

高速液體 크로마토그래피에 의한 人蔘 및 人蔘製品中の 遊離糖의 定量

崔 鎮浩 · 張 辰奎 · 朴 吉童 · 朴 明漢 · 吳 成基*
韓國人蔘煙草研究所, *慶熙大學校 産業大學
(1981년 2월 18일 수리)

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Sugars in Ginseng and Its Products

Jin Ho Choi, Jin Gyu Jang, Kil Dong Park, Myung Han Park and Sung Ki Oh*
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Seoul 110,
*College of Industry, Kyunghee University, Seoul 131
(Received February 18, 1981)

Abstract

Free sugars were isolated from ginseng root and its products and analyzed by using high performance liquid chromatography.

To isolate free sugars from aqueous sample solution, fat-soluble components, crude saponin and protein were removed from the solution by extracting with benzene, water-saturated butanol and 80% ethanol, respectively.

Free sugars found from both ginseng root and its products were fructose, glucose, sucrose and maltose, and the only sugar detected from red ginseng root and its products was rhamnose. Major sugar detected from fresh ginseng and white ginseng roots was sucrose, while sucrose and maltose were the major sugars of red ginseng root.

序 論

人蔘의 遊離糖에 관한 研究로서 李⁽¹⁾등은 ion exchange resin chromatography와 anthrone反應에 의하여 sucrose, glucose 및 fructose를 分別定量하였고 朴⁽²⁾은 paper chromatography를 利用한 比色法으로 fructose, glucose, sucrose, maltose 및 raffinose의 存在를 確認하였으며 金⁽³⁾도 paper chromatography에 의한 比色法으로 fructose, glucose 및 sucrose를 定量하여 報告한 바 있다. 또 Takiura⁽⁴⁻⁶⁾등은 人蔘 中の oligosaccharides의 研究에서 80%-에 탄을抽出 物을 에탄올-물 system을 展開溶媒로 한 active

carbon column chromatography와 cellulose powder partition column chromatography에 의한 比色法으로 fructose, glucose, sucrose 및 maltose를 定量하여 報告했다. 이것은 全部 比色法에 의한 定量으로서 人蔘 및 人蔘製品自體가 많은 色素를 갖고 있기 때문에 多少 問題가 있다고 생각된다.

그런데 李⁽⁷⁾등은 GLC를 사용하여 試料를 TMS化하여 内部標準物質로서 manitol을 사용한 内部標準法에 의해 fructose, glucose, galactose, sucrose 및 maltose를 定量하였으며 또한 Conrad⁽⁸⁾등 및 Yasui⁽⁹⁾등도 果實, 牛乳 및 乳製品中の 糖의 定量法에 대해서 報告하고 있다.

著者⁽¹⁰⁻¹⁴⁾등은 HPLC法을 사용하여 人蔘의 藥理成

分으로 밝혀지고 있는 사포닌중의 각 ginsenosides의 單離法에 대해서 이미 報告한 바 있다.

이번에는 人蔘 및 人蔘製品중의 遊離糖의 定量法을 檢討한 結果, HPLC의 利用이 아주 效果的임이 認定 되어 그 結果를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

材 料

水蔘은 韓國人蔘煙草研究所 曾坪人蔘試驗場에서 1980年 10월에 採掘한 것을 白蔘 및 紅蔘은 이 水蔘을 原料로 常法에 따라 製造 사용하였으며 紅蔘製品은 專賣店 高麗人蔘廠에서 6年根紅尾蔘을 原料로 1980年 10월에 製造한 것을 사용하였고 白蔘精은 市販되는 一般會社製品을 購入하여 사용하였다.

方 法

1. 試料의 製造

Fig. 1과 같은 方法에 따라 人蔘類는 잘 水洗한 水蔘을 細切한 후 20g을 秤量하고 또 白蔘과 紅蔘은 100 mesh로 粉碎한 후 각각 5g씩을 秤量하여 round bottom flask에 넣고 80%-에탄올을 100ml을 加하여 reflux condenser를 附着하여 80°C water bath上에서 2時間씩 抽出하여 東洋濾紙 No. 5A로 濾過하여 濾液 30 ml을 取하였고, 또 人蔘製品類는 各各 2g씩 秤量하여 蒸留水 70 ml씩을 加하여 水溶液을 만들었다. 여기에 各各 벤젠 20 ml씩으로써 抽出, 脫脂한 후 水層을 다시 水飽和부탄올 70 ml씩으로써 抽出하여 부탄올層(crude saponin)을 除去하고 남은 水層에서 各各 10 ml씩을 取하여 rotary evaporator로 50°C에서 減壓乾燥한 후 80%-메탄올 20 ml씩을 넣어 vortex mixer로 30秒間 잘 混合하여 8000 rpm에서 20分間 遠心分離하여 除蛋白된 上澄液 10 ml씩을 取하여 다시 rotary evaporator로 50°C에서 減壓濃縮하면서 數회에 걸쳐 少量의 메탄올으로써 完全乾燥한 후 蒸留水 2 ml로써 定容하여 HPLC注入用 試料溶液을 製造하였다.

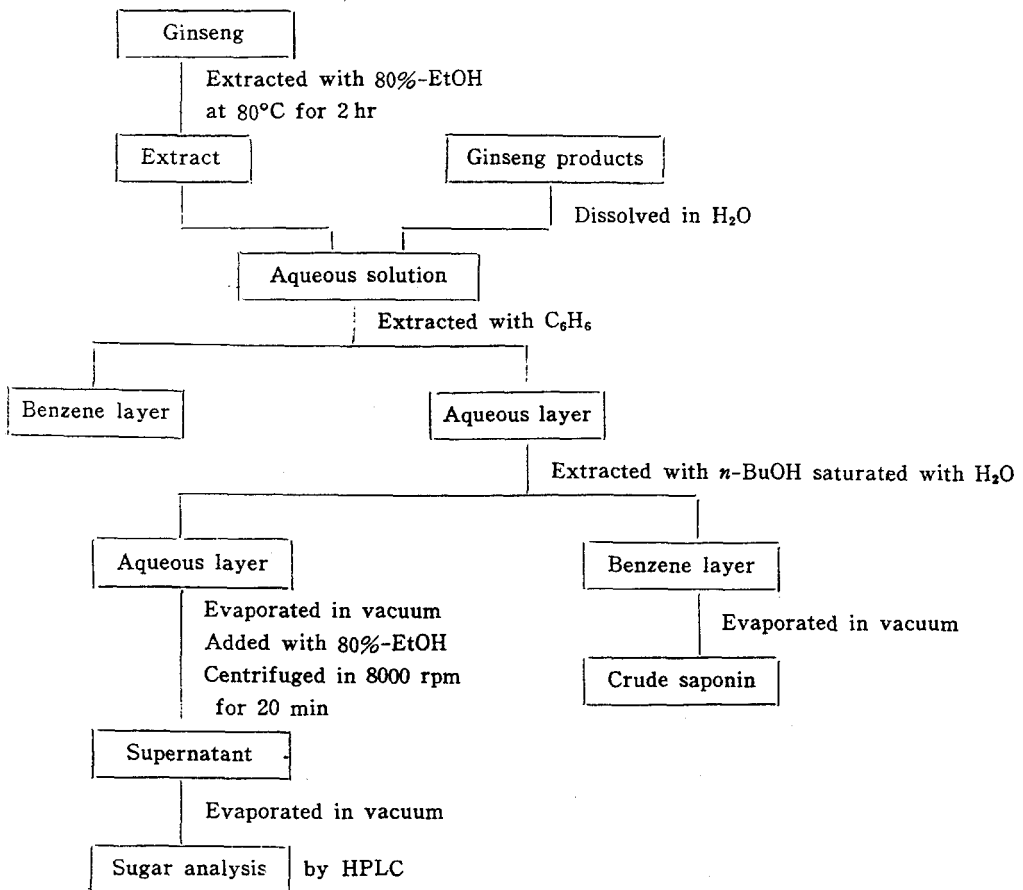


Fig. 1. Flow chart of extraction and analysis for free sugars in ginseng root and its products

2. 試藥 및 標準溶液의 調製

試料의 抽出 및 製造에 사용한 에탄올(Merck製), 부탄올(和光純藥製), 벤젠(和光純藥製) 등의 有機溶媒는 1級試藥을 사용하였으며 HPLC用試藥으로 사용한 아세토니트릴(Mallinckrodt, Inc.製), 蒸留水(和光純藥製) 및 sugar standards(Merck製)는 特級試藥을 사용하였다.

또 抽出 및 除蛋白에 사용한 80%-에탄올은 99.5%-에탄올 : 물(4 : 1, v/v)로 混合하여 調製하였고 HPLC用 移動相은 아세토니트릴 : 물(84 : 16, v/v)로 混合한 후 0.5 μm membrane filter (Millipore Corp., Bedford, MA, USA)로 濾過하여 사용하기 직전에 超音波洗淨槽(Branson Co., USA)에서 5分間 脫氣한 후 사용하였다.

Sugar standards로 사용한 rhamnose, arabinose, xylose, fructose, galactose, sucrose, maltose 및 lactose를 各各 5g씩 秤量하여 蒸留水 1ml씩에 溶解하여 4°C冷藏庫에서 保存하였고 必要에 따라 混合標準溶液의 調製時에는 同一量씩 micro pipette로 分取 混合하여 사용하였다.

3. HPLC의 條件

實驗에 사용한 HPLC는 analytical HPLC/ALC-244 (Waters Associates Inc., Milford, MA, USA)를 사용하였으며 檢出器는 differential refractometer R-401 (RI Detector, Waters Associates Inc.)을, recorder는 Texas Instrument製 2 pen system을 各各 사용하였는데 이 때 HPLC의 分析條件은 다음과 같다.

Packing: Carbohydrate analysis

Column: 0.39×30 cm

Mobile phase: Acetonitrile : Water = 84 : 16(v/v)

Flow rate: 2.0 ml/min

Chart speed: 1.0 cm/min

RI detector: Attenuation 8×

Sample load: 20 μl/injection

4. 糖의 定量

試料溶液은 HPLC에 注入하기 전에 0.5 μm membrane filter로 濾過한 후 20 μl씩 injection하여 피크 면적(peak area)을 半值幅法으로 計算하였으며 또 sugars 標準溶液(5 mg/ml)을 各各 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 50 μl씩 injection하여 피크 면적으로써 檢量線을 作成하였다.

이 標準檢量線을 利用하여 各 試料溶液의 피크 면적으로써 換算하였으며 人蔘 및 人蔘製品의 水分含量을 乾物量으로 換算하여 各 試料當 3회씩 反復測定한 平均值로서 糖類의 含量으로 定量(mg/g)하였다.

結果 및 考察

抽出條件의 檢討

試料에서 遊離糖을 抽出하기 위해서는 抽出溶媒, 溫度 및 時間 등을 考慮해야 한다. 人蔘製品을 試料로 하는 경우는 이미 人蔘類에서 물이나 에탄올-물로 抽出된 人蔘精을 原料로 하기 때문에 물에 溶解하여 各種溶媒를 사용하여 糖을 分劃하면 된다. 그러나 水蔘, 白蔘 및 紅蔘등 人蔘類속에 있는 遊離糖을 抽出하는 경우에는 물을 溶媒로 抽出하면 遊離糖이 거의 抽出可能하지만 高溫長時間 抽出하면 oligosaccharides, polysaccharides 및 配糖體인 saponin 變化가 豫想된다. 따라서 보통 澱粉質含量을 減少시키기 위해서 사용하는 ethanol-water system을 利用하여 抽出하고 있는데 除蛋白實驗結果, 가장 效果의인 80%-에탄올을 抽出溶媒로, 白蔘을 試料로 하여 80°C에서 各 時間別로 抽出한 遊離糖의 含量은 Table 1과 같다. Glucose와 sucrose의 含量을 比較한 結果, 2時間 抽出에서 各各 99.51%, 99.49%까지 抽出이 可能하였으므로 2時間 抽出이 適當하다고 생각된다.

糖의 分劃

抽出된 試料에서 糖을 分劃할 目的으로 Fig. 1에서 보는 바와 같이 水溶液層에서의 脫脂를 위해 벤젠, 에테르, 클로로포름 등이 사용되고 있으나 實驗結果 벤

Table 1. Effect of extraction time on glucose and sucrose in white ginseng root extracted with 80% ethanol at 80°C

Extraction time (hr)	Glucose		Sucrose	
	Contents(mg/g)	Extraction(%)	Contents(mg/g)	Extraction(%)
1	8.16	98.31	117.05	97.54
2	0.10	1.20	2.35	1.95
3	trace	—	0.45	0.37
4	—	—	—	—

젠을 사용한 抽出層에는 전연 糖이 移行되지 않았다. 또 水飽和부탄을 抽出로서 脫脂된 水溶液層중의 사포닌을 除去하였으며 이 때 糖이 부탄층에 移行하는 것을 막기 위해 여러번 水洗하였다.

이 水層을 減壓乾燥한 다음 80%-에탄올을 加하여 蛋白質, 펙틴, 澱粉 등의 高分子物質들을 遠心分離에 의하여 除去하였다. 蛋白質은 HPLC의 分離能을 低下시키는 가장 큰 要因이기 때문에 처음 5%-TCA로써 除蛋白을 試圖하였으나 rhamnose와 retention time이 같아 不可能했다. 따라서 除蛋白效果를 調査하기 위하여 알부민(2 mg/ml)으로써 各 濃度別 에탄올을 사용하여 micro-Kjeldahl protein法으로 蛋白質量을 調査한 結果 80%-에탄올이 가장 效果의인 것으로 判明되었다.

HPLC條件의 檢討

Carbohydrate analysis column은 analytical HPLC에 사용하는 糖分析專用 컬럼으로서 糖이외에 사포닌 分析에도 利用되는 컬럼이다. 사포닌과 蛋白質 등에 影響을 받는 것으로 알려져 있다. Mobile phase로는 주로 아세트니트릴-물 system이 사용되고 있으며 일부 文獻上에는 容積比로 75 : 25, 80 : 20, 82 : 18 등이 報告되어 있으나 fructose와 glucose의 overlap때문에 이들 system으로는 完全分離를 期할 수 없었다.

本實驗에서 사용한 84 : 16(v/v)이 分離能이 優秀한 뿐만 아니라 약 12분대에서 完全分離가 可能한 좋은 結果를 얻었다. 또 mobile phase의 流速에 있어서도 2.0 ml/min이 良好한 分離能을 나타냈으며 그 以下에서는 分離時間이 많이 걸릴 뿐만 아니라 피크幅이 넓게 퍼지는 경향이 있었다. 특히 試料와 標準溶液의 溶媒로서 알콜을 사용하지 않고 물을 사용하면 移動相보다도 極성이 커서 피크幅이 넓어짐으로 2.0 ml/min 이하의 流速은 不適當하며 한편 알콜 사용은 일부 糖類의 溶解度와 關聯해서 問題點을 안고 있는 것으로 생각한다. mobile phase를 84 : 16(v/v)으로 한 sugar standards의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 分離能이 良好하였다.

回收率과 再現性

試料에 添加한 糖의 回收率을 檢討하기 위하여 白蔘에서 調製한 試料溶液 20 μl에 glucose와 sucrose標準溶液(5 mg/ml)을 各各 2.5, 5, 10 μl씩 混合하여 HPLC에 注入한 다음 피크面積을 計算하고 sugar standards의 檢量線을 利用하여 回收率을 檢討한 結果는 Table 2와 같다. Glucose는 96%이상 sucrose는 glucose보다 약간 낮은 95%이상의 좋은 回收率을 나타냈다.

또 本定量法에 따라 3種의 人蔘類에서 調製한 試料溶液을 3회씩 反復測定, 定量하여 再現性을 檢討한 結

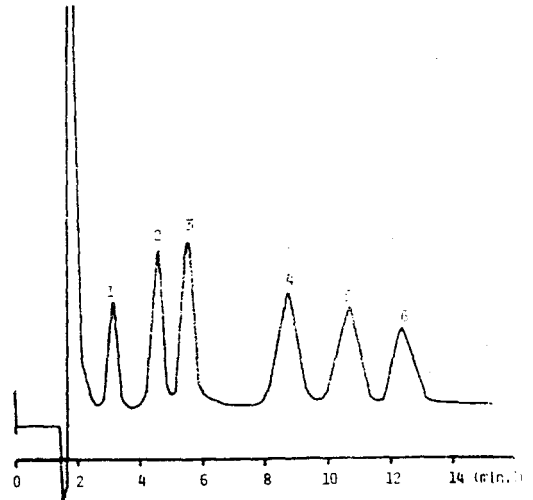


Fig. 2. HPLC chromatogram of sugar standards.

- 1. Rhamnose; 2. Fructose; 3. Glucose;
- 4. Sucrose; 5. Maltose; 6. Lactose

Table 2. Recovery rates in the addition test: added to white ginseng root

No. of exp.	Amount of sugars added(μg)	Observed con- tents (μg)	Recovery (%)
1	Glucose ^{a)} 12.5	38.78	98.17
2	25.0	50.68	97.46
3	50.0	74.29	96.48
1	Sucrose ^{b)} 12.5	393.80	97.83
2	25.0	399.31	96.22
3	50.0	418.62	95.21

a) Content of glucose : 27 μg

b) Content of sucrose : 390 μg

果 各試料當의 定量値는 거의 一定한 값을 나타냈다.

人蔘類의 糖組成

同一한 6年根 原料水蔘을 사용하여 製造한 白蔘과 紅蔘의 遊離糖의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 水蔘과 白蔘에서는 4개, 紅蔘에서는 6個의 피크를 얻었다. 이 중 水蔘과 白蔘에서는 fructose, glucose, sucrose 및 maltose가 同定되었고 紅蔘에서는 rhamnose, fructose, glucose, sucrose 및 maltose를 同定할 수 있었으며 peak 1은 同定할 수 없었다.

그러나 차⁽²⁾ 및 李 등⁽⁷⁾이 報告한 raffinose, galactose, arabinose는 同定할 수 없었는데 특히 arabinose

는 ginsenoside-Rb₂와 -Rc의 C₂₀에서 glycosidic linkage를 이루고 있는 glucose에 arabinose가 결합하고 있기 때문에 紅蔘 및 紅蔘製品 製造時 加水分解에 의해 生成될 것이 豫想되지만 amino-carbonyl反應에 의한 褐變反應에의 關與때문에 檢出되지 않는 것으로 생각되며 ginsenoside-Rb₂의 xylose도 같은 理由로 同定되지 않는 것으로 推定된다.

또 紅蔘에서는 水蔘이나 白蔘에 없는 rhamnose가 同定되고 있는데 이것 역시 配糖體인 사포닌 中の ginsenoside-Re와 -Rg₂의 C₆位에서 glycosidic linkage를 이루고 있는 glucose에 결합한 rhamnose의 離脫로 推定되나 全體遊離糖의 1.8%정도가 定量되는 것으로 보아 다른 糖類에 비해 amino-carbonyl反應에의 關與가 적은 것으로 생각되며 이러한 사실은 著者 등⁽¹⁵⁾이 熱處理에 의한 紅蔘엑기스의 成分變化에서 指摘한 바 있다.

한편 sugar標準溶液의 檢量線을 利用하여 定量的 遊離糖의 組成은 Table 3에서 보는 바와 같이 全體遊離糖에 대하여 水蔘과 白蔘에서는 sucrose含量이 가장 높은 65%, 86%였으나 紅蔘에서는 sucrose와 maltose가 거의 비슷한 43%, 45%였다. 또 全體遊離糖의 含量을 比較하면 紅蔘이 白蔘보다 約 22%정도 減少하고 있는데 이는 amino-carbonyl反應에 의한 褐色色素生成에 關與한 것으로 推定된다.

人蔘製品의 糖組成

에탄올-물 system에 의하여 抽出된 白蔘精과 물로써 高溫에서 長時間 抽出한 紅蔘精의 遊離糖 組成은 Table 4와 같다. Table 4에서 보는 바와 같이 白蔘精에서는 sucrose가 가장 많은 69.75 mg/g으로 全體遊離糖의 약 51%인데 반해 紅蔘精은 sucrose含量이 2.45 mg/g으로 4%에 不遇하다. 이것은 紅蔘精 製造時, 물로써 高溫에서 長時間 抽出, 濃縮, 熟成중에 sucrose가 加水分解되어 fructose와 glucose로 變化되어 이것이 amino-carbonyl反應에 關與한 것으로 생각된다. 또한 著者 등⁽¹⁶⁾이 報告한 熟成溫度가 紅蔘엑기스의 色相變化에 미치는 影響에서 紅蔘精의 pH가 4.2~4.6이며 100°C에서 30時間이상 熟成하면 sucrose가 95%가

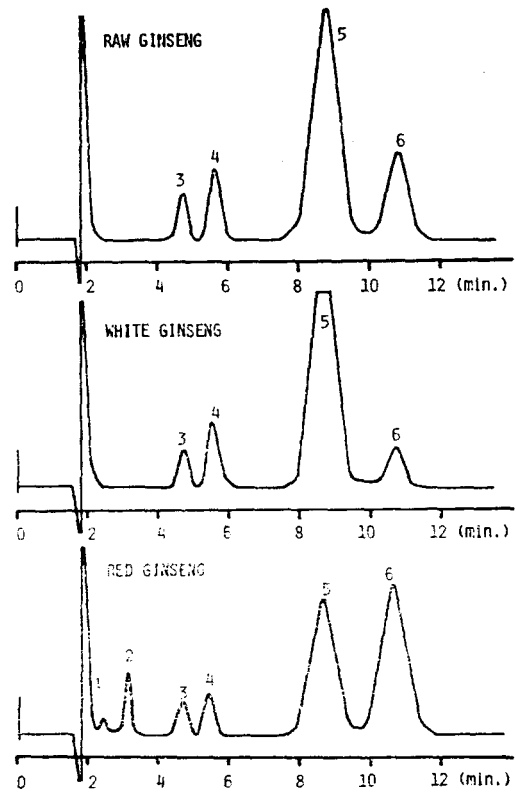


Fig. 3. Comparison of HPLC chromatograms of free sugars in raw, white and red ginseng roots

- 1, Unknown; 2, Rhamnose; 3, Fructose;
- 4, Glucose; 5, Sucrose; 6, Maltose

량 加水分解된다는 사실로도 설명할 수 있다.

또 rhamnose의 生成 역시 紅蔘精이 白蔘精보다도 5배가 많은 5.38 mg/g으로 전체 遊離糖의 9.7%에 해당되며 紅蔘물엑기스가 白蔘알물 엑기스보다 抽出, 濃縮, 熟成중에 配糖體인 사포닌의 分解가 쉽게 일어나는 것으로 사료된다.

Table 5에서 보는 바와 같이 紅蔘精과 紅蔘粉末製品의 遊離糖 組成을 比較하여 보면 紅蔘精茶(RGET)는

Table 3. Sugar contents of raw, white and red ginseng roots*

Samples	Sugar contents (mg/g)					Total
	Rhamnose	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	
Raw ginseng	—	6.23	9.49	69.72	21.75	107.19
White ginseng	—	4.62	8.30	120.00	5.85	138.77
Red ginseng	1.99	4.16	5.34	47.39	49.73	108.11

* Each sample was extracted with 80% ethanol

Table 4. Sugar contents in the extracts of white and red ginseng roots

Samples	Sugar contents (mg/g)					
	Rhamnose	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	Total
White ginseng extract (WGE) ^{a)}	1.07	27.96	19.35	69.75	19.45	137.58
Red ginseng extract (RGE) ^{b)}	5.38	11.83	13.98	2.45	21.50	55.14

a) Extracted with ethanol-water system, b) Extracted with water

Table 5. Sugar contents in the manufactures of red ginseng root

Samples	Sugar Contents (mg/g)						
	Rhamnose	Fructose	Glucose	Sucrose	Maltose	Lactose	Total
Extract tea ^{a)}	trace	2.25	502.12	7.78	9.12	261.96	783.23
Extract powder ^{b)}	4.25	12.32	13.14	1.56	17.20	—	48.47
Extract pill ^{b)}	3.62	10.25	17.82	1.34	15.13	—	48.16
Tablet	1.35	14.18	8.95	30.14	32.39	—	87.01
Capsule	1.39	13.25	11.21	29.28	30.05	—	85.18
Powder	1.56	12.63	10.16	32.16	34.28	—	90.79

a) extracted with 70% ethanol, b) extracted with water

glucose와 lactose가 각각 전체 遊離糖의 64%와 33%였다. 이것은 紅蔘精茶 製造時에 賦形劑로 添加된 glucose와 lactose 때문이며 이때 紅蔘精도 10~14%添加되고 있다.

紅蔘精粉과 紅蔘精丸도 紅蔘精과 거의 같은 패턴을 보이고 있는데 이것은 紅蔘精을 原料로 사용하고 있기 때문이다.

또 紅蔘 tablet, 紅蔘 capsule 및 紅蔘粉도 역시 紅蔘과 거의 같은 패턴을 나타내고 있는데 이것 역시 紅蔘을 原料로 粉末化하여 製造하기 때문으로 생각된다.

要 約

人蔘과 人蔘製品中에 들어 있는 遊離糖의 組成을 測定함에 있어서 比色法은 人蔘 및 人蔘製品自體의 褐色色素로 因하여 甚한 誤差가 豫想되기 때문에 HPLC에 의한 定量法을 檢討하였으며 그 實驗結果는 다음과 같다.

(1) 人蔘試料中의 遊離糖을 分離하기 위하여 脂肪成分은 벤젠으로, 사포닌成分은 水飽和부탄올로, 蛋白質, 澱粉 등 高分子物質은 80%-에탄올로 抽出, 除去함이 效果의이었다.

(2) HPLC의 條件은 carbohydrate analysis column과 移動相으로서 아세토니트릴-물 system (84 : 16, v/

v)을 사용하고 流速을 2.0 ml/min으로 했을때 分離能 이 가장 良好하였다.

(3) Glucose와 sucrose의 標準溶液(5 mg/ml)을 試料溶液에 添加하여 回收率을 檢討한 結果, glucose는 96%, sucrose는 95%이상의 回收率을 나타냈으며, 再現性도 良好하였다.

(4) 人蔘類의 遊離糖 抽出時間을 檢討하기 위하여 80%-에탄올로 80°C에서 抽出하여 본 結果, 2時間 抽出에서 glucose는 99.51% sucrose는 99.49%까지 抽出이 可能하였다.

(5) 水蔘, 白蔘 및 紅蔘에서 fructose, glucose, sucrose, maltose가 同定되었고 紅蔘에서는 水蔘과 白蔘에 없는 rhamnose가 同定되었다. 또 水蔘과 白蔘에서는 sucrose가 가장 많았고 紅蔘에서는 sucrose와 maltose가 거의 같았다.

(6) 人蔘精의 遊離糖 組成은 抽出溶媒에 따라 많은 差異가 있는데 白蔘精은 sucrose가 가장 많은 反面 紅蔘精은 sucrose가 거의 없었다. 또 人蔘製品의 遊離糖 組成도 原料인 紅蔘과 紅蔘精의 遊離糖의 패턴과 거의 같았다.

文 獻

2. 朴明三 : 全南大學校 論文集, 10, 279 (1964)
3. 金銅淵 : 韓國農化學會誌, 16(2), 60 (1973)
4. Takiura, K. and Nakagawa, I. : *Yakugaku Zasshi*, 83, 298 (1963)
5. Takiura, K. and Nakagawa, I. : *Yakugaku Zasshi*, 83, 301 (1963)
6. Takiura, K. and Nakagawa, I. : *Yakugaku Zasshi*, 83, 305 (1963)
7. 李盛雨, 小机信行, 裴孝元, 尹泰憲 : 韓國食品科學會誌, 11(4), 273 (1979)
8. Conrad, E. C. and Palmer, J. K. : *Food Technol.*, 30, 84 (1976)
9. Yasui, T., Furukawa, T. and Hase, S. : *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 27(7), 358 (1980)
10. Nagasawa, T., Oura, H., Choi, J. H. and Bae, H. W. : *The 3rd International Ginseng Symposium*, Seoul, Korea, Sept. 8-10 (1980)
11. Nagasawa, T., Choi, J. H., Nishino, Y. and Oura, H. : *Chem. Pharm. Bull.*, 28(12), 3701 (1980)
12. Choi, J. H., Nagasawa, T., Nishino, Y. and Oura, H. : *The 100th Annual Meeting of Pharmaceutical of Japan*, Tokyo, Apr. 2-5 (1980)
13. 崔鎮浩, 金友政, 裴孝元, 吳成基, 大浦彥吉 : 韓國農化學會誌, 23(4), 199 (1980)
14. 崔鎮浩, 金友政, 洪淳根, 吳成基, 大浦彥吉 : 韓國農化學會誌, 23(4), 206 (1980)
15. 崔鎮浩, 金友政, 梁宰源, 成綯淳, 洪淳根 : 韓國農化學會誌, 24(1) (1981) (in press)
16. 崔鎮浩, 金友政, 朴吉童, 成綯淳 : 高麗人蔘學會誌, 4(2), 165 (1980)