

韓國人蔘의 Saponin에 關한 研究 [第一報]

Saponin fraction別 定量方法에 關하여

趙 成 桓·趙 漢 玉*·金 載 島

서울大學校 農科大學·首都女師大 食品營養學科*

(1976년 9월 20일 수리)

Saponins of Korean Ginseng *Panax ginseng* C.A. Meyer [Part I]

Determination of Saponins Fractions

Sung-Hwan Cho · Han-OK Cho* · Ze-Uook Kim

College of Agriculture, Seoul National University
Soodo Women's University*

(Received Sept. 20. 1976)

SUMMARY

In this paper, new methods for the determination of the total and the individual saponin glucosides were proposed. One of them was a colorimetric method following Two-dimensional Thin layer chromatography. And the method employing Thinchrograph TFG-10 or Densitrol DMU-33C followed the separation of the saponins by means of a preparative thin layer chromatography. In accordance with the density of the chromatogram of each saponin, Thinchrogram or Densitogram of the individual saponin fraction was plotted and determined.

緒 論

人蔘에 對한 많은 研究의 結果로 saponin成分이 그 效能의 主體로 밝혀지고 있다.

人蔘의 主有効成分으로 알려진 saponin을 中心으로 그 研究過程을 더듬어보면 다음과 같다.

即 1854年 Garriques¹⁾가 Canada產人蔘 *Panax quinquefolium*의 뿌리로 부터 panaquilon이란 saponin을 分離·報告하였고 1906~1920년에 日本의 朝比奈²⁾ 및 近藤³⁾는 人蔘에서 saponin과 prosapogenin을 分離하였다.

1930년에 小竹⁴⁾는 saponin을 강한 鹽酸으로 加水分解하여 鹽素를 含有하는 saponin을 얻었다.

이 以後에는 saponin의 研究가 한때 中斷되었다가 1957년에 이르러 蘇聯의 Brekhman⁵⁾ 및 불가리아의 Petkov⁶⁾가 人蔘의 藥効作用을 하는 主成分이 saponin에 屬하는 dammarane系 terpen glycoside群(Panax saponin 또는 Panax glycosides)임을 밝히게 되면서 1960年頃부터 人蔘 Saponin에 對한 化學的 研究가 다시 활발하게 이루어졌다. 그리하여 1965年 柴田等⁷⁾은 高麗人蔘 *Panax ginseng* C.A.Meyer의 saponin을 thin layer chromatography(TLC)를 利用하여 만든 TL chromatogram에서 Rf值가 작은 것에서부터 큰것에 이르는 順序로 ginsenoside-Rx(x=0, a, b₁, b₂, c, d, e, (f), g₁, g₂, g₃, h)로 命名하였고 이들中, ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rc,

-Re 및 -Rg₁가 주된 saponin이고 이들은 다같이 天然에서 처음으로 分離된 dammarane系 saponin이다.

여기서 얻은 ginsenoside Rb群(Rb₁, Rb₂) 및 Rc를 酸으로 加水分解하면 panaxadiol이 생기나, 이들 saponin의 眞性 sapogenin은 protopanaxadiol이며, Re, Rf, Rg群을 加水分解하면 panaxatriol을 遊離하게 되나 그 眞性 sapogenin은 protopanaxatriol임을 報告하였고^{7,8,9)} panaxadiol과 panaxatriol은 C₁₇에 trimethyl tetrahydropyrane ring을 含有한 dammarane系 tetracyclic terpenes임을 밝혔다.¹⁰⁾

한편 이와같은 時期에 蘇聯의 Elyakov^{11,12)} 등은 saponin을 그 polarity의 크기에 따라 panaxoside A,B,C,D,E,F로 區別한 6개의 fraction으로 分離하였고 panaxosides A,B,C를 加水分解하여 genin A₁~A₆를 含有한 物質을 얻었으며, panaxoside D,E,F를 加水分解하여 genin F₁~F₆를 含有하는 類似物質을 얻었다.^{21,22,23,27,28)}

柴田等과 Elyakov等の 研究結果는 完全하게 一致하지는 않으나 ginsenoside Rg₁의 理化學的 特性이 panaxoside A와 같고, genin A₆는 panaxatriol이고, genin F₆는 panaxadiol과 同一物質임을 알게 되었다.^{7,13,14)}

그리고 藤田等¹⁵⁾도 高麗人蔘의 뿌리에서 얻은 saponin을 加水分解하여 0.1%에 해당하는 panaxadiol을 얻었고, Kim과 Staba¹⁶⁾는 Elyakov의 panaxoside 및 柴田의 ginsenoside와 혼돈되는 것을 피하기 위하여 美國人蔘에서 分離한 saponin을 panaquilin이라 하였고, 2次元 TLC를 행하며 panaquilin B,C,D,E, G-1 및 G-2를 分離하는 한편, panaquilin B와 C를 加水分解하여 panaxadiol을 얻었으며, panaquilin G-1을 加水分解하여 panaxatriol을 얻었다. 또한 panaquilin E는 panaquilins E-1, E-2, E-3의 混合物이며 panaxadiol과 panaxatriol系를 aglycone으로 하며 panaquilin D는 oleanolic acid를 aglycone으로 하는 saponin임을 gas liquid chromatography(GLC)로 立證하였고, 美國人蔘에는 ginsenosides Ra와 Rf가 缺如되어 있고, 高麗人蔘에는 panaquilin E-1과 G-2가 缺如되어 있어 美國人蔘과 高麗人蔘은 多少相異한 saponin pattern을 가지고 있다고 報告하였다.

한편, 우리나라에서도 最近 藥理學者들이 中心이 되어 人蔘의 化學成分에 관한 分析學的 研究^{24,25,26)}가 활발하게 이루어져 왔다. 卽, 禹等^{29,30)}

은 人蔘中에 含有된 dammarane glycoside를 抽出하고 TLC와 Vanillin-H₂SO₄比色法을 併用하여, 이들 抽出液에 含有된 saponin의 panaxadiol과 panaxatriol의 含量比를 研究함으로써 韓國產 및 外國產 人蔘의 成分을 比較하였고 李等²⁰⁾은 人蔘抽出液의 TL Chromatogram에서 saponin을 fraction別로 溶出하여 黃酸으로 發色시킴으로써 人蔘有効成分을 定量的으로 測定하는 方法을 提案하고 있다.

上記한 바와 같은 대부분의 연구에서는 saponin을 酸으로 加水分解하여 生成되는 panaxadiol과 panaxatriol 등의 aglycone의 組成比만으로 人蔘 및 그 加工品の 品質을 評價하는 方法을 提示하고 있으나, dammarane系 glycoside의 構造와 生理作用의 相關關係는 人蔘 saponin의 aglycone으로 評價될뿐 아니라, 同時에 結合糖의 數와 結合位置 등을 고려해서 檢討되어야 할 것이다.

따라서, 人蔘 saponin은 그 aglycone 水準에서 평가되기에 앞서, saponin自體의 fraction別定量方法이 定立되어야 된다고 생각된다. 本實驗도 이와같은 意圖下에서 비교적 正確度가 높은 saponin 定量方法을 提案할 수 있었기에 이에 報告하고자 하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 分析試料의 調製

人蔘 saponin을 定量하기 위하여 使用된 人蔘은 1975년 9월에 金浦에서 採取한 것을 다음과 같은 方法으로 調製하였다.

즉, 蔘田에서 캐낸 6年根 水蔘을 물로 洗滌하고 그 末口直徑이 2mm이하되는 細尾를 切斷·收集하고, 胴體部와 별도로 50°C에서 3日間 通風乾燥한 다음, Plant mill (Thomas-Willey laboratory mill, model-4, U.S.A)로 粉碎하여 人蔘 saponin抽出試料로 하였다.

2. 分析定量方法

(1) Saponin의 抽出

人蔘根의 saponin抽出은 柴田^{15,18,27,28)}와 Kim 등¹⁶⁾의 方法을 變形시켜 다음 Chart 1과 같은 方法으로 抽出하였다.

卽, 人蔘乾燥粉末 50g을 ethyl ether로 Fig. 1과 같은 modified Soxhlet apparatus를 利用하여 色素物質, 精油 및 脂溶性成分을 제거한 다음, 殘査를 Soxhlet apparatus에서 methyl alcohol로 5일간 연속추출하고 methanol抽出液을 濾過하여 rotary evaporator로 濃縮하여 생긴 暗褐色 methanol액기

Chart 1. Extraction and separation of saponins from *Panax ginseng*

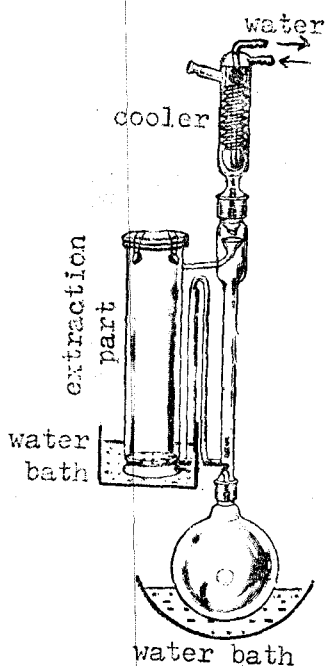
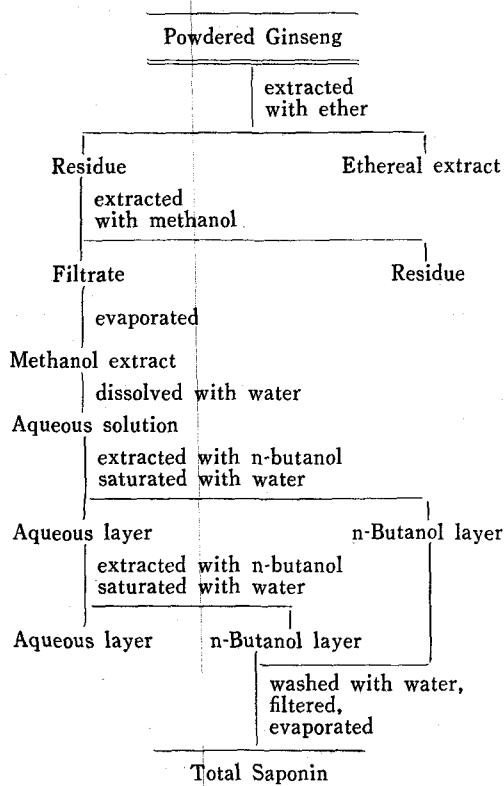


Fig. 1. A Modified Soxhlet apparatus used for continuous extraction of ginseng principles

스를 溫水로 溶解하고, 同量의 물로 포화시킨 n-butanol을 가하여, separatory funnel에서 진탕하여 n-butanol層部에 saponin을 移行시키고 다시, 水層部에 同量의 n-butanol을 가하여 진탕함으로써 saponin을 分離하는 操作을 數回 되풀이하여 水層部에서 Liebermann Buchard反應이 陰性이 될때까지 계속하였다. 이와같이 하여 얻어진 n-butanol層을 전부 합하여 물로 세척한 후, 減壓乾燥시켜 생기는 殘渣를 CaSO₄가 담긴 desiccator內에 保管하여 實驗用 saponin試料로 하였다.

(2) Thin layer chromatography에 의한 saponin fraction의 分離

TLC plate는 三角 flask에 silicagel 30g과 H₂O-MeOH混合溶液(2:1) 60ml를 넣고 parafilm으로 마개를 한후, 1분간 격렬하게 진탕한 다음, 이것을 TLC plate에 0.5mm두께로 coating하고 室溫에 30分間 放置하였다가, 120°C에서 1時間 活性化시켜 TLC展開時까지 CaSO₄를 넣은 desiccator內에 保管하였다.

이와같이 活性化시킨 TLC plate에 methanol에 녹인 10% saponin용액을 10~20λ정도 spotting하고 一定條件下에서 展開시켰다.

展開溶媒로는 1次展開時는 CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10)의 下層部(以下 solvent-B라 稱함)를 使用하여 檢體 spot에서부터 15cm거리까지 展開시키고, 2次展開用溶媒로는 CHCl₃-MeOH-H₂O(Solvent-B)와 n-BuOH-HAc-H₂O(4:1:5)의 上層部(以下 Solvent-A라 稱함)를 使用하여 展開시키되, 檢體 spot로부터 10cm거리까지 2次元으로 展開되면 plate를 chamber에서 꺼내어 室溫에서 건조한 다음, 3% CeSO₄溶液(3N H₂SO₄에 녹인 용액)을 plate에 분무하고 110°C에서 10분간 가열하여 發色시켜 暗赤色의 saponin spot가 나타난 chromatogram을 얻었다.

(3) saponin fraction의 確認

1次元TLC法으로 展開하여 發色시킨 各 saponin chromatogram의 R_f值를 測定하여 柴田의 R_f值와 比較하는 同時에, 그 TL chromatogram을 溶出·乾固시켜, Thomas Hoover capillary melting point apparatus를 使用하여, 融點을 測定하고, 柴田의 各 saponin fraction의 融點과 比較하여 Table 1. 과 같이 確認하고 同一한 TLC의 densitogram에 나타나는 各 peak를 柴田의 ginsenosides에 따라 命名하였다.^{11,16,18,21,22,23,28)}

柴田^{18,28)} 등은 solvent-A와 solvent-B를 展開溶

Table 1. Identification of saponins obtained from *Panax ginseng*

saponin fraction code	Rf value		M.P. (°C)		ginsenoside estimated
	measured	reported	measured	Panaxoside reported	
K-1	0.13	0.14	165	185-187	Rd
K-2	0.19	0.18	183	185-187	Rb ₁
K-3	0.30(0.22)	0.30(0.24)	165		Rb ₂
K-4	0.30(0.35)	0.30(0.36)	154	157-160	Rc
K-5	0.38	—	184	—	Re
K-6	0.42	0.42	180	182-185	
K-7	0.48	0.50	170	176-178	Rg ₁

Note: Solvent-B was used to isolate all the saponin fractions, and Solvent-A for the isolation of K-3 & K-4.

The numbers in the parentheses were Rf values of K-3 & K-4 as they were developed in the Solvent system A.

媒로 하여 各 溶媒系에서 saponin의 1次元 Thin layer chromatography를 行하여, Rf值의 順序에 따라, 各 saponin fraction을 ginsenoside -R₀, -R_a, -R_{b1}, -R_{b2}, -R_c, -R_d, -R_e, -R_f, -R_{g1}, -R_{g2}, -R_{g3} 및 -R_h로 命名하였으며, Solvent-A에서는 R_{b1}과 R_{b2}가 分離되지 않고, Solvent-B에서는 R_{b2}와 R_c가 重復된 1개의 spot로 나타났다.

本實驗에서도 Solvent-B에서 1次元展開시켜 同一한 Rf值를 가진 K-3와 K-4 fraction이 分離되지 않고 重復된 1개의 spot로 나타났다(Fig. 2). 그래서, 이것을 methanol로 溶出시켜 다시 solvent-A에서 1次元으로 展開하여, Rf值가 다른 2個의 saponin fraction을 分離하고, Rf值가 작은 spot를 K-3

fraction(R_{b2}), 큰 spot를 K-4 fraction(R_c)으로 設定하였다.

그리고 solvent-B에서 1次元展開하여 얻은 Table 1.의 K-1 fraction은 多量의 不純物이, 混在하여 다시 solvent-A에서 1次元展開하여, K-1 fraction 量의 4.2%정도로 비교적 작은 量의 R_d를 分離할 수가 있어서 K-1 fraction을 ginsenoside-R_d라고 比較·同定하기가 어려웠다. 따라서, 本實驗에서는 solvent-B에서 1次元으로 展開하여, R_d를 分離

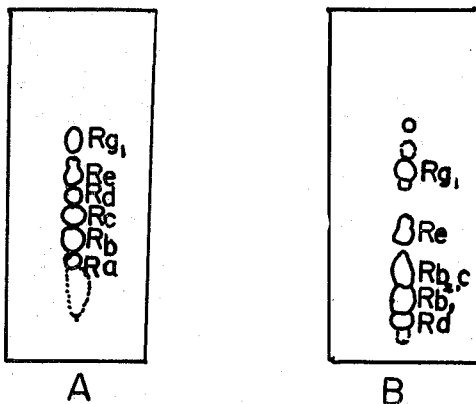


Fig. 2. One-dimensional thin-layer chromatograms of ginseng root saponins

Solvent-B: CHCl₃-MeOH-H₂O 65:35:10, lower layer.

Spray reagent: 3% CeSO₄ in 3N-H₂SO₄

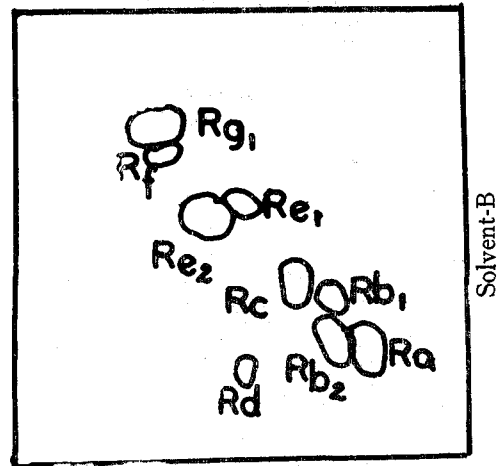


Fig. 3. Two-dimensional thin-layer chromatograms of ginseng saponins

Solvent-A: n-BuOH-HOAc-H₂O 4:1:5, upper layer

Solvent-B: CHCl₃-MeOH-H₂O 65:35:10, lower layer

10%-10λ: 10% saponin- 10 lambda application

Spray reagent: 3% CeSO₄ in 3N-H₂SO₄

하지 않고, 混合物이 多量 含有된 채로 얻어지는 K-1 fraction의 saponin 劃分比만을 算出하고 Rd는 분리·정제하지 않았다.

한편, K-6 fraction은 solvent-A의 1次元展開에서 Rd에 相當하는 fraction과 重復된 1개의 spot로 나타나나, 이것을 다시 solvent-B로 2次展開하면, Rd와 分離되어 Re에 해당하는 K-fraction과 인접하는 spot로 나타났다(Fig. 3).

Kim等¹⁰⁾도 美國人蔘 saponin을 2次元展開하여 이와같은 spot를 얻고, 각각 E-2 및 E-3라 하고 이것들은 ginsenoside-Re₂ 및 -R₃에 相當한다고 報告하였는데, 本實驗에서는 K-5와 K-6의 2개의 fraction을 모두 ginsenoside-Re로 比較·同定하였다

(4) Saponin의 定量

A. 比色法

人蔘根에서 抽出한 saponin 100mg을 1ml의 me-

thanol에 溶解하고, 그중 20 μ 를 TLC plate에 spotting하여 solvent-A와 solvent-B에서 2次元展開하고 乾燥한 다음, 물을 spray하면 saponin fraction들의 白色 spot가 分離된 형태로 나타난다. 이 部分을 表示하고, 같은 조건하에서 병행하여 분리한 다른 TLC plate에 3% CeSO₄ 溶液을 분무하고 가열·발색시켜 얻은 chromatogram들을 對照區로 하여 saponin fraction別로 그 spot자리의 silicagel을 긁어모아 각각 다른 시험관에 分取한다. 여기에 methanol 0.5ml式을 가하고 ethanol에 녹인 8% vanillin-용액 0.2ml式을 가한 다음, 氷冷水浴中에서 冷却하면서 72% H₂SO₄ 5ml式을 가하여 混合하고, 60°C의 water bath에서 10분간 加溫·發色시켜 15분동안 3,000rpm으로 遠沈分離하여 silicagel粒子를 除去한 다음에 並行實驗한 reagent blank를 對照로하여 最高吸光度를 나타내는 540m μ

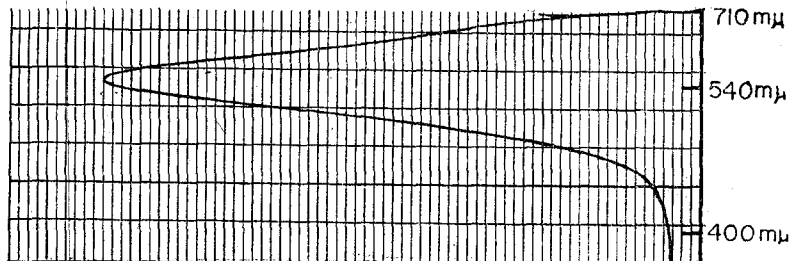


Fig. 4. Absorption spectra of ginseng saponin.

(Fig. 4)에서, 그 吸光度를 測定하였다.^{29,30)}

B. Thinchrograph에 의한 定量法

上記方法에 의하여 調製된 saponin 100mg을 10ml의 methanol에 溶解하고 그중 1 μ g를 microsyringe로 취하여, silica gel분말을 塗布한 石英棒에 spotting한 다음, solvent-B 溶媒系에서 10cm정도 展開시키고, chamber에서 꺼내어 용매를 除去하고 IATRON thinchrograph TFG-10에 장치하여 saponin의 fraction別 相對含量을 測定하였다. IATRON thinchrograph TFG-10는 水素炎 ion化檢出器(FID)를 利用해서 薄層上에 分離시킨 各 chromatogram을 직접 定量的으로 檢出하여 그 測定結果를 recorder에 기록할 수 있는 장치로서, saponin 定量時 operation condition은 다음과 같이 하였다.

Flow rate: H₂-165ml/min.

Air-2500ml/min.

Chart speed: 120mm/min

Range: 50mV

C. Densitometer에 의한 定量法

活性化시킨 TLC plate 上에 methanol에 녹인 10% saponin용액을 20 μ spotting하고 Solvent-B에서 15cm거리까지 1次元 展開하여 plate를 室溫에서 乾燥한 다음, 3% CeSO₄ 溶液을 분무하고, 110°C에서 10분간 발색시켜 나타난 saponin spot들을 digital densitrol DMU-33c(日本東洋電氣工業株式會社製)에 걸쳐 各 ginsenoside別 TL chromatogram의 濃度曲線을 記錄케 하여, 그 densitogram의 peak分劃別 saponin fraction의 含量比를 算出하였다. 이때, 測定波長은 500nm, Slit는 1.0×3 mm, O.D range는 1.5~4.0, 試料移動速度는 1/2(試料: 記錄紙=1/2: 1)이었다.

(5) Saponin의 加水分解

上記의 抽出·分離過程을 거쳐 만들어진 saponin을 ethanol에 溶解하고, 여기에 一定濃度の H₂SO₄ 10ml를 가한 다음, 直火上에서 逆流시켜 一定時間 동안 加水分解하고, 減壓·濃縮하여 ethanol을 溜去한 후, 25ml의 증류수로 희석하고 ether 50ml式으로 3회 反復抽出하여 습하고 ether층은 5% Na-

HCO₃ 30ml 및 물 30ml式으로 세척한 다음에 ether를溜去하고 얻어진 殘渣를 EtOH에 녹여 정확히 10ml가 되게 하여 이를 aglycone分析用 檢液으로 하였다.

(6) aglycones의 定量

aglycone分析用 檢液 20 μ 를 lambda pipette으로 정확히 취하여 두께 0.5mm(20 \times 5cm)의 silicagel plate에 spotting한 다음, benzene: acetone(4:1)으로 15cm展開하고 plate를 chamber에서 꺼내 室溫에서 건조한 다음, 3% CeSO₄용액을 분무하고 110°C에서 10분간 가열하여 暗褐色의 aglycone spot가 나타나게 한다. 그리고 이것을 saponin定量時와 같은 方法으로 densitometer에 걸어 saponin의 aglycone에 對한 fraction別 相對含量을 產出하였다.

結果 및 考察

1. 比色法에 의한 saponin fraction의 組成

人蔘根을 methanol로 抽出하고 처리하여 얻은 粗 saponin을 TLC plate에 spotting하고 2次元으로 전개하여 分離된 各 ginsenoside를 methanol로 溶出하여 Vanillin-H₂SO₄으로 發色시켜 比色法으로 測定한 O.D값과 이것을 saponin의 構準曲線(Fig. 5)에서 읽은 含量值를 原蔘에 對한 比率로 표시한 것은 Table 2와 같다.

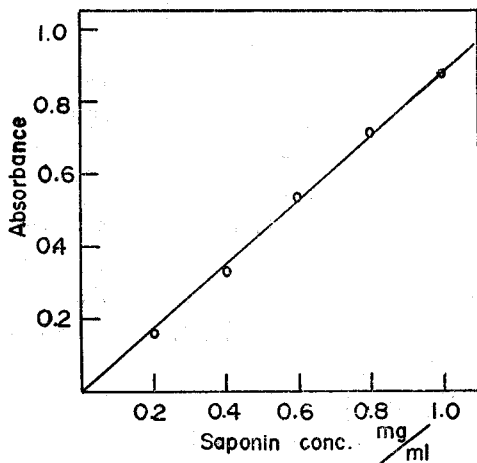


Fig. 5. Calibration curve of ginseng saponin by Vanillin-H₂SO₄ color reaction

이 結果는 柴田等^{17,19,20}이 原蔘中에 含有되어 있는 ginsenoside-Rb₂(0.47%), -Rb₂(0.21%), -Rc(0.26%), Re(0.15%), Rg₁(0.17%)라고 報告한 것과 Rb₁ 및 Rc에서 多少 다른 含量值를 나타내 보이고 있는데, 이것은 柴田等이 1次元 TLC展開

Table 2. Composition of ginsenosides in saponin isolated from Korean ginseng

ginsenoside estimated	O.D. value observed	saponin composition(%)
Rb ₁	0.425	0.23
Rb ₂	0.324	0.17
Rc	0.298	0.16
Re ₁ (Rd)*	0.238	0.13
Re ₂	0.271	0.15
Rg ₁	0.306	0.16

* Shibata designated it as Rd.

만으로 ginsenoside를 分離하여, 完全하게 saponin fraction을 分離하지 못한채, 各 fraction을 溶出하여 定量한데서 연유하는 것으로 생각된다. 즉, 柴田等도 지적한바와 같이 solvent-A에서는 Rb₁과 Rb₂가, solvent-B에서는 Rb₂와 Rc가 重複된 한개의 spot로 나타날 뿐아니라, 1次元 展開에서는 Rf值가 작은 ginsenoside -Rb₁, -Rb₂, -Rc 등의 親水性 saponin의 分離가 完全하게 이루어지지 않는다. 따라서, TLC法과 比色法을 並行하여 各 ginsenoside別 含量을 測定하기 위하여서는 saponin fraction間의 分離가 完全치 않은 1次元 展開法보다는 分離 및 溶出이 용이한 2次元 展開法이 바람직한 것으로 생각된다.

2. Thinchrograph에 의한 saponin fraction의 組成

市販品 韓國乾蔘에서 얻은 saponin을 solvent-B에서 1次元으로 展開하여 fraction別로 分離한 다음, thinchrograph에 걸어 作成한 saponin fraction別 Thinchrogram은 Fig. 6과 같다.

Fig. 6에서 thinchrograph에 의해서 作成된 各 peak의 면적은 planimeter를 使用해서 積分하여

Table 3. Fractional distribution of ginseng saponin by thinchrograph TFG-10

saponin fraction	fractional distribution(%)	ginsenoside estimated
K-1	23.4	(Rd)
K-2	17.0	Rb ₁
K-3	6.3	Rb ₂
K-4	7.1	Rc
K-5	13.7	Re ₂
K-6	8.5	Re ₁
K-7	10.2	Rg ₁

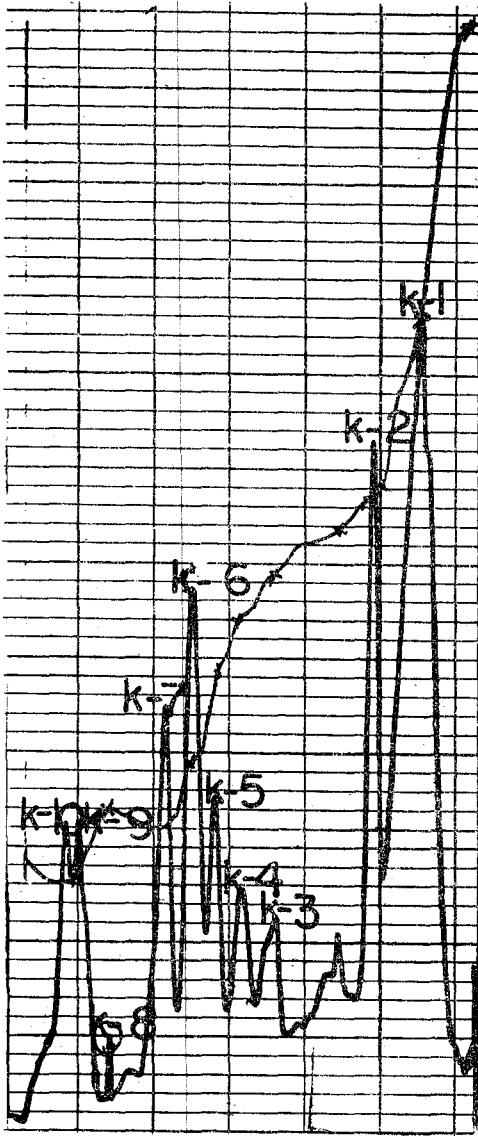


Fig. 6. Thinchromograms of saponin plotted by using IATRON Thinchromography TFG-10 saponin fraction別 濃度比를 算出한 結果는 Table 3과 같다.

上記 結果는 IATRON株式會社(日本)가 人蔘 saponin을 1次元 TLC法에 의해 各 ginsenoside를 分離하고 thinchromograph에 걸쳐 나타난 各 fraction의 peak를 柴田方法으로 同定·定量한 報告와 各 saponin fraction의 命名 및 同定方法이 다소 다르다. 즉 위의 결과에서 나타난 各 fraction중 K-1과 K-6은 각각 IATRON社 報告의 Ra₍₁₎와 Rd에 상당하다고 생각된다. 그러나 앞에서도 지적했던 바와

같이, 柴田等の 方法에 따라 1次元 TLC로 分離하여 命名한 ginsenoside-Rd는 solvent-A와 solvent-B로 2次展開시키면 Rd와 Re₁으로 分離되어 2個의 spot로 나타나며(Fig. 3). 이 두 spot는 solvent-B로 1次元 TLC를 행하여 얻은 Table 3의 K-1(Rd)과 K-6(Re₁)에 해당한다.

3. Densitometer에 의한 saponin fraction의 組成

標準 saponin fraction Re(ginsenoside-Re)를 1~13%가 되게 各各 methanol로 희석·조제한 標準溶液을 solvent-B로 1次展開하고 發色시킨 TLC plate를 digital densitometer DMU-33c에 걸쳐 얻은 densitogram(Fig. 7)의 digital data(Table 4)에 의해 作成한 標準曲線은 Fig. 8과 같다.

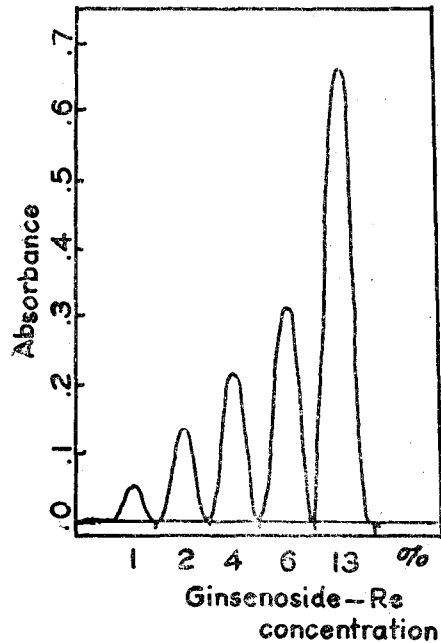


Fig. 7. & Table 4. Densitograms and digital data of ginsenoside-Re by digital densitometer DMU-33c

ginsenoside-Re conc. (%)	digital data	densitogram %
1	00132	3.8
2	00290	8.4
4	00526	15.2
6	00804	23.4
13	01700	49.2
Total	03452	100.0

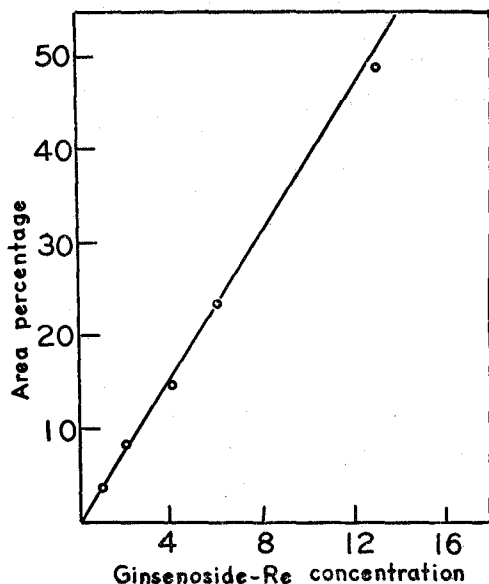


Fig. 8. Standard curve of ginsenoside-Re

尾蔘에서 抽出調製한 saponin을 Solvent-B에서 1次展開하여 發色시킨 TL chromatogram을 densitometer에 걸어 作成한 各 fraction別 densitogram은 Fig. 9와 같으며, 그 digital data에 의해 算出한 saponin fraction의 含量比는 Table 5와 같다.

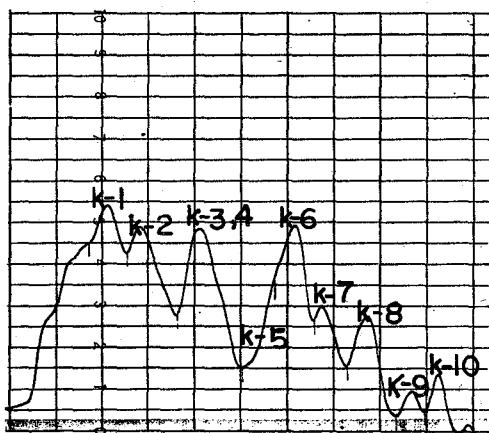


Fig. 9. Densitograms of saponin plotted by using digital densitator DMU-33c

Fig. 9의 1次展開 TL chromatogram에서 K-3 (Rb₂) 및 K-4(Rc)의 2가지 saponin이 重複된 spot는 同一한 saponin試料를 solvent-A로 展開·分離하여 이것들의 densitogram을 만들어 두 saponin의 比率를 定하여 이 比例로 原 densitogram의 劃分比를 計算한 結果는 Table 5와 같다.

Table 5. Fractional distribution of ginseng saponin by digital densitator DMU-33c

saponin fraction	fractional distribution(%)	ginsenoside estimated
K-1	20.8	(Rd)
K-2	23.7	Rb ₁
K-3	10.9	Rb ₂
K-4	14.3	Rc
K-5	10.1	Re ₂
K-6	8.8	Re ₁
K-7	5.1	Rg ₁

3. 人蔘 saponin의 aglycone

saponin을 加水分解하여 그 aglycone을 얻어내는 最適條件을 알기위한 예비실험結果는 Table 6과 같다.

Table 6. Relative yield of aglycones from saponin on various hydrolysis condition

reaction time (6hr) saponin conc. (2.0%) H ₂ SO ₄ conc. (%:w/w)	H ₂ SO ₄ conc.(5%) saponin conc.(2.0%) reaction time(hr.)	yield	yield
2.5	1	0.8	0.1
5.0	2	1.0	0.2
7.5	3	0.9	0.3
10.0	4	0.9	0.8
	5		1.0
	6		1.0
	10		1.0

Note) 1. Sulfuric acid was diluted with 50%-aqueous alcohol.

2. Relative yield of aglycones was a comparative value of measured O.D..

以上の 結果에서 saponin은 5% H₂SO₄용액으로 5시간이상 加水分解하였을 때 가장 높은 收率의 aglycone이 生成됨을 알 수 있다. 本實驗에서는 2% saponin을 5% H₂SO₄으로 6시간 加水分解하여 얻어지는 混合溶液을 人蔘 saponin의 aglycone檢液으로 하였다.

aglycone檢液을 TLC plate에 spotting하여 benzene: acetone(4:1)의 溶媒로 1次展開하고 發色시킨 chromatogram은 Fig. 10과 같다.

saponin의 aglycone檢液을 spotting하고 1次展開

結 論

Dammarane系 glycoside의 構造와 生理作用의 相關關係는 人蔘 saponin의 aglycone으로 評價될 뿐 아니라, 結合糖의 數와 結合位置等을 考慮해서 檢討되어야 할 것이다.

따라서, 從前처럼 saponin을 酸으로 加水分解하여 生成되는 panaxadiol과 panaxatriol 등의 aglycone의 組成比만으로 人蔘 및 그 加工品의 品質을 評價하기에 앞서, saponin自體의 fraction別 定量方法이 定立되어야 한다고 생각된다.

이러한 의도하에서 제안한 saponin 定量법중 2次元 TLC-比色法의 경우, 2次元展開후 TLC plate를 發色시키지 않고 물로 spray하여 그 spot의 흔적만으로 各 fraction을 同定한다는 不合理性이 있어 그점이 더욱 改善補完되어야 할 것이며, Thinchrograph를 사용하는 경우, 그 sensitivity는 비교적 좋은 편이나, 이것 또한 標品과 比較·同定하는 實驗이 並行되어야만 saponin의 fraction別 定量法으로 그 의미를 가질 것으로 기대된다.

Densitometer는 thinchrograph보다는 그 感도가 떨어지기는 하나, 多少 사용이 간편하며, 쉽게 各 fraction을 同定할 수 있어, TLC에서 chromatogram의 分離가 좋은 용매계를 선택한다면 비교적 정확도가 높은 측정치를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

摘 要

人蔘중에 함유된 dammarane glycoside들을 glycoside水準에서 fraction別로 定量하는 方法으로 2次元 TLC法에 의해 分離된 glycoside를 溶出하여 Vanillin-H₂SO₄ 發色法으로 定量하는 方法을 검토하는 동시에, 1次元 TLC法으로 saponin fraction을 分離하고 이것을 thinchrograph TFG-10 및 digital densitometer DMU-33c에 걸쳐 各 fraction別로 saponin을 定量하였다.

1. 2次元 TLC를 並用한 Vanillin-H₂SO₄ 比色法은 各 fraction의 定離는 용이하였으나, 各 spot를 同定하기가 어려웠다.

2. Thinchrograph를 이용하여 saponin을 定量하는 경우, 비교적 感도가 높은 ginsenoside의 peak를 얻을 수 있었으나, 同一한 定量條件에서 標品과의 對照實驗이 並行해야 하므로 標品の 입수가 어려워, 各 peak에 해당하는 saponin同定이 불가능하였다.

3. Densitometer의 경우 thinchrograph보다 그

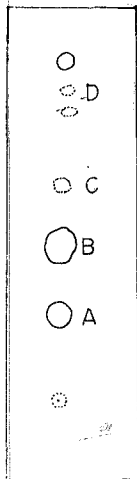


Fig. 10. Thin layer chromatograms of aglycone fractions of ginseng saponin
Solvent system: Benzene-Acetone(4:1)
Color reagent: 3% CeSO₄ in 3N H₂SO₄
A: panaxatriol B: panaxadiol
C: Oleanolic acid D: β-sitosterol

시켜 얻은 Fig. 10의 chromatogram을 densitometer에 걸쳐 aglycone fraction別 densitogram과 그 組成比를 구한 결과는 Fig. 11 및 Table 7와 같다.



Fig. 11. Densitograms of aglycone fractions of ginseng side root saponin
A: panaxatriol B: panaxadiol
C: Oleanolic acid D: β-sitosterol

Table 7. Fractional distribution of aglycones of ginseng side root saponin

sample code	aglycones	aglycone composition(%)
A	panaxatriol	21.8
B	panaxadiol	54.7
C	oleanolic acid	18.8
D	β-sitosterol	4.7

감도는 떨어지나, 사용법이 간편하고, 쉽게 각 fraction을 同定할 수 있어 TLC에서 分離가 좋은 용매를 사용한다면 비교적 정확도가 높은 정량치를 얻을 수 있을 것이다.

參 考 文 獻

1. S. Garrigues: *Ann. Chem. Pharm.*, **90**, 231 (1854).
2. 朝比奈泰彦, 田口文太: *藥誌.*, **26**, 549(1906)
3. 近藤平三郎 等: *藥誌.*, **35**, 749(1915); **38**, 747 (1918); **40**, 1027(1920)
4. 小竹無二雄: *日化*, **51**, 357(1930)
5. Brekman, I.I: *Proceeding International Pharmacological Meeting, 2nd, Prague Macmillan Co., N.Y.* **7**, 97-102, (1963)
6. Petkov, W.: *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, **236**(1), 298-9(1959)
7. Shibata, S., Tanaka, O., Soma, K., Iida, Y., Ando, T., Nakamura, H.: *Tetrahedron Lett.*, No., **3**, 207-13(1965)
8. Shibata, S., Tanaka, O., Sado, M., Tsushima, S.: *Tetrahedron Lett.*, No. **12**, 795-800(1963)
9. Tanaka, O., Nagai, M., Shibata, S.: *Tetrahedron Lett.* No. **33**, 2291-7(1964)
10. Shibata, S., Sanada, S., Kondo, N., Shoji, J., and Tanaka, O.: *Chem. Pharm. Bull.* **22** (2), 421-428(1974)
11. Elyakov, G.B.: *The 11th Pacific Science Congress (Abstracts)*, Tokyo **8**, 10(1966)
12. Elyakov, G.B.et.al.: *Tetrahedron Lett.* No. **48**, 3591(1964)
13. Iida, Y., Tanaka, O. and Shibata, S.: *Tetrahedron Lett.* No. **52**, 5449(1968)
14. Nagai, M., Tanaka, O. and Shibata, S.: *Tetrahedron* No. **27**, 881(1671)
15. Fujita, M., Itakawa, H. and Shibata, S.: *Yakugaku Zasshi*, **82**(2), 1634(1962)
16. Kim, J.Y. and E.J. Staba: *Kor. J. Pharmacog.* **4**(4), 193(1973)
17. Nagai, M. Ando, T., Tanaka, O. and Shibata, S.: *Tetrahedron Lett.* No. **37**, 3579(1967)
18. Shibata, S., Ando, T., Tanaka, O., Meguro, Y., Soma, K. and Iida, Y.: *Yakugaku Zasshi*, **85**, 753(1965)
19. Shibata, S., Ando, T., Tanaka, O.: *Chem. Pharm. Bull. (Japan)* **14**, 595(1966)
20. 李泰寧, 安承堯, 張暎洙: *研報(專賣技術研究所刊) 第16·17號* p. 89-119(1976)
21. Elyakov, G.B. and L.I. Strigina: *Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk SSSR* **5**, 126(1963) *CA* **58**: 572d.
22. Uvarova, N.I. et al: *Khim. Prir. Soedin*, **8**, 312(1970)
23. Shaposhnikova, G.I., Ferens, N.A., Uvarova, N.I. and Elyakov, G.B.: *Carbohydr. Res.* **51**, 319(1970)
24. Kim, T.B., Lee, K.B. and S.H. Han.: *Korean Minister of Science and Technology, STF* **69-10** (Seoul), 1-17(1970)
25. Han, B.H. and Han, Y.N.: *J. Pharmacog.*, **3** (4), 211(1972)
26. Paik, T.H. *Res. Work Grad. School. Han Yang Univ.*, **6**:280-9(1970)
27. Shibata, S.: *Tampaku-Shitsu, Kakusan, Kosa*, **2**(1), 32-38(1967)
28. Ando, T., Tanaka, O., and Shibata, S.: *Syoyakugaku Zasshi* **25**(1), 28-32(1971)
29. Woo, L.K., Han, B.H., Park, D.S., and Lah, W.L.: *Kor. J. Pharmacog.* **4**(4), 181(1973)
30. Woo, L.K., Han, B.H., Park, D.W., and Park, D.S.: *J. Pharm. Soc. Korea*, **17**, 129 (1973)