

발간등록번호

11-1543000-000156-01

인삼 화뢰를 이용한 기능성식품 및 화장품 신소재 및  
제품 개발

(Development of new material and product for functional food  
and cosmetic using ginseng flower buds)

세명대학교 산학협력단

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “인삼 화퇴를 이용한 기능성식품 및 화장품 신소재 및 제품 개발”의 보고서로 제출합니다.

2013년 7월 30일

주관연구기관명 : 세명대학교

주관연구책임자 : 고 성 권

세부연구책임자 : 고 성 권

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 정 성 현

협동연구기관명 : 치의학대학교

협동연구책임자 : 이 부 용

협동연구기관명 : (주)엠디젠

협동연구책임자 : 백 형 개

# 요 약 문

I. 제 목 : 인삼 화퇴를 이용한 기능성식품 및 화장품 신소재 및 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 지금까지의 인삼 연구개발은 주로 지하부(뿌리)에 대하여 진행되어 왔고, 이에 대한 논문만도 약 2000여편에 이르고 있으나, 인삼 재배부산 폐기물인 인삼 지상부에 대한 연구개발은 체계적으로 이루어지고 있지 않고 있음.

○ 특히, 인삼사포닌으로서 생리활성성분인 진세노사이드 Re가 4%로 고농도로 함유하고 있는 인삼 화퇴에 대한 성분 규격 및 유효성 시험을 통하여 기능성 식품 및 화장품 신소재 및 제품을 개발하고자 함.

○ 인삼 화퇴 등 인삼지상부는 현재, 현행법(건강기능식품, 식품위생법)에서는 인삼류 건강기능식품 및 식품으로는 사용허가되지 않기 때문에, 본 연구를 바탕으로 인삼화퇴 엑스는 별규 건강기능식품(간기능개선)으로 개발하고자 하며, 초음파 처리 인삼화퇴 엑스는 Rg2, F4 고농도 함유 주름개선 기능성화장품으로 개발하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

인삼 화퇴에 대한 소재 개발(분리, 생물전환 최적화) 및 유효성(간기능 개선, 숙취 개선, 아토피 피부염) 검토를 통하여 기능성 식품 및 화장품 신소재 및 제품을 개발하고자 아래와 같은 연구를 실시함.

(1차년도)

- 인삼 화퇴의 성분 분리 및 가공 조건(ginsenoside Rg2, Rh1, F1, protopanaxatriol 1% 이상 고농도 함유) 최적화
- 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 간기능 개선시험
- 액상 소재화 가공
- 인삼 화퇴 대량 수집 및 원료 자원 조사

(2차년도)

- 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 항알레르기 시험
- 인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체의 간기능개선시험
- 적정 부재료 선정 및 최종 배합시험
- 소재 분석법 연구
- 인삼화퇴 및 세척 인삼화퇴의 잔류농약 시험

(3차년도)

- 인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체 주름 개선 전임상 시험

- 인삼 화퇴 가공물의 주름 개선 임상시험
- 시제품 제작
- 제조공정 최적화 및 안정성 연구

#### IV. 연구개발결과

○ 인삼의 재배시 지하부(뿌리)를 굵게 하기위해서 따서 버리는 인삼화퇴는 재배부산물로서 연간 1만톤 규모로 폐기되고 있고, 이는 우리자연의 어류자원에 커다란 위협이 되고 있다. 따라서, 이를 이용한 기능성식품 및 화장품의 개발은 인삼 농가에 수익을 가져다 주고, 친환경 인삼산업 발전에 기여하는 것이다.

○ 인삼화퇴의 주성분인 ginsenoside Re를 컬럼크로마토그래피법으로 분리하였으며, 분광학적 방법으로 화학구조를 확인 동정하였고, 기능성 강화 인삼화퇴 조성물 개발의 일환으로 초음파 및 식초 처리에 의하여 활성 prosapogenin 성분인 ginsenoside Rg2, Rh1, F4 를 고농도로 함유하는 조성물을 개발하여 특허(출원번호 : 10-2011-0142000)를 출원하였다.

○ 인삼화퇴 숙취개선시험으로 인삼화퇴와 알코올을 1회 투여한 래트에서 알코올 및 아세트알데하이드 농도를 감소시키는 작용이 있음을 확인하였고, 인삼화퇴와 알코올을 20일간 투여한 마우스에서 농도 의존적으로 알코올, 아세트알데하이드가 감소되었으며, sALT, sAST치가 농도 의존적으로 감소되었다. 이와 같은 결과로부터 인삼화퇴는 알코올투여로 인한 숙취개선효과와 간기능장애 개선효과가 있음을 확인하였고, 이를 바탕으로 특허(출원번호 : 10-2011-0057835)를 출원하였다.

○ 인삼화퇴의 주성분인 ginsenoside Re는 고지방식이 마우스에서 혈중 혈당, 중성지방, NEFA치를 유의적으로 낮추었으며, 또한, 간조직에서 지방구가 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 ginsenoside Re가 혈당, TG, NEFA 등 조절할 뿐만 아니라 비알코올성 지방간에도 탁월한 효과가 있을 것이라는 것을 알수 있었다.

○ 고지방식이 마우스 간조직에서 AMPK가 용량 의존적으로 현저하게 phosphorylation 되었으며 ACC 역시 현저하게 phosphorylation 되었으며, 지방합성 (lipogenesis) 관련 gene 들인 SREBP1 $\alpha$ , FAS, SCD1 등 gene들의 발현을 고지방식이 그룹과 비교하였을 때 현저하게 감소된 것을 볼수 있었으며 당신생 관련 gene인 PEPCK와 G6Pase 또한 감소되었다. 이러한 결과로부터 진세노사이드 Re가 지방축적 억제, 당신생 억제 등에 효과가 있다는 것을 알수 있었다.

○ Human hepatoma cell-HepG2에서 진세노사이드 Re는 용량, 시간 의존적으로 AMPK와 ACC를 현저하게 인산화 시켰다. 한편 그림 C에서는 AMPK inhibitor인 compound C를 전처리하였을 때 AMPK와 ACC 인산화가 억제됨을 확인하였다. 이 결과로부터 진세노사이드 Re가 AMPK 경로를 통하여 생리활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다. 또한, 진세노사이드 Re의 lipogenesis 관련 유전자에 대한 효과들이 AMPK와 관련이 있는지를 알아보기 위해 HePG2 세포에 AMPK inhibitor인 compound C를 전처리하였을때 lipogenesis gene들인 SREBP-1,



SCD1, FAS가 증가한 것을 알수 있었다.

○ 한편, 인삼화퇴의 항알레르기 작용 시험으로 비만 세포주인 Human Mast Cell Line (HMC)를 이용하여 시료의 항histamine 작용을 관찰함으로써 항알레르기 효과를 검토하였으며, Histamine 분비 유도로는 compound 48/80을 사용하였고, 시료는 인삼화퇴와 ginsenoside Re를 가지고 농도별로 투여 하여 실험한 결과, 인삼 화퇴는 30ug/ml( $P>0.01$ ), 10ug/ml( $P>0.05$ )에서 유의성 있게 histamine 분비를 억제 하였으며, ginsenoside Re는 30ug/ml( $P>0.01$ ), 10,3,1ug/ml( $P>0.05$ )에서 유의성 있는 억제효과 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 인삼 화퇴 엑스와 ginsenoside Re는 실험적으로 histamine 분비량을 감소시킴으로써 항 알레르기 효과를 갖는다고 사료된다.

○ 초음파 처리 인삼화퇴 조성물의 간기능개선 시험으로 래트에 알콜투여 6주후에 인삼화퇴를 10일간 경구투여한 결과, 혈중 중성지방은 ETOH 대조군에 비해 25.7% ( $p<0.01$ ) 낮아지는 결과를 보여주었다. 혈중 ALP, ALT, AST 및 TNF- $\alpha$  는 ETOH 대조군에 비해 각각 23.8% ( $p<0.001$ ), 9.0%, 18.1% ( $p<0.05$ ), 15.1% ( $p<0.05$ ) 낮아지는 결과를 보여주었다. 이 결과는 인삼화퇴 제제가 ETOH로 유발된 흰쥐의 간 독성에 개선 작용이 있음을 보여주었다.

○ 초음파 처리 인삼화퇴 조성물의 간 조직의 형태에 미치는 영향을 살펴본 결과, 지방구가 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 인삼화퇴 제제가 알코올성 지방간에 탁월한 효과가 있음을 보여주었다.

○ 초음파 처리 인삼화퇴 조성물의 알코올성지방간 보호작용기전으로 Western blot analysis를 통하여 AMPK 가 현저하게 phosphorylation 되었으며 ACC 역시 현저하게 phosphorylation 되었다.

○ 초음파 처리 인삼화퇴 조성물은 Real-time PCR 결과로서 SREBP1c 유전자 발현은 감소되는 경향을 보였고 FAS, SCD1, GPAT 등 gene들의 발현은 유의적으로 감소하였고, CD36, PPAR- $\alpha$  유전자 발현이 유의적으로 증가하였다. 염증관련 gene 들인 TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2의 발현은 현저하게 감소하였다.

○ 이상의 결과에서 초음파 처리 인삼화퇴 조성물은 ETOH에 의해 유도된 지방간에 현저한 개선 효과가 있으며, 본 제제의 알콜성 지방간 개선 효과 작용기전은 간 조직에서 AMPK signaling pathway를 활성화시킴으로써 지방산의 산화를 촉진한 결과 중성지방의 축적을 억제하고 추가로 염증유발 유전자들의 발현을 억제함으로써 알코올성 지방간의 간 독성을 개선한 것으로 추측되어 향후 조성물이 숙취개선 건강기능식품으로 개발되는데 기초적인 자료로 활용될 것으로 기대한다.

○ 초음파 처리 인삼화퇴 조성물의 이소프로필알콜 분획(ginsenoside Rg2, Rh1, F4 고농도 함유 분획)의 주름개선 효력시험에서 자외선을 처리하지 않은 상태에서 낮은 농도(0.000004%-0.000008%)에서 콜라겐 합성을 촉진하는 효과가 나타내었고, Hs68세포에서 생성

되는 human MMP1이 0.025, 0.05%의 농도에서 유의하게 감소되었다. 따라서, ginsenoside Rg2, Rh1, F4 고농도 함유 분획은 사람의 섬유아세포 유래의 Hs68세포에 있어서 콜라겐 생합성이나 콜라겐을 분해하는 human MMP1의 생성을 억제함으로써 주름개선 효과가 있는 것으로 사료된다.

○ 초음파 처리 인삼화퇴 조성물의 이소프로필알콜 분획(ginsenoside Rg2, Rh1, F4 고농도 함유 분획)의 주름개선 인체효능평가에서 전문의에 의한 육안평가로서 제품 사용 4주 후에 육안평가 결과 통계적으로 유의한 수준의 차이는 없었지만, 제품 사용 8주 후, 제품 사용 12주 후에는 대조제품에 비해 통계적으로 유의한 수준의 차이를 보였다. 제품 사용 후 대조제품과 시험제품의 모사판 화상 분석에 대한 통계 분석 결과 제품 사용 후 12주에서 parameter값인 R1, R4, R5에서 통계적으로 유의한 수준의 주름개선 효과가 있었다. 따라서 시험제품은 사용 12주 후 대조제품과의 모사판 화상 분석에 대한 통계 분석 결과 통계적으로 유의한 수준( $p < 0.05$ )의 주름개선 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 시험이 진행되는 동안 피험자로부터 특별한 이상 반응은 보고되지 않았으므로 피부 이상반응이 없는 것을 알 수 있었으며, 피부과 전문의에 의한 이학적 검사상 대조제품 및 시험제품 모두 사용 후 홍반이나 소양감, 발진 등 피부 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서 대조제품과 시험제품은 피부에 자극이 없는 안전한 제품임을 알 수 있었다.

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 실용화·산업화 계획(기술실시 등) : 초음파 처리 인삼화퇴 조성물의 이소프로필알콜 분획을 이용한 주름개선 기능성 화장품 허가를 취득하여 실용화함. 또한, 미숙과 상태의 인삼화퇴를 이용하여 간기능개선 효능인정 식품 허가를 취득하여 실용화함.
- 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등 : 인삼재배 농가에 인삼화퇴를 미숙과 상태에서 채취하도록 교육, 지도, 홍보함.
- 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등 : 인삼화퇴 간기능개선 특허 3건을 출원하였으며, 주름개선 기능성 화장품 특허 1건을 출원예정(2013년 8월 내 출원)임. 또한, SCI급 논문 8편, 비SCI급 논문 4편을 투고 출판하였음.
- 추가연구, 타연구에 활용 계획 등 : 향후, 초음파 처리 인삼화퇴의 인체적용시험, 안전성시험 등을 보완하여 지방간 개선 기능성식품으로 개발하고자 함.

## SUMMARY

The root of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) is applied for medicinal purposes, and the main physiologically active substances of ginseng are ginsenosides, polyacetylenes, ginseng proteins, polysaccharides, and phenolic compounds. Diverse researches have been conducted in earnest since the late 1960s on ginsenoside, which was paid attention as the effective constituent of ginseng with biochemical and medicinal functions, and the chemical structure of ginsenoside was clearly confirmed by the studies of Shibata et al. Furthermore, ginsenoside can be subdivided into protopanaxadiol (PD), propanaxatriol (PT), and oleanane saponin according to the characteristics of its chemical structure, and so far the chemical structures of 22 types of PD, 13 types of PT and 1 type of oleanane compounds have been identified. Several research groups reported that ginsenoside exhibits the medicinal actions including among others anti-cancer and anti-diabetic activities, constraint effect on central nervous system (CNS), prevention of arterial hardening and hypertension, promotion of liver function and protein synthesis, relief of hangovers, antifatigue, anti-stress, anti-oxidative, and anti-inflammatory activities, as well as enhancement of immunity. As such, many biochemical and medicinal studies have been conducted for scientific explanation of the efficacy of ginsenoside, and efforts are currently being made in various aspects to identify the efficacy of ginsenoside components.

However, although many studies have been done on ginseng regarding the age of root and regions of ginseng cultivation, so far, no systematic studies have been done on ginsenoside components of different parts, including flower buds, of the ginseng species. Moreover, the flower buds of ginseng, which also contains ginsenosides, could be used as an alternative ginsenosides resource and supplementary ingredient. Therefore, the aim of the present study was to analyze the contents of ginsenosides in flower buds of *P. ginseng* cultivated in Korea (FPGK) and China (FPGC), and the flower bud of Sanchi ginseng (*P. notoginseng* cultivated in China, FSGC) using high-performance liquid chromatography (HPLC).

To provide the basic information on the components of flower buds in various ginseng types, the content and composition of ginsenosides in the FPGK, FPGC, and FSGC were analyzed by HPLC. Ginsenoside standards were made on the ginseng saponins of ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, and Rh1, the results were directly compared to the standard ginsenosides for confirmation through the HPLC analysis. Total saponin contents of the FPGK, FPGC, and FSGC were  $7.30 \pm 0.11$ ,  $5.44 \pm 0.22$ , and  $5.63 \pm 0.02\%$ , respectively. The ginsenoside Re was found to be a major saponin in the FPGK (3.46%) and FPGC (2.73%). However, the most abundant ginsenoside of FSGC was Rb1 (3.74%). These results indicate that the contents of total saponin and ginsenoside Re were significantly higher in FPGK than those of both FPGC and FSGC, whereas the ginsenoside Rb1 content was significantly higher in FSGC compared with FPGK and FPGC. The ginsenoside Re is a major physiologically activated substance, which promotes the release of adrenocortical hormones and anti-inflammatory effect as a dammarane triterpenoid in the rotopanaxatriol group. On the other hand, the ginsenoside Rb1 is the key physiologically activated saponin of ginseng with suppression effects of the CNS and hypertension.

The ratio of PD/PT was 1.98 in FSGC, higher than 2.5 and 4 times of those of FPGK (0.82) and FPGC (0.47). These data suggest that the differences in the biologically active ginsenoside compositions of the FPGK, FPGC, and FSGC can be attributed to the method of ginseng cultivation and species, which can lead to better sources of ginsenosides for various functional applications. The results of these studies provide basic information about the content of ginsenosides in flower buds of various ginseng including FPGK, FPGC, and FSGC. In conclusion, the flower buds of ginseng showed the possibility of becoming another new material that has physiologically active function for use in food and medicine. We expect the results of this study could be used as a valuable reference for the establishment of a standard for FPGK, FPGC, and FSGC, which can be utilized as alternative source of ginsenosides.

It was confirmed that contain ginseng saponins such as Rb1, Rb2, Rd, Re, Rg1, Rg2 and Rh1. It was also reported that other effects of ginseng flower buds include such

physiologically activating functions as anti gastric ulcer, antiobese, Antisenility, antistress, antiallergic and anticancer effects.

Among others, it was particularly confirmed that ginsenoside Re is contained as much as approximately 3.5%, supposedly to ginsenoside Rg2 by means of biological conversion, hydrolysis and so forth.

Accordingly, the current study proposes to probe into changes in the ginseng saponin composition of ginseng flower buds through ultrasonication treatment for the purpose of developing ginseng flower buds products containing high-concentrated ginsenoside Rg2.

The current study proposes to examine differences with a focus on the pattern of saponin contents by comparing and analyzing the distribution of contents of individual ginsenoside contained in ginseng flower buds added with vinegar, and treated and processed with ultrasonication, a preparation containing high-concentrated ginseng-activated prosapogenins such as ginsenoside Rg2, Rg3, Rg5, Rg6, Rh1 and F4, and basic physiochemical information on the same proposed preparation.

The current study proposes to develop a preparation containing high-concentrated prosapogenin, a ginseng activated ingredient, such as ginsenoside Rg2, Rg3, Rg5, Rg6, Rh1, and F4 and examine differences with a focus on saponin content patterns by comparing and analyzing distribution of contents of individual ginsenoside for the aerial parts of ginseng samples which were added with vinegar, and treated and processed with microwave, and provide their basic physiochemical information.

Ginseng saponins that were subject to our analysis included ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3, Rg5, Rg6, Rh1, Rh4, Rk1, Rk3, F1, and F4, which were directly compared with the samples and confirmed through the HPLC as shown in Fig.1, and the average was statistically treated and calculated. Samples were collected at Eumsng, Choongbuk, Korea, a major ginseng area. A comparative analysis of saponin contents of the samples indicates that MGFB-40 reached 6.079%, MGFB-10 5.9243%, and MGFB-50 5.5528%, respectively, in terms of the quantity of crude saponins in the preparation of ginseng berries processed with microwave and vinegar as shown in Table 1, where crude saponin contents of ginseng berry preparations processed with microwave and vinegar for 10 min were measured as relatively high.

The total saponin content, a sum of each ginsenoside, showed that MGFB-40, MGFB-10 and MGFB-50 stood at 6.079%, 5.9243%, 5.5528% respectively as shown in Table 1, where the total saponin of ginseng flower buds processed with ultrasonication and vinegar for 40 minute showed a high saponin content.

It is known that prosapogenin, an ingredient generated as a result of hydrolysis by heat or acid, has a absorption level better than ginseng saponin glycoside found in the wild, with pharmacological effects reinforced.

MGFB-40, which stood at 5.2832%, peaked in the total amount of prosapogenin (ginsenoside Rg2, Rg3, Rg5, Rg6, Rh1, Rh4, Rk1, Rk3, F1, F4), followed by MGFB-50(5.0789%) and MGFB-10(4.6747%).

In the content of ginsenoside Rg2, featuring wrinkle improving effects in particular, MGFB-40 peaked with 1.4297%, followed by MGFB-10(1.4150%) and MGFB-50(1.3604%).

On the other hand, when it comes to ginsenoside Rg3, which displays cancer prevention, cancer cell growth-resistant, hypotensive, brain cell protection, antithrombotic and antioxidant actions, MGFB-50 peaked with 1.1766%, followed by MGFB-40(1.1522%) and MGFB-60(1.0275%). However, no ginsenoside Rg3 was found in ginseng flower buds extracts.

Ginsenoside Re is a protopanaxatriol-type saponin isolated from *Panax ginseng* flower buds. Although anti-diabetic and anti-hyperlipidemic effects of Re have been reported by several groups, its mechanism of action is largely unknown until now. Here, we examine anti-diabetic and anti-hyperlipidemic activities of Re and action mechanism(s) in human HepG2 hepatocytes and high-fat diet fed C57BL/6J mice. Re suppresses the hepatic glucose production via induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner (SHP), and inhibits lipogenesis via suppression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and its target gene [fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1)] transcription. These effects were mediated through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), and abolished when HepG2 cells were treated with an AMPK inhibitor, Compound C. C57BL/6J mice were randomly divided into five groups: regular diet fed group (RD), high-fat diet fed group (HFD) and the HFD plus Re (5, 10, 20 mg/kg) groups. Re treatment groups were fed a high-fat diet for 6 weeks, and then orally administered Re once a day for 3 weeks. The *in vitro* results are likely to hold true in an *in vivo* experiment, as Re markedly lowered blood glucose and triglyceride levels and protected against hepatic steatosis in high-fat diet fed C57BL/6J mice. In conclusion, the current study suggest that ginsenoside Re improves hyperglycemia and hyperlipidemia through activation of AMPK, and confers beneficial effects on type 2 diabetic patients with insulin resistance and dyslipidemia.

The isopropylalcohol fraction of ginseng flower buds promotes collagen synthesis at low concentrations on not treated with UV. MMP1 was significantly reduced at 0.025, 0.05% concentrations on Hs68 cell. Therefore, the isopropylalcohol fraction of ginseng flower buds is considered that anti-wrinkle effect appeared by MMP1 inhibition and collagen biosynthesis.

## CONTENTS

chapter I	A summary of research and development -----	11
chapter II	The present state of technical development on the inside and outside of the country -----	13
chapter III	Results and contents of research and development -----	16
chapter IV	Achievement of a target and contribution of relation fields -----	157
chapter V	Application plan on results of research and development -----	159
chapter VI	Science technology information of foreign countries was achieved from research and development -----	164
chapter VII	Status of research facilities, equipment -----	169
chapter VII	Reference -----	170

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	11
	* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술	
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	13
	* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술	
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	16
	* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술	
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	157
	* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술	
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	159
	* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)	
	* 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등	
	* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등	
	* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등	
	* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함	
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	164
제 7 장	연구시설·장비 현황 -----	169
	* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술	
제 8 장	참고문헌 -----	170
	* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거	

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구목표 및 필요성

○ 지금까지의 인삼 연구개발은 주로 지하부(뿌리)에 대하여 진행되어 왔고, 이에 대한 논문만 도 약 2000여편에 이르고 있으나, 인삼 재배부산 폐기물인 인삼 지상부에 대한 연구개발은 체계적으로 이루어지고 있지 않고 있음.

○ 특히, 인삼사포닌으로서 생리활성성분인 진세노사이드 Re가 4%로 고농도로 함유하고 있는 인삼 화퇴에 대한 성분 규격 및 유효성 시험을 통하여 기능성 식품 및 화장품 신소재 및 제품을 개발하고자 함.

○ 인삼 화퇴 등 인삼지상부는 현재, 현행법(건강기능식품, 식품위생법)에서는 인삼류 건강기능식품 및 식품으로는 사용허가되지 않기 때문에, 본 연구를 바탕으로 인삼화퇴 엑스는 별규 건강기능식품(간기능개선)으로 개발하고자 하며, 초음파 처리 인삼화퇴 엑스는 Rg2, F4 고농도 함유 주름개선 기능성화장품으로 개발하고자 함.

## 제 2 절 연구내용 및 범위

인삼 화퇴에 대한 소재 개발(분리, 생물전환 최적화) 및 유효성(간기능 개선, 숙취 개선, 아토피 피부염) 검토를 통하여 기능성 식품 및 화장품 신소재 및 제품을 개발하고자 아래와 같은 연구를 실시함.

(1차년도)

- 인삼 화퇴의 성분 분리 및 가공 조건(ginsenoside Rg2, Rh1, F1, protopanaxatriol 1% 이상 고농도 함유) 최적화
- 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 간기능 개선시험
- 액상 소재화 가공
- 인삼 화퇴 대량 수집 및 원료 자원 조사

(2차년도)

- 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 항알레르기 시험
- 인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체의 간기능개선시험
- 적정 부재료 선정 및 최종 배합시험
- 소재 분석법 연구
- 인삼화퇴 및 세척 인삼화퇴의 잔류농약 시험

(3차년도)

- 인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체 주름 개선 전임상 시험
- 인삼 화퇴 가공물의 주름 개선 임상시험
- 시제품 제작



- 제조공정 최적화 및 안정성 연구

## 제 3 절 연구개발에 대한 기대성과

### 1. 기술적 측면

- 인삼 화퇴 천연물 기능성분의 분리, 정제 및 생산에 관한 기술을 확보
- 현재 인삼의 면역력증강 및 피로회복에 제한되어 있는 기능성내용을 각 기능성 지표물질을 신소재화하여 피부 보습 및 피부장벽기능개선, 간기능 개선, 숙취개선 물질 등으로 신소재 개발에 기여
- 현장 애로기술의 해결과 공정표준으로 생산성, 안전성, 기술성 향상을 도모함.

### 2. 경제·산업적 측면

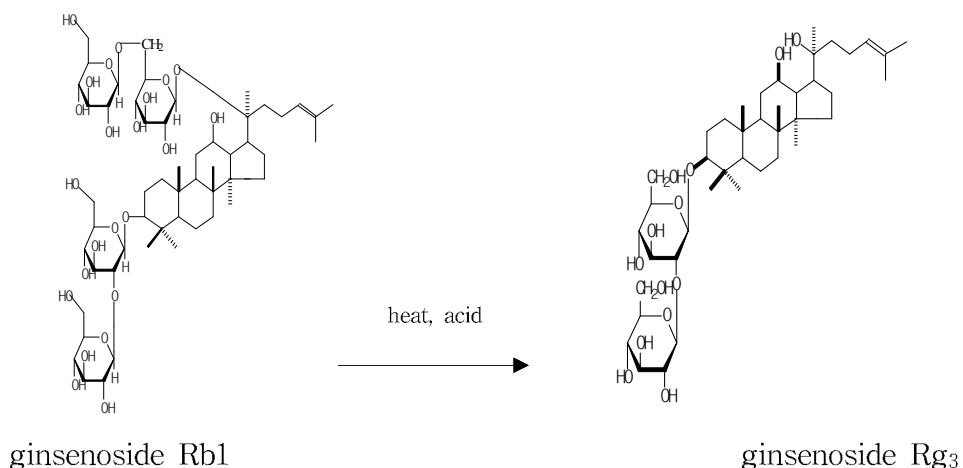
- 인삼 화퇴의 특유성분을 분석하고, 생리활성물질을 확인함으로써 새로운 기능성 강화의 인삼제품을 소재원료로 개발하여 대기업 제품생산업체에 제공함으로써 인삼산업의 혁신적 발전에 기여
- 인삼 화퇴 천연물 약리기능성분의 분리, 정제 및 생산에 관한 원천기술 확보하여 신제품의 내수 및 수출을 통한 경제적 효과 기대
- 식품산업의 발전을 위한 건강기능식품법이 공표된 이래 건강기능식품시장이 확대. 안정화 단계에 진입하고, 현대인의 생명연장으로 인한 노인연령대의 급증, 건강한 삶을 추구하는 현대인의 삶의 형태에서 기능성 신소재 개발은 중요한 요소임.

### 3. 활용방안(사업화 방안)

- 인삼 화퇴에 대한 생리활성물질을 확인하고, 생리활성 성분 및 흑삼 특유성분을 탐색한 뒤 원료 및 제품의 개발.
- 특정 유효 인삼 화퇴 사포닌 성분이 함유된 기능성 화장품 및 건강기능식품의 개별 인정형 원료를 소재로한 건강기능식품 및 일반 특수영양식품 제품화
- 인삼 화퇴 소재에 대한 가공 제조공정을 최적화
- 인삼 화퇴 특유 생리활성 성분 고농도 함유제제를 개발하고 산업화
- 현재의 면역력증강 및 피로회복에 제한되어 있는 기능성내용을 각 기능성 지표물질을 신소재화하여 피부 보습 및 피부장벽기능개선, 간기능 개선, 숙취개선 물질 등으로 신소재 개발에 기여

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 고부가가치 기능성 강화 인삼제품을 개발하기 위해서는 강력한 생리활성을 나타내는 특정 성분을 고농도로 함유하게 하는 가공기술과 이와 관련한 생리활성소재의 유효성을 입증한 기능성제품을 개발해야함.
- 인삼 함유 성분에 있어서 수삼 및 백삼에는 인삼사포닌 배당체(ginsenoside Ra, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub> 등)가 함유되어 있음.
- 인삼사포닌 배당체는 동맥경화 및 고혈압의 예방, 위 및 간기능 촉진 및 숙취 제거 효과, 항피로 및 항스트레스 작용, 노화방지 작용, 두뇌활동 촉진 작용, 항당뇨작용 등이 보고되어 있음.
- 홍삼은 수삼 즉 밭에서 채굴한 생삼을 수증기로 찌서 건조한 것을 말함. 찌때 열에 의해서 가수분해가 일어나 사환성 triterpenoid인 Dammarane 기본구조에서 일부분의 당이 유리되어 prosapogenin type의 ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rh<sub>2</sub>, Rh<sub>4</sub>등의 Artifact 즉 홍삼특유성분이 생성됨.
- 인삼 prosapogenin 즉 홍삼특유성분(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>2</sub>)은 암전이 억제활성, 항종양 작용, 혈압강하, 항산화, 항당뇨, 뇌인지개선 등의 생리활성이 국제저널에 보고됨으로서 기능성 물질로서 세계적인 주목을 받고 있음.
- 이와 같은 인삼 prosapogenin을 고농도로 함유한 제제를 개발하기 위한 생명공학적인 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 서울대학교의 박판기 등은 열과 압력을 가하는 물리적인 방법에 의해 인삼사포닌 배당체(ginsenosides)의 당기를 일부분 가수분해하여 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>)을 높은 농도로 함유하는 인삼제품(선삼)을 개발하여 현재 시판 중임.



### Transformation of protopanaxadiol saponin ginsenoside Rb<sub>1</sub> to ginsenoside Rg<sub>3</sub>

- 한편, (주) 일화와 (주) 원광제약은 장내미생물이 분비하는 효소를 이용하여 효소 가수분해를 유도하여 얻어지는 인삼 prosapogenin(IH-901, Compound K)을 높은 농도로 함유하는 인삼 식품(락토진생, 효삼)을 개발하여 현재 시판 중임.
- 그러나, 본 연구팀은 안전성에 커다란 문제가 없는 초음파와 식용 양조식초를 이용하여 인삼

prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rk<sub>1</sub>)을 고농도로 함유하는 인삼제제와 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>4</sub>)를 고농도로 함유하는 인삼 지상부 조성물을 천연물화학적 접근방법을 통하여 개발하여 국내특허(국내특허 출원번호: 10-2011-0141997, 10-2011-0141998, 10-2011-0141999, 10-2011-0142000, 출원일 : 2011년 12월 26일)를 출원하였음.

○ 이와 같은 발명은 현재 개발된 어떤 방법보다 수율이 높고, 빠른 시간에 간단히 인삼 prosapogenin을 대량으로 생산할 수 있는 방법으로 산업계에 활용가치가 매우 높음.

○ 특히, 공지의 사실인 인삼사포닌 배당체(ginsenoside Rb<sub>2</sub>, Re)의 항당뇨작용, 뇌인지개선작용, 암예방작용, 간기능개선과 관련하여 기능성식품 개발을 위한 보다 체계적인 접근의 연구개발이 필요함.

○ 이와 같이 인삼의 주요 약리 성분으로 알려진 인삼사포닌(ginsenosides)을 물리·화학·생물학적 공정을 적용하여 특정 ginsenoside의 함량을 증가시키는 연구는 국내·외적으로 많은 연구가 이미 진행.

○ 그러므로 인삼에 함유된 다양한 생리활성 물질들의 함량 패턴을 조절하여 특정 효능을 강화할 수 있는 제어 기술 필요.

○ 인삼화퇴는 인삼뿌리를 굵게 하기위하여 채종용(5%) 만 제외하고 따서 폐기하는데, 인삼재 배면적 평당 150 g의 인삼화퇴가 생산되어 연간 10,000톤 가량 폐기되고 있음.



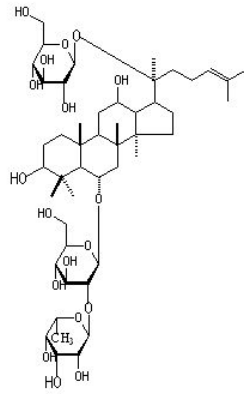
**Fig. 1. Figure of Ginseng Flower buds**

○ 인삼화퇴에는 항산화, 항백혈병, 위장보호 작용 등 생리활성이 확인되었고, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub> 뿐만 아니라, floralginsenosides Ka, Kb, Kc, vinaginsenoside R, majoroside F, ginsenoside I, II, III, floralginsenosides Ta, Tb, Tc, Td, floralginsenosides A, B, C, D, E, F, floralginsenosides M, N, O, P 등의 성분이 분리 보고되었음.

○ 또한, ginsenoside Re 가 약 3.388%의 높은 농도로 존재하는 것을 본 연구팀(1협동)이 확인하였음. [J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.(SCIE) 54(1), 154-157, 2011]

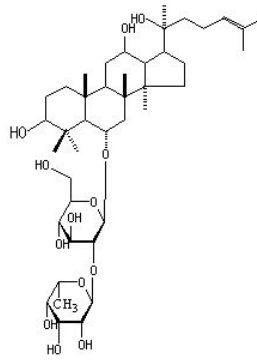
○ 인삼화퇴의 ginsenoside Re 는 물리화학적 가공에 의해서 ginsenoside Rg<sub>2</sub> 등 활성 사포닌으로 전환될 수 있으며, 본 연구팀(1협동)은 ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>4</sub> 등 기능성 성분 강화 조성물을 초음파 처리를 이용하여 개발하여 특허를 출원하였음. [초음파 처리를 이용한 인삼 프로사포게닌 고농도 함유 인삼화퇴 제제 및 이의 제조방법 (출원번호 : 10-2011-0142000), 출원일 : 2011년 12월 26일]

Saponin glycoside



Ginsenoside Re

prosapogenin



Ginsenoside Rg2

Treatment  
(acid, heat)

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발 목표와 내용

- 지금까지의 인삼 연구개발은 주로 지하부(뿌리)에 대하여 진행되어 왔고, 이에 대한 논문만 도 약 2000여편에 이르고 있으나, 인삼 재배부산물 폐기물인 인삼 지상부에 대한 연구개발은 체계적으로 이루어지고 있지 않고 있음.
- 특히, 인삼사포닌으로서 생리활성성분인 진세노사이드 Re가 4%로 고농도로 함유하고 있는 인삼 화퇴에 대한 성분 규격 및 유효성 시험을 통하여 기능성 식품 및 화장품 신소재 및 제품을 개발하고자 함.
- 인삼 화퇴 등 인삼지상부는 현재, 현행법(건강기능식품, 식품위생법)에서는 인삼류 건강기능식품 및 식품으로는 사용허가되지 않기 때문에, 본 연구를 바탕으로 인삼화퇴 엑스는 별규 건강기능식품(간기능개선)으로 개발하고자 하며, 초음파 처리 인삼화퇴 엑스는 Rg2, F4 고농도 함유 주름개선 기능성화장품으로 개발하고자 함.

### 2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연도		연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2010	세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 성분 대량 분리 (ginsenoside Re 분리) 및 가공 조건 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 인삼 화퇴 추출물의 Ether 처리 등 전처리</li> <li>◦ 인삼 화퇴 추출물의 Diaion Column 흡착</li> <li>◦ 사포닌 분획의 Silica gel Column 분리</li> <li>◦ 사포닌 분획의 C18 Column 분리</li> <li>◦ Preb-LC 성분 분리</li> <li>◦ HPCPC 성분 분리</li> <li>◦ 사포닌의 분광학적 구조 분석</li> <li>◦ 최적 발효 조건 탐색</li> <li>◦ 대체체 고농도 함유 조성물 개발</li> <li>◦ 산처리 가공조건 탐색</li> </ul>
		1협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 전임상시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 간기능 개선 시험</li> </ul>
		2협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 소재화 가공</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 적정 유효성분 추출</li> <li>◦ 여과 및 적정 전처리 공정 확립</li> <li>◦ 액상 소재화 위한 적정 농축공정 확립</li> </ul>
		3협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 원료 수집 및 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 인삼 화퇴 대량 수집</li> <li>◦ 원료 자원 조사</li> </ul>

2차 년도	2011	세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 항알레르기 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>인삼 화퇴의 항알레르기 시험</li> <li>ginsenoside Re의 항알레르기 시험</li> <li>잔류농약검사</li> </ul>
		1협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체의 기능개선시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ginsenoside Rg2 고농도 함유 제제의 숙취 개선시험</li> <li>ginsenoside Rg2 고농도 함유 제제의 간기능 개선시험</li> </ul>
		2협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>적정 부재료 선정 및 배합 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>적정 부형제 선정</li> <li>적정 감미제 선정</li> <li>적정 산미료 선정</li> <li>Panel discussion 방식에 의한 배합비 결정</li> </ul>
		3협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료 표준화 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료 추출 및 제조법 연구</li> <li>분석법 베리데이션</li> </ul>

3차 년도	2012	세부	<ul style="list-style-type: none"> <li>인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체 주름개선 전임상 시험(세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>주름개선 전임상시험(콜라겐 시험)</li> </ul>
		1협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>인삼 화퇴 가공물의 주름 개선 임상시험(위탁)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>피부장벽 회복에 대한 유효성 평가(주름 개선 효과 평가, 주름평가, 설문평가, 피부자극평가)</li> </ul>
		2협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>시제품 제작 및 대량 생산공정 검토(2협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>적정 살균공정 확립</li> <li>액상시제품 제작</li> <li>대량 생산위한 소재화 공정 검토</li> <li>대량 배합 공정 검토 (액상 시제품)</li> </ul>
		3협동	<ul style="list-style-type: none"> <li>제조공정 최적화(3협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>소재 분석법 연구(HPLC 법)</li> <li>안정성 연구</li> </ul>

## 2. 연구개발 방법 및 설계

### 가. 제1세부과제 - 신소재 개발 및 항알레르기 및 주름개선 효력시험

	연구개발의 목표	연구개발 방법 및 설계
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>성분 대량 분리 (ginsenoside Re 분리) 및 및 가공 조건 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>인삼 화퇴 추출물의 Ether 처리 등 전처리</li> <li>인삼 화퇴 추출물의 Diaion Column 흡착</li> <li>사포닌 분획의 Silica gel Column 분리</li> <li>사포닌 분획의 C18 Column 분리</li> <li>Preb-LC 성분 분리</li> <li>HPCPC 성분 분리</li> <li>사포닌의 분광학적 구조 분석</li> <li>최적 발효 조건 탐색</li> <li>대사체 고농도 함유 조성물 개발</li> </ul>

		◦ 산처리 가공조건 탐색
2차년도	◦ 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 항알레르기 시험	인삼 화퇴의 항알레르기 시험 ginsenoside Re의 항알레르기 시험 잔류농약검사
3차년도	◦ 인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체 주름개선 전임상 시험(세부)	◦ 주름개선 전임상시험(콜라겐 시험)

나. 제1위탁과제 - 주름개선 임상시험

	연구개발의 목표	연구개발 방법 및 설계
3차년도	◦ 인삼 화퇴 가공물의 주름 개선 임상시험	◦ 피부장벽 회복에 대한 유효성 평가(주름 개선 효과 평가, 주름평가 설문평가, 피부자극평가)

다. 제1협동과제 - 간기능개선 효력시험

	연구개발의 목표	연구개발 방법 및 설계
1차년도	◦ 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 전임상시험	◦ 간기능 개선 시험
2차년도	◦ 인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체의 간기능개선시험	ginsenoside Rg2 고농도 함유 제제의 숙취 개선시험 ginsenoside Rg2 고농도 함유 제제의 간기능 개선시험

라. 제2협동과제 : 소재화 가공 및 시제품 제작

	연구개발의 목표	연구개발 방법 및 설계
1차년도	◦ 소재화 가공	◦ 적정 유효성분 추출 ◦ 여과 및 적정 전처리 공정 확립 ◦ 액상 소재화 위한 적정 농축공정 확립
2차년도	◦ 적정 부재료 선정 및 배합시험	적정 부형제 선정 적정 감미제 선정 적정 산미료 선정 Panel discussion 방식에 의한 배합비 결정
3차년도	◦ 시제품 제작 및 대량 생산 공정 검토 (협동)	◦ 적정 살균공정 확립 ◦ 액상시제품 제작 ◦ 대량 생산위한 소재화 공정 검토 ◦ 대량 배합 공정 검토 (액상 시제품)

마. 제3협동과제 - 표준화 및 제조공정 최적화

	연구개발의 목표	연구개발 방법 및 설계
1차년도	◦ 원료 수집 및 조사	◦ 인삼 화퇴 대량 수집 ◦ 원료 자원 조사
2차년도	◦ 원료 표준화 연구	원료 추출 및 제조법 연구 분석법 베리데이션
3차년도	◦ 제조공정 최적화(3협동)	◦ 소재 분석법 연구(HPLC 법) ◦ 안정성 연구



## 제 2 절 신소재 개발 및 항알레르기 및 주름개선 효력시험

### 1. 성분 대량 분리 (ginsenoside Re 분리) 및 가공 조건 최적화

#### 가. 인삼 화퇴의 인삼사포닌 분리 및 동정

##### (1) 실험 재료 및 엑스의 조제

###### (가) 실험 재료

본 연구에 사용한 고려 인삼 화퇴(*Panax ginseng*)는 한국 충북 음성에서 재배(재배자, 남성업) 5년생 인삼의 열매를 2010년 5월 14일에 채집하였다. 제품표본은 세명대학교 한방식품연구실에 보관하고 있다. (Fig. 1.)



Fig. 1. Figure of ginseng flower buds

###### (나) 엑스의 조제

위의 시료를 세말하였고 시료 5kg을 인삼 화퇴를 약 65℃에서 95% ethyl alcohol (6L)로 2시간씩 2회 추출하여 여액을 모아 감압 농축하여 동결건조하여 95% EtOH 엑스 1080g을 얻었다. (scheme. 1.)

##### (2) 인삼 화퇴로부터 주 사포닌의 분리

###### (가) 인삼 화퇴로부터 사포닌 분획의 추출

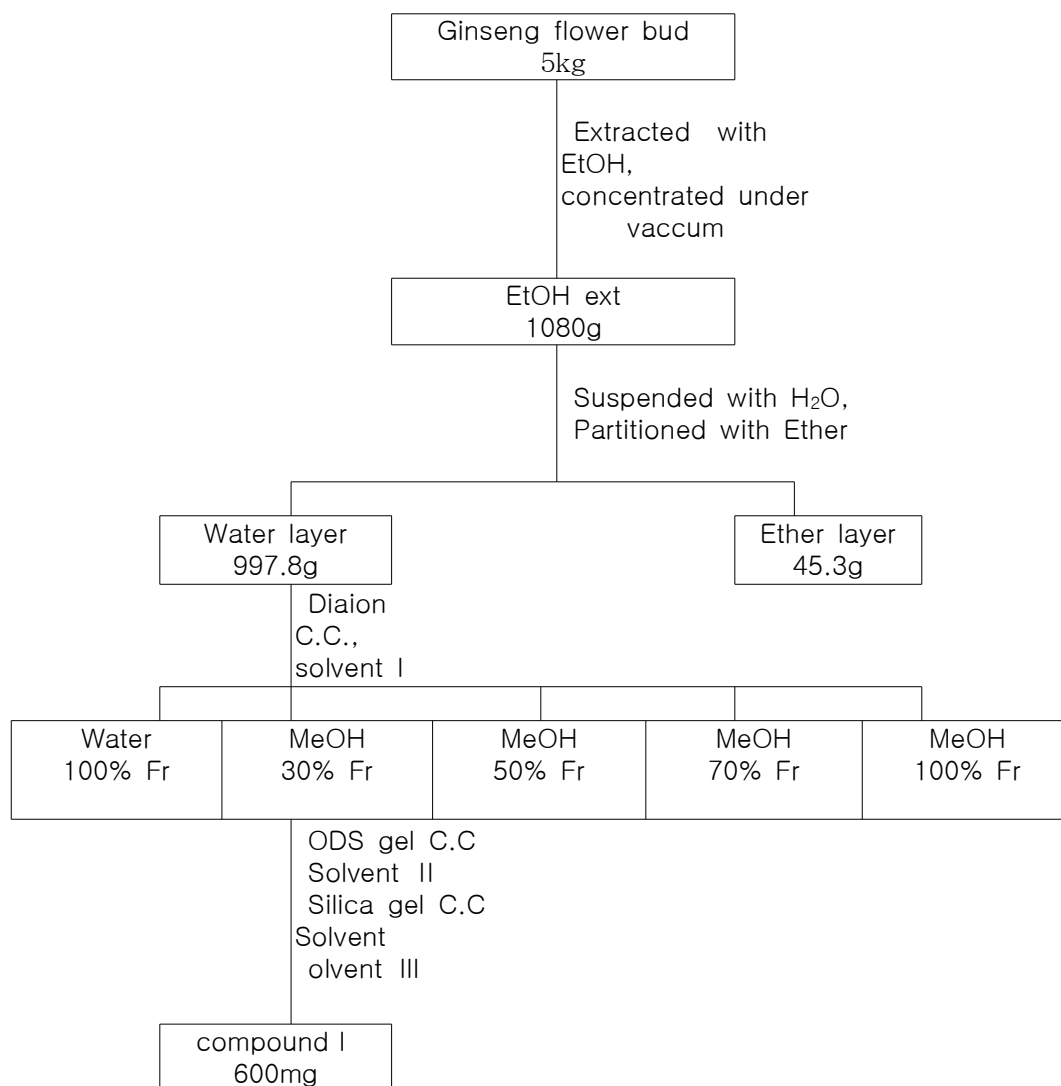
인삼 화퇴 95% EtOH 엑스 1080g을 증류수에 현탁하여 분획 깔때기에 넣고 Diethyl Ether넣어 shaking 하여 진탕하고 방치한 후 Ether를 제거한다. 이 방법을 10회 처리하여 Diethyl Ether 분획(45g), 물 분획(998g)을 얻었다.

표본은 세명대학교 한방식품영양학과에 보관하고 있다.

###### (나) 인삼 화퇴로부터 사포닌 분획과 Compound I (ginsenoside Re)의 분리

위의 수가용성 분획을 증류수에 현탁하여 Diaion column에 흡착시킨 후 30% methanol 분획, 50% methanol 분획, 70% methanol 분획, 100% methanol 분획을 하였고, 30% methanol 분획

10g을 ODS gel column에 로딩하여 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH, 100% MeOH 순차적으로 치환하면서 전개하여 F1~F4를 얻었다. 위에서 얻은 F3로 silica gel column에 전개 용매 [CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 70:30:4 v/v]로 로딩하여 0.6g Compound I (ginsenoside Re)를 얻었다. (scheme. 1.)



**Scheme 1. Extraction and Isolation ginsenoside Re from ginseng flower buds**

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

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

\*Solvent III : CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 70:30:4 v/v

## 출원번호통지서

출원일자 2011.06.15  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2011-0057835 (접수번호 1-1-2011-0451022-22)  
출원인명칭 경희대학교 산학협력단(2-2004-007362-3) 외 1명  
대리인성명 안소영(9-2000-000155-5)  
발명자성명 정성현 고성권  
발명의명칭 알코올성 간손상 내지 알코올성 지방간 예방 및 숙취해소 효과를 갖는 조성물

## 특 허 청 장

위와 같은 연구를 바탕으로 특허(알코올성 간손상 내지 알코올성 지방간 예방 및 숙취해소 효과를 갖는 조성물, 출원번호 10-2011-0057835, 출원일 2011년 6월 15일)를 출원하였다. 또한, 본 연구에서 제시한 성분 분리 방법에서 전처리 방법(sonicator 사용)의 수정과 대형 컬럼(직경 20cm 길이 1m)을 제작 사용하여 대량 분리를 시도하고 있다.



### (3) 인삼 화퇴로부터 주 사포닌의 화학구조 동정

#### (가) 기기 및 조건

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

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

FAB-MS : JEOL JMS-700 D

#### (나) Compound I의 단리 및 물리 화학적 성상

<sup>13</sup>C-NMR : DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm (Table. 3, Fig. 6. )

<sup>1</sup>H-NMR :(Fig. 5.)

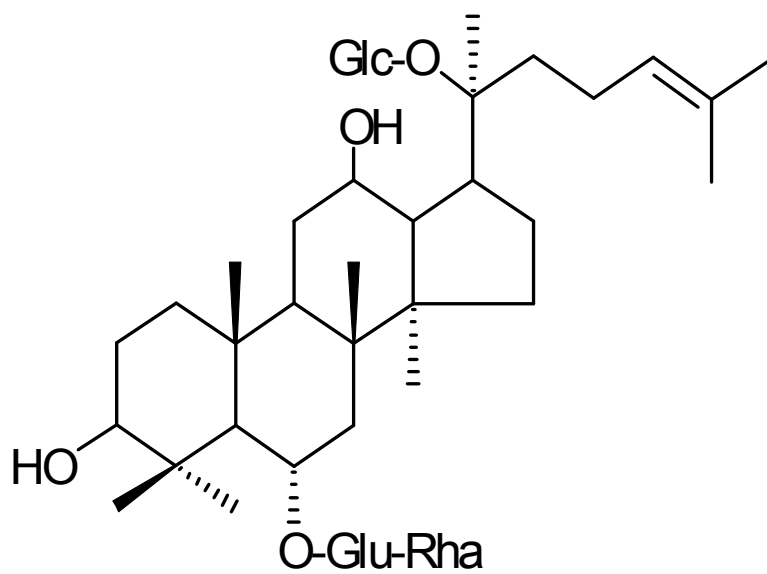
FAB-MS (m/z) :(Table. 2, Fig. 6-7.)

#### (다) 화학구조 동정

Compound I의 TLC Rf값은 0.5(CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 65 : 35 : 8/kieselgel 60 F254 Merk)이고(Fig. 5.), UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 붉은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며,(Fig.5.) High resolution MS에서 molecular negative 값이 945.54에서 나타났으며, positive값은 969.54가 나왔다.(Table. 2, Fig. 6-7.) <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 0.95ppm으로부터 δ 2.11ppm까지 8개의 methyl singnal이 나타나고 있으며, δ 3.473ppm에서의 doublet은 H-3의 anomeric proton이고, δ 3.856과 δ 4.436에서의 doublet은 당으로부터 기인하는 singnal로 나타났으며, δ 4.10의 singnal은 H-12의 singnal임을 알수있고, δ 5.25의 singnal은 H-24의 olefinic signal임을 알 수 있었다.(Fig. 5.)

<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 C-24와 C-25가 124.56ppm과 129.49ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 C-1'''가 96.86ppm에서 확인되었고, C-3는 77.19ppm에서 확인되었다. (Table. 1, Fig. 4. )이러한 결과들은 인삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 (20S)-ginsenoside Re의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, Compound I을 (20S)-ginsenoside Re로 동정하였다.

Fig. 2. Chemical structures of compound I.



compound I : 20(S)- ginsenoside-Re

\*rha :  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl    glc :  $\beta$ -D-glucopyranosyl

Fig. 3.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of compound I ( $\text{d}_5$ -Py)

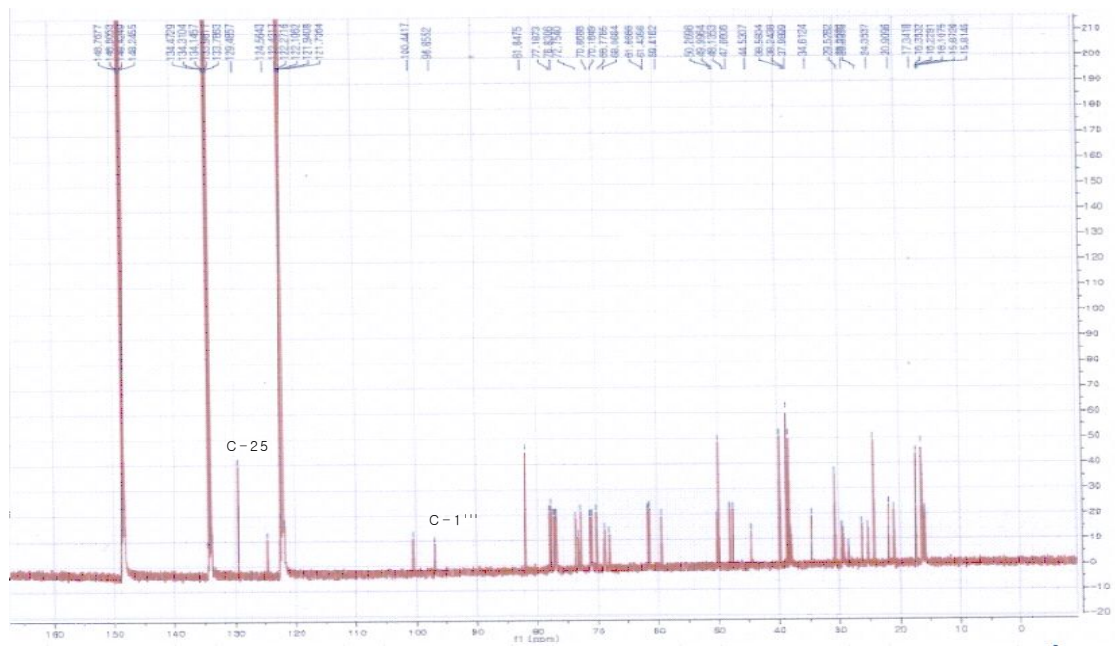


Fig. 4.  $^1\text{H}$ -NMR spectra of compound I ( $\text{d}_5$ -Py)

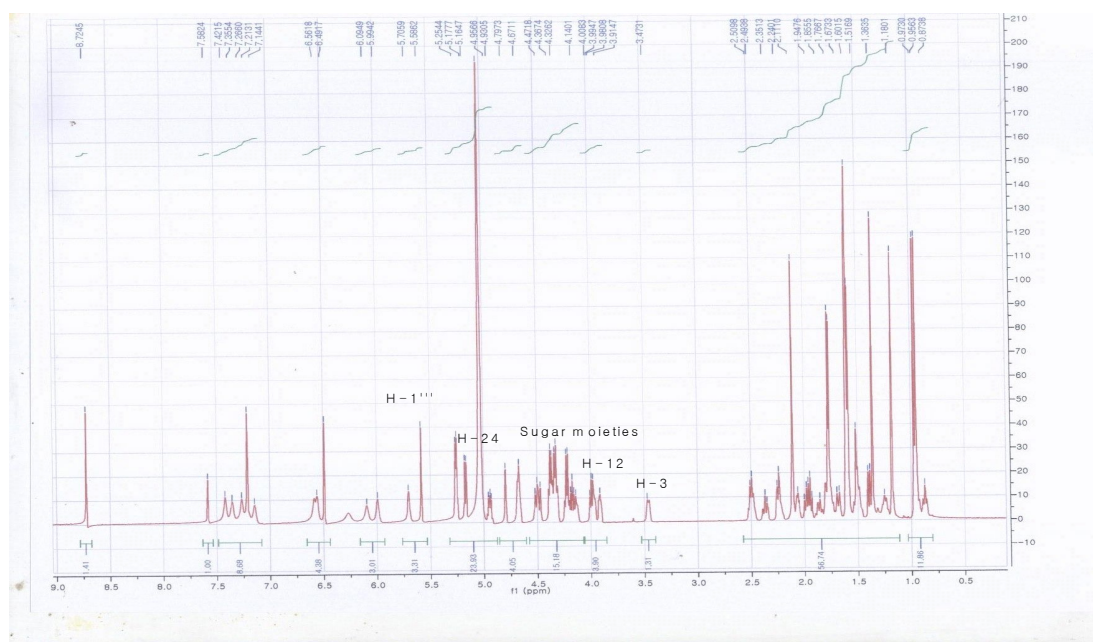


Table. 1. Chemical shifts of ginsenosides in  $^{13}\text{C}$ -NMR

Carbon No.	G-Re	Compound I
C-1	39.43	38.24
C-2	27.50	26.34
C-3	78.35	77.19
C-4	39.77	38.58
C-5	61.52	61.43
C-6	74.33	73.17
C-7	45.75	44.53
C-8	40.96	39.78
C-9	49.32	48.14
C-10	39.17	37.98
C-11	60.60	59.41
C-12	70.04	68.77
C-13	48.80	47.66
C-14	51.20	50.00
C-15	30.61	29.33
C-16	26.42	25.22
C-17	51.52	50.27
C-18	17.32	16.10
C-19	17.46	16.22
C-20	83.08	81.85
C-21	22.15	20.90
C-22	35.77	34.61
C-23	23.26	21.82
C-24	125.75	124.56
C-25	130.74	129.49
C-26	25.60	24.35
C-27	17.59	16.35
C-28	31.99	29.53
C-29	17.06	15.87
C-30	17.00	15.81
20-Glc 1	98.06	96.86
20-Glc 2	74.95	73.75
20-Glc 3	78.94	77.80
20-Glc 4	71.28	70.19
20-Glc 5	78.20	76.98
20-Glc 6	62.55	61.43
6-Glc 1	101.63	100.442
6-Glc 2	79.18	77.99
6-Glc 3	78.13	76.90
6-Glc 4	72.05	70.87
6-Glc 5	78.06	76.83
6-Glc 6	62.82	61.66
-Rha 1	101.69	100.441
-Rha 2	72.32	71.16
-Rha 3	72.21	71.01
-Rha 4	73.91	72.75
-Rha 5	69.26	68.06
-Rha 6	18.55	17.34

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

-Rha:  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl

Fig. 5. FAB-MS of compound I (ginsenoside Re)

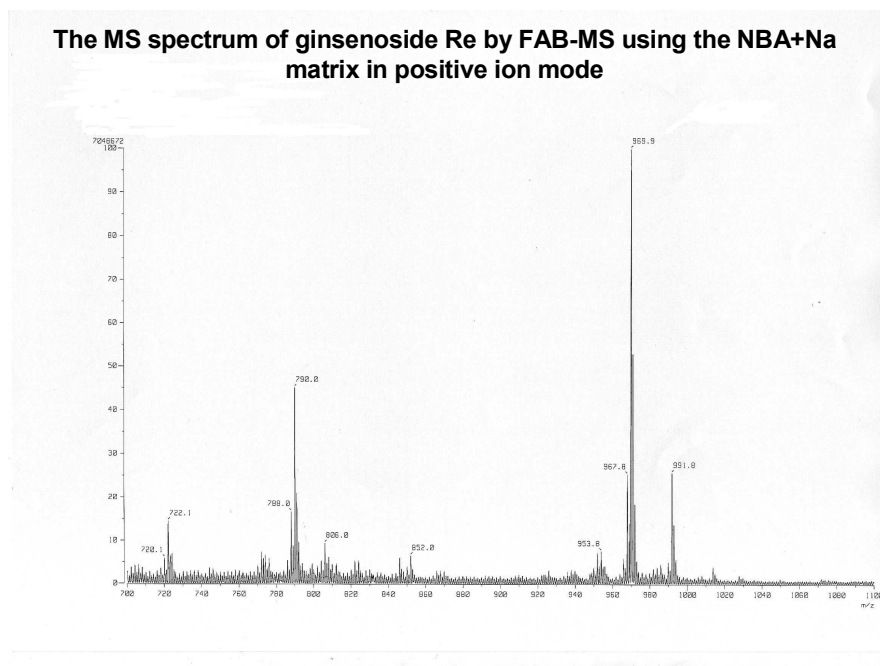


Fig. 6. FAB-MS of compound I (ginsenoside Re)

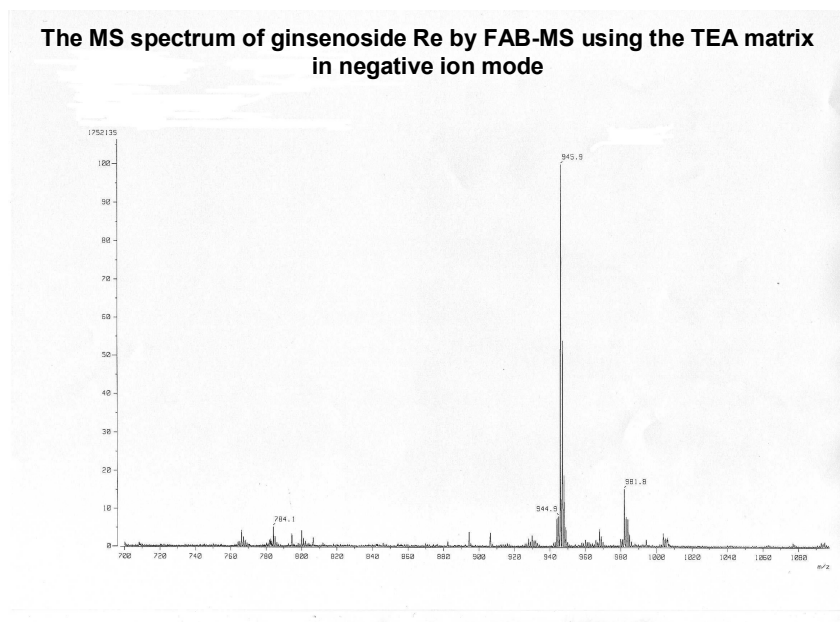




Table. 2. The High resolution MS data of the ginsenoside Re

Sample name	Mode	Matrix	Chemical formula	Exact mass	Observed mass	Error (*mmu)
Ginsenoside Re	negative	Tri-ethyl amine (TEA)	C <sub>48</sub> H <sub>81</sub> O <sub>18</sub>	945.5423	945.5430	+0.7
	positive	3-nitrobenzyl alcohol+Na (NBA+Na)	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub> Na	969.5399	969.5421	+2.2

## 2. 가공조건 최적화(Ginsenoside Rg2 고농도 함유 조성물 개발)

### 가. 실험재료

본 연구에 사용한 인삼화뢰(Ginseng Fros, Flower bud of *Panax ginseng*)는 충청북도 음성에서 2010년 5월 14일에 5년근 인삼화뢰 10kg를 채집하였고, 건조는 음성의 충북인삼영농조합법인(대표 : 남성엽)에서 시행하였다.

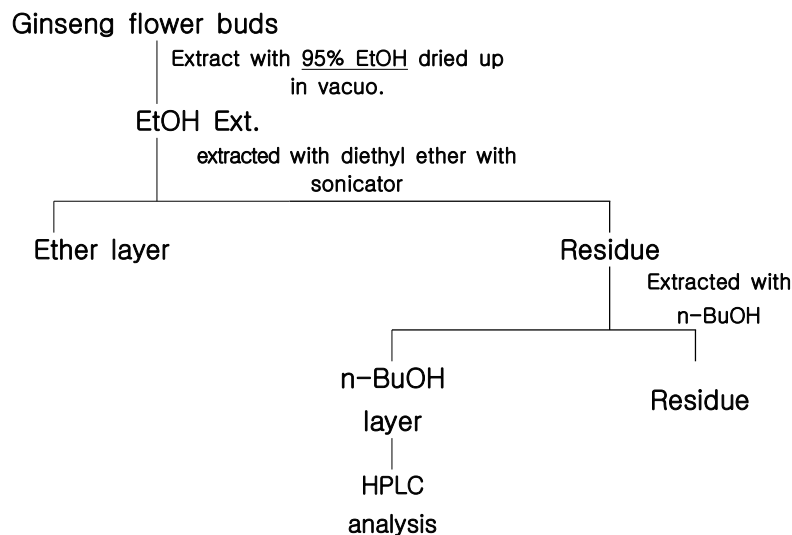
얻은 시료를 대상으로 조건별 초음파 처리 후, 인삼의 사포닌함량을 비교 검토하였다. 각각의 제품표본은 세명대학교 한방식품영양학부에 보관하고 있다.

### 나. 인삼화뢰 초음파 처리 조성물 조제

인삼화뢰 건조물 각각 200g에 Ethyl alcohol 2,000ml를 가하여 2회 환류 추출후 여과하여 감압농축하여 Ethyl alcohol 엑스를 얻었다. 얻은 에탄올 엑스 1g에 2배식초 200ml를 가하여 ultrasonicator(고도기연, 한국)에 넣고, 100℃에서 10, 20, 30, 40, 50, 그리고 60분씩 초음파 처리를 각각 1회씩 시행하였다.

### 다. 조사포닌(crude saponin) 조제

Scheme. 1에서 보는바와 같이 초음파 처리 체제 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.



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)를 사용하였다.

이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 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  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

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

Flower bud of <i>Panax ginseng</i> <sup>a)</sup>	Time	0	20	38	85	95	105	115	125	130	140
	%A	17	25	42	60	80	80	100	100	17	17

1) Mobile phase :

Solvent A - ACN

Solvent B - water

2) Flow rate : 0.8 ml/min

3) Column : a - Eurospher 100-5 C18P (Knauer, 3×250mm, Germany), b - Eurospher 100-5 C18 (Knauer, 3×250mm, Germany)

4) Detector : Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.)

## 마. 결과 및 고찰

Table 3에서와 같이 조 사포닌의 양에 있어서 MGFB-10이 37.89%이었으며 MGFB-60은 37.86%이었으며, MGFB-30은 36.61%로서 초음파 10분 처리 인삼화퇴 제제의 조 사포닌 함량이 높게 측정되었다.

각 ginsenoside의 총합인 총 사포닌(total saponin) 함량에 있어서는 Table 4에서 보는 바와 같이 MGFB-40이 6.079%이었으며 MGFB-10은 5.9243%이었으며, MGFB-50는 5.5528%로서 초음파 40분 처리 인삼화퇴 제제의 총 사포닌이 높은 함량을 보여주었다.

Prosapogenin의 총량에 있어서는 MGFB-40이 5.2832%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, MGFB-50(5.0789%), MGFB-10(4.6747%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

Ginsenoside Rg<sub>2</sub>의 함량에 있어서는 MGFB-40이 1.4297%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, MGFB-10(1.4150%), MGFB-50(1.3604%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

Ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 경우, MGFB-50가 1.1766%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, MGFB-40(1.1522%), MGFB-60(1.0275%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 반면에 인삼화퇴 엑스(MGFB)에는 ginsenoside Rg<sub>3</sub>가 함유되어 있지 않았다.

또다른 열 가수분해물인 Ginsenoside Rg<sub>5</sub>의 경우, MGFB-50가 0.4615%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, MGFB-40(0.4286%), MGFB-60(0.3546%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 반면에 인삼화퇴 엑스(MGFB)에는 ginsenoside Rg<sub>5</sub>가 함유되어 있지 않았다.

Ginsenoside Rg<sub>6</sub>의 경우, MGFB-40이 0.2532%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, MGFB-50(0.2522%), MGFB-60(0.2032%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 반면에 인삼화퇴 엑스(MGFB)에는 ginsenoside Rg<sub>6</sub>가 함유되어 있지 않았다.

Ginsenoside Rh<sub>1</sub>에 있어서는 MGFB-40이 0.8465%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, MGFB-50(0.7873%), MGFB-60(0.7298%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

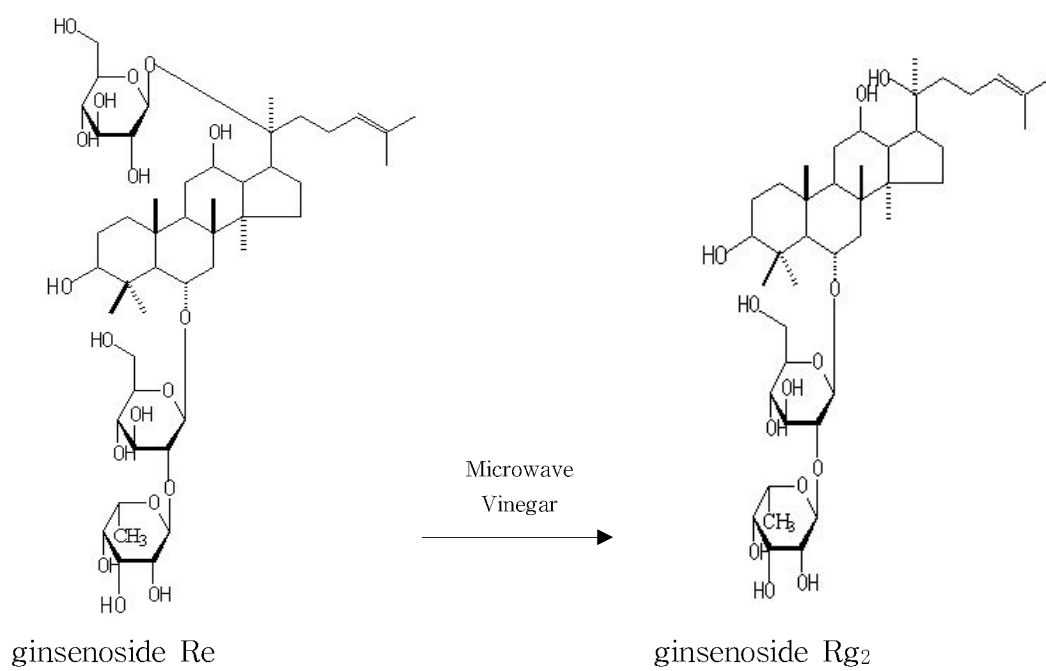
또한, ginsenoside F<sub>4</sub>에 있어서는 MGFB-50가 0.5287%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, MGFB-40(0.5195%), MGFB-60(0.4205%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

## 바. 결론

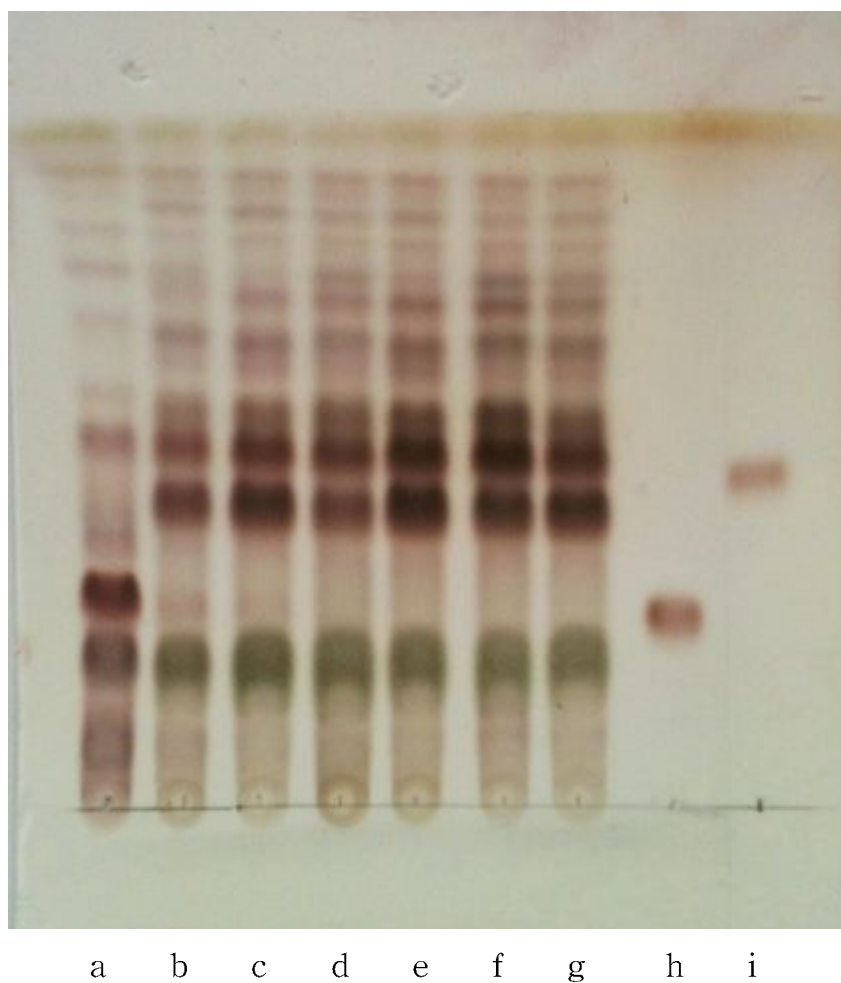
본 연구는 Ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>6</sub>, Rh<sub>1</sub> 그리고 F<sub>4</sub> 등의 인삼의 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 제제를 개발하여 기능성 화장품 및 식품의 핵심 원료 소재 획득을 목표로 하였다. 이의 일환으로 농림 부산 폐기물인 인삼 화퇴에 물리화학적 가공 방법의 하나로서 2배식초를 가하여 초음파 처리를 함으로써 인삼사포닌 배당체를 인삼 prosapogenin으로 전환하여 HPLC법으로 검토했다.

그 결과, 인삼화퇴 제제에서는 40분 초음파 처리시 ginsenoside Rg<sub>2</sub>가 1.4297%, 50분 초음파 처리시 ginsenoside Rg<sub>3</sub>가 1,1766%로 고농도 함유를 보여주었다.

이와 같은 결과를 검토해 보면, 인삼 화퇴를 이용한 초음파 처리 prosapogenin 고농도 함유 제제는 기능성 화장품 및 식품의 기능성 강화 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료되며, 향후, 본 제제를 이용한 새로운 기능성 제품의 개발이 기대되고 있다.



**Fig. 1. Transformation of protopanaxatriol saponin ginsenoside Re to ginsenoside Rg<sub>2</sub>**



\* a : (MGFB, ginseng flower bud), b : (MGFB-10, ginseng flower bud processed with ultrasonication for 10 minute), c : (MGFB-20 : ginseng flower bud processed with ultrasonication for 20 minutes), d : (MGFB-30, ginseng flower bud processed with ultrasonication for 30 minutes), e : (MGFB-40, ginseng flower bud processed with ultrasonication for 40 minutes), f : (MGFB-50, ginseng flower bud processed with ultrasonication for 50 minutes), g : (MGFB-60, ginseng flower bud processed with ultrasonication for 60 minutes), h : ginsenoside Re, i : ginsenoside Rg<sub>2</sub>

**Fig 2. TLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower buds extracts (MGFB)**

Table 2. The processing conditions of various ultrasonication on ginseng flower buds extracts

(%)

samples	Times (minute)
MGFB	0
MGFB-10	10
MGFB-20	20
MGFB-30	30
MGFB-40	40
MGFB-50	50
MGFB-60	60

Table 3. Content of Crude Saponins in ginseng flower buds extracts

(%)

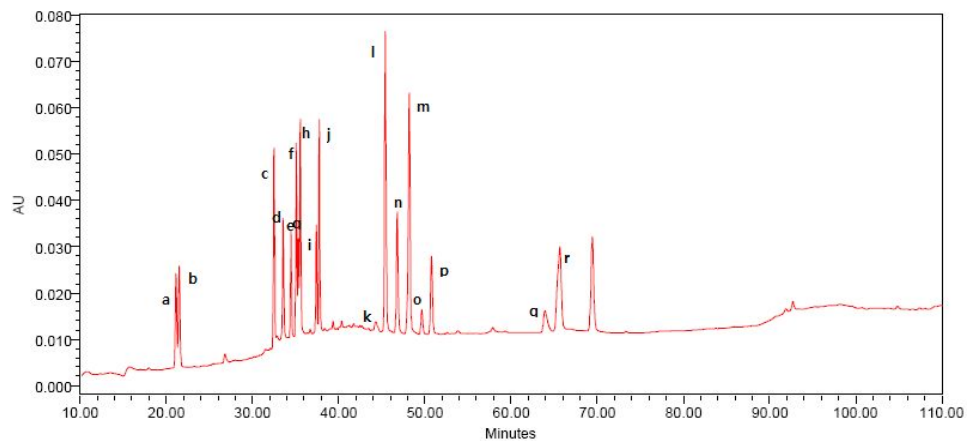
samples	crude saponins
MGFB	78.18
MGFB-10	37.89
MGFB-20	34.25
MGFB-30	36.61
MGFB-40	34.17
MGFB-50	35.17
MGFB-60	37.86

**Table 4. The ginsenoside composition of the ginseng flower bud extracts processed with ultrasonication as time passes**

Ginsenosides	Ginseng flower bud processed with ultrasonication						
	MGFB	MGFB-10	MGFB-20	MGFB-30	MGFB-40	MGFB-50	MGFB-60
Rb <sub>1</sub>	1.0120 ±0.0405	0	0	0	0	0	0
Rb <sub>2</sub>	1.4692 ±0.0578	0.1980 ±0.0550	0.2028 ±0.0160	0.1344 ±0.0175	0.3013 ±0.0120	0.2484 ±0.0127	0.2338 ±0.0108
Rc	0.0487 ±0.0215	0.0558 ±0.0193	0	0	0	0	0
Rd	5.0902 ±0.1663	0.0846 ±0.0240	0.1913 ±0.0063	0.0147 ±0.0023	0.1534 ±0.0044	0.0556 ±0.0013	0.1146 ±0.0079
Re	7.2071 ±0.0643	0.6997 ±0.0113	0.2626 ±0.0016	0.0219 ±0.0024	0.2148 ±0.0003	0.0987 ±0.0169	0.1235 ±0.0049
Rf	0.1109 ±0.0300	0.0742 ±0.0059	0.0800 ±0.0052	0.0337 ±0.0015	0.0892 ±0.0089	0.0600 ±0.0026	0.0760 ±0.0023
Rg <sub>1</sub>	1.2031 ±0.0136	0.1373 ±0.0012	0.2538 ±0.0025	0.0100 ±0.0034	0.0371 ±0.0017	0.0112 ±0.0037	0.0137 ±0.0009
Rg <sub>2</sub>	1.3978 ±0.0361	1.4150 ±0.0736	1.2245 ±0.0104	0.7114 ±0.0153	1.4297 ±0.0107	1.3604 ±0.0329	1.2255 ±0.0082
20S-Rg3	0	0.5501 ±0.0112	0.5000 ±0.0107	0.3085 ±0.0020	0.6170 ±0.0056	0.6159 ±0.0060	0.5336 ±0.0046
20R-Rg3	0	0.3993 ±0.0038	0.4001 ±0.0057	0.2820 ±0.0008	0.5352 ±0.0100	0.5607 ±0.0025	0.4939 ±0.0091
Rg5	0	0.3256 ±0.0065	0.2317 ±0.0033	0.2005 ±0.0015	0.4286 ±0.0032	0.4615 ±0.0029	0.3546 ±0.0023
Rg6	0	0.1849 ±0.0157	0.1580 ±0.0105	0.1084 ±0.0047	0.2532 ±0.0003	0.2522 ±0.0026	0.2032 ±0.0033
Rh1	0	0.5788 ±0.0287	0.6434 ±0.0126	0.4047 ±0.0109	0.8465 ±0.0116	0.7873 ±0.0153	0.7298 ±0.0042
Rh4	0	0.0482 ±0.0105	0.0350 ±0.0034	0.0424 ±0.0009	0.0840 ±0.0004	0.0802 ±0.0013	0.0627 ±0.0021
Rk1	0	0.1756 ±0.0039	0.1666 ±0.0049	0.1224 ±0.0007	0.2577 ±0.0005	0.2770 ±0.0021	0.2215 ±0.0012
Rk3	0	0.0275 ±0.0077	0.0230 ±0.0043	0.0297 ±0.0005	0.0455 ±0.0015	0.0477 ±0.0015	0.0316 ±0.0018
F1	0	0.5752 ±0.0837	0.3994 ±0.0399	0.0365 ±0.0076	0.2663 ±0.0179	0.1073 ±0.0092	0.1813 ±0.0192
F4	0	0.3945 ±0.0140	0.2986 ±0.0091	0.2257 ±0.0019	0.5195 ±0.0025	0.5287 ±0.0014	0.4205 ±0.0048
Prosapogenin <sup>a)</sup>	1.3978	4.6747	4.0803	2.4722	5.2832	5.0789	4.4582
Total saponin <sup>b)</sup>	17.539	5.9243	5.0708	2.6869	6.079	5.5528	5.0198

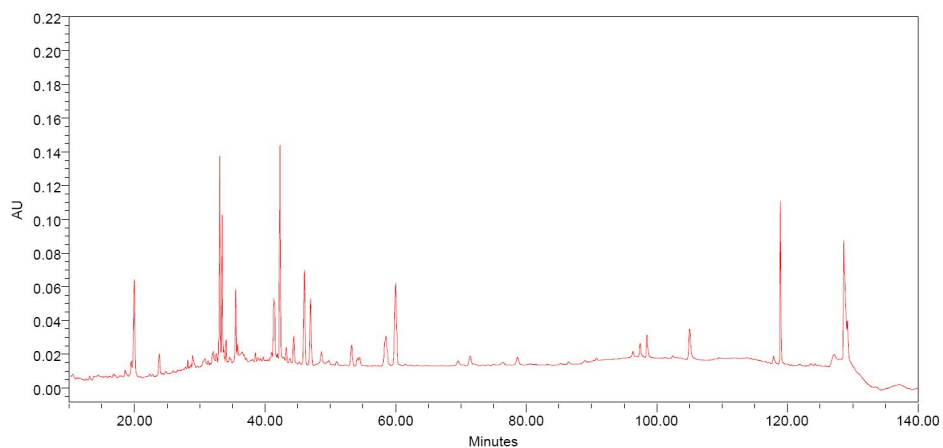
<sup>a)</sup> Sum of individual ginsenosides content  
 Values represent the mean±S.E. (n=3)



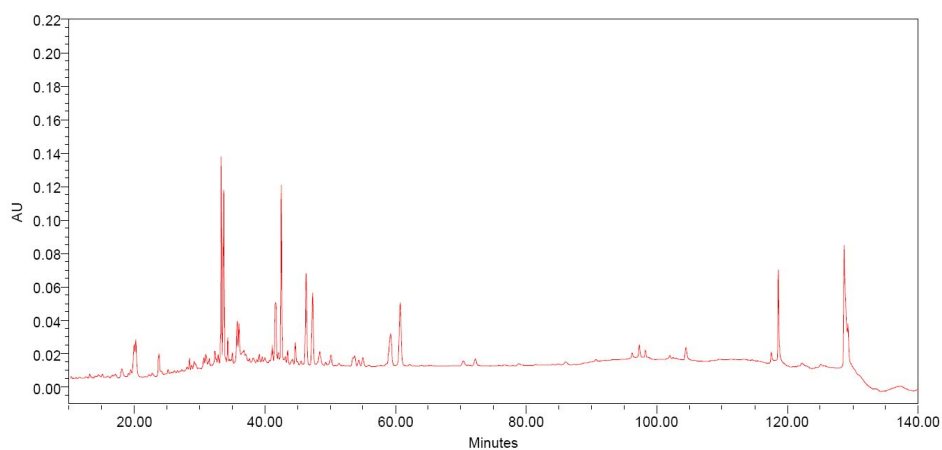


\* a : Ginsenoside Rg1 , b : Ginsenoside Re, c : Ginsenoside Rf,  
 d : Ginsenoside Rb1, e: Ginsenoside Rg2, f : Ginsenoside Rh1,  
 g : Ginsenoside Rc, h : Ginsenoside Rb2, l : Ginsenoside F1,  
 j : Ginsenoside Rd, k : Ginsenoside Rg6, l : Ginsenoside F4,  
 m : Ginsenoside Rk3, n : Ginsenoside Rh4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

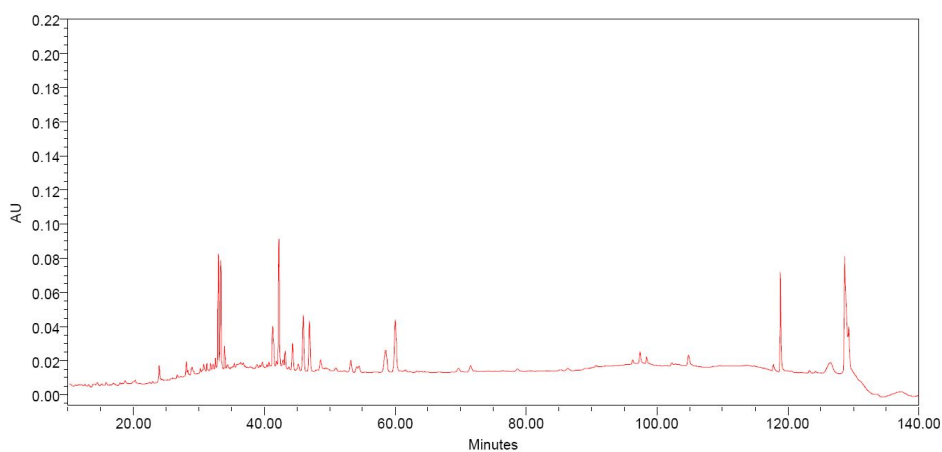
**Fig. 3. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the standard authentics**



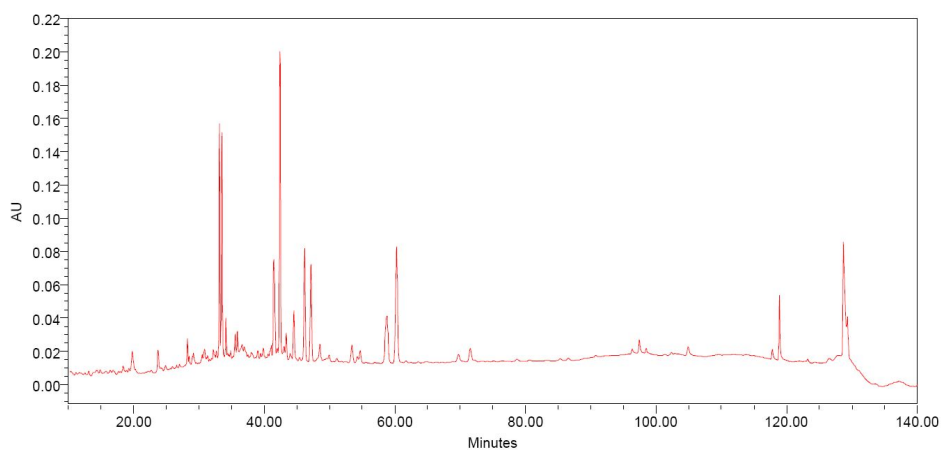
**Fig. 4. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower bud extracts processed with ultrasonication for 10 minutes (MGFB-10)**



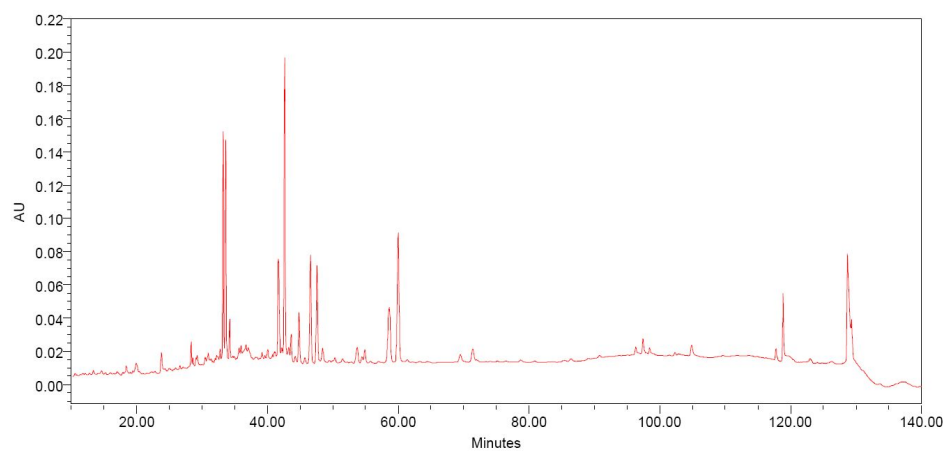
**Fig. 5. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower bud extracts processed with ultrasonication for 20 minutes (MGFB-20)**



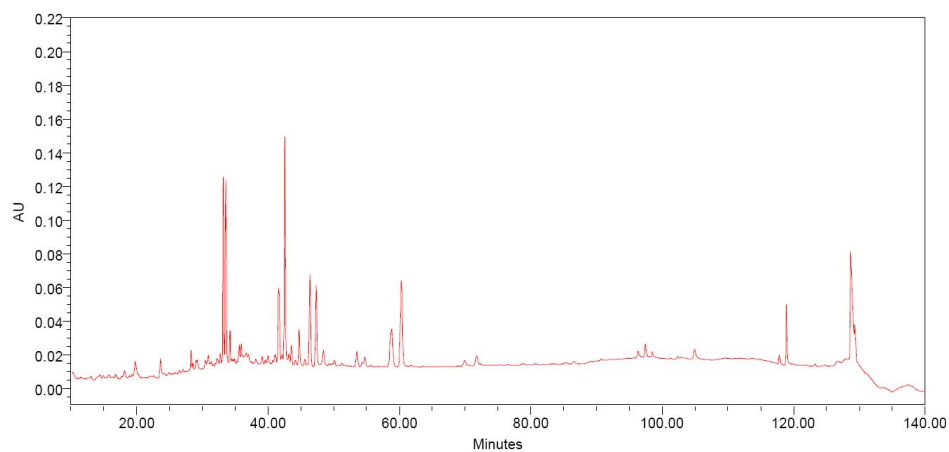
**Fig. 6. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower bud extracts processed with ultrasonication for 30 minutes (MGFB-30)**



**Fig. 7.** HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower bud extracts processed with ultrasonication for 40 minutes (MGFB-40)



**Fig. 8.** HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower bud extracts processed with ultrasonication for 50 minutes (MGFB-50)



**Fig. 9. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng flower bud extracts processed with ultrasonication for 60 minutes (MGFB-60)**

### 3. 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 항알레르기 시험

#### 가. 실험 재료 및 엑스의 조제

##### (1) 실험 재료

본 연구에 사용한 고려 인삼화퇴(*Panax ginseng*)는 한국 충북 음성에서 재배(재배자, 남성업) 4년생 인삼 화퇴를 2005년 6월 10일에 채집하였다. 제품표본은 세명대학교 한방식품연구실에 보관하고 있다. (Fig. 1.)



Fig. 1. Figure of Ginseng Flower buds

##### (2) 엑스의 조제

위의 시료를 세말하였고 시료 5kg을 인삼 화퇴를 약 65℃에서 95% ethyl alcohol (6L)로 2시간씩 2회 추출하여 여액을 모아 감압 농축하여 동결건조하여 95% EtOH 엑스 1kg을 얻었다.

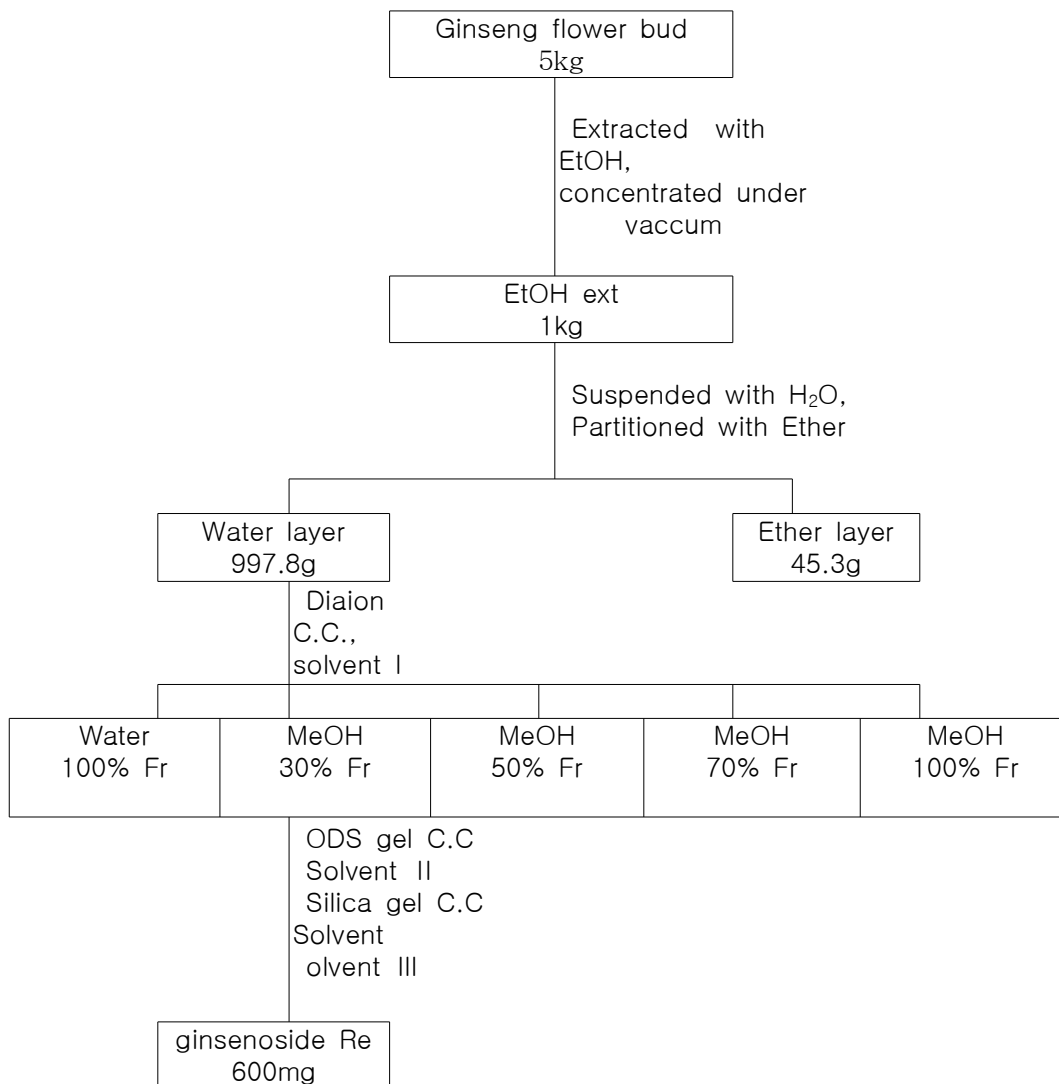
#### 나. 인삼 화퇴로부터 주 사포닌의 분리

##### (1) 인삼 화퇴로부터 사포닌 분획의 추출

인삼 화퇴 95% EtOH 엑스 1kg을 증류수에 현탁하여 분획 깔때기에 넣고 Diethyl Ether넣어 shaking 하여 진탕하고 방치한 후 Ether를 제거한다. 이 방법을 10회 처리하여 Diethyl Ether 분획(45g), 물 분획(998g)을 얻었다. 표본은 세명대학교 한방식품영양학과에 보관하고 있다.

(2) 인삼 화뢰로부터 사포닌 분획과 ginsenoside Re의 분리

위의 수가용성 분획을 증류수에 현탁하여 Diaion column에 흡착시킨 후 30% methanol 분획, 50% methanol 분획, 70% methanol 분획, 100% methanol 분획을 하였고, 30% methanol 분획 10g을 ODS gel column에 로딩하여 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH, 100% MeOH 순차적으로 치환하면서 전개하여 F1~F4를 얻었다. 위에서 얻은 F3로 silica gel column에 전개 용매 [CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 70:30:4 v/v]로 로딩하여 0.6g Compound I (ginsenoside Re)를 얻었다. (scheme. 1.)



**Scheme 1. Extraction and Isolation ginsenoside Re from ginseng flower buds**

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

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

\*Solvent III : CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 70:30:4 v/v

## 다. 항알레르기 시험

### (1) Compound 48/80 유도 histamine 분비 시험

실험 재료로는 ginseng berry EtOH ext와 Compound I 두 그룹으로 분류하여 비교하였다. Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)로부터 배양된 HMC는 10% 소혈청 알부민, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 50 ug/ml streptomycin를 첨가하였다. 세포는 37°C 5% CO<sub>2</sub>와 95% humidity에서 2~3일 동안 배양되었다.

HMC는 24 well plate에 24시간동안 분주 안정화시킨 후 3시간 동안 각 시료를 처리하여 배양하였다. 이후 compound 48/80을 처리하여 histamine 분비를 유도하였다. 10분 후 각 시료를 100ul씩 취하여 1M NaOH 50ul과 1 mg/ml의 o-phthaldialdehyde EtOH 수용액 100ul을 첨가하여 5분간 반응시킨 후 황산 용액으로 반응을 정지시켰다. 측정은 excitation 360/40, emission 460/40의 형광 파장을 이용하였으며 histamine standard 곡선과 비교하여 정량하였다.

### (2) 항알레르기 시험 결과 및 고찰

알레르기는 일반적으로 다른 사람들에게는 별로 해가 없는 외부물질(항원)에 대한 신체의 과민반응으로 알레르기 반응을 유발하는 항원은 알레르겐이라고 하며, 전형적인 알레르겐은 꽃가루, 약물, 식물성 섬유(실), 세균, 음식물, 염색약, 화학물질 등이 있다.

면역계는 정상적으로 항원에 대하여 신체를 지키기 위해 몇 가지 방어 메커니즘을 갖고 있다. 이들 중 가장 많은 종류는 림프구로 이 세포는 특정 항원에 반응하기 위해 특이화되어 있다. 림프구에는 B세포와 T세포가 있다. B세포는 항원에 결합하여 항원을 파괴시키고 중화시키는 단백질인 항체를 생성한다. T세포는 항체를 생산하는 대신에 항원에 직접 결합하여 공격을 자극한다.

알레르기 반응은 즉시형 알레르기 또는 지연형 알레르기로 나타나는데, 항원이 B세포나 T세포 중 어느 세포와 반응하는지에 따라 결정된다. 즉시형 알레르기 반응은 항원-항체(B세포 반응의 생성물) 반응의 결과이다. 이들은 3가지 기본형으로 분류된다.

I형 반응은 건초열·곤충독알레르기·천식 등을 일으키는 면역 글로블린 E(IgE)라고 하는 항체를 포함한다. IgE 분자는 치밀하지 않은 결합조직에서 발견되는 비만세포와 결합되어 있다. 과다한 항원이 IgE 항체에 결합하면 비만세포는 히스타민과 헤파린 과립을 방출하고 류코트리엔 등의 물질을 생산한다. 이러한 잠재되어 있던 화학물질들은 혈관을 팽창시키고 공기의 통로인 기도를 수축시킨다. 히스타민은 알레르기에 의해 콧물이 흐르거나, 숨이 가쁘고, 피부가 부어오르는 외형적인 증상의 원인이 된다. 심각하거나 때로 치명적인 I형 알레르기 반응은 아나필락시쇼크(→아나필락시)라고도 한다. I형 알레르기 반응에 대한 개인적 소인은 유전적으로 결정된다. 알레르기의 가장 좋은 예방법은 알레르기를 일으키는 물질의 유입을 막는 것이다. 항히스타민제는 일시적인 고통을 완화시켜 주기도 한다. 또다른 유용한 방법은 탈감작으로서, 환자에게 알레르기 반응이 일어나지 않을 때까지 항원을 점차적으로 늘려가면서 일정기간 이상 주입시키는 것이다.

II형 반응은 특정 표적세포에서 발견되는 항원과 항체가 반응할 때 일어나는 결과이다. 항원은 건강한 세포의 선천적인 구성요소이거나 약물이나 감염 미생물 처럼 외래 구성요소일 수

있다. 항원-항체 복합체는 표적세포를 파괴하는 일련의 잠재성 효소들로 이루어진 보체계를 활성화한다.

Ⅲ형 반응은 특정 항원에 매우 민감한 사람이 항원에 계속적으로 노출되었을 때 생긴다. Ⅲ형 반응에서 항원-항체 복합체는 작은 혈관벽에 침착된다. 이때 복합체는 보체를 자극하여 염증과 혈관손상을 일으킨다. I형 반응과 달리 Ⅱ형 반응과 Ⅲ형 반응은 유전적 소인에 따르지 않는다. 알레르겐으로 알려진 물질을 피하는 것이 이러한 반응을 예방하는 최선의 방법이다.

Ⅳ형 반응 또는 지연형 알레르기 반응은 T세포 반응에 의해 발생되고, 이는 항원이 있는 위치에 축적되는 시간이 B세포보다 더 오래 걸린다. 알레르기 반응은 항원에 노출된 후 12~24시간 후 또는 그 이상의 시간이 지난 후에 나타난다. 일반적인 지연형 알레르기 반응은 접촉피부염이다. 이식한 기관의 거부반응도 T세포에 의해 중개되고 따라서 지연형 알레르기 반응의 하나로 간주되기도 한다.

알레르기 질환은 대표적인 만성 반복적인 질환으로 유전적 요인과 환경적 요인의 상호작용으로 발병한다. 알레르기 질환의 종류로는 기관지 천식, 알레르기 비염, 알레르기 결막염, 급성 및 만성 두드러기, 아토피 피부염, 아나필락시스 등이다. 알레르기 치료의 3대 원칙으로는 환경관리, 약물요법, 면역치료라고 할 수 있다.

일반적으로 두드러기, 알레르기성 비염, 천식 등 즉시형면역반응 질환들은 비만세포가 분비하는 여러화학적 mediator 들에 의해 발생한다고 알려져 있다. 즉시형면역반응과정 중에서 비만세포가 탈과립하여 분비하는 히스타민은 가장 잘 알려지고 면역반응에 중요한 역할을 하는 mediator이다. Compound 48/80은 히스타민 유리제로서 잘 알려졌다. 본 논문은 HMC를 이용하여 Compound 48/80을 유도한 histamine 분비를 관찰하였다. Compound 48/80을 유도한 HMC test 로서 인삼 화퇴 EtOH 추출물과 인삼 화퇴의 주종 사포닌인 ginsenoside Re를 분리하여 실험을 수행하였다.

본 연구에서는 비만 세포주인 Human Mast Cell Line (HMC)를 이용하여 시료의 항 histamine 효과를 관찰함으로써 시료의 항알레르기 효과를 확인하였다. Histamine 분비 유도로는 compound 48/80을 사용하였으며 시료는 인삼과육 95% EtOH 엑스와 ginsenoside Re 시료를 가지고 농도별로 투여 하여 실험 하였다.

인삼 화퇴 EtOH ext와 ginsenoside Re, blank, control 과 비교하여 실험한 결과 compound 48/80을 처치한 군의 histamine 분비량  $19.9 \pm 3.11$ 에 비해 아무것도 처치하지 않은 실험군은  $3.00 \pm 0.20$ 의 histamine의 분비량을 나타냈으며, 인삼 화퇴 EtOH ext을 처치한 실험군 (100, 30, 10, 3, 1 (ug/ml))은 농도별로 각각  $13.7 \pm 3.67$ ,  $6.63 \pm 0.68$ ,  $11.1 \pm 1.74$ ,  $15.2 \pm 1.39$ , 및  $13.6 \pm 0.28$ 의 histamine 분비량을 보였으며(Table. 1), 인삼 화퇴 EtOH ext는 30ug/ml( $P > 0.01$ ), 10ug/ml( $P > 0.05$ )에서 유의성 있게 억제 하였다. (Table. 1, Fig. 1.)

ginsenoside Re을 처치한 실험군 (100, 30, 10, 3, 1 (ug/ml))은 농도별로 각각  $19.7 \pm 0.76$ ,  $0.54 \pm 0.20$ ,  $11.2 \pm 0.77$ ,  $11.9 \pm 0.90$  및  $11.5 \pm 0.80$ 의 histamine 분비량을 보였다.(Table.2.)

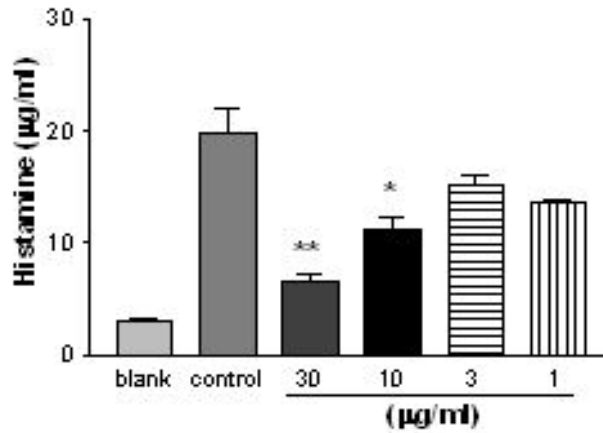
ginsenoside Re은 30ug/ml( $P > 0.01$ )에서 유의성이 있었고, 10,3,1ug/ml( $P > 0.05$ )으로 유의성 있게 억제 하였다. (Table. 2, Fig. 2.)

이렇게 각 시료를 분석해 본 결과 농도 비 의존적으로 고농도가 아닌 저농도에서 항 알레르기 능을 가진다는 점에서, 인삼 사포닌이 강한 해독 작용으로 인해 고농도에서는 활성을 가지지 못한 것이라 사료된다.

이와 같은 결과로부터 인삼 화퇴 엑스와 ginsenoside Re는 실험적으로 histamine 분비량을 감소시킴으로서 항 알레르기 효과를 갖는다고 사료된다.



이런 인삼 화퇴의 항 알레르기 효과를 가진다는 점에서 기호성과 기능성이 우수한 기능성이 강화된 인삼과육제품 실용화 및 품질규격화 연구의 필요성이 있다고 사료 된다.



**Fig. 1. Inhibitory effect of ethanol(GFB-ext) and induced histamine release from human mast cell line in vitro.**

Significantly different from the control group, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

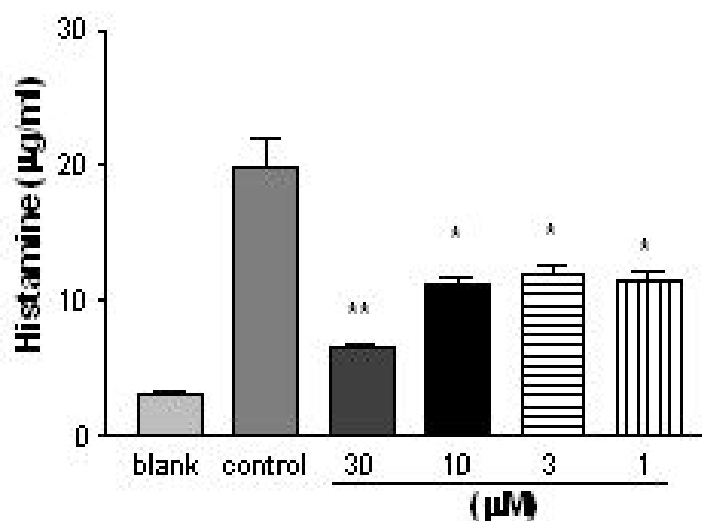
Blank : none treated, Control : compound 48/80 treated only.

**Table. 1. Inhibitory effect of ethanol(GFB-ext) and its main component from Ginseng Flower bud and induced histamine release from human mast cell line in vitro.**

Samples	Concentration (ug/ml)	Histamine (ug/ml)
blank		3.00±0.20
cont.		19.9±3.11
Ginseng berry EtOH	100	13.7±3.67
ext	30	6.63±0.68**
	10	11.1±1.74*
	3	15.2±1.39
	1	13.6±0.28

Significantly different from the control group, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Blank : none treated, Control : compound 48/80 treated only.



**Fig. 2. Main component(ginsenoside Re) from Ginseng Flower bud and induced histamine release from human mast cell line in vitro.**

Significantly different from the control group, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Blank : none treated, Control : compound 48/80 treated only.

**Table.2. Inhibitory effect of ethanol(GFB-ext) and its main component from Ginseng Berry and induced histamine release from human mast cell line in vitro.**

Samples	Concentration (ug/ml)	Histamine (ug/ml)
blank		3.00±0.20
cont.		19.9±3.11
Compound I	100	19.7±0.76
	30	0.54±0.20**
	10	11.2±0.77*
	3	11.9±0.90*
	1	11.5±0.80*

Significantly different from the control group, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Blank : none treated, Control : compound 48/80 treated only.

#### 4. 인삼화되 및 세척인삼화되의 잔류농약검사

##### 가. 재료 및 방법

###### (1) 실험재료

###### (가) 시료

시료는 직접 채집한 인삼화되를 풍건하여  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 냉장 보관하고 사용시 전처리하여 분석하였다.

###### (나) 시약 및 기구

농약의 표준품 67종은 ChemService(99.5%이상 purity, USA)에서 구입하였고, 추출용매인 아세톤 및 헥산, 아세토니트릴등의 유기용매는 농약분석용으로 PRA grade(J.T.Baker, USA) 사용하였고, 정제에 사용된 SPE cartridge는 Supelco사의 Florisil 카트리지(1g, 6ml)를 사용하였다.

###### (다) 기기 및 장치

GC- $\mu$ ECD는 HP 6890N Series(Agilent Technologies, USA)를 사용하였고, GC-NPD는 HP 6890 Series(Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. HPLC-UV는 Binary Pump 627 system(Alltech, USA)를 사용하였다.

###### (2) 분석방법

###### (가) 분석대상 농약

조사대상으로 선정된 농약은 인삼(수삼)의 잔류농약 허용기준(식약청 2011.10.14. 고시)에 포함되는 총 67종으로 GC- $\mu$ ECD, GC-NPD와 HPLC-UV로 구분한 후, 사용되는 컬럼을 고려하여  $\mu$ ECD-DB5,  $\mu$ ECD-DB17, NPD-DB5, NPD-DB17로 구분하여 사용하였다. 또한, HPLC-UV로도 수행하였다.

<표. > 잔류농약 분석항목

연 번	분석항목	연 번	분석항목
1	디디티(DDT)	36	부프로페진(Buprofezin)
2	메타락실(Metalaxyl)	37	사이할로스린(Cyhalothrin)
3	비에치시(BHC)	38	푸루실라졸(Flusilazole)
4	일드린(Aldrin) 및 디엘드린(Dieldrin)	39	프로클로라즈(Prochloraz)
5	엔드린(Endrine)	40	디치아논(Dithianon)
6	카벤다짐(Carbendazim)	41	사이목사닐(Cymoxanil)
7	퀸토젠(Quintozene)	42	클로치아니딘(Clothianidin)
8	디에토펜카브(Diethofencarb)	43	티아메톡삼(Thiametoxam)
9	디페노코나졸(Difenoconazole)	44	에타복삼(Ethaboxam)
10	사이퍼메스린(Cypermethrine)	45	사이플루스린(Cyfluthrin)
11	아зок시스트로빈(Azoxystrobin)	46	후루아지남(Fluazinam)
12	토릴플루아니드(Tolylfluanid)	47	테부코나졸(Tebuconazole)
13	톨크로포스-메틸(Tolclofos-methyl)	48	만디프로파미드(Mandipropamid)
14	이민옥타딘(Iminoctadine)	49	메톡시페노자이드(Methoxyfenozide)
15	피리메타닐(Pyrimethanil)	50	메트코나졸(Metconazole)
16	펜헥사미드(Fenhexamid)	51	비펜스린(Bifenthrin)
17	시아조파미드(Cyazofamid)	52	세록시딤(Sethoxydim)
18	사이프로디닐(Cyprodinil)	53	에마벡티베조에이트 (Emamectin benzoate)
19	크레속심-메틸(Kresoxim-methyl)	54	에트리디아졸(Etridiazole)
20	에틸렌비스디치오카바메이트 (Ethylenebis dithiocarbamate)	55	티아크로프리트(Thiacloprid)
21	카두사포스(Cadusafos)	56	프로파모카브(Propamocarb)
22	펜시쿠론(Pencycuron)	57	헥사코나졸(Hexaconazole)
23	후루디옥소닐(Fludioxonil)	58	플루오피콜라이드(Fluopicolide)
24	카보설향(Carbosulfan)	59	트리플루미졸(Triflumizole)
25	티플루자마이드(Thifluzamide)	60	포세탈알루미늄(Fosetyl-aluminium)
26	플루토라닐(Flutolanil)	61	시메코나졸(Simeconazole)
27	테부피림포스(Tebupirimfos)	62	아미설프롬(Amisulbrom)
28	트리플록시스트로빈(Trifloxystrobin)	63	아세타미프리트(Acetamiprid)
29	보스칼리드(Boscalid)	64	클로르헨나피르(Chlorfenapyr)
30	디메토모르프(Dimethomorph)	65	디노테푸란(Dinotefuran)
31	클로로타로닐(Chlorothalonil)	66	카보후란(Carbofuran)
32	테플루스린(Tefluthrin)	67	크레소딤(Clethodim)
33	플루퀸코나졸(Fluquinconazole)		
34	피라크로스트로빈(Pyraclostrobin)		
35	아미트라즈(Amitraz)		

(나) 표준원액 및 표준용액의 조제

각각의 표준품은 아세톤에 녹여 1ml당 1,000 $\mu$ g(1,000ppm)을 함유하도록 표준원액을 만들고, 이를 GC- $\mu$ ECD로의 분석용 혼합표준용액 group 1, 2와 GC-NPD로 분석 가능 혼합 표준용액 group 3, 4 그리고 HPLC-UVD로 분석가능한 표준용액 group 5으로 하였다. 이를 각각 1ml당 100 $\mu$ (100ppm)으로 희석하여 4 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 냉장 보관 하다가 사용 전에 이 표준용액을 1ml당 0.001-10 $\mu$ g(0.001-10ppm)으로 희석하여 사용하였다.

(다) 시험용액의 조제

식품의약품안전청 식품공전 중의 다성분 동시 분석법, CDFA(California Department of Food and Agriculture), 미)FDA의 PAM(Pesticide Analysis Method)등을 참조하여 수행하였다.

추출: 시료는 적절한 크기로 세절하여 10-50g으로 칭량한 후 브렌더에 넣고 아세토니트릴 200ml을 가하여 5분간 고속으로 균질화 한 후 여과하여 진공회전농축기로 40 $^{\circ}$ C 수욕상에서 감압 농축 후 5ml의 20% 아세톤/헥산용액으로 재용해 하였다.

정제: 미리 Florisil 카트리지에 헥산 5ml를 초당 2-3방울 정도의 속도로 유출하여 버리고, 이 카트리지에 20% 아세톤/헥산용액 5ml를 같은 방법으로 유출하여 버린다. 그 후 시험용액 2ml를 초당 1-2방울 정도의 속도로 용출시켜 시험관에 받는다. 다시 카트리지에 용매가 젖어있는 상태에서 20% 아세톤/헥산용액 5ml를 용출하여 동일 시험관에 모은 용출액은 질소하에 용매를 제거한 후 1ml의 아세톤으로 재용해하여 GC- $\mu$ ECD/NPD의 분석 시험용액으로 하였다. 또한 HPLC-UVD의 분석 시험용액은 메탄올에 재용해한 것을 사용하였다.

(라) Gas Chromatography 분석방법

정제한 시험용액은 표. 와 표. 과 같은 조건으로 분석하였다.

<Ⅴ. > Operating conditions of GC- $\mu$ ECD

---

GC- $\mu$ ECD	
Column	DB-5 (30m length $\times$ 0.25mm I.D $\times$ 0.25 $\mu$ m film-thickness) DB-17 (30m length $\times$ 0.25mm I.D $\times$ 0.25 $\mu$ m film-thickness)
Detector	Electron capture detector
Injector temp.	270 $^{\circ}$ C
Detector temp.	300 $^{\circ}$ C
Oven temp.	80 $^{\circ}$ C (2min)-7 $^{\circ}$ C/min-250 $^{\circ}$ C-5 $^{\circ}$ C/min-280 $^{\circ}$ C (15min)-10 $^{\circ}$ C/min-300 $^{\circ}$ C (10min)
Injection vol.	1 $\mu$ L
Carrier gas	N <sub>2</sub> (1.2ml/min)
Mode	Split(50:1)

---

<Ⅵ. > Operating conditions of GC-NPD

---

GC-NPD	
Column	DB-5 (30m length $\times$ 0.25mm I.D $\times$ m 0.25 $\mu$ m film-thickness) DB-17 (30m length $\times$ 0.25mm I.D $\times$ m 0.25 $\mu$ m film-thickness)
Detector	Nitrogen phosphorus detector
Injector temp.	250 $^{\circ}$ C
Detector temp.	280 $^{\circ}$ C
Oven temp.	80 $^{\circ}$ C (2min)-7 $^{\circ}$ C/min-250 $^{\circ}$ C-5 $^{\circ}$ C/min-280 $^{\circ}$ C (15min)-10 $^{\circ}$ C/min-300 $^{\circ}$ C (10min)
Injection vol.	1 $\mu$ L
Carrier gas	N <sub>2</sub> (1.5ml/min)
Mode	Split(5:1)

---

(마) HPLC-UV 분석방법

식품공전에 고시된 카벤다짐 시험법을 응용하여 분석하였고 분석조건은 표. 과 같다.

<표. > Operating conditions of HPLC-UV

HPLC-UV	
Column	Capcellpak C18(4.6mm*150mm, 5um, Japan)
Detector	UV 282nm
Mobile phase	0.01M 인산완충용액/메탄올의 혼합액(40/60, v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection vol.	20µL

나. 분석 결과 및 고찰

(1) 표준농약의 chromatogram

그림. 과 표. 에서 보는바와 같이 GC-µECD에 의해 분석이 가능한 group 1 표준농약인 Quintozene(PCNB), Chlorothalonil, Tebupirimfos, Aldrin, Dimethomorph, Flutolanil, Dieldrin, Endrin, Cyazofamid 그리고 Boscalid와 group 2 표준농약인 BHC-α, BHC-β, BHC-γ, Tefluthrin, BHC-δ, Cypermethrin, DDT, Azoxystrobin, Fluquinconazole, Thifluzamide, Pencycuron, Difenoconazole 그리고 Ethylenebis(dithiocarbamate)s는 동시분석이 가능하였고, 그림. 과 표. 에서 보는바와 같이 GC-NPD에 의해 분석 가능한 group 3인 Cadusafos, Pyrimethanil, Tolclofos-methyl, Diethofencarb, Tolyfluanid, Kresoxim-methyl, Trifloxystrobin, Carbosulfan 그리고 Iminoctadine과 group 4인 Metalaxyl, Cyprodinil, Pyraclostrobin, Fludioxonil 그리고 Fenhexamid 또한 동시분석이 가능하였다.

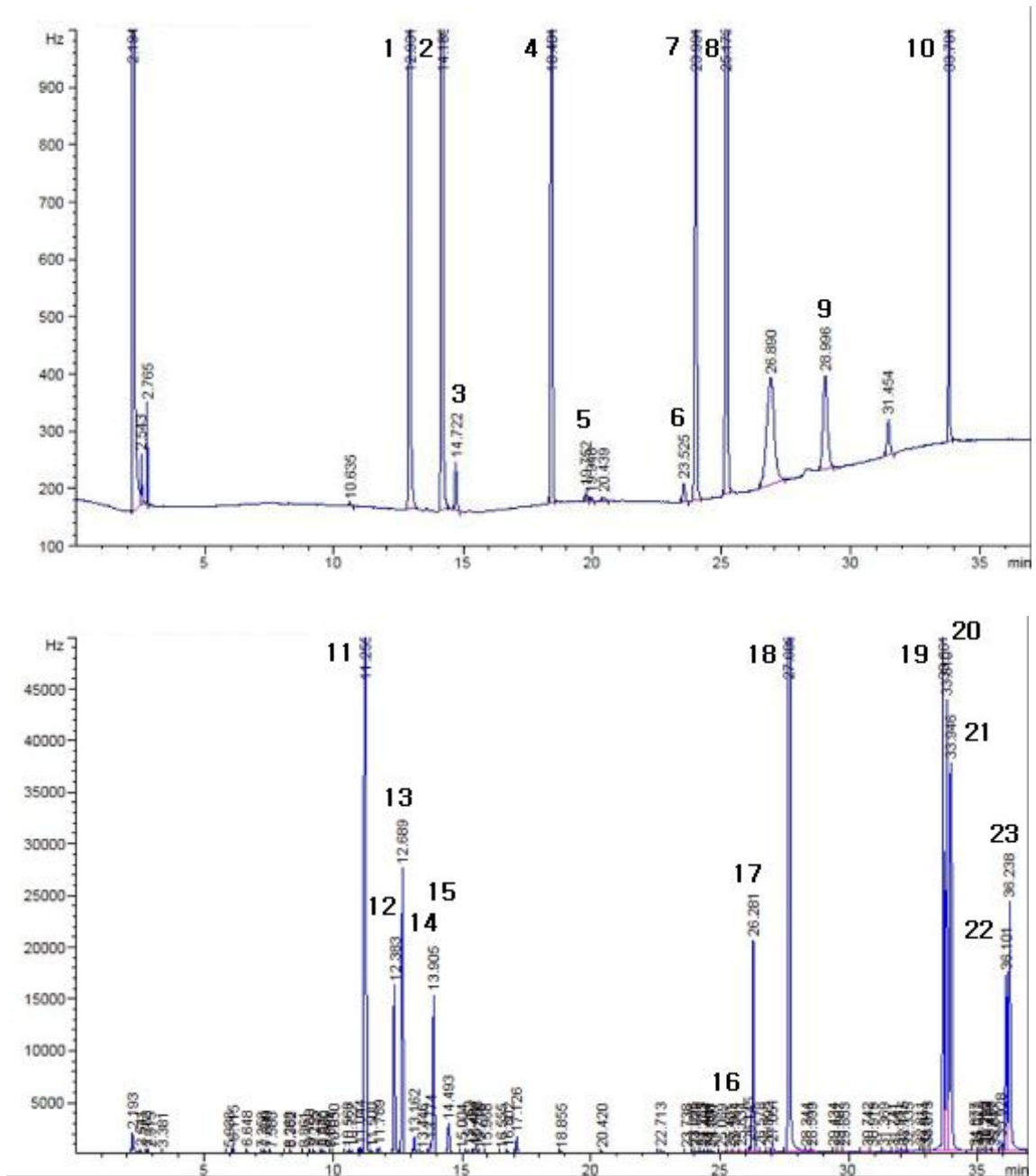


그림. Chromatograms of 23 different pesticide standards (GC- $\mu$ ECD)



<표. > Group of 23 different pesticide standards (GC- $\mu$ ECD)

Group No.	번호	농약명	RT
1	1	Quintozene(PCNB)	13.614
	2	Chlorothalonil	14.967
	3	Tebupirimfos	15.356
	4	Aldrin	19.067
	5	Dimethomorph	20.386
	6	Flutolanil	24.283
	7	Dieldrin	24.700
	8	Endrin	25.967
	9	Cyazofamid	28.637
	10	Boscalid	34.193
2	11	BHC- $\alpha$	11.924
	12	BHC- $\beta$	13.095
	13	BHC- $\gamma$	13.424
	14	Tefluthrin	14.701
	15	BHC- $\delta$	14.727
	16	Cypermethrin	26.012
	17	DDT	26.787
	18	Azoxystrobin	28.180
	19	Fluquinconazole	33.984
	20	Thifluzamide	34.139
	21	Pencycuron	34.283
	22	Difenoconazole	36.577
	23	Ethylenebis(dithiocarbamate)s	36.723

\* RT : Retention Time

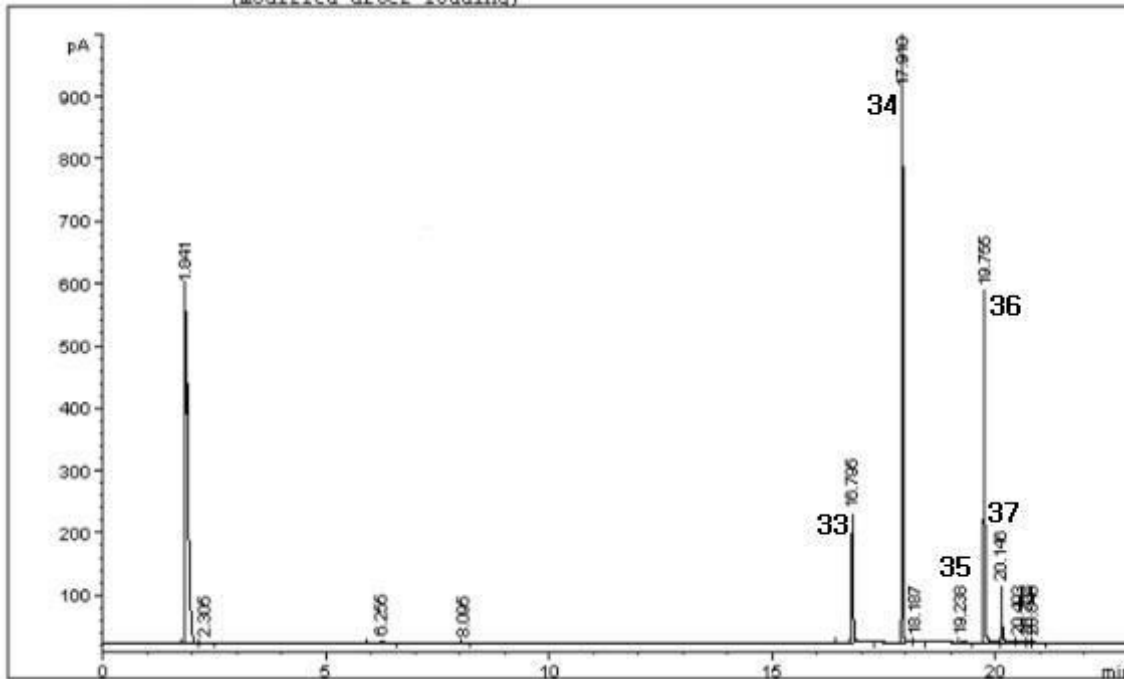
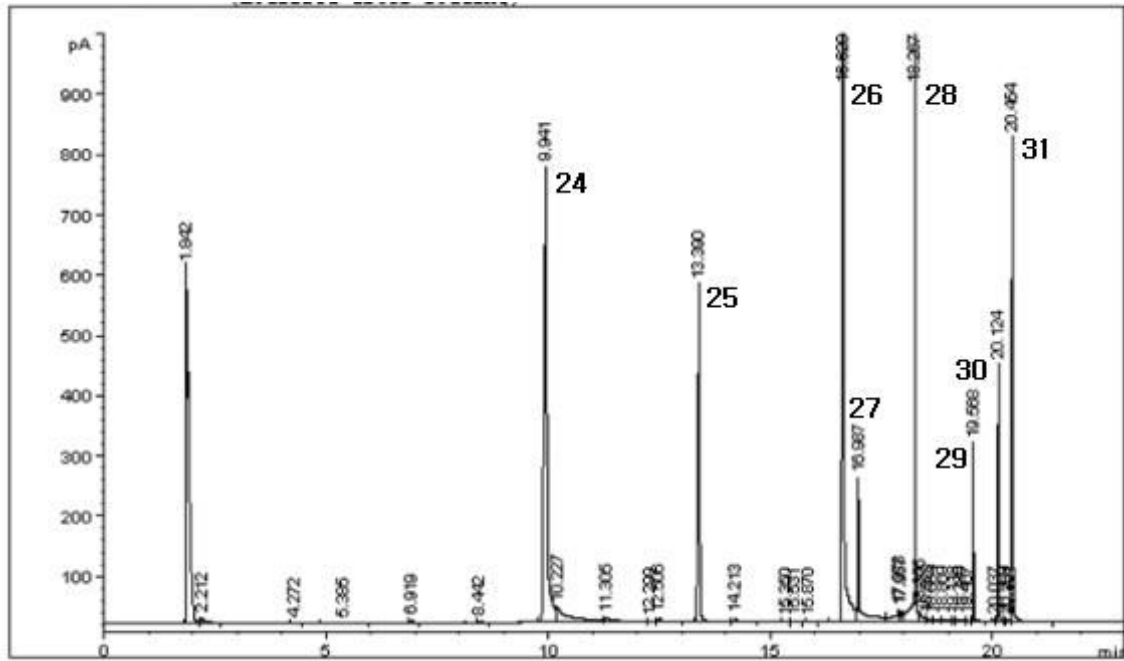


그림. Chromatograms of 14 different pesticide standards (GC-NPD)

<표. > Group of 14 different pesticide standards (GC-NPD)

Group No.	번호	농약명	RT
3	24	Cadusafos	9.9710
	25	Pyrimethanil	13.471
	26	Tolclofos-methyl	16.626
	27	Diethofencarb	17.038
	28	Tolyfluanid	18.276
	29	Kresoxim-methyl	19.585
	30	Trifloxystrobin	20.138
	31	Carbosulfan	20.469
	32	Iminoctadine	22.044
4	33	Metalaxyl	16.837
	34	Cyprodinil	17.947
	35	Pyraclostrobin	19.445
	36	Fludioxonil	19.783
	37	Fenhexamid	20.190

\* RT : Retention Time

(2) 인삼화퇴 및 세척인삼화퇴 잔류농약 분석결과

표. 에서 보는바와 같이 현재 시행되고 있는 잔류농약 검출기준으로 (식약청 2011.10.14.고시-인삼(수삼)의 잔류농약 허용기준) 표품과 비교해 보았을 때 본 연구에서 사용된 인삼화퇴 및 세척인삼화퇴에서는 모든항목의 잔류농약이 검출되지 않았다. 따라서 인삼 가공제품 원료 및 화장품 제재로서 안전성이 확인되었다.

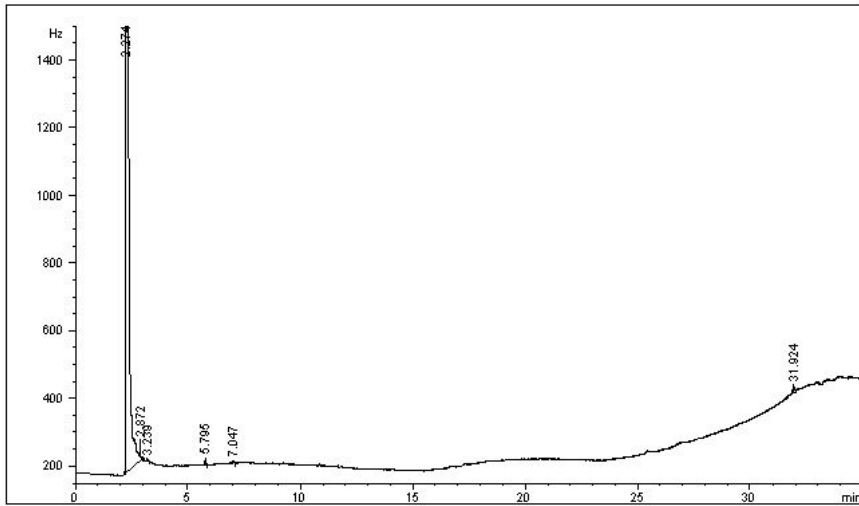


그림. 인삼화퇴 잔류농약 분석 Chromatogram

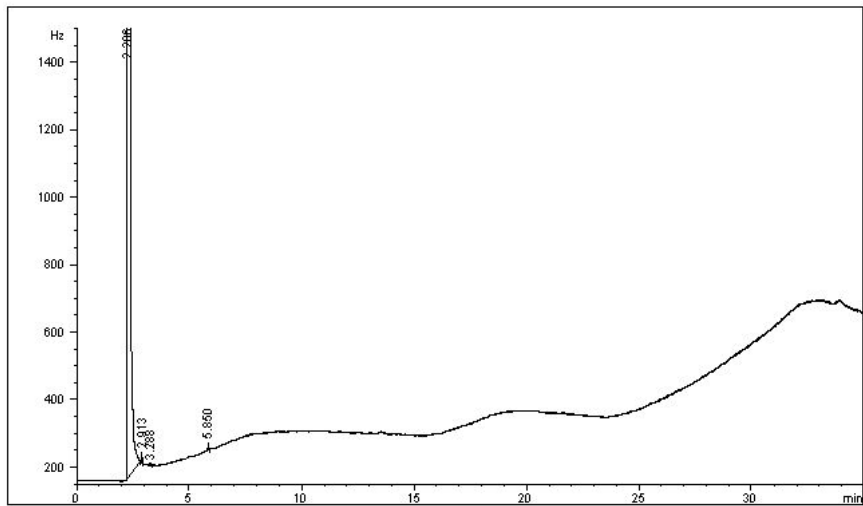


그림. 세척인삼화퇴 잔류농약 분석 Chromatogram

<표. > 인삼화퇴 및 세척인삼화퇴 잔류농약 분석결과

연번	농약명	허용기준(수삼)	단위 : ppm	
			인삼화퇴	세척인삼화퇴
1	DDT	0.01	N.D	N.D
2	Metalaxyl	0.50	N.D	N.D
3	BHC	0.01	N.D	N.D
4	Aldrin and Dieldrin	0.01	N.D	N.D
5	Endrin	0.01	N.D	N.D
6	Carbendazim	0.20	N.D	N.D
7	Quintozene	0.10	N.D	N.D
8	Diethofencarb	0.30	N.D	N.D
9	Difenoconazole	0.20	N.D	N.D
10	Cypermethrin	0.10	N.D	N.D
11	Azoxystrobin	0.50	N.D	N.D
12	Tolyfluanid	0.20	N.D	N.D
13	Tolclofos-methyl	0.30	N.D	N.D
14	Iminoctadine	0.10	N.D	N.D
15	Pyrimethanil	1.00	N.D	N.D
16	Fenhexamid	0.30	N.D	N.D
17	Cyazofamid	0.30	N.D	N.D
18	Cyprodinil	2.00	N.D	N.D
19	Kresoxim-methyl	0.20	N.D	N.D
20	Ethylenebis(dithiocarbamate)s	0.30	N.D	N.D
21	Cadusafos	0.05	N.D	N.D
22	Pencycuron	0.70	N.D	N.D
23	Fludioxonil	0.50	N.D	N.D
24	Carbosulfan	0.10	N.D	N.D
25	Thifluzamide	1.00	N.D	N.D
26	Flutoanil	1.00	N.D	N.D
27	Tebupirimfos	0.01	N.D	N.D
28	Trifloxystrobin	0.10	N.D	N.D
29	Boscalid	0.30	N.D	N.D
30	Dimethomorph	3.00	N.D	N.D
31	Chlorothalonil	0.10	N.D	N.D
32	Tefluthrin	0.10	N.D	N.D
33	Fluquinconazole	0.20	N.D	N.D
34	Pyraclostrobin	2.00	N.D	N.D
35	Amitraz	0.05	N.D	N.D
36	Buprofezin	0.07	N.D	N.D
37	Cyhalothrin	0.05	N.D	N.D
38	Flusilazole	0.07	N.D	N.D
39	Prochloraz	0.30	N.D	N.D
40	Dithianon	0.20	N.D	N.D
41	Cymoxanil	0.20	N.D	N.D
42	Clothianidin	0.20	N.D	N.D
43	Thiametoxam	0.10	N.D	N.D
44	Ethaboxam	0.20	N.D	N.D
45	Cyfluthrin	0.10	N.D	N.D
46	Fluazinam	0.70	N.D	N.D
47	Tebuconazole	0.50	N.D	N.D
48	Mandipropamid	0.10	N.D	N.D
49	Methoxyfenozide	0.20	N.D	N.D
50	Metconazole	1.00	N.D	N.D
51	Bifenthrin	0.50	N.D	N.D
52	Sethoxydim	0.05	N.D	N.D
53	Emamectin benzoate	0.05	N.D	N.D
54	Etridiazole	3.00	N.D	N.D
55	Thiacloprid	0.10	N.D	N.D
56	Propamocarb	0.50	N.D	N.D
57	Hexaconazole	0.50	N.D	N.D
58	Fluopicolide	0.10	N.D	N.D
59	Triflumizole	0.10	N.D	N.D
60	Fosetyl-aluminium	2.00	N.D	N.D
61	Simeconazole	0.70	N.D	N.D
62	Amisulbrom	0.30	N.D	N.D
63	Acetamiprid	0.10	N.D	N.D
64	Chlorfenapyr	0.10	N.D	N.D
65	Dinotefuran	0.05	N.D	N.D
66	Carbofuran	0.03	N.D	N.D
67	Clethodim	0.05	N.D	N.D

※ N.D : Not detected.

## 5. 인삼화퇴 가공물(GFB-JK, 초음파 처리 인삼화퇴 이소프로판올 분획)의 주름개선 효력시험

### 가. 시험 항목

- (1) 세포독성 시험
- (2) 세포 내 콜라겐 생성 시험
- (3) 세포 내 human metalloproteinase 1 (MMP1) 생성억제 시험
- (4) 엘라스타제 활성 억제시험

### 나. 시험 조건

- (1) 장비 모델

SpectraMAX190 (Molecular Devices)

- (2) Detector

- (가) 세포독성 시험 : 570 nm
- (나) 세포 내 콜라겐 생성 시험 : 450 nm
- (다) 세포 내 MMP1 생성억제 시험 : 450 nm
- (라) 엘라스타제 활성억제 시험 : 405 nm

### 다. 대조군 설정

- (1) 세포독성 시험: 시료물질을 처리하지 않은 세포대조군
- (2) 세포 내 콜라겐 생성 시험: 시료물질을 처리하지 않은 세포대조군
- (3) 세포 내 MMP1 생성억제 시험: 시료물질을 처리하지 않은 세포대조군
- (4) 엘라스타제 활성억제 시험: 시료물질을 처리하지 않은 대조군

### 라. 시험 방법

- (1) 세포독성 시험 (MTT assay)

(가) Human fibroblast 유래의 Hs68 (ATCC; CRL-1635) 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well로 96-well plate에 분주하고 세포가 바닥 면에 부착되도록 24시간 배양하였다.

(나) 세포가 바닥 면에 부착한 후에 배양액을 제거하고 0.1%부터 2~64배 희석한 시료를 well당 100  $\mu$ l씩 넣어 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

(다) 배양이 끝난 후, 세포 성장에 대한 영향은 MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenylterazohum bromide) assay 로 Microplate reader로 570nm 흡광도에서 측정하였다.

#### (2) 세포 내 콜라겐 생성 시험

(가) Human fibroblast 유래의 Hs68 (ATCC; CRL-1635) 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well으로 6-well plate에 분주하고 세포가 바닥 면에 부착되도록 24시간 배양하였다.

(나) 세포가 바닥 면에 부착한 후에 배양액을 제거하고 세포독성시험 결과를 토대로 세포 생존율이 100%인 농도부터 2~16배 희석한 배지를 처리하고 24시간 동안 배양하였다.

(다) 24시간 뒤, 배양액과 세포를 회수하고 세포 lysate로 단백질을 정량 한 뒤 ELISA kit (mdblproducts; Cat. M036007) 사용하여 배양액에 생성된 콜라겐의 양을 측정하였다.

#### (3) 세포 내 human matrix metalloproteinase 1 (MMP1) 생성억제 시험

(가) Human fibroblast 유래의 Hs68 (ATCC; CRL-1635) 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well으로 6-well plate에 분주하고 세포가 바닥 면에 부착되도록 24시간 배양하였다.

(나) 세포가 바닥 면에 부착한 후에 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 PBS에서 UVB (80 mJ/cm<sup>2</sup>; 312nm)조사를 하였다.

(다) 세포독성시험 결과를 토대로 세포 생존율이 100%인 농도부터 2~16배 희석한 배지를 처리하고 48시간 동안 배양하였다.

(라) 48시간 뒤, 배양액과 세포를 회수하고 세포 lysate로 단백질을 정량 한 뒤 ELISA kit (Amersham; Cat. RPN2610) 사용하여 배양액에 함유된 MMP1양을 측정하였다.

#### (4) 엘라스타제 활성억제 시험

(가) Human fibroblast 유래의 Hs68 세포를 10cm dish에 적당량 분주하여 80%가 되도록 배양하였다.

(나) 배지를 제거하고 Triton-X 100이 0.1%함유된 Tris-HCl buffer (pH 8.0)으로 세포를 회수하고 초음파분쇄기로 세포를 균질화 한 뒤 1,000 rpm, 4°C, 10분으로 원심분리하여 상층액을 엘라스타제를 포함하는 효소액으로 하였다.

(다) 세포독성시험 결과를 토대로 세포 생존율이 100%인 농도부터 2~16배 희석하여 처리하였다.

(라) 엘라스타제의 기질인 STANA (N-succinyl-tri-alanyl-p-nitroanilide)

50 mM과 37°C에서 90분간 반응시키고 Microplate reader로 측정하였다.

$$\text{Elastase activity (\%)} = \frac{\text{Sample group}}{\text{Control group}} \times 100$$

마. 시험 결과

(1) 세포독성 시험

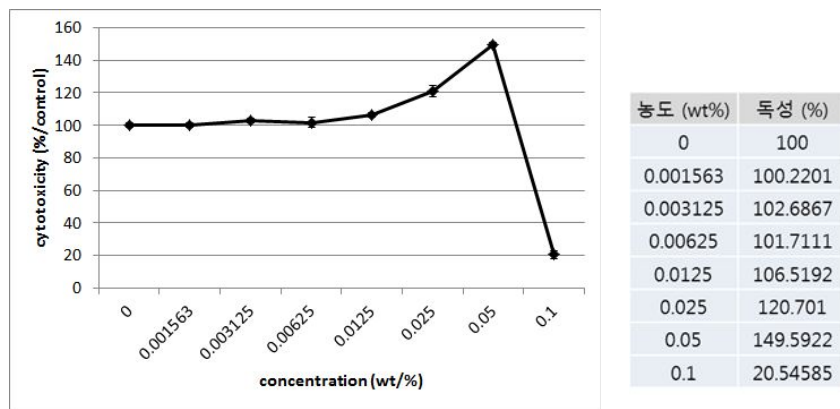


그림 1. GFB-JK의 세포독성

Hs68세포에 GFB-JK를 0.1%부터 0.5%부터 2~64배 배지로 희석하여 농도 별로(0, 0.001563, 0.003125, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1%) 처리하여 24시간 뒤의 세포 독성 유무를 확인하였다. 0.1%에서 세포독성 (20.54 ± 2.29%)을 나타내었으며 0.05%이하의 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았다.

(2) 세포 내 콜라겐 생성 시험

(가) UV 미처리군

세포생존율이 100%인 GFB-JK 농도 0.001 ~ 0.000008% 구간에서 세포 내 콜라겐 생성 정도를 시험하였으며 결과는 그림.6에 나타내었다.



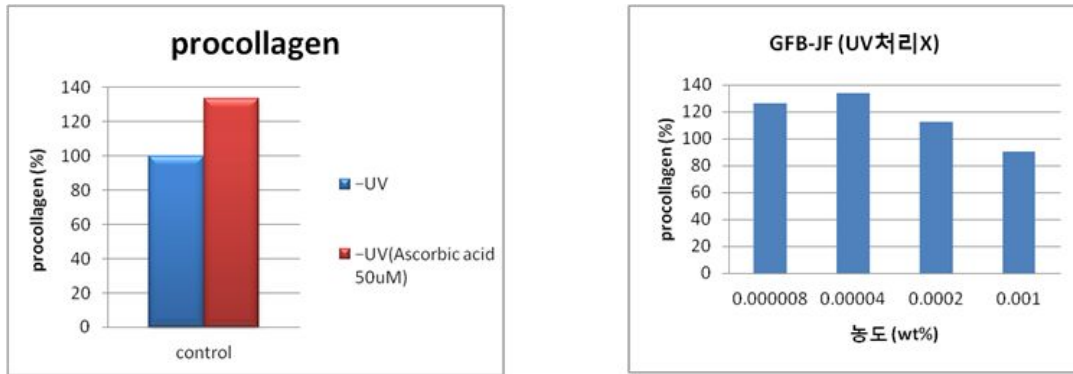


그림 3. UV 미처리시 human fibroblast 콜라겐 생성량의 변화

Ascorbic acid 50uM을 처리한 세포는 control (시료물질의 처리하지 않은 세포대조군) 보다 높은 콜라겐 합성을 촉진하는 효과를 보였으며, 0.0002 ~ 0.000008% 농도구간에서는 control과 비교해 높은 콜라겐 합성을 촉진하는 효과를 보임.

(나) UV 처리군

세포독성이 나타나지 않는 GFB-JK 농도 0.001 ~ 0.000008%의 구간에서 세포 내 콜라겐 생성 정도를 시험하였으며 결과는 그림.7에 나타내었다.

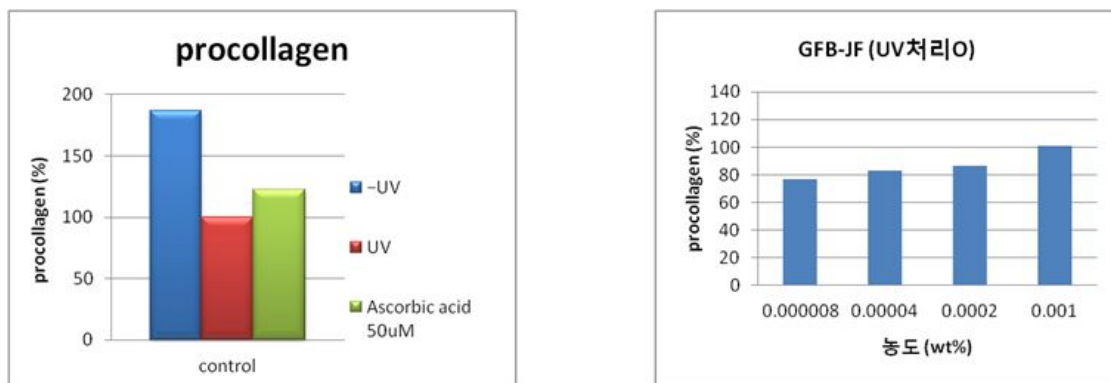


그림3. UV 처리시 human fibroblast 콜라겐 생성량의 변화

시료의 전체 농도 구간은 UV 처리한 세포(negative control)과 비교하였을 때 자외선을 처리한 광노화 조건에서는 콜라겐 합성을 촉진하는 효과가 보이지 않음.

(3) 세포 내 MMP1 생성 억제시험

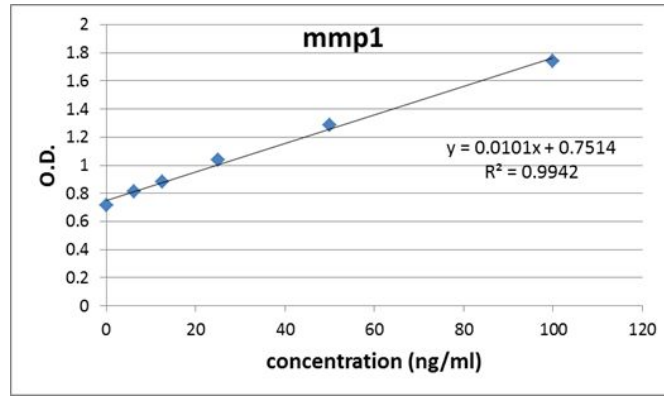


그림 4. Human MMP1표준품의 standard 그래프

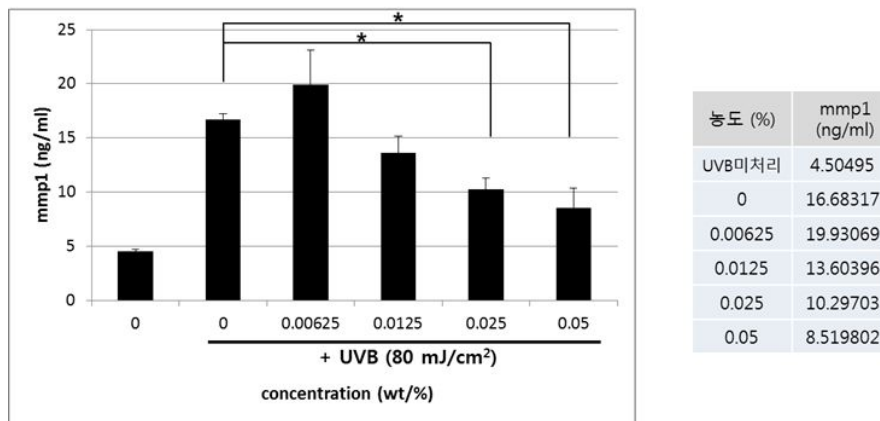


그림 5. GFB-JK처리에 의한 Hs68 cell의 MMP1량의 변화

Hs68세포에 GFB-JK를 0.5%부터 2~16배 배지로 희석하여 농도 별로(0, 0.001563, 0.003125, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05%) 처리하여 48시간 뒤, 배지 속에 함유된 MMP1을 측정하였다. MMP1은 UVB조사에 의하여 생성량이 크게 증가되는 것을 확인하였다 ( $4.50 \pm 0.20 \rightarrow 16.68 \pm 0.53$  ng/ml). 0.00625, 0.0125%의 농도에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았으나 ( $19.93 \pm 3.18$ ;  $13.60 \pm 1.60$  ng/ml), 0.025, 0.05%의 처리농도에서는 MMP1이 유의하게 감소되었음이 확인하였다( $10.30 \pm 0.99$ ;  $8.52 \pm 1.83$  ng/ml). \* $p < 0.05$

(4) 엘라스타제 활성 억제시험

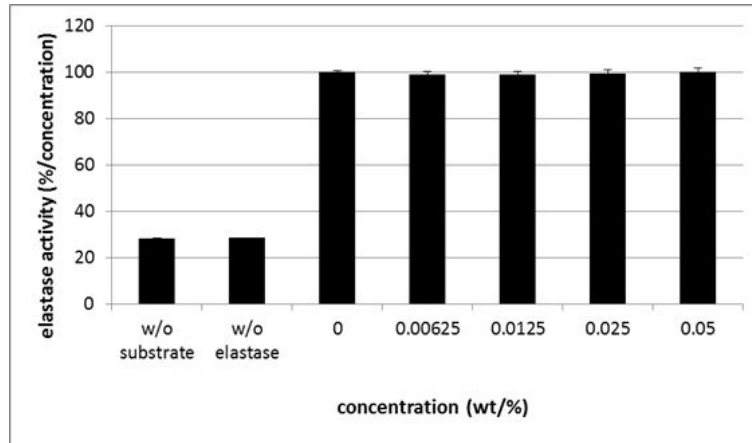


그림 6. GFB-JK처리에 의한 엘라스타제 효소 활성 변화

Hs68세포로부터 cell lysate를 획득하여 엘라스타제를 포함하는 효소액으로 하였다. 효소액을 기질과 반응시키고 동시에 GFB-JK를 0.5%부터 2~16배 배지로 희석하여 농도 별로(0, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05%) 처리하여 엘라스타제 효소 활성을 측정하였다. 어떤 처리 농도에서도 엘라스타제 효소 활성에 변화는 관찰되지 않았다.

#### 바. 결론 및 고찰

- (1) GFB-JK는 Hs68세포에 대하여 0.05%이하의 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다.
- (2) Ascorbic acid 50uM을 처리한 세포는control (시료물질을 처리하지 않은 세포대조군) 보다 높은 콜라겐 합성을 촉진하는 효과를 보였으며 0.0002 ~ 0.00008% 농도구간에서는 control과 비교해 높은 콜라겐 합성을 촉진하는 효과를 보였으며, 자외선을 처리하지 않은 상태에서 GFB-JK는 낮은 농도에서 콜라겐 합성을 촉진하는 효과가 나타났다.
- (3) 시료의 전체 농도 구간은 UV 처리한 세포 (negative control)과 비교하였을 때 자외선을 처리한 광노화 조건에서는 콜라겐 합성을 촉진하는 효과가 보이지 않음.
- (4) Hs68세포에서 생성되는 human MMP1의 양이 GFB-JK 0.025, 0.05%의 농도에서 유의하게 감소되었다.
- (5) GFB-JK는 엘라스타제 효소 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다.
- (6) GFB-JK는 사람의 섬유아세포 유래의 Hs68세포에 있어서 콜라겐 생합성이나 콜라겐을 분해하는 human MMP1의 생성을 억제함으로써 주름개선 효과가 있다고 판단된다.

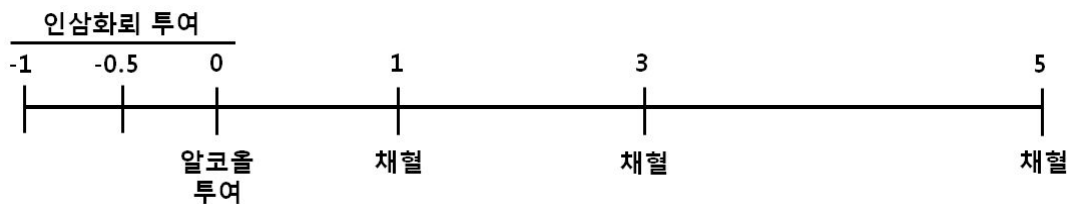
## 제 3 절 간기능개선 효력시험

### 1. 인삼 화퇴의 숙취 개선시험

#### 가. 실험방법

##### (1) 단기 실험

실험에 사용하는 rat은 5주령의 웅성 SD rat을 (주) 오리엔트 (Sungnam, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 plastic rat cage에 보관하여 동물실험실에서  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , light/dark cycle (12/12 hr)의 조건하에서 사육하며, 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하여 실험시작 전 일주일 동안 환경에 적응시켰다. 실험동물은 1, 0.5, 0 시간 전에 인삼 화퇴를 투여한 후 ethanol (6 g/kg) 을 경구투여 하였으며 각 실험 군은 Normal Control 군(NC), Ethanol alone 군(EA), Ethanol + 시료 250 mg/kg 투여군(ER250), Ethanol + 시료 500 mg/kg 투여군(ER500) 등 4개 그룹으로 나누었고 그룹 당 3마리씩 투여하였다.



##### (2) 장기 실험

실험에 사용하는 mouse 는 5주령의 웅성 ICR mouse를 (주) 오리엔트 (Sungnam, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 plastic mouse cage에 보관하여 동물실험실에서  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , light/dark cycle (12/12 hr)의 조건하에서 사육하며, 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하여 실험시작 전 일주일 동안 환경에 적응시켰다. 각 실험 군은 Normal Control 군(NC), Ethanol alone 군(EA), Ethanol + 시료 100 mg/kg 투여군(ER100), Ethanol + 시료 250 mg/kg 투여군(ER250) 등 4개 그룹으로 나누어 (그룹 당 10마리) Ethanol (6 g/kg)과 시료를 아침 (10시), 저녁 (6시)으로 나누어 20일간 경구투여 하였다.

##### (3) 혈액지표분석

혈액 지표 분석을 위한 혈액 채취는 12시간 절식 후 실시하였다. 채혈한 혈액은 5,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 혈청을 분석에 사용하였다. 혈중 알코올, 아세트알데하이드 농도는 각각 ethanol, acetaldehyde 측정 kit (Roche, Germany)를 구입하여 ELISA reader (Thermo, USA)로 측정하였고 간 지표지수인 sALT(serum alanine aminotransferase), sAST (serum aspartate aminotransferase)를 시판되는 측정 키트(Stanbio, USA)를 구입하여 생화학분석기

(SMARTLAB, USA)로 제조사의 사용설명서에 따라 측정하였다.

#### (4) 간 조직의 형태학적 관찰

실험동물에서 적출한 간 조직을 10% neutral buffered formalin을 사용하여 고정하고 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하여 두께 5  $\mu$ m의 관상 절편으로 제작하였다. 이후 xylene을 사용하여 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화 시킨 다음 hematoxylin과 eosin로 염색하고 다시 탈수과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입하고 광학 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

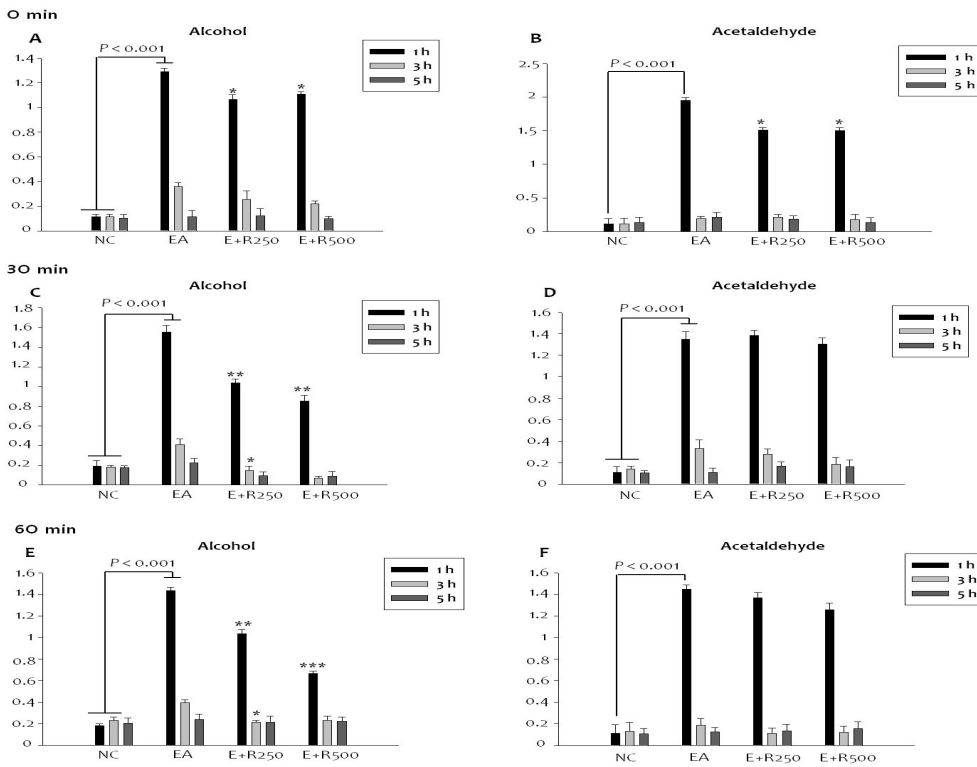
### 나. 실험결과

#### (1) 단기 실험

##### (가) 혈중 알코올, 아세트알데하이드 농도 측정

그림 1은 인삼화퇴 추출물이 혈중 알코올 농도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각각 1시간, 0.5시간, 0시간 전에 인삼화퇴를 투여한 후 Ethanol 을 경구투여 하여 1시간, 3시간, 5시간째에 채혈하여 혈중 알코올농도와 아세트알데하이드 농도를 측정하였다. 패널 A~ F를 종합하여 볼 때 1시간에 알코올만 투여한 그룹의 혈중 알코올 농도와 혈중 아세트알데하이드 농도는 NC 그룹에 비하여 유의적으로 증가하였고 (0 min: 11배, 17배; -30 min: 8배, 12배; -60 min: 7.8배, 12.6배) 반면 인삼 화퇴 250, 500 mg/kg 투여한 그룹은 EA그룹에 비하여 유의적으로 감소(0 min: 18%, 15%, 23%, 23%; -30 min: 34%, 46%; -60 min: 28%, 54%, 6%, 14%)되는 것을 확인하였다. 이 결과로부터 인삼화퇴를 알코올 투여 전 60분에 복용시키는 것이 가장 혈중 알코올 및 아세트알데하이드 농도를 감소시키는 활성이 큼을 알 수 있었다.

[그림 1]

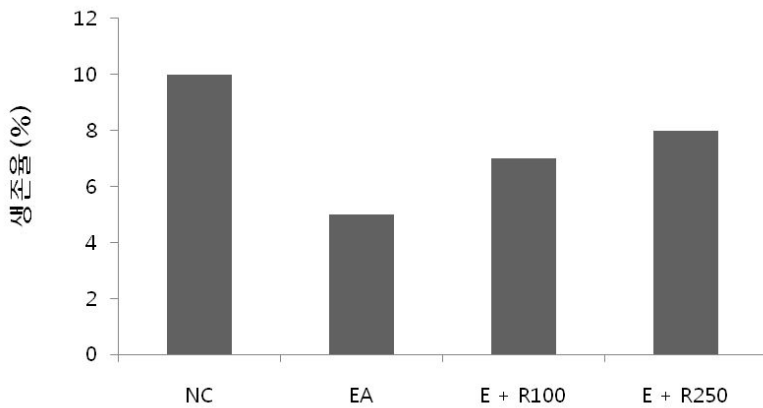


## (2) 장기 실험

### (가) 생존율 측정

그림 2는 인삼화퇴 추출물과 알코올 투여로 인한 생존율 효과를 본 것이다. 그림에서 보다시피 알코올 투여군은 NC그룹에 비하여 생존율이 50%로 나타났지만 인삼화퇴 추출물과 함께 투여한 그룹은 농도별로 각각 70%, 80%로 증가 된 것을 확인하였다. 이로부터 인삼화퇴 추출물은 알코올 투여로 인한 damage를 감소시키는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

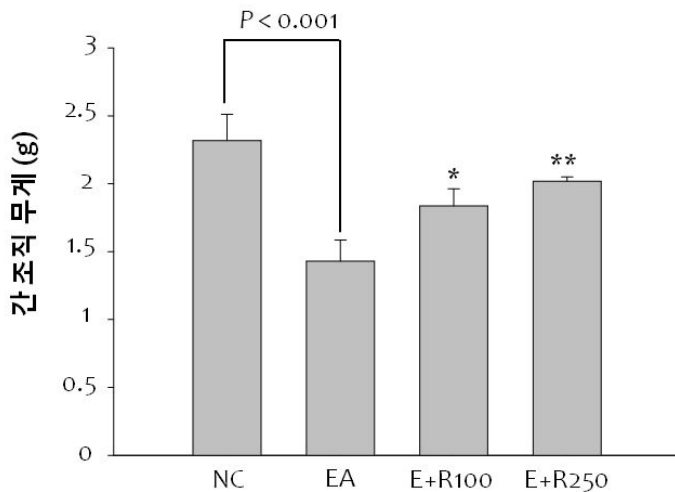
[그림 2]



(나) 간조직 무게 측정

그림 3은 알코올 투여로 인한 간조직 무게를 측정하는 것이다. 그림에서 보듯이 알코올 투여군은 NC그룹에 비하여 무게가 39% 감소되었지만 인삼화피 추출물과 함께 투여한 그룹은 농도별로 각각 28%, 41% 유의적으로 증가된 것을 확인하였다. 이로부터 인삼화피 추출물은 알코올 투여로 인한 간 조직 보호효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

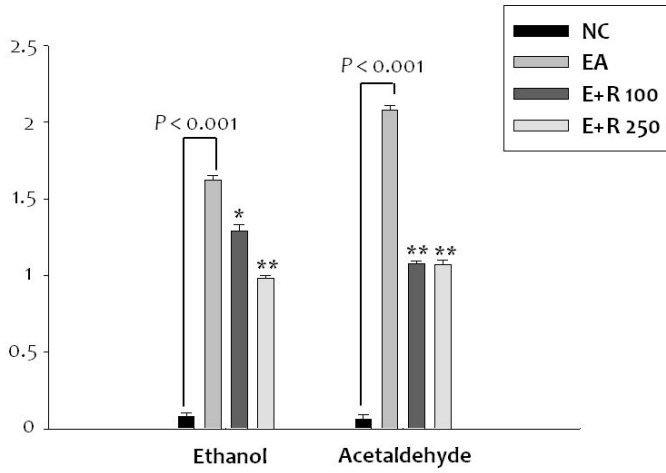
[그림 3]



(다) 혈중 알코올 농도, 혈중 아세트알데하이드 농도 측정

그림 4는 알코올과 인삼화피 투여 20일 째에 mouse를 개복하여 심장채혈 한 후 혈중 알코올 농도와 혈중 아세트알데하이드 농도를 측정하는 것이다. 그림에서 보듯이 알코올만 투여한 그룹은 NC그룹보다 혈중 알코올 농도와 혈중 아세트알데하이드 농도는 각각 20배, 34배 유의적으로 증가되었고 반면 인삼화피 추출물을 투여한 그룹은 농도 의존적으로 (알코올: 21%, 40%; 아세트알데하이드: 49%, 49%) 감소되었다.

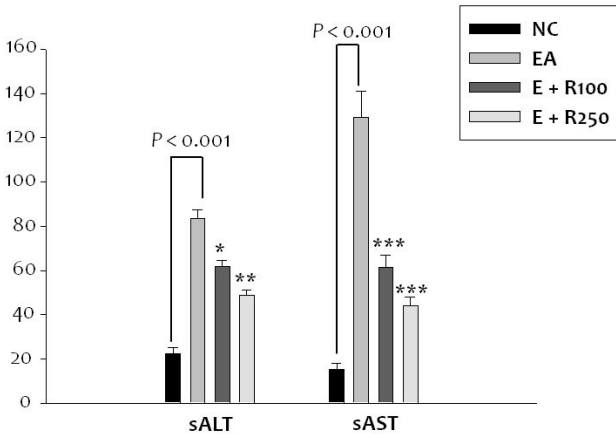
[그림 4]



(라) 간 기능 지표 (sALT, sAST) 측정

그림 5는 알코올과 인삼화퇴 투여 20일 째에 mouse를 개복하여 심장채혈 한 후 간 기능 지표인 sALT와 sAST 농도를 측정하였다. 그림에서 보듯이 알코올만 투여한 그룹은 NC그룹보다 sALT, sAST 농도는 각각 3.7배, 8.5배 유의적으로 증가되었고 반면 인삼화퇴 추출물을 투여한 그룹은 농도 의존적으로 (sALT: 27%, 42%; sAST: 53%, 66%) 감소되었다.

[그림 5]





## 2. Ginsenoside Re의 간기능 개선 시험

### 가. 실험방법

#### (1) 세포 배양

Human hepatoma cell line HepG2는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100U/ml), streptomycin (100U/ml) 을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지(Gibco)를 사용하였고 CO<sub>2</sub> 배양기에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건에서 배양하였다.

#### (2) 동물실험

실험에 사용하는 마우스는 5주령의 웅성 C57BL/6J 마우스를 (주) 오리엔트 (Sungnam, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 plastic mouse cage에 보관하여 동물실험실에서 23±2°C, 상대습도 50±10%, light/dark cycle (12/12 hr)의 조건하에서 사육하며, 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하여 실험시작 전 일주일 동안 환경에 적응시켰다. 실험동물은 Regular Diet (RD)군, High-fat diet (HFD, 고지방식이투여)군, HFD+Re 5 군, HFD+Re 10 군, HFD+Re 20 군 등 5개 그룹으로 나누었으며 3주 동안 매일 경구투여 하였다. 각 실험 군은6마리씩 나누었고 체중과 혈당은 주 1회 측정하였다.

#### (3) 혈액지표분석

혈액 지표 분석을 위한 혈액 채취는 12시간 절식 후 실시하였다. 채혈한 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 혈청을 분석에 사용하였다. 혈중 포도당, 중성지방, NEFA, 시판 kit(Stanbio, USA)를 구입하여 생화학 분석기기 (SMARTLAB, USA)를 사용하여 측정하였고 혈중 인슐린 농도는 마우스 insulin ELISA kit (Shibayagi, Japan)를 구입하여 ELISA reader (Labsystems, Finland)로 측정하였다.

#### (4) 간의 형태학적관찰

실험동물에서 적출한 간(liver)을 10% neutral buffered formalin을 사용하여 고정하고 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블럭을 제작하여 두께 5 μm의 관상 절편으로 제작하였다. 이후 xylene을 사용하여 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화 시킨 다음 hematoxylin과 eosin로 염색하고 다시 탈수과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입하고 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

#### (5) 단백질추출 및 Western blot

liver와 HepG2 cell을 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.25% sucrose,

0.4 mg/ml digonin and 1.5 mM PMSF)와 함께 균질화 시킨 후 단백질을 4 °C에서 20분간 13000rpm속도로 원심 분리하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad assay reagent (Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였고 분석한 단백질 30 µg을 SDS-PAGE로 분리한 후 gel membrane 에 transfer 하고 5% skim milk로 상온에서 1시간 blocking 한 후 1:1000 비율로 희석시킨 primary antibody와 4 °C에서 overnight 반응 하였다. 다음 Tris-buffered saline tween-20 (TBST)로 3번 washing한 후 1:2000 비율로 희석시킨 secondary antibody와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 TBST로 3번 washing하고 ECL solution (Amersham, Sweden)을 이용하여 X-ray 필름에 developing 하였다.

#### (6) RNA 추출 및 RT-PCR

total RNA는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform 분리 방법을 이용하여 분리하였다. 물 층에 있는 total RNA는 isoproryl alcohol을 이용하여 침전시키고 분리한 RNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였으며 총 RNA 1µg을 Moloney murine leukemia virus transcriptase와 Oligo(dT)15 primer를 이용하여 역 전사 하였다. Primer는 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dNTP, 5µl cDNA 그리고 2.5 unit 의 Taq DNA polymerase가 포함되어 있는 25µl의 반응 용액에 각각의 최종 농도가 0.5 µM이 되도록 첨가하였다. PCR 조건은 95 °C에서 1분 동안 변성, 30초 동안 붙임, 72 °C에서 1분 동안 연장을 하여 총 30 cycle 하였다. 이후, 반응 생성물을 0.5 µg/ml ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel을 이용하여 100V에서 전기영동 하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) 혈액지표 분석

표 1은 혈중 포도당 농도와 인슐린저항성 지수를 그룹 간 비교한 결과로 공복 시 혈당을 보면 Re 20 투여그룹은 고지방식이 (HFD) 그룹에 비하여 19% 감소하였고 인슐린농도는 진세노사이드 Re 투여그룹은 HFD 그룹에 비하여 각각 6.3%, 11.9%, 17.1% 감소된 것을 알수 있었다. 또한 TG, NEFA를 측정하였을 때 Re 투여군은 HFD군에 비해 효과가 있음을 알수 있었다.

**Table 1.** Effect of Re on blood glucose, Insulin, HOMA-IR, TG, NEFA in mice fed a high fat diet

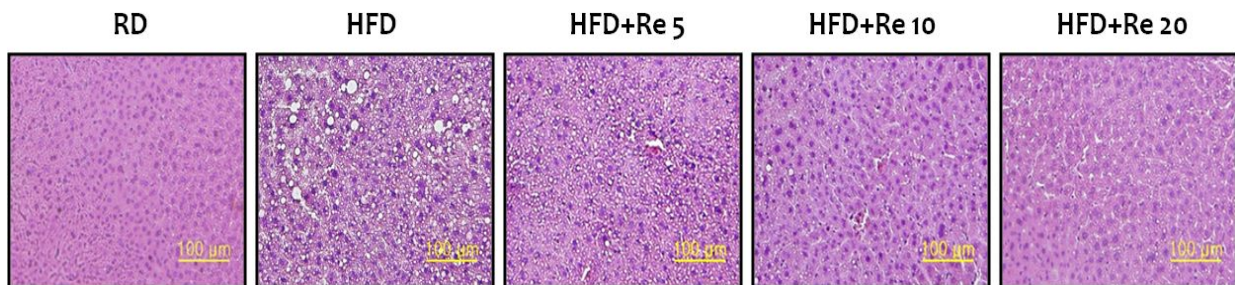
	Blood glucose (mM)	Insulin (U/ml)	HOMA-IR	Triglyceride (mg/dl)	NEFA (mEq/L)
Con	7.6±0.2	272.7±6.3	91.7±2.0	56.2±3.7	641.4±24.8
HFD	9.5±0.4 <sup>***</sup>	331.2±17.9 <sup>*</sup>	139.2±7.7 <sup>**</sup>	77.9±8.2 <sup>*</sup>	870.2±33.6 <sup>***</sup>
Re 5	9.5±0.4	313.8±17.6	133.1±11.0	74.1±7.8	787.0±21.7
Re 10	9.4±0.2	295.1±12.6	123.0±7.2	69.1±6.1	742.5±28.4 <sup>#</sup>
Re 20	7.7±0.3 <sup>###</sup>	278.1±8.6 <sup>#</sup>	94.9±2.8 <sup>#</sup>	54.9±3.8 <sup>#</sup>	707.5±28.3 <sup>###</sup>

Values represent the mean ± SE (n=6).

## (2) 간조직의 형태학관찰

그림 1은 헤마톡실린/에오신 염색을 하여 고지방식으로 지방간을 유도한 마우스에서 진세노사이드 Re가 간의 형태에 미치는 영향을 본 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 HFD군에서 많은 지방들이 관찰 되었지만 진세노사이드 Re 투여군에서는 지방구가 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 인삼화뢰가 혈당, TG, NEFA 등 조절할 뿐만 아니라 비알코올성 지방간 (non-alcoholic fatty liver disease)에도 탁월한 효과가 있을것이라는 것을 알수 있었다.

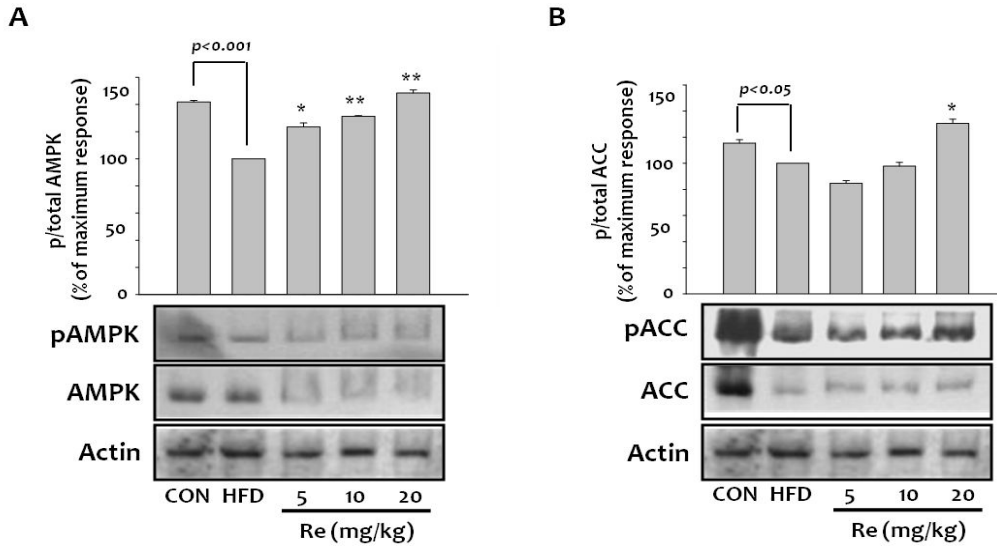
### [그림 1]



## (3) 간에서 AMPK 및 ACC의 인산화 확인

그림 2는 C57BL/6J 마우스의 간에서 pAMPK, pACC의 단백질을 western blot으로 측정 한 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 HFD군에 비해 인삼화뢰 투여군에서는 AMPK가 용량의존적으로 현저하게 phosphorylation 되었으며 ACC 역시 현저하게 phosphorylation 되었다.

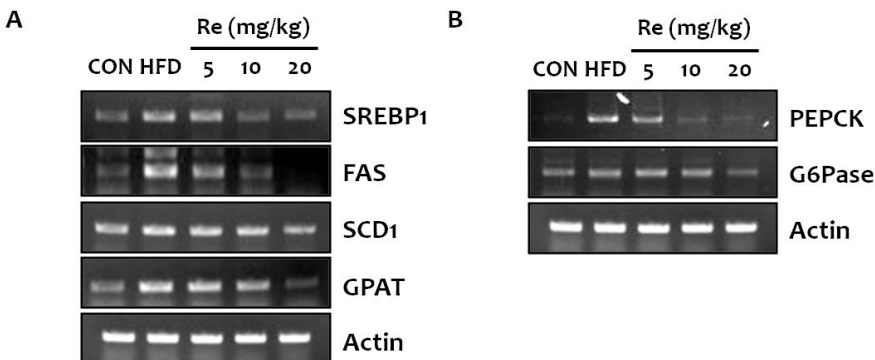
### [그림 2]



(4) 간에서 지방생성 및 당신생 유전자 발현 확인

그림 3은 간 조직에서 중성지방 합성 및 분해에 관여하는 유전자들의 mRNA level을 RT-PCR로 그룹간 비교한 것이다. 그림 3에서 보는 바와 같이 인삼화되 투여군에서 지방합성 (lipogenesis) 관련 gene 들인 SREBP1 $\alpha$ , FAS, SCD1 등 gene들의 발현을 HFD그룹과 비교하였을 때 현저하게 감소된 것을 볼수 있었으며 당신생 관련 gene인 PEPCK와 G6Pase 또한 감소되었다. 이러한 결과로부터 진세노사이드 Re가 지방축적 억제, 당신생 억제 등에 효과가 있다는 것을 알수 있었다.

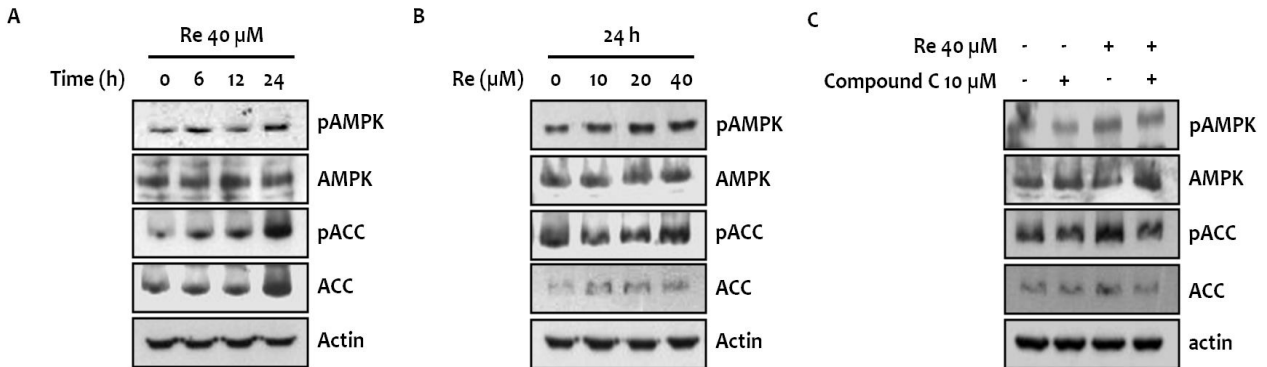
[그림 3]



(5) Human hepatoma cell-HepG2에서 AMPK 및 ACC의 인산화 확인

그림 4A와 4B 에서 보는 바와 같이 진세노사이드 Re는 용량, 시간 의존적으로 AMPK와 ACC를 현저하게 인산화 시켰다. 한편 그림 C에서는 AMPK inhibitor인 compound C를 전처리하였을 때 AMPK와 ACC 인산화가 억제됨을 확인하였다. 이 결과로부터 진세노사이드 Re가 AMPK 경로를 통하여 생리활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

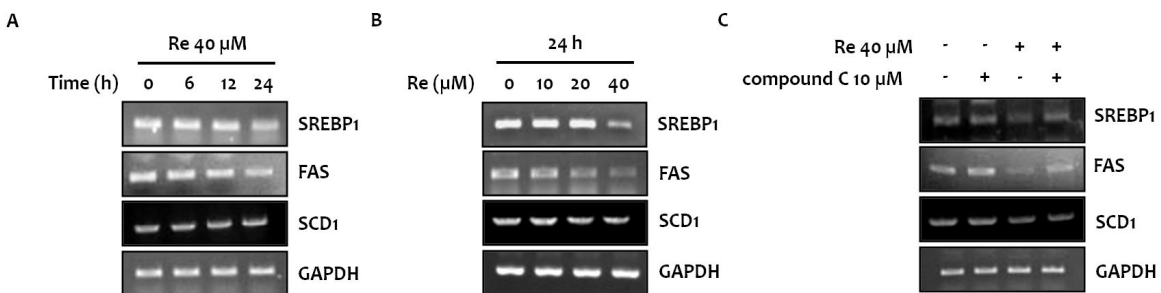
[그림 4]



(6) HepG2에서 지방생성 전사인자(SREBP1) 발현과 target gene에 미치는 영향

그림 5는 mRNA 발현을 RT-PCR 방법으로 확인하고 SREBP1 및 그 target gene들의 mRNA 발현을 측정하였다. 그림에서 A와 B에서 유전자/단백질의 발현이 시간별 농도별로 진세노사이드 Re에 의하여 감소되는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 Re의 lipogenesis 관련 유전자에 대한 효과들이 AMPK와 관련이 있는지를 알아보기 위해 HepG2 세포에 AMPK inhibitor인 compound C를 전처리하였을 때 lipogenesis gene들인 SREBP-1, SCD1, FAS가 증가한 것을 알 수 있었다.

[그림 5]



### 3. 초음파 처리 인삼화뢰 제제의 숙취 및 간기능 개선 실험

#### 가. 실험방법

##### (1) 실험동물 및 약물투여

5주령의 SD rats을 (주)중앙동물로부터 구입하여 1주일 동안 고형사료와 물을 섭취하면서 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다. 정상군(CON), 초음파 처리 인삼화뢰군(GFB 300 mg/kg), 에탄올투여군(ETOH), 초음파 처리 인삼화뢰 실험군(ETOH+GFB 투여군)과 대조군(ETOH+Silymarine 100 mg/kg) 등 각 6마리씩 5개 그룹으로 나누었으며 정상군과 초음파 처리 인삼화뢰군은 Lieber-DeCarli Control Diet를 섭취시켰고 나머지 그룹은 Lieber-DeCarli Diet를 5% 에탄올에 희석시켜 섭취시켰다. 초음파 처리 인삼화뢰 투여는 Lieber-DeCarli 에탄올 식이 섭취 6주 후부터 시작하였다. 초음파 처리 인삼화뢰는 5% carboxymethyl cellulose에 용해하여 10일간 경구 투여하였다.

##### (2) 혈액지표분석

혈액 지표 분석을 위한 혈액 채취는 12시간 절식 시킨 후 실시하였다. 채혈한 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 혈청을 분석에 사용하였다. 혈중 총 콜레스테롤(Total cholesterol), HDL-콜레스테롤, 중성지방 (triglyceride, TG), ALP, ALT, AST 시판 kit (Stanbio, USA)를 구입하여 생화학 분석기기 (SMARTLAB, USA)을 사용하여 측정하였고 혈중 TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )는 RAT TNF- $\alpha$  ELISA kit (BD Bioscience, USA)를 구입하여 측정하였다.

##### (3) 간조직에서 MDA 및 GSH 함량측정

간 조직에서 MDA 측정은 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 방법으로 측정하였다. 간 조직에 1 ml의 Tris-완충액 (pH=7.0)을 넣고 분쇄한 후 4°C에서 600×g로 10분간 원심분리 하였다. 상층 액 0.3 ml에 0.9 ml의 TCA 용액(8%),을 넣고 4°C에서 10,000×g로 5분간 원심 분리한 후에 상층 액 1 ml 에 TBA 용액 (1%) 0.25 ml을 넣고 100°C에서 20분간 가열한 후 상온까지 냉각시키고 2 ml의 n-butanol을 넣고 90초 동안 진탕시켰다. 다시 4°C, 3,000×g에서 5분간 원심분리 한 후 1 ml의 butanol 층을 취하여 532 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 malonaldehyde bis(dimethyl acetal)을 표준으로 하여 같은 방법으로 만들었다. 분석결과는 (pmol/ mg protein으로 표시하였다. 단백질 정량은 BCA 방법으로 하였고 표준품은 소 혈청 알부민으로 하였다. 간 조직에서 GSH (Gluthaione) 함량은 GSH assay kit (BIOXYTECH® GSH-400)로 측정하였다.

##### (4) 조직의 형태학적 관찰

쥐에서 적출한 간 조직을 10% neutral buffered formalin을 사용하여 고정. 이후 탈수 및 포

매 과정을 거쳐 파라핀 블럭을 제작하고 두께 5  $\mu\text{m}$ 의 관상 절편으로 제작한 후 xylene으로 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화 시킨 후 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다. Oil red O 염색은 10% sucrose 용액에 고정하였던 간 조직을 Optimal Cutting Temperature Compound (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan)으로 포매한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 두께 15 $\mu\text{m}$ 의 관상 절편으로 제작한 후 Oil red O 와 hematoxylin으로 염색하여 광학현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

## (5) Western blot analysis

단백질 발현 분석을 위해 간 조직을 lysis buffer를 이용하여 균질화 시켰다. 단백질 정량은 Bio-Rad assay reagent (Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였고 정량한 단백질 20  $\mu\text{g}$ 을 8% SDS-PAGE 로 분리한 후 gel을 membrane (Milipore, Cat. No: IPVH00010)에 transfer하고 5% skim milk로 상온에서 1시간 blocking 한 후 1:3000 비율로 희석시킨 primary antibody (P-AMPK, AMPK, P-ACC, ACC)와  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 하였다. 다음 Tris-buffered saline Tween-20 (TBST)로 4번 washing 한 후 1:5000의 비율로 희석시킨 secondary antibody와 상온에서 1시간 반응. 이 후 TBST로 4번 washing하고 ECL solution (Amersham, Sweden) 을 이용하여 X-ray 필름에 developing 하였다.

## (6) 간 조직에서 유전자발현 측정

간조직에서 total RNA분리는EASY-BLUE total RNA extraction kit의 방법대로 분리하였고 cDNA 합성은 5 $\mu\text{g}$  의 RNA, oligo (15)-dT primers 와 reverse transcriptase 등을 이용하여 합성하였다. SREBP1c, FAS, SCD1, GPAT, PPAR- $\alpha$ , CD36, TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2 의 유전자 발현은 LightCycler Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)으로 SYBR Premix Ex Taq 용액을 사용하여 측정하였으며 CPN은 증폭된 유전자들의 대조군으로 사용하였다. Primer의 종류 및 서열은 다음과 같다. SREBP1c (Sterol regulatory element-binding proteins)의 주형사 서열은 5'-ACG ACG GAG CCA TGG ATT G-3', 비주형사 서열은5'-TTT GAT TGG AGG CCC AGG GG-3' ; FAS Fattyacidsynthesis)의 주형사 서열은 5'-GCA GTC GCT CAT CAA GCT CT-3', 비주형사 서열은5'-GGC TCA TTT TCC AGG CTA CC-3'; SCD1 (StearoylCoAdesaturase)의 주형사 서열은 5'-GTG TTG AAC CTT CCC CGA CT-3', 비주형사 서열은 5'-TGG AGG TAG GGA GGA TCT GG-3'; GPAT (Glycerol-3-phosphateacyltransferase)의 주형사 서열은 5'-GGG GCT TTT TCA TAA GAC GG-3', 비주형사 서열은 5'-TAA CGC CTC TTG CCA CAC TC-3'; PPAR- $\alpha$  (Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$ )의 주형사 서열은 5'-TCG CAG GAA AGA CTA GCA AC-3', 비주형사 서열은 5'-ATG CAC AAG GTC TCC ATG TC-3'; CD36의 주형사 서열은 5'-GAA GCA CTG AAG AAT CTG AAG AG-3', 비주형사 서열은 5'-TCC AAC ACC AAG TAA GAC CAT C-3'; TNF- $\alpha$ 의 주형사 서열은 5'-TTA GAG TTG TCC ACA GTT CGG AGA-3', 비주형사 서열은 5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3'; iNOS의 주형사 서열은 5'-ATG GCT TGC CCC TGG AAF T-3', 비주형사 서열은 5'-GTA CTT GGG ATG CTC CAT GGT CA-3'; COX-2의 주형사 서열은 5'-ATG CTC TTC

CGA GCT GTG CT-3', 비주형사 서열은 5'-TTA CAG CTC AGT TGA ACG CCT TTT-3'; CPN의 주형사 서열은 5'-ATG GTC AAC CCA CCG TG-3', 비주형사 서열은 5'-TTA GAG TTG TCC ACA GTT CGG AGA-3'이다. PCR 반응 조건은 SREBP1-c, FAS, SCD1, PPAR- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  의 경우 95°C에서 30초 동안 변성, 50°C에서 30초 동안 붙임, 72°C에서 30초 동안 연장을 하여 총 40 cycle 하고 GPAT, CPN, CD36, COX-2, iNOS의 경우 95°C에서 30초 동안 변성, 60°C에서 30초 동안 붙임, 72°C에서 30초 동안 연장을 하여 총 40 cycle 하였다.

## (7) 자료 분석 및 통계 처리

모든 실험 결과는 평균±표준 오차로 나타내었다. 에탄올 대조군 (ETOH)과 비교하여 통계적 유의성을 Student Newman Keuls-test로 처리하였으며  $P < 0.05$  이하인 경우 유의성 있는 차이가 있는 것으로 판정하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) 혈액지표분석 결과

Table 1은 10일 동안 시료를 경구 투여한 후, 12시간 절식시켜 공복 상태의 실험동물에서 전혈을 채취한 후 측정된 중성지방(TG), Total cholesterol (TC), HDL-C, 유리지방산 (NEFA), ALP, sALT, sAST, TNF- $\alpha$ 의 농도를 나타낸 것이다. 혈중 중성지방은 ETOH군에서 CON군에 비해 유의적으로 높았으며 ( $p < 0.001$ ) GFB+ETOH 투여군에서는 ETOH 대조군에 비해 25.7% ( $p < 0.01$ ) 낮아지는 결과를 보여주었다. 총 콜레스테롤 (TC)과 HDL-C 역시 ETOH 군에서 CON 군에 비해 유의적으로 높았으나 ( $p < 0.001$ ) GFB+ETOH 투여군에서는 ETOH 대조군에 비해 낮아지는 경향을 보이지 않았다. 유리지방산은 CON군과 ETOH 군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 혈중 ALP, ALT, AST 및 TNF- $\alpha$  는 ETOH군에서 CON 군에 비해 유의적으로 높았으며 GFB+ETOH 투여군에서는 ETOH 대조군에 비해 각각 23.8% ( $p < 0.001$ ), 9.0%, 18.1% ( $p < 0.05$ ), 15.1% ( $p < 0.05$ ) 낮아지는 결과를 보여주었다. 이 결과는 초음파 처리 인삼화퇴 제제가 ETOH로 유발된 흰쥐의 간 독성에 개선 작용이 있음을 보여주었다.



Table 1. Effects of ginseng flower buds on blood chemistry in the ethanol-fed rats

	CON	인삼화퇴 제제(GFB)	ETOH	ETOH+GFB	ETOH+ Silymarine
TG (mg/dL)	59.8±7.3	59.0±11.2	70.8±11.9 <sup>†††</sup>	52.6±3.6 <sup>**</sup>	49.7±12.7
TC (mg/dL)	67.5±3.4	74.5±3.5	113.7±7.3 <sup>†††</sup>	113.6±6.5	114±3.6
HDL-C (mg/dL)	0.082±0.006	0.086±0.005	0.140±0.007 <sup>†</sup>	0.140±0.006	0.140±0.005
NEFA (uEq/L)	386.2±49.3	368.6±23.1	361.2±28.9	384.8±18.5	202.8±20.1 <sup>**</sup>
ALP (U/L)	179.0±6.4	178.6±8.1	233.8±3.7 <sup>†††</sup>	178.2±7.4 <sup>***</sup>	186.8±4.4 <sup>***</sup>
sALT(U/L)	44.1±2.1	48.6±1.9	86.8±3.8 <sup>†</sup>	79.0±5.8	114.6±22.7
sAST (U/L)	71.9±5.2	73.6±4.2	124.0±7.6 <sup>†††</sup>	101.6±11.0 <sup>*</sup>	151.2±7.6
TNF-α (pg/ml)	11.6±0.8	11.8±0.8	18.6±0.4 <sup>†††</sup>	15.8±0.5 <sup>*</sup>	19.8±1.4

### (2) 간 조직에서 MDA 및 GSH 측정 결과

Table 2 는 간 조직에서 MDA, 및 GSH 측정 결과를 나타낸 것이다. MDA 수치는 ETOH군에서 CON군에 비해 유의적으로 높았으며 ( $p<0.001$ ) GFB+ETOH 투여군에서는 ETOH 대조군에 비해 27.3% ( $p<0.01$ ) 낮아지는 결과를 보여주었다. GSH 수치는 ETOH군에서 CON 군에 비해 유의적으로 낮았으나 ( $p<0.001$ ) GFB+ETOH 투여군에서는 ETOH 대조군에 비해 158.0% ( $p<0.01$ ) 높아지는 결과를 보여주었다.

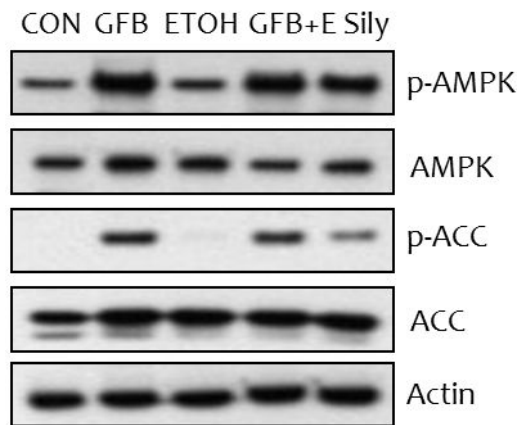
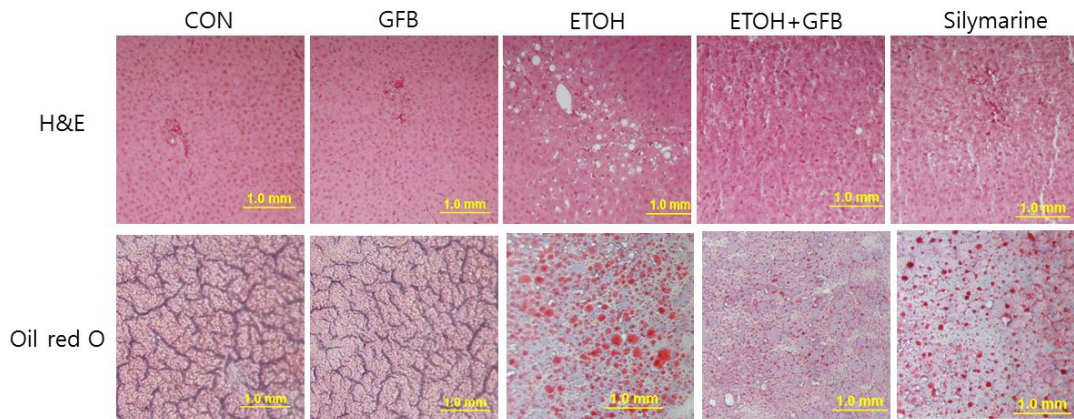
Table 2. Effects of GFB on MDA and GSH in the liver of ethanol-fed rats

	CON	GFB	ETOH	ETOH+GFB	ETOH+ Silymarine
MDA (pmol/mg protein)	87.9±3.0	81.2±1.3	151.5±8.0 <sup>†††</sup>	110.1±9.4 <sup>**</sup>	120.9±9.8 <sup>**</sup>
G S H ( m g / g protein)	75.8±1.8	77.2±4.3	38.3±4.7 <sup>†††</sup>	60.5±4.8 <sup>**</sup>	48.1±5.1

### (3) 간 조직의 조직형태학적 관찰

아래 그림은 초음파 처리 인삼화퇴 제제가 간 조직의 형태에 미치는 영향을 살펴본 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 ETOH군에서 많은 지방구 (lipid droplet)들이 관찰 되었지만 초음파 처리 인삼화퇴+ETOH 투여군에서는 지방구가 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 초음파 처리 인삼화퇴 제제가 알코올성 지방간에 탁월한 효과가 있음을 보여주는

그림이다.



#### (4) Western blot analysis

초음파 처리 인삼화퇴 제제의 알코올성지방간 보호작용기전이 AMPK activation과 관련이 있는지를 살펴보기 위하여 간 조직에서 AMPK activation을 Western blot 방법으로 측정하였다. 옆 그림에서 보는바와 같이 ETOH 모델군에 비해 GFB+ ETOH투여군에서는 AMPK 가 현저하게 phosphorylation 되었으며 ACC 역시 현저하게 phosphorylation 되었다.

#### (5) Real-time PCR

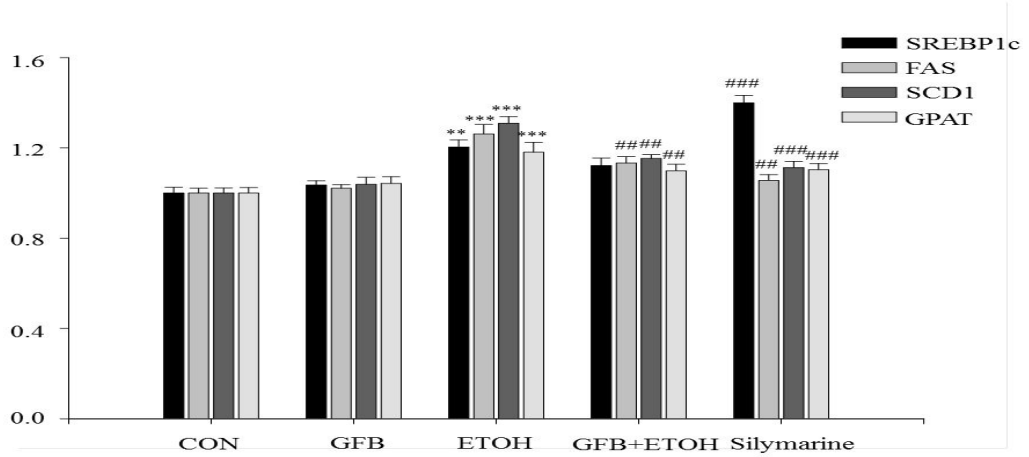
Real-time PCR 결과에서 CON군에 비하여 ETOH군에서 lipogenesis 관련 gene들인 SREBP1c, FAS, SCD1, GPAT등 gene들의 발현은 유의적으로 증가한 반면 초음파 처리 인삼화퇴+ETOH 투여군에서는 SREBP1c 유전자 발현은 감소되는 경향을 보였고 FAS, SCD1, GPAT등 gene들의 발현은 유의적으로 감소하였다 (A). CON군에 비하여 ETOH군에서 lipolysis 관련 gene 들인 CD36, PPAR- $\alpha$ 의 발현은 유의적으로 감소한 반면 ETOH군에 비하여 GFB+ETOH 투여군에서는 CD36, PPAR- $\alpha$  유전자 발현이 유의적으로 증가하였다 (B). 옆

증관련 gene 들인 TNF-a, iNOS, COX-2의 발현은 CON군에 비하여 ETOH군에서 유의적으로 증가한 반면 ETOH군에 비하여 초음파 처리 인삼화뢰+ETOH 투여군에서는 현저하게 감소하였다 (C).

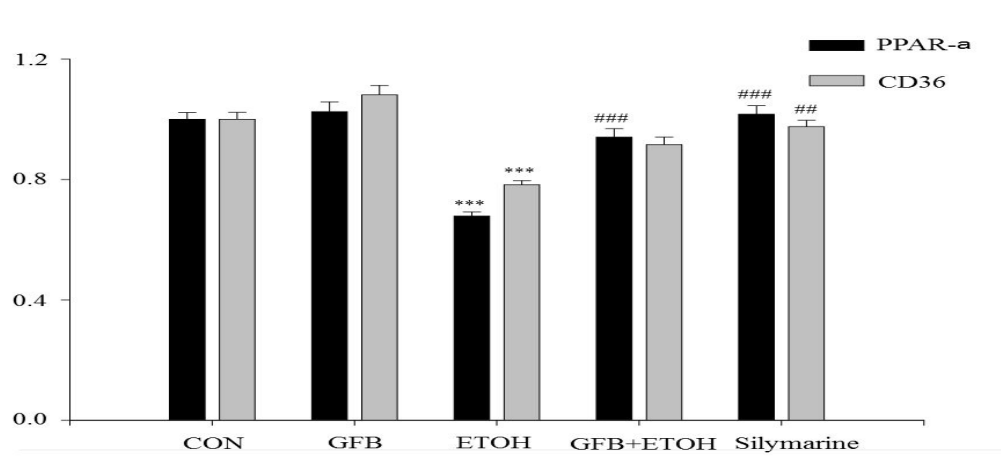
#### 다. 결 론

이상의 결과에서 초음파 처리 인삼화뢰 제제는 ETOH에 의해 유도된 지방간에 현저한 개선 효과가 있으며, 본 제제의 알콜성 지방간 개선 효과 작용기전은 간 조직에서 AMPK signaling pathway를 활성화시킴으로서 지방산의 산화를 촉진한 결과 중성지방의 축적을 억제하고 추가로 염증유발 유전자들의 발현을 억제함으로써 알코올성 지방간의 간 독성을 개선한 것으로 추측되어 향후 제제가 숙취개선 건강기능식품으로 개발되는데 기초적인 자료로 활용될 것으로 기대한다.

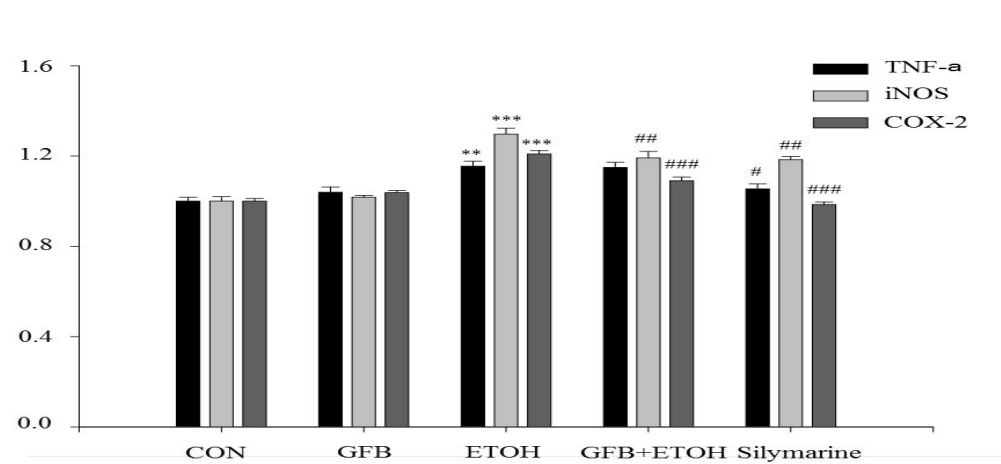
A



B

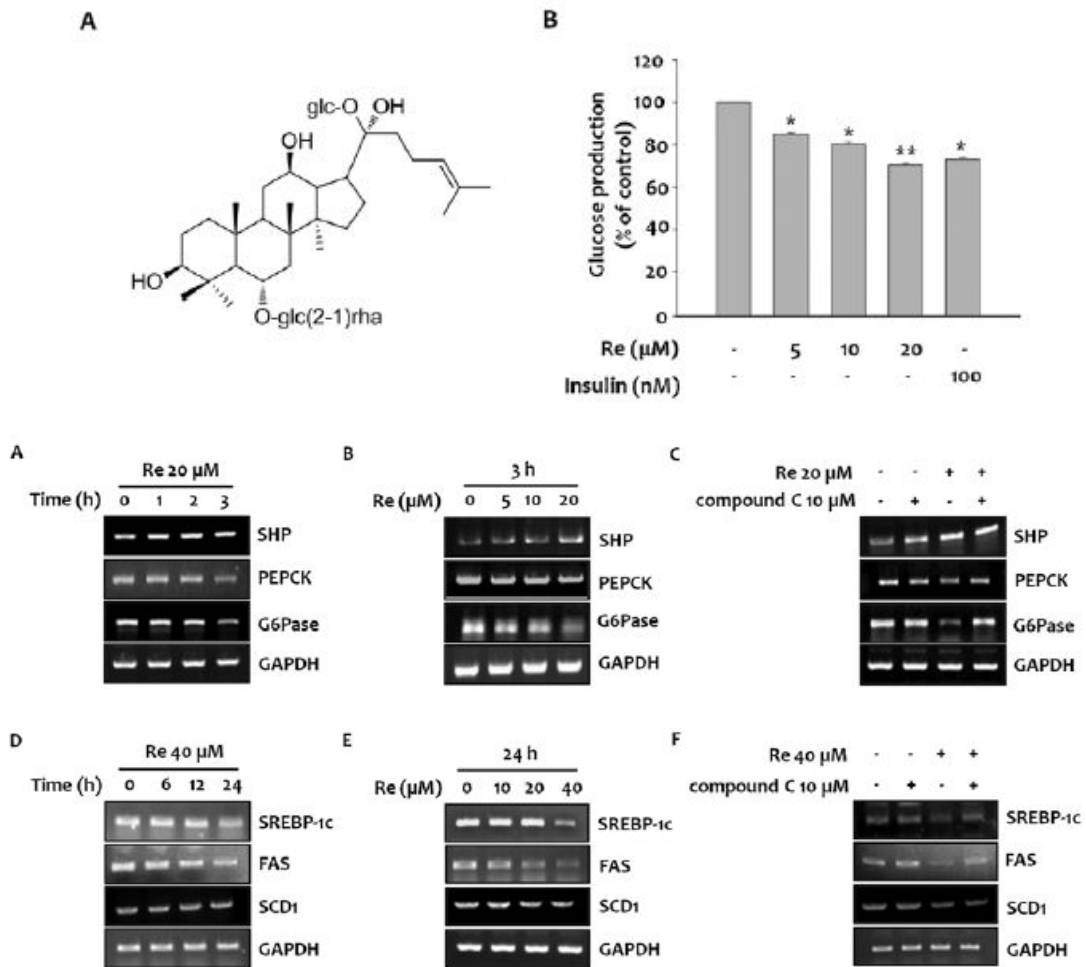


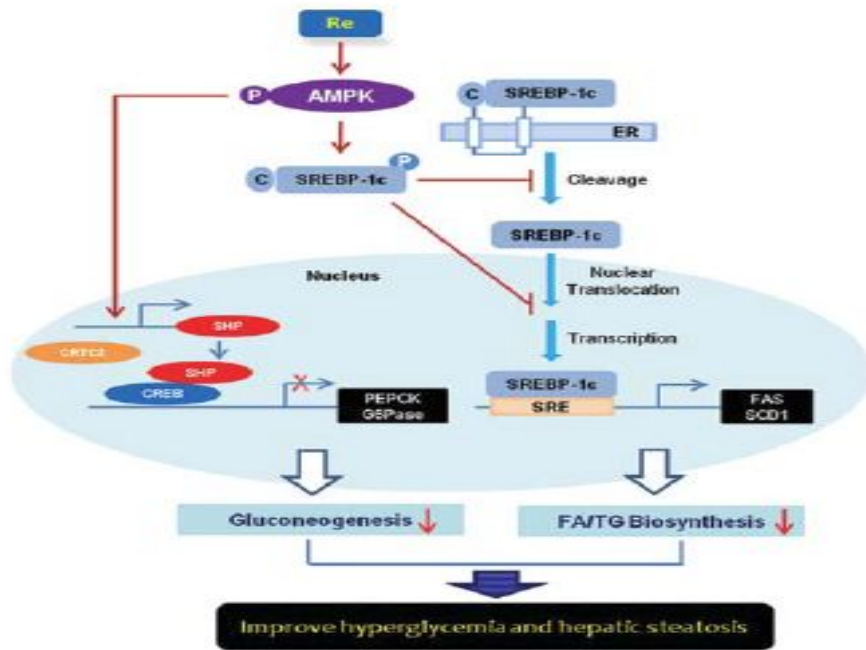
C



#### 4. 진세노사이드 Re의 간기능 개선 기전실험

인삼화퇴의 주성분인 Re의 간기능 개선활성을 HepG2 cell과 고지방식이를 섭취시킨 C57BL/6J에서 살펴보았음. Re는 orphan nuclear receptor small heterodimer partner (SHP)의 발현을 증가시켜 당신생을 억제하였고 SREBP-1C 그리고 이것의 타깃인 FAS, SCD1 유전자 발현을 억제함으로 중성지방합성을 억제하였음. 이러한 효과는 AMPK를 활성화함으로 나타난 것으로 AMPK inhibitor인 compound C를 이용하여 검증하였음. 5-20 mg/kg/day 용량으로 3주간 투여한 동물실험에서도 시험관내 실험의 결과와 유사한 결과를 보여주었음. 곧 혈당을 개선시켰고 간에서 지방간을 개선시켰음.





Proposed model for Re to suppress gluconeogenesis and lipogenesis through SHP induction and SREBP-1c regulation, respectively, via AMPK activation: potential therapeutic implication in diabetic and hepatic steatosis.

## 제 4 절 소재화 가공 및 시제품 제작

### 1. 인삼 화퇴 적정 유효성분 추출 수율 최적화

#### 가. 실험재료 및 방법

##### (1) 실험재료

본 연구에 사용한 고려 인삼 화퇴(*Panax ginseng*)는 한국 충북 음성에서 재배(재배자, 남성엽) 3년생 인삼 화를 2005년 6월에 채집하였고, 중국산 인삼 화는 길림성 안도현에서 재배하는 3년생 인삼 화를 2004년 10월에 요령성 심양의 약재시장에서 구입하였다. 한편, 중국 전칠삼 화는 운남성 약재시장에서 2004년 8월에 구입하였다. 이와 같이 얻은 시료를 대상으로 ginsenosides 성분의 함량을 비교 검토하였다. 각각의 제품표본은 세명대학교 한방식품연구실에 보관하고 있다. (Fig 1)

##### (2) 엑스의 조제

건조한 각 인삼 화퇴를 세말로 하여 시료 각각 100g 씩에 95% ethyl alcohol과 증류수로 수욕상에서 2시간씩 1회씩 추출하여 여과 후 여액을 합하여 감압 농축하여 엑스를 얻었다.

##### (3) 조 사포닌(crude saponin) 조제(Shibata 법)

검체 각 10g을 취하여 ethylether로 3회 처리하여 지용성 물질을 제거한 후 다시 수포화 n-butanol로 3회 처리하여 얻은 n-BuOH 층을 합하여 감압농축 하였다. 이때 모든 조작은 정량적으로 하였다. 감압농축물의 함량을 조 사포닌(crude saponin) 양으로 하였다.

##### (4) 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 Gemini 5 $\mu$  C<sub>18</sub> 110A(Phenomenex, 4.6 $\times$ 250mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %에서 40 %, 60 % 그리고 80 %로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 1.0 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

## (5) 결과 및 고찰

본 연구에서는 현재 우리나라에서 재배되고 있는 고려 인삼 화뢰와 중국 인삼 화뢰 및 전칠삼 화뢰를 대상으로 개별 ginsenoside의 함량 분포를 조사 · 비교함으로써 사포닌함유패턴을 중심으로 하는 차이점을 검토하여 인삼 화뢰 성분에 대한 기초정보를 제공하고자 한다.

분석한 인삼 사포닌은 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>이었으며 이들은 Fig. 2과 같이 HPLC를 통하여 표품과 직접 비교 · 확인하였다. 국내 인삼 및 전칠삼 주 생산 지역(충북, 길림성, 운남성)를 대상으로 대표적인 4년근 재배 인삼 화을 채집 및 구입하여 Saponin 함량을 비교 분석한 결과, 각 ginsenoside의 총합인 총사포닌(total saponin) 함량에 있어서는 Table I에서 보는 바와 같이 한국 음성의 인삼 화와 중국 길림성의 인삼 화의 인삼사포닌 중에서는 protopanaxatriol group의 dammarane triterpenoid로서 부신피질 호르몬 증진작용, 항염증작용 등<sup>28)</sup>을 나타내는 ginsenoside Re가 3.388%, 2.727%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 또한, 중국 전칠삼 화에서는 중추신경 억제작용, 혈압강하작용<sup>29-32)</sup>을 나타내는 ginsenoside Rb<sub>1</sub>이 3.738%로 가장 높은 함량을 나타내었다.

한편, protopanaxadiol group과 protopanaxatriol group의 비율(PD/PT)에 있어서 한국과 중국의 인삼 화(0.44, 0.47)에 비해서 중국 전칠삼 화는 1.98을 나타냄으로써 약 4배의 높은 비율을 나타내었다.

본 연구를 통해서 우리나라에서 생산되는 인삼 화뢰(*Panax ginseng*)와 중국의 인삼 화뢰 및 전칠삼 화뢰(*Panax notoginseng*)에 대한 인삼사포닌 함량을 대상으로 동일 조건에서 HPLC 법으로 분석한 결과, 인삼 화는 산지에 관계없이 ginsenoside Re의 함량에 있어서 전칠삼 화에 비해서 특별히 높은 함량을 나타냄을 알 수 있었으며, 전칠삼 화는 ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 함량에 있어서 인삼 화에 비해서 현저히 높은 함량을 나타내었다. 따라서, 인삼 근과는 또다른 생리활성이 기대되는 식의약품 신소재의 가능성 보여주었다.

Table II에서 보는 바와 같이 95% ethyl alcohol로 추출한 엑스가 총사포닌 함량에 있어서 6.86%를 나타내어 가장 높은 인삼사포닌 함량을 보여주었고, 50% ethyl alcohol로 추출한 엑스가 3.566%, 증류수 추출이 2.234%의 순이었다. 특히, 인삼화뢰의 주 인삼사포닌인 ginsenoside Re에 있어서도 95% ethyl alcohol로 추출한 엑스가 3.388%로 가장 높은 함량을 나타내었다. 따라서, 인삼 화뢰로부터 인삼사포닌을 추출할 경우 95% ethyl alcohol로 추출하는 것이 가장 좋은 추출 수율을 확인할 수 있었다.



**Table I . The Ginsenoside content of the ginseng flower buds**  
(%,w/w)

Ginsenosides	Ginseng flos		
	GFK	GFC	NFC
Rb <sub>1</sub>	0.716±0.018	0.761±0.495	3.738±0.053
Rb <sub>2</sub>	0.636±0.030	0.453±0.354	0
Rc	0.003±0.002	0	0
Rd	0.736±0.050	0.509±0.415	0
Re	3.388±0.125	2.727±0.021	0
Rf	0.028±0.002	0	0.270±0.005
Rg <sub>1</sub>	0.585±0.020	0.325±0.006	0
Rg <sub>2</sub>	0.732±0.038	0.662±0.084	0.802±0.016
Rh <sub>1</sub>	0.032±0.002	0	0.821±0.015
Total ginsenosides <sup>a)</sup>	6.86	5.44	5.63

<sup>a)</sup> Sum of individual ginsenosides content

\* GFK : Ginseng Flower buds(Panax Ginseng) cultivated in korea, GFC : Ginseng Flower buds(Panax Ginseng) cultivated in China, NFC : Notoginseng Flower buds(Panax notoginseng) cultivated in China

**Table II Quantitative analysis of Ginsenosides in ginseng flower buds extracted under various solvent**

Ginsenosides	Ginseng flos		
	GFK(E)	GFK(W)	GFK(50%E)
Rb <sub>1</sub>	0.716±0.018	0.213±0.009	0.379±0.009
Rb <sub>2</sub>	0.636±0.030	0.236±0.027	0.332±0.005
Rc	0.003±0.002	0.001±0.032	0.015±0.032
Rd	0.736±0.050	0.224±0.045	0.318±0.025
Re	3.388±0.125	1.122±0.008	1.842±0.005
Rf	0.028±0.002	0.012±0.004	0.012±0.032
Rg <sub>1</sub>	0.585±0.020	0.199±0.053	0.311±0.007
Rg <sub>2</sub>	0.732±0.038	0.212±0.009	0.345±0.007
Rh <sub>1</sub>	0.032±0.002	0.015±0.043	0.012±0.032
Total ginsenosides <sup>a)</sup>	6.86	2.234	3.566

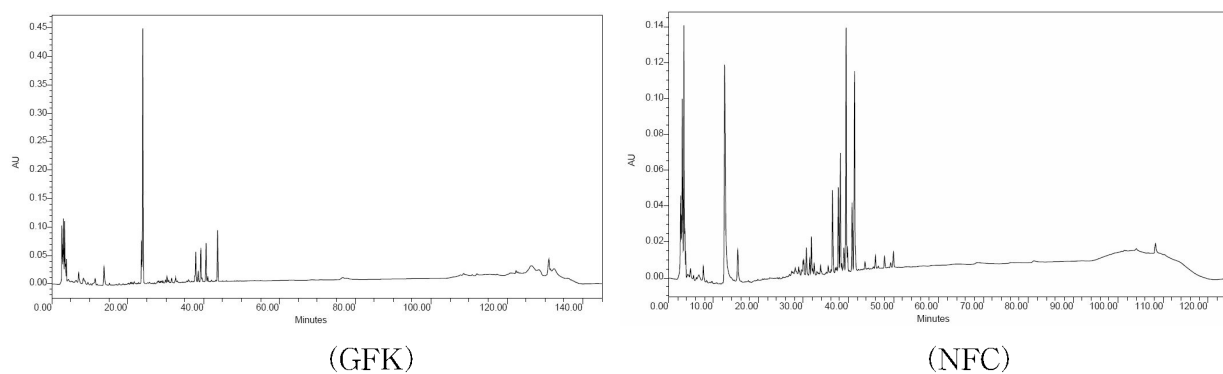
<sup>a)</sup> Sum of individual ginsenosides content

\* GFK(E) : Ginseng Flower buds extracted with 95% ethyl alcohol, GFK(W) : Ginseng Flower buds extracted with distilled water, GFK(50%E) : Ginseng Flower buds extracted with 50% ethyl alcohol

Fig. 1. Figure of Ginseng Flos cultivated in Korea (GFK) and Notoginseng Flos cultivated in China (NFC)



Fig. 2. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the 3 years old Ginseng Flos cultivated in Korea (GFK), and compared with chromatogram of the 3 years old Notoginseng Flos cultivated in China (NFC)



## 2. 여과 및 적정 전처리 공정 확립

본 공정확립시험에서 확립하고자 하는 여과 및 적정 전처리 공정 확립은 앞의 추출시험에서 사포닌 조성분석 및 시험용 Re 분획을 위한 조사포닌을 얻기 위한 추출에서와 같이 화뢰 분말 100g에 95% ethyl alcohol을 넣어 수욕상에서 2회 반복 환류 추출시키는 것과는 달리, 효능이 있는 사포닌 분획을 포함한 조사포닌을 대량으로 추출하여 건강기능식품 및 화장품 제조시 소재로 사용하기 위한 소재를 제조하는데 필요한 scale-up 개념의 대량공정을 미리 검토하여 확립해 놓고자 하는 것이다.

### 가. 원료 전처리

수집된 건조 인삼화뢰(수분함량 6.4%)를 선별하여 이물질을 제거한다. 이물질을 제거한 화뢰를 pin mill(25목 체 장착)을 사용하여 20 mesh 정도의 입도로 분쇄하여 환류추출 원료로 사용하였다. 이때 화뢰가 부서져 추출후 여과시 분말입자들에 의한 filter cake가 생기지 않도록 너무 곱게 마쇄하지 않은 것이 중요하다. pin mill로 분쇄한 분말 100g을 체질하여 입자들의 입도분포를 측정 한 결과는 다음과 같다

표. pin mill로 분쇄한 화뢰 분말의 입도분포

입도분포(mesh)	분말의 비율(%)
100>	1
60-100	2
40-60	4
30-40	32
20-30	61

위의 표에서 보듯이 25목의 체를 장착한 pin mill로 화뢰를 분쇄시 40 mesh 이하의 비교적 큰 입자들 위주로 분말(93%)을 얻을 수 있어서 추출 및 여과시 발생할 수 있는 filter cake의 생성을 방지할 수 있었다.

### 나. 용매 예열

앞의 추출시험에서 사포닌 조성분석 및 시험용 Re 분획을 위한 조사포닌을 얻기 위한 추출에서와 같이 화뢰 분말 100g에 95% ethyl alcohol을 넣어 수욕상에서 2회 반복 환류 추출시에는 미리 추출용매를 예열시킬 필요까지는 없다. 그러나 2년차 및 3년차에 화뢰 추출물을 건강기능식품 및 화장품 제조시 필요한 소재로 소재화하기 위하여 10-20kg 이상의 화뢰를 대량으로 추출할 때에는 사용되는 용매인 95% ethyl alcohol을 추출탱크에 넣고 미리 80 C 정도로 증탕 가열 시키면서 용매가 예열되어 있는 추출탱크에 20 mesh 이하로 분쇄된 화뢰 분말을 넣는 효율적인 공정을 확립하였다.

### 다. 교반 및 추출

임펠러가 장착된 100L 급의 추출탱크에 12L의 95% ethyl alcohol을 넣고, 10Kg의 화퇴분말을 서서히 혼합하면서 80C에서 2시간 추출하였다. 이때 1번째 추출후 아래와 같이 냉각 및 여과하여 추출물을 획득하고, 나머지 잔사에 대하여 다시 한번 2회 반복 추출을 실시하였다. 압착프레스기로 압착하여 여과후 회수한 2회반복 추출물의 총 추출물 양은 21L 이었으며, 고형분 농도는 10Brix로 나타났다.

표. 95% ethyl alcohol 추출횟수에 따른 추출물의 고형분양과 고형분중 총사포닌 양의 변화

추출횟수	고형분함량(Brix)	총사포닌(%w/w)
1차 추출물	15.1	7.8
2차 추출물	4.9	3.9
3차 추출물	1.1	0.6
4차 추출물	0.4	0.1

결과에서 보듯이 3회부터는 화퇴로부터 추출되어 나오는 총 고형분과 총사포닌의 양이 매우 적다. 추출용매로 사용되는 95% ethyl alcohol의 소요비용, 추출시 가열비용, 농축 비용, 용매회수비용 등을 고려하여 2회 반복추출이 최적의 공정으로 판단되었다.

#### 라. 냉각

추출이 끝난 후 반응물을 50-60C 이하로 냉각시켜 여과 효율을 높인다.

#### 마. 여과

Nylon 여과포를 사용하여 1차 조여과 후, 0.5마이크론 cartridge filter를 사용하여 2차 정밀여과를 실시하여 화퇴 95% ethyl alcohol추출물을 얻었다.

이상과 같은 대량 전처리, 추출, 여과 공정을 확립하였고, 확립된 공정에 따라 건조된 화퇴 분말로부터 95% ethyl alcohol을 사용하여 추출한 추출물의 고형분 함량을 측정하여 계산한 고형분 추출수율(%)은 21%로 나타났다. 즉 건조된 화퇴 100g을 95% ethyl alcohol로 위와 같은 방법으로 추출하였을때 21g의 고형분을 얻을 수 있었다.

### 3. 액상 소재화 위한 적정 농축공정 확립

#### 가. 농축

최종적으로 0.5마이크론 cartridge filter를 통과하여 정밀 여과된 화뢰 95% ethyl alcohol 추출물의 고형분 함량은 약 10 Brix 정도로서 고형분양이 낮은편이다. 이 추출물을 진공농축기를 사용하여 농축시켜 저장, 운반, 배합 등이 효율적으로 이루어 질수 있도록 건강기능식품 및 화장품 제조시 사용될수 있는 원료소재로 농축 액상 소재화시키는 공정을 확립하는 것이 필요하다.

약 10 Brix 정도의 고형분 함량을 갖고 있는 추출물을 50-55 C에서 진공농축하여 40 Brix 정도의 농축 액상소재를 제조하였다. 농축시 건강기능식품이나 화장품원료로 사용시 좋지 않게 생각될수 있는 풀냄새 등의 이취가 많이 제거되어 소재의 가공적성이 훨씬 향상되었다.

표. 진공농축에 따른 화뢰 추출물 농축 액상 소재의 이취 강도

농축전 추출물(10Brix)	농축된 소재(40Brix)
5.7*	2.7

\* 9점 척도 관능검사법: 1점;매우약함, 5점;보통, 9점;매우 강함

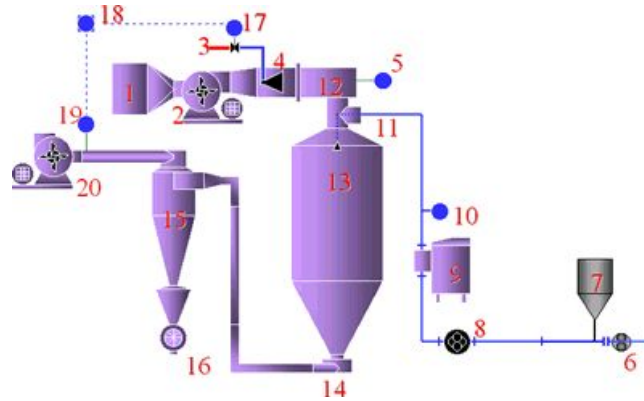
한편, 인삼화뢰 95% ethyl alcohol 추출물을 액상 농축액으로 사용하는것 보다 분말로 소재화 하여 formulation 하는것이 배합시 정량성, 용해성, 성분함량을 일정하게 조절하기에 훨씬 유리하다. 따라서 제품화를 고려한다면 분말소재로 소재화 가공을 실시하는 것이 필요하다. 또한 반응물을 분말로 소재화 시키면 시험용 소재로 다룰 때는 물론이고, 원료소재의 보관 및 취급이 액상보다 용이해져 액상의 드링크나 고형의 정제 및 캡슐 타입의 최종제품 제조시에 전체적인 공정의 품질관리가 용이해지는 장점이 있다. 분무건조시험을 실시하여 분말소재화에 적합한 아래와 같은 최적의 분무건조 조건을 설정하였다.

#### 나. 분무건조

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

표. 반응농축액의 분무건조 조건

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



1. Inlet Filter System, 2. Inlet Supply, 3. Heater Fuel Train, 4. Heater Unit, 5. Temperature Probe, 6. Liquid Feed Transfer Pump, 7. Batch Feed Tank, 8. Booster Pump, 9. High Pressure Feed Pump, 10. Feed Line Pressure Monitor, 11. Atomiser Assembly, 12. Inlet Air Header, 13. Drying Chamber, 14. Powder Conveying Line, 15. High Efficiency Cyclone Collector /Bag Filter Options Available, 16. Rotary Valve / Blow Seal, 17. Fuel Control Valve, 18. Temperature Controller, 19. Exhaust Temperature Probe, 20. Exhaust Air Fan

그림. 분무건조기의 구조 및 공정

표. 진공농축 및 분무건조에 따른 화퇴 추출물 소재의 이취 강도

농축전 추출물(10Brix)	농축된 액상소재(40Brix)	분무건조된 소재(분말)
5.7*	2.7	1.9

\* 9점 척도 관능검사법: 1점;매우약함, 5점;보통, 9점;매우 강함

위와 같은 조건으로 확립된 분무건조 공정으로 제조된 분말소재는 진공농축에 의해 농축된 농축액상 소재보다도 아래와 같이 훨씬 풀냄새 등의 이취가 감소하여 제품화시에 소재의 가공 적성이 더욱 향상된 것으로 나타났다.

#### 4. 인삼화퇴 음료 개발을 위한 적정 부재료 선정 및 배합시험

1차년도에 아래와 같이 인삼화퇴 주정추출물을 사용하여 농축액상 소재를 소재화 하였다. 인삼화퇴 주정추출물의 농축액상 소재 특성: 최종적으로 0.5마이크론 cartridge filter를 통과하여 정밀 여과된 화퇴 95% ethyl alcohol 추출물의 고형분 함량은 약 10 Brix 정도로서 고형분양이 낮은편이다. 약 10 Brix 정도의 고형분 함량을 갖고 있는 추출물을 50-55 C에서 진공농축하여 40 Brix 정도의 농축 액상소재를 제조하였다. 농축시 건강기능식품이나 화장품원료로 사용시 좋지 않게 생각될 수 있는 풀냄새 등의 이취가 많이 제거되어 소재의 가공적성이 훨씬 향상되었다.

##### 가. 인삼화퇴 추출물 소재 및 부재료

인삼화퇴 주정추출물(1.2°Bx)은 전년도의 제조된 농축액상소재를 환원시켜 사용하였고, 과즙은 배(69°Bx), 사과(68°Bx), 레몬(65°Bx), 모과(65°Bx), 대추(65°Bx) 및 매실(65°Bx), 복숭아(68°Bx) 농축물을 대안상사로부터 구입하여 사용하였다. 매실향(Ume flavor, KMC-9302)과 복숭아향(Peach flavor, KMC-9801)은 Comax international corp.로부터, 설탕 및 액상과당(75°Bx)은 (주)삼양사에서 구입하였다.

##### 나. 인삼화퇴 음료의 적정 배합비 결정 시험

감미료(백설탕)는 음료제조 후 총 가용성고형분량이 13-14°Bx가 되도록 첨가하였고 pH는 저장 및 살균 특성을 고려하여 4.0미만으로 조절하고자 하였다. 이때 추출하여 사용한 인삼화퇴 농축액의 가용성고형분 함량은 1.2°Bx 이었다. 그 밖의 과즙은 원액 그대로 사용하였다. 아래의 각 배합비들은 10명으로 구성된 panel discussion 방식에 의해 관능평가를 실시하였다. Panel discussion 방식에 의한 배합비 결정시험 과정중에서 주요한 몇가지 배합비에 대한 묘사 시험을 기술하면 아래와 같다.

##### (1) 배합비 1

원.부재료	화퇴추출물	사과농축물	배농축물	모과농축물	대추농축물	매실농축물	액상과당
g	50	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	8.0

배합비 1은 매실의 신맛이 강하고 음료의 body감이 부족하였다. Body감을 부여할 수 있는 과즙 농축액(사과와 배)의 첨가량을 늘려보기로 하였다.

##### (2) 배합비 2

원.부재 료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	매실 농축물	액상 과당
g	50	0.5	0.5	0.2	0.2	0.1	8.0

배합비 2에서도 매실에 의한 신맛이 강하게 남아 매실의 양을 더 줄여서 신맛을 줄이기로 하였다.

(3) 배합비 3

원.부재 료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	매실 농축물	액상 과당
g	50	0.5	0.5	0.2	0.2	0.05	8.0

배합비 3에서도 신맛이 뒷맛으로 많이 남았지만 신맛이 상큼하지 못하여 다른 계통의 신맛인 레몬 농축액을 사용하여 신맛을 보강하기로 하였다.

(4) 배합비 4

원.부재 료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	레몬 농축물	액상 과당
g	50	0.5	0.5	0.2	0.2	0.05	8.0

레몬 농축액을 소량 더 첨가(0.06g)하기로 하였다. 음료의 맛을 향상시키고 기호도를 증진시키기 위하여 복숭아맛 인삼화퇴 음료와 매실맛 인삼화퇴 음료의 배합비를 제조해보기로 하였다.

(5) 배합비 5

원.부 재료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	레몬 농축물	복숭아 농축물	복숭아 flavor	액상 과당
g	50	0.5	0.5	0.2	0.2	0.06	0.3	0.0075% (w/w)	8.0

배합비 5는 복숭아 과즙과 향의 첨가로 음료의 맛이 대체적으로 좋아졌지만 복숭아 향이 적어 복숭아 향을 0.01%로 증가시키기로 하였다.

(6) 배합비 6

원.부재료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	매실 농축물	매실 flavor	액상 과당
g	50	0.5	0.5	0.2	0.2	0.05	0.0075% (w/w)	8.0



배합비 6은 매실의 은은한 향이 조화를 이루어 음료의 전체적인 맛이 좋아졌으나 매실의 향이 적어 매실향을 0.01%로 증가시키기로 하였다.

(7) 배합비 7

원.부재료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	레몬 농축물	액상 과당
g	50	0.5	0.5	0.2	0.2	0.06	8.0

배합비 7은 복숭아나 매실이 첨가되지 않은 은은하고 단맛과 신맛 및 인삼화퇴추출물이 조화를 이루어 기호도가 좋았으나 body감이 부족하여 사과와 배를 0.55g 으로 증가시키기로 하였다. 이때의 pH는 3.51이고 당도는 13.0°Bx(10℃) 였다.

(8) 배합비 8 (복숭아맛 인삼화퇴음료 최종배합비)

원.부 재료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	레몬 농축물	복숭아 농축물	복숭아 flavor	액상 과당
g	50	0.5	0.5	0.2	0.2	0.06	0.3	0.01% (w/w)	8.0

배합비 8은 5번 배합비에서 부족했던 복숭아 향을 0.01%로 증가시켰다. 전체적으로 복숭아 향과 맛이 은은하게 남아 기호도가 좋았으며, 복숭아의 단맛과 레몬 등의 신맛이 조화를 이루어 기호도가 우수하였다. 이때의 pH는 3.62이고 13.6°Bx(10℃)였다.

(9) 배합비 9

원.부 재료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	매실 농축물	매실 flavor	액상과당
g	50	0.5	0.5	0.2	0.2	0.05	0.01% (w/w)	8.0

배합비 9는 6번 배합비에서 부족했던 매실향을 0.01%로 증가시켰다. 전체적으로 매실의 향이 인삼화퇴와 어우러져 좋은 맛을 보였지만 단맛과 신맛의 비율이 맞지 않아 body감이 부족하였으므로 사과와 배를 0.55g 으로 증가시키기로 하였다.

(10) 배합비 10 (인삼맛 인삼화퇴 음료 최종배합비)

원.부 재료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	레몬 농축물	액상과당
g	50	0.55	0.55	0.2	0.2	0.05	8.0

사과와 배를 0.55g 으로 늘려 전체적으로 body 감이 생겼으며 약간 씹쌀한 인삼의 향을 느낄 수 있는 음료로 단맛과 신맛이 조화를 이루었다. 이때의 pH는 3.79이고 13.3°Bx(10℃)였

다.

(11) 배합비 11 (매실맛 인삼화퇴 음료 최종배합비)

원.부 재료	화퇴 추출물	사과 농축물	배 농축물	모과 농축물	대추 농축물	매실 농축물	매실 flavor	액상과당
g	50	0.55	0.55	0.2	0.2	0.05	0.01% (w/w)	8.0

배합비 11은 9번 배합비에서 body감을 부여하기 위하여 사과와 배 과즙을 0.55g 으로 첨가하여 전체적으로 body감을 살렸으며, 매실의 은은한 향이 좋았다. 이때의 pH는 3.64이고, 당도는 13.1°Bx (10℃)였다.

결론적으로 복숭아맛, 인삼맛 및 매실맛 인삼화퇴 음료의 최종배합비는 배합비 8(복숭아맛 인삼화퇴음료), 배합비 10(인삼맛 인삼화퇴음료) 및 배합비 11(매실맛 인삼화퇴음료) 과 같이 제시하였다.

## 5. 인삼화퇴 음료의 침전물 형성방지 및 살균 처리 방법

인삼화퇴 및 부재료로 사용한 추출물들을 0.2  $\mu\text{m}$  카트리지 필터로 여과하여도 저온에서 일정시간동안 방치하게 되면 추출물 성분의 용해도가 변하게 되므로 침전물이 생성되는데 이를 제거하기 위하여 하루 동안 냉장상태로 정치한 후 원심분리하여 침전물을 제거시키고 상등액을 이용하였다. 또한 최종배합비로 제조한 인삼화퇴 음료의 살균은 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초간 처리하였다. 최종배합비로 제조한 인삼화퇴 음료들의 pH가 3.9 이하의 산성 상태이므로 위와 같은 살균 조건으로 처리하여도 음료내에 함유되어 있던 영양세포는 모두 사멸되고 저장 중 포자형태의 미생물로 인한 품질 변화는 발생하지 않을 것으로 판단되었다.

### 가. 인삼화퇴 음료 최종 제조 공정도

인삼화퇴 농축액상소재를 사용한 인삼화퇴 음료의 최종 제조 공정은 Fig 와 같다.

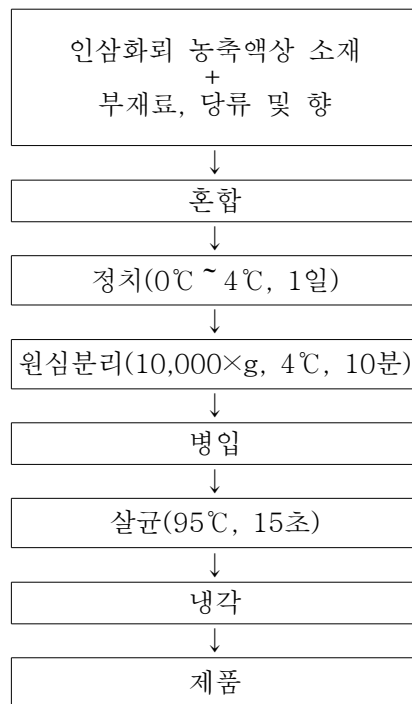


Fig. 1. 인삼화퇴 농축액상 소재를 사용한 인삼화퇴 음료 제조공정도

## 6. 인삼화퇴음료 시제품 제조

2년차에 수행한 인삼화퇴 음료 개발을 위한 적정 부재료 선정 및 배합시험과 관능검사에서 최종적으로 선정된 복숭아맛, 인삼맛 및 매실맛 인삼화퇴 음료의 최종배합비는 배합비 8(복숭아맛 인삼화퇴음료), 배합비 10(인삼맛 인삼화퇴음료) 및 배합비 11(매실맛 인삼화퇴음료) 과 같이 제시하였다. 이 배합비대로 3가지의 시제품을 아래와 같이 제조하였다.



그림. 복숭아맛, 인삼맛, 매실맛 인삼화퇴음료 시제품

## 7. 대량생산 공정검토

### 가. 인삼화퇴 추출물의 액상 소재화 공정

1차년도에 이미 아래와 같이 인삼화퇴 주정추출물을 사용하여 농축액상 소재를 소재화는 기본공정을 확립 하였다. 최종적으로는 아래와 같이 추출물을 대량으로 진공농축시 박막하강식 진공농축기를 사용하는 것으로 대량생산공정을 확립하였다. 즉, 인삼화퇴 주정추출물은 최종적으로 0.5마이크론 cartridge filter를 통과하여 정밀 여과된 화퇴 95% ethyl alcohol 추출물의 고형분 함량은 약 10 Brix 정도로서 고형분양이 낮은 편이다. 약 10 Brix 정도의 고형분 함량을 갖고 있는 추출물을 50-55 C에서 박막하강식으로 진공농축하여 40 Brix 정도의 농축 액상소재를 대량으로 제조하였다. 박막하강식 농축시 건강기능식품이나 화장품원료로 사용시 좋지 않게 생각될 수 있는 풀냄새 등의 이취가 많이 제거되어 소재의 가공적성이 훨씬 향상되었다. 위와같이 화퇴 확철에 대량으로 액상농축소재를 확보해놓고, 년중 화퇴음료 배합시 환원시켜 사용하는 것으로 대량생산공정을 확립하였다.

### 나. 적정살균공정 확립

최종배합비로 제조한 인삼화퇴 음료의 살균은 95℃에서 15초간 처리하였다. 이때는 판형 열교환기를 통과시켜 통과시 95℃에서 머무름 시간이 15초간 되도록 유속을 조절하여 hot filling으로 병입을 실시하였다. 최종배합비로 제조한 인삼화퇴 음료들의 pH가 3.9 이하의 산성 상태이므로 위와 같은 살균 조건으로 처리하여도 음료내에 함유되어 있던 영양세포는 모두 사

멸되고 저장 중 포자형태의 미생물로 인한 품질 변화는 발생하지 않는 것으로 판단되었다.

#### 다. 대량 배합 및 생산 공정

2년차의 배합비 시험에서 검토된 인삼화퇴 음료제조공정을 기반으로 대량생산에 적합하도록 인삼화퇴 농축액상소재를 사용한 인삼화퇴 음료의 최종 대량생산 제조 공정을 그림과 같이 확립하였다.

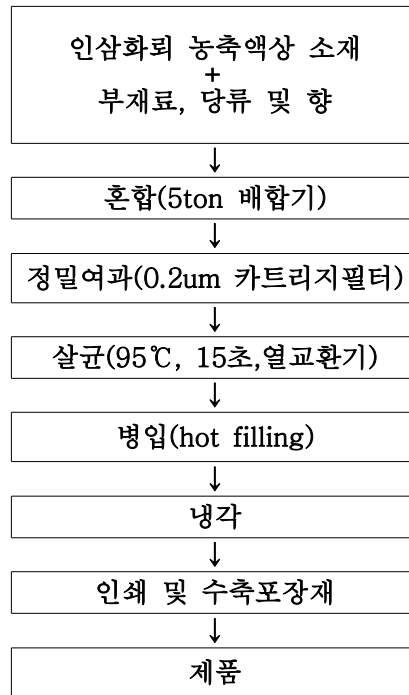


그림. 인삼화퇴 농축액상 소재를 사용한 인삼화퇴 음료 대량생산 제조공정도

## 제 5 절 표준화 및 제조공정 최적화

### 1. 원료 수집 및 조사

#### 가. 인삼 생산현황 및 화퇴 생산량

##### (1) 국내 인삼산업의 개요

(가) 재배면적 : ('95) 9,375ha → ('00) 12,445 → ('07) 17,831 → ('08)19,408

(나) 생산량 : ('95) 11,971톤 → ('00) 13,664 → ('07) 21,818 → ('08)24,613

(다) 농가수 : ('95) 23.1천호 → ('00) 23 → ('07) 19.8 → ('08)24.3

(라) 생산액 : ('95) 2,839억원 → ('00) 3,727 → ('07) 7,355 → ('08)7,533

\*\* 주) 자료출처 : 2008 인삼통계자료집('09년)

##### (마) 인삼 화퇴 생산량 :

- ① 일반적으로 평당 150g의 화퇴를 확보할수 있다.
- ② 인삼화퇴의 약 5 %정도는 수정 및 분화로 채취하지 않는다.
- ③ 상기 자료를 근거로 추정된 인삼화퇴의 생산량은 아래표와 같다.

(단위 : 톤)

구 분	'95	'00	'06	'07	'08
인삼 화퇴 생산량	5,600	6,400	9,300	10,250	11,600

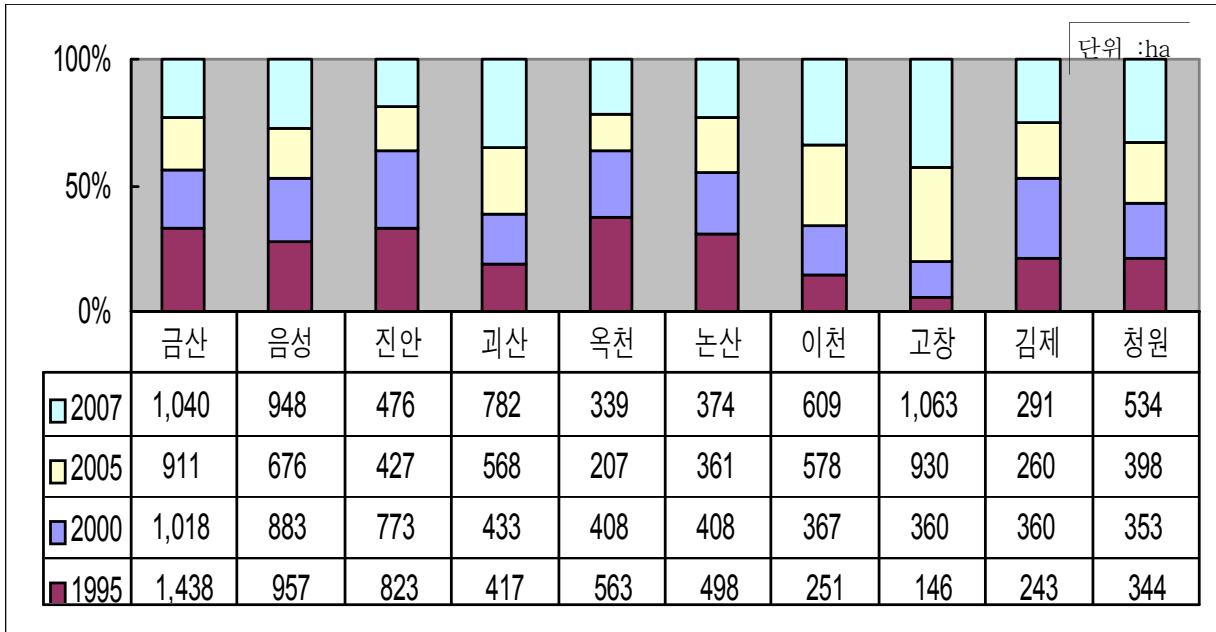
#### 나. 산업구조

##### (1) 생산구조

(가) '90년대 중반까지 금산 등 주산지 중심 재배에서 연작장해에 따른 경작지 부족으로 전국으로 재배 확대, 전체 재배면적의 35%정도가 과중단계부터 계약재배를 통해 관리

(나) '95년 10대 주산지 중 금산, 음성, 진안, 논산 등은 집중도가 낮아지고, 이천, 고창지역 등은 재배면적 급증 추세

(다) 이력관리가 수반되는 계약재배 면적이 지속적으로 증가



- 이력관리/재배면적 비율 : ('04)3.6% → ('05)7.2 → ('06)10.7 → ('07)14.3 → ('08)18.6
- 전체 생산량('08 : 24,613톤)의 80%이상이 금산을 거쳐 전국으로 유통

## (2) 생산 경영규모 및 소득

(가) 인삼 경작농가와 재배면적도 지속적으로 증가 추세이며, 1.5ha이상 규모화된 농가수도 크게 증가

(나) '95년대비 1.5ha 이상 규모화된 농가수는 3배 이상 증가

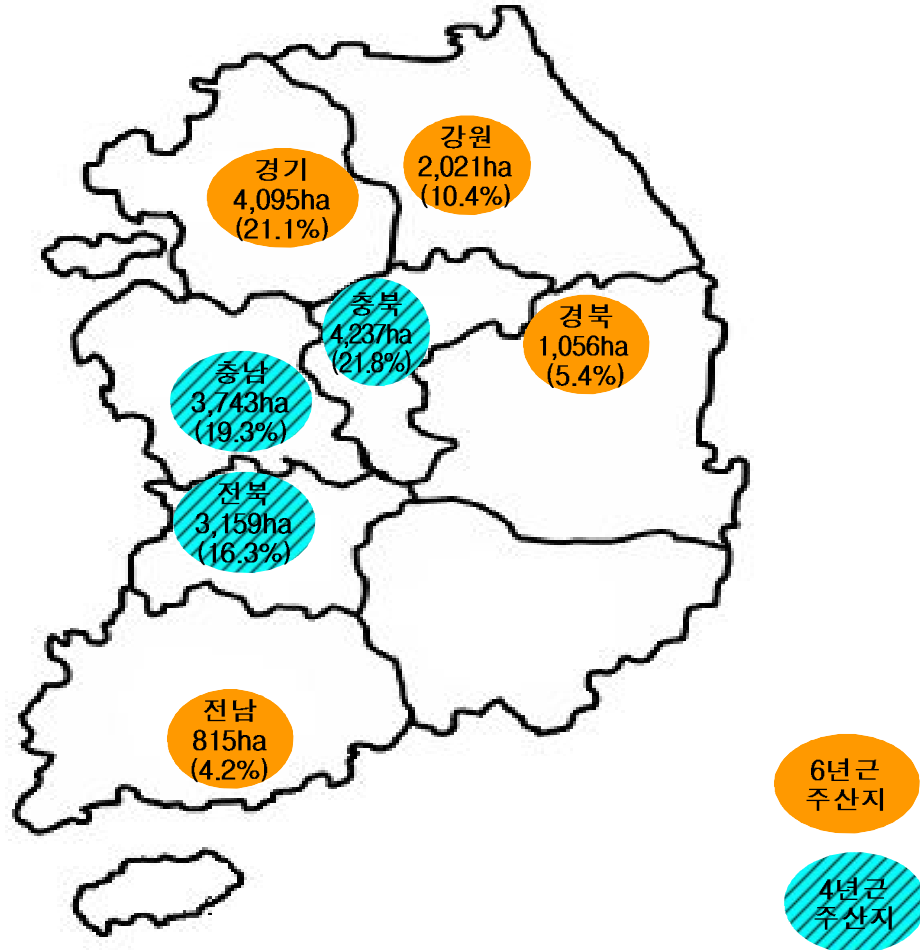
- 1.5ha이상 농가 비중 : ('95) 6.8% → ('00) 14.3 → ('05) 21.5

\* 인삼재배 농가수 : ('95) 23.1천호 → ('00) 23 → ('07) 19.8 → ('08) 24.3

(다) 호당 평균 경작면적은 약 2배 증가 : ('95) 0.54ha → ('05) 1.07

다. 지역별 인삼재배지현황

**주산지별 현황 및 특징**



- 국내 재배지역은 금산을 기준으로 4년근과 5·6년근 재배지역으로 양분
  - 4년근(수삼, 백삼용) : 금산, 논산, 충북, 고창 등 전남북 일원
  - 5·6년근(홍삼용) : 포천, 김포, 이천, 서산, 전남 해안지역 등



## 2. 인삼 화퇴 수집

### 가. 인삼 화퇴 수집

충청북도 음성군 금왕읍 인삼 재배지(재배자 남성엽)에서 5년생 인삼의 열매 10kg을 2010년 5월 14일에 채집하였다.



음성 인삼 재배지 사진

### 나. 인삼 화퇴 건조

충청북도 음성군 충북인삼영농조합법인(대표 남성엽) 일건장에서 건조하였다.



건조된 인삼 화퇴 사진

### 3. 원료 표준화 연구(원료 추출 및 제조법 연구)

#### 가. 실험재료 및 방법

##### (1) 실험재료

본 연구에 사용한 고려 인삼 화뢰(*Panax ginseng*)는 한국 충북 음성에서 재배(재배자, 남성엽) 3년생 인삼 화를 2005년 6월에 채집하였고, 이와 같이 얻은 시료를 대상으로 ginsenosides 성분의 함량을 비교 검토하였다. 각각의 제품표본은 (주) 엠디젠 분석연구실에 보관하고 있다.

##### (2) 엑스의 조제

건조한 인삼 화뢰를 세말로 하여 시료 각각 100g 씩에 95% ethyl alcohol과 증류수로 수욕상에서 2시간씩 1회씩 추출하여 여과 후 여액을 합하여 감압 농축하여 엑스를 얻었다.

##### (3) 조 사포닌(crude saponin) 조제(Shibata 법)

검체 각 10g을 취하여 ethylether로 3회 처리하여 지용성 물질을 제거한 후 다시 수포화 n-butanol로 3회 처리하여 얻은 n-BuOH 층을 합하여 감압농축 하였다. 이때 모든 조작은 정량적으로 하였다. 감압농축물의 함량을 조 사포닌(crude saponin) 양으로 하였다.

##### (4) 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 Gemini 5 $\mu$  C<sub>18</sub> 110A(Phenomenex, 4.6 $\times$ 250mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %에서 30 %, 40 %, 60% 그리고 100 %로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전 개온도는 실온, 유속은 분당 1.0 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

#### HPLC 조건

Pump : Waters 1525 Binary HPLC

Autosampler : Waters 717plus

Detector : Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance

column : Eurospher 100-5 C18 (250\*3mm)

이동상 : 물 · 아세토니트릴

Flow rate : 0.8ml/1min  
 run time : 165 min  
 inject vol (ul) : 10ul  
 검출기 : 측정파장 203nm  
 conditions : gradient

Time	Flow	A% (ACN)	B% (Water)
0	0.8	17.0	83.0
40	0.8	30.0	70.0
55	0.8	40.0	60.0
100	0.8	60.0	40.0
110	0.8	100	0.0
120	0.8	100	0.0
125	0.8	17.0	83.0
135	0.8	17.0	83.0

### (5) 결과 및 고찰

본 연구에서는 현재 우리나라에서 재배되고 있는 인삼 화퇴 원료 추출의 최적 조건을 탐색하기 위하여 개별 ginsenoside의 함량 분포를 조사 · 비교함으로써 사포닌함유페턴을 중심으로 하는 차이점을 검토하여 인삼 화퇴 성분에 대한 추출의 최적 조건 제공하고자 한다.

분석한 인삼 사포닌은 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>이었으며 이들은 Fig. 2과 같이 HPLC를 통하여 표품과 직접 비교 · 확인하였다. 추출용매(증류수, 50% ethylalcohol, 100% ethylalcohol)를 달리하고, 추출방법(열 추출, 초음파 추출)을 달리하여 Saponin 함량을 비교 분석한 결과, 각 ginsenoside의 총합인 총사포닌(total saponin) 함량에 있어서는 Table I에서 보는 바와 같이 50% ethyl alcohol로 열 추출한 엑스가 총사포닌 함량에 있어서 22.19%를 나타내어 가장 높은 인삼사포닌 함량을 보여주었고, 100% ethyl alcohol로 열 추출한 엑스가 21.35%, 증류수 열 추출 11.77%, 100% ethyl alcohol 초음파 추출 6.44%의 순이었다. 특히, 인삼화퇴의 주 인삼사포닌인 ginsenoside Re에 있어서는 100% ethyl alcohol로 추출한 엑스가 10.35%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 50% ethyl alcohol 열 추출, 증류수 열 추출, 00% ethyl alcohol 초음파 추출의 순이었다. 따라서, 인삼 화퇴로부터 인삼사포닌을 추출할 경우 50% ethyl alcohol로 열 추출하는 것이 가장 좋은 추출 수율을 확인할 수 있었다.

**Table I. The Ginsenoside content of the ginseng flower bud extract depending on the extracting conditions**

Ginsenoside s	ginseng flower buds (%w/w)			
	증류수 열 추출	50% EtOH 열 추출	100% EtOH 열 추출	EtOH 초음파 추출
Rb <sub>1</sub>	0.8713±0.1975	1.7208±0.0257	1.4412±0.0090	0.2868±0.0294
Rb <sub>2</sub>	1.0538±0.2453	2.0612±0.0310	1.7960±0.0170	0.4297±0.0091
Rc				
Rd	1.8706±0.3995	4.0849±0.0453	3.5247±0.0351	0.7972±0.0134
Re	4.5440±0.9615	9.5842±0.1171	10.3496±0.1206	3.4558±0.1420
Rf	0.0591±0.0207	0.1550±0.0035	0.1435±0.0437	0.0340±0.0028
Rg <sub>1</sub>	0.8099±0.1994	1.8351±0.0355	1.8351±0.0355	0.8271±0.0677
Rg <sub>2</sub>	0.5294±0.1344	0.4545±0.0155	0.4697±0.0123	0.1459±0.0082
20S-Rg3	0.2216±0.0504			
20R-Rg3	0.1511±0.0404			
Rg5	0.1415±0.0205			
Rg6	0.0314±0.0140			
Rh1	1.0681±0.2988	1.6228±0.0448	1.3151±0.0328	0.3189±0.0139
Rh2				
Rh4				
Rk1	0.0295±0.0109			
Rk3				
compound k				
F1	0.1864±0.0363	0.4617±0.0399	0.4774±0.0158	0.1484±0.0064
F4	0.1654±0.0372			
Total ginsenosides <sup>a)</sup>	11.7645	22.1918	21.3523	6.4438
Diol/Triol <sup>b)</sup>	0.5844	0.5492	0.4634	0.3070

<sup>a)</sup> Sum of individual ginsenosides content

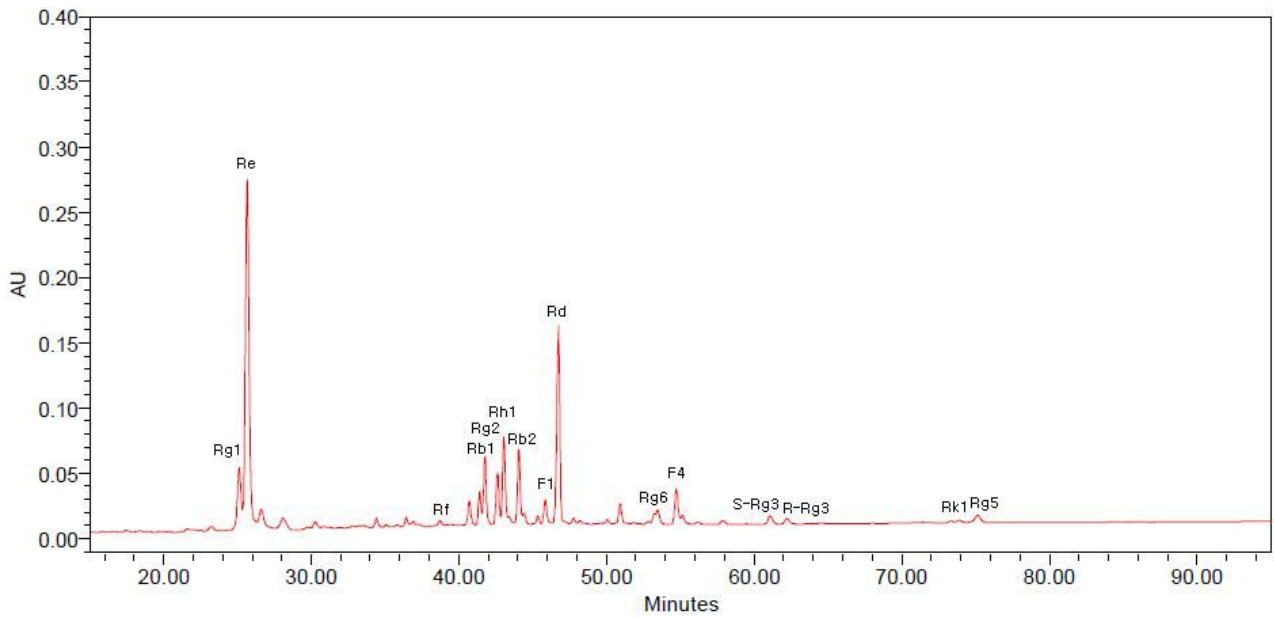


Fig. 1. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the 3 years old Ginseng Flower bud(distilled water heat pcessed extract)

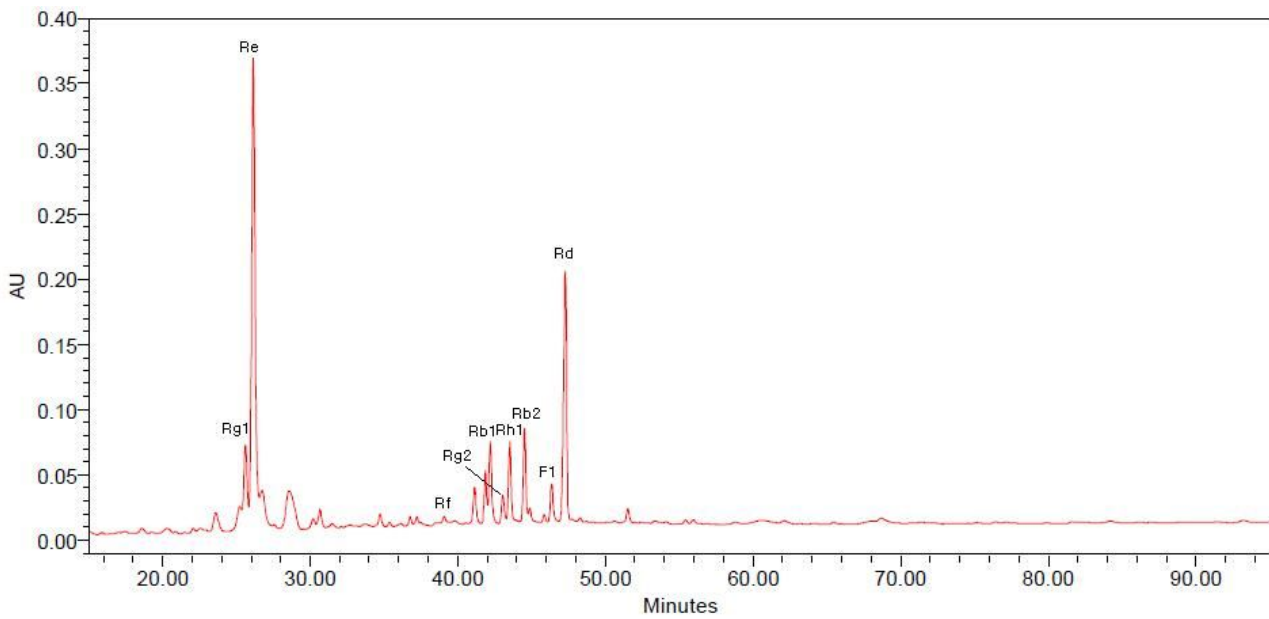


Fig. 2. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the 3 years old Ginseng Flower bud(50% ethyl alcohol heat pcessed extract)

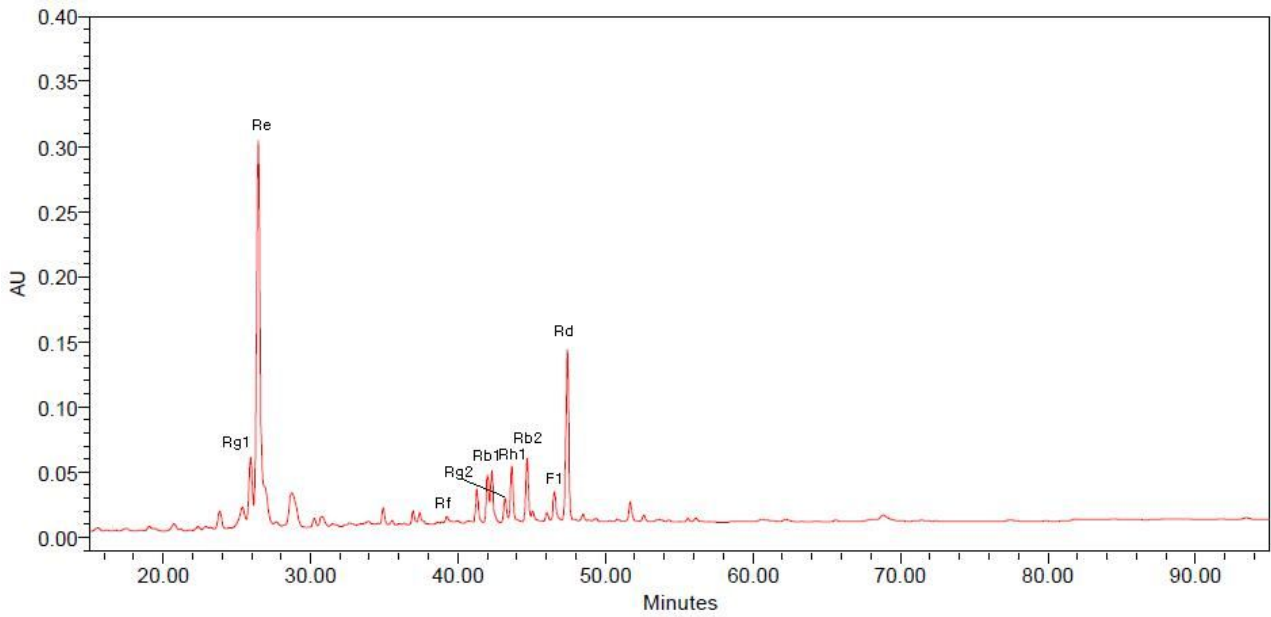


Fig. 3. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the 3 years old Ginseng Flower bud(100% ethyl alcohol heat processed extract)

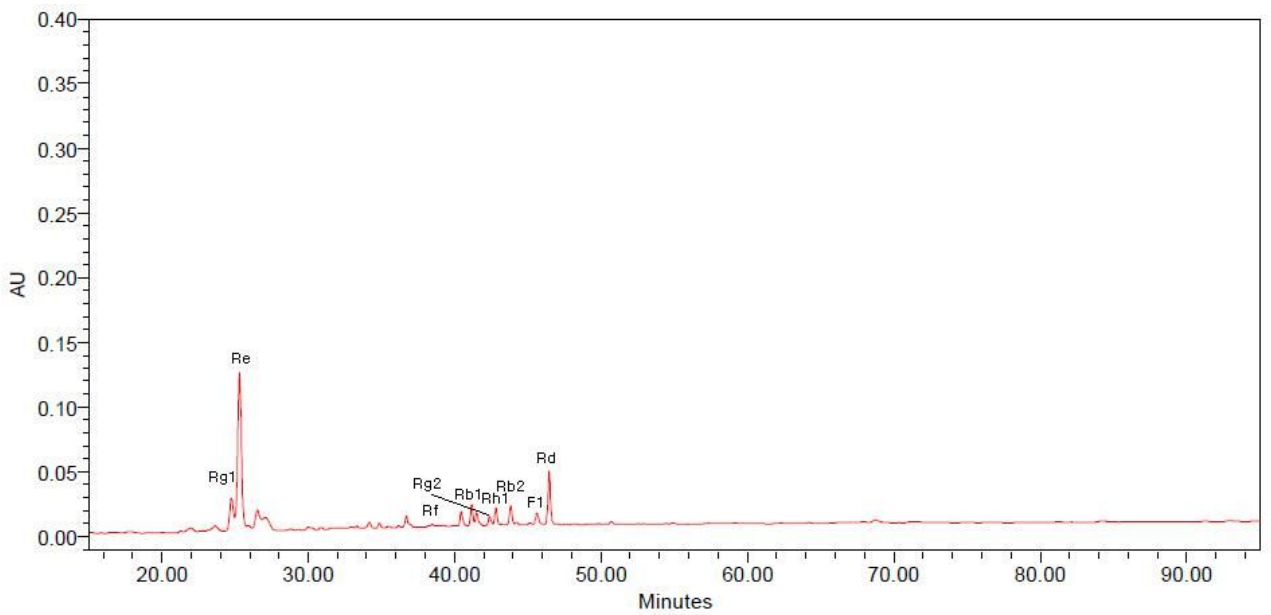


Fig. 4. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the 3 years old Ginseng Flower bud(100% ethyl alcohol sonication processed extract)

#### 4. 원료 표준화 연구(HPLC 법에 의한 분석법 연구)

##### 가. 검량선 작성을 통한 직선성 확인

###### (1) 표준용액 조제

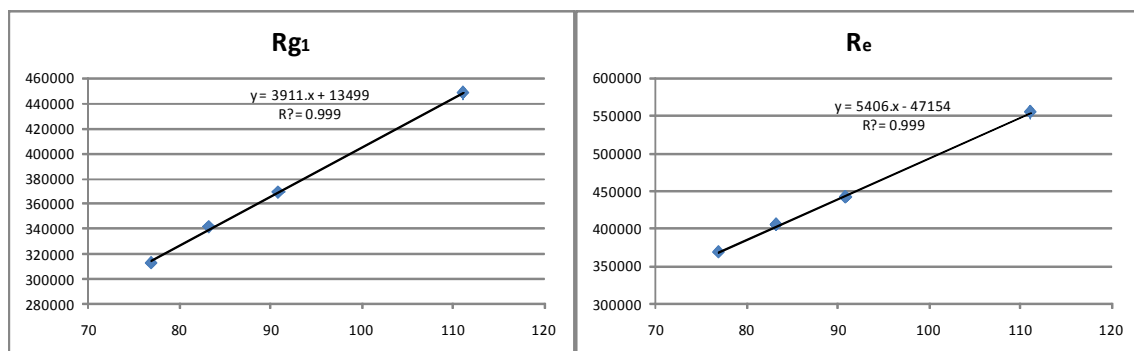
9개의 인삼사포닌(ginsenoside) 표준물질 1mg을 정밀히 달아 메탄올용액 1ml에 녹여 1000ppm 표준용액을 조제하였다. 이 표준용액을 각각 0.1ml씩 취하여 혼합액을 만들어 각 성분이 111.11ppm이 되도록 하였고, 이 혼합액에 0.1, 0.2, 0.3, 0.4ml 메탄올로 순차적으로 희석하여 100, 90.91, 83.33, 76.92ppm의 표준용액을 만들어 검량선 작성에 사용하였다. (Fig. 5)

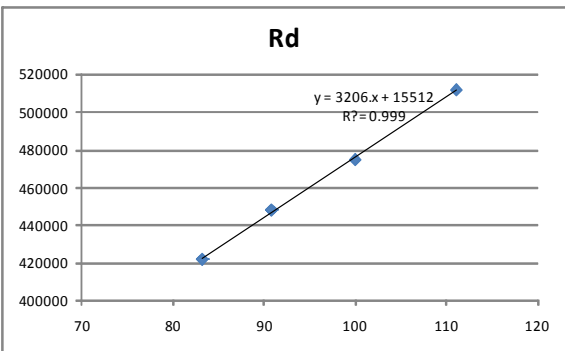
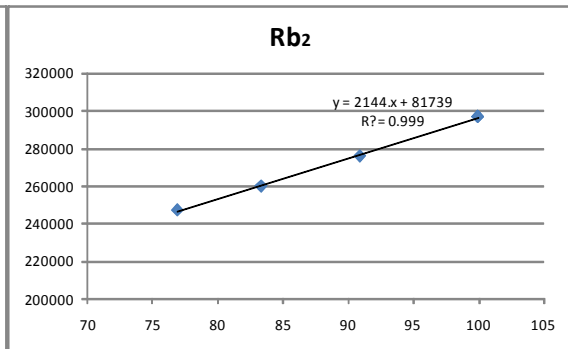
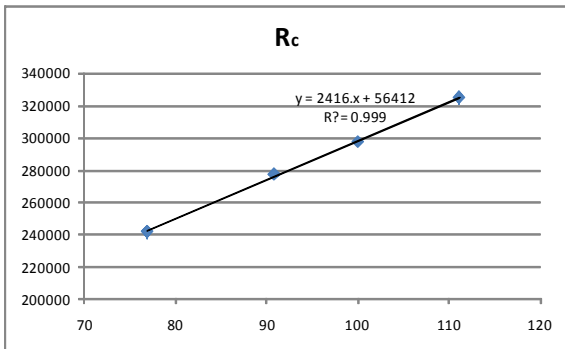
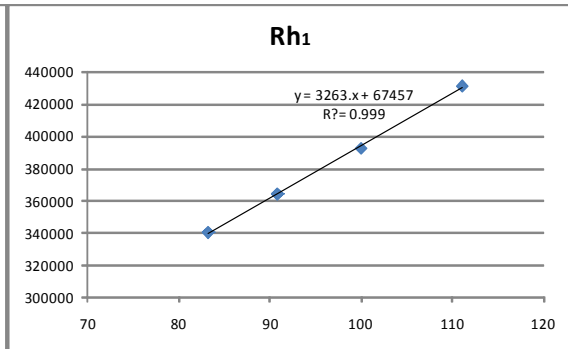
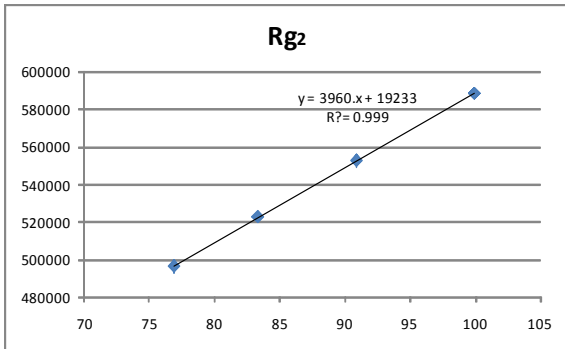
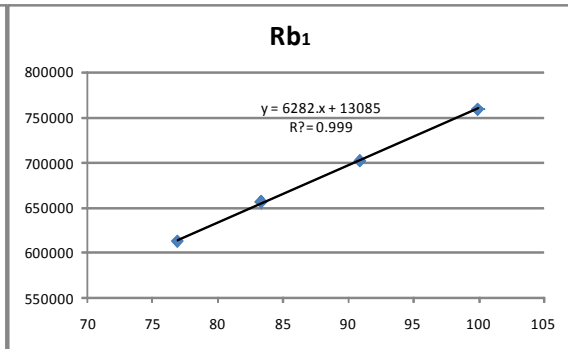
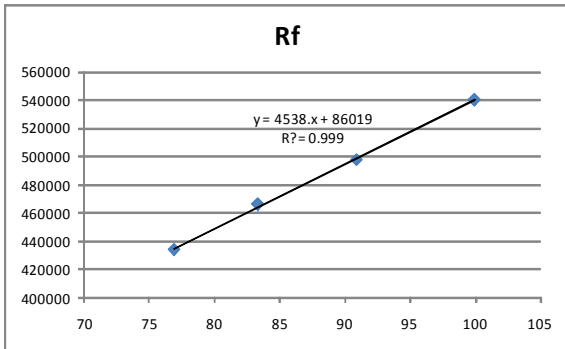
###### (2) HPLC-ginsenoside의 분석

위에서 얻은 엑스를 고 등<sup>14)</sup>의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표준품과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표준품 Chromadex (U.S.A.)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside를 사용하였다.

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system (Waters, 미국)이며, 컬럼은 Gemini 5 $\mu$  C18110A(Phenomenex, 4.6 $\times$ 250mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 A(acetonitrile, HPLC급, Sigma, 미국)와 B(water)의 비율을 17% A(0 min), 30% A(40 min), 40% A(70 min), 100% A(80 min)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

Fig. 5. Calibration curves of ginsenoside standards







## 5. 원료 표준화 연구(인삼 prosapogenin 성분 분석법 연구)

### 가. 실험재료

흑삼은 (Fig. 1에서 보는바와 같이-삭제) 5년근 수삼을 2009년 8월에 풍기 인삼시장에서 구입하여 가정용 증숙기로 98°C 조건에서 2시간 증숙한 후, 건조기에서 60°C 조건에서 24시간 건조하였고, 이를 9회 반복한 것을 사용하였으며, 홍삼은 2시간 1회 증숙 및 건조한 것을 사용하였다. 표본은 세명대학교 한방식품영양학부 천연물연구실에 보관하고 있다.

### 나. 검액의 조제

흑삼, 홍삼(을-삭제) 각각 8 g 씩에 95% Ethyl alcohol (EtOH)를 각각 250 ml 씩 넣고, 각각 2시간씩 1회 환류 추출하였고, 여과후 여액을 70°C에서 감압 농축하여 95% EtOH (Ethyl alcohol-삭제) 엑스를 얻었다.

### 다. 조사포닌 조제

검체 (sample) 각 10g을 취하여 증류수에 현탁하여 분액깔데기에 넣고, diethylether 250ml로 3회 처리하여 지용성 물질을 제거한 후, 수가용부에 수포화 n-butanol 250ml로 3회 처리하여 얻은 n-BuOH 층을 합하여 감압농축 하였다. 이때 모든 조작은 정량적으로 하였다. 감압농축물의 함량을 조 사포닌 (crude saponin) 양으로 하였다<sup>20)</sup>.

### 라. HPLC(-ginsenoside의-삭제) 조건

위에서 얻은 엑스를 고 등<sup>21)</sup>의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표준품과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표준품은 Chromadex (U.S.A.)와 Ambo (Korea)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, 독일)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile (HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %에서 30 % (55분), 40 % (80분) 그리고 60 % (135분)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

## 마 결과 및 고찰

분석한 인삼 사포닌은 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>6</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>4</sub>, Rk<sub>1</sub>, Rk<sub>3</sub>, F<sub>1</sub> 그리고 F<sub>4</sub> 이었으며, 이들은 Fig. 2와 같이 HPLC를 통하여 표준과 직접 비교·확인하고 함량을 계산하였다.

인삼 사포닌의 함량 분포는 Table 1에서 보는바와 같이 총사포닌 (total saponin)은 분석한 ginsenoside 함량의 총 합계로서, 총사포닌의 함량은 흑삼이 2.351%로서 홍삼의 1.520%보다 높은 함량을 나타내었다.

protopanaxadiol group과 protopanaxatriol group의 비율 (PD/PT)에 있어서는 흑삼이 3.630으로 홍삼의 1.508보다 약 2.4배 높은 비율을 나타내었다. 결과적으로 흑삼은 상대적으로 protopanaxadiol group ginsenosides (ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rk<sub>1</sub>)가 많은 함량 비율을 나타내었다.

이와 같은 결과는 2005년 한 등이 보고한 흑삼의 인삼사포닌 연구에서 흑삼은 protopanaxatriol group이 높은 함유율을 나타낸다고 보고하였으나, 본 연구에서는 2005년보다 인삼 prosapogenin 성분 중 ginsenoside Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>6</sub>, Rh<sub>4</sub>, Rk<sub>1</sub>, Rk<sub>3</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>4</sub>를 새로이 추가하여 성분 분석한 결과로서 한 등의 연구와는 상이한 결과를 보여주었다.

또한, 열에 의하여 생성되는 인공물 즉 홍삼 특유성분으로서, 항암<sup>22)</sup> 및 두뇌기능 개선작용<sup>23)</sup>을 나타낸다고 알려진 인삼 prosapogenin (ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>6</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>4</sub>, Rk<sub>1</sub>, Rk<sub>3</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>4</sub>) 성분의 함량에 있어서는 흑삼이 1.799%, 홍삼은 0.681%로서 흑삼이 홍삼보다 약 2.6배의 높은 함량을 나타내었다.

한편, 현행 건강기능식품 공전에 홍삼의 지표물질로 되어 있는 인삼 사포닌 배당체 성분인 ginsenoside Rb<sub>1</sub> 과 Rg<sub>1</sub> 의 함량에 있어서는 ginsenoside Rb<sub>1</sub>의 경우, 홍삼이 0.281%로 흑삼의 0.157%보다 약 1.8배 높은 함량을 보여주었고, ginsenoside Rg<sub>1</sub> 에서도 홍삼이 0.202%로 흑삼의 0.015%보다 약 13.5배 높은 함량을 나타내었다.

Table I. The composition and contents of ginseng prosapogenin in Red and Black Ginseng

Ginsenosides	(%w/w)	
	Red ginseng	Black ginseng
Rb <sub>1</sub>	0.281±0.005	0.157±0.003
Rb <sub>2</sub>	0.086±0.000	0.098±0.007
Rc	0.048±0.006	0.120±0.005
Rd	0.057±0.000	0.082±0.007
Re	0.108±0.003	0.013±0.001
Rf	0.057±0.001	0.067±0.001
Rg <sub>1</sub>	0.202±0.003	0.015±0.001
Rg <sub>2</sub>	0.029±0.000	0.076±0.002
20S-Rg <sub>3</sub>	0.195±0.002	0.652±0.008
20R-Rg <sub>3</sub>	0.136±0.003	0.385±0.004
Rg <sub>5</sub>	0.089±0.002	0.281±0.003
Rg <sub>6</sub>	0.002±0.000	0.011±0.002
Rh <sub>1</sub>	0.184±0.007	0.248±0.007
Rh <sub>4</sub>	0.007±0.000	0.024±0.002
Rk <sub>1</sub>	0.022±0.000	0.068±0.000
Rk <sub>3</sub>	0.003±0.000	0.014±0.001
F <sub>1</sub>	0.004±0.001	0.003±0.002
F <sub>4</sub>	0.010±0.000	0.037±0.001
Total ginsenosides <sup>a)</sup>	1.520	2.351
Diol <sup>b)</sup> /Triol	1.508	3.630
Crude saponin	5.289	7.528
Prosapogenin <sup>c)</sup>	0.681	1.799

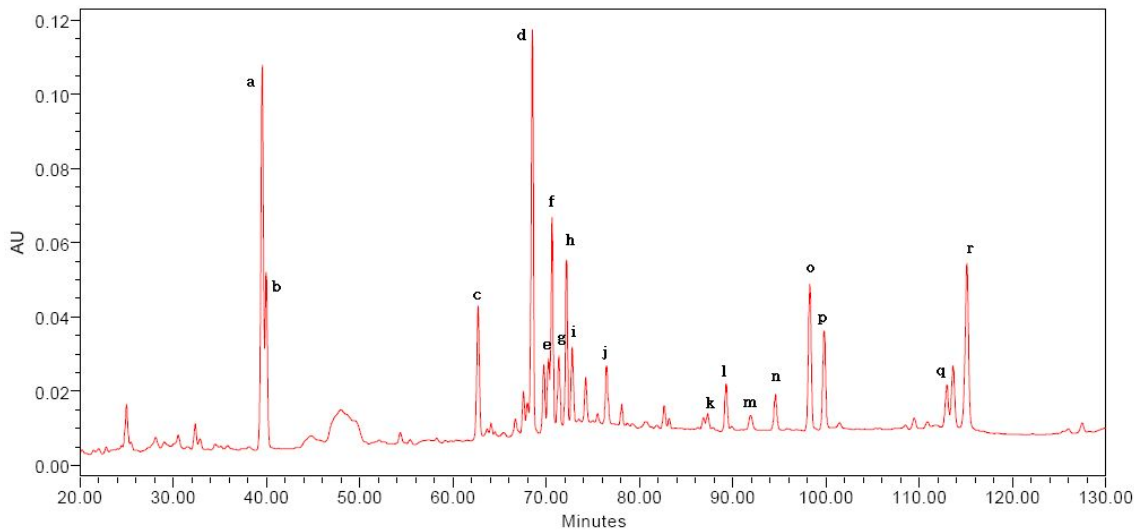
<sup>a)</sup> Sum total of individual ginsenoside contents

<sup>b)</sup> Ginsenosides Rb<sub>1</sub>+Rb<sub>2</sub>+Rc+Rd+Rg<sub>3</sub>+Rg<sub>5</sub>+Rk<sub>1</sub>

<sup>c)</sup> Ginsenosides Rg<sub>2</sub>+Rg<sub>3</sub>+Rg<sub>5</sub>+Rg<sub>6</sub>+Rh<sub>1</sub>+Rh<sub>4</sub>+Rk<sub>1</sub>+Rk<sub>3</sub>+F<sub>1</sub>+F<sub>4</sub>

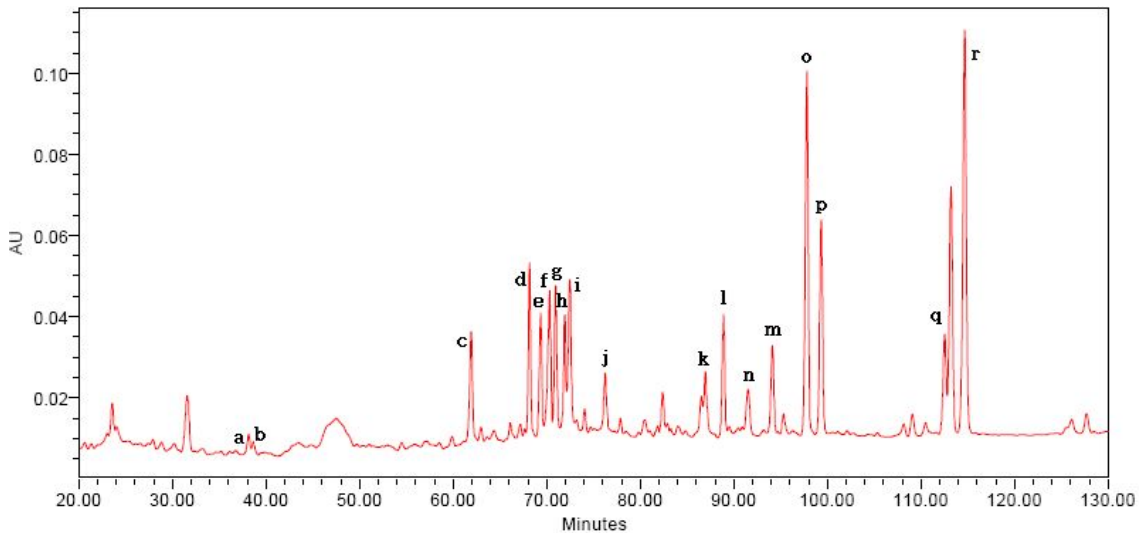
Values represent the mean±S.E. (n=3)

Fig. 1. HPLC profiles of ginsenosides detected from Red and Black Ginsengs  
(Red ginseng)



a : Ginsenoside Rg<sub>1</sub> , b : Ginsenoside Re, c : Ginsenoside Rf, d : Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, e: Ginsenoside Rg<sub>2</sub>, f : Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, g : Ginsenoside Rc, h : Ginsenoside Rb<sub>2</sub>, I : Ginsenoside F<sub>1</sub>, j : Ginsenoside Rd, k : Ginsenoside Rg<sub>6</sub>, l : Ginsenoside F<sub>4</sub>, m : Ginsenoside Rk<sub>3</sub>, n : Ginsenoside Rh<sub>4</sub> , o : Ginsenoside (20S)Rg<sub>3</sub>, p : Ginsenoside (20R)Rg<sub>3</sub>, q : Ginsenoside Rk<sub>1</sub>, r :Ginsenoside Rg<sub>5</sub>

(Black ginseng)



a : Ginsenoside Rg<sub>1</sub> , b : Ginsenoside Re, c : Ginsenoside Rf, d : Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, e: Ginsenoside Rg<sub>2</sub>, f : Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, g : Ginsenoside Rc, h : Ginsenoside Rb<sub>2</sub>, I : Ginsenoside F<sub>1</sub>, j : Ginsenoside Rd, k : Ginsenoside Rg<sub>6</sub>, l : Ginsenoside F<sub>4</sub>, m : Ginsenoside Rk<sub>3</sub>, n : Ginsenoside Rh<sub>4</sub> , o : Ginsenoside (20S)Rg<sub>3</sub>, p : Ginsenoside (20R)Rg<sub>3</sub>, q : Ginsenoside Rk<sub>1</sub>, r :Ginsenoside Rg<sub>5</sub>

## 6. 제조공정 최적화(소재 분석법 연구)

### 가. 인삼사포닌 HPLC 분석법 최적화

20여종의 인삼사포닌을 동시 분석할 경우, 일부 시그널(ginsenoside Rh1, Rc)이 겹쳐서 정확한 분석 데이터를 얻을 수 없었다. 이와 같은 분석조건의 문제점을 해결하기 위하여 여러 조건의 분석 조건을 검토하여 완벽히 분리되는 동시분석 조건(A-5)을 완성하였다.

인삼사포닌 HPLC 분석조건

A-1	시간(min)	0	25	50	105	110	120	125	135
	ACN(%)	17	25	40	60	100	100	17	17
A-2	시간(min)	0	25	60	115	120	130	135	145
	ACN(%)	17	25	40	60	100	100	17	17
A-3	시간(min)	0	25	50	105	110	120	125	135
	ACN(%)	17	25	35	55	100	100	17	17
A-4	시간(min)	0	25	50	105	110	120	125	135
	ACN(%)	17	25	37.5	57.5	100	100	17	17
A-5	시간(min)	0	25	50	105	110	120	125	135
	ACN(%)	17	25	38	58	100	100	17	17

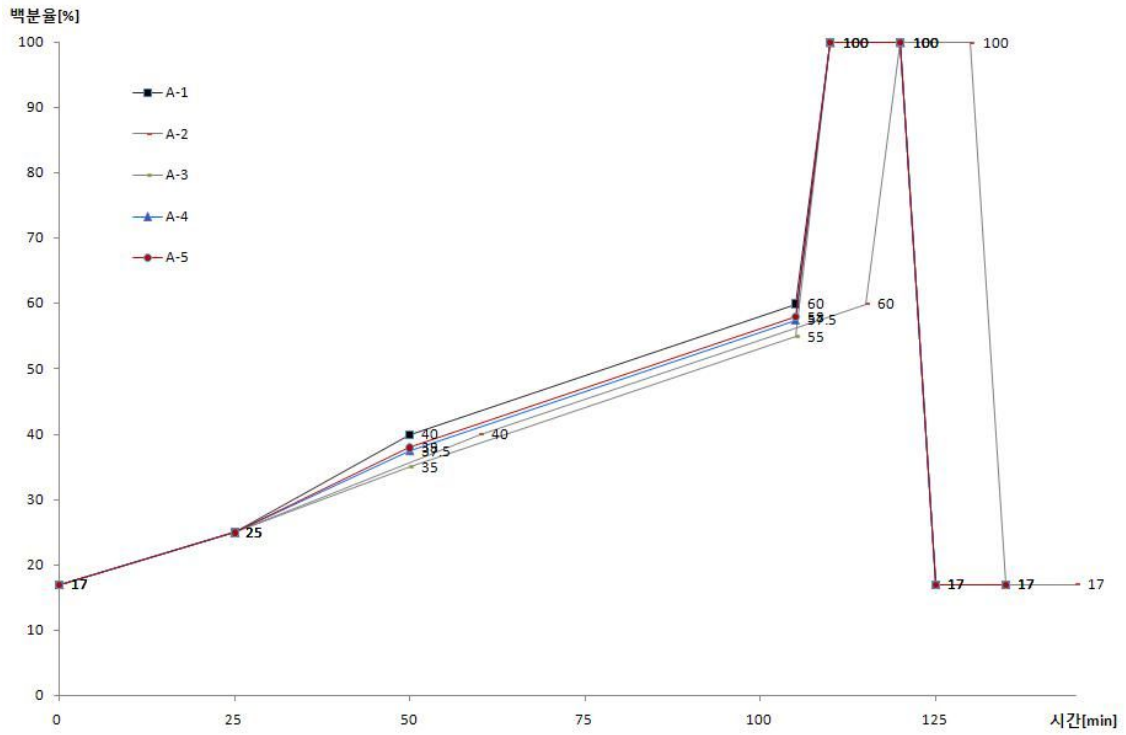
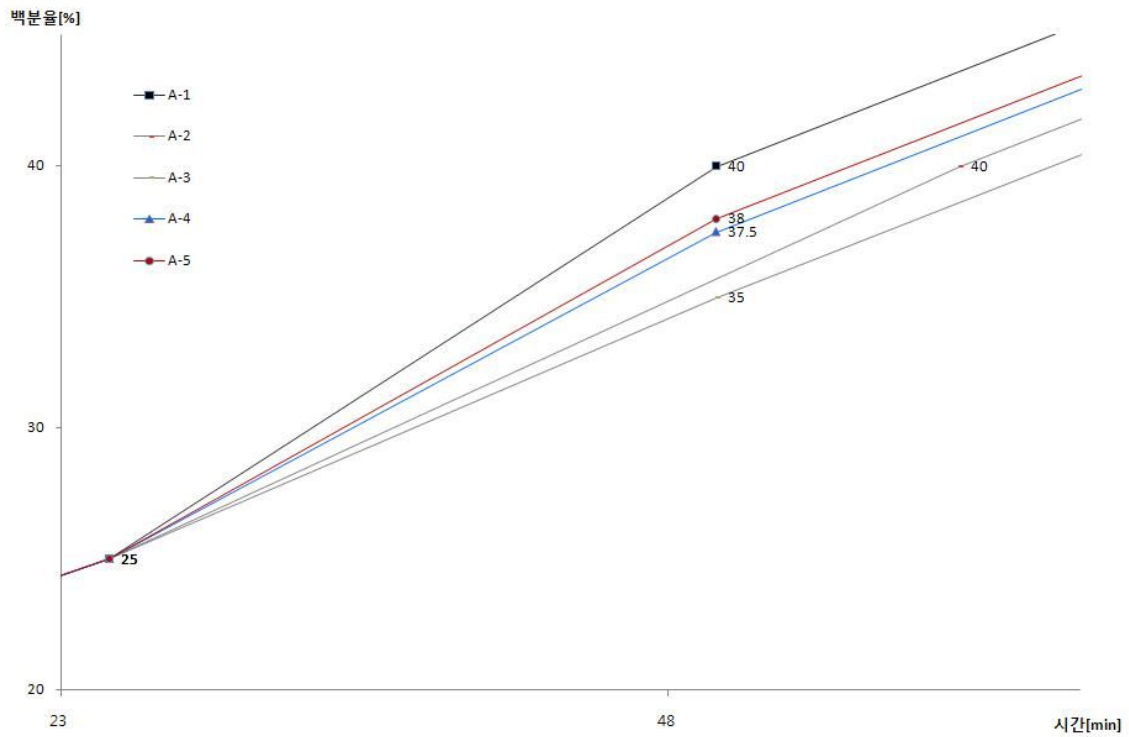
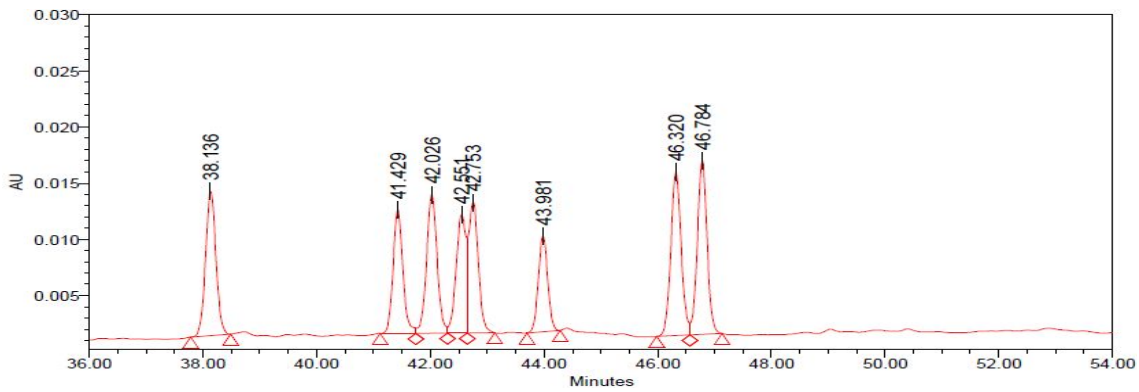
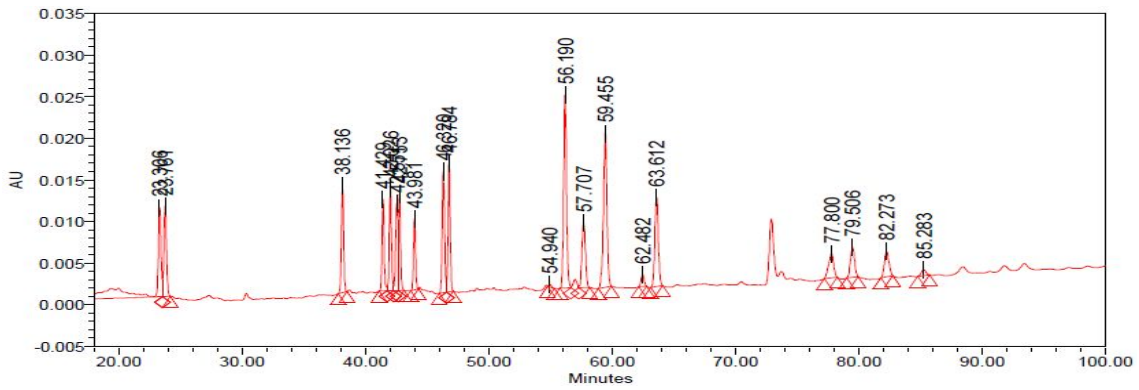


그림 1

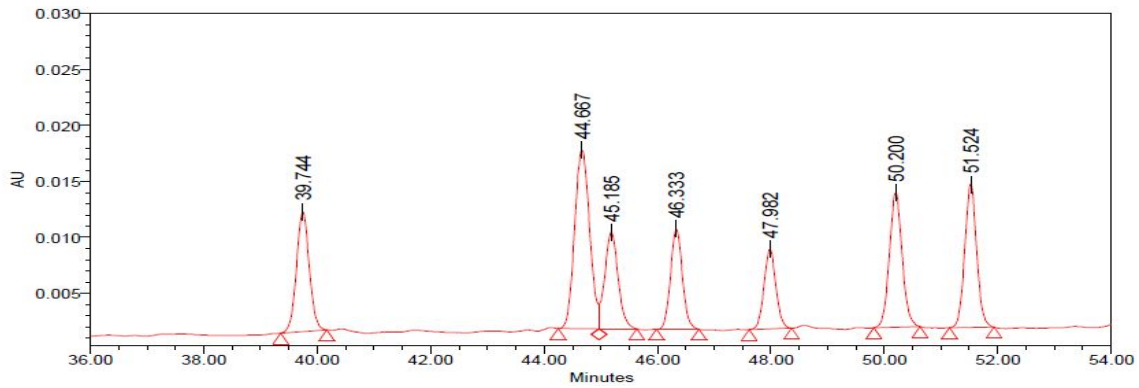
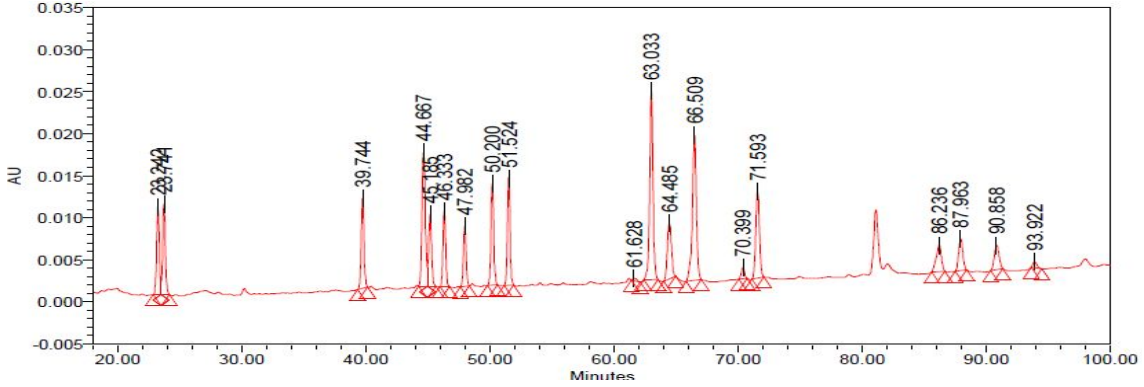


분석조건 기울기

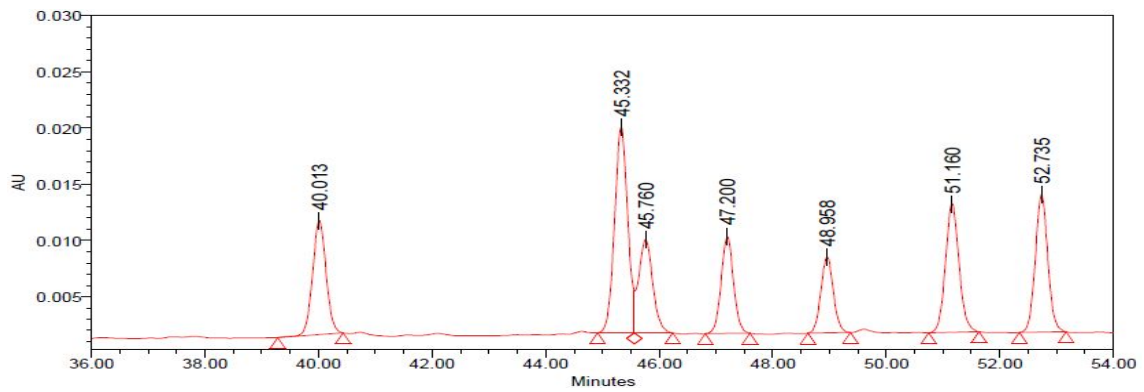
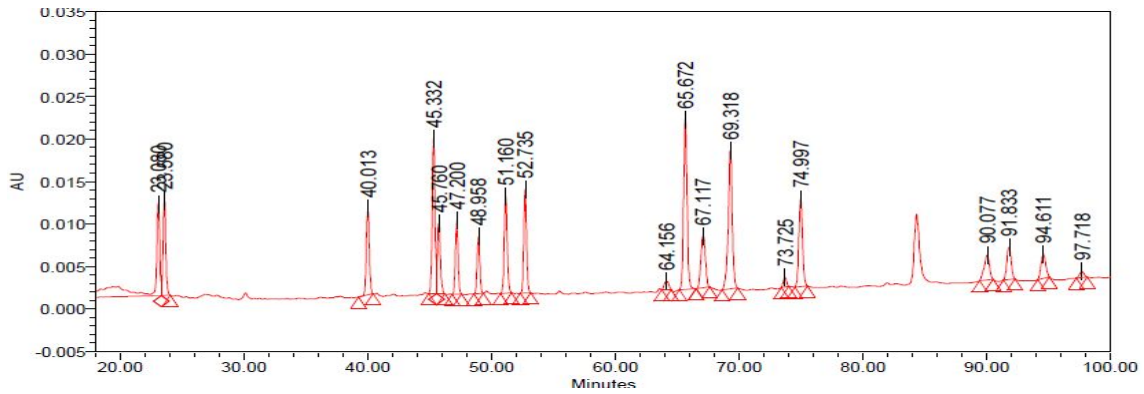
(A-1)



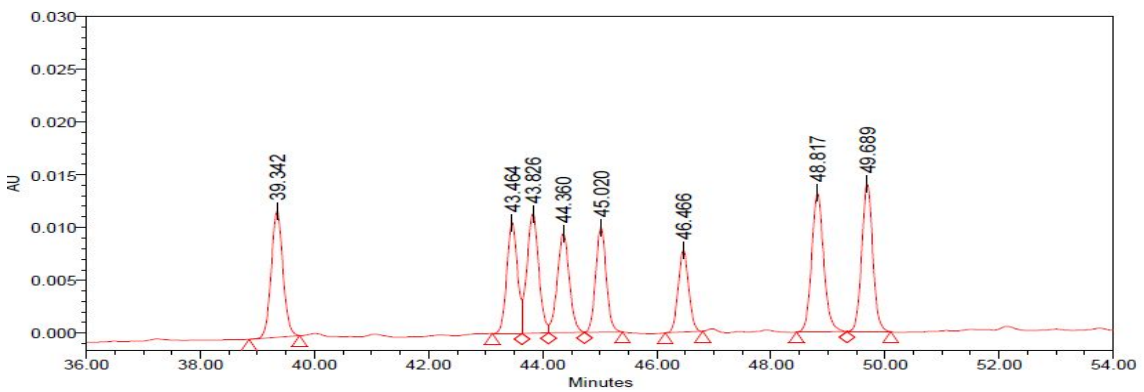
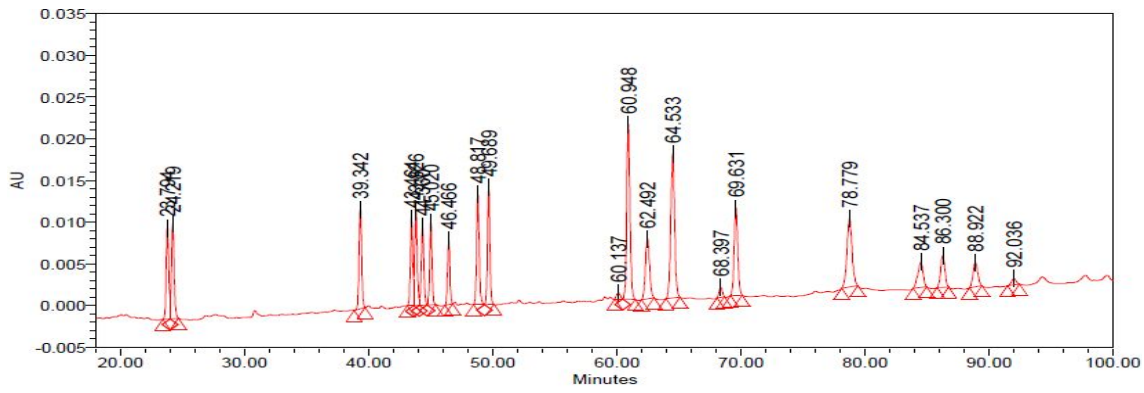
(A-2, 기울기 0.428)



(A-3, 기울기 0.4)

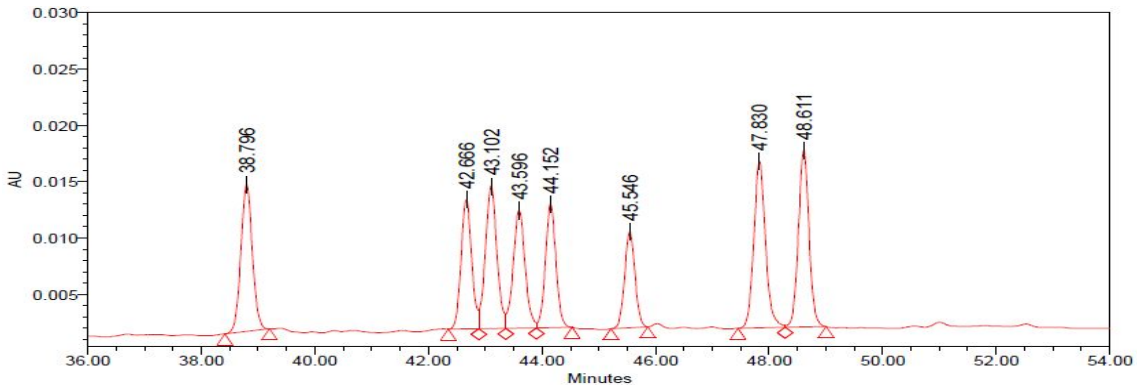
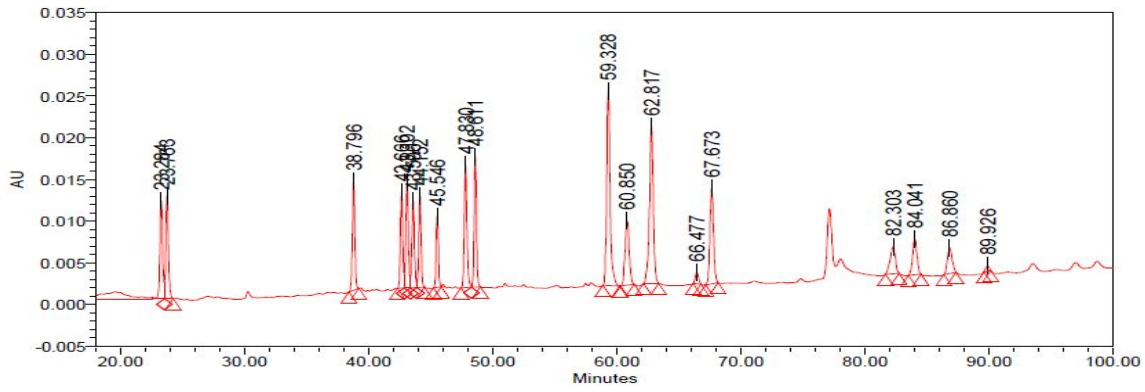


(A-4, 기울기 0.5)





(A-5, 기울기 0.52) : 최적 분리 조건



## 7. 제조공정 최적화(초음파 처리 인삼화퇴 조성물로부터 ginsenoside Rg2, Rh1, F4 고농도 함유 분획 탐색)

기능화장품 소재를 탐색하기 위해서 초음파 처리 인삼화퇴 조성물의 butanol 분획을 대상으로 용매분획을 실시한 결과, isopropylalcohol 분획이 ginsenoside Rg2(8.234%), Rh1(5.749%), F4(3.881%)로 고농도 분획임을 HPLC 법으로 확인하였다.

### ● HPLC 조건

Pump : Waters 1525 Binary HPLC

Autosampler : Waters 717plus

Detector : Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance

column : Eurospher2 100-5 C18 (250\*3mm)

이동상 : 물 · 아세토니트릴

Flow rate : 0.8ml/1min

run time : 135min

inject vol (ul) : 10ul

검출기 : 측정파장 203nm

conditions : gradient

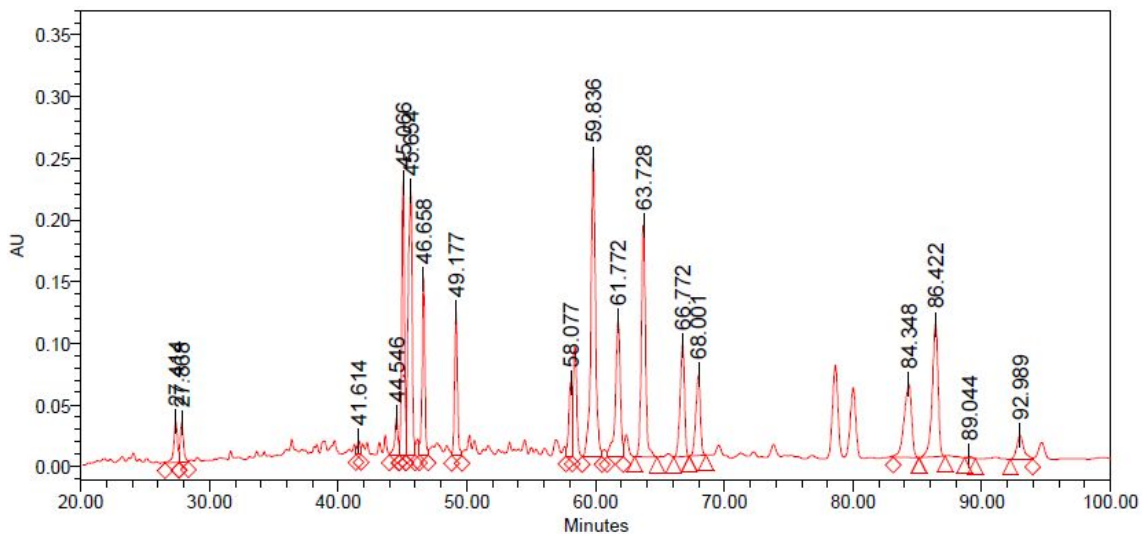
Time	Flow	A% (ACN)	B% (Water)
0	0.8	17.0	83.0
25	0.8	25.0	75.0
50	0.8	40.0	60.0
105	0.8	60.0	40.0
110	0.8	100	0.0
120	0.8	100	0.0
125	0.8	17.0	83.0
135	0.8	17.0	83.0

초음파 처리 인삼화퇴 용매분획의 인삼사포닌 함량

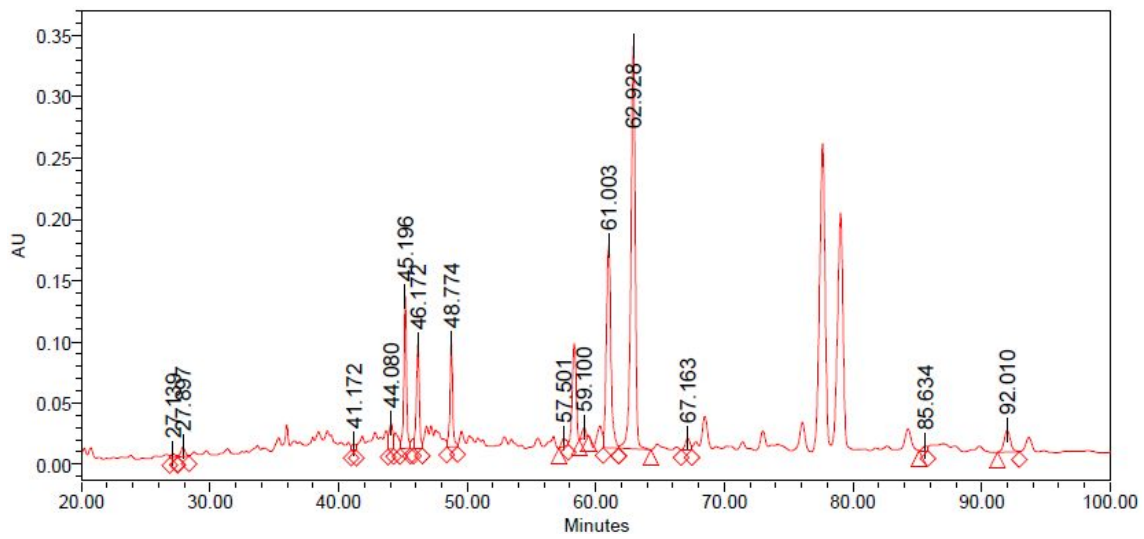
(%,w/w)

Ginsenosides	초음파 처리 인삼화퇴			
	acetone	ethyl acetate	chloroform	isopropanol
Rg <sub>1</sub>	0.959	0.378	0.104	0.768
Re	1.120	0.082	0.368	2.011
Rf	0.367	0.041	0.213	0.414
Rb <sub>1</sub>	1.388	0.733	1.150	1.094
Rg <sub>2</sub>	6.598	1.671	-	8.234
Rh <sub>1</sub>	6.073	3.759	2.494	5.749
Rb <sub>2</sub>	6.615	5.806	4.147	5.102
F1	2.730	1.487	2.017	4.318
Rd	-	-	-	-
Rg <sub>6</sub>	0.710	0.301	0.115	0.792
F4	4.083	1.553	0.117	3.881
Rk <sub>3</sub>	1.676	1.612	2.412	1.096
Rh <sub>4</sub>	2.486	2.647	4.544	1.612
20S-Rg <sub>3</sub>	8.103	2.430	-	6.996
20R-Rg <sub>3</sub>	5.924	1.910	0.891	5.188
Rk <sub>1</sub>	3.227	2.073	-	2.352
Rg <sub>5</sub>	4.545	2.905	0.131	3.248
compound k	0.113	-	-	-
Rh <sub>2</sub>	1.630	1.761	1.368	1.105
Total				
ginsenosides <sup>a)</sup>	58.348	31.148	20.070	53.960
Diol/Triol <sup>b)</sup>	1.177	1.302	0.621	0.869
20S-Rg <sub>3</sub> + 20R-Rg <sub>3</sub>	14.027	4.340	0.891	12.184

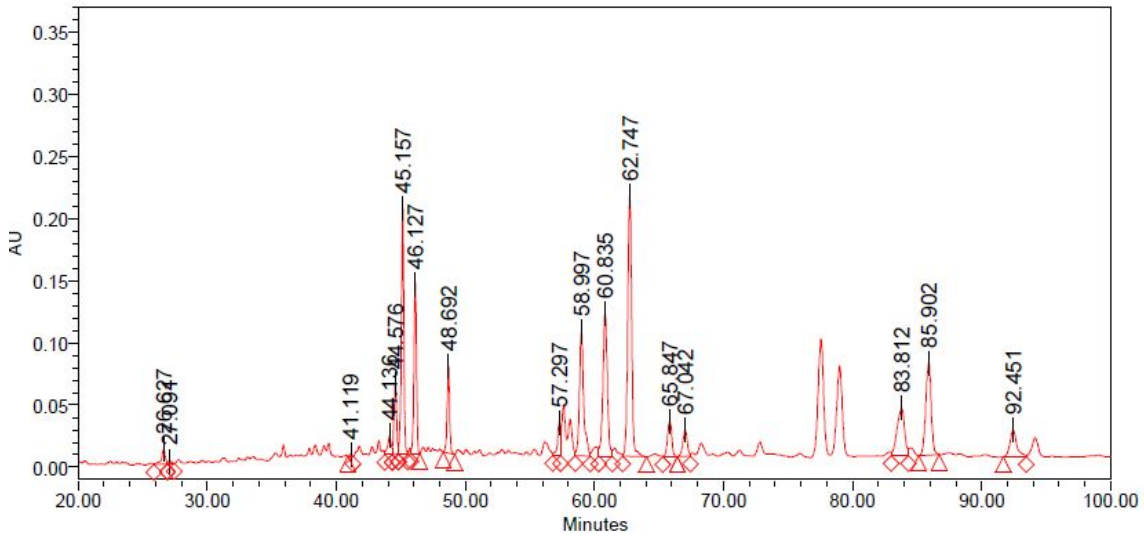
(acetone 분획 HPLC 시그널)



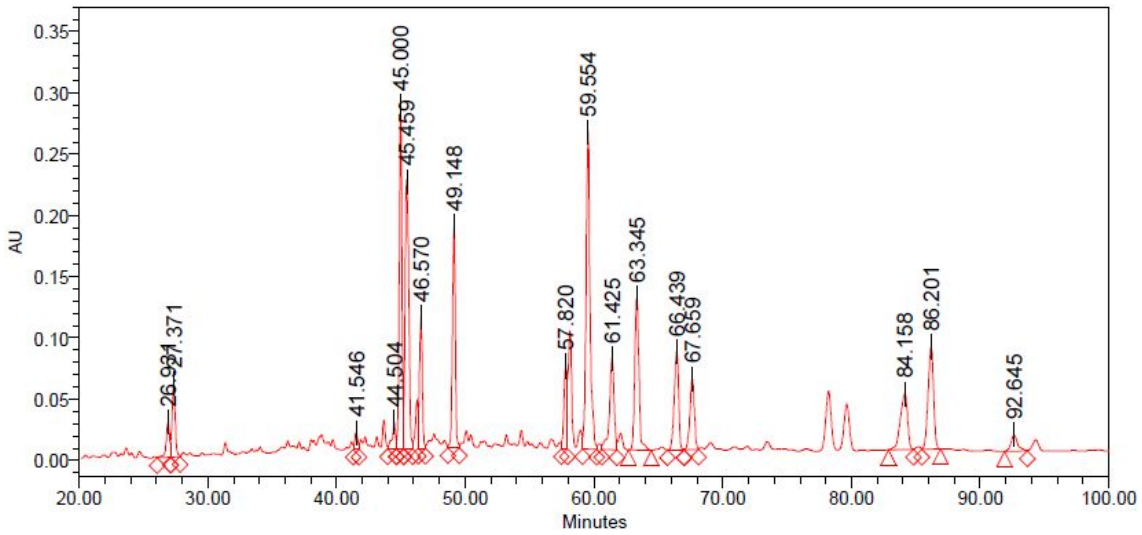
(chlorform 분획 HPLC 시그널)



(ethyl acetate 분획 HPLC 시그널)



(isopropylalcohol 분획 HPLC 시그널)



## 8. 주름개선 화장품 인체적용시험 시험제품 제조

### 가. 화장품 소재 조성

번호			30			
	D.I-Water	54.19	16.26	54.19	%	물
	EDTA-2Na	0.020	0.01	0.02		킬레이트제(중금속)
	Hydrovance	2.000	0.60	2.00		보습제
	Glycerin	1.000	0.30	1.00		보습제
	1,3-BG	5.000	1.50	5.00		보습제
	Hyaluronic Acid	0.050	0.02	0.05		보습제
	Na-HA(1%)	3.000	0.90	3.00		보습제
	Phospholipon 80	2.000	0.60	2.00		유화제
				0.00		
	Macademia Nut Oil	4.000	1.20	4.00		오일
	TCG-M	2.000	0.60	2.00		오일
	Arlacel 165	1.000	0.30	1.00		유화제
	Vit. E Acetate	0.100	0.030	0.10		
	Cremerline PURA	3.000	0.90	3.00		보습제
	BHT	0.020	0.01	0.02		산화방지제
	Reliefer	2.000	0.60	2.00		자극 완화제
	CEH	1.000	0.30	1.00		오일(Ester Oil)
				0.00		
	Bioneat	0.420	0.13	0.42		방부제
	Glycacid Eco	3.000	0.90	3.00		저분자 침투제
				0.00		
	Vitaceraesterol	1.000	0.30	1.00		보습제
	Aqua Touch L	3.000	0.90	3.00		사용감 개선제
				0.00		
	P. Water	2.000	0.60	2.00		
	L-Arginine	0.200	0.06	0.20		Gel 중화제
				0.00		
	Seppic Plus 400	1.000	0.30	1.00		점증제
				0.00		
	초음파 인삼화퇴 분획	1.00	0.30	1.00		기능성 원료
	1,3-BG	8.00	2.40	8.00		
				0.00		
				0.00		
				0.00		
				0.00		
				0.00		
				0.00		
	Total	100.00	30.00	100.00		



인삼화뢰 화장품 소재 시험 제품 사진

나. 화장품 소재의 인삼사포닌 함량

(1) 시료

초음파 처리 인삼화되 isopropylalcohol 분획

(2) HPLC 조건

Pump : Waters 1525 Binary HPLC

Autosampler : Waters 717plus

Detector : Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance

column : Eurospher2 100-5 C18 (250\*3mm)

이동상 : 물 · 아세토니트릴

Flow rate : 0.8ml/min

run time : 135min

inject vol (ul) : 10ul

검출기 : 측정파장 203nm

conditions : gradient

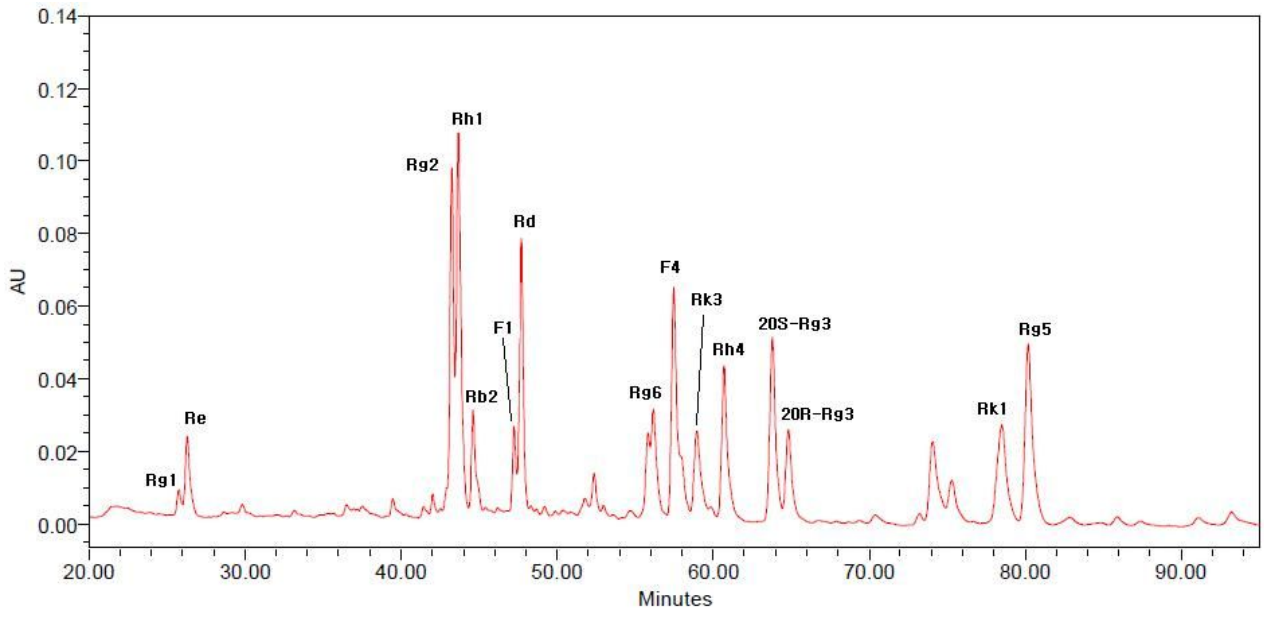
Time	Flow	A% (ACN)	B% (Water)
0	0.8	17.0	83.0
25	0.8	25.0	75.0
50	0.8	40.0	60.0
105	0.8	60.0	40.0
110	0.8	100	0.0
120	0.8	100	0.0
125	0.8	17.0	83.0
135	0.8	17.0	83.0



초음파 처리 인삼화뢰 isopropylalcohol 분획의 인삼사포닌 함량

(%,w/w)

Ginsenosides	인삼화뢰 회장품 소재
Rh <sub>1</sub>	10.733±0.9184
Rb <sub>1</sub>	0.149±0.0018
Rb <sub>2</sub>	3.685±0.4102
Rd	9.202±0.5111
Re	2.168±0.0932
Rf	0.190±0.1233
Rg <sub>1</sub>	0.527±0.0419
Rg <sub>2</sub>	5.409±0.0938
20S-Rg <sub>3</sub>	7.491±0.3291
20R-Rg <sub>3</sub>	4.001±0.2252
Rg <sub>5</sub>	4.855±0.2858
Rg <sub>6</sub>	1.084±0.0555
Rh <sub>2</sub>	-
Rh <sub>4</sub>	1.250±0.0053
Rk <sub>1</sub>	3.257±0.2227
Rk <sub>3</sub>	0.841±0.1376
compound k	-
F1	1.022±0.0264
F4	2.573±0.0040
Total	58.437
ginsenosides <sup>a)</sup>	
Diol/Triol <sup>b)</sup>	1.265
20S-Rg <sub>3</sub> + 20R-Rg <sub>3</sub>	11.492



초음파 처리 인삼화퇴 isopropylalcohol 분획의 인삼사포닌 HPLC 시그널

## 9. 안정성 연구

### 가. 실험방법

1차년도에 수행한 원료 추출 및 제조법 연구를 통해 제조된 원료를 가지고 실온(25℃, 60% RH)조건에 보관하면서 12개월 동안 3개월마다 시험을 실시하였다. (식품의약품안전청고시 제 2000-7호 '의약품 등의 안정성시험기준'에 준하여 실시)

### 나. 실험 결과

#### (1) 원료의 안정성 시험

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

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

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

## 제 6 절 주름개선 임상시험(인체적용시험)

### 인체적용시험 계획서 요약

인체적용시험의 명칭	인삼 화뢰의 피부 주름개선 효과 시험 연구																				
시험기관	세명대학교부속제천한방병원																				
시험 책임자	세명대학교부속제천한방병원 한방 안이비인후피부과 김희택 교수																				
시험 담당자	세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 피부과 전문의 백종현 겸임교수																				
공동연구자 및 연구원	세명대학교부속제천한방병원 침구과 노정두 교수 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터 김용민 교수 세명대학교부속제천한방병원 한방 안이비인후피부과 강다혜(전문수련의) 세명대학교부속제천한방병원 침구과 김정현(전문수련의)																				
연구기간	IRB 승인일로부터 12개월																				
시험 디자인	단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 대조제품 비교 인체적용시험																				
연구 목적	인삼 화뢰를 이용한 주름개선 화장품을 12주간 사용했을 때 피부 주름의 개선 등 유효성과 제품의 안전성을 평가하고자 한다.																				
대상자수	최종 평가 가능한 피험자 수 20명, 20% 탈락률을 고려하여 총 24명																				
연구대상	눈가에 주름을 가진 만 30~65세의 성인 여성																				
선정기준	<p>(대상피험자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 주 시험자가 설명한 피험자에게 알려주어야 할 사항에 대하여 충분히 설명 듣고 자발적으로 임상 시험 참가 동의서를 작성하고 서명한다</li> <li>2. 연구 책임자의 판단과 육안평가상 시험부위에 주름이 있는 경우 <table border="1" data-bbox="491 1487 1369 1868"> <thead> <tr> <th colspan="2">visual assessment score</th> </tr> <tr> <th>severity</th> <th>wrinkle grading</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>none</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>none/mild</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>mild</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>mild/moderato</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>moderato</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>moderato/severe</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>severe</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>very severe</td> </tr> </tbody> </table> </li> <li>3. 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자</li> <li>4. 주 시험자의 판단에 따라 시험부위에 주름을 가지고 있는 자</li> <li>5. 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 자</li> </ol>	visual assessment score		severity	wrinkle grading	0	none	1	none/mild	2	mild	3	mild/moderato	4	moderato	5	moderato/severe	6	severe	7	very severe
visual assessment score																					
severity	wrinkle grading																				
0	none																				
1	none/mild																				
2	mild																				
3	mild/moderato																				
4	moderato																				
5	moderato/severe																				
6	severe																				
7	very severe																				

<p style="text-align: center;"><b>제외기준</b></p>	<p>(다음 어느 하나라도 해당되는 피험자는 본 연구에 참여할 수 없다)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 임신 또는 수유중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성</li> <li>2. 피부 질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용한 자</li> <li>3. 동일한 시험에 참가한 뒤 6개월이 경과되지 않은 자</li> <li>4. 민감성, 과민성 피부를 가진 자</li> <li>5. 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 자</li> <li>6. 연구 시작 전 3개월 내에 시험부위에 동일 또는 유사한 화장품 또는 의약품을 사용한 자</li> <li>7. 연구 시작 전 6개월 내에 피부박피술, 주름제거술 등을 받은 자</li> <li>8. 그 외 주 시험자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 자</li> </ol>
<p style="text-align: center;"><b>인체적용시험용 제품</b></p>	<p><input type="checkbox"/> 시험제품 : 인삼 화뢰가 함유된 제품</p> <p><input type="checkbox"/> 대조제품 : 대조시험용 제품</p>
<p style="text-align: center;"><b>사용기간 및 사용방법</b></p>	<p>대상자를 두 그룹으로 나누어 시험제품과 대조제품을 바르는 위치를 두 그룹간에 서로 반대로 도포하게 하였다. 연구원이 지정해 준 우(좌)측 눈가에는 시험제품을, 좌(우)측 눈가에는 대조제품을 도포하였으며 12주간 1일 2회 아침, 저녁 세안 후 지정된 눈가에 적당량을 고르게 도포한다.</p>
<p style="text-align: center;"><b>평가 방법</b></p>	<p><b><u>유효성 (efficacy)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 눈가 주름의 육안 평가</li> <li>○ Skin-Visiometer를 이용한 화상평가</li> <li>○ 설문평가</li> </ul> <p>Baseline과 4주, 8주, 12주후 시험군과 대조군의 눈가 주름을 평가한다. 설문평가는 4주, 8주, 12주 경과 후에 각각 피험자를 대상으로 대조제품과 시험제품의 일반적 평가(사용감), 효능성(주름개선) 평가, 화장품적 적합성 평가, 제품에 대한 호감도, 이상 반응 등을 조사한다.</p> <p><b><u>안전성 (safety)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 시험제품 및 대조제품의 이상반응인 홍반(Erythema), 부종(Edema), 인설(Scaling), 가려움(Itching), 자통(Stinging), 작열감(Burning), 뻣뻣함(Tightness), 따끔거림(Prickling)이나 다른 이상반응이 발생하는지의 존재 여부를 면밀히 관찰하고 피부 이상반응이 나타날 시 심한 정도에 따라 등급을 표시하고 이에 대한 검사 소견을 작성한다.</li> </ul>

## 1. 시험 방법

본 연구는 화장품법 제 9조의 규정에 의하여 ‘피부 주름개선에 도움을 주는 기능성 화장품’에 관한 식품의약품안전청고시 제2009-166호의 ‘주름개선효과의 측정방법 및 기준’에 따라 시험을 수행하였으며, 식품의약품안전청고시에 규정하지 않은 사항은 참고문헌을 참조하여 수행하였다.

### 가. 연구 개요

의뢰자로부터 시료를 수령한 후 눈가에 주름을 가진 만 30~65세의 성인 여성을 대상으로 12주간 제품을 1일 2회 도포하도록 하고 사진촬영과 주름개선 측정 및 안전성 평가, 설문평가, 육안평가를 병행하여 효과를 평가하였다.

### 나. 연구 일정 및 절차

#### (1) 방문1 (0주차, 시험 시작일)

피험자 선정, 제외 기준에 따라 연구에 적합한 피험자를 선정하고, 피험자의 피부 상태를 확인한 후 육안 평가 및 사진촬영, 기기평가(SV600)를 병행하여 평가하였다.

#### (2) 방문2 (4주차)

배포된 시험제품을 사용방법에 따라 4주 동안 사용한 피험자를 대상으로 육안 평가 및 안전성 평가, 사진촬영, 기기평가(SV600), 설문평가를 병행하여 효과를 평가 하였다.

#### (3) 방문3 (8주차)

배포된 시험제품을 사용방법에 따라 8주 동안 사용한 피험자를 대상으로 육안 평가 및 안전성 평가, 사진촬영, 기기평가(SV600), 설문평가를 병행하여 효과를 평가 하였다.

#### (4) 방문4 (12주차)

배포된 시험제품을 사용방법에 따라 12주 동안 사용한 피험자를 대상으로 육안 평가 및 안전성 평가, 사진촬영, 기기평가(SV600), 설문평가를 병행하여 효과를 평가 하였다.

### 다. 피험자 선정방법

#### (1) 피험자 선정

만 30세 ~ 65세의 성인 남녀 중에서 선정기준에 만족하며 제외기준에 해당되는 사항이 없는 사람을 대상으로 선정하였다. 시험 제품의 주름개선효과를 평가하기 위해 문서화된 정보를 피험자에게 제공하고 시험책임자 등이 구두로 자세하게 설명한 다음 피험자의 자유로운 의사에 의해 대상자가 되기를 서면으로 동의한 후 시험에 참여하였다.

- (가) 한방바이오산업 임상지원센터에서는 인터넷 접수 및 전화 접수 등을 통해 사전에 모집된 피험자를 확보, 관리하였다.
- (나) 임상시험 계획에 적합한 피험자를 사전에 모집된 피험자를 대상으로 선택한 후 전화로 시험 내용을 설명하고 본 센터로 방문하게 하였다
- (다) 방문 첫날, 피험자 피부에 이상소견과 피부 상태가 시험에 적합한지 여부를 연구책임자가 육안평가와 설문평가를 통해 확인한 후 최종 피험자를 선정하였다.
- (라) 최종 피험자를 대상으로 피험자에게 전달될 사항을 서면과 구두로 설명하고 자유로운 의사에 의해 동의서를 작성한 후 시험에 참가하도록 하였다.

(2) 선정 기준

- (가) 주 시험자가 설명한 피험자에게 알려주어야 할 사항에 대하여 충분히 설명 듣고 자발적으로 임상 시험 참가 동의서를 작성하고 서명한자
- (나) 연구 책임자의 판단과 육안평가상 시험부위에 주름이 있는 경우

<b>visual assessment score</b>	
<b>severity</b>	<b>wrinkle grading</b>
0	none
1	none/mild
2	mild
3	mild/moderato
4	moderato
5	moderato/severe
6	severe
7	very severe

- (다) 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
- (라) 주 시험자의 판단에 따라 시험부위에 주름을 가지고 있는 자
- (마) 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 자

(3) 제외 기준

피험자와의 면담을 통해 다음 사항에 해당되는 사람은 피험자에서 제외하였다.

- (가) 임신 또는 수유중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성
- (나) 피부 질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용한 자
- (다) 동일한 시험에 참가한 뒤 6개월이 경과되지 않은 자
- (라) 민감성, 과민성 피부를 가진 자

- (마) 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 자
- (바) 연구 시작 전 3개월 내에 시험부위에 동일 또는 유사한 화장품 또는 의약품을 사용한 자
- (사) 연구 시작 전 6개월 내에 피부박피술, 주름제거술 등을 받은 자
- (아) 그 외 주 시험자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 자

(4) 피험자 주의 사항

- (가) 검사일정 및 시간을 꼭 지키도록 하였다.
- (나) 피험자는 시험하는 동안 시험 부위에 심한 마찰을 주는 행위를 자제하도록 하였다.
- (다) 인체적용 시험 중 과음과 지나친 흡연을 삼가도록 하였다.
- (라) 제품을 1일 2회 빠지지 않고 도포하도록 하였다.
- (마) 시험부위를 햇빛에 노출시키지 않도록 하였다.
- (바) 시험제품과 대조제품을 혼동하여 도포하지 않도록 하였다.
- (사) 시험 기간 중 다른 기후의 지역으로의 휴가, 과도한 스트레스 등 일상 생활을 크게 벗어난 활동을 하지 않도록 하였다.
- (아) 평가하기 12시간 전에는 화장을 하지 말도록 하였다.

(5) 시험기간 중 자진탈퇴

시험기간 중 피험자는 언제든지 자유의사에 따라 자진 탈퇴할 수 있도록 하였다.

(6) 시험기간 중도 탈락 기준

선정기준에 해당하고 제외기준에 해당되지 않더라도 다음의 상황이 발생한 경우 연구책임자와 연구원의 판단 하에 제외시켰으며, 이는 시험 결과 산정에서 제외하고 이를 보고서에 작성하였다.

- (가) 피험자에게 중대한 이상 반응(Serious Adverse Events)이 발생한 경우 혹은 모든 제품 사용 부위에 소양감이나 홍반 등의 이상 반응이 발생하여 피험자가 시험 중단을 요구한 경우
- (나) 인체적용시험에서 발견치 못한 전신 질환이 발견된 피험자
- (다) 시험 진행과정 중 시험 부위에 과도한 자외선 노출을 한 자
- (라) 시험 진행과정 중 지나친 음주, 흡연 등으로 결과 평가에 장애가 발생할 경우
- (마) 인체적용시험 기간 중 피험자 또는 피험자의 법정 대리인이 시험 중단을 요구한 경우
- (바) 연구자나 피험자에 의해 시험계획을 위반한 경우
- (사) 피험자의 추적관찰이 되지 않는 경우
- (아) 피험자에게 시험 화장품을 투여하는데 문제가 있는 경우
- (자) 경과 관찰 기간 동안 전문의의 지시 없이 연구결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우
- (차) 기타 담당자의 판단에 의해 연구 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우

(7) 이상반응 발생 시 보상대책



본 연구센터는 모든 시험 수행 시 피험자의 안전을 위해 최선의 노력을 다하였으며, 예측 가능한 이상반응 이외의 이상반응 발생시 신속하고 적절한 조치를 취하여 그 이상반응을 최소화 하였다. 이에 대하여 연구기관장 및 연구책임자는 조사 및 관리를 수행하였다. 본 연구와 관련된 시험 중 시험에 연계된(도포한 시료) 이상 반응이 발생한 경우에는 즉시 시험을 중단하고, 증상이 호전되지 않을 경우 와 기타 비정상적인 피부 반응이 발생할 경우 피부과 전문의에게 문진하여 치료를 받도록 하였다. 연구책임자와 연구원은 피부과적 평가와 함께 적절한 조치를 취하며 증례 및 상황에 대하여 상세히 기록을 하였다.

#### (8) 시험에 관한 일반적인 주지사항

연구자는 피험자들에게 본 시험의 목적과 방법, 기대 이득 효과와 시험으로부터 야기될 수 있는 소양증, 홍반, 자극 등의 이상반응, 시험기간 종료와 동시에 즉시적인 시험군에서의 탈퇴, 본인의 임상시험 거부 또는 탈퇴로 다른 불이익을 받지 않게 됨을 확인하고 시험시료로 인한 모든 이상반응의 발생 가능성과 만일 이상반응 발생시 중도탈락 및 치료 등의 다른 조치가 고려될 수 있음에 대하여 충분히 설명하였다.

#### (9) 피험자 정보의 비밀 유지와 성실 의무

본 시험에 참여한 피시험자의 비밀은 보장되었으며, 의학적인 목적에 의해서 피험자의 신원이 밝혀지지 않는 범위에서 시험자료를 이용하도록 하였다. 피시험자는 본 실험을 통해 얻는 정보는 실험이 종료될 때까지 비밀을 유지하도록 하였고, 성실하고 정직하게 자료를 작성하도록 하였다.

### 라. 피험자 수

(1) 최소 20명 이상을 선정하였다. 시험 도중 탈락 및 중도 포기한 피험자 3명을 제외하고 시험에 참여한 피험자는 총 21명이다.

(가) 중도탈락 피험자

(나) 피험자 관리번호: W1093, W1106, W1110

(다) 피험자 이니셜: KAG, LGJ, HGD

(라) 중도 탈락 사유: 일신상 사유로 자의적 탈락

\* 상기 피험자의 시험결과는 결과 산정에서 제외하였음

### 마. 시험부위

시험은 피험자의 눈가에 실시하였으며, 얼굴 좌우측을 절반으로 나누어 한쪽엔 시험제품을 반대쪽엔 대조제품을 도포하였다. 시험부위는 깨끗하고 마른 상태에서 최소 30분간 피부안정을 취한 다음 진행하였다.

### 바. 모사판의 제조방법

특수 제작된 눈금자\*를 이용하여 수평으로 1.0cm 되는 부위에 양쪽 접착성 plastic frame의 한쪽 끝 중앙에 오도록 붙인다. (특수 제작된 눈금자\*: 눈금자의 끝에서 1.0cm에 plastic frame 형태로 특수 제작된 눈금자)

모사판 제작을 위한 실리콘 용액B(기제)와 C(촉매제)를 혼합 용기에 각각 2방울씩 떨어 뜨려 진공펌프에 의한 감압 조건 하에서 15초 정도 두 용액이 잘 섞이도록 혼합한다(그림 1., 그림 2.). 감압 조건은 혼합과정에서 혼합용액 내에 기포가 생성되지 않도록 하기 위해서이다.

혼합 용액 1방울을 모사판 제작 부위(frame의 중앙-눈꼬리 부위에서 수평으로 1.5cm 되는 부위)에 떨어뜨리고 cover plastic을 올려 혼합용액인 원형의 모사판 제작 부위에 균일하게 도포되도록 살짝 눌러 준다(그림 3.).

위의 일련과정들은 10초 이내에 신속하게 진행한다.

피험자는 모사판 제작 부위에 적용한 혼합용액이 완전히 경화될 때까지 움직이지 말고 편안한 자세를 유지하도록 한다. 혼합용액이 완전히 경화되면 실리콘 모사판 frame을 눈가에서 조심스럽게 떼 낸 후 피부주름 모사판 상태, 기포의 유무 등을 확인한 후 문제가 있을 시 모사판을 다시 제작한다. 오른쪽, 왼쪽 동일한 방법으로 모사판을 제작한다.

완성된 모사판은 종이 재질의 틀에 붙이고 피험자와 관리번호 및 날짜 등을 기록한 후 먼지가 묻지 않도록 정리 보관한다(그림 4.).



그림 1.



그림 2.



그림 3.

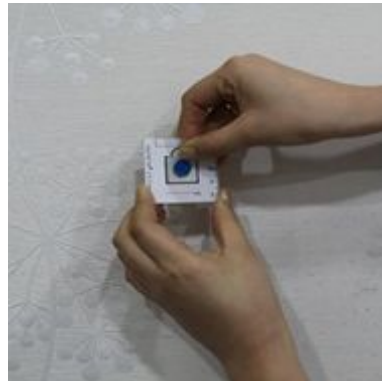


그림 4.

## 사. 시료

### (1) 시료명

제품A(시험제품):

제품B(대조제품):

### (2) 성상 : 백색 크림

### (3) 시료관리번호

제품A(시험제품): 13-WR0001

제품B(대조제품): 13-WR0002

### (4) 사용 방법

피험자를 두 그룹으로 나누어 제품 A와 제품 B를 바르는 위치를 두 그룹간에 서로 반대로 도포하게 하였다. 연구원이 지정해 준 우(좌)측 눈가에는 제품 A를, 좌(우)측 눈가에는 제품 B를 도포하였으며 1일 2회 아침, 저녁 세안 후 지정된 눈가에 적당량을 고르게 도포하였다.

인체적용시험 종료 시까지는 유사한 기능성 화장품의 사용을 중단하였고 팩이나 마사지를 금하였다.

아. 측정 및 평가

(1) 효능

(가) 육안 평가

피험자의 눈가 주름 정도는 충분히 밝은 광원 하에서 두 명(KYM, IYS)의 숙련된 연구원에 의해 이중맹검(Double-blind test)으로 평가 하였다. 인체적용시험 시작전(0주), 4주, 8주, 12주 경과 후에 본 센터에 방문한 피험자들을 대상으로 눈가의 주름 정도를 global photodamage score(0:none, 1:none/mild, 2:mild, 3:mild/moderato, 4:moderato, 5:moderato/severe, 6:severe, 7:very severe, ref:Arch Dermatol vol.127(8):1043-1051, 2001)에 근거하여 평가하였다. 두 전문가의 평가에 차이가 있을 경우에는 효능성은 낮은 단계를, 피부 이상반응은 높은 단계를 선택 하였다. 육안 평가 분류표는 다음과 같다.

<b>■ 육안평가 (visual assessment)</b>	
* Wrinkle grading	
0:none(주름없음), 1:none/mild, 2:mild, 3:mild/moderato, 4:moderato, 5:moderato/severe, 6:severe, 7:very severe(주름많음) (ref: Arch Dermatol vol. 127(8):1043-1051, 2001)	
좌측	우측
0---1---2---3---4---5---6---7	0---1---2---3---4---5---6---7
none mild moderato very severe	none mild moderato very severe

(나) 화상 사진

- ① 육안 평가와 더불어 육안 판정 결과의 보조적인 방법으로 화상사진을 촬영하였다.
- ② 주름 촬영용 안면고정장비세트 및 조명세트와 고해상도 디지털 카메라(NIKON D200, JAPAN)를 이용하여 실내 조명의 밝기가 동일한 조건에서 화상사진을 촬영하였다. 표준화를 위하여 사진 촬영은 동일 연구자가 시행하였으며 특수 제작된 장비를 통하여 촬영 조건(측정 방향 및 위치)을 고정하여 측정하였다.

(다) 모사판 제작과 Skin-Visiometer를 이용한 화상분석

제품 사용에 따른 주름개선 효과를 Skin-Visiometer를 이용하여 분석하였다. 피험자의 방문 (0주, 4주, 8주, 12주)시 지정된 눈가 부위에서 모사판을 제작하였다.

모사판의 제작은 항온 항습(22±2°C, 40%~60% humidity) 조건에서 제작하였으며, 피험자는 시험 당일 스킨 등 모든 화장품을 바르지 않도록 하였다. 아울러 방문하여 모사판 제작 부위를 중심으로 제모 후 세안한 다음 30분간 항온 항습 조건에서 안정을 취한 후 실리콘 용액 B(기제), C(촉매제)를 이용하여 모사판을 제작하였다.

제작된 모사판은 Skin-Visiometer SV600의 software를 이용하여 분석하였다. 분석 원리는 인공 광원에서 방출된 빛이 실리콘 재질을 투과하면서 생기는 빛의 Intensity를 Lambert & Beer's Law에 의해 분석하여 피부주름 개선 정도를 측정하였다. ( $I_{ex}=I_{in}e^{-kd}$ )

- 제작된 모사판을 Skin-Visiometer SV600내 분석 kit에 넣고 Visiometer의 Image analyzer software에 의해 분석한다.

- 모사판은 항상 같은 방향으로 Skin-Visiometer SV600내에 들어가도록 주의한다.

- Skin-Visiometer SV600의 분석 결과는 R1~R5의 값으로 분석하여 정리한다.

- R1~R5의 값이 작아질수록 피부 주름이 개선되어 주름의 깊이가 낮아짐을 의미하며 단위는 임의의 단위(Arbitrary Unit)이다.

- Skin-Visiometer SV600의 측정 값은 다음과 같다.

R1: Skin Roughness  
 R2: Maximum Roughness  
 R3: Average Roughness  
 R4: Smoothness Depth  
 R5: Arithmetic Average Roughness

- Skin-Visiometer SV600에 의한 분석 Parameter로는 circle, horizontal, vertical, 3종류가 있으며 본 인체적용시험에서는 circle을 이용하여 R1~R5값을 계산하였다. 이는 미세주름 측정기인 Skin-Visiometer SV600의 Image analyzer software가 주름 분석을 함에 있어 인체의 실제 주름과 같은 그물망 조직을 분석할 수 있는 circle로 분석하는 것이 과학적이라 판단하였기 때문이다.

- 제작된 모사판의 분석은 시험기간 동안의 모든 모사판 제작이 완료된 후 정량하였다.



그림5. Skin-Visiometer

## 2. 설문 평가

설문은 4주, 8주, 12주 경과 후에 각각 피험자를 대상으로 대조제품과 시험제품의 일반적 평가(사용감), 효능성(주름개선) 평가, 화장품적 적합성 평가, 제품에 대한 호감도, 이상 반응 등을 설문 조사하였다.

### (1) 순응도 및 안전성 평가

#### (가) 순응도 평가

첫 방문 시부터 시험이 종료된 시점까지 순응 일지에 제품 도포 여부 및 이상 반응 여부를 매일 작성하도록 하였다.

#### (나) 안전성 평가

시험제품 및 대조제품의 이상반응인 홍반(Erythema), 부종(Edema), 인설(Scaling), 가려움(Itching), 자통(Stinging), 작열감(Burning), 뻣뻣함(Tightness), 따끔거림(Prickling)이나 다른 이상반응이 발생하는지의 존재 여부를 면밀히 관찰하고 피부 이상반응이 나타날 시 심한 정도에 따라 등급을 표시하고 이에 대한 검사 소견을 작성하였다. 그리고 시험중지 또는 탈락사항이 발생하는지 점검하여 Case Report Form에 기입하였다. 방문하는 날이 아니더라도 시험에 더 이상 참가 할 수 없게 되는 경우는 본인의 서명이 첨부된 “시험참가 포기동의서”를 쓰도록 하였다.

이상 반응 여부 및 등급 분류표는 다음과 같다.

<p>■ 피부자극평가 (이상반응)</p> <p>* 피험자의 상태를 판단하여 자극과 자극 부위를 기록한다.</p> <p>*Adverse grading</p> <p>0:none(이상반응 없음), 1:mild, 2:severe, 3:very severe(심각한 이상반응)</p>								
	Erythem a 홍반	Edema 부종	Scalin g 인설	Itching 가려움	Stingin g 자통	Burning 작열감	Tightnes s 뻣뻣함	Pricklin g 따끔거림
좌측								
우측								

## 차. 결과분석

○ 전문가에 의한 육안평가는 independent t-test를 통해 대조제품과 시험제품 간의 유의성 여부를 가설평균 차 5% ( $p < 0.05$ )로 확인하였다.

- Visiometer를 이용한 모사판 분석 결과는 주름 parameter인 대조제품과 시험제품의 R1, R2, R3, R4, R5에 대한 각각의  $\Delta R1$ ,  $\Delta R2$ ,  $\Delta R3$ ,  $\Delta R4$ ,  $\Delta R5$  값을 independent t-test를 통해 대조제품과 시험제품 간의 유의성 여부를 가설평균 차 5% ( $p < 0.05$ )로 확인하였다.
  
- 피험자에 의한 설문 평가는 대조제품과 시험제품의 사용감(피짐, 발림, 흡수정도, 산뜻함) 및 사용 후 변화(부드러움, 매끄러움, 윤기증가, 촉촉함, 탄력감, 주름에 대한 효과), 이상반응 여부에 대해 기술 통계학(Descriptive Statistics)적 방법을 이용하였다.
  
- 통계 분석 프로그램은 SPSS version17.0 software를 이용하였다.

### 3. 시험결과

#### 가. 피험자 기본정보

피험자 기본정보 및 시험 전 photodamage score는 표1-1.에 정리하였다.

표1-1. 피험자 기본정보 및 시험 전 photodamage score

No.	피험자	나이	성별	Photodamage score	
				우측 눈가	좌측 눈가
1	SSM	46	F	4	4
2	EIS	44	F	3	4
3	KDH	38	F	2	2
4	KAG	48	F	3	3
5	OSM	37	F	2	2
6	YJA	41	F	3	3
7	JGU	49	F	5	4
8	CEY	43	F	5	4
9	LHJ	48	F	4	4
10	JYA	42	F	2	3
11	LJG	36	F	2	2
12	LIS	42	F	3	4
13	LSI	40	F	3	3
14	LDS	43	F	3	3
15	SYS	45	F	4	4
16	KY	36	F	2	3
17	LGJ	41	F	3	3
18	JSH	47	F	2	3
19	KMJ	37	F	3	3
20	KHJ	40	F	5	5
21	HGD	47	F	3	4
22	SGH	45	F	2	3
23	LJH	47	F	3	2
24	HHO	41	F	4	4
평균		42.63		3.13	3.29
표준편차		4.04		0.99	0.81

본 인체적용시험에 참가한 사람은 24명의 여성으로 평균 연령은 42.63세, 표준 편차는 4.04이었다. 시험 도중 이상반응 및 그 밖의 이유로 탈락한 피험자는 3명으로 최종 피험자 수는 21명이었다. 피험자 연령별 구성은 표1-2.와 같다.



표1-2. 피험자 연령별 구성

인원	구분	참여 피험자	탈락 및 중도포기	시험을 종료한 총 피험자(%)
21명	30대	5	0	5 (24%)
	40대	19	3	16 (76%)
	50대	0	0	0 (0%)

시험 전 photodamage score는 표1-3.과 같다.

표1-3. 시험 전 photodamage score

구분	Photodamage score	명	%
우측 눈가	none/mild(1)	0	0
	mild(2)	7	29
	mild/moderato(3)	10	42
	moderato(4)	4	17
	moderato/severe(5)	3	13
	severe(6)	0	0
	very severe(7)	0	0
좌측 눈가	none/mild(1)	0	0
	mild(2)	4	17
	mild/moderato(3)	10	42
	moderato(4)	9	38
	moderato/severe(5)	1	4
	severe(6)	0	0
	very severe(7)	0	0

#### 나. 피험자 관리

##### (1) 피부유형 및 피부 상태

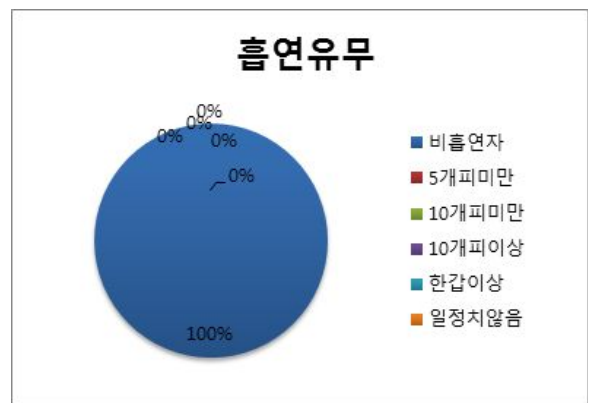
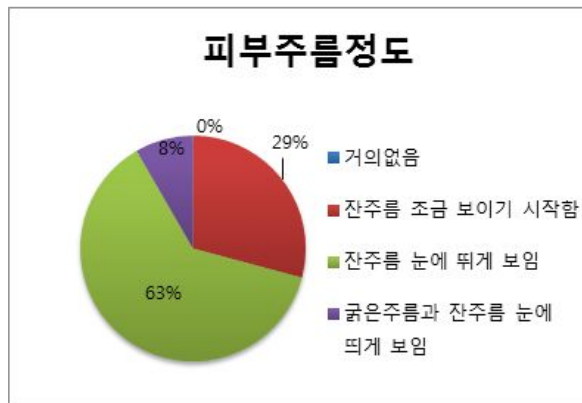
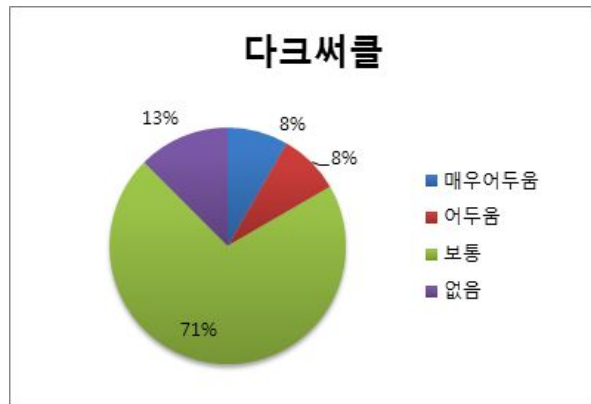
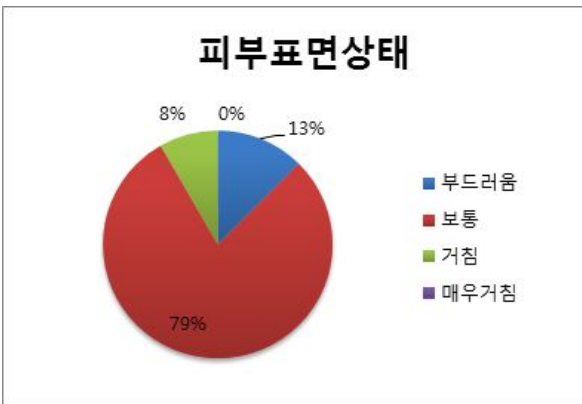
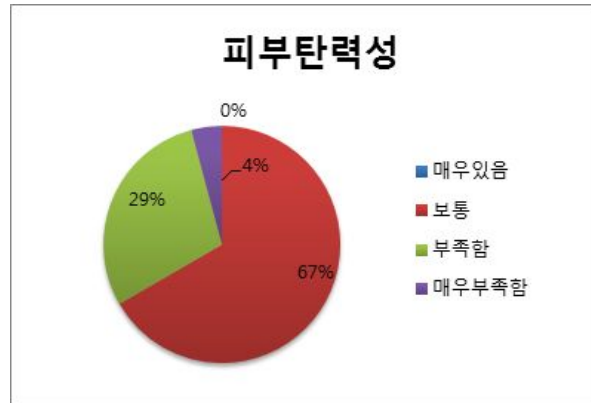
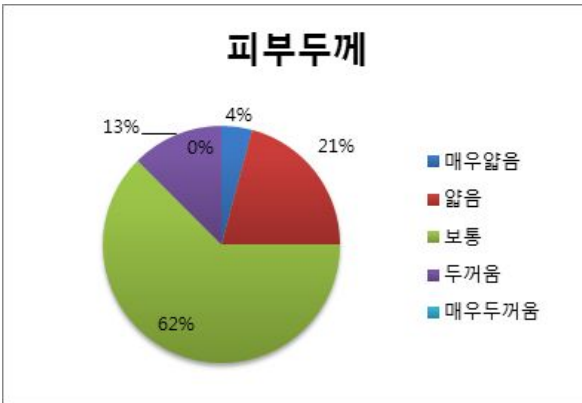
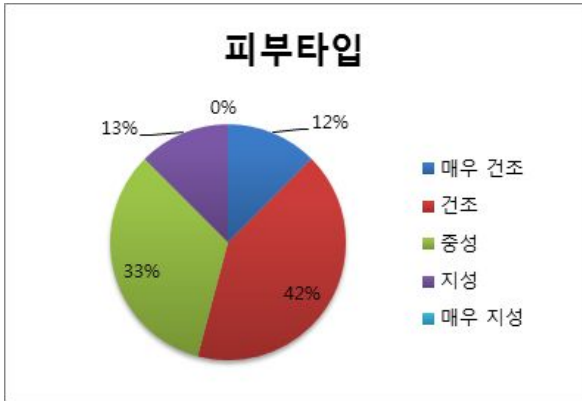
방문1 (0주차, 시험 시작일)에 피험자 개개인에 대한 제품 도포 전 피부유형 및 피부 상태를 설문을 통해 자가 작성 하였으며 그 결과는 표2-1.과 같다.

표2-1. 피부상태에 대한 자가 설문 평가 결과

피부 타입	명	%
매우 건조	3	12
건조	10	42
중성	8	33
지성	3	13
매우 지성	0	0
피부 유분	명	%
매우 축축	0	0
축축	0	0
정상	11	46
건조	11	46
매우 건조	2	8
피부두께	명	%
매우 얇음	1	4
얇음	5	21
보통	15	62
두꺼움	3	13
매우 두꺼움	0	0
피부 탄력성	명	%
매우 있음	0	0
보통	16	67
부족함	7	29
매우 부족함	1	4

피부표면상태	명	%
부드러움	3	13
보통	19	79
거침	2	8
매우 거침	0	0
다크써클(색소침착)정도	명	%
매우 어두움	2	8
어두움	2	8
보통	17	71
없음	3	13
피부 주름 생성 정도	명	%
거의 없음	0	0
잔주름이 조금 보이기 시작함	7	29
잔주름이 눈에 띄게 보임	15	63
깊은 주름과 잔주름이 눈에 띄게 보임	2	8
흡연유무(하루 흡연량)	명	%
비 흡연자	24	100
5개피 미만	0	0
10개피 미만	0	0
10개피 이상	0	0
한 갑 이상	0	0
민감성 여부	명	%
민감성	0	0
비 민감성	24	100

제품 도포 전 피부상태에 대한 자가 설문 평가 결과를 정리하면 그림 6.과 같다.



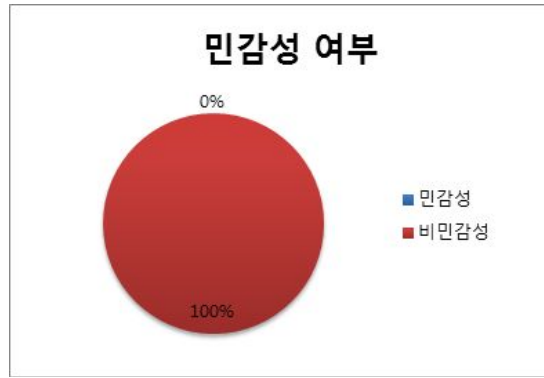


그림 6. 제품 도포 전 피부상태에 대한 자가 설문 결과

(2) 시험제품에 대한 수거 및 순응도 확인 절차

피험자들이 사용한 시험제품은 시험 종료와 함께 수거 되었으며, 시험이 진행되는 동안 피험자에 의해 작성된 순응일지를 통해 순응도를 평가 하였다.

(3) 전문의에 의한 육안평가

(가) 피험자 21명에 대한 개인별 대조제품과 시험제품간의 주름개선 효능 차이를 평가한 결과는 다음의 표3-1.과 표3-2., 표3-3.에 정리하였다.

표3-1. 피험자 별 제품 배정

1. No.	2. 피험자	3. 제품 배정	
		4. 좌측	5. 우측
1	SSM	A	B
2	EIS	A	B
3	KDH	A	B
5	OSM	B	A
6	YJA	B	A
7	JGU	B	A
8	CEY	B	A
9	LHJ	B	A
10	JYA	A	B
11	LJG	A	B
12	LIS	A	B
13	LSI	A	B
14	LDS	B	A
15	SYS	B	A
16	KY	B	A
18	JSH	A	B
19	KMJ	B	A
20	KHJ	B	A
22	SGH	A	B
23	LJH	A	B
24	HHO	B	A

A=시험제품, B=대조제품

표3-2. 시험제품과 대조제품의 육안평가 결과

No.	피험자	시험 제품				대조 제품			
		0주	4주	8주	12주	0주	4주	8주	12주
1	SSM	4	4	4	4	4	4	5	5
2	EIS	4	4	4	3	3	3	3	3
3	KDH	2	3	3	3	2	2	3	3
5	OSM	2	2	2	2	2	2	2	2
6	YJA	3	3	3	3	3	3	3	3
7	JGU	5	5	5	4	4	5	5	5
8	CEY	5	5	5	5	4	5	5	5
9	LHJ	4	5	5	4	4	4	4	4
10	JYA	3	3	3	3	2	2	3	2
11	LJG	2	2	2	2	2	2	2	2
12	LIS	4	4	4	4	3	4	4	4
13	LSI	3	4	3	3	3	4	4	4
14	LDS	3	3	3	3	3	4	4	4
15	SYS	4	3	4	4	4	4	4	4
16	KY	2	2	2	1	3	3	3	2
18	JSH	3	3	3	3	2	2	3	3
19	KMJ	3	3	3	3	3	2	3	3
20	KHJ	5	5	5	4	5	5	5	5
22	SGH	3	2	3	2	2	2	2	2
23	LJH	2	1	1	1	3	2	2	2
24	HHO	4	4	4	4	4	4	5	5

평가 시기		0주	4주	8주	12주
대조제품	평균	3.10	3.24	3.52	3.43
	표준편차	0.89	1.14	1.08	1.16
시험제품	평균	3.33	3.33	3.38	3.10
	표준편차	1.02	1.15	1.12	1.04

표 3-3. 시험제품과 대조제품간 육안평가 변화 결과의 통계적 분석 결과

	4주	8주	12주
<i>p</i> -value	0.414 ( <i>p</i> >0.05)	0.019* ( <i>p</i> <0.05)	0.004 ( <i>p</i> <0.05)

\*8주 경과 후에 Levene의 등분산 검정이 유의차 5% 보다 작으므로(*p*<0.05) 등분산 가정에 위배되어 등분산이 가정되지 않은 유의 확률을 택하였음

제품 사용 4주 후에 육안 평가 결과 통계적으로 유의한 수준의 차이는 없었지만, 제품 사용 8주 후, 제품 사용 12주 후에는 대조제품에 비해 통계적으로 유의한 수준의 차이를 보였다. 본 시험은 동일 피험자를 대상으로 양측 눈가에 대조 제품과 시험 제품을 각각 도포하여 비교한 것이므로 개인차에 의한 변수에 기인한 것은 아님을 알 수 있었다.

시험제품과 대조제품간의 육안평가결과를 정리하면 그림 7.과 같다.

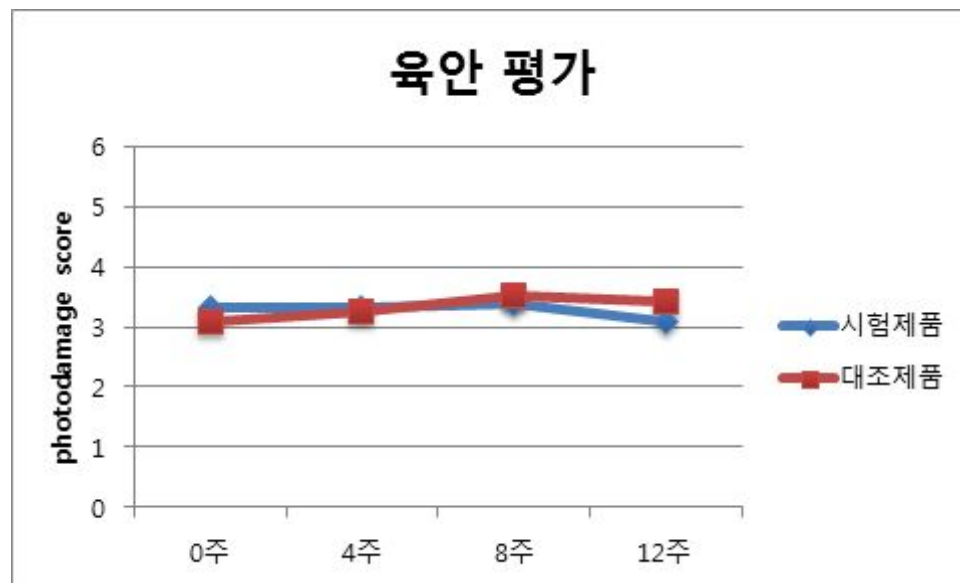


그림 7. 시험제품과 대조제품의 육안평가 결과



(4) Visiometer에 의한 화상분석(기기분석)

Visiometer에 의한 화상분석 결과는 다음과 같다.

표4-1. 제품 사용 전 모사판 화상분석 결과

No.	피험자	시험 제품					대조 제품				
		R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	SSM	0.10	0.06	0.04	0.05	0.02	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
2	EIS	0.07	0.05	0.03	0.03	0.01	0.09	0.05	0.03	0.04	0.01
3	KDH	0.08	0.04	0.03	0.04	0.01	0.10	0.06	0.04	0.06	0.02
5	OSM	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01
6	YJA	0.10	0.06	0.04	0.06	0.02	0.08	0.05	0.03	0.04	0.01
7	JGU	0.07	0.05	0.03	0.03	0.01	0.07	0.04	0.03	0.03	0.01
8	CEY	0.09	0.05	0.03	0.06	0.02	0.05	0.04	0.02	0.03	0.01
9	LHJ	0.07	0.05	0.03	0.04	0.01	0.05	0.04	0.02	0.02	0.01
10	JYA	0.09	0.04	0.03	0.05	0.02	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01
11	LJG	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01	0.08	0.05	0.03	0.04	0.01
12	LIS	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01	0.05	0.04	0.03	0.03	0.01
13	LSI	0.08	0.05	0.03	0.04	0.01	0.08	0.05	0.04	0.04	0.01
14	LDS	0.10	0.06	0.04	0.05	0.02	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01
15	SYS	0.09	0.05	0.03	0.05	0.02	0.09	0.05	0.03	0.05	0.02
16	KY	0.07	0.04	0.03	0.03	0.01	0.07	0.05	0.04	0.03	0.01
18	JSH	0.08	0.06	0.04	0.03	0.01	0.07	0.05	0.04	0.03	0.01
19	KMJ	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01
20	KHJ	0.09	0.05	0.04	0.05	0.02	0.11	0.05	0.04	0.05	0.02
22	SGH	0.07	0.04	0.03	0.03	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01
23	LJH	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01	0.05	0.04	0.03	0.03	0.01
24	HHO	0.08	0.06	0.04	0.04	0.01	0.04	0.03	0.03	0.02	0.01
평균		0.078	0.047	0.032	0.040	0.013	0.066	0.042	0.030	0.034	0.011
표준편차		0.015	0.010	0.006	0.011	0.005	0.020	0.009	0.007	0.010	0.004

표4-2. 제품 사용 4주 후 모사관 화상분석 결과

No.	피험자	시험 제품					대조 제품				
		R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	SSM	0.08	0.05	0.03	0.05	0.02	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01
2	EIS	0.08	0.04	0.03	0.04	0.01	0.09	0.05	0.04	0.04	0.02
3	KDH	0.06	0.03	0.03	0.03	0.01	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01
5	OSM	0.08	0.04	0.03	0.05	0.01	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01
6	YJA	0.11	0.07	0.05	0.06	0.02	0.09	0.05	0.04	0.05	0.02
7	JGU	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01
8	CEY	0.06	0.03	0.03	0.03	0.01	0.06	0.04	0.03	0.04	0.01
9	LHJ	0.06	0.03	0.02	0.04	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01
10	JYA	0.09	0.05	0.03	0.06	0.02	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01
11	LJG	0.06	0.04	0.02	0.03	0.01	0.08	0.05	0.03	0.04	0.01
12	LIS	0.07	0.04	0.03	0.03	0.01	0.07	0.05	0.03	0.05	0.01
13	LSI	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01
14	LDS	0.07	0.03	0.02	0.04	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.00
15	SYS	0.09	0.04	0.03	0.05	0.02	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01
16	KY	0.07	0.05	0.03	0.04	0.02	0.06	0.04	0.03	0.04	0.01
18	JSH	0.06	0.05	0.03	0.03	0.01	0.10	0.06	0.04	0.05	0.02
19	KMJ	0.05	0.04	0.02	0.03	0.01	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01
20	KHJ	0.07	0.05	0.03	0.04	0.01	0.08	0.05	0.04	0.04	0.01
22	SGH	0.07	0.05	0.03	0.03	0.01	0.05	0.04	0.03	0.03	0.01
23	LJH	0.06	0.04	0.03	0.04	0.01	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
24	HHO	0.08	0.05	0.04	0.04	0.01	0.07	0.05	0.03	0.03	0.01
평균		0.071	0.042	0.029	0.040	0.012	0.066	0.042	0.030	0.036	0.011
표준편차		0.014	0.010	0.007	0.010	0.004	0.017	0.008	0.006	0.009	0.004

표4-3. 제품 사용 8주 후 모사관 화상분석 결과

No.	피험자	시험 제품					대조 제품				
		R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	SSM	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01
2	EIS	0.11	0.08	0.05	0.05	0.02	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01
3	KDH	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01	0.06	0.04	0.03	0.04	0.01
5	OSM	0.08	0.05	0.04	0.05	0.01	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01
6	YJA	0.08	0.05	0.04	0.04	0.01	0.09	0.05	0.03	0.05	0.02
7	JGU	0.07	0.05	0.03	0.04	0.01	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
8	CEY	0.09	0.04	0.03	0.05	0.02	0.04	0.03	0.02	0.03	0.01
9	LHJ	0.07	0.05	0.03	0.04	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01
10	JYA	0.09	0.06	0.03	0.06	0.02	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01
11	LJG	0.11	0.07	0.05	0.06	0.02	0.08	0.07	0.04	0.03	0.01
12	LIS	0.05	0.03	0.03	0.02	0.01	0.06	0.04	0.03	0.04	0.01
13	LSI	0.06	0.05	0.04	0.02	0.01	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01
14	LDS	0.07	0.05	0.03	0.04	0.01	0.06	0.04	0.02	0.03	0.01
15	SYS	0.09	0.04	0.03	0.05	0.02	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01
16	KY	0.07	0.04	0.03	0.03	0.01	0.06	0.03	0.02	0.03	0.01
18	JSH	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01	0.08	0.05	0.04	0.03	0.01
19	KMJ	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01
20	KHJ	0.08	0.05	0.03	0.05	0.01	0.10	0.05	0.04	0.05	0.02
22	SGH	0.09	0.05	0.04	0.04	0.01	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01
23	LJH	0.05	0.04	0.02	0.03	0.01	0.07	0.05	0.03	0.04	0.01
24	HHO	0.08	0.05	0.04	0.04	0.01	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
평균		0.075	0.048	0.033	0.040	0.012	0.065	0.042	0.030	0.034	0.011
표준편차		0.018	0.012	0.008	0.012	0.004	0.014	0.009	0.006	0.008	0.003

표4-4. 제품 사용 12주 후 모사판 화상분석 결과

No.	피험자	시험 제품					대조 제품				
		R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	SSM	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01	0.05	0.03	0.02	0.02	0.01
2	EIS	0.07	0.05	0.03	0.03	0.01	0.08	0.06	0.04	0.03	0.01
3	KDH	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01	0.13	0.06	0.04	0.07	0.03
5	OSM	0.07	0.04	0.03	0.03	0.01	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01
6	YJA	0.10	0.06	0.04	0.06	0.02	0.10	0.05	0.04	0.05	0.02
7	JGU	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01	0.05	0.03	0.02	0.02	0.01
8	CEY	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01
9	LHJ	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01	0.07	0.03	0.03	0.04	0.01
10	JYA	0.07	0.04	0.03	0.04	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01
11	LJG	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01
12	LIS	0.07	0.04	0.03	0.03	0.01	0.06	0.04	0.03	0.04	0.01
13	LSI	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.07	0.05	0.03	0.04	0.01
14	LDS	0.06	0.03	0.03	0.03	0.01	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01
15	SYS	0.06	0.03	0.02	0.03	0.01	0.09	0.05	0.04	0.05	0.02
16	KY	0.05	0.04	0.03	0.03	0.01	0.08	0.05	0.03	0.04	0.01
18	JSH	0.11	0.06	0.04	0.05	0.02	0.06	0.04	0.03	0.03	0.01
19	KMJ	0.05	0.03	0.02	0.03	0.01	0.08	0.05	0.03	0.05	0.02
20	KHJ	0.07	0.04	0.03	0.03	0.01	0.10	0.05	0.04	0.05	0.02
22	SGH	0.06	0.05	0.03	0.03	0.01	0.08	0.05	0.03	0.04	0.01
23	LJH	0.04	0.03	0.02	0.03	0.01	0.07	0.04	0.03	0.03	0.01
24	HHO	0.06	0.05	0.03	0.03	0.01	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
평균		0.066	0.041	0.030	0.034	0.011	0.069	0.041	0.029	0.036	0.013
표준편차		0.016	0.009	0.005	0.009	0.003	0.023	0.011	0.008	0.013	0.006

표 4-5. 시험제품과 대조제품간 모사판 화상분석 변화 결과의 통계적 분석 결과

6.	7. 주	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	$\Delta R4$	$\Delta R5$
8. <i>p</i> -value	9. 4주	0.197 ( <i>p</i> >0.05)	0.155* ( <i>p</i> >0.05)	0.074 ( <i>p</i> >0.05)	0.388 ( <i>p</i> >0.05)	0.768 ( <i>p</i> >0.05)
	10. 8주	0.753 ( <i>p</i> >0.05)	0.808 ( <i>p</i> >0.05)	0.573 ( <i>p</i> >0.05)	0.689* ( <i>p</i> >0.05)	0.743 ( <i>p</i> >0.05)
	11. 12주	0.006 ( <i>p</i> <0.05)	0.116 ( <i>p</i> >0.05)	0.348* ( <i>p</i> >0.05)	0.008 ( <i>p</i> <0.05)	0.011* ( <i>p</i> <0.05)

\* 제품 사용 4주 경과 후에  $\Delta R2$ 와 제품 사용 8주 경과 후  $\Delta R4$ , 제품 사용 12주 경과 후  $\Delta R3$ ,  $\Delta R5$ 의 경우 Levene의 등분산 검정이 유의차 5% 보다 작으므로(*p*<0.05) 등분산 가정에 위배되어 등분산이 가정되지 않은 유의 확률을 택하였음

제품 사용 후 대조제품과 시험제품간의 모사판 화상 분석 변화 결과를 정리하면 그림8.과 그림 9., 그림 10.과 같다.

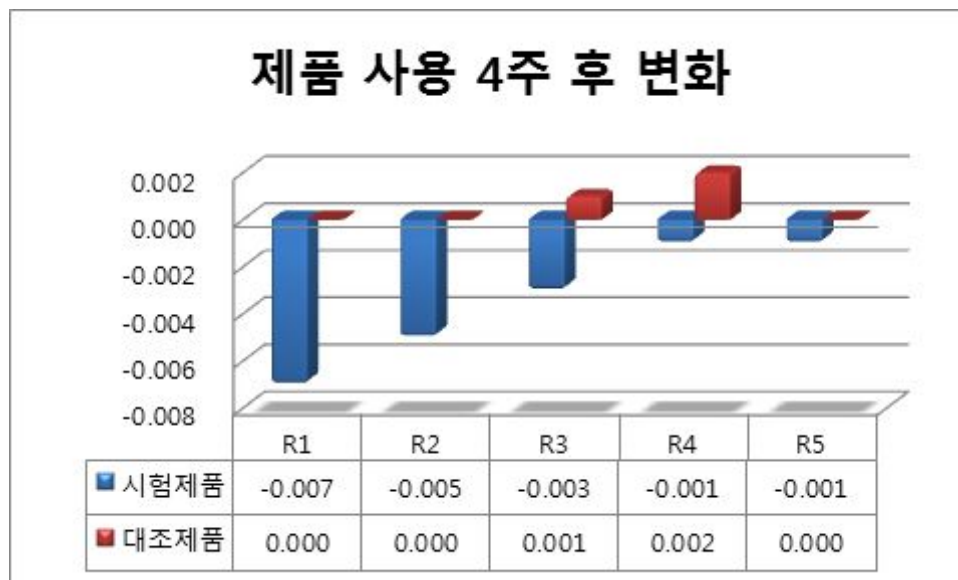
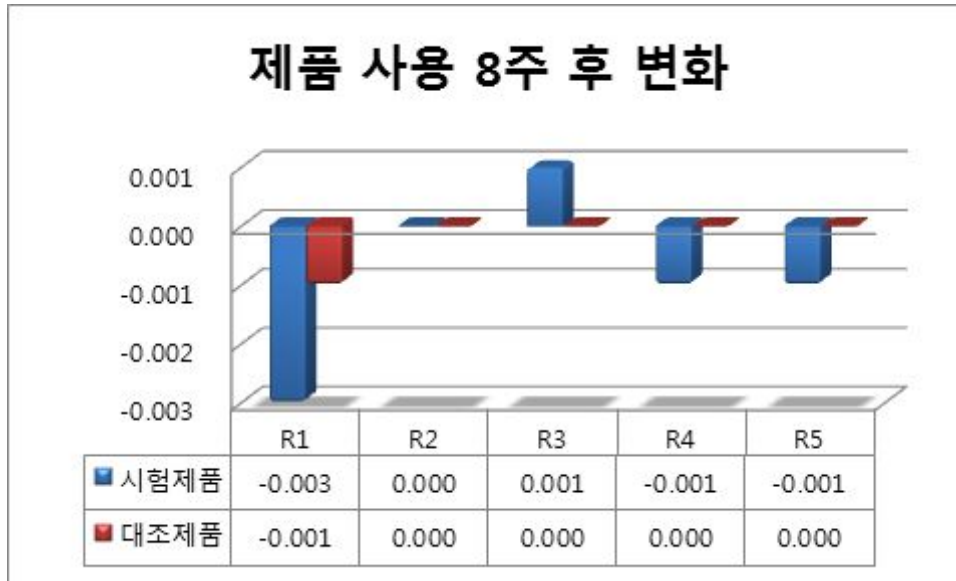


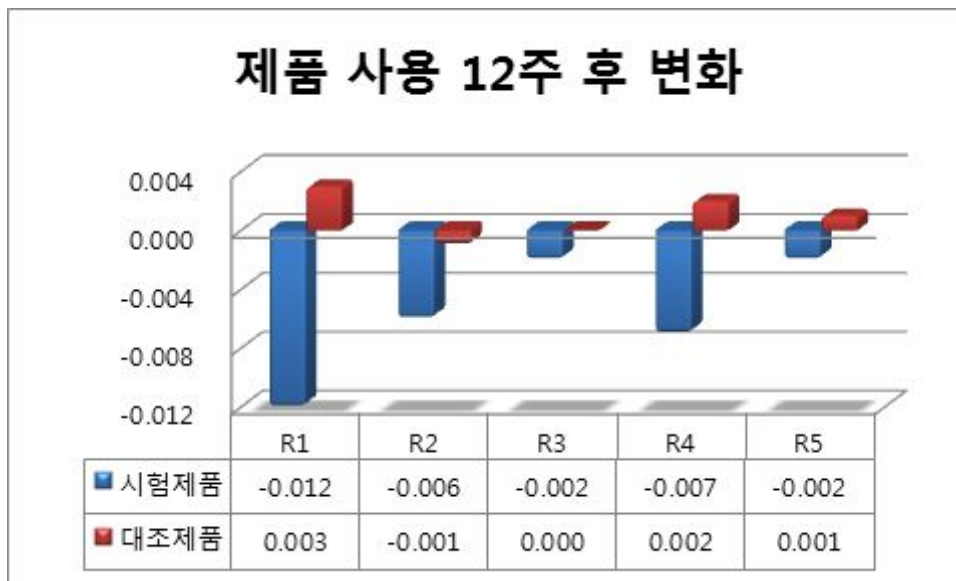
그림 8. 제품 사용 4주 후 대조제품과 시험제품의 모사판 화상 분석 변화 결과



12.

그림 9. 제품 사용 8주 후 대조제품과 시험제품의 모사판 화상 분석 변화 결과

13.



14.

그림 10. 제품 사용 12주 후 대조제품과 시험제품의 모사판 화상 분석 변화 결과

제품 사용 후 대조제품과 시험제품의 모사판 화상 분석에 대한 통계 분석 결과 제품 사용 후 12주에서 parameter값인 R1, R4, R5에서 통계적으로 유의한 수준의 주름개선 효과가 있었다. 따라서 시험제품은 사용 12주 후 대조제품과의 모사판 화상 분석에 대한 통계 분석 결과 통계적으로 유의한 수준( $p < 0.05$ )의 주름개선 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

R4값은 전술한 바와 같이 Depth Of Smoothness로 매끄러운 정도를 나타내는 Parameter로 값이 작아질수록 피부의 거칠기가 개선됨을 의미한다. 따라서 R4가 통계적으로 유의하게 측정되었으므로, 제품 사용 전, 제품 사용 12주 후 효과 차이를 보였음을 의미한다.

R5값은 Arithmetic Average Roughness로 mean roughness value를 의미한다. 즉 거칠기 값의 평균으로 주름 깊이와 관련된 직접적인 Parameter이므로 R5가 통계적으로 유의하게 측정되었다는 것은 제품 사용 전, 제품 사용 12주 후 개선 효과 차이가 있다는 것을 의미한다.

#### (5) 피부 이상 반응

##### (가) 피험자 자가 평가

피험자들은 이상반응 발생 즉시 본 센터로 보고하도록 하였으며 순응일지에 기재하도록 하였다. 또한 방문 시 마다 설문지를 통하여 이상반응 여부에 표기하도록 하였다. 시험이 진행되는 동안 피험자로부터 특별한 이상반응은 보고되지 않았으므로 \*\*\*의 대조제품 및 시험제품은 피부 이상반응이 없는 것을 알 수 있었다.

##### (나) 연구자에 의한 평가

피부과 전문의에 의한 이학적 검사상 대조제품 및 시험제품 모두 사용 후 홍반이나 소양감, 발진 등 피부 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서 대조제품과 시험제품은 피부에 자극이 없는 안전한 제품임을 알 수 있었다.

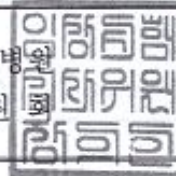




심사결과 통보서

수 신	책임연구자	성명	김희택	소속	세명대	직위	부교수
	의뢰 기관	농림수산식품기술기획평가원					
IRB No.	2012-13	Protocol No.	SMJOH-DER-12-01		Version No.	1.0	
연구과제명	인상 화뢰의 피부 주름개선 효과 시험 연구						
연구종류 및 대상	<input type="checkbox"/> 유전자관련 <input type="checkbox"/> 보관된 경체연구 <input type="checkbox"/> 조직 및 혈액연구 <input type="checkbox"/> 의료행위 <input type="checkbox"/> 의무기록을 이용한 환자군 연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 관찰연구 <input type="checkbox"/> 기타( ) <input checked="" type="checkbox"/> 임상시험 ( <input type="checkbox"/> 의약(외)품 <input type="checkbox"/> 의료기기 <input type="checkbox"/> 건기식 <input checked="" type="checkbox"/> 화장품 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제)						
	일반명	인상 화뢰 추출물		상품명			
	연구용도	<input checked="" type="checkbox"/> 학술용 <input type="checkbox"/> 국내 허가용(KFDA) <input type="checkbox"/> 해외 허가용(국가명: )					
	Phase	<input type="checkbox"/> 제1상 <input type="checkbox"/> 제2상 <input type="checkbox"/> 제3상 <input type="checkbox"/> 제4상 <input type="checkbox"/> PMS <input checked="" type="checkbox"/> 학술연구 <input type="checkbox"/> 기타					
피험자수	24 명		(본 기관 배정)		24 명		
제출서류	<input checked="" type="checkbox"/> 임상시험 심사의뢰서			<input checked="" type="checkbox"/> 피험자에게 제공되는 정보 (해당하는 경우)			
	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서 (Protocol)			<input checked="" type="checkbox"/> 피험자에게 제공되는 보상에 대한 정보			
	<input checked="" type="checkbox"/> 계획서 요약 (Synopsis)			<input type="checkbox"/> 피험자 모집관련 서류 (광고문, 매체 정보)			
	<input checked="" type="checkbox"/> 증례기록서 (CRF)			<input checked="" type="checkbox"/> 이해상충서약서(연구책임자 및 연구자)			
	<input checked="" type="checkbox"/> 피험자 동의서			<input type="checkbox"/> 임상시험자 자료집 (해당하는 경우)			
	<input checked="" type="checkbox"/> 안전성 정보			<input type="checkbox"/> 식약청이나 공모기관의 신청서 또는 승인서			
<input checked="" type="checkbox"/> 연구책임자의 CV			<input type="checkbox"/> (해당되는 경우)				
심사종류	<input checked="" type="checkbox"/> 초기심사 <input type="checkbox"/> 재심사 <input type="checkbox"/> 신속심사 <input type="checkbox"/> 기타						
관련근거	심사회의록	심사일자	2012년 9월 19일	승인일자	2012년 9월 25일		
심사결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 중지 <input type="checkbox"/> 부결						
연구승인기간	2012년 09월 25일 ~ 2013년 09월 24일 까지						
정기보고주기	<input type="checkbox"/> 3개월 <input type="checkbox"/> 6개월 <input checked="" type="checkbox"/> 1년 <input type="checkbox"/> 기타 ( ) 정기보고주기는 1년을 초과할 수 없음						
심사결과내용	상기 과제의 연구계획서 및 제출된 서류를 정식심사에서 검토한 결과, 효과 및 안전성이 완전히 입증되지 않은 시험제품으로 인한 잠재적인 부작용이 예상되지만 피험자에게 부가되는 위험은 최소위험을 상회하지 않고, 피험자에게 기대되는 직접이익이 위험을 상회하는 것으로 판단합니다. 참석위원 7명 중 6명이 "승인"에 찬성, 1명이 "시정승인"에 찬성하여 본 과제의 최종 심사 의견을 "승인"으로 결정합니다.						
※ 보완을 요구하는 "보완", "시정 승인"시에는 보완서류를 1주일 이내에 제출하시기 바랍니다.							

세명대학교부속제천한방병원  
임상시험심사위원회







세명대학교부속제천한방병원 임상시험심사위원회

Tel: 82-43-645-1010 Fax: 82-43-645-1382 충청북도 제천시 신월동 산 21-11 (우) 390-230

본 위원회에서 승인된 모든 연구자들은 다음의 사항을 준수하여야 합니다.

1. 본 위원회는 국제 임상시험 통일안(ICH) 및 임상시험관리기준(GCP)을 준수합니다.
2. 모든 연구는 위원회에서 승인한 계획서에 따라 수행하여야 합니다.
3. 위원회의 승인을 받은 피험자 동의서를 사용하여야 합니다.
4. 모국어가 한국어가 아닌 피험자들에게는 승인된 동의서를 피험자의 모국어로 인증된 번역본을 사용할 것이며, 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회 승인을 받아야 합니다.
5. 연구진행에 있어 피험자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행하여야 합니다. 피험자들의 보호를 위해 취해진 어떠한 응급 상황에서의 변경도 즉각 위원회에 보고하여야 합니다.
6. 연구 중에 중대한 이상반응(Adverse Event) 발생 시 연구책임자는 본 위원회에 즉시 보고하여야 합니다.
7. 위원회에서 승인된 계획서에 따라 등록된 어떠한 피험자라도 사망, 입원, 심각한 질병에 대하여는 위원회에 서면으로 보고하여야 합니다.
8. 임상시험 또는 피험자의 안전에 대해 유해한 영향을 미칠 수 있는 어떠한 새로운 정보도 즉각적으로 위원회에 보고하여야 합니다.
9. 위원회의 요구가 있을 때에는 연구의 진행과 관련된 보고를 위원회에 제출하여야 합니다.
10. 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거한 동의 과정을 수행할 것이며, 잠재적인 피험자에게 연구에의 참여여부를 고려할 수 있도록 충분히 기회를 제공하여야 합니다.
11. 임상시험심사위원회(정식회의)에서 재평가하여 변경이나 보완을 요구할 수 있습니다.
12. 본 위원회에서 지정한 중간보고시기에 중간보고서를, 연구종료 시에는 종료 및 결과보고서를 작성하여 제출하여 주시기 바랍니다.
13. 본 임상연구 결과는 임상시험실시기관의 사전 서면 동의 없이는 어떤 경우라도 학술 목적 이외에 실시기관명을 사용할 수 없습니다.
14. 이 결정에 대하여 이의신청(appeal)을 할 경우에는 세명대학교부속제천한방병원 임상시험심사위원회 위원장을 수신인으로 하여, 이의신청을 받아들여야 하는 근거를 서면으로 제출하십시오.
15. 본 통보서는 KGCP 제13조 ①항에 따른 심사통보서로 사용할 수 있습니다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 평가의 착안점 및 달성도

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도
1차 연도	2010	◦ 성분 대량 분리 (ginsenoside Re 분리) 및 가공 조건 최적화	2 %	성분 분리	100%
			2 %	성분 동정	100%
			4 %	가공 조건 확립	100%
		◦ 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 전입 상시험	5 %	인삼화퇴 효력시험	100%
			5 %	ginsenoside Re 효력시험	100%
		◦ 소재화 가공	2 %	적정 유효성분 추출	100%
			2 %	여과 및 적정 전처리 공정 확립	100%
			2 %	액상 소재화 위한 적정 농축공정 확립	100%
		◦ 원료 수집 및 조사	3 %	인삼 화퇴 대량 수집	100%
			3 %	원료 자원 조사	100%
2차 연도	2011	◦ 인삼 화퇴 및 ginsenoside Re의 항알레르기 시험 및 잔류농약 검사	2 %	인삼 화퇴의 항알레르기 시험	100%
			2 %	ginsenoside Re의 항알레르기 시험	100%
			2 %	잔류농약검사	100%
		◦ 인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체의 간기능개선시험	5 %	초음파 처리 인삼화퇴 제제의 숙취 개선시험	100%
			5 %	초음파 처리 인삼화퇴 제제의 간기능 개선시험	100%
		◦ 적정 부재료 선정 및 배합시험	2 %	적정 부형제 선정	100%
			2 %	적정 감미제 선정	100%
			2 %	적정 산미료 선정	100%
			1 %	Panel discussion 방식에 의한 배합비 결정	100%
		◦ 원료 표준화 연구	3 %	원료 추출 및 제조법 연구	100%
4 %	분석법 베리데이션		100%		
3차 연도	2012	◦ 인삼 화퇴 가공물 및 생물전환 대사체 주름개선 전임상 시험(세부)	6 %	주름개선 전임상시험(콜라겐 시험)	100%
			20 %	주름 개선 임상시험	100%
		◦ 시제품 제작 및 대량 생산공정 검토(2협동)	2 %	적정 살균공정 확립	100%
			2 %	액상시제품 제작	100%
			2 %	대량 생산위한 소재화 공정 검토	100%
		◦ 제조공정 최적화(3협동)	1 %	대량 배합 공정 검토	100%
			4 %	소재 분석법 연구(HPLC 법)	100%
			3 %	안정성 연구	100%
최종 평가		◦ 신소재 개발 및 항알레르기 및 주름개선 효력시험	20 %	신소재 개발 및 항알레르기 및 주름개선 효력 시험	100%
		◦ 주름개선 임상시험	20 %	주름개선 임상시험	100%
		◦ 간기능개선 효력시험	20 %	간기능개선 효력시험	100%
		◦ 소재화 가공 및 시제품 제작	20 %	소재화 가공 및 시제품 제작	100%
		◦ 표준화 및 제조공정 최적화	20 %	표준화 및 제조공정 최적화	100%

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

최종목표	내용	기여도
성분 분리 및 동정	인삼사포닌 분리 동정	사포닌 성분 분리 방법 현장지도
기능성 강화 소재 개발	초음파 처리 인삼화퇴 조성물	ginsenoside Rg2, Rh1, F4 고농도 함유 인삼화퇴 조성물 세계 최초 보고
약효평가	생리활성시험	인삼화퇴의 간기능개선 및 주름개선 작용 세계 최초 보고
드링크형 건강기능식품 개발	액상소재화 공정 확립	액상제제 가공방법 현장지도
임상시험	주름개선 임상시험	인삼화퇴 주름개선 임상시험 자료 세계 최초 보고

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 연구성과활용

### 1. 산업재산권

본 과제 관련 특허를 참여기업인 (주)엠디젠에 3건의 기술을 공여하여 출원함으로써 간기능 개선 및 주름개선 기능성식품 개발의 원천 기술로 하고자 한다.

별첨 : 특허 출원증

#### 기술이전 특허 등록 현황

구 분 (발명특허, 실용신안 등)	명칭(기술명)	출원국가	출원번호 (출원일)	출원인	등록번호 (등록일)	등록인
발명특허	초음파 처리를 이용한 인삼 프로사포게닌 고농도 함유 인삼 화퇴 제제 및 이의 제조방법	대한민국	10-2011-014200 0(2011.12.26.)	세명대학교 산학협력단	-	-
발명특허	진세노사이드 Re를 유효성분으로 함유하는 지방간의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	10-2011-005748 1(2011.06.15)	경희대학교 산학협력단	10-1261721 (2013.04.30)	경희대학교 산학협력단
발명특허	알코올성 간손상 내지 알코올성 지방간 예방 및 숙취해소 효과를 갖는 조성물	대한민국	10-2011-005783 5(2011.6.15.)	세명대학교 산학협력단, 경희대학교 산학협력단	10-1303541 (2013.08.28)	세명대학교 산학협력단, 경희대학교 산학협력단

### 2. 학술지 게재

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

별첨 : 게재 학술지

학술지 게재 현황

연구자	연구제목	학술지명	통권, 호	년, 월	발행기관(국명)	SCI 게재여부
Sun A Lee, Liuting, Hee Kyung Jo, Byung Ok Im, Soon Hyun Cho, Wan Kyun Whang, Sung Kwon Ko	The Comparison of Ginsenoside Composition Contents in Notoginseng Radix (Sanchi) on Various Parts and Ages	<i>Kor. J. Pharmacogn. gn.</i>	41(4)	2010	Korean Society of Pharmacognosy (Korea)	-
Sun A Lee, Hee Kyung Jo, Soon Hyun Cho, Sung Kwon Ko	Comparison of the contents of phenolic compounds of sea buckthorn ( <i>Hippophae rhamnoides</i> ) cultivated in Korea and Mongolia	<i>Kor. J. Pharmacogn. gn.</i>	41(4)	2010	Korean Society of Pharmacognosy (Korea)	-
Ok-Hwan Lee, Hee-Hyun Lee, Ji-Hyup Kim, Boo-Yong Lee	Effect of ginsenoside Rg3 and Re on glucose transport in mature 3T3-L1 adipocytes	<i>Phytother apy Research</i>	25(5)	2011	Wiley-Blackwell (England)	SCI
Sung Kwon Ko, Ok Sun Cho, Hye Min Bae, Byung Ok Im, Ok-Hwan Lee, Boo-Yong Lee	Quantitative analysis of ginsenosides composition in flower buds of various ginseng	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.	54(1)	2011	The Korean Society for Applied Biological Chemistry (Korea)	SCIE
Min-Chang Sung, Sung-Kwon Ko	The Comparison of Ginseng Saponin Composition Contents in Woods Grown Ginseng on the Market	Korean Journal of Mountain Ginseng	6	2011	The Society of Mountain Ginseng (Korea)	-

Hai-Yan Quan, Hai-Dan Yuan, Mi Song Jung, Sung Kwon Ko, Young Guk Park, Sung Hyun Chung	Ginsenoside Re lowers blood glucose and lipid levels via activation of AMP-activated protein kinase in HepG2 cells and high-fat diet fed mice	International Journal of Molecular Medicine	29	2012	Spandidos Publications (Greece)	SCI
원혜단 김도연 권혜연 김수정 정미송 정성현	Ginsenoside Rg2 induces orphan nuclear receptor SHP gene expression and inactivates GSK3b via AMP-activated protein kinase to inhibit hepatic glucose production in HepG2 cells	Chemico-Biological Interactions	195	2012	Elsevier (Ireland)	SCI
Hye-Min Lee, Ok-Hwan Lee, Kui-Jin Kim, Boo-Yong Lee	Ginsenoside Rg1 promotes glucose uptake through activated AMPK pathway in insulin-resistant muscle cells	Phytotherapy Research	26(7)	2012	Wiley-Blackwell (England)	SCI
Jae-Won Kim, Seok-Yun Jung, Yi-Hong Kwon, Sang-Hun Lee, Jun-Hee Lee, Boo-Yong Lee, Sang-Mo Kwon	Ginsenoside Rg3 Inhibits Endothelial Progenitor Cell Differentiation through Attenuation of VEGF-Dependent Akt/eNOS Signaling	Phytotherapy Research	26(9)	2012	Wiley-Blackwell (England)	SCI
Jae-Won Kim, Seok-Yun Jung, Yi-Hong Kwon, Sang-Hun Lee, Zun-Hee Lee, and Sang-Mo Kwon, Boo-Yong Lee	Ginsenoside Rg3 attenuates tumor angiogenesis via inhibiting bioactivities of endothelial progenitor cells	Cancer Biology and Therapy	13(7)	2012	Landes Bioscience (USA)	SCI

Hye Min Bae, Ok Sun Cho, Shin Jung Kim, Byung Ok Im, Soon Hyun Cho, Sena Lee, Myung-Gyou Kim, Kyung Tack Kim, Kang Hyun Leem, Sung Kwon Ko	Inhibitory Effects of Ginsenoside Re Isolated from Ginseng Berry on Histamine and Cytokine Release in Human Mast Cells and Human Alveolar Epithelial Cells	J. Ginseng Res.	36(4)	2012	The Korean Society of Ginseng (Korea)	SCIE
Shin Jung Kim, Ju Duck Kim, Sung Kwon Ko	The change of ginsenoside composition in ginseng leaf and stem extract by the microwave and vinegar process	<i>Kor. J. Pharmacogn</i>	44(2)	2013	Korean Society of Pharmacognosy (Korea)	-

### 3. 학술대회 발표

본 과제로부터 얻어진 학술적 정보를 학술대회에 발표하여 본 연구성과를 국내외에 홍보하고자 한다.

발표자	발표제목	학술대회명	인쇄물 명칭, 통권, 호	년, 월, 일	장소, 국명
Shin-Jung Kim, Hee-Kyung Jo, Sung-Kwon Ko, Ju-Duck Kim	The change of ginsenoside composition in ginseng berry extract by the microwave process	대한약학회	2011년도 대한약학회 추계 학술대회	2011년 11월 7일	인천, 한국
SUNG Min Chang, CHO Hee Kyung, IM Byung Ok, KO Sung- Kwon	The change of ginsenoside composition in Notoginseng Radix (Sanchi, <i>Panax notoginseng</i> ) by the microwave and vinegar process	대한약학회	2012년도 대한약학회 춘계 학술대회	2012년 4월 21일	제주, 한국

#### 4. 산업체 이전활용 계획

본 연구 결과를 바탕으로 참여기업인 (주)엠디젠에 기술을 공여하고 기능성 화장품 및 간기능 개선 기능성 인정 식품의 허가를 얻어 산업화 하고자 함.

#### 산업화 계획

업체명 (대표자 및 연락책임자)	전화 번호	업체현황 (설립시기, 직원수 등)	산업화시기 (예정)	기업활용유형 (신제품명 및 특성, 공정개선등)
(주)엠디젠 (백형개, 신현국)	02-962-6474	2008.5.27. 3명	2014년 상반기	트리플진생 간기능개선 기능인정 식품

#### 5. 교육 및 지도활용

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

#### 교육 및 지도활용 현황

교육명칭	교재명	일시	장소	참석 대상	인원	주요내용	기대효과
생활 한방	생활 한방	14. 2	제천	시민	100	인삼 기능성식품 개발	인삼제제 홍보
인삼전문가 과정	우리인삼의 이해	14. 2	안성	시민	50	고려인삼의 한방적 효능과 우수성 확인	고려인삼의 우수성 확인



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 기능성 강화 인삼 논문 현황

1. Ko SK, Bae HM, Cho OS, Im BO, Chung SH, Lee BY. Analysis of ginsenoside composition of ginseng berry and seed. Food Sci. Biotechnol 2008;17:1379-1382.
2. Dey L, Zhang L, Yuan CS. Anti-diabetic and anti-obese effects of ginseng berry extract: comparison between intraperitoneal and oral administrations. Am J Chin Med 2002;30:645-647.
3. Huo YS. Anti-senility action of saponin in Panax ginseng fruit in 327 cases. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 1984;4:593-596.
4. Zhang SC, Jiang XL. The anti-stress effect of saponins extracted from panax ginseng fruit and the hypophyseal-adrenal system (author's transl). Yao Xue Xue Bao 1981;16:860-863.
5. Hye Min Bae, Ok Sun Cho, Shin Jung Kim, Byung Ok Im, Soon Hyun Cho, Sena Lee, Myung Gyou Kim, Kyung Tack kim, Kang Hyun Leem, Sung Kwon Ko. Inhibitory Effects of Ginsenoside Re Isolated from Korean Ginseng Berry on Histamine and Cytokine Release in Human Mast Cells and Human alveolar Epithelial Cells. J. Ginseng Res 2012;36:(   -   )
6. Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H, Zhang R. Invitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of Panax ginseng. Cancer Chemother Pharmacol 2007;59:589-601.
7. Lee SA, Jo HK, Im BO, Kim SG, Whang WK, Ko SK. Changes in the contents of prosapogenin in the Red ginseng (*Panax ginseng*) depending on steaming batches. J. Ginseng Res 2012;36:102-106.
8. Sung Kwon Ko, Kyung Hee Lee, Jun Kee Hong, Sung An Kang, Uy Dong Sohn, Byung Ok Im, Sung Tai Han, Byung Wook Yang, Sung Hyun Chung, Boo Yong Lee. The Change of Ginsenoside Composition in Ginseng Extract by the Vinegar Process. Food Sci. Biotechnol 2005;14:509-513.
9. Jeong SJ, Han SH, Kim DY, Lee JC, Kim HS, Kim BH, Lee JS, Hwang EH, Park JK. Effects of mRg2, a mixture of ginsenosides containing 60% Rg2, on the ultraviolet

B-induced DNA repair synthesis and apoptosis in NIH3T3 cells. *Int J Toxicol* 2007;26:151-158.

10. Keum YS, Han SS, Chun KS, Park KK, Park JH, Lee SK, Surh YJ. Inhibitory effects of the ginsenoside Rg<sub>3</sub> on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF- $\kappa$ B activation and tumor promotion. *Mutat Res* 2003;523:75-85.

11. Kim ND, Kang SY, Park JH, Schini-Kerth VB. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> mediates endothelium-dependant relaxation in response to ginsenosides in rat aorta : role of K<sup>+</sup> channels. *Eur J Pharmacol* 1999;367:41-49.

12. Yang L, Hao J, Zhang J, Xia W, Dong X, Hu X, Kong F, Cui X. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> promotes beta-amyloid peptide degradation by enhancing gene expression of neprilysin. *J Pharm Pharmacol* 2009;61:375-380.

13. Lee WM, Kim SD, Park MH, Cho JY, Park HJ, Seo GS, Rhee MH. Inhibitory mechanisms of dihydroginsenoside Rg<sub>3</sub> in platelet aggregation: critical roles of ERK2 and cAMP. *J Pharm Pharmacol* 2008;60:1531-1536.

14. Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett* 2000;150: 41-48.

15. Zheng H, Jeong Y, Song J, Ji GE. Oral administration of ginsenoside Rh1 inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions induced by oxazolone in hairless mice. *Int Immunopharmacol* 2011;11:511-518.

16. Ko, SK. and Im, BO. (2009) The science of Korean ginseng, 47-52, *Yakupsinmunsa*, Seoul.

17. Lee, D. C., Lee, M. O., Kim, C. Y. and Clifford, D. H. (1981) Effect of ether, ethanol and aqueous extracts of ginseng on cardiovascular function in dogs. *Can. J. Comp. Med.* 45: 182-187.

18. Jie, Y. H., Cammisuli, S. and Baggiolini, M. (1984) Immunomodulatory effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer in the mouse. *Agents Actions.* 15: 386-391.

19. Kim, Y. C., Kim, S. R., Markelonis, G. J. and Oh, T. H. (1998) Ginsenosides Rb<sub>1</sub> and Rg<sub>3</sub> protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 53: 426-432.

20. Joo, C. N., Koo, J. D., Kim, D. S. and Lee, S. J. (1977) Biochemical studies of ginseng saponins. XI. The effects of ginseng saponins on alcohol dehydrogenase. *Hanguk Saenghwa Hakhoe Chi.* 10: 109-120.
21. Tahara, M., Kono, H., Mune, S. and Odashima, S. (1985) Action of ginsenosides on tumor cells. Growth inhibition and redifferentiation of neoplasia. *Wakan Yaku Gakkaishi.* 2: 170-171.
22. Yokozawa, T., Kobayashi, T., Oura, H. and Kawashima, Y. (1985) Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb<sub>2</sub> in streptozotocin-diabetic rats. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 869-872.
23. Park, J. D. (1996) Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng. *Korean J. Ginseng Sci.* 20: 389-415.
24. Sanata, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S. (1974) Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginseng-R<sub>0</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc and Rd. *Chem. Pharm. Bull.* 22: 421-428.
25. Kitagawa, I., Taniyama, T., Shibuya, H., Nota, T. and Yoshikawa, M. (1987) Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2) ; Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *Yakugaku Zasshi.* 107: 495-505.
26. Kim, S. E., Lee, Y. H., Park, J. H. and Lee, S. K. (1999) Ginsenoside-Rs<sub>3</sub>, a new diol-type ginseng saponin, selectively elevates protein levels of p53 and p21WAF1 leading to induction of apoptosis in SK-HEP-1 cells. *Anticancer Res.* 19: 487-491.
27. Kim, W. Y., Kim, J. M., Han, S. B., Lee, S. K., Kim, N. D., Park, M. K., Kim, C. K. and Park, J. H. (2000) Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J. Nat. Prod.* 63: 1702-1704.
28. Bao, H. Y., Zhang, J., Yeo, S. J., Myung, C. S., Kim, H. M., Kim, J. M., Park, J. H., Cho, J. S. and Kang, J. S. (2005) Memory enhancing and neuroprotective effects of selected ginsenosides. *Arch. Pharm. Res.* 28: 335-342.
29. Jung, K. Y., Kim, D. S., Oh, S. R., Lee, I. S., Lee, J. J., Park, J. D., Kim, S. I. and Lee, H. K. (1998) Platelet activating factor antagonist activity of ginsenosides. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 79-80.

30. Kwon, S. W., Han, S. B., Park, I. H., Kim, J. M., Park, M. K. and Park, J. H. (2001) Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. *J. Chromatogr.* 921: 335-339.
31. Hasegawa, H., Sung, J. H., Matsumiya, S. and Uchiyama, M. (1996) Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. *Planta Med.* 62: 453-457.
32. Hasegawa, H., Sung, J. H. and Benno, Y. (1997) Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing ginseng saponins. *Planta Med.* 63: 436-440.
33. Yahara, S., Tanaka, O. and Komori, T. (1976) Saponins of the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chem. Pharm. Bull.* 24: 2204-2208
34. Yahara. S. Matsuura. K., Kasai. R. and Tanaka. O. (1976) Saponins of buds and flowers of *Panax ginseng* (I). Isolation of ginsenosides Rd, Re, and Rg<sub>1</sub>. *Chem. Pharm. Bull.*, 24: 3212-3213.
35. Yahara. S., Kaji. K. and Tanaka. O. (1979) Further study on dammarane-type saponins of roots, leaves, flower buds, and fruits of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chem. Pharm. Bull.*, 27: 88-92.
36. Zhang. S., Yao. X., Chen, Y., Cui. C., Tezuka. Y. and Kikuchi. T. (1989) Ginsenoside La, a novel saponin from the leaves of *Panax ginseng*. *Chem. Pharm. Bull.*, 37: 1966-1968.
37. Zhang. S., Takeda. T., Zhu. T., Chen. Y., Yao. X., Tanaka, O. and Ogihara. Y. (1990) A New Minor Saponin from the Leaves of *Panax ginseng*. *Planta Medica.* 56: 298-300.
38. Kwon, S. W., Han, S. B., Park, I H., Kim, J. M., Park, M. K. and Park, J. H. (2001) Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. *Journal of chromatography A*, 921: 335-339.
39. Ko, S. K., Lee, K. H., Hong, J. K., Kang, S. A., Sohn, U. D., Im, B. O., Han, S. T., Yang, B. W., Chung, S. H. and Lee, B. Y. (2005) Change of Ginsenoside Composition in Ginseng Extract by Vinegar Process. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 509-513.
40. Shibata, S., Tanaka, T., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S. and Ohsawa, T. (1966) Chemical Studies on oriental plant drugs (XIV) Prtopanaxadiol, a genuine sapogenin of ginseng saponins. *Chem. Pharm. Bull.* 14: 595-600.

41. Jo, H. K., Sung, M. C. and Ko, S. K. (2012) The comparison of ginseng prosapogenin composition and contents in Red and Black ginseng. *Kor. J. Pharmacogn.* 42: 361-365.

## 제 7 장 연구시설 장비 현황

구분	품 명	규 격	단 위	수 량	단 가	금 액(원)	비 고
보유	Rotary evaporator	Buchi	20 ℓ	1	50,000,000	50,000,000	
보유	Funnel shaker	Eyelar	3000cc	1	4,000,000	4,000,000	
보유	Fraction collector	Gilson	FC 204	3	4,000,000	12,000,000	
보유	Ultrasonicator	고도기업	3 ℓ	1	3,000,000	3,000,000	
보유	Ultrasonicator	고도기업	20 ℓ	1	6,000,000	6,000,000	
보유	질소농축기	Eyelar	MG2200 B	1	4,000,000	4,000,000	
보유	데스크탑 PC	삼보		2	500,000	1,000,000	
보유	Waters 1525 binary HPLC system	Waters	1525 binary	1	100,000,000	100,000,000	
합 계						180,000,000	

## 제 8 장 참고문헌

1. Semenkovich CF: Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest* 116: 1813-1822, 2006.
2. Kahn BB, Alquier T, Carling D and Hardie DG: AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15-25, 2005.
3. Horton JD, Goldstain JL and Brown MS: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109: 1125-1131, 2002.
4. Goldstain JL and Brown MS: From fatty streak to fatty liver: 33 years of joint publications in the JCI. *J Clin Invest* 118: 214-226, 2008.
5. Yang J, Craddock L, Hong S and Liu ZM: AMP-activated protein kinase suppresses LXR-dependent sterol regulatory element-binding protein-1c transcription in rat hepatoma McA-RH7777 cells. *J Cell Biochem* 106: 414-426, 2009.
6. Zang M, Xu S, Maitland-Toolan K, Zuccolio A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ and Cohen RA: Polyphenols stimulates AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibits accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* 55: 2180-2191, 2006.
7. Yang CY, Wang J, Zhao Y, Shen L, Jiang X, Xie ZG, Liang N, Zhang L and Chen ZH: Anti-diabetic effects of *Panax notoginseng* saponins and its major anti-hyperglycemic components. *J Ethnopharmacol* 130: 231-236, 2010.
8. Yuan HD, Kim SJ and Chung SH: Beneficial effects of IH-901 on glucose and lipid metabolisms via activating adenosine monophosphate-activated protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase pathways. *Metabolism* 60: 43-51, 2011.
9. Lee HJ, Lee Y H, Park SK, Kang ES, Kim HJ, Lee YC, Choi CS, Park SE, Ahn CW, Cha BS, Lee KW, Kim KS, Lim SK and Lee HC: Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves insulin sensitivity and attenuates the development of diabetes in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Metabolism* 58: 1170-1177, 2009.
10. Luo JZ and Luo L: Ginseng on hyperglycemia: effects and mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med* 6: 423-427, 2008.
11. Vuksan V, Sung MK, Sievenpiper JL, Stavro PM, Jenkins AL, Di Buono M, Lee KS, Leiter LA, Nam KY, Arnason JT, Choi M and Naeem A: Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves glucose and insulin regulation in well-controlled, type 2 diabetes: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 46-56, 2008.
12. Xiong Y, Shen L, Liu KJ, Tso P, Xiong Y, Wang G, Woods SC and Liu M:

Antiobesity and antihyperglycemic effects of ginsenoside Rb1 in rats. *Diabetes* 59: 2505-2512, 2010.

13. Attele AS, Zhou YP, Xie JT, Wu JA, Zhang L, Dey L, Pugh W, Rue PA, Polonsky KS, and Yuan CS: Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes* 51: 1851-1858, 2002.

14. Kim SJ, Yuan HD and Chung SH: Ginsenoside Rg1 suppresses hepatic glucose production via AMP-activated protein kinase in HepG2 cells. *Biol Pharm Bull* 33: 325-328, 2010.

15. Hardie DG: The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117: 5479-5487, 2004.

16. Birnbaum MJ: Activating AMP-activated protein kinase without AMP. *Mol Cell* 19: 289-290, 2005.

17. Kim YD, Park KG, Lee YS, Park YY, Kim DK, Nedumaran B, Jang WG, Cho WJ, Ha J, Lee IK, Lee CH and Choi HS: Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* 57: 306-314, 2008.

18. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA and Zang M: AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab* 13: 376-388, 2011.

19. Son YM, Kwak CW, Lee YJ, Yang DC, Park BC, Lee WK, Han SH and Yun CH: Ginsenoside Re enhances survival of human CD4<sup>+</sup> T cells through regulation of autophagy. *Int Immunopharmacol* 10: 626-631, 2010.

20. Song X, Chen J, Sakwivatkul K, Li R and Hu S: Enhancement of immune responses to influenza vaccine (H3N2) by ginsenoside Re. *Int immunopharmacol* 10: 351-356, 2010.

21. Wang YG, Zima AV, Ji X, Pabbidi R, Blatter LA and Lipsius SL: Ginsenoside Re suppresses electromechanical alternans in cat and human cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: 851-859, 2008.

22. Zhang Z, Li X, Lv W, Yang Y, Gao H, Yang J, Shen Y and Ning G: Ginsenoside Re reduces insulin resistance through inhibition of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and nuclear factor- $\kappa$ B. *Mol Endocrinol* 22: 186-195, 2007.

23. Cho WC, Chung WS, Lee SK, Leung AW, Cheng CH and Yue KK: Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 550: 173-179, 2006.

24. Xie JT, Mehendale SR, Li X, Quigg R, Wang X, Wang CZ, Wu JA, Aung HH, A Rue P, Bell GI and Yuan CS: Anti-diabetic effect of ginsenoside Re in ob/ob mice. *Biochim Biophys Acta* 1740: 319-325, 2005.



25. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Herbrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F and Foretz M: AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol* 196: 81-98, 2009.
26. Lee JM, Seo WY, Song KH, Chanda D, Kim YD, Kim DK, Lee MW, Ryu D, Kim YH, Noh JR, Lee CH, Chiang JY, Koo SH and Choi HS: AMPK-dependent repression of hepatic gluconeogenesis via disruption of CREB.CRTC2 complex by orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *J Biol Chem* 285: 32182-32191, 2010.
27. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, *et al*: The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310: 1642-1646, 2005.

## 주 의

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