-	-	-	-	-	-
Re	5.4865± 0.0277	0.0353± 0.0069	0.0125± 0.0055	0.0080± 0.0012	0.0060± 0.0021	0.0137± 0.0076	-
Rf	0.6708± 0.0232	0.1140± 0.0090	0.0937± 0.0095	0.0742± 0.0110	0.0475±0.0020	0.0815± 0.0039	0.0287± 0.0017
Rg ₁	1.3570± 0.0552	0.0127± 0.0056	0.0107± 0.0022	-	-	-	-
Rg ₂	7.0851± 0.3425	0.4790± 0.0236	0.3835± 0.0276	0.3124± 0.0109	0.2917± 0.0089	0.4304± 0.0194	0.1657± 0.0129
20S-Rg ₃	0.2324± 0.0097	1.7003± 0.0094	1.2989± 0.0567	1.0684± 0.0163	0.8742± 0.0149	1.5830± 0.0049	0.4902± 0.0080
20R-Rg ₃	1.7515± 0.0218	1.5151± 0.0087	1.1442± 0.0522	1.1953± 0.0177	1.1374± 0.0163	1.7115± 0.0037	0.7238± 0.0056
Rg ₅	0.0959± 0.0054	0.9147± 0.0066	0.7333± 0.0354	0.8264± 0.0135	0.7328± 0.0084	1.1666± 0.0149	0.4936± 0.0027
Rg ₆	0.0235± 0.0043	0.0417± 0.0047	0.0397± 0.0027	0.0566± 0.0044	0.0451± 0.0050	0.0920± 0.0028	0.0290± 0.0024
Rh ₁	-	0.4226± 0.0042	0.3350± 0.0238	0.3124± 0.0109	0.2409±0.0036	0.3959± 0.0248	0.1819± 0.0013
Rh ₄	-	0.0701± 0.0022	0.0600± 0.0016	0.0726± 0.0007	0.0654± 0.0022	0.1160± 0.0070	0.0420± 0.0048
Rk ₁	0.0267± 0.0176	0.4662± 0.0014	0.3737± 0.0185	0.3755± 0.0053	0.3121± 0.0041	0.5869± 0.0078	0.2102± 0.0014
Rk ₃	-	0.0320± 0.0036	0.0285± 0.0021	0.0288± 0.0016	0.0247± 0.0019	0.0459± 0.0044	0.0176± 0.0010
F ₁	1.4399± 0.0145	-	-	-	-	-	-
F ₄	0.0084± 0.0043	0.1540± 0.0092	0.1306± 0.0030	0.1415±0.0021	0.1182± 0.0054	0.2057± 0.0058	0.0768± 0.0006
Total saponin ^{a)}	27.2555	6.2554	4.8267	4.7538	4.0616	6.7154	2.5657
Rg ₃ ^{b)}	1.9839	3.2154	2.4431	2.2637	2.0116	3.2945	1.2140
Rg ₅ +Rk ₁ ^{c)}	0.1226	1.3809	1.1070	1.2019	1.0449	1.7535	0.7038

a) Sum of individual ginsenosides content

b) 20S-ginsenoside Rg₃ + 20R-ginsenoside Rg₃

c) ginsenoside Rg₅ + ginsenoside Rk₁

Values represent the mean±S.E. (n=3)



- * a : Ginsenoside Rg1 , b : Ginsenoside Re, c : Ginsenoside Rf,
 d : Ginsenoside Rb1, e: Ginsenoside Rg2, f : Ginsenoside Rh1,
 g : Ginsenoside Rc, h : Ginsenoside Rb2, I : Ginsenoside F1,
 j : Ginsenoside Rd, k : Ginsenoside Rg6, l : Ginsenoside F4,
 m : Ginsenoside Rk3, n : Ginsenoside Rh4 , o : Ginsenoside (20S)Rg3,
 p : Ginsenoside (20R)Rg3, q : Ginsenoside Rk1, r :Ginsenoside Rg5

Fig. 4. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the standard authentics

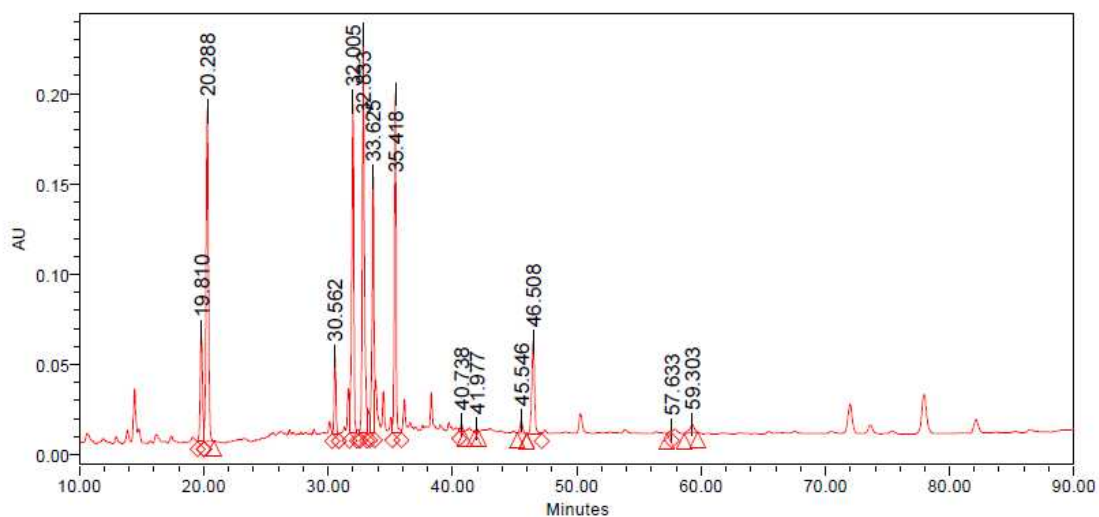


Fig. 5. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the Ginseng Radix palva extract (GRP)

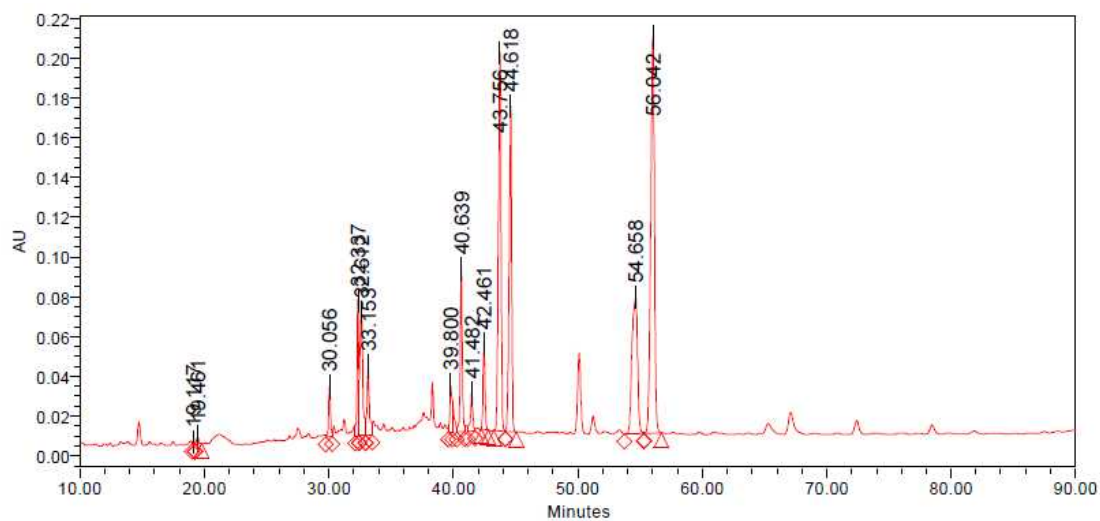


Fig. 6. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the Ginseng Radix palva extract processed with ultrasonication for 5 minutes (MGRP-5)

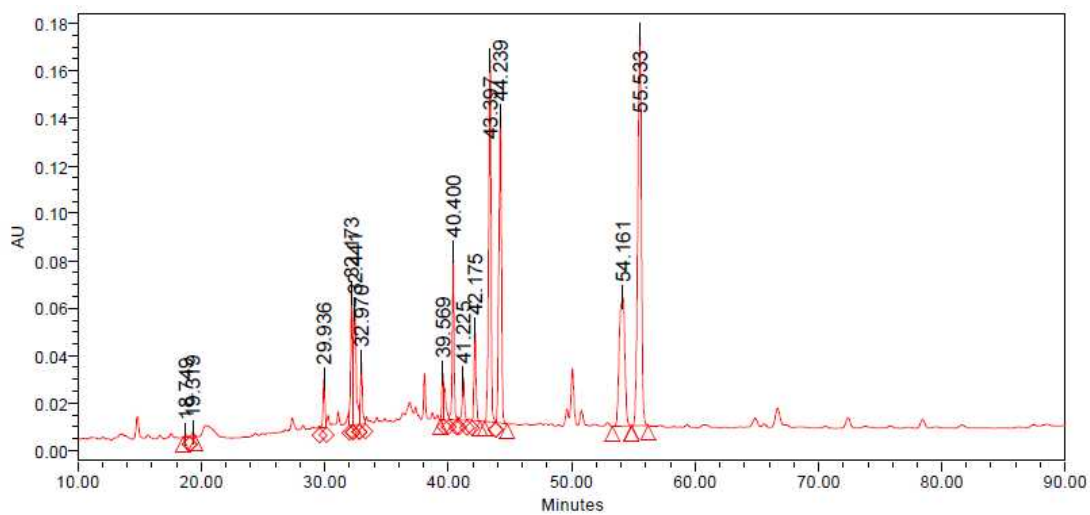


Fig. 7. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the Ginseng Radix palva extract processed with ultrasonication for 10 minutes (MGRP-10)

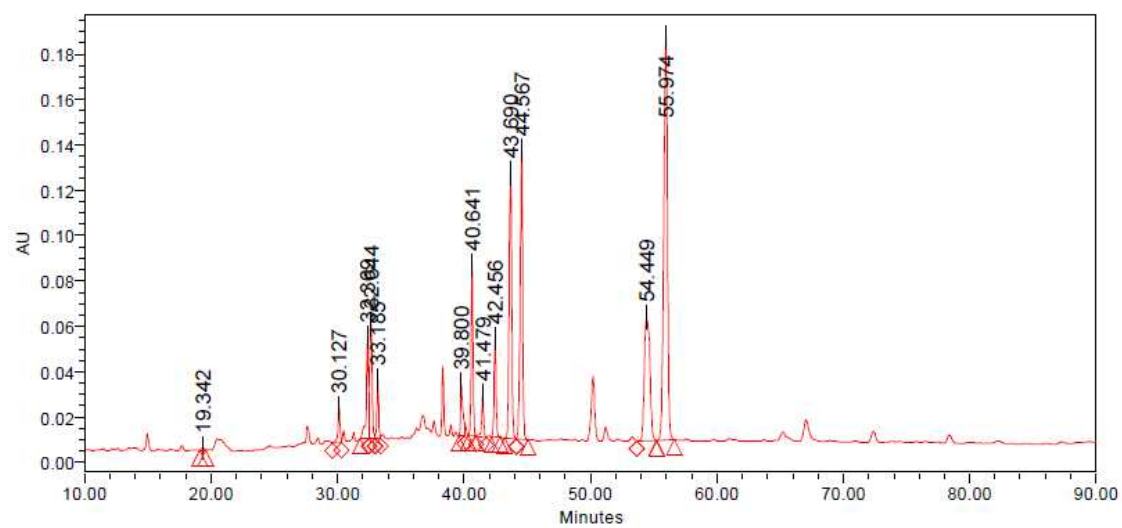


Fig. 8. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the Ginseng Radix palva extract processed with ultrasonication for 15 minutes (MGRP-15)

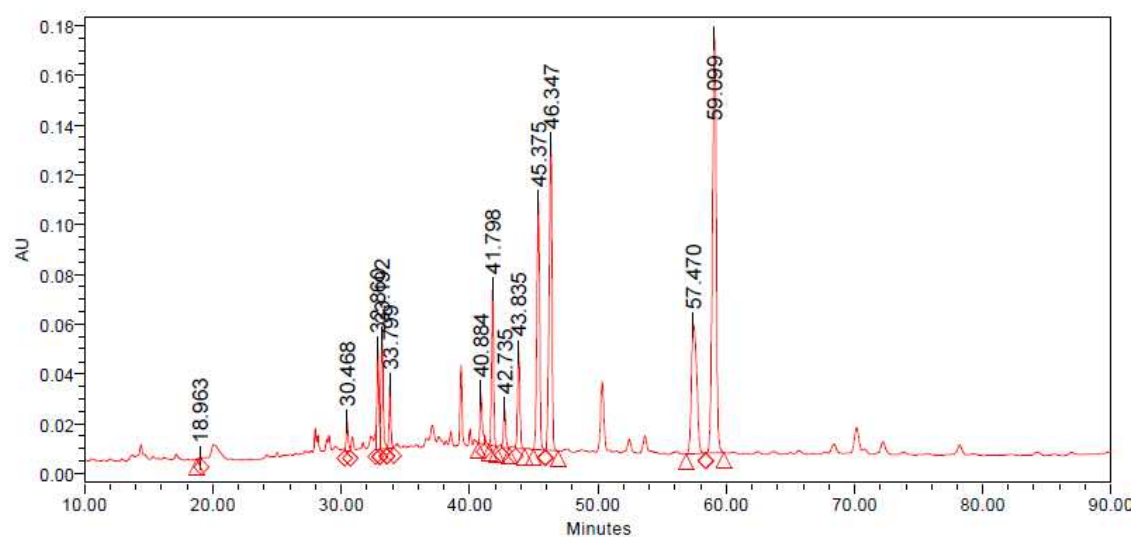


Fig. 9. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the Ginseng Radix palva extract processed with ultrasonication for 20 minutes (MGRP-20)

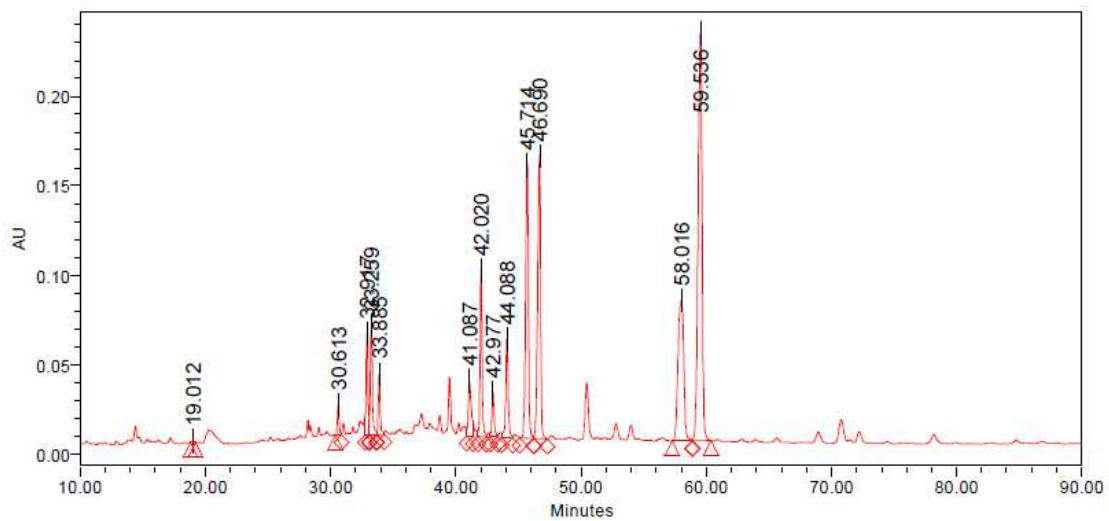


Fig. 10. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the Ginseng Radix palva extract processed with ultrasonication for 25 minutes (MGRP-25)

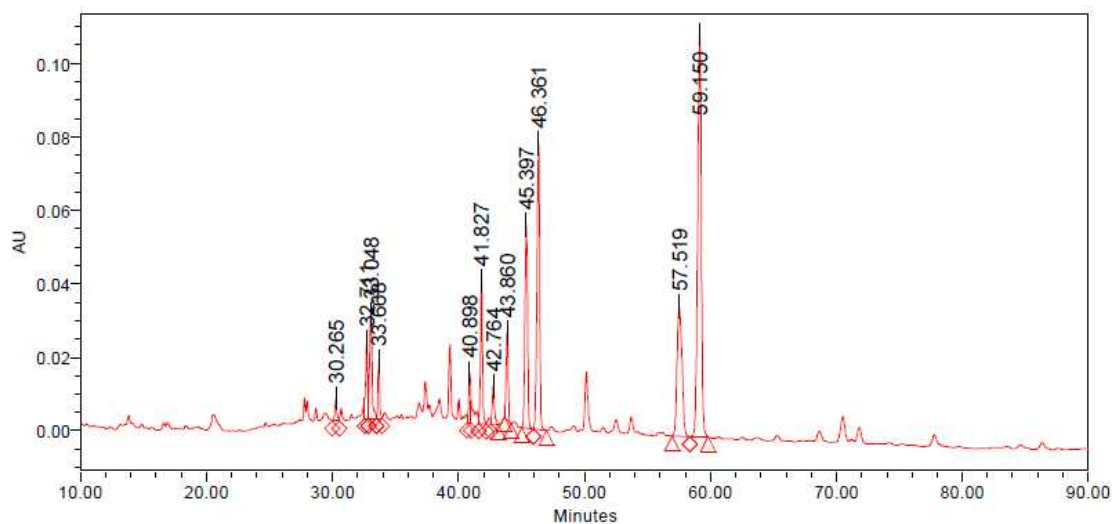


Fig. 11. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the Ginseng Radix palva extract processed with ultrasonication for 30 minutes (MGRP-30)

3. 흑삼으로부터 흑삼특유 사포닌의 분리 II

가. 흑삼으로부터 사포닌 분획의 추출

흑삼 95% EtOH 엑스 200g을 증류수에 현탁하여 분획 깔때기에 넣고 Diethyl Ether넣어 shaking 진탕하고 방치한 후 Ether층을 제거한다. 이 방법을 4회 반복한다. 처리한 Diethyl Ether층은 모두 제거하고 물층은 버리지 않고 수포화 부탄올을 넣어 shaking 진탕하고 방치하여 수포화 부탄올층을 모아둔다. 모아둔 수포화 부탄올층은 농축하여 가루상태(102g)로 만들어 놓았다. 표본은 세명대학교 한방식품영양학부에 보관하고 있다.

나. 흑삼으로부터 사포닌 분획과Compound I (ginsenoside Rg5)의 분리

위의 부탄올 분획을 Chloroform:Methanol:Water(100:25:2.5)를 이동상으로 하여 Silicagel column에 로딩하여 현재까지 총 Fr.1~Fr5까지 5개의 분획을 얻었고, 그 중 Fr.3 분획 10g을 silica gel column에 전개용매 C:M:W(115:25:2.5)로 전개하여 현재까지 F1~F7를 얻었다.

다. 흑삼으로부터 주 사포닌의 화학구조 동정

(1) 기기 및 조건

^1H -NMR spectrometer : 모델명-VNS, 제조회사-varian, 600MHz (미국)

^{13}C -NMR spectrometer : 모델명-VNS, 제조회사-varian, 600MHz (미국)

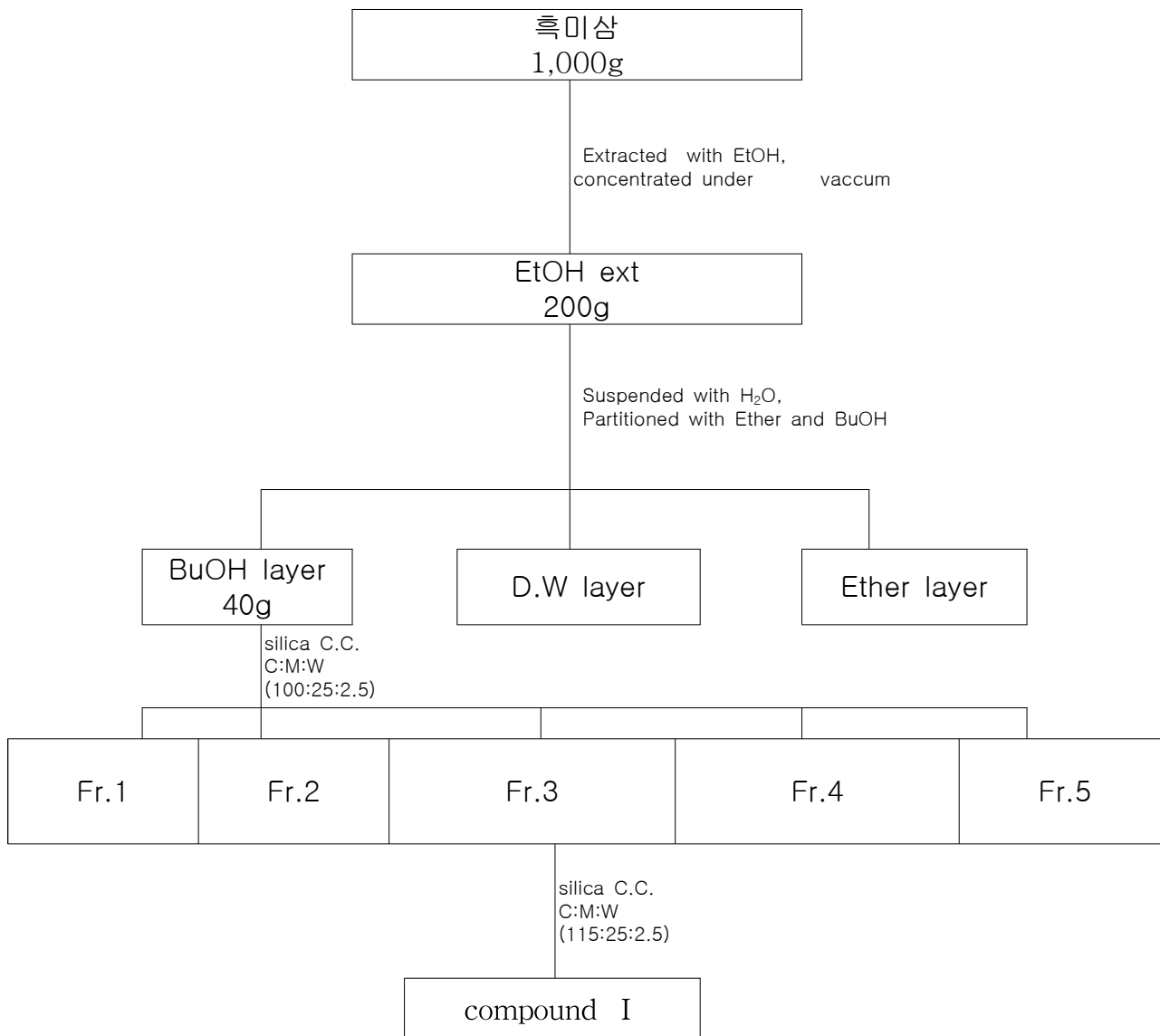
FAB-MS : JEOL JMS-700 D

(2) Compound I의 단리 및 물리 화학적 성상

^{13}C -NMR : DMSO-d₆, δ ppm (Table. 1, Fig. 2.)

^1H -NMR :(Fig. 3.)

FAB-MS (m/z) :(Table. 4, Fig. 4)

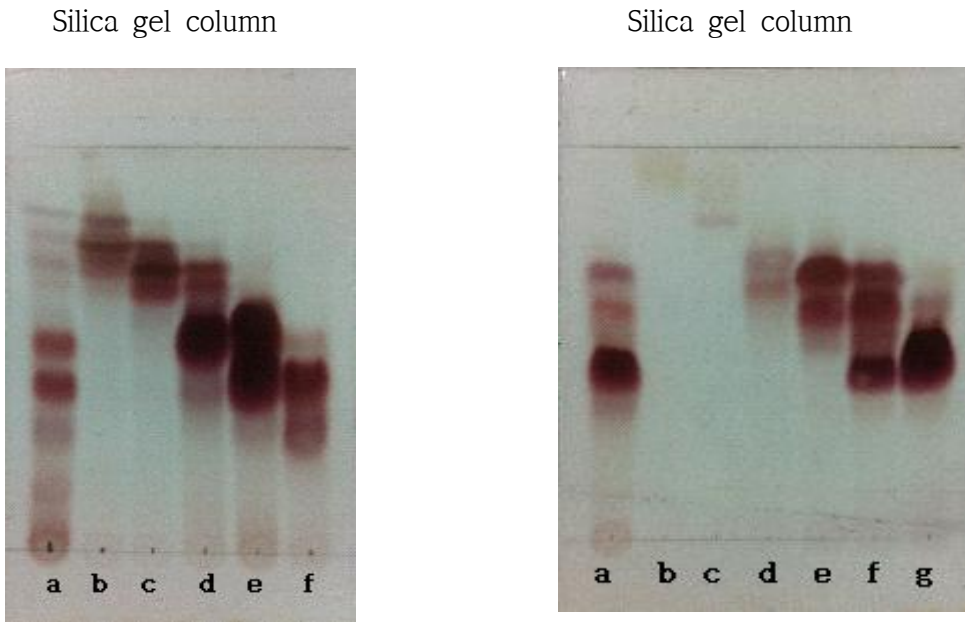


Scheme 1. Extraction and Isolation ginsenoside Rg₅

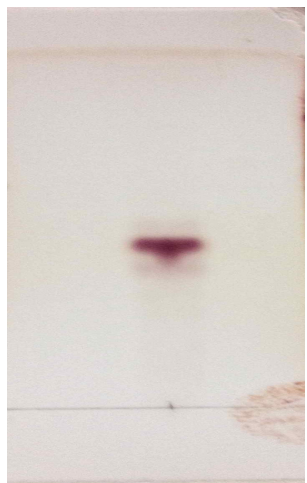
*Solvent I : CHCl₃ : MeOH : H₂O = 100:25:2.5 v/v

*Solvent II : CHCl₃ : MeOH : H₂O = 115:25:2.5 v/v

Fig. 1. TLC chromatogram of Black ginseng extract and compound I and ginsenoside Rg5, Rk1



a : Black ginseng ethyl alcohol extract BuOH,	a : Black ginseng ethyl alcohol extract BuOH
b : fraction-1	fraction-3
c : fraction-2	b : F-3-1
d : fraction-3	c : F-3-2
e : fraction-4	d : F-3-3
f : fraction-5	e : F-3-4
	f : F-3-5
	g : F-3-6



compound I

전개용매 Chlorform : MeOH : Water = 70 : 30 : 4

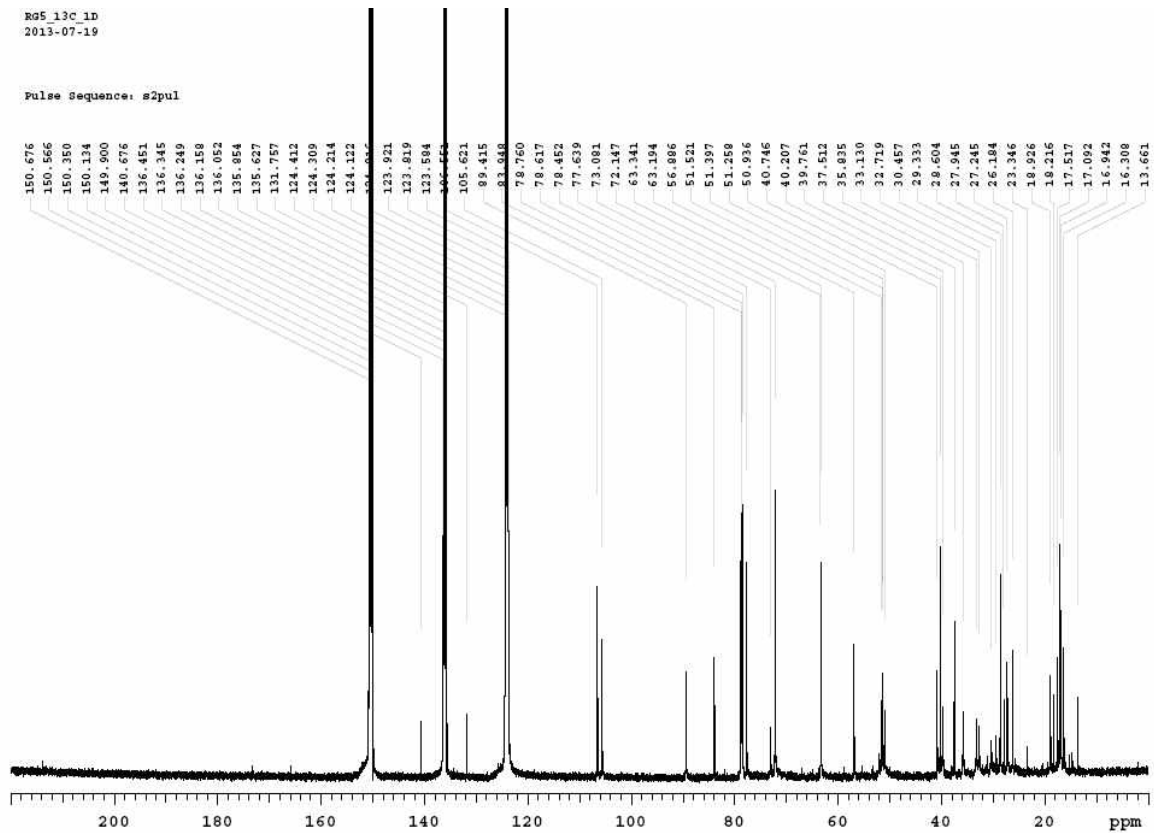


Fig. 2. ^{13}C -NMR spectra of compound I (d_5 -Py)

865_1H_1d
2013-07-19

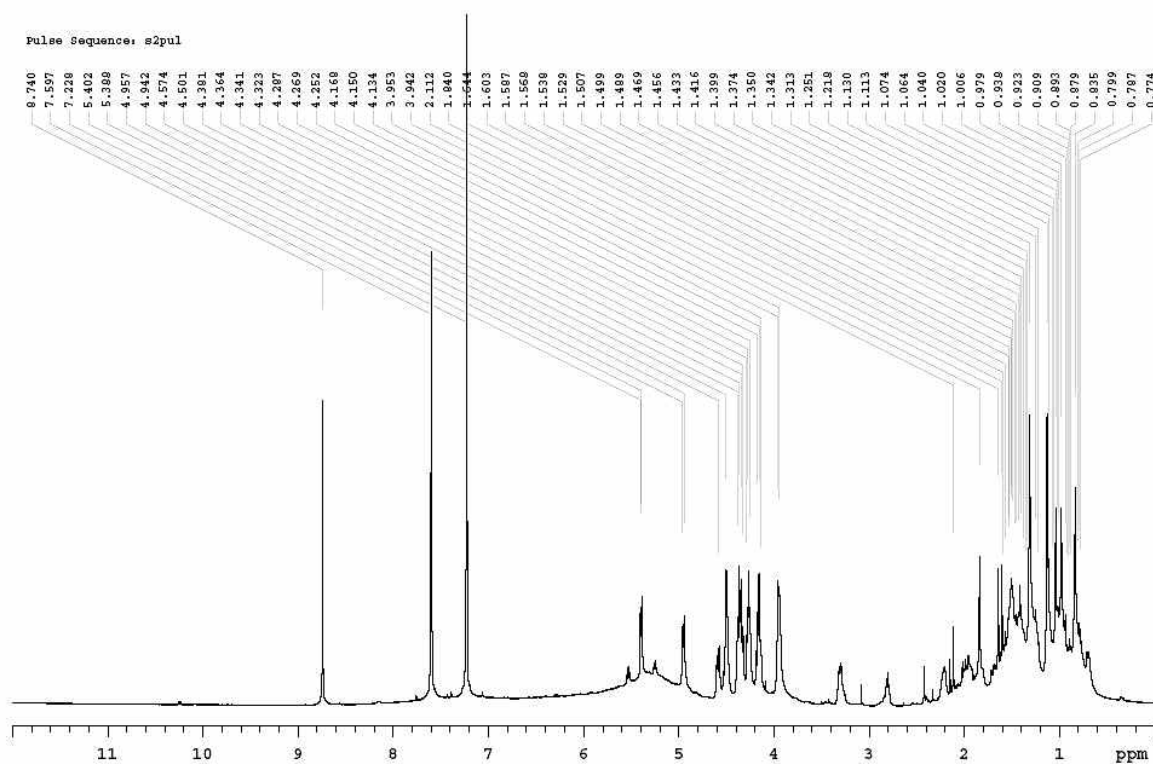


Fig. 3. ^1H -NMR spectra of compound I (d_5 -Py)

Table. 1. Chemical shifts of ginsenosides in ^{13}C -NMR

	ginsenoside Rg ₅	compound I
1	40.4	40.2
2	28.5	29.3
3	91.4	89.5
4	41.3	40.8
5	57.7	56.9
6	19.4	18.9
7	36.2	35.8
8	40.7	39.7
9	51.5	51.4
10	38.2	37.5
11	32.5	32.7
12	74.3	73.1
13	51.4	51.3
14	52.0	51.5
15	33.5	31.1
16	27.4	28.0
17	51.9	51.9
18	16.8	16.7
19	16.9	16.9
20	140.6	140.1
21	13.1	13.7
22	124.3	123.9
23	28.1	28.6
24	124.7	124.4
25	132.3	131.8
26	25.9	26.2
27	17.9	17.5
28	29.5	30.5
29	16.3	16.3
30	17.3	17.1
1'	106.7	106.6
2'	83.3	84.0
3'	78.4	78.8
4'	71.7	71.7
5'	77.8	77.6
6'	62.9	63.2
1	105.5	105.5
2	76.4	76.4
3	78.6	78.0
4	72.0	72.1
5	78.0	78.5
6	63.2	63.3

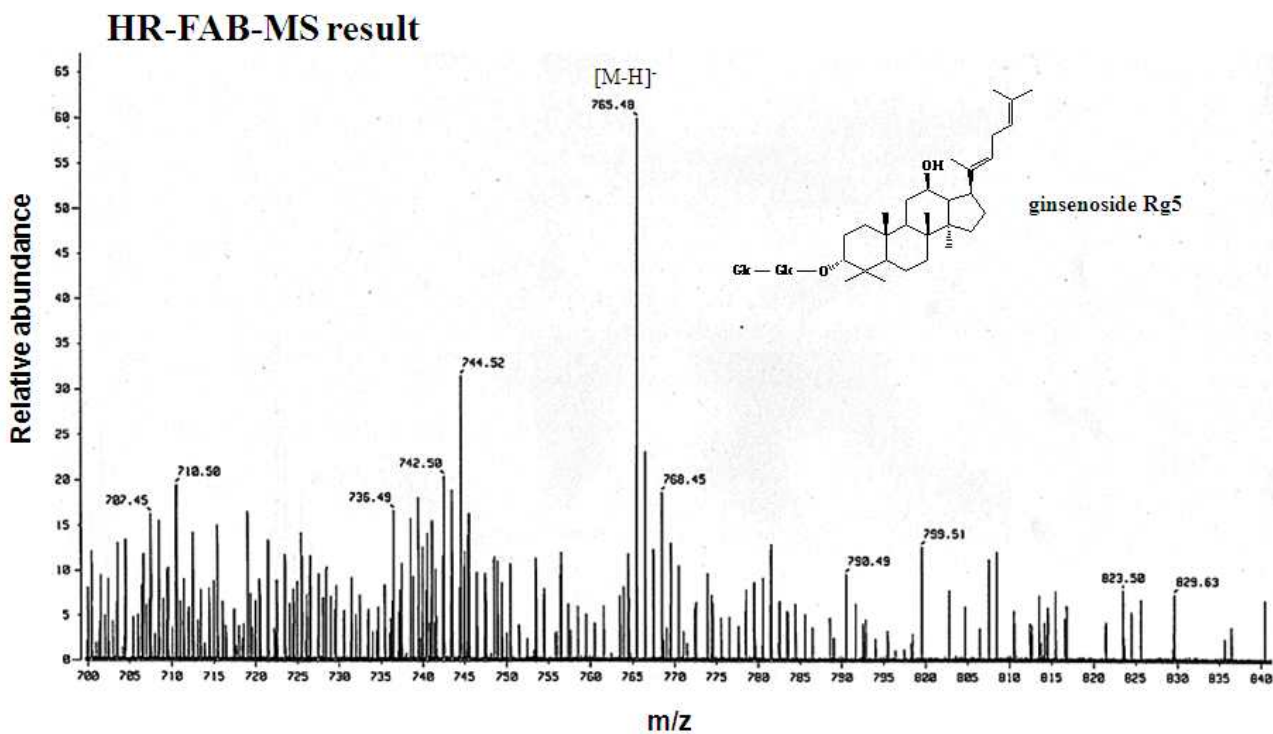


Fig. 4. FAB-MS of compound I (ginsenoside Rg₅)

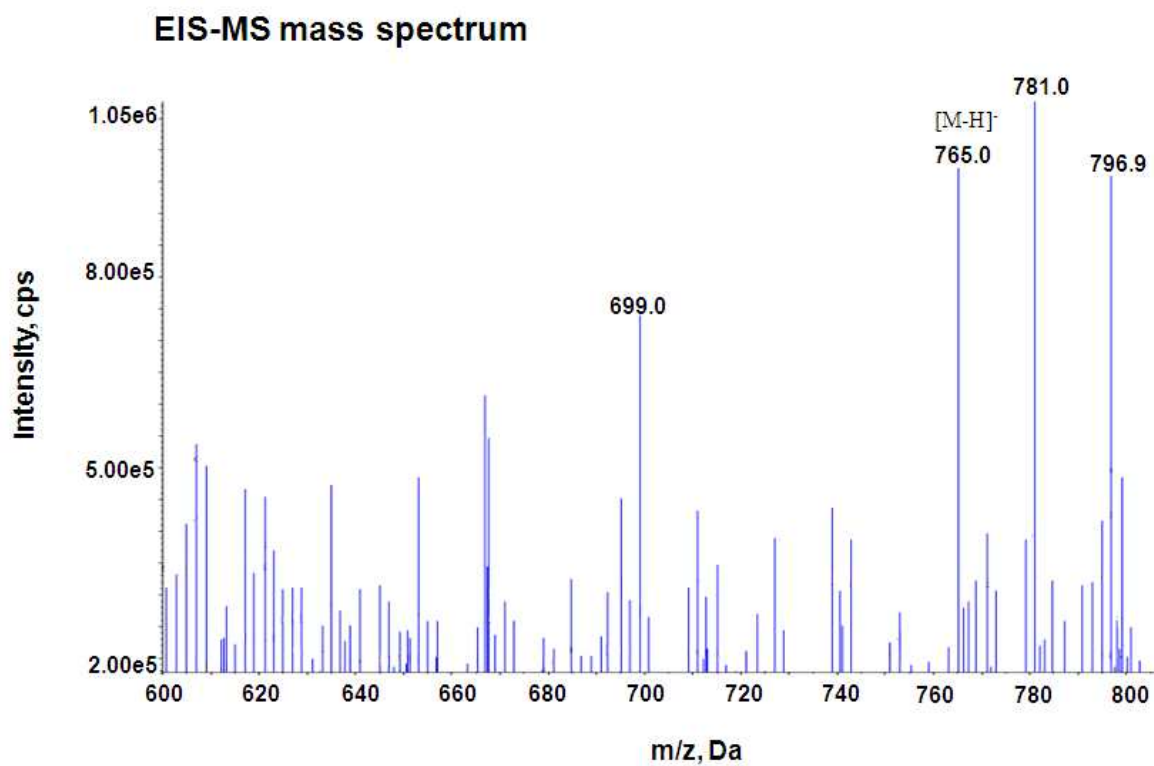


Fig. 5. EIS-MS of compound I (ginsenoside Rg₅)

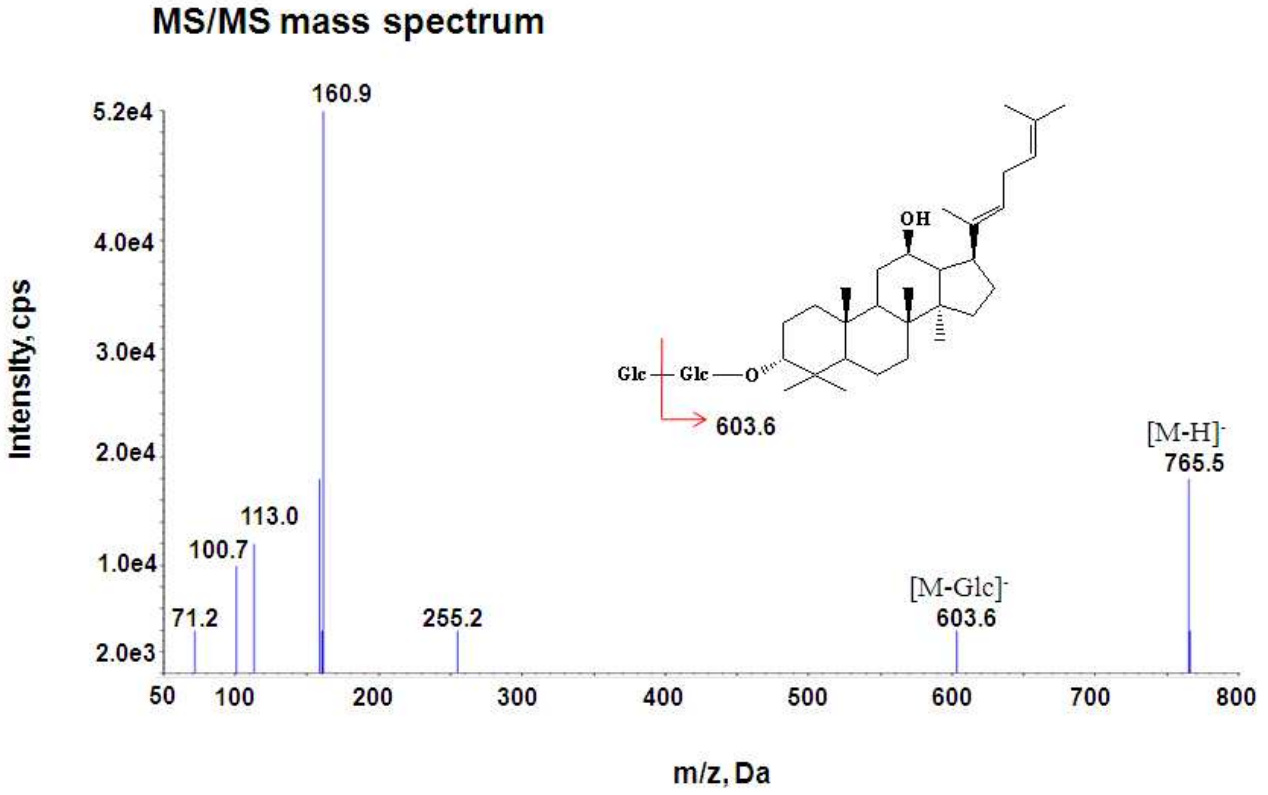


Fig. 6. MS-MS of compound I (ginsenoside Rg₅)

4. 단계별 제조 흑삼의 벤조피렌(Benzo(a)pyrene) 함량 분석

가. 벤조피렌 함량 분석

현재 인삼(홍삼)에서는 규제기준의 양이 정해져 있지 않으므로 식용유지류의 기준에 의거하여 2.0 μ g/kg이하로 기준을 설정하여 실험을 실시하였다. 식용유지 중 벤조피렌을 내부표준물질로 3-메틸콜란트렌을 사용하여 N,N-디메틸포름아마이드-물 (9:1)과 헥산으로 추출한 후 SPE (Solid Phase Extraction) 카트리지로 정제하여 고속액체크로마토그래프/형광검출기로 분석하였다.

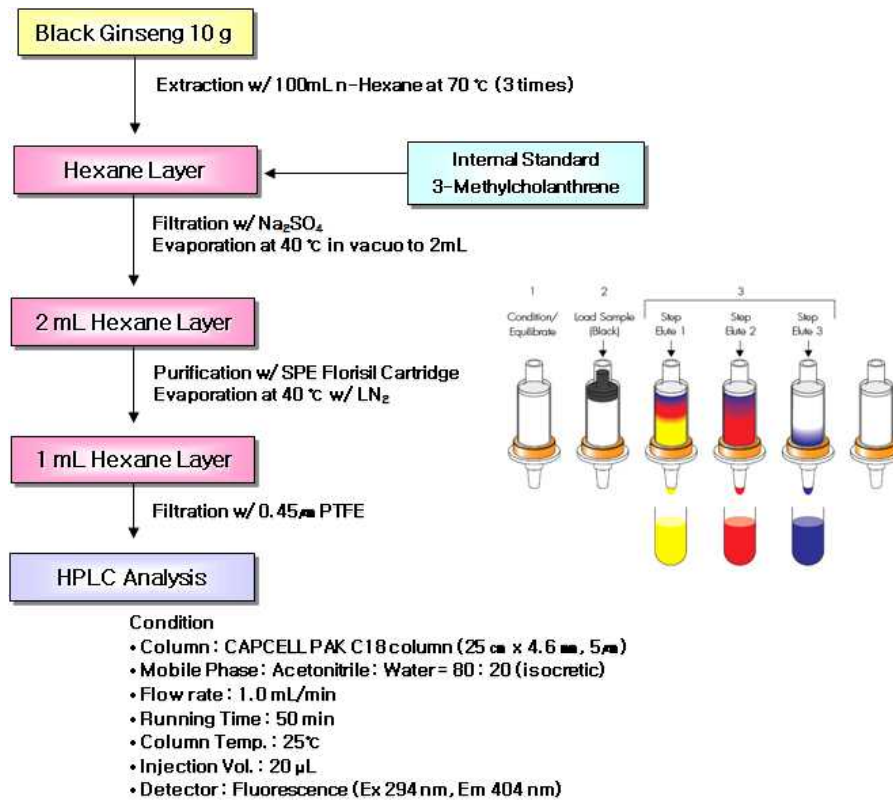


Fig. 7. 벤조피렌 분석과정

(1) 장치

고속액체크로마토그래프/형광검출기 (High Performance Liquid Chromatography/Fluorescence Detector, HPLC/FLD)를 사용하였다.

(2) 시약 및 시액

- ① 용매 : 잔류농약시험용 또는 이와 동등한 것을 사용함

- ② 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것을 사용함
- ③ 후로리실 카트리지 : SPE용 또는 이와 동등한 것을 사용함
- ④ 멤브레인 필터 : 수용성 폴리테트라플루오로에틸렌 또는 이와 동등한 것을 사용함
- ⑤ 표준원액 : 벤조피렌 표준품을 아세토니트릴에 녹여 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 함
- ⑥ 내부표준원액 : 3-메틸콜란트렌 표준품을 아세토니트릴에 녹여 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 함
- ⑦ 표준용액 : 표준원액을 아세토니트릴을 사용하여 적당한 농도로 희석함
- ⑧ 내부표준용액 : 내부표준원액을 아세토니트릴을 사용하여 적당한 농도로 희석함
- ⑨ 기타시약 : 잔류농약시험용 또는 특급시약을 사용함

(3) 시험용액의 조제

① 추출

검체 약 10 g을 정밀히 달아 내부표준용액 1 mL를 첨가하고 헥산 100 mL에 녹여 분액깔대기 (I)에 옮기고 N,N-디메틸포름아마이드-물 (9:1) 50 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정치하여 N,N-디메틸포름아마이드-물 (9:1)층을 분리하여 다른 분액깔대기 (II)에 옮긴다. 헥산층에 N,N-디메틸포름아마이드-물 25 mL씩을 넣고 위와 같이 2회 되풀이하여 N,N-디메틸포름아마이드-물 (9:1)층을 분액깔대기 (II)에 합친다. 여기에 1% 황산나트륨 용액 100 mL를 넣어 섞고 헥산 50 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정치하여 헥산층을 분액깔대기 (III)에 옮긴다. N,N-디메틸포름아마이드-물 (9:1)층에 헥산 35 mL씩을 넣고 위와 같이 2회 되풀이하여 헥산층을 위의 분액깔대기 (III)에 합친다. 물 40 mL씩을 넣고 흔들어 섞은 후 정치하여 물층은 버리는 조작을 2회 되풀이한다. 헥산층을 무수황산나트륨 약 15 g을 넣은 여과지를 사용하여 탈수여과한 후 40 $^{\circ}\text{C}$ 이하의 수욕상에서 감압하여 약 2 mL로 농축한다.

② 정제

후로리실카트리지는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 헥산 20 mL를 초당 2~3방울의 속도로 유출시킨 후 사용한다. 이 카트리지에 위의 농축액을 1 mL/분의 속도로 가한다. 이어서 헥산 10 mL와 헥산/디클로로메탄 (3:1) 8 mL로 각각 용출시킨 후 이 용출액을 40 $^{\circ}\text{C}$ 이하의 수욕상에서 질소가스 하에 날려 보낸 후 잔류물을 아세토니트릴에 녹여 전량을 1 mL로 하고 이를 0.5 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

(4) 시험조작

① 고속액체크로마토그래프의 측정조건

- ㉠ 칼럼 : C18 (4.6 \times 250 mm, 5 μm)
- ㉡ 검출기 파장 : 여기파장 294nm, 형광파장 404nm
- ㉢ 이동상 : 아세토니트릴과 물의 혼합액 (8:2)

㉔ 이동상 유량 : 1.0 mL/분

② 정성시험

위의 조건에서 얻어진 크로마토그램상의 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하였다.

③ 정량시험

검량곡선에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 피크에 대한 면적비[AS/AIS]를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량곡선을 작성하고 시험용액의 면적비[ASAM/ASAMIS]를 Y축에 대입하여 벤조피렌의 농도를 계산하였다. (정량한계 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

AS : 검량곡선표준용액의 표준물질 피크면적

AIS : 검량곡선표준용액의 내부표준물질 피크면적

ASAM : 시험용액의 벤조피렌 피크면적

ASAMIS : 시험용액의 내부표준물질 피크면적

나. 단계별 제조 흑삼의 벤조피렌 함량 분석결과

각 단계별로 9번의 반복된 증숙 및 건조과정을 거쳐 제조된 흑삼을 각각 분말화하여 벤조피렌 함량을 측정된 결과, 본 연구에서 사용된 제조조건인 증숙조건 $121 \pm 5^\circ\text{C}$, $15 \text{ lb}/\text{in}^2$ 의 조건하에서 30분간 증숙하고, 건조조건 $60 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 12시간동안 건조하여 제조한 흑삼에서 벤조피렌은 1차에서 7차까지 분석결과는 검출되지 않았으나 8차 및 9차 증숙 및 건조 후에 기준함량($2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이하)보다 미량 검출되었다. 따라서 본 연구에서 사용된 방법 및 제제는 안전한 식품가공 제제로 사료된다.

Table. 2. Analysis of Benzo(a)pyrene

(단위 : $\mu\text{g}/\text{kg}$)

증숙차수	B(a)P 함량
Control	N.D
1st	N.D
2nd	N.D
3rd	N.D
4th	N.D
5th	N.D
6th	N.D
7th	N.D
8th	0.019 ± 0.004
9th	0.023 ± 0.024

N.D : Not detected

Values represent the mean \pm S.E. (n=3)

5. 생리활성성분 대량 분리 동정

가. 분리공정 최적화

(1) Ginsenoside Rg₅ Rk₁ 고농도 함유 조성물 조제

대용량 ultrasonicator(고도기연, 특별제작) 에 미삼 엑스를 넣고, 2배식초를 10배량 가한 후, 100℃ 에서 초음파 처리하고, 감압 농축한다.



초음파 처리 장치



대용량(20 l) 감압농축 장치

(2) 조사포닌 분획 조제

Ginsenoside Rg₅ Rk₁ 고농도 함유 조성물을 증류수 1000 ml에 현탁하여 3000 ml 분획깔데기에 넣고, diethyl ether 1000 ml를 가하여 Funnel Shaker로 1시간씩 3회 진탕 추출한 후, 원심분리하여 상등액을 제거한다. 얻은 수가용부에 수포화 butanol 1000 ml를 가하여 Funnel Shaker로 2시간씩 3회 진탕 추출하고, 원심분리하여 상등액을 취하여 여과하고, 감압농축을 하여 조사포닌 분획을 얻는다.



Funnel Shaker

(3) Silica gel Column을 이용한 분리 정제

위에서 얻은 조사포닌을 감압농축한 후, 대용량 오픈컬럼에 전개용매 Chloroform : Methanol : Water = 70 : 30 : 4 로 충전한 후, 로딩하여 TLC로 확인하며 Ginsenoside Rg₅ Rk₁ 고농도 함유하는 분획을 분리한다.



대용량 시리카겔 컬럼

(4) ODS(C18 YMC) 역상 Column을 이용한 분획

대용량 오픈컬럼에 증류수로 ODS(C18 YMC) Column을 충전한 후, 60% ACN(acetonitrile)을 전개하여 ginsenoside Rg₅ Rk₁를 분리 정제한다.



대용량 ODS(C18 YMC) 역상 Column

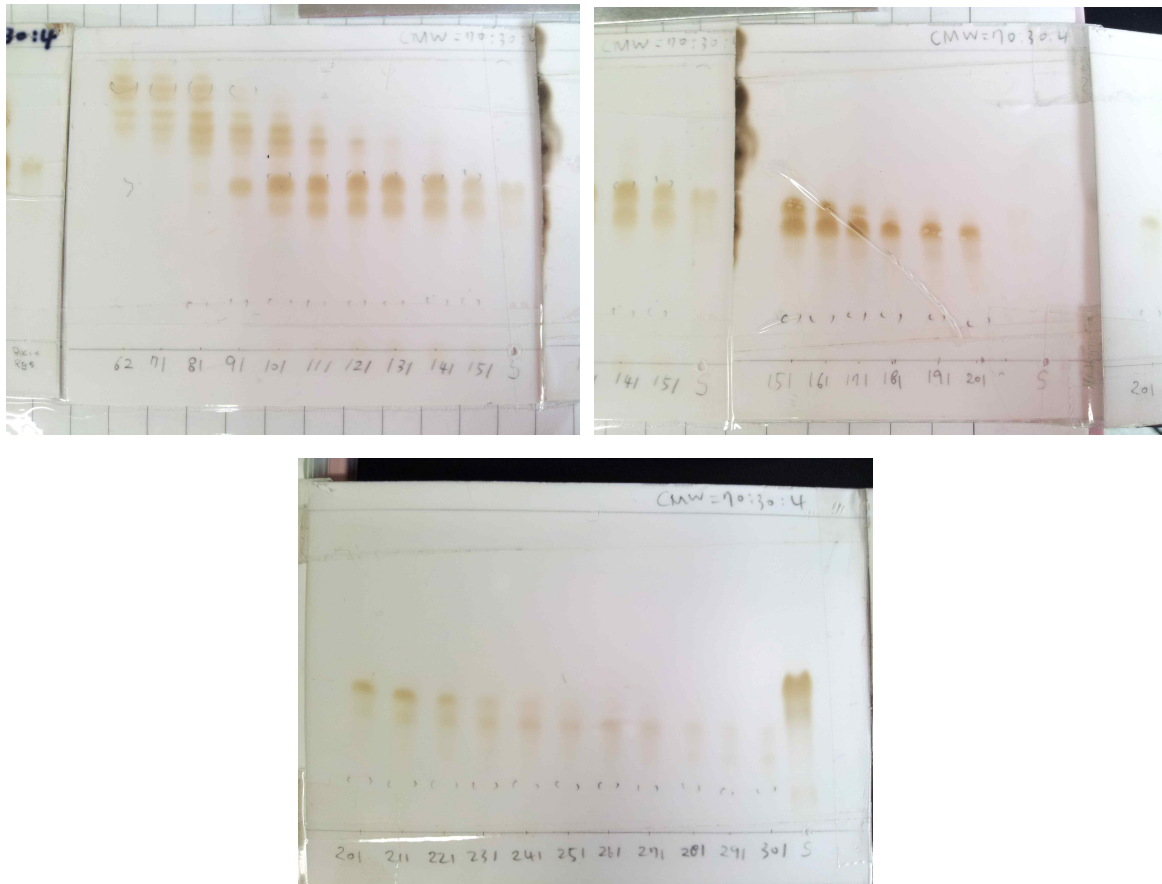
나. Ginsenoside Rg5, Rk1 대량 분리

(1) 초음파 처리 미삼제제로부터 사포닌 분획의 추출

초음파 처리 미삼제제 1,200g을 증류수에 현탁하여 분획 깔때기에 넣고 Diethyl Ether넣어 shaking 진탕하고 방치한 후 Ether층을 제거한다. 이 방법을 4회 반복한다. 처리한 Diethyl Ether층은 모두 제거하고 물층은 버리지 않고 수포화 부탄올을 넣어 shaking 진탕하고 방치하여 수포화 부탄올층을 모아둔다. 모아둔 수포화 부탄올층은 농축하여 조사포닌 분획(600g)으로 하였다. 표본은 세명대학교 한방식품영양학부에 보관하고 있다.

(2) Silica gel column chromatography 를 이용한 성분 분획

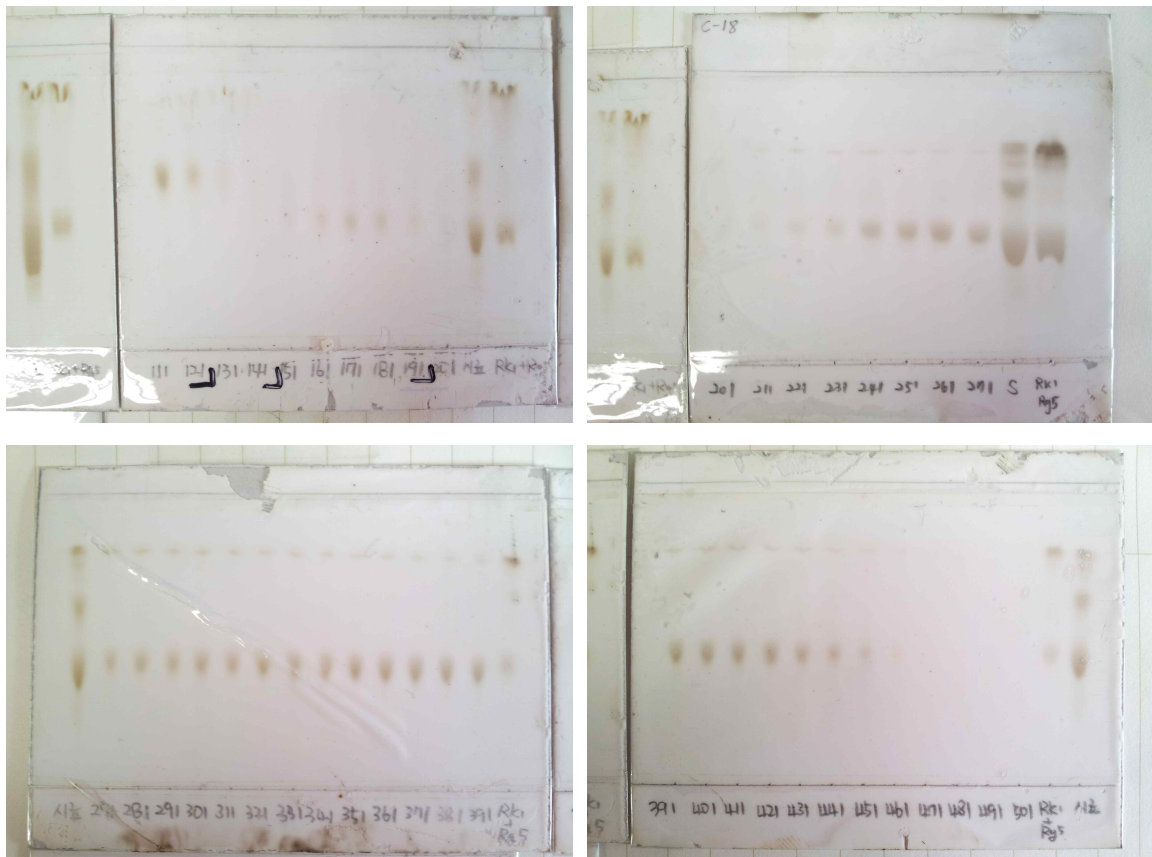
위의 부탄올 분획 600g을 Chloroform:Methanol:Water(70:30:4)를 이동상으로 하여 Silicagel column에 로딩하여 총 Fr.1~Fr5까지 5개의 분획을 얻었고, 그 중 ginsenoside Rg5, Rk1 고농도 함유 분획인 Fr.4 분획(91번-301번) 25.93g 을 얻었다.



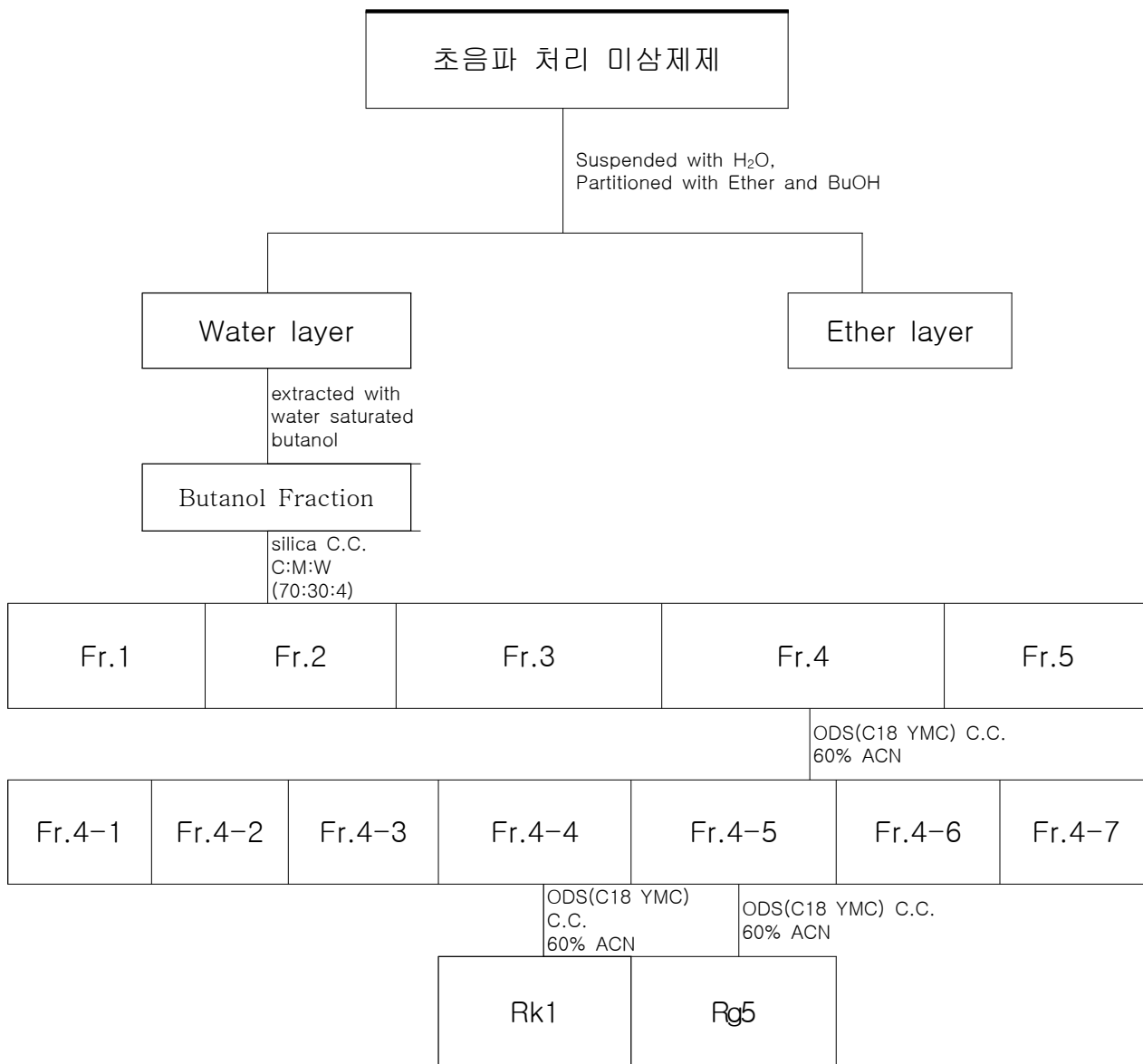
Silica gel column TLC

(3) ODS(C18 YMC) 역상 column chromatography 를 이용한 성분 분리

ODS(C18 YMC) 역상 column에 전개용매 60% ACN 으로 전개하여 총 Fr.4-1~Fr4-7까지 7개의 분획을 얻었고, 그중 Fr4-4에서 ginsenoside Rk1(1.1g)을 얻었고, Fr4-5에서 ginsenoside Rg5(1.9g)를 얻었다.



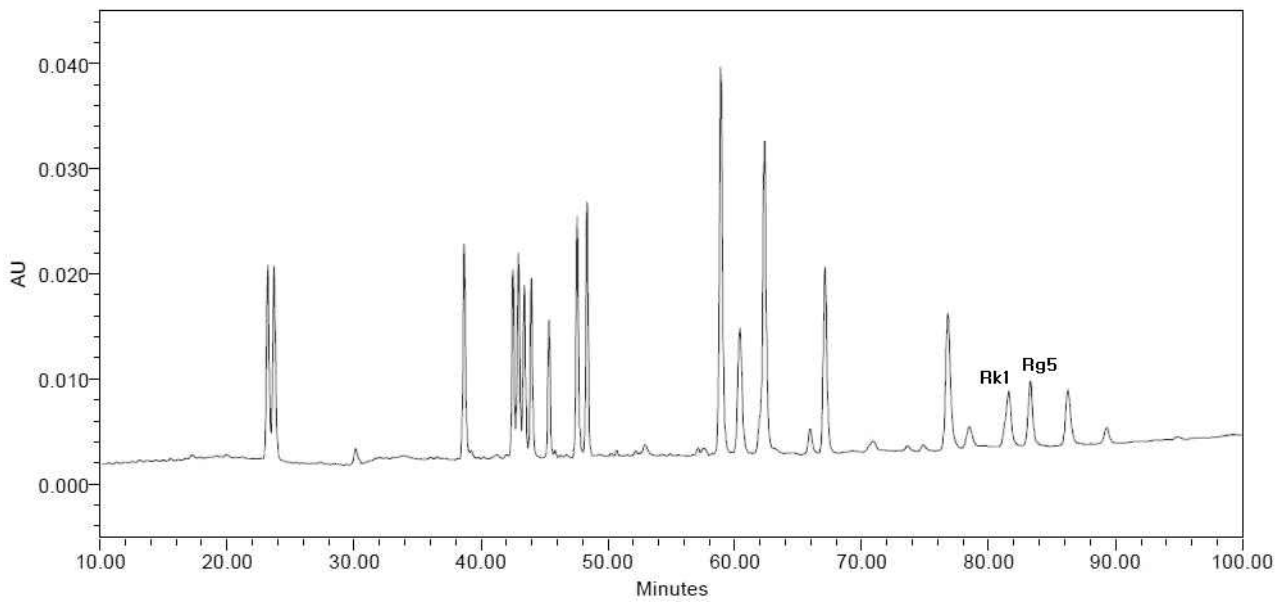
ODS(C18 YMC) 역상 column TLC



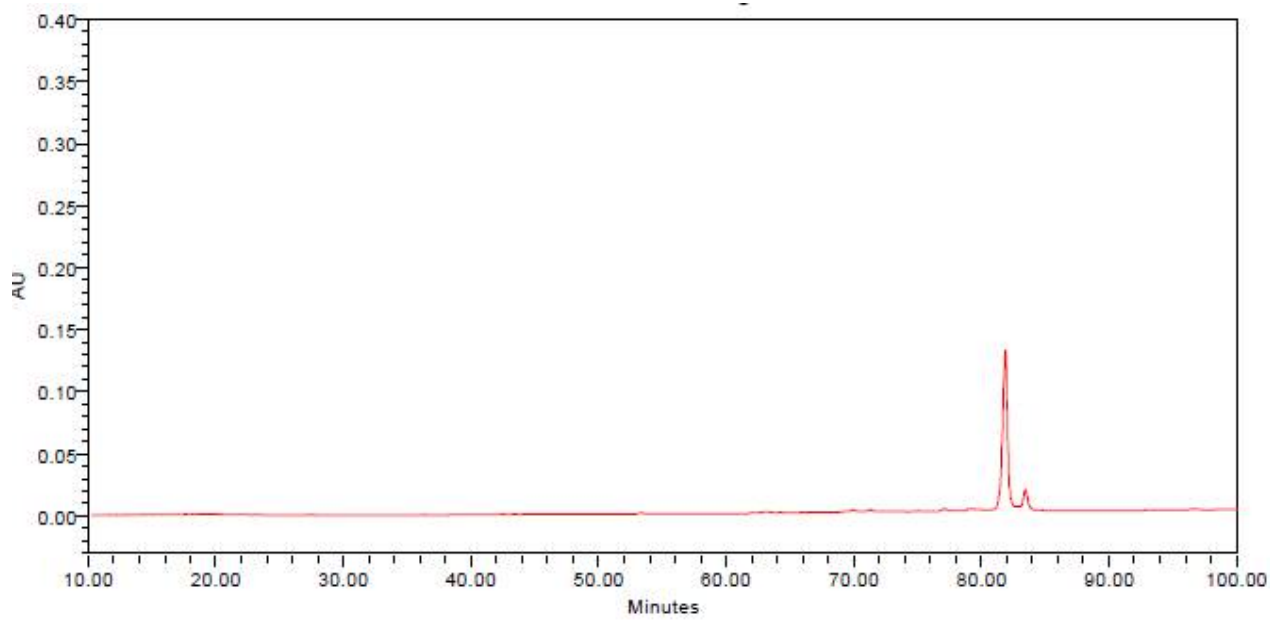
Scheme 1. Extraction and Isolation ginsenoside Rg₅, Rk₁

3) HPLC 법으로 ginsenoside Rg5, Rk1 분리 확인

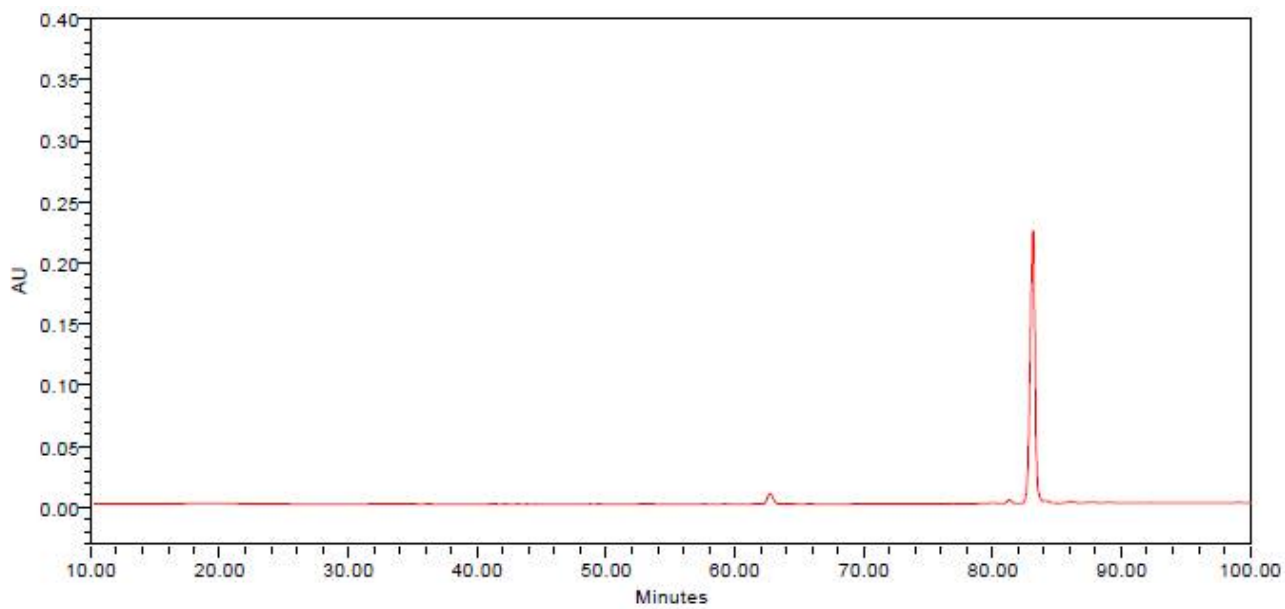
ODS(C18 YMC) 역상 column에 전개용매 60% ACN 으로 전개하여 얻은 ginsenoside Rg5, Rk1 를 HPLC 법으로 확인하였다.



Mixed standards



ginsenoside Rk1



ginsenoside Rg5

제 3 절 인지기능 개선 효력시험

1. 알츠하이머 치매의 동물모델에서 인지기능 개선 약리효과 평가

경제 및 보건의 향상으로 인해 노인 인구가 급격히 증가하면서 신경퇴행성 질환이 큰 문제가 되고 있다. 이중, 노인성 치매의 대부분의 원인을 차지하는 것은 알츠하이머 병이 그 원인으로 그 병인기전은 아직 명확하지 않으나 아밀로이드 전구단백질의 이상 대사과 그 산물의 축적으로 인한 신경세포 사멸로 인한 인지기능의 저하라는 것이 공통된 시각이다. 이에 대한 연구를 위해서는 적절한 동물실험 모델이 중요한데 본 연구에서는 아밀로이드 전구단백질의 이상대사 산물인 $A\beta$ 1-42 펩타이드를 생쥐의 뇌실에 주입하여 알츠하이머 치매와 유사한 병변을 유도한 후 Ginsenoside Rg₅, Rk₁을 고농도로 함유한 인지기능 개선 표준화 기능성식품 유효성분 (이하 BG25라 줄임)의 효과를 여러 가지 신경정신행동약리학적인 일련의 방법들을 통해 평가하고자 하였다.

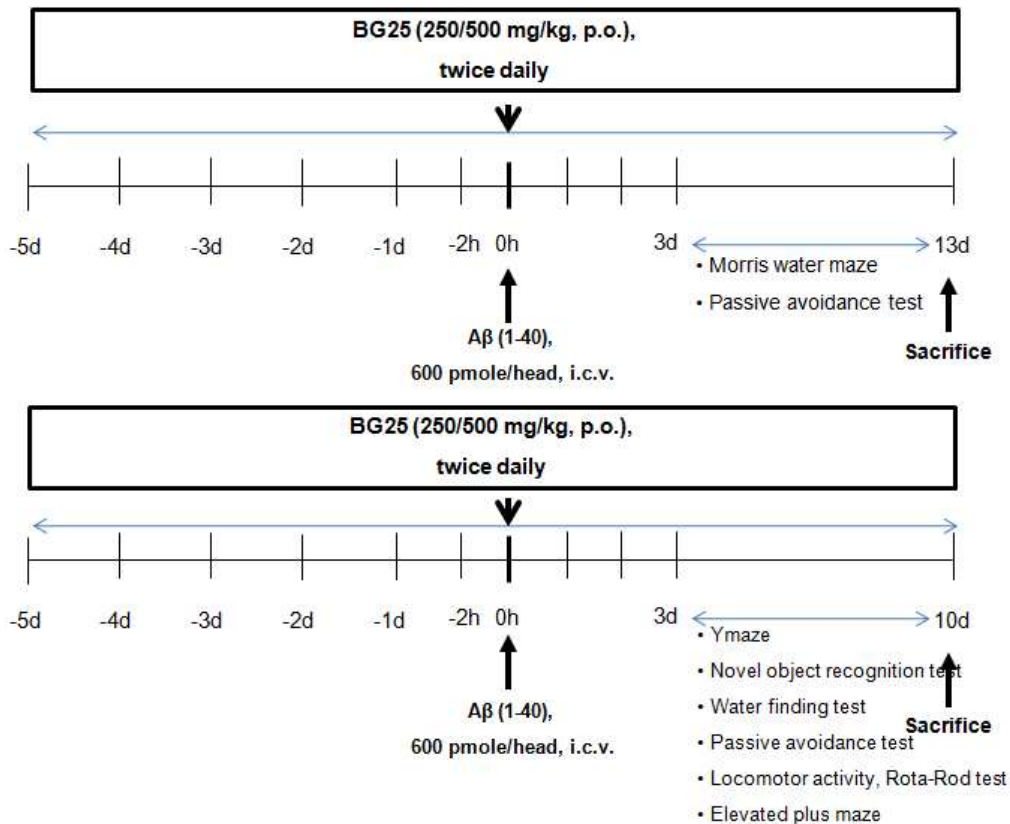


그림 1. BG25를 생쥐에 투여하고 인지기능을 평가하는 실험 일정의 모식도

약 20 g 정도 되는 4주령의 BKW(ICR)계 수컷 생쥐(나라바이오텍, 서울, 대한민국)를 22°C 50% 습도의 항온항습 사육실에서 12시간 주기로 명암을 조절하며 자유식으로 사육하였으며 7일 이상 순화시킨 후 실험에 사용하였다. BG25와 대조물질인 Rg3는 3차증류수에 녹여 매일 2회 경구투여하였으며 A β 펩타이드는 DMSO에 녹인 뒤 PBS에 녹여 37에서 72시간 배양한 후 I.c.v. 주사함. A β 투여 후 3일간 BG25를 더 투여한 후 1주일 후에 여러 가지 행동약리학적 평가를 한 후 뇌 조직을 분리하여 조직학적으로 병리모형을 검증하고 추후 생화학 및 분자생물학적 분석을 위하여 남겨둠. A β 에 대한 면역조직학적 염색을 통하여 노인반(senile plaque)와 유사한 병소의 성립을 관찰하였다 (결과는 따로 보이지 않음). 대조군으로서는 A β 펩타이드의 아미노산 서열이 거꾸로인 펩타이드를 이용하였다.

가. 장단기 기억력 평가

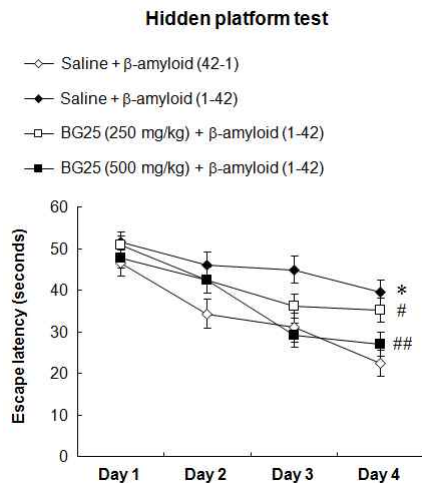


그림 2

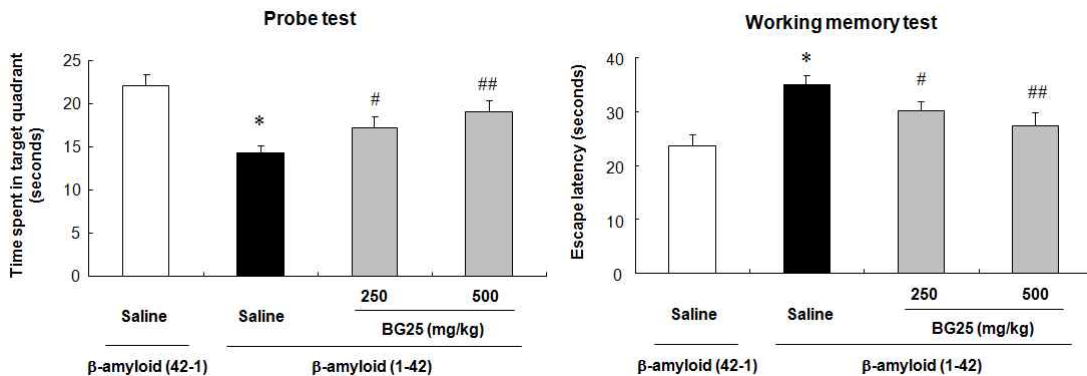


그림 3

그림 4

모리스 수중 미로를 이용한 Hidden platform, Probe, Working memory test 등의 일련의 장기

기억력 평가에서 BG25는 유의한 인지기능개선 효과를 보였으며 대조성분인 Rg3보다 우수하였다 (데이터 따로 보이지 않음). [그림 2-4. Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs. Saline + $A\beta(42-1)$; # $P < 0.05$ vs. Saline + $A\beta(1-42)$; ## $P < 0.05$ vs. Saline or BG25 (250 mg/kg) + $A\beta(1-42)$ (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

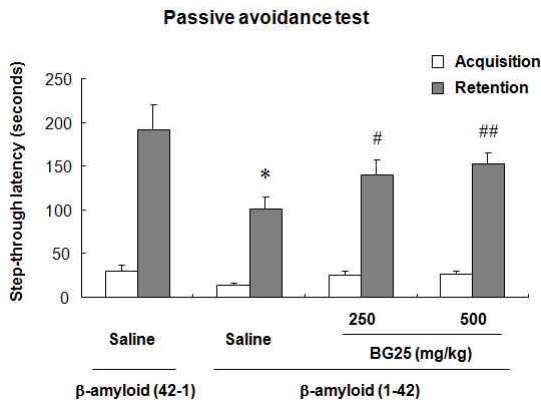


그림 5

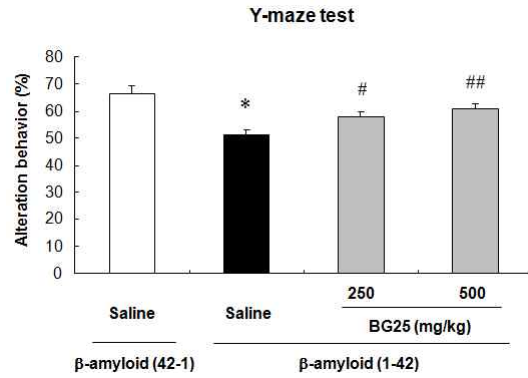


그림 6

나. 주의 집중력 평가

수동회피시험 (그림 5)에서도 BG는 Rg3보다 유의하게 더 우수한 인지기능개선 효과를 보였다. Y 미로 (그림 6)를 이용한 비교적 단기 기억력 평가에서는 그 효과가 그리 크지는 않으나 유의하게 인지기능이 개선되는 경향을 보였다. [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs. Saline + $A\beta(42-1)$; # $P < 0.05$ vs. Saline + $A\beta(1-42)$; ## $P < 0.05$ vs. Saline or BG25 (250 mg/kg) + $A\beta(1-42)$ (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

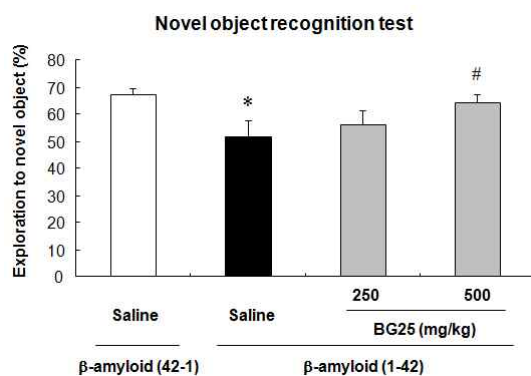


그림 7

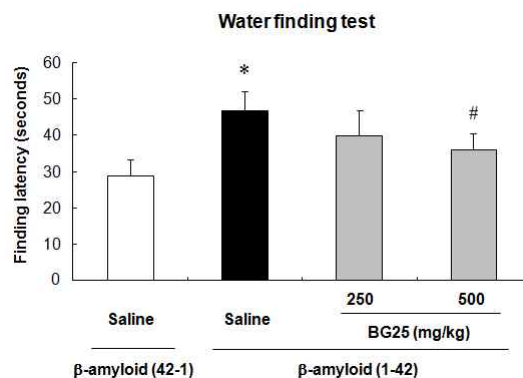


그림 8

다. 잠재학습능력 평가

주의집중력과 잠재학습능력을 평가하는 novel object recognition test (그림 7)와 water finding test (그림 8)에서는 비교적 높은 용량에서만 유의한 개선효과를 관찰할 수 있었다. [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs. Saline + A β (42-1); # $P < 0.05$ vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

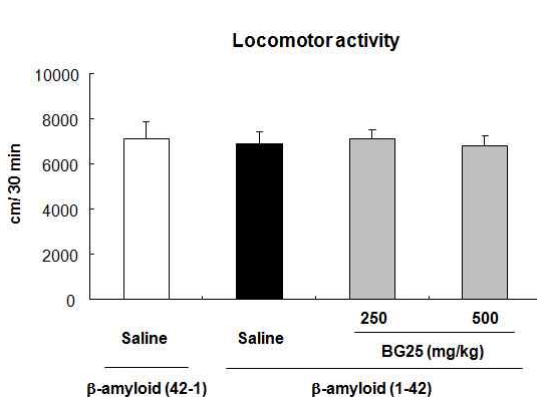


그림 9

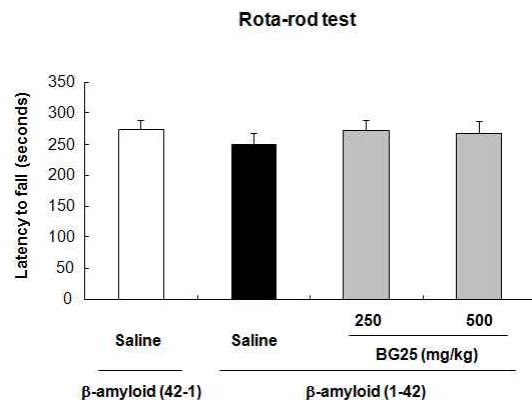


그림 10

라. 운동수행능력 평가

한편 운동수행능력을 평가하는 개방장에서의 운동성 (그림 9)이나 로타로드 시험 (그림 10) 등에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 앞의 인지능력평가 결과들이 운동기능의 감소로 인한 오류가 아님을 의미한다.

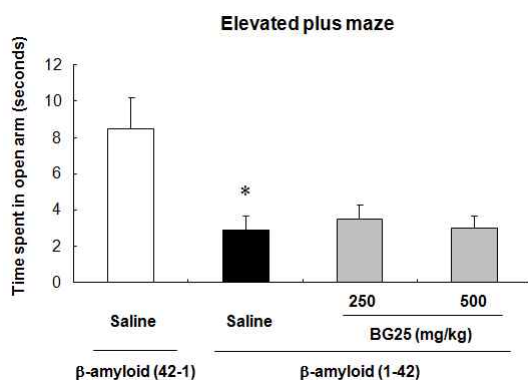


그림 11

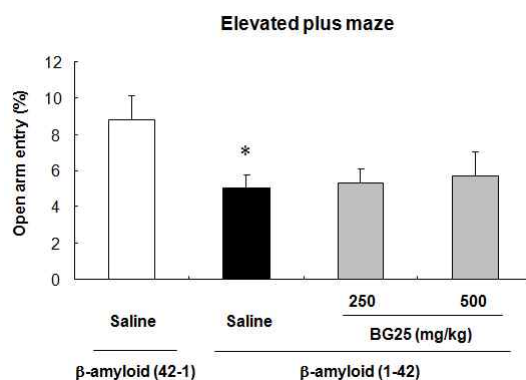


그림 12

마. 정서능력 평가

또한 정서능력에 대한 영향을 평가하는 십자형 높은 미로 (그림 11-12)에서는 A β 를 투여하여 병변을 일으킨 군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 즉 A β 의 뇌실내 주사를 통한 알츠하이머성 치매 동물모델에서는 BG25의 정서능력에 대한 영향을 관찰할 수 없었다. [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * P < 0.05 vs. Saline + A β (42-1). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

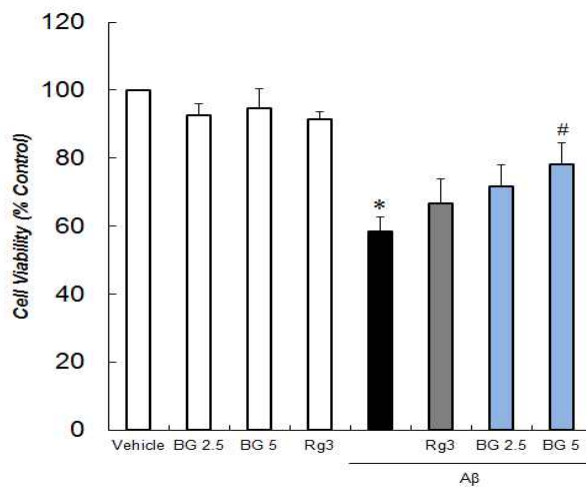


그림 13

한편 BG25에 의한 인지기능개선효과의 기작을 알아보기 위하여 추가로 *in vitro*에서 신경모세포주인 SH-SY5Y 세포에서 A β 처리에 의한 세포사멸에 대하여 BG25의 전처리는 Rg3에 비해 우수한 보호효과를 나타냈으며 또한 그 작용은 용량의존적인 경향을 보임. [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * P < 0.05 vs. Saline + A β (42-1); # P < 0.05 vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).] 그 자세한 기작에 대하여는 차후 후속 연구가 필요하다. 이상의 결과는 당초 계획된 연구내용 뿐 아니라 예상 외의 성과도 얻은 것으로 본다.

2. APP/PS-1 이중발현 생쥐에서 약리효능 평가

경제 및 보건의 향상으로 인해 노인 인구가 급격히 증가하면서 신경퇴행성 질환이 큰 문제가 되고 있다. 이중, 노인성 치매의 대부분의 원인을 차지하는 것은 알츠하이머 병이 그 원인으로 그 병인기전은 아직 명확하지 않으나 아밀로이드 전구단백질의 이상 대사와 그 산물의 축적으로 인한 신경세포 사멸로 인한 인지기능의 저하라는 것이 공통된 시각이다. 이에 대한 연구를 위해서는 적절한 동물실험 모델이 중요한데 본 연구에서는 1차년도에 아밀로이드 전구단백질의 이상대사 산물인 $A\beta$ 1-42 펩타이드를 생쥐의 뇌실에 주입하여 알츠하이머 치매와 유사한 병변을 유도한 후 Ginsenoside Rg₅, Rk₁을 고농도로 함유한 인지기능 개선 표준화 기능성식품 유효성분 (이하 BG25라 줄임)의 효과를 여러 가지 신경정신행동약리학적인 일련의 방법들을 통해 평가한 바 있다. 2차년도에서는 1차년도의 성과를 바탕으로 실제 알츠하이머 병의 진행에 훨씬 더 유사하며 전세계적으로 널리 사용되는 동물모델인 아밀로이드 전구단백질 스웨덴형 돌연변이와 프리세닐린1 돌연변이 이중 유전자변형 생쥐 [B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J]를 이용하여 BG25의 인지기능 개선효과를 평가하고자 하였다.

Daily treatment with BG25 (250 mg/kg, p.o., b.i.d.) for 3 months

6 months old

9 months old

B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J

Behavioral tests

그림 1 BG25를 APP/PS1 double tg 생쥐에 투여하고 인지기능을 평가하는 실험 일정의 모식도

약 40 g 정도 되는 6개월령의 B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J 수컷 생쥐(The Jackson Laboratory, Maine, USA)를 22°C 50% 습도의 항온항습 사육실에서 12시간 주기로 명암을 조절하며 자유식으로 사육하였으며 대조군으로는 동일 연령의 B6C3F1/J 수컷 생쥐를 사용하였다. BG25와 대조물질인 Rg3는 3차증류수에 녹여 250 mg/kg의 용량으로 매일 2회 경구투여하였다. 9개월령이 되었을 때 여러 가지 행동약리학적 평가를 한 후 뇌 조직을 분리하여 조직학적으로 병리모형을 검증하고 추후 생화학 및 분자생물학적 분석을 위하여 남겨두었다. A β 에 대한 면역조직학적 염색을 통하여 노인반(senile plaque)와 유사한 병소의 성립을 관찰하였다 [그림2].

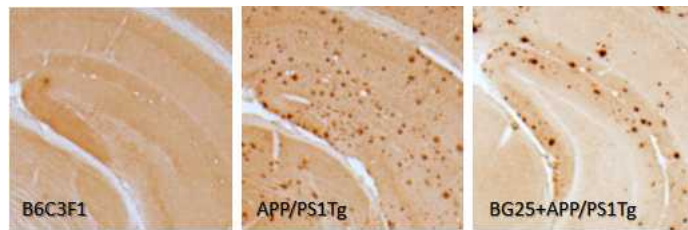


그림 2 해마에서의 아밀로이드 플라크 축적의 면역조직 염색의 각 처리군별 대표적 형태

가. 장단기 기억력 평가

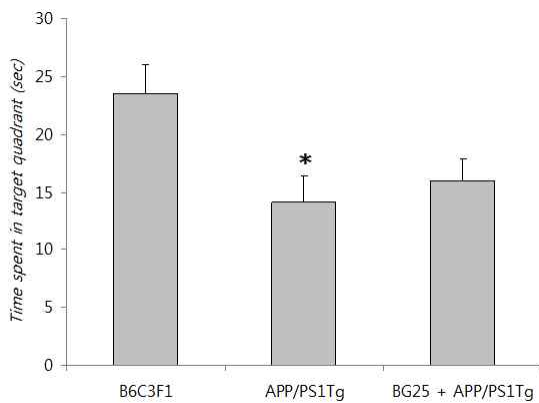


그림 3 Probe test

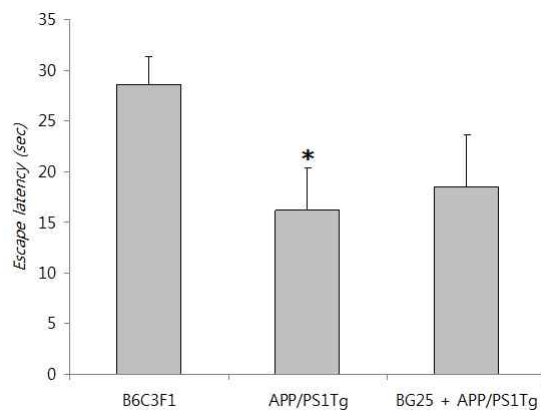


그림 4 Working memory test

모리스 수중 미로를 이용한 Hidden platform, Probe, Working memory test 등의 일련의 장기 기억력 평가에서 BG25는 인지기능개선 효과 경향을 보였으며 용량으로 미루어 볼 때 대조성분인 Rg3보다 대체로 동등이상의 경향을 보였다 (데이터 따로 보이지 않음). [그림 3-4. Each value is the mean \pm S.E.M. of 4 mice. * P < 0.05 vs. B6C3F1 (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

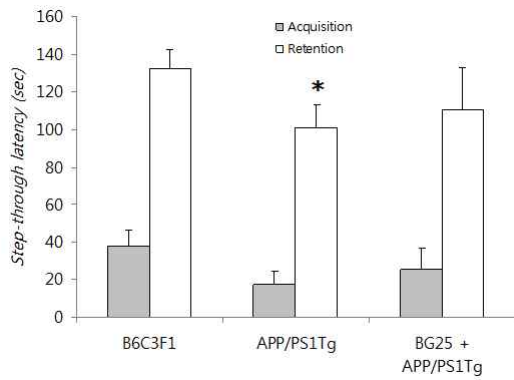


그림 5 Passive avoidance test

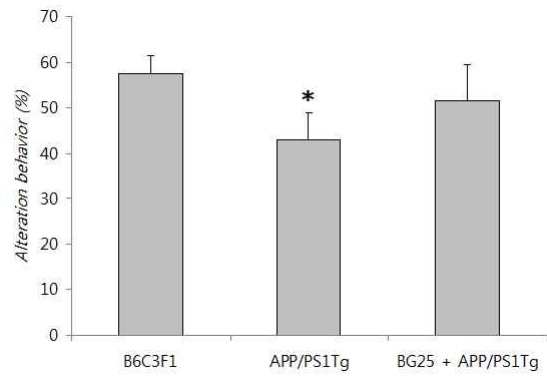


그림 6 Y-maze test

수동회피시험 (그림 5)에서도 BG는 Rg3보다 유의하게 더 우수한 인지기능개선 효과를 보였다. Y 미로 (그림 6)를 이용한 비교적 단기 기억력 평가에서는 그 효과가 그리 크지는 않으나 인지 기능이 개선되는 경향을 보였다. [그림 5-6. Each value is the mean \pm S.E.M. of 4 mice. * $P < 0.05$ vs. B6C3F1 (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

다. 잠재학습능력 평가

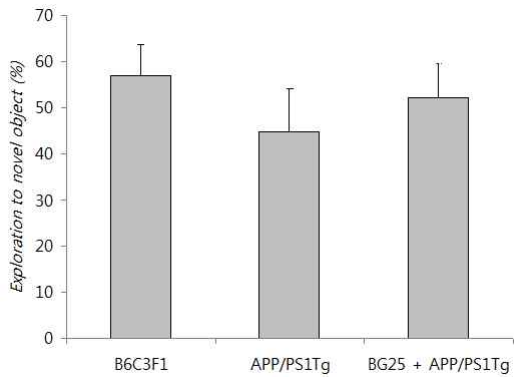


그림 7 Novel object recognition test

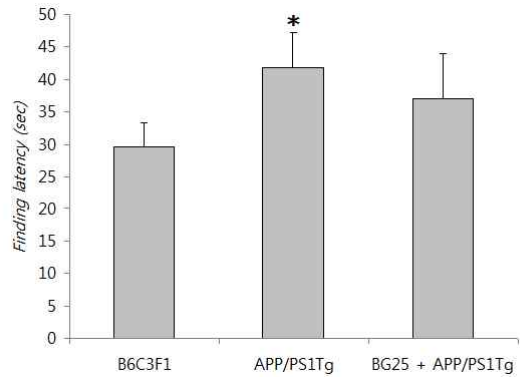


그림 8 Water finding test

주의집중력과 잠재학습능력을 평가하는 novel object recognition test (그림 7)와 water finding test (그림 8)에서는 개선경향을 관찰할 수 있었다. 용량의존성과 유의성 판단을 위해서는 추가 실험이 필요할 것으로 판단된다. [그림 3-5. Each value is the mean \pm S.E.M. of 4 mice. * $P < 0.05$ vs. B6C3F1 (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

라. 운동수행능력 평가

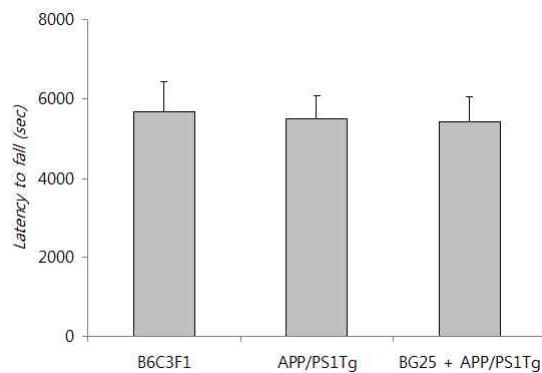


그림 9 Locomotor activity

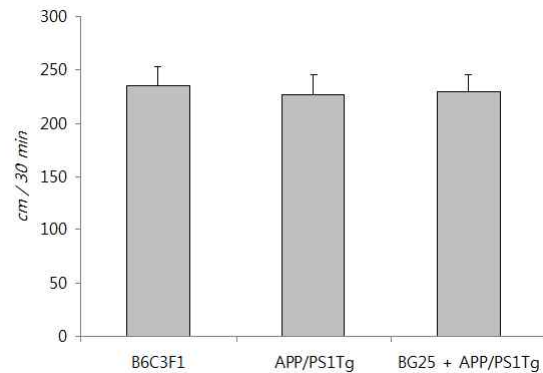


그림 10 Rota-rod test

한편 운동수행능력을 평가하는 개방장에서의 운동성 (그림 9)이나 로타로드 시험 (그림 10) 등에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 앞의 인지기능평가 결과들이 운동기능의 감소로 인한 오류가 아님을 의미한다.[그림 9-10. Each value is the mean \pm S.E.M. of 8 mice.]

이상의 결과에서 APP/PS1Tg 동물모델이 비교적 잘 성립되었으며 BG25의 투여가 인지기능 손상의 예방 및 증상 호전의 경향은 보인 것으로 판단된다. 정서능력에 대한 영향을 평가하는 십자형 높은 미로 실험과 BG25의 용량의존성 등의 실험과 각 실험군의 개체수(n)를 늘려 통계적 유의성 판단을 위한 더 정확한 실험결과를 얻는 것은 시료의 공급 관계로 차년도에도 계속적인 보장이 필요할 것으로 생각된다.

3. Acetylcholine system에 대한 약리효과

Acetylcholine system에 대한 BG25의 약리효과를 확인하기 위해 해마와 대뇌 피질의 acetylcholine (ACh) level 및 acetylcholinesterase (AChE) 활성, choline acetyltransferase (ChAT) 활성을 측정하였다.

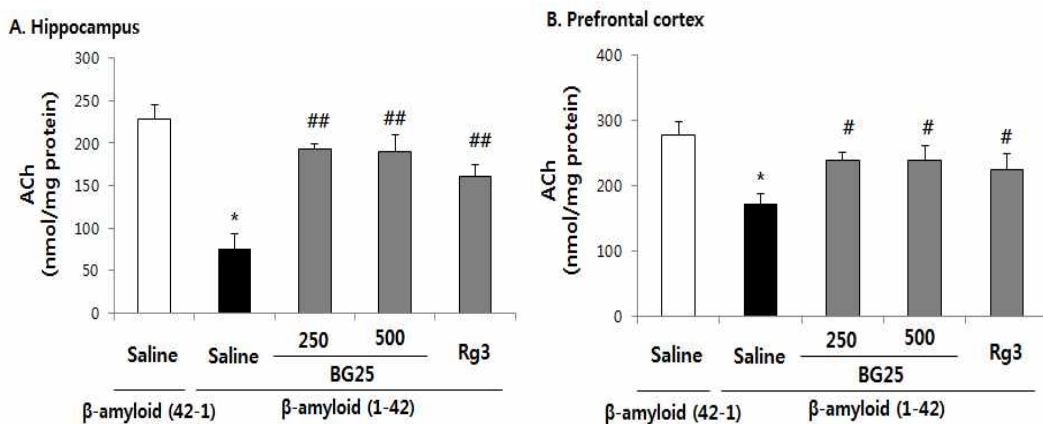


그림 29

해마 (A) 와 대뇌 피질 (B) 의 Acetylcholine level에 있어서 BG25는 유의한 보호 효과를 나타냈다 (그림29). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs. Saline + $A\beta$ (42-1); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. Saline + $A\beta$ (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

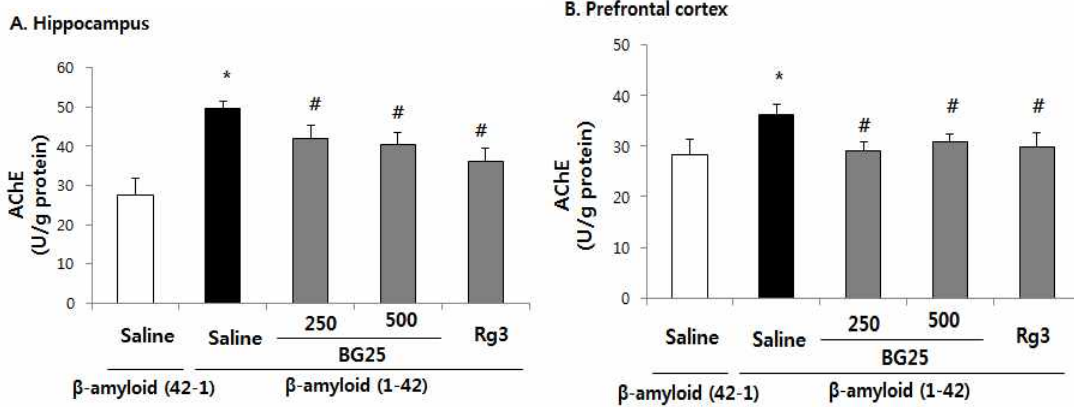


그림 30

해마 (A) 와 대뇌 피질 (B) 의 AChE 활성에 있어서 BG25는 유의한 보호 효과를 나타냈다 (그림30). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs. Saline + $A\beta(42-1)$; # $P < 0.05$ vs. Saline + $A\beta(1-42)$. (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

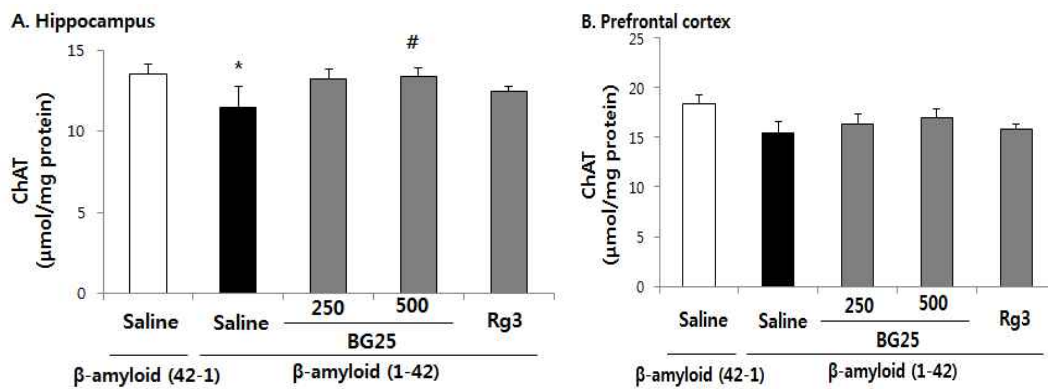


그림 31

해마 (A) 와 대뇌 피질 (B) 의 ChAT 활성에 있어서 BG25는 보호 효과를 나타냈다. 일부 유의성이 없으나 일관된 보호경향을 보였다 (그림31). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs. Saline + $A\beta(42-1)$; # $P < 0.05$ vs. Saline + $A\beta(1-42)$. (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

Acetylcholine system 에 대한 BG25의 보호효과는 대조군인 Rg3에 비해 우수하거나 동등하였다.

4. 항산화 관련 지표

해마와 대뇌 피질의 항산화 관련 기전에 대한 BG25의 약리효과를 확인하기 위해서, 손상성 지표인 활성산소(ROS), Malondealdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE), protein carbonyl 을 측정하였다. 또한 항산화 관련 효소인 glutathione peroxidase-1 (GPx-1) 및 superoxide dismutase (SOD)의 단백질 발현을 확인하였다.

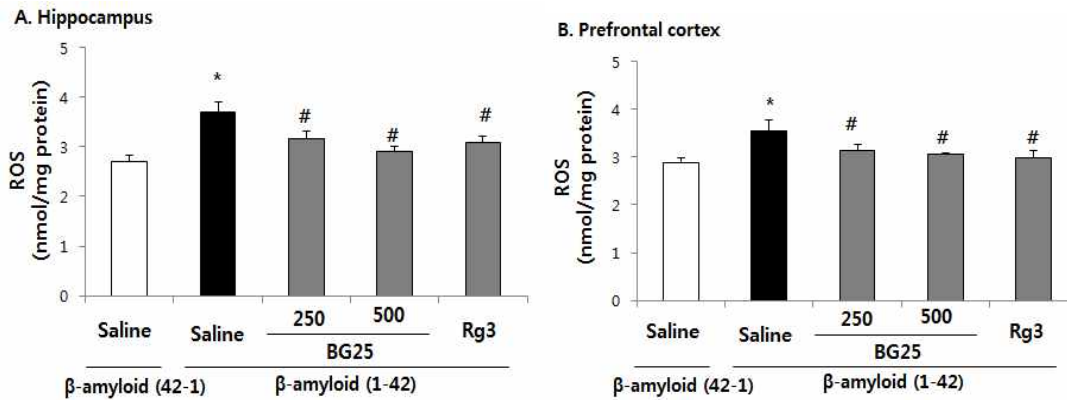


그림 32

해마(A) 와 대뇌 피질 (B) 에서 증가한 활성산소에 대해서 BG25는 유의한 보호효과를 나타냈다 (그림32). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs. Saline + A β (42-1); # $P < 0.05$ vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

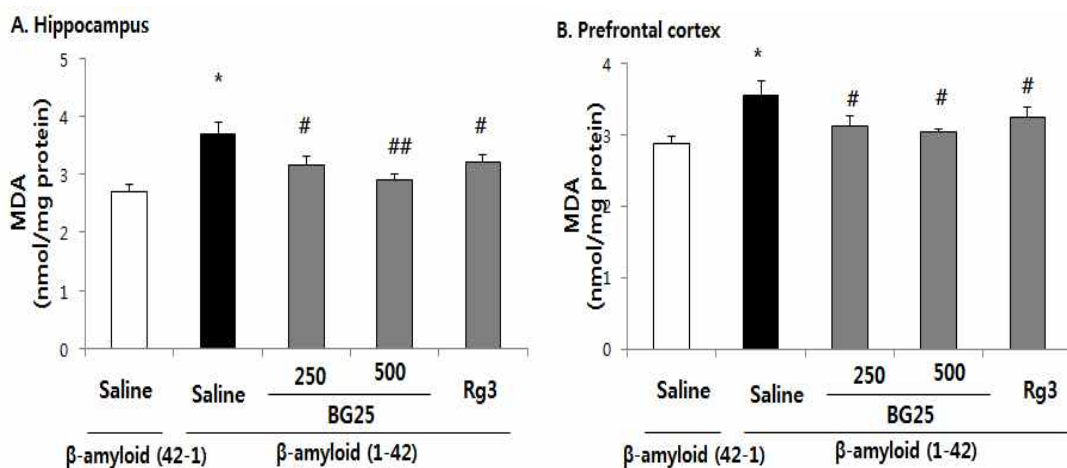


그림 33

해마(A) 와 대뇌 피질 (B) 에서 지질과산화 지표인 MDA의 증가에 있어 BG25는 유의한 보호효과를 나타냈다 (그림 33). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs.

Saline + A β (42-1); # P < 0.05, ## P < 0.01 vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

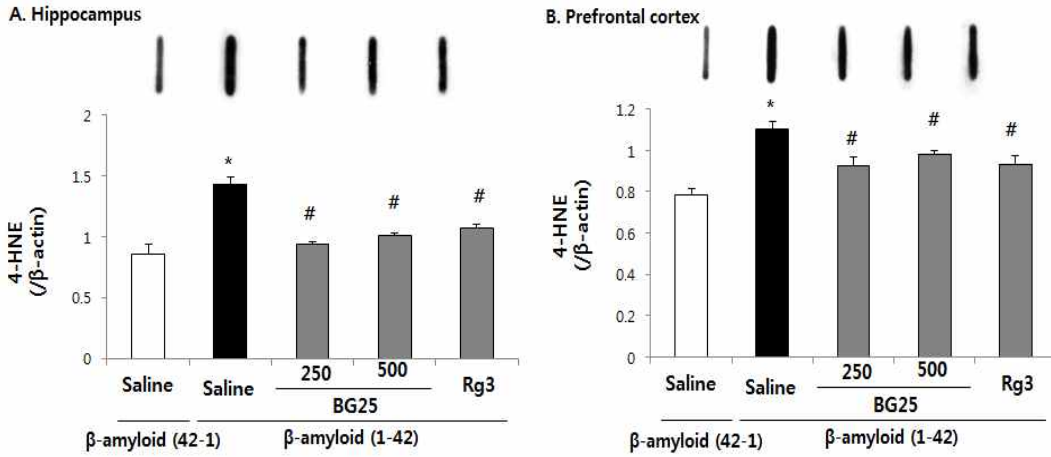


그림 34

해마(A) 와 대뇌 피질 (B) 에서 또다른 지질과산화 지표인 4-HNE를 slot blot을 통해 확인하였음. BG25는 지질과산화에 대해서 유의한 보호효과를 나타냈다 (그림 34). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * P < 0.05 vs. Saline + A β (42-1); # P < 0.05 vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

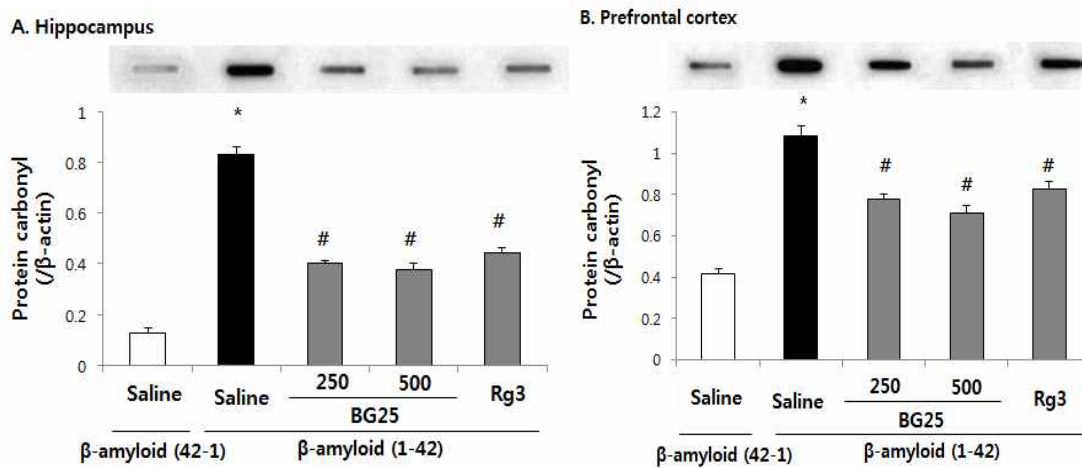


그림 35

해마(A) 와 대뇌 피질 (B) 에서 단백질산화 지표인 protein carbonyl을 slot blot을 통해 확인하였음. BG25는 단백질산화에 대해서 유의한 보호효과를 나타냈다 (그림 35). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * P < 0.05 vs. Saline + A β (42-1); # P < 0.05, ## P < 0.01 vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

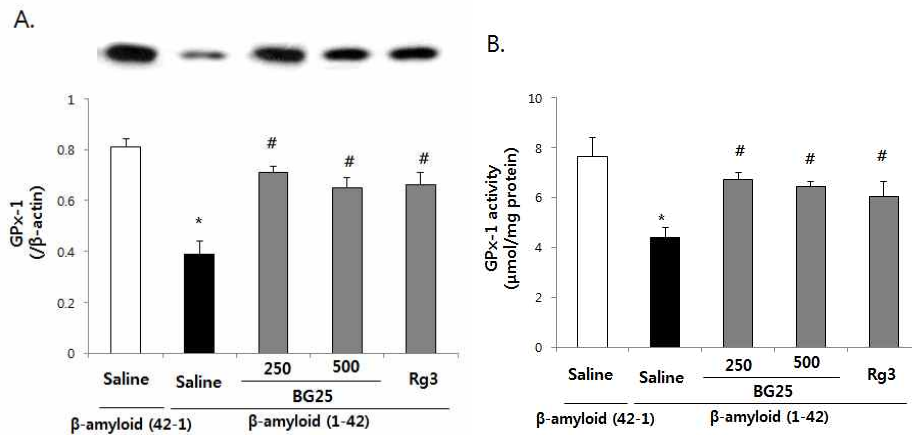


그림 36

해마의 GPx-1의 단백발현 (A)과 그 활성(B)을 측정함. BG25는 항산화 기전에 필수적인 GPx-1 단백 발현 뿐 아니라 그 활성에 대해서 유의한 보호효과를 나타냈다 (그림 36). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs. Saline + A β (42-1); # $P < 0.05$ vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

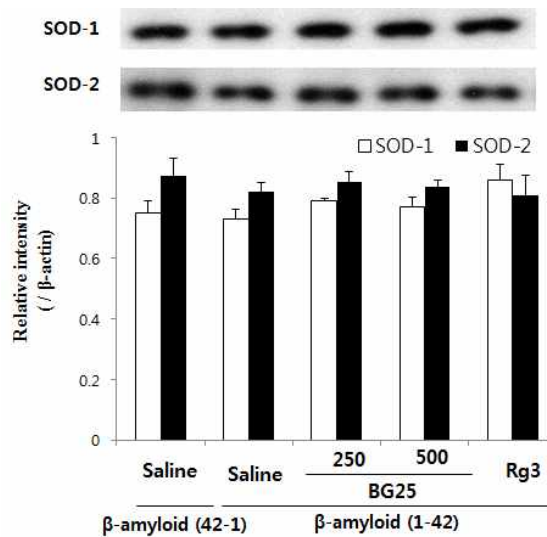


그림 37

해마의 SOD-1, SOD-2의 단백발현 정도를 western blot을 통해 확인하였다. SOD의 발현은 모든 실험군에서 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 GPx-1의 발현 및 활성이 알츠하이머 동물모델의 병리기전에 있어 더 중요한 지표임을 의미한다 (그림 37). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * $P < 0.05$ vs. Saline + A β (42-1); # $P < 0.05$ vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

산화적 손상지표와 항산화 관련 효소에 대한 보호효과에 있어 BG25는 Rg3와 비교하여 동등하거나 더 우수한 효과를 보였다.

5. 항염증 관련 지표

항염증 관련 기전에 대한 BG25의 약리효과를 확인하기 위해 대표적 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 mRNA 발현정도를 PCR 기법을 이용하여 확인하였다.

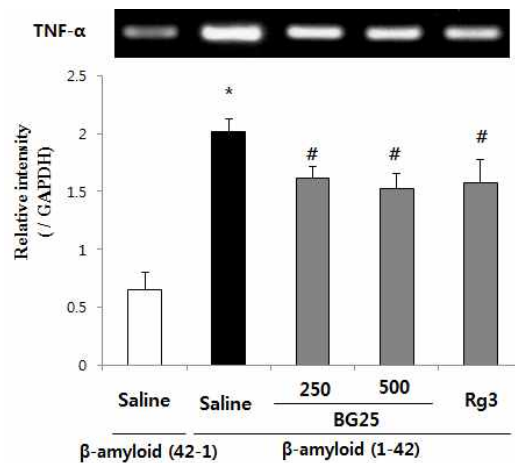


그림 38

염증성 사이토카인인 TNF- α 의 mRNA 발현에 있어 BG25는 유의한 보호효과를 나타냈다. 그림 (38). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * P < 0.05 vs. Saline + A β (42-1); # P < 0.05 vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

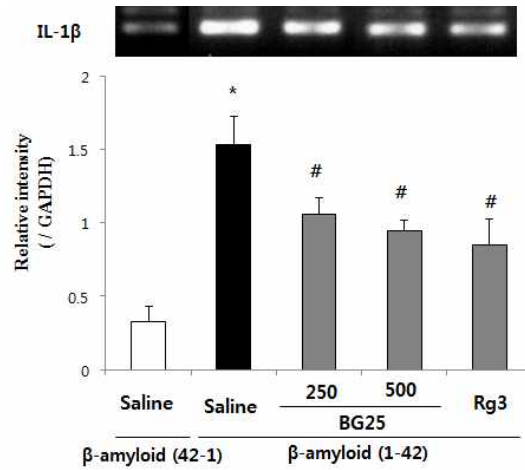


그림 39

또다른 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 mRNA 발현에 있어서도 BG25는 유의한 보호효과를 나타냄 (그림 39). [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * P < 0.05 vs. Saline + A β (42-1); # P < 0.05 vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).]

6. 기타 in vitro 실험 결과

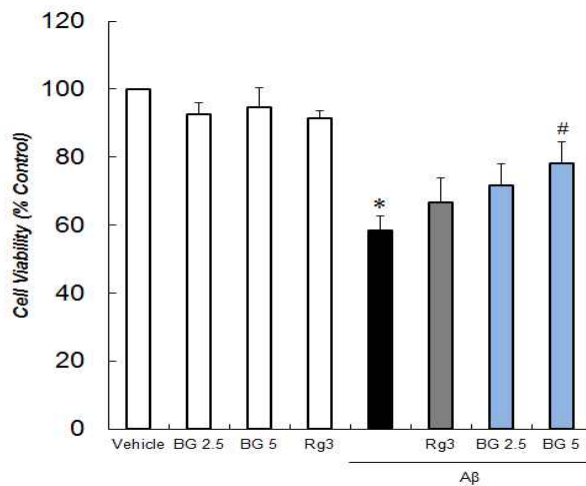


그림 40

한편 BG25에 의한 인지기능개선효과의 기작을 알아보기 위하여 추가로 *in vitro*에서 신경모세포주인 SH-SY5Y 세포에서 A β 처리에 의한 세포사멸에 대하여 BG25의 전처리는 Rg3에 비해 우수한 보호효과를 나타냈으며 또한 그 작용은 용량의존적인 경향을 보였다. [Each value is the mean \pm S.E.M. of 20 mice. * P < 0.05 vs. Saline + A β (42-1); # P < 0.05 vs. Saline + A β (1-42). (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test).] 그 자세한 기작에 대하여는

차후 후속 연구가 필요하다. 이상의 결과는 당초 계획된 연구내용 뿐 아니라 예상 외의 성과도 얻은 것으로 본다.

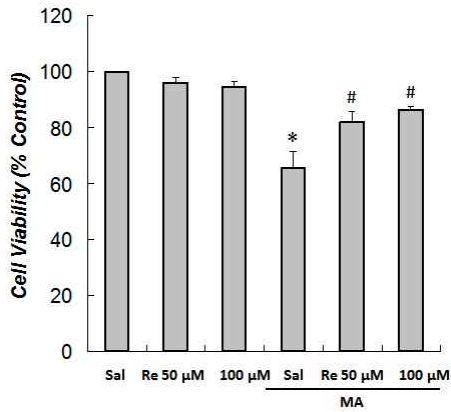


그림 41 Human neuroblastoma SH-SY5Y cell에 대한 Ginsenoside Re의 MA 독성에 대한 보호효과 (XTT assay)

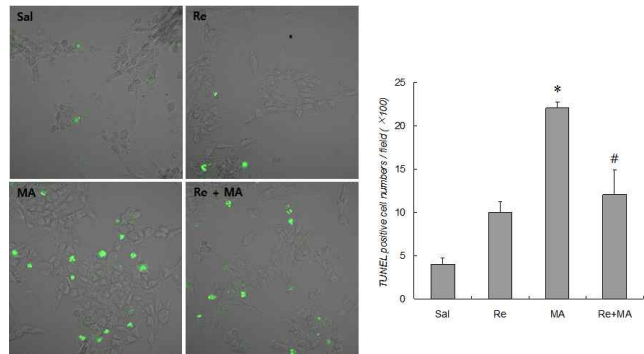
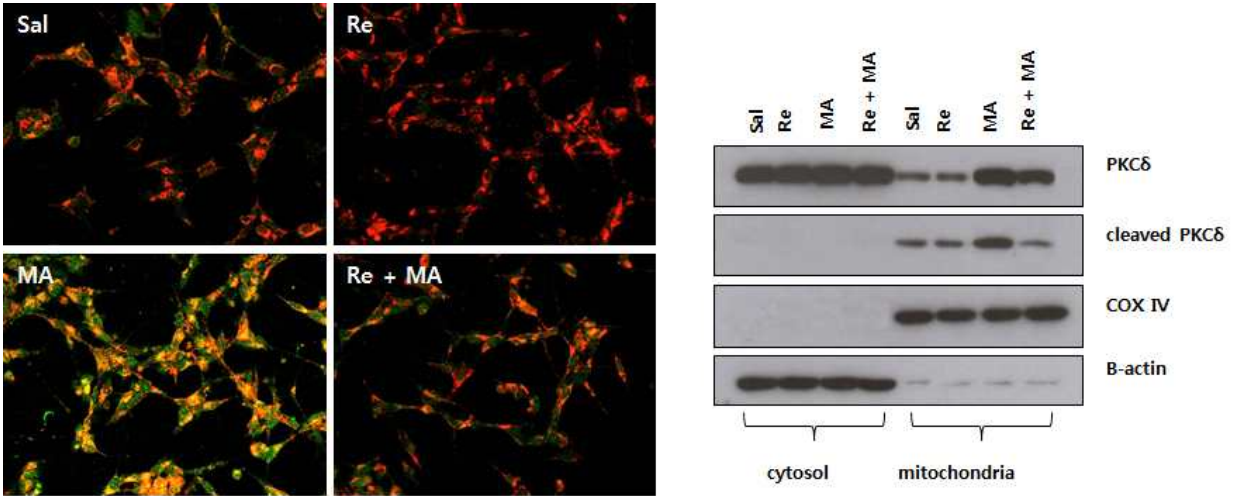


그림 42 Human neuroblastoma SH-SY5Y cell에 대한 Ginsenoside Re의 MA 독성에 대한 보호효과 (TUNEL staining)

BG25에 의한 인지기능 개선효과 외에 정제과정에서 얻어지는 부산물로서 ginsenoside 중 상당량을 차지하는 ginsenoside Re (Re)의 신경세포 보호효과에 대한 연구가 진행되어 간략히 소개한다. *in vitro*에서 신경모세포주인 SH-SY5Y 세포에서 methamphetamine (MA) 처리에 의한 세포사멸에 대하여 Re의 전처리는 우수한 보호효과를 나타냈으며 또한 그 작용은 용량의존적인 경향을 보였다. [Each value is the mean \pm S.E.M. of 6 replicates. * $P < 0.05$ vs. Saline; # $P < 0.05$ vs. MA. (One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test)].



Red: MitoTracker Red CMXRos Green: anti-PKCδ (Alexa 488)

그림 43 Human neuroblastoma SH-SY5Y cell에 대한 MA 독성에 PKCδ의 mitochondria로의 translocation이 관여하며 Ginsenoside Re의 보호효과는 이 기전을 차단함

또한 그 MA에 의한 신경세포 사멸과정에 PKC δ 의 mitochondria로의 translocation이 관여하며 Re의 보호효과는 아마도 이 기전을 차단하는 것을 통한 것이라는 것을 공초점 현미경을 이용한 연구 등을 통해 밝혔다. 더 자세한 기작에 대하여는 차후 후속 연구가 필요하다. 이상의 결과는 Re를 이용한 새로운 기능성 식품 개발의 시발점도 될 수 있어 당초 계획된 연구내용 뿐 아니라 예상 외의 성과도 얻은 것으로 본다.

제 4 절 식품 소재화 가공 및 포장개발

1. 유효성분의 추출 및 소재화 공정

전체적인 유효성분의 추출 및 시험용 소재화 제조 공정 흐름도는 다음과 같다.

흑삼원료 전처리->예열->교반 및 추출->냉각->여과->농축->분무건조

2. 각 공정 단계별 최적화

- 1) **원료 전처리:** 제조된 흑삼을 적절한 크기로 조분쇄한다. 이때 흑삼이 너무 미세하게 분쇄되어 추출후 여과시 분말입자들에 의한 filter cake가 생기지 않도록 조분쇄 하는 것이 중요하다.
- 2) **예열:** 미리 추출용매(물 및 주정)를 80 C정도로 가열 시킨다. 용매가 예열되어 있는 추출 탱크에 조분쇄된 흑삼을 넣는다.
- 3) **교반 및 추출:** 임펠러로 서서히 혼합하면서 95C 이상으로 2시간씩, 2회 반복 추출한다.
- 4) **냉각:** 추출이 끝난 후 반응물을 50-60C로 냉각시킨다.
- 5) **여과:** Nylon 여과포를 사용하여 1차 조여과 후, cartridge filter 2차 정밀여과를 실시한다.
- 6) **농축:** 여과된 반응물을 진공농축기를 사용하여 50-55 C에서 30-40 Brix 정도로 농축을 시킨다. 농축시 이취 성분들이 상당량 제거되는 것으로 판단됨.

흑삼의 유효성분 추출물을 시험용으로만 사용할 때에는 위와 같이 진공농축공정만 실시하여 적당한 고형분농도로 농축시킨 후 시험설계에 따라 적절한 농도로 희석시켜 시험하면 충분하다.

그러나 제품용 소재를 제조하는 소재화 공정측면에서는 반응물의 이미, 이취를 제거시켜 드

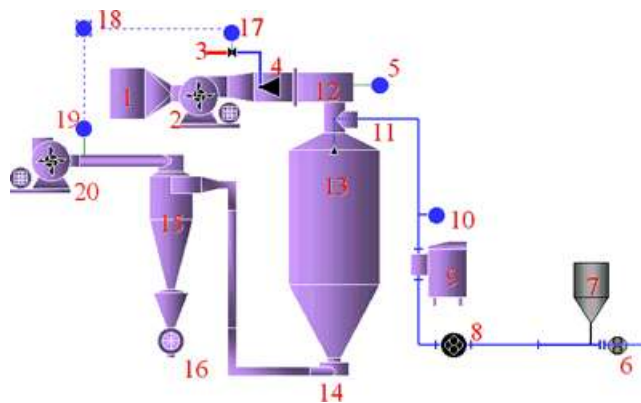
링크타입의 음료소재로서 적합한 관능적 특성을 갖도록 하며, 액상으로 배합시 성분함량을 일정하게 조절하기에 유리한 분말소재로 소재화 가공을 실시하는 것이 필요하다.

또한 반응물을 분말로 소재화 시키면 시험용 소재로 다룰 때는 물론이고, 원료소재의 보관 및 취급이 용이해져 액상의 드링크나 고형의 정제 및 캡슐 타입의 최종제품 제조시에 전체적인 공정의 품질관리가 용이해지는 장점이 있다. 따라서 분무건조시험을 실시하여 아래와 같은 최적의 분무건조 조건을 설정하였다.

7) 분무건조: 30-40 Brix로 진공농축 시킨 추출농축액을 분무건조시켜 분말소재를 제조하였다. 예비시험 결과 확립된 최적의 분무건조조건은 다음과 같다.

표 1. 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 1. 분무건조기의 구조 및 공정

3. 흑삼 제조 및 건조

단계별 흑삼제조는 9번의 반복된 증숙 및 건조과정을 거쳐 제조하였다(그림 1). 고압멸균기(Autoclave, KMC1221, 비전과학, Korea)를 사용하여 121℃, 15 lb/in²의 조건하에서 30분간 증숙하고, 열풍건조기(Drying oven, LS-501M, LS Tech, Korea)를 사용하여 60℃에서 12시간 동안 건조하여 제조하였다. 원료수삼부터 9차 증숙까지 증숙하면서 변화된 인삼의 외형은 아래 사진들과 같다.

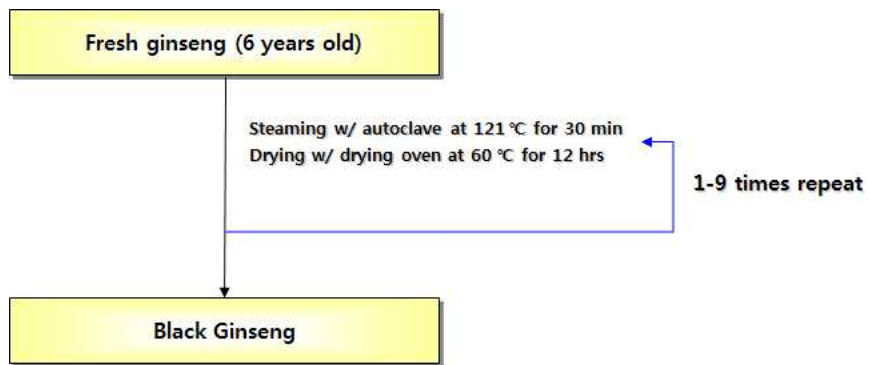


그림 1. 단계별 흑삼 제조



<원료수삼>



<1차증숙 흑삼>



<5차증숙 흑삼>



<9차증숙 흑삼>

4. 흑삼의 미세 분쇄화 조건

인간의 혀로 인식할 수 있는 입도는 약 20 μ m 정도 까지라고 보고되고 있으나, 선호하는 기호도는 첨가하는 식품의 종류, 상태 및 사람의 기호에 따라 조금 다르다고 알려져 있다. 본시험에서는 흑삼분말을 사용하는 액상제품 기호도를 입안느낌이 부드럽게 제조하기 위해서는 흑삼분말의 입도크기를 적어도 20 μ m이하로 분쇄하는 것이 필요하다는 전제조건하에서 적절한 미분쇄공정을 검토하였다. 이에따라 입자크기가 20 μ m이하로 미세분쇄된 흑삼 미분쇄분말은 입자가 큰 흑삼 조분쇄물과는 어떤 물성적 차이가 나타나는지 조사하여 흑삼분말을 활용한 가공적성의 기초자료를 확보하고자 하였다.

가. 흑삼분말의 1차 조분쇄

미분쇄실험시 1차적으로 흑삼을 고속회전식 knife mill형태의 분쇄기로 조분쇄하였다. 조분쇄한 흑삼분말의 평균입도크기는 105.71 μ m 이었으며, 입도분포는 그림 2와 같다. 위와 같이 고속회전식 분쇄기를 통과시켜 얻은 흑삼분말의 입자크기는 그대로 음료형태의 제품에 활용되는 소재로 사용하기에는 매우 커서 입안느낌이 부드럽지 못하였다.

나. 흑삼분말의 2차 미분쇄

미분쇄는 볼밀(Ball mill)을 사용하여 보다 곱게 분쇄하는 미분쇄 시험을 실시하였다. 분쇄기(Jar)내에 볼(Ball)을 넣어 입자를 분쇄하는 시스템으로서 분쇄 조건은 아래와 같다.

표 1. 흑삼 미분쇄에 사용한 볼밀의 분쇄조건

Types of mill	- Ball mill
Mill dimension	- Jar내용적 5L
Operating conditions	- 볼 충전량 : 50vol% - 시료 장입량 : 700g - 회전속도: 100 rpm - 분쇄시간 : 24 hr

위와 같은 볼밀 조건으로 2차 미분쇄를 실시하여 얻은 흑삼분말의 입도분포는 아래 그림 3과 같다.

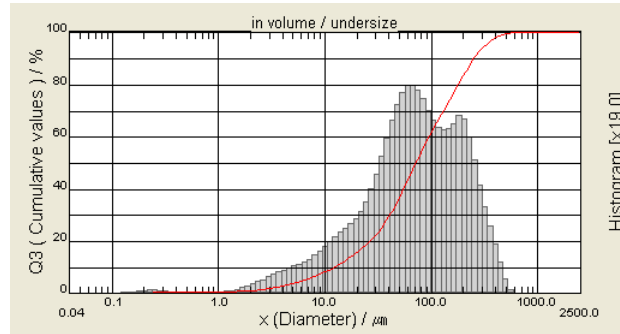


그림 2. Ball mill 처리전 1차 조분쇄 흑삼분말의 입도분포

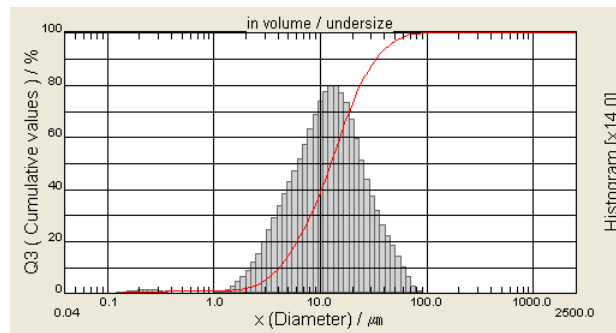


그림 3. Ball mill 처리한 흑삼 미세분말의 입도분포

흑삼분말을 ball mill로 24시간 처리하여 ball mill 처리전과 후의 입도와 색도를 측정하였다. 위 그림에서 보는 바와 같이 ball mill처리전은 평균 입도크기가 105.71 μm 이고 불규칙한 분포를 보인 반면 ball mill처리후의 흑삼분말의 평균입도크기는 16.12 μm 로 상당히 미세분쇄화가 되었음을 알 수 있었고, 입자분포도 매우 균일한 양상을 보였다.

한편, 불밀에서 흑삼분말이 16.12 μm 로 미세분쇄되는데는 실제로 24시간 걸리지 않을 것으로 판단되지만 분시험에서는 불밀 시간에 따른 흑삼분말의 미세분쇄 정도를 파악하는 것이 목적이 아니라, 미세분쇄된 흑삼분말과 조분쇄된 흑삼분말의 입자크기에 따른 물성적 차이를 조사하는 것이 목적이었기 때문에 충분한 불밀 시간을 주어서 최대한 미세분쇄된 흑삼분말을 얻은 것이다.

다. 색도측정

흑삼분말을 고형원료소재로 음료형태의 제품에 사용할 때 흑삼분말의 입도크기에 따라 혼합된 흑삼분말이 나타내는 색도가 달라지게 되므로 입도크기에 따른 색도를 측정하여 최종제품의 색을 결정할 때 참고할 수 있도록 하였다. 색도측정은 Color and color difference meter (Model: Hunter Lab Color Quest II, USA) 를 사용하였으며, CIE color system내의 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값으로 나타내었다. 이때 표준백색판의 L, a, b값은 각각 94.42, -0.98, 0.86 이었다.

표 2. 미세분쇄화에 따른 흑삼분말의 색도변화

색도지표	L	a	b
조분쇄분말 (ball mill 처리전)	46.62	5.39	12.10
미분쇄분말 (ball mill 처리후)	64.49	5.45	20.24

표 2에서 보듯이 Ball mill처리전의 흑삼에 비해서 처리한 후의 흑삼 미세분말의 L값과 b값이 큰 폭으로 증가하였다. 즉 lightness와 yellowness가 크게 증가하여 전체적인 색도가 조분쇄분말보다 갈색이 매우 연해지고 밝기도 크게 증가한 것으로 평가되었다.

라. 분산성 및 침전도 시험

액상제품에 분말활용시 중요한 가공적성 특성인 분산성 및 침전도를 조사하였다. Ball mill 처리한 흑삼미세분말과 흑삼 조분쇄분말 0.1g을 100ml의 물에 떨어뜨려 물에 가라앉는 속도와 분산정도를 측정한결과는 그림4와 같다.

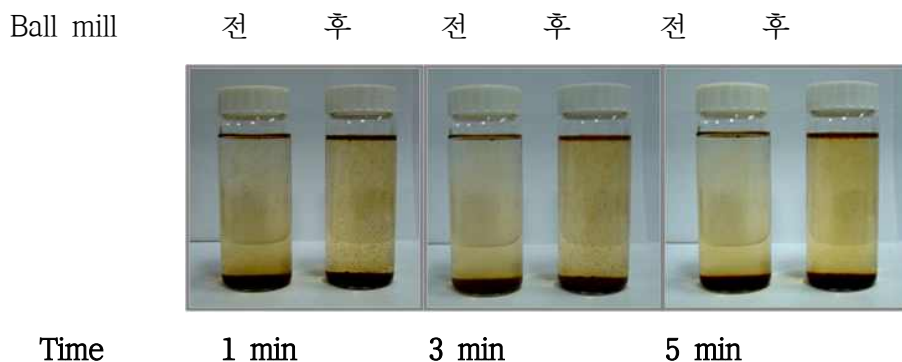


그림 4. Ball mill 전(조분쇄분말)과 후(미세분말)의 시간별 분산정도

Ball mill처리하지 않은 흑삼 조분쇄분말은 첨가한지 1분만에 대부분의 분말이 밑바닥에 가라앉았고 3분후 물에 분산되어있던 미세 분말도 거의 가라 앉았다. 한편, ball mill을 처리한 흑삼미세분말은 5분이 지나도 상당량의 분말이 용액중간에 분산되어 있었으며, 물 표면에도 아직 밑으로 가라앉지 않은 시료가 많이 관찰되었다. 이 시간 이후로는 외부 충격이 없는 한 더 이상의 침전이 관찰되지 않았다.

Ball mill 처리전 조분쇄분말과 후의 흑삼 미세분말 5g을 100 ml의 물에 잘 섞어주고 일정시간 지난 후 침전되는 정도를 관찰한 결과는 그림 5와 같다.

Ball mill 전 후 전 후 전 후 전 후 전 후

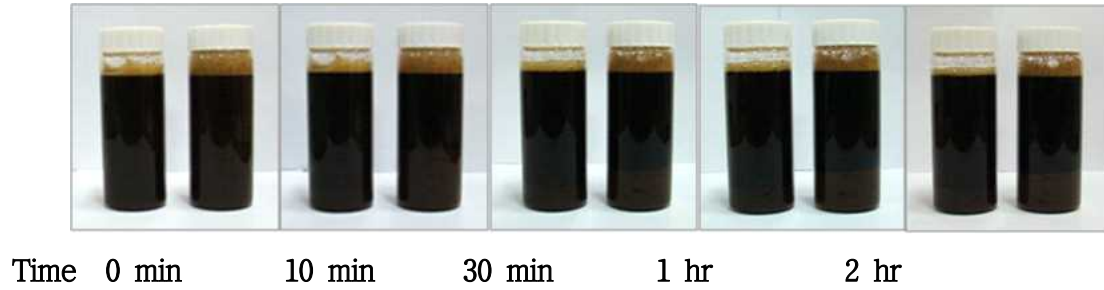


그림 5. Ball mill 전(조분쇄분말)과 후(미세분말)의 시간별 침전도 변화

10분이 지난 후부터 침전되는 정도의 차이를 눈으로는 구별할 수 있었고 시간이 지남에 따라 구분이 좀더 쉬웠지만 흑삼 자체의 검은 색 때문에 침전되는 정도를 뚜렷히 관찰하기가 어려웠다. Ball mill처리 전의 흑삼 조분쇄 분말은 예상대로 빠른 시간내에 침전이 완료되어 비교적 얇은 침전층을 형성했고 10분 후 부터는 더 이상의 침전이 관찰되지 않았다. Ball mill 처리 후의 흑삼 미세분말은 30분 후에도 분말이 용액내에 분산되어있는 것이 관찰되었으며, ball mill 처리전보다 두꺼운 침전층을 형성하였다. 이와 같은 현상은 같은 중량의 분말이라도 조분쇄 분말보다 미세분말이 액상형태의 제품에 활용될 때 침전에 의한 수화능력도 매우 크고, 비용적도 훨씬 더 크고, 따라서 액상내에서 분산되는 정도가 더 크다는것을 나타내는 것으로서 판단된다. 즉 액상제품에 활용시 입자가 작을수록 침전도 덜 될뿐만 아니라 침전이 일어난 것도 훨씬 쉽게 재분산 된다는 것을 시사해주는 현상으로 해석된다. 또한 그림 4에서 보듯이 흑삼의 검은색은 오히려 제품개발에 있어서 침전물이 생겼을 시 발생하는 미관상의 네거티브 효과를 어느정도 상쇄시킬 수도 있을 것으로 생각된다.

5. 대량추출공정 확립

유효성분의 추출 및 생산용 소재화 대량 제조 공정은 1년차에 확립한 제조공정을 기반으로 capacity를 생산용에 적합하도록 scale up시켰다. 기본적인 제조공정 흐름은 아래와 같다.

흑삼원료 전처리->예열->교반 및 추출->냉각->여과->농축->분무건조

- 각 단위 공정별 대량 생산화

1)원료 전처리: 제조된 흑삼을 20 mesh 정도로 pin mill을 사용하여 조분쇄 한다. 이때 흑삼이 너무 미세하게 분쇄되어 추출후 여과시 분말입자들에 의한 filter cake가 생기지 않도록 조분쇄

하는 것이 중요하다.

2)예열: 미리 추출용매(물 및 주정)를 80 C정도로 가열 시킨다. 용매가 예열되어 있는 5ton 짜리 추출탱크에 조분쇄된 흑삼을 넣는다.

3)교반 및 추출: 임펠러로 서서히 혼합하면서 95C 이상으로 2시간씩, 2회 반복 추출한다.

4)냉각: 추출이 끝난 후 반응물을 50-60C로 냉각시킨다.

5)여과: Nylon 여과포를 사용하여 1차 조여과 후, 0.2um의 cartridge filter 2차 정밀여과를 실시한다.

6)농축: 여과된 반응물을 박막하강식 진공농축기를 사용하여 50-55 C에서 30-40 Brix 정도로 농축을 시킨다. 농축시 이취 성분들이 상당량 제거된다.

7)분무건조: 30-40 Brix로 진공농축 시킨 추출농축액을 분무건조시켜 분말소재를 대량으로 제조하였다.

종합적으로 볼때 제품용 소재를 대량으로 제조하는 소재화 공정측면에서는 반응물의 이미, 이취를 제거시켜 드링크타입의 음료소재로서 적합한 관능적 특성을 갖도록 하며, 액상으로 배합시 성분함량을 일정하게 조절하기에 유리한 분말소재로 소재화 가공을 실시하는 것이 필요하다.

또한 반응물을 분말로 소재화 시키면 시험용 소재로 다룰 때는 물론이고, 원료소재의 보관 및 취급이 용이해져 액상의 드링크나 고형의 정제 및 캡슐 타입의 최종제품 제조시에 전체적인 공정의 품질관리가 용이해지는 장점이 있다.

6. 대량 건조 및 분쇄 공정 확립

2년차 보고서에 보고한대로 열풍건조기(Drying oven, LS-501M, LS Tech, Korea)를 사용하여 60°C에서 12시간동안 건조하여 흑삼을 대량으로 제조하였다. 대량 분쇄조건은 3년차에 새로이 설정하였다.

1)대량 미분쇄 조건 확립

인간의 혀로 인식할 수 있는 입도는 약 20 μ m 정도 까지라고 보고되고 있으나, 선호하는 기호도는 첨가하는 식품의 종류, 상태 및 사람의 기호에 따라 조금 다르다고 알려져 있다. 흑삼분말의 입도크기를 적어도 20 μ m이하로 분쇄하는 것이 필요하다는 전제조건하에서 적절한 대량 미분쇄공정을 검토하였다. 2차년도에는 ball mill을 사용하여 미분쇄조건을 설정하였으나, 3차년도에는 연속적인 기류식분쇄기(jet mill)를 이용하는 것으로 대량미분쇄공정을 확립하였다.

(1) 잘 건조하여 제조된 흑삼을 pin mill을 이용하여 80-100mesh정도로 1차 조분쇄를 대량으로 실시하였다.

(2) 80-100mesh정도로 1차 조분쇄된 흑삼분말을 아래와 같은 기류식분쇄기를 사용하여 20 μ m 이하로 대량미분쇄하였다.



그림. 조분쇄된 흑삼의 대량미세분쇄에 사용한 기류식 분쇄기

7. 적정 대량 포장법 검토

흑삼추출물 분무건조물이나 흑삼전체를 미세분쇄한 분말의 경우 흡습방지 및 유통시 강도가 있는 포장을 실시하면 큰 문제가 없는 것으로 판단되었다. 따라서 HDPE, LDPE, PP 등의 포장재를 사용하고 알미늄호일 등이 라미네이팅된 포장재를 사용하여 대용량으로 밀봉, 포장한 뒤 보관 및 유통을 시키는 것이 적당한 것으로 나타났다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	[제1세부(주관)] 흑삼 제조 표준화 및 제조공정 최적화	원료 표준화 (흑삼제조)	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 자료조사:원료 추출법, 분석법 자료 및 특허 조사 ▪ 원료제조 및 사포닌 추출법 연구:흑삼제제 표준화 제조공정 및 분석법 연구 ▪ 원료 및 제제의 분리정량이 가능한 기기분석 시험법 연구
	[제1협동연구] 성분 분리 분석 및 소재 개발	특유성분 분리 및 소재 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ginsenoside Rk₁ 분리 동정 ▪ 흑삼특유성분 고농도 함유 소재 개발
	[제2협동연구] 알츠하이머 치매의 동물모델에서 인지기능 개선 약리효과 평가	β -amyloid (1-40)을 뇌실내 (i.c.v.) 투여한 알츠하이머성 치매 동물모델에서 약리효능 평가	110%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 생쥐에 β-amyloid (1-40)을 뇌실내 (i.c.v.) 투여하여 알츠하이머성 치매 동물 모델 확립하여 아래의 평가를 수행함. ▪ ·장단기 기억력 평가 : Morris water maze, Y-maze, Passive avoidance test ▪ ·주의집중력 평가 : Novel object recognition test ▪ ·잠재학습능력 평가 : Water finding test ▪ ·운동수행능력 평가 : Rota-rod test, Locomotor activity ▪ ·정서능력 평가 : Elevated plus maze ▪ ·차년도 연구수행을 위한 APP/PS-1 이중 발현 생쥐의 개체수 확보
	[제3협동연구] 식품 소재화 가공 및 포장개발	유효성분의 추출 및 액상 원료 소재화	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ·제조된 흑삼의 원료 전처리 ▪ 제조된 흑삼의 교반 및 추출 ▪ 반응물의 냉각, 여과, 농축 ▪ 제조된 흑삼엑스의 분무건조 최적화

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2011)	[제1세부(주관)] 흑삼 제조 표준화 및 제조공정 최적화	원료 및 제제의 안정성 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 가속조건에 따른 안정성 분석 및 확립 ▪ 기초물성 및 부형제와의 상호작용 연구
	[제1협동연구] 생리활성성분분리 동정 및 분석	특유성분 분리, 동정 및 분석	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 성분분리 ▪ 성분분석 ▪ 벤조피렌 함량분석
	[제2협동연구] APP/PS-1 이중발현 생쥐에서 약리효능 평가	APP/PS-1 이중발현 생쥐에서 약리효능 평가 (대조물질로 ginsenosides Rg3 사용)	110%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1차년도에 개체수를 확보한 APP/PS-1 이중발현 생쥐에 시험물질 및 대조물질을 장기간 투여한 후 아래의 평가를 수행함. ▪ 장단기 기억력 평가 : Morris water maze, Y-maze, Passive avoidance test ▪ 주의집중력 평가 : Novel object recognition test ▪ 잠재학습능력 평가 : Water finding test ▪ 운동수행능력 평가 : Rota-rod test, Locomotor activity ▪ 정서능력 평가 : Elevated plus maze
	[제3협동연구] 식품 소재화 가공 및 포장개발	흑삼 전체를 이용한 고품 원료 소재화	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 적정 건조공정 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 열풍건조 ▪ 적정 분쇄조건 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 핀밀, 햄머밀에 의한 일반 분쇄 공정 - 기류식 분쇄기에 의한 미세분쇄 공정 확립

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2012)	[제1세부(주관)] 흑삼 제조 표준화 및 제조공정 최적화	안정성 및 제조공정 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 흑삼특유사포닌 분석시험법 연구 ▪ 초기대비 5%미만의 안정한 원료 및 제제 생산 ▪ Scale-up에 대비한 제조공정 최적화 ▪ 시험용 제품 생산
	[제1협동연구] 생리활성성분분리 동정 및 분석	생리활성성분 대량 분리 동정	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ HPLC분석 ▪ ginsenoside Rg5, Rk1
	[제2협동연구] APP/PS-1 이증발현 생쥐에서 약리효능 평가	알츠하이머 치매 동물모델의 해마 및 대뇌피질 영역에서 acetylcholine system의 기능에 미치는 약리효능 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 해마조직 및 대뇌피질 조직에서 acetylcholine의 수치 측정 ▪ 해마조직 및 대뇌피질 조직에서 acetylcholinesterase와 choline acetyltransferase의 활성 측정 ▪ 해마조직 및 대뇌피질 조직에서 acetylcholinesterase와 choline acetyltransferase의 mRNA 및 단백질 발현 측정 ▪ 항산화 기전의 평가 ▪ 항염증 기전의 평가
	[제3협동연구] 식품 소재화 가공 및 포장개발	대량 생산공정및 적정 포장법 확립	100%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 대량 추출 공정 확립 ▪ 대량 건조 공정 확립 ▪ 대량 분쇄 공정 확립 ▪ 흡습방지 포장재 및 방법 확립

제2절 인삼산업 발전에의 기여도

- 본 연구는 뛰어난 기능성분에도 불구하고 제조법에 따른 이화학적, 산업적 논란이 있는 흑삼에 대한 지표물질을 제시하고 아울러 그 기능성분의 생리활성 연구를 통해 인지기능 개선식품의 소재개발을 목표로 *in vivo* 및 *in vitro* 상의 실험을 통하여 인지기능 및 항 당뇨 효능 평가를 수행하였다.
- 흑삼제조 최적화 및 흑삼 특유성분의 분리, 정제 및 동정 연구에서는 증숙 조건별 및 증숙 차수별로 흑삼을 제조하고 사포닌함량 등 성분분석으로 실시하여 최적조건으로 제조된 흑삼에서 특유성분을 분리하고, 정제 및 동정하였다.
- 흑삼 제조시 사회적 논란이 되어온 벤조피렌의 함량을 측정한 결과 본 실험의 조건에서는 120°C의 고온에서 벤조피렌이 미량 검출 되었지만 현재 기준규격에 비하여 현저히 낮은 수준이었다.
- 증숙 차수별 ginsenosides 함량을 분석한 결과 가열하고 건조하는 과정을 반복함으로써 가수분해가 일어나 Ginsenoside의 구조적 변화로 Major saponin에서 Minor saponin 으로의 전환이 뚜렷하게 일어났다.
- 또한, 본 연구의 궁극적인 목적인 인지기능 개선 기능성 식품소재로의 흑삼제품을 개발하기 위하여 Rk₁, Rg₅ 등 흑삼의 prosapogenin 성분을 분석한 결과 열에 의하여 생성되는 인공물 즉 홍삼 특유성분으로서, 항암 및 두뇌기능 개선작용을 나타낸다고 알려진 인삼 prosapogenin (ginsenoside Rg₂, Rg₃, Rg₅, Rg₆, Rh₁, Rh₄, Rk₁, Rk₃, F₁, F₄) 성분의 함량에 있어서는 흑삼이 1.799%로 높은 함량을 나타내었고 본 연구를 통하여 흑삼 특유성분을 분리하고 정제하여 분광학적으로(NMR, MS) 구조 분석한 결과 ginsenoside Rk₁과 물리 화학적 성상이 같은 것이므로 ginsenoside Rk₁으로 확인 동정하였다.
- Ginsenoside Rg₅, Rk₁을 고농도로 함유한 인지기능개선 표준화 기능성식품 유효성분(BG25)의 효과를 여러 가지 신경정신행동약리학적인 일련의 방법들을 통해 평가하였다. 장기 기억력 평가에서 BG25는 유의한 인지기능개선 효과를 보였으며 대조성분인 홍삼의 Rg₃보다 우수하였다. 또한, 수동회피시험에서도 BG는 홍삼의 Rg₃보다 유의하게 더 우수한 인지기능개선 효과를 보였다. 단기 기억력 평가에서는 그 효과가 그리 크지는 않으나 유의하게 인지기능이 개선되는 경향을 보였다. 주의집중력 및 잠재학습능력 평가에서는 비교적 높은

용량에서 유의한 개선효과를 관찰할 수 있었다. 운동수행능력을 평가에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 앞의 인지기능평가 결과들이 BG25가 인지기능 개선에 영향을 준다고 할 수 있다.

- 일련의 결과들로 볼 때 흑삼에서 추출 및 정제한 특유성분인 BG25가 인지기능 개선에 효과적인 것으로 사료된다. 아울러 이를 활용한 다양한 제형의 기능식품으로서의 개발의 길이 무궁무진하다고 생각되어 진다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구논문 발표 및 지적재산권 확보

1. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Changes in the Contents of Prosapogenin in the Red ginseng (<i>Panax ginseng</i>) depending on Steaming Batches	Sun A Lee	Sung Kwon Ko	Jo, Min Chang Sung, Soon Hyun Cho, Byung Ok Im, Sungun Kim, Wan Kyun Whang	Journal of Ginseng Research	submit	국내	SCIE
2011	발효 산양삼의 인삼사포닌 분석	황진숙	고성권	조희경	한국산삼학회지	submit	국내	-
2010	¹ H NMR-Based Discrimination of Thermal and Vinegar Treated Ginseng Roots	So-Hyun Kim	Boo-Yong Lee	Sun-Hee Hyun, Seung-Ok Yang, Hyung-Kyoon Choi	Journal of Food Science	75(6) C577-C581	국외	SCI
2012	Changes in the Contents of Prosapogenin in the Red ginseng (<i>Panax ginseng</i>) depending on Steaming Batches	Sun A Lee	Sung Kwon Ko	Jo, Min Chang Sung, Soon Hyun Cho, Byung Ok Im, Sungun Kim, Wan Kyun Whang	Journal of Ginseng Research	36(1)	국내	SCIE
2012	Ginsenoside Rg1 promotes glucose uptake through activated AMPK pathway in insulin-resistant muscle cells	Hye-Min Lee	Boo-Yong Lee	Ok-Hwan Lee, Kui-Jin Kim	Phytotherapy Research	DOI: 10.1002/ptr.3686	국외	SCI
2012	Ginsenoside Rg3 attenuates tumor angiogenesis via inhibiting bioactivities of endothelial progenitor cells	Jae-Won Kim	Boo-Yong Lee	Seok-Yun Jung, Yi-Hong Kwon, Sang-Hun Lee, Zun-Hee Lee, and Sang-Mo Kwon	Cancer Biology and Therapy	accepted 2012.2.4	국외	SCI
2011	Ginsenoside Rg3 Inhibits Endothelial Progenitor Cell Differentiation through Attenuation of VEGF-Dependent Akt/eNOS Signaling	Jae-Won Kim	Sang-Mo Kwon	Seok-Yun Jung, Yi-Hong Kwon, Sang-Hun Lee, Jun-Hee Lee, Boo-Yong Lee	Phytotherapy Research	DOI: 10.1002/ptr.3722	국외	SCI

2. 학술대회 발표 성과

발표일시	발표명	발표자	학회	장소
2010. 9. 24.	Quantitative analysis of ginsenosides in black ginseng(<i>Panax ginseng</i>) steamed under various the number of times	Sun A Lee, Hee Kyung Jo, Sungun Kim ¹ , Wan Kyun Whang ¹ , Il Hyuk Kim ¹ , Sung Kwon Ko	제5회 한중일 합동 생약 심포지움(JSP-CCTNM-KSP Joint Symposium)	토쿠시마, 일본
2011. 11. 7.	The change of ginsenoside composition in the White ginseng extract by the microwave process	JO Hee-Kyung, SUNG Min-Chang, KO Sung-Kwon	011년도 대한약학회 추계 학술대회	인천, 한국
2011. 11. 30.	The change of ginsenoside composition in the American ginseng extract by the microwave process	HeeKyung JO, MinChang SUNG, SungKwon KO	2011년 한국생약학회 추계 학술대회	서울, 한국
2012. 4. 21.	Ginsenoside Re prevents methamphetamine induced dopaminergic toxicity in vitro : attenuation of protein kinase C δ activation, apoptosis and mitochondrial dysfunction	Bach Jae-Hyung, NGUYEN Xuan-Khanh Thi, LEE Jeonghyun, SHIN Eun-Joo, KO Sung Kwon, Kim Hyung-Chun	2012년도 대한약학회 춘계 학술대회	제주, 한국
2013, 4. 19.	Role of PKC δ in Ginsenoside Re-Mediated Protection in Response to Methamphetamine-Induced Dopaminergic Neurodegeneration: Mitochondrial Dysfunction, Cytotoxicity, and Behavioral Impairments	Bach JH, Nguyen TXK, Lee JH, Yang BW, Shin EJ, Ko SK, Kim HC	2013 Proceedings of Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea.	Sunchon, Republic of Korea.
2013. 4. 20.	Ginsenoside Re prevents methamphetamine-induced dopaminergic toxicity <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> : attenuation of protein kinase C δ activation, apoptosis and mitochondrial dysfunction	Bach JH, Nguyen TXK, Lee JH, Shin EJ, Ko SK, Kim HC	2012 Proceedings of International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies	Jeju, Republic of Korea

3. 특허 성과

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2011	ginsenoside Rg ₅ , Rk ₁ 고농도 함유 조성물 및 이의 제조방법	세명대학교 산학협력단	한국	출원 예정
2011	초음파 처리를 이용한 인삼 프로사포게닌 고농도 함유 인삼 제제 및 이의 제조방법	세명대학교 산학협력단	한국	10-2011-0141997

제2절 사업화 방안

- 흑삼에 대한 생리활성물질을 확인하고, 생리활성 성분 및 흑삼 특유성분을 탐색한 뒤 원료 및 제품의 개발한다.
- 특정 유효 흑삼사포닌 성분이 함유된 건강기능식품의 개별 인정형 원료를 소재로한 건강기능식품 및 일반 특수영양식품 제품화한다.
- 흑삼제제에 대한 가공 제조공정을 최적화한다.
- 흑삼 특유 생리활성 성분 고농도 함유제제를 개발하고 산업화한다.
- 현재의 면역력증강 및 피로회복에 제한되어 있는 기능성내용을 각 기능성 지표물질을 신소재화하여 치매증 개선 신소재 개발에 기여한다.
- GMP 공장시설 가동
 - 현재 인삼(홍삼)의 추출/농축실에서 흑삼사포닌 추출 및 농축이 이뤄지고 각 단계별 공정실을 이용하여 최종제품을 생산할 계획이다.
 - 또한, GMP 공장이 현재 가동중이며 생산라인 중 건강기능식품에 관련된 제품들은 모두 GMP 공장동에서 생산하고 있다. 따라서 본 과제이 결과로 생산될 제품또한 GMP시설의 공장라인에서 생산할 계획이다.

○ 거래처 확보 및 마케팅 활동

- 온라인(On-line) 활용 : 제품정보가 상세히 기술된 영문, 중문, 일문 홈페이지를 구축하여 정보를 제공한다.
- 홈쇼핑판매 : GMP 공장에서 생산된 기능성을 강화시킨 브랜드화 된 제품을 홈쇼핑에 Lanching한다.
- 생산공정 견학시스템 구축 : 해당제품의 신뢰도를 높이기 위하여 원료의 입고부터 제품의 출고까지 공개한다.
- 해외수출시장 개척 : 한국무역협회, 중기청 수출지원센터 등의 기관과 연계하여 해외시장의 판로를 개척하고 해외 식품학회 및 식품박람회에 참가하여 제품 및 기업을 홍보한다.

○ 사업화 계획

구 분		사업화 년도		
		(2013)년 (개발종료 해당년)	(2014)년 (개발종료 후 1년)	(2015)년 (개발종료 후 2년)
사업화 제품		신왕수흑삼	신왕수흑삼	신왕수흑삼
투자계획(백만원)		500	300	200
판매 계획 (백만원)	내 수	50	500	1,500
	수 출	50	500	1,500
	계	100	1,000	3,000
수입대체효과(백만원)		50	500	1,500
고용 창출(명)		2	4	8

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당내용 없음

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

Hwang SH, Shin EJ, Shin TJ, Lee BH, Choi SH, Kang J, Kim HJ, Kwon SH, Jang CG, Lee JH, Kim HC, Nah SY. Gintonin, a ginseng-derived lysophosphatidic acid receptor ligand, attenuates Alzheimer's disease-related neuropathies: involvement of non-amyloidogenic processing. *J Alzheimers Dis.* 2012; 31(1): 207-223.

Jhoo JH, Kim HC, Nabeshima T, Yamada K, Shin EJ, Jhoo WK, Kim W, Kang KS, Jo SA, Woo JI. Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav Brain Res.* 2004; 155(2): 185-196.

Jin CH, Shin EJ, Park JB, Jang CG, Li Z, Kim MS, Koo KH, Yoon HJ, Park SJ, Choi WC, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC. Fustin flavonoid attenuates beta-amyloid (1-42)-induced learning impairment. *J Neurosci Res.* 2009; 87(16): 3658-3670.

Kim BK, Shin EJ, Kim HC, Chung YH, Dang DK, Jung BD, Park DH, Wie MB, Kim WK, Shimizu T, Nabeshima T, Jeong JH. Platelet-activating factor receptor knockout mice are protected from MPTP-induced dopaminergic degeneration. *Neurochem Int.* 2013 Jun; 63(3): 121-132.

Niwa M, Matsumoto Y, Mouri A, Ozaki N, Nabeshima T. Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011; 14(4): 459-477

Park SJ, Shin EJ, Min SS, An J, Li Z, Hee Chung Y, Hoon Jeong J, Bach JH, Nah SY, Kim WK, Jang CG, Kim YS, Nabeshima Y, Nabeshima T, Kim HC. Inactivation of JAK2/STAT3 Signaling Axis and Downregulation of M1 mAChR Cause Cognitive Impairment in klotho Mutant Mice, a Genetic Model of Aging. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(8): 1426-1437.

Shin EJ, Chae JS, Park SJ, Kim SC, Koo KH, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC. Growth

hormone-releaser diet attenuates beta-amyloid(1-42)-induced cognitive impairment via stimulation of the insulin-like growth factor (IGF)-1 receptor in mice. *J Pharmacol Sci.* 2009; 109(1): 139-143.

Shin EJ, Duong CX, Nguyen XK, Li Z, Bing G, Bach JH, Park DH, Nakayama K, Ali SF, Kanthasamy AG, Cadet JL, Nabeshima T, Kim HC. Role of oxidative stress in methamphetamine-induced dopaminergic toxicity mediated by protein kinase C δ . *Behav Brain Res.* 2012; 232(1): 98-113.

Wang Q, Shin EJ, Nguyen XK, Li Q, Bach JH, Bing G, Kim WK, Kim HC, Hong JS. Endogenous dynorphin protects against neurotoxin-elicited nigrostriatal dopaminergic neuron damage and motor deficits in mice. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 124.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.