

## High-speed countercurrent chromatography를 이용한 인삼 saponin의 대량 분리 농축

이창호\* · 이부용  
 한국식품개발연구원

### Preparative Isolation of Ginseng Saponin from *Panax ginseng* Root Using High-speed Countercurrent Chromatography

Chang-Ho Lee\* and Boo-Yong Lee  
 Korea Food Research Institute

Ginseng saponin was isolated from *Panax ginseng* root using high-speed countercurrent chromatography (HSCCC). Preliminary studies were performed to optimize physical properties of two-phase solvent system and operating parameters including rotation speed of column, elution mode of mobile phase, and flow rate. Two-phase solvent system for isolation of ginseng saponins was composed of chloroform, water, and methanol as blending solvent. Chloroform-aqueous methanol (4 : 6) systems with various concentration of methanol in water were evaluated for retention of stationary phase in column. Retention of stationary phase decreased with increasing flow rate in tail-to-head elution mode using upper phase as mobile phase and head-to-tail elution mode using lower phase as mobile phase. Latter mode produced high retention at flow rate of 5 mL/min. Optimum conditions for isolation of saponin were chloroform/methanol/water (40/39/21) solvent system; mobile phase, of lower organic layer, flow rate, of 5 mL/min, head to tail elution mode, rotation speed, of 800 rpm, and sample injection, of 200  $\mu$ L. Recovery yield of ginseng saponin from *Panax ginseng* root extract by HSCCC was 63.6%, and the purity of HSCCC fractions was verified by TLC.

**Key words:** high-speed countercurrent chromatography (HSCCC), saponin, *Panax ginseng*, two-phase solvent system

## 서 론

Countercurrent chromatography(CCC)는 liquid-liquid partition chromatography로 부터 발전한 새로운 분리 기술로 기존의 HPLC방식과는 달리 서로 섞이지 않고 혼합후 2개의 층으로 분리되는 용매시스템을 이용한 것으로 분리된 2개의 층중 한 층을 이동상으로, 또다른 층을 고정상으로 하여 고체 지지체없이 물질을 분리 정제할 수 있는 시스템이다. Countercurrent chromatography기법은 Craig(1,2)에 의해 고안된 countercurrent distribution(CCD) 개념에서 출발한다. CCD의 경우 용매의 혼합 후 상평형이 단순한 중력에 의해서만 이루어지므로 분리하는데 매우 긴 시간이 소요될 뿐 아니라 분배 효율을 따지는 plate 수가 제한되어 분리능이 매우 낮기 때문에 장치의 지속적인 개선을 통하여 CCC로 발전하였다(3-7). CCC는 이와 같은 일련의 분배과정을 한 개의 튜브 내에서 연속적으로 일어나도록 고

안된 시스템으로 전체적인 구성은 pump, injector, countercurrent chromatograph 본체, detector, recorder, fraction collector로 구성 되어 있어서 HPLC와 유사하나, 물질의 분리 정제가 이루어지는 컬럼 부분이 크게 다르다. CCC의 컬럼은 PTFE(polytetrafluoroethylene) 튜브가 다층으로 감겨있는 원통형의 홀더 3개가 서로 기어를 통해 물려있으며, 홀더가 회전과 공전을 통해 튜브의 꼬임을 방지하는 rotary seal-free flow centrifuge시스템으로 되어 있다(8). 이러한 형식의 CCC는 이미 은행잎으로부터 혈류개선 효능이 우수한 flavonoglycoside의 대량 분리에 매우 효과적인 것으로 나타났다(9). 본 연구에서는 한방에서 약재로 널리 이용되는 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)으로부터 사포닌을 대량분리 하는데 CCC 기법을 적용하고자 하였다. 인삼의 주된 약리 효능을 나타내는 성분인 사포닌은 dammarane계 triterpene 배당체로 진세노사이드(ginsenosides)라고 하며 aglycone 부분의 -OH의 수에 따라 protopanaxadiol계 사포닌과 protopanaxatriol계 사포닌으로 구분되며(10) 면역증강작용, 암세포전이억제, 당 및 지질대사 촉진 등의 약리 작용이 알려져 있다(11). 현재 인삼 사포닌에 대한 추출방법으로 용매 추출법이 주로 사용되고 있으나 추출시간이 장시간 소요되어 대량의 시료를 신속히 처리하는데 문제가 있다(12-14). 따라서 본 연구에서는 컬럼을 고속으로 회전하여 분리능을 증대시킨 high-speed

\*Corresponding author: Chang-Ho, Lee, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyon-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea  
 Tel: 82-31-780-9226  
 Fax: 82-31-780-9234  
 E-mail: chang@kfri.re.kr

countercurrent chromatograph를 이용하여 인삼으로부터 생리 활성 성분인 saponin의 대량 분리 농축을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 인삼 사포닌 추출물 제조

본 실험에 사용한 인삼은 금산지역의 재배농가에서 구입한 5년근으로 동결 건조한 후 60 mesh로 분쇄하여 HSCCC에 적용하기 위한 조추출 공정을 행하였다. 건조 인삼분말 10g을 80% methanol 300 mL와 혼합하여 1시간 동안 환류 추출한 후 여과하고 이를 감압 농축한 후 증류수 200 mL에 녹인 다음 분액여두에 넣고 ether 200 mL를 가하여 추출하였다. 물층에 같은 부피의 butanol을 가하여 추출하고 saponin 성분이 포함된 butanol층을 감압 농축시킨 후 증류수 30 mL로 정용하여 인삼 saponin extract를 제조하였다.

### Solvent system 선정

인삼 saponin의 대량 분리를 위한 최적의 용매시스템을 선정하기 위하여 chloroform, methanol, water의 세 가지 용매로 구성된 시스템에서 aqueous-methanol 분획 중 methanol의 함량을 10%에서 70%까지 증가시키면서 인삼 saponin extract의 분배계수를 측정하였다. 분배계수 측정은 254 nm에서의 흡광도를 측정하여 상층부와 하층부의 농도비로 계산하였다.

$$\text{Partition coefficient}(K) = \frac{C_U}{C_L}$$

$C_U$ : Solute concentration of upper stream

$C_L$ : Solute concentration of lower stream

### 용매시스템의 계면장력 측정

Aqueous methanol 중의 methanol 함량에 따른 2상계 용매시스템의 계면장력(interfacial tension)은 Surface tensiometer(Fisher, Model 20, USA)를 이용하여 측정하였다.

### 고정상 체류율 측정

CCC의 분리능(resolution)에 크게 영향을 미치는 컬럼내 고정상 체류율 측정은 먼저 컬럼을 고정상으로 전부 채운 다음 일정한 속도로 회전시키면서 이동상을 주입하였다. 이동상이 컬럼내로 흘러 들어가면서 고정상이 밀려나오다가 컬럼내 이동상과 고정상 사이에 평형이 이루어져 더 이상 고정상이 밀려나오지 않고 이동상만 흘러나오게 되는 시점까지 밀려나온 고정상 용매를 측정하여 컬럼내에 체류되는 고정상 양을 계산한다. 본 실험에 사용한 HSCCC 컬럼 내 체류되는 고정상의 비율은 전체 컬럼의 부피 325 mL에 대한 고정상의 비율로써 나타내었다.

### HSCCC system

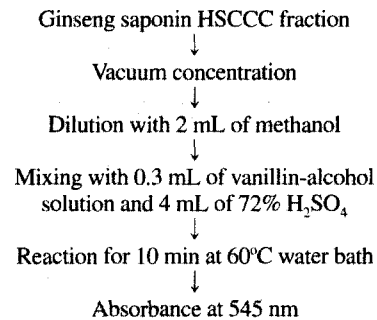
본 실험에 사용한 HSCCC system은 본체인 preparative CCC (Model: CCC-1000, Pharma-Tech Research Corp. USA), piston pump(Gilson 305, 306, France), UV/VIS detector(Gilson 118, France), fraction collector(Gilson FC204, France), integrator(SP4600, Spectra-Physics, USA)를 사용하였으며 작동 조건은 Table 1과 같다.

### TLC를 이용한 인삼 saponin 순도 확인

HSCCC를 통하여 분리된 인삼 saponin 분획의 순도를 확인

**Table 1. Operation conditions of high-speed countercurrent chromatograph (HSCCC)**

Apparatus:	CCC-1000 (Pharma-Tech Research Corp. USA)
Column:	ID 1.6 mm PTFE tube
Column volume:	325 mL
Column rotation speed:	800 rpm
Flow rate:	5 mL/min
Injection:	200 $\mu$ L
Mobile phase:	Lower phase
Elution mode:	Head to tail
Detection:	UV detector 254 nm



**Fig. 1. Determination of ginseng saponin in HSCCC fractions.**

하기 위하여 TLC를 사용하였으며 이 때 사용한 TLC plate는 silica gel 60(20×20 cm, Merck Co., Germany)이었으며 전개용매로는 chloroform/methanol/water(40/39/21, v/v/v) 용매시스템의 하층부를 사용하였다.

### 인삼 saponin 정량

HSCCC를 통하여 분리된 각 분획의 총 saponin 함량은 Fig. 1과 같은 방법으로 정량하였다(15).

## 결과 및 고찰

### Solvent system 선정

HSCCC에서 활성 물질의 분리 시 가장 중요한 일은 적합한 용매시스템을 선정하는 일이다. 일반적으로 HSCCC에 적합한 최적의 용매시스템은 settling time이 30초 이내로 충분리가 신속히 이루어져야 하며 층 분리 후 부피비가 비슷하여 이동상 선정 시 용매의 낭비를 최소화할 수 있어야 한다. 또한 분리하고자 하는 물질의 분배계수가 1을 중심으로 하여 일정한 간격으로 분포하여야 한다. 컬럼내 고정상 유지율(retention volume)이 작으면 peak resolution이 감소하며 반대로 너무 크면 과도한 mixing 효과에 의해 sample의 peak가 넓어지기 때문에 적절하여야 한다(16,17). Fig. 2는 chloroform/methanol/water 용매시스템에서 chloroform을 40%로 고정시키고 나머지 60% aqueous methanol 중에서 methanol의 함량을 10%에서 70%까지 첨가하여 극성을 달리 하였을 때 인삼 saponin extract의 분배계수 분포를 나타낸 것이다. Aqueous methanol중 methanol의 함량 10%에서 70% 범위에서의 인삼 saponin extract의 분배계수 값은 0.245에서 1.913의 범위를 나타내어 비교적 넓은 범위의 영역에서 HSCCC를 이용한 물질 분리에 유효한 분배계수 값을

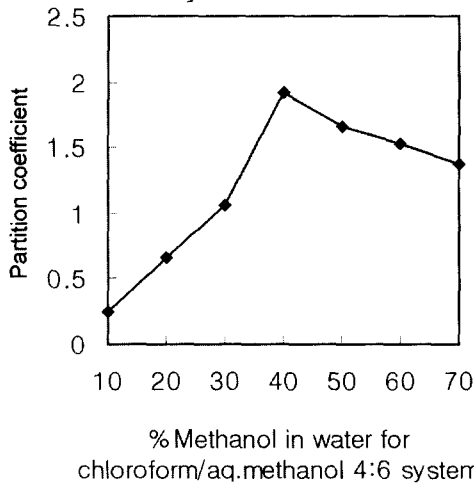
**Table 2. Retention of stationary phase in column with various flow rate of mobile phase at 800 rpm of column rotation speed**

Mobile phase (Elution mode)	%Methanol <sup>1)</sup>	Interfacial tension (dynes/cm)	Flow rate (mL/min)				
			0.5	1.0	2.0	3.0	5.0
Lower phase (H → T) <sup>2)</sup>	10	25.1	87	82	82	80	75
	20	18.6	86	82	82	79	74
	30	17.6	87	85	83	80	75
	40	14.6	88	86	83	81	78
	50	9.9	88	83	83	81	76
	60	7.0	88	86	82	80	75
Upper phase (T → H) <sup>3)</sup>	10	25.1	95	89	75	0	0
	20	18.6	94	0	0	0	0
	30	17.6	94	92	0	0	0
	40	14.6	93	91	87	83	0
	50	9.9	92	89	86	79	0
	60	7.0	91	88	86	82	0

<sup>1)</sup>% methanol in water for chloroform/aqueous methanol (4:6) system.

<sup>2)</sup>Head to tail direction.

<sup>3)</sup>Tail to head direction.

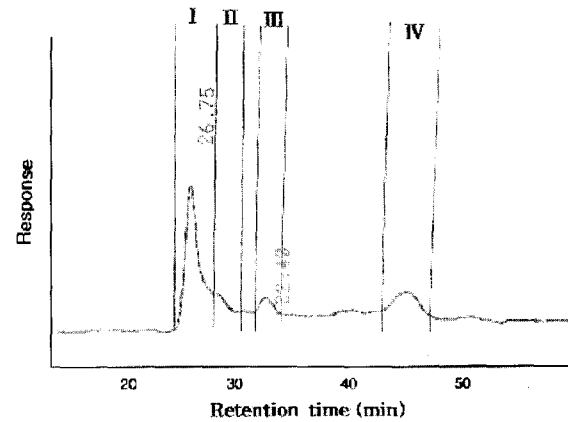


**Fig. 2. Changes in partition coefficients of ginseng extract with the increase of methanol concentration in the solvent system.**

나타내었다. 본 실험에서는 분배계수 값이 1.5 정도를 가지며 고정상을 컬럼내에 적절히 유지시키고 상하층부의 부피비를 고려하여 aqueous methanol 중에서 methanol 함량을 65%로 한 chloroform/methanol/water(40/39/21, v/v/v) 용매시스템을 선정하였다.

#### HSCCC 작동 조건 선정

HSCCC 작동 시 물질의 분리능은 용매시스템 이외에 HSCCC 컬럼 회전수, 이동상의 유속, elution mode 등에 의해서 많은 영향을 받게 된다. Table 2는 컬럼의 회전속도를 800 rpm으로 고정된 후 이동상의 유속 및 elution 방식에 따른 컬럼내 고정상의 체류율을 측정된 것이다. HSCCC에서는 상하층부 사이의 계면장력의 크기에 따라 컬럼내에서의 두 층의 방향성이 달라지게 된다. 계면장력이 큰 용매 시스템, hexane/water 시스템의 경우 하층부(heavy phase)가 tail(컬럼 회전 시 컬럼내에서 물질이 이동하려는 쪽을 head, 그 반대 쪽을 tail이라고 함)쪽으로 향하게 되어 이동상이 하층부인 경우 head to tail, 상층부인 경



**Fig. 3. Countercurrent chromatogram of ginseng saponin from *Panax ginseng* root using HSCCC.**

우 tail to head mode가 되며, 반면 계면장력이 매우 작은 sec-butanol/water 시스템에서는 하층부가 head 방향으로 향하게 되어 이동상의 elution 방향은 반대가 된다(18). 본 실험에서의 chloroform/methanol/water 용매시스템에서는 하층부를 이동상으로 한 경우 head to tail, 상층부를 이동상으로 한 경우에는 tail to head mode에서 고정상에 컬럼내에 체류되었으며, 반대로 하층부를 이동상으로 사용한, tail to head mode, 상층부를 이동상으로 사용한, head to tail mode에서는 고정상이 컬럼내에 유지되지 않아 부적합한 것으로 나타났다. 용매시스템의 계면 장력은 aqueous methanol 중 methanol의 함량이 10%인 경우 25.1 dynes/cm에서 70% 인 경우 7.0 dynes/cm로 나타났으며 고정상의 체류 정도에는 영향을 미치지 않았다. 또한 이동상의 유속이 증가할 수록 고정상의 체류정도는 감소하는 경향을 나타내었으며, 하층부를 이동상으로 한 head to tail mode에서 이동상의 유속이 5 mL/min인 경우에도 75% 이상 체류율을 나타내어 chloroform/methanol/water 용매시스템에서는 하층부를 이동상으로 한 head to tail mode에서 이동상의 유속 5 mL/min의 조건이 적합한 것으로 판단되었다. 보고에 의하면 이동상의 유속은 HSCCC의 효율에 크게 영향을 미치며 유속이 작을수록 고정상의 컬럼내 체류는 증가한다고 보고되고 있다(19-21).

Table 3. Amounts of total saponin in HSCCC fractions

(µg/200 mg)

	Fraction No.				Ginseng extract
	I	II	III	IV	
Total saponin	297.5 ± 15.15 <sup>1)</sup>	150.6 ± 18.30	31.0 ± 3.0	71.6 ± 6.37	865.5 ± 25.72

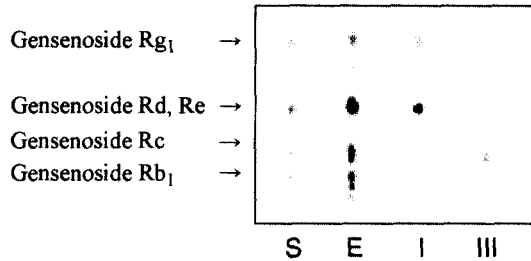
<sup>1)</sup>Average ± SD

Fig. 4. TLC chromatogram of HSCCC fractions of ginseng extract (S: standard, E: ginseng extract, I: fraction I, III: fraction III).

### HSCCC를 이용한 인삼saponin의 분리 농축

HSCCC를 이용하여 인삼 추출물로부터 saponin을 분리하였으며 Fig. 3는 분리된 인삼saponin의 크로마토그램이다. 분리된 크로마토그램 상에서 분획을 각 4개 peak로 나누어 saponin의 함량을 Fig. 1의 방법에 따라 정량하였으며 그 결과 Table 3과 같다.

HSCCC를 통하여 분리된 총 saponin의 양은 550.7 µg으로 나타났다. 같은 방법으로 정량한 인삼 extract 200 µL 중에 존재하는 총 saponin의 양 865.5 µg과 비교하여 전체 수율은 63.6%로 나타났다. HSCCC를 통하여 분리된 분획들의 순도를 TLC를 통하여 각 분획들의 순도를 확인한 결과는 Fig. 4와 같다. 분획 I에서 ginsenoside R<sub>g</sub>, R<sub>d</sub>, R<sub>e</sub> 성분이 검출되었으며 분획 III에서는 ginsenoside R<sub>c</sub> 성분이 확인되어 HSCCC를 통하여 인삼 saponin이 비교적 고순도로 분리되고 있어 HSCCC가 생리활성 물질의 대량 분리에 효과적임을 확인할 수 있었다.

### 요 약

이상계 용매시스템을 이용하여 물질을 고순도로 대량 분리할 수 있는 기술인 countercurrent chromatography를 이용하여 인삼으로부터 생리활성 성분인 saponin을 대량 분리 농축하였다. 용매 조성별 인삼 saponin의 분배계수에 따른 인삼 saponin 분리에 적합한 용매시스템은 chloroform/methanol/water(40/39/21, v/v/v)으로 결정되었으며 HSCCC의 작동 조건은 chloroform/methanol/water 용매시스템의 하층부를 이동상으로 한 head to tail mode에서 이동상의 유속 5 mL/min, 인삼추출물 injection량 200 µL, 컬럼회전속도 800 rpm의 조건이 적합한 것으로 판단되었다. 이러한 조건하에서 분리된 인삼saponin의 양은 550.7 µg으로 HSCCC에 주입한 인삼 추출물 200 µL중에 존재하는 총 saponin의 양 865.5 µg에 비교하여 전체 수율은 63.6%로 나타났다. TLC로 각 분획의 순도를 확인할 수 있었다.

### 문 헌

- Craig LC, Post O. Apparatus for countercurrent distribution. Anal. Chem. 21: 500-504 (1949)
- Craig LC, Hausman W, Ahrens EH, Harfenist EJ. Automatic countercurrent distribution equipment. Anal. Chem. 23: 1236-1244 (1951)
- Mandava NB, Ito Y, Conway WD. Part one, Countercurrent chromatography: Historical development and early instrumentation. Am. Lab. 14: 62-78 (1982)
- Mandava NB, Ito Y, Conway WD. Part two, Countercurrent chromatography: Recent instrumentation and application. Am. Lab. 14: 48-57 (1982)
- Ito Y. Countercurrent chromatography. Trend Biomed. Sci. 7: 47-50 (1982)
- Murayama W, Kobayashi T, Kosuge Y, Yano H, Nunogaki Y, Nunogaki K. A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. J. Chromatogr. 239: 643-649 (1982)
- Ito Y, Sandlin J, Bowers WG. High-speed preparative counter-current chromatography with a coil planet centrifuge. J. Chromatogr. 244: 247-258 (1982)
- Ito Y. Countercurrent chromatography. Vol. 51A, pp. A69-A107. In: J. Chromatogr. Library. Elsevier, NY, USA (1992)
- Lee CH, Lee BY, Lee CH. The separation of major flavonoglycosides from *Ginkgo biloba* L. leaves by high-speed counter-current chromatography. Food Sci. Biotechnol. 8: 189-192 (1999)
- Korea Ginseng and Tobacco Research Institute. Analytical methods of ginseng components. Jeilmunhwasa, Taejeon, Korea. pp. 56-57 (1991)
- Park CK, Jeon BS, Yang JW. The chemical components of Korean ginseng. Food Ind. Nutr. 8: 10-23 (2003)
- Shon HJ, Jang JG, Lee KS, Kim JG, Lee YW. A study on extraction methods of saponin in ginseng products. Korean J. Ginseng Sci. 8: 32-37 (1984)
- Cho HO, Cho SH, Kim SJ. Quality control of ginseng products (part 1): The saponins isolated from ginseng roots and leaves. J. Korean Agric. Chem. Soc. 22: 10-17 (1979)
- Kim JG, Lee YW, Sohn HJ, Lee KS. A study on comparison of extraction methods of ginseng saponin by phase separation and by extrelut column -For recovery rates of saponin. Korean J. Env. Hlth. Sci. 10: 87-92 (1984)
- Korea Ginseng and Tobacco Research Institute. Analytical Methods of Ginseng Components. Jeilmunhwasa, Taejeon, Korea. pp. 59-61 (1991)
- Abbott TP, Kleiman R. Solvent selection guide for counter-current chromatography. J. Chromatogr. 538: 109-118 (1991)
- Oka F, Oka H, Ito Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. 538: 99-108 (1991)
- Conway WD. Countercurrent Chromatography. VCH Publishers Inc., NY, USA. pp. 29-35 (1990)
- Oka H, Ikai Y, Hayakawa J, Harada KI, Nagase K, Suzuki M, Nakazawa H, Ito Y. Discrepancy between the theoretical plate number (N) and peak resolution (Rs) for optimizing the flow rate in countercurrent chromatography. J. Liq. Chromatogr. 15: 2707-2719 (1992)
- Shinomiya K, Menet JM, Fales HM, Ito Y. Studies on a new cross-axis coil planet centrifuge for performing counter-current chromatography. I. Design of the apparatus, retention of the stationary phase, and efficiency in the separation of proteins with polymer phase systems. J. Chromatogr. 644: 215-229 (1993)
- Bousquet O, Foucault AP, Goffic FL. Efficiency and resolution in countercurrent chromatography. J. Liq. Chromatogr. 14: 3343-3363 (1991)