

GC에 의한 인삼 종의 방향족 산성 성분 분석

박만기# · 박정일# · 김경호* · 한상범 · 한병훈**

서울대학교 약학대학, *강원대학교 약학대학, **서울대학교 천연물과학연구소

(Received June 8, 1994)

Analysis of Aromatic Acids in *Panax Ginseng* by Gas Chromatography

Man Ki Park[#], Jeong Hill Park[#], Kyoung Ho Kim^{*}, Sang Bum Han
and Byung Hoon Han^{**}

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

^{*}College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

^{**}Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—Eight aromatic acids in *Panax ginseng* were determined by GC. Ultra-1 (25 m×0.2 mm ×0.33 μm) capillary column was employed with temperature programming from 150°C to 240°C at a rate of 3°C/min. The mean contents of eight aromatic acids in 8 white ginseng samples were as follows; salicylic acid: 4.30 ppm, cinnamic acid: 18.2 ppm, vanillic acid: 4.22 ppm, gentisic acid: trace, syringic acid: 6.69 ppm, p-coumaric acid: 13.3 ppm, ferulic acid: 21.9 ppm, caffeic acid: 24.3 ppm, respectively.

Keywords □ *Panax ginseng* C.A. Meyer, Araliaceae, analysis of aromatic acids, salicylic acid, cinnamic acid, vanillic acid, gentisic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 수 천년 동안 동양 지역에서 불로장수의 영약으로 알려져 왔으며 이는 근대 과학적 개념으로 노화방지 효과와 강장제로서의 효과가 있는 것으로 믿어져 왔다.

인삼에 관한 과학적인 연구는 1960년대에 와서야 비로소 현대 과학기기를 이용하여 본격적으로 시작되었다. 특히 Brekhman 등¹⁾이 사포닌 성분을 인삼의 유효 성분으로 강조한 이래 Shibata²⁻⁶⁾ 등은 14종의 ginsenoside들을 분리하였고 그 구조는 tetraterpenoid의 dammarane골격을 가진 중성 배당체인 것으로 규명하였다. 이후의 인삼에 대한 각종 약리 작용 연구에 의해 인삼의 주요 약효 성분은 사포닌이라는 견해가 학계의 공통된 의견이 되어 왔다.

그러나, 1980년대에 이르러 인삼의 약효 성분으로 사포닌만을 생각하는 것에 대한 문제점이 제기되었다. 그 이유는 첫째, *Panax*속 이외의 식물인 돌외(*Gyno-*

stemma pentaphyllum Makino)에서 일부 ginsenoside가 분리 보고 되었으며 둘째, ginsenoside들을 다량 함유하고 있는 인삼의 지상부를 약용으로 쓰지 않고 제재, 주근에 비해 ginsenoside 함량이 2배 이상 많은 미삼을 민간이나 한의학에서 약으로 사용하지 않는다는 점이다. 또한 사포닌의 약리 작용 연구에 사용된 시료들이 순수한 사포닌이 아니고 불순한 사포닌 분획물인 경우가 많았다는 것이 지적 되었다. 한편 최근에는 불순 사포닌 분획물에서 분리된 각종 非사포닌 성분들에 대한 약리 작용이 보고됨에 따라 휘발성 terpenoid, polyacetylene,¹⁰⁾ phenolic acid,¹⁴⁻²⁰⁾ lignan,¹³⁾ alkaloid^{11,12)} 등에 관한 관심이 높아지고 있다.

Han 등¹⁴⁻¹⁶⁾ 급성 알콜 중독에 의한 간 조직 중 과산화 지질 생성을 억제하는 항산화 활성 물질로서 maltol, salicylic acid, vanillic acid, p-hydroxy cinnamic acid 등 폐놀성 성분을 인삼에서 분리 동정 하

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

였고 반면 인삼에서 순수하게 분리 정제된 사포닌 성분들은 항산화 효과가 없다고 보고하였다. 계속해서 Han 등은¹⁷⁾ ferulic acid를, Kim은¹⁸⁾ caffeic acid를, Wee 등은^{19,20)} gentisic acid를 분리하였다.

본 연구에서는 인삼 중 이러한 사포닌 이외의 성분에 관한 연구의 기초 자료로서 이들 성분에 대한 함량 분석을 시도하였다. 함량 분석의 방법으로 gas-liquid chromatography 방법을 채택하였고 시중에서 구입한 8가지 4년근 백삼에 대하여 8가지 aromatic acid의 함량을 조사하였다. 이 8가지 aromatic acid는 각각 salicylic acid, cinnamic acid, vanillic acid, gentisic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid이며 구조는 Fig. 1과 같다.

실험재료 및 방법

재료 및 시약—본 실험에 사용한 4년근 백삼 8종은 경동시장과 시중 약국에서 구입하여 잘게 분쇄하여 사용하였다. 특별한 언급이 없는 한 모든 시약은 1급(EP) 시약을 사용하였으며 GC분석을 위한 TMS 유도체화 시약인 HMDS(hexamethyldisilazane), TMCS(trimethylchlorosilane)는 각각 동경화성공업(Japan)과 Fluka Chemical Co.(Switzerland)에서 구입하였다.

표준품 중 syringic acid, vanillic acid, ferulic acid, caffeic acid, cinnamic acid는 Aldrich Chemical Co. (U.S.A.)의 것을 사용하였으며 salicylic acid는 Jassen Chemica(Belgium)의 것을, p-coumaric acid, gentisic acid는 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)의 것을 사용하였다.

기구 및 기기—본 실험에 사용된 GC는 Hewlett-Packard 5890 series II이고 detector는 flame ionization detector, column은 Ultra-1(crosslinked methyl silicone gum, 25 m×0.2 mm×0.33 μ film thickness)을 사용하였다. Mass는 VG TRIO-II GC/MS system을 사용하였다.

인삼의 추출 및 분획—8종의 백삼 시료를 각각 10 g씩 정밀히 취해 잘게 분쇄한 후, 메탄올 100 ml로 3시간 환류 추출하여 여과하는 조작을 3회 실시하고 그 여액을 감압 농축 하였다. 농축한 메탄올 추출물들을 d-HCl 100 ml로 현탁시킨 후 분액 깔대기에서 에틸 100 ml로 3회 추출하여 에틸 분획을 얻었고, 이

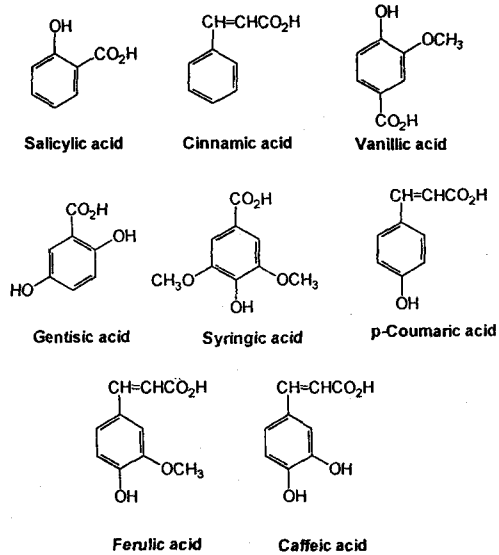


Fig. 1—Structures of aromatic acids.

액을 다시 1N-NaOH 50 ml로 3회 추출하였다. 이 염기층에 6N-HCl을 가하여 산성화한 후 에틸아세테이트 130 ml로 3회 추출하고, 이 에틸아세테이트액에 무수 망초를 가하여 수분을 제거하였다. 탈수한 에틸아세테이트액을 다시 감압 농축시켜 에틸 가용성 산성 분획들을 얻었다.

GC용 검액의 조제—salicylic acid, cinnamic acid, vanillic acid, gentisic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid 표준품 각 1 mg을 반응 용기(reaction vial)에 정밀히 취한 후, 여기에 무수 pyridine 850 μl와 TMS화제 (HMDS : TMCS=2 : 1) 150 μl를 가하였다. 마개를 막고 반응액을 완전히 혼합시킨 후 70℃~80℃에서 30분 동안 반응시킨 것을 GC분석용 표준액으로 사용하였다.

백삼 시료 8종의 에틸 가용성 산성 분획을 각각 감압 건조하고, 여기에 에틸아세테이트 8 ml를 가하여 완전히 녹였다. 이중 각각 2 ml를 반응 용기(reaction vial)에 옮겨 질소 가스 하에서 용매를 완전히 증발시키고 여기에 무수 pyridine 125 μl와 TMS화제 (HMDS : TMCS=2 : 1) 75 μl를 가하였다. 마개를 막고 반응액을 완전히 혼합시킨 후 70℃~80℃에서 30분 동안 반응시킨 것을 GC 분석용 검액으로 사용하였으며 편의상 각 백삼 시료들은 A, B, C, D, E, F, G, H로 명명하였다.

방향족 산성 성분의 확인 및 정량—조제한 GC 분

Table I—GC condition for the quantitation of aromatic acids

Instrument:	Hewlett-Packard 5890 series II
Column:	Ultra-1(cross linked methylsilicone gum, 25 m×0.2 mm×0.33 μ film thickness)
Detector:	Flame Ionization Detector
Oven Temperature:	150°C / 3°C/min / 1 min / 240°C / 20°C/min / 1 min / 290°C / 20 mins
Injector Temperature	280°C
Detector Temperature	300°C
Carrier gas:	N ₂
linear velocity:	7.8 m/min

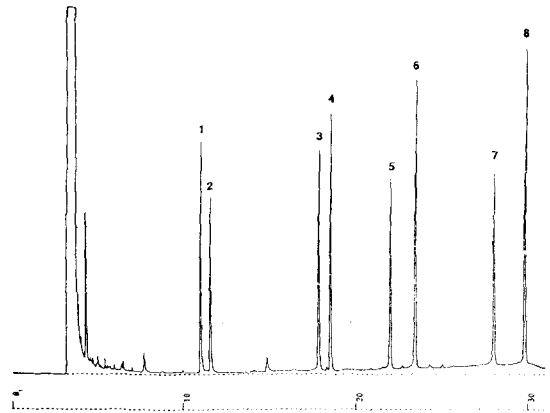
석용 표준액 및 검액들을 각각 1 μ씩 Table I의 조건에 따라 GC에 주입하였다. 검액 중의 aromatic acid는 GC/MS로 확인하였으며 함량은 각 표준품을 분석하여 얻은 표준 검량선을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

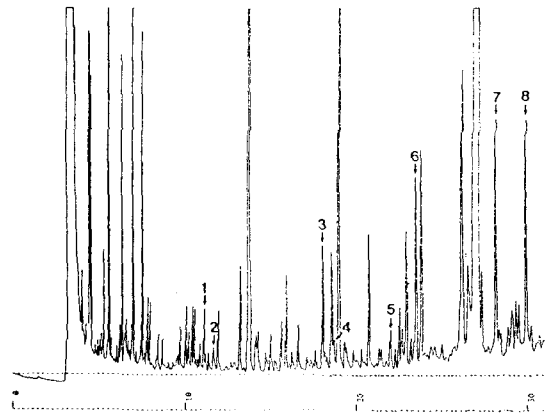
8종의 aromatic acid의 TMS 유도체를 GC로 분석한 결과 salicylic acid, cinnamic acid, vanillic acid, gentisic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid의 순서로 검출되었으며 FID를 사용하여 나타난 검출감도는 caffeic acid가 가장 좋았고 cinnamic acid가 가장 좋지 않았다(Fig. 2).

한편 Krygier 등은⁷⁻⁹⁾ oilseed, cereal, legume의 phenolic acid를 정량할 때 palmitic acid, oleic acid와 같은 유리 지방산이 cis-, trans-sinapic acid와 비슷한 위치에 나타나 정량에 방해가 되므로 hexan 추출로 유리 지방산을 미리 제거하는 방법을 보고하였다. 그러나, 본 실험에서는 8가지 방향족 산성 성분은 30분 이전에 검출되었고 유리 지방산의 대부분은 30분 이후에 검출되어 방향족 산성 성분의 정량에 방해 요인이 되지 않았으므로 hexan 추출 과정을 생략하였다.

검액 중 방향족 산성 성분들은 표준품을 co-injection한 후 GC 및 GC/MS에서의 retention time과 spectrum으로 확인하였고(Fig. 3), 각각의 방향족 산성 성분의 함량은 표준품의 검량선으로부터 구하였

**Fig. 2**—GC chromatogram of TMS derivatives of aromatic acids.

1: salicylic acid, 2: cinnamic acid, 3: vanillic acid, 4: gentisic acid, 5: syringic acid, 6: p-coumaric acid, 7: ferulic acid, 8: caffeic acid

**Fig. 3**—GC chromatogram of TMS derivatives of ether-soluble acidic fraction of sample A.

1: salicylic acid, 2: cinnamic acid, 3: vanillic acid, 4: gentisic acid, 5: syringic acid, 6: p-coumaric acid, 7: ferulic acid, 8: caffeic acid

다(Fig. 4). 이 때 검량선의 상관계수는 0.998~0.999로 양호한 직선성을 나타냈다. 단 gentisic acid는 분리도가 좋지 않아 정량하기가 어려웠다.

백삼 시료 8종 중의 방향족 산성 성분의 평균 함량은 salicylic acid: 4.30 ppm, cinnamic acid: 18.2 ppm, vanillic acid: 4.22 ppm, gentisic acid: trace, syringic acid: 6.69 ppm, p-coumaric acid: 13.3 ppm,

문헌

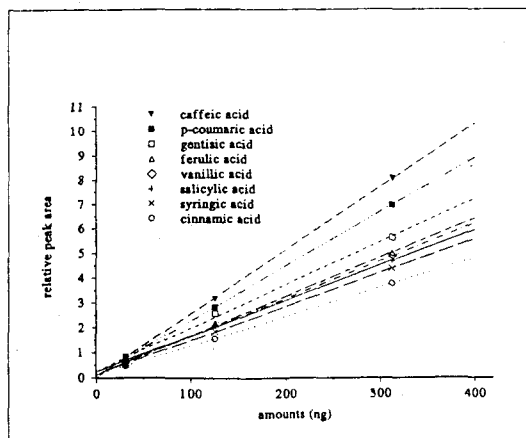


Fig. 4—Calibration curves of TMS derivatives of aromatic acids.

ferulic acid: 21.9 ppm, caffeic acid: 24.3 ppm 으로 나타났다(Table 2).

Cinnamic acid, vanillic acid의 함량이 백삼 시료 간에 큰 차이를 보였으며, 특히 편차가 크게 나타난 cinnamic acid의 경우 시료 C 중의 함량이 76.2 ppm으로 시료 E 중의 함량 2.2 ppm보다 35배 많은 것으로 나타났고, vanillic acid의 경우 시료 A 중의 함량이 11.8 ppm으로 시료 G 중의 함량 1.1 ppm보다 11배 많았다. 기타 salicylic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid는 최저 함량과 최고 함량사이에 2.3~4.7배의 차이가 있었다. 또한 8종의 백삼 시료 중에 p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid의 함량이 전반적으로 다른 phenolic acid보다 많은 것으로 나타났다.

- 1) Brekhman, I. I. and Dardymav, I. V.: New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **9**, 419 (1969).
- 2) Shibata, S., Tanka, O., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S. and Ohsawa, T.: Chemical Studies on Oriental Plant Drugs. XIV. Protopanaxadiol, a Genuine Saponenin of Ginseng Saponins. *Chem. Pharm. Bull.*, **14**(60), 595 (1966).
- 3) Shibata, S.: Some chemical studies on Ginseng. *Proceeding of international ginseng symposium*, 69 (1974).
- 4) Tanaka, O.: Chemistry of ginseng-saponins: Aerial parts of *Panax ginseng* and its related plants, New natural sources of biologically active dammarane saponins. *Proceeding of 2nd international ginseng symposium*, 145 (1978).
- 5) Sanada, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S.: Studies on the Saponins of Ginseng. I. Structures of Ginsenoside-Ro, -Rb₁, -Rb₂, -Rc and -Rd. *Chem. Pharm. Bull.*, **22** (2), 421 (1974).
- 6) Sanada, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S.: Studies on the Saponins of Ginseng. II. Structures of Ginsenoside-Re, -Rf and -Rg₂. *Chem. Pharm. Bull.*, **22**(10), 2407 (1974).
- 7) Krygier, K., Sosulski, F. and Hogge, L.: Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 1. Extraction and Purification Procedure. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 330 (1982).

Table II—Contents of aromatic acids in white ginseng

sample										(unit; µg/g)
	A	B	C	D	E	F	G	H	mean ± S.D.	
phenolic acid										
salicylic acid	3.66	3.17	5.04	4.83	9.82	3.23	2.56	2.06	4.30± 2.45	
cinnamic acid	3.90	35.8	76.2	6.84	2.16	6.27	10.2	4.22	18.2± 25.8	
vanillic acid	11.8	6.06	4.42	3.70	3.22	2.01	1.13	1.48	4.22± 3.48	
gentisic acid	*—	—	—	—	—	—	—	—	—	
syringic acid	5.77	8.05	3.35	4.31	14.0	9.60	3.52	4.90	6.69± 3.68	
p-coumaric acid	16.8	21.5	9.44	18.3	8.47	16.4	6.15	9.13	13.3± 5.62	
ferulic acid	25.3	37.6	30.2	22.5	24.5	14.8	10.6	9.81	21.9± 9.70	
caffeic acid	17.1	27.7	21.7	30.3	38.3	25.1	16.3	18.1	24.3± 7.61	

(*; trace)

- 8) Krygier, K., Sosulski, F. and Hogge, L.: Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 2. Composition of Phenolic Acids in Rapeseed Flour and Hulls. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 334 (1982).
- 9) Krygier, K., Sosulski, F. and Hogge, L.: Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 3. Composition of Phenolic Acids in Cereal and Potato Flours. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 337 (1982).
- 10) Shim, S. C. and Chang, S. K.: Polyacetylene Compounds from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Proceeding of 5th international ginseng symposium*, 122 (1988).
- 11) Han, B. H., Park, M. H., Han, Y. N. and Woo, L. K.: Alkaloidal Components of *Panax ginseng*. *Arch. Pharm. Res.*, **9**(1), 21 (1986).
- 12) Park, J. D., Kim, M. W., Yoo, S. J. and Wee, J. J.: Chemical Studies on the Ether-Soluble Alkaloidal Fraction of *Panax ginseng*. Isolation of 1-carbobutoxy- β -carboline and 1-carbomethoxy- β -carboline. *Arch. Pharm. Res.*, **10**(3), 197 (1987).
- 13) Huh, B. H., Lee, I. R. and Han, B. H.: Lignans from Korean Red Ginseng. *Arch. Pharm. Res.*, **13**(3), 278 (1990).
- 14) Han, B. H., Park, M. H., Woo, L. K., Woo, W. S. and Han, Y. N.: Studies on the Antioxidant Components of Korean Ginseng I. *Korean Biochem. J.*, **12**(1), 33 (1979).
- 15) Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N.: Studies on the Antioxidant Components of Korean Ginseng V. The Mechanism of Antioxidant Activity of Maltol and Phenolic acid. *Korean Biochem. J.*, **18**(4), 337 (1985).
- 16) Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N.: Studies on the Antioxidant Components of Korean Ginseng III. Identification of Phenolic Acids. *Arch. Pharm. Res.*, **4**(1), 53 (1981).
- 17) Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N.: Isolation of linoleic acid and ferulic acid from alkaline hydrolysate of saponin rich fraction of *Panax ginseng*. *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**, 1 (1989).
- 18) Han, B. H.: 인삼의 非-saponin 成分에 관한 연구. *Korean J. Ginseng Sci.*, **15**(1), 74 (1991).
- 19) Wee, J. J., Park, J. D., Kim, M. W. and Lee, H. J.: Isolation of Phenolic Antioxidant Components from *Panax ginseng*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **32**(1), 44 (1989).
- 20) Wee, J. J., Park, J. D., Kim, M. W. and Lee, H. J.: Identification of Phenolic Antioxidant Components Isolated from *Panax ginseng*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **32**(1), 50 (1989).