



Comparison of ginsenoside (Rg1, Rb1) content and radical-scavenging activities of wild-simulated ginseng extract with respect to the solvent

Su Cheol Kim¹, Chung Eun Hwang², Ba O Lo Kim³, Ki Hyun Lee³, Jin Hwan Lee⁴,
 Kye Man Cho^{1*}, Ok Soo Joo^{1*}

¹Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

²Department of Research and Development, Jinju Bio Industry Foundation, Jinju 52839, Korea

³Agricultural Corporation Ltd., St Mario Farm, Goseong 52951, Korea

⁴Department of Life Resources Industry, Dong-A University, Busan 49315, Korea

추출용매에 따른 산양삼의 진세노사이드(Rg1, Rb1) 함량과 radical-scavenging 활성 비교

김수철¹ · 황정은² · 김바오로³ · 이기현³ · 이진환⁴ · 조계만^{1*} · 주옥수^{1*}

¹경남과학기술대학교 식품과학과, ²(재)진주바이오산업진흥원 연구개발실,

³주식회사 농업회사법인 성마리오농장, ⁴동아대학교 생명자원산업학과

Abstract

The variation in the ginsenoside (Rg1, Rb1) content and antioxidant activities of a wild-simulated ginseng extract with respect to the extraction solvent (water and ethanol) were investigated. During water extraction, the Rg1 (17.85-18.31 mg/g) and Rb1 (12.22-13.64 mg/g) contents were high at an extraction temperature of 80°C, and there was no significant difference upon varying the extraction time. The ginsenoside content was higher in ethanol extracts than in water, and the Rg1 and Rb1 contents increased with an increase in the ethanol concentration. In particular, the average concentrations of Rg1 and Rb1 were 16.38 and 25.28 mg/g, when extracted for 2 h and 4 h, respectively in ethanol at 80 °C. In the case of hot water extraction, the total phenolics content (TPC) and total flavonoid content (TFC) gradually increased with an increase in the extraction temperature; however, there was no difference between TPC and TFC during ethanol extraction (p>0.05). In addition, the DPPH (70.91%) and ABTS (69.17%) radical scavenging activities were the highest in the 70% ethanol extract (extracted for 2 h). From present study the optimal extraction conditions for ginsenosides Rg1 and Rb1 in wild-simulated ginseng were determined as 2 h of extraction time, 70% ethanol, and 80°C of extraction temperature.

Key words : wild-simulated ginseng, ginsenoside (Rb1, Rg1), water and ethanol extract, radical-scavenging activities

서 론

산양삼(wild-simulated ginseng)은 산림청 특별관리 임산물로 인삼을 인공시설이 아닌 자연상태에서 종자나 종묘를

산지에 직접 파종 혹은 이식하여 재배된 삼을 말하며, 식물학적으로 두릅나무과 인삼속에 속하는 식물로 *Panax ginseng* C. A. Meyer로 학명을 표기한다(Kim 등, 2019b). 최근 건강 기능식에 대한 관심이 증가하면서 값이 비싸고 생산량이 적

*Corresponding author. Kye Man Cho. E-mail : kmcho@gntech.ac.kr, Phone : +82-55-751-3272, Fax : +82-55-751-3279

Ok Soo Joo. E-mail : osjoo@gntech.ac.k, Phone : +82-55-751-3273, Fax : +82-55-751-3279

Received 09 December 2020; Revised 04 January 2021; Accepted 05 January 2021.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

은 산삼을 대체할 수 있는 가능성이 높으며 재배 인삼보다 약리활성 및 진세노사이드 함량이 높은 산양삼에 대한 관심이 증가하고 있다(Jung 등, 2019; Kim 등, 2019a; Lui와 Staba, 1980). Kim 등(2004a)은 산삼, 인삼 및 산양삼의 항암 효과 비교 연구를 보고하였고, 인삼 및 산양삼의 생리활성물질 비교, 페놀성 성분 비교 및 유리 아미노산 비교와 같은 연구에서 산양삼이 높은 효능을 보였음을 보고하였다(Lee 등, 2000; Yoo 등, 2000). 또한 산양삼의 항산화 효과(Kim과 Kim, 2006), 혈압강하 효과(Hong 등, 2008), 항염증 효과(Kim과 Son, 2012), 간기능 개선(Lee 등, 2008a) 및 간 독성 효능(Kwon 등, 2003), 지질강하 효과(Yun 등, 2004), 항암 효과(Kim 등, 2004b) 및 혈관신생 촉진 효과(Kim 등, 2018a), 피부 주름 개선 효과(Kim 등, 2018b)의 연구가 보고 되었다.

인삼류의 특유 사포닌인 진세노사이드는 여러 생리활성 물질 중 하나로 인삼의 ginseng과 배당체의 glycoside의 합성어이다. Aglycone의 골격에 의해 triterpenoid계와 steroid계로 나뉘지게 되며 대부분의 고려인삼의 사포닌은 triterpenoid의 dammarane계 사포닌으로 약성이 온화하고 용혈작용이 거의 없으며 과량투여의 독성이 없는 것으로 보고되었다(Chung, 2003). 또한, aglycone의 골격에 glucose, xylose 등의 당을 결합하는 소수성 스테로이드 형태를 가지며, protopanaxadiol, protopanaxatriol, oleanolic 및 octillol계로 나뉜다(Park 등, 2017). Protopanaxadiol계에는 Rb1, Rb2, Rd 등이 있으며, protopanaxatriol계에는 Re, Rg1, Rf 등이 있다(Shin 등, 2015). 이렇듯, 다양한 진세노사이드 화합물에 관해 여러 효능이 연구되었으며, 항통증(Kim 등, 2018c), 항암작용(Shin 등, 2012), 뇌신경 세포 보호(Kim 등, 2004b) 및 항산화 효과(Bae와 Kim, 1998) 등이 알려져 있다.

현대인의 건강에 큰 위협이 되며 노화 및 각종 질병을 유발하는 것으로 주목받고 있는 자유기(free radical)는 세포막 파괴, 지질의 산화, DNA 변성 등과 같은 세포의 기능 장애를 초래하고, 암, 뇌 질환, 동맥경화, 염증, 노화 및 면역질환 등의 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 활성 산소에 의해 발생하는 지질 과산화물은 각종 기능장애를 일으키며, 노화와 각종 질병의 원인이 되기도 한다(Valko 등, 2007). 과도한 스트레스에 의해 여러 질병과 노화에 노출된 현대인에게 효과적이며 안전한 식이성 항산화제의 요구가 절실하다. 인공 합성 항산화제의 안정성에 대한 논란으로 인해 그 사용이 제한되게 되었고, 천연 항산화제에 대한 연구가 증가하고 있으며, 인삼과 같은 식물체로부터의 항산화 능력에 대한 관심이 증가하고 있다(Lee 등, 2008a).

따라서 본 연구자들은 산양삼 열수 추출과 주정 추출에 따른 진세노사이드 Rb1과 Rg1 함량 및 각 산양삼 추출물의 항산화 활성을 비교 분석하여 최적 추출 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

산양삼은 주식회사 자연에 바이오랩농업회사법인으로부터 구입하여 본 연구에서 사용하였다. Ginsenoside 표준품(Rb1 및 Rg1)은 KOC 바이오텍(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. Total phenolics 및 total flavonoids 함량 측정에 사용된 Folin-Ciocalteu phenol 및 diethylene glycol은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. DPPH 라디칼 소거활성에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)과 ABTS 라디칼 소거활성에 사용된 2,4,6-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt(ABTS) 역시 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 이외 분석에 사용된 시약은 1급을 사용하였고, HPLC-water 및 ethanol 등의 유기용매는 Fisher Scientific(Fairlawn, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

분석기기

pH 측정은 pH meter(MP 200, Jenway, Lodon, UK)를 사용하였고 당도 측정은 굴절당도계(Sccharometer, W.S.R.O-90, Atago, Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다. 진세노사이드 Rg1 및 Rb1 분석은 high performance liquid chromatogram(HPLC, Agilent 1200 series, Agilent Co., Forest Hill, Australia)을 사용하였다. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 측정은 spectrophotometer(Mega-800, Scinco, Seoul, Korea)를 사용하였다.

산양삼 열수추출 및 에탄올 추출물 제조

산양삼 건조 분말 5 g을 비이커에 칭량하고, HPLC 등급의 water 또는 에탄올의 농도별(30, 50, 70 및 95%)로 100 mL를 가하여 환류냉각추출장치에서 각각 2시간 및 4시간 추출을 진행하였다. 열수추출의 경우 70, 75, 80, 85, 90 및 95°C로 추출온도를 설정하였고 에탄올 추출의 경우 80 및 95°C로 추출온도를 설정하였다. 추출 후에는 상온까지 냉각시킨 뒤 감압상태에서 필터하여 산양삼 추출물을 제조하였다. 각 추출물들은 60°C에서 용매를 증발시키고, 여기에 증류수 5 mL에 용해한 이 조성물을 대상으로 이화학적 특성, 진세노사이드 함량 및 항산화 활성을 비교 측정하였다.

이화학적 특성 분석

pH 측정은 상기 제조된 시료(1-2 mL)에 pH meter 전극봉을 접촉시켜 측정하였다. 산도 측정은 pH 측정을 끝낸 시료에 1% 페놀프탈레인 용액을 2-3방울 떨어뜨린 후 0.01 N NaOH로 역 적정하여 소비량을 측정하고, 젯산(%) 양으로 환

산하여 결과값을 산출하였다. 가용성 고형물 측정은 시료 1 mL를 굴정당도계를 사용하여 당도를 측정하였다.

진세노사이드 Rg1 및 Rb1 분석

Ginsenoside 분석은 제조된 각 추출물들을 0.45 µm membrane filter로 여과한 것을 분석시료로 사용하였다. 분석에 사용된 칼럼은 C₁₈ TSKgel ODS-100Z(4.6 mm I.D.×25 cm, 5 µm, Tosoh Corp, Darmstadt, Germany)를 사용하였고, 이동상 용매는 HPLC water(A 용매)와 HPLC acetonitrile(B 용매)를 사용하였다. 용매 조건은 A 용매 기준으로 0분-100%, 5분-80%, 10분-77%, 12분-70%, 45분-65%, 50분-30%, 60분-10% 및 65분-81%를 유지하였으며, 시료 주입량은 0.02 mL, 유속은 1 mL/min을 유지하면서 203 nm의 파장에서 검출하였다. 각 표준품들을 HPLC methanol에 녹여 최종적으로 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0 mg/mL의 농도로 제조하여 HPLC로 분석하여 다음과 같은 검량곡선을 작성하여 계산하였다.

$$\text{Rg1(mg/mL)} = (x - 36.99) / 7398.9$$

$$\text{Rb1(mg/mL)} = (x - 11.23) / 5446.5$$

Total phenolics 및 total flavonoids 함량 측정

Total phenolics 함량(TPC)은 Folin과 Ddnis(1912)의 분석을 약간 변형하여 실시하였다. 적당히 희석한 각 조성물 500 µL를 시험관에 분주하고, 25% 탄산나트륨(Na₂CO₃) 용액 500 µL를 첨가하고 3분간 1차 반응시켰다. 1차 반응이 끝난 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 시약을 250 µL 첨가하여 37°C에서 1시간 발색반응을 진행하였다. 발색된 청색 반응물을 3분간 13,500 rpm 속도로 원심분리(Micro 12, Hanil Science Co., Ltd., Daejeon, Korea)하여 상등액만 회수하여 spectrophotometer (Mega- 800, Scinco, Seoul, Korea)에서 732 nm의 파장으로 측정하였다. Total phenolics 함량 계산은 gallic acid를 이용하여 작성된 표준 검량곡선으로부터 함량(mg/g)을 산출하였다.

Total flavonoids 함량(TFC)는 Cho 등(2018)의 분석법을 일부 변형하여 실시하였다. 적당히 희석한 조성물 950 µL를 시험관에 분주하고, diethylene glycol 250 µL와 0.1 N NaOH 50 µL를 첨가한 후 37°C 수욕상에서 1시간 반응시켰다. 발색된 노란색의 반응물을 3분간 원심분리하여 상등액만 회수하여 spectrophotometer(420 nm)로 측정하였다. Total flavonoids 함량 계산은 rutin을 이용하여 작성된 표준 검량곡선으로부터 함량(mg/g)을 산출하였다.

Radical scavenging 활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 Hwang 등(2018)의 분석법을 약간 변형하여 실시하였다. 적당히 희석한 조성물 0.2 mL를 시

험관에 분주하고, DPPH 용액 0.8 mL를 첨가하여 약 30초간 교반한 후 암실에서 30분간 반응시켰으며 분광광도계를 이용하여 525 nm의 파장에서 측정하였다.

ABTS 라디칼 소거활성은 또한 Hwang 등(2018)의 분석법을 약간 변형하여 실시하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate 용액을 각각 1:1 비율로 섞은 후 암실에서 12-16시간 반응하여 ABTS⁺ radical을 형성하였다. 광도계(732 nm)에서 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 메탄올로 희석하였다. 시료 0.1 mL를 시험관에 분주하고 희석된 ABTS 용액 0.9 mL를 첨가하였으며, 교반한 후 3분간 반응 후 값을 측정하였다.

상기 라디칼 소거활성은 아래와 같은 식으로 계산하여 %로 나타내었다.

$$\text{DPPH/ABTS 라디칼 소거활성(\%)} =$$

$$\frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료 첨가시의 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

통계처리

각 실험은 3회 반복 수행하였으며, 본 결과는 SPSS 12.0 package(IBM)를 사용하여 분산분석을 수행하였으며, Duncan's의 다범위검정을 이용하여 유의차를 나타내었다(p<0.05).

결과 및 고찰

추출조건에 따른 이화학적 특성

열수(90°C)에서 4시간 추출하였을 때 5.03으로 가장 낮은 pH값을 보였으며, 80°C에서 열수로 2시간 추출하였을 때에는 5.89로 가장 높은 pH를 보였으나, 평균 5.41로 추출 온도 및 시간에 따른 pH 차이는 크게 없었다. 산도 역시 pH와 비례적으로 나타내었으며 평균 0.11%의 수치를 보였다. 고형물 함량은 12-13 °Brix로 큰 차이를 보이지 않았다. 주정 추출 또한 pH와 산도의 큰 변화를 보이지 않았다. 30% 및 50%의 주정 농도에서 pH 범위는 5의 수준을 보였으며, 70% 및 95%의 농도에서는 pH가 4의 수준을 보였다. 이에 산도는 pH에 비례하는 값을 나타내었다. 가용성 고형물 함량은 95°C에서 95% 주정으로 추출하였을 때 15 °Brix로 가장 높은 함량을 보였으며 평균 13 °Brix로 열수추출보다 조금 증가하였다 (data not shown).

추출조건에 따른 진세노사이드 Rg1 및 Rb1 함량

산양삼을 온도와 시간을 달리하여 열수추출 후 Rg1과 Rb1 함량을 비교 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 70°C에서 2시간 추출한 경우 Rg1은 14.29 mg/g, Rb1은 10.61

Table 1. Comparison of Rg1 and Rb1 contents of wild-simulated ginseng according to the hot-water extraction

Extraction time (h)	Ginsenoside content (mg/g)	
	Rg1	Rb1
70°C-Water		
2	14.29±0.71 ^{1)c2)}	10.61±0.53 ^c
4	9.86±0.49 ^e	6.75±0.34 ^e
75°C-Water		
2	9.87±0.49 ^e	4.66±0.23 ^f
4	3.43±0.17 ^g	1.26±0.06 ^h
80°C-Water		
2	17.85±0.89 ^b	12.22±0.61 ^b
4	18.31±0.92 ^a	13.64±0.68 ^a
85°C-Water		
2	12.09±0.60 ^d	6.71±0.34 ^e
4	11.49±0.57 ^d	4.91±0.25 ^f
90°C-Water		
2	6.52±0.33 ^f	3.40±0.17 ^g
4	13.81±0.69 ^c	9.01±0.15 ^d
95°C-Water		
2	5.26±0.26 ^f	3.54±0.45 ^g
4	0±0.00 ^h	0±0.00 ⁱ

¹⁾All values are presented as the mean±SD (n=3).

²⁾All values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

mg/g이었다. 4시간의 경우, Rg1은 9.86 mg/g, Rb1은 6.75 mg/g으로 감소하였다. 75°C에서 2시간 추출한 경우 Rg1과 Rb1 함량은 각각 9.87 및 4.66 mg/g이었고, 4시간 추출한 경우에는 3.43 및 1.26 mg/g으로 함량이 감소하였다. 특히, 80°C의 경우, Rg1 함량은 17.85(추출 2시간) → 18.31(추출 4시간) mg/g, Rb1 함량은 12.22(추출 2시간) → 13.64(추출 4시간) mg/g으로 약간 증가하였고, 함량은 다른 조건들에 비해 가장 많았다(Table 1). 85°C 온도 조건 역시 Rg 1(12.09 → 11.49 mg/g) 및 Rb1(6.71 → 4.91 mg/g) 함량이 비교적 많았으나, 추출 시간이 증가함에 따라 약간 감소하였다. 90°C에서는 추출 시간이 증가함에 따라 Rg1(6.52 → 13.81 mg/g)과 Rb1(3.40 → 9.01 mg/g) 함량이 증가하였다. 한편, 95°C에서는 4시간 추출 후에 Rg1 및 Rb1 함량이 검출되지 않았다. 특히, 산양삼 추출물은 HPLC로 분석 전, 0.45 μm 등과 같은

필터과정을 거치게 되는데, 70-80°C까지는 필터가 잘 되는 반면, 85-95°C로 갈수록 추출물의 점성이 매우 높아짐에 따라 필터가 되지 않은 어려움이 있었다. 때문에, 본 연구결과에서와 같이 95°C 4시간 추출의 경우 높은 점성으로 인해 HPLC 분석 시 추출물이 분석컬럼을 통과하는 데 어려움이 있어 본 결과와 같이 Rg1과 Rb1 함량이 검출되지 않았다. 이러한 요인은 아마도 고온으로 갈수록 섬유소와 당, 그리고 불순물과 같은 복합물들이 많이 용출되므로 이 물질들의 용해도 증가에 따른 것으로 사료된다. 따라서 산양삼의 열수추출물에서 진세노사이드(Rg1 및 Rb1) 함량이 가장 많이 용출되었던 추출조건은 80°C로 판단되어 상기와 같은 조건으로 주정 농도 별(30, 50, 70, 95%) 추출을 실시하고, 진세노사이드 함량을 비교 분석한 결과는 Table 2와 같았다. 열수추출과는 달리 주정 추출 시에는 Rg1보다는 Rb1 함량이 높게 나타났다. 30% 주정의 경우, Rg1 함량은 15.89 → 16.06 mg/g, Rb1 함량은 22.48 → 21.96 mg/g이었다(Table 2). 한편, 50%-95%의 주정 농도에서는 Rg1과 Rb1 함량이 높은 것으로 나타났으며 큰 차이를 보이지 않았다(Table 2).

Lee 등(2011)은 인삼꽃의 물 추출 온도 및 추출 시간에 따른 진세노사이드 함량을 비교하였으며, 총 진세노사이드는

Table 2. Comparison of Rg1 and Rb1 contents of wild-simulated ginseng according to the ethanol extraction

Extraction time (h)	Ginsenoside content (mg/g)	
	Rg1	Rb1
80°C-30% EtOH		
2	15.89±0.79 ^{1)b2)}	22.48±1.12 ^c
4	16.06±0.80 ^a	21.96±1.10 ^c
80°C-50% EtOH		
2	16.39±0.82 ^a	24.59±1.23 ^b
4	16.38±0.82 ^a	25.53±1.28 ^b
80°C-70% EtOH		
2	16.80±0.84 ^a	25.57±1.28 ^b
4	16.23±0.81 ^a	27.36±1.37 ^a
80°C-95% EtOH		
2	16.76±0.84 ^a	27.35±1.37 ^a
4	16.50±0.83 ^a	27.41±1.37 ^a

¹⁾All values are presented as the mean±SD (n=3).

²⁾All values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

85°C의 온도에서 3시간 추출하였을 때 67.44 mg/g으로 최고 함량을 보였다고 보고하였다. Ha 등(2015)은 진생베리를 주정의 농도, 추출 온도 및 시간에 따라 진세노사이드 함량을 분석하였고, 주정의 농도가 70%일 때 진세노사이드 Rg1의 함량이 4.38 mg/g으로 가장 높은 함량을 보였으며, 100%의 농도에서 3.91 mg/g으로 함량이 감소한다고 보고하였다. 또한 추출 온도가 80°C일 때 3.12 mg/g으로 높은 함량을 나타내었고, 2시간 추출하였을 때보다 3-6시간 추출하였을 때 높은 함량을 보였으며, 3-6시간에 따른 차이는 크게 없음을 보고하였다. 인삼꽃과 진생베리를 이용하여 진세노사이드를 측정하는 점을 제외하고 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 산양삼과 유사한 홍삼은 Lee 등(2008b)의 연구에 따르면, 75, 80, 85, 90, 95°C에서 24, 48, 72시간 추출을 진행하였을 시 Rb1과 Rg1 함량은 지속적으로 감소 혹은 검출되지 않았으며, 추출온도와 시간이 증가할수록 진세노사이드 개별 함량은 전반적으로 감소함을 보고하였다. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 추출시간(2-4시간)이 짧기 때문에 열에 의한 분해가 없어 Rb1과 Rg1 화합물이 검출된 것으로 사료된다. 한편, 본 연구의 산양삼 추출물과 Lee 등(2008b)의 홍삼 추출액에서의 진세노사이드 함량의 차이는 크게 나타났으며, 이는 추출 방법과 추출 용매 등에 따른 차이도 있으나, 가장 큰 차이점은 인삼, 홍삼, 고려삼, 산양삼 등 원물에 따른 차이가 가장 큰 것으로 판단된다. 한편, 삼 종류에 따른 추출물의 진세노사이드 함량 비교 외에도 Kwon 등(2017)의 *Lactobacillus plantarum*을 이용한 산양삼 추출물 발효 연구에서는 생물전환반응을 통해 Rb1 및 Re 농도는 감소한 반면, Rg1 및 Rg5가 증가함을 보고하였고, *Leuconostoc mesenteroides*를 사용한 팽화홍삼 발효(Shim 등, 2014)와 *Aspergillus usami*를 사용한 인삼발효(Jo 등, 2014) 등의 생물전환 반응을 통한 연구가 여럿 보고되었다. 상기 여럿 연구결과들을 바탕으로 본 연구자들도 마찬가지로 유산균 등의 균주를 사용하여 산양삼에서 다양한 진세노사이드 화합물을 변화시키는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

추출조건에 따른 TPC, TFC 함량 및 DPPH, ABTS radical scavenging 활성

산양삼을 온도와 시간을 달리하여 제조한 열수와 주정 추출물의 total phenolics content(TPC), total flavonoids content(TFC) 함량 및 DPPH 및 ABTS radical scavenging은 Tables 3-4와 같았다. 온도 및 시간에 따라 열수 추출하였을 때 70°C의 온도에서 2시간 및 4시간째 TPC는 2.33 mg/g으로 나타났으며, 80°C의 온도에서 2시간 추출하였을 때 3.15 mg/g의 함량을 보였고, 4시간 추출하였을 때 3.19 mg/g의 함량을 보였다. 95°C의 온도에서 2시간 및 4시간 열수추출을 진행하였을

때 시간 별 각 함량은 5.03 mg/g 및 5.12 mg/g으로 나타났다. TPC의 경우 2시간 추출하였을 때보다 4시간 추출하였을 때 높은 함량을 보였으며, 추출 온도가 높을수록 함량이 조금 증가하는 것으로 나타났다. TFC는 추출 시간에 따른 큰 차이를 보이지 않았으며, 추출 온도가 높을수록 높은 함량을 보였다. DPPH 라디칼 소거활성은 95°C의 온도로 2시간 및 4시간 추출하였을 때 각 70.37% 및 71.98%의 활성으로 추출 조건 중 가장 높은 활성을 보였으며 ABTS 라디칼 소거활성 역시 95°C일 때 추출 시간에 따라 72.64% 및 71.63%의 활성으로 높은 활성을 보였다(Table 3).

주정의 경우에는 80°C에서 70% 주정으로 추출했을 때 TPC 함량이 5.05 mg/g(추출 2시간) 및 5.06 mg/g(추출 4시간)으로 함량이 가장 많았으나, 추출용매와 추출시간에 따른 TPC 및 TFC 함량에는 큰 차이가 없었다(Table 4). DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성은 2시간 및 4시간 추출 조건 모두 80°C에서 높은 활성을 보였으며 DPPH 라디칼 소거활성은 70.91%(80°C, 추출 2시간), ABTS 라디칼 소거활성은 69.17%(80°C, 추출 4시간)로 우수하였다. 이 외 30%와 95% 추출물에서는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성이 낮았다. 한편, 50% 주정의 경우, 추출 2시간째 DPPH 라디칼 소거활성은 57.37%, ABTS 라디칼 소거활성은 40.10%로 비교적 우수하였다(Table 4).

페놀성 물질 중 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량에 비례하여 항산화 활성이 증가한다는 연구에 의해 페놀성 물질은 항산화 효과의 지표라고 할 수 있다(Kang 등, 1996). DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성은 free radical 소거활성을 측정하는데 널리 사용되는 대표적인 방법으로 free radical 소거 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 노화를 억제하고 항산화 효과를 억제하는 척도로 이용된다고 알려져 있다(Kim과 Son, 2012). 이와 같이 폴리페놀성 물질과 항산화 활성에 대한 많은 연구가 진행되었으며, Park 등(2018)은 유산균 발효에 따른 붉은 아마씨 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성을 비교하였다. 그 결과 발효를 하지 않은 붉은 아마씨에 비해 발효하였을 때 폴리페놀은 약 1.5-8배 증가하였고 플라보노이드는 약 1.2배 증가하였다고 보고하였다. 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량이 증가함에 따라 유산발효하였을 때 항산화 활성이 증가하였음을 보였고, DPPH 라디칼 소거활성의 경우 100 ppm의 농도에서 약 5.6배 증가하였다고 보고하였다. 또한 Byun 등(2016)은 꽃고추, 홍고추 및 홍피망 중 꽃고추에서 높은 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량을 보였고, 이에 꽃고추에서 높은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성을 보였다고 보고하였다. 한편, 산양삼 지상부 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 연구 결과, Kim 등(2018b)은 열수 추출물의 경우 DPPH 라디칼 소거능

Table 3. Comparison of antioxidant activity of wild-simulated ginseng according to the hot-water extraction

Extraction time (h)	Antioxidant activity			
	TPC ¹⁾ (mg/g)	TFC ²⁾ (mg/g)	DPPH (%)	ABTS (%)
70°C-Water				
2	2.33±0.12 ^{3)c4)}	0.61±0.03 ^c	52.16±2.61 ^c	53.39±2.67 ^c
4	2.33±0.12 ^c	0.63±0.03 ^c	52.16±2.61 ^c	52.38±2.62 ^c
75°C-Water				
2	2.55±0.13 ^c	0.63±0.03 ^c	49.78±2.49 ^d	60.49±3.02 ^b
4	2.65±0.13 ^c	0.69±0.03 ^c	46.77±2.34 ^d	61.50±3.08 ^b
80°C-Water				
2	3.15±0.16 ^b	1.10±0.06 ^b	46.82±2.34 ^d	61.50±3.08 ^b
4	3.19±0.16 ^b	1.10±0.06 ^b	46.77±2.34 ^d	59.47±2.97 ^c
85°C-Water				
2	4.64±0.23 ^a	1.31±0.07 ^b	65.25±3.26 ^b	67.58±3.38 ^b
4	4.84±0.24 ^a	1.33±0.07 ^b	64.12±3.21 ^b	66.57±3.33 ^b
90°C-Water				
2	4.83±0.24 ^a	1.74±0.09 ^a	64.98±3.25 ^b	69.60±3.48 ^a
4	4.97±0.25 ^a	1.74±0.09 ^a	68.27±3.41 ^a	69.60±3.48 ^a
95°C-Water				
2	5.03±0.25 ^a	1.86±0.09 ^a	70.37±3.52 ^a	72.64±3.63 ^a
4	5.12±0.26 ^a	1.86±0.09 ^a	71.98±3.60 ^a	71.63±3.58 ^a

¹⁾TPC, Total phenolics content.

²⁾TFC, Total flavonoids content.

³⁾All values are presented as the mean±SD (n=3).

⁴⁾All values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

이 크게 높지 않다고 하였고, 에탄올 추출물은 전 농도구간에 서 활성이 보이지 않음을 보고하여 본 연구 결과와는 매우 상이하였다. 본 연구에서는 열수 추출물과 30%와 95%의 주 정 추출물을 제외하고는 모두 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성이 비교적 우수하였으며, 이는 아마도 각 용매에 의해 산 양삼에 함유된 생리활성 물질들인 TPC와 TFC, 진세노사이드 Rg1과 Rb1 그리고 여러 갈변물질들이 복합적으로 생성됨 에 따라 항산화 활성이 증가한 것으로 추정된다. 이외에도 진 세노사이드 Rg1 및 Rg1의 항노화 및 피부 탄력 관련 효능을 유전체 분석을 통하여 두 효능의 작용점에 있는 일련의 유전 자군 FGF2의 활성을 증가시키며, HaCaT 피부각질세포의 효 능검증 및 작용점을 규명하는 연구 또한 보고되었다(Kim 등, 2014).

이상의 결과를 바탕으로 산양삼의 진세노사이드(Rg1 및 Rb1) 함량 표준화와 관련한 기초 연구가 이루어진 것으로 판

단된다. 본 저자는 이번 연구를 통해 산양삼에 함유된 Rg1 및 Rb1 함량 증대를 위한 최적 추출 공정을 확립하였고, 이를 기 반으로 하여 향후 산양삼 숙성과 발효 등 미생물 전환공정 연 구가 이루어진다면 산양삼으로부터 다양한 진세노사이드 화 합물 변화 결과를 도출할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 추출용매(열수 및 주정)에 따른 산양삼 추출물의 이화학적 특성, 진세노사이드 함량 및 항산화 활성을 조사하 였다. 열수추출 시 80°C의 추출 온도에서 Rg1(17.85 → 18.31 mg/g) 및 Rb1(12.22 → 13.64 mg/g)의 함량이 높았으며, 시 간에 따른 유의적 차이는 없었다. 열수추출보다 주정 추출 시 진세노사이드 함량이 높았고 주정 농도가 증가할수록 Rg1 및 Rb1의 함량이 증가하였다. 특히, 80°C에서 주정 2시간과

Table 4. Comparison of antioxidant activity of wild-simulated ginseng according to the ethanol extraction

Extraction time (h)	Antioxidant activity			
	TPC ¹⁾ (mg/g)	TFC ²⁾ (mg/g)	DPPH (%)	ABTS (%)
80°C-30% EtOH				
2	4.05±0.20 ^{3) b4)}	1.01±0.05 ^a	23.13±1.16 ^d	21.55±1.08 ^c
4	4.75±0.24 ^b	1.15±0.06 ^a	17.18±0.86 ^c	10.78±0.54 ^c
80°C-50% EtOH				
2	4.66±0.23 ^b	1.14±0.06 ^a	57.37±2.74 ^c	40.10±2.01 ^b
4	4.83±0.24 ^b	1.12±0.06 ^a	54.86±2.74 ^c	40.10±2.01 ^b
80°C-70% EtOH				
2	5.05±0.25 ^a	1.35±0.07 ^a	70.91±3.55 ^a	69.17±3.46 ^a
4	5.06±0.25 ^a	1.38±0.07 ^a	63.01±3.15 ^b	63.41±3.17 ^a
80°C-95% EtOH				
2	4.10±0.21 ^b	1.36±0.07 ^a	24.76±1.24 ^d	15.79±0.79 ^d
4	4.24±0.21 ^b	1.37±0.07 ^a	63.01±3.15 ^b	11.03±0.55 ^c

¹⁾TPC, Total phenolics content.

²⁾TFC, Total flavonoids content.

³⁾All values are presented as the mean±SD (n=3).

⁴⁾All values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

4시간 추출 시 Rg1 및 Rb1 평균 함량은 각각 16.38 mg/g 및 25.28 mg/g이었다. 열수추출의 경우 추출온도가 상승할수록 TPC 및 TFC가 조금씩 증가하였고 주정 추출 시에는 TPC 및 TFC 차이는 없었다. 또한, DPPH(70.91%) 및 ABTS (69.17%) 라디칼 소거활성은 70% 주정 추출물(2시간 추출)이 가장 우수하였다. 따라서 진세노사이드 Rg1과 Rb1 최적 추출조건은 80°C, 추출 용매는 70% 주정, 추출시간은 2시간 인 것으로 판단된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Su Cheol Kim <https://orcid.org/0000-0002-8607-0151>

Kye Man Cho <https://orcid.org/0000-0002-5928-0532>

Ok Soo Joo <https://orcid.org/0000-0002-8905-9820>

References

Bae KC, Kim SH. Antioxidant effects of Korea ginseng radix, Korea red ginseng radix and total saponin. Korean

- J Orient Med Pathol, 12, 72-81 (1998)
- Byun EB, Park WY, Ahn DH, Yoo YC, Park CH, Jang BS, Park WJ, Byun EH, Sung NY. Comparison study of three varieties of red peppers in terms of total polyphenol, total flavonoid contents, and antioxidant activities. J Korean Soc Food Sci Nutr, 45, 765-770 (2016)
- Chang HK. Effect of processing methods on the saponin contents of *Panax ginseng* leaf-tea. Korean J Food Nutr, 16, 46-53 (2003)
- Cho KM, Hwang CE, Kim SC, Joo OS. Physicochemical properties, phytochemicals, and biological activities of heat-treated *Elaeagnus multiflora* juice and vinegar. Korean J Food Preserv, 25, 52-61 (2018)
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem, 12, 239-243 (1912)
- Ha YJ, Kim MR, Yoo SK. Process optimization of ginseng berry extract using mixed solvent and its ginsenoside analysis. J Korea Acad-Indust Cooper Soc, 16, 7794-7800 (2015)
- Hong MH, Lim HK, Park J, Jun NJ, Lee YJ, Cho M, Cho SK. The antihypertensive and vasodilating effects of adventitious root extracts of wild ginseng. J Korean Soc

- Appl Biol Chem, 51, 102-107 (2008)
- Hwang CE, Cho KM, Kim SC, Joo OS. Change in physicochemical properties, phytoestrogen content, and antioxidant activity during lactic acid fermentation of soy powder milk obtained from colored small soybean. Korean J Food Preserv, 25, 696-705 (2018)
- Jo MN, Jung JE, Yoon HJ, Chang KH, Jee HS, Kim KT, Paik HD. Bioconversion of ginsenoside Rb1 to the pharmaceutical ginsenoside compound K using *Aspergillus usami* KCTC6954. Korean J Microbiol Biotechnol, 42, 347-353 (2014)
- Jung JI, Kim JM, Kim HS, Kim HS, Kim EJ. Immunostimulatory effect of wild-cultivated ginseng extract via the increase in phagocytosis and cytokine secretions in RAW264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr, 48, 686-691 (2019)
- Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J Food Sci Technol, 28, 232-239 (1996)
- Kim DH, Kwak KH, Lee KJ, Kim SJ, Shin YC, Chun BG, Shin KH. Effects of Korea red ginseng total saponin on repeated unpredictable stress induced changes of proliferation of neural progenitor cells and BDNF mRNA expression in adult rat hippocampus. J Ginseng Res, 28, 94-103 (2004b)
- Kim JH, Kim JK. Antioxidant activity and functional component analysis of Korean mountain ginseng's different sections. J Korean Soc Food Sci Nutr, 35, 1315-1321 (2006)
- Kim JM, Cho WJ, Yoon HS, Bang IS. Transcriptome analysis of human HaCaT keratinocytes by ginsenosides Rb1 and Rg1. J Korea Acad-Indust Cooper Soc, 15, 6774-6781 (2014)
- Kim KY, Jeong DH, Kim HJ, Jeon KS, Kim MJ, Um YR. A study on growth characteristics of wild-simulated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) by direct seeding and transplanting. Korean J Plant Res, 32, 160-169 (2019a)
- Kim KY, Um YR, Jeong DH, Kim HJ, Kim MJ, Jeon KS. Study on the correlation between the soil bacterial community and growth characteristics of wild-simulated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Korean J Environ Biol, 37, 380-388 (2019b)
- Kim MK, Kang H, Baek CW, Jung YH, Woo YC, Choi GJ, Shin HY, Kim KS. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ginsenoside Rf in a rat model of incisional pain. J Ginseng Res, 42, 183-191 (2018c)
- Kim MW, Lee EH, Kim YJ, Park TS, Cho YJ. Beauty food activities of wild-cultivated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) ground part. J Appl Biol Chem, 61, 33-38 (2018b)
- Kim NE, Lee MO, Jang MH, Chung BH. Angiogenic effects of wood-cultivated ginseng extract and ginsenoside Rg5 in human umbilical vein endothelial cells. Korean J Food Sci Technol, 50, 349-355 (2018a)
- Kim SJ, Shin SS, Seo BI, Ji SY. Effect of mountain grown ginseng radix, mountain cultivated ginseng radix, and cultivated ginseng radix on apoptosis of HL-60 cells. Kor J Herbology, 19, 41-50 (2004a)
- Kim YJ, Son DY. Antioxidant and inhibitory effects of Korean *Panax ginseng* extract on pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 1371-1377 (2012)
- Kwon HJ, Cho YJ, Kim MD. Enhancement of ginsenoside Rg1 and Rg5 contents in an extract of wood-cultivated ginseng by *Lactobacillus plantarum*. Microbiol Biotechnol Lett, 45, 305-310 (2017)
- Kwon KR, Cho AL, Lee SG. The study on acute and subacute toxicity and anti-cancer effects of cultivated wild ginseng herbal acupuncture. J Pharmacopuncture, 6, 7-27 (2003)
- Lee HJ, Yoo BS, Byun SY. Differences in free amino acids between Korean ginsengs and mountain ginsengs. Korean J Biotechnol Bioeng, 15, 323-328 (2000)
- Lee NR, Han JS, Kim JS, Choi JE. Effects of extraction temperature and time on ginsenoside content and quality in ginseng (*Panax ginseng*) flower water extract. Korean J Medicinal Crop Sci, 19, 271-275 (2011)
- Lee SH, Kang JI, Lee SY. Saponin composition and physico-chemical properties of Korean red ginseng extract as affected by extracting conditions. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 256-260 (2008b)
- Lee SM, Park SY, Jang GS, Ly SY. The protective effects of ethanol extract of wild simulated ginseng on carbon tetrachloride induced acute hepatic injury in mouse. Korean J Nutr, 41, 701-710 (2008a)
- Lui JHC, Staba EJ. The ginsenosides of various ginseng plants and selected products. J Nat Prod, 43, 340-346

- (1980)
- Park SM, Jung EH, Kim JK, Jegal KH, Park CA, Cho IJ, Kim SC. 20S-Protopanaxadiol, an aglycosylated ginsenoside metabolite, induces hepatic stellate cell apoptosis through liver kinase B1-AMP-activated protein kinase activation. *J Ginseng Res*, 41, 392-402 (2017)
- Park YE, Kim BH, Yoon YC, Kim JK, Lee JH, Kwon GS, Hwang HS, Lee JB. Total polyphenol contents, flavonoid contents, and antioxidant activity of roasted-flaxseed extracts based on lactic acid bacteria fermentation. *J Life Sci*, 28, 547-554 (2018)
- Shim KS, Park GG, Park YS. Bioconversion of puffed red ginseng extract using β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Eng Prog*, 18, 332-340 (2014)
- Shin BK, Kwon SW, Park JH. Chemical diversity of ginseng saponins from *Panax ginseng*. *J Ginseng Res*, 39, 287-298 (2015)
- Shin JY, Lee JM, Shin HS, Park SY, Yang JE, Cho SK, Yi TH. Anti-cancer effect of ginsenoside F₂ against *Glioblastoma multiforme* in xenograft model in SD rats. *J Ginseng Res*, 36, 86-92 (2012)
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84 (2007)
- Yoo BS, Lee HJ, Byun SY. Differences in phenolic compounds between Korean ginseng and mountain ginseng. *Korean J Bio-technol Bioeng*, 15, 120-124 (2000)
- Yun SN, Moon SJ, Ko SK, Im BO, Chung SH. Wild ginseng prevents the onset of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice. *Arch Pharm Res*, 27, 790-796 (2004)