



## 인지능 개선 효과 증진을 위한 백삼 추출물 조제 연구

이승은<sup>†</sup> · 김금숙 · 이대영 · 김형돈 · 이재원 · 이영섭 · 박춘근 · 안영섭

농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부

## Study on White Ginseng Extract Preparation for Cognition Improvement

Seung Eun Lee<sup>†</sup>, Geum Sook Kim, Dae Young Lee, Hyung Don Kim, Jae Won Lee,  
Young Sup Lee, Chun Geun Park and Young Sup Ahn

Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

### ABSTRACT

**Background:** The study was conducted to elucidate the extraction conditions under which white ginseng has cognition-improving efficacy.

**Methods and Results:** Extracts from white ginseng under different solvent and temperature conditions were analyzed for ginsenoside content and inhibitory effect on *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor and acetylcholinesterase. The total ginsenoside contents and amounts of ginsenoside Rb1 plus ginsenoside Rg1 from the 1st extracts (prepared with EtOH/H<sub>2</sub>O as solvent) were higher than those from the 2nd extracts (extracted with H<sub>2</sub>O after the 1st EtOH/H<sub>2</sub>O extraction). The contents in the 1st and 2nd extracts produced at 80 °C were also higher than those obtained at 50 °C. Samples from the 1st extraction at 80 °C indicated higher inhibitory activities on NMDA receptors-whose excessive activation is thought to mediate the calcium-dependent neurotoxicity associated with several neurodegenerative diseases-than those from the 2nd extraction. Among the samples prepared at varying temperatures, the extract prepared at 50 °C showed the highest suppression activity on NMDA receptors. Note, however, that the extracts from the 2nd extraction at 50 °C inhibited acetylcholinesterase-whose inhibition could be a therapeutic strategy for neurodegenerative diseases with cognitive deficits and memory malfunction-more effectively than those from the 1st extraction.

**Conclusions:** To enhance the cognition-improving activity of white ginseng extract, it is suggested that the extracts be utilized after being combined the 1st extracts (made with EtOH/H<sub>2</sub>O solvent) and the 2nd extracts (prepared with H<sub>2</sub>O) at low temperature.

**Key Words:** *Panax ginseng*, Acetylcholinesterase, Cognition, Extraction, *N*-Methyl-*D*-Aspartate Receptor

## 서 언

오랜 세월 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 식품이나 한약재로 이용되어 왔으며 최근에 보고된 연구결과에 의하면 수삼이나 백삼 등이 항당뇨 효과 (Kim *et al.*, 1989), 항염증 효과 (Hyun *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2015b), 항산화활성 (Jeon *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006), 암세포에 대한 독성 (Jung *et al.*, 2000), 간보호효과 (Seong *et al.*, 2005) 등 다양한 생리활성을 가지며 부작용이 없는 것 (Kim *et al.*, 2015a)으로 확인된다.

이 뿐만 아니라, 여러 연구자들에 의해 인삼이 신경보호효과 (Lee *et al.*, 2011), 중추신경계 면역력 증가 및 염증반응 조절효과 (Sung *et al.*, 2004), acetylcholinesterase 저해활성 (Lee *et al.*, 2008)을 가지며 인삼 성분인 진세노사이드 Rb1과 Rg1이 실험동물에서 부분적으로 학습향상효과를 보인다는 연구결과 (Mook-Jung *et al.*, 2001)가 보고되었고, 인삼이 허혈로 유도한 흰쥐의 신경손실 및 학습과 기억 손상에 대해 보호 효과를 가진다는 연구 (Kim, 2007)가 보고되어 인삼의 중추신경계 기능개선 효과를 증명해주고 있다. 이러한 인삼의 중추신경계에 미치는 유익한 효과는 사람을 대상으로 한 연구에서도

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5586 (E-mail) herbin3@korea.kr

Received 2016 July 13 / 1st Revised 2016 August 1 / 2nd Revised 2016 October 5 / 3rd Revised 2016 October 18 / Accepted 2016 October 19  
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

확인 되었는데, Kennedy 등 (2002)은 *Ginkgo biloba* · ginseng 복합제의 단회 투여에 의한 인지기능개선 효과를 보고하였고, Reay 등 (2010)은 인체에서 *Panax ginseng* (G115)의 작업기억능력 개선 효과를 보고한 바 있다.

그러므로 이처럼 국내외적으로 보고된 인삼의 유용한 효능을 이용하여 건강기능식품으로 개발한다면 국민건강 증진, 농가소득 향상 뿐 만아니라 산업 활성화 등과 같은 다양한 측면에서 긍정적인 효과를 기대할 수 있을 것이다.

한편, 근래에 들어 인삼을 증숙 가공한 홍삼은 건강기능식품원료로서 면역력증진, 피로회복, 기억력 개선, 혈행 개선, 항산화 효과, 갱년기 여성건강 개선 등 다양한 기능성을 인정받고 있지만, 가공되지 않은 인삼 (백삼, 수삼 등)에 대해서는 면역력증진, 피로회복에 국한하여 기능성이 인정되어 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 국내외적으로 연구된 인삼의 중추신경계, 기억력 개선 등과 관련된 효능을 건강기능식품 기능성 원료로 개발하기 위한 예비단계로서 몇 가지 추출 조건에 따라 추출된 인삼 추출물의 진세노사이드 함량, 기억력개선 또는 인지능개선과 관련되는 분석지표인 *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) 수용체 저해활성 및 아세틸콜린에스테라제 저해활성을 평가함으로써 기능성이 우수한 인삼 추출물 제조 방법을 제시하고자 하였다.

인삼 추출물 조제에 있어서는 건강기능식품제조에 사용이 가능한 용매로서 EtOH과 H<sub>2</sub>O를 사용하여, 먼저 일정 온도에서 EtOH과 H<sub>2</sub>O의 혼합 비율별로 추출물을 제조하여 1차 추출물로 하였고, 1차 추출 후의 잔사에 남아 있을 수 있는 성분을 최대한 추출하여 활용하기 위해 H<sub>2</sub>O로서 2차 추출물을 조제하였다. 또한, 온도를 정한 후 얻어진 용매별 추출물들에 대한 진세노사이드 성분 및 활성분석을 통해 용매 조건을 설정하고, 설정한 용매 조건에서 다시 여러 온도 조건에서의 추출물을 조제하였으며, 마지막으로 정해진 온도 조건에서 여러 가지 EtOH과 H<sub>2</sub>O의 혼합용매 조건으로 다시 추출물을 조제하여 진세노사이드 함량과 활성을 분석함으로써 인지기능을 보유하는 인삼 추출물 조제과정을 완성하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험에 사용된 인삼 시료 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)는 충북 보은군 임학용 농가에서 키운 4년근 수삼을 충북인삼농협이 2013년 9월 24일 채굴 및 수매한 후 세척, 박피 및 건조과정을 거쳐 피부백삼 형태로 가공한 것이었다 (Table. 1, 2). 추출물조제를 위해 표피잔사와 뇌두를 제외한 인삼 시료를 조사된 피부백삼과 미삼의 비율 (72.7 : 21.7)로 칭량하여 세절한 후 사용하였다.

**Table 1.** Characteristics of 4 year-old ginseng sample.

Parameters	Weight of root (g)	Diameter of root (cm)	Number of lateral root (No.)	Weight of head (g)
Results (n = 102)	45.5 ± 14.9	24.3 ± 3.7	2.3 ± 0.9	2.9 ± 0.9

**Table 2.** Part composition of white ginseng.

	Main root	Tail root	Skin residue and head
Weight (g)	15.4	4.6	1.2
Ratio (%)	72.7	21.7	5.6

### 2. 용매 비율별 인삼 추출물의 조제

앞에서 설명한 바와 같이 세절한 백삼 시료 약 316 g을 10배량의 90%, 70%, 50%, 30%, 0% EtOH (Daehan Ethanol Life, Seoul, Korea)으로 pyrex flask, 냉각관 및 맨틀 (Mtops, Misung Scientific Co., Ltd., Yangju, Korea)로 조립한 환류추출장치를 이용하여 80°C에서 3시간 추출하고 여과하였으며 여과 후 남은 시료 잔여물은 다시 동일 용매를 사용하여 추출 및 여과를 4차례 반복하였다. 최종적으로 남은 시료 잔여물은 H<sub>2</sub>O를 가해 추출 및 여과하기를 2차례 반복하였다. 이렇게 얻어진 4차례 반복 추출된 EtOH 비율별 추출물을 합한 것 (이하 85°C 1차 추출물)과 2차례 반복 추출된 H<sub>2</sub>O 추출물을 합한 것 (이하 85°C 2차 추출물)은 감압 농축 (Eyela N-1200B, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) 및 동결건조 (PVTFD 50R, IlshinBioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea)로 각각 용매 또는 수분을 제거하고 진세노사이드 함량 분석 및 NMDA receptor 결합 저해능 분석에 사용하였다.

그리고, 대조 추출물로 사용하기 위해 전통적인 한약 달임과 같은 방식으로 백삼시료를 10배량의 H<sub>2</sub>O로 100°C에서 3시간 3회 반복하여 끓여서 조제한 것을 모두 합한 것을 여과하고 용매를 제거하였다.

한편, 진세노사이드 함량을 분석하기 위해서는 조제된 인삼 추출물 일정량을 70% 메탄올 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 녹인 후 필터로 여과하고 HaloRP-amide 컬럼 (4.6 × 150 mm, 2.7 μm, Wilmington, DE, USA)을 이용하여 50 °C에서 HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)로 진세노사이드 함량을 분석하였다. HPLC 분석에 사용된 용매는 아세토나이트릴 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 및 H<sub>2</sub>O를 혼합해서 사용했으며 유속은 0.5 - 0.8 ml/min으로 설정하였다. 분석대상 진세노사이드는 Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rh1, Rc, Rb2, Rb3, Rd이었으며 진세노사이드 표준물질은 ChromaDex사 (Irvine, CA, USA)의 것을 사용하였으며, 모든 표준물질은 <sup>1</sup>H-NMR을 측정하여 비교 확인하였다.

### 3. 온도 조건별 인삼 추출물 조제

인삼 약 254 g을 칭량하여 중량의 10배에 해당하는 70% EtOH를 가해 pyrex flask, 냉각관 및 heater로 조립한 환류추출장치를 이용하여 온도별 (상온, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C)로 3시간씩 4회 반복 추출 및 여과하였다. 4회 반복 및 여과한 추출액을 합한 것 (이하 각 온도별 70% EtOH 추출물)은 감압농축장치를 이용해 용매를 제거하였고 용매 제거 후 남은 수분과 H<sub>2</sub>O 추출물은 동결건조로 제거하였다. 얻어진 각 온도별 70% EtOH 추출물의 진세노사이드 함량 분석은 앞서 언급한 인삼추출물의 분석과 동일한 방법으로 수행하였다.

### 4. 저온에서의 인삼 추출물 조제

추출 온도를 50°C로 고정된 환류추출장치에서 세절된 백삼 시료 약 254 g을 10배량의 90%, 70%, 50%, 30%, 0% EtOH로 각각 4차례 추출 및 여과하는 과정을 반복하여 합한 후 농축하였으며 이를 저온 (또는 50°C) 1차 추출물로 하였으며, 각 추출액을 여과하고 남은 잔사를 동량의 H<sub>2</sub>O로 2회 반복 추출 및 여과하여 합한 후 농축함으로써 저온 (또는 50°C) 2차 추출물을 조제하였다. 각 추출액의 용매 제거에는 감압농축기를 사용하였고 남은 수분은 동결 건조하여 최종 추출물을 얻었다. 얻어진 저온 1차 추출물 및 저온 2차 추출물의 진세노사이드 함량은 위에서 언급한 것과 동일한 방법으로 분석하였으며 저온에서 추출한 1차 추출물 (5개) 및 2차 추출물 (5개)을 아세틸콜린에스테라제 저해능 분석에 사용하였다.

### 5. 용매 조건 및 온도 조건별 인삼 추출물의 세포독성 분석

용매 비율별 인삼 추출물 및 온도 조건별 인삼 추출물의 세포에 대한 독성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 먼저, fetal bovine serum (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA)이 없는 RPMI 배지 (Gibco, Carlsbad, CA, USA)에 PC12 cells ( $1 \times 10^5$  cells/well)을 96 well plate에 분주하였다. 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 배양액을 모두 제거하였으며 새로운 배지 [RPMI (Gibco, Carlsbad, CA, USA) + 1% penicillin (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), streptomycin (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)] 100  $\mu$ l를 각각의 well에 넣은 후 최종 농도 50  $\mu$ g/ml 이 되게 준비한 시료 20  $\mu$ l을 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 상온에서 녹인 CellTiter 96 aqueous solution reagent (Promega Co., Ltd., Madison, WI, USA) 20  $\mu$ l를 well에 각각 첨가하여 2시간 동안 배양기에서 반응시킨 후 Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 490 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

### 6. 용매 조건 및 온도 조건별 인삼 추출물의 NMDA receptor 결합 저해능 분석

용매 비율별 인삼 추출물 및 온도 조건별 인삼 추출물의 NMDA receptor 결합 저해능을 측정을 위해 랫드에서 추출한 대뇌피질을 4°C에서 균질화하여 최종 1 mg 단백질을 멤브레인 에 얇게 편 후, 4°C에서 60분간 5 nM의 [<sup>3</sup>H]CGP39653 (DuPont NEN, Boston, MA, USA)과 5 mM Tris-Hcl (pH 7.7) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), 10 mM EDTA-Tris (Gibco, Carlsbad, CA, USA)에 최종농도가 50  $\mu$ g/ml 이 되도록 녹인 인삼추출물 시료를 동시에 처리하여 반응시키고, 100  $\mu$ M의 L-glutamine (Gibco, Carlsbad, CA, USA)을 첨가하여 비특이적 결합을 막았다. 반응 후 즉시 진공을 사용하여 글라스 섬유 필터 (Whatman GF/B glass fiber filters, Whatman Co., Maidstone, UK)로 걸러준 후 필터를 아이스-콜드 배양 버퍼로 2-3회 세척 후 필터를 건조하여 Topcount NXT™ (Packard Bioscience Co., Meriden, CT, USA)로 방사선량을 측정하였다.

### 7. 저온에서 조제된 인삼추출물의 acetylcholinesterase 저해능 분석

50°C에서 EtOH 비율별로 추출된 1차 추출물 및 남은 잔사에 대해 H<sub>2</sub>O로 추출한 2차 추출물의 인지능 개선 효과를 확인하기 위해 아세틸콜린에스테라아제 저해능을 분석하였다. 먼저, 96 well black plate (SPL Life Science Co., Ltd., Pocheon, Korea)에 Amplex Red acetylcholine/acetylcholinesterase assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 5  $\times$  반응 버퍼를 H<sub>2</sub>O (3차 증류수), 시료를 첨가하여 1  $\times$  반응 버퍼로 제조하여 웰에 100  $\mu$ l씩 첨가하였다. 여기에 200  $\mu$ l의 Amplex red reagent stock solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100  $\mu$ l의 HRP conjugate solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100  $\mu$ l의 choline oxidase stock solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10  $\mu$ l의 acetylcholine stock solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 9.59 ml의 1  $\times$  reaction buffer로 구성된 혼합액 100  $\mu$ l를 첨가하여 빛이 없는 상온에서 30분간 반응시킨 후 Infinity F200 PRO (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 형광을 측정 (excitation 530 nm, emission 590)하였다. 위에서 언급한 저온 1차 추출물들 (5개) 및 저온 2차 추출물 (5개) 각각에 대해 3회 반복하여 acetylcholinesterase 저해능 분석을 수행하였다.

### 8. 통계처리

활성과 관련 실험결과 (n=2)는 mean  $\pm$  standard error로 나타내었고, Student's *t*-test에 의해 유효성을 분석하였으며 control과 비교하여 *p* < 0.05 이상인 것을 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 용매 비율별 인삼 추출물의 수율 및 진세노사이드 함량 분석 결과

각 용매 비율별 추출물을 조제하여 수율과 진세노사이드 함량을 확인하고 그 결과를 Table 3에 나타내었다.

먼저, 수율에 있어서는 EtOH와 H<sub>2</sub>O를 비율별 (EtOH: H<sub>2</sub>O=90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100)로 1차 추출한 추출물들은 14.8-50.4%의 수율을 나타내었으며, 1차 추출물의 잔사들에 대해 각각 H<sub>2</sub>O로 2차 추출하여 얻어진 추출물들은 2.4-12.2%의 수율을 나타내는 것으로 나타나 EtOH를 혼합한 용매로 추출한 추출물들이 그 잔사에 대해 다시 추출한 추출물보다는 높은 수율을 나타냄을 알 수 있었다. 또, 용매 조건별로 추출한 1차 추출물 중에서는 H<sub>2</sub>O만으로 추출하였을 때 가장 높은 수율을 나타내었고, 그 잔사들에 대해 2차로 H<sub>2</sub>O로 추출한 추출물 중에서는 90% EtOH 추출잔사에 대해 2차로 추출한 추출물의 수율이 가장 높았다. 하지만, 수율에 있어서는 대조 추출물로서 전통적인 한약추출과 유사한 방법으로 추출하여 얻어진 추출물의 수율이 55.2%로서 1차 및 2차 용매 조건별 추출물들보다 더 높았다.

한편, 각 용매 비율별 추출물 및 그 잔사로부터 2차 추출로 얻어진 H<sub>2</sub>O 추출물들에 대해 진세노사이드 함량을 분석한 결과, 추출물 g당 총 진세노사이드 함량은 1차 추출물에서 24.1-91.5 mg/g의 함량을 보였고, EtOH 비율별 1차 추출물의 잔사에 대해 H<sub>2</sub>O로 2차 추출한 추출물들의 g당 총 진세노사이드 함량은 0.8-39.6 mg/g를 나타내었다. 1차 추출물 중에서는 90% EtOH 1차 추출물이 가장 높은 수치를 나타냈었으며, 2차 추출물 중에서는 1차 H<sub>2</sub>O 추출 후 남은 잔사에 대해 2차 H<sub>2</sub>O로 추출한 추출물이 가장 높았다. 대조 추출물은 21.9 mg/g의 g 당 총 진세노사이드 함량을 보여 비교적 낮은 수치를 나타냄을 확인하였다. 또한, 이들 추출물 g당 Rb1 + Rg1 함량을 살펴보면, 1차 추출물들이 9.4-32.8 mg/g 2차 추출물들이 0.8-14.2 mg/g를 나타내었다.

총 추출물에 대한 진세노사이드 함량은 1차 추출물들에서 3,847-4,691 mg 이었고, 2차 추출물들은 15-308 mg으로 나타났으며, 총 추출물에 대한 Rb1 + Rg1 함량은 1차 추출물에서 1,445-1,717 mg, 2차 추출물에서 15-111 mg을 나타내었다. 이러한 결과에 의하면 총 추출물에 대한 총 진세노사이드 함량과 Rb1 + Rg1 함량은 70% EtOH로 추출한 1차 추출물이 각각 4,691 mg 및 1,717 mg로 가장 높았는데 이는 대조 추출

**Table 3.** Yields and ginsenoside contents of the ginseng extracts prepared according to EtOH ratio at 80°C.

Phase	Sample name	Weight of ginseng (g)	Total extract (g)	Yield (%)	Ginsenoside (mg/g of extract)			Ginsenoside (mg/total extract)	
					Total	Rb1 + Rg1	PD/PT	Total	Rb1 + Rg1
1st Extraction	90% EtOH, 80°C <sup>1)</sup>	315.7	46.7	14.8	91.5 ± 0.20	32.8	15.7 ± 0.11	4,271	1,531
	70% EtOH, 80°C <sup>2)</sup>	315.2	68.3	21.7	68.7 ± 0.19	25.1	17. ± 0.07	4,691	1,717
	50% EtOH, 80°C <sup>3)</sup>	315.8	66.5	21.1	59.6 ± 0.29	21.7	17.9 ± 0.08	3,961	1,445
	30% EtOH, 80°C <sup>4)</sup>	316.1	68.7	21.7	60.7 ± 0.06	22.2	15. ± 0.07	4,172	1,523
	0% EtOH, 80°C <sup>5)</sup>	316.6	159.4	50.4	24.1 ± 0.03	9.4	9.3 ± 0.01	3,847	1,498
2nd Extraction	90% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C <sup>6)</sup>		38.6	12.2	6.5 ± 0.02	2.6	6.4 ± 0.03	253	102
	70% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C <sup>7)</sup>		19.7	6.2	0.8 ± 0.00	0.8	0.0 ± 0.00	15	15
	50% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C <sup>8)</sup>		13.3	4.2	1.4 ± 0.00	1.2	0.0 ± 0.00	19	15
	30% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C <sup>9)</sup>		7.5	2.4	5.0 ± 0.02	2.6	8.5 ± 0.05	38	20
	0% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C <sup>10)</sup>		7.8	2.5	39.6 ± 0.06	14.2	37.2 ± 0.02	308	111
Control	H <sub>2</sub> O, 100°C (Traditional) <sup>11)</sup>	316.0	174.4	55.2	21.9 ± 0.02	7.9	11.2 ± 0.02	3,826	1,377

Table 3. continued.

Phase	Sample name	Ginsenoside (mg/g of extract)									
		Rg1	Re	Rf	Rb1	Rg2	Rh1	Rc	Rb2	Rb3	Rd
1st Extraction	90% EtOH, 80°C	13.0 ± 0.09	11.8 ± 0.08	8.9 ± 0.03	19.8 ± 0.07	1.7 ± 0.01	0.2 ± 0.00	16.3 ± 0.05	12.1 ± 0.04	1.4 ± 0.01	5.6 ± 0.02
	70% EtOH, 80°C	9.5 ± 0.05	7.8 ± 0.04	6.3 ± 0.02	15.6 ± 0.05	1.4 ± 0.00	0.2 ± 0.00	12.7 ± 0.04	9.4 ± 0.03	1.0 ± 0.01	4.3 ± 0.01
	50% EtOH, 80°C	7.3 ± 0.05	6.9 ± 0.06	5.9 ± 0.04	14.4 ± 0.05	1.1 ± 0.01	0.2 ± 0.00	10.7 ± 0.04	8.0 ± 0.02	0.9 ± 0.00	3.7 ± 0.01
	30% EtOH, 80°C	8.3 ± 0.03	8.1 ± 0.03	5.8 ± 0.01	13.9 ± 0.03	1.1 ± 0.00	0.2 ± 0.00	10.6 ± 0.03	7.9 ± 0.02	0.9 ± 0.00	3.6 ± 0.01
	0% EtOH, 80°C	5.1 ± 0.02	4.3 ± 0.01	2.3 ± 0.00	4.3 ± 0.01	0.6 ± 0.00	0.2 ± 0.00	3.4 ± 0.01	2.4 ± 0.00	0.3 ± 0.00	1.1 ± 0.00
2nd Extraction	90% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C	1.5 ± 0.01	1.9 ± 0.01	0.6 ± 0.00	1.2 ± 0.00	<sup>12)</sup>	-	0.6 ± 0.00	0.5 ± 0.00	-	0.3 ± 0.00
	70% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C	0.8 ± 0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C	0.12 ± 1.2	0.03 ± 0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
	30% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C	1.8 ± 0.00	0.6 ± 0.01	0.2 ± 0.00	0.9 ± 0.01	-	0.1 ± 0.00	0.6 ± 0.00	0.5 ± 0.00	-	0.3 ± 0.00
	0% EtOH-H <sub>2</sub> O, 80°C	2.9 ± 0.00	1.2 ± 0.01	2.5 ± 0.02	11.4 ± 0.01	1.2 ± 0.00	0.5 ± 0.00	8.7 ± 0.01	6.6 ± 0.01	0.7 ± 0.00	3.5 ± 0.01
Control	H <sub>2</sub> O, 100°C (Traditional)	3.7 ± 0.01	3.3 ± 0.01	2.0 ± 0.00	4.2 ± 0.00	0.8 ± 0.00	0.6 ± 0.00	3.3 ± 0.00	2.5 ± 0.00	0.3 ± 0.00	1.2 ± 0.00

<sup>1)</sup>90% EtOH, 80°C; sample extracted with 90% EtOH, <sup>2)</sup>70% EtOH, 80°C; sample extracted with 70% EtOH, <sup>3)</sup>50% EtOH, 80°C; sample extracted with 50% EtOH, <sup>4)</sup>30% EtOH, 80°C; sample extracted with 30% EtOH at 80°C, <sup>5)</sup>0% EtOH, 80°C; sample extracted with 0% EtOH, <sup>6)</sup>90% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 90% EtOH, <sup>7)</sup>70% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 70% EtOH, <sup>8)</sup>50% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 50% EtOH, <sup>9)</sup>30% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 30% EtOH, <sup>10)</sup>0% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 0% EtOH at 80°C, and <sup>11)</sup>H<sub>2</sub>O, 100°C (Traditional); sample extracted with H<sub>2</sub>O at 100°C, respectively. <sup>12)</sup>-; not detected.

물의 총 진세노사이드 함량인 3,826 mg 및 Rb1 + Rg1 함량인 1,377 mg 보다 높은 결과였다.

그런데, 인삼의 건강기능성 원료로 활용하기 위한 규격 기준인 Rb1 + Rg1 함량을 기준으로 활용성이 높은 용매 비율별 추출 조건을 선정하는 것이 매우 중요하므로 분석된 수율 및 진세노사이드 함량은 각 EtOH 비율별 총 추출물 중에서의 총 진세노사이드 함량 및 Rb1 + Rg1 함량을 산출하고 가장 높은 수치를 나타내는 용매 조건으로 인삼의 추출물을 조제하는 것이 바람직할 것으로 사료되었다. 따라서, 위 실험된 결과 중에서 80°C에서 얻어진 인삼 추출물의 경우, 총 추출물에 대한 총 진세노사이드 함량과 Rb1 + Rg1 함량이 가장 높았던 70% EtOH로 1차 추출물의 활용성이 좋을 것으로 사료되었다.

## 2. 온도 조건별 인삼 추출물의 수율 및 진세노사이드 함량 분석 결과

위에서 언급된 실험결과에 따라 총 진세노사이드 함량 및 Rb1 + Rg1 함량이 가장 높았던 70% EtOH을 용매 조건으로 고정하고 여러 가지 온도 조건 (상온, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C)에서 추출물을 조제한 후 수율, 단위 g당 진세노사이드 함량 및 총 추출물에 대한 진세노사이드 함량을 분석하였으며 그 결과는 Table 4에 나타내었다.

70% EtOH로 상온, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C 및 100°C에서 추출한 추출물들의 수율은 8.8 - 22.5%로 나타나 70°C에서 추출한 추출물이 가장 높은 수율을 나타내었고, 단위 g 당 총 진세노사이드 함량은 각각 45.1 - 63.4 mg/g의 결과를, 그리고

**Table 4.** Yields and ginsenoside contents of the ginseng extracts prepared at different temperatures with 70% EtOH.

Sample name	Weight of ginseng (g)	Extract (g)	Yield (%)	Ginsenoside (mg/g of extract)			Ginsenoside (mg/total extract)	
				Total	Rg1 + Rb1	PD/PT	Total	Rg1 + Rb1
70% EtOH, RT <sup>1)</sup>	255.8	22.4	8.8	46.6 ± 0.14	17.3	7.1 ± 0.05	1,042	387
70% EtOH, 50°C <sup>2)</sup>	254.7	50.8	19.9	45.1 ± 0.16	17.1	8.8 ± 0.04	2,288	866
70% EtOH, 60°C <sup>3)</sup>	255.1	48.8	19.1	51.0 ± 0.15	19.7	10.3 ± 0.04	2,487	960
70% EtOH, 70°C <sup>4)</sup>	254.8	57.4	22.5	53.2 ± 0.17	19.6	11.8 ± 0.08	3,051	1,125
70% EtOH, 80°C <sup>5)</sup>	254.9	55.5	21.8	58.0 ± 0.15	22.2	13.6 ± 0.07	3,219	1,233
70% EtOH, 90°C <sup>6)</sup>	254.6	50.2	19.7	58.8 ± 0.11	22.3	13.3 ± 0.08	2,950	1,117
70% EtOH, 100°C <sup>7)</sup>	254.5	55.8	21.9	63.4 ± 0.16	24.2	13.8 ± 0.05	3,537	1,348

**Table 4.** continued.

Sample name	Ginsenoside (mg/g of extract)									
	Rg1	Re	Rf	Rb1	Rg2	Rh1	Rc	Rb2	Rb3	Rd
70% EtOH, RT	10.2 ± 0.09	9.5 ± 0.07	6.4 ± 0.01	7.1 ± 0.02	1.3 ± 0.00	–	5.6 ± 0.02	4.0 ± 0.02	0.7 ± 0.00	1.5 ± 0.00
70% EtOH, 50°C	9.3 ± 0.07	7.9 ± 0.07	5.5 ± 0.02	7.8 ± 0.02	1.2 ± 0.00	–	6.1 ± 0.01	4.4 ± 0.01	0.7 ± 0.00	1.8 ± 0.00
70% EtOH, 60°C	10.2 ± 0.04	8.2 ± 0.04	5.5 ± 0.01	9.5 ± 0.03	1.3 ± 0.00	–	7.4 ± 0.02	5.5 ± 0.02	0.8 ± 0.00	2.2 ± 0.01
70% EtOH, 70°C	9.1 ± 0.07	8.5 ± 0.06	5.6 ± 0.02	10.5 ± 0.04	1.2 ± 0.00	–	8.2 ± 0.03	6.0 ± 0.02	0.9 ± 0.00	2.7 ± 0.01
70% EtOH, 80°C	9.8 ± 0.06	8.0 ± 0.05	5.5 ± 0.02	12.5 ± 0.02	1.3 ± 0.00	–	9.4 ± 0.02	6.8 ± 0.01	1.0 ± 0.00	3.4 ± 0.01
70% EtOH, 90°C	10.3 ± 0.08	8.2 ± 0.05	5.5 ± 0.02	11.9 ± 0.03	1.3 ± 0.00	–	9.5 ± 0.02	7.1 ± 0.02	1.0 ± 0.00	3.6 ± 0.01
70% EtOH, 100°C	10.9 ± 0.07	8.4 ± 0.05	6.1 ± 0.01	13.3 ± 0.02	1.3 ± 0.00	–	10.3 ± 0.01	7.7 ± 0.01	1.0 ± 0.00	3.9 ± 0.00

<sup>1)</sup>70% EtOH, RT; sample extracted at room temperature, <sup>2)</sup>70% EtOH, 50°C; sample extracted at 50°C, <sup>3)</sup>70% EtOH, 60°C; sample extracted at 60°C, <sup>4)</sup>70% EtOH, 70°C; sample extracted at 70°C, <sup>5)</sup>70% EtOH, 80°C; sample extracted at 80°C, <sup>6)</sup>70% EtOH-H<sub>2</sub>O, 90°C; sample extracted at 90°C, <sup>7)</sup>70% EtOH-H<sub>2</sub>O, 100°C; sample extracted at 100°C with 70% EtOH, respectively. <sup>8)</sup> –; not detected.

단위 g 당 Rb1 + Rg1 함량은 17.1 - 24.2 mg/g의 결과를 보였는데 100°C에서 추출할 경우 단위 g 당 총 진세노사이드 함량과 단위 g 당 Rb1 + Rg1 함량이 가장 높았다.

한편, 각 온도 조건별로 얻어진 총 추출물에 대한 총 진세노사이드 함량과 Rb1 + Rg1 함량에 있어서는 각각 1,042 - 3,537 mg 및 387 - 1,348 mg의 함량을 나타내었으며, 총 추출물에 대한 총 진세노사이드 함량과 Rb1 + Rg1 함량도 100°C에서 추출한 추출물이 가장 높은 함량을 나타내었다. 하지만, 인

삼 중의 malonyl ginsenoside는 가열에 의해 malonyl 기가 소실되며, C-20 위치의 당 결합은 산에 약하여 인삼의 가열추출 시 인삼에 존재하는 유기산류와 반응하여 가수분해 되기 쉬워 (Shin *et al.*, 2001) 인삼 고유의 성분을 유지시킨 추출물을 제조하기 위해서는 온도설정이 매우 중요하다고 사료되었다.

### 3. 저온에서 조제된 인삼 추출물의 수율 및 진세노사이드 함량 분석 결과

위 실험결과에서 80°C로 고정된 온도 조건에서 EtOH 비율별로 추출된 1차 인삼 추출물과 2차 인삼 추출물 그리고 70% EtOH로 온도별로 추출된 인삼 추출물에 대한 NMDA 수용체 저해활성에 대한 실험결과로부터 인삼 추출물은 저온에서 70% EtOH로 추출하였을 때, 가장 우수한 NMDA 수용체에 대한 저해활성을 보였기에 온도 조건을 50°C로 고정된 후 EtOH 비율별로 추출물을 조제하였고, 이들에 대한 아세틸콜린에스테라제 저해활성을 분석하였다.

먼저, 저온에서 EtOH 비율별로 얻어진 각 추출물의 수율은 Table 5에 나타낸 바와 같이 EtOH 비율별로 추출된 1차 추출물은 10.9 - 51.4%의 수율을 보였고, 2차 추출물은 1.0 - 11.5%의 수율을 나타내었다. 한편, 50°C의 온도 조건에서 인삼 추출물 단위 g당 총 진세노사이드 함량은 1차 추출물에서 19.0 - 79.7 mg/g이었으며 2차 추출물에서는 1.1 - 37.7 mg/g이었다. 단위 g당 Rb1 + Rg1의 함량은 1차 추출물에서 6.3 - 28.0 mg/g이었으며 2차 추출물에서는 0.7 - 11.8 mg/g로 나타났다.

한편, 1차 추출로 얻어진 각 총 추출물에 대한 총 진세노사이드 함량은 2,210 - 3,282 mg이었으며 30% EtOH 추출물이 가장 높은 수치를 보였고, 2차 추출물에서는 7 - 45 mg으로 나타났고 90% EtOH 추출 후의 잔사에 대한 H<sub>2</sub>O 추출물이 가장 높았다. 저온에서 얻어진 각 EtOH 비율별 총 추출물에서

총 Rb1 + Rg1의 함량은 1차 추출물에서 776 - 1,238 mg으로 나타났고 이중 30% EtOH 추출물이 가장 높은 수치를 보였으며, 2차 추출물에서는 5 - 170 mg로 나타났으며 이중 90% EtOH 추출 후의 잔사에 대한 H<sub>2</sub>O 추출물이 가장 높았다.

온도를 50°C로 고정된 조건에서 단위 g당 진세노사이드 함량이나 총 추출물의 진세노사이드 함량은 80°C에서 추출된 인삼추출물의 각 함량과 다소 차이가 있는 것으로 확인되어 건강기능식품으로 제조 시에 종합적으로 검토되어야 할 사항이라고 사료되었다.

**4. 용매 조건 및 온도 조건별 인삼 추출물의 세포독성 분석 결과**

위에서 언급한 용매 비율별 1차 및 2차 추출물, 대조 추출물과 온도 조건별 추출물을 최종 농도 50 µg/ml의 조건에서 PC12 세포에 대한 세포독성을 실험하였다 (Table. 3, 4). 그 결과, Fig. 1에 나타낸 바와 같이 용매 비율별 추출물 12개는 88.3 - 101.8%의 세포증식율을 보였는데, 70% EtOH로 1차 추출한 추출물이 101.8%로 가장 우수하였다. 또한, Fig. 2에 나타내었듯이 온도 조건별 추출물은 92.8 - 101.1%의 세포증식율을 나타내었는데 60°C에서 70% EtOH로 추출한 추출물이 101.1%로 가장 높은 수치를 나타내었다. 용매 조건별 및 온도

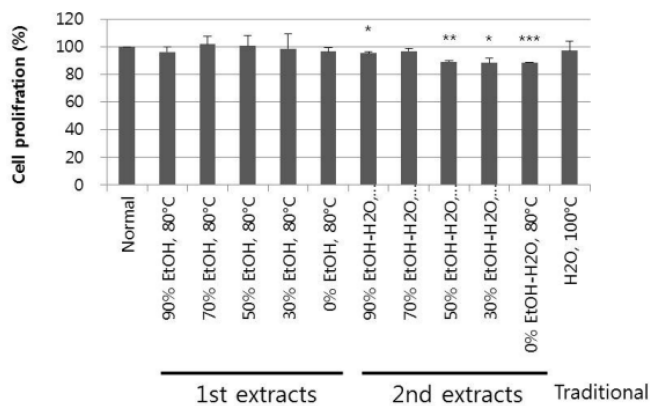
**Table 5.** Yields and ginsenoside contents of the ginseng extracts prepared according to EtOH ratio at 50°C.

Phase	Sample name	Weight of ginseng (g)	Total extract (g)	Yield (%)	Ginsenoside (mg/g of extract)			Ginsenoside (mg/total extract)	
					Total	Rb1 + Rg1	PD/PT	Total	Rb1 + Rg1
1st Extraction	90% EtOH, 50°C <sup>1)</sup>	254.7	27.7	10.9	79.7 ± 0.28	28.0	9.5 ± 0.03	2,210	776
	70% EtOH, 50°C <sup>2)</sup>	254.8	45.3	17.8	54.7 ± 0.19	20.3	9.9 ± 0.01	2,477	919
	50% EtOH, 50°C <sup>3)</sup>	254.8	56.8	22.3	55.1 ± 0.14	19.9	9.9 ± 0.03	3,129	1,130
	30% EtOH, 50°C <sup>4)</sup>	254.7	59.8	23.5	54.9 ± 0.24	20.7	10.7 ± 0.04	3,282	1,238
	0% EtOH, 50°C <sup>5)</sup>	254.3	130.6	51.4	19.0 ± 0.05	6.3	7.6 ± 0.03	2,486	822
2nd Extraction	90% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C <sup>6)</sup>	-	29.2	11.5	15.5 ± 0.01	5.8	7.1 ± 0.03	452	170
	70% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C <sup>7)</sup>	-	12.4	4.9	1.1 ± 0.00	0.7	4.0 ± 0.03	14	8
	50% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C <sup>8)</sup>	-	4.7	1.9	1.4 ± 0.01	1.0	4.4 ± 0.01	7	5
	30% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C <sup>9)</sup>	-	2.6	1.0	9.1 ± 0.02	3.7	8.4 ± 0.02	23	9
	0% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C <sup>10)</sup>	-	3.7	1.4	37.7 ± 0.17	11.8	24.7 ± 0.15	138	43

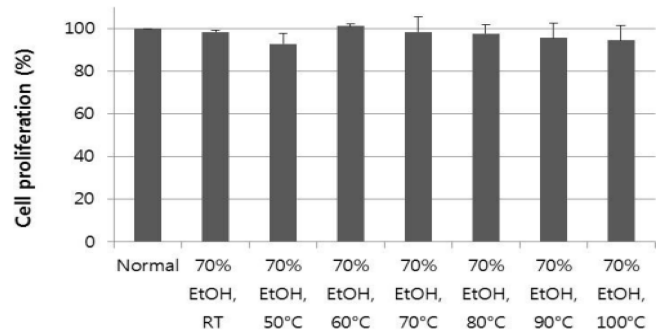
Table 5. continued.

Phase	Sample name	Ginsenoside (mg/g of extract)									
		Rg1	Re	Rf	Rb1	Rg2	Rh1	Rc	Rb2	Rb3	Rd
1st Extraction	90% EtOH, 50°C	13.7 ± 0.05	11.1 ± 0.06	13.8 ± 0.6	14.3 ± 0.05	2.3 ± 0.01	-	12.4 ± 0.04	6.8 ± 0.02	1.1 ± 0.00	3.7 ± 0.01
	70% EtOH, 50°C	9.5 ± 0.04	7.1 ± 0.02	9.3 ± 0.01	10.8 ± 0.05	1.6 ± 0.01	-	8.3 ± 0.04	4.6 ± 0.02	0.8 ± 0.00	2.3 ± 0.01
	50% EtOH, 50°C	9.1 ± 0.03	6.9 ± 0.02	10.0 ± 0.05	10.8 ± 0.02	1.6 ± 0.00	-	8.3 ± 0.02	4.8 ± 0.01	0.8 ± 0.00	2.4 ± 0.01
	30% EtOH, 50°C	9.7 ± 0.04	7.2 ± 0.03	8.0 ± 0.04	11.0 ± 0.05	1.7 ± 0.01	-	8.4 ± 0.04	5.0 ± 0.02	0.8 ± 0.01	2.7 ± 0.02
	0% EtOH, 50°C	3.2 ± 0.01	3.5 ± 0.01	3.5 ± 0.01	3.1 ± 0.01	0.6 ± 0.00	-	2.5 ± 0.01	1.5 ± 0.01	0.3 ± 0.00	0.7 ± 0.00
2nd Extraction	90% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C	3.2 ± 0.01	3.5 ± 0.01	1.9 ± 0.00	2.6 ± 0.01	0.4 ± 0.00	-	1.8 ± 0.01	1.1 ± 0.00	0.2 ± 0.00	0.5 ± 0.00
	70% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C	0.4 ± 0.00	0.4 ± 0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
	50% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C	0.6 ± 0.00	0.4 ± 0.00	-	0.4 ± 0.00	-	-	-	-	-	-
	30% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C	2.1 ± 0.01	1.1 ± 0.00	1.3 ± 0.00	1.6 ± 0.01	0.4 ± 0.00	-	1.3 ± 0.00	0.8 ± 0.00	-	0.5 ± 0.00
	0% EtOH-H <sub>2</sub> O, 50°C	1.5 ± 0.00	1.2 ± 0.01	6.3 ± 0.03	10.3 ± 0.07	1.8 ± 0.00	-	7.9 ± 0.04	4.7 ± 0.04	0.9 ± 0.00	2.7 ± 0.01

<sup>1)</sup>90% EtOH, 50°C; sample extracted with 90% EtOH, <sup>2)</sup>70% EtOH, 50°C; sample extracted with 70% EtOH, <sup>3)</sup>50% EtOH, 50°C; sample extracted with 50% EtOH, <sup>4)</sup>30% EtOH, 50°C; sample extracted with 30% EtOH, <sup>5)</sup>0% EtOH, 50°C; sample extracted with 0% EtOH, <sup>6)</sup>90% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 90% EtOH, <sup>7)</sup>70% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 70% EtOH, <sup>8)</sup>50% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 50% EtOH, <sup>9)</sup>30% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 30% EtOH, <sup>10)</sup>0% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C; sample extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 0% EtOH at 50°C, respectively <sup>11)</sup>-; not detected.



**Fig. 1. Cell proliferation on PC12 of ginseng extracts (50 µg/ml) prepared at different solvent conditions.** Normal means distilled water. 1st extracts prepared at 80°C included five samples extracted with 90% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH, 30% EtOH and 0% EtOH, respectively. Five 2nd extracts were obtained at 80°C are 90% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C, 70% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C, 50% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C, 30% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C, 0% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C which are extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 90%, 70%, 50%, 30% and 0% EtOH, respectively. Traditional means the sample extracted with H<sub>2</sub>O at 100°C. Statistical analysis were conducted by Student's t-test (n = 2). Significant differences with normal were designated as \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001.



**Fig. 2. Cell proliferation on PC12 of ginseng extracts (50 µg/ml) prepared at several temperatures.** Normal means distilled water. 70% EtOH, RT named the sample extracted at room temperature, 70% EtOH, 50°C did the sample extracted at 50°C, 70% EtOH, 60°C did the sample extracted at 60°C, 70% EtOH, 70°C did the sample extracted at 70°C, 70% EtOH, 80°C did the sample extracted at 80°C, 70% EtOH, 90°C did the sample extracted at 90°C, 70% EtOH, 100°C did the sample extracted at 100°C with 70% EtOH, respectively. Statistical analysis were conducted by Student's t-test (n = 2).

조건별 추출물은 대부분의 추출물이 PC12 세포에 대해 우수한 증식효과가 있음을 알 수 있었다.



5. 용매 조건별 및 온도 조건별 인삼 추출물의 NMDA 수용체 결합저해능 분석 결과

NMDA 수용체의 과도한 활성화는 glutamate 독성과 신경사멸과 관련되며 이것이 알츠하이머병과 같은 신경퇴행과 관련된 여러 질환에서 관찰된다는 보고 (Chen *et al.*, 1992)가 있어 80°C에서 추출된 EtOH 비율별 1차, 2차 추출물 및 대조추출물, 그리고 온도 조건에 따른 70% EtOH 추출물을 재료로 하여 최종 농도 50 µg/ml의 조건에서 NMDA 수용체에 대한 결합저해능을 분석하였으며 (Table. 3, 4), 그 결과를 Fig. 3 및 Fig. 4에 나타내었다.

EtOH 비율별 추출물에서는 1차 추출물이 34.9 ± 0.1 - 49.0 ± 2.5%, 2차 추출물이 11.2 ± 2.5 - 48.0 ± 4.2%의 NMDA 수용체에 대한 저해활성을 보여 1차 EtOH 추출물이 2차 H<sub>2</sub>O 추출물 보다 대체적으로 우수한 저해활성을 보였다. 1차 추출물 중에서는 70% EtOH 추출물, 30% EtOH 추출물, 2차 추출물 중에서는 90% EtOH 추출 후 잔사에 대한 H<sub>2</sub>O 추출물이 48% 이상의 매우 우수한 저해활성을 보였다 (Fig. 3).

온도 조건별 70% EtOH 추출물에 있어서는 37.5 ± 4.6 - 52.1 ± 1.7%의 NMDA 수용체 저해활성을 확인할 수 있었으며 상온, 50°C 및 60°C에서 추출된 추출물이 각각 49.5 ± 0.6%, 52.1 ± 1.7% 및 50.1 ± 2.5%의 유의하고 우수한 NMDA 수용체 저해활성을 보였으므로 NMDA 수용체에 대해서는 70°C 이상의 고온보다는 60°C이하의 저온에서 추출된 추출물이 더 우수한 저해활성을 나타내는 것으로 확인되었다 (Fig. 4).

보고에 의하면 인삼에 함유된 여러 종의 진세노사이드 중에서 ginsenoside Rb1은 허혈로부터 해마를 보호하며 (Lim *et al.*, 1997), ginsenoside Rb1는 glutamate로 유도한 신경독성으로부터 피질신경세포를 보호하는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 1998). 또한, Radad 등 (2004)은 가공되지 않은 인삼의 주요성분인 ginsenoside Rb1과 Rg1이 세포배양실험에서 부분적이지만 신경보호 작용을 가진다고 보고한 바 있다. 이러한 보고들을 고려하여 Table 3, 4의 인삼 추출물의 ginsenoside Rb1과 Rg1의 함량 및 Fig. 3와 Fig. 4의 NMDA 수용체에 대한 저해효과를 비교하였을 때, ginsenoside Rb1과 Rg1의 함량이 높은 인삼 추출물일지라도 반드시 NMDA 수용체에 대해 우수한 저해효과를 나타내지는 않음을 알 수 있으므로 이들 2가지 진세노사이드 외의 다른 성분이 작용할 가능성이 있을 것으로 사료된다. 한편, 가공된 홍삼의 주요성분인 ginsenoside Rg3는 배양된 세포에서 NMDA 수용체에 대한 저해효과를 통해 신경보호작용을 할 것 이라는 보고가 있었고 (Kim *et al.*, 2002), ginsenoside Rh2도 Rg3와는 다른 기전에 의해 NMDA 수용체에 대한 저해효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있다 (Lee *et al.*, 2006).

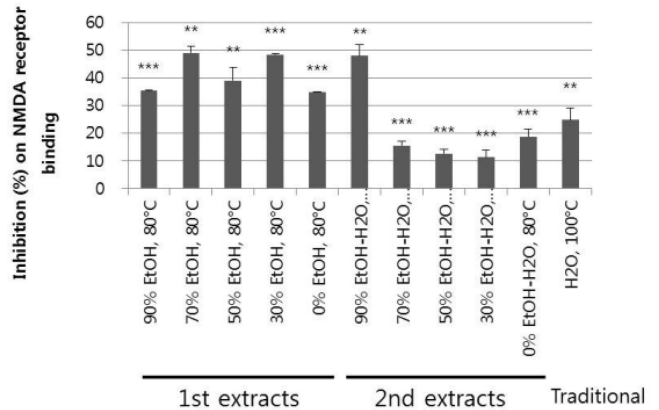


Fig. 3. Inhibition on NMDA receptor binding of ginseng extracts (50 µg/ml) prepared at different solvents. Normal means distilled water. 1st extracts prepared at 80°C include five samples extracted with 90% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH, 30% EtOH and 0% EtOH, respectively. Five 2nd extracts obtained at 80°C are 90% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C, 70% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C, 50% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C, 30% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C, 0% EtOH-H<sub>2</sub>O, 80°C which are extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 90%, 70%, 50%, 30% and 0% EtOH, respectively. Traditional means the sample extracted with H<sub>2</sub>O at 100°C. Statistical analysis were conducted by Student's t-test (n = 2). \*\*Indicate significant difference at p < 0.01 compared with control. \*\*\*Indicate significant difference at p < 0.001 compared with control.

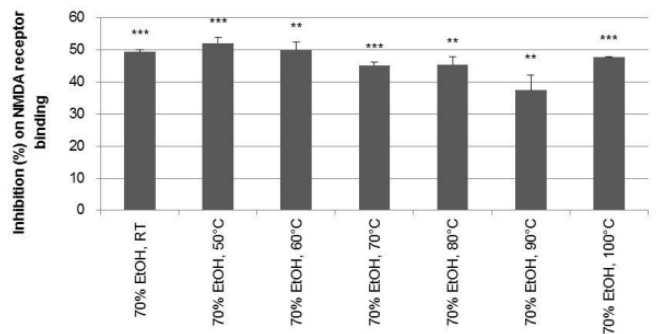
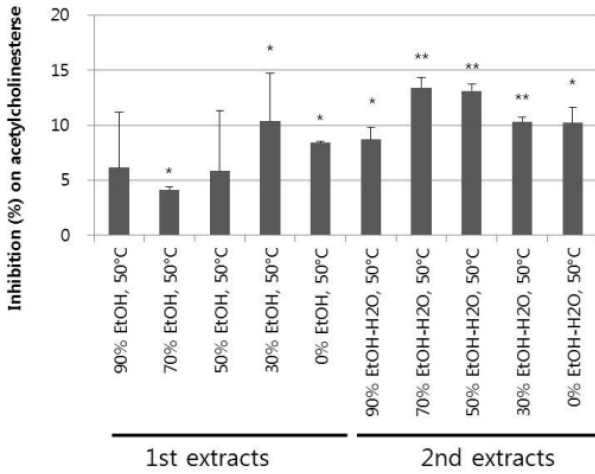


Fig. 4. Inhibition on NMDA receptor binding of ginseng extracts (50 µg/ml) prepared at different temperatures. 70% EtOH, RT means the sample extracted at room temperature, 70% EtOH, 40°C means the sample extracted at 50°C, 70% EtOH, 60°C means the sample extracted at 60°C, 70% EtOH, 70°C means the sample extracted at 70°C, 70% EtOH, 80°C means the sample extracted at 80°C, 70% EtOH-H<sub>2</sub>O, 90°C means the sample extracted at 90°C, 70% EtOH-H<sub>2</sub>O, 100°C means the sample extracted at 100°C with 70% EtOH, respectively. Statistical analysis were conducted by Student's t-test (n = 2). Significant differences with normal were designated as \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001.

6. 저온에서 조제된 인삼 추출물의 acetylcholinesterase 저해능 분석 결과

전뇌의 콜린성 신경세포는 뇌에서 다른 신경전달물질을 조절하는 중요한 역할을 하는 데 (Giacobini, 2003), 알츠하이머 병에서는 인지 및 행동기능에 관여하며 전뇌의 콜린성 신경세포



**Fig. 5. Suppressive effect on acetylcholinesterase of ginseng extracts 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  prepared with different solvents at 50°C.** 1st extracts prepared at 50°C includes five samples extracted with 90% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH, 30% EtOH and 0% EtOH, respectively. Five 2nd extracts obtained at 50°C include 90% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C, 70% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C, 50% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C, 30% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C, 0% EtOH-H<sub>2</sub>O, 50°C which are extracted with H<sub>2</sub>O after extraction with 90%, 70%, 50%, 30% and 0% EtOH, respectively. Statistical analysis were conducted by Student's *t*-test (*n* = 2). Significant differences with normal were designated as \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001.

포의 손실과 아세틸콜린의 감소가 보고되어 있고 (Perry *et al.*, 1978), 뇌의 아세틸콜린 활성은 콜린에스테라제에 의해 가수분해되어 종결되므로 이들 효소에 대한 저해물질의 개발 필요하다 (Greig *et al.*, 2005).

이와 관련하여 본 연구에서 조제한 각 인삼 추출물을 인지능과 관련된 지표물질인 아세틸콜린에스테라제에 대한 저해활성을 분석한 결과, Fig. 5에 나타낸 바와 같이 최종농도 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 조건에서 4.1 ± 0.2 - 13.4 ± 0.9%의 아세틸콜린에스테라제 저해활성을 나타내는 것으로 확인되어 인삼 추출물들이 대체적으로 아세틸콜린에스테라제에 대해 저해효과가 높지 않았으나, 70% EtOH 추출 후의 H<sub>2</sub>O 추출물과 50% EtOH 추출 후의 H<sub>2</sub>O 추출물은 각각 13.4 ± 0.9% 및 13.1 ± 0.6%의 유의한 저해활성을 보여 다른 인삼 추출물들에 비해 비교적 우수한 효과를 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 한편, 저온에서 추출된 인삼 추출물들의 진세노사이드 함량을 분석한 Table 3의 결과를 살펴보면 아세틸콜린에스테라제 저해활성이 우수하였던 70% EtOH 추출 후의 H<sub>2</sub>O 추출물과 50% EtOH 추출 후의 H<sub>2</sub>O 추출물은 다른 추출물들에 비해 mg당 total ginsenoside 함량, Rb1 + Rg1 함량 및 PD/PT에서도 낮은 수치를 보였으며, 개별 ginsenoside 함량에서도 매우 낮은 수치를 보인 것을 알 수 있었다. 따라서, 이들 두 가지 저온 추출물이 아세틸콜린에스테라제 저해효과를 보인 것은 본 연구에서 분석된 진세노사이드 외의 다른 성분에 기인할 것으로 사료되었다.

이상의 실험결과를 종합할 때, 인삼 (백삼)으로 부터 인지능 개선 효과 상승을 기대할 수 있는 추출물의 제조 조건으로는 NMDA 수용체에 대한 저해능이 우수한 60°C이하의 저온에서, 총 진세노사이드 함량과 Rb1 + Rg1 함량이 높은 EtOH을 사용한 1차 추출물과 아세틸콜린에스테라제 저해능에서 우수한 활성을 보여준 70% 또는 50% EtOH 추출물 잔사에서 추출한 2차 (H<sub>2</sub>O) 추출물을 혼합하여 사용하는 방법이 적절할 것으로 사료되었으며, 이러한 조합은 알츠하이머 질환치료를 위해 NMDA 수용체 저해물질과 아세틸콜린에스테라제 저해물질을 조합하는 최근의 경향 (Lopes *et al.*, 2013)을 고려하여도 타당한 것으로 사료되었다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 시험연구사업(사업번호: PJ00983501)의 연구비 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

Chen HSV, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE and Lipton SA. (1992). Open-channel block of *N*-methyl-*D*-aspartate(NMDA) responses by memantine: Therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*. 12:4427-4436.

Choi CS, Kim KI, Hong HD, Choi SY, Lee YC, Kim KT, Rho JH, Kim SS and Kim YC. (2006). Phenolic acid composition and antioxidative activity of white ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Journal of Ginseng Research*. 30:22-30.

Giacobini E. (2003). Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 18:S1-S5.

Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu QS, Mamczarz J, Hollyoway HW, Giordano T, Chen D, Furukawa K, Sambamurti K, Brossi A and Lahiri DK. (2005). Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:17213-17218.

Hyun MS, Hur JM, Shin YS, Song BJ, Mun YJ and Woo WH. (2009). Comparison study of white ginseng, red ginseng, and fermented red ginseng on the protective effect of LPS-induced inflammation in RAW 264.7 *Journal of Applied Biological Chemistry*. 52:21-27.

Jeon BH, Seong GS, Chun SG, Sung JH and Chang CC. (2005). Antioxidative effects of white ginseng and red ginseng on liver of high fat diet-treated mice. *Journal of Ginseng Research*. 29:138-144.

Jung NP, Song SO and Choi SU. (2000). Cytotoxicity of white and red ginseng against cancer cells and their effects on the cell cycle. *Journal of Ginseng Research*. 24:183-187.

Kennedy DO, Scholey AB and Wesnes KA. (2002). Modulation of cognition and mood following administration of single doses of *Ginkgo biloba*, ginseng, and a ginkgo/ginseng combination

- to healthy young adults. *Physiology and Behavior*. 75:739-751.
- Kim DH, Xu YH, Kim YC, Bang KH, Kim JU, Cha SW, He ZM, He Y, Jang IB and Zhang LX.** (2015a). Clinical study on food safety evaluation of *Panax ginseng*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:185-189.
- Kim S, Ahn K, Oh TH, Nah SY and Rhim H.** (2002). Inhibitory effect of ginsenosides on NMDA receptor-mediated signals in rat hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 296:247-254.
- Kim SM, Jeon YJ, Sim HJ and Lee YE.** (2015b). Protective effect of fresh ginseng Kkakdugi against LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *Journal of the Korean Society of Food Culture*. 30:197-205.
- Kim US, Koh HK and Kang SK.** (1989). Study of the effects of different products of ginseng radix aqua-acupuncture on the alloxan-induced diabetic rats. *The Acupuncture*. 6:1-13.
- Kim YC, Kim SR, Markelonis GJ and Oh TH.** (1998). Ginsenoside Rb1 and Rg3 protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *Journal of Neuroscience Research*. 53:426-432.
- Kim YO.** (2007). Effects of ginseng radix on the ischemia-induced 4-vessel occlusion and cognitive impairments in the rat. *Journal of Ginseng Research*. 31:44-50.
- Lee E, Kim S, Chung KC, Choo MK, Kim DH, Nam G and Rhim H.** (2006). 20(S)-ginsenoside Rh2, a newly identified active ingredient of ginseng, inhibits NMDA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *European Journal of Pharmacology*. 536:69-77.
- Lee MR, Sun BS, Gu LJ, Wang CY, Mo EK, Yang SA, Ly SY and Sung CK.** (2008). Effect of white ginseng and red ginseng extract on learning performance and acetylcholinesterase activity inhibition. *Journal of Ginseng Research*. 32:341-346.
- Lee SE, Shim IS, Kim GS, Yim SV, Park HJ, Shim HS, Ye MS and Kim SY.** (2011). The neuroprotective effect of white ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) on the trimethyltin(TMT)-induced memory deficit rats. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:456-463.
- Lim JH, Wen TC, Matsuda S, Tanaka J, Maeda N, Peng H, Aburaya J, Ishihara K and Sakanaka M.** (1997). Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb1, a main ingredient of ginseng root. *Neuroscience Research*. 28:191-200.
- Lopes JP, Tarozzo G, Reggiani A, Piomelli D and Cavalli A.** (2013). Galantamine potentiates the neuroprotective effect of memantine against NMDA-induced excitotoxicity. *Brain and Behavior*. 3:67-74.
- Mook-Jung I, Hong HS, Boo JH, Lee KH, Yun SH, Cheong MY, Joo I, Huh K and Jung MW.** (2001). Ginsenoside Rb1 and Rg1 improve spatial learning and increase hippocampal synaptophysin level in mice. *Journal of Neuroscience Research*. 63:509-515.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G and Tomlinson BE.** (1978). Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 4:273-277.
- Radad K, Gille G, Moldzio R, Saito H and Rausch WD.** (2004). Ginsenosides Rb<sub>1</sub> and Rg<sub>1</sub> effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate. *Brain Research*. 1021:41-53.
- Reay JL, Scholey AB and Kennedy DO.** (2010). *Panax ginseng* (G115) improves aspects of working memory performance and subjective ratings of calmness in healthy young adults. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 25:462-471.
- Seong GS, Chun SG and Chang CC.** (2005). Hepatoprotective effects of white and red ginseng extracts on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Journal of Ginseng Research*. 29:131-137.
- Shin JY, Choi EH and Wee JJ.** (2001). The difference of ginsenoside compositions according to the conditions of extraction and fractionation of crude ginseng saponins. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 33:282-287.
- Sung JH, Choi DH, Kim DH, Chun BG and Choi SH.** (2004). White ginseng saponin upregulated the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and NO in primary cultures of mixed glial cells. *Journal of Ginseng Research*. 28:120-126.