

# Panaxadiol 및 Panaxatriol의 比色定量法에 關한 研究

南成熙 · 兪炳武 · 金海中 · 李錫健\*  
(株) 一和 研究室, 忠南大學校 農科大學\*  
(1979년 10월 15일 접수)

## Studies on the Colorimetric Determination of Panaxadiol and Panaxatriol

by

Sung-Hee Nam, Byung-Moo You, Hai-Jung Kim and Suk-Kun Lee\*

Laboratory of Il Hwa Co., Ltd., College of Agriculture, Choong Nam National University\*

(Received October 15, 1979)

### Abstract

A simple and rapid colorimetric method for determination of panaxadiol and panaxatriol was developed.

1. After heating with 60% perchloric acid, panaxadiol and panaxatriol yielded red-purple color with absorption maximum at 540 nm and 538 nm, respectively.
2. The maximum colors of the panaxadiol and panaxatriol were reached when the algycones were treated at 60°C, 5 minutes or 70°C, 3 minutes.
3. The absorbance varied linearly with the amount of aglycone in the reaction mixture. And the colorimetric method was sensitive to about 10 $\mu$ g of aglycone in 5.5ml of the reaction mixture.
4. The color was stable for about a week at 4°C.
5.  $\beta$ -Sitosterol, oleanolic acid and cholesterol were not yielded red color by treatment with 60% perchloric acid under the conditions described.

### I. 緒 論

人蔘特有成分의 定量方法으로 지금까지 TLC 및 Vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>法<sup>(1)</sup>, GLC<sup>(2)</sup> 및 GLC-MS法<sup>(3)</sup>, HPLC法, Thinchrography에 의한 方法<sup>(4)</sup>, 방사성 동위원소에 의한 方法<sup>(5)</sup>, Vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>法<sup>(6)</sup>等 여러가지 方法이 開發되어 있으며 그 나뉠대로 모두 長短點을 가지고 있다. 그중에서 比色定量方法으로는 Vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>法이 널리 이용되고 있는것같으며 糖類의 영향을 排除하기 위하여 XAD-4와 같은 樹脂를 이용하는 等 점차 좋은 분석방법이 도입 또는 修正되고 있다. 그러나 XAD-4와같은 非極性樹脂로 糖類의 영향을 排除시킨다고 하더라도 他生藥材로부터 由來되는 glycoside 또는 그들의 aglycone들에 의한 영향은 쉽게

排除되지않기때문에 이를 해결하기 위하여 몇가지 기초실험을 하던중 종래의 Vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법에 비해 다소 簡便하고도 迅速하며 檢出限界도 그와 비슷한 정도 銳敏하고 oleanolic acid와  $\beta$ -sitosterol, cholesterol, butanol등에 의해 거의 영향을 받지않는 새로운 比色定量方法을 考案하게 되었으며 그에따른 몇가지 기초실험결과를 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗材料 :

panaxadiol과 panaxatriol 및 oleanolic acid는 Shibata등<sup>(7,8)</sup>의 抽出方法에 따라 조제된 saponin을 Sakamoto등<sup>(9)</sup>의 방법에 準하여 aglycone을 조제한 다음 column chromatography로 分離하고 panaxadiol은 ethyl acetate로<sup>(10)</sup>, panaxatriol은 benzene으로 oleanolic acid는 methanol로 各各 再結晶하여 사용하였다. 또  $\beta$ -sitosterol과 cholesterol은 E. Merck製를 사용하였다.

### 2. 實驗方法

#### (1) spectrophotometer에 의한 scanning

ethanol과 butanol의 1:1 混合液 0.5ml와 60% perchloric acid 5ml를 충분히 혼합한 후 그중 일부를 취하여 對照區로하고 ethanol과 butanol의 1:1혼합액으로 試料 一定量을 용해시킨 용액 0.5ml에 60% perchloric acid 5ml를 加하여 70°C water bath에서 3分間 發色시킨 액을 試料液으로하여 900nm에서부터 190nm까지 spectrophotometer(Varian Tectron 635)로 scanning하여 試料液의 최대흡광과장 및 흡광도를 측정하였다.

#### (2) panaxadiol과 panaxatriol의 發色最適條件檢討

panaxadiol과 panaxatriol 일정량을 취하여 ethanol과 butanol의 1:1 混合液에 용해해서 0.0025%용액을 各各 조제하고 그중 0.5ml를 시험관(10×130mm)에 취하고 60% perchloric acid 용액 5ml를 加한다음 40, 50, 60, 70, 100°C의 water bath에서 1~15分間 發色시키고 冷水로 急冷하여 540nm에서 各各의 absorbance를 측정하였으며 短時間內에 비교적低溫에서 最高의 吸光度를 나타내는 조건을 發色最適條件으로 하였다.

#### (3) panaxadiol과 panaxatriol의 standard curve作成

panaxadiol 및 panaxatriol 一定量을 ethanol과 butanol의 1:1 混合液에 溶解하여 各各 0.00315%~0.05% 용액을 조제하고 그중 0.5ml씩을 시험관에 취하여 60% perchloric acid 5ml와 혼합한뒤(15.625 $\mu$ g~250 $\mu$ g of aglycone/5.5ml of reaction volume) 70°C water bath에서 3分間 發色시킨 것을 冷水로 急冷하고 aglycone이 除外된 反應液을 對照區로하여 540nm에서 absorbance를 측정하였다.

#### (4) 呈色の 安定性檢討

panaxadiol 또는 panaxatriol 5mg을 ethanol과 butanol의 1:1混合液 20ml에 溶解시킨후 10倍量의 60% perchloric acid를 添加하여 70°C water bath에서 3分間 發色시킨다음 冷水로

急冷하고 그중 일부를 취하여 540nm에서의 吸光度를 측정하였다. 또 發色된 액을 2等分하여 一部는 4°C 前後로 조정된 냉장고에 保管하고 一部는 密栓하여 室溫에서 保管하면서 經時的으로 540nm에서의 吸光度의 變化를 觀察하였다.

### III. 結果 및 考察

#### 1. perchloric acid에 의한 panaxadiol 및 panaxatriol의 發色

panaxadiol 및 panaxatriol을 ethanol과 butanol의 1:1 混合液에 용해하여 各各 0.0025% 용액을 조제하고 그 용액 0.5ml를 시험관에 취한다음 60% perchloric acid용액 5ml를 加하여 70°C에서 3分間 처리한 용액은 지금까지 인삼 saponin 또는 sapogenin의 定量에 應用되어 온 vanillin을 사용하지 않고도 赤紫色을 나타내었으며 呈色速度도 빨라서 특히 panaxatriol의 경우에는 室溫에서도 發色될 정도로 銳敏하였다. 最大吸光度를 나타내는 波長은 Fig. 1에 나타난 바와같이 panaxadiol의 경우 540nm, panaxatriol의 경우에는 538nm였으나 대개의 發色試藥의 경우와 마찬가지로 低濃度 溶液의 경우에는 broad peak를 나타내므로써 panaxadiol과 panaxatriol의 區別이 뚜렷하지 않았다. 그러므로 panaxadiol과 panaxatriol이 低濃度로 混在해 있을 경우에는 分別定量이 困難하며 540nm에서 측정하여 panaxadiol과 panaxatriol을 合한것으로 表示하는것이 보다 妥當할것으로 판단되었다.

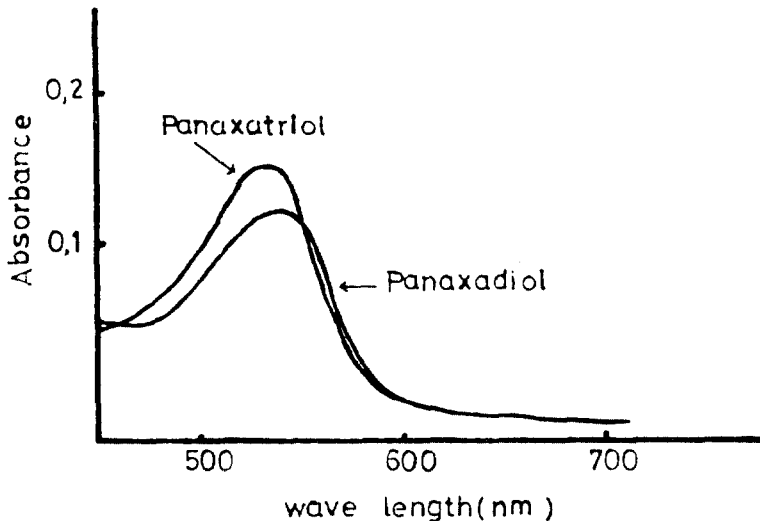


Fig. 1. Absorption spectra of panaxadiol and panaxatriol.

#### 2. panaxadiol과 panaxatriol의 發色最適條件

panaxadiol과 panaxatriol이 perchloric acid에 의하여 發色될 수 있는 最適條件을 구하기 위하여 panaxadiol과 panaxatriol의 0.0025%용액 0.5ml를 시험관에 취하고 60% perchloric acid 5ml씩을 加한다음 40, 50, 60, 70 및 100°C water bath에서 1~7分間 發色시키고 冷水로 急冷하여 540nm에서 各各의 吸光度를 측정한 결과 Fig. 2와같은 graph를 얻었다. 즉, 40°C

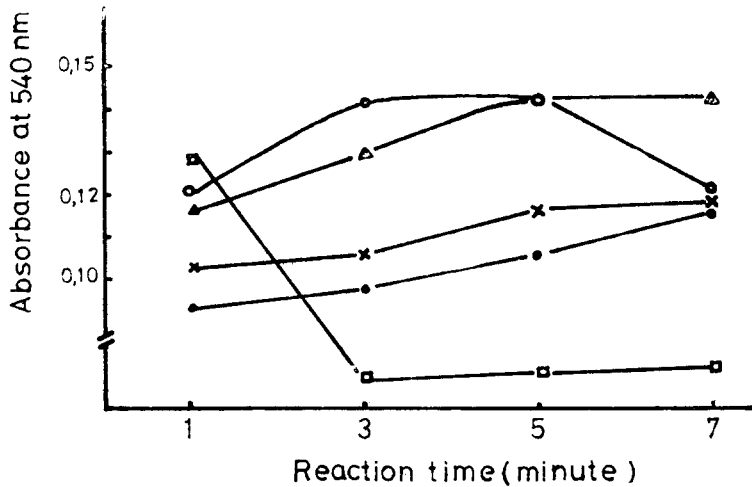


Fig. 2. Effect of reaction temperature and time on absorbance of panaxatriol  
 —●—40°C, —×—50°C, —△—60°C, —○—70°C, —□—100°C.

처리구의 경우 시간이 經過함에 따라 吸光度는 增加하였으나 그 증가속도는 극히 緩慢하였으며 50°C처리구의 경우도 40°C처리구의 경우보다 전체적으로는 다소 높은 수준의 吸光度를 나타내었으나 時間經過에 따른 吸光度의 增加속도는 40°C처리구의 경우보다 큰 차이를 나타내지 않았고 60°C 이상의 경우에는 시간이 經過함에 따라 吸光度의 增加속도가 급격하였다. 즉, 60°C처리구의 경우 5분이 지난후에 最大吸光度를 나타내었고 5분부터 12분까지는 吸光度의 차이가 나타나지 않았으나 12分以上 처리한 경우에는 吸光度가 下落하므로써 5分以上, 12分以下로 처리하는 것이 좋은 것으로 나타났다. 또 70°C處理區의 경우에는 1~3분 사이에는 急激하게 吸光度가 增加하여 3分以後에 最大吸光度를 나타내며 5분까지는 별로 變化가 없었으나 5분이 지난 이후에는 역시 시간이 경과함에 따라 점점 吸光度가 감소하므로써 70°C처리구의 경우에는 3~5分間 처리하는 것이 가장 좋은 것으로 나타났다. 100°C 처리구의 경우에는 1分以上 처리한 것은 吸光度가 급격하게 감소하므로써 100°C에서는 1分以內로 처리해야 좋은 것으로 나타났으나 water bath중에 反應液을 넣은 후 熱傳達時間이 시험관의 材質에 따라 다를 수 있고 고온에서는 溶媒가 蒸發될 염려가 많으며 100°C에서 1分이내에 처리한다는 것은 誤差가 많이 발생하여 再現性이 없기 때문에 실제로 perchloric acid에 의한 發色조건으로는 不適當한 것으로 판단되었다. 이상의 결과로 미루어볼 때 反應溫度가 높을수록 發色속도는 빠른 것으로 나타났으나 高溫에서는 溶媒가 揮發되어 濃度에 變化가 있을 것이며 또 1分以內의 單時間의 처리는 誤差가 심하며 또 가급적 낮은 온도에서 최단시간내에 최고의 흡광도를 나타내는 조건을 찾아야 할 것으로 판단되어 60°C에서 5分, 또는 70°C에서 3分처리하는 것이 가장 적당하였다. 한편 spectrophotometer의 scale인 0~3以內에서 측정이 가능할 정도의 aglycone농도는 panaxatriol로 換算하여 反應液量 5.5ml중 약 10 $\mu$ g이상 450 $\mu$ g以下였고 80 $\mu$ g前後로 조정하여 측정하는 것이 가장 좋았다.

### 3. panaxadiol 및 panaxatriol의 濃度別 呈色度의 變化

앞의 실험결과 panaxadiol과 panaxatriol은 perchloric acid에 의하여 赤紫色으로 呈色되는 것으로 나타났기때문에 panaxadiol과 panaxatriol의 濃度에 따라 呈色度의 差異가 定量的으로 나타나는가를 알아보기 위하여 0.003125~0.05% 용액을 各各조제하여 그중 0.5ml를 시험관에 취하고 60% perchloric acid 5ml를 加하여 70°C에서 3分間 처리한다음 冷水로 急冷하고 540nm에서 吸光度를 측정 한 결과 Fig. 3과 같은 직선적인 graph를 얻으므로써 panaxadiol과 panaxatriol은 perchloric acid에 의해 發色될 경우 모두 濃度에 따라 呈色程度가 定量的으로 變化되는 것으로 판단되었다. 한편 두 aglycone間的 呈色度의 差이는 panaxatriol이 panaxadiol보다 다소 빠르고 높은 편이었다.

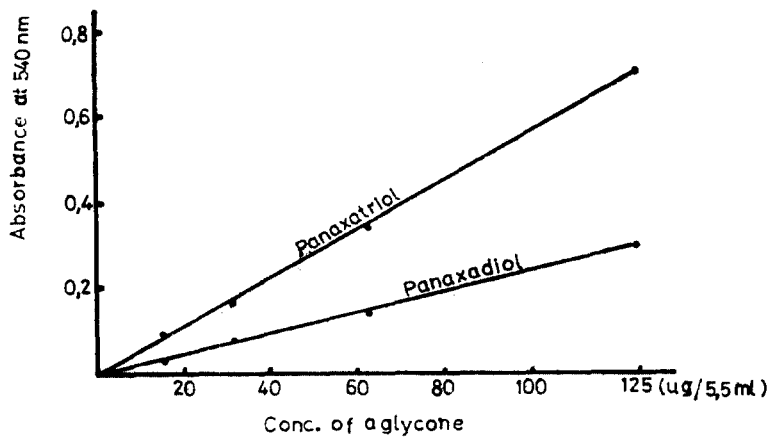


Fig. 3. Standard curve of panaxadiol and panaxatriol.

### 4. oleanolic acid, $\beta$ -sitosterol 및 cholesterol의 영향

앞의 실험결과 panaxadiol과 panaxatriol은 perchloric acid에 의하여 赤紫色을 나타내고 또 그 呈色程度가 定量的으로 變化되는 것으로 나타났으나 인삼에서 由來되는 aglycone으로 알려진 oleanolic acid와  $\beta$ -sitosterol 및 대표적인 steroid인 cholesterol에 의하여 發色에 어떠한 영향을 받을 것인가를 알아보기 위하여 oleanolic acid,  $\beta$ -sitosterol 및 cholesterol 一定量을 ethanol과 butanol의 1:1 混合液에 용해하여 perchloric acid로 처리한후 900nm에서부터 190nm까지 scanning하였으나 540nm부근에서 peak를 찾아볼수 없었으며 800nm에서부터 450nm까지를 scanning 한결과는 Fig. 4와 같았다. 즉, panaxadiol과 panaxatriol은 perchloric acid에 의하여 70°C 3分間 처리로 충분히 呈色되었고 특히 panaxatriol은 panaxadiol보다도 呈色速度가 빨라서 perchloric acid를 添加한후 室溫에서도 1~2分以內에 赤紫色을 나타내기 시작하는데에 반하여  $\beta$ -sitosterol, oleanolic acid 및 cholesterol은 40°C에서부터 100°C까지 온도를 높여가면서 1~10分間 처리하여도 肉眼으로 전혀 赤色을 찾아볼수 없었으며 spectrophotometer로도 panaxadiol과 panaxatriol의 最大吸光波長인 540nm 또는 그부근에서도 peak를 찾아볼수 없었다. 그러므로 이들 성분은 panaxadiol 및 panaxatriol과 混在해있다고 하더

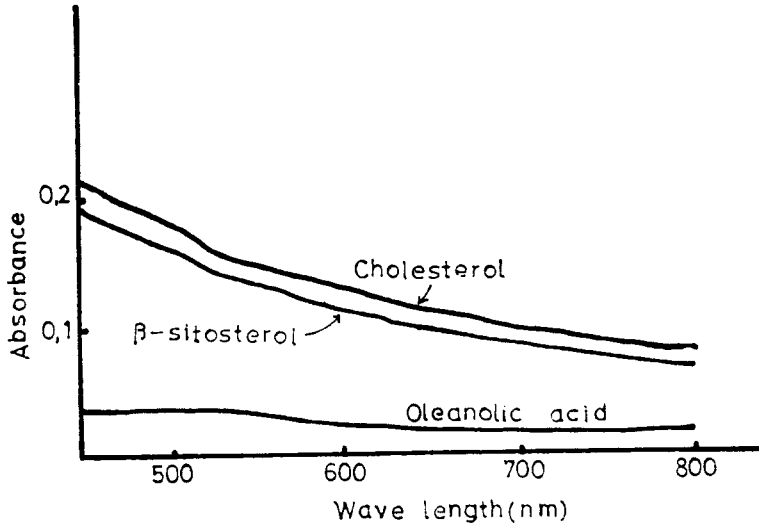


Fig. 4. Absorption spectra of oleanolic acid,  $\beta$ -sitosterol and cholesterol (250 $\mu$ g/5.5ml of reaction mixture).

라도 540nm에서 측정하는데에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 또 이러한 현상은 cholesterol이나 oleanolic acid 및  $\beta$ -sitosterol과의 混合物中에서도 panaxadiol 및 panaxatriol을 分別하여 定量할 수 있음을 시사해 주는 것으로서 아울러 vanillin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>法에서는 propanol, butanol에 의하여 綠色 또는 紫色으로 呈色되고 특히 oleanolic acid가 538nm에서 最大吸光度를 나타내는데에 반하여<sup>(6)</sup> perchloric acid를 사용하여 發色시킬 경우에는 이들 성분에 의하여 거의 영향을 받지 않음은 다행스러운 현상이라고 생각된다. 그러나 糖類나 amino酸類, phenol性物質, fatty acids等에 대한 영향은 追後로 자세히 檢討되어야 할 것이며 특히 다른 生藥材에서 由來되는 各種 saponin 및 그들의 aglycones의 영향에 대해서도 충분히 검토되어야 할 것으로 판단된다.

### 5. 呈色の 安定性

panaxadiol 및 panaxatriol을 ethanol과 butanol의 1:1 混合液에 용해시킨 후 perchloric acid로 처리하여 70°C에서 3분간 發色시킨 후 經時的으로 540nm에서의 吸光度의 變化를 觀察한 결과 室溫의 경우 4日以後에는 다소 吸光度가 감소하는 경향이 있었으나 큰 차이는 인정할 수 없었고 냉장고중에서 0~4°C로 保管할 경우 1週日까지는 吸光度의 變化가 나타나지 않았으나 自然蒸發에 의한 液量의 變化 및 濃度의 變化 등을 고려할 때 그 이상의 長期間의 保存은 呈色度의 變化가 없다고 하더라도 바람직하지 못할 것이며 실제로도 그러한 경우는 극히 드물 것으로 생각하여 1週日以上은 觀察하지 않았다. 한편 perchloric acid를 가하여 發色시킨 이후에는 色度가 强하다고 하더라도 증류수로 희석하면 不透明한 乳白色으로 退色되므로 butanol과 ethanol의 1:1 混合液으로 희석해야 하며 아울러 水分의 變化에 따라 呈色도의 變化가 예상되었고 長時間의 保存이 필요할 때에는 密栓하여 低溫에서 保存하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

## IV. 要 約

panaxadiol 및 panaxatriol의 迅速 簡便한 比色定量法에 關하여 基礎的인 資料를 얻기 위한 實驗을 遂行하여 다음과같은 結果를 얻었다.

1. panaxadiol과 panaxatriol용액을 60% perchloric acid로 처리한 결과 540nm와 538nm에서 最大吸光度를 나타내는 赤紫色을 나타내었다.
2. 發色最適條件으로는 70°C에서 3分間처리 또는 60°C에서 5分間 처리하는 것이 가장 좋았다.
3. aglycone濃度에 따라 定量的으로 發色되었고 반응액 5.5ml중 최저 약 10 $\mu$ g까지 檢出이 可能하였다.
4. 發色된 후에는 4°C의 냉장고에 保管하면 약 1週日까지도 色度가 安定하였다.
5.  $\beta$ -sitosterol, oleanolic 및 cholesterol은 panaxadiol 및 panaxatriol의 發色最適條件에서는 赤色으로 發色되지 않았다.

## 參 考 文 獻

1. Woo, L.K., Han, B.H., Baik, D.W., Park, D.S.: *J. Pharm. Soc. Korea*, **17**, 129 (1973)
2. Sakamoto, I., Morimoto, K. and Tanaka, O.: *Yakugaku Zasshi*, Japan, **85**, 753 (1965)
3. Ezio Bombardelli, A. Bonati, B. Gabetta and E.M. Martinelli: *Proceedings of the 2nd International Ginseng Symposium*, Korea Ginseng Research Institute, Seoul Korea, 29 (1978)
4. Kim, H.J. S.H. Nam, Fukura Yosiaki and S.K. Lee: *Korean J. Ginseng Sci.*, **1**(1) 79 (1976)
5. Han, B.H., L.K. Woo: Presented at 21st Annual Conv. of Pharm. Soc. Korea, D-3 (1972)
6. S. Hiai, H. Oura, Y. Odaka, T. Nakajima: *Plant Medica*, **28**, 363 (1975)
7. Fujita, M., Tokawa, H. and Shibata, S.: *Yakugaku Zasshi*, **82**, 1634 (1962)
8. 難波恒雄, 吉崎正雄, 富森毅, 小稿恭一, 三井健一郎, 長谷純一: *藥學雜誌* **94**, (1974)
9. 坂本征則, 森本義, 田中治: *藥學雜誌* **94**, 1456 (1975)
10. 金貞淵, 이. 존. 스테 바: *生藥學會誌* **4**(4) 193 (1973)