

## 반응표면분석법을 사용한 가속 용매 추출에 의한 홍삼 지표성분의 추출 최적화

김은옥 · 서구량 · 엄병헌

한국과학기술연구원 강릉분원 천연물융합연구센터

### Optimization of Extraction of Marker Compounds from Red Ginsengs by Accelerated Solvent Extraction Using Response Surface Methodology

Eun Ok Kim, Jiu Liang Xu, and Byung Hun Um

Functional Food Center, Korea Institute of Science and Technology (KIST) Gangneung Institute

**ABSTRACT** A new method based on accelerated solvent extraction (ASE) combined with response surface methodology (RSM) has been developed for optimization of the extraction of ginsenoside [Rb1, Rg1, and Rg3(20S)], total phenolics, and benzopyrene in red ginseng. The RSM method, based on a five level and two variable central composite design, was employed to obtain the optimal combination of extraction conditions. In brief, ginsenosides Rb1, Rg1, and Rg3(20S) and total phenolics with undetectable benzopyrene were optimally extracted with 50% ethanol as an extraction solvent, extraction temperature of 158°C, extraction time of 20 min, extraction pressure of 2,500 psi, flush volume of 60%, and one extraction cycle. The contents of ginsenosides and total phenolics in red ginseng extracted by ASE under optimum conditions were significantly higher than those extracted by sonication and reflux extraction.

**Key words:** accelerated solvent extraction, response surface methodology, red ginseng, marker compounds, optimization

## 서 론

반응표면분석법(response surface methodology, RSM)은 Box와 Wilson(1)이 1951년 처음 소개한 방법으로 종속 변수에 대하여 각 독립 변수의 영향이 어느 정도인가를 등고 분석으로 확인할 수 있도록 고안한 것으로, 최소의 실험횟수로부터 최대의 정보를 얻을 수 있는 실험계획법과 실험계획법에 의해 얻어진 실험 자료를 분석하여 반응(종속) 변수에 영향을 주는 유의한 요인 효과들을 찾고 최적화하는 데 사용된다. RSM을 식품에 이용한 연구로는 메밀 새싹의 총페놀,  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성능 및 acetylcholine esterase 저해 활성능 등을 종속 변수로 하여 추출 조건을 최적화하였고(2), 새우 껍질로부터 astaxanthin 최적 추출 조건의 예측치를 추정하였으며(3), 차가버섯의 초음파 추출에 의한 총페놀, 총플라보노이드 및 갈색도에 대해 최적 추출 조건을 예측하였다(4).

추출은 천연물로부터 많은 생리활성성분을 분리 정제하는 데 있어 필수적인 첫 단계이며, 식품산업에서 추출방법은 초음파추출법, 환류냉각추출법, 스팀증류법 등의 일반적인 방법과 최근 실용화되고 있는 초임계유체추출방법이 새로

운 추출기술로 이용되어 왔다(5). 그러나 전자들은 추출효율이 낮고 에너지 소비가 많으며, 후자는 높은 경비가 요구되는 등 단점을 지니고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위한 추출방법으로서 최근 마이크로웨이브 에너지를 이용한 파프리카의 색소 추출(6), 라즈베리로부터 항산화 성분 추출(7) 및 인삼 사포닌 추출(8) 등이 연구 보고되고 있으며, 가속 용매 추출기를 이용한 사상자의 기능성분 추출(9), 오미자로부터 리그난의 추출(10), 클로렐라로부터 카로티노이드 및 클로로필 색소 추출(11) 등을 포함한 많은 연구가 보고되어 있다. 이들 중 가속 용매 추출(accelerated solvent extraction, pressurized liquid extraction)은 온도와 압력을 조절하여 발생한 고온고압의 증기를 식품에 공급하여 생리활성물질을 다량 생산할 수 있는 조건으로 식품을 열처리할 수 있다. 현재까지 식품에 대한 고온고압 처리에 관한 연구는 감초(12), 마늘(13) 및 배(14) 등의 시료를 고온고압 처리할 경우 폴리페놀과 플라보노이드 성분의 함량 및 항산화 활성이 증가한다는 보고가 있으며, 표고버섯(15), 옥수수(16), 감귤 껍질(17) 등을 열처리할 경우 폴리페놀 함량 및 총 항산화 활성이 증가한다고 보고하였고, 인삼(18) 및 홍삼(19) 또한 고온고압 처리로 syringic acid, ferulic acid, cinnamic acid와 같은 페놀산의 증가와 진세노사이드 조성 및 함량에 변화를 보인 것으로 보고하였다.

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오가과(두릅나무과: Araliaceae)에 속하는 다년생 초목으로 수 천 년 동안 인간이 사용하고 있는 대표적인 약용식물로서 세계적으로

Received 5 April 2016; Accepted 13 June 2016

Corresponding author: Byung Hun Um, Functional Food Center, Korea Institute of Science and Technology (KIST) Gangneung Institute, Gangneung, Gangwon 25451, Korea  
E-mail: albertum@kist.re.kr, Phone: +82-33-650-3601

자연 건강식품으로 각광받고 있으며, 약리 효능이 과학적으로 입증됨에 따라 한방뿐만 아니라 현대의학에서도 의약품, 기능성 식품 및 화장품 등에 광범위하게 사용되고 있다(20). 인삼은 가공방법에 따라 백삼, 태극삼, 홍삼 등 3종류로 분류된다. 백삼은 수삼을 익히지 아니하고 말린 것을 말하며, 태극삼은 수삼을 물로 익혀서 말린 것을 말하고, 홍삼은 수삼을 수증기 또는 기타 방법으로 찌서 익혀 건조한 것을 말한다(18). 위와 같이 건조인삼은 사용이 간편하도록 물이나 알코올과 같은 용매로 추출한 백삼 추출물이나 홍삼 추출물 등으로 가공되어 유통되고 있다. 이들의 제조과정과 공법 즉 건조, 증숙 및 추출방법의 차이에 따라 색도, 일반성분, 폴리페놀, 플라보노이드 및 진세노사이드의 조성 및 함량이 크게 달라진다고 보고되어 있다(21-23). 현재까지 보고된 인삼의 효능으로는 간 기능 활성화, 혈당 강하, 신경기능 조절, 체액과 신진대사기능 조절, 강심, 항이노 및 성기능 증강 효과, 항고혈압성, 동맥경화 예방, 스트레스에 대한 저항력 증가, 염증 억제, 항산화, 체내 면역기능 활성화 및 항암 효과 등으로 매우 다양한 효능이 보고되어 있다(24-26). 이러한 인삼의 효능을 나타내는 약리활성 물질로는 진세노사이드, 다당류, 펩타이드, 폴리아세틸렌, 정유 성분 및 지방산 등이 알려져 있으며, 가장 주목을 받고 있는 성분이 바로 인삼 사포닌인 진세노사이드이다. 고온고압 처리에 의해 인삼의 사포닌 성분인 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc 및 Rd는 약효가 훨씬 강한 것으로 알려진 홍삼의 특이성분인 Rg3, Rg5 및 Rk1 등으로 전환되며, 이외에도 Rk2, Rk3 및 Rg6 등 상대적으로 극성이 작은 사포닌 성분들로 전환된다고 보고되어 있으나(27,28), 가속 용매 추출기를 이용하여 인삼 및 홍삼의 유효성분을 분석한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 기능성 홍삼제품의 지표성분인 진세노사이드 함량을 최대로 하면서 벤조피렌의 생성을 최소로 하는 새로운 가공기술을 개발하기 위해 RSM을 사용하여 추출용매, 압력, 온도, 추출시간을 조절하여 가속 용매 추출한 후 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합, 총폴리페놀 및 벤조피렌 함량을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용한 홍삼은 강화농협에서 6년근으로 구입한 인삼을 수세한 후 가정용 홍삼제조기(Hongsambonga HK-10000, Jinhongtech, Goyang, Korea)로 98°C 조건에서 18시간 증숙한 다음 60°C 건조기(WFO-400, Eyela, Tokyo, Japan)에서 48시간 동안 건조하였으며, 건삼은 수세한 인삼의 껍질을 벗겨내지 않고 그대로 건조기에서 위와 동일한 조건으로 건조하였다. 건조된 시료는 가위로 0.5 cm 이하로 자른 후 850 mm 체(#20, Chunggyesanggongsa, Seoul, Korea)에 통과시킨 다음 냉동 보관하면서 실험에 이용하였다.

### 인삼 가속 용매 추출물의 제조

인삼 가속 용매 추출은 11 mL 스테인리스 스틸 추출 셀과 60 mL collection vial이 장착된 ASE 200 accelerated solvent extractor(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 인삼 5 g으로 압력(1,000 및 2,000 psi)과 온도(50, 100, 150°C)를 달리하여 증류수로 실시하였으며, 추출액은 여과지(Whatman No. 2, Whatman, Maidstone, UK)로 여과 후 증류수 20 mL로 정용하여 제조하였다. 한편 홍삼의 초음파 추출은 ultrasonicator(RK 158s, BANDELIN, Berlin, Germany)를 사용하여 시료 5 g에 70% 에탄올 수용액 50 mL를 첨가한 후 2시간 동안 2회 반복 추출한 다음 여과지로 여과한 후 진공농축기(rotary vacuum evaporator, Eyela)로 농축하여 얻어진 추출물을 70% 에탄올 수용액 20 mL에 용해하여 추출액을 제조하였다.

### 초음파, 환류냉각 및 가속 용매 추출물의 제조

식품산업에서 추출방법은 일반적으로 초음파추출법, 환류냉각추출법 및 스팀증류법 등이 사용되며(5), 본 연구에서는 가장 많이 사용되고 있는 초음파 및 환류냉각 추출법과 가속 용매 추출법에 의한 홍삼의 지표 진세노사이드 성분 및 추출 효율성을 비교하기 위해 다음과 같이 추출하였다. 초음파 및 환류냉각 추출은 Kwon 등(8)과 Yang 등(18)의 방법을 약간 변형하여 ultrasonicator 및 환류냉각장치를 각각 사용하여 홍삼 5 g에 진세노사이드 추출의 일반적인 용매인 70% 에탄올 수용액 50 mL를 첨가한 후 2시간 동안 2회 반복 추출한 다음 Whatman No. 2 여과지로 여과한 후 진공농축기로 농축하여 얻어진 각각의 추출물을 70% 에탄올 수용액 20 mL에 용해하여 추출액을 제조하였다. 한편 가속 용매 추출은 11 mL 스테인리스 스틸 추출 셀과 60 mL collection vial이 장착된 Dionex ASE 200 accelerated solvent extractor를 사용하여 홍삼 5 g으로 실시하였으며, 추출액은 여과지로 여과 후 50% 에탄올 수용액 20 mL로 정용하여 제조하였다.

### 홍삼 지표성분의 추출 최적화를 위한 실험설계

본 실험에서는 홍삼으로부터 지표성분 진세노사이드의 추출조건에 대하여 중심합성계획(central composite design, CCD)을 사용하여 실험 설계하였고, 최적 추출조건은 최적화 기법으로 활용되고 있는 RSM으로 예측하였다. 독립변수의 설정을 위해 사전 실험으로 에탄올 농도(20~100%), 압력(1,000~2,500 psi), 온도(50~200°C) 및 추출시간(5~30분)을 달리하여 추출하였다. 중심합성계획에서 독립(조진)변수로 온도(40~200°C,  $X_1$ )와 추출시간(5~25분,  $X_2$ )을 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하여 중심합성계획에 따라 13구간으로 설정하여 추출하였다(Table 1). 또한, 추출물의 품질 특성에 관련된 증숙(반응)변수로는 진세노사이드 Rg1, Rb1, Rg3(20S) 함량의 합, 총 페놀성 화합물 및 벤조피렌 함량으로 하였으며, 3회 반복 측정하여 평균값을 회귀분석

**Table 1.** Central composite design with 13 runs for all possible combination of factors levels

Run No.	Coded variables		Natural variables	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Temperature (°C)	Time (min)
1	0	0	120	15
2	1	-1	160	10
3	-2	0	40	15
4	-1	-1	80	10
5	1	1	160	20
6	0	0	120	15
7	0	-2	120	5
8	0	2	120	25
9	-1	1	80	20
10	0	0	120	15
11	0	0	120	15
12	2	0	200	15
13	0	0	120	15

에 사용하였다. 실험계획 및 통계분석은 Design Expert 7.1.3(Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) program을 이용하였다.

#### 총페놀화합물 함량 측정

총페놀화합물 함량은 Singleton 등(29)의 방법을 약간 변형하여 각 추출 시료 용액 80 µL에 2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 20 µL를 가하여 실온에서 5분간 반응시킨 후, 반응용액에 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 100 µL를 첨가하여 혼합한 다음 상온에서 30분 동안 정치한 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하고 총페놀화합물 함량을 계산하였다.

#### 진세노사이드 함량 측정

진세노사이드 함량은 앞서 얻어진 인삼 및 홍삼 에탄올 추출물을 0.45 µm PVDF syringe filter(Whatman)를 통과

시킨 다음 G1322A Degasser, G1312A Bin pump, G1329A Autosampler, G1316A detector가 장착된 Agilent Technologies 1200 series system의 분석용 HPLC(1200 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 진세노사이드를 분리 및 정량하였다. 이때 분석조건으로 칼럼은 Kinetex C18 column(4.6×150 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), 검출기는 UV(203 nm), 이동상은 아세토니트릴(A)과 증류수(B)를 0~10분, 20% A; 10~40분, 40% A; 40~50분, 55% A; 50~70분, 100% A의 조건으로 linear gradient 하였으며, 유량은 1.0 mL/min으로 하고 시료주입량은 10 µL로 하였다. 홍삼 사포닌류의 정량 분석을 위한 표준액은 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2(20R), Rg2(20S), Rg3(20R), Rg3(20S), F4, Rk1, Rk3, Rh4, Rg5 및 Rg6의 17종 표준품(Ambo Institute, Daejeon, Korea)을 메탄올로 녹인 후 25~200 µg/mL 농도 범위로 희석하여 HPLC 3회 분석하였으며, 얻어진 각각의 진세노사이드에 대한 표준품 농도와 피크 면적에 대해 검량곡선을 작성하였다. 이때 크로마토그래피 조건에서의 검출 한계(limits of detection, LOD) 및 정량 한계(limits of quantification, LOQ)는 signal-to-noise ratio(S/N) 각각 3과 10에서 측정하였다. 그 결과 각 진세노사이드의 검량선의 함수와 상관계수 R<sup>2</sup> 값, LOD 및 LOQ는 Table 2에 제시하였다.

#### 벤조피렌 함량 측정

벤조피렌 함량은 Hu 등(30)의 방법에 따라 홍삼 가속 용매 에탄올 추출물 중 10 mL를 취해 헥산 10 mL로 분획한 후 헥산층을 감압 농축하여 메탄올로 용해한 다음 0.45 µm PVDF syringe filter를 통과시킨 후 HPLC(1200 series, Agilent Technologies)로 정량하였다. 이때 분석조건으로 칼럼은 Kinetex C18 column(4.6×150 mm, Phenome-

**Table 2.** Regression data, LOD, and LOQ of the three ginsenosides

Ginsenoside	Regression equation <sup>1)</sup>	Correlation coefficient (r <sup>2</sup> )	LOD <sup>2)</sup> (µg/mL)	LOQ <sup>3)</sup> (µg/mL)
Rg1	y=6.0852x+37.817	0.9977	0.77	2.34
Re	y=4.2407x - 6.3222	1.0	12.26	37.14
Rf	y=4.4138x+3.618	1.0	1.96	5.93
Rg2(20S)	y=5.2741x - 66.641	1.0	0.42	1.26
Rg2(20R)	y=5.0321x - 5.3223	0.9998	0.49	1.48
Rb1	y=3.3708x+14.61	0.9990	1.25	3.80
Rc	y=5.425x - 4.73	0.9987	0.37	1.11
Rb2	y=3.4423x - 2.5341	1.0	0.79	2.40
Rd	y=4.4514x - 31.133	1.0	1.49	4.52
Rg6	y=26.977x+15.478	1.0	0.26	0.79
F4	y=27.023x+44.922	1.0	0.64	1.95
Rk3	y=28.365x - 9.6667	0.9989	0.13	0.39
Rh4	y=30.513x - 23.067	0.9988	0.13	0.41
Rg3(20S)	y=3.9433x+26.256	1.0	0.62	1.88
Rg3(20R)	y=7.5505x - 9.4192	0.9998	0.64	1.93
Rk1	y=20.15x - 6.8838	0.9972	0.20	0.62
Rg5	y=19.968x+7.59	0.9968	0.10	0.31

<sup>1)</sup>y=peak area and x=concentration (µg/mL). <sup>2)</sup>Limit of detection (S/N=3). <sup>3)</sup>Limit of quantification (S/N=10).

nex), 검출기는 UV(280 nm), 이동상은 80% 아세트니트릴을 사용하여 isocratic 조건으로 분석하였으며, 유량은 1.0 mL/min으로 하고 시료주입량은 10 µL로 하였다. 분석 결과 머무름 시간에 의해 정성 확인을 하였으며 피크 면적법으로 정량하였다.

**통계처리**

모든 실험 결과들은 3회 반복 측정하여 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 처리별 평균치 간의 유의성 검정은 SPSS 14.0(Statistical Package for Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software를 이용하여 분산분석을 시행하였다. 평균 간 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 시료 간의 유의차를 검정하였다( $P < 0.05$ ).

**결과 및 고찰**

**인삼 가속 용매 추출에 따른 진세노사이드 성분 및 함량 변화**

가속 용매 추출에 의한 인삼의 진세노사이드 함량에 미치는 영향을 확인하기 위해 압력(1,000 및 2,000 psi)과 온도(50, 100, 150°C)를 달리하여 물로 고온고압 추출하여 그 함량을 비교한 결과는 Table 3과 같다. 인삼의 진세노사이드 화합물은 Re, Rg1, Rf, Rb1 및 Rc가 주를 이루었고, 진세노사이드 각 화합물의 함량은 압력 증가에 따라 전체적으로 증가하거나 유사한 함량을 나타내었으며, 온도에 따라서는 50°C에서 100°C로 높아짐에 따라 모든 진세노사이드의 함량이 유의적으로 증가하였고 총진세노사이드 함량은 약 1.8 배 증가하였다. 한편 150°C로 추출 시 1,000 및 2,000 psi 압력하에서 Rg1 및 Re의 함량은 100°C 추출 시에 비해 절반 정도 줄었고 Rb1 및 Rf는 각각 2배 및 1.4배 정도 함량이 높아졌으며, Rg2(20S), Rg2(20R), Rg3(20S), Rg3(20R), Rk1 및 Rg5 등의 화합물이 새로 생성되었다. 즉 추출조건별 인삼의 진세노사이드 함량은 추출압력과 추출온도의 영향을 모두 받았으며, 특히 150°C 추출에서 진세노사이드 조성이 다양하고 함량이 높은 것으로 나타났다. 인삼은 추출조건에 따라 진세노사이드 조성에 따른 함량에 차이가 있음이 보고되어 있지만 대부분 Rg1, Rb1, Rb2, Rd 및 Re를 주로 함유하고 있다고 보고되어 있다(5,18). 150°C 추출에서 Re의 감소와 Rg2(20S)와 Rg2(20R)의 생성은 Re가 가열에 의해 가수분해되면서 Rg2(20S) 및 Rg2(20R)로 전환된 것으로 판단된다(31,32). 한편 홍삼의 특이성분인 Rg3(20S), Rg3(20R), Rk1 및 Rg5의 생성은 Rb1, Rb2 및 Rc 등의 열 가수분해 및 탈수에 의해 전환되는 것으로 알려져 있으나(31), 본 연구에서는 Rb1의 함량은 증가하고 Rb2는 검출되지 않았으며 Rc 함량은 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 이는 인삼으로 홍삼 제조 시 진세노사이드 Rb1, Rb2 및 Rc 함량은 증가하고 Rg3(20S), Rg3(20R), Rk1 및 Rg5는 생성

**Table 3.** Changes of ginsenoside content in white ginseng by ASE at different pressures and temperatures condition

Extraction method	Pres. (psi)	Temp. (°C)	Ginsenoside (mg/100 g, dry weight)																	
			Rg1	Re	Rf	Rg2 (20S)	Rg2 (20R)	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg6	F4	Rk3	Rh4	Rg3 (20S)	Rg3 (20R)	Rk1	Rg5	Total
ASE	1,000	50	16.35 <sup>b</sup>	30.95 <sup>b</sup>	5.83 <sup>c</sup>	ND <sup>1)</sup>	ND	5.4 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	58.53 <sup>e</sup>
		100	22.19 <sup>a</sup>	44.00 <sup>a</sup>	8.24 <sup>b</sup>	ND	ND	10.00 <sup>c</sup>	2.40 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	86.83 <sup>d</sup>
		150	13.16 <sup>c</sup>	20.92 <sup>c</sup>	11.87 <sup>a</sup>	26.23 <sup>b</sup>	6.75 <sup>b</sup>	20.32 <sup>b</sup>	2.42 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.25 <sup>c</sup>	0.56 <sup>c</sup>	0.81 <sup>c</sup>	106.29 <sup>bc</sup>
ASE	2,000	50	16.90 <sup>b</sup>	28.39 <sup>b</sup>	5.21 <sup>c</sup>	ND	ND	2.62 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53.12 <sup>e</sup>
		100	25.12 <sup>a</sup>	44.85 <sup>a</sup>	8.50 <sup>b</sup>	3.60 <sup>d</sup>	1.82 <sup>c</sup>	10.02 <sup>c</sup>	2.74 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	96.66 <sup>c</sup>
		150	12.16 <sup>c</sup>	27.17 <sup>b</sup>	11.53 <sup>a</sup>	20.71 <sup>c</sup>	7.02 <sup>b</sup>	19.78 <sup>b</sup>	2.38 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.1 <sup>b</sup>	8.83 <sup>b</sup>	2.51 <sup>b</sup>	120.28 <sup>b</sup>
Somication	Red ginseng		1.92 <sup>d</sup>	2.93 <sup>d</sup>	9.94 <sup>ab</sup>	39.98 <sup>a</sup>	10.06 <sup>a</sup>	44.26 <sup>a</sup>	10.49 <sup>a</sup>	9.80	9.08	3.15	1.24	4.13	6.57	29.55 <sup>a</sup>	15.21 <sup>a</sup>	13.18 <sup>a</sup>	12.47 <sup>a</sup>	223.96 <sup>a</sup>

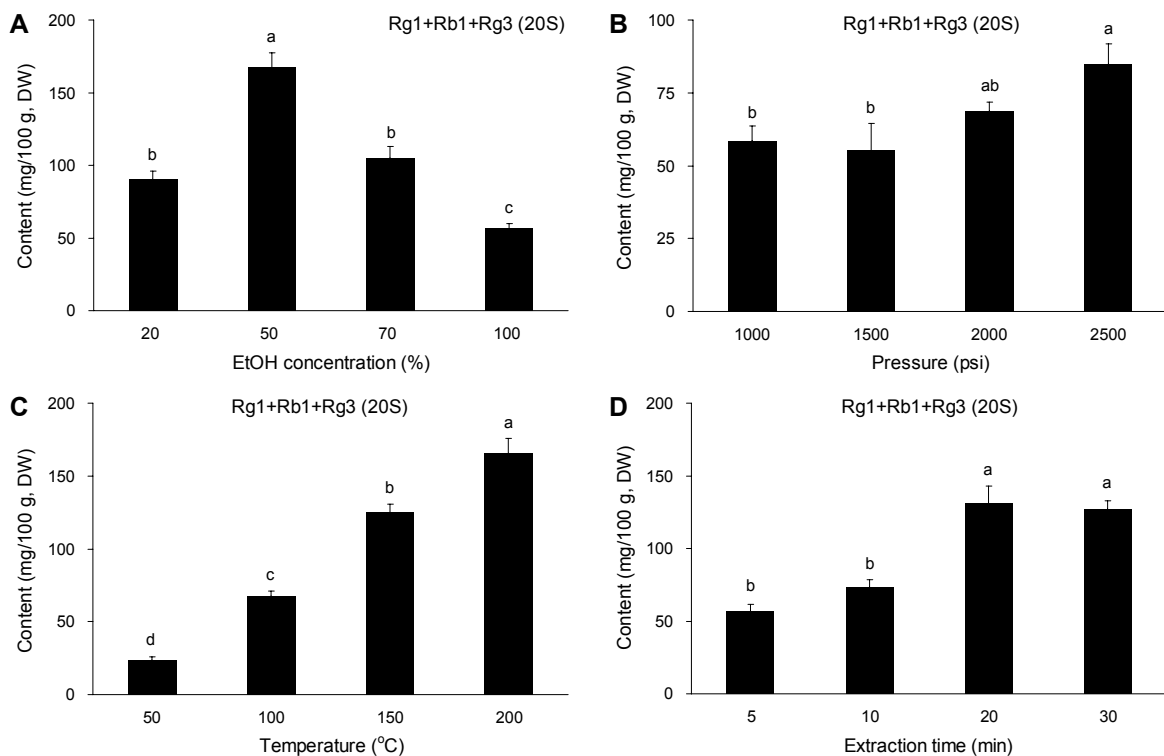
Data are mean of triplicate determinations.  
 Values with the different letters (a-e) in each column are significantly different at  $P < 0.05$ .  
 1) Not detected.

되는데, Rb1, Rb2 및 Rc 함량은 절대적인 감소가 아닌 진세노사이드의 구조변환에 의한 상대적인 감소가 일어나므로 실제로는 증가하거나 변화가 없는 것으로 보인다(21). 인삼 가속 용매 추출에서 진세노사이드 Rg2(20S), Rg2(20R), Rg3(20S), Rg3(20R), Rk1 및 Rg5 등의 생성은 인삼을 홍삼으로 가공했을 때의 효과이기는 하나 홍삼 70% 에탄올 수용액으로의 추출 시 함량(Table 3)과 비교하였을 때 낮은 함량을 나타내었기에 추출 최적화를 위한 원료로 홍삼을 선택하였다.

### 홍삼 가속 용매 추출에 의한 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합의 변화

2012년 식품의약품안전청의 건강기능식품 기준 및 규격에 따르면 홍삼 건강기능제품류의 기능성분(또는 지표성분)의 함량을 'Rb1, Rg1 및 Rg3(20S)의 합으로서 2.5~34 mg/g'으로 제정하였다. 따라서 홍삼의 기능성분 강화를 위한 가속 용매 추출 최적화를 위해 먼저 에탄올 농도, 압력, 온도 및 추출시간에 따른 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S)의 함량 합을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 에탄올 농도별(20, 50, 70 및 100%)로 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S)의 함량 합은 56.27~167.11 mg/100 g으로 측정되었으며, 50% 에탄올로 추출 시 가장 높은 진세노사이드

Rb1, Rg1 및 Rg3(20S)의 함량 합을 나타내었다. 압력(1,000~2,500 psi)과 온도(50~200°C)는 높아짐에 따라 그 함량이 높아지는 경향을 보였으며, 특히 200°C로 높아질수록 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합은 유의적으로 크게 높아졌다. Nho(33)의 연구 결과에 따르면 고온고압 추출 시 추출 용매의 에탄올 농도에 따라 물보다는 에탄올(25~75%)을 첨가하여 열처리할 경우 총진세노사이드 함량이 증가하는 경향을 보였다. 고온고압 처리장치를 사용하여 110, 120, 130, 140 및 150°C로 열처리 물 추출하여 진세노사이드 함량을 분석한 결과 온도 증가에 따라 진세노사이드 Rb1은 110°C, 2시간 처리까지는 함량이 증가하고 그 이후 온도부터는 함량이 감소하였으며, Rg3의 함량은 140°C, 3시간까지 점차 증가하였다 그 이후에 감소하는 경향을 보인 Yang 등(18)과 Nho(33)의 연구 결과와는 다소 차이가 있는 것으로 나타났는데, 이는 추출압력, 추출용매 및 추출시간을 포함한 추출 방법적인 차이에 따라 다른 경향이 나타난 것으로 생각한다. 한편 Fig. 1D에서 추출시간에 따라 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S)의 함량 합이 증가하여 20분에 최고로 높았으며 30분에 낮아지는 경향이나 유의적인 차이는 없었다. 따라서 진세노사이드 추출에 가장 최적의 용매를 50% 에탄올로 하고, 진세노사이드 함량에 미치는 영향이 작았으며 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S)의 함량 합이 최고



**Fig. 1.** Influence of selected factors including ethanol concentration (A), pressure (B), temperature (C), and extraction time (D) on the ASE extraction of sum of ginsenoside Rb1, Rg1, and Rg3(20S) content in red ginseng. Condition: to determine one of the parameters including ethanol concentration, pressure, temperature, and extraction time, the others were set at the system default value (ethanol concentration, 70%; pressure, 1,500 psi; temperature, 100°C; and extraction time, 10 min). Flush volume, 60%. Data are mean±SD of triplicate determinations. Values with the different letters above bars are significantly different at  $P < 0.05$ .

**Table 4.** Values of 3 responses for the ASE experiment with 13 runs

Run No.	Responses (mg/100 g, dry weight)		
	Ginsenoside Rb1+Rg1+Rg3(20S)	Total phenolics	Benzopyrene <sup>1)</sup>
1	95.46±2.46	206.45±8.48	ND <sup>2)</sup>
2	120.62±8.75	363.23±12.55	ND
3	30.54±3.01	36.78±2.52	ND
4	43.78±2.38	37.61±3.74	ND
5	146.28±10.55	448.22±16.24	ND
6	92.50±7.34	232.08±6.55	ND
7	40.84±1.62	64.18±3.17	ND
8	103.94±6.75	249.54±12.06	ND
9	89.07±5.43	98.37±4.40	ND
10	103.10±5.28	230.48±8.36	ND
11	89.53±7.90	235.61±10.57	ND
12	90.54±7.32	510.34±13.70	7.8
13	91.02±4.03	232.36±4.13	ND

Data are mean±SD of triplicate determinations.

<sup>1)</sup> µg/100 g, dry weight.

<sup>2)</sup> Not detected.

치를 나타냈던 압력을 2,500 psi로 설정하였으며, 추출온도와 추출시간을 독립변수로 설정하였다.

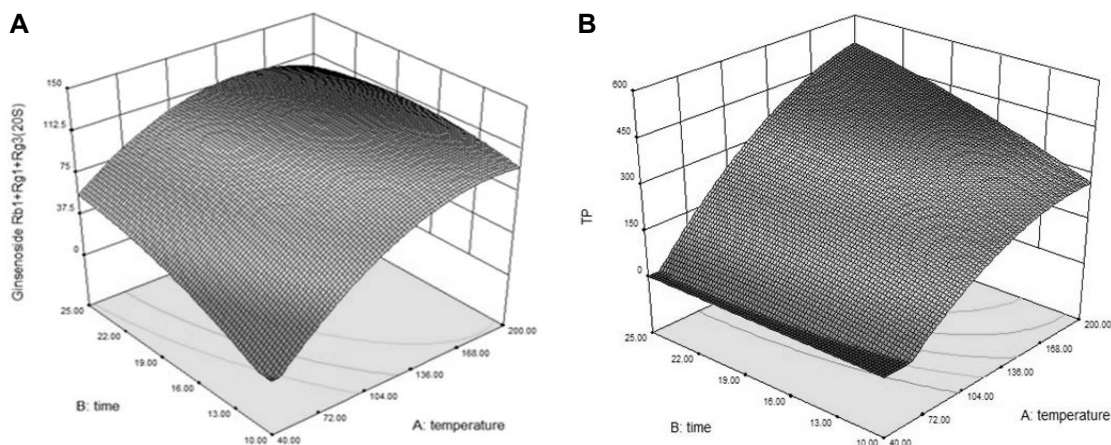
**홍삼 고온고압 추출 조건의 최적화**

추출 온도 및 시간을 가속 용매 추출조건으로 하여 홍삼의 추출조건 최적화를 위해 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량의 합, 총 페놀성 화합물 및 벤조피렌 함량을 측정 한 결과를 Table 4에 나타내었고, 본 모델의 벨리데이션을 위해 Fig. 2와 같이 반응표면 그래프를 그려 최적추출조건을 예측하였다. 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합의 범위는 30.54~146.28 mg/100 g, 총페놀화합물은 36.78~510.34 mg/100 g의 범위를 나타내어 온도가 모든 반응 변수에서의 추출 효율에 대해 뚜렷한 효과를 나타내었으며, 추출시간의 증가에 따라서도 약하게 증가하였다. 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합에 대한 최적의

추출 온도 및 시간은 158.42°C, 20.7분으로 나타났으며, 총 페놀화합물 함량은 200°C, 25분으로 나타났지만 벤조피렌은 200°C, 15분에서만 검출되었다. 식품 중 벤조피렌은 주로 음식을 조리, 가공할 때 식품의 주성분인 탄수화물, 단백질, 지방 등이 400~1,000°C 온도에서 불완전 연소 시 열분해 되어 생성되는 것으로 알려져 있는데(30,34), 2,500 psi 압력, 200°C, 15분 처리로 추출 시 생성되는 것을 알 수 있었다. 따라서 벤조피렌이 검출되지 않는 조건에서 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S)의 함량 합을 최대로 하는 최적화된 추출온도 및 추출시간은 158°C, 20분임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과와 유사하게 Yoon 등(35)은 가열처리에 따른 인삼의 이화학적 성분에 관한 연구에서 가열온도 및 가열시간이 증가할수록 가용성 고형분 함량은 감소하고 조사포닌 함량은 160°C에서 20분간 가열처리 할 때까지 증가하지만 가열온도와 가열시간을 더 증가시키면 오히려 감소하는 경향을 나타낸다고 보고하였다. 한편 추출온도의 증가에 따른 폴리페놀 함량의 증가는 bound형의 폴리페놀이 첨가용매 농도와 열처리에 의해 free형으로 전환되고, 고분자의 페놀성 화합물이 저분자의 페놀성 화합물로 전환되어 폴리페놀 함량이 증가한 것으로 생각한다(15,36).

**추출방법에 따른 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합, 총폴리페놀 및 벤조피렌 함량 비교**

가속 용매 추출에 의한 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S)의 함량 합이 최적화된 조건에서와 초음파(sonicator) 및 환류냉각(reflux)의 일반적인 추출조건에서의 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합, 총폴리페놀 및 벤조피렌 함량을 비교한 결과는 Table 5와 같다. 가장 일반적인 추출방법인 초음파 및 환류냉각 추출 시 70% 에탄올 수용액으로 2시간의 추출시간과 시료량의 10배에 해당하는 50 mL의 용매량이 필요하지만 가속 용매 추출의 경우에는 50% 에탄올 수용액으로 20분의 추출시간과 14 mL의 추출용매량이 필요하므로 용매 중 에탄올의 사용량이 적고 적은 양의



**Fig. 2.** Response surface plot of ASE extraction showing the effects of the temperature and extraction time on sum of ginsenoside Rb1, Rg1, and Rg3(20S) content (A) and total phenolics (B).

**Table 5.** Comparison of sonication, reflux, and ASE method for the extraction of ginsenoside Rb1, Rg1, and Rg3(20S), total phenolics, and benzopyrene in red ginseng

Extraction method	EtOH concentration (%)	Extraction time (min)	Temperature (°C)	Solvent volume (mL)	Rb1+Rg1+Rg3(20S) (mg/100 g, DW) <sup>1)</sup>	Total phenolics (mg/100 g, DW)	Benzopyrene
Sonication	70	120	25	50	75.73±2.54 <sup>c</sup>	89.09±4.20 <sup>c</sup>	ND <sup>2)</sup>
Reflux	70	120	80	50	94.35±6.43 <sup>b</sup>	203.41±5.57 <sup>b</sup>	ND
ASE	50	20	158	14	146.24±8.84 <sup>a</sup>	452.68±9.45 <sup>a</sup>	ND

Data are mean±SD of triplicate determinations.

Values with the different letters (a-c) in each column are significantly different at  $P<0.05$ .

<sup>1)</sup>Dry weight. <sup>2)</sup>Not detected.

용매로 훨씬 단시간에 추출할 수 있는 특징이 있다. 초음파 추출의 경우 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합 및 총폴리페놀 함량이 각각 75.73 mg/100 g 및 89.09 mg/100 g이었으며, 환류냉각 추출의 경우에는 초음파 추출 시의 함량보다 높은 94.35 mg/100 g 및 203.41 mg/100 g이었다. 반면 가속 용매 추출의 경우 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합 및 총폴리페놀 함량이 초음파 추출보다 각각 2배(146.24 mg/100 g), 5배(452.68 mg/100 g) 높음을 알 수 있었다. 따라서 가속 용매 추출을 이용해 적은 용매로 단시간 추출하면서 유해성분을 생성하지 않는 조건에서 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합을 최대 로 추출할 수 있는 최적조건임을 확인할 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 KIST 기관고유사업(과제번호 2z04690)의 지원을 받아 수행되었음.

### 요 약

본 연구에서는 기능성 홍삼 엑기스 제조를 위해 추출용매, 압력, 온도, 추출시간을 조절하여 가속 용매 추출한 후 기능성 홍삼제품의 지표성분인 진세노사이드 함량, 총페놀화합물 및 벤조피렌 함량 등을 조사하였다. 홍삼 가속 용매 추출 최적화를 위한 독립변수 선택을 위해 에탄올 농도, 압력, 온도 및 추출시간에 따른 기능성 홍삼제품의 지표성분인 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량의 합을 분석하여 진세노사이드 추출에 가장 최적의 용매를 50% 에탄올로 하고, 영향이 다소 작았던 요인인 압력을 2,500 psi로 설정하였으며, 온도와 추출시간을 독립변수로 설정하였다. 추출 온도 및 시간을 독립변수로 하여 고온고압 처리한 홍삼의 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량의 합, 총 페놀성 화합물 및 벤조피렌 함량을 측정 한 결과, 벤조피렌이 검출되지 않는 조건에서 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S)의 함량 합이 최적화된 조건은 158°C, 20분임을 확인할 수 있었다. 최적화된 조건에서의 가속 용매 추출 시 초음파 및 환류냉각 추출에 비해 적은 용매로 단시간 추출하면서 진세노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3(20S) 함량 합 및 총폴리페놀 함량이 각각

1.5~2배 및 2.2~5배 높게 추출할 수 있어 효율적인 추출방법이 될 것으로 생각된다.

### REFERENCES

- Box GEP, Wilson KB. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *J Roy Statist Soc* 13: 1-45.
- Park KJ, Lim JH, Kim BK, Jeong JW, Kim JC, Lee MH, Cho YS, Jung H. 2009. Optimization of extraction conditions to obtain functional components from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprouts, using response surface methodology. *Korean J Food Preserv* 16: 734-741.
- Yoon CH, Bok HS, Choi DK, Row KH. 2012. Optimization condition of astaxanthin extract from shrimp waste using response surface methodology. *Korean Chem Eng Res* 50: 545-550.
- Kim DY, Teng H, Choi YH. 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process for *Inonotus obliquus* using response surface methodology. *Curr Res Agric Life Sci* 30: 68-75.
- Lee HS, Lee HJ, Yu HJ, Ju DW, Kim Y, Kim CT, Kim CJ, Cho YJ, Kim N, Choi SY, Suh HJ. 2011. A comparison between high hydrostatic pressure extraction and heat extraction of ginsenosides from ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer). *J Sci Food Agric* 91: 1466-1473.
- Csiktsunádi Kiss GA, Forgács E, Cserhádi T, Mota T, Morais H, Ramos A. 2000. Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum* L.) powders. *J Chromatogr A* 889: 41-49.
- Teng H, Lee WY, Choi YH. 2013. Optimization of microwave-assisted extraction for anthocyanins, polyphenols, and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology. *J Sep Sci* 36: 3107-3114.
- Kwon JH, Bélanger JM, Paré JR. 2003. Optimization of microwave-assisted extraction (MAP) for ginseng components by response surface methodology. *J Agric Food Chem* 51: 1807-1810.
- Gao F, Hu Y, Ye X, Li J, Chen Z, Fan G. 2013. Optimal extraction and fingerprint analysis of *Cnidii fructus* by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatographic analysis with photodiode array and mass spectrometry detections. *Food Chem* 141: 1962-1971.
- Zhao LC, He Y, Deng X, Yang GL, Li W, Liang J, Tang QL. 2012. Response surface modeling and optimization of accelerated solvent extraction of four lignans from *Fructus Schisandrae*. *Molecules* 17: 3618-3629.
- Cha KH, Lee HJ, Koo SY, Song DG, Lee DU, Pan CH. 2010. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J Agric*

- Food Chem* 58: 793-797.
12. Woo KS, Jang KI, Kim KY, Lee HB, Jeong HS. 2006. Antioxidative activity of heat treated licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) extracts. *Korean J Food Sci Technol* 38: 355-360.
  13. Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2006. Physicochemical characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. *Korean J Food Sci Technol* 38: 331-336.
  14. Hwang IG, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Yang MH, Jeong HS. 2006. Change of physicochemical characteristics of Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) juice with heat treatment conditions. *Korean J Food Sci Technol* 38: 342-347.
  15. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387.
  16. Dewanto V, Wu X, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
  17. Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, Lee SC. 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J Agric Food Chem* 52: 3389-3393.
  18. Yang SJ, Woo KS, Yoo JS, Kang TS, Noh YH, Lee J, Jeong HS. 2006. Change of Korean ginseng components with high temperature and pressure treatment. *Korean J Food Sci Technol* 38: 521-525.
  19. Jung KH, Hong HD, Cho CW, Lee MY, Choi UK, Kim YC. 2012. Phenolic acid composition and antioxidative activity of red ginseng prepared by high temperature and high pressure process. *Korean J Food & Nutr* 25: 827-832.
  20. Park CK, Jeon BS, Yang JW. 2003. The chemical components of Korean ginseng. *Food Industry and Nutrition* 8(2): 10-23.
  21. Nam KY. 2005. The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs processed ginsengs (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J Ginseng Res* 29: 1-18.
  22. Shoji J. 1999. Studies on the constituents of ginseng. *Nat Med* 53: 55-59.
  23. Choi JE, Nam KY, Li X, Kim BY, Cho HS, Hwang KB. 2010. Changes of chemical compositions and ginsenoside contents of different root parts of ginsengs with processing method. *Korean J Med Crop Sci* 18: 118-125.
  24. Kim JS, Kim KW, Choi KJ, Kwak YK, Im KS, Lee KH, Chung HY. 1996. Screening of antioxidative components from red ginseng saponin. *Korean J Ginseng Sci* 20: 173-178.
  25. Kim MJ, Jung NP. 1987. The effect of ginseng saponin on the mouse immune system. *Korean J Ginseng Sci* 11: 130-135.
  26. Ha TY, Lee JH, Han JH. 1987. Inhibitory effects of *Panax ginseng* on tumorigenesis in mice. *J Cheonbuk Medical Sci* 11: 1-11.
  27. Park JH. 2004. Sun ginseng - A new processed ginseng with fortified activity. *Food Industry and Nutrition* 9(1): 23-27.
  28. Park IH, Kim NY, Han SB, Kim JM, Kwon SW, Kim HJ, Park MK, Park JH. 2002. Three new dammarane glycosides from heat processed ginseng. *Arch Pharm Res* 25: 428-432.
  29. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
  30. Hu S, Jin S, Choi D. 2008. Analysis of benzo(a)pyrene in red ginseng beverage. *J Fd Hyg Safety* 23: 26-30.
  31. Kim EO, Cha KH, Lee EH, Kim SM, Choi SW, Pan CH, Um BH. 2014. Bioavailability of ginsenosides from white and red ginsengs in the simulated digestion model. *J Agric Food Chem* 62: 10055-10063.
  32. Kong H, Wang M, Venema K, Maathuis A, van der Heijden R, van der Greef J, Xu G, Hankemeier T. 2009. Bioconversion of red ginseng saponins in the gastro-intestinal tract *in vitro* model studied by high-performance liquid chromatography-high resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216: 2195-2203.
  33. Nho JW. 2010. Effect of temperature and solvent on ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) saponin profiling during high temperature and pressure processing. *MS Thesis*. Chungbuk National University, Cheongju, Korea.
  34. Simko P. 2002. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and flavouring food additives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 770: 3-18.
  35. Yoon SR, Lee MH, Park JH, Lee IS, Kwon JH, Lee GD. 2005. Changes in physicochemical compounds with heating treatment of ginseng. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1572-1578.
  36. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010-3014.