

발간등록번호

11-1541000-001034-01

보안과제( ), 일반과제( O )      과제번호 108079

인삼을 이용한 혁신적 신규 기능성 소재 개발 -  
인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자  
바이러스(H5N1) 예방 및 치료용

Development of new functional food for prevention and  
treatment against high pathogenic AIV(H5N1)  
by using Panax ginseng

충남대학교

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “인삼을 이용한 혁신적 신규 기능성 소재 개발 - 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(H5N1) 예방 및 치료용에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 7 월 11 일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 송규용

세부연구책임자 : 김영호

세부연구책임자 : 서상희

연 구 원 : 이지현

연 구 원 : 박상혁

연 구 원 : 김윤희

협동연구기관명 : 관동대학교

협동연구책임자 : 오한진

협동연구기관명 : 금산인삼농협

협동연구책임자 : 윤국중



# 요 약 문

## I. 제 목

인삼을 이용한 혁신적 신규 기능성 소재 개발 : 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(H5N1) 예방 및 치료

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 인삼의 약효를 나타내는 주요한 성분은 dammarane계 triterpene인 aglycone에 당류가 결합된 배당체인 saponin으로 알려져 있음. 인삼뿌리에는 대략 3-5% 정도의 조사포닌이 함유되어 있으며 인삼에 대한 연구는 대부분 뿌리에 국한되어있음.
- 하지만 근래 들어 인삼뿌리 뿐만 아니라 인삼잎 및 인삼꽃봉오리에 대한 관심이 증가되고 있음.
- 특히, 인삼잎의 조사포닌 함량은 13-18%로써 인삼뿌리보다 조사포닌의 양이 3~5배나 되고, 화학구조도 인삼근과 동일할 뿐만 아니라 인삼뿌리에는 존재하지 않는 성분들도 존재한다고 보고되어 있음. 특히 중국에서는 꽃봉오리를 건조하여 고가로 공항면세점에서 전 세계인을 대상으로 판매하고 있는 실정임.
- 인삼사포닌을 다량함유하고 있지만 현재 대부분 폐기처분되고 있는 인삼잎 및 꽃봉오리를 이용한 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성을 검증하고자 함.
- 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(H5N1) 뿐만 아니라 면역활성, 항산화활성 등과 같은 다양한 생리활성을 검증할 필요가 있음.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구조직은 기반연구팀, 활성검증팀, 생산팀 등의 세 분야 연구팀으로 구성되어 있으며 기반연구팀과 활성검증팀은 대학에서, 생산은 참여기업으로 현재 다양한 인삼제품을 개발하여 국내 및 해외에 수출하고 있는 기업인 금산인삼농협 및 (주)석산터메디칼에서 제품을 개발하고 있음.

### 1. 기반연구팀

- 인삼잎 및 꽃봉오리 성분연구
- 증숙방법 개발 : 인삼잎 및 꽃봉오리의 증숙 방법에 따른 인삼사포닌의 성분변화와 활성관계로부터 최적의 활성을 나타내는 증숙 조건을 확립함.

- 활성 유효성분의 분리 : 실리카겔, C-18 등의 충전제를 이용한 활성을 나타내는 유효물질의 분리
- 분리된 유효물질의 IR, Mass, NMR 등과 같은 spectroscopy를 이용한 구조결정
- 증속하지 않은 또는 증속한 인삼잎 및 꽃봉오리에 사포닌이 다량 함유된 도라지 더덕 등과 같은 다른 한약재가 가미되어 효능이 증강된 고기능성 복합제의 개발

## 2. 활성검증팀

- 증속 또는 증속하지 않은 인삼잎 및 꽃봉오리 추출물의 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성 및 면역활성 측정.
- 인삼지상부 사포닌의 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성 검증
- 증속 또는 증속하지 않은 인삼잎 및 꽃봉오리로부터 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성을 나타내는 물질분리 및 작용기전 연구(면역활성 또는 바이러스에 직접적인 영향을 주는가?).
- 사포닌이 다량 함유된 다른 한약재를 포함한 고기능성 복합제의 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성 측정.
- 항산화, 면역활성, 발모촉진, 심근세포 수축력 감소활성과 같은 다양한 생리활성 측정

## 3. 생산팀

- 최근 시대적 흐름에 따른 국내 소비자의 성향 변화와 소비자가 요구하는 새로운 형태의 제형 개발 : 정제, 캡슐제
- 샴푸의 개발

## IV. 연구개발결과

- 인삼지상부(잎, 꽃봉오리) 증속방법을 개발하였으며 증속한 인삼지상부의 성분을 분석할 수 있는 분석조건을 확립한 바, 증속한 인삼지상부에는 Rg3, Rg5 등 10여종 이상의 사포닌이 새로이 생성됨을 확인하였다.
- 벤조피란과 같은 발암성물질의 분석방법을 확립하였으며, 이러한 분석방법에 의해서 증속한 인삼지상부를 분석한 결과 벤조피란 함량이 식약청 기준인 5ppb 이하를 만족하는 것을 확인하였다.
- 인삼지상부(잎, 꽃봉오리)의 산처리 증속방법을 개발하였으며 증속한 인삼지상부의 성분을 분석할 수 있는 분석조건을 확립한 바, 증속한 인삼지상부에는 Rh1, Rh2, compound K 및 PPT가 다량 존재함을 알 수 있었다.
- 증속한 인삼지상부는 항산화활성, 발모활성, 혈관내피세포 염증반응 억제활성 및 심근수축력 감소활성을 나타냄을 확인하였다. 특히 단일물질인 ginsenoside F1이 심근수축력 감소활성이 뛰어난을 관찰하여 향 후 고혈압 치료제로 개발가능성이 있음을 확인하였다.
- 복합제 1, 2를 개발하였다.

- 인삼 잎으로부터 20종의 화합물을 분리정제하여 구조를 동정하였다. 이 중 17종의 화합물은 사포닌 화합물이었으며 2종의 화합물은 flavonoid 화합물로, 1종의 화합물은 steroid 화합물로 구조동정하였다. 17종의 화합물중 1종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하였다.
- 인삼 꽃봉오리로부터 21종의 화합물을 분리정제하였으며, 17종의 화합물을 구조동정하였다. 17종의 화합물 중에서 16종의 화합물은 사포닌 화합물이었으며 1종의 화합물은 flavonoid 화합물로 구조동정하였다. 16종의 화합물 중 3종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하였다.
- 증숙한 인삼잎으로부터 26종의 화합물을 분리정제하여 구조를 동정하였다. 총 26종의 화합물 중에서 9종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하였다.
- 증숙한 인삼꽃봉오리로부터 23종의 화합물을 분리정제하여 구조를 동정하였다. 구조를 동정한 1종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하였다.
- 인삼에 존재하는 사포닌은 in vitro 바이러스 억제활성을 나타내지 않았지만 in vivo 동물실험에서는 증숙인삼잎 조사포닌 및 복합제가 강한 바이러스 억제활성을 나타내었다.
- 비장세포의 증식실험, FACS에 의한 유세포 분석, Cytokine assay 실험, 지연성 과민반응검사 실험 등을 통하여 인삼추출물은 면역활성을 증강시킴을 확인하였다.
- 인삼 분말 및 추출물을 이용하여 정제 및 캡슐제를 만들었다.
- 인삼을 이용한 한방삼푸를 개발하여 상품화 하여 금산인삼농협을 통하여 판매하고 있다.

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 인삼에 존재하는 새로운 물질의 발견 및 활성실험 결과를 SCI 논문에 6건을 게재하였다.
  - ◇ Nguyen Huu TUNG, Gyu Yong SONG, Yong Jin PARK, and Young Ho KIM, Two New Dammarane-Type Saponins from the Leaves of Panax ginseng, Chem. Pharm. Bull. 57(12) 1412-1414 (2009)
  - ◇ Nguyen Huu Tung, Gyu Yong Song, Jeong-Ah Kim, Jae-Hee Hyun, Hee-Kyoung Kang, Young Ho Kim, Dammarane-type saponins from the flower buds of Panax ginseng and their effects on human leukemia cells, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20 (2010) 309 - 314
  - ◇ Tung, Nguyen-Huu; Song, Gyu-Yong; Nhiem, Nguyen-Xuan; Ding, Yan; Tai, Bui-Huu; Jin, Long-Guo; Lim, Chae-Moon; Hyun, Jin-Won; Park, Chun-Jung; Kang, Hee-Kyoung; Kim, Young-Ho. Dammarane-Type Saponins from the Flower Buds of Panax ginseng and their Intracellular Radical Scavenging Capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2010), 58(2), 868-874.
  - ◇ Nguyen Huu Tung, Jeong-Hyun Son, Kyoungwon Cho, Jeong-Ah Kim, Jae-Hee Hyun, Hee-Kyoung Kang, Gyu Yong Song, Chun Jung Park, Young Ho Kim, Phenolic components from the leaves of Panax ginseng and their effects on HL-60

human leukemia cells, Food Sci. Biotechnol, 19(1):271-274(2010),

◇ Nguyen Huu Tung, Seo Young Yang, Jeong Ah Kim, Gyu Yong Song, and Young Ho Kim. Dammarane-type Saponins from the Black Ginseng. Bull. Korean Chem. Soc. 2010, Vol. 31, No. 11 3423-3426.

◇ Nguyen Huu TUNG, Gyu Yong SONG, ChauVan MINH ,Phan Van KIEM, Long Guo JIN, Hye-Jin, BOO, Hee-Kyoung KANG, Young Ho KIM. Steamed Ginseng-Leaf Components Enhance Cytotoxic Effects on Human Leukemia HL-60 Cells. Chem. Pharm. Bull. 58(8)1111-1115(2010).

□ 인삼에 존재하는 새로운 물질의 발견 및 활성화에 대한 특허를 6건 출원하였으며 1건이 등록되었다.

- 특허출원

◇ 송규용, 서상희, 김영호, 박용진, 박천정. 흑인삼엽 가공 건조분말 또는 그 추출물을 유효 성분으로 함유하는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 예방 및 치료용 조성물, 출원번호 : 10-2008-0097442

◇ 송규용, 서상희, 김영호, 흑인삼꽃봉오리 가공 건조분말 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 예방 및 치료용 조성물, 출원번호 : 10-2010-0029649

◇ 송규용, 김영호, 고영상, 신규 진세노사이드 및 이의 용도, 출원번호 : 10-2010-0048283

◇ 송규용, 김영호, 고영상, 진세노사이드의 자가면역 질환의 예방 및 치료 용도, 출원번호 : 10-2010-0042156

◇ 김영호, 송규용, 우선희, 진세노사이드를 함유하는 심혈관계 질환의 예방 및 치료용 조성, 출원번호 : 10-2010-0051845

◇ 김영호, 고영상, 진세노사이드의 면역성 질환의 예방 및 치료 용도, 출원번호 : 10-2011-0003063

- 특허등록

◇ 김영호, 송규용, 우선희, 진세노사이드를 함유하는 심혈관계 질환의 예방 및 치료용 조성, 출원번호 : 10-2010-0051845, 등록번호 : 10-1016996 (20110216)

□ 인삼추출물이 고병원성조류인플루엔자 바이러스인 H5N1에 대해서 억제활성이 있음을 관찰하여 향 후 이를 이용한 제품개발 가능성을 타진하였다.

□ 인삼잎과 꽃봉오리에 많이 존재하는 ginsenoside F1이 강력한 심근수축 억제활성을 나타냄을 관찰하여 향 후 고혈압 치료제 개발 가능성을 타진하였다.

□ 인삼추출물의 발모촉진 활성이 뛰어난을 관찰하여 “인삼머리알지”라는 상품명으로 현재 금산인삼농협에서 판매하고 있다. 이밖에 정제 및 캡슐제 및 화장품에 대한 시제품을 개발하였으며 향 후 상품화할 예정이다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

The purpose of this study is to prepare steamed ginseng leaf(SGL) and flower bud(SGF) devoid of tumor promoting agent such as benzopyren and develop a dietary supplement and cosmetics. In order to make SGL and SGF, 5 year fresh ginseng leaf and flower bud were steamed at 120°C for 3 hr under high pressure and dried at 60°C for 12-24 hr. Temperature and pressure were considered as a significant factors to prepare BG with high quality.

During the heat processing for preparing SGL and SGF, the thermally unstable malonyl-ginsenoside was degraded into corresponding neutral ginsenosides. Also, the steaming process of ginseng leaf and flower bud caused degradation or transformation of neutral ginsenoside. The main ginsenosides of SGL and SGF were Rg3, Rk1 and Rg5 which were present small amount in red ginseng. Also, we have totally isolated 41 kinds of compounds from ginseng leaf and flower bud. Among them, 4 kinds of compounds were found to be new compounds.

It was found that the extract of BG exhibited stronger cytotoxic activity against MCF, HT-1080, Hepa 1C1C7, ACHN, HCT-15, PC-3, and NUGO-3 cancer cell lines than the extract of red ginseng. Also, the extract of BG exhibited stronger antitumor activity(33%) in BDF1 mice bearing Lewis lung carcinoma cells(LLC) than the extract of red ginseng.

In regard to the *in vitro* and *in vivo* anti-angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells(HUVEC), the extract of BG was found to show inhibition of HUVEC proliferation, migration and tube formation induced by bFGF in a dose-dependent manner. Also, the extract of BG exhibited potent anti-angiogenic activity in CAM assay. Additionally, the ginsenosides Rg3, Rk1 and Rg5 which were purified from BG exhibited potent anti-angiogenic activity in vitro and in vivo assay. Taken together, these results indicate that BG could be useful in preventing and treatment of metastatic cancer.

Using the extract from BG, Research Group II has examined the effects of BG on obesity and memory. First, after administering the extracts of BG for 3 weeks both in rats fed normal diets and high-fat diet-induced obese (DIO) mice, BG persistently suppressed weight gain. Whereas food intake was not significantly changed in rats fed normal diets, food intake was significantly decreased in DIO mice with decreasing the expression of neuropeptide Y, a powerful feeding stimulant, in the arcuate nucleus of hypothalamus. However, the weight of both epididymal and abdominal fats was decreased in BG-treated rats, not significantly changed



in DIO mice. Moreover, serum triglyceride level in rats administered with BG was also significantly lowered, but not in DIO mice. After administering the extract of anti-obese complex with BG (OB-Rx 1) in DIO mice for 5 weeks, body weight was reduced and the weight of both epididymal and subcutaneous fats were decreased. Both serum triglyceride and LDL levels were reduced. Taken together, the repeated administration of either BG or OB-Rx 1 causes a suppression of body weight gain by decreasing triglyceride level in blood and body fat deposit. To investigate the anti-obese mechanism of BG, three ginsenosides separated from BG, Rk1, Rg3, and Rg5, were applied in differentiated adipocyte. As rosiglitazone, a drug for the treatment of type II diabetes mellitus, did, both Rk1 and Rg5 induced adipogenesis and the increment of PPAR-g mRNA expression. These are similar to rosiglitazone to improve insulin sensitivity. Thus, these results suggested that the BG may be used for the treatment of metabolic syndrome.

Second, in order to examine the neuroprotective effects of BG on memory dysfunction, the extracts of either BG or nootropic complex with BG (BN-Rx 1), when orally administered for 7 days, significantly ameliorated the memory impairment induced by the single oral administration of ethanol. It is noteworthy that three ginsenosides separated from BG, Rk1, Rg5, and Rg3, increased the level of acetylcholine by inhibiting acetylcholinesterase. These are similar to tacrine, an anticholinesterase, to improve memory dysfunction, so that three ginsenosides exerted anticholinesterase activities. Taken together, these results indicate that BG significantly reversed the memory dysfunction induced by ethanol, and suggest that these neuroprotective actions may be attributed to anticholinesterase activities induced by their ginsenosides, Rk1, Rg5 and Rg3, and used for the treatment of Alzheimer's disease.

Using the extract from BG, Research Group III has examined the effects of BG on immunity. The extract of BG was found to increase the amounts of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Also, the extract of BG was found to increase NK cell activity. Moreover, we found that the extract of BG reduced the expression of iNOS, COX-1 and COX-2 induced by LPS.

In summary, an efficient method for preparing BG without tumor-promoting agent was developed and BG was found to show various biological activities such as anti-tumor, anti-obesity, neuroprotection, and immuno-stimulating activities. Therefore, we will focus on transferring these technology to company for the production of various dietary supplement products that may be used for the treatment of cancer, obesity, Alzheimer's disease.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

<b>Chapter 1. Outline of Project</b> .....	<b>1</b>
1. Justification .....	1
2. Objectives .....	5
<b>Chapter 2. Current Status of Technique</b> .....	<b>10</b>
1. Current Status and Problem of the Related Technique .....	10
<b>Chapter 3. Contents and Results of Research and Development</b> .....	<b>12</b>
1. Analysis, Steaming method and development of Complex in Ginseng's Aerial parts .....	12
2. Separation and Structure analysis of active compounds in Ginseng's Aerial parts .....	52
3. Inhibitory Effects of Ginseng's Aerial parts against high pathogenic AIV(H5N1) .....	90
4. Studies on Effect of Ginseng's Aerial parts in Immuno-stimulation .....	95
5. Industrialization of Ginseng's Products .....	114
<b>Chapter 4. Achievement Degree of Objective and Contribution Degree to related field</b> .....	<b>120</b>
<b>Chapter 5. Future Plan Due to the Results of Research and Development</b> .....	<b>124</b>
<b>Chapter 6. Collected Scientific and Technical Informations from Overseas</b> .....	<b>126</b>
<b>Chapter 7. References</b> .....	<b>129</b>

# 목 차

□ 제 출 문 .....	i
□ 요 약 문 .....	iii
□ 영문요약문 .....	vii
□ 영문 목 차 .....	ix
□ 목 차 .....	x

## 제 1 장 연구개발과제의 개요 ..... 1

제 1 절 연구개발의 필요성 및 목적 .....	1
1. 사회적·문화적 측면 .....	1
2. 기술적 측면 .....	1

제 2 절 연구개발의 목표 .....	5
1. 연구개발의 목표 및 내용 .....	5
가. 연구개발의 최종목표 .....	5
나. 연구개발의 내용 .....	5
다. 연차별 연구개발의 목표 및 내용 .....	7

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황 ..... 10

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점 .....	10
1. 국내·외 인삼관련 연구동향 .....	10

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ..... 12

제 1 절 인삼지상부의 성분분석, 증숙법 및 복합제의 개발 .....	12
1. 인삼지상부(잎, 꽃봉오리)의 채집 및 전처리 .....	12
가. 인삼잎의 전처리 .....	12
나. 인삼꽃봉오리의 전처리 .....	12
2. 인삼지상부의 증숙 .....	13
가. 열에 의한 증숙 .....	13
나. 산에 의한 증숙 .....	25

다. 다당체 분획 .....	31
3. 발암성 물질인 벤조피란 측정 .....	32
가. 시약 및 기기 .....	32
나. 분석기기 조건 .....	32
다. 직선성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) .....	32
라. 특이성 .....	33
마. 추출 효율 .....	33
바. 벤조피렌의 함량 분석 .....	33
4. 인삼지상부의 활성 .....	36
가. 항산화활성 .....	36
나. 발모효과 .....	44
다. 혈관내피세포염증 억제활성 .....	45
라. 심근세포 수축력에 미치는 영향 .....	46
5. 인삼복합제 개발 .....	50
제 2 절 인삼지상부의 활성물질의 분리 정제 및 구조동정 .....	52
1. 인삼잎에 존재하는 인삼사포닌의 성분분석 .....	52
가. 인삼잎의 추출 및 분획 .....	52
2. 인삼 꽃봉오리에 존재하는 인삼 사포닌의 성분분석 .....	63
가. 인삼 꽃봉오리의 추출 및 분획 .....	63
3. 증숙 인삼잎에 존재하는 인삼사포닌의 성분분석 .....	70
가. 증숙 인삼잎의 추출, 분획 및 분리정제 .....	70
4. 증숙 인삼꽃봉오리에 존재하는 인삼사포닌의 성분분석 .....	81
가. 증숙 인삼꽃봉오리의 추출, 분획 및 분리정제 .....	81
제 3 절 인삼지상부의 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제효과에 관한 연구 .....	90
1. 연구내용 .....	90
2. 연구범위 .....	90
3. 연구시설 .....	90
가. in vitro 바이러스 억제활성 .....	90
나. in vivo 마우스 치사율에 미치는 영향 .....	92
제 4 절 인삼지상부의 면역활성에 관한 연구 .....	95
1. 실험방법 .....	95
가. 약물투여 .....	95
나. 항원 및 면역 .....	95
다. 비장세포 분리 .....	95

라. 지연성 과민반응 (Delayed Type Hypersensitivity) .....	95
마. Plaque forming cell assay .....	95
바. Cytokine assay .....	96
사. Flow cytometric analysis .....	96
아. 비특이면역 실험 (Carbon clearance assay) .....	96
2. 실험결과 .....	97
가. 인삼 추출물 및 분리한 단일 물질의 비장세포 증식에 미치는 영향 .....	97
나. FACS에 의한 유세포 분석 .....	97
다. Cytokine assay .....	102
라. 조직 미네랄 검사 .....	105
마. 지연성 과민반응검사 .....	108
바. 비장의 무게와 세포수에 미치는 영향 .....	109
사. Plaque Forming Cell assay .....	111
아. Carbon clearance assay .....	112
제 5 절  제품의 산업화 .....	114
1. 인삼의 타정 .....	114
2. 코팅 .....	115
3. 인삼 추출물의 타정 .....	116
가. 엑스제조 .....	116
나. 완체제조 .....	116
4. 샴푸의 개발 .....	116
가. 샴푸의 제조 .....	117
나. 시판중인 샴푸 .....	117
5. 화장품 개발 .....	117
6. 잔류농약측정 .....	118
제 4 장  목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	120
제 1 절  연차별 목표달성도 .....	120
1. 1차년도 달성도 .....	120
2. 2차년도 달성도 .....	121
3. 3차년도 달성도 .....	122
제 2 절  관련 분야에의 기여도 .....	123

제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	124
제 1 절	실용화, 사업화 계획 .....	124
제 2 절	교육지도, 홍보, 특허, 지적재산권 확보 계획 .....	124
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	126
제 7 장	참고문헌 .....	129

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절. 연구개발의 필요성 및 목적

### 1. 사회적·문화적 측면 측면

- Well-Being 이라는 단어가 많은 사람들의 관심인 요즘, 현재를 살고 있는 대다수의 사람들의 초미의 관심사는 건강임.
- 인삼은 오가피과(Araliaceae) 인삼속에 속하는 다년생 초본류로서 한반도를 비롯하여 동아시아로부터 시베리아 동부, 북아메리카 지역에 걸쳐 분포되고 있음. 그 중에서 고려인삼(Panax ginseng C.A. Meyer)은 중국 본초학의 원전인 ‘神農本草經’에 불로장생의 약효를 지닌 上藥으로 등재된 이래 수천년 간 민간과 한방의학에서 사용되고 있음<sup>1)</sup>.
- 인삼은 특히 고려인삼은 타국의 인삼보다 탁월한 효능을 나타낸다고 알려져 있어 각국의 소비자들에게 많은 사랑을 받아왔으며 최근 고려인삼에 대한 과학적이고 합리적인 연구방법을 통하여 우수한 효능적인 측면들이 밝혀지고 있음. 이러한 인삼의 약리학적 효과로는 자양·강장효과, 성기능 및 생식기능 부전 개선 효과, 항고혈압 및 항동맥경화 효과, 조혈기능 향진 및 빈혈치료 효과, 혈당대사 및 당뇨병 개선 효과, 항암효과, 간장기능 부전 개선 효과, 숙취해소 효과, 기생충 감염 방지 효과, 진통·소염 작용 등이 있음<sup>2-9)</sup>.
- 세계 인삼류 시장의 규모는 대략 60억불을 상회한다고 추정되나 한국 인삼 산업은 위기임. 한국산 고려인삼은 가격이 비싸지만 상품의 품질이 가격에 미치지 못하여 한국산 고려인삼의 신규수요가 계속 감소하고 있는 추세임. 한국산 고려인삼의 세계시장 점유율은 80년대 초 30-40% 수준이었으나 현재는 10%이하에 머물고 있음.
- 현재 국내 인삼 시장 개방은 최소시장접근(MMA)이 허용된 인삼류는 20%의 저율관세로 수입이 가능하며, 95년 34톤(국내 생산량의 0.3%)에서 2004년 56.8톤(국내 생산량의 0.5%)까지 시장을 개방하였음. 국내 시장을 더욱 더 개방해야 하기 때문에 중국 및 화기삼과 같은 증저가 인삼 수입이 급증할 것으로 예상되므로 인삼을 경작하는 농민들에게 커다란 경제적 손실을 초래할 것임.
- 따라서 새로운 고부가가치 인삼상품을 개발한 후 이를 이용한 건강기능성 식품 및 의약품 수준의 제품 개발이 절실히 요구됨.

### 2. 기술적 측면

- 인삼의 약효를 나타내는 주요한 성분은 dammarane계 triterpene인 aglycone에 당류가 결합된 배당체인 saponin으로 알려져 있음. 인삼뿌리에는 대략 3-5% 정도의 조사포닌이 함유되어 있으며 인삼에 대한 연구는 대부분 뿌리에 국한되어있음.

- 하지만 근래 들어 인삼뿌리 뿐만 아니라 인삼잎 및 인삼꽃봉오리에 대한 관심이 증가되고 있으며 이에 대한 연구가 진행되고 있음<sup>10-12)</sup>.



그림 1. 인삼꽃봉오리

- 특히, 인삼잎의 조사포닌 함량은 13-18%로써 인삼뿌리보다 조사포닌의 양이 3~5배나 되고, 화학구조도 인삼근과 동일할 뿐만 아니라 인삼뿌리에는 존재하지 않는 성분들도 존재한다고 보고되어 있음. 특히 중국에서는 꽃봉오리를 건조하여 고가로 공항면세점에서 전 세계인을 대상으로 판매하고 있는 실정임(그림 1).
- 그러나 우리나라에서는 위와 같이 인삼의 활성을 나타내는 사포닌 함량이 인삼뿌리보다 월등히 높아 인삼잎 및 꽃봉오리는 기능성식품 및 의약적 자원으로서 경제적 가치가 있음에도 불구하고 대부분 사료로 사용되거나 폐기되고 있는 실정임.
- 따라서 최근 인삼의 연구동향은 성분을 바탕으로 한 활성위주의 연구가 수행되고 있어 지금까지 밝혀진 여러 가지 생리활성 이외에 다른 기술적·경제적 파급효과가 큰 새로운 활성에 대한 연구가 시급하다고 판단됨.
- 인플루엔자에 대한 최초의 기록은 기원전 412년으로 거슬러 올라가나, 20세기에 접어들면서 인플루엔자에 대한 기록이 보다 과학적으로 다루어지면서 남겨진 자료를 근거해 보면 20세기 이후 지금까지 사람에서 3번의 인플루엔자 대유행 있었음. 1918년부터 1920년 사이에 전 세계적으로 유행한 20세기 이후 1차 인플루엔자 대유행 (일명 스페인 독감)은 인류가 겪은 가장 큰 피해로 기록되고 있으며 그 기간 중 2천만 명에서 5천만 명의 사람이 사망하였음. 스페인 독감의 원인 바이러스는 돼지 인플루엔자 바이러스와 매우 유사한 혈청형 A/H1N1으로 판명되었으며 지금도 매년 전 세계적으로 유행하고 있는 유행성 독감의 주된 유행주입. 이밖에 1957년부터 1958년 사이에 발생한 20세기이후 2차 인플루엔자 대유행과 1968년부터 1969년 사이에 발생한 3차 인플루엔자 대유행은 홍콩에서 유래된 것으로 확인되었으며 대만, 필리핀, 싱가포르, 베트남 등지로 급속히 전파되었음. 원인 바이러스는 혈청형 A/H3N2 바이러스로서 이전의 혈청형 H2N2 바이러스와 HA형이 다른데, 이 HA형은 조류로부터 전달된 것으로 분석되고 있으며, 지금도 매년 전 세계적으로 유행하고 있는 유행성 독감의 주된 유행주입.



- 조류에서 주로 문제시되고 있는 조류인플루엔자 바이러스(AIV) 중 일부 혈청형은 사람에게 감염되어 독감증세를 보이다가 사망을 유발하기도 함.
- 고병원성 H5N1 조류인플루엔자바이러스는 1997년 홍콩에서 처음 발생하였으며, 최근 혈청형 A/H5N1 조류 인플루엔자 바이러스는 이 종속간의 장벽을 뛰어넘어 인체에 감염을 시켜 20세기 이후 4차 사람 인플루엔자 대유행의 전주곡으로서 전 세계가 현재 이 인체인체감염이 가능한 변이 바이러스의 사람에서 사람으로의 직접전염 등 그 전과양상에 주목하고 있음.
- 우리나라에서도 2003년 충북음성에서 고병원성 H5N1 조류인플루엔자바이러스가 발생한 바가 있으며, 현재 인도네시아, 베트남, 중국, 영국, 독일 등 전 세계적으로 확산된 상태임.
- 고병원성 H5N1 조류인플루엔자 바이러스가 닭에 감염할 시 100%의 치사율을 보이며, 현재까지 346명의 사람이 감염하여 213명이 사망하여 61%이상의 치사율을 보이고 있음.
- 고병원성 H5N1 조류인플루엔자바이러스를 예방하기 위한 효과적인 백신은 및 치료제로써 타미플루와 같은 물질이 있지만 조류인플루엔자 바이러스에 감염된 사람을 치유하는데 생각보다는 효과를 나타내지 못하고 있는 상태임.
- 2006년말/2007년초 전라북도를 비롯한 지역에서 7건의 고병원성 H5N1 조류인플루엔자가 발생하여 270만 가축을 살처분 하였고, 690억 원을 피해를 입었음.
- 최근 고병원성 A/H5N1 조류 인플루엔자 (HPAI) 발생빈도가 과거에 비하여 10배 가량 증가되어 미국, 호주, 멕시코, 파키스탄, 홍콩, 이탈리아 등 전 세계적으로 확산되고 있어 이를 효과적으로 방제할 수 있는 보다 새로운 개념의 방제대책이 절실히 요구되고 있음.
- 많은 조류인플루엔자바이러스 중에서도 사람에게 직접 전파할 능력이 있는 H5N1 조류인플루엔자바이러스가 21세기의 첫 번째 대유행 독감바이러스가 될 가능성이 가장 높음.
- H5N1 조류인플루엔자바이러스 감염에 의한 사람의 치사율이 60% 이상임을 감안하면, 만약에 이 바이러스가 대유행독감으로 변하면 은 인류의 대재앙이 될 것임이 자명함.
- 타미플루는 중국 토착식물인 “스타아니스”로부터 새로운 가치를 발굴하여 활용한 사례로 현재까지 유일한 조류 인플루엔자 치료제이며 연 3조원의 시장을 창출한 바 있음.
- 따라서 천연물을 이용한 새로운 치료제 및 예방제의 개발이 절실히 요구되며, 개발될 경우 엄청난 경제적 이윤을 창출할 수 있음.
- 전 세계적으로 조류인플루엔자바이러스 치료제를 위한 특허가 135건 밖에 안되며, 국내에서도 출원등록된 것이 31건이 되어 이 분야에서는 세계적인 기술을 보유하고 있음.
- 천연물의 경우 어성초, 솔잎, 생강, 녹차,둥글레, 김치유산균, 계피, 버섯균사체를 이용한 특허출원등록이 이루어지고 있음(표 1).

표 1. 천연물을 이용한 조류독감 치료제의 기술분포

출원번호	출원인	식물	동물	미생물	균류 (버섯)	내용
[KR]200500877 42	(주)롯데			○		김치유산균,웨이셀라코리엔시스포함
[KR]200700352 03	(주)엘지생활건강	○				어성초추출물
[KR]200700428 95	문치웅	○				솔잎추출물
[KR]200700428 96		○				솔잎추출물
[US]200501476 97	Rosenbloom, Richard A.	○				생강, 녹차
[US]200700270 78	Ooi Linda Shiou Mei	○				등굴레에서 추출한 단백질
[US]200600680 44	Reynolds Max	○				Melaleuca plant
[US]200601719 58	Stamets Paul				○	버섯균사체
[US]200602755 15	Ovadia Michael	○				계피
[JP]1998031658 3	SHIZUOKA PREFECTURE		○			조류적혈구, 당단백질
[WO]200700312 97	PANDALIS GEORGIOS	○				Cistus 속
[WO]200500679 40	EN-BIO TEC			○		효모균주유래 수용성글루칸
[WO]200600269 05	GUANGDONG LABORATORY	○				Phyto-flavonoid

- 이에 본 연구자는 흑삼(뿌리)의 조사포닌 분획물이 위와 같은 고병원성 H5N1 조류인플루엔자 바이러스에 감염시킨 마우스에 대해서 100% 생존율을 관찰한 바 특허를 출원한 바 있음.
- 따라서 인삼 뿌리에 비해서 인삼사포닌 함량이 월등히 높은 인삼잎 뿐만 아니라 꽃봉오리를 대상으로 고병원성 H5N1 조류인플루엔자 바이러스 억제효과를 관찰할 필요가 있다고 판단됨.
- 이에 본 연구는 인삼잎 및 꽃봉오리의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 억제활성, 면역활성을 검증하고자 하였으며, 심사위원님의 지적에 따라 항산화활성, 발모활성, 심근 수축력 감소활성과 같은 다양한 생리활성을 검증하고자 하였음
- 즉, 성공적인 연구성과는 WTO 체제하 및 FTA를 대비하여 농민들로 하여금 농가소득 증대는 물론 수출을 통하여 막대한 외화를 벌어들임으로서 국가 경제 발전에 크게 이바지 할 수 있으리라 판단됨.

## 제 2 절. 연구개발의 목표

### 1. 연구개발의 목표 및 내용

#### 가. 연구개발의 최종목표

1. 인삼사포닌을 다량함유하고 있지만 현재 대부분 폐기처분되고 있는 인삼잎 및 꽃봉오리를 이용한 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성 검증
2. 증숙방법의 개발 : 효능이 증강된 가공 인삼잎 및 꽃봉오리 개발
3. 효능이 증강된 다른 한약재가 포함된 고기능성 복합제의 개발 ;  
더덕, 도라지 등과 같은 사포닌이 다량 함유된 식물을 중심으로
4. 건강기능식품 및 파마톤사의 파마톤 또는 진사나와 같은 의약품형태의 고부가가치 인삼제품의 개발 : 인체에 치명적인고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제용
5. 시대적 흐름에 따른 소비자의 성향 변화와 소비자가 요구하는 새로운 형태의 제형 개발 ;  
정제, 캡슐제 제제 등
6. 인체에 치명적인고병원성 조류인플루엔자바이러스 억제효능에 기초한 세계일류 제품을 개발하여 홍보 및 판촉의 강화로 국외 시장에 고려인삼의 우수성을 널리 알림
7. 인삼지상부의 다양한 생리활성 검증

#### 나. 연구개발의 내용

본 연구조직은 기반연구팀, 활성검증팀, 생산팀 등의 세 분야 연구팀으로 구성되어 있으며 기반연구팀과 활성검증팀은 대학에서, 생산은 참여기업으로 현재 다양한 인삼제품을 개발하여 국내 및 해외에 수출하고 있는 기업인 금산인삼농협 및 (주)석산터메디칼에서 제품을 개발하고 있음.

#### (1) 기반연구팀

- 인삼잎 및 꽃봉오리 성분연구
- 증숙방법 개발 : 인삼잎 및 꽃봉오리의 증숙 방법에 따른 인삼사포닌의 성분변화와 활성관계로부터 최적의 활성을 나타내는 증숙 조건을 확립함.
- 활성 유효성분의 분리 : 실리카겔, C-18 등의 충전제를 이용한 활성을 나타내는 유효물질의 분리
- 분리된 유효물질의 IR, Mass, NMR 등과 같은 spectroscopy를 이용한 구조결정
- 증숙하지 않은 또는 증숙한 인삼잎 및 꽃봉오리에 사포닌이 다량 함유된 도라지 더덕 등과 같은 다른 한약재가 가미되어 효능이 증강된 고기능성 복합제의 개발

## (2) 활성검증팀

- 증숙 또는 증숙하지 않은 인삼잎 및 꽃봉오리 추출물의 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성 및 면역활성 측정.
- 인삼지상부 사포닌의 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성 검증
- 증숙 또는 증숙하지 않은 인삼잎 및 꽃봉오리로부터 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성을 나타내는 물질분리 및 작용기전 연구(면역활성 또는 바이러스에 직접적인 영향을 주는가?).
- 사포닌이 다량 함유된 다른 한약재를 포함한 고기능성 복합제의 인체에 치명적인 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제활성 측정.
- 항산화, 면역활성, 발모촉진, 심근세포 수축력 감소활성과 같은 다양한 생리활성 측정

## (3) 생산팀

- 최근 시대적 흐름에 따른 국내 소비자의 성향 변화와 소비자가 요구하는 새로운 형태의 제형 개발 : 정제, 캡슐제
- 샴푸의 개발

다. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	2008	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼잎, 꽃봉오리의 대량 채집, 구입 및 추출</li> <li>■ 인삼잎 및 꽃봉오리 추출물의 성분분석</li> <li>■ 증숙방법 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼잎, 꽃봉오리에 존재하는 인삼사포닌의 성분을 분석</li> <li>■ 최적의 증숙조건 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 여러 가지 성분중 인삼사포닌 위주로 성분을 분석함</li> <li>■ 증숙온도, 시간 등</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 고병원성 조류인플루엔자바이러스 (AIV)인 H5N1 억제 활성물질의 분리정제 및 구조결정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼잎 및 꽃봉오리로부터 AIV인 H5N1 바이러스 억제 활성물질의 분리정제 및 구조결정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼잎 및 꽃봉오리의 용매추출</li> <li>■ 각종 크로마토그래피를 이용한 활성물질의 분리정제</li> <li>■ NMR, MS 등의 spectrum을 이용한 화합물의 구조동정</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ (In vivo) 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스에 대한 면역력을 갖는 후보물질 탐구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ (In vivo) 시료 후보의 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스에 대한 면역항진 효과 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스 감염된 마우스에 대한 치사율에 관한 연구</li> <li>■ 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스에 감염된 마우스에 대한 바이러스 증식 억제에 관한 연구</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼잎 및 꽃봉오리 추출물의 면역활성 작용 측정</li> <li>■ 작용기전</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ FACS analysis에 의해 immunophenotype 평가</li> <li>■ Th1, Th2의 cytokine 및 대식세포 활성화 측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ CD3, CD4, CD8, CD18, NK 세포</li> <li>■ 작용 기전연구</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제형개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 맞춤형 제형개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 정제, 캡슐제 등 고부가가치 의약품형태의 제형으로 개발</li> </ul>

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차년도	2009	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 증숙한 인삼잎 및 꽃봉오리 추출물의 성분 분석</li> <li>■ 활성검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 증숙한 인삼잎, 꽃봉오리 추출물에 존재하는 인삼사포닌의 성분을 분석</li> <li>■ 다양한 생리활성 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 여러 가지 성분중 인삼사포닌 위주로 성분을 분석함</li> <li>■ 항산화활성, 발모촉진 활성 검증</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 고병원성 조류인플루엔자바이러스 (AIV)인 H5N1 억제 활성물질의 분리정제 및 구조결정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼잎 및 꽃봉오리와 증숙한 시료로부터 가장 높은 억제 활성물질을 갖는 화합물의 물리화학적 성질과 NMR MS 등을 이용한 화합물의 구조동정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Silica gel CC와 각종크로마토그래피 및 HPLC 등을 이용한 화합물의 분리정제</li> <li>■ <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR 등을 이용한 화합물의 구조동정</li> <li>■ COSY, HMQC, HMBC 등을 이용한 화합물의 구조동정</li> <li>■ LRMS HR MS등을 이용한 화합물의 분자량 동정</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ (In vivo, in vitro) 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스에 대한 면역력을 갖는 후보물질 탐구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ (In vivo) 시료 후보의 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스에 대한 면역항진 효과 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스 감염된 마우스에 대한 치사율에 관한연구</li> <li>■ 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스에 감염된 마우스에 대한 바이러스 증식 억압에 관한연구</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 증숙한 인삼잎 및 꽃봉오리 추출물의 면역활성 작용</li> <li>■ 작용기전</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ FACS analysis에 의해 immunophenotype 평가</li> <li>■ Th1, Th2의 및 대식세포 활성화 측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ CD3, CD4, CD8, CD18, NK 세포</li> <li>■ 작용 기전연구</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제품개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 소비자 기호 및 욕구를 충족시킬 수 있는 맞춤형 제형개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 정제, 캡슐제 등 고부가가치 의약품형태의 제형으로 개발</li> </ul>

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차년도	2010	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 효능이 증강된 복합제의 개발</li> <li>■ 최적의 배합비율확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 사포닌을 다량 함유 식물을 대상으로 효능이 증강된 복합제를 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 사포닌을 다량 함유하고 있는 더덕, 도라지 등과 같은 단일식물을 중심으로 복합제를 개발함.</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(AIV)인 H5N1 억제 활성물질의 대량 분리정제 및 산업화 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 인삼잎 및 꽃봉오리로부터 활성물질의 대량분리정제</li> <li>■ 증숙한 동일시료로부터 억제 활성물질의 대량분리정제</li> <li>■ 활성물질의 산업화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 대량분리정제를 위한 시료 확보</li> <li>■ 대량분리정제를 위한 최적분리방법설정</li> <li>■ 대량분리방법의 최적화 및</li> <li>■ 제품개발을 위한 산업화 연구</li> <li>■ 파이롯트 규모의 분리정제</li> <li>■ 공장스케일의 분리정제</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ (In vivo) 인체에 치명적인 Wild type H5N1 AI 바이러스에 대한 면역항진 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 후보 시료의 인체에 치명적인 wild type H5N1 AI 바이러스가 감염된 마우스에 대한 면역증강에 관한 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 후보 시료의 인체에 치명적인 wild type H5N1 AI 바이러스가 감염된 마우스에 대한 치사율에 관한 연구</li> <li>■ 후보 시료의 인체에 치명적인 wild type H5N1 AI 바이러스가 감염된 마우스에 대한 바이러스 증식 억압에 관한 연구</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 분리한 단일물질의 면역활성 작용</li> <li>■ 복합제의 면역활성</li> <li>■ 작용기전</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ FACS analysis에 의해 immunophenotype 평가</li> <li>■ Th1, Th2의 cytokine 다당체의 분리 및 대식세포 활성화 측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ CD3, CD4, CD8, CD18, NK 세포</li> <li>■ 작용 기전연구</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 제품개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 다양한 제형개발</li> <li>■ 화장품개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 정제, 캡슐제 개발</li> <li>■ 샴푸 화장품 개발</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

\* 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

### 제 1 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

#### 1. 국내·외 인삼관련 연구동향

- 35억 달러 세계 인삼시장을 잡기 위하여 국내 바이오 벤처기업들이 연간 35억 달러에 달하는 세계 인삼 관련 신 물질 개발에 열을 올리고 있다.
- 현재까지 인삼을 기능성식품으로 표준화 해 세계 시장에서 성과를 올리고 있는 기업은 스위스 베링거인겔하임 산하의 “파머톤사” 뿐이며 국내에서도 인삼에 대한 국가차원의 연구와 벤처업계의 상품화가 속속 진행되고 있다.
- 또한 중국의 경우 백삼에는 거의 존재하지 않으며 홍삼에 소량 존재하는 인삼 사포닌인 Rg3를 대량 생산하는 방법을 개발하여 ‘Shenyi’ 라는 상품명으로 항암치료 보조제로 사용하고 있다.
- 국내의 경우 기능성 인삼의 대표 제품은 지난 98년 바이오벤처기업 진생사이언스가 개발한 ‘선삼’으로써 지난 2001년 선삼정도로 개발돼 국내 건강기능성식품 시장에 본격 알려진 이후 국내는 물론 전 세계적인 발명품으로도 인정받으며 기능성 인삼의 선두주자로 자리매김한 상태이다<sup>13)</sup>.
- 이밖에도 다음과 같은 여러 종류의 가공인삼이 개발되고 있다.
  - 한국생명공학연구원과 바이오벤처기업 비티진이 공동 개발한 ‘황삼EX’
  - (주)남일농장 인삼영농조합이 바이오벤처기업인 (주)그린바이오와 손잡고 제품화한 ‘평화홍삼’
  - 남양알로에서 분사한 (주)유니젠은 최근 미국 UPI사와 공동으로 개발 한 ‘바이오맥스’
  - 코인텍은 인삼에서 인체 면역력을 강화시키는 물질을 다량으로 추출하는데 성공했다.
  - (주)CJ의 ‘식스플러스’
  - (주)일동제약의 ‘황삼’
- 표 2에서와 같이 조류독감 치료관련 분야의 주요 출원인은 미국특허에서는 St Jude Children’s Hospital(3건), Virogenetics Corp.(3건)이며, 한국특허의 경우 농림부 국립수의과학검역원(3건)과 (주)엘지전자, 일본의 경우는 Pizer Prod Inc(2건), Virogenetics Corp.(2건), 그리고 국제특허에서는 CAPUA, Ilaria(2건), MEDIMMUNE VACCINES, INC(2건)임.
- Virogenetics Corp의 경우 미국에 3건 한국, 일본에 각각 2건씩 출원하여, 가장 골고루 출원한 것으로 나타남.
- 전반적으로 미국의 기업들이 각국 TOP 5의 상위에 위치한 것으로 나타났으며, 이는 미국



의 기업들이 전 세계적으로 조류독감 치료 분야의 특허활동이 활발한 것으로 보아 기술수준이 가장 높은 것으로 판단됨.

- 그러나 인삼과 관련해서는 전 세계적으로 특허에 대한 정보가 전무한 실정임. 따라서 본 연구팀이 새로운 가공인삼인 흑삼 조사포닌 분획물이 인삼이 인체에 양향을 주는 H5N1과 같은 고병원성 조류인플루엔자바이러스를 억제한다는 사실을 밝힌 것은 큰 의미가 있다고 판단됨.

표 2. 전 세계 국가별 주요 출원인 Top5

순위	미국		한국		일본		국제	
	특허권자	건수	출원인	건수	출원인	건수	출원인	건수
1	St. Jude Children's Research Hospital(미국)	3	농림부 국립수의과학 검역원 (한국)	3	PFIZER PROD INC(미국)	2	CAPUA, Ilaria(이태리)	2
2	Virogenetics Corporation (미국)	3	㈜엘지전자 (한국)	3	VIROGENETICS CORP(미국)	2	MEDIMMUNE VACCINES, INC(미국).	2
3	Regents of the University of Minnesota(미국)	2	비로제네틱스 (미국)	2	IMUNOBANK KUSU JAPAN(일본)	1	CHIRON CORPORATION (미국)	1
4	Willmar Poultry Company Inc.(미국)	2	정영도 (한국)	2	KANAZAWA UNIV TLO INC(일본)	1	EN-BIO TECHNOLOGY CO., LTD.(한국)	1
5	Akzo Nobel, N.V.(네덜란드)	1	(주)네추럴FN P (한국)	1	국립농생명과학연구원 (일본)	1	G.S.K BIOLOGICALS S.A.(미국)	1

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구진은 제1세부과제: 인삼지상부의 증숙방법개발, 성분분석, 발암성물질검사, 제2세부과제:물질분리정제 및 구조동정,제3세부과제: 고병원성 AI 바이러스 H5N1바이러스 억제활성검증, 제1협동과제: 면역활성 검증, 제2협동과제: 제품개발과 같이 총 5과제로 구성되어 있다.

제1세부과제에서는 인삼지상부의 증숙방법을 개발하여 새로이 생성되는 물질들을 분석하였으며, 증숙과정중에 발생될 수 있는 벤조피란과 같은 발암성 물질 분석방법개발, 항산화활성, 발모촉진활성 및 심근수축력 억제활성과 같은 연구를 수행하였다. 제2세부과제에서는 제1세부과제에서 넘겨받은 인삼지상부로부터 여러 가지 물질들을 분리정제 및 구조동정 연구를 수행하였다. 제3세부과제에서는 제1세부과제에서 넘겨받은 인삼지상부 추출물을 고병원성 AI 바이러스 H5N1 억제활성을 검증한 결과 40%의 생명연장활성이 있다는 것을 발견하였다. 고병원성 AI 바이러스 H5N1에 전염되면 치사율이 60-70%임을 감안할 때 우수한 항바이러스 활성이 있다고 판단된다. 제1협동과제에서는 인삼지상부의 면역활성증강 효과를 FACS 유세포분석, 여러 가지 cytokine 검사, 조직 미네랄검사, 과민성면역반응 지연활성등을 측정하여 검증한 결과 면역활성 효능이 있다고 판단하였다.

제2협동과제에서는 CNU biotech이 참여하여 인삼지상부를 소재로하여 정제, 캡슐제와 같은 제형연구를 수행하였다. 각 세부과제의 구체적인 실험방법 및 결과는 다음과 같다.

### 제 1 절. 인삼지상부의 성분분석, 증숙법 및 복합제의 개발

#### 1. 인삼지상부(잎, 꽃봉오리)의 채집 및 전처리

##### 가. 인삼잎의 전처리

인삼의 본고장인 충남 금산 일대에서 인삼수확기인 10-11월 사이에 채집한 신선한 인삼잎을 흐르는 물에서 3회 세척하고 초음파 세척기에서 10분간 2회 세척하였다. 통풍이 잘되는 곳에서 직사광선을 피하여 하루 건조시킨 후 건조기(50℃)에서 완전히 건조시켰다. 완전 건조시킨 인삼잎을 분쇄기를 이용하여 균일하게 잘게 부수어 증숙 및 성분분석의 원료로 사용하였다. 또한 제2, 3세부과제, 제1, 2협동과제에 넘겨 인삼잎에 존재하는 성분분리 및 구조결정, 바이러스 억제활성, 면역활성 및 제형연구를 위한 연구를 수행하였다.

##### 나. 인삼꽃봉오리의 전처리

인삼의 본고장인 충남 금산 일대에서 인삼뿌리의 발육을 증대시키기 위해서 제거하는 시기인 5-6월 사이에 채집한 신선한 꽃봉오리를 흐르는 물에서 3회 세척하고 초음파 세척기에서 10분간 2회 세척하였다. 통풍이 잘되는 곳에서 직사광선을 피하여 하루 건조시킨 후 건조기(50℃)에서 완전히 건조시켰다. 완전 건조시킨 인삼꽃봉오리를 분쇄기를 이용하여 균일하게 잘게 부수어 증숙 및 성분분석의 원료로 사용하였다. 또한 제2, 3세부과제, 제1, 2협동과제에 넘겨

인삼잎에 존재하는 성분분리 및 구조결정, 바이러스 억제활성, 면역활성 및 제형연구를 위한 연구를 수행하였다.

## 2. 인삼지상부의 증숙

### 가. 열에 의한 증숙

인삼지상부의 증숙은 본 연구자가 개발한 신공법에 의한 흑삼의 제조방법<sup>14)</sup>을 바탕으로 하여 최근에 문제시 되고 있는 발암성 물질인 벤조피란의 함량이 식약청 허용기준 이내에 도달하는 방법을 개발하고자 하였다. 또한 선행연구 결과에서 인삼추출물보다는 조사포닌 분획이 바이러스 억제활성이 우수하여 사포닌의 성분변화를 중점적으로 관찰하였다.

즉, 전처리 한 인삼지상부를 증숙기에 넣고 100-130℃ 사이의 온도에서 10분-180분까지 증숙하여 색깔, 향, 사포닌 성분, 벤조피란 함량 검사등을 통하여 최적의 증숙조건을 확립하였다. 실험결과 증숙온도는 120℃가 가장 적당하다고 판단되었으며, 시간별로 증숙한 인삼잎의 결과로써 증숙시간에 따라서 녹색에서 갈색을 거쳐서 점점 흑색으로 변하였다.

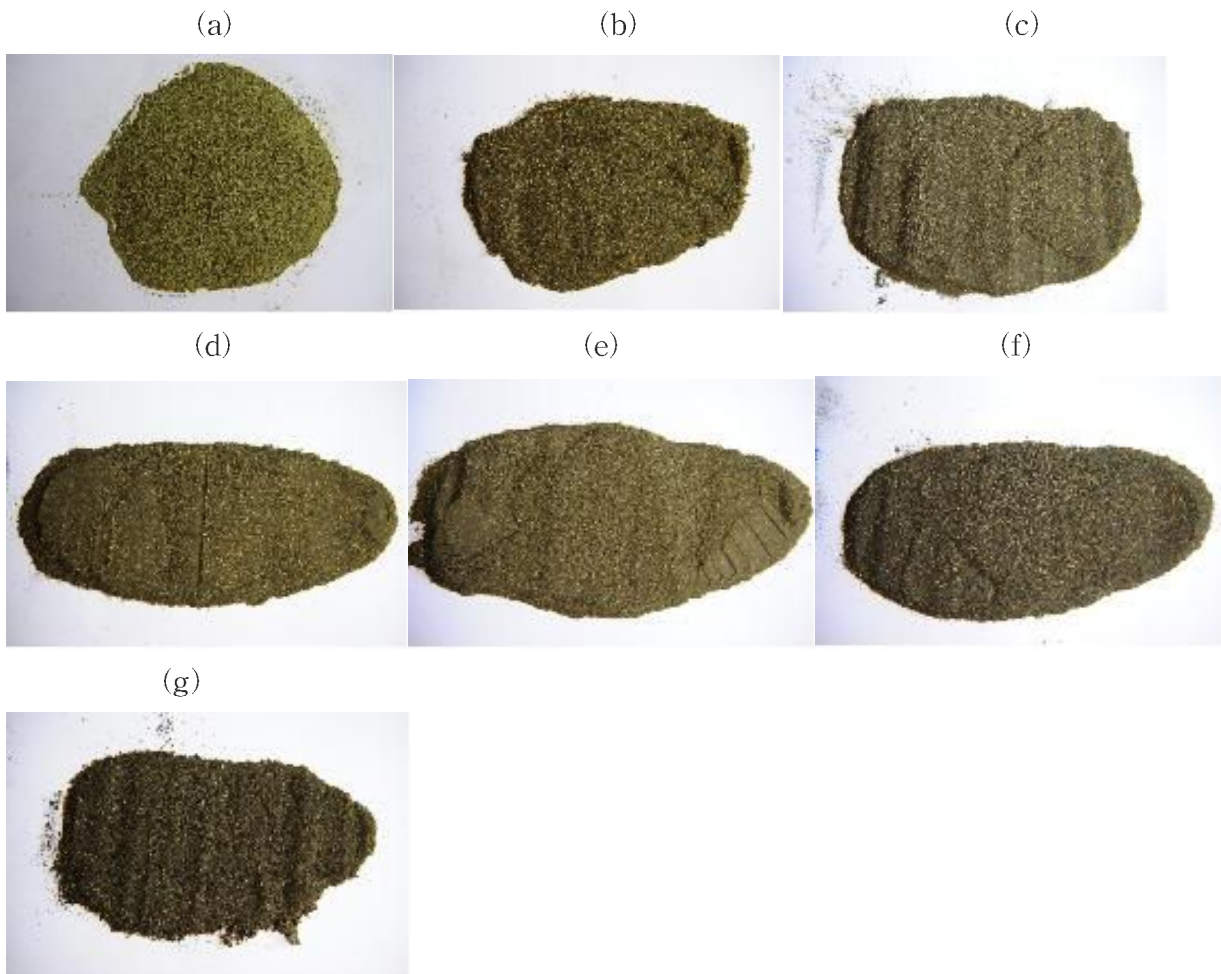


그림 2. 증숙시간에 따른 인삼잎

- a) 0분 증숙; b)30분 증숙; c) 60분 증숙; d) 90분 증숙; e) 120분 증숙; f) 150분 증숙;  
g) 180분 증숙

아래의 사진은 120℃에서 시간별로 증숙한 인삼꽃봉오리의 결과로써 인삼잎과 마찬가지로 증숙시간에 따라서 녹색에서 갈색을 거쳐서 점점 흑색으로 변화하였다.

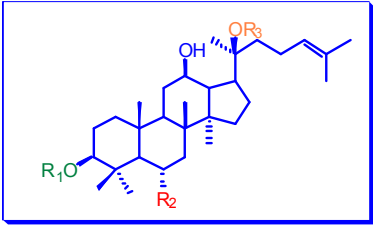


그림 3. 증숙시간에 따른 인삼꽃봉오리

a) 0분 증숙; b) 30분 증숙; c) 60분 증숙; d) 90분 증숙; e) 120분 증숙; f) 150분 증숙;  
g) 180분 증숙

(1) 인삼지상부의 성분변화

인삼사포닌의 구조



Ginsenosides	R1	R2	R3	PD or PT
Rb1	-Glc2-Glc	-H	-Glc6-Glc	PD
Rb2	-Glc2-Glc	-H	-Glc6-Ara(pyr)	PD
Rc	-Glc2-Glc	-H	-Glc6-Ara(fur)	PD
Rd	-Glc2-Glc	-H	-Glc	PD
Rg3	-Glc2-Glc	-H	-H	PD
Re	-H	-O-Glc2-Rha	-Glc	PT
Rf	-H	-O-Glc2-Glc	-H	PT
Rg1	-H	-O-Glc	-Glc	PT
Rg2	-H	-O-Glc2-Rha	-H	PT



그림 4. 인삼사포닌의 구조

(가) 증숙시간에 따른 인삼잎 및 인삼꽃봉오리의 TLC 변화

증숙시간에 따른 인삼지상부의 성분변화를 관찰하고자 1차적으로 TLC를 수행한 결과 그림 5에서와 같이 증숙시간에 따라서 일부성분은 감소되며 일부성분은 증가됨을 관찰할 수 있었다.

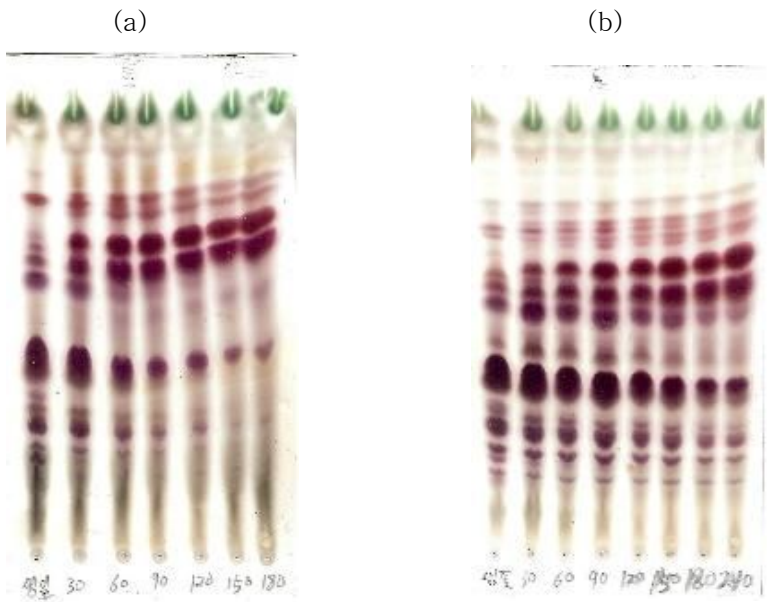


그림 5. 증숙시간에 따른 인삼지상부의 TLC 형태  
 a) 인삼잎; b) 인삼꽃봉오리  
 TLC 조건; CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:35:10

그림 5에서와 같이 증숙하지 않는 인삼지상부와 증숙한 인삼지상부의 성분이 확연하게 변화됨에 따라서 구체적으로 어느 성분의 변화가 가장 많이 변화는지를 관찰하고자 표준물질과 비교분석하였다(그림 6).

(a) (b)(c)(d)(e)(f)(g) (h)



그림 6. 증숙조건에 따른 인삼지상부의 성분변화

- a) Rc & Rd; b) 인삼잎; c) 180분 증숙 인삼잎; d) Rg3; e) Rg5 & Rk1;  
f) 인삼꽃봉오리; g) 240분 증숙 인삼꽃봉오리; h) Rg1

TLC 조건;  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 70:35:10$

그림 6에서와 같이 증숙하지 않은 인삼지상부의 주 사포닌은 Rc, Rd, Rg1 등이었다. 이에 비해서 증숙한 인삼지상부 모두 이러한 주 사포닌의 점점 사라지고 최근에 항암활성 등 여러 가지 활성이 있다고 알려져 있는 Rg3 및 Rg5 & Rk1이 많이 생성됨을 알 수 있었다. 따라서 이러한 사포닌의 함량을 보다 구체적으로 살펴보기 위하여 HPLC를 이용하여 성분분석을 실시하였다.

(나) HPLC를 이용한 증숙시간에 따른 인삼잎 및 인삼꽃봉오리의 성분분석

① 인삼잎

증숙시간에 따른 인삼잎 및 인삼꽃봉오리를 각각 50g을 취하여 80% 메탄올에 넣고 실온에서 하룻밤 방치한 뒤 6시간 환류 추출하여 얻은 용액을 실온까지 냉각시킨 후 용액을 여과하여 감압 농축 시켰다. 동일한 방법으로 총 3회 추출하여 증숙시간에 따른 인삼잎 추출물과 인삼꽃봉오리 추출물을 얻었다. 이렇게 얻은 인삼잎 및 인삼꽃봉오리 추출물을 500ml의 물에 현탁시키고, 500ml의 에테르로 2회 추출하여 비극성 물질을 제거하였다. 여기에서 얻은 물층을 물로 포화된 부탄올을 사용하여 3회 추출하여 이로부터 얻어진 수포화된 부탄올 층을 감압건조하여 인삼잎 추출물 및 인삼꽃봉오리 추출물을 각각 얻었다. 실험결과 표 3에서와 같이 인

삼잎 및 인삼꽃봉오리의 조사포닌 함량은 각각 18.5% 및 17.7%로써 인삼뿌리의 3-5%에 비해서 3배이상 조사포닌 함량이 높았다. 또한 증숙을 하면 증숙하지 않은 조사포닌 함량에 비해서 약간 감소됨을 알 수 있었다. 이렇게 얻은 각각의 인삼잎 및 인삼꽃봉오리 조사포닌 추출물을 사포닌 함량을 확인하기 위한 시료로 사용하였다.

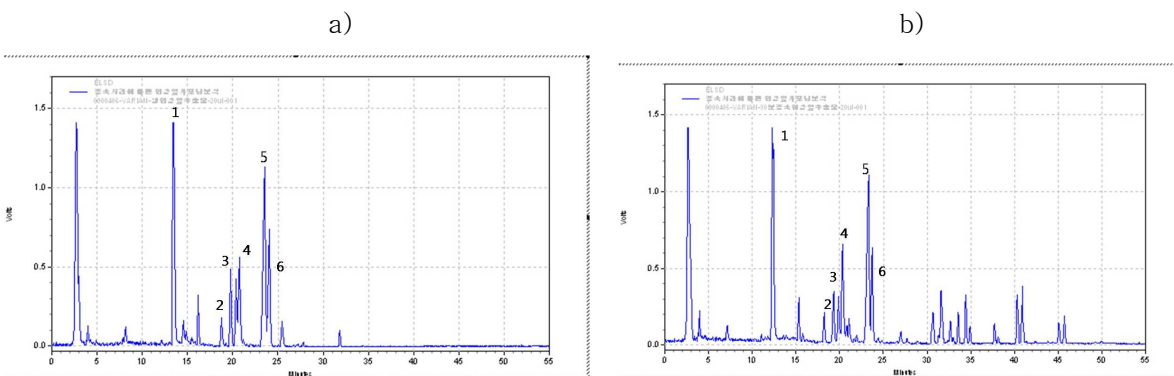
표 3. 조사포닌의 양

	인삼잎	180분증숙 인삼엽	인삼꽃봉오리	180분증숙 인삼꽃봉오리
조사포닌 (g)	9.19	9.02	8.86	7.23
수득율 (%)	18.4	18.0	17.7	14.2

\* 증숙온도 : 120℃

증숙시간에 따른 인삼지상부에 존재하는 인삼사포닌의 성분을 분석하기 위하여 위에서 제조한 추출물 20 mg을 메탄올 1 ml에 녹인 후 0.45 μm 필터로 여과한 여액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

사용한 HPLC 장치는 Shimadzu LC-6AD(Japan) 이었으며, 컬럼은 Shiseido(5 μm, 250×4.6 mm)를 사용하였다. 이동상으로 사용한 A 용매는 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O:5%acetic acid=15:80:5, B 용매는 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=80:20 이었다. 용매는 gradient elution system으로 0분(0%B), 0-10분(30%B), 10-25분(50%B), 25-40(100%B), 40-50분(100%B), 50-53분(0%B), 53-56분(0%B)으로 조절하였다. 전개온도는 40℃이었고 유속은 1ml/min이었으며, 검출기는 ELSD-LT (Shimadzu, Japan) 를 사용하여 사포닌의 성분을 분석하였다.







보아 최적의 증속시간은 150분인 것으로 판단하였다. 이밖에도 7, 8, 9, 10, 12번 및 45-46분대에서 나타나는 피크에 해당되는 사포닌들이 새로이 생성되어 증속과정중에 새로운 사포닌이 최소한 10개 이상 생성됨을 확인할 수 있었으며 기존의 흑삼에 주로 존재하는 사포닌이 다량 존재함을 확인하였다(그림 7, 8, 표 4). 이러한 증속방법에 의해서 제조된 증속인삼엽 추출물을 제3세부과제 넘겨 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 억제활성을 측정한 결과 우수한 항바이러스 효과를 나타내어 그 결과를 특허출원하였다(흑인삼엽 가공 건조분말 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 예방 및 치료용 조성물, 출원일자: 2008.10.4일, 출원번호: 10-2008-0097442).

표 4. 증속한 인삼잎의 Rg3, Rg5 및 Rk1의 함량

	0분	150분
Rg3	-	17-26 mg
Rg5 + Rk1	-	65-76 mg

\* 증속온도 : 120℃

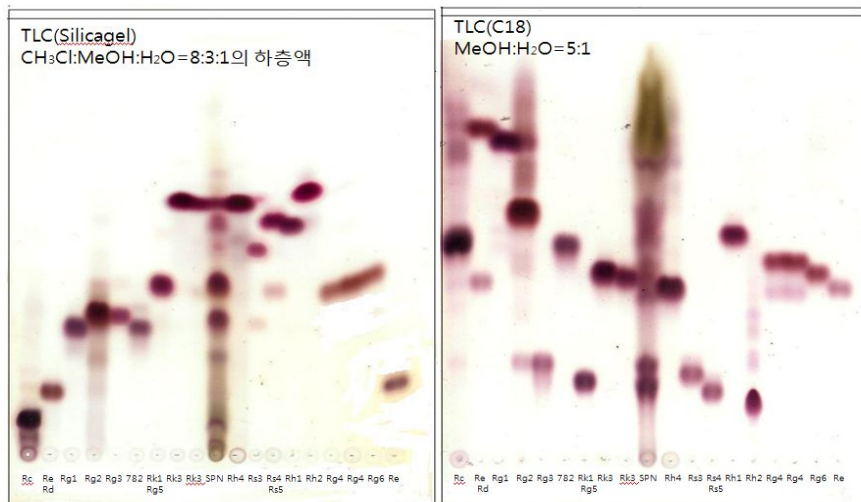


그림 8. 분리한 표준 물질의 TLC

이와같이 인삼사포닌의 구조가 변하는 이유는 아래와 같이 인삼잎에 다량으로 존재하는 Rc, Rg 및 Rd 가 열에 의해서 가수분해되기 때문이다(그림 9, 10).

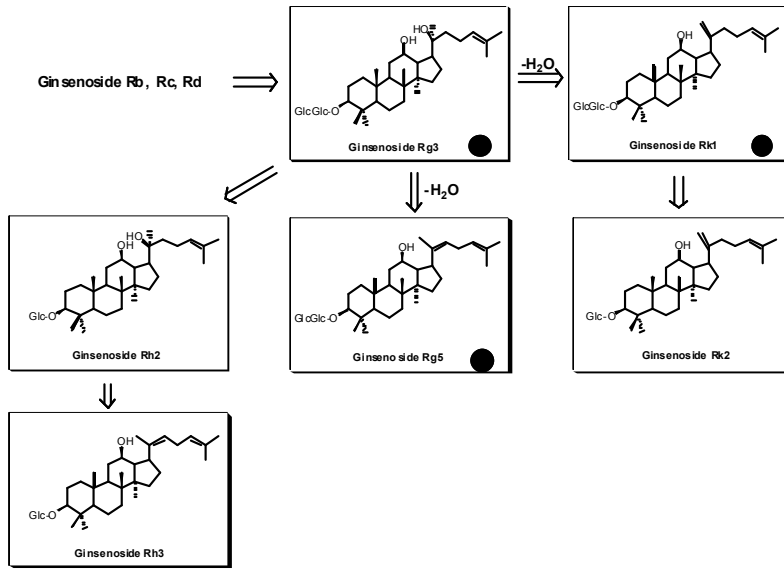


그림 9. PD계 사포닌의 변화

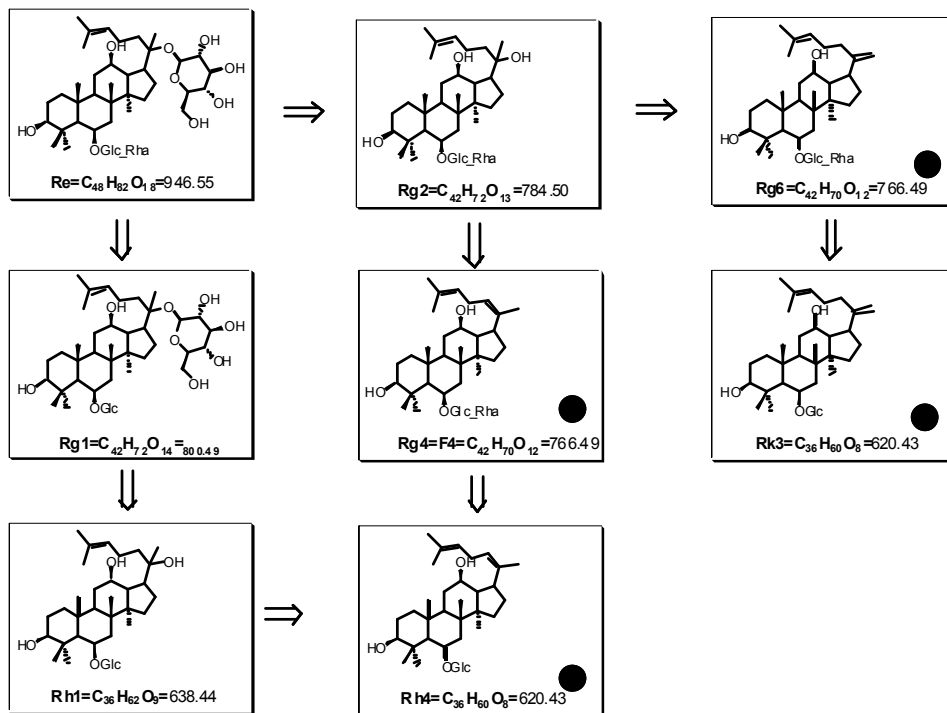
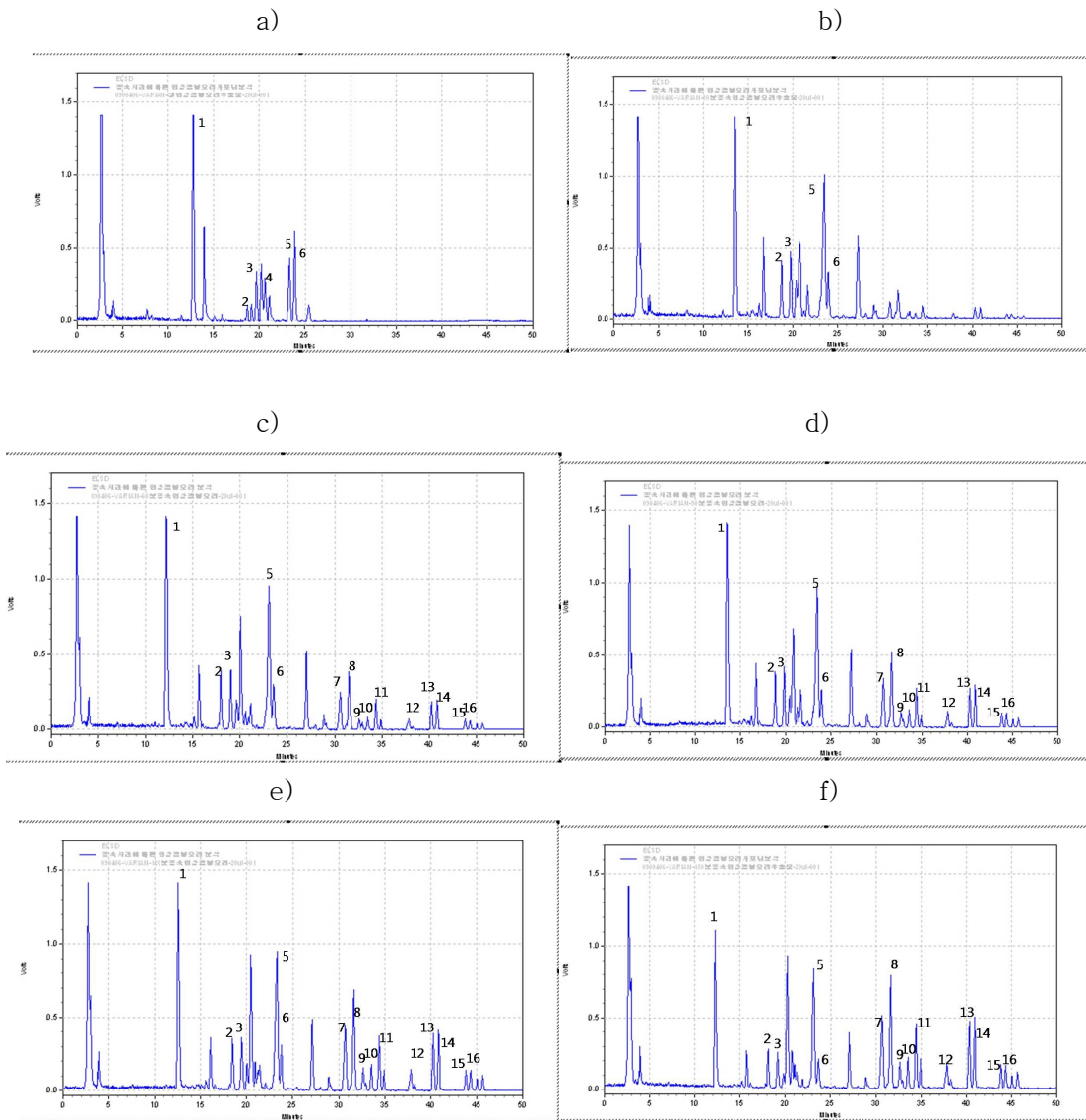


그림 10. PT계 사포닌의 변화

② 인삼 꽃봉오리

인삼꽃봉오리를 120°C에서 시간별로 증숙한 후 그 성분의 변화를 살펴본 결과 증숙인삼잎과 마찬가지로 증숙하지 않은 인삼꽃봉오리의 주 사포닌인 Rg1, Re, Rd 및 Rg2 등이 증숙시간에 비례해서 점점 사라짐을 알 수 있었다. 반대로 증숙시간에 비례해서 최근에 많은 관심을 받고 있는 흑삼에 특이적으로 대량 존재하는 사포닌인 Rg3, Rk1 및 Rg5 가 점점 증가됨을 알 수 있었다.

그러나 인삼잎과는 달리 인삼꽃봉오리의 경우 150분이 아니라 240분까지 증숙을 하여도 Rg1 및 Re 등이 남아있음을 관찰하였다. 240분을 증숙한 인삼꽃봉오리 1g당 Rg3가 12-15mg, Rg5 + Rk1이 49-68mg으로 다량 존재함을 할 수 있었다(그림 11, 표 5). 이러한 이유는 아마도 인삼꽃봉오리 조직이 인삼잎에 비해서 두껍고 튼튼하기 때문일 것으로 판단된다.



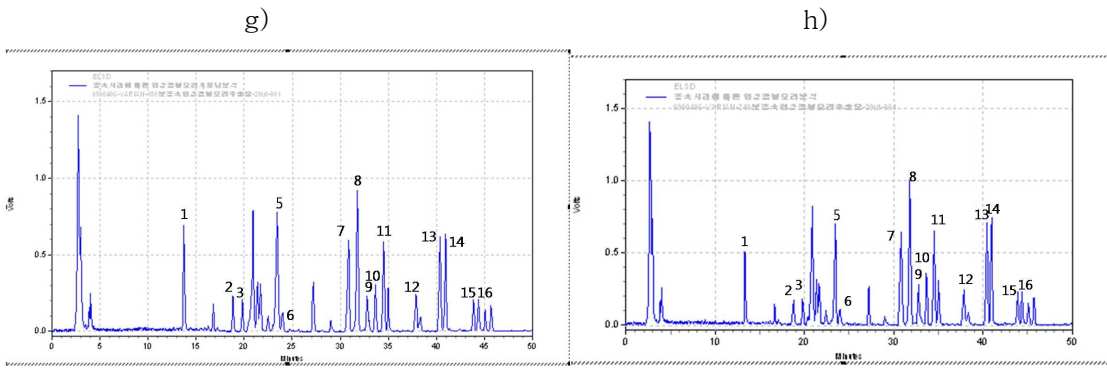


그림 11. 증속시간에 따른 인삼꽃봉오리 HPLC 분석

a) 0분 증속; b)30분 증속; c) 60분 증속; d) 90분 증속; e) 120분 증속; f) 150분 증속;  
g) 180분 증속; h) 240분 증속

1:Rg1 & Re, 2:Rb1, 3:Rc, 4:Rb2, 5:Rd, 6:Rg2, 7:Rg6, 8:Rg4, 9:Rk3, 10:Rh4,  
11:Rg3(S,R), 12:Rs3(S,R), 13:Rk1, 14:Rg5, 15:Rs5, 16:Rs4

표 5. 증속한 인삼꽃봉오리의 Rg3, Rg5 및 Rk1의 함량

	0분	150분
Rg3	-	12-15 mg
Rg5 + Rk1	-	49-68 mg

\* 증속온도 : 120°C

분리한 사포닌의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR(400Mz NMR spectrometer, Jeol, Akishima, Japan), PE-SCIEX LC/MS/MS mass spectrometer(API 2000, Japan), DIP-370 polarimeter(Jasco, Tokyo, Japan), and Nicolet 380 FT-IR spectrometer(Thermo, Madiso, USA) 등을 이용하여 기존의 논문<sup>15-18</sup>에 보고된 데이터 및 표준품과 비교분석하여 사포닌의 구조를 결정하였다.

### (20S)-Ginsenoside Rg<sub>3</sub>

Amorphous solid. C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub> ; [α]<sub>D</sub> : +8.5° (MeOH, c=1.0%, 20°C), MS(*m/z*) 807.6 (M+Na)<sup>+</sup>  
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.68 (1H, br. d, *J* =11.2Hz, H-5), 0.80 (3H, s, Me-19), 0.95 (3H, s, Me-30), 0.96 (3H, s, Me-18), 1.09 (3H, s, Me-29), 1.28 (3H, s, Me-28), 1.40 (1H, m, H-9), 1.42 (3H, s, Me-21), 1.62 (3H, s, Me-27), 1.65 (3H, s, Me-26), 2.01(1H, m, H-13), 2.35 (1H, m, H-17), 3.26 (1H, dd, *J* =4.3, 11.5 Hz, H-3), 3.89(1H, m, H-5'), 3.90 (1H, m, H-12), 3.91(1H, m, H-5"), 4.11 (1H, m, H-2"), 4.11 (1H, t, *J* =7.5 Hz, H-4'); 4.19 (1H, m, H-3'), 4.22 (1H, m, H-2'), 4.28 (1H, m, H-3"), 4.30 (1H, m, H-4"), 4.33 (1H, m, H<sub>b</sub>-6'), 4.43 (dd, *J* =3.7, 11.5Hz, H<sub>b</sub>-6"), 4.47 (dd, *J* =2.9, 11.5 Hz, H<sub>a</sub>-6"), 4.53

(1H, dd,  $J = 2.6, 11.8\text{Hz}$ , H<sub>a</sub>-6'), 4.90 (1H, d,  $J = 7.3\text{ Hz}$ , H-1), 5.31(1H, t,  $J = 7.2\text{Hz}$ , H-24), 5.34 (1H, d,  $J = 7.5\text{ Hz}$ , H-1')

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm)  $\delta$  15.9, 16.4, 16.7, 17.1, 17.8, 18.5, 23.1, 25.9, 26.8, 26.9, 28.2, 31.4, 32.1, 35.2, 35.9, 37.0, 39.2, 39.8, 40.0, 48.6, 50.4, 51.8, 54.9, 56.4, 62.8, 62.9, 71.1, 71.7, 73.1, 77.2, 78.0, 78.2, 78.4, 83.4, 89.0, 105.2, 106.1, 126.4, 130.8

### (20R)-Ginsenoside Rg<sub>3</sub>

Amorphous solid. (C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>, 784.5), MS( $m/z$ ) 807.6 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm)  $\delta$  0.69 (1H, br. d,  $J = 11.2\text{Hz}$ , H-5), 0.82 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, s, H-18), 1.11 (3H, s, H-29), 1.30 (3H, s, H-28), 1.40 (3H, s, H-21), 1.41 (1H, m, H-9), 1.66 (3H, s, H-27), 1.70 (3H, s, H-26), 2.01 (1H, m, H-13), 2.40 (1H, dd,  $J = 6.9, 10.2\text{Hz}$ , H-17), 3.29 (1H, dd,  $J = 4.2, 11.6\text{Hz}$ , H-3), 3.89 (1H, m, H-5), 3.91(1H, m, H-12), 3.93 (1H, m, H-5), 4.12 (1H, t,  $J = 7.5$ , H-2), 4.14 (1H, t,  $J = 7.5\text{Hz}$ , H-4), 4.20 (1H, m, H-3), 4.22 (1H, m, H-2), 4.28 (1H, m, H-3), 4.31(1H, m, H-4); 4.33 (1H, m, H<sub>b</sub>-6), 4.45 (1H, dd,  $J = 4.2, 11.6\text{Hz}$ , H<sub>b</sub>-6), 4.49 (1H, dd,  $J = 3.3, 11.6\text{Hz}$ , H<sub>a</sub>-6), 4.55 (1H, dd,  $J = 2.5, 11.6\text{Hz}$ , H<sub>a</sub>-6), 4.92 (1H, d,  $J = 7.5\text{Hz}$ , H-1), 5.23 (1H, t,  $J = 7.2\text{Hz}$ , H-24), 5.37 (1H, d,  $J = 7.7\text{Hz}$ , H-1)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm)  $\delta$  15.9, 16.4, 16.7, 17.4, 17.8, 18.5, 22.7, 22.8, 25.9, 26.7, 26.8, 28.2, 31.5, 32.2, 35.2, 37.0, 39.2, 39.8, 40.1, 43.3, 49.3, 50.4, 50.7, 51.8, 56.4, 62.7, 62.9, 71.9, 71.7, 73.1, 77.2, 78.0, 78.2, 78.3, 78.4, 83.4, 89.0, 105.2, 106.1, 126.1, 130.9

### Ginsenoside Rk1

Amorphous powder, C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>12</sub>, mp: 178-181°C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: +11.0 ° (MeOH, c= 0.2%, 20°C); IR Vmax (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3400, 2944, 1655, 1457, 1389, 1078.

MS( $m/z$ ) 789 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm)  $\delta$  0.62 (1H, d,  $J = 11.47\text{ Hz}$ , H-5), 0.72 (3H, s, Me-19), 0.91 (3H, s, Me-30), 1.95 (3H, s, Me-18), 1.02 (3H, s, Me-29), 1.31 (3H, s, Me-28), 1.49 (3H, s, Me-27), 1.61(3H, s, Me-26), 2.77 (1H, m, H-17), 3.23 (1H, dd,  $J = 11.76, 4.37\text{ Hz}$ , H-3), 3.89 (3H, H-12, 5',5''), 4.83 (1H, d,  $J = 7.53\text{ Hz}$ , H-1), 4.86 (1H, br. s, H-21), 5.13 (1H, br. s, H-21), 5.23(1H, br.t,  $J = 6.68\text{ Hz}$ , H-24), 5.33 (1H, d,  $J = 7.71\text{ Hz}$ , H-1'').

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm)  $\delta$  15.80, 16.45, 16.58, 16.98, 17.74, 18.45, 25.74, 26.75, 27.08, 28.11, 30.77, 32.60, 32.67, 33.89, 35.36, 39.30, 39.72, 37.03, 40.21, 48.23, 50.86, 51.21, 52.49, 56.43, 62.76, 62.87, 71.65, 71.72, 72.47, 77.08, 77.96, 78.06, 78.19, 78.34, 83.45, 88.95,

105.09, 106.01, 108.15, 125.33, 131.21, 155.55

61.36, 62.96, 71.71, 72.51, 75.34, 77.98, 78.52, 79.50, 79.97, 105.87, 123.42, 123.78, 131.18, 140.01

### Ginsenoside Rg<sub>5</sub>

Amorphous solid. (C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>, 766.49); m.p; 188–192.C, [α]<sub>D</sub>: +4.70 (c, 1.2, MeOH),

IR Vmax (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3460, 3124, 2985, 1646 cm<sup>-1</sup>; MS(*m/z*) 789 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.81 (3H, s, H-29), 0.95 (3H, s, H-30), 1.01 (3H, s, H-19), 1.09 (3H, s, H-18), 1.27 (3H, s, H-28), 1.58 (3H, s, H-27), 1.62 (3H, s, H-26), 1.81 (3H, s, H-21), 2.77 (2H, dd, *J* =7.0, 6.9 Hz, H-23), 3.26 (1H, dd, *J* = 4.0, 11.6 Hz, H-3), 3.90 (1H, br. s, H-12), 4.10 (1H, dd-like, H-2.), 4.21 (1H, dd-like, H-2.), 4.90 (1H, d, *J* =7.4 Hz, H-1.), 5.21 (1H, t, *J* =6.9 Hz, H-24), 5.33(1H, t, *J* =7.6 Hz, H-1), 5.49 (1H, t, *J* =7.0 Hz, H-22)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 13.07, 15.72, 16.35, 16.49, 16.92, 17.66, 18.33, 25.60, 26.64, 27.35, 28.00, 28.73, 32.10, 35.24, 32.54, 39.60, 36.91, 39.17, 40.14, 50.33, 50.66, 50.80, 50.91, 56.29, 62.58, 62.73, 71.50, 71.53, 72.49, 77.00, 77.82, 77.98, 78.13, 78.21, 83.31, 88.182, 105.00, 105.91, 123.21, 123.54, 131.16, 140.06

### Ginsenoside Rs<sub>4</sub>

Amorphous powder, C<sub>44</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>, mp: 161– 162 °C, [α]<sub>D</sub>: +2.54° (MeOH, c = 0.2%, 20); IR Vmax (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3400, 2950, 1740, 1450

MS(*m/z*) 831 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.85 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-30), 1.05 (3H, s, H-19), 1.13 (3H, s, H-18), 1.34 (3H, s, H-28), 1.59 (3H, s, H-27), 1.63 (3H, s, H-26), 1.82 (3H, s, H-21), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 3.28 (1H, dd, *J* = 4.3, 11.6 Hz, H-3), 3.92 (1H, m, H-12), 4.89 (1H, d, *J* =7.3 Hz, H-1'), 5.23 (1H, t, *J* =6.9 Hz, H-24), 5.31 (1H, d, *J* =7.7 Hz, H-1"), 5.51 (1H, t, *J* =7.0 Hz, H-22)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 13.07, 15.92, 16.35, 16.49, 17.66, 16.92, 18.33, 25.60, 26.64, 27.35, 28.00, 28.73, 32.10, 32.54, 35.24, 39.60, 36.91, 39.17, 40.14, 50.33, 50.66, 50.80, 50.91, 56.29, 62.58, 62.73, 71.50, 71.53, 72.49, 77.00, 77.82, 77.98, 78.13, 78.21, 83.31, 88.82, 105.00, 105.91, 123.21, 123.54, 131.16, 140.06

### Ginsenoside Rk<sub>3</sub>

Amorphous powder, C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>8</sub>, mp : 145 –147°C, [α]<sub>D</sub> : +19.6° (MeOH, c= 0.4%, 20°C), IR Vmax (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3390, 2928, 1652, 1455, 1023.

MS(*m/z*) 643 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) : δ 0.93 (3H, s, Me-30), 1.05 (3H, s, Me-19), 1.30 (3H, s, Me-18), 1.60 (3H, s, Me-29), 1.67 (3H, s, Me-27), 1.74 (3H, s, Me-26), 2.05 (3H, s, Me-28), 2.53 (1H, dd, *J*= 12.76, 3.27 Hz, H-7a), 2.77 (1H, m, H-17), 3.56 (1H, dd, *J*=11.5, 4.5 Hz, H-3), 3.98 (1H, m, H-12) 4.97 (1H, br. s, H-21a), 5.01 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-1'), 5.23 (1H, br. s, H-21b), 5.34 (1H, t, *J*=6.8 Hz, H-24).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 16.34, 16.73, 17.33, 17.33, 17.73, 25.74, 27.02, 27.92, 30.71, 31.70, 32.50, 32.73, 33.70, 39.50, 39.71, 40.37, 41.26, 45.31, 48.27, 50.64, 51.13, 52.07, 61.44, 63.06, 71.82, 72.42, 75.45, 78.12, 78.56, 79.65, 80.05, 106.00, 108.11, 125.33, 131.18, 155.42

#### Ginsenoside Rh4

Amorphous powder, C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>8</sub>, mp : 155-157°C, [α]<sub>D</sub> : +26.9° (MeOH, c=0.5%, 20°C), IR Vmax (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3390, 2928, 1650, 1385, 1022.

MS(*m/z*) 643 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.80 (3H, s, Me-30), 1.02 (3H, s, Me-19), 1.21 (3H, s, Me-18), 1.56 (3H, s, Me-29), 1.60 (3H, s, Me-27), 1.61 (3H, s, Me-26), 1.80 (3H, s, Me-21), 2.05 (3H, s, Me-28), 2.50 (1H, dd, *J*=12.64, 2.83 Hz, H-7), 2.75 (3H, H-23, 17), 3.51 (1H, dd, *J*=11.53, 4.6 Hz, H-3), 5.00 (1H, d, *J* =7.78 Hz, H-1'), 5.20 (1H, br.t, H-24), 5.45 (1H, br.t, H-22).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 13.07, 16.27, 16.73, 17.31, 17.67, 17.67, 25.64, 27.38, 27.80, 28.74, 31.63, 32.18, 32.47, 39.44, 39.66, 40.27, 41.25, 45.22, 50.32, 50.50, 50.59, 50.77, 61.36, 62.96, 71.71, 72.51, 75.34, 77.98, 78.52, 79.50, 79.97, 105.87, 123.42, 123.78, 131.18, 140.01

#### 나. 산에 의한 증숙

##### (1) 인삼지상부의 증숙(산처리)

열에 의한 흑삼을 제조하는 방법을 인삼지상부(잎, 꽃봉오리)에 적용하여 제조한 증숙인삼잎 및 꽃봉오리가 우수한 바이러스억제활성을 나타냄을 관찰하였으며, 이와같은 열 이외의 다른 증숙방법 즉, 산처리를 한 증숙방법을 개발하고자 하였다. 위에서 언급한 건조한 인삼꽃봉오리 (또는 잎) 50g을 분쇄한 후 1리터의 50%에탄올과 10% 염산 200ml의 혼합액에 넣고 환류하면서 24시간 동안 반응을 진행하였다.

산처리시간에 따른 인삼지상부의 성분변화를 관찰하고자 1차적으로 TLC를 수행한 결과 그림 12에서와 같이 증숙시간에 따라서 일부성분은 감소되며 일부성분은 증가됨을 관찰할 수 있었다. 즉, 인삼잎 및 꽃봉오리의 주성분인 진세노사이드 Rg1, Re, Rc 등이 다른 사포닌으로 전환되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 열처리를 한 증숙인삼잎 및 증숙인삼꽃봉오리와 마찬가지로 열이나 산에 의해서 당부분이 가수분해되기 때문이다.

(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g)

(h) (i) (j) (k) (l) (m) (n)

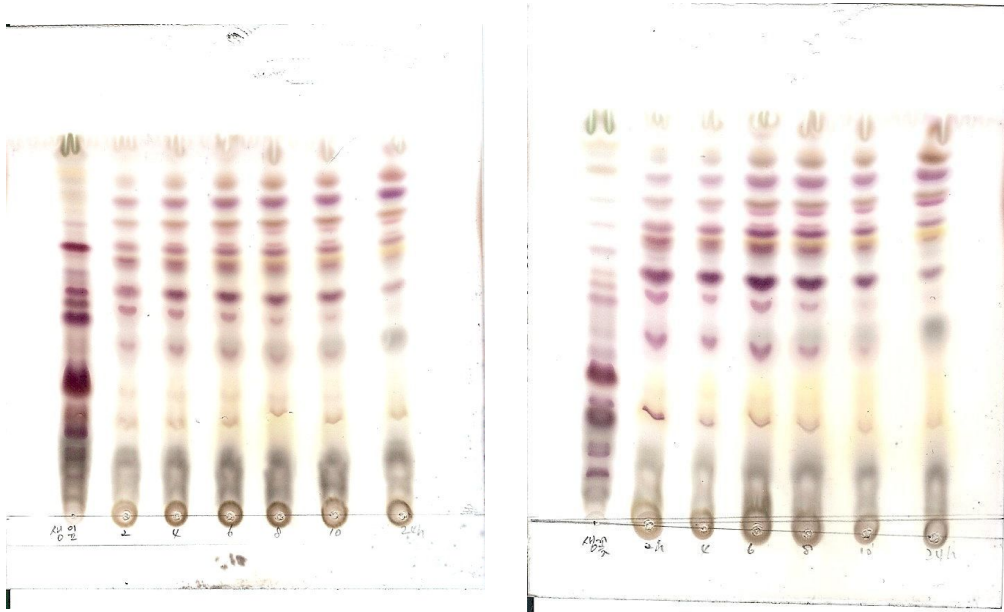


그림 12. 산처리 시간에 따른 인삼지상부의 TLC 형태

a) 인삼잎; b) 인삼잎(산처리 2시간); c) 인삼잎(산처리 4시간); d) 인삼잎(산처리 6시간);  
e) 인삼잎(산처리 8시간); f) 인삼잎(산처리 10시간); g) 인삼잎(산처리 24시간); h)  
인삼꽃봉오리; i) 인삼꽃봉오리(산처리 2시간); j) 인삼꽃봉오리(산처리 4시간); k)  
인삼꽃봉오리(산처리 6시간); l) 인삼꽃봉오리(산처리 8시간); m) 인삼꽃봉오리(산처리  
10시간); n) 인삼꽃봉오리(산처리 24시간)

TLC 조건;  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 65:35:10$

그림 12에서와 같이 산처리하지 않는 인삼지상부와 증숙한 인삼지상부의 성분이 확연하게 변화됨에 따라서 구체적으로 어느 성분의 변화가 가장 많이 변화는지를 관찰하고자 표준물질과 비교분석하였다.



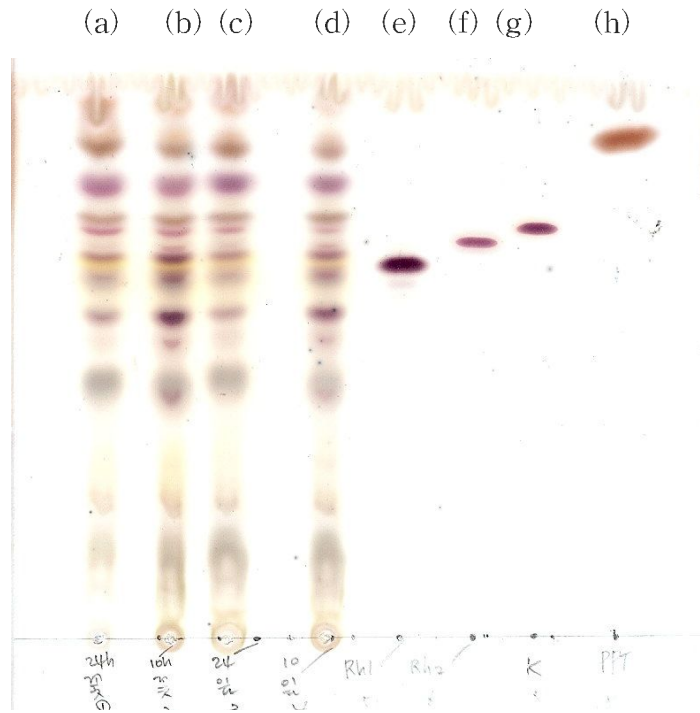


그림 13. 산처리 시간에 따른 인삼지상부의 성분변화

a) 인삼꽃봉오리(산처리 24시간); b) 인삼꽃봉오리(산처리 10시간); c) 인삼잎(산처리 24시간); d) 인삼잎(산처리 10시간); e) Rh1; f) Rh2; g) compound K; h) PPT  
TLC 조건;  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 70:35:10$

그림 13에서와 같이 증숙하지 않은 인삼지상부의 주 사포닌은 Rc, Rd, Rg1 등이었다. 이에 비해서 증숙한 인삼지상부 모두 이러한 주 사포닌의 점점 사라지고 최근에 항암활성 등 여러 가지 활성이 있다고 알려져 있는 Rh1, Rh2, compound K 및 PPT가 많이 생성됨을 알 수 있었다. 따라서 이러한 사포닌의 함량을 보다 구체적으로 살펴보기 위하여 HPLC 및 NMR을 이용하여 성분분석을 실시하였다.

사용한 HPLC 장치는 Shimadzu LC-6AD(Japan) 이었으며, 컬럼은 Shiseido( $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.6 \text{ mm}$ )를 사용하였다. 이동상으로 사용한 A 용매는  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:5\% \text{ acetic acid} = 15:80:5$ , B 용매는  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} = 80:20$  이었다. 용매는 gradient elution system으로 0분(0%B), 0-10분(30%B), 10-25분(50%B), 25-40(100%B), 40-50분(100%B), 50-53분(0%B), 53-56분(0%B)으로 조절하였다. 전개온도는  $40^\circ\text{C}$  이었고 유속은  $1 \text{ ml/min}$  이었으며, 검출기는 ELSD-LT (Shimadzu, Japan)를 사용하여 사포닌의 성분을 분석하였다.

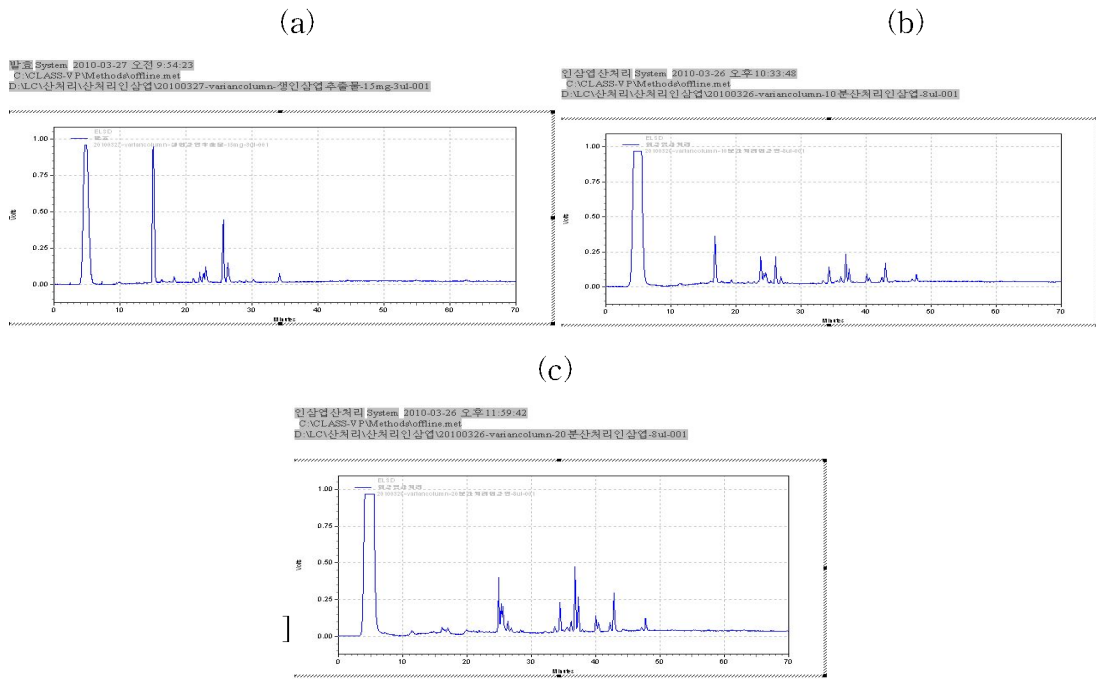
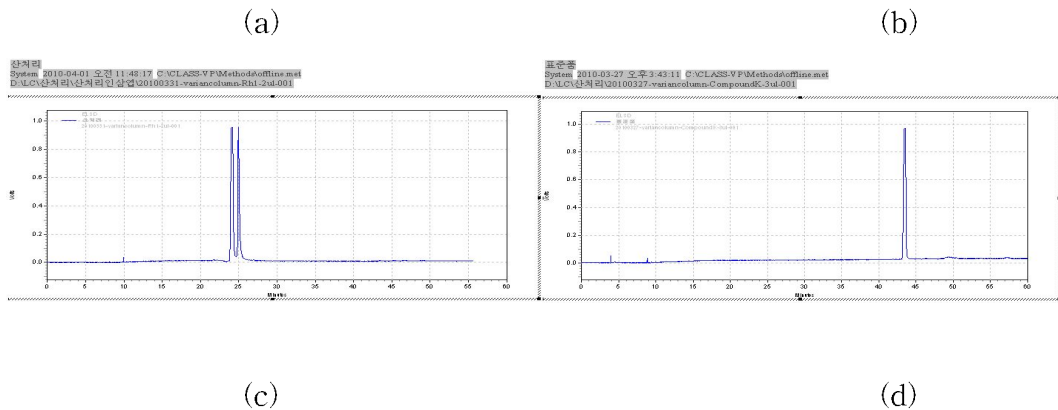


그림 14. 산처리 시간에 따른 인삼잎 HPLC 분석  
 a) 인삼잎; b) 2시간 산처리; c) 24시간 산처리

그림 14에서와 같이 인삼잎을 산처리하면 15분대에 나타나는 Rg1과 Re가 점점 사라지면서 다른 사포닌으로 전환되는 것을 알 수 있으며 24시간 후에는 Rg1과 Re가 거의 사라지는 것을 알 수 있었다. 따라서 새롭게 형성되는 사포닌의 구조를 살펴보고자 표준품을 사용하여 분석한 결과 그림 15에서와 같이 Rh2, Rh1를 확인하였으며, compound K 및 PPT가 동시에 겹쳐서 나옴을 확인 할 수 있었다.



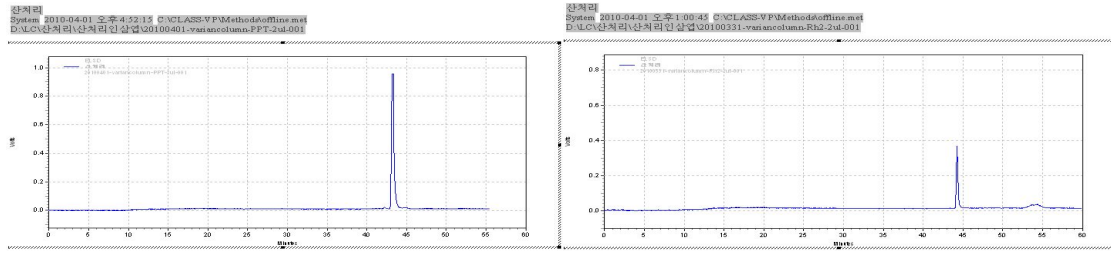


그림 15. 표준 Rh1(R), Rh1(S), compound K, PPT 및 Rh2 HPLC 분석  
 a) Rh1(R), Rh1(S); b) compound K; c) PPT; d) Rh2

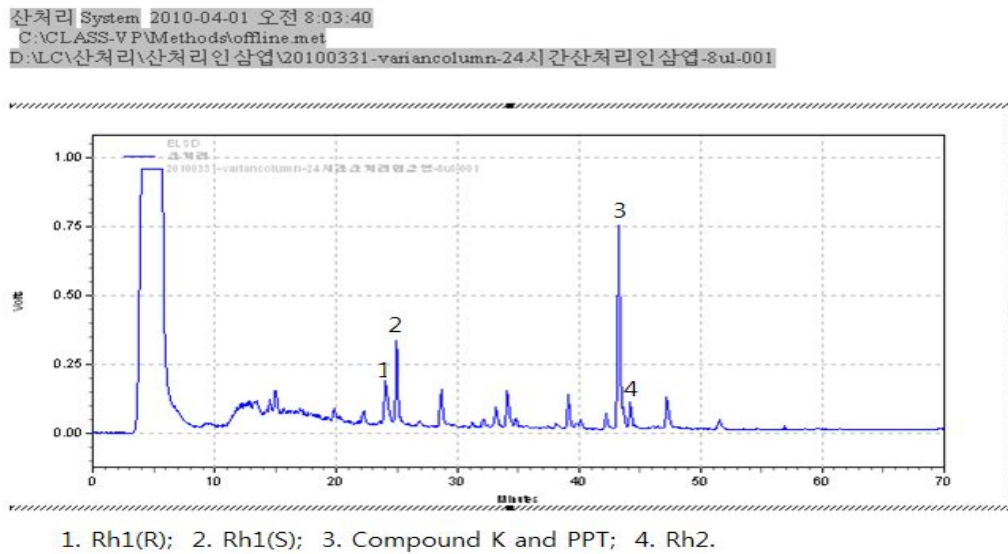


그림 16. 인삼잎의 산처리 24시간 후 HPLC 분석

인삼잎과 꽃봉오리를 산처리 했을 경우 TLC 및 HPLC 양상은 거의 동일함을 알 수 있었다. 인삼잎을 24시간 동안 산처리 했을 경우 인삼잎의 주 사포닌인 Rg1, Re, Rd 및 Rg2 등이 증속시간에 비례해서 점점 사라짐을 알 수 있었다. 반대로 증속시간에 비례해서 Rh1, Rh2, compound K 및 PPT가 점점 증가됨을 알 수 있었다. 24시간 산처리를 하면 이러한 변화가 완결되었으며 더 이상의 변화가 없는 것으로 보아 최적의 증속시간은 24시간인 것으로 판단하였다. 이밖에도 28, 30-40분대 사이 및 46분대에서 나타나는 피크에 해당되는 사포닌들이 새로이 생성되어 증속과정중에 새로운 사포닌이 최소한 10개 이상 생성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이러한 증속방법에 의해서 제조된 증속인삼(잎, 꽃봉오리) 추출물을 제3세부과제 넘겨 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 억제활성을 측정 한 결과 우수한 항바이러스 효과를 나타냄을 확인하였다.

분리한 사포닌의 구조는  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ (400Mz NMR spectrometer, Jeol,

Akishima, Japan), PE-SCIEX LC/MS/MS mass spectrometer(API 2000, Japan), DIP-370 polarimeter(Jasco, Tokyo, Japan), and Nicolet 380 FT-IR spectrometer(Thermo, Madison, USA) 등을 이용하여 기존의 논문<sup>15-18)</sup>에 보고된 데이터 및 표준품과 비교분석하여 사포닌의 구조를 결정하였다.

#### (20R)-Ginsenoside Rh<sub>1</sub>

amorphous powder, C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>9</sub>, mp : 155-157°C, [α]<sub>D</sub> : +26.9° (MeOH, c=0.5%, 20°C), IR Vmax (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3390, 2928, 1650, 1385, 1022. MS(*m/z*) 643 (M+Na)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 0.86 (3H, s, H-30), 1.02(1H, m, H-1a), 1.05(1H, s, H-19), 1.13(1H, t, *J* =10.2 Hz, H-15b), 1.29(1H, m, H-16b), 1.23(1H, s, H-18), 1.38 (3H, s, H-21), 1.43(1H, d, *J* =10.2 Hz, H-5), 1.54 (1H, m, H-11b), 1.58(3H, s, H-9), 1.60 (3H, s), 1.63 (3H, s, H-27), 1.64 (1H, m, H-15a), 1.67 (1H, m, H-22b), 1.69 (3H, s, H-27) 1.70(1H, m, H-1b), 1.72 (1H, m, H-22a), 1.81(1H, m, H-2b), 1.92 (1H, m, H-16a), 1.93(1H, br d, *J* =11.5, H-2a) 1.94(1H, s, H-7a), 2.01(1H, t, *J* =10.4 Hz, H-13), 2.06(3H, s, H-28), 2.15 (1H, dd, *J* =5.1, 11.5 Hz, H-11a), 2.33(1H, m, H-17), 2.42 (1H, dd, *J* =6.6, 12.6 Hz, H-23b), 2.49 (1H, m, H-23a), 2.53(1H, dd, *J* =2.5, 12.9 Hz, H-7b), 3.52 (1H, br d, *J* =9.3 Hz, H-3), 3.91(1H, dd, *J* =5.2, 11.5 Hz, H-12), 3.95(1H, s, H-5'), 4.08 (1H, d, *J* =8.0 Hz, H-2'), 4.20 (1H, t, *J* =9.1 Hz, H-4'), 4.25((1H, t, *J* =8.5 Hz, H-3'), 4.35(1H, dd, *J* =4.8, 11.5 Hz, H-6' b), 4.44 (1H, t, *J* =10.7 Hz, H-6), 4.52 (1H, br d, *J* =11.5 Hz, H-6' a), 5.03(1H, d, *J* =7.5 Hz, H-1'), 5.30(1H, t, *J* =6.9 Hz, H-24)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 16.5, 17.2, 17.5, 17.8, 17.8, 22.7, 22.8, 25.9, 26.7, 28.0, 31.4, 31.8, 32.3, 39.5, 39.8, 40.4, 41.2, 43.3, 45.3, 49.0, 50.7, 50.3, 51.4, 61.5, 63.2, 71.0, 71.9, 73.1, 75.5, 78.2, 78.7, 79.7, 80.1, 106.1, 126.1, 130.9

#### (20S)-Ginsenoside Rh<sub>1</sub>

amorphous powder, C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>9</sub>, mp : 155-157°C, [α]<sub>D</sub> : -26.8° (MeOH, c=0.5%, 20°C), IR Vmax (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3390, 2928, 1650, 1385, 1022. MS(*m/z*) 643 (M+Na)<sup>+</sup> <sup>1</sup>H 및 C-NMR 데이터는 R 이성체와 동일함.

#### Compound K:

amorphous powder, C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>9</sub>, mp 162-164°C; [α]<sub>D</sub> = +43.1 (c= 0.248, MeOH), MS(*m/z*) = 645 (M+Na)<sup>+</sup>,

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 5.22 (1H, t, *J* =7.1Hz, H-24), 5.17 (1H, d, *J* = 7.8Hz, H-31), 3.93 (1H, ddd-like, H-12-OH), 3.4 (1H, dd, *J* = 10.5, 5.1Hz, H-3-OH), 1.62 (3H, s, H-21), 1.57 (6H, s, H-26, 27), 1.22 (3H, s, H-28), 1.03 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-30), 0.93 (3H, s, H-18), 0.87 (3H, s, H-19), 0.79 (1H, d, *J* = 11.0Hz, H-5);

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm) δ 130.8, 125.9, 98.4, 83.5, 79.6, 78.6, 78.3, 75.4, 72.0, 70.5, 63.3, 56.8, 52.0, 51.9, 50.8, 50.0, 40.6, 40.1, 39.9, 37.9, 36.7, 35.7, 31.6, 31.4, 29.3, 28.9, 27.3,

26.4, 23.9, 23.0, 19.5, 18.5, 18.1, 17.1, 16.7.

PPT:

Colorless needles,  $C_{36}H_{52}O_4$ , mp 219–222°C; MS( $m/z$ ) = 477 ( $M+1$ )<sup>+</sup>,

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) eight methyl signals at  $\delta$  : 0.90, 0.93, 0.98, 1.06, 1.13, 1.19, 1.63, and 1.69 (all 3H, all s), 3.18 (1H, dd, H-3), 3.57 (1H, ddd-like, H-12), 4.09 (1H, ddd, H-6), and 5.14 (1H, t, H-24);

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm)  $\delta$  130.8, 126.3, 78.6, 73.0, 71.0, 67.1, 61.4, 54.7, 51.6, 50.2, 48.2, 47.0, 41.1, 40.3, 39.6, 39.4, 35.8, 32.0, 31.7, 31.2, 27.8, 27.0, 26.8, 25.8, 23.0, 17.7, 17.6, 17.3, 16.7, 16.4.

Rh2:

amorphous powder,  $C_{36}H_{62}O_8$ , mp 219–221°C;  $[\alpha]_D = +21.5$  ( $c = 0.248$ , MeOH), MS( $m/z$ ) = 645 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>,

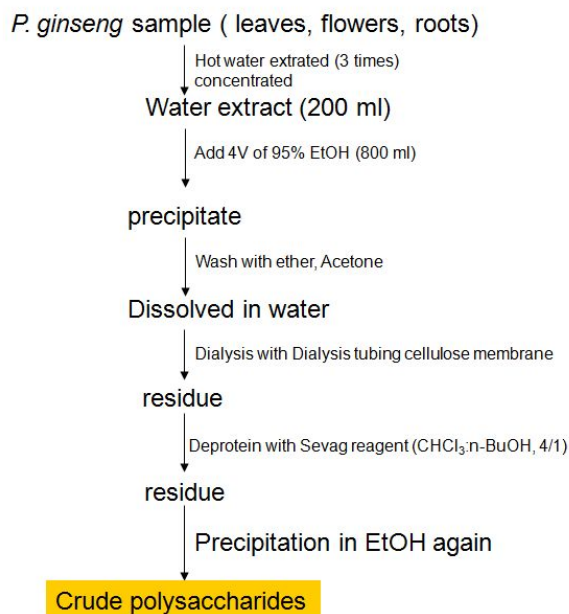
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm)  $\delta$  5.32 (1H, dd,  $J = 7.0, 7.0$  Hz, H-24), 4.96 (1H, d,  $J = 7.7$ Hz, H'-1), 3.38 (1H, dd,  $J = 4.5, 11.5$ Hz, H-3).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, ppm)  $\delta$  130.7, 126.3, 106.9, 88.8, 78.7, 78.3, 75.8, 72.9, 71.7, 71.0, 63.1, 56.4, 54.8, 51.7, 50.4, 49.5, 40.0, 39.7, 39.1, 36.9, 35.9, 35.2, 32.0, 31.3, 28.1, 27.1, 26.8, 26.7, 25.8, 23.0, 18.4, 17.66, 17.65, 16.8, 16.3, 15.6.

다. 다당체 분획

인삼지상부에 존재하는 다당체를 그림 17과 같이 분획하였다.

#### Protocol for Polysaccharide Isolation by Tung



Ref.: Xu Zhang et al. Carbohydrate Polymers, 77, 544-552 (2009)  
Chuanguang Qin et al. Carbohydrate Polymers, 49, 367-371 (2002)

그림 17. 다당체 분획방법

### 3. 발암성 물질인 벤조피란 측정

벤조피렌은 Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)으로 동물성이나 식물성 성분의 불완전 연소에 의해 생기는 환경 오염 물질로서 국제 암 연구소(IARC)에서 발암물질 그룹 1으로 분류되고 있다. 현재 우리나라에서는 올리브유, 옥수수 기름 등 식용 유지에 대해서 2 ppb 이하로 기준을 정하여 관리하고 있다. 그러나 최근 흑삼에서 발암물질인 벤조피렌의 함량이 기준치 이상으로 검출되어 사회적인 이슈가 되고 있어 이에 대한 기준과 검체 특성에 따른 벤조피렌의 추출방법 등에 대한 검토가 필요하여, 최근 식약청에서 생약의 벤조피렌 기준 및 시험방법을 제정하여 벤조피렌 허용기준을 5 ppb이하로 규정한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 증숙인삼잎 및 꽃봉오리에서의 유해물질인 벤조피렌의 직선성, 검출한계 및 정량한계, 특이성을 통한 분석방법을 확립하여 식약청 고시 기준에 의한 추출방법을 이용하여 본 연구팀이 개발한 증숙인삼잎 및 꽃봉오리 중의 벤조피렌 함량을 검토하여 벤조피란이 검출되지 않는 우수한 품질의 증숙인삼잎 및 꽃봉오리 제조방법을 제시하고자 하였다.

#### 가. 시약 및 기기

시약으로는 벤조피렌(Sigma Chem., U.S.A), N,N-Dimethylformamide(이하 DMF로 약함, Samchen, Korea), 황산나트륨.10수화물, 무수황산나트륨, HPLC용 아세토니트릴과 3차 증류수를 사용하였다.

기기로는 Machanical Stirrer(MS-280, Korea), 감압 농축기(Laborata 410, Heidolph, Germany), 원심분리기(Micro 12, Hanil Sci. Inc., Korea) HPLC(Waters millenium system)를, Column은 Atlantis™ $C_{18}$ (4.6\*250mm, 5 $\mu$ m, Waters, U.S.A.)을 Detector는 Fluorescence Detector를 선택해 사용하였다.

#### 나. 분석기기 조건

사용한 HPLC는 Waters alliance system을 사용 하였고, 여기 파장 294nm, 형광 파장 404nm, 컬럼 온도는 30℃, 이동상으로는 아세토니트릴 : 3차 증류수(80:20), 유속은 1.0 ml/min에서 정량하였다.

#### 다. 직선성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

벤조피렌 표준품 50mg을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 정확히 50 ml로 하여 표준원액으로 한 다음 이를 희석하여 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5 및 125 ng/ml의 농도별 표준액을 제조하여 분석 조건에 의한 피크 면적을 구하여 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선으로부터 직선식의 상관 계수 (기준:  $R^2=0.99$  이상)를 구하여 직선성을 검토 하였고, 3번 반복 실험하여 평가 하였다. 검량선의 직선성 범위가 좋은 부분을 이용하여 다음과 같은 식을 이용하여 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)를 산출하였다.

$$\text{검출한계} = 3.3 \times \sigma/S \quad (S/N=3)$$

$$\text{정량한계} = 10 \times \sigma/S \quad (S/N=10)$$

이 때  $\sigma$ 는 질편의 평균표준편차이며  $s$ 는 기울기의 평균을 의미한다.

#### 라. 특이성

시료 추출액과 시료 추출액에 기지 농도의 표준품을 각각 spiking하여 정량적으로 늘어나는지의 여부를 검토하였다. 따로 시료에서 벤조피렌을 추출하기 위하여 사용되어진 방법에 얻어진 헥산층이 벤조피렌의 피크에 영향을 미치는지를 검토하기 위하여 상층과 하층을 모두 처리하여 HPLC로 주입하여 분석하여 크로마토그램을 얻었다. 즉 헥산 100 ml을 분액여두에 넣고 물:DMF 혼합액(1:9) 50ml를 넣어 균일하게 흔들어 섞어준다. DMF와 헥산을 분리한 후, 헥산층에 물:DMF 혼합액(1:9) 25ml를 넣고 흔들어 섞어준 다음 분리된 헥산과 DMF층을 분리한다. 이를 2회 실시한다. 헥산층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40 °C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1ml에 용해하고 0.45 $\mu$ m 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다(상층). 따로 100 ml의 DMF층에 1% 황산나트륨 용액 100 ml를 넣고 충분히 섞은 후, 헥산 50 ml를 넣고 추출하고, 다시 헥산 35 ml를 넣고 2회 더 추출한다. 헥산 층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40 °C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 0.45 $\mu$ m 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다(하층).

#### 마. 추출 효율

벤조피렌 표준액 0.25  $\mu$ g/ml을 헥산 100 ml에 넣어 충분히 섞어 준다. 헥산층에 물:DMF 혼합액(1:9)을 50 ml 넣어 균일하게 흔들어 섞어준 다음 DMF와 헥산을 분리시켰다. 다시 헥산층에 DMF혼합액 25 ml을 넣어 추출하였다. 이 조작을 2회 반복하여 총 DMF가 100 ml이 되게하였다.

분리된 물:DMF 혼합액(1:9)층에 1% 황산나트륨 100 ml을 넣고 충분히 섞은 후, 헥산 50 ml를 넣고 추출하고 다시 헥산 35 ml를 넣고 2회 더 추출하였다. 헥산 층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40 °C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다. 따로 벤조피렌 표준액 0.25  $\mu$ g/ml을 HPLC에 주입하여 분석하여 얻어진 면적값을 사용하여 다음과 같은 식으로 추출효율을 계산하였다.

$$\text{추출효율}(\%) = \frac{\text{추출후면적}}{\text{벤조피렌표준액의면적}} \times 100$$

#### 바. 벤조피렌의 함량 분석

증숙조건에 따른 인삼지상부에 존재하는 벤조피렌의 함량변화를 관찰하기 위하여 0, 60, 120, 180, 240 및 300분 동안 증숙한 인삼지상부를 각각 10g을 취하여 다음과 같은 추출방법으로 3번 추출하여 HPLC에 주입하여 분석하였다. 시료 10g을 칭량하여 헥산 100 ml을 넣어 섞어준 다음, 물:DMF 혼합액(1:9) 50 ml를 넣어 균일하게 흔들어 섞어준 다음 DMF와 헥산을 분리시킨다. 다시 헥산층에 DMF혼합액 25 ml을 넣어 추출하였다. 이 조작을 2회 반복하여 총

DMF가 100 ml가 되도록 한다. 분리된 DMF 혼액층에 1% 황산나트륨 용액 100 ml을 넣고 충분히 섞은 후, 헥산 50 ml를 넣고 추출하고 다시 헥산 35 ml를 넣고 2회 더 추출하였다. 헥산층을 증류수로 3회 세척하여 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40 °C에서 감압 농축하여 아세토니트릴 1 ml에 용해하고 0.45 μm 막 여과기로 여과한 후 HPLC에 주입하여 분석하였다. 벤조피렌을 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5 및 125 ng/ml의 농도로 제조하여 HPLC로 분석하였을 때 얻은 피크 면적을 Y축으로 표준액 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하여 나타내었다(그림 18). 이 때 얻어진 검량선식으로부터 상관계수는 0.999이상으로 양호한 직선성을 나타내었다. 가장 직선성이 좋은 부분을 이용하여 검출한계와 정량한계를 구한 결과 각각 2.7과 8.2 ng/ml이었다.

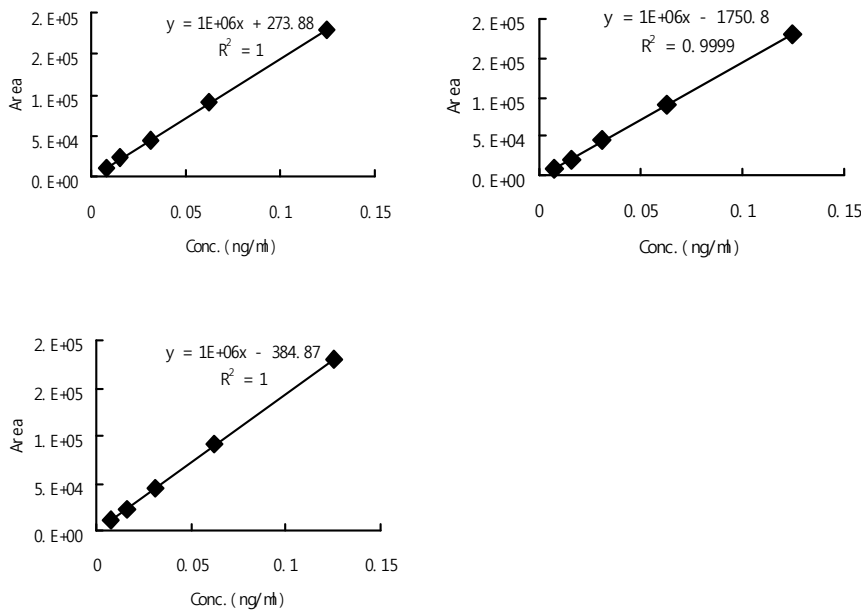


그림 18. Calibration curve of benzopyrene.

특이성은 시료 내 다른 물질의 공존 시 해당 분석물질을 분리하고 정량하는 분석 능력을 나타낸다. 벤조피렌 표준액(5 μg/ml), 시료 추출액, 벤조피렌 표준액으로 spiking한 시료 추출액의 크로마토그램을 Figure 8에 나타내었다. 이 때 벤조피렌의 머무름 시간은 10.881분으로 시료 추출액의 다른 성분들과 명확하게 분리되었다. 시료 추출액에 기지 농도의 표준품을 spiking하여 얻어진 면적은 시료 추출액의 면적과 표준품의 면적을 더한 값과 같으므로 다른 물질과의 간섭이 없이 분석할 수 있는 방법임을 확인할 수 있었다. 또한 공시험에서 상층과 하층을 각각 위의 분석조건으로 분석한 결과 상층에서 10.942분의 유지시간을 가지는 미지의 피크가 나타났는데 이는 정제과정을 충분히 거치지 않아 잔류하는 DMF로 인한 피크로 사료되어진다(그림 19, 20). 그러나 하층에서는 벤조피렌의 피크에 영향을 주는 아무런 피크가 나타나지 않으므로 기술된 추출 단계를 거쳐 추출되어지는 방법에 의해 얻어지는 추출액을 가지고 분석할 때 이러한 분석방법은 다른 피크와 분리되어 벤조피렌을 분석할 수 있을 것으로 사



료되어진다.

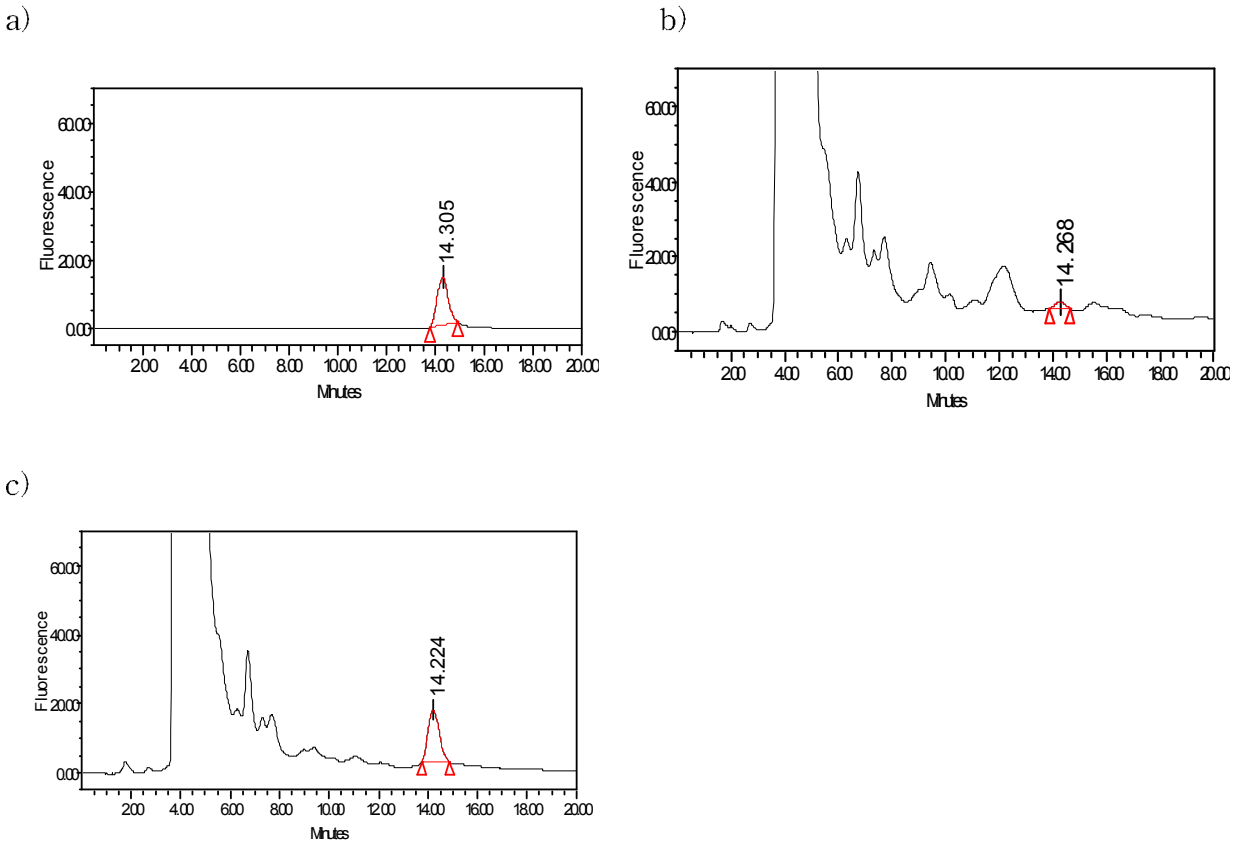


그림 19. Chromatogram of benzopyrene(a), black ginseng(b) and spiled sample with benzopyrene

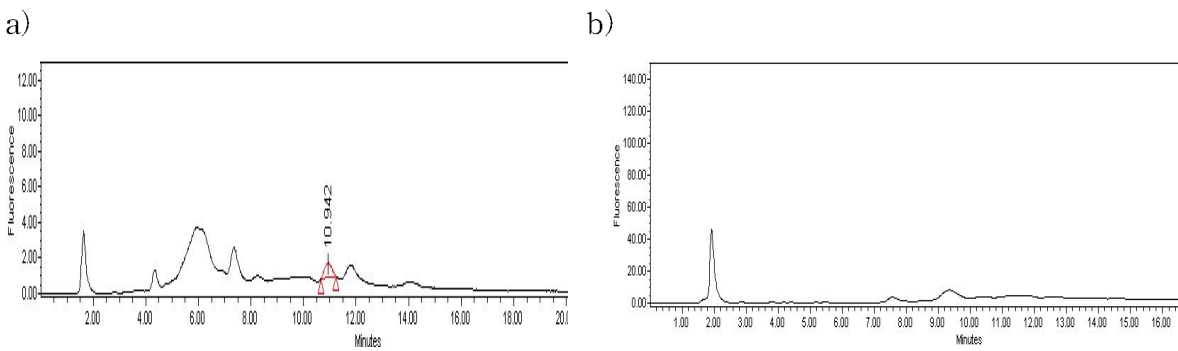


그림 20. Chromatogram of upper layer(a) and lower layer(b) in extract

벤조피렌 표준액 0.25ppm의 면적과 추출 과정을 거친 벤조피렌의 면적값을 이용하여 추출 효율을 검토한 결과 약 97%이었다. 일반적으로 재현성 있고 정확한 추출과정은 95% 이상의 추출효율을 기대하므로 이 방법은 신뢰할 수 있는 추출방법이라고 할 수 있었다.

따라서 인삼잎과 꽃봉오리를 증숙시간에 따른 벤조피렌의 함량을 분석하여 표 6과 7에 나

타내었다. 실험결과 120℃에서 인삼지상부(잎, 꽃봉오리)를 시간별로 증숙하였을 경우 240분 이내에서 한약제제의 식약청 기준인 5 ppb를 만족하는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 조건에서 증숙한 인삼지상부를 이용한 제품개발에는 전혀 문제가 없을 것으로 판단된다.

표 6. 처리시간에 따른 인삼잎 중의 벤조피렌 함량(Mean±S.D, n=3)

Treatment time (min)	Benzopyrene Conc. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
60	1.378±0.014
120	1.406±0.002
180	1.488±0.012
240	1.590±0.036
300	2.227±0.048

표 7. 처리시간에 따른 인삼꽃봉오리 중의 벤조피렌 함량(Mean±S.D, n=3)

Treatment time (min)	Benzopyrene Conc. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
60	0.972±0.004
120	1.552±0.005
180	1.679±0.006
240	1.914±0.018
300	2.231±0.051

#### 4. 인삼지상부의 활성

##### 가. 항산화활성

##### (1) 폴리페놀의 정량

총 폴리페놀 화합물은 Folin-Denis 방법<sup>19)</sup>으로 측정하였으며, 시료(10%) 1 ml에 95% ethanol 1 ml와 증류수 5 ml를 첨가하고 1N Folin-ciocalteu reagent 0.5 ml를 넣어 잘 섞어 주고, 5분간 방치한 후, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 ml를 가한 후, 725 nm에서 1시간 이내에 흡광도를 측정하여 gallic acid를 이용하여 미리 작성된 검량선으로부터 양을 환산하였다. 이 때 검량선은 탄닌산 표준품 10mg을 에탄올 5ml에 용해시켜 표준원액을 제조한 다음 적당히 희석하여 작성하였다.

표 8. 인삼추출물의 폴리페놀

Sample	Content (mg/g)
인삼잎	82.55±0.78
증숙인삼잎	104.83±0.78
인삼잎 조사포닌	89.14±0.95
증숙인삼잎 조사포닌	118.44±0.09
인삼꽃봉오리	67.59±0.52
증숙인삼꽃봉오리	86.88±0.69
인삼꽃봉오리 조사포닌	50.13±0.69
증숙인삼꽃봉오리 조사포닌	67.22±2.24
산처리 인삼잎	121.37±0.43
산처리 인삼꽃봉오리	136.88±1.64

Each value is expressed as mean±SD of triplicate determination

실험결과 폴리페놀의 함량은 증숙한 인삼잎 및 꽃봉오리 추출물에서 높게 나타났으며 가장 함량이 높은 것은 산 처리한 인삼꽃봉오리 추출물로서 121.37±0.432 mg/g이었다. 즉, 증숙방법에 따라서 일반적으로 폴리페놀은 열처리 및 산처리에 의해 함량이 증가하는 것으로 나타났으며 꽃봉오리보다는 잎에 더 많은 양이 함유되어 있는 것으로 나타났다(표 8).

## (2) DPPH 라디칼 소거능

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois의방법<sup>19)</sup>을 변형하여 측정하였다. 각 시료 20 $\mu$ l에 0.1 mM DPPH 180 $\mu$ l를 넣고 vortex한 후, 30분 동안 방치한 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

표 9. 인삼추출물의 DPPH 라디칼 소거활성

Sample	Conc.( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	DPPH Radical Scavenging Activity(%)	IC <sub>50</sub>
BHA	250	70.82±0.67	8.32±0.10
	125	42.90±0.29	
	62.5	25.65±0.17	
	31.25	9.76±0.17	
	15.625	4.64±0.82	
인삼잎	1000	95.85±0.43	260.94±7.19
	500	90.86±0.43	
	250	40.06±1.13	
	125	22.34±0.16	
	62.5	10.56±1.07	
증숙인삼잎	31.25	3.11±1.61	223.17±0.99
	1000	97.01±1.00	
	500	95.05±0.47	
	250	64.81±0.66	
	125	38.39±0.44	
인삼잎 조사포닌	62.5	18.47±0.18	617.42±2.65
	31.25	6.60±0.18	
	1000	74.41±0.20	
	500	47.70±0.74	
	250	25.77±0.49	
증숙인삼잎 조사포닌	125	15.37±1.29	239.72±0.77
	62.5	6.09±1.10	
	31.25	3.00±0.20	
	1000	95.65±1.15	
	500	86.00±0.71	
인삼꽃봉오리	250	60.45±0.16	665.62±0.61
	125	35.10±1.40	
	62.5	22.61±0.91	
	31.25	10.79±0.87	
	1000	72.92±0.72	
	500	39.33±0.60	
	250	23.25±1.63	
	125	10.14±0.57	
	62.5	4.78±1.75	
	31.25	3.16±0.88	

증숙인삼꽃봉오리	1000	91.12±0.82	477.89±2.58
	500	60.43±0.59	
	250	36.64±0.16	
	125	19.17±1.56	
	62.5	9.54±1.40	
	31.25	2.74±0.71	
인삼꽃봉오리 조사포닌	1000	44.96±0.59	1057.01±8.83
	500	30.16±0.85	
	250	21.74±0.28	
	125	11.10±0.42	
	62.5	5.83±0.70	
	31.25	4.81±0.39	
증숙인삼꽃봉오리 조사포닌	1000	73.9±0.40	644.43±4.23
	500	43.03±0.76	
	250	24.69±0.15	
	125	12.79±0.31	
	62.5	7.14±0.46	
	31.25	3.88±0.15	
산처리 인삼잎	1000	97.87±0.17	222.25±1.75
	500	92.45±0.77	
	250	61.76±1.17	
	125	37.85±0.41	
	62.5	21.59±0.77	
	31.25	12.88±0.50	
산처리 인삼꽃봉오리	1000	97.41±0.71	278.23±1.14
	500	80.69±0.24	
	250	51.81±0.59	
	125	29.28±0.27	
	62.5	16.48±0.36	
	31.25	6.75±0.00	

Each value is expressed as mean±SD of triplicate determination

인삼잎과 꽃봉오리에 대한 DPPH radical 소거능을 시판 항산화제인 BHA와 비교하여 radical 소거능을 측정한 결과 소거능은 산처리 인삼꽃봉오리, 증숙인삼잎, 증숙산처리 인삼꽃봉오리가 높게 측정되었다. 그리고 조사포닌 추출물은 상대적으로 라디칼 소거능이 약하였다.

또한 산처리 인삼잎, 증숙인삼잎, 증숙인삼잎 조사포닌, 산처리 꽃봉오리는 높은 라디칼 소거능으로 인해 500과 1000 µg/mL에서 90% 이상의 높은 소거능을 나타내었다. 시판 항산화제인 BHA는 단일 물질로서 더 높은 항산화능을 나타내었으나 증숙인삼잎과 증숙인삼잎 조사포닌은 250 µg/mL에서 각각 64.81과 60.45%로서 70.82%인 BHA와 거의 차이가 나지 않는 것으로 보아 이를 단일물질과 비교했을 때 더 높은 소거능을 나타낼 수 있다고 사료되어지며 열처리에 의해 증숙되어진 잎이나 꽃봉오리의 소거능이 증가되었음을 확인할 수 있었다(표 9).

### (3) 아질산염 소거 작용

아질산염 소거작용은 Kato 등의 방법<sup>21)</sup>에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉, 1 mM의 NaNO<sub>2</sub> 용액 30 $\mu$ l에 시료추출물을 60 $\mu$ l를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl 용액 210 $\mu$ l를 가하여 전체를 300 $\mu$ l로 하였다. 그리고 37°C에서 1시간동안 반응시켜 얻은 반응액을 40 $\mu$ l씩 취하고 여기에 2% 초산 용액 200 $\mu$ l를 첨가한 다음 Griess 시약 16 $\mu$ l를 가하여 혼합시켜 실온에서 15분간 방치시킨 후 흡수 분광광도계를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염의 백분율로 나타내었다. 공시험은 Griess시약 대신 증류수를 가하여 같은 방법으로 행하였다

$$N(\%) = [1 - \text{시료 첨가구} / \text{대조구}] \times 100$$

아질산염은 니트로사민의 전구체인 nitrous anhydride (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)와 같은 활성 니트로소화 물질을 생성하고, 이 nitrous anhydride가 2차 아민과 결합하여 발암물질인 N-nitrosamine을 생성한다. 이에 따라 니트로사민 생성 억제 인자에 대한 실험이 진행되었다. GR(Griess Romigin)아질산 시약과 아질산염이 반응시 자적색을 띄고 이를 이용하여 시료가 아질산염을 얼마나 소거하는지 측정하는 방법이다.

조사포닌은 모든 경우에 250  $\mu$ g/ml의 농도까지 50% 이상의 아질산염 소거능을 나타내는 것으로 나타났으며 인삼잎 보다는 증숙인삼잎에서 약간 더 높은 효능을 나타내었다. 그러나 꽃봉오리의 경우 증숙하지 않은 꽃봉오리의 경우에 오히려 더 높아 125  $\mu$ g/ml에서도 50%이상의 억제 효과를 나타내었다. 인삼잎과 꽃봉오리 자체를 추출하는 것보다 조사포닌 추출물이 더 효능이 좋은 것을 알 수 있었다(표 10).

표 10. 인삼추출물의 아질산 소거능

Sample	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )	Nitrite Scavenging Activity	IC <sub>50</sub>
BHA	25	92.97 $\pm$ 0.94	12.70 $\pm$ 0.09
	12.5	51.08 $\pm$ 0.47	
	6.25	25.95 $\pm$ 0.94	
인삼잎	500	61.3 $\pm$ 1.42	372.58 $\pm$ 0.16
	250	38.3 $\pm$ 1.74	
	125	29.6 $\pm$ 3.26	
증숙인삼잎	500	75.44 $\pm$ 2.01	317.97 $\pm$ 5.90
	250	45.61 $\pm$ 1.52	
	125	17.11 $\pm$ 1.32	
인삼잎 조사포닌	500	66.87 $\pm$ 0.54	247.78 $\pm$ 3.77
	250	51.08 $\pm$ 1.42	
	125	41.80 $\pm$ 1.42	
증숙조사포닌	250	64.84 $\pm$ 0.79	163.73 $\pm$ 3.59
	125	45.66 $\pm$ 0.79	
	62.5	29.68 $\pm$ 1.58	
인삼꽃봉오리	500	63.4 $\pm$ 0.71	352.30 $\pm$ 1.24
	250	38.7 $\pm$ 1.43	
	125	32.5 $\pm$ 1.88	
증숙	1000	58.511.07	571.48 $\pm$ 9.11
	500	50.150.54	
	250	42.110.54	
인삼꽃봉오리 조사포닌	250	71.18 $\pm$ 1.97	109.50 $\pm$ 4.82
	125	56.99 $\pm$ 0.74	
	62.5	39.35 $\pm$ 1.29	
증숙인삼꽃봉오리 조사포닌	500	77.140.99	153.70 $\pm$ 8.46
	250	61.140.99	
	125	45.431.31	
산처리 인삼잎	1000	81.62 $\pm$ 1.27	278.42 $\pm$ 2.38
	500	58.82 $\pm$ 1.27	
	250	49.26 $\pm$ 3.12	
산처리 인삼꽃봉오리	500	75.74 $\pm$ 2.20	269.78 $\pm$ 2.20
	250	52.21 $\pm$ 1.27	
	125	30.15 $\pm$ 1.27	

Each value is expressed as mean $\pm$ SD of triplicate determination

#### (4) Superoxide anion 소거능

Super anion 소거활성은 Okamura 등의 방법<sup>22)</sup>을 변형하여 측정하였다. 즉 시료 20 $\mu$ l, 2mM xanthine과 0.1mM NBT 혼합액 160 $\mu$ l를 넣고 0.05mM EDTA가 포함된 50mM potassium phosphate buffer(pH7.4)에 녹인 xanthine oxidase(0.5unit/ml) 20 $\mu$ l를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시켰다. 다음, 여기에 2.5N HCl 80 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 중지시키고 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험결과, superoxide anion radical 소거능은 산처리 꽃봉오리와 산처리 인삼잎의 경우 가장 강한 활성을 나타내었으며, 인삼잎의 경우 열처리에 의한 증숙인삼잎의 소거능이 더 높아지는 것을 볼 수 있었다. 그러나 인삼꽃봉오리의 경우에는 소거능이 매우 미약하였다.(표 11).



표 11. 인삼추출물의 Superoxide anion radical 소거활성

Sample	Conc.( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Superoxide Anion Radical Scavenging Activity	IC <sub>50</sub>
BHA	100	96.85±1.57	52.72±0.63
	50	42.13±1.32	
	25	27.10±0.52	
인삼잎	1000	89.87±0.55	237.39±2.57
	500	66.30 ±0.67	
	250	49.68±0.95	
증숙	500	73.16±1.58	139.85±5.23
	250	57.37±1.58	
	125	48.95±0.91	
인삼잎 조사포닌	1000	83.97±0.73	487.00±3.96
	500	49.37±1.27	
	250	36.08±0.63	
증숙인삼잎 조사포닌	1000	90.78±0.84	221.89±4.56
	500	67.96±1.46	
	250	53.40±1.46	
	125	41.75±1.46	
인삼꽃봉오리	1000	26.43±0.39	811.57±3.54
	500	3.11±0.39	
증숙인삼꽃봉오리	1000	67.59±1.19	836.65±3.15
	500	15.86±1.82	
인삼꽃봉오리 조사포닌	1000	29.49±0.39	901.93±4.36
	500	16.24±0.78	
	250	3.79±1.29	
증숙인삼꽃봉오리 조사포닌	1000	54.25±0.80	952.63±9.10
	500	17.93±1.82	
	250	5.29±1.05	
산처리 인삼잎	1000	59.62±1.11	114.42±3.94
	500	6.20±1.61	
산처리 인삼꽃봉오리	1000	69.44±2.06	106.19±3.37
	500	42.95±1.70	
	250	12.39±0.74	

Each value is expressed as mean±SD of triplicate determination

### 나. 발모효과

인삼지상부 추출물의 발모효과를 확인하기 위하여 문헌에 게시된 Lee 등<sup>23)</sup>의 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

#### (1) 실험 동물의 준비

생후 5주된 수컷 C57BL/6 마우스를 중앙실험동물로부터 구입하여 1주간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 온도 23±3 °C, 상대습도 50±10%, 12시간씩 밤낮을 유지하였다. 실험동물은 사료와 물을 자유로이 급여하였으며 군은 총 6개로 군당 6마리씩 총 20마리를 실험에 사용하였다.

#### (2) 실험과정

발 효과를 살펴보기 위하여 등쪽 피부의 색이 분홍색을 보이는 휴지기 제모의 6주기령을 사용하였다. 제모는 에바크린 제모약(삼공제약(주))을 사용하여 마우스 등관의 털을 제거한 후, 이틀 후부터 그 부위에 100 µl의 시료를 각 군별로 도포하였다. 시료 처리는 매일 오전 10시에 1회씩 2주간 실시하였다.

시료로서 3% MXD(미녹시딜, 현대약품)과 5% 인삼추출물(saline 용액에 5% 농도로 인삼추출물을 녹인 후 100ul를 도포하였음)을 실험 시작 후 피부(제모부위)에 매일 도포하였으며 음성대조군으로서 동량의 생리식염수를 도포하였다.

실험 시작 후 1, 7, 및 14일에 털이 자라는 상태를 육안적으로 확인하기 위하여 에테르로 가볍게 마취한 후에 사진기(니콘, Coolpix S230)로 사진촬영을 실시하였다. 털이 자란 정도는 육안적으로 0~25% (-), 25~50% (±), 50~75% (+), 75~100% (++)로 평가하여 비교하였다.

#### (3) 실험결과

실험결과, 산처리인삼꽃봉오리 추출물의 효과(++)가 기존 발모제인 미녹시딜의 발모효과와 거의 동등한 우수한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(표 12, 그림 21)

표 12. 인삼추출물의 발모효과

Treatment	Score
Saline	±
3% 미녹시딜	++
5% 증숙인삼잎추출물	+
5% 증숙인삼꽃봉오리	+
5% 산처리인삼잎추출물	++
5% 산처리꽃봉오리추출물	++



그림 21. 증숙조건에 따른 인삼추출물의 발모효과

#### 다. 혈관내피세포염증 억제활성

##### (1) 실험방법

인간 줄기 정맥 상피 세포 (HUVECs) 는 Clonetics로부터 구매하였고 상피 성장 medium에 서 배양하였다. 경로 3과 6 사이의 세포가 사용되었다. U937 세포 계열은 American Type Culture Collection (Manassa,VA, USA)으로부터 구매했다. anti-VCAM-1 과 anti-ICAM-1은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 로부터 구매했다. HRP-라벨된 anti-rabbit 과 anti-mouse 항체는 Amersham ( Buckinghamshire, UK) 로부터 구매했다. 인간 TNF-a 와 lucigenin은 Sigma (St. Louis, MO. USA)로부터 구매했다.

##### Monocyte adhesion assay

부착 세포 정량을 위해, U937 세포는 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxy-fluores cein acetoxymethy ester (BCECF-AM)로 형광 표지 되었는데, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>에서 30분 동 안 RPMI-1640 medium에서 1umol/L BCECF-AM로 세포 (1\*10<sup>7</sup> cells/ml) 로 배양했다. HUV EC가 유착성 단층 되도록 24-well plate에 배양했고, EGM-2 medium에서 24 시간 동안 인삼 추출물로 전처리했다. 인간 재조합 TNF-alpha는 라벨된 단핵구가 가해지기 18 시간 전에 적 절한 well (15 ng/ml) 에 넣었다. 부착 단핵구는 형광의 여기 (excitation, 485 nm) 와 발광 (e mission, 535 nm) 측정에 의해 정량했다.

(2) 실험결과

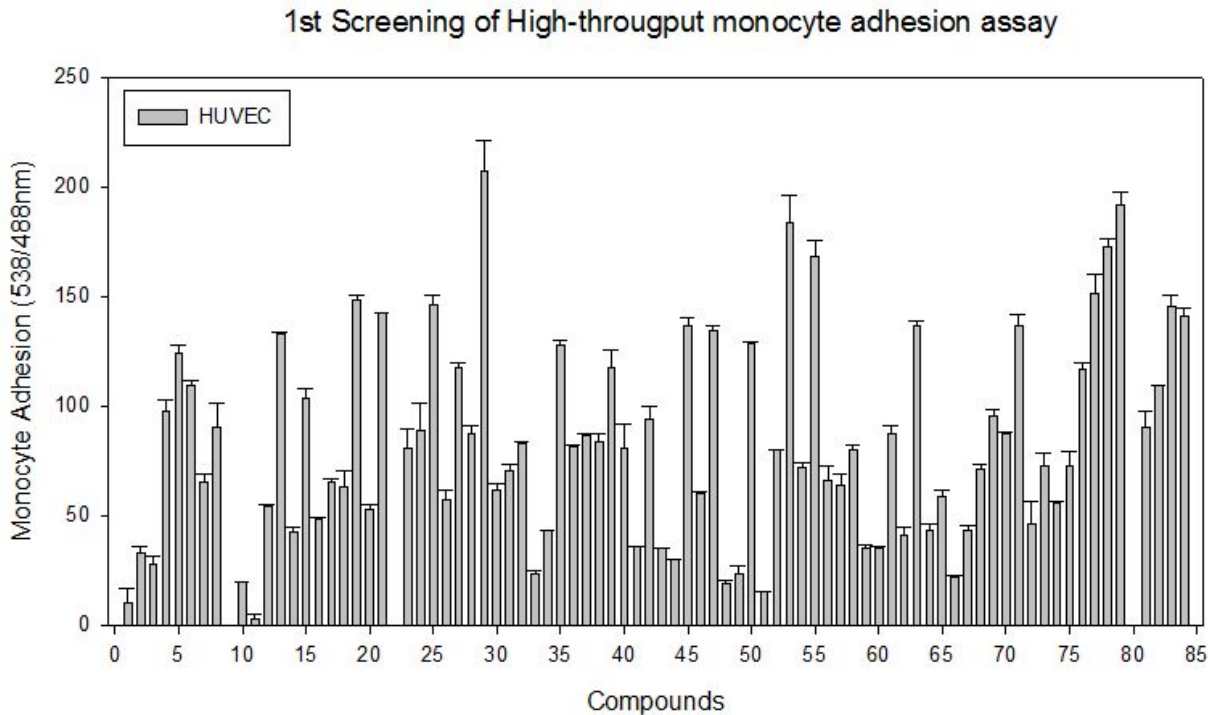


그림 22. 인삼추출물의 혈관내피세포염증 억제활성

그림 22에서와 같이 인삼꽃봉오리 다당체(59번), 인삼잎 다당체(60번), 인삼꽃봉오리(71번), 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌(64번), 증숙인삼잎 조사포닌(65번), 인삼잎(73번), 증숙인삼잎(74번), 인삼잎 조사포닌(66번), 증숙인삼잎 조사포닌(67번), 산처리 인삼잎(75), 산처리인삼꽃봉오리(76) 중에서 **인삼잎 다당체(60번), 인삼꽃봉오리 다당체(59번), 인삼꽃봉오리 조사포닌(64번) 및 인삼잎 조사포닌(66번)와 같이 다당체 및 조사포닌 분획물이 가장 강한 혈관내피세포염증 억제활성을 나타내었다.**

라. 심근세포 수축력에 미치는 영향

(1) 실험방법

(가) 심근세포 분리

수컷 백서(Wistar rat, 200-300 g)를 sodium pentobarbital(150 mg/kg, i.p.)로 마취한 후 심장을 적출하고, 분리한 심장의 대동맥을 Langendorff perfusion system의 cannular에 연결하여 고정된 후 대동맥 안으로 0 mM  $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액(in mM: 137 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 1  $MgCl_2$ , 10 Glucose, pH 7.3)을 37°C에서 5분간 관류시켰다. 이어서 10 mM  $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액에 collagenase(1.4 mg/ml)와 protease(0.16 mg/ml)를 포함한 용액을 12분간 관류시킨 다음, 마지막으로 0.2 mM  $[Ca^{2+}]$ 을 포함한 Tyrode 용액을 약 7분간 관류시켜 사용된 enzyme을 제거하였다. 심장을 Langendorff system에서 분리한 후 심실을 취하여 25 mm petri dish, 0.2

mM  $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액에 두고 여러 번 chopping한 후, mechanical dispersion으로 세포를 분리하였다. 분리된 세포들은 실험에 사용되기 전까지 실온에서 0.2 mM  $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액에 보관하였다.

#### (나) 심근세포 수축력 측정 및 분석

분리한 쥐 심실근세포들은 도립현미경 위에 놓인 세포 chamber에 놓고, 계속 정상 Tyrode 용액으로 superfusion 하며, 백금 전극으로 자극을 가하여 활동전위를 유발하였다. 활동전위에 의해 세포내  $Ca^{2+}$ 의 transient가 유도되고, 그에 따라 세포는 수축, 이완을 하므로, 1초에 한 번씩 자극을 주고 수축력을 video-edge detection 방법으로 측정하였다. 측정된 trace는 pClamp PC 프로그램으로 수축력 및 수축 이완 속도 등을 분석한다. 여러 개의 세포에서 측정하여 물질의 효과의 신뢰도를 student's t-test로 검증하며  $P < 0.05$ 일 때 효과의 신뢰성을 인정하였다.

#### (다) Depolarization (excitation)

분리한 세포를  $Ca^{2+}$  indicator dye fluo-4 AM으로 loading(3-4 mM, 30 min, 실온)하고, 도립현미경 재물대 위에 놓인 chamber 바닥에 안착시켰다. 세포 외부는 normal Tyrode 용액으로 계속 superfusion시켰다. 활동전위 유도를 위해 patch pipette을 이용하여 voltage clamp를 시행하거나 stimulator와 Pt 전극을 이용하여 field stimulation을 세포에 가해 주었다. Patch pipette으로 탈분극 시킬 경우,  $K^+$ -rich internal solution을 모세관에 채우고(저항: 2-3 M $\Omega$ ), whole cell mode의 patch clamp를 시행하였다. 탈분극성 전류를 2 ms 동안 0.5-1 Hz의 간격으로 세포에 규칙적으로 가하여 활동전위를 유발하였다.

#### (라) Global $Ca^{2+}$ transient 및 수축력 측정

위에서 언급한 방법으로 활동전위를 일으키고 동시에 Fluo-4- $Ca^{2+}$ 에 의한 형광신호를 측정하기 위하여 도립현미경의 대물렌즈를 통해 단일 세포에 488 nm 파장의 레이저(Ar)를 조사하였다. TIRF 및 공초점현미경 시스템을 이용하여 emission되는 형광을 빠른 속도의  $Ca^{2+}$  영상화로 측정하였다. 얻은  $Ca^{2+}$  영상의 시간에 대한 정량은 자체 개발한 분석 프로그램 (Pic, C++로 작성)으로 시행하였다. 시간에 대한  $Ca^{2+}$  농도 변화는 형광 비( $F/F_0$ )로 나타낼 수 있으며, F는 측정된 형광 강도이고,  $F_0$ 는 휴지기 평균  $Ca^{2+}$  형광이다. 수축력 측정을 위해 현미경 light source (halogen light)를 이용한 가시광선을 별도의 dichroic mirror (DM 600)를 사용하여 직접 CCD camera로 보내고, camera에 연결된 TV-monitor와 video-edge detector (Crescent, USA)를 통해 세포를 영상화하였다. 세포의 edge를 추적하여 수축 시 줄어드는 cell length 변화를 cell shortening으로 측정하였다.

(2) 실험결과

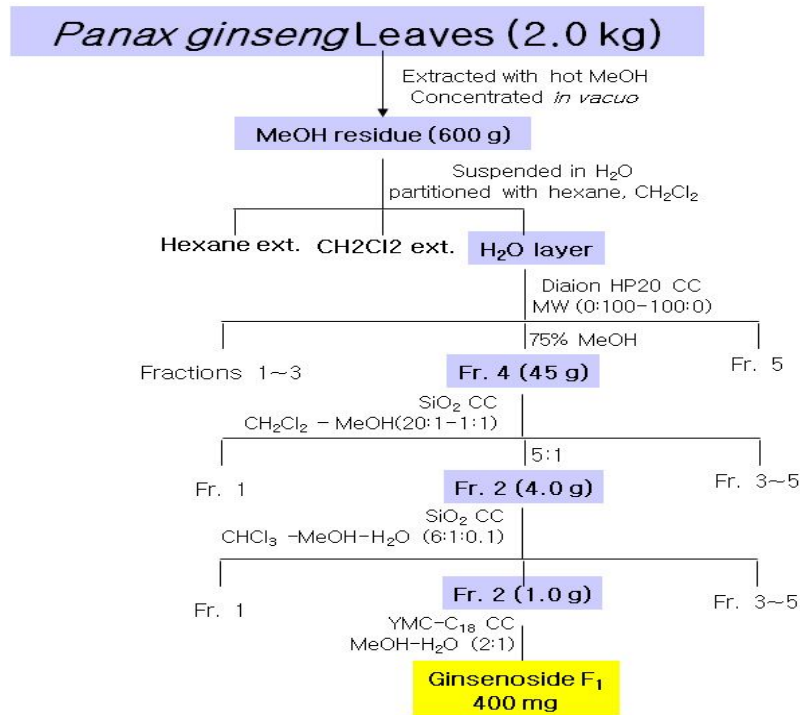
인삼지상부에 존재하는 분리한 dammarane 계열의 9종의 신규 사포닌과 25종의 기지의 사포닌에 대한 심근 수축력 조절 효능을 검색하였으며, 그 결과를 표 13에 나타내었다. 인삼의 잎에서 분리한 12B-PGL-79A와 12B-PGL-83A는 10  $\mu$ M 농도에서 수축력을 약 35%, 53% 각각 감소시켰으며, 인삼의 꽃봉오리에서 분리해낸 12B-PGF-146A는 10  $\mu$ M 농도에서 수축력을 약 32% 증가시켰다.

표 13. 인삼으로부터 분리한 사포닌의 심근 수축력 조절 활성

	Name	Conc.	% Change in cell shortenings
PGL leaf	12B-PGL-74B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-74C	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-75A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-76A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-79A	10 $\mu$ M	-35.7 $\pm$ 3.44 (n=4)
	12B-PGL-80D	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-81A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-83A	10 $\mu$ M	-53.0 $\pm$ 1.06 (n=2)
	12B-PGL-87A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-89C	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-90B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-91A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-93A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-94A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-94B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-96B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-91B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGL-93B	5 $\mu$ g/ml	0
	12B-PGL-105B	5 $\mu$ g/ml	0
	12B-PGL-82A	5 $\mu$ g/ml	0
PGF-Bud	12B-PGF-125C	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-127B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-129A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-129B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-130D	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-134A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-142A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-140A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-140B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-143A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-143B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-144A	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-144B	10 $\mu$ M	0
	12B-PGF-146A	5 $\mu$ M	0
	12B-PGF-146A	10 $\mu$ M	32.9 $\pm$ 9.71 (n=6)
12B-PGF-138A	10 $\mu$ M	0	

(가) 12B-PGL-79A의 분리정제

제2세부과제에서 인삼잎으로부터 12B-PGL-79A를 다음과 같이 분리정제하였다.



Scheme 1. 인삼잎으로부터 ginsenoside F1의 분리

(나) 12B-PGL-79A의 함량분석

12B-PGL-79A의 HPLC 함량을 분석한 결과 잎에는 0.36%, 꽃봉오리에는 0.21% 함유되어 있는 것을 알 수 있었다.

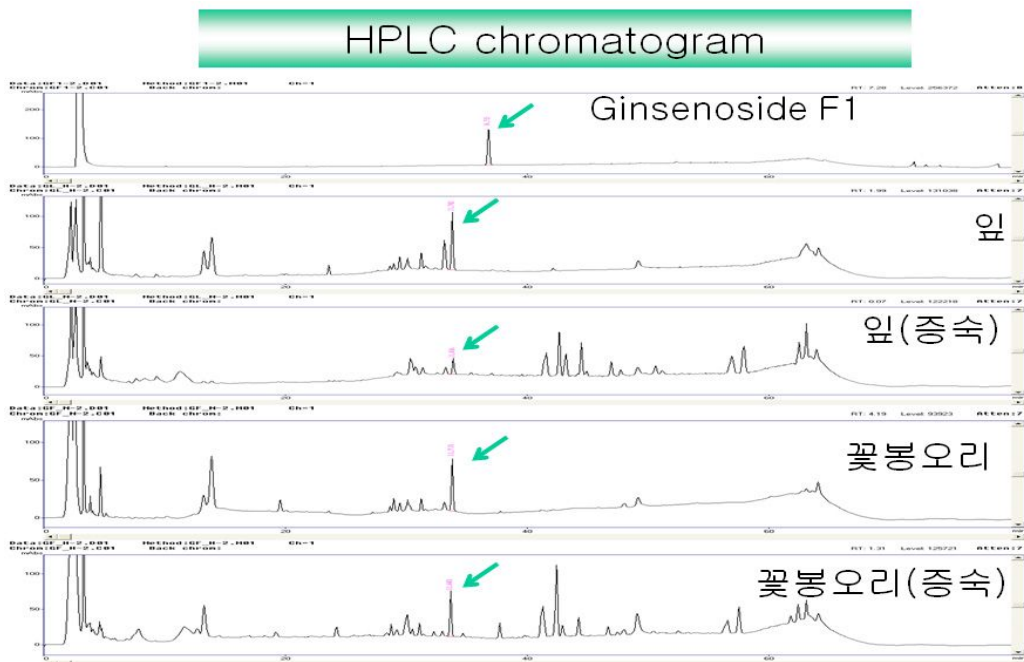
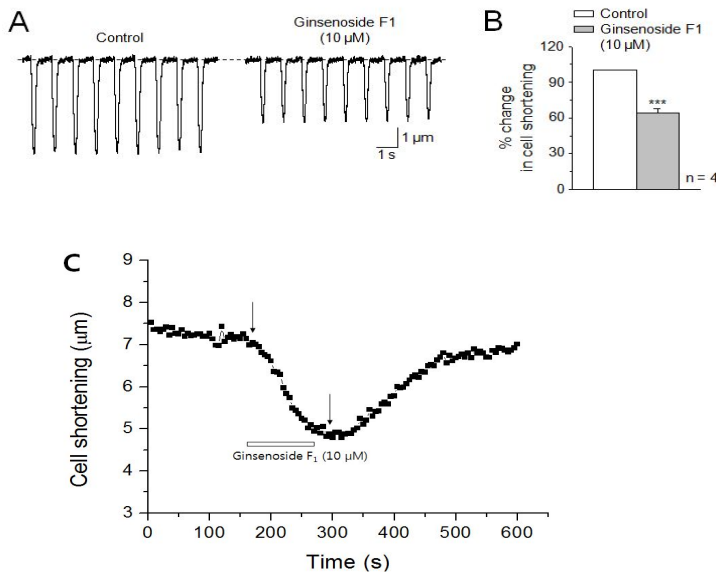


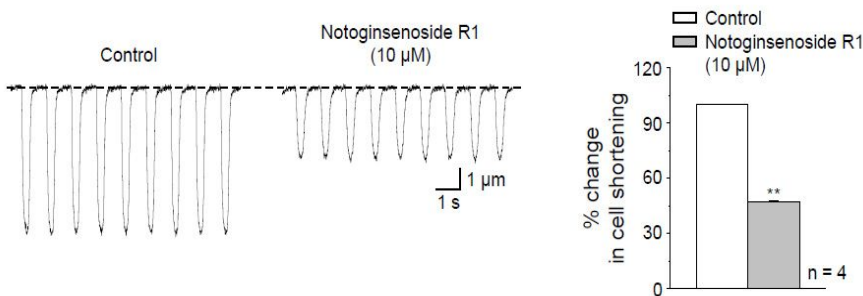
그림 23. 함량분석

(다) 심근세포의 수축력에 미치는 효능

12B-PGL-79A와 12B-PGL-83A(notoginsenoside R1)는 효능 10 μM 농도에서 수축력을 약 35%, 53% 각각 감소시켰으며, 그 결과를 그림 24와 25에 나타내었다.



**그림 24.** 인삼추출물에서 분리한 12B-PGL-79A에 의한 심실 근세포 수축력 증가효과 및 그 time course. A, 좌측 trace는 12B-PGL-79A (10 μM)을 처리하기 직전에 기록한 세포 수축 이완이며 우측은 물질을 처리 후 최대효과를 나타내는 지점에서 기록한 trace임. B, 4개의 세포에서 측정된 평균 변화 %를 나타냄.  $P < 0.001$  vs. control. C, 물질 효능의 time course. 화살표 위치에서 기록된 수축력 trace가 panel A에 보여짐.



**그림 25.** 12B-PGL-83A에 의한 수축력 억제. 좌측은 수축력 trace. 우측은 평균 억제효과.  $**P < 0.01$  vs control.

결과적으로 볼 때 심실 수축력 억제는 심박출량을 억제시켜 혈압을 떨어뜨리는 효과가 있을 것으로 기대되어 유력한 고혈압 치료제 후보물질로 사료된다.

## 5. 인삼복합제 개발

활성이 증강된 복합제를 개발하기 위하여 사포닌을 다량함유하고 있는 더덕, 도라지 등을 포함하는 복합제를 개발하였다.

복합제 1 : 인삼잎 3g, 증숙인삼잎 3g, 도라지 1g, 더덕 1g 외 5가지 약재로 구성됨.

복합제 2 : 인삼꽃봉오리 3g, 증숙인삼꽃봉오리 3g, 도라지 1g, 더덕 1g 외 5가지 약재로 구성됨.



이상과 같은 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

- ✓ 다량의 인삼지상부(잎, 꽃봉오리)를 채집하여 물질분리, 바이러스 억제활성 및 면역활성 검증을 위해 제2, 3세부과제 및 제1협동과제에 넘겨주었다. 또한 제형개발을 위해서 제2협동과제에 인삼지상부를 넘겨주었다.
- ✓ 인삼지상부(잎, 꽃봉오리) 증숙방법을 개발하였으며 증숙한 인삼지상부의 성분을 분석할 수 있는 분석조건을 확립한 바, 증숙한 인삼지상부에는 Rg3, Rg5 등 10여종 이상의 사포닌이 새로이 생성됨을 확인하였다.
- ✓ 벤조피란과 같은 발암성물질의 분석방법을 확립하였으며, 이러한 분석방법에 의해서 증숙한 인삼지상부를 분석한 결과 벤조피란 함량이 식약청 기준인 5ppb 이하를 만족하는 것을 확인하였다.
- ✓ 다량의 인삼지상부(잎, 꽃봉오리)를 채집한 후 증숙하여 물질분리, 바이러스 억제활성 및 면역활성 검증을 위해 제2, 3세부과제 및 제1협동과제에 넘겨주었다. 또한 제형개발을 위해서 제2협동과제에 인삼지상부를 넘겨주었다.
- ✓ 인삼지상부(잎, 꽃봉오리)의 산처리 증숙방법을 개발하였으며 증숙한 인삼지상부의 성분을 분석할 수 있는 분석조건을 확립한 바, 증숙한 인삼지상부에는 Rh1, Rh2, compound K 및 PPT가 다량 존재함을 알 수 있었다.
- ✓ 증숙한 인삼지상부는 항산화활성, 발모활성, 혈관내피세포 염증반응 억제활성 및 심근수축력 감소활성을 나타냄을 확인하였다. 특히 단일물질인 ginsenoside F1이 심근수축력 감소활성이 뛰어난을 관찰하여 향 후 고혈압 치료제로 개발가능성이 있음을 확인하였다.
- ✓ 복합제 1, 2를 개발하였다.

## 제 2 절. 인삼지상부의 활성물질의 분리 정제 및 구조동정

### 1. 인삼잎에 존재하는 인삼사포닌의 성분분석

#### 가. 인삼잎의 추출 및 분획

제1세부과제로부터 넘겨받은 인삼잎 2.3 kg을 MeOH (50 °C, 3 x 9 Liter, 8 hr)로 초음파 추출하고 감압농축하여 메탄올 엑스 630 g을 얻었다. 메탄올 엑스를 물에 현탁하고 헥산과 디클로로메탄으로 순차적으로 분획하여 헥산 분획 (45.0 g), 디클로로메탄 분획 (20.0 g)을 얻었다. 물 분획은 물-메탄올 용액 (0:100 - 100:0)을 gradient로 이용하여 Dianion HP 20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 6개의 분획을 얻었다 (Fr. 72C-72 H).

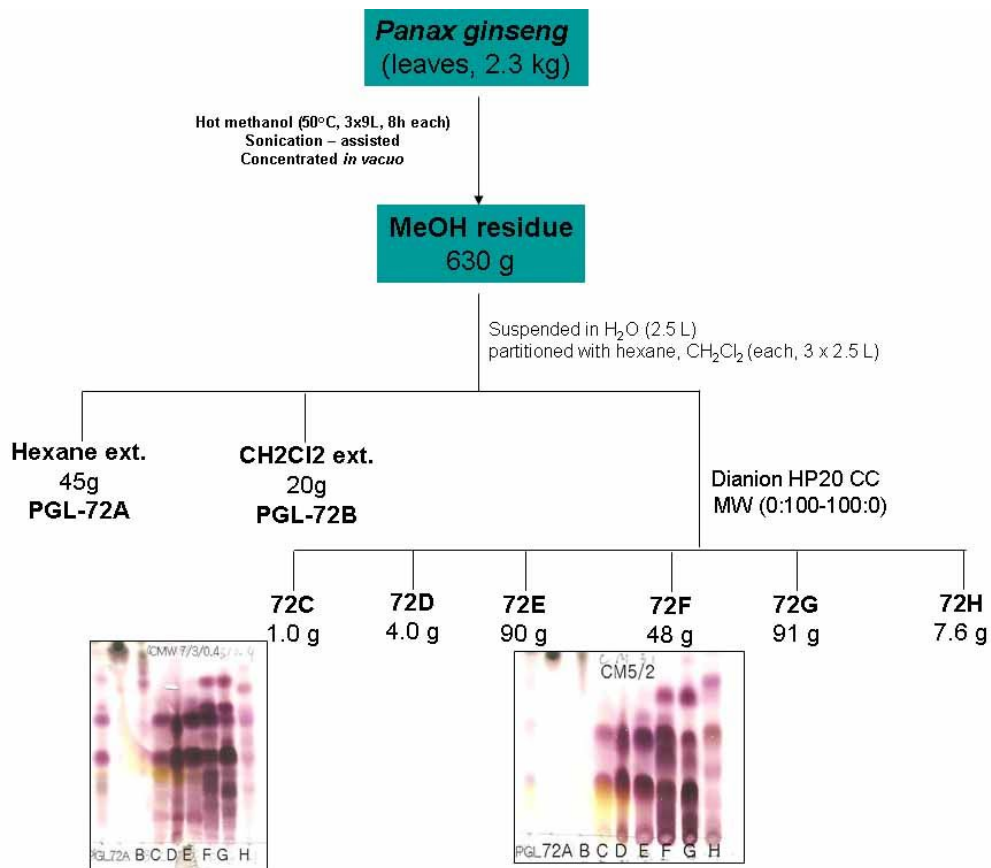


그림 26. Purification of compounds of Panax Ginseng's leaf

#### (1) 분획72C의 분리정제

분획 72C를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여

순수 화합물 74B, 74C, 75A, 76A를 분리정제하였다.

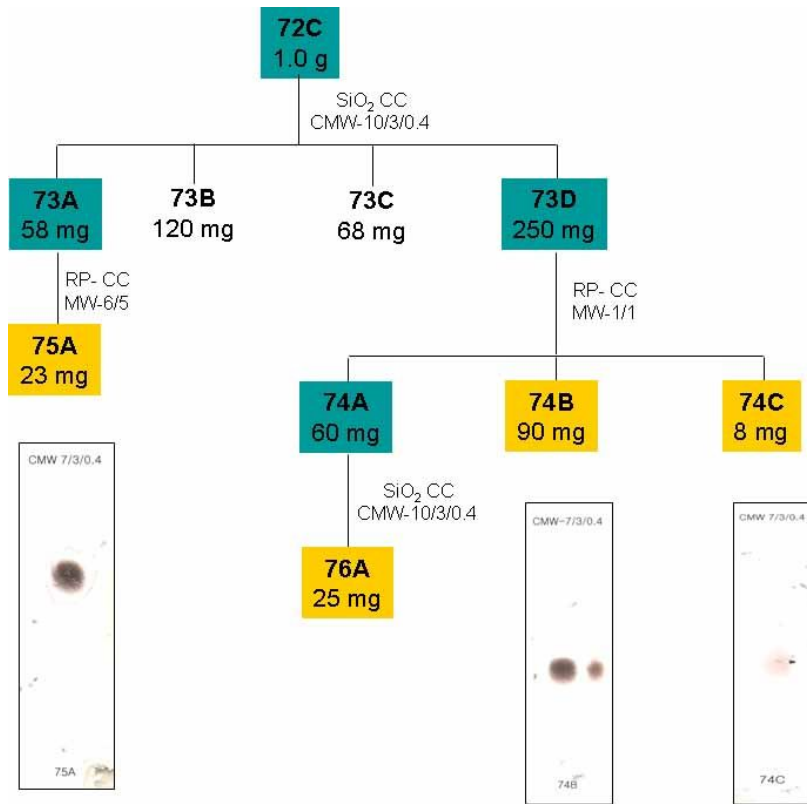
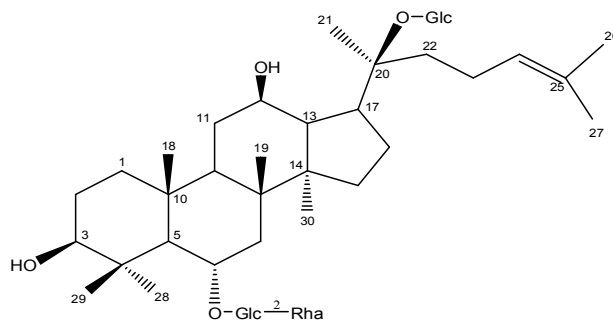


그림 27. Purification of compounds of Panax Ginseng's leaf

(가) 74B의 구조동정

74B 화합물을 각종 물리화학적 데이터와 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 등의 spectrum을 이용하여 구조를 동정한 결과 Ginsenoside Re [(20S)-Damara-24-ene-3β,6α,12β,20β-tetrol-6-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl]-20-O-β-D-glucopyranoside]로 동정하였다.



**ginsenoside Re**

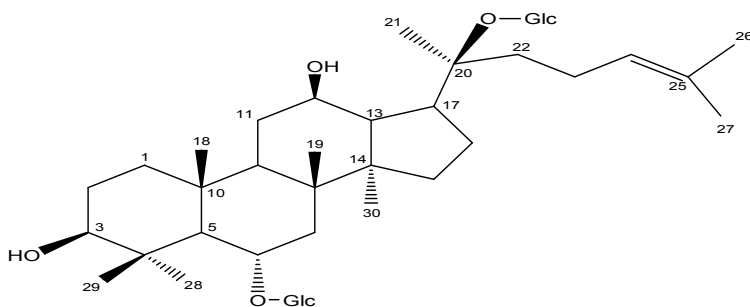
White powder, Mp.: 201-203°C, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: 0 (c 0.90, MeOH), C<sub>48</sub>H<sub>82</sub>O<sub>18</sub>, MW947.165

Table 14.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of 75B.

Position	$^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD,100MHz)	$^1\text{H}$ (CD <sub>3</sub> OD,400MHz)	
<b>Aglycone</b>			
1	40.23		
2	27.52		
3	79.07	3.56, 1H, dd (J=12.0, 5.2)	
4	40.35		
5	61.41		
6	79.14	4.36, 1H, dt (J=12.0, 3.6)	
7	46.05		
8	41.94		
9	50.26		
10	40.23		
11	30.92		
12	71.19	4.08, 1H, m	
13	49.37		
14	52.46		
15	31.94		
16	27.26		
17	53.10		
18	17.32	1.05, 3H, s	
19	17.68	0.90, 3H, s	
20	84.90		
21	22.82	1.58, 3H, s	
22	36.62		
23	24.22		
24	125.83	5.06, 1H, br t	
25	132.30		
26	25.87	1.30, 3H, s	
27	17.95	1.58, 3H, s	
28	31.74	1.64, 3H, s	
29	17.20	0.94, 3H, s	
30	17.44	0.91, 3H, s	
<b>Sugar moiety</b>			
6-Glc	1	101.60	4.58, 1H, d (J=7.6)
	2	79.74	
	3	77.92	
	4	72.42	
	5	75.38	
	6	63.06	
Rha	1	101.60	5.28, 1H, brs
	2	71.85	
	3	72.20	
	4	73.99	
	5	69.63	
	6	18.03	1.18, 3H, d (J=7.2)
20-Glc	1	98.30	4.55, 1H, d (J=8.0)
	2	74.85	
	3	78.07	
	4	71.85	
	5	78.21	
	6	62.52	

(나) 75A의 구조동정

75A 화합물을 각종 물리화학적 데이터와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS 등의 spectrum을 해석하여 구조를 동정한 결과 Ginsenoside Rg1 [(20S)-Damara-24-ene-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ ,20 $\beta$ -tetrol-6,20-Di-O-- $\beta$ -D-glucoopyranoside]으로 동정하였다.



Ginsenoside Rg1

White powder,

Mp.: 194-196°C

$[\alpha]_D^{25}$ : +32 ( c 0.90, MeOH)

$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$ , MW801

Table 15. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of 75A.

Position	<sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD,100MHz)	<sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD,400MHz)	
<b>Aglycone</b>			
1	40.36		
2	27.59		
3	79.07	3.60, 1H, m	
4	40.49		
5	61.77		
6	80.93	4.04, 1H, dt (J=12.0, 3.6)	
7	45.28		
8	41.86		
9	50.58		
10	40.19		
11	30.95		
12	71.19	3.76, 1H, m	
13	49.86		
14	52.44		
15	31.53		
16	27.25		
17	53.12		
18	16.13	1.05, 3H, s	
19	17.84	0.90, 3H, s	
20	84.90		
21	22.82	1.58, 3H, s	
22	36.62		
23	24.22		
24	125.85	5.06, 1H, br t	
25	132.29		
26	25.90	1.30, 3H, s	
27	17.98	1.58, 3H, s	
28	31.39	1.64, 3H, s	
29	17.14	0.94, 3H, s	
30	17.64	0.91, 3H, s	
<b>Sugar moiety</b>			
6-Glc	1	105.56	4.31, 1H, d (J=8.0)
	2	75.48	
	3	78.22	
	4	71.86	
	5	77.92	
	6	62.90	
20-Glc	1	98.30	4.55, 1H, d (J=8.0)
	2	75.38	
	3	77.65	
	4	71.70	
	5	77.92	
	6	62.52	

(2) 분획 72F의 분리정제

분획 72F를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 순수 화합물 79A, 80D, 81A, 81B, 83A를 분리정제하였다.

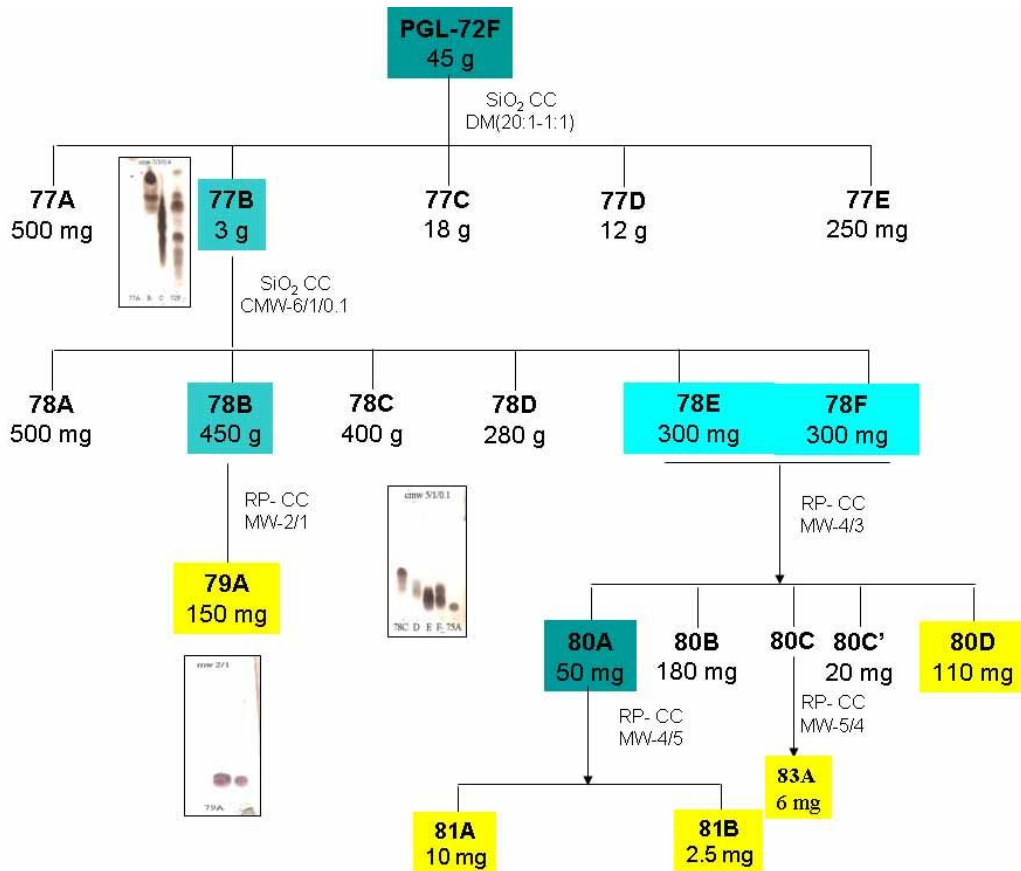
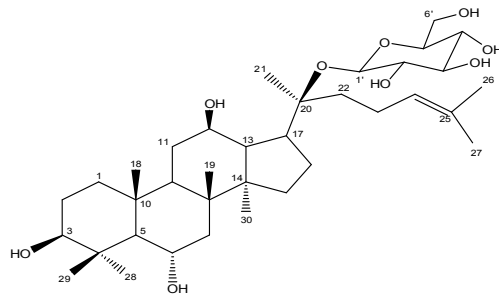


그림 28. Purification of compounds of Panax Ginseng's leaf

(가) 79A의 구조동정

79A 화합물을 각종 물리화학적 데이터와 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS 등의 spectrum을 해석하여 구조를 동정한 결과 Ginsenoside F1

[(20S)-Damara-24-ene-3β,6α,12β,20β-tetrol-20-O-β-D-glucopyranoside]으로 동정하였다.



Ginsenoside F1

White powder

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: +36 (c 0.90, MeOH)

C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>9</sub>, MW638.88

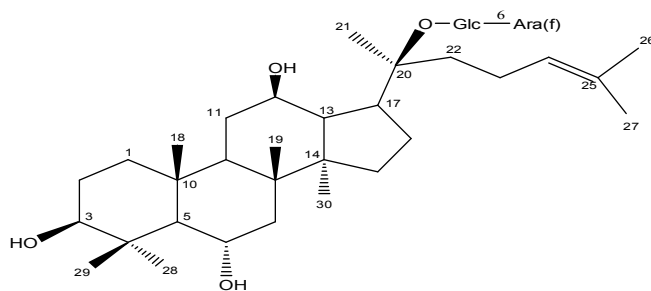
Table 16.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of 79A.

Position	$^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD,100MHz)	$^1\text{H}$ (CD <sub>3</sub> OD,400MHz)
<b>Aglycone</b>		
1	40.12	
2	27.75	
3	79.50	3.58, 1H, dd (J=12.0, 5.2)
4	40.49	
5	62.10	
6	68.86	4.85, 1H, overlapped
7	47.17	
8	41.99	
9	50.44	
10	40.48	
11	30.90	
12	71.17	3.98, 1H, dt-like (J=10.8, 6.8)
13	49.39	
14	52.34	
15	31.46	
16	27.13	
17	53.08	
18	17.25	1.25, 3H, s
19	17.68	0.92, 3H, s
20	84.86	
21	22.82	1.58, 3H, s
22	36.59	
23	24.20	
24	125.83	5.06, 1H, br t
25	132.27	
26	25.90	1.30, 3H, s
27	17.96	1.58, 3H, s
28	31.61	1.64, 3H, s
29	16.14	1.04, 3H, s
30	17.68	0.92, 3H, s
<b>20-Glc</b>		
1	98.27	4.55, 1H, d (J=8.0)
2	75.36	
3	77.91	
4	71.78	
5	78.22	
6	62.52	



(나) 80D의 구조동정

80D 화합물을 각종 물리화학적 데이터와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS 등의 spectrum을 해석하여 구조를 동정한 결과 Ginsenoside F5  
[(20*S*)-Damara-24-ene-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ ,20 $\beta$ -tetrol-20-*O*-[ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside]으로 동정하였다.



Ginsenoside F5

White powder

Mp.: 189-190°C

$\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$ , MW 770.996

Table 17.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of 80D.

Position	$^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD,100MHz)	$^1\text{H}$ (CD <sub>3</sub> OD,400MHz)	
<b>Aglycone</b>			
1	40.09		
2	27.71		
3	79.47	3.59, 1H, dd (J=12.0, 5.2)	
4	40.42		
5	62.06		
6	68.16	4.80, 1H, overlapped	
7	47.14		
8	41.92		
9	50.42		
10	40.09		
11	30.63		
12	71.52	4.00, 1H, m	
13	49.85		
14	52.22		
15	31.46		
16	27.18		
17	53.79		
18	17.73	1.03, 3H, s	
19	17.64	0.91, 3H, s	
20	84.77		
21	22.39	1.24, 3H, s	
22	36.68		
23	23.79		
24	125.97	5.09, 1H, br t	
25	132.17		
26	25.96	1.31, 3H, s	
27	18.01	1.58, 3H, s	
28	31.46	1.64, 3H, s	
29	16.15	0.91, 3H, s	
30	17.39	0.91, 3H, s	
<b>Sugar moiety</b>			
20-Glc	1	97.94	4.54, 1H, d (J=8.0)
	2	75.20	
	3	78.47	
	4	71.85	
	5	76.28	
	6	68.84	
Ara(f)	1	110.77	4.88, 1H, brs
	2	83.10	
	3	78.81	
	4	85.68	
	5	62.89	

(3) 분획 77D의 분리정제

분획 77D를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 순수 화합물 87A를 분리정제하였다.

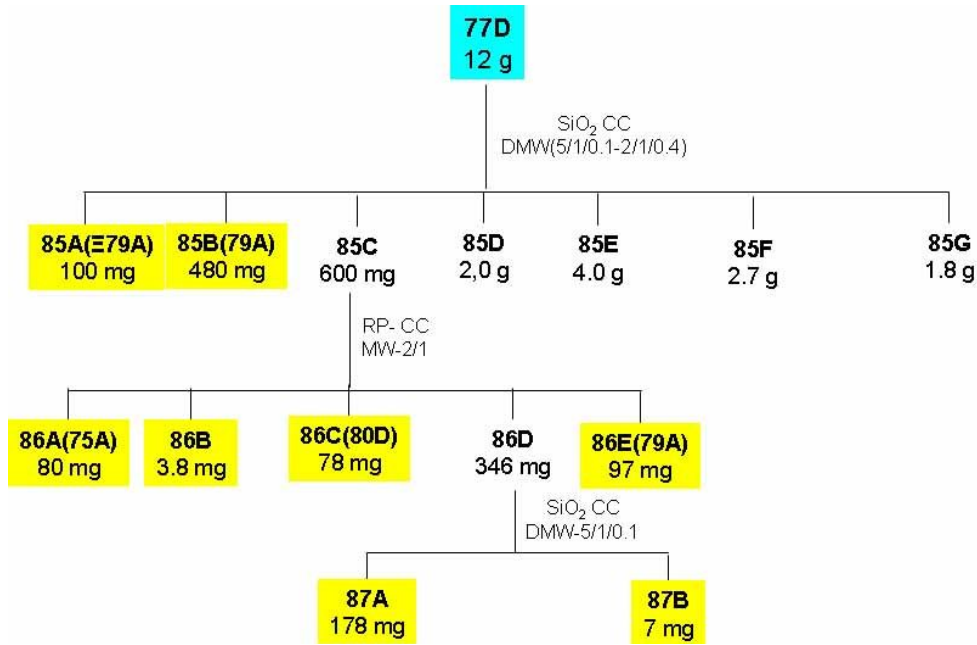
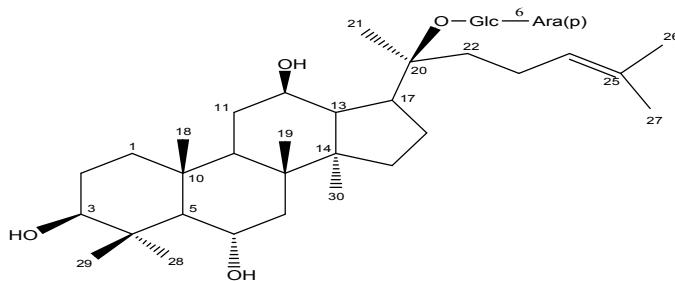


그림 29. Purification of compounds of Panax Ginseng's leaf

(가) 87A의 구조동정

87A 화합물을 각종 물리화학적 데이터와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS 등의 spectrum을 해석하여 구조를 동정한 결과 Ginsenoside F3 [(20S)-Damara-24-ene-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ ,20 $\beta$ -tetrol-20-O-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside]으로 동정하였다.



Ginsenoside F3

White solid,  $[\alpha]_D^{25}$ : +26.5 (c 0.98, MeOH),  $\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$ , MW 770.996

표 18.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of 87A.

Position	$^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD,100MHz)	$^1\text{H}$ (CD <sub>3</sub> OD,400MHz)	
<b>Aglycone</b>			
1	40.17		
2	27.77		
3	79.56	3.75, 1H, m	
4	40.50		
5	62.13		
6	68.92	4.80, 1H, overlapped	
7	47.21		
8	42.00		
9	50.51		
10	40.17		
11	30.71		
12	71.57	3.94, 1H, m	
13	49.88		
14	52.29		
15	31.49		
16	27.26		
17	52.85		
18	17.77	0.97, 3H, s	
19	17.67	0.85, 3H, s	
20	84.96		
21	22.39	1.18, 3H, s	
22	36.78		
23	23.87		
24	125.95	5.04, 1H, br t	
25	132.34		
26	25.96	1.27, 3H, s	
27	18.01	1.53, 3H, s	
28	31.49	1.59, 3H, s	
29	16.17	0.85, 3H, s	
30	17.42	0.85, 3H, s	
<b>Sugar moiety</b>			
20-Glc	1	98.13	4.50, 1H, d (J=7.6)
	2	75.26	
	3	78.51	
	4	71.57	
	5	76.54	
	6	69.19	
Ara(p)	1	104.52	4.25, 1H, d (6.0)
	2	72.17	
	3	73.95	
	4	68.92	
	5	65.82	

(4) 최종분리 물질

상기와 같은 방법으로 물질을 분리 및 정제하여 인삼잎으로부터 20종의 화합물을 분리정제하여 구조를 동정하였다. 총 20종의 화합물 중에서 17종의 화합물은 사포닌 화합물이었으며 2종의 화합물은 flavonoid 화합물로, 1종의 화합물은 steroid 화합물로 구조

동정하였다. 17종의 화합물 중 1종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하여 SCI 논문에 투고하였다.

## 2. 인삼 꽃봉오리에 존재하는 인삼사포닌의 성분분석

### 가. 인삼 꽃봉오리의 추출 및 분획

제1세부과제로부터 넘겨받은 인삼 꽃봉오리 1.2 kg을 MeOH (50 °C, 3 x 5 Liter, 8 hr)로 초음파 추출하고 감압농축하여 메탄올 엑스 204 g을 얻었다. 메탄올 엑스를 물에 현탁하고 헥산과 디클로로메탄으로 순차적으로 분획하여 헥산 분획 (29.0 g), 디클로로메탄 분획 (9.0 g)을 얻었다. 물 분획은 물-메탄올 용액 (0:100 - 100:0)을 gradient로 이용하여 Dianion HP 20 컬럼크로마토그래피를 수행하여 5개의 분획을 얻었다 (Fr. PGF 111D-111H).

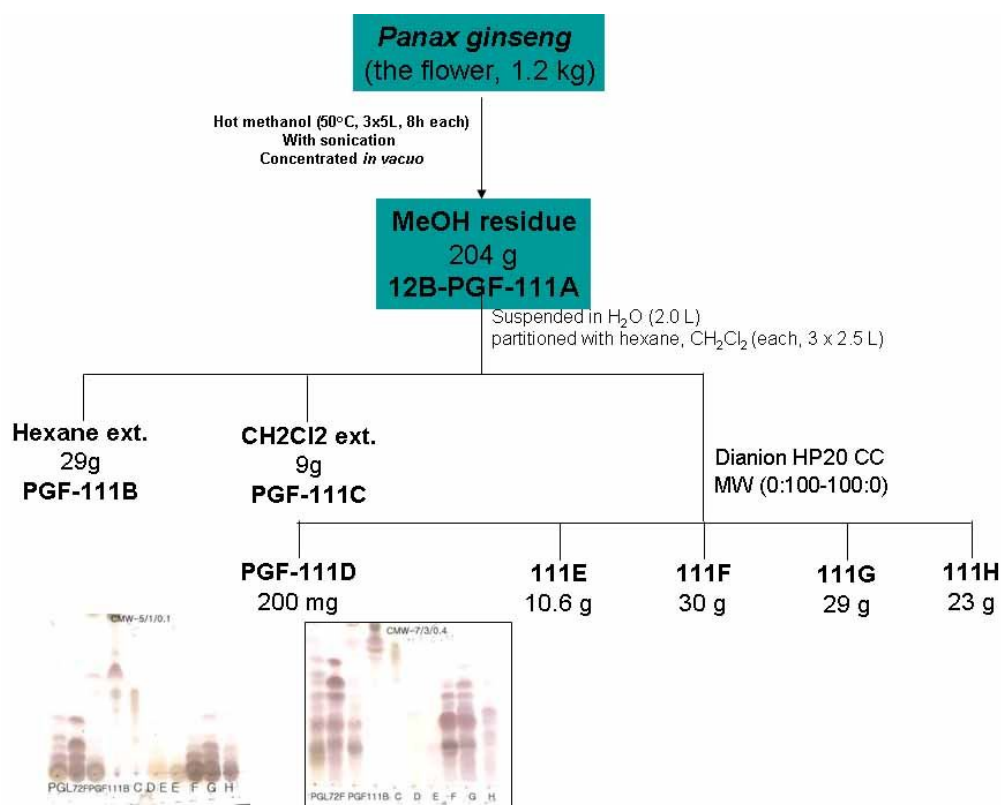


그림 30. Purification of compounds of Panax Ginseng's flower bud

(1) 분획 111F의 분리정제

분획 111F를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 순수 화합물 126A를 분리정제하였다.

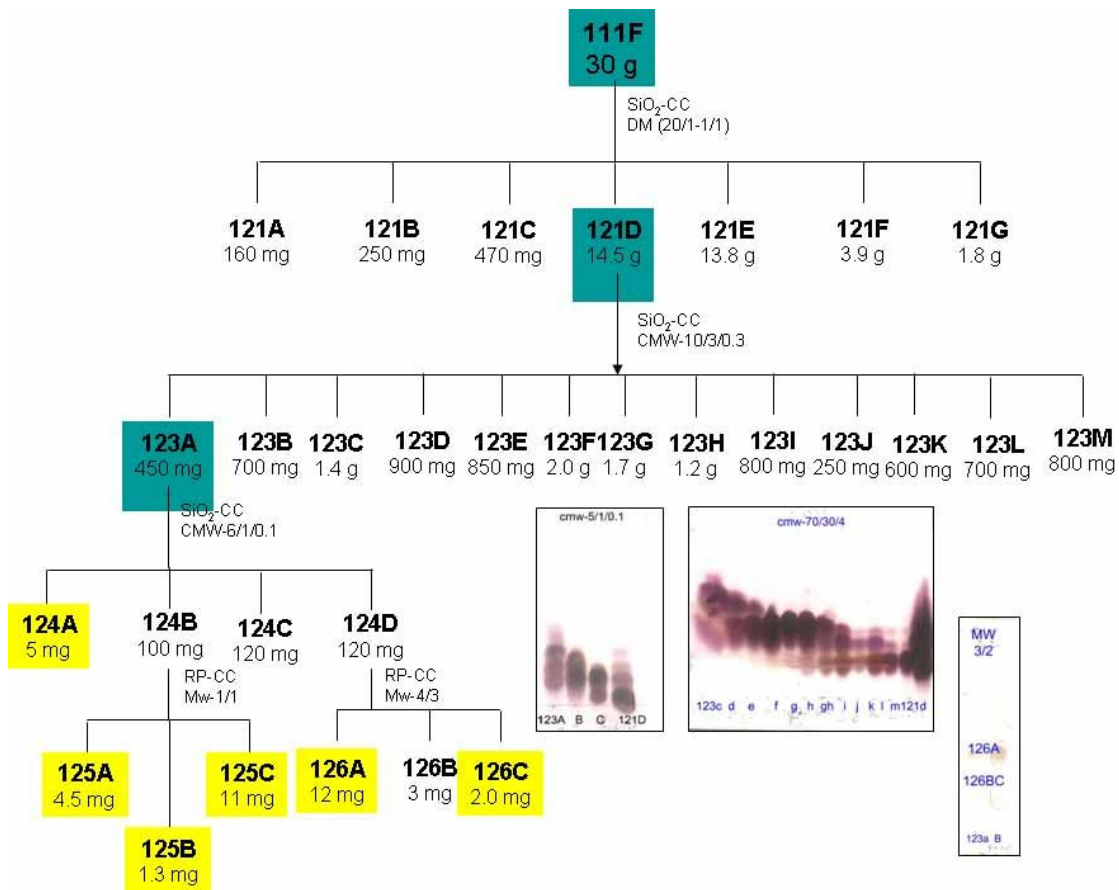
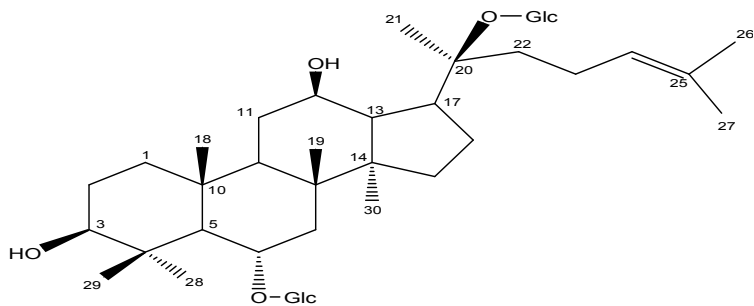


그림 31. Purification of compounds of Panax Ginseng's flower bud

(가) 126A의 구조동정

126A 화합물을 각종 물리화학적 데이터와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  등의 spectrum을 이용하여 구조를 동정한 결과 Ginsenoside Rg1 [(20S)-Damara-24-ene-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ ,20 $\beta$ -tetrol-6,20-Di-O- $\beta$ -D-glucopyranoside]으로 동정하였다.



Ginsenoside Rg1

White powder

Mp.: 194 - 196°C

$[\alpha]_D^{25}$ : +32 ( c 0.90, MeOH)

$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$ , MW801

Table 19. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of 126A.

Position	<sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD,100MHz)	<sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD,400MHz)	
<b>Aglycone</b>			
1	40.36		
2	27.59		
3	79.07	3.60, 1H, m	
4	40.49		
5	61.77		
6	80.93	4.04, 1H, dt (J=12.0, 3.6)	
7	45.28		
8	41.86		
9	50.58		
10	40.19		
11	30.95		
12	71.19	3.76, 1H, m	
13	49.86		
14	52.44		
15	31.53		
16	27.25		
17	53.12		
18	16.13	1.05, 3H, s	
19	17.84	0.90, 3H, s	
20	84.90		
21	22.82	1.58, 3H, s	
22	36.62		
23	24.22		
24	125.85	5.06, 1H, br t	
25	132.29		
26	25.90	1.30, 3H, s	
27	17.98	1.58, 3H, s	
28	31.39	1.64, 3H, s	
29	17.14	0.94, 3H, s	
30	17.64	0.91, 3H, s	
<b>Sugar moiety</b>			
6-Glc	1	105.56	4.31, 1H, d (J=8.0)
	2	75.48	
	3	78.22	
	4	71.86	
	5	77.92	
	6	62.90	
20-Glc	1	98.30	4.55, 1H, d (J=8.0)
	2	75.38	
	3	77.65	
	4	71.70	
	5	77.92	
	6	62.52	



(2) 분획 123G의 분리정제

분획 123G를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 순수 화합물 127B를 분리정제하였다.

또한 분획 123B를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 순수 화합물 128C를 분리정제하였다. 화합물 128C는 구조동정결과 앞에서 분리된 Ginsenoside F5로 동정하였다.

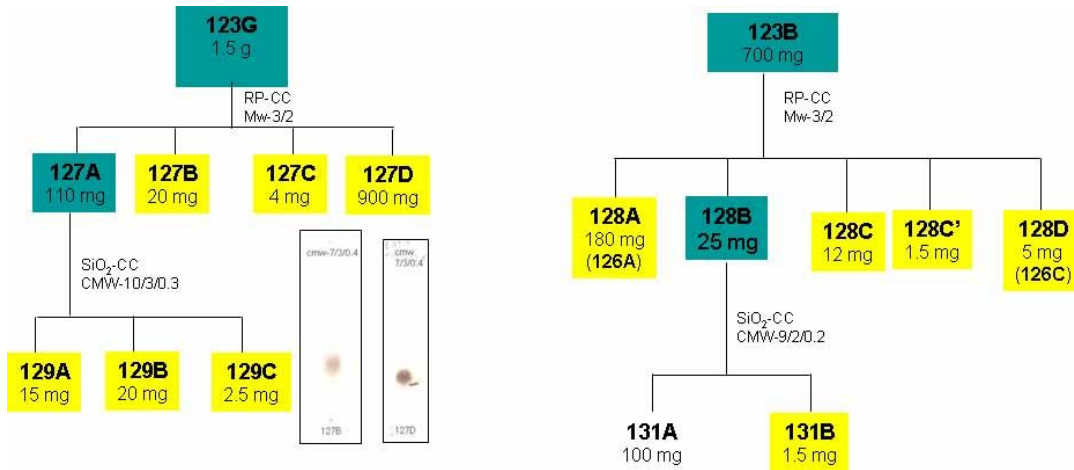
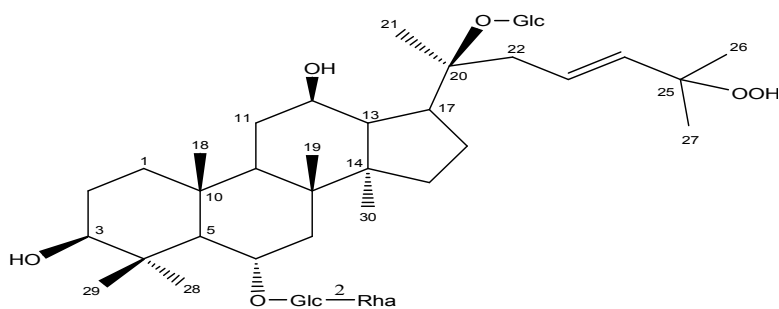


그림 32. Purification of compounds of Panax Ginseng's flower bud

(가) 127B의 구조동정

127B 화합물을 각종 물리화학적 데이터와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  등의 spectrum을 이용하여 구조를 동정한 결과 Floralginsenoside I

[(20*S*)-Damara-23(24)-ene-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ ,20 $\beta$ -tetraol-25-hydroperoxyl-6-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-20-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside]으로 동정하였다.



Floralginsenoside I

White amorphous powder

$[\alpha]_D^{25}$ : +4.7 (c 0.48, MeOH)

$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{20}$ , MW 978

표 20. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of 127B.

Position	<sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD,100MHz)	<sup>1</sup> H ( CD <sub>3</sub> OD,400MHz)	
<b>Aglycone</b>			
1	39.71		
2	28.06		
3	78.62	3.48, 1H, m	
4	39.94		
5	61.44		
6	74.01	4.28, 1H, m	
7	46.24		
8	41.48		
9	49.31		
10	40.28		
11	30.97		
12	70.51	4.02, 1H, m	
13	49.85		
14	49.95		
15	30.80		
16	27.07		
17	51.77		
18	17.52	1.02, 3H, s	
19	17.92	1.13, 3H, s	
20	84.57		
21	23.56	1.46, 3H, s	
22	40.24		
23	127.38	5.67, 1H, m	
24	139.13	5.52, 1H, br d, J = 16.0 Hz	
25	81.55		
26	26.12	1.54, 3H, s	
27	26.52	1.59, 3H, s	
28	31.95	2.01, 3H, s	
29	16.64	1.60, 3H, s	
30	17.31	0.93, 3H, s	
<b>Sugar moiety</b>			
20-Glc	1	98.60	4.55, 1H, d (J=8.0)
	2	75.52	
	3	78.91	
	4	71.99	
	5	78.62	
	6	63.38	
6-Glc	1	101.61	4.60, 1H, d (J=7.4)
	2	79.71	
	3	78.91	
	4	72.72	
	5	78.62	
	6	63.38	
6-Rha	1	101.61	5.26, 1H, br s
	2	72.86	
	3	72.58	
	4	74.47	
	5	69.76	
	6	19.04	1.78, 3H, d (J=6.4)

(3) 최종분리 물질

상기와 같은 방법으로 물질을 분리 및 정제하여 인삼꽃봉오리로부터 21종의 화합물을 분리정제하여 구조를 동정하였다. 총 21종의 화합물 중에서 16종의 화합물은 사포닌 화합물이었으며 1종의 화합물은 flavonoid 화합물로 구조동정하였다. 16종의 화합물중 3종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하여 SCI 논문에 투고하였다.

### 3. 증숙 인삼잎에 존재하는 인삼사포닌의 성분분석

#### 가. 증숙 인삼잎의 추출, 분획 및 분리정제

제1세부과제로부터 넘겨받은 잘 건조된 증숙한 인삼잎을 MeOH (50 °C, 4 Liter, 3회)로 추출하고 감압농축하여 메탄올 엑스 160 g을 얻었다. 메탄올 엑스를 물에 현탁하고 디클로로메탄으로 분획하여 물층을 얻었다. 물 분획은 물-메탄올 용액 (0:100 - 100:0)을 gradient로 이용하여 Dianion HP 20 컬럼크로마토그래피를 수행하여 8개의 분획을 얻었다 (Fr. SPGL-181C - 181I)(그림 30).

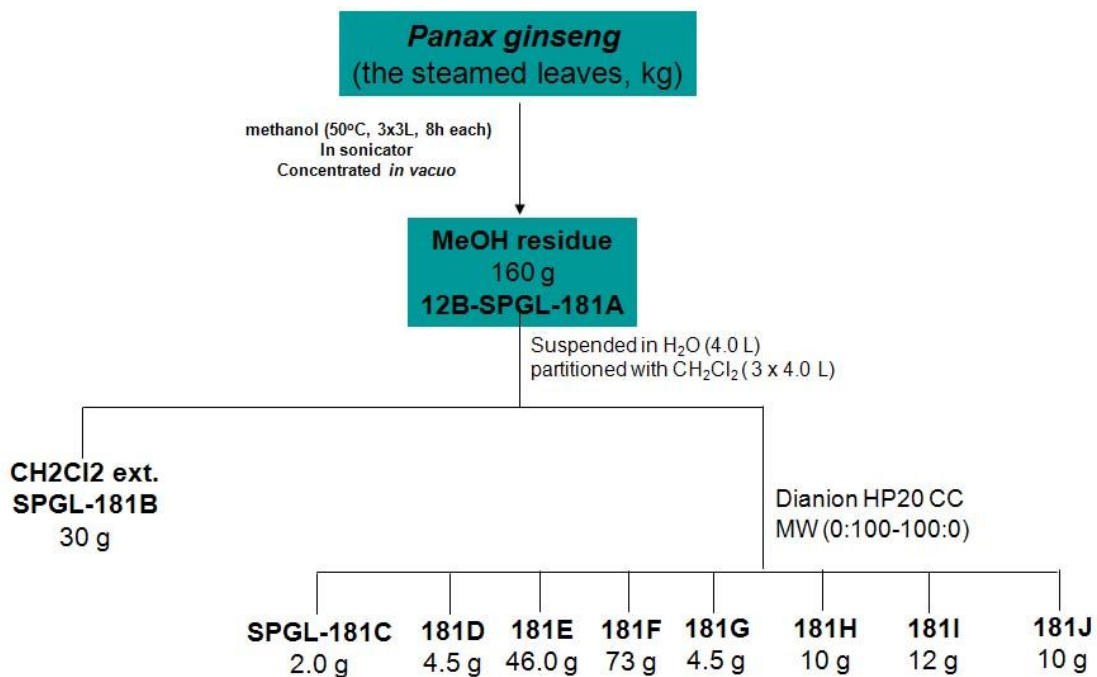


그림 33. 증숙인삼잎의 물질정제

(1) 분획 SPGL181G의 분리정제

분획 SPGL-181G를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 순수 화합물 183D ((20E)-ginsenoside F<sub>4</sub>), 183E (ginsenoside Rg<sub>3</sub>), 184A (notoginsenoside R<sub>10</sub>), 186A (ginsenoside SL<sub>5</sub> 신규물질이나 아직 보고하지 않은 것임)를 분리정제하여 구조를 동정하였다.

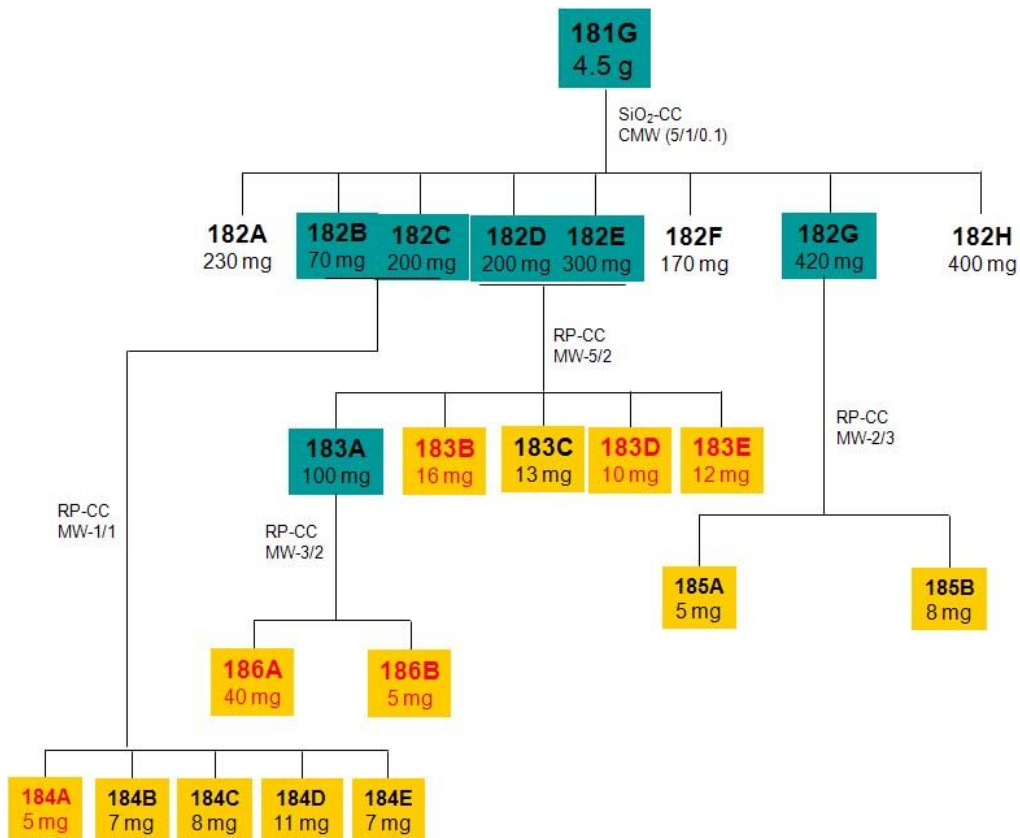


그림 34. 증숙인삼옆의 물질정제

(2) 분획 SPGL-181I의 분리정제

분획 SPGL-181I를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여

순수 화합물 188B (ginsenoside SL<sub>6</sub> 신규물질이나 아직 보고하지 않은 것임), 188C (ginsenoside SL<sub>7</sub> 신규물질이나 아직 보고하지 않은 것임), 188D (ginsenoside Rh<sub>1</sub>), 188E (notoginsenoside F<sub>1</sub>), 189A (ginsenoside Rh<sub>4</sub>), 189B (ginsenoside RS<sub>4</sub>), 190A (ginsenoside SL<sub>2</sub>, 신규물질), 190B (ginsenoside SL<sub>3</sub>, 신규물질), 190C ((20S)-ginsenoside Rg<sub>2</sub>), 190D ((20R)-ginsenoside Rg<sub>2</sub>)를 분리정제하여 구조를 동정하였다.

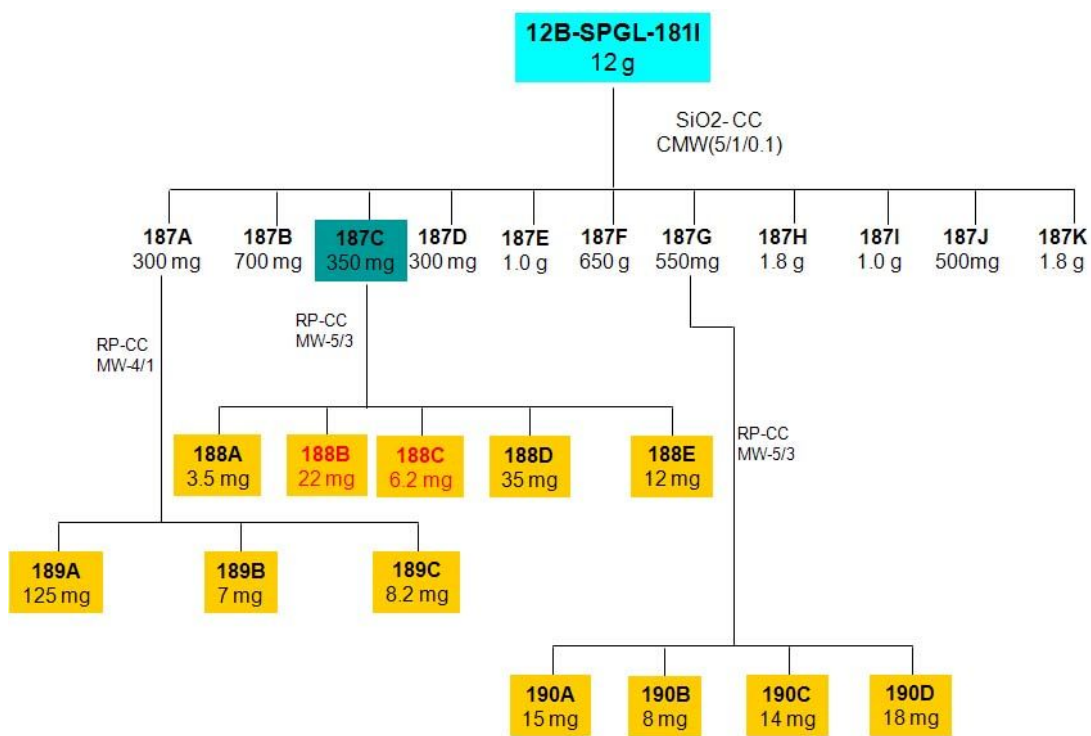
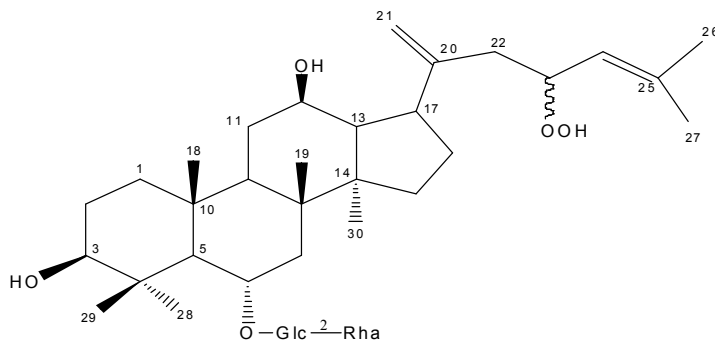


그림 35. 증숙인삼잎의 물질정제

(가) 신규물질 190A의 구조동정

190A 화합물을 각종 물리화학적 데이터와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS 등의 spectrum을 해석하여 구조를 동정한 결과 Damara-20(21),24-diene-23 $\xi$ -hydroperoxyl-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ -triol-6-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside]로 동정하였으며, Ginsenoside SL<sub>2</sub>로 명명하였다.



Ginsenoside SL<sub>2</sub>

White amorphous powder

$[\alpha]_D^{25}$  : -9.5 ( c 0.90, MeOH)

C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>14</sub>, MW 798

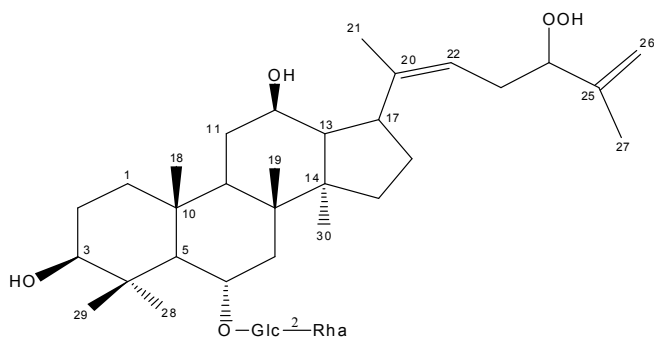
Table 21.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of Ginsenoside SL<sub>2</sub>.

Position	$^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD, 100 MHz)	$^1\text{H}$ (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz)	
1	40.26		
2	27.55		
3	79.16	3.68, 1H, dd (J=12.0, 4.0)	
4	40.36		
5	61.45		
6	74.86	4.35, 1H, m	
7	46.28		
8	42.10		
9	51.05		
10	40.48		
11	31.93		
12	73.76	4.08, 1H, m	
13	51.12		
14	52.29		
15	32.74		
16	25.02		
17	52.16		
18	17.30	1.29, 3H, s	
19	17.81	0.92, 3H, s	
20	154.79		
21	114.06	4.67, 1H, br s; 4.93, 1H, br s	
22	38.18		
23	90.07	4.25, m	
24	130.21	5.63, 1H, m	
25	137.01		
26	24.97	1.33, 3H, s	
27	17.81	1.59, 3H, s	
28	31.93	1.66, 3H, s	
29	17.06	1.10, 3H, s	
30	17.30	0.94, 3H, s	
6-Glc	1	101.62	4.64, 1H, d (J=7.2)
	2	79.74	
	3	78.09	
	4	72.44	
	5	79.09	
	6	63.11	
Rha	1	101.62	5.30, 1H, brs
	2	71.88	
	3	72.22	
	4	73.99	
	5	69.64	
	6	18.02	1.22, 3H, d (J=6.0)



(나) 190B의 구조동정

190B 화합물을 186A 화합물을 각종 물리화학적 데이터와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS 등의 spectrum을 해석하여 구조를 동정한 결과 (20E)-Damara-20(22),24-diene-24 $\xi$ -hydroperoxyl-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ -triol-6-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside]로 동정하였으며, Ginsenoside SL<sub>3</sub>로 명명하였다.



Ginsenoside SL<sub>3</sub>

White amorphous powder

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -9.5 (c 0.90, MeOH)

C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>14</sub>, MW 798

Table 22.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of 190B.

Position	$^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD, 100 MHz)	$^1\text{H}$ (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz)	
1	40.26		
2	27.54		
3	79.16	3.68, 1H, dd (J=12.0, 4.0)	
4	40.36		
5	61.45		
6	74.83	4.22, 1H, overlapped	
7	46.28		
8	42.15		
9	51.05		
10	40.48		
11	31.93		
12	73.76	4.08, 1H, m	
13	51.12		
14	52.29		
15	31.08		
16	25.96		
17	52.16		
18	17.30	1.33, 3H, s	
19	17.81	0.92, 3H, s	
20	142.56		
21	13.12	1.71, 3H, s	
22	121.92	5.10, m	
23	30.67		
24	90.09	4.35, m	
25	145.74		
26	113.91	4.88, 1H, s; 4.91, 1H, s	
27	17.77	2.15, 3H, s	
28	31.93	1.66, 3H, s	
29	17.15	1.11, 3H, s	
30	17.31	0.94, 3H, s	
6-Glc	1	101.62	4.64, 1H, d (J=7.2)
	2	79.74	
	3	78.09	
	4	72.44	
	5	79.09	
	6	63.11	
Rha	1	101.62	5.30, 1H, brs
	2	71.88	
	3	72.22	
	4	73.99	
	5	69.64	
	6	18.02	1.22, 3H, d (J=6.0)

(3) 분획187D의 분리정제

분획 187D를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 191A (ginsenoside SL<sub>8</sub> 신규물질이나 아직 보고하지 않은 것임), 191B-1 ((20R)-floralquinque A, ginsenoside SL<sub>1</sub>, 신규물질), 191B-2 (ginsenoside SF, 신규물질, 꽃봉오리에서도 분리됨), 192A (ginsenoside Rg<sub>6</sub>), 192B (ginsenoside F<sub>4</sub>)를 분리정제하여 구조를 동정하였다.

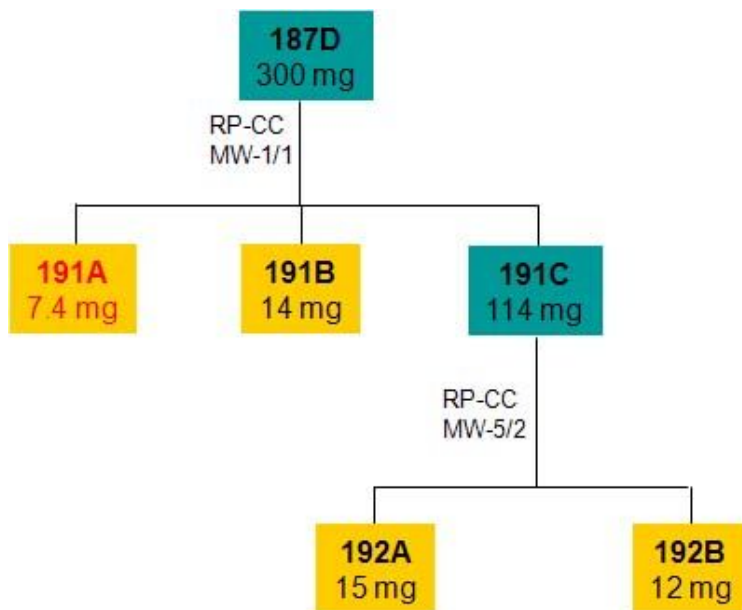
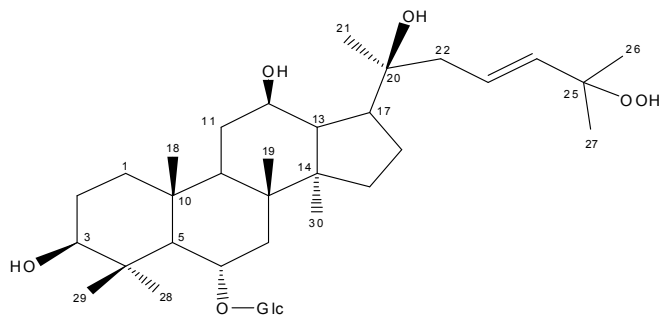


그림 36. 증숙인삼옆의 물질정제

(가) 신규화합물 191B-1의 구조동정

신규화합물 191B-1를 각종 물리화학적 데이터와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS 등의 spectrum을 해석하여 구조를 동정한 결과 (20*R*)-Damara-23-ene-25-hydroperoxyl-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ ,20 $\beta$ -tetraol-6-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside로 동정하였으며, Ginsenoside SL<sub>1</sub>로 명명하였다.



**Ginsenoside SL<sub>1</sub>**

White amorphous powder

$[\alpha]_D^{25}$ : + 21.8° (c 0.1, MeOH)

C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub>, MW 670

Table 23.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of 191B-1.

Position	$^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz)	$^1\text{H}$ ( CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz)	
<b>Aglycone</b>			
1	39.4		
2	27.7		
3	79.23	3.64, 1H, br dd, J = 12.0, 5.0 Hz	
4	40.6		
5	61.9		
6	80.0	4.63, 1H, m	
7	45.5		
8	41.9		
9	50.0		
10	40.3		
11	32.1		
12	71.8	4.10, 1H, m	
13	49.6		
14	51.0		
15	31.5		
16	26.9		
17	52.7		
18	17.7	1.00, 3H, s	
19	17.3	1.12, 3H, s	
20	75.3		
21	22.42	1.10, 3H, s	
22	40.6		
23	127.2	5.82, 1H, m	
24	138.6	5.63, 1H, br d, J = 16.0 Hz	
25	82.7		
26	25.2	1.30, 3H, s	
27	25.1	1.29, 3H, s	
28	31.6	1.33, 3H, s	
29	16.2	1.10, 3H, s	
30	17.3	0.90, 3H, s	
<b>Sugar moiety</b>			
6-Glc	1	105.7	4.35, 1H, d, J = 8.0 Hz
	2	75.6	
	3	77.8	
	4	72.1	
	5	79.7	
	6	63.0	

(4) 분획 181J의 분리정제

분획 181J를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 194A-1 (ginsenoside Rh<sub>3</sub>), 194A-2 (ginsenoside Rk<sub>2</sub>), 195A-1 ((20S)-ginsenoside Rh<sub>2</sub>), 195A-2 ((20R)-ginsenoside Rh<sub>2</sub>)를 분리정제하여 구조를 동정하였다.

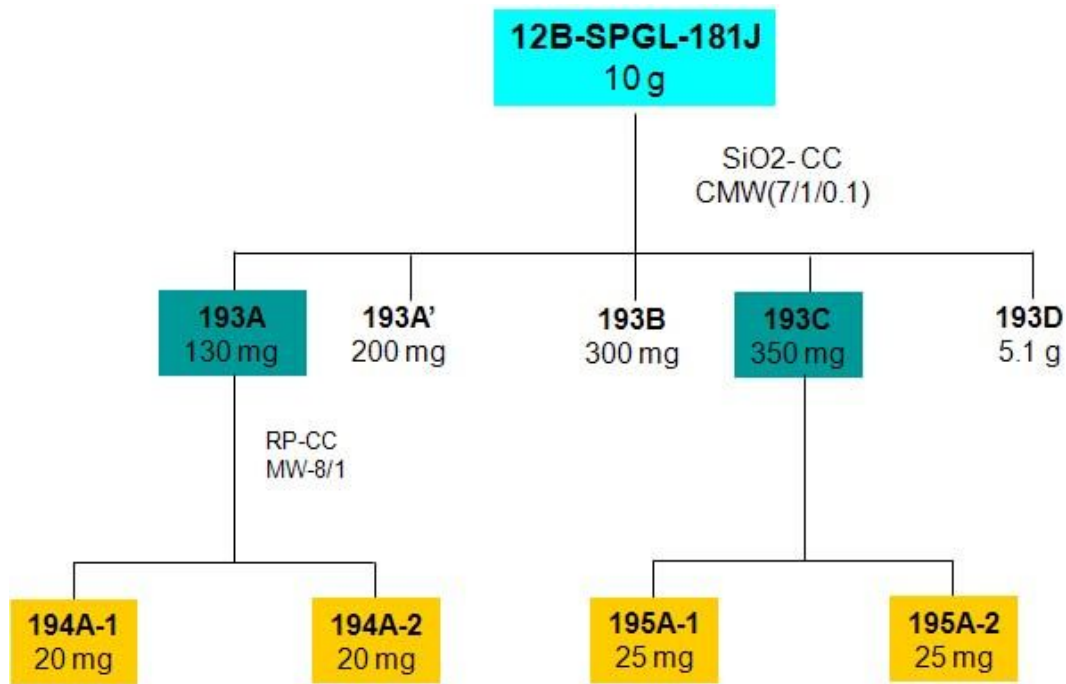


그림 37. 증숙인삼옆의 물질정제

#### 4. 증숙 인삼꽃봉오리에 존재하는 인삼사포닌의 성분분석

##### 가. 증숙 인삼꽃봉오리의 추출, 분획 및 분리정제

제1세부과제에서 넘겨받은 잘 건조된 증숙한 인삼꽃봉오리 2.7 kg을 MeOH (50 °C, 5 Liter, 8시간, 3회)로 추출하고 감압농축하여 메탄올 엑스 850 g을 얻었다. 메탄올 엑스를 물에 현탁하고 디클로로메탄으로 분획하여 디클로로메탄 분획과 물 분획을 얻었다. 물 분획은 물-메탄올 용액 (0:100 - 100:0)을 gradient로 이용하여 Dianion HP 20 컬럼크로마토그래피를 수행하여 6개의 분획을 얻었다 (Fr. SPGF-155C - 155H).

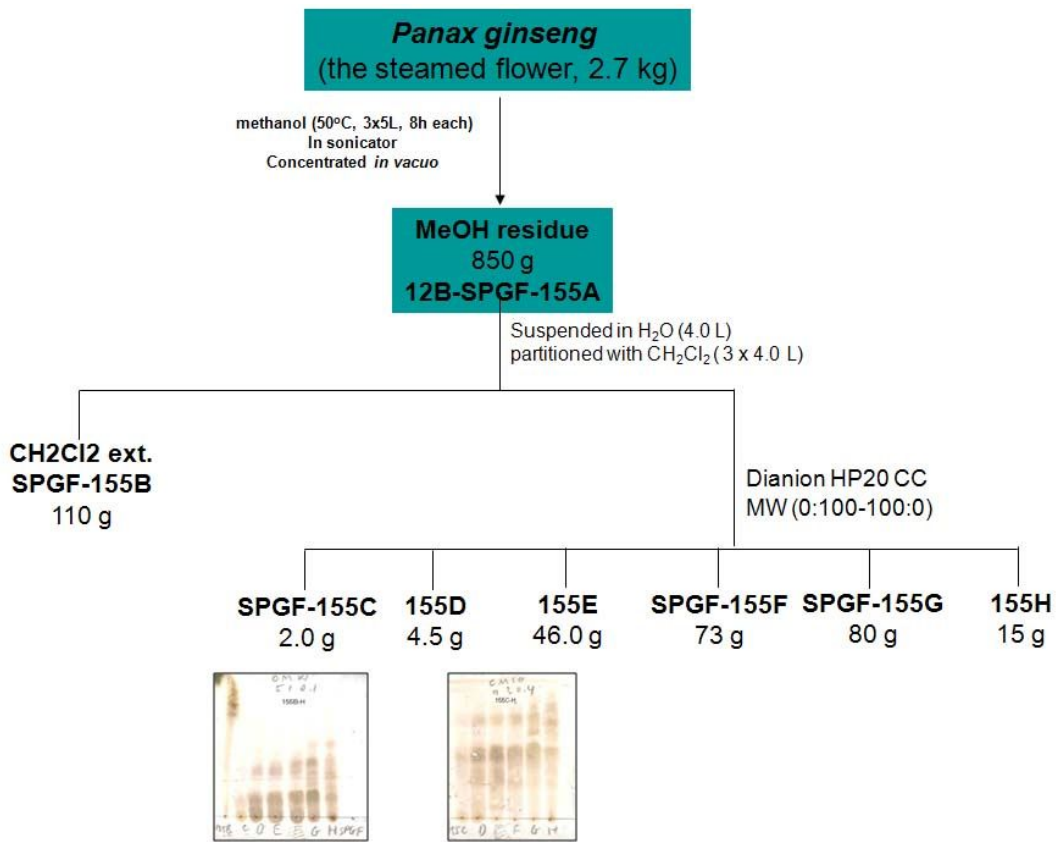


그림 38. 증숙인삼꽃봉오리의 물질정제

(1) 분획 155E의 분리정제

분획 155E를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 순수 화합물 159B-1 (ginsenoside Rh<sub>4</sub>), 159B-2 (ginsenoside Rk<sub>3</sub>), 160C (ginsenoside F<sub>1</sub>)를 분리정제하였다.

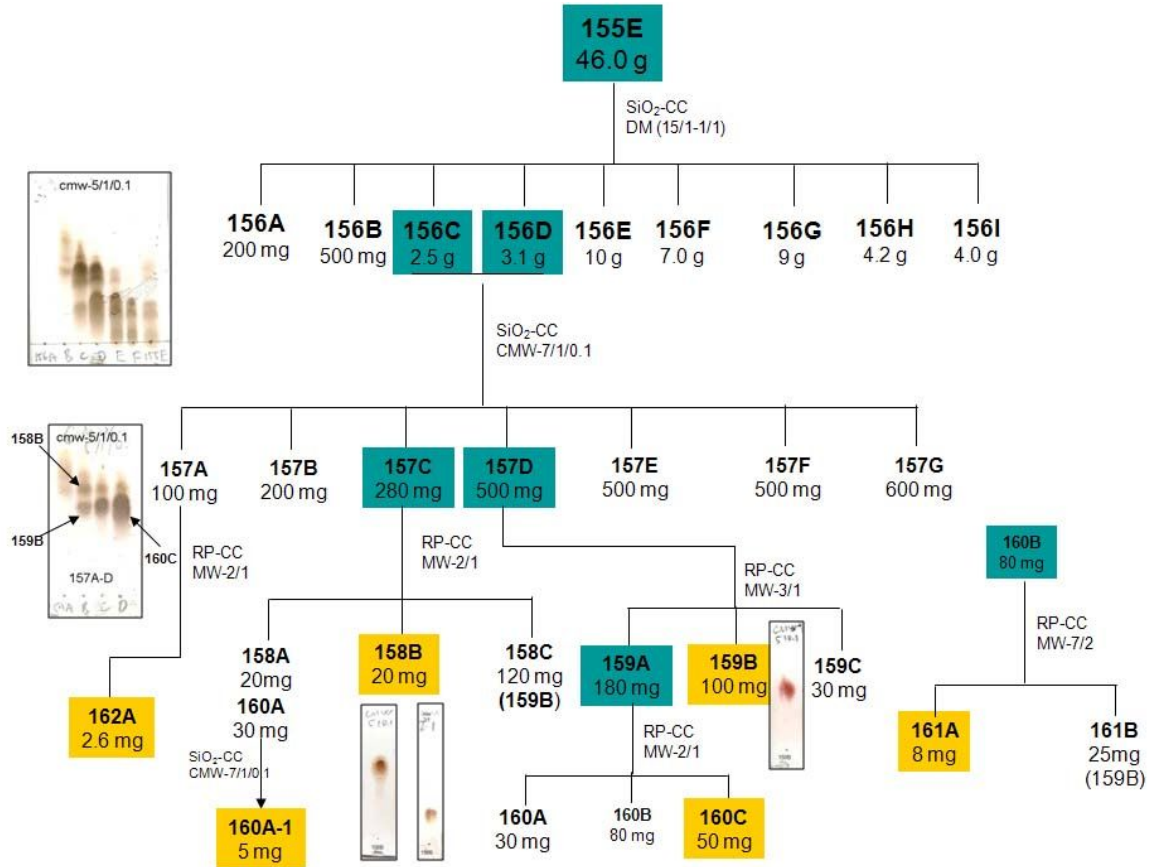


그림 39. 증숙인삼꽃봉오리의 물질정제



(2) 분획 156G의 분리정제

분획 156G를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 순수 화합물 164C (ginsenoside Rg<sub>2</sub>), 164D-1 (ginsenoside Rg<sub>6</sub>), 164D-2 (ginsenoside F<sub>4</sub>), 165B (pseudoginsenoside Rg<sub>1</sub>), 166B (ginsenoside Rg<sub>1</sub>), 166C (6'-O-acetyl ginsenoside Rg<sub>1</sub>), 166E (ginsenoside Rd), 167A (vinaginsenoside R<sub>4</sub>), 167B (ginsenoside Rc), 167C (ginsenoside Rb<sub>2</sub>), 168A (ginsenoside Rg<sub>3</sub>), 168B (ginsenoside Re), 170A (ginsenoside Mb), 170B (ginsenoside Rb<sub>1</sub>)를 분리정제하였다.

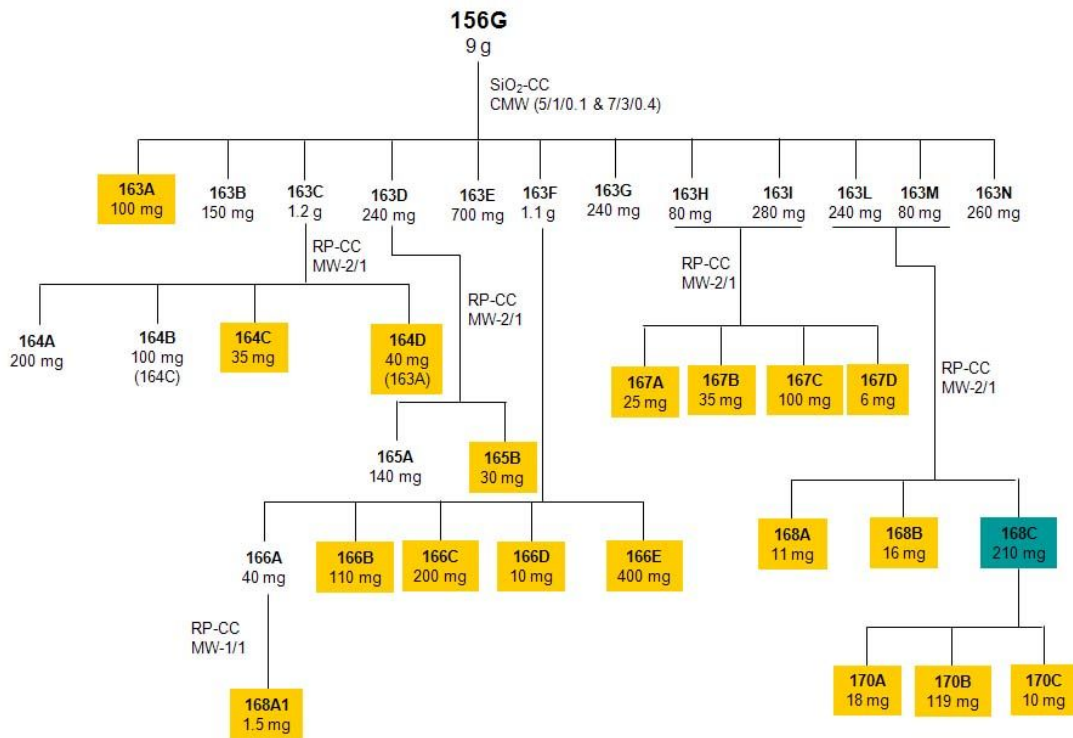


그림 40. 증숙인삼꽃봉오리의 물질정제

(3) 분획 155H의 분리정제

분획 155H를 silicagel column chromatography와 역상 컬럼크로마토그래피를 반복 수행하여 순수 화합물 175D-1 ((20Z)-ginsenoside Rs<sub>4</sub>), 175D-2 (ginsenoside Rs<sub>4</sub>)와 신규 화합물인 175B를 얻었다.

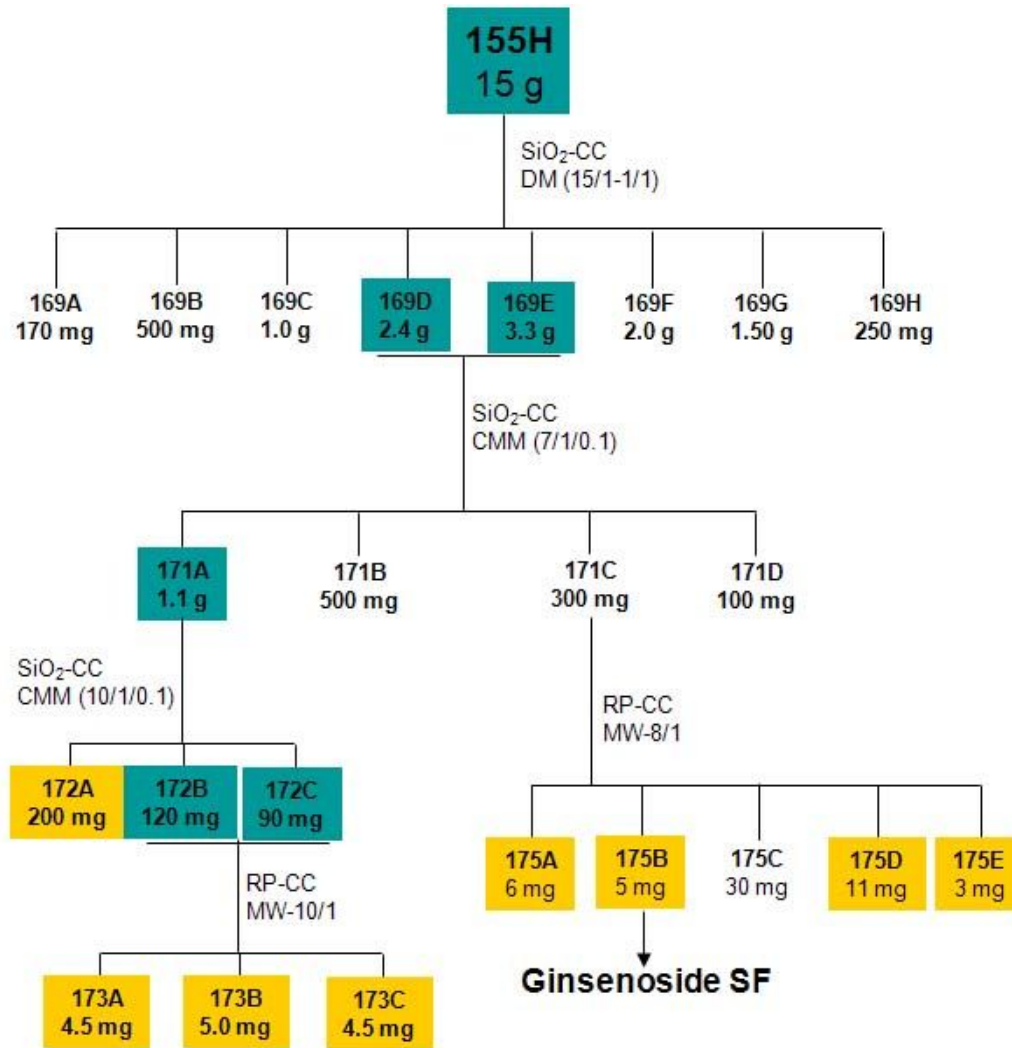
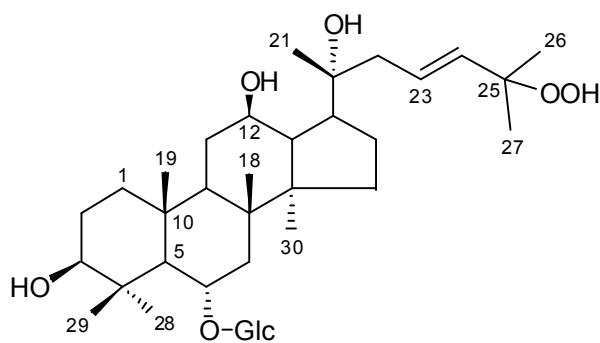


그림 41. 증숙인삼꽃봉오리의 물질정제

(가) 신규화합물 175B의 구조동정

175BA 화합물을 각종 물리화학적 데이터와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  등의 spectrum을 이용하여 구조를 동정한 결과 (20*R*)-Damara-25-ene-24-hydroperoxyl-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ ,20 $\beta$ -tetraol-6-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside 로 동정하였으며, Ginsenoside SF로 명명하였다.



Ginsenoside SF

White powder

Mp.: 194 - 196°C

$[\alpha]_D^{25}$ : +18 ( c 0.22, MeOH)

$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_{11}$ , MW 670

Table 24.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of 175B.

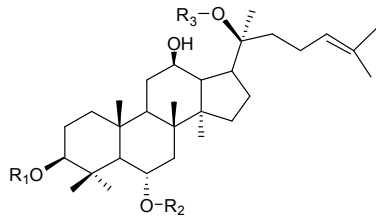
Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)
1	39.3	1.03 m, 1.73 m
2	27.9	1.87 m, 1.95 m
3	78.5	3.54 dd (11.6, 4.8)
4	40.4	
5	61.4	1.42 d (8.0)
6	80.1	4.42 m
7	45.1	1.97 m 2.54 m
8	41.0	
9	50.2	1.61 m
10	39.6	
11	31.2	1.46 m 2.13 m
12	70.9	3.98 m
13	49.6	2.02 m
14	51.6	
15	31.7	1.10 m, 1.61 m
16	26.3	1.29 m, 1.85 m
17	51.1	2.38 m
18	17.7	1.25 s
19	17.4	1.07 s
20	73.7	
21	22.7	1.43 s
22	40.6	2.16 m 2.56 m
23	126.8	6.38 m
24	137.9	6.08 d (16.0)
25	81.3	
26	25.3 <sup>b</sup>	1.56 s
27	25.2 <sup>b</sup>	1.57 s
28	31.7	2.09 s
29	16.4	1.65 s
30	17.3	0.88 s
Glc-1'	106.0	5.07 d (7.2)
2'	75.4	4.13 t (8.0)
3'	79.6	4.28 t (8.4)
4'	71.8	4.22 m
5'	78.2	3.97 m
6'	63.0	4.40 m, 4.57 br d (11.2)

✓ 이상과 같이 인삼의 잎과 꽃봉오리에서 분리한 물질은 표 25와 같다.

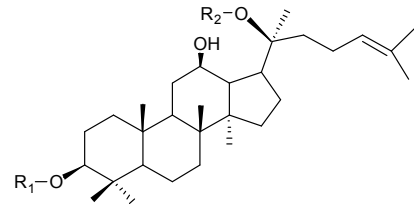
표 25. List of Compounds from the leaves and flower buds of P.ginseng

No.	Code	Name	Origin
1	12B-PGL-74B	Ginsenoside Re	Leaves, flower buds
2	12B-PGL-74C	Floralginsenoside M & N	Leaves
3	12B-PGL-75A	Ginsenoside Rg1	Leaves, flower buds
4	12B-PGL-76A	Sophoraflavonolside	Leaves, flower buds
5	12B-PGL-79A	Ginsenoside F1	Leaves
6	12B-PGL-80D	Ginsenoside F5	Leaves, flower buds
7	12B-PGL-81A	Naringenin glucopyranoside	Leaves
8	12B-PGL-83A	Notoginsenoside R1	Leaves
9	12B-PGL-87A	Ginsenoside F3	Leaves
10	12B-PGL-89C	Ginsenoside Rd	Leaves
11	12B-PGL-90B	Vinaginsenoside R4	Leaves, flower buds
12	12B-PGL-91A	Ginsenoside Rh6	Leaves
13	12B-PGL-93A	Ginsenoside Rc	Leaves
14	12B-PGL-94A	Ginsenoside Ia	Leaves
15	12B-PGL-94B	Ginsenoside Rb2	Leaves
16	12B-PGL-96B	Ginsenoside Rb1	Leaves, flower buds
17	12B-PGL-91B	Ginsenoside Km	Leaves
18	12B-PGL-93B	20R-Ginsenoside Rb1	Leaves
<b>19</b>	<b>12B-PGL-105B</b>	<b>new</b>	<b>Leaves</b>
20	12B-PGL-82A	unknown	Leaves
21	12B-PGF-125C	Ginsenoside M7cd	Flower buds
22	12B-PGF-127B	Floralginsenoside J	Flower buds
23	12B-PGF-129A	Floralginsenoside B	Flower buds
24	12B-PGF-129B	Vinaginsenoside R15	Flower buds
25	12B-PGF-130D	Vinaginsenoside R9	Flower buds
26	12B-PGF-134A	Floralginsenoside La & Lb	Flower buds
27	12B-PGF-142A	Floralginsenoside Kb	Flower buds
28	12B-PGF-140A	Floralginsenoside Ka	Flower buds
<b>29</b>	<b>12B-PGF-140B</b>	<b>new</b>	<b>Flower buds</b>
30	12B-PGF-143A	Ginsenoside I	Flower buds
31	12B-PGF-143B	Ginsenoside II	Flower buds
32	12B-PGF-144A	Floralginsenoside Kd	Flower buds
33	12B-PGF-144B	Floralginsenoside Ke	Flower buds
34	12B-PGF-146A	Floralginsenoside Kc	Flower buds
<b>35</b>	<b>12B-PGF-138A</b>	<b>new</b>	<b>Flower buds</b>
<b>36</b>	<b>12B-PGF-138B</b>	<b>new</b>	<b>Flower buds</b>

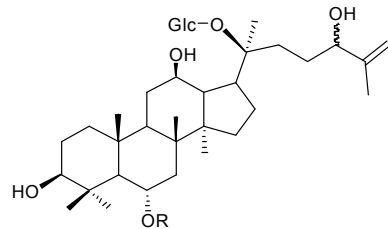
✓ 인삼의 잎과 꽃봉오리에서 dammarane 계열의 9종의 신규 사포닌과 25종의 기지 사포닌을 분리정제하였다.



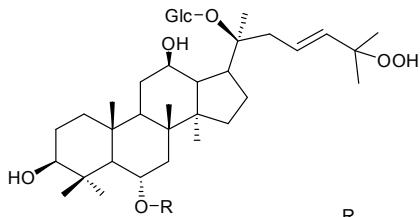
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ginsenoside Re (3)	H	Glc- <sup>2</sup> -Rha	Glc
Ginsenoside Rg <sub>1</sub> (4)	H	Glc	Glc
Notoginsenoside R <sub>1</sub> (5)	H	Glc- <sup>2</sup> -Xyl	Glc
Floralginsenoside M (6)	H	Glc- <sup>2</sup> -Rha	Glc- <sup>6</sup> -Ara(f)
Floralginsenoside N (7)	H	Glc- <sup>2</sup> -Rha	Glc- <sup>6</sup> -Ara(p)
Ginsenoside F <sub>1</sub> (8)	H	H	Glc
Ginsenoside F <sub>5</sub> (9)	H	H	Glc- <sup>6</sup> -Ara(f)
Ginsenoside F <sub>3</sub> (10)	H	H	Glc- <sup>6</sup> -Ara(p)
Vinaginsenoside R <sub>4</sub> (11)	Glc- <sup>2</sup> -Glc	H	Glc
Ginsenoside Ia (12)	Glc	H	Glc



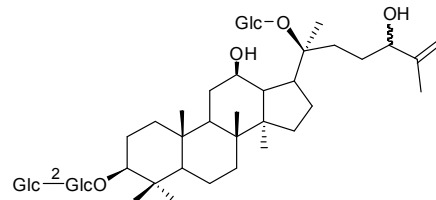
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ginsenoside Rd (13)	Glc- <sup>2</sup> -Glc	Glc
Ginsenoside Rc (14)	Glc- <sup>2</sup> -Glc	Glc- <sup>6</sup> -Ara(f)
Ginsenoside Rb <sub>2</sub> (15)	Glc- <sup>2</sup> -Glc	Glc- <sup>6</sup> -Ara(p)
Ginsenoside Rb <sub>1</sub> (16)	Glc- <sup>2</sup> -Glc	Glc- <sup>6</sup> -Glc



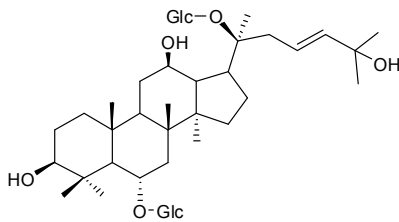
Ginsenoside M<sub>7od</sub> (25) R = H  
 Floralginsenoside La (31) R = Glc-<sup>2</sup>-Rha; 24S  
 Floralginsenoside La (32) R = Glc-<sup>2</sup>-Rha; 24R



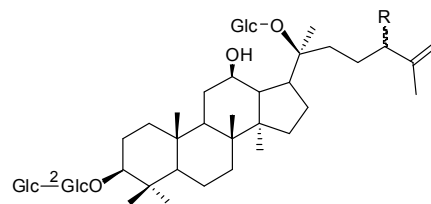
Ginsenoside Rh<sub>6</sub> (17) R  
 Floralginsenoside B (30) H  
 Floralginsenoside J (29) Glc  
 Floralginsenoside J (29) Glc-<sup>2</sup>-Rha



Vinaginsenoside R<sub>9</sub> (27) 24S  
 Majoroside F<sub>1</sub> (28) 24R



Vinaginsenoside R<sub>15</sub> (26)



Ginsenoside I, II (33, 34): R = α or β-OOH

그림 42. 분리한 물질

이상과 같은 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

- ✓ 인삼 잎으로부터 20종의 화합물을 분리정제하여 구조를 동정하였다. 총 20종의 화합물 중에서 17종의 화합물은 사포닌 화합물이었으며 2종의 화합물은 flavonoid 화합물로, 1종의 화합물은 steroid 화합물로 구조동정하였다. 17종의 화합물중 1종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하였다.
- ✓ 인삼 꽃봉오리로부터 21종의 화합물을 분리정제하였으며, 17종의 화합물을 구조동정하였다. 구조를 동정한 17종의 화합물 중에서 16종의 화합물은 사포닌 화합물이었으며 1종의 화합물은 flavonoid 화합물로 구조동정하였다. 16종의 화합물중 3종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하였다.
- ✓ 결과적으로 인삼잎 및 꽃봉오리로부터 새로운 구조의 물질 총 4종을 분리 및 확인하였다.
- ✓ 증숙한 인삼잎으로부터 26종의 화합물을 분리정제하여 구조를 동정하였다. 총 26종의 화합물 중에서 9종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하였다.
- ✓ 증숙한 인삼 꽃봉오리로부터 23종의 화합물을 분리정제하여 구조를 동정하였다. 구조를 동정한 1종은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 동정하였다.
- ✓ 결과적으로 증숙한 인삼잎 및 꽃봉오리로부터 새로운 구조의 물질 총 10종을 분리 및 확인하였다.

## 제 3 절. 인삼지상부의 고병원성 조류인플루엔자바이러스(H5N1) 억제효과에 관한 연구

### 1. 연구내용

마우스에 치명적인 H5N1 백신균주에 대한 인삼잎 및 꽃봉오리 시료의 억제작용 Screen 검증  
인체에 치명적인 Wild type H5N1 조류인플루엔자 및 마우스를 이용한 인삼잎 및 꽃봉오리 시료의 억제작용 검증, 인체에 치명적인 Wild type H5N1 조류인플루엔자 및 페렛 (ferret)를 이용한 인삼잎 및 꽃봉오리 시료의 억제작용 검증

### 2. 연구범위

- ✓ 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스 감염된 마우스에 대한 치사율에 관한 연구
- ✓ 마우스에 치명적인 H5N1 AI 바이러스에 감염된 마우스에 대한 바이러스 증식 억압에 관한 연구

### 3. 연구시설

고병원성 H5N1 조류인플루엔자 바이러스를 연구가 가능한 3 등급 안전밀폐시설 (BSL-3 시설) 구축하고 있음(그림 43):



그림 43. 안전밀폐 연구시설

#### 가. in vitro 바이러스 억제활성

##### (1) 실험방법

24-well plate에 MDCK세포를 배양한 후 100TCID50/ml (H5N1)를 1시간 접종 하였다. 시



료를 첨가 한 1ml(10 $\mu$ M) 의 배지 (MEM)를 세포에 넣은 72시간 후 혈구응집역가 (HA)를 측정하였다.

(2) 실험결과

실험결과 분리한 단일물질 35종의 in vitro 바이러스 억제활성을 측정한 결과 바이러스 억제활성이 없었다. 또한 인삼 분획 추출물 및 복합제 1,2 도 in vitro 바이러스 억제활성을 나타내지 않았다.

표 26. 분리한 단일물질들의 바이러스 억제활성

샘플	바이러스 HA 역가 (log2)	억제활성
PG-1	7	항바이러스 작용 없음
PG-2	7	항바이러스 작용 없음
PG-3	7	항바이러스 작용 없음
PG-4	8	항바이러스 작용 없음
PG-5	7	항바이러스 작용 없음
PG-6	8	항바이러스 작용 없음
PG-7	8	항바이러스 작용 없음
PG-8	9	항바이러스 작용 없음
PG-9	7	항바이러스 작용 없음
PG-10	8	항바이러스 작용 없음
PG-11	7	항바이러스 작용 없음
PG-12	7	항바이러스 작용 없음
PG-13	7	항바이러스 작용 없음
PG-14	7	항바이러스 작용 없음
PG-15	8	항바이러스 작용 없음
PG-16	9	항바이러스 작용 없음
PG-17	8	항바이러스 작용 없음
PG-18	7	항바이러스 작용 없음
PG-19	7	항바이러스 작용 없음
PG-20	8	항바이러스 작용 없음
PG-21	7	항바이러스 작용 없음

PG-22	8	항바이러스 작용 없음
PG-23	7	항바이러스 작용 없음
PG-24	7	항바이러스 작용 없음
PG-25	8	항바이러스 작용 없음
PG-26	8	항바이러스 작용 없음
PG-27	8	항바이러스 작용 없음
PG-28	8	항바이러스 작용 없음
PG-29	8	항바이러스 작용 없음
PG-30	8	항바이러스 작용 없음
PG-31	8	항바이러스 작용 없음
PG-32	8	항바이러스 작용 없음
PG-33	8	항바이러스 작용 없음
PG-34	8	항바이러스 작용 없음
PG-35	7	항바이러스 작용 없음
증숙인삼잎 조사포닌	7	항바이러스 작용 없음
증숙인삼꽃봉오리 조사포닌	7	항바이러스 작용 없음
인삼뿌리 다당체	8	항바이러스 작용 없음
인삼꽃봉오리 다당체	7	항바이러스 작용 없음
인삼잎 다당체	8	항바이러스 작용 없음
인삼 복합체	7	항바이러스 작용 없음
Tamiflu	1	항바이러스 작용 있음
No treatment	8	-

#### 나. in vivo 마우스 치사율에 미치는 영향

##### (1) 실험방법

Balb/c 마우스 (n=10/ 군)에 30일 동안 인삼시료를 50mg/g 투여한 후 마우스에 치명적인 H5N1 조류인플루엔자 (10 MLD/50) 를 코로 50 ml 접종한 후 치사율을 2주간 매일 관찰하였다.

##### (2) 실험결과

실험관찰 2주후에 살아있는 마우스의 수를 관찰한 결과 대조군의 경우 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(H5N1)를 마우스에 접종하면 평균생존일 수가 8.5일이었다. 이에 비해서 인삼

잎 추출물, 증숙인삼잎 추출물, 인삼꽃봉오리 추출물, 증숙인삼꽃봉오리 추출물, 인삼잎 조사포닌, 증숙조사포닌, 증숙인삼잎 조사포닌, 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌 투여군의 평균생존일 수는 각각 11.9, 12.0, 11.0, 11.5, 12.3, 13.3, 11.3 및 11.9일로써 40.0, 41.1, 29.4, 35.2, 44.7, 56.4 32.9 및 40.0%의 바이러스 억제활성을 나타내었다. 즉, 인삼꽃봉오리 보다는 인삼잎의 바이러스 억제활성이 강하였으며, 증숙한 인삼지상부(잎, 꽃봉오리)의 억제활성이 강하였다. 또한 조사포닌 분획물이 바이러스 활성이 강함을 알 수 있었다.

한편, 인삼 다당체 분획물의 경우 즉, 뿌리, 잎, 꽃봉오리 다당체 투여군의 경우는 바이러스 억제활성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 바이러스 억제활성을 나타내는 물질은 인삼에 존재하는 인삼사포닌으로 판단된다.

또한 in vitro 실험에서는 바이러스 억제활성이 없었는데 in vivo 동물실험에서 한달 간 인삼추출물을 투여한 후 바이러스를 감염시켰을 때 바이러스 억제활성을 나타내는 것은 인삼추출물이 직접적으로 바이러스를 억제하는 것이 아니라 간접적으로 즉, 면역을 활성화시키기 때문일 것으로 판단된다.

한편 인삼복합제 1,2 투여군의 경우 평균생존일 수가 13.9일 및 13.8일로써 63.5% 및 62.3%의 강한 바이러스 억제활성을 나타내었다(표 27).

표 27. 인삼추출물의 바이러스 억제활성

샘플	투여량	평균생존일수	억제활성(%)
인삼잎 추출물	50mg/g	11.9	40.0
증숙인삼잎 추출물	50mg/g	12.0	41.1
인삼꽃봉오리 추출물	50mg/g	11.0	29.4
증숙인삼꽃봉오리 추출물	50mg/g	11.5	35.2
인삼잎 조사포닌	50mg/g	12.3	44.7
증숙인삼잎 조사포닌	50mg/g	13.3	56.4
인삼꽃봉오리 조사포닌	50mg/g	11.3	32.9
증숙인삼꽃봉오리 조사포닌	50mg/g	11.9	40.0
인삼뿌리 다당체	50mg/g	8.5	-
인삼잎 다당체	50mg/g	8.5	-
인삼꽃봉오리 다당체	50mg/g	8.5	-
복합제 1	50mg/g	13.9	63.5
복합제 2	50mg/g	13.8	62.3
대조군		8.5	-

이상과 같은 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

- ✓ 인삼잎 및 증숙인삼꽃봉오리의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 억제활성을 검증하였다.
- ✓ in vitro 실험에서는 인삼추출물 및 인삼에 존재하는 사포닌은 바이러스 억제활성을 나타내지 않았다.
- ✓ in vivo 동물실험에서는 인삼추출물이 바이러스 억제활성을 나타내었으며, 증숙인삼잎 조 사포닌 분획물이 강한 바이러스 억제활성을 나타내었다.
- ✓ 복합제 1,2 가 가장 강한 바이러스 억제활성을 나타내었다.

## 제 4 절. 인삼지상부의 면역활성에 관한 연구

### 1. 실험방법

#### 가. 약물 투여

각각의 시료를 실험 시작날부터 마지막 날까지 1일 1회 경구 투여 하였다. 대조군은 시료를 녹이는데 사용한 PBS buffer(pH 7.2)를 실험군에는 정제된 인삼 지상부 추출물 투여군으로 나누어 10일간 25mg/kg의 농도로 경구 투여하였다.

#### 나. 항원 및 면역.

항원은 Sheep Red Blood Cell(SRBC)를 한국배지(Korea Media Co.)로부터 구입하여 사용하였다. SRBC는 PBS로 적정 수로 조정하거나 희석하여 사용하며, 4℃에서 보존하고 보존 1주일 이내의 것만 사용하였다. 시료는 10일간 경구 투여한 후 실험군과 대조군의 미정맥에  $1 \times 10^9$  cells/ml의 농도로 면양적혈구 부유액 0.2ml 주사하여 면역시켰다. 4일 후에  $4 \times 10^9$  cells/ml로 조정된 면양적혈구 부유액 0.025 ml를 후측후지족척피내에 주사하여 2차 면역시켰다.

#### 다. 비장세포 분리

2차 면역후 24시간 후에 동물을 처사시키고 비장을 적출하여 무게 측정 후, 비장세포 수를 측정하고  $5 \times 10^7$  cells/ml로 조정하였다.

#### 라. 지연성 과민반응 (Delayed Type Hypersensitivity)

지연성 과민반응의 측정은 1차 면역시킨 4일 후에  $4 \times 10^9$  cells/ml로 조정된 면양적혈구 부유액 0.025 ml를 우측후지족척피내에 주사하여 2차 면역시켜 측정하였다. 음성대조군으로서 좌측후지족척피내에는 대조물질로서 PBS를 동량 주입하였다. 주사 직전, 주사 후 24시간째에 족척부종검사 (Footpad swelling reaction)를 시행하였다. 족척부종 정도는 micrometer (Mitutoyo, MFG. Co. Tokyo, Japan)를 사용하여 우측 후지족척 두께를 0.01mm까지 측정하여 두께의 차이를 계산하였다. 종창증가의 정도는 다음 공식에 따라 %로 표시하였다.

$$\% \text{ increase, } = \{(T_{24} - T_0)/T_0\} \times 100$$

$T_{24}$ : 주사 후 24시간의 우측 후지족척 두께

$T_0$ : 주사 직전의 우측 후지족척 두께

#### 마. Plaque forming cell assay

spleen cell을  $5 \times 10^6$  cells/ml 로 PBS에 희석하고 SRBC는  $4 \times 10^9$  cells/ml 맞추었다. guinea pig complement (Gibco) 100 $\mu$ l와 SRBC 200 $\mu$ l를 혼합하여 ice에서 30분간 방치한 혼합액에 비장부유액 1ml을 가하고 slide glass와 cover glass 사이에 혼합액 200 $\mu$ l를 주입한뒤 37℃에서 1시간 이상 incubation 한후 생성된 plaque 수를 count 하였다.

#### 바. Cytokine assay

Cytokine assay는 Becton Dickinson 사의 Mouse ELISA kit를 사용하였으며 manufacturer protocol에 의해 실시하였다. 사용한 cytokine assay antibody의 종류는 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ,였으며 microplate reader를 사용하여 450nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다

#### 사. Flow cytometric analysis

##### (1) 비장 백혈구 현탁액 조제

BALB/C를 cervical dislocation으로 치사시킨 후 비장을 적출하고 비장 백혈구 현탁액을 제조하였다. 세포 처리 및 형광염색 완충액으로는 Ca<sup>2+</sup>과 Mg<sup>2+</sup>이 들어 있지 않은 Saining buffer를 사용하였다. 적출한 비장을 60 mesh (sigma, USA)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 조직을 분쇄하였다. 15ml conical tube(Becton dickinson,USA)에 옮겨 약 5분간 방치하여 조직덩어리를 침전시킨 후 상층액을 취해 2회 세척하고 0.83 % NH<sub>4</sub>Cl 용액을 넣고 5분간 incubation시켜 적혈구를 용혈시켰다. 다시 2회 세척하고 RPMI1640-10% FBS (sigma, USA)로 1x10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 희석하였다.

##### (2) 면역형광염색(immunofluorescence staining)

면역형광염색은 전과정을 0-4 °C에서 실시하였고 배양한 비장세포를 회수하여 PBS로 3회 세척한후 5ml FACS tube(Becton Dikinson,U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex 한 후 원심분리 (1300rpm, 5min)한다. 각각의 1차 항체를 100 $\mu$ l 씩을 5ml FACS tube에 넣고 vortex 한 후 40분간 ice에서 반응시켰다. 사용한 1차 항체는 3회 세척 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse Ig F(ab)<sub>2</sub> fragment 1:100(Tago, USA) 희석액 50 $\mu$ l를 가하고 40분간 반응시켜 3회 세척후 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex 한 후 FACScan(Becton dickinson,USA)으로 분석하였다. 분석자료는 시료당 10,000개의 세포에 대하여 list mode로 취합하였다. 분석자료의 취합은 forward scatter(FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot 상에서 적혈구와 죽은 세포가 밀집된 부분(FSC와 SSC 값이 모두 작은 부분을 제거한 나머지 세포들에 대해서만 gating하여 FSC, SSC, FL1, FL2의 4가지 parameter를 취하였다. CD3, CD4, CD8, CD18, NK antibody의 분석은 전체 영역 및 임파구영역의 상대비율을 관찰하였다.

#### 아. 비특이면역 실험(Carbon clearance assay)

BALB/C 생쥐에 10일간 약물 투여한후 Thorbeck 등의 방법에 준하여 측정하였으며 ink 100 $\mu$ l를 생쥐 미정맥에 주사한 다음 retroorbital venous plexus 로부터 heparin 처리된 capillary로 20 $\mu$ l씩 5분, 10분, 15분 동안 각각 채혈하여 0.1% sodium carbonate 2ml에 용혈시킨 다음 spectrophotometer를 사용하여 675nm에서의 흡광도를 측정하여 아래와 같이 계산하였다

$$\log C1 - \log C2$$

$$\text{Phagocytic index K} = \frac{\log C1 - \log C2}{T2 - T1}$$

(C: 해당시간대의 흡광도 T: 시간)

## 2. 실험결과

### 가. 인삼 추출물 및 분리한 단일 물질의 비장세포 증식에 미치는 영향

in vitro에서 인삼추출물 및 인삼에서 분리한 단일 물질들의 비장세포 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. 비장세포에 LPS를 1ug/ml 농도로 처리하면 비장세포 증식이 유도됨을 확인할 수 있었으며 인삼추출물을 50ug/ml의 농도로 비장세포에 처리하면 2번(증숙인삼잎 조사포닌), 10번(증숙인삼꽃봉오리 조사포닌)과 같은 증숙인삼 조사포닌이 비장세포의 증식을 유도함을 할 수 있었다. 또한 5번(인삼꽃봉오리 다당체), 7번(인삼뿌리 다당체)과 같은 다당체 분획물이 비장세포의 증식을 유도하였다(그림 44).

한편, 분리한 단일물질을 20uM 농도로 처리했을 때 1번(ginsenoside Re), 13번(20S-protopanaxatriol) 및 54번(ginsenoside Rk1)이 비장세포의 증식을 증가시킴을 확인할 수 있었다.

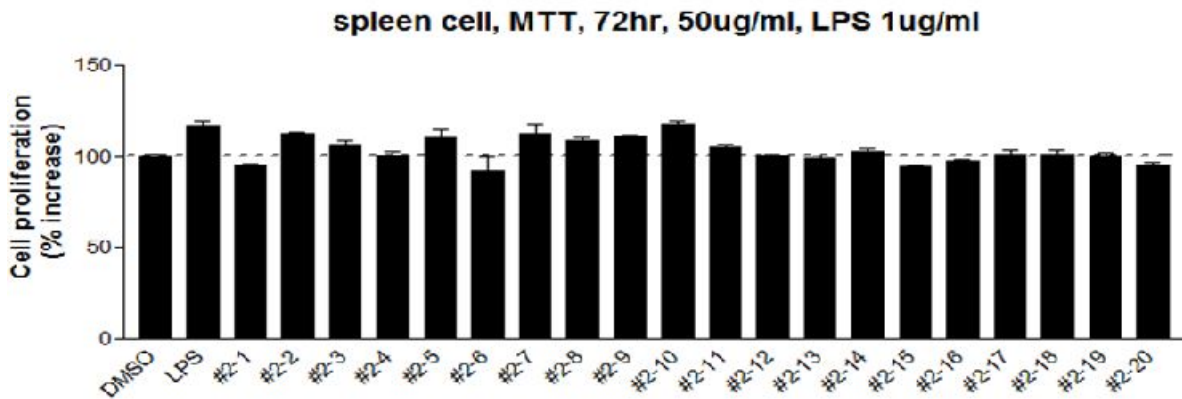


그림 44. 인삼추출물의 비장세포 증식에 미치는 영향

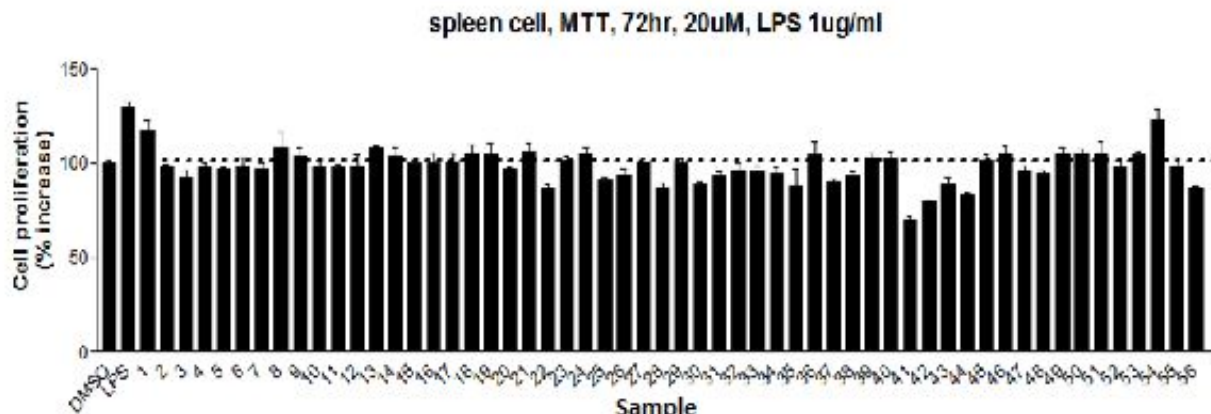


그림 45. 인삼에서 분리한 단일물질의 비장세포 증식에 미치는 영향

### 나. FACS에 의한 유세포 분석

(1) 증숙인삼잎, 인삼잎, 증숙꽃봉오리, 꽃봉오리 투여군 유세포 분석

24시간 후 미처리군 및 각 추출물 처리군들이 비장의 T-lymphocyte subsets population의 변화에 미치는 영향을 알아보았다. Fluorescein isothicyanate (FITC)이 부착되어 있는 T-임파구인 mature subset(CD3), T helper cell(CD4), cytotoxic T cell(CD8), 항체를 1시간동안 처리하고 세척 buffer로 3회 세척한 후, 유세포 분석기(BD bioscience) 장비를 이용하여 관찰하였다.

실험결과 CD3, CD4, CD 8, CD18, NK의 경우 미처리군에서는 발현양상이 보이지 않았으나 증숙된 인삼잎, 인삼잎, 증숙된 꽃봉오리, 꽃봉오리 추출물 처리군에서는 발현양상을 보였다(그림 46-49).

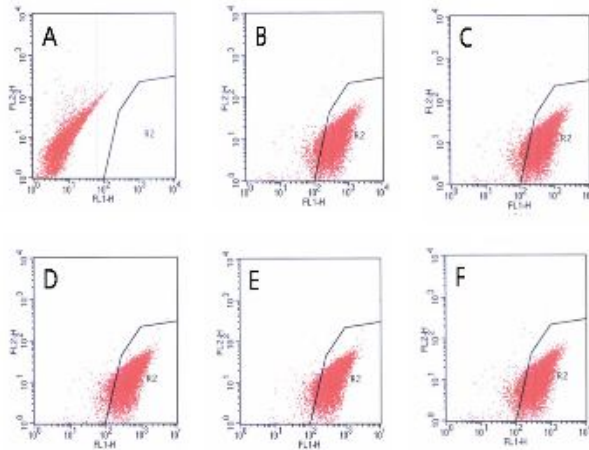


그림 46. 증숙인삼잎 유세포 분석

A: 대조군; B: CD3; C: CD4; D: CD8; E: CD18; F: NK

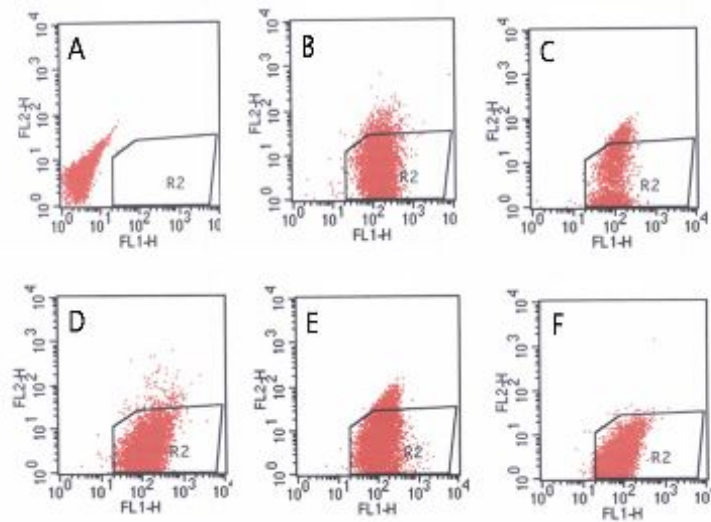


그림 47. 인삼잎 유세포 분석

A: 대조군; B: CD3; C: CD4; D: CD8; E: CD18; F: NK



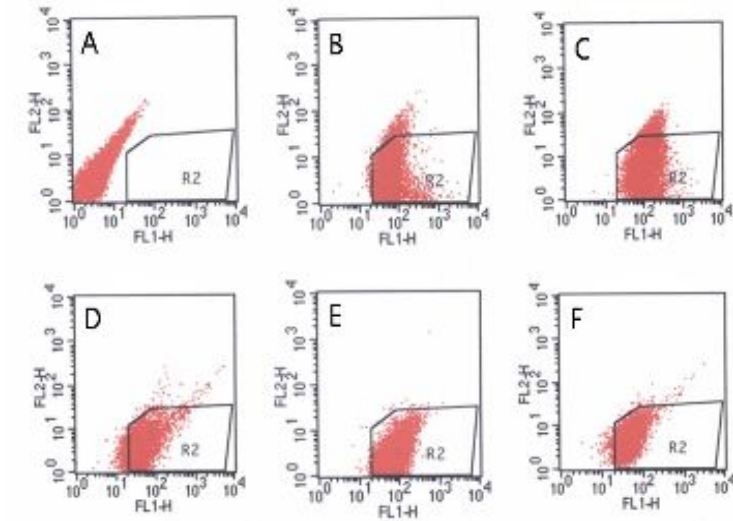


그림 48. 증숙인삼꽃봉오리 유세포 분석

A: 대조군; B: CD3; C: CD4; D: CD8; E: CD18; F: NK

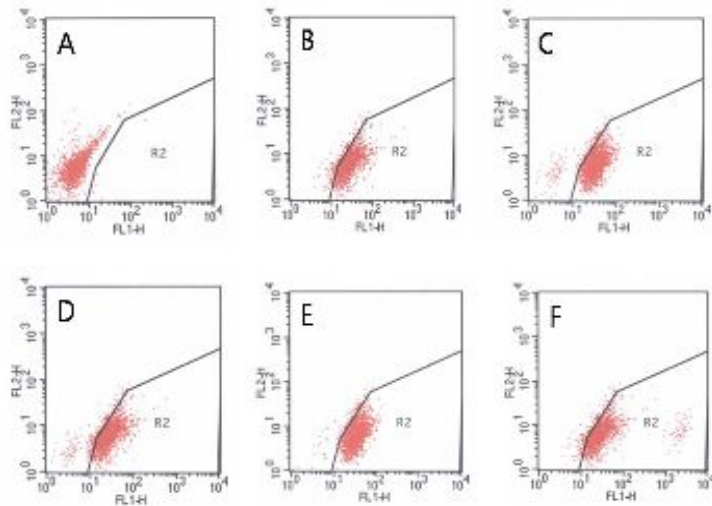


그림 49. 인삼꽃봉오리 유세포 분석

A: 대조군; B: CD3; C: CD4; D: CD8; E: CD18; F: NK

(2) 조사포닌 및 복합제 투여군 유세포 분석

체내 면역기능이 활성화되면 가장먼저 반응하여 면역기능 강화의 지표로 사용되는 CD3, CD4, CD8, 18 그리고 NK cell activity를 FACs analysis법을 이용하여 확인하였다. 그 결과 각 시료에 의한 CD3, CD4, CD 8, CD18, NK cell activity 는 처리 전에 비해 활성을 띠었으며, 인삼 꽃봉오리 조사포닌(KEK-2-25) < 증숙인삼 꽃봉오리 조사포닌(KEK-2-24) < 인삼잎 조사포닌(KEK-1-188) < 증숙인삼열 조사포닌(KEK-2-3) < 복합제1(LG-036-03) < 복합제 2(LG-036-06) 의 순서로 그 활성의 차이를 보였으나, 복합제1 과 복합제 2에서는 큰 차이를 보이지 않았다(그림 51).

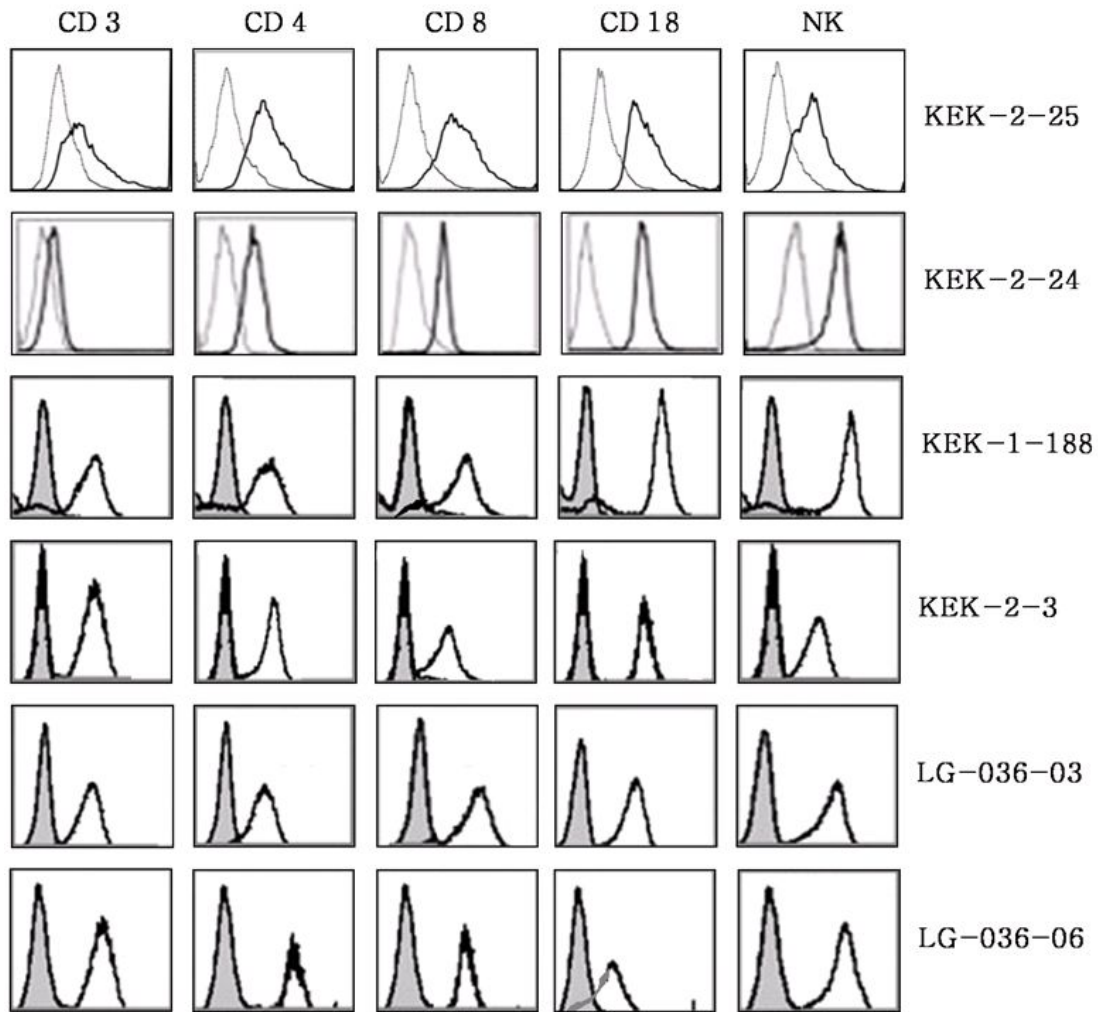


그림 50. 조사포닌 및 복합제 유세포 분석

(3) ginsenoside Re, 인삼다당체 투여군 유세포 분석

표 28 및 그림 51에서와 같이 ginsenoside Re, 인삼꽃봉오리 다당체(FP) 투여군 및 인삼뿌리 다당체(RP) 투여군의 경우는 대조군에 비해서 CD3와 CD8은 증가하였으나, CD4와 NK는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 또한 인삼잎 다당체(LP) 투여군의 경우에는 CD8의 양을 증가시켰으나, CD3와 NK에 대해서는 거의 변화가 없었으며, CD4는 오히려 감소되었다.

표 28. Effects of Ginseng extracts on T lymphocyte subset population in spleen of the SRBC-immunized mice

Group	CD3	CD4	CD8	NK
대조군	35.0 ± 3.2	25.3 ± 0.8	8.9 ± 0.6	0.8 ± 0.2
FP	37.2 ± 1.4	24.7 ± 1.1	9.2 ± 1.3	0.6 ± 0.1
LP	35.1 ± 2.4	23.2 ± 2.5	9.8 ± 0.8	0.8 ± 0.2
RP	35.2 ± 1.8	24.1 ± 1.8	9.1 ± 1.1	0.6 ± 0.1
ginsenoside Re	36.2 ± 3.5	23.3 ± 2.9	12.8 ± 1.2*	1.3 ± 0.2*

FP : 인삼꽃봉오리 다당체, LP : 인삼잎 다당체, RP : 인삼뿌리 다당체; RE: ginsenoside Re

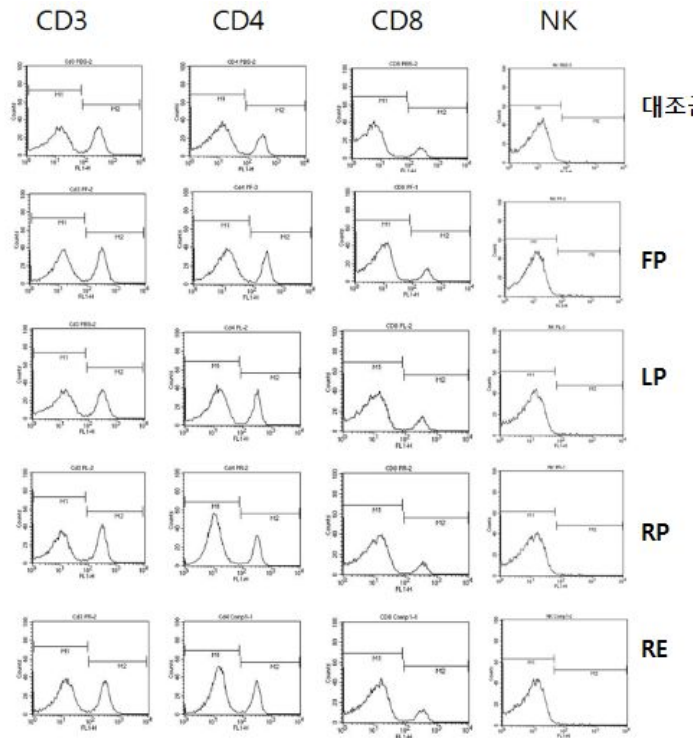


그림 51. ginsenoside Re, 인삼다당체 유세포 분석

data: Mean ± S.D., P value: Statistically significant value compared with control.

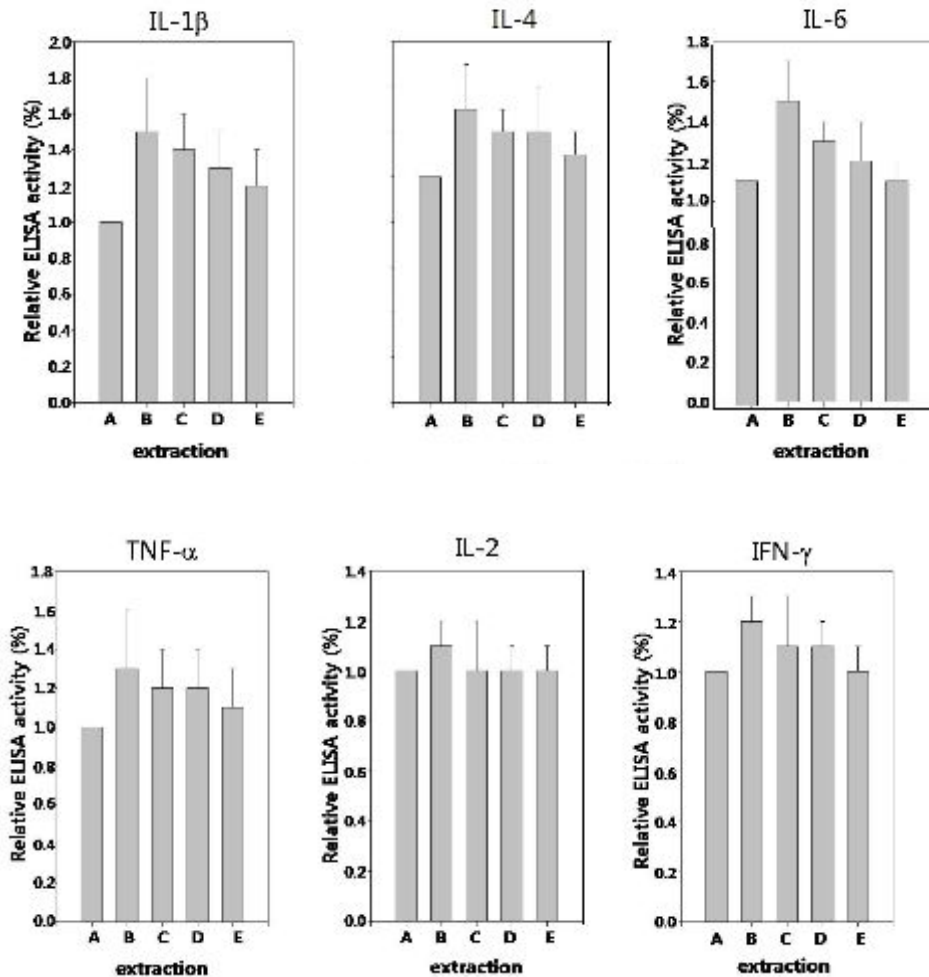
(\*; P<0.05)

## 다. Cytokine Assay

### (1) 증숙인삼엽, 인삼엽, 증숙꽃봉오리, 꽃봉오리 투여군

Cytokine의 생산과 수준은 세포의 면역 반응을 나타내는 중요한 지표이다. 본 연구에서 인삼 추출물을 투여하고 1차, 2차 면역 후 혈청에서의 염증성 cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), Th1 type cytokine (IL-2), Th2 type cytokine (IL-4) 그리고 macrophage type cytokine (IL-12)을 측정하였다.

실험결과 IL-1 $\beta$ 의 경우 증숙된 인삼잎, 인삼잎, 증숙된 꽃봉오리, 꽃봉오리 추출물이 미처리군에 비해 약 1.5, 1.4, 1.3, 1.2배 증가하였고 IL-4의 경우 또한 미처리군에 비해 약 1.4, 1.2, 1.2, 1.1배 증가하였으며, IL-6의 경우 약 1.5, 1.3, 1.2, 1.1배 증가를 보였다. 또한 TNF- $\alpha$ 는 1.3, 1.2, 1.2, 1.1배, IL-2는 증숙된 인삼엽에서만 1.2배정도의 차이를 보였으며, IFN- $\gamma$ 와 IL-12는 큰 변화를 보이지 않았다(그림 52).



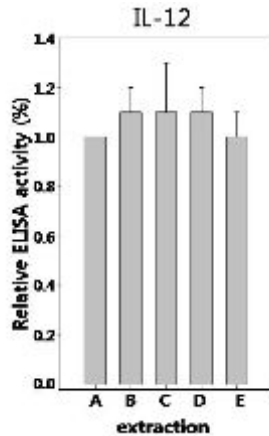
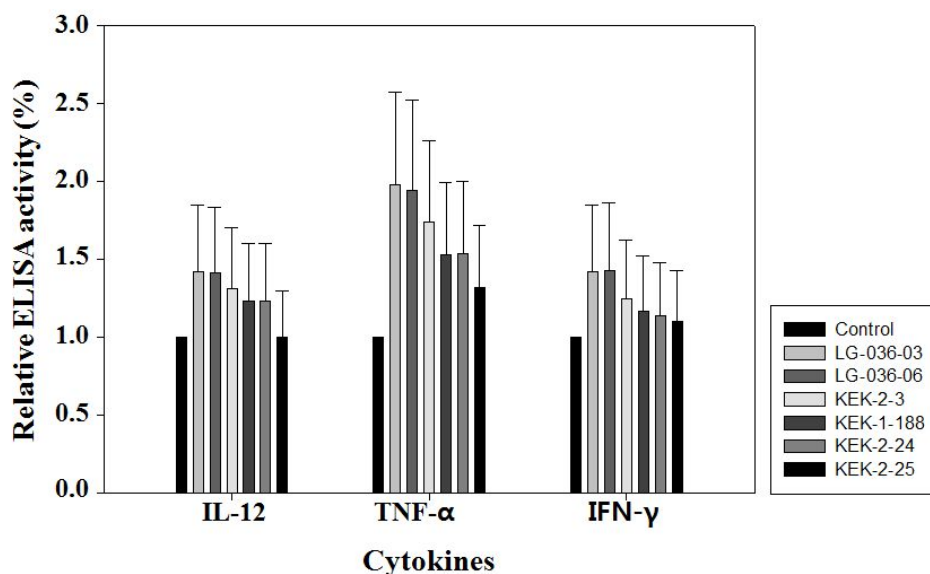


그림 52. Cytokine

A: 대조군; B: 증숙인삼잎; C: 인삼잎; D: 증숙꽃봉오리; E: 꽃봉오리

(2) 조사포닌 및 복합제 투여군

각 제제에 대한 면역기능 활성여부를 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  등의 지표를 cytokine assay를 통하여 재확인 하였다. 그 결과 IL-1 $\beta$ , TNA- $\alpha$ 에서는 대체적으로 생인삼 꽃봉오리 조사포닌(KEK-2-25) < 증숙인삼 꽃봉오리 조사포닌(KEK-2-24) < 생인삼잎 조사포닌(KEK-1-188) < 증숙인삼잎 조사포닌(KEK-2-3) < 복합제 1(LG-036-03) < 복합제 2(LG-036-06)의 순으로 증가하였고, IL-2, IL-4, IL-6 및 IFN- $\gamma$ 에서는 미처리군에 비해 활성이 있고, 복합제1 과 복합제 2에서는 현저한 차이를 보였으나 생인삼 꽃봉오리, 증숙인삼 꽃봉오리, 생인삼잎 및 증숙인삼엽에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 볼때 복합제 1, 2가 가장 강력하게 cytokine을 증가시켰다(그림 53).



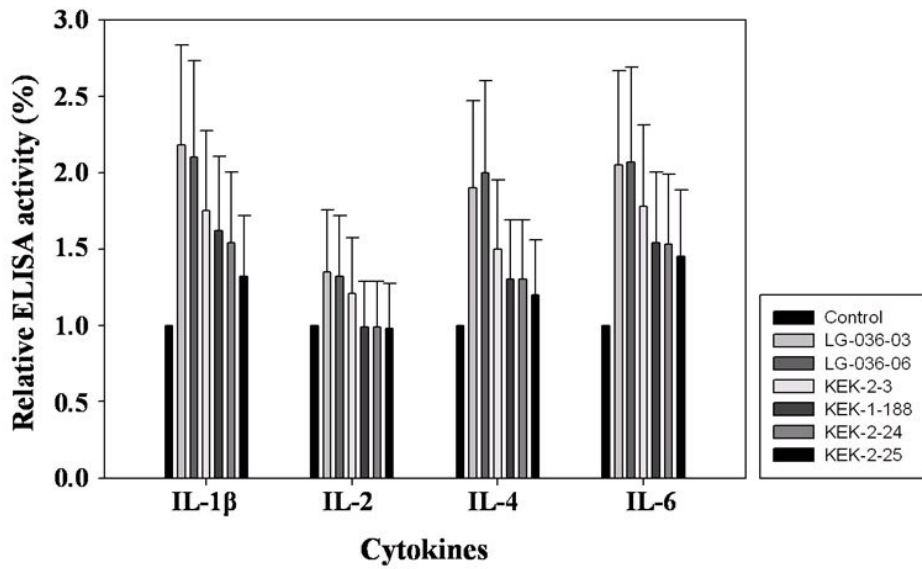
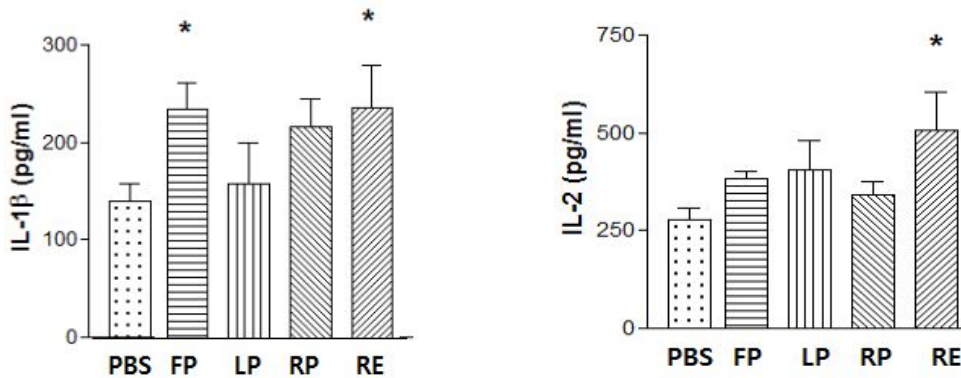


그림 53. 인삼조사포닌이 cytokine에 미치는 영향

(3) 다당체 투여군

각 제제에 대한 면역기능 활성여부를 IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IFN-γ, TNF-α 등의 지표를 cytokine assay를 통하여 재확인 하였다. 그 결과 IL-1β에 대해서 ginsenoside Re 와 인삼꽃봉오리 다당체(FP) 투여군이 유의적으로 가장 강력하게 증가시켰다(P<0.05). IL-2에 대해서는 ginsenoside Re 투여군이 유의적으로 가장 강력하게 증가시켰으며, 인삼잎 다당체(LP) 투여군이 강력하게 증가시켰다. IL-4에 대해서는 인삼꽃봉오리 다당체 및 인삼뿌리 다당체 투여군이 증가시켰으며 인삼잎 다당체 투여군은 거의 차이가 없었다(그림 54).

한편, IL-6, IL-12 및 TNF-α에 대해서는 특이하게 인삼꽃봉오리, 잎, 뿌리 다당체 투여군이 감소시키는 경향을 보였으며 ginsenoside Re는 대조군과 거의 동일하였다. 향후 이에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.



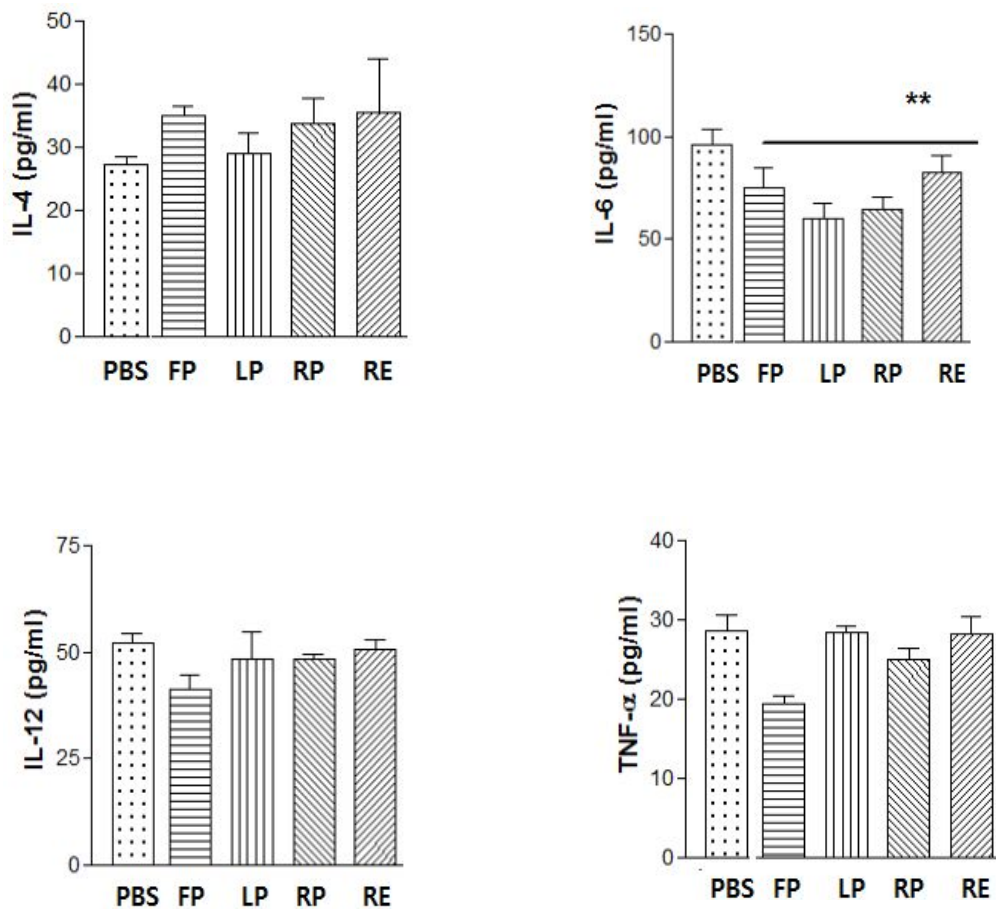


그림 54. ginsenoside Re, 인삼 다당체가 cytokine에 미치는 영향

data: Mean  $\pm$  S.D., P value: Statistically significant value compared with control.

(\*;  $P < 0.05$ ), FP : 인삼꽃봉오리 다당체, LP : 인삼잎 다당체, RP : 인삼뿌리 다당체; RE: ginsenoside Re

#### 라. 조직 미네랄 검사

6주령의 BALB/C Mouse 25마리를 준비하여 일주일간 먹이를 주며 실험실 환경에 적응시켰다. 적응이 된 후 군 당 5마리씩 나누는 후 미 투여군, 증숙된 인삼잎, 인삼잎, 증숙된 꽃봉오리, 꽃봉오리 추출물 투여군으로 나누는 후 추출물을 25mg/kg, 7일간 경구 투여하였다. 7일 후 털을 적당량 채취하여 (주) 한국 TEI 에 의뢰하여 RT-mess 방법으로 분석하여 홍삼추출물 투여 전과 후의 미네랄 함량 변화를 확인하였다.

(1) 증숙인삼잎, 인삼잎, 증숙꽃봉오리, 꽃봉오리 투여군

실험결과 Ca, Mg 및 Na는 각 추출물이 1.5배정도의 증가를 보였으며 K의 경우는 감소하였다(그림 55).

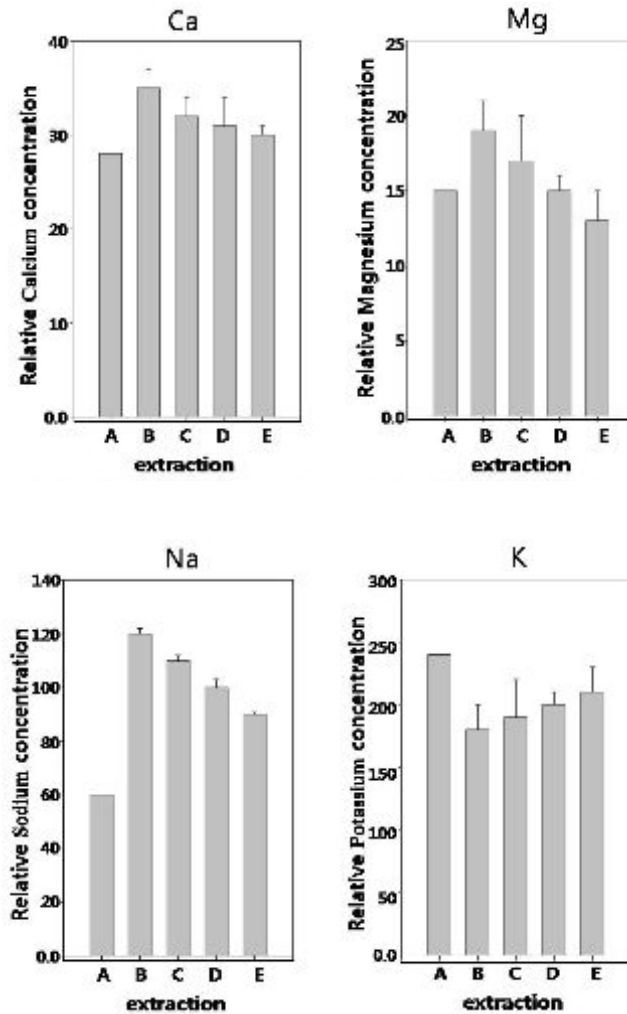


그림 55. 조직 미네랄 검사

A: 대조군; B: 증숙인삼잎; C: 인삼잎; D: 증숙꽃봉오리; E: 꽃봉오리

(2) 조사포닌 및 복합제 투여군

각 제제가 체내 미네랄에 미치는 영향을 Potassium, Sodium, Magnesium 그리고 Calcium 을 통하여 확인한 결과, Sodium과 Magnesium에서는 복합제 1, 복합제 2, 증숙인삼엽 조사포닌, 생인삼엽 조사포닌, 증숙인삼 꽃봉오리 조사포닌, 및 생인삼 꽃봉오리 조사포닌의 순으로 감소하는 경향을 보였으며, Potassium에서는 복합제 1 과 복합제 2에서는 다소 높은 경향을 보였으나 증숙인삼엽 조사포닌, 생인삼엽 조사포닌, 증숙인삼 꽃봉오리 조사포닌, 및 생인삼 꽃봉오리 조사포닌 투여군 에서는 영향을 미치지 않았으며, Calcium에서는 별다른 활성이 보이지 않았다(그림 56).



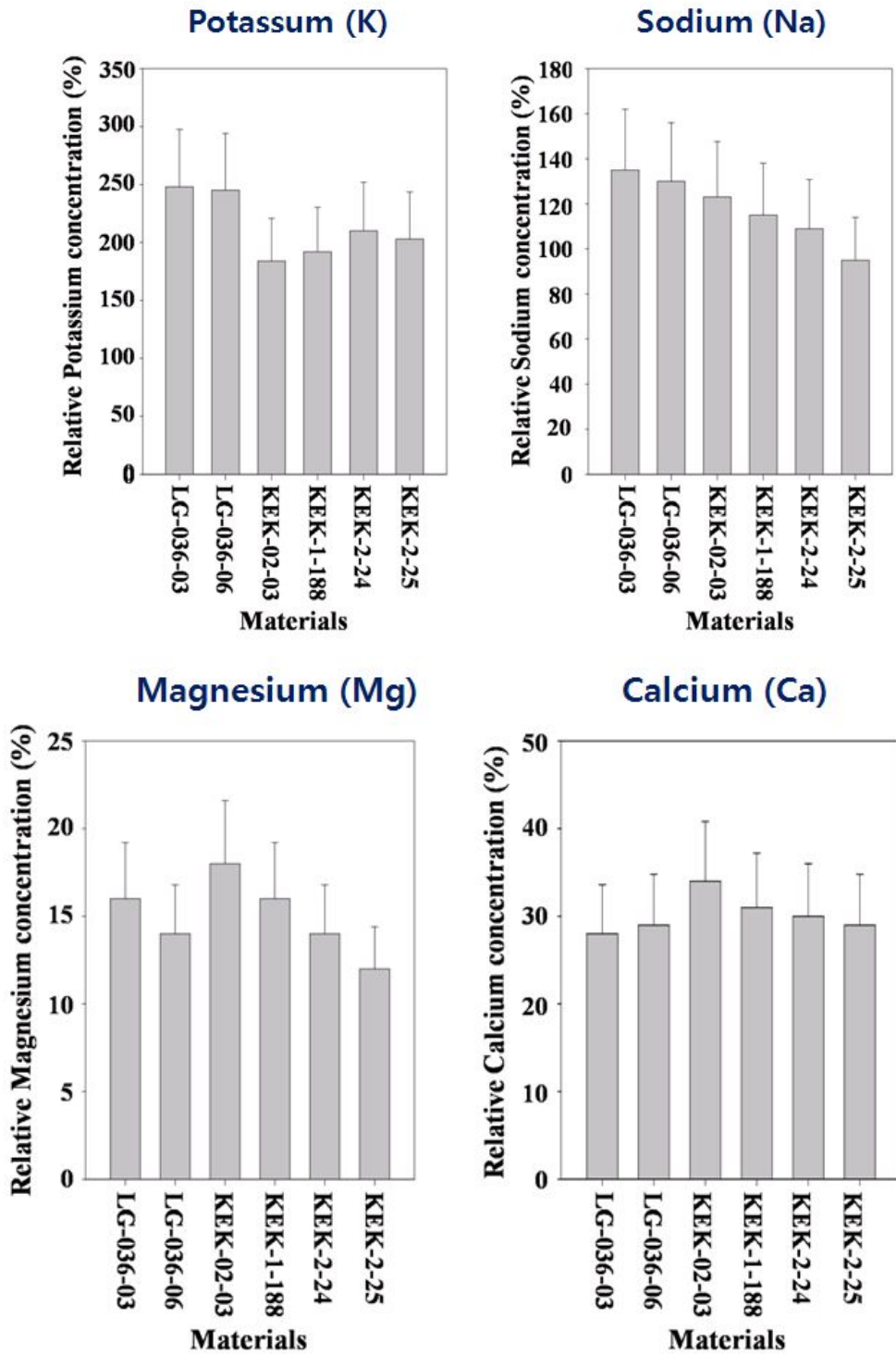


그림 56. 조사포닌 및 복합제 투여군이 조직미네랄에 미치는 영향

LG-036-03: 복합제 1 ; LG-036-06: 복합제 2; KEK-1-188: 생인삼잎 조사포닌; KEK-2-3: 증숙인삼잎 조사포닌; KEK-2-25: 생인삼꽃봉오리 조사포닌; KEK-2-24: 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌

마. 지연성 과민반응검사

(1) 증숙인삼잎, 인삼잎, 증숙꽃봉오리, 꽃봉오리 투여군

실험결과 면양적혈구 투여 후 모든 군에서 면역작용이 증가하였으나 처리 1일 이후에는 점차 반응이 약해졌으며, 증숙된 인삼잎, 인삼잎, 증숙된 꽃봉오리, 꽃봉오리 추출물순으로 반응을 나타냈다(그림 57).

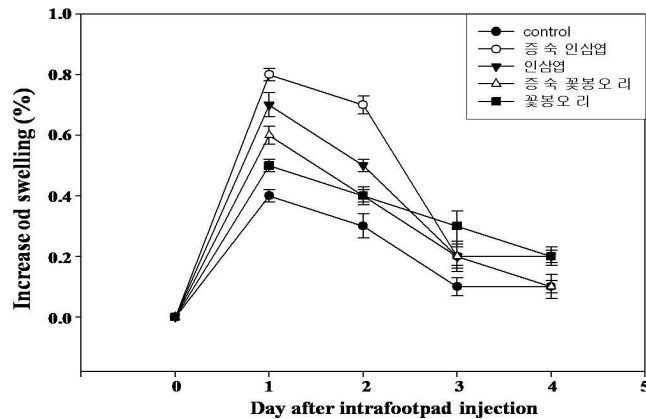


그림 57. 지연성 과민반응검사

(2) 조사포닌 및 복합제 투여군

면역동물실험에서는 복합제 2, 복합제 1, 증숙인삼잎 조사포닌, 생인삼잎 조사포닌, 증숙인삼꽃봉오리 그리고 생인삼꽃봉오리 순으로 면역활성을 보였다(그림 58).

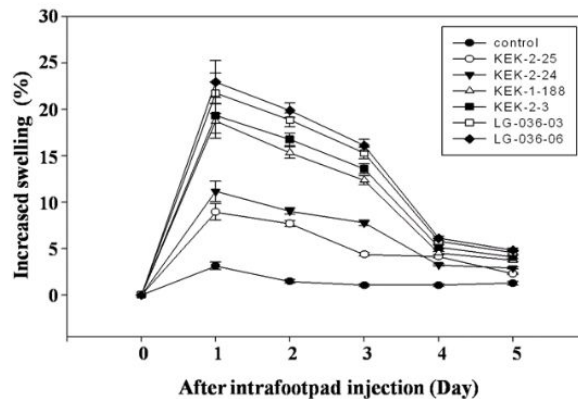


그림 58. 지연성 과민반응검사

LG-036-03: 복합제 1 ; LG-036-06: 복합제 2; KEK-1-188: 생인삼잎 조사포닌; KEK-2-3: 증숙인삼잎 조사포닌; KEK-2-25: 생인삼꽃봉오리 조사포닌; KEK-2-24: 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌

(3) 다당체 및 ginsenoside Re 투여군

면양세포를 죽체에 주사하여 야기된 부종이 대조군에서  $10.53 \pm 1.602$ 로 나타났으며 단일물질인 ginsenoside Re투여군의 경우  $16.378 \pm 4.899$ 로 유의적으로 가장 많이 증가되었다( $P < 0.05$ ). 또

한 인삼뿌리 다당체(RP), 인삼꽃봉오리 다당체(FP), 인삼뿌리 다당체(PR) 순으로 증가하였으나 유의성은 없었다(표 29, 그림 59).

표 29. Effects of *Ginseng extracts* on delayed type hypersensitivity response to SRBC in BALB/C Mice.

Group	Footpad swelling(%)	Significant
대조군	10.534 ± 1.602	
PF	11.342 ± 4.255	.707
PL	11.037 ± 3.324	.809
PR	12.699 ± 2.126	.284
ginsenoside Re	16.378 ± 4.899	.005**

Data was expressed as mean±S.D.P value: Statistically significant value compared with control. (\*; P<0.05, \*\*; P<0.01), PF: 인삼꽃봉오리 다당체; PL: 인삼잎 다당체; PR: 인삼뿌리 다당체

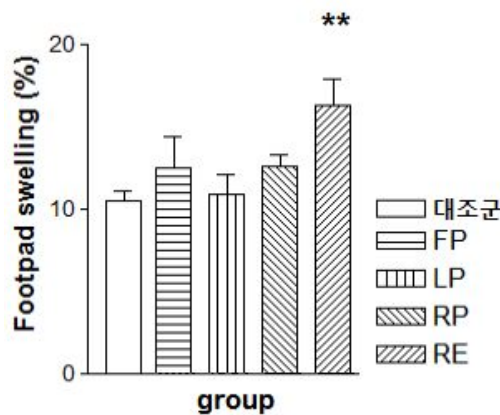


그림 59. 지연성 과민반응검사

#### 바. 비장의 무게와 세포수에 미치는 영향

##### (1) 비장의 무게에 미치는 영향

실험결과 비장의 무게를 측정한 결과 대조군의 비장 무게는 0.139±0.011g 이었다. 이에 비해 증숙인삼잎 조사포닌 투여군의 경우 대조군에 비해 통계적 유의성은 없었으나, 비장무게가 약간 증가된 양상을 보였다. 또한 ginsenoside Re와 생인삼잎 조사포닌 투여군에서 가장 많이 무게가 증가하였다 또한 증숙인삼 조사포닌과 인삼꽃봉오리 다당체 투여군의 경우에는 약간 비장의 무게가 증가하였지만, 인삼잎 다당체와 인삼뿌리 다당체 투여군의 경우에는 오히려 감소하는 경향을 보였다(표 30, 그림 60).

표 30. Effects of Ginseng extracts on spleen weight in BALB/C mice.

Group	Spleen weight(g/animal)
대조군	0.139 ± 0.011
생인삼잎 조사포닌	0.146 ± 0.014
증숙인삼잎 조사포닌	0.151 ± 0.018
증숙인삼꽃봉오리 조사포닌	0.143 ± 0.016
FP	0.141 ± 0.012
LP	0.130 ± 0.016
RP	0.132 ± 0.010
Ginsenoside Re	0.146 ± 0.012

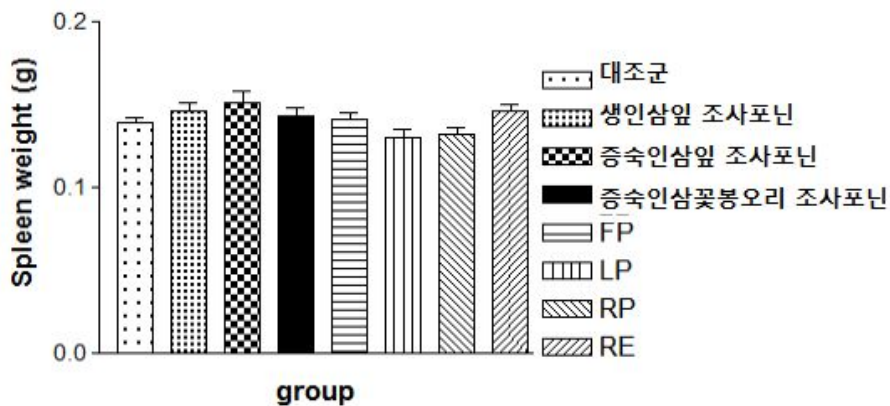


그림 60. 비장무게에 미치는 영향

(2) 비장 세포수에 미치는 영향

실험결과 비장의 세포수를 측정한 결과 대조군의 비장 세포수는  $2.56 \pm 0.2710^7$  이었다. 이에 비해 증숙인삼잎 조사포닌 투여군의 경우  $3.03 \pm 0.25^7$ 로 대조군에 비해 통계적 유의성은 없었으나 비장 세포수가 약간 증가된 양상을 보였다. 또한 ginsenoside Re, 생인삼잎 조사포닌, 인삼꽃봉오리 다당체, 인삼잎 다당체와 인삼뿌리 다당체 투여군은 대조군과 거의 동등하였으며, 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌 투여군의 경우에는 오히려 감소하는 경향을 보였다(표 31, 그림 61).

표 31. Effects of Ginseng extracts on spleen weight in BALB/C mice.

Group	Total spleen cells ( $\times 10^7$ /ml/mouse)
대조군	2.56 $\pm$ 0.27
생인삼잎조사포닌	2.49 $\pm$ 0.36
증숙인삼잎조사포닌	3.03 $\pm$ 0.25
증숙인삼꽃봉오리 조사포닌	2.26 $\pm$ 0.82
FP	2.53 $\pm$ 0.82
LP	2.43 $\pm$ 0.79
RP	2.68 $\pm$ 0.48
ginsenoside Re	2.58 $\pm$ 0.49

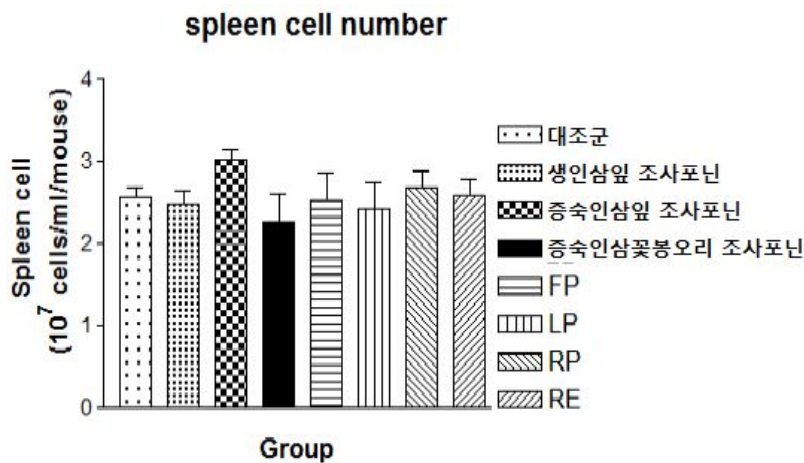


그림 61. 비장 세포수에 미치는 영향

#### 사. Plaque Forming Cell assay

Plaque forming cell assay는 T-의존성 항원인 면양적혈구(SRBC)에 대한 항체생산세포의 항체(IgM) 생성능의 영향을 알아보는 시험법으로서, 인삼뿌리 다당체와 인삼잎 다당체 투여군에서 가장 많이 증가되었으며, ginsenoside Re, 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌 투여군에서도 증가되었으며, 인삼잎 조사포닌 및 증숙인삼잎 조사포닌 투여군에서는 대조군과 거의 동등한 양상을 보였다(표 33, 그림 62).

표 32. Effects of Ginseng extracts on appearance of Plaque Forming Cells response in BALB/C mice.

Group	PFC/10 <sup>6</sup> spleen cells		
대조군	137.7	±	22.0
생인삼잎조사포닌	142.0	±	30.5
증숙인삼잎조사포닌	146.7	±	23.1
증숙인삼꽃봉오리조사포닌	156.7	±	45.5
FP	136.3	±	9.5
LP	162.7	±	34.0
RP	176.0	±	49.0
ginsenoside Re	151.0	±	28.0

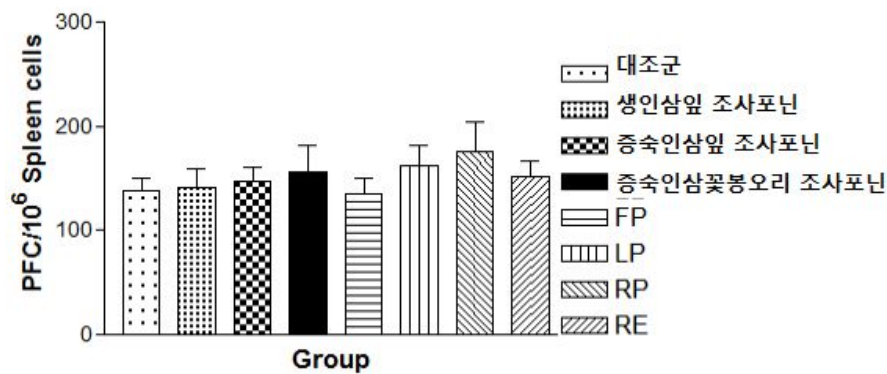


그림 62. Plaque Forming Cell assay

#### 아. Carbon clearance assay

망상내피계 대식세포의 활성을 carbon clearance 분석으로 측정하였을 때 5~10분의 phagocyte index 값은 ginsenoside Re 투여군이 유의적으로 증가되었으며, 증숙인삼잎 조사포닌 투여군을 제외하고 모든 군에서 증가되었다. 또한 5~15분의 Phagocyte index 값에서는 인삼뿌리 다당체 투여군을 제외하고 모든 군에서 증가되었다(표 33).

표 33. Effects of Ginseng extracts on Phagocytic index K of response in BALB/C mice.

Group	Phagocyte index K					
	K 5-10			K 5-15		
대조군	0.014	±	0.005	0.009	±	0.005
생인삼잎 조사포닌	0.021	±	0.016	0.015	±	0.007
증숙인삼잎 조사포닌	0.012	±	0.003	0.010	±	0.005
증숙인삼꽃봉오리 조사포닌	0.018	±	0.011	0.012	±	0.007
FP	0.016	±	0.006	0.014	±	0.005
LP	0.019	±	0.004	0.016	±	0.004
RP	0.016	±	0.008	0.008	±	0.005
ginsenoside Re	0.026	±	0.004*	0.013	±	0.007

이상과 같은 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

- ✓ 비장세포의 증식에 대한 연구를 수행한 결과, 증숙인삼잎 조사포닌, 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌, 인삼꽃봉오리 다당체, 인삼뿌리 다당체와 단일 물질로서 ginsenoside Re, 20S-protopanaxatriol, ginsenoside Rk1이 비장세포의 증식을 증가시켰다.
- ✓ FACS에 의한 유세포 분석을 한 결과, 대부분의 인삼추출물이 T-림파구인 mature subset(CD3), T helper cell(CD4), cytotoxic T cell(CD8)의 발현을 증가시켰으며, 복합제가 가장 큰 활성을 나타내었다.
- ✓ Cytokine assay 실험에서는 대부분의 인삼추출물이 염증성 cytokines인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Th1 type cytokine 인 IL-2, Th2 type cytokine인 IL-4 그리고 macrophage type cytokine인 IL-12이 증가하였으며, 복합제 및 ginsenoside Re가 가장 큰 활성을 나타내었다.
- ✓ 지연성 과민반응검사에서는 대부분의 인삼추출물이 면역활성 작용을 나타내었으며, ginsenoside Re 및 인삼 다당체의 활성이 가장 강하였다.
- ✓ 비장의 무게 및 세포수에 대한 결과로서, ginsenoside Re와 생인삼잎 조사포닌 투여군에서 가장 많이 무게가 증가하였으며, 인삼잎 다당체와 인삼뿌리 다당체 투여군의 경우에는 오히려 감소하는 경향을 보였다.
- ✓ T-의존성 항원인 면양적혈구(SRBC)에 대한 항체생산세포의 항체(IgM) 생성능의 영향을 알아보는 시험법으로서 Plaque forming cell assay를 실시한 결과, 인삼 다당체 투여군에서 가장 많이 증가되었으며, ginsenoside Re, 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌 투여군에서도 증가되었으며, 인삼잎 조사포닌 및 증숙인삼잎 조사포닌 투여군에서는 대조군과 거의 동등한 양상을 보였다.

종합적으로볼때 인삼추출물은 면역활성을 나타내었으며 증숙한 인삼추출물이 증숙하지 않은 인삼추출물에 비해서 활성이 강한 양상을 보였다.

## 제 5 절. 제품의 산업화

### 1. 인삼의 타정

인삼 분말을 가지고 타정을 실시하였다. 천연물 특징을 살리기 위해 가급적 부형제 사용을 자제하였다. 즉 원료 소모량이 크기 때문에 타정 중 손실량을 줄이기 위해 단발타정기로 전체적인 조건을 잡고 후에 로터리 타정기로 타정을 실시 하였다.

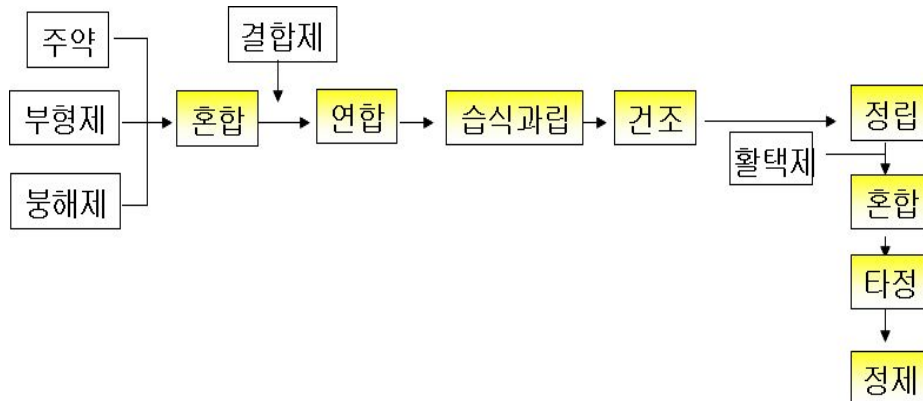


표 34. 인삼지상부 타정 조제

성분	함량(g)	함량(%)
인삼지상부	3185	67.05
직타유당	896	18
Avicell 102	380.8	8
Mg.st	67.2	1.41
MF	164	3.45
정제수	59.7	1.25
Explotab	40	0.84
<b>Total</b>	4743	100

①A (인삼지상부 +직타유당 +Avicell 102 +Mg.st 혼합)

②B (MF+정제수 혼합)

③A+B+Explotab 혼합

④정제 타정

정제무게: 287 - 315mg

정제경도: 6 - 7 Mpa

✓ 제조 과정 A

인삼지상부 자체의 미세 파우더를 다량 함유하기 때문에 압축력이 매우 작아서 타정이 어렵기 때문에 인삼지상부 +직타유당 +Avicell 102 +Mg.st 혼합 하여 타정하기 좋은 상태로 만들어 주었다.



✓ 제조 과정 B

일차 과립을 만든 상태에서 타정을 실시 후 경도 및 마손도 측정 하였으나 기준치 미달을 보였으며 인삼지상부 자체의 결합력이 현저히 부족하다 판단하였다. 이에 MF(함수이산화규소)+정제수 혼합하여 결합력을 높여서 타정을 실시 하였다.

A 과정 으로 타정을 실시 할 때 경도 : 1.9 - 2.3 Mpa

B 과정 으로 타정을 실시 할 때 경도 : 6 - 7 Mpa

위의 경도는 마손도 실험 및 경도 실험을 실시하여 정제의 모서리 부분이 쉽게 깨지지 않는 상태이고 봉해시험법을 실시 하였을 때 적합한 시간에 봉해가 된 경도 조건이다.

✓ 봉해도

제조과정 A, B 를 실시 한 후 봉해시험을 실시 한하였다. B 과정 정제를 가지고 봉해시험 법에 따라 실시 하였다. 실험결과 정제 8개 모두 15분 안에 완전 봉해 되었다(대한 약전 규정에 따르면 나정은 30분, 제피정은 60분 이내에 완전히 용해되어야 한다).

2. 코팅

천연물 특성상 수분에 약하고 마찰에 약하기 때문에 나정 상태에서 코팅하여 정제의 단점을 보완 하였다.

표 35. 인삼지상부 코팅액 조제

성분	함량
HPMC 6cp	25g
HPMC 50cp	35g
PEG 6000	26g
피마자유	4g
에탄올	600ml
디클로메탄	600ml

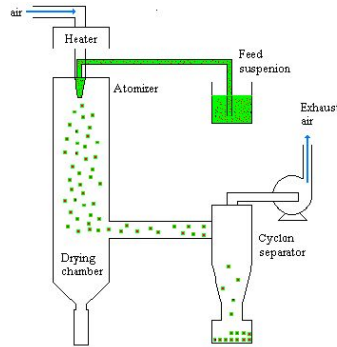
정제 2.2kg에 해당하는 양을 기준으로 두 번에 걸쳐 코팅 실시 하였다.

- ① A(HPMC 6cp+HPMC 50cp+에탄올 - 50℃ 교반)
- ② B(PEG 6000+피마자유+디클로메탄 - 30℃에 교반)
- ③ A+B 교반하여 혼합

### 3. 인삼 추출물의 타정

#### 가. 엑스제조

- 인삼지상부를 70%에탄올로 5시간 동안 추출한 후 건조하여 2층의 메쉬로 여과하였다.
- 동결건조 또는 분무건조를 이용한 추출물의 농축하였다



#### 나. 완제제조

- 정제 제조 : 위에서 제조한 인삼지상부 추출물에 부형제, 붕해제, 활택제를 첨가하여 타정 후, 코팅하였다.
- 캡슐제 제조 : 위에서 제조한 인삼지상부 추출물에 결합제, 감미제등을 첨가하여 균일한 크기의 입자를 갖는 과립제를 제조하여 캡슐에 충전하였다.

### 4. 샴푸의 개발

표 36. 샴푸의 조성

성분	함량
HPMC 6cp	25g
HPMC 50cp	35g
PEG 6000	26g
피마자유	4g
에탄올	600ml
디클로메탄	600ml

A 상	라우릴폴리옥시에틸렌황산에스테르나트륨염	30
	라우릴황산에스테르나트륨염	10
	야자유지방산디에탄올아미드	4
	글리세린	1
	라우릴디메틸아미노초산베타인	3
	정제수	45

B상	한약재 투입(증숙인삼엑기스, 당귀, 흑마늘 엑기스 등	적량
	향료	적량
	방부제	적량
	금속이온봉쇄제	
	정제수	TO 100

### 가. 샴푸의 제조

상기의 A상과 B상을 조성비율로 각각을 혼합한 후 약 60-70도 정도의 온도를 유지하면서 A상과 B상을 혼합한다. 이때 기포가 발생되지 않도록 주의한다. 혼합이 정상적으로 이루어졌는지 확인한 후 상온까지 냉각시킨다. 이때 점도, 물성 등의 품질관리 상태를 체크하면서 이상이 없을 때에는 충진을 한다.

### 나. 시판중인 샴푸

✓ 현재 참여기업인 금산인삼농협을 통하여 “인삼머리알지”라는 상품명으로 판매하고 있으며 (그림 63), 이밖에 정제, 파우치 등의 시제품을 개발하였음(그림 64).



그림 63. 인삼머리알지 샴푸



64. 정제, 파우치 시제품

### 5. 화장품 개발

✓ 인삼추출물이 항산화활성이 뛰어난을 관찰하여 현재 화장품을 개발하고 있음

## 6. 잔류농약 측정

인삼지상부에 존재하는 잔류농약이 증숙과정을 거치면서 허용기준 이하로 감소되는지를 살펴보았다. 인삼꽃봉오리를 미분쇄하여 시료로 사용하였다. 발효인삼꽃봉오리는 액상의 발효 인삼꽃봉우리 샘플을 동결건조한후 이를 재분쇄하여 시료로 사용하였다.

분석방법은 식품공전(2010)의 제10항의 일반시험법 중 인삼의 잔류농약의 분석법에 준하여 실시하였다.

① GC: Agilent 7890A detector;  $\mu$ ECD, NPD, column ; J and W Scientific HP-5: Length : 30m , ID:0.320mm, Film: 0.25um

② LC : Agilent 1200; detector; scanning UV (254nm), column ; GRACE 사의 Gracesmart RP-18 5um, Length : 250mm, ID : 4.6mm, Fluorescence Detector (Ex 330nm → Em 425nm)을 사용하였다.

Standard material : Accustandard 사의 각각의 표준물질(100ppm)을 구입하여 사용하였다.

분석결과 표 37, 38, 39에서와 같이 56종의 잔류농약 중 5종의 농약이 검출되었으며 Kresoxim-Methyl은 허용 기준치 이하로 검출되었다. 또한 증숙(열처리)한 인삼꽃봉오리의 잔류농약도 비슷한 양상으로 검출되었다. 한편, 발효한 인삼꽃봉오리의 경우 Fluquinconazole의 농약이 상당부분 감소되었으나 허용 기준치를 초과하였다. 인삼 꽃봉오리는 보통 5월 말-6월 중순경에 채집하는데 이 시기에 농약을 많이 사용하는 시기이므로 검출이 많이 되는 것으로 판단된다. 한편, 인삼잎의 경우에는 꽃봉오리에 비해서 비교적 낮게 검출되었으며 뿌리는 검출되지 않았다.

표 37. 인삼잎, 꽃봉오리 잔류농약

농약명	허용 기준치 (ppm)	측정치(ppm)	
		인삼꽃봉오리	인삼잎
Pyrimethanil	0.3	1.78	0.28
Kresoxim-Methyl	1	0.39	0.12
Fluquinconazole	0.5	2.22	0.78
Boscalid	1.2	3.6	1.35
Cypermethrin	0.1	3.44	0.67

표 38. 증숙인삼잎, 꽃봉오리 잔류농약

농약명	허용 기준치 (ppm)	측정치(ppm)	
		인삼꽃봉오리	인삼잎
Pyrimethanil	0.3	1.78	0.16
Kresoxim-Methyl	1	ND	ND
Fluquinconazole	0.5	2.22	0.65
Boscalid	1.2	3.6	1.33
Cypermethrin	0.1	3.44	0.53

표 39. 발효인삼꽃봉오리 잔류농약

농약명	허용 기준치 (ppm)	측정치(ppm)	
		인삼꽃봉오리	인삼잎
Pyrimethanil	0.3	1.04	0.06
Kresoxim-Methyl	1	ND	ND
Fluquinconazole	0.5	1.35	0.48
Boscalid	1.2	3.6	1.33
Cypermethrin	0.1	3.44	0.53

이상과 같은 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

- ✓ 인삼 분말을 이용하여 정제 및 캡슐제를 만들었다.
- ✓ 인삼 추출물을 이용하여 정제 및 캡슐제를 만들었다.
- ✓ 인삼을 이용한 한방삼푸를 개발하여 상품화 하여 금산인삼농협을 통하여 판매하고 있다.
- ✓ 인삼에 존재하는 잔류농약을 측정된 바 향 후 잔류농약을 제거할 수 있는 방법을 개발할 필요가 있다고 판단된다.

# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제1절 연차별 목표달성도

□ 본 연구는 인삼지상부를 이용하여 증숙방법의 개발, 성분분석 및 유효물질 분리, 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(H5N1)의 억제활성, 면역활성, 항산화활성, 발모활성, 심근수축력 억제활성과 같은 다양한 생리활성 검증 및 이를 이용한 제품화하는 과제으로써 다음과 같이 연차별로 목표를 달성하였다.

### 1. 1차년도 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2008)	인삼지상부의 성분분석, 증숙법 및 복합제의 개발	인삼잎, 꽃봉오리의 대량 채집 및 추출	100	■ 금산지역에서 5-6월 사이에 대량으로 인삼꽃봉오리 채집, 10-11월 사이에 인삼잎 채집
		인삼잎, 꽃봉오리 추출물의 성분분석	100	■ 채집한 인삼잎 및 꽃봉오리의 여러가지 사포닌 성분을 분석하였음
		증숙방법 개발	100	■ 온도별, 시간별 인삼잎, 꽃봉오리의 증숙조건을 확립하였음
	인삼지상부의 활성물질의 분리 정제 및 구조동정	인삼지상부의 물질분리	100	■ 인삼잎으로부터 20종의 물질을 분리 및 정제했음 ■ 인삼꽃봉오리로부터 2종의 물질을 분리 및 정제했음
		분리된 물질구조 분석	100	■ 인삼잎으로부터 17종의 화합물을 구조동정하였으며 이 중 1종의 신규물질을 찾아내었음 ■ 인삼꽃봉오리로부터 1종의 화합물을 구조동정하였으며 이 중 3종의 신규물질을 찾아내었음
	인삼지상부의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(H5N1) 억제효과에 관한 연구	인삼잎, 증숙인삼잎의 in vivo AIV인 H5N1 바이러스 억제활성 측정	100	■ 인삼잎 및 증숙인삼잎은 40%의 생명연장활성을 나타내었음(특허출원).
		인삼꽃봉오리, 증숙인삼꽃봉오리의 in vivo AIV인 H5N1 바이러스 억제활성 측정	100	■ 인삼꽃봉오리 및 증숙인삼꽃봉오리는 32.9-40%의 생명연장활성을 나타내었음(특허출원).
	인삼지상부의 면역활성에 관한 연구	인삼잎, 인삼꽃봉오리, 증숙인삼잎, 증숙인삼꽃봉오리의 면역활성측정	100	■ cytokine assay : 여러 가지 사이토카인의 발현이 증가되었음 ■ 조직 미네랄검사 : Ca, Mg, Na의 양이 1.5배 증가되었음.
	제품의 산업화 및 수출화	인삼지상부를 소재로 한 제형개발	100	■ 정제 및 캡슐제와 제형연구를 수행하였음

## 2. 2차년도 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2009)	인삼지상부의 성분분석, 증숙법 및 복합제의 개발	증숙방법 개발	90	■ 인삼지상부의 산처리에 의한 증숙방법 연구
		성분 분석	100	■ 증숙방법에 따른 인삼지상부의 성분변화를 분석하였음
		성분 표준화	100	■ 온도별, 시간별 인삼잎, 꽃봉오리의 증숙조건을 확립하였음
		증숙방법에 따른 활성	100	■ 항산화, 혈관내피세포염증억제 활성 및 발모활성 검증
	인삼지상부의 활성물질의 분리 정제 및 구조동정	화합물의 분리정제 및 구조결정	100	■ 증숙인삼잎으로부터 2종의 물질을 분리 및 정제했으며 이 중 9종은 신물질을 찾아냈음
		대량분리정제방법 개발	100	■ 증숙인삼잎으로부터 대량분리정제방법을 확립했음. ■ 증숙인삼꽃봉오리로부터 대량분리정제방법을 확립했음
	인삼지상부의 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스(H5N1) 억제효과에 관한 연구	인삼잎, 증숙인삼잎의 in vivo AIV인 H5N1 바이러스 억제활성 측정	100	■ 증숙인삼잎 조사포닌 분획물은 56.4%의 생명연장활성을 나타내었음.
		인삼꽃봉오리, 증숙인삼꽃봉오리의 in vivo AIV인 H5N1 바이러스 억제활성 측정	100	■ 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌 분획물은 40% 생명연장활성을 나타내었음(특허출원)
		분리한 단일물질 및 증숙 인삼지상부 추출물의 in vitro 바이러스 억제활성	100	■ in vitro 바이러스 억제활성은 나타나지 않았음
	인삼지상부의 면역활성에 관한 연구	면역활성측정	100	■ cytokine assay : 여러 가지 사이토카인의 발현이 증가되었음 ■ 조직 미네랄검사 : Ca, Mg, Na의 양이 1.5배 증가되었음.
	제품의 산업화 및 수출화	인삼지상부를 소재로 한 제형개발 및 잔류농약 검사	100	■ 정제 및 캡슐제와 제형연구를 수행하였음

### 3. 3차년도 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2010)	인삼지상부의 성분분석, 증숙법 및 복합제의 개발	효능이 증강된 복합제의 개발	100	■ 사포닌을 다량 함유하고 있는 더덕, 도라지 등과 같은 단일식물을 중심으로 복합제 1,2를 개발하였음.
		증숙방법에 따른 활성	100	■ 항산화, 혈관내피세포염증억제 활성, 발모활성, 심근수축력 감소활성 검증
	인삼지상부의 활성물질의 분리 정제 및 구조동정	화합물의 분리정제 및 구조결정	100	■ 증숙인삼꽃봉오리로부터 2종의 물질을 분리 및 정제했으며 이중 1종이 신물질을 찾아냈음
		대량분리정제방법 개발	100	■ 증숙인삼잎으로부터 대량분리정제방법을 확립했음. ■ 증숙인삼꽃봉오리로부터 대량분리정제방법을 확립했음
	인삼지상부의 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스(H5N1) 억제효과에 관한 연구	인삼잎, 증숙인삼잎의 조사포닌 분획물의 in vivo AIV인 H5N1 바이러스 억제활성 측정	100	■ 증숙인삼잎 조사포닌 분획물은 우수한 생명연장활성을 나타내었음. ■ 다당체는 생명연장활성을 나타내지 않았음
		인삼꽃봉오리, 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌 분획물의 in vivo AIV인 H5N1 바이러스 억제활성 측정	100	■ 증숙인삼꽃봉오리 조사포닌 분획물은 우수한 생명연장활성을 나타내었음(특허출원) ■ 다당체는 생명연장활성을 나타내지 않았음
		인삼지상부에서 분리한 단일물질의 in vitro AIV인 H5N1 바이러스 억제활성 측정	90	■ in vitro 실험에서 바이러스 억제활성을 나타내지 않았음
	인삼지상부의 면역활성에 관한 연구	면역활성측정	100	■ cytokine assay : 여러 가지 사이토카인의 발현이 증가되었음 ■ 조직 미네랄검사 : Ca, Mg, Na의 양이 1.5배 증가되었음.
	제품의 산업화 및 수출화	인삼지상부를 소재로 한 제형개발 및 잔류농약 검사	100	■ 정제 및 캡슐제 시제품 및 인삼머리알지"와 같은 한방삼푸 상품화 및 판매



## 제2절 관련 분야에의 기여도

- 대부분 버려지고 있는 인삼지상부를 소재로 하여 증숙방법을 개발하였으며 고병원성조류인 플루엔자 바이러스인 H5N1에 우수한 억제활성이 있음을 발견하여 향 후 이 분야에 커다란 기여를 할 것으로 판단된다.
- 인삼잎과 꽃봉오리로부터 신규물질을 최초로 찾아내었으며, 증숙인삼잎과 꽃봉오리로부터 신규물질을 찾아내어 학문적으로 많은 기여를 할 것으로 판단된다.
- 인삼지상부는 바이러스 억제활성 뿐만 아니라 면역활성, 발모활성, 항산화활성을 나타냄을 확인하였다,
- 특히, 인삼잎과 꽃봉오리에 다량 존재하는 ginsenoside F1이 강력한 심근수축력 감소활성을 나타내어 향 후 고혈압 치료제로서의 가능성을 타진 하였다.
- 인삼의 발모효능을 검증하여 샴푸를 개발하여 참여업체인 금산인삼농협에서 현재 시판하고 있으며 향 후 화장품으로서의 개발 가능성이 있다고 판단된다.

향 후 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 억제제 개발과 관련된 분야에 커다란 기여를 할 것으로 판단되며, 나아가서 우리나라 인삼의 우수성을 세계에 널리 홍보할 수 있을 것이라 판단된다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절. 실용화, 사업화 계획

- 이미 “인삼머리알지”와 같은 제품을 개발하여 판매하고 있으며 향 후 화장품으로 개발할 예정이다.
- 파우치는 물론 정제 및 캡슐제로 개발하여 판매할 예정이다.
- 단일물질인 ginsenoside F1을 고혈압 치료제로 개발 가능성을 타진하고 있다.
- 효능이 증강된 복합제를 제품화하기 위한 연구를 수행할 계획이다.

### 제 2 절. 교육지도, 홍보, 특허, 지적재산권 확보 계획

- 인삼에 존재하는 새로운 물질의 발견 및 활성실험 결과를 SCI 논문에 6건을 게재하였다.
  - ◇ Nguyen Huu TUNG, Gyu Yong SONG, Yong Jin PARK, and Young Ho KIM, Two New Dammarane-Type Saponins from the Leaves of Panax ginseng, Chem. Pharm. Bull. 57(12) 1412-1414 (2009)
  - ◇ Nguyen Huu Tung, Gyu Yong Song, Jeong-Ah Kim, Jae-Hee Hyun, Hee-Kyoung Kang, Young Ho Kim, Dammarane-type saponins from the flower buds of Panax ginseng and their effects on human leukemia cells, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20 (2010) 309 - 314
  - ◇ Tung, Nguyen-Huu; Song, Gyu-Yong; Nhiem, Nguyen-Xuan; Ding, Yan; Tai, Bui-Huu; Jin, Long-Guo; Lim, Chae-Moon; Hyun, Jin-Won; Park, Chun-Jung; Kang, Hee-Kyoung; Kim, Young-Ho. Dammarane-Type Saponins from the Flower Buds of Panax ginseng and their Intracellular Radical Scavenging Capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2010), 58(2), 868-874.
  - ◇ Nguyen Huu Tung, Jeong-Hyun Son, Kyoungwon Cho, Jeong-Ah Kim, Jae-Hee Hyun, Hee-Kyoung Kang, Gyu Yong Song, Chun Jung Park, Young Ho Kim, Phenolic components from the leaves of Panax ginseng and their effects on HL-60 human leukemia cells, Food Sci. Biotechnol, 19(1):271-274(2010),
  - ◇ Nguyen Huu Tung, Seo Young Yang, Jeong Ah Kim, Gyu Yong Song, and Young Ho Kim. Dammarane-type Saponins from the Black Ginseng. Bull. Korean Chem. Soc. 2010, Vol. 31, No. 11 3423-3426.
  - ◇ Nguyen Huu TUNG, Gyu Yong SONG, ChauVan MINH ,Phan Van KIEM, Long Guo JIN, Hye-Jin, BOO, Hee-Kyoung KANG, Young Ho KIM. Steamed Ginseng-Leaf Components Enhance Cytotoxic Effects on Human Leukemia HL-60 Cells. Chem.

Pharm. Bull. 58(8)1111 - 1115(2010).

□ 인삼에 존재하는 새로운 물질의 발견 및 활성화에 대한 특허를 6건 출원하였으며 1건이 등록되었다.

- 특허출원

- ◇ 송규용, 서상희, 김영호, 박용진, 박천정. 흑인삼엽 가공 건조분말 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 예방 및 치료용 조성물, 출원번호 : 10-2008-0097442
- ◇ 송규용, 서상희, 김영호, 흑인삼꽃봉오리 가공 건조분말 또는 그 추출물을 유효성분으로 함유하는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 예방 및 치료용 조성물, 출원번호 : 10-2010-0029649
- ◇ 송규용, 김영호, 고영상, 신규 진세노사이드 및 이의 용도, 출원번호 : 10-2010-0048283
- ◇ 송규용, 김영호, 고영상, 진세노사이드의 자가면역 질환의 예방 및 치료 용도, 출원번호 : 10-2010-0042156
- ◇ 김영호, 송규용, 우선희, 진세노사이드를 함유하는 심혈관계 질환의 예방 및 치료용 조성, 출원번호 : 10-2010-0051845
- ◇ 김영호, 고영상, 진세노사이드의 면역성 질환의 예방 및 치료 용도, 출원번호 : 10-2011-0003063

- 특허등록

- ◇ 김영호, 송규용, 우선희, 진세노사이드를 함유하는 심혈관계 질환의 예방 및 치료용 조성, 출원번호 : 10-2010-0051845, 등록번호 : 10-1016996 (20110216)

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 중국삼 및 화기삼이 세계시장을 석권하고 있다. 특히 화기삼은 성분분석과 활성을 바탕으로 하여 고품질의 인삼제품으로 개발되고 있는 추세이다.
- 또한 미국과학자들은 화기삼 뿐만 아니라 고려인삼에 대한 연구도 활발한 편이다. 최근의 인삼연구에 대한 자료는 아래와 같다.
  - Activity and properties of  $\alpha$ -amylase in growing *Panax ginseng* C. A. Mey. tissue culture. Spasenkova, O. M.; Shvedova, V. N.; Komov, V. P.; Komarova, O. V. St. Petersburg. Khim.-Farm. Akad., Russia. *Rastitel'nye Resursy* (2002), 38(4), 90-96.
  - Structural identification of ginseng polysaccharides and testing of their antioxidant activities. Luo, Dianhui; Fang, Baishan. *Carbohydrate Polymers* (2008), 72(3), 376-381.
  - American ginseng and Asian ginseng reduce blood glucose level and body weight. Xie, Jing-Tian; Wicks, Sheila; McEntee, Eryn; Yuan, Chun-Su. *Recent Progress in Medicinal Plants* (2008), 20 111-123.
  - Ginsenosides promote proliferation of chicken primordial germ cells via PKC-involved activation of NF- $\kappa$ B. Ge, Chutian; Zhang, Caiqiao; Ye, Jian; Tang, Xinyan; Wu, Yanqun. *Cell Biology International* (2007), 31(10), 1251-1256.
  - Angiomodulatory and neurological effects of ginsenosides. Leung, K. W.; Yung, K. K. L.; Mak, N. K.; Yue, P. Y. K.; Luo, H.-B.; Cheng, Y.-K.; Fan, T. P. D.; Yeung, H. W.; Ng, T. B.; Wong, R. N. S. *Current Medicinal Chemistry* (2007), 14(12), 1371-1380.
  - Ineffectiveness of American ginseng in the prevention of dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors in mice. Wurz, Gregory T.; Marchisano-Karpman, Cristina; DeGregorio, Michael W. *Oncology Research* (2006), 16(6), 251-260.
  - Increase of acetylcholine release by *Panax ginseng* root enhances insulin secretion in Wistar rats. Su, Chih-Fen; Cheng, Juei-Tang; Liu, I.-Min. *Neuroscience Letters* (2007), 412(2), 101-104.
  - Anti-tumor study of ginseng stems and leaves saponin and combined with 5-fluorouracil. Chen, Zhidong; Wu, Tie; Zhang, Liyuan. *Guangdong Medical College, Zhanjiang, Xiandai Zhongxiyi Jiehe Zazhi* (2008), 17(5), 660-661.
  - Method for removing pesticide residues from ginseng. Zhang, Min; Zhao, Suoqi; Xu, Zhiming; Sun, Xuewen; Zhao, Guanglei. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* (2008), 13pp.
  - Easy DNA extraction for rapid detection of *Panax ginseng* C. A. Meyer in commercial ginseng products. Del Serrone, P.; Attorri, L.; Palazzino, G. *Natural Product Research*.
  - Age stages in the ontogeny of cultivated *Panax ginseng* C. A. Mey. Khrolenko Iu A; Burundukova O L; Bezdeleva T A; Muzarok T I; Zhuravleva Iu N, *Rossiiskaia akademiia nauk* (2007), (2), 157-62
  - Medicinal flowers. XI. Structures of new dammarane-type triterpene diglycosides with hydroperoxide group from flower buds of *Panax ginseng*. Yoshikawa, Masayuki; Sugimoto, Sachiko; Nakamura, Seikou; Matsuda, Hisashi. *Chemical & Pharmaceutical*

Bulletin (2007), 55(4), 571-576.

- Red american ginseng : ginsenoside constituents and antiproliferative activities of heat-processed Panax quinquefolius roots. Wang, Chong-Zhi; Aung, Han H.; Ni, Ming; Wu, Ji-An; Tong, Robin; Wicks, Sheila; He, Tong-Chuan; Yuan, Chun-Su. Planta Medica (2007), 73(7), 669-674.
- Studies on chemical constituents of the hydrolysate of the fruit of Panax ginseng C. A. Meyer. Wang, Dan; Chai, Ruihua; Zhao, Yuqing. Zhongguo Xiandai Zhongyao (2008), 10(1), 12-14, 40.

□ 유럽에서 인삼소비가 비교적 많은 프랑스 인사제품 시장규모 및 시장동향  
(2006.1.13, 건강기능식품에서 발췌)

### 1. 시장 규모 및 동향

프랑스는 해외에서 수입한 인삼 원료 외에도 지난 '91년부터 피카르디(프랑스 북부)지방에서 재배하는 인삼(연간 5톤 정도)을 사용해 크림, 샴푸, 젤리형 등 영양제를 제조하고 있다. 나머지는 제약회사에서 강장제 등 갱년기 현상 방지 보약을 캡슐이나 분말 형태로 제조, 판매하고 있는 것으로 알려졌다. 프랑스의 홍삼 시장은 주로 제약회사에서 약제로 사용하는 수요에 한정되어 있었는데 피카르디 지방에서 재배한 인삼을 제품화하면서 인삼의 효력에 대한 소비자들의 호응이 바뀌고 있다. 그렇지만 여전히 프랑스 소비자들의 인삼에 대한 인지도가 여타 경쟁 보조식품 및 건강식품에 비해 낮은 상태여서 인삼제품의 수요 붐을 창출하는 데는 상당히 긴 시간이 필요할 것으로 보인다. 프랑스 보조식품 및 의약품 제조업체들은 인삼을 함유한 건강식품, 청량음료 및 비타민 제품을 개발하고 있으며, 유통업체들도 마진율이 일반 식료품보다 월등히 좋은 인삼 상품 판매에 열을 올림으로써 최근 수년 동안 연평균 10% 이상의 판매 증가율을 기록했다. 그러나 2003년도에 수입이 감소한 것으로 미루어 보아 수요 증가를 기대하기가 어려울 것으로 보인다. 한편, 프랑스 인삼 제품 제조업체들은 가격이 저렴한 중국 인삼을 선호하고 있어 지난 2000년도까지는 중국 인삼이 프랑스 수입시장의 7할을 차지했다. 그 이후 중국인삼의 수입이 급감해 수입 시장 점유율이 5할 수준으로 떨어지면서 한국 인삼 뿌리 및 분말의 수입 회복세가 보이고 있어 고무적이다. 이는 한국인삼의 수입가격 인하와 유로화의 강세 등으로 경쟁력이 향상된 데 기인한 것으로 분석된다. 따라서 한국 인삼의 수출 증대를 위해서는 가격경쟁력을 강화하는 것이 가장 지름길일 것으로 판단된다. 프랑스 관세청 수입통계에 의하면, 2000년도까지는 중국산이 물량면에서 프랑스의 인삼 뿌리 및 분말 시장의 70% 이상을 차지했고 한국산은 0.6% 내지 1.8% 수준에 불과했다.

이탈리아, 독일 및 스페인 등을 거쳐서 수입되는 중국산을 포함하면, 중국이 원산지인 인삼 및 인삼 분이 차지하는 비중은 95% 이상이었을 것으로 추정된다. 2001년도부터 중국과 한국산 인삼 뿌리 및 분말 수입시장 점유율은 종전과는 상반되는 증감 현상을 보여 2003년 말 현재

금액 면에서는 중국산이 48%, 한국산이 27.5%를, 그리고 물량 면에서는 중국산이 53.2%, 한국산이 13%에 달한 것으로 나타났다. 프랑스에서는 본래 노인들이 원기 회복용으로 인삼을 원료로 한 약품들을 의사의 추천을 받아 구매해왔는데, '90년대 후반에 들어서는 여타 정력제품과 함께 청장년 남자 소비자들이 정력제로 구매하는 비중이 증가했다. 약국에서 판매하는 캡슐 또는 분말과 약초 전문점에서 판매하는 인삼 절편 등이 판매되고 있다. 정력제용 인삼으로서는 중국이나 네팔산보다 한국산이 더 좋은 것으로 인식돼 있으나 인삼의 효과를 알고 있는 소비자 비중은 전체 국민의 5%에 불과한 것으로 나타나 인삼에 대한 홍보가 부족한 실정이다. 한국산 인삼의 효능 및 품질에 대한 인지도에도 불구하고 프랑스의 한국산 인삼 수입량이 중국산 수입량에 비해 극히 저조한 원인은 인삼을 원료로 한 의약품이 프랑스 사회보장 제도의 환불 대상이 아니어서 가격이 저렴한 중국산을 선호하기 때문이다. 인삼을 원료로 한 의약품이 환불 받지 못하는 이유는 인삼 제품이 치료제가 아니고 보약이기 때문이다. 일부에서는 사회보장기관의 적자해소 면에서 보약이나 강장제 등을 환불해주는 것이 오히려 더 경제적이라는 주장을 하지만 반영되지 않고 있다. 그리고 또 다른 이유로는 중국에서 재배된 미국 품종 인삼이 음성이어서 열이 많은 젊은층 및 여성 소비자들에게 더 효과적이라는 중국 측의 홍보 때문인 것으로도 알려지고 있다. 판매처를 보면, 약국을 통해 인삼을 구매하는 소비자가 대부분이며 건강식품 전문점, 일부 슈퍼마켓의 식품코너 등도 인기를 끌고 있고 근래부터는 우편판매업체를 통해 일반 인삼제품을 구매하는 소비자도 증가하고 있다.

## 제 7 장   참고문헌

1. 이상인. 1980. 한국인삼사. 삼화인쇄주식회사. 하권, p 166.6.
2. Park JD, Rhee DK, Lee YH. Biological activities and chemistry of saponin from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Phytochemistry Reviews*, 4:159-175, 2005.
3. 김기환 등, *Korea J. Ginseng Sci*, 21(2):78-84, 1997.
4. 서성욱 등, *Korea J. Ginseng Sci*, 22(1):32-42, 1998.
5. Saito H et al. Proc. 1978, 2nd International Ginseng symposium, 109.
6. Okamura N et al. *Biol. Pharm. Bull.* 17(2):270, 1994.
7. 오미숙 등, *Korea J. Ginseng Sci*, 24(4):188-195, 2000.
8. 이혜연 · 이한수, *Korea J. Ginseng Sci*, 22(1):60-65, 1998.
9. 최영득 등, *Korea J. Ginseng Sci*, 23(1):13, 1999.
10. Xie JT, Wang CZ, Wang AB, Wu J, Basila D, Yuan CS. Antihyperglycemia effects of total ginsenosides from leaves and stem of *Panax ginseng*. *Acta Pharmacologica Sinica* 26(9):1104-1110, 2005.
11. Wang CZ, Wu JA, Mcentee E, Yuan CS. Saponins composition in american ginseng leaf and berry assayed by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 54(6):2261-2266, 2006.
12. 장현기. 인삼엽의 채엽시기에 따른 사포닌 성분의 함량 및 조성. 한국식품영양학회지. 11(1):82-86, 1998.
13. Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, et al. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett.* 150:41-48, 2000.
14. 송규용 외 6명; 흑삼의 제조방법 및 이를 함유하는 조성물, 특허등록 10-754253 (2007.08.27)
15. Park IH, Kim NY, Han SB, Kim JM, Kwon SW, Kim HJ, Park MK, Park JH. Three new dammarane glycosides from heat processed ginseng. *Archives of pharmacal research*, 25(4):428-32, 2002.
16. Park IH, Han SB, Kim JM, Piao L, Kwon SW, Kim NY, Kang TL, Park MK, Park JH. Four new acetylated ginsenosides from processed ginseng (sun ginseng). *Archives of pharmacal research*, 25(6):837-41, 2002.
17. Liu L, Zhu, XM. Wang QJ. Zhang DL. Fang ZM. Wang CY et al. Enzymatic preparation of 20(S,R)-protopanaxadiol by transformation of 20(S,R)-Rg3 from black ginseng. *Phytochemistry*. 71(13):1514-1520, 2010.
18. Sun BS, Gu LJ, Fang ZM, Wang CY, Wang Z, Sung CK. Determination of 11 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by high performance liquid chromatography. *Food Science and Biotechnology*. 18(2):561-564, 1998.

19. Folin A.D et al., A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine. *Biol. Chem.*, 22:305-308, 1915.
20. Blois MS, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 181:1199-120, 1958.
21. Kato H, Lee IE, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F., Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidines. *Agric. Biol. Chem.*, 51:1333-1338, 1987.
22. Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, 33:557-561, 1993.
23. Nam, S. Y., Mun, J. H, Yun, Y .W., Baek, I. J. and Yon, J. M, Effect of NDM hair tonic on hair growth promotion in an alopecia model of C57BL/6 Mice, *Korean J. Lab. Animal Sci.*, 20(1):55, 2004.