

人蔘 사포닌의 High Performance Liquid Chromatography 에 의한 分離

洪淳根 · 朴恩奎 · 李春寧* · 金明運**

高麗人蔘研究所 · 서울大學校 農科大學* · 建國大學校 農科大學**

(Received September 3, 1979)

Soon Keun Hong, Eun Kyue Park, Choon Young Lee* and Myong Un Kim**

*Korea Ginseng Research Institute, Seoul 110,
College of Agriculture, Seoul National University*, Suwon 170, and
College of Agriculture, Kunkuk University**, Seoul 133, Korea*

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Ginseng Saponins

Abstract—A high performance liquid chromatographic procedure is described for determining ginseng saponins such as ginsenoside-Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd, -Re, -Rf, -Rg1, and -Rg2. Ginseng saponins extracted with 90% methanol and water-saturated butanol were compared with pure standard ginsenosides. The resolution of the saponins was satisfactory and detection limit for each saponin was about 5 μ g. Separation of the saponins was accomplished using a μ Bondapak carbohydrate analysis column, mobile phase of acetonitrile-water-butanol (80:20:15) and differential refractive index (RI) detector. The reproducibility and the recovery were also studied. This method was applied for determining the saponin contents of several parts of leaf, fresh ginseng, white ginseng, and red ginseng.

人蔘을 科學的으로 研究하기 始作한 것은 1854年 Garrique¹⁾가 美國 人蔘에서 Panaquilon 을 抽出하여 藥理作用을 究明한데서 부터라고 할 수 있으며 그 후에도 많은 人蔘에 의해 研究發 表된 바 있으며 특히 20餘年前부터는 加速化되어 多角의인 研究가 進行되었다.

그중 Shibata²⁾ 등 Elyakov³⁾ 등과 韓⁸⁾ 등에 의해 有效成分 및 特異成分으로 알려지게 된 人蔘 사포닌의 化學的 研究는 括目할 만하며 거의 完結단계에 이르렀다.

藥理學的 研究도 Brekhan 등⁴⁾, Takagi 등⁵⁾, Oura^{6,7)} 등과 韓⁸⁾ 등에 의해 分子藥理學的 水準까지 進行되어 神秘에 쌓였던 高麗人蔘의 비밀이 하나씩 밝혀지고 있다⁸⁾.

最近 이와 때를 같이하여 生藥으로서 優秀한 人蔘 및 人蔘製品의 수요는 國內外를 莫論하고 증가추세에 있다. 이와 같은 추세를 뒷받침하기 위해서는 이들 제품의 品質을 效率的으로 管理 할 必要性이 점차 커져가고 있다. 그러므로 人蔘中의 有效 및 特異成分으로 알려진 人蔘사포닌

을 確認, 定量하여 人蔘製品的 檢査 또는 品質管理에 응용할 수 있을 것이다.

인삼 사포닌의 分析方法은 현저히 發展되어 여러 報告가 나와 있다²⁻⁹⁾. 예를 들면 定性적 確認만이 可能的인 TLC法, TLC法을 改良發展시켜서 定量까지 可能的인 TLC scanner法^{10,11)} silica gel 奉을 利用하는 thinchrograph法^{12,13)}, 色の 變化가 고려되나 총 사포닌 定量이 可能的인 바닐린-황산 比色法^{6,7,14)}, TMS 化시켜 使用하는 gas liquid chromatograph法^{15,16,17,18)}, UV labeling을 시키거나 사포닌 그대로 分析할 수 있는 high performance liquid chromatograph法^{19,20,21)}, (HPLC라 칭함) 등 最新의 機器를 利用한 分析方法이 開發되었으나 이들은 定性만이 可能하거나 定量이 된다하더라도 前處理를 하거나 分離能이 良好치 못하거나 아니면 溶媒條件을 바꿔주어야 하는 등 定量的인 面에서 볼 때 實用度가 낮은 方法들이었다. mobile phase용 매로 acetonitrile/water (80:20)만을 利用하는 것을 Butanol를 添加함으로써 分離能이 상당히 良好하며 簡便한 HPLC를 利用한 效率的인 人蔘 사포닌의 定量方法을 開發하였기에 報告하고자 한다.

實驗 方法

試料 및 試藥—水蔘은 金浦産 6年根을 찬물로 깨끗이 세척한 후 腦頭, 胴體, 脚部 및 全體로 합친 4種類로 나누어 試料로 使用하였으며 白蔘 龍仁産 6年根을 찬물로 깨끗이 세척한 후 竹刀로 表皮를 벗기고 胴體, 尾蔘 및 表皮로 나누어 日乾한 것을 試料로 使用하였으며 紅蔘은 龍仁産 6年根을 찬물에 깨끗이 세척한 후 常法에 따라 3時間동안 蒸蔘한 후 70°C에서 24時間 乾燥하고 胴體와 脚部로 나누어 日乾시킨 것을 試料로 使用하였으며 人蔘葉 및 莖은 6年生의 葉과 莖을 陰乾시킨 후 分쇄하여 試料로 하였다. 檢體를 抽出하는데 使用한 有機溶媒는 1級 試藥을 使用하였으며 HPLC용 試藥으로 使用한 부탄올은 Merck製 液體크로마토用을, 증류수는 和光製 液體크로마토用을, acetonitrile은 Mallinckrodt製 液體크로마토用을 使用하였으며 人蔘 사포닌 標準品은 日本 昭和大學으로 부터 분양받은 정제된 純品을 使用하였다.

機 器—HPLC裝置는 Waters Associate Model 244型을, column은 μ Bondapak carbohydrate analysis (4mm ϕ ×30cm)를 檢出器는 differential refratometer R401를, recorder는 Texas Instrument製 2 pen system을 使用하였다.

方 法—試料를 잘게 부수어 試料의 10倍量의 90% 메탄올로 가열환류시키며 3時間씩 3回 반복 抽出하고 이를 진공 농축시켰다. 농축 후 最少量의 물에 溶解시킨 후 에틸로 1回, CHCl₃로 1回 處理한 후에 水層을 모으고 水飽和 부탄올로 3回 抽出하고 少量의 물로 부탄올을 세척한 후 부탄올 層을 진공농축시켜 粗사포닌을 얻었다. HPLC法에 의한 標準操作—純品 사포닌 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, 및 Rg₂를 각 5mg씩을 取하여 HPLC用 메탄올 2ml에 溶解시킨 후 이를 2倍씩 4回 희석하여 標準溶液을 調製한 후 正確히 標準溶液 25 μ l를 取하여 주입하여 peak 面積과 주입量과의 關係를 求하여 檢量曲線을 작성하였다. column은 μ Bondapak carbohydrate analysis를, mobile phase 溶媒로는 acetonitrile/H₂O/BuOH (80:20:15)를 使用하였고 이때 溶媒速度는 1.5ml/min이고 檢出器는 RI 檢出器를 使用했으며 감도는 8X에서 檢出하였다.

人蔘 部位別 사포닌의 HPLC에 의한 分析—사포닌 抽出法에 따라 抽出한 各試料의 사포닌을 50mg씩 取해 메탄올 1ml에 溶解시키고 Millipore filter (pore size 0.5 μ m)를 여과한 후 25 μ l를 HPLC에 주입하였다. 面積을 계산한 후 檢量線과 比較하여 다음식에 의해 定量하였다.

$$\text{人蔘 試料中의 各 ginsenoside 의 含量(\%)} = X \times \frac{1000}{25} \times \frac{Y}{50} \times \frac{100}{A} \times 10^{-3} = \frac{2X}{25} \times \frac{Y}{A}$$

여기서 X는 檢量線에서 읽은 ginsenoside의 量(μg), Y는 粗 saponin의 量(mg), A는 人蔘 試料量(mg)이다.

結果 및 考察

Column 및 溶媒條件 選擇—사포닌은 panaxadiol 또는 panaxatriol 과 같은 aglycone 을 갖는 配糖體임은 잘 알려져 있는 사실이다. 이런 面에서 糖을 分離定量하는데 적합하도록 開發된 μ Bondapak carbohydrate analysis column 을 使用했으며 80/20의 acetonitrile/H₂O의 비율이 양호하였으나 Rf 및 Rg₂가 거의 分離가 되지 않으며 Rd와 Re도 겹쳐 나오는 短點이 發見되었다. 이들의 分離能을 좀 더 良好하게 할 目的으로 부탄올을 溶液에 混合하고 試圖하였다. 80/20/15 비율의 acetonitrile/H₂O/BuOH 混液이 가장 良好한 分離能을 보여 주었다. 따라서 本實

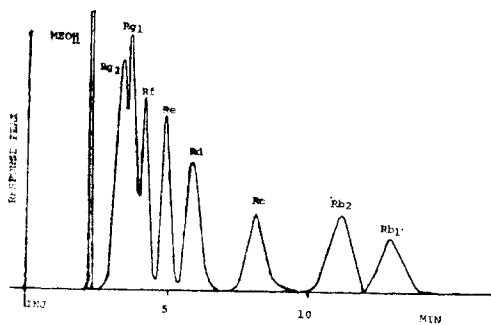


Fig. 1—Chromatogram of standard saponins

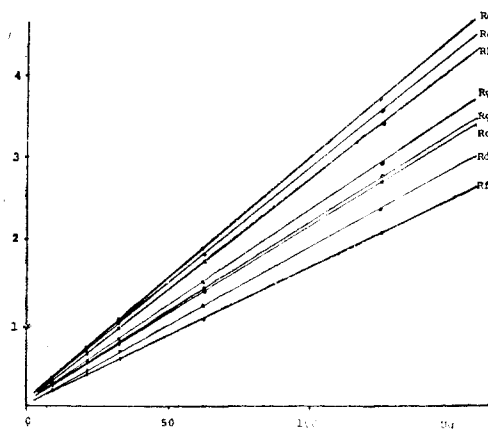


Fig. 2—Calibration curve of each standard saponin by HPLC

驗에서는 μ Bondapak carbohydrate analysis column 을 選擇했으며 acetonitrile/H₂O/BuOH=80/20/15의 混合溶液을 溶媒條件으로 選擇하였다. 流速은 1.5ml/min 일 경우에 分離能이 가장 良好하였다.

檢量線 作成—사포닌 標準品 ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rc, -Rd, -Re, -Rf, -Rg₁, 및 -Rg₂를 25μl 씩 주입하여 얻은 chromatogram Fig.1으로 부터 peak面積을 計算하여 檢量線을 作成하였다. (Fig. 2) 농도와 peak面積사이에는 良好한 直線性을 나타내었으며 이로부터 定量이 可能하였다. 各純品 ginsenoside의 retention time은 Table I과 같다.

Table I—The retention time of each ginsenoside by HPLC

Gnsenoside	Retention time (min.)
Rb1	12.9
Rb2	11.2
Rc	8.1
Rd	5.9
Re	4.85
Rf	4.05
Rg1	3.6
Rg2	3.4
glucose	5.4
sucrose	7.6

Table II—The content of ginsenosides in ginseng

Sample	Ro	Ra	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rf	Rg1	Rg2
1	0.29	0.1	0.60	0.52	0.62	0.15	0.57	0.07	0.23	0.08
2	0.32	0.13	0.68	0.52	0.62	0.15	0.59	0.07	0.23	0.10
3	0.28	0.11	1.63	0.52	0.61	0.17	0.55	0.07	0.23	0.08
4	0.30	0.12	1.63	0.53	0.61	0.17	0.56	0.07	0.23	0.07
5	0.33	0.11	1.64	0.57	0.65	0.17	0.57	0.06	0.22	0.07
average	0.30	0.11	0.64	0.53	0.62	0.16	0.57	0.07	0.23	0.08
±SD	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01

Table III—Recovery rate in addition test

No. of Exp.	Add amount of ginsenoside (μg)	Observed (μg)	Recovery (%)
1	Rg ₁ ^{a)} 12.5	53	96.0
2	25	65	96.0
3	37.5	77.3	98.4

a) Content of ginsenoside-Rg₁ : 41 μg

再現性 및 回收率——人蔘試料의 粗사포닌을 메탄올에 녹여 5%가 되게 溶解시킨 후 Millipore filter로 여과하고 25 μl 씩 取해 5회 주입하여 再現性을 檢討한 結果는 Table II과 같으며 良好한 再現性을 보여 주었다. 한편 HPLC 操作上의 誤差範圍를 確認하기 위하여 粗사포닌 溶液에 Rg₁을 12.5 μg , 25 μg , 37.5 μg 을 첨가하여 檢量線에 의해 定量한 結果는 다음 Table III과 같으며 96~98%의 우수한 回收率을 보여 주었다.

人蔘 各 部位別 사포닌 定量——사포닌 抽出法에 따라 抽出한 13種의 人蔘試料의 粗사포닌의 收率은 다음 Table IV와 같으며 이들을 50mg씩 取하여 1ml의 메탄올에 溶解시킨 후 Millipore filter로 여과한 후 25 μl 씩 取해 injection 한 후 上記式에 의해 계산하여 부위별, 人蔘 종류별 各 ginsenoside의 含量을 구하였다. 各 含量은 Table V와 같다.

Table IV—The yield of crude saponins in ginseng parts

Ginseng parts	Yield (%)
Fresh ginseng	1.98
-lateral root	3.8
-main body	1.7
-head	3.31
White ginseng	
-lateral root	11.3
-main body	5.0
Red ginseng	
-lateral root	10.8
-main body	5.1
Ginseng peelings	9.3
seeds	1.0
fruits	1.4
leaves	2.5
stems	1.2

結 論

HPLC를 利用하여 人蔘 사포닌인 ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, 및 Rg₂를 分離했으며 이때의 分析條件은 mobile phase 용매로는 acetonitrile/H₂O/BuOH (80/20/15)를 使用했으며 溶媒速度는 1.5ml/min일때 分離能이 良好하였으며 檢出器는 RI detector (8X)를 사용했다. 再現性 및 回收率도 良好했고 檢量線의 直線性도 良好하였다. 이를 利用하여 人蔘 各 部位別 사포닌의 pattern 및 定量을 시도 하였으며 이는 앞으로 人蔘製品 品質管理에 應用될 수 있다고 사료된다.

Table V—Contents of ginsenosides in ginseng

Parts of ginseng	Ro	Ra	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rf	Rg1	Rg2	etc.
Fresh ginseng	0.01	0.02	0.42	0.15	0.14	0.05	0.12	0.02	0.12	0.03	
-lateral root	0.05	0.03	0.80	0.37	0.38	0.13	0.25	0.03	0.24	0.04	
-main body	0.05	0.03	0.30	0.09	0.09	0.06	0.09	0.02	0.23	0.04	
-head	0.02	0.01	0.62	0.19	0.19	0.12	0.18	0.15	0.23	0.03	
White ginseng											
-lateral root	0.40	0.27	2.38	0.77	0.83	0.31	0.87	0.10	0.37	0.18	
-main body	0.07	0.02	1.04	0.24	0.18	0.06	0.32	0.08	0.67	0.05	
Red ginseng											
-lateral root	0.24	0.24	2.11	0.64	0.79	0.26	0.73	0.01	0.40	0.29	
-main body	0.13	0.11	1.69	0.16	0.09	0.07	0.24	0.09	0.22	0.11	
Ginseng peelings	0.23	0.13	1.22	0.35	0.28	0.08	1.08	—	0.25	0.12	
seeds	—	—	0.04	0.01	—	—	0.10	—	—	0.17	0.01
fruits	—	—	0.04	0.06	0.06	0.05	0.36	—	0.03	0.02	0.02
leaves	—	—	—	—	—	—	0.33	—	0.25	0.14	0.02
stems	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	

純品 사포닌을 분양해 주신 日本 昭和大學의 庄司 教授님 및 이에 협조한 김 종수씨께 심심한 謝意를 표하는 바이다.

文 獻

1. 今村 綱, 人蔘史 第5卷 朝鮮總督府 專賣局 (1937).
2. S. Shibata, H. Otsuka, Y. Morita, and Y. Ogihara, *Planta Medica*, **32**, 9(1977).
3. G. B. Elyakov *et al.*, *Dokl. Acad. Nauk. SSSR*, **158**, 862(1964).
4. I. I. Brekhman, and I. V. Dardymov, *Ann. Rev. Pharmacol.*, **9**, 419(1969),
5. K. Takagi, Proceedings of Internatrontal Ginseng Symposium, p.119(1974).
6. H. Oura, S. Hiai, Y. Odaka, and T. Nakajima, *Planta Medica*, **28**, 363(1975).
7. H. Oura, S. Hiai, H. Hamanaka, and Y. Odaka, *Planta Medica*, **28**, 131(1975).
8. 韓秉勳, 韓國生藥學會誌, **3**, 151(1972).
9. S. Chen, and E. J. Staba, *Lloydia*, **41**, 361(1978).
10. S. Sandada, J. Shoji, and S. Shibata, *Yakugaku Zasshi*, **98**, 1048(1978).
11. Y. Saruwatari, H. Besso, K. Futumura, T. Fuwa, and D. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 147(1979).
12. T. Namba, M. Yoshizaki, T. Tomimori, K. Kobashi, K. Mitsui, and J. Hase, *Yakugaku Zasshi*, **94**, 252(1974).
13. 金海中, 南成熙, 福食義昭, 李錫健, 韓國食品科學會誌, **9**, 24(1977).
14. 禹麟根, 韓秉勳, 白德禹, 朴大植, 人蔘 엑기스 規格 設定에 관한 研究, 保健社會部(1972).
15. S. Yahara, R. Kashi, and O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2041(1977).
16. I. Sakamoto, K. Morimoto, and O. Tanaka, *Yakugaku Zasshi*, **95**, 1456(1975).
17. E. Bombadelli, A. Bonati, B. Gobetta, and E. M. Martinelli, Proceedings of the 2nd International

- Ginseng Symposiun, p. 29 (1978).
18. C. H. Brieskorn, and A. Mosandl, Proceedings of the 2nd International Ginseng Symposium p. 49 (1978).
 19. 李泰寧, 沈相哲, 人蔘 및 人蔘製品的 成分 分析 및 分析 比較 研究, 高麗人蔘研究所 用役報告集 (1977).
 20. 禹源植, 金濟勳, 韓秉勳, 申國鉉, 人蔘製品的 品質管理 基準試驗法 開發 研究, 文教部(1978).
 21. O. Sticher, and F. Soldati, *Planta Medica*, **36**, 30(1979).