



Research Article

# Use of extraction solvent method to monitor the concentrations of acidic polysaccharides and ginsenosides from red and black ginseng 추출용매에 따른 홍삼 및 흑삼의 산성다당체와 진세노사이드 함량 모니터링

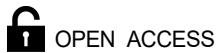
Gee Dong Lee\*

이기동\*

Department of Biofood Science and Technology, Joongbu University, Chungnam 32713, Korea

중부대학교 바이오식품학전공

**Abstract** In this study, the extraction yield, acidic polysaccharides and ginsenosides of red and black ginseng were optimized by using the response surface methodology in consideration of the ethanol concentration and temperature of the extraction. The  $R^2$  of the model formula for the yield, acidic polysaccharides and ginsenosides was 0.8378-0.9679 ( $p < 0.1$ ). An optimal extraction yield of 5.29% was reached for red ginseng soluble solids when 1.52% ethanol concentration was used at a temperature of 67.27°C. Additionally, the optimal extraction yield for black ginseng soluble solid was 6.11% when 3.12% ethanol concentration was used at a temperature of 66.13°C. Furthermore, the optimal conditions for extracting acidic polysaccharides from red ginseng were using an ethanol concentration of 4.03% at a temperature of 69.61°C; a yield of 1.86 mg/mL was obtained. The optimal extraction yield for acidic polysaccharides from black ginseng was 1.80 mg/mL when extracted using a concentration of 24.67% of ethanol at a temperature of 71.14°C. An optimal extraction yield of 0.22 mg/mL was reached for ginsenoside R<sub>g1</sub> from red ginseng when 79.92% ethanol concentration was used at a temperature of 70.62°C. The optimal extraction yield of ginsenoside R<sub>g3</sub> from black ginseng was 0.31 mg/mL when ethanol was used at a concentration of 75.70% at a temperature of 65.49°C. The ideal extraction conditions for obtaining the maximum yield of both acidic polysaccharide and ginsenoside from red and black ginseng were using ethanol at a concentration between 35 and 50% at an extraction temperature of 70°C.



OPEN ACCESS

**Citation:** Lee GD. Use of extraction solvent method to monitor the concentrations of acidic polysaccharides and ginsenosides from red and black ginseng. Korean J Food Preserv, 30(5), 857-867 (2023)

**Received:** August 22, 2023  
**Revised:** September 21, 2023  
**Accepted:** September 24, 2023

\*Corresponding author  
 Gee Dong Lee  
 Tel: +82-041-750-6291  
 E-mail: geedlee@jbm.ac.kr

**Keywords** red ginseng, black ginseng, ethanol extraction, acidic polysaccharides, ginsenosides

Copyright © 2023 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.

## 1. 서론

전통적으로 인삼은 수삼을 그대로 말려 약용이나 건강식품용으로 사용하여 왔으며, 수삼을 3회까지 찌고 말리는 과정을 반복한 홍삼과 9번까지 찌고 말린 흑삼을 주로 가공하여 건강기능성 식품으로 많이 사용하여 왔다(Jang과 Jeong, 2014; Ko 등, 1994; Lee, 2020). 이러한 찌고 말리는 증포 방법은 오래전부터 인삼을 장시간 보관하면서 식용 및 약용으로 이용하고자

도입하는 전통적인 가공방식이다(Lee, 2020; Nam 등, 2012). 이러한 가공방식에 따라 건강 기능성이 다르다는 것을 알게 되면서 약용 식품, 건강기능성 식품 등 다양한 용도에 따라 다르게 가공하여 사용되어 왔다(Nam, 1996). 최근 들어 찌고 말린 홍삼, 흑삼 등은 단순 건조한 백삼과는 다른 기능성 성분을 가지고 있으며 건강 기능적 특성 또한 다르다는 것이 알려지게 되었다(Nam, 1996).

인삼의 건강기능식품 지표성분은 건강기능식품의 기준 및 규격(2023)에서 ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>로 설정하고 있으나, 홍삼 및 흑삼의 주요 지표성분은 ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub>으로 설정되어 있다. Ginsenoside Rg<sub>1</sub>은 수삼이나 백삼에 많이 들어 있으나 찌고 말리는 과정에서 열에 의해 분해되어 다른 ginsenoside로 변환되고, 증포 횟수가 많아지면 면역활성이 우수한 ginsenoside Rg<sub>3</sub>이 생성되어 4번 이상 찌고 말린 흑삼에는 ginsenoside Rg<sub>3</sub>이 상대적으로 많은 것으로 알려져 있다(Lee, 2020; Nam 등, 2012).

인삼, 홍삼 등에는 건강기능식품 지표성분으로 사용되는 ginsenosides 이외에도 많은 건강기능성 성분을 포함하고 있으나 인삼류 가공업체에서는 건강기능식품 지표성분인 ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub>의 증대를 위한 열처리방법, 추출방법 등을 주로 사용하고 있다(Jo 등, 2011; Lee, 2020). 특히 홍삼의 산성다당체는 면역활성(Kim 등, 1991; Lee 등, 1997; Park 등, 2000), 항암효과(Kim 등, 1990; Kwak 등, 2003; Kwak 등, 2005) 등의 건강 기능성을 가지고 있으며 홍삼 및 흑삼의 ginsenosides의 기능성을 보완해 주거나 새로운 기능성을 더해 주는 우수한 건강기능성 성분이다. 이외에도 홍삼 등의 산성다당체는 고지혈증 개선(Lee 등, 1999), 혈당 강하(Kwak 등, 2005), 지질과산화물 감소(Lee 등, 1998) 등 다양한 건강 기능성을 가지고 있다.

홍삼 및 흑삼의 주요한 건강기능성 성분인 ginsenosides와 산성다당체는 서로 극성이 달라서 추출방법을 달리하여 여러 번 추출해야 충분한 함량을 추출할 수 있다. 홍삼 및 흑삼의 ginsenosides는 물보다는 상대적으로 알코올에 잘 녹는 특성을 가지고 있고(Nam, 1996), 홍삼에 함유되어 있는 산성다당체는 pectin-like α-1,4-polygalacturonan 골격을 가지고 있으며, 분자량이 약 34,600으로 60.3% galacturonic acid, 2.1% arabinose, 11.6% rhamnose, 13% glucose 및 12.2% galactose을 함유하고 있는 hetero

polysaccharide이다(Lee와 Do, 2006). 이러한 산성다당체는 고분자로서 물에도 잘 녹지 않아 추출 후 남은 홍삼박 및 흑삼박에 잔류하여 버려지는 경향이 있다. 물론 찌고 말리는 과정을 통한 열처리로 저분자화된 산성다당체는 상대적으로 용해도가 증가하여 열수에 일부 녹는다.

일반적으로 홍삼 등의 추출방법은 열수로 장시간 추출하는 방법이 사용되고 있다(Lee 등, 2013). 열수 추출에서는 산성다당체가 상대적으로 많이 추출될 수 있으나, 열수 추출 시 추출물의 ginsenosides 함량은 상대적으로 낮은 것으로 알려져 있다(Li 등, 2009). 최근 들어 많은 기업체에서 홍삼 및 흑삼 지표성분인 ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub> 함량을 높이기 위해 ethanol을 이용하여 추출하는 공정을 채택하고 있다.

따라서 본 연구에서는 홍삼과 흑삼의 기능성 성분 추출 극대화를 위해 추출 용액의 ethanol 농도와 추출 온도에 따른 추출 수율, 산성다당체 및 ginsenosides의 함량 변화를 반응표면분석법을 통해 모니터링해 보고 적정 추출조건을 찾아보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료

본 실험에 사용된 홍삼 및 흑삼은 금산군에 소재하는 우신산업(주)에서 6년근 홍삼 및 흑삼의 주근을 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 시약은 ethanol(Samchun Chemical, Seoul, Korea), carbazole(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), sulfuric acid(Sigma Chemical Co.), D-(+)-galacturonic acid monohydrate(Sigma Chemical Co.), methanol(JT Baker, Philipsburg, PA, USA), ginsenosides(Wako, Osaka, Japan), acetonitrile(JT Baker) 등이다.

### 2.2. 분쇄 및 추출 방법

홍삼 및 흑삼의 분쇄는 믹스기로 분쇄 후 25메쉬 체로 분취하여 분말(홍삼의 수분함량 9.57%, 흑삼의 수분함량 8.22%)을 추출에 사용하였다. 추출은 홍삼 및 흑삼 분말 20g을 각각 용매 200 mL에 첨가한 후 일정 온도에서 100 rpm으로 교반하면서 24시간 추출하였다. 이 때 추출조건은 실험계획에 따라 용매조건이 ethanol 함량을 0, 20, 40,

60, 80%로 설정하였으며, 추출온도는 60, 65, 70, 75, 80°C로 각각 다섯 단계로 설정하였다.

### 2.3. 실험계획

본 실험에서는 홍삼 및 흑삼의 추출에 따른 수율, 산성다당체, ginsenosides 함량을 모니터링하고자 실험계획에 의한 반응표면분석법을 이용하였다. 본 실험의 실험계획은 중심합성 실험계획법(Myers, 1971; Park, 1991)에 따라 실험설계를 하였으며, 반응표면 회귀분석은 홍삼과 흑삼의 수율, 산성다당체, 홍삼의 ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>과 흑삼의 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub> 함량을 SAS program(ver. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 사용하여 반응표면분석을 하였다(SAS, 1988). 중심합성 실험계획법으로 설계된 홍삼 및 흑삼의 추출조건인 요인변수는 ethanol 용액 농도(X<sub>1</sub>)와 추출 온도(X<sub>2</sub>)로 -2, -1, 0, 1, 2로 다섯 단계로 부호화하여 실험값을 Table 1에 나타내었다. 또한, 이들 요인변수에 영향을 받는 반응변수들은 홍삼의 수율(Y<sub>1</sub>), 흑삼의 수율(Y<sub>2</sub>), 홍삼의 산성다당체(Y<sub>3</sub>), 흑삼의 산성다당체(Y<sub>4</sub>) 그리고 홍삼의 ginsenoside Rg<sub>1</sub>(Y<sub>5</sub>), Rb<sub>1</sub>(Y<sub>6</sub>) 및 흑삼의 ginsenoside Rb<sub>1</sub>(Y<sub>7</sub>), Rg<sub>3</sub>(Y<sub>8</sub>)으로 하고 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다.

### 2.4. 가용성 고형분 함량 측정

홍삼 및 흑삼의 추출수율을 확인하기 위해 각각의 실험조건에서 얻어진 추출물의 가용성 고형분 함량은 3회 반복 측정하였다. 즉 시험용액 50 mL를 항량을 구한 수기에 취하여 105°C에서 증발건조시켜 그 무게를 측정하였으며, 추출액 100 mL 중의 가용성 고형분의 함량(g) 백분율로써 고형분 수율(%)을 구하였다.

### 2.5. 산성다당체 분석

홍삼과 흑삼의 산성다당체 추출방법은 Cho 등(2008)의 방법을 개량하여 홍삼 및 흑삼 추출액 1 mL를 15 mL 팔콘 튜브에 넣고 증류수 10 mL를 첨가한 후 80°C에서 15 min 동안 용해하였다. 이 용해액을 100 mL 질량 플라스크에 정용한 다음 50 mL 팔콘 튜브에 옮겨 담은 후 원심분리기(Centrifuge, Sigma Chemical Co.) 1,245 ×g에서 15 min 동안 분심분리를 행한 후 상정액을 0.45 μm 막피터(HM Syringe filters, Hyumdai Micro Co., Seoul, Korea)를 이용하여 여과하였으며, 이 여액을 회석하여 산성다당체 측정에 사용하였다.

산성다당체의 측정은 홍삼 및 흑삼의 산성다당체 추출 용해액 0.5 mL와 carbazole 0.25 mL, sulfuric acid 3 mL

**Table 1.** Contents of yields, acidic polysaccharides and ginsenosides for response surface analysis of the extraction conditions of red and black ginseng

Exp. No. <sup>1)</sup>	Extraction conditions		Yield (% g/100 mL)		Acidic polysaccharides (mg/mL)		Ginsenosides (mg/mL)			
	Ethanol conc. (%)	Temperature (°C)	Red ginseng	Black ginseng	Red ginseng	Black ginseng	Red ginseng		Black ginseng	
							Rg <sub>1</sub>	Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>1</sub>	Rg <sub>3</sub>
1	60	75	3.80±0.03 <sup>2)</sup>	3.94±0.04	1.64±0.04	1.68±0.03	0.20±0.01	0.31±0.02	0.24±0.01	0.27±0.02
2	60	65	3.80±0.01	2.16±0.02	1.62±0.04	1.69±0.02	0.19±0.01	0.31±0.01	0.26±0.02	0.28±0.01
3	20	75	4.52±0.03	4.82±0.05	1.84±0.03	1.78±0.01	0.16±0.03	0.19±0.02	0.20±0.01	0.19±0.01
4	20	65	4.72±0.04	4.74±0.02	1.86±0.05	1.75±0.04	0.15±0.01	0.18±0.01	0.19±0.01	0.15±0.01
5	40	70	4.24±0.06	4.62±0.03	1.72±0.04	1.73±0.02	0.18±0.01	0.28±0.01	0.24±0.01	0.25±0.02
6	40	70	4.26±0.04	4.56±0.01	1.74±0.02	1.72±0.02	0.19±0.02	0.28±0.01	0.24±0.02	0.27±0.01
7	80	70	2.96±0.04	3.32±0.04	1.44±0.05	1.49±0.03	0.22±0.01	0.35±0.03	0.27±0.01	0.30±0.02
8	0	70	5.40±0.05	5.86±0.05	1.83±0.03	1.71±0.05	0.16±0.01	0.20±0.01	0.18±0.02	0.15±0.01
9	40	80	4.36±0.04	4.56±0.06	1.62±0.04	1.54±0.04	0.18±0.02	0.28±0.02	0.24±0.01	0.25±0.01
10	40	60	4.36±0.06	4.06±0.03	1.55±0.01	1.42±0.04	0.18±0.01	0.27±0.01	0.23±0.01	0.24±0.01

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by central composite design.

<sup>2)</sup>Values are mean±SD (n=3).

를 넣고 잘 혼합시켜 준다. 공시험구는 색상에 의한 영향을 제거하고자 carbazole 대신 ethanol을 사용하였다. 85°C에서 5분간 water bath에서 정치한 후 15분간 실온에서 방치한 다음 UV spectrophotometer(SpectraMax ABS, Molecular Devices Co., St. San Jose, CA, USA) 525 nm에서 측정하여 흡광도를 측정하였다. 정량을 위한 표준 물질은 D-(+)-galacturonic acid monohydrate를 사용하였다.

## 2.6. Ginsenoside 분석

Ginsenoside을 측정하기 위해 식품의약품안전처 건강기능식품 시험법(2023)에 따라 시험용액을 조제하였다.

시험용액은 홍삼 및 흑삼 추출물 5.00-5.50 mL를 50 mL 부피 플라스크에 취한 후 70% methanol 약 25 mL로 완전히 용해시키고 동일 용액으로 정용한 후 막필터(0.45  $\mu$ m)로 여과한 것을 적절히 희석하여 시험용액으로 사용하였다.

시험용액의 정제는 C<sub>18</sub> 카트리지(Agilent Bond Elut C18 cartridge, Agilent, Santa Clara, CA, US)에 methanol 5 mL와 증류수 10 mL를 연속으로 통과시켜 활성화시킨 후 시험용액 5 mL를 흡착시켰다. 흡착된 카트리지에 25 mL의 증류수와 25% methanol 10 mL로 분당 2-3 mL의 유속으로 세척한 후 methanol로 용출하였다. 용출액은 5 mL 부피 플라스크에 모아 methanol로 표선까지 정용한 것을 적절히 희석하여 측정용 시험용액으로 하였다.

이 때 ginsenosides 분석을 위한 HPLC/UV(2489 UV, Waters, Milford, MA, USA) 측정 조건은 Xbridge C18 UG120(4.6×250 mm, 5  $\mu$ m, Merck, Darmstadt, Germany) 칼럼에 시험용액 10  $\mu$ L를 주입하고, 검출기 파장은 203 nm, 칼럼 온도는 30°C, 이동상은 A: 증류수, B: acetonitrile로 하고, 유속은 1.0 mL/min으로 하였으며, 이동상의 조건은 0-55분 동안 B 용액을 20%에서 50%로 증가시킨 후 55-75분 동안 55%에서 20%로 감소시켰다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 가용성 고형분 함량의 변화

홍삼과 흑삼의 수율을 모니터링하기 위해 홍삼과 흑삼을 일정 농도의 ethanol 용액에서 추출하면서 각각의 추출조

건별 가용성 고형분 함량을 측정하였다.

홍삼과 흑삼의 10배수 ethanol 용액으로 추출한 후 추출액의 가용성 고형분 함량을 분석한 결과, 홍삼 및 흑삼의 함량은 각각 2.96-4.72, 2.16-5.86%의 범위로 나타났다(Table 1). 이를 회귀분석한 결과, 홍삼 및 흑삼에 대한 모델식의 R<sup>2</sup>는 각각 0.9679(p<0.01), 0.8545(p<0.1)로 모두 유의성이 인정되었다(Table 2).

가용성 고형분 함량에 대한 조건변수의 영향을 알아보고자 F-value를 구한 결과(Table 2), 홍삼의 경우에는 추출액의 ethanol 농도가 F-value 39.76(p<0.01)으로 홍삼의 가용성 고형분 함량에 아주 크게 영향을 미치고 있었으나, 온도(F-value 0.33)의 영향은 미미했다. 흑삼의 경우에도 ethanol 농도가 7.07(p<0.05)로 흑삼의 가용성 고형분 함량에 주로 영향을 미치고 있었고 온도(1.47)의 영향은 낮았다. 홍삼 및 흑삼의 ethanol 용액 추출에 따른 가용성 고형분 함량의 반응표면은 홍삼 추출 시 가용성 고형분이 ethanol 농도가 감소함에 따라 비례적으로 증가하였고, 흑삼 추출 시 ethanol 용액의 농도가 감소하고 온도가 증가할수록 가용성 고형분이 증가하는 패턴을 나타내었다(Fig. 1). 그리고 능선분석을 통해 최적 추출조건을 분석해 본 결과(Table 3), 반응표면의 모형은 홍삼 및 흑삼 모두 안장점(saddle point)의 형태를 보였으며, 홍삼은 ethanol 농도 79.75%에서 68.88°C로 추출할 경우 가용성 고형분 함량이 3.07%로 가장 낮게 나타났으나, ethanol 농도 1.52%에서 67.27°C로 추출 시 가용성 고형분 함량이 5.29%로 가장 높게 나타났다. 흑삼 또한 홍삼과 유사한 경향으로 나타났으며 ethanol 농도 70.52%에서 68.88°C로 추출할 경우 가용성 고형분 함량이 2.07%로 가장 낮게 나타났으나, ethanol 용액 농도 3.12%에서 66.13°C로 추출 시 가용성 고형분 함량이 6.11%로 가장 높게 나타났다. 홍삼보다는 흑삼에서 최고 수율이 상대적으로 더 높게 나타났다. 이것은 증포의 헛수가 증가하면서 흑삼의 전분이 가열에 의해 더 많이 분해되어 쉽게 용해되기 때문으로 여겨진다(Kim 등, 2011). 그러나 전체적으로 보면 홍삼과 흑삼의 가용성 고형분 함량은 ethanol 용액 추출에서 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다.

### 3.2. 산성다당체 함량의 변화

산성다당체는 인삼류의 면역활성을 나타내는 주요한 성



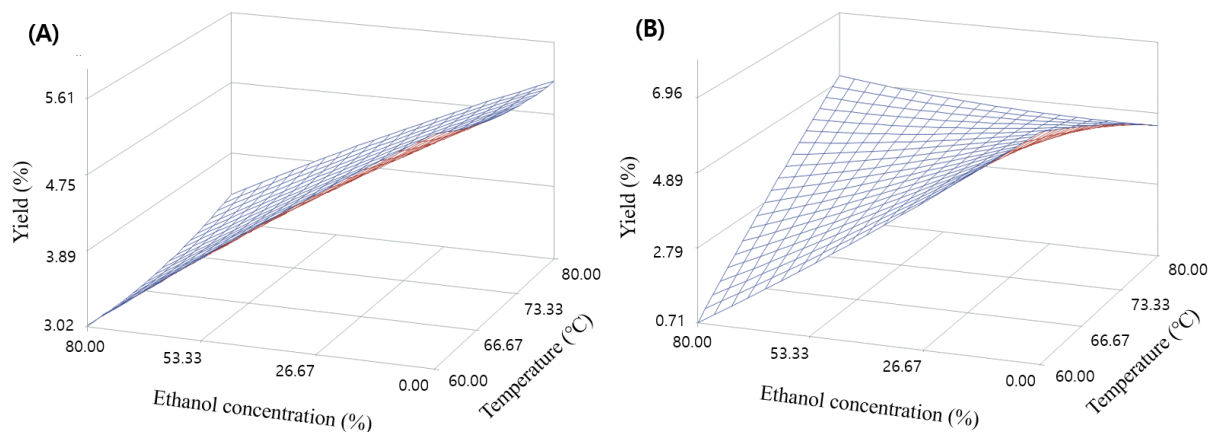
**Table 2.** Polynomial equations and F-value calculated by response surface methodology for yields, acidic polysaccharides and ginsenosides of red and black ginseng

Responses	Polynomial equations <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup> <sup>2)</sup>	Significance	F-value	
				Ethanol conc.	Temperature
Yields	Red ginseng $Y_1 = 12.975714 - 0.059381X_1 - 0.197333X_2 - 0.000034821X_1X_1 + 0.0005X_1X_2 + 0.001243X_2X_2$	0.9679	0.0044	39.76***	0.33
	Black ginseng $Y_2 = 9.15381 - 0.341726X_1 + 0.027667X_2 + 0.000108X_1X_1 + 0.00425X_1X_2 - 0.001071X_2X_2$	0.8545	0.0795	7.07**	1.47
Acidic polysaccharides	Red ginseng $Y_3 = -6.11 - 0.006333X_1 + 0.229333X_2 - 0.000071875X_1X_1 + 0.0001X_1X_2 - 0.00165X_2X_2$	0.9251	0.0227	14.58**	3.19
	Black ginseng $Y_4 = -12.156905 + 0.012071X_1 + 0.388333X_2 - 0.0000946431X_1X_1 - 0.0001X_1X_2 - 0.002714X_2X_2$	0.0970	0.0970	3.30	5.02*
Red ginseng ginsenosides	Rg <sub>1</sub> $Y_5 = 0.025476 + 0.00044X_1 + 0.003333X_2 + 0.000004911X_1X_1 - 0.000021429X_2X_2$	0.8941	0.0440	11.00**	0.12
	Rb <sub>1</sub> $Y_6 = 0.244762 + 0.003863X_1 - 0.0035X_2 + 0.000002232X_1X_1 - 0.000025X_1X_2 + 0.000035714X_2X_2$	0.8718	0.0629	9.04**	0.04
Black ginseng ginsenosides	Rb <sub>1</sub> $Y_7 = -0.118571 + 0.00703X_1 + 0.005169X_2 - 0.000007143X_1X_1 - 0.000075X_1X_2 - 0.000014286X_2X_2$	0.9378	0.0159	20.03***	0.64
	Rg <sub>3</sub> $Y_8 = -0.660476 + 0.012268X_1 + 0.016833X_2 - 0.000017411X_1X_1 - 0.000125X_1X_2 - 0.000078571X_2X_2$	0.9105	0.0320	13.42**	0.52

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub>, ethanol conc. (%); X<sub>2</sub>, temperature (°C).

<sup>2)</sup>Determination coefficients of polynomial equations.

\*Significant at 10% level, \*\*Significant at 5% level, \*\*\*Significant at 1% level.



**Fig. 1.** Response surfaces for yields of red ginseng (A) and black ginseng (B) depending on ethanol concentration and extraction temperature.

분으로 알려져 있으나(Kim 등, 1991; Lee 등, 1997; Park 등, 2000), ginsenoside만큼 많이 연구되지 않았다(Nam,

1996; Nam 등, 2012). 산성다당체는 고분자물질로서 ethanol보다는 물에 상대적으로 잘 녹는 수용성 특성을 가

**Table 3.** Predicted level of the optimum extraction conditions for yields, acidic polysaccharides and ginsenosides of red and black ginseng by the ridge analysis of their response surfaces

Responses		Extraction conditions						Morphology
		Ethanol conc. (%)		Temperature (°C)		Estimated response		
		Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	
Yields (%) <sup>1)</sup>	Red ginseng	1.52	79.75	67.27	68.88	5.29	3.07	Saddle point
	Black ginseng	3.12	70.52	66.13	63.54	6.11	2.07	Saddle point
Acidic polysaccharides (mg/mL)	Red ginseng	4.03	76.32	69.61	65.81	1.86	1.44	Maximum point
	Black ginseng	24.67	48.86	71.14	60.25	1.80	1.46	Maximum point
Red ginseng ginsenosides (mg/mL)	Rg <sub>1</sub>	79.92	1.11	70.62	67.67	0.22	0.15	Saddle point
	Rb <sub>1</sub>	79.94	0.50	69.46	68.42	0.36	0.17	Saddle point
Black ginseng ginsenosides (mg/mL)	Rb <sub>1</sub>	75.11	2.63	65.21	66.43	0.28	0.17	Saddle point
	Rg <sub>3</sub>	75.70	2.74	65.49	66.35	0.31	0.12	Saddle point

<sup>1)</sup>The yields of the extracts obtained by adding 20 g of red and black ginseng to 200 mL of solvent.

지고 있으나 많은 양의 ginsenoside를 추출하기 위해 산업 체에서는 ethanol 용액으로 많이 추출하고 있다. 따라서 홍삼과 흑삼의 산성다당체 함량을 모니터링해 보고자 홍삼과 흑삼을 일정 농도의 ethanol 용액으로 추출하면서 각각의 조건별 산성다당체 함량을 측정해 보았다.

10배수 ethanol 용액으로 시료를 추출한 추출액의 산성다당체 함량을 분석한 결과, 홍삼 및 흑삼의 함량은 각각 1.44-1.86, 1.42-1.78 mg/mL의 범위로 유사한 함량을 나타내었다(Table 1). 이를 회귀분석한 결과 홍삼 및 흑삼에 대한 모델식의 R<sup>2</sup>는 각각 0.9251, 0.8379로 홍삼(p<0.05)에서 높은 유의성이 인정되었으나, 흑삼(p<0.1)에서는 유의성이 상대적으로 낮았다(Table 2).

산성다당체 함량에 대한 F-value를 구해본 결과(Table 2), 홍삼은 추출용액의 ethanol 농도가 F-value 14.58(p<0.05)로 산성다당체 함량에 크게 영향을 미치고 있었으나 온도(F-value 3.19)의 영향은 적었다. 흑삼의 경우에는 ethanol 농도가 F-value 3.30으로 산성다당체 함량에 미치는 영향이 낮았으나 온도의 F-value 5.02(p<0.1)로 산성다당체 함량에 ethanol 농도보다 다소 높은 영향을 미치고 있었다. 홍삼 및 흑삼의 ethanol 용액 추출에 따른 산성다당체의 반응표면은 홍삼 및 흑삼 모두 ethanol 농도가 낮을수록 비례적으로 증가하였으며 홍삼과 흑삼의 반응표면은 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 2). 그리고 능선분석을 통해 산

성다당체의 최적 추출조건을 분석해 본 결과(Table 3), 반응표면의 모형은 홍삼 및 흑삼 모두 최대점의 형태를 나타내었으며, 홍삼은 ethanol 농도 76.32%에서 65.81°C로 추출할 경우 산성다당체 함량이 1.44 mg/mL로 가장 낮게 나타났으나, ethanol 농도 4.03%에서 69.61°C로 추출 시 산성다당체 함량이 1.86 mg/mL로 가장 높게 나타났다. 흑삼 또한 유사한 경향으로 나타내었으나 ethanol 농도에서 다소 차이를 나타내었으며, ethanol 농도 48.86%에서 60.25°C로 추출할 경우 산성다당체 함량이 1.46 mg/mL로 가장 낮게 나타났으나, ethanol 농도 24.67%에서 71.14°C로 추출한 추출물의 산성다당체 함량이 1.80 mg/mL로 가장 높게 나타났다. 홍삼과 흑삼의 산성다당체 함량은 거의 차이가 없었으며, 산성다당체의 변화패턴 또한 거의 유사한 것을 알 수 있었다. 홍삼 산성다당체의 추출에서 온도의 영향보다는 ethanol 농도의 영향을 많이 받는 것은 산성다당체의 ethanol 용해도가 낮고 열수에 더 잘 녹는 용해특성 때문으로 여겨진다. 홍삼의 산성다당체는 ethanol 용액에는 잘 용해되지 않아 ethanol 추출 시 많은 양이 홍삼박에 잔류하게 되므로 홍삼박으로부터 산성다당체가 주로 추출되고 있다(Chang 등, 2007; Lee와 Do, 2002). 그러나 찌고 말린 횡수가 많은 흑삼의 산성다당체는 홍삼의 산성다당체와 달리 지나친 열처리로 저분자화되면서 용해도가 변화되어 에탄올의 농도의 영향을 상대적으로 적게 받는 것으로

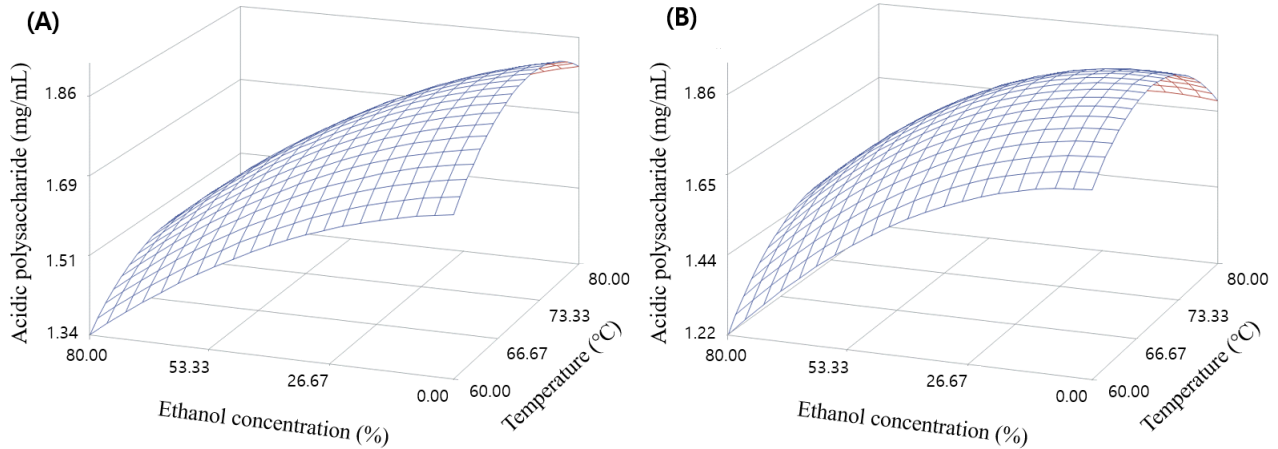


Fig. 2. Response surfaces for acidic polysaccharides of red ginseng (A) and black ginseng (B) depending on ethanol concentration and extraction temperature.

여겨진다.

### 3.3. 진세노사이드 함량의 변화

인삼류의 기능성은 ginsenosides의 조성과 그 함량에 기반을 두고 있다(Nam, 1996). 특히 ginsenoside Rg<sub>3</sub>은 면역활성이 우수한 것으로 알려져 Rg<sub>3</sub> 함량을 높이기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. 그 중에서 인삼의 증자와 건조과정을 반복(증포)하여 제조함으로써 Rg<sub>3</sub>을 높이는 방법은 다양하게 연구되어 왔다(Jo 등, 2011; Lee, 2020). 이러한 각종 ginsenosides의 조성을 변화시키고 특정성분의 함량을 높이는 것도 중요하지만, 추출 시 물에는 잘 용해되지 않아 추출물에 그 함량이 낮으므로 ginsenoside 함량을 높이고자 산업체에서는 ethanol을 이용하여 추출하는 방법을 선호하고 있다.

홍삼 및 흑삼의 ginsenoside 함량에 대한 건강기능식품의 규격(2023)은 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 함으로 나타내고 있다. 따라서 본 연구에서는 홍삼 및 흑삼의 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub> 함량을 측정해 보았다.

시료의 10배수에 해당하는 ethanol 용액에 홍삼 또는 흑삼 분말을 첨가하여 추출한 추출액의 ginsenoside 함량을 분석한 결과, 홍삼의 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 및 Rb<sub>1</sub> 함량은 각각 0.15-0.22, 0.18-0.35 mg/mL의 범위로 나타났으며, ginsenoside Rg<sub>1</sub>보다 Rb<sub>1</sub>이 다소 높게 나타났다(Table

1). 그리고 흑삼의 ginsenoside Rb<sub>1</sub> 및 Rg<sub>3</sub> 함량은 각각 0.18-0.27, 0.15-0.30 mg/mL의 범위로 나타났다(Table 1). 홍삼 추출물에서는 ginsenoside Rg<sub>3</sub>이 극미량 검출되었으나 증포를 많이 한 흑삼에서는 ginsenoside Rg<sub>3</sub>이 많이 발현되었는데(data not shown), 이것은 증포횟수가 증가하면 열처리 효과로 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rd 등의 ginsenoside 20번 탄소의 당의 떨어져 나가면서 ginsenoside Rg<sub>3</sub>으로 전환되는 것으로 알려져 있다(Nam, 1996; Nam 등, 2012). 그리고 백삼이나 홍삼에 상대적으로 많은 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 또한 증포를 통한 열처리로 20번 탄소의 당의 떨어져 나가면서 ginsenoside Rh<sub>1</sub> 등으로 전환되면서 흑삼에서는 사라졌다(Nam, 1996)(data not shown).

홍삼 ginsenosides에 대한 회귀분석 결과 ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>에 대한 모델식의 R<sup>2</sup>는 각각 0.8941(p<0.05), 0.8718(p<0.1)로 유의성이 인정되었으며, 흑삼의 ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>에 대한 모델식의 R<sup>2</sup>는 각각 0.9378(p<0.05), 0.9105(p<0.05)로 유의성이 인정되었다(Table 2).

Ginsenosides 함량에 대한 F-value를 구해본 결과(Table 2), 홍삼 및 흑삼의 ginsenosides에 대한 ethanol 농도의 F-value 9.04-20.03(p<0.05)으로 ginsenosides 함량에 크게 영향을 미치고 있었으나 온도(F-value 0.04-0.64)의 영향은 거의 없었다. 홍삼의 ethanol 용액 추출에 따른 ginsenoside Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>의 반응표면은 모두 ethanol 농도가 높을수록 비례적으로 증가하였으며 온도에 따른 변

화는 거의 없이 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 3). 흑삼의 ethanol 용액 추출에 따른 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub>의 반응 표면은 모두 ethanol 농도가 증가할수록 비례적으로 증가하였으며 홍삼의 추출 패턴과 유사한 경향을 나타내었으나, 홍삼에서와는 다르게 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub> 모두 높은 ethanol 농도에서는 온도가 높을수록 상대적으로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3). 홍삼과 흑삼의 ginsenosides 추출 패턴은 산성다당체의 추출 패턴과 반비례 관계에 있었다.

그리고 능선분석을 통해 ginsenosides의 최적 추출조건을 분석해 본 결과(Table 3), 반응표면의 모형은 홍삼 및 흑삼 모두 안장점의 형태를 나타내었으며, 홍삼의 ginsenosides는 ethanol 농도 79.92%에서 70.62°C로 추출할 경우 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 함량이 0.22 mg/mL로 가장 높았으며, ethanol 농도 79.94%에서 69.46°C로 추출 시 추출물의

ginsenoside Rb<sub>1</sub> 함량이 0.36 mg/mL로 가장 높게 나타났다. 흑삼의 ginsenosides는 ethanol 농도 75.11%에서 65.21°C로 추출할 경우 ginsenoside Rb<sub>1</sub> 함량이 0.28 mg/mL로 가장 높았으며, ethanol 농도 75.70%에서 65.49°C로 추출 시 추출물의 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량이 0.31 mg/mL로 가장 높게 나타났다. 홍삼 및 흑삼의 ginsenosides 최적 추출 조건은 ethanol 70% 이상의 높은 농도에서 잘 추출되었으나, 홍삼 및 흑삼 산성다당체의 최적 추출 조건은 ethanol 25% 이하의 낮은 농도에서 잘 추출되는 것으로 나타났다.

### 3.4. 최적 추출조건 설정

시중에서 판매되고 있는 홍삼과 흑삼의 ethanol 용액 추출에 따른 가용성 고형분, 산성다당체 및 ginsenosides의

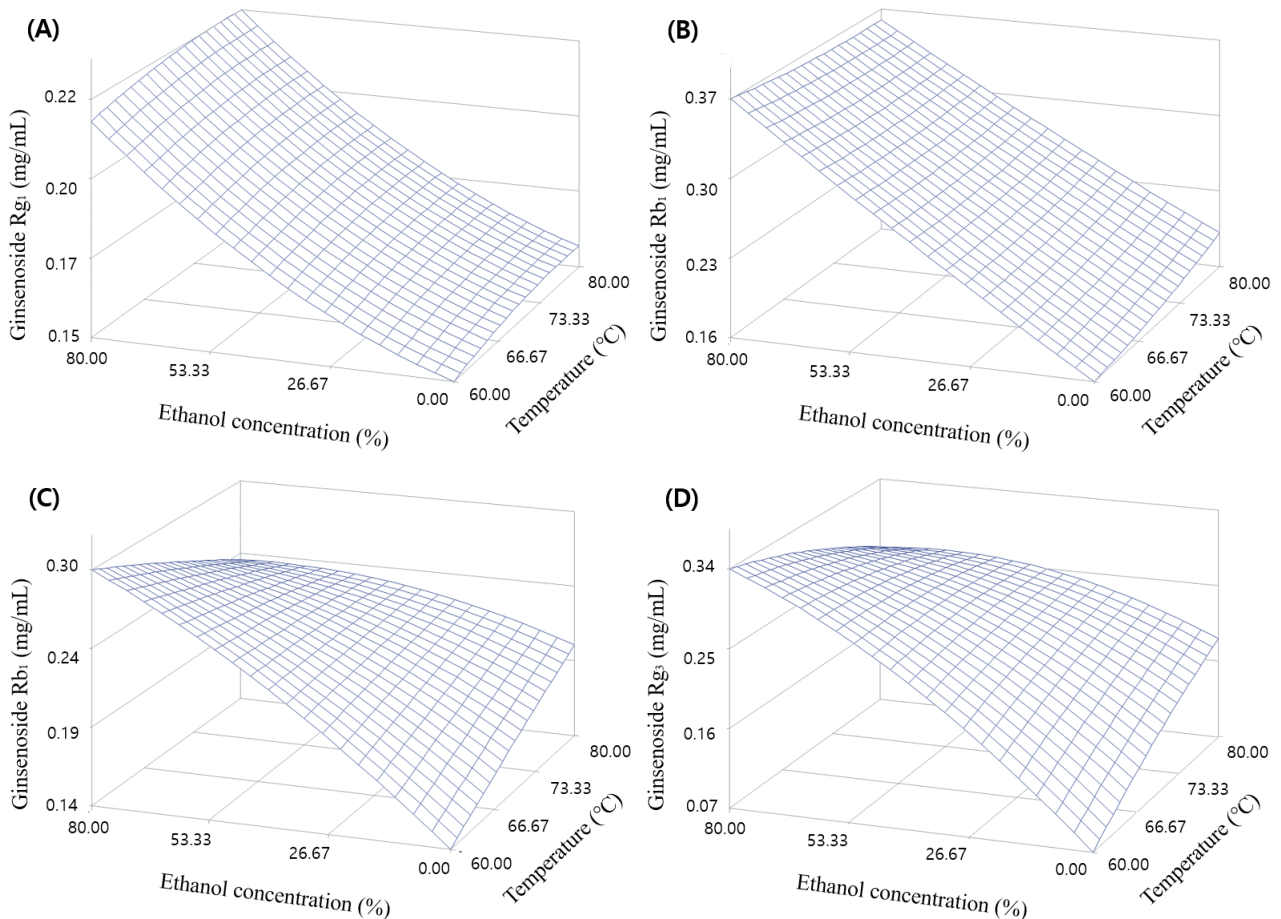


Fig. 3. Response surfaces for ginsenoside Rg<sub>1</sub> (A) and Rb<sub>1</sub> (B) of red ginseng, and Rb<sub>1</sub> (C) and Rg<sub>3</sub> (D) of black ginseng depending on ethanol concentration and extraction temperature.



함량을 모니터링해 봄으로써 ethanol을 이용한 홍삼 및 흑삼 추출조건을 설정해 보았다.

홍삼 및 흑삼의 산성다당체, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub> 등을 효율적으로 추출하기 위해서는 건강기능적 특성을 고려하여 Fig. 4의 중앙에 있는 어두운 부분(dark circles)과 같이 산성다당체 수율과 ginsenoside 수율이 모두 만족하는 ethanol 농도 35-50%의 범위 내에서 67-73℃의 온도로 추출하는 것이 적합한 것으로 여겨진다.

따라서 본 중심합성 실험계획의 중심점인 ethanol 40%에서 70℃로 추출할 경우(Table 1), 홍삼 및 흑삼 산성다당체가 1.73, 1.72 mg/mL이고, 홍삼의 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 0.18, Rb<sub>1</sub> 0.28 mg/mL, 흑삼의 ginsenoside Rb<sub>1</sub> 0.24, Rg<sub>3</sub> 0.25 mg/mL로서 산성다당체와 ginsenoside의 최적 추출 수율과 차이가 크지 않으므로 홍삼 및 흑삼을 1회 추출할 경우에는 적합한 추출 조건으로 설정해 볼 수 있다.

그러나 ginsenosides와 산성다당체의 추출 패턴이 추출용매인 ethanol 농도에 따라 완전히 다르므로 ginsenosides와 산성다당체를 충분히 추출하기 위해서는 ethanol 추출과 물 추출을 분리하여 ethanol로 충분히 추출 후 물을 이용하여 추가적으로 추출하는 방법을 검토해 볼 수 있다.

#### 4. 요약

본 연구에서는 홍삼과 흑삼의 기능성 성분 추출 극대화를 위해 추출 용액의 ethanol 농도와 추출 온도를 고려하여

추출 수율, 산성다당체 및 ginsenosides의 함량 변화를 반응표면분석법을 통해 모니터링해 보고 적정 추출조건을 찾아보았다. 홍삼 및 흑삼의 가용성 고형분 함량에 대한 모델식의 R<sup>2</sup>는 각각 0.9679(p<0.01), 0.8545(p<0.1)였다. 홍삼 가용성 고형분의 최적 추출조건은 ethanol 농도 1.52%에서 67.27℃로 추출 시 그 함량이 5.29%였으며, 흑삼 가용성 고형분의 최적 추출조건은 ethanol 농도 3.12%에서 66.13℃로 추출 시 그 함량이 6.11%였다. 홍삼 및 흑삼의 산성다당체 함량에 대한 모델식의 R<sup>2</sup>는 각각 0.9251(p<0.05), 0.88379(p<0.1)였다. 홍삼의 산성다당체 최적 추출조건은 ethanol 농도 4.03%에서 69.61℃로 추출 시 그 함량이 1.86 mg/mL였다. 흑삼의 산성다당체 최적 추출조건은 ethanol 용액 농도 24.67%에서 71.14℃로 추출 시 그 함량이 1.80 mg/mL였다. 홍삼의 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 및 Rb<sub>1</sub> 함량에 대한 모델식의 R<sup>2</sup>는 각각 0.8941(p<0.05), 0.8718(p<0.1)이었다. 홍삼의 ginsenosides 최적 추출조건은 ethanol 농도 79.92%에서 70.62℃로 추출 시 ginsenoside Rg<sub>1</sub> 함량이 0.22 mg/mL였으며, ethanol 농도 79.94%에서 69.46℃에서 ginsenoside Rb<sub>1</sub> 함량이 0.36 mg/mL였다. 흑삼의 ginsenosides 최적 추출조건은 ethanol 농도 75.11%에서 65.21℃로 추출할 경우 ginsenoside Rb<sub>1</sub> 함량이 0.28 mg/mL였으며, ethanol 농도 75.70%에서 65.49℃에서 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 함량이 0.31 mg/mL였다. 홍삼 및 흑삼의 산성다당체 수율과 ginsenoside 수율을 모두 만족하는 최적 추출조건은 ethanol 농도 35-50%의 범위 내에서 70℃였다.

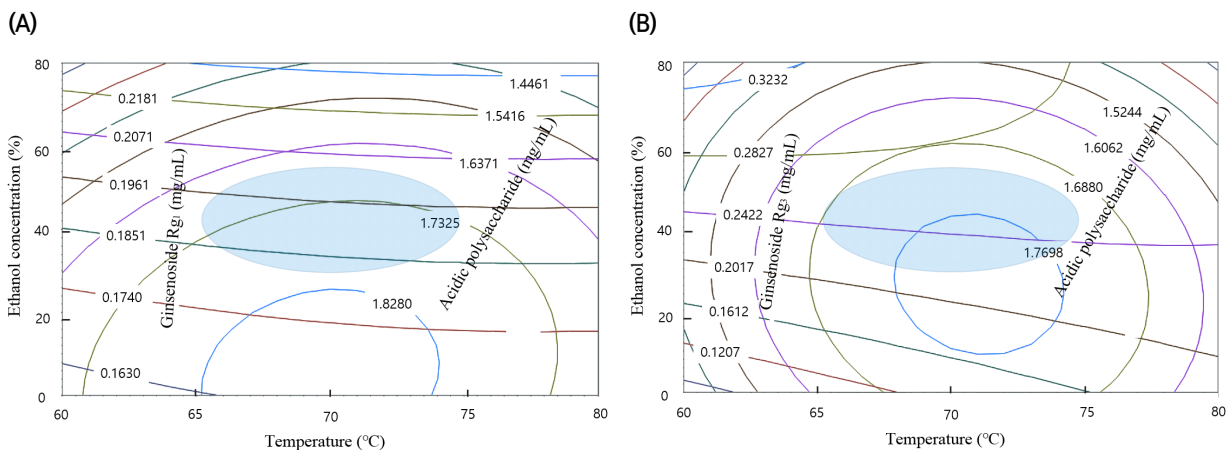


Fig. 4. Superimposed contour maps and dark circles for optimization of red ginseng acidic polysaccharide/Rg<sub>1</sub> (A) and black ginseng acidic polysaccharide/Rg<sub>3</sub> (B) depending on ethanol concentration and extraction temperature.

### Acknowledgements

이 논문은 2023년 중부대학교 학술연구비 지원으로 이루어진 것입니다. 이에 감사드립니다.

### Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

### Author contributions

Conceptualization: Methodology; Formal analysis: Validation; Writing: Lee GD.

### Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

### ORCID

Gee Dong Lee (First & Corresponding author)  
<https://orcid.org/0000-0002-6840-1770>

## References

- Chang EJ, Park TK, Han YN, Hwang KH. Conditioning of the extraction of acidic polysaccharide from red ginseng marc. *Kor J Pharmacogn*, 38, 56-61 (2007)
- Cho CW, Kim SW, Rho J, Rhee YK, Kim K. Extraction characteristics of saponin and acidic polysaccharide based on the red ginseng particle size. *J Ginseng Res*, 32, 179-186 (2008)
- Jang JK, Jeong CM. *Korean Ginseng Processing*. Jungbu Publishing, Cheongju, Korea, p 214-217 (2014)
- Jo HK, Sung MC, Ko SK. The comparison of ginseng prosapogenin composition and contents in red and black ginseng. *Kor J Pharmacogn*, 42, 361-365 (2011)
- Kim HJ, Lee JY, You BR, Kim HR, Choi JE, Nam KY, Moon BD, Kim MR. Antioxidant activities of ethanol extracts from black ginseng prepared by steaming-drying cycles. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40, 156-162 (2011)
- Kim YS, Kang KS, Kim SI. Study on antitumor and immunomodulating activities of polysaccharide fractions from *Panax ginseng*: Comparison of effects of neutral and acidic polysaccharide fraction. *Arch Pharm Res*, 13, 330-337 (1990)
- Kim YS, Kang KS, Kim SI. Effects of ginseng component on immunotoxicity of cyclophosphamide. *Korean J Ginseng*, 15, 13-20 (1991)
- Ko GY, Kim YS, Kim HY, Na KC, Do YH, Park JD, Park JK, Park HJ, Baek NI, Lee SS, Lee JH, Lee JO, Jeong KT. *Korean Ginseng*. Korean Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon, Korea, p 44-48 (1994)
- Konno C, Murakami M, Oshima Y, Hikino H. Isolation and hypoglycemic activity of panaxans Q, R, S, T and U, glycans of *Panax ginseng* roots. *J Ethnopharmacol*, 14, 69-74 (1985)
- Kwak YS, Kim YS, Shin HJ, Song YB, Kyung JS, Wee JJ, Park JD. Effect of oral administration of red ginseng acidic polysaccharide (RGAP) on the tumor growth inhibition. *J Ginseng Res*, 29, 176-181 (2005)
- Kwak YS, Kim YS, Shin HJ, Song YB, Park JD. Anticancer activities by combined treatment of red ginseng acidic polysaccharide (RGAP) and anticancer agents. *J Ginseng Res*, 27, 47-51 (2003)
- Lee CK, Choi JW, Kim H, Han YN. Biological activities of acidic polysaccharide of Korean red ginseng 2: Effects on hyperlipidemia induced by alcohol. *J Ginseng Res*, 23, 8-12 (1999)
- Lee CK, Choi JW, Kim SH, Kim H, Han YN. Biological activities of acidic polysaccharide of Korean red ginseng 3: Effects on metabolizing activities in acetaminophen-treated rats. *J Ginseng Res*, 22, 267-273 (1998)
- Lee GD. Optimization of formation of the ginsenoside Rg<sub>3</sub> in black ginseng steamed with acetic acid solution. *Korean J Food Preserv*, 27, 66-73 (2020)
- Lee GS, Nam KY, Choi JE. Ginsenoside composition and quality characteristics of red ginseng

- extracts prepared with different extracting methods. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 21, 276-281 (2013)
- Lee JW, Do JH. Extraction condition of acidic polysaccharide from Korean red ginseng marc. *J Ginseng Res*, 26, 202-205 (2002)
- Lee JW, Do JH. Current studies on browning reaction products and acidic polysaccharide in Korean red ginseng. *J Ginseng Res*, 30, 41-48 (2006)
- Lee YS, Chung LS, Lee IR, Kim KH, Hong WS, Yun YS. Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginseng isolated from *Panax ginseng*. *Anticancer Res*, 17, 323-331 (1997)
- Li X, Han JS, Park YJ, Kang SJ, Kim JS, Nam KY, Lee KT, Choi JE. Extracting conditions for promoting ginsenoside contents and taste of red ginseng water extract. *J Crop Sci*, 54, 287-293 (2009)
- Myers RH. *Response Surface Methodology*. Allyn and Bacon Inc., Boston, USA, p 127-134 (1971)
- Nam KY. *The Latest Korean Ginseng (Ingredients and Efficacy)*. Korean Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon, Korea, p 1-18 (1996)
- Nam KY, Lee NR, Moon BD, Song GY, Shin HS, Choi JE. Changes of ginsenosides and color from black ginseng prepared by steaming-drying cycles. *Korean J Med Crop Sci*, 20, 27-35 (2012)
- Park KM, Jeong TC, Kim YS, Shin HJ, Nam KY, Park JD. Immunomodulatory effect of acidic polysaccharide fraction from Korean red ginseng. *Nat Prod Sci*, 6, 31-35 (2000)
- Park SH. *Modern Experimental Planning Method*. Minyoungsa, Seoul, Korea, p 600-603 (1991)
- SAS. *SAS/STAT: User's Guide Version 6*. 4th ed, Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA, p 1457-1478 (1988)