

인삼중 사포닌 성분의 정성 및 정량 분석

홍희도

한국식품개발연구원

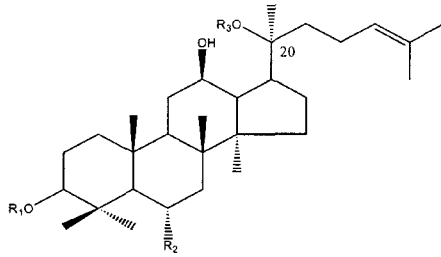
I. 서 언

인삼(人蔘, *Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오가피나무과 인삼속에 속하는 다년생 초본류로서 한방에서는 그 뿌리를 주로 이용하고 있는 대표적인 약용작물 중에 하나이다. 그 중에서도 고려인삼(高麗人蔘) 즉 국내에서 재배되는 인삼이 중국, 일본, 미국 등에서 생산되는 인삼에 비해 그 약효가 훨씬 뛰어난 것으로 잘 알려져 있다. 인삼의 주요 생리활성 성분으로는 사포닌을 비롯하여 정유성분, 폴리아세틸렌(polyacetylene), 페놀성분, 배당체 및 산성펩티드 등이 있으며 그 밖에도 비타민, 당류, 무기질과 같은 다양한 영양성분들이 함유되어 있다.^{1,2)} 그 중에서도 가장 대표적인 생리활성성분인 사포닌의 경우 1960년대 일본의 Shibata와 Tanaka 그룹에 의해 그 화학적 연구가 시작되었으며,^{3,4)} 이후 최근 까지도 새로운 사포닌 성분 및 사포닌 성분의 생리활성에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.

인삼 사포닌은 인삼속(*Panax* genus) 식물에만 함유된 특이한 모형의 담마란(dammarane)계 트리테르펜(triterpene) 배당체(glycoside)로 인삼의 사포닌은 진세노사이드(ginsenoside)라고도 부르며 최근까지 약 33종 정도의 구조가 밝혀졌다(그림 1).^{1,5)} 이와 같은 인삼사포닌의 생리활성으로 연구된 내용을 간략히 살펴보면 중추신경계에 대한 작용, 뇌기능 개선작용, 항발암 및 항암작용, 면역기능 조절작용, 항당뇨 작용, 간기능 강화작용, 심혈관 개선작용, 항스트레스 작용, 항피로 작용, 항산화 작용 등이 보고되어 있다.⁶⁻¹⁷⁾

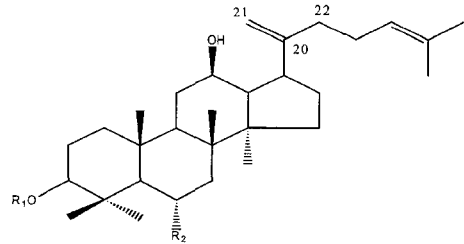
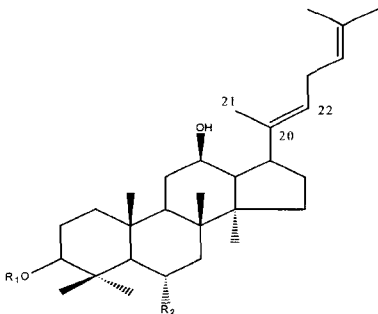
사포닌의 분석방법으로 현재까지 가장 많이 이용되는 방법으로는 메탄올을 이용하여 추출한 후 물포화 부탄올을 이용하여 분획, 추출한 조사포닌 분획을 분석용 시료로 사용하여 중량법, 바닐린-황산 비색법, 얇은 막 크로마토그래프법(thin layer chromatography) 및 고속액체 크로마토그래프법(high performance liquid chromatography) 등이 있으며 얇은 막 크로마토그래프법은 주로 사포닌의 정성 분석용으로 고속액체 크로마토그래프법은 정량 분석용으로 주로 이용된다.¹⁸⁾

인삼중 사포닌 성분의 정성 및 정량 분석



Ginsenosides	R ₁	R ₂	R ₃
(20S)Rb ₁	Glc-Glc-	H	Glc-Glc-
(20S)Rb ₂	Glc-Glc-	H	Ara(p)-Glc-
(20S)Rc	Glc-Glc-	H	Ara(f)-Glc-
(20S)Rd	Glc-Glc-	H	Glc-
(20S),(20R)Rg ₃	Glc-Glc-	H	H
(20S),(20R)RS ₃	Ac-Glc-Glc	H	H
(20S)Re	H	Rha-Glc-O-	Glc-
(20S)Rg ₁	H	Glc-O-	Glc-
(20S),(20R)Rg ₂	H	Rha-Glc-O-	H
(20S)Rf	H	Glc-Glc-O-	Glc-
(20S), (20R)Rh ₁	H	Glc-O-	H

Glc: -D-glucopyranosyl, Ara(P): -L-arabinopyranosyl, Ac: 6'-O-acetyl
 Ara(f): -L-arabinofuranosyl, Rha: -L-rhamnopyranosyl



Ginsenosides	R ₁	R ₂
F ₄	H	Rha-Glc-O-
Rg ₅	Glc-Glc-	H
Rh ₃	Glc-	H
Rh ₄	H	Glc-O-
RS ₄	Ac-Glc-Glc-	H
RS ₆	H	Ac-Glc-O-

Ginsenosides	R ₁	R ₂
Rg ₆	H	Rha-Glc-O-
Rk ₁	Glc-Glc-	H
Rk ₂	Glc-	H
Rk ₃	H	Glc-O-
RS ₅	Ac-Glc-Glc-	H
RS ₇	H	Ac-Glc-O-

Fig. 1. 인삼의 진세노사이드의 종류 및 구조(출처: Kwon, S.W. et. al. 2001)

II. 분석방법

1. 시료 조제¹⁸⁾

얇은 막 크로마토그래프법(thin layer chromatography) 및 고속액체 크로마토그래프법(high performance liquid chromatography) 등의 방법을 이용한 인삼성분의 정성, 정량을 위한 인삼 조사포닌 추출방법은 시료의 형태에 따라 다소 달라질 수 있으며 본문에서는 인삼분말을 대상으로 한 추출방법에 대해 기술하고자 한다.

1) 장치 및 기구

- (1) 환류추출장치
- (2) 감압농축기

2) 시약

- (1) 80% 메탄올(methanol): 메탄올 80 ml를 100 ml의 용량플라스크에 옮기고 증류수를 이용하여 정용한다.
- (2) 물포화 부탄올(water-saturated n-butanol)용액: n-부탄올과 증류수를 70:30 비율로 혼합한 뒤 분액여두내에서 충분히 진탕시킨 후 정치하여 물포화 부탄올층과 물층을 완전히 분리한 뒤 상층의 물포화 부탄올층을 분리하여 사용한다.
- (3) 에테르(diethyl ether)
- (4) 메탄올: HPLC 분석 용도로 사용시에는 HPLC grade를 사용한다.

3) 조작

인삼 시료 약 2~5 g을 정확히 칭량하여 추출용 삼각플라스크에 80% 메탄올 용액 100 ml를 가하여 물중탕에서 1시간 정도 환류 추출한 다음 여과한다. 여과후 잔사에 80% 메탄올 용액 100 ml를 가하여 1~2회 반복하여 추출 여과한다. 추출한 여액을 한데 모아 감압 농축시킨다. 농축물을 증류수 50 ml에 녹여 분액깔대기에 옮기고 에테르 50 ml 씩으로 2회 정도 반복 추출하여 불순물을 제거한다. 이후 남아있는 물층에 물포화 부탄올 용액 50 ml를 첨가하여 3~4회 추출한 다음 물포화 부탄올층을 함께 모아 증류수 30 ml 씩으로 2~3회 세척한다. 물포화 부탄올층을 감압하에서 완전히 농축한 다음 메탄올 5 ml로 녹이고 0.45 μm의 막필터로 여과하여 인삼사포닌의 정성, 정량분석을 위한 시료용액으로 사용한다.

4) 고찰

인삼중의 사포닌 성분을 정성, 정량분석하기 위한 추출, 분리하는 방법으로는 본문에서 서술한 방법, 즉 메탄올을 이용하여 환류 추출한 후 물포화 부탄올로 분획, 추출하는 방법이 가장 대표적이고 많이 이용되는 방법인 것은 사실이다. 하지만 본 방법의 경우 사포닌 분획과정에서 층분리와 같은 공정중에 시간이 많이 걸리고 완전하고 정확한 층분리가 다소 어렵은 단점이 있다. 따라서 사포닌의 신속하고 정확한 추출을 위한 새로운 방법에 대한 연구가 진

행되고 있다. 그 몇가지 예를 살펴보면 곽 등²⁰⁾은 Waring blender와 유기용매를 이용한 새로운 추출방법을 검토해 본 결과 기존의 증류 추출방법과 유사한 사포닌 추출경향을 나타내었으며 특히 메탄올과 클로로포름 7:3 비율의 유기용매를 사용할 때 가장 효과적으로 추출됨을 보고한 바 있다. 또한 신 등²¹⁾도 기존의 고온 메탄올/n-부탄올 추출법과 고온 메탄올 추출/Diaion HP-20 흡착법 이외에 고온 메탄올 추출/cation AG 50 W 흡착/ 증류수 용출/부탄올 추출법, 상온 메탄올 추출/Diaion HP-20 흡착법, 초산에틸(ethyl acetate)/n-부탄올 직접 추출법 등의 다양한 방법으로 조 사포닌 분획을 추출하고 사포닌 및 다양한 구성성분의 함량차이를 비교하여 보고한 바 있다.

2. 얇은 막 크로마토그래프법(Thin Layer Chromatography)에 의한 사포닌 정성분석

1) 장치 및 기구

- (1) 얇은 막 크로마토그래피 전개조(TLC developing tank)
- (2) 실리카겔 얇은 막 크로마토그래피 전개판(Silica gel TLC plate)
- (3) 스프레이 병(spray bottle)

2) 시약

- (1) 전개용매 1: 클로로포름(chloroform), 메탄올(methanol), 물(distilled water)을 65:35:10 (v/v/v)의 비율로 혼합한 뒤 분액깔대기에 옮기고 충분히 진탕시킨 후 정치하여 층 분리시키고 아래 층을 취하여 전개용매로 사용한다.
- (2) 전개용매 2: n-부탄올(n-butanol), 초산에틸(ethyl acetate), 물을 5:1:4 (v/v/v)의 비율로 혼합한 뒤 분액깔대기에 옮기고 충분히 진탕시킨 후 정치하여 층 분리시키고 윗 층을 취하여 전개용매로 사용한다.
- (3) 진세노사이드 표준용액(ginsenoside standard solution): ginsenoside Re와 같은 표준품을 5 mg 정도를 정확하게 칭량하여 메탄올 1 ml에 녹인 후 사용한다.
- (4) 발색시약: 10% 황산(sulfuric acid)용액(v/v) 또는 30% 황산-에탄올용액을 제조하여 사용한다.

3) 조작

인삼추출시료와 확인하고자 하는 진세노사이드 표준용액을 각각 실리카겔판에 일정량씩 점적(spotting)하고 전개용매 1 또는 2를 사용하여 전개시킨다. 전개가 끝난 실리카겔판은 잘 건조시킨 후 발색시약을 골고루 분무하고 다시 잘 건조시킨 다음 110°C에서 약 5~10분간 발색시켜 시료액 중의 사포닌성분과 진세노사이드 표준품의 Rf 값(이동거리)과 색상을 대조하거나 자외선(365nm) 광을 이용하여 비교, 확인한다.

4) 실험의 예 및 고찰

실리카겔판을 이용한 얇은 막 크로마토그래프법(Thin Layer Chromatography)에 의한 사포닌 정성분석의 실험 예는 그림 2와 같다.

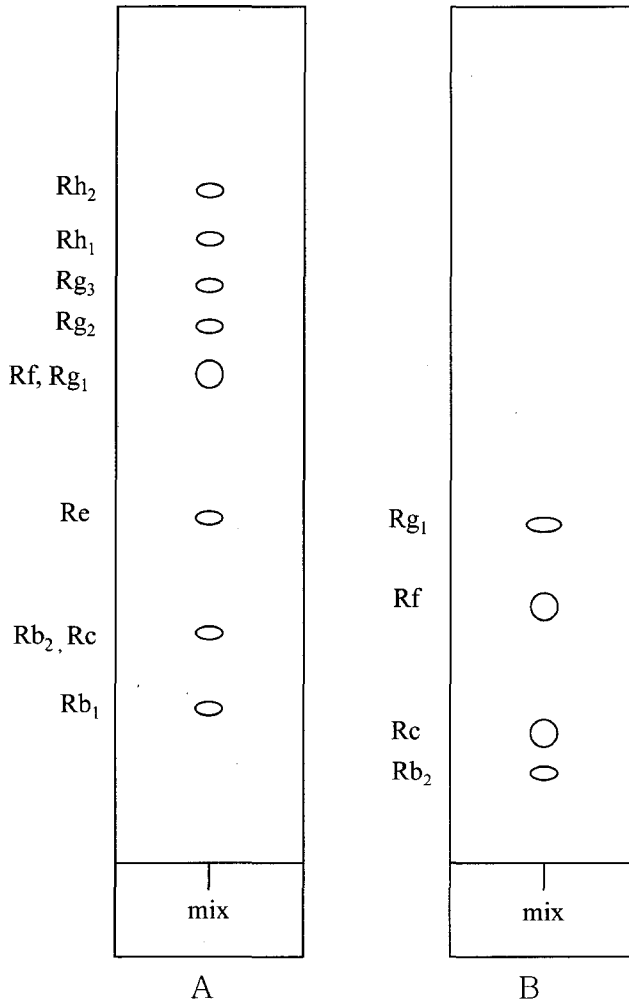


Fig. 2. 얇은 막 크로마토그래피(TLC)에 의한 인삼 사포닌 분리

A: 전매용매 1(클로로포름:메탄올:물 (65:35:10, v/v)의 아래층

B: 전매용매 2(n-부탄올:초산에틸:물 (5:1:4, v/v)의 윗층

얇은 막 크로마토그래피의 경우 인삼 또는 인삼가공제품중의 사포닌을 확인하기 위한 가장 간편하고 빠른 방법인 것으로 생각된다. 그러나 앞서 실험의 예에서 보는 바와 같이 모든 진세노사이드들을 동시에 완전히 분리하기에는 다소 한계가 있는 것으로 보인다. 따라서 분석하고자하는 진세노사이드의 종류에 따라 분석조건을 선택하거나 2~3개 정도의 분석조건을 함께 수행하여 정확한 정성분석을 시도하는 것이 바람직한 것으로 판단된다. 또한 최근들어 새로운 진세노사이드 들이 확인되고 기존에 미량 존재하는 진세노사이드 들에 대한 관심이 높아짐에 따라 이들을 정확하게 분리, 동정할 수 있는 전개판, 전개용매 및 검출방법 등의 분석조건에 대한 많은 연구가 있어야 할 것으로 판단된다.

3. 고속액체 크로마토그래프법(high performance liquid chromatography : HPLC)에 의한 진세노사이드의 정량, 정성분석

1) 장치 및 기구

(1) 고속액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography) 장치

2) 시약

(1) 아세트니트릴, n-부탄올, 메탄올, 증류수 등의 HPLC grade 용매

(2) 진세노사이드 표준용액: ginsenoside Re와 같은 표준품을 5~10 mg 정도 호 정확하게 칭량하여 메탄올(정량분석시에는 HPLC grade를 사용) 1 ml에 녹인 후 0.45 μm 의 막 필터로 여과하여 사용한다. 사용하는 검출기에 검출성능에 따라 표준용액의 농도는 달리 사용할 수 있으며 일반적으로 자외선 검출기를 사용시에는 굴절률 검출를 사용할 경우보다 5~10배 정도 묽은 표준용액을 사용하는 것이 적당하다.

3) 조작

(1) 분석조건

인삼중의 진세노사이드를 정성, 정량분석하기 위한 HPLC 분석조건은 사용하는 컬럼의 종류나 검출방법 등에 따라 크게 2가지 정도가 가장 많이 이용되어 왔으며 각각의 분석조건은 아래와 같다.

분석조건 1 : 굴절률 검출기(RI)를 이용한 방법

- 컬럼: LiChrosorb-NH₂(4.6 × 250 mm, 5 μm , Merck사)와 같은 NH₂ 컬럼
- 이동상: 아세트니트릴 : 물 : 부탄올 (8 : 2 : 1, v/v/v)
- 유속: 1.0 ml/min
- 검출기: 굴절률 검출기 (Refractometer Index : RI)

분석조건 2 : 자외선 검출기(UV)를 이용한 방법

- 컬럼: μ -Bondapak C₁₈ (3.9 × 300 mm, 10 μm , Waters사)와 같은 역상의 C₁₈ 컬럼
- 이동상: 아세트니트릴: 물 (3 : 7, v/v)
- 유속: 1.5 ml/min
- 검출기: 자외선 검출기 (UV 203 nm)

(2) 사포닌 함량 계산

Ginsenoside 표준용액을 농도별로 조제한 후 고속액체 크로마토그래프에 주입하여 표준검량선을 작성한다. 이후 시료용액을 고속액체 크로마토그래프에 주입하여 분석한 다음 HPLC 크로마토그램 상에서 구한 각 ginsenoside의 peak 면적 또는 높이를 구하고 표준검량선을 이용하여 시료용액중의 각 ginsenoside 의 함량을 계산한다.

4) 실험의 예 및 고찰

굴절률 검출기 및 자외선 검출기를 이용한 분석조건 1과 2에 따라 인삼 사포닌 표준품을 HPLC로 분리한 결과는 그림 3 및 4와 같다.

HPLC를 이용한 사포닌 분석방법의 경우 최근까지도 사포닌 성분을 정량 분석하기 위해 가장 많이 이용되는 대표적인 방법이다. 그러나 TLC와 마찬가지로 본문에서 기술한 기존의 방법으로는 미량의 사포닌 성분과 다양한 가공처리로 새로이 생성되거나 검출되는 사포닌을 분석하기에는 다소 어려움이 있다. 따라서 최근 새로운 검출장비 및 분석조건을 이용하여 20종 이상의 사포닌 성분을 동시에 그리고 신속하게 검출하기 위한 분석조건에 대한 연구가 진행되고 있다. 그 하나의 예로서 Kwon 등²²⁾은 역상의 C₁₈ 컬럼상에서 이동상으로는 단계적인 용매 gradient를 사용하고 검출기로는 최근 보급되고 있는 ELSD(evaporative light scattering detector)를 사용함으로써 40여분의 비교적 짧은 시간내에 21종의 진세노사이드 들을 동시에 분석하는 방법을 연구하여 보고한 바 있다.



Fig. 3. 인삼 사포닌 분석을 위한 NH₂ 컬럼을 이용한 고속액체크로마토그램.

(출처: 인삼분석법, 한국인삼연초연구소)

LiChrosorb-NH₂(4.6 × 250 mm, 5 μm, Merck사),

아세토니트릴:물:부탄올(8:2:1, v/v/v),

1.0 ml/min, 굴절율 검출기 (Refractometer Index: RI)

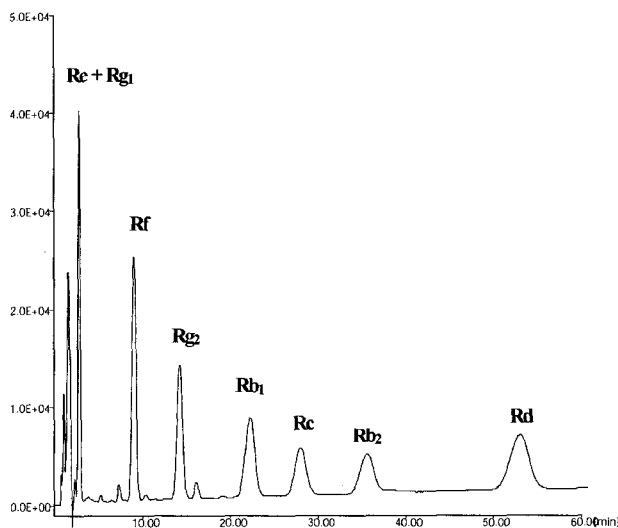


Fig. 4. 인삼 사포닌 분석을 위한 역상의 C₁₈ 컬럼을 이용한 고속액체크로마토그램.
 Lichrosorb® RP-18 (4 × 250 mm, 10 μm, MercK사),
 아세토니트릴 : 물 (3 : 7, v/v), 1.5 ml/min, 자외선 검출기 (UV 203 nm)

참고문헌

1. 고려인삼. 1994. 한국인삼연초연구원, p. 63-88.
2. 고려삼의 이해. 1995. 고려인삼학회, p. 9-16.
3. Shibata, S., T. Ando, and O. Tanaka. 1966. Chemical studies on oriental plant drugs and prosapogenin of the ginseng saponin. *Chem. Pharm. Bull.* 14(10) : 115-116.
4. Shibata, S., T. Ando, O. Tanaka, Y. Meguro, K. Soma, and Y. Ida. 1965. Saponins and prosapogenins of *Panax ginseng* C.A. Meyer and some *Panax* sp.. *J. Yakugaku*, 85(8) : 753-755.
5. 박종대. 1997. 고려인삼의 화학성분에 관한 고찰, *고려인삼학회지*, 20(4) : 389.
6. Benishin, C. G. 1992. Action of ginsenoside Rb1 on choline uptake in central cholinergic nerve endings. *Neurochem. Int.* 21(1) : 1-5.
7. Saito, H. and N. Nishiyama. 1988. 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.
8. Kikuchi, Y., H. Sasa, T. Kita, J. Hirata, and T. Tode. 1991. 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.
9. Singh, V. K., S. S. Agarwal, and B. M. Gupta. 1984. Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract. pp. 225-232. In: Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea.
10. Huo, Y. and Y. Chen. 1988. The effect of *Panax ginseng* extract(GS) on insulin and corticosteroid receptors. *J. Traditional Chinese Medicine* 8(4) : 293-295.
11. Oura, H. and S. Hiai. 1973. Physiological chemistry of ginseng. *Metabolism Disease* 10 : 564-569.
12. Kim, H. Y., X. Chen, and C. N. Gillis. 1992. Ginsenosides protect pulmonary vascular endothelium

- against free radical induced injury. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189(2) : 670-676.
13. Kang, S. Y. and N. D. Kim. 1992. The antihypertensive effect of red ginseng saponin and the endothelium-derived vascular relaxation. *Korean J. Ginseng Sci.* 18 : 175-182.
 14. Ogita, S. and K. Samugawa. 1994. Clinical effectiveness of Korea ginseng on patients with climacteric disturbances. *The Ginseng Review* 18: 95-97.
 15. Saito, H. and T. T. Bao. 1984. Effect of red ginseng on mice exposed to various stress. pp. 97-105. In: Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp. Seoul, Korea.
 16. Brekhman, I. I. 1976. Ancient ginseng and pharmacology. pp. 6. In: Proc. Symp. Gerontology, Lugano, Switzerland.
 17. Mei, B., Y. E. Wang, J. X. Wu, and W. Z. Chen. 1994. 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.
 18. 인삼성분분석법. 1991. 한국인삼연초연구소, p. 56-68.
 19. 손현주, 장진규, 이광승, 김종규, 이용욱. 1984. 인삼제품의 saponin 추출방법에 관한 연구, 고려인삼학회지, 8(1), 32-37.
 20. 박이성, 김미주, 김은희, 김영애. 1997. 인삼사포닌 화합물의 신속한 추출, 한국식품과학회지, 29(6) : 1327-1329.
 21. 신지영, 최언호, 위재준. 2001. 인삼 조사포닌의 새로운 분리방법, 한국식품과학회지, 33(2) : 166-172.
 22. Kwon, S. W., S. B. Han, I. H. Park, J. M. Kim, M. K. Park, and J. H. Park. 2001. Liquid chromatographic determination of less polar ginsenoside in processed ginseng. *J. Chromato.*, 921 : 335-339.

Qualitative and Quantitative Analysis of Saponin in Ginseng

Hee-Do Hong

Ginseng research group, Korea Food Research Institute, Songnam, 463-746, Korea
+82-31-780-9285, honghd@kfri.re.kr