

인삼 조사포닌의 새로운 분리 방법

신지영 · 최언호 · 위재준*

서울여자대학교 식품미생물 공학과, *한국인삼연초연구원

New Methods for Separation of Crude Ginseng Saponins

Ji-Young Shin, Eon-Ho Choi and Jae Joon Wee*

Department of Food and Microbial Technology Graduate School, Seoul Women's University

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute

In order to increase ginsenoside content, to reduce chemical change, to shorten extracting procedure, new methods of extraction and fractionation of crude ginseng saponin were established and compared for their chemical composition. Those are hot MeOH extraction/*n*-BuOH fractionation (BuOH method) and hot MeOH extraction/Diaion HP-20 adsorption/MeOH elution (HP-20 method), which are already known methods, and additional three new methods: hot MeOH extraction/cation AG 50W adsorption/H₂O elution/*n*-BuOH extraction (AG 50W method), cool MeOH extraction/Diaion HP-20 adsorption/MeOH elution (cool extraction method) and direct extraction with EtOAc/*n*-BuOH (direct extraction method). AG 50W method provided a crude saponin showing the highest content of ginsenosides of 61.5% and the lowest contents of protein and free amino acids of 0.93% and 0.19%, respectively. The protein content was the highest as 14.18% in the crude saponin by HP-20 method, while free sugar content was the highest as 13.5% by BuOH method, indicating that these are factors that lower the rate of ginsenoside in crude saponins by those methods. On the other hand, it was revealed that AG 50W method produced large amount of prosapogenins during the pass through the cation exchange resin (AG 50W) column being strongly acidic. Crude saponin from direct extraction method showed relatively higher composition of ginsenoside R_{g1} and Re. The results suggest that contents and composition of ginsenosides and other chemical components in crude ginseng saponin greatly depend on the condition of the extraction and fractionation.

Key words : crude ginseng saponin, ginsenoside, prosapogenin

서 론

인삼의 약리효능은 주로 인삼 사포닌에 관한 것으로서 중추신경계에 대한 작용⁽¹⁾, 뇌기능에 대한 작용⁽²⁾, 항발암과 항암작용⁽³⁾, 면역기능 조절작용⁽⁴⁾, 항당뇨 작용⁽⁵⁾, 간기능 강화작용⁽⁶⁾, 심혈관 장애 개선작용⁽⁷⁾, 혈압 조절작용⁽⁸⁾, 갱년기 장애 개선작용⁽⁹⁾, 항스트레스⁽¹⁰⁾와 항피로작용⁽¹¹⁾, 항산화 작용⁽¹²⁾ 등이 보고되었다.

인삼의 약리활성 시험은 실험 동물에 조사포닌을 투여하여 효과를 시험하는 예가 많은데, 이미 알려진 기존의 조사포닌 추출 방법에 따라 분리한 조사포닌 중에는 사포닌의 순도가 40~50% 밖에 되지 않으므로 사포닌 이외의 물질의 영향도 배제할 수 없다. 이러한 관점에서 한 등⁽¹³⁾은 순수한 사

포닌보다 조사포닌의 항피로 효과가 더 강한테 이는 조사포닌 중에 혼입되어 있는 페놀계 항산화 물질에 기인한다고 보고한 바 있다. 또한 박 등⁽¹⁴⁾은 인삼뿌리의 부위별 건물당 사포닌 함량이 가는 뿌리일수록 높음에도 불구하고⁽¹⁵⁾ 인삼의 사용부위가 옛날부터 주로 동체부분임에 착안하여 동체에 함유비율이 높은 합질소화합물의 중요성을 강조한 바 있다. 따라서 주로 사포닌에 기인하는 약리효능을 보기 위해서는 페놀계 화합물을 비롯한 산성, 염기성 또는 합질소 화합물의 혼입이 적은 조사포닌의 분리방법 개발이 절실히 요구된다.

본 연구에서는 인삼 사포닌의 분리 방법으로서 시료를 methanol로 환류 추출한 후 *n*-butanol로 분획 추출하거나, methanol로 환류 추출 후 Diaion HP-20 수지에 흡착시킨 후 methanol로 용출하는 기존의 방법 외에 고온추출에 따른 사포닌의 화학적 변화를 막거나 사포닌의 순도를 높이거나 또는 추출단계를 줄이기 위한 세 가지 새로운 방법 즉, 상온에서 methanol로 추출한 후 Diaion HP-20 수지에 흡착시켜 methanol로 용출하는 방법, methanol 추출 후 양이온교환수지 AG 50W 흡착시켜 물로 용출하고 *n*-butanol로 분획분리하는 방법, ethyl acetate와 *n*-butanol로 직접 추출하는 방법

Corresponding author : Jae Joon Wee, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Shinsung-dong, Yousung-ku, Taejeon 305-345, Korea
Tel : 82-42-866-5332
Fax : 82-42-861-1949
E-mail : jjwee@gtr.kgtri.re.kr

등 5가지 방법에 의해 조사포닌을 분리하고, 이들의 ginsenoside 함량 및 화학성분 조성을 비교하였다.

재료 및 방법

인삼시료

본 실험에서 사용한 백삼(4년근)은 금산산 직삼과 반곡삼 20편 및 피부백삼 50편(표피가 부착됨)을 시장에서 구입하였고 홍삼은 한국담배인삼공사에서 제조한 양삼 30지를 사용하였다.

시약

Ginsenoside 표준품은 한국인삼연초연구원 품질검증실에서 분리한 Rb₁ 등 11종을 사용 하였고 methanol, *n*-butanol 등 추출용매는 일급 또는 특급 시약을 사용하였다. ferulic acid 등 페놀성 표준물질은 미국 Sigma사 제품을, 다공성 흡착수지 Diaion HP-20은 일본 Mitsubishi Kasei사 제품을 사용하였다. 양이온교환수지(Cation AG 50W, 200~400 mesh)는 미국 BIO-RAD사 제품을, TLC plate는 silica gel 60F₂₅₄ pre-coated aluminum sheet(두께 0.2 mm, 20 cm×20 cm)로서 독일 Merck사 제품을 사용하였다.

조사포닌의 분리

고온 MeOH 추출/*n*-BuOH 분획에 의한 분리: 한국산 홍삼과 백삼 분말(80 mesh)을 100 g씩 취하여 70% methanol 900 mL로 80°C에서 3회 반복 환류 추출하였다. 추출액은 60°C에서 감압농축기로 농축하여 용액이 100 mL될 때까지 methanol을 제거한 후 여기에 물을 가하여 200 mL로 정용하였다. 이 시료 200 mL와 *n*-butanol 200 mL를 분획갈대기에 취한 다음 세차게 흔들어 혼합한 후 정치하여 유기용매층과 물층을 분리하였다. 물층은 다시 200 mL의 *n*-butanol로 2회 반복 추출하였다. 3회에 걸쳐 추출한 *n*-butanol 층은 모두 합쳐 증류수 200 mL로 세척 후 약 900 mL의 *n*-butanol 층을 취하여 진공농축한 다음 무게를 측정하고 조사포닌 시료로 사용하였다(Fig. 1, Method A).

고온 MeOH 추출/Diaion HP-20 흡착/MeOH 용출에 의한 분리: 앞에서와 같은 방법으로 얻은 70% methanol 추출물 900 mL 중 300 mL 수용액을 Diaion HP-20 column(φ2.5×35 cm)에 흡착시켰다¹⁶⁾. 흡착 후 증류수(500 mL)로 수지를 충분히 세척한 다음 90% methanol(300 mL)로 용출하고 진공농축기로 농축한 다음 무게를 측정하고 조사포닌으로 사용하였다(Fig. 1, Method B).

고온 MeOH 추출/cation AG 50W 흡착/H₂O 용출/*n*-BuOH 추출을 이용한 분리: Cation AG 50W를 유리 컬럼(φ2.5×35 cm)에 충전한 다음 1 N NaOH(200 mL), 1 N HCl(200 mL), 증류수(500 mL)를 순서대로 가하여 활성화시킨 후 앞에서와 같은 방법으로 얻은 70% methanol 추출물 300 mL의 수용액을 통과시켰다. 그 다음 물 300 mL로 용출하고 이 분획과 *n*-butanol 300 mL를 분획갈대기에 취한 다음 세차게 흔들어 혼합한 후 정치하여 유기용매층과 물층을 분리하였다. 물층은 *n*-butanol 300 mL로 3회 반복 추출하였다. *n*-Butanol층 900 mL를 진공농축한 다음 무게를 측정하고 조사

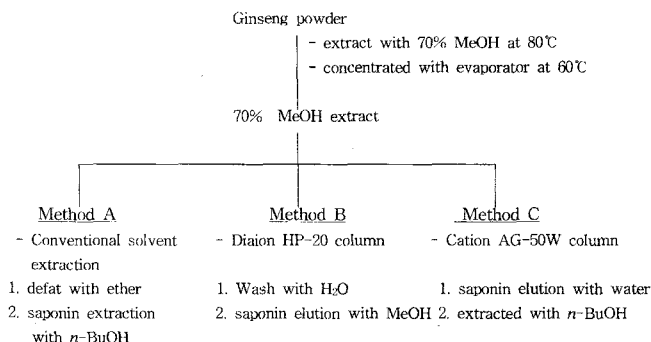


Fig. 1. Procedure for separation of crude saponins from ginseng.

포닌 시료로 사용하였다(Fig. 1, Method C).

상온 MeOH 추출/Diaion HP-20 흡착/MeOH 용출에 의한 분리: 인삼분말 시료 100 g에 70% methanol 300 mL를 넣고 실온에서 24시간 진탕시켜 3회 반복 추출하였다. 추출물은 40°C 이하에서 진공농축하여 methanol을 제거하고 Diaion HP-20(φ2.5×35 cm) 수지에 흡착시킨 후 30% methanol로 수지를 세척하고 90% methanol 500 mL로 용출하였다. 90% methanol 분획을 40°C 이하에서 진공농축하여 methanol을 제거한 후 냉동 건조(-45°C, 10 mmHg)한 다음 무게를 측정하고 조사포닌 시료로 사용하였다.

EtOAc/*n*-BuOH 직접추출에 의한 분리: 인삼분말 시료 50 g에 물을 포화시킨 ethyl acetate/*n*-butanol(4 : 1) 용매 300 mL를 가하고 80°C에서 2시간씩 2회 환류 추출한 추출액을 여과한 후 진공농축하고 무게를 측정한 다음 조사포닌 분석시료로 사용하였다. 이상의 5가지 방법으로 분리한 각 조사포닌의 중량을 각 방법에 따른 인삼분말 중 조사포닌의 함량(%)으로 나타내었다.

조사포닌 중 ginsenoside 및 비사포닌 성분 함량 분석

Ginsenoside: 조사포닌 중 개별 ginsenoside는 HPLC(미국 Waters Model 244)를 사용하여 정량하였는데, 사용한 column은 YMC-Pack NH₂(φ4.6 mm×250), 전개용매는 CH₃CN/H₂O/*n*-BuOH(8 : 2 : 1), 검출기는 RI(Refractive Index), flow rate는 1.6 mL이었다. 분리한 조사포닌 1 mg을 1 mL의 50% methanol에 용해하고 0.45 μm nylon syringe filter(Waters)로 여과하여 NH₂ column(φ4.6×250 mm)에 주입한 후 분리되는 각 ginsenoside 피크면적을 표준품의 면적과 비교하여 함량을 계산하였다.

총 질소: 조사포닌 중 총질소 분석은 Auto Kjeldahl System (Buchi 339)을 사용하여 실시하였다. 조사포닌 시료 0.5 g을 취하여 분해 촉매제 5 g을 넣고 시료의 20% 정도가 되게 conc. H₂SO₄를 첨가하였다. 분해장치의 온도를 서서히 올려 흰 연기가 나기 시작하여 파란색이 될 때까지 분해하였다. 분해된 시료는 실온으로 냉각시켜 증류되어 나오는 암모니아를 3% H₃BO₃ 40 mL에 흡수시킨 후 이를 0.1 N HCl 용액으로 적정하여 다음과 같은 식으로 총질소함량(%)을 구하였다.

$$\text{총 질소(\%)} = \frac{(A-B) \times f \times 0.0014 \times 10}{W}$$

- A: 적정에 소요된 0.1 N HCl 용액의 mL 수
 B: 공시험에 소요된 0.1 N HCl 용액의 mL 수
 f: 0.1 N HCl 용액의 factor
 W: 시료중량(g)

총아미노산 및 유리아미노산 분석을 위한 시료 전처리: 총 아미노산의 경우는 7 mL vial에 조사포닌 100 mg과 6 N HCl 1 mL를 넣고 질소로 bubbling하여 공기를 완전히 제거한 후에 신속히 마개를 막고 105°C에서 20±2 시간 동안 반응시킨 후 질소 기류 하에서 건조시켜 증류수에 용해한 후 1 N NaOH 5 mL와 1 N HCl 5 mL, H₂O 10 mL로 활성화한 양이온교환수지 AG 50W(φ0.8×4 cm)에 통과시켜 흡착시켰다. 물 10 mL로 세척 후 4.5 N NH₄OH 5 mL로 용출하여 감압농축 후 최종 100 μL로 조정하여 총아미노산 분석시료로 사용하였다. 유리 아미노산의 경우는 조사포닌 시료 200 mg을 물에 용해시킨 후 양이온교환수지 AG 50W를 이용하여 총아미노산 시료조제 방법과 동일한 방법으로 조제하였다.

아미노산의 TLC 분석: 총아미노산 및 유리아미노산의 시료를 최종 100 μL로 하여 silica gel TLC plate에 5 μL씩 점적하였다. 전개용매는 CHCl₃/CH₃OH/7N NH₄OH(4:4:1)를 사용하였으며⁽¹⁷⁾ 1% ninhydrin/ethanol을 분무하여 110°C에서 10분간 발색하였다.

아미노산의 GC 분석: 총아미노산 및 유리아미노산 시료를 Islam과 Darbre⁽¹⁸⁾의 방법 및 Knapp⁽¹⁹⁾의 방법에 따라 질소 기류하에서 건조시킨 후 3 N HCl/MeOH 0.5 mL를 넣고 100°C에서 30분간 반응시킨 다음 질소 기류 하에서 건조시킨 후 TFAA(trifluoroacetic anhydride) 200 μL를 넣고, 140°C에서 10분간 반응시킨 다음 질소 기류하에 건조시킨 후 acetone 200 μL로 정용하였다. 사용한 GC 기종은 미국 Hewlett Packard 5890, column은 fused silica capillary SPB-1(0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 mm thickness)을 사용하였고, 온도는 80°C에서 5분간 유지한 후 분당 5°C의 비율로 280°C까지 승온시켰다.

유리당 분석을 위한 시료 전처리: 조사포닌 시료 각 10 mg을 증류수 1 mL에 용해시켜 C₁₈ Sep-Pak(Waters)에 통과시킨 후 2 mL의 증류수를 통과시켜 질소 기류하에서 최종 1 mL로 하여 TLC, HPLC 분석 시료로 사용하였다.

유리당의 TLC 분석: 유리당 시료를 silica gel TLC plate에 15 μL씩 점적하였다. 전개용매로는 *n*-BuOH/CH₃COOH/ethyl ether/H₂O(9:6:3:1)를 사용하였으며⁽²⁰⁾ 발색시약은 α-naphthol을 분무한 후 110°C에서 10분간 가열하여 발색하였다.

유리당의 HPLC 분석: 유리당 시료를 0.45 μm membrane filter로 여과 후 HPLC로 유리당을 분석하였다. Column은 NH₂(φ4.6×250 mm), flow rate는 1.2 mL/min, mobile phase는 CH₃CN:H₂O(17:3),⁽²¹⁾ detector는 ELSD(Evaporative Lights Cattering Detector)를 사용하였다.

페놀계 화합물의 TLC 분석: 조사포닌 100 mg을 증류수 10 mL에 용해시킨 다음 ethyl acetate를 10 mL씩 2회 가하여 추출한 다음 유기용매층에 1 N NaOH 10 mL를 가하여 산성 성분을 추출하였다. 이 알칼리층은 pH 3.0으로 조절 후 ethyl acetate 5 mL를 넣고 세차게 흔든 다음 ethyl acetate층을 분획하여 질소 기류하에 날린 후 최종 200 μL로 하여 silica gel

TLC plate에 10 μL씩 점적하였다. 전개용매로는 toluene/ethyl acetate/HCOOH(5:4:1)를 사용하였으며, 발색시약은 Folin-Ciocalteu 시약(Sigma)을 사용하였다.

총 phenol의 비색정량: 조사포닌 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 용해시킨 후 Folin-Ciocalteu 시약 2 mL과 Na₂CO₃ 7 mL를 넣은 다음 상온에서 2시간 방치한 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 사용하였으며 총 phenol 물질의 양은 gallic acid equivalent[GAE mg/L (W/V)]로 나타내었다.

결과 및 고찰

조사포닌 함량 비교

인삼분말로부터 추출 용매의 종류와 온도, 흡착수지의 종류 등을 달리한 다섯 가지 방법, 즉 이미 알려진 방법인 고온 MeOH 추출/*n*-BuOH 분획법(BuOH법)과 고온 MeOH 추출/Diaion HP-20 흡착/MeOH 용출법(HP-20법) 그리고 본 실험에서 새로이 시도된 방법으로 고온 MeOH 추출/cation AG 50W 흡착/H₂O 용출/*n*-BuOH 추출법(AG 50W법), 상온 MeOH 추출/Diaion HP-20 흡착/MeOH 용출법(상온추출법)과 EtOAc/*n*-BuOH 직접 추출법으로 분리한 조사포닌의 함량을 비교한 결과는 Table 1과 같다. AG 50W법의 경우 조사포닌의 함량이 4.2%로서 5가지 실험방법 중 가장 높았으며 EtOAc/*n*-BuOH 직접 추출의 경우는 1.7%로 가장 낮은 것을 알 수 있는데, 이는 이 혼합 용매의 극성이 *n*-butanol에 비해 상대적으로 낮은 데서 오는 예상된 결과이다. 인삼 사포닌은 종류에 따라 결합된 당의 수가 다른데, ginsenoside Ra₁ 등은 5개, ginsenoside Rb₁, Rc 등은 4개, ginsenoside Rg₁ 등은 2개, ginsenoside Rh₁ 등은 1개로서 이에 따라 극성이 크게 다르다. 따라서 추출방법에 따라 추출물 중 ginsenoside의 상대 조성은 크게 달라질 수 있다.

조사포닌 중 ginsenoside 및 비사포닌의 성분 비교

Ginsenoside: 다섯 가지 방법으로 조제한 조사포닌 분획의 TLC 결과는 Fig. 2와 같이 나타났다. BuOH법으로 분리한 조사포닌의 경우 ginsenoside Rb₁ 아래에는 ginsenoside Ro⁽²²⁾

Table 1. Contents of crude saponins extracted from ginseng under different conditions of solvents, ion exchange resins and temperatures

Separation method	Content (%)
A	3.1
B	2.8
C	4.2
D	2.3
E	1.7

- A. Separation through hot MeOH extraction/*n*-BuOH fractionation
 B. Separation through hot MeOH extraction/Diaion HP-20 adsorption/MeOH elution
 C. Separation through hot MeOH extraction/cation AG-50W adsorption/H₂O elution/*n*-BuOH extraction
 D. Separation through cool MeOH extraction/Diaion HP-20 adsorption/MeOH elution
 E. Separation by direct extraction with boiling EtOAc/*n*-BuOH

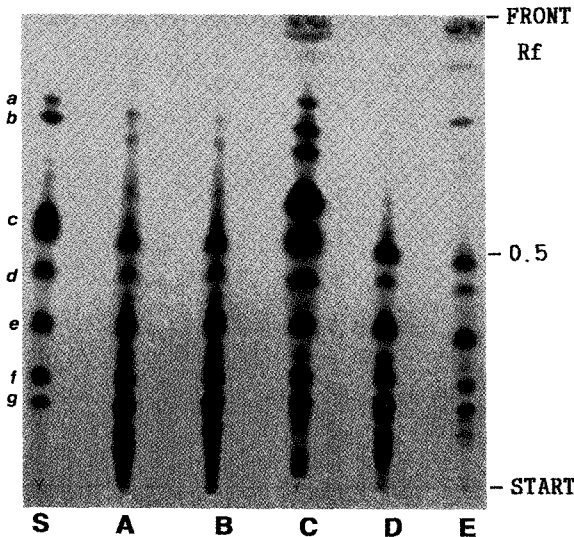


Fig. 2. TLC profiles of crude ginseng saponins separated from ginseng under different conditions of solvents, ion exchange resins and temperatures

S: authentic ginsenosides mixture, A: Direct extraction with hot MeOH/n-BuOH fractionation, B: Separation through hot MeOH extraction/Diaion HP-20 adsorption, C: Separation through hot MeOH extraction/cation AG 50W/n-BuOH extraction, D: Separation through cool MeOH extraction/Diaion HP-20 adsorption, E: Direct extraction with EtOAc/n-BuOH, a: Ginsenoside Rh₂, b: G-Rh₁, c: G-Rg₁, d: G-Rf, e: G-Rd+Re, f: G-Rb₂+Rc, g: G-Rb₁

및 ginsenoside Ra₁, Ra₂가 존재하고 있으며⁽²³⁾ HP-20법으로 분리한 조사포닌은 BuOH법에 의한 조사포닌과 대체로 비슷한 TLC 분리패턴을 나타내었다. 상온추출법으로 분리한 조사포닌은 ginsenoside Rb₁ 이하에서 malonyl-ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc 및 Rd로 추정되는 spot을 볼 수 있었다. 이 방법은 다섯 가지 조사포닌의 추출 방법 중 유일하게 끊이지 않는 방법으로서 사포닌의 추출율은 다소 떨어지나 사포닌의 분리패턴은 BuOH법 또는 HP-20법에 의해 분리된 조사포닌과 spot a, b를 제외하고는 대체로 유사함을 알 수 있다. AG 50W법으로 분리된 조사포닌은 ginsenoside Rg₁ 이상에서 prosapogenin으로 추정되는 spot이 많이 생성됨을 볼 수 있는데, 이들은 강산성의 양이온교환수지 AG 50W 칼럼을 통과하는 과정에서 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 및 Rg₁의 비당부의 C₂₀ 위치의 당이 떨어져 생성된 것으로 추정된다. EtOAc/n-BuOH 직접추출에 의한 조사포닌은 다른 조사포닌과는 대조적으로

ginsenoside Rh₁, Rg₁ 및 Re 등의 발색강도가 상대적으로 높게 나타나는 것으로 보아 이 방법에 의해 당이 1~3개 결합된 저극성 사포닌이 주로 추출되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 살펴보았듯이 malonyl ginsenoside, prosapogenin, ginsenoside Re 또는 Rg₁ 등 실험 목적에 따라 원하는 사포닌을 상대적으로 많이 얻을 수 있는 추출방법을 사용할 수 있음을 알 수 있다. 각 조사포닌 중 ginsenoside 함량을 정량한 후 각 ginsenoside가 차지하는 비율을 계산한 결과는 Table 2와 같다. 조사포닌 중 총 ginsenoside의 비율은 AG 50W법으로 분리하였을 때 61.5%로서 가장 높았으며, 상법인 BuOH 법과 HP-20법의 경우 각각 52.3과 54.9%로서 상온추출법의 경우 55.5%와 유사한 비율을 나타내었다. EtOAc/n-BuOH로 직접추출한 조사포닌의 경우는 24.7%로서 사포닌 이외의 지질로 추정되는 물질이 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다 (Table 2).

조단백질 및 아미노산: 다섯가지 방법으로 분리한 조사포닌 중에 존재하는 조단백질 함량을 측정된 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 HP-20법에 따라 얻은 조사포닌 중에 14.18%로 현저하게 높았으며, AG 50W법의 경우 0.93%, EtOAc/n-BuOH 직접추출 조사포닌은 0.54%로 사포닌 중 조단백질 함량이 매우 낮았다. EtOAc/n-BuOH 추출의 경우 Table 1에서 볼 수 있듯이 사포닌의 추출을 자체가 낮으므로 방법간 상호비교에서 제외한다면, 4가지 방법 중 AG 50W법으로 분리한 조사포닌 수득율이 4.2%로 가장 높으면서도 단백질 함량은 가장 낮게 나타나는 것으로 보아 이 방법이 단백질을 비롯한 합질소 화합물의 혼입을 가장 줄일 수 있는 방법임을 알 수 있다.

조사포닌 중 유리 아미노산과 단백질을 6N HCl로 산가수 분해하여 얻은 아미노산과 유리 아미노산을 합친 총아미노산을 TLC한 결과는 Fig. 3과 같다. 총아미노산은 Rf 0.62(a)에서 phenylalanine, Rf 0.58(b)에서 leucine+isoleucine+tyrosine+methionine, Rf 0.51(c)에서 valine, Rf 0.32(d)에서 threonine+serine+glycine+alanine이 분리되었으며 대부분의 spot이 HP-20법으로 분리한 조사포닌에서 강하게 나타난 것으로 보아 총아미노산도 가장 많이 함유한 것으로 추정된다. 사포닌 중의 유리아미노산의 경우 Rf 0.62는 phenylalanine으로서 HP-20법으로 분리한 조사포닌 중에 특히 많이 존재하는 것으로 알 수 있다.

위에서 TLC 분석에 사용한 시료중 일부를 취하여 조사포닌 중 총아미노산 및 유리 아미노산을 GC로 정량한 결과 Table 4와 같이 총아미노산함량은 HP-20법으로 분리한 조사

Table 2. Contents of ginsenosides in crude saponins separated from ginseng under different conditions of solvents, ion exchange resins and temperatures

Separation method ¹⁾	Ginsenoside (%)						
	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rf+Rg ₁	Total
A	11.0	8.0	6.3	3.7	8.4	14.9	52.3
B	9.6	7.4	8.2	2.8	10.1	16.8	54.9
C	12.5	8.8	10.7	3.6	9.1	16.8	61.5
D	11.3	9.4	8.4	2.6	10.2	13.6	55.5
E	4.7	3.6	1.5	1.8	5.4	7.7	24.7

¹⁾Notes are the same as in Table 1

Table 3. Crude protein contents of crude saponins separated from ginseng under different conditions of solvents, resins and temperatures

Separation method ¹⁾	Crude protein(%)
A	7.37
B	14.18
C	0.93
D	5.81
E	0.54

¹⁾Notes are the same as in Table 1

포닌이 7.35%, BuOH법 조사포닌이 5.17%, 상온추출법 조사포닌이 1.42%, AG 50W법 조사포닌이 0.59%의 순서로 나타났으며 이러한 결과는 HP-20법으로 분리한 조사포닌 중에 조단백질의 함량이 가장 높게 나타난 결과와 일치한다. 인삼의 아미노산은 인삼 분말 또는 수삼을 시료로 사용하여 분석하는 경우가 대부분이며 그 분석값을 보면 본 연구에서와 같이 조사포닌 중에서 측정된 결과와는 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. 즉 이와 박은⁽²⁴⁾ 6년근 수삼의 동체 중심의 유리아미노산의 조성 중 arginine(58%), glycine(8.2%), lysine(5.9%)등이 주요한 구성 아미노산이라고 보고하였다. 성등⁽²⁵⁾은 홍삼 추출물중 유리아미노산을 조사한 결과 lysine을 비롯하여 17종을 확인하였고 그 중 arginine이 70% 이상 점유하였다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 arginine은 HP-20법으로 분리한 조사포닌 중에서만 존재하였다. 따라서 인삼 분말이나 수삼중에 존재하는 총아미노산과 인삼분말로부터 추출된 조사포닌 중의 총아미노산과는 조성비율이 많이 다른 것을 알 수 있었다. 또한 조사포닌의 추출방법에 따라 조사포닌 중의 총아미노산의 조성이 다른 것을 알 수 있었다.

유리아미노산은 BuOH법, HP-20법, AG 50W법 그리고 상온추출법으로 분리한 조사포닌에서 각각 1.87%, 3.15%, 0.19%, 0.59%로 나타난 바와 같이 BuOH법으로 분리한 조사포닌 중 가장 높은 것을 볼 수 있었으며 이것은 TLC 결과와 일치하는 경향이었다. 유리아미노산의 경우 alanine은 AG-50W법으로 분리한 조사포닌에서만 검출되었으며 HP-20법으로 분리한 조사포닌에서는 valine이 0.16%로서 다른 조사포닌에서 검출되지 않았으나 HP-20법으로 분리한 조사포닌에서만 특징적으로 나타났고 phenylalanine도 1.70%로서 다른 조사포닌에 비해 매우 높은 함량을 나타내었다. 그 밖에 BuOH법으로 분리한 조사포닌에서만 aspartic acid가 0.20%로 검출된 점도 특징적이었다.

유리당: 인삼 조사포닌은 일반적으로 인삼 분말의 70% methanol 추출물로부터 diethyl ether로 탈지조작을 거친 다음 물이 포화된 n-butanol로 분배추출함으로써 얻어지는데, 이 과정에서 70% methanol 추출물 중에 포함되어 있던 다량의 유리당 중 상당량이 n-butanol 층으로 넘어오게 되며 이것이 조사포닌 중 순수 사포닌 함량을 낮추는 한 요인이 된다. 따라서 본 연구에서는 유리당 유입을 줄이기 위한 방법으로 BuOH법 이외에 HP-20법, AG 50W법 등을 이용하여 조사포닌을 분리하고 각각의 유리당 함량을 TLC 및 HPLC로 비교 확인하였다. 유리당 분석시료의 TLC 결과는 Fig. 4와 같이

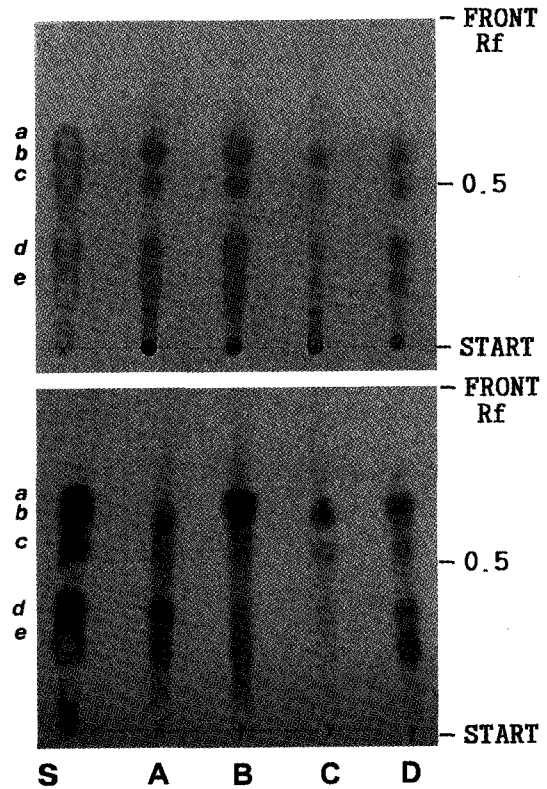


Fig. 3. TLC profiles of total(upper plate) and free(lower plate) amino acids in crude saponins separated from ginseng under different conditions of solvents, resins and temperatures

S: authentic amino acids mixture, a: Phe, b: Ieu+Ile+Tyr+Met, c: Val, d: Thr+Gly+Ser+Ala, e: Glu+Arg+His, A, B, C and D: Refer to footnote of Fig. 2

나타났다. BuOH법으로 분리된 조사포닌 중에는 다량의 sucrose가 존재함을 알 수 있었으나 HP-20법, 상온추출법 그리고 AG 50W법으로 분리된 조사포닌 중에는 유리당이 많이 제거됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 추출방법에 따라 조사포닌 중 유리당 함량이 현저한 차이가 있음을 시사한다.

TLC에 나타난 결과를 확인하기 위하여 조사포닌으로부터 유리당 시료를 조제하여 HPLC한 결과 BuOH법으로 분리한 조사포닌에서만 sucrose 피크가 현저하게 나타나 TLC에서 나타난 spot이 sucrose임을 알 수 있었다. 함량을 계산한 결과는 Table 5와 같다. 김과 박⁽²⁶⁾은 수삼을 물로 추출할 경우 추출물 중에 존재하는 당류의 90% 이상이 sucrose라고 보고하였고 최 등⁽²⁷⁾의 보고에 따르면 백삼류의 경우 sucrose가 총 유리당의 91.3%로서 대부분의 유리당은 sucrose라고 하였는데, 상당량의 sucrose가 수포화 n-butanol로 분배 추출시 사포닌과 함께 추출되어 조사포닌 분획으로 이행됨을 알 수 있었다. HP-20법으로 분리된 조사포닌에서는 sucrose의 피크가 거의 나타나지 않는 것으로 보아 다공성 흡착수지인 Diaion HP-20은 유리당과 사포닌을 분리할 수 있는 좋은 흡착제임을 알 수 있었다.

폐놀계 화합물: 다섯가지 방법으로 분리된 조사포닌으로부터 폐놀계 화합물을 추출하여 TLC한 결과, 발색강도로 보아 BuOH법, HP-20법 그리고 상온추출법으로 분리한 조사포닌은 거의 비슷한 정도의 폐놀계 화합물을 함유하는 것으로 나

Table 4. Contents of total and free amino acids in crude saponins separated from ginseng under different conditions of solvents, resins and temperatures (Unit: %)

Amino acid	Separation method ¹⁾							
	A		B		C		D	
	T ²⁾	F ³⁾	T	F	T	F	T	F
Alanine	0.12	nd ⁴⁾	0.13	nd	nd	0.04	nd	nd
Glycine	0.17	0.06	0.25	nd	0.30	0.13	0.07	nd
Leucine	0.60	0.06	0.52	nd	0.14	0.81	0.13	0.07
Isoleucine	0.27	0.01	0.24	nd	nd	0.32	0.08	nd
Serine	1.12	nd	nd	0.24	nd	nd	0.27	nd
Valine	0.72	nd	0.50	0.16	nd	nd	nd	nd
Proline	0.20	0.19	0.49	0.04	0.04	0.07	0.10	0.04
Aspartic acid	0.23	0.19	0.77	nd	nd	nd	nd	nd
Histidine	0.19	0.23	0.35	0.35	nd	0.15	0.16	nd
Glutamic acid	0.91	0.27	1.52	0.59	0.04	0.07	0.17	0.12
Tyrosine	nd	nd	0.40	nd	nd	nd	nd	nd
Phenylalanine	0.55	0.79	1.29	1.70	0.07	0.27	0.20	0.20
Lysine	0.09	0.07	0.67	0.05	nd	nd	0.23	0.16
Arginine	nd	nd	0.22	nd	nd	nd	nd	nd
Total	5.17	1.87	7.35	3.15	0.59	0.19	1.42	0.59

¹⁾Notes are the same as in Table 1
²⁾Total amino acid
³⁾Free amino acid
⁴⁾Not detected

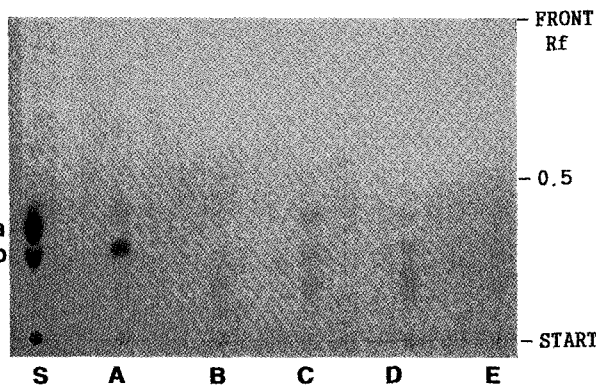


Fig. 4. TLC profiles of free sugars in crude saponins separated from ginseng under different conditions of solvents, resins and temperatures

TLC plate: Silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated aluminium sheet, Developing solvent: *n*-BuOH/CH₃COOH/ethyl ether/H₂O (9 : 6 : 3 : 1), Spray reagent : α -Naphthol, S: authentic free sugars mixture, a: glc+frc, b: sucrose, A, B, C, D and E: Refer to footnote of Fig. 2

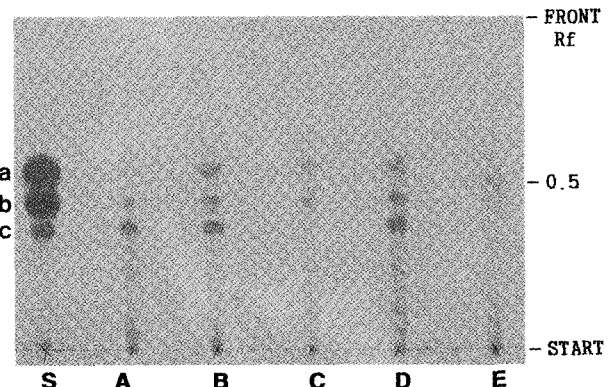


Fig. 5. TLC profiles of phenolic compounds in crude saponins separated from ginseng under different conditions of solvents, resins and temperatures

S: authentic phenolic acids mixture, a: *p*-coumaric+vanillic+*p*-OH-benzoic+ferulic acid, b: gentisic+caffeic acid c: polyphenol, A, B, C, D and E: Refer to footnote of Fig. 2

타났으나 AG 50W법으로 분리된 조사포닌 중에는 페놀계 화합물이 상당히 감소되는 것으로 나타나 강산성의 양이온 교환수지 사용이 조사포닌 중 페놀계 화합물을 줄일 수 있는 좋은 방법임을 알 수 있었다. EtOAc/*n*-BuOH 직접추출에 의한 조사포닌 중에는 페놀계 화합물이 거의 없는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

각 조사포닌 중 총phenol 함량을 비색정량한 결과는 Table 6과 같은데, HP-20법으로 분리된 조사포닌 중 총 페놀함량이 2.2%로서 가장 높은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 TLC에서 나타난 결과와도 일치하는 경향이였다.

요 약

인삼의 약리활성 성분인 사포닌 성분의 추출분획 중 ginsenoside 함량을 높이거나 화학적 성분 변화를 줄이거나 또는 추출과정을 간편화하기 위한 새로운 추출 분획 방법을 정립하고 기존의 방법과 화학적 조성을 비교하였다. 인삼사포닌의 분획분리 방법으로서 일반적인 고온 MeOH/*n*-BuOH추출법(BuOH법) 및 고온 MeOH/Diaion HP-20법(HP-20법) 이외에도 새로운 3가지 방법, 즉 고온 MeOH 추출/cation AG 50W 흡착/H₂O 용출/*n*-BuOH 추출법(AG 50W법), 상온 MeOH/Diaion HP-20법(상온추출법), EtOAc/*n*-BuOH 직접추출

Table 5. Free sugar contents of crude saponins separated from ginseng under different conditions of solvents, resins and temperatures

Separation method ¹⁾	Free sugar (%)
A	13.5
B	0.3
C	0.6
D	<0.1
E	<0.1

¹⁾Notes are the same as in Table 1

Table 6. Total phenol contents of crude saponins separated from ginseng under different conditions of solvents, resins and temperatures

Separation method ¹⁾	Total phenol (%)
A	1.0
B	2.2
C	0.3
D	0.3
E	0.1

¹⁾Notes are the same as in Table 1

법으로 조사포닌을 분리하였다. AG 50W법에 의한 조사포닌 중 총 ginsenoside 함량은 61.5%로 가장 높았으며 반대로 단백질과 유리 아미노산 함량은 각각 0.93과 0.19%로 다른 방법에 비해 현저히 낮게 나타났다. 단백질의 함량은 HP-20법에 의한 분리가 14.18%로 가장 높았고, 유리당은 BuOH법이 13.5%로서 HP-20법 및 AG 50W법에 비해 20~40배 높은 것으로 나타나 유리당이 BuOH법에 의한 조사포닌 중 순수 조사포닌 함유 비율을 낮추는 한 요인임을 알 수 있다. 한편, 본 연구에서 새로이 정립한 AG 50W법의 경우 prosapogenin의 생성이 많았다. 그 밖에, 사포닌 분석시료의 신속한 조제를 위하여 추출과정을 단축하여 EtOAc/n-BuOH 혼합용매로 직접 환류추출할 경우, ginsenoside R_g과 R_e의 조성이 높게 나타났다. 본 연구 결과는 조사포닌의 조제 방법에 따라 ginsenoside, 유리당 및 조단백질 등 화학성분의 조성이 현저히 다르며 실험목적에 따라 적절한 방법이 이용될 수 있음을 시사한다.

문 헌

- Benishin, C.G. Action of ginsenoside R_{b1} on choline uptake in central cholinergic nerve endings. *Neurochem. Int.* 21(1): 1-5 (1992)
- Saito, H. and Nishiyama, N. Effect of ginseng and its saponins on experimental amnesia in mice and on cell cultures of neurons. pp. 92-98. In: Proc. 5th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea (1988)
- Kikuchi, Y., Sasa, H., Kita, T., Hirata, J. and Tode, T. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation *in vitro* by ginsenoside-Rh2 and adjuvant effects of cisplatin *in vivo*. *Anticancer Drugs(England)* 2(1): 63-67 (1991)
- Singh, V.K., Agarwal, S.S. and Gupta, B.M. Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract. pp. 225-232. In: Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea (1984)
- Huo, Y. and Chen, Y. The effect of *Panax ginseng* extract(GS) on

- insulin and corticosteroid receptors. *J. Traditional Chinese Medicine* 8(4): 293-295 (1988)
- Oura, H. and Hiai, S. Physiological chemistry of ginseng. *Metabolism Disease* 10: 564-569 (1973)
- Kim, H.Y., Chen, X. and Gillis, C.N. Ginsenosides protect pulmonary vascular endothelium against free radical induced injury. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189(2): 670-676 (1992)
- Kang, S.Y. and Kim, N.D. The antihypertensive effect of red ginseng saponin and the endothelium-derived vascular relaxation. *Korean J. Ginseng Sci.* 18: 175-182 (1992)
- Ogita, S. and Samugawa, K. Clinical effectiveness of Korea ginseng on patients with climacteric disturbances. *The Ginseng Review* 18: 95-97 (1994)
- Saito, H. and Bao, T.T. Effect of red ginseng on mice exposed to various stress. pp. 97-105. In: Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea (1984)
- Brekhman, I.I. Ancient ginseng and pharmacology. pp. 6. In: Proc. Symp. Gerontology, Lugano, Switzerland (1976)
- Mei, B., Wang, Y.E., Wu, J.X. and Chen, W.Z. Protective effect of ginsenosides on oxygen free radical induced damages of cultured vascular endothelial cells *in vitro*. *Yao Hsueh Hsuuh Pao* 29(11): 801-808 (1994)
- Han, B.H., Han, Y.N. and Park, M.H. Chemical and biochemical studies on antioxidant components. pp. 485-498. In: *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*, Chang, H.W., Yeung, H.W., Tso, W.W. and Koo, A. (eds.). World Scientific Co., Singapore (1985)
- Park, H., Cho, B.G. and Lee, M.K. Nitrogen compounds of Korean ginseng and their physiological significance. pp. 175. In: Proc. Int'l. Symp. on Kor. Ginseng, Seoul, Korea (1984)
- Kim, M.W., Lee, J.S., Nam, K.Y. Saponin contents in various parts of raw red ginseng. *Korean J. Ginseng Sci.* 8(1): 8-14 (1984)
- Duc, N.M., Nham, N.T., Kasai, R., Ito, A., Yamasaki, K. and Tanaka, O. Saponin from Vietnamese ginseng *Panax vietnamensis* HA et GRUSHV. *Chem. Pharm. Bull.* 41(11): 2010-2014 (1993)
- Stahl, E. Thin-Layer Chromatography. pp. 739-756. Springer-Verlag, Berlin, Germany (1969)
- Islam, A. and Darbre, A. Gas-liquid chromatography of trifluoroacetylated amino acid methyl esters development of a mixed stationary phase for their separation. *J. Chromatog.* 43: 11-24 (1969)
- Knapp, D.R. Handbook of Analytical Derivatization Reactions. pp. 250-251. John Wiley & Sons, New York, USA (1979)
- Stahl, E. Thin-Layer Chromatography. pp. 810-837. Springer-Verlag, Berlin, Germany (1969)
- Nollet, L.M.L. Food Analysis by HPLC. pp. 265. Marcel Dekker, Inc., New York, USA (1992)
- Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S. and Ohsawa, T. Protopanaxadiol, a genuine saponin of ginseng saponins. *Chem. Pharm. Bull.* 14(60): 595-600 (1966)
- Besso, H., Kasai, R., Saruwatari, Y., Fuwa, T. and Tanaka, O. Ginsenoside-Ra₁ and Ginsenoside-Ra₂, new dammarane-saponins of ginseng roots. *Chem. Pharm. Bull.* 30: 2380-2385 (1982)
- Lee, M.K., Park, H. Free amino acids of xylem-pith in *Panax ginseng* root. *Korean J. Ginseng Sci.* 11(1): 32-38 (1987)
- Sung, H.S., Kim, W.J., Yang, C.B. Effect of extraction temperature and ethanol concentration on nitrogenous constituents of red ginseng extract. *Korean J. Ginseng Sci.* 9(1): 265-273 (1985)
- Kim, M.W., Park, N.J. Changes in free amino acids sugars in water-soluble extracts of fresh ginseng during browning reaction. *Korean J. Ginseng Sci.* 5(2): 122-131 (1981)
- Choi, J.H., Jang, J.G., Park, K.D., Park, M.H., Oh, S.K. High performance liquid chromatographic determination of free sugars in ginseng and its products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 13(2): 107-113 (1981)

(2000년 8월 31일 접수)