

흑삼의 인삼 사포닌 분석

한성태 · 황완균* · 김일혁* · 양병욱 · 조순현 · 고성권**.#
중앙대학교 인삼산업연구소, *중앙대학교 약학대학, **세명대학교 한방식품영양학과
(Received October 6, 2005; Revised November 24, 2005)

Analysis of Ginsenosides of Black Ginseng

Sung Tai Han, Wan Kyun Whang*, Il Hyuk Kim*, Byung Wook Yang,
Soon Hyun Cho and Sung Kwon Ko**.#

Korea Ginseng Institute, Chung-Ang University

**College of Pharmacy, Chung-Ang University*

***Department of Oriental Medical Food & Nutrition, Semyung University*

Abstract — The objective of this study is to provide the basic information for developing a high-value ginseng product using ginseng saponin and prosapogenin. In order to achieve such aim, Ginsenoside compositions of black ginseng (BG) extracts with various solvent conditions were examined by HPLC. The total saponin and the prosapogenin content of 95% ethyl alcohol extract were higher than that of the either 50% ethyl alcohol extract or distilled water extract. As a result, the order of the total saponin and the prosapogenin content was 1) 95% ethyl alcohol, 2) 50% ethyl alcohol, 3) the first and second mixture of 95% ethyl alcohol, distilled water, and 4) distilled water extract. In the case of fine black ginseng (FBG), the first and second mixture extracts of 95% ethyl alcohol and distilled water were the highest. In addition, the ratio of the protopanaxadiol group and the protopanaxatriol group (PD/PT) showed that the ratio of BG ranged from 0.304 to 0.601, while the ratio of FBG ranged from 1.166 to 1.657.

Keywords □ black ginseng, ginsenoside, prosapogenin, HPLC

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 2000여년 전부터 동북아시아에서 보원기제로 사용되어온 중요한 한약 중의 하나이다. 동양에서 가장 오래된 약물학서인 신농본초경에 인삼은 오장을 보하고, 원기를 보충한다고 기록되어 있다.¹⁾ 인삼의 생리활성은 체계적인 약리학적 접근으로 심혈관계,²⁾ 면역계,³⁾ 신경계⁴⁾에 대한 효능과 해독작용,⁵⁾ 항암작용⁶⁾ 그리고 항당뇨작용⁷⁾ 등이 보고되었다.

또한, ginsenosides, polyacetylenes, polysaccharides, phenolic compounds, proteins, acidic peptides⁸⁻¹⁰⁾와 같은 여러 가지의 독특한 성분을 함유하고 있다. 특히, 인삼사포닌(ginsenosides)은 생화학 및 약리작용을 나타내는 인삼의 주요한 성분이라고 알려져 있다.

인삼은 밭에서 채굴한 수삼을 증진한 것을 홍삼, 껍질과 잔뿌

리를 제거한 후 일광에 자연 건조한 것을 백삼, 잔뿌리를 자연 건조한 것을 미삼이라고 한다. 특히 홍삼은 열에 의해 생성되어 소량 존재하는 진세노사이드 Rg₂, Rg₃, Rh₁, Rh₂, Rs₃와 같은 특유성분이 암예방작용, 암세포성장 억제작용,^{11,12)} 혈압강하 작용,¹³⁾ 뇌신경세포 보호작용,¹⁴⁾ 항혈전작용,¹⁵⁾ 항산화작용¹¹⁾이 있다고 하여 홍삼만의 특·장점으로 주목받고 있다.

최근에는 기능성물질을 다량 함유하는 인삼가공제품 개발의 일환으로, 한약의 전통적인 가공방법인 수치법을 활용하는 제품들이 출시되고 있다. 특히, 숙지황과 같은 한약에서 응용하고 있는 구중구폭(九蒸九曝)의 방법¹⁾을 이용하여 새로운 형태의 홍삼류 제품이 개발되고 있다. 이와 같은 제품은 외부형태적인 특징이 검은 색을 띠고 있어서 흑삼(black ginseng)이라고 부르고 있다.

그러나, 흑삼류 생약에 대한 체계적인 연구가 되어있지 않은 데에 착안하여 우선, 흑삼과 흑미삼을 대상으로 추출 조건에 따른 ginsenosides의 함량 변화에 대한 연구를 시행함으로써, 흑삼류 생약의 가공제품개발에 기초정보를 제공하고자 한다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-649-1433 (팩스) 043-649-1759
(E-mail) skko@semyung.ac.kr



Fig. 1 - Figures of BG (black ginseng) and FBG (fine black ginseng).
a : black ginseng, b : fine black ginseng.

실험 방법

실험재료

금산에서 생산되어 유통되는 흑삼(BG)과 흑미삼(FBG) 제품을 Fig. 1에서와 같이 각 1종씩 구입하여 원형의 변화를 가하지 않고 그대로 실험재료로 하였다. 동정은 중앙대학교 약학대학 김일혁 명예교수가 하였으며, 각각의 제품표본은 중앙대학교 인삼산업연구소 천연물연구실에서 보관하고 있다. 표본 번호는 BG 1~4, FBG 1~4이다.

엑스의 조제

흑삼엑스 조제 - 흑삼 각 25 g에 BG-1은 95% Ethyl alcohol (EtOH), BG-2는 50% EtOH, BG-3는 증류수를 각각 1ℓ씩 넣고, 각각 1시간씩 4회, 총 4시간 동안 추출하였다. BG-4는 95% EtOH로 1시간씩 2회, 증류수로 1시간씩 2회, 총 4시간 동안 추출하여 70°C에서 감압 농축하였다.

흑미삼엑스 조제 - 흑미삼 각 25 g에 FBG-1은 95% EtOH, FBG-2는 50% EtOH, FBG-3는 증류수를 각각 1ℓ씩 넣고, 각각 1시간씩 4회 총 4시간 동안 추출하였다. FBG-4는 95% EtOH로 1시간씩 2회, 증류수로 1시간씩 2회, 총 4시간 동안 추출하여 70°C에서 감압 농축하였다.

엑스 수율은 실험재료인 흑삼류 생약 각각의 중량에 대한 감압 농축 엑스의 중량 백분율로 구하였다.

조 사포닌의 조제

식품공전¹⁶⁾의 방법에 따라 조 사포닌을 조제하여 함량을 결정하고, 이 조 사포닌을 ginsenoside 분석용 시료로 하였다.

식품공전 법 - 홍삼성분 법에 따라 검체 7.0 g을 수포화 n-butanol로 70~80°C에서 약 1시간 추출하는 조작을 2회 반복하여 합한 추출액을 감압농축 하였다. 이 농축물을 ethylether로 30분간 가열하여 탈지시켰다. 잔류물의 함량을 측정 후 공전의 공식에 따라 조 사포닌의 양을 계산하였다.

인삼사포닌의 HPLC 분석

위에서 얻은 조 사포닌을 고 등¹⁷⁾의 조건을 응용, 분석을 상법에 따라 표본과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 분석하였다. 표본은 중앙대학교 인삼산업연구소에서 정제한 순품 사포닌과 Wako Chemical(일본)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside들 이었다.

사용한 HPLC 장치는 Alltech Binary Gradient HPLC system Model 627(Alltech Associates, Inc, 미국)이었으며, 컬럼은 Prevail Carbohydrate ES column(Alltech Associates, Inc, 4.6×250 mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile, isopropylalcohol, Water(HPLC급, JT Baker, 미국)을 사용하였으며, Solvent A는(ACN:Water:IPA=80:5:15), Solvent B는(ACN:Water:IPA=67:21:12)이었고, Solvent B의 비율을 10%에서 85%, 80%, 75%, 90%, 100%, 그리고 25 %로 순차적으로 변화시켜 주고 마지막으로 다시 10%로 조절하였다. 전개온도는 실온이었고 유속은 분당 0.8 ml이었다. 크로마토그램은 ELSD detector(Alltech Associates, Inc, 미국)를 이용하여 검출하였다.

결과 및 고찰

현재 금산에서 생산되고 있는 흑삼(BG)과 흑미삼(FBG) 각각 1종씩을 선정하여 조 사포닌(crude saponin)량과 추출조건에 따른 개별 ginsenoside의 함량 분포를 조사·비교함으로써 흑삼 및 흑미삼의 인삼 사포닌 함유패턴을 검토하여 흑삼류 생약의 가공제품개발에 기초정보를 제공하고자 한다.

엑스 수율은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 인삼의 주근만을 사용하여 가공한 흑삼에 있어서는 95% EtOH로 1차 추출, 증류수로 2차 추출한 BG-4가 68.120%로 가장 좋았으며, 다음으로 증류수로 추출한 BG-3가 54.276%의 수율을 나타내었으며, 50% EtOH로 추출한 BG-2는 51.852%, 95% EtOH로 추출한 BG-1가 35.624%이었다. 이와 같은 결과로부터, 엑스 수율에 있어서는 95% EtOH와 증류수로 1, 2차 추출하는 경우가 가장 좋으며, 단

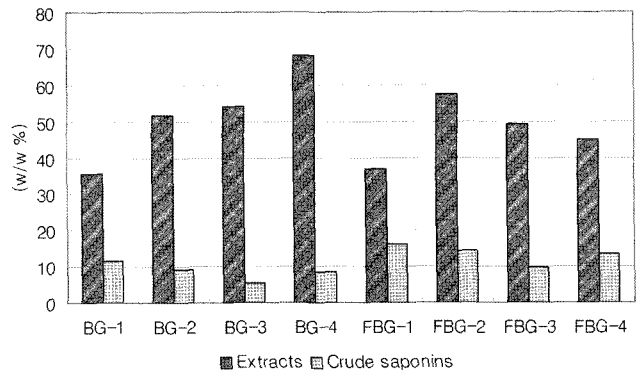


Fig. 2 - Content of extracts and crude saponins in black ginseng and fine black ginseng.

일 용매의 경우는 증류수의 함량이 높을수록 좋은 수율을 나타내었다. 따라서, 주근은 증류수에 용해성이 좋은 비 사포닌류(다당류, 단백질)가 세균에 비해서 많은 함량을 갖는다는 결과^{8,18)}와 밀접한 연관성을 갖는 것으로 사료된다.

또한, 세균만으로 가공한 흑미삼의 경우는 50% EtOH로 추출한 FBG-2가 57.616%로 가장 좋았으며, 증류수 추출(FBG-3)이 49.192%, 95% EtOH와 증류수로 1, 2차 추출(FBG-4)이 45.016%, 95% EtOH 추출(FBG-1)이 36.688%의 순이었다. 이와 같은 결과는 세균이 주근보다 인삼 사포닌(ginsenosides)이 비 사포닌(다당류, 단백질)의 함량보다 높은 비율이라고 하는 사실^{18,19)}과 관련이 있는 것으로 사료된다.

그러나, 식품공전 법¹⁶⁾에 따라 측정된 조 사포닌(crude saponin)의 함량은 흑삼과 흑미삼 공히, 95% EtOH 추출(BG-1 11.656%, FBG-1 16.040%)이 가장 높았으며, 50% EtOH(BG-2 9.276%, FBG-2 14.260%)추출, 95% EtOH와 증류수로 1, 2차 추출(BG-4 8.520%, FBG-4 13.512%), 증류수 추출(BG-3 5.568%, FBG-3 9.856%)의 순이었다. 이와 같은 결과는 인삼 사포닌은 증류수보다 ethyl alcohol에 용해성이 좋아서,²⁰⁾ 추출 용매에서 ethyl alcohol의 함량이 높을수록 조 사포닌 수율이 좋다고 할 수 있다.

본 연구에서 분석한 인삼 사포닌은 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rh₁ 그리고 Rh₂이었으며, 이들은 Fig. 3과 같이 HPLC를 통하여 표품과 직접 비교·확인하고 함량을 계산하였다.

흑삼 인삼 사포닌의 함량 분포는 Table I에서 보는 바와 같이 총 사포닌(total saponin)은 분석한 ginsenoside 함량의 총 합계로서, 조 사포닌 함량과 같은 패턴을 보여주었으나, 총 사포닌 함량이 증류수 추출 엑스인 BG-3를 제외하고 ethyl alcohol을 사

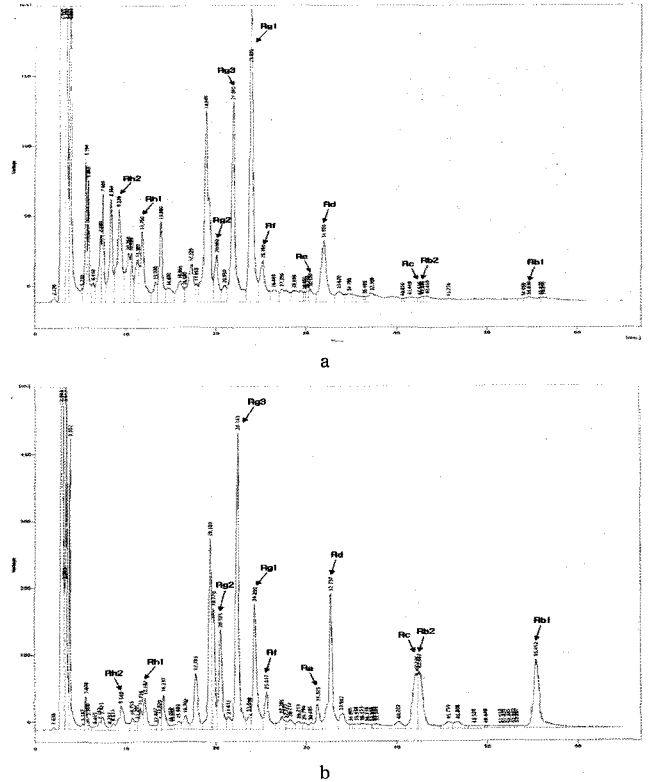


Fig. 3 - HPLC profiles of ginsenosides detected from the BG (black ginseng) and FBG (fine black ginseng). a : black ginseng, b : fine black ginseng.

용한 추출 엑스[BG-1(1.966%), BG-2(1.942%), BG-4(1.605%)]는 모두 홍삼 및 백삼의 보고된 총 사포닌 함량인 1.276%, 1.526%⁸⁾보다 높은 함량을 나타내었다. 특히, 저조한 총 사포닌

Table I - Composition of ginsenosides of BG (black ginseng)

(%, w/w)

Ginsenosides	Black ginseng (BG)			
	BG-1	BG-2	BG-3	BG-4
Rb ₁	0.028±0.006	0.058±0.128	0.005±0.089	0.048±0.140
Rb ₂	0.005±0.057	0.002±0.093	0.002±0.139	0.024±0.004
Rc	0.003±0.024	0.017±0.052	0.004±0.096	0.030±0.135
Rd	0.139±0.018	0.105±0.060	0.047±0.070	0.084±0.149
Re	0.029±0.056	0.019±0.009	0.020±0.051	0.024±0.071
Rf	0.117±0.023	0.098±0.008	0.059±0.011	0.083±0.012
Rg ₁	0.704±0.059	0.752±0.002	0.420±0.102	0.737±0.156
Rg ₂	0.101±0.008	0.085±0.204	0.039±0.089	0.168±0.048
Rg ₃	0.306±0.035	0.286±0.142	0.074±0.106	0.056±0.125
Rh ₁	0.277±0.158	0.273±0.054	0.119±0.025	0.174±0.201
Rh ₂	0.257±0.134	0.247±0.078	0.068±0.087	0.177±0.058
Total ginsenosides ^{a)}	1.966	1.942	0.857	1.605
Diol/Triol ^{b)}	0.601	0.583	0.304	0.494
Prosapogenin ^{c)}	0.941	0.891	0.300	0.575

a) Sum of individual ginsenosides content.

b) Ginsenoside Rb₁+Rb₂+Rc+Rd+Rg₃+Rh₂/Re+Rf+Rg₁+Rg₂+Rh₁.

c) Ginsenoside Rg₂+Rg₃+Rh₁+Rh₂.

Values represent the mean±S.E. (n=3).

함량을 나타낸 BG-3는 추출 용매인 증류수가 극성 용매로서 상대적으로 비극성인 ginsenoside에 대한 추출 수율이 비극성 용매인 ethyl alcohol보다 크게 떨어진 결과라고 사료된다.

한편, protopanaxadiol group과 protopanaxatriol group의 비율 (PD/PT)에 있어서는 백삼과 홍삼의 비율인 약 2.50, 1.28⁸⁾과는 다른 비율로서, BG-1이 0.601, BG-2가 0.583, BG-3가 0.304, BG-4가 0.494로, 상대적으로 protopanaxatriol group ginsenosides (ginsenoside Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rh₁)가 많은 함량을 나타내었으며, 특히, 추출 용매의 ethyl alcohol의 함량이 높을수록 protopanaxadiol group ginsenosides(ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₃, Rh₂)의 함량 비율이 높아지는 경향을 확인할 수 있었다.

열에 의하여 생성되는 인공물 즉 홍삼 특유성분으로서, 항암^{11,12)} 및 두뇌기능 개선작용¹⁴⁾을 나타낸다고 알려진 인삼 prosapogenin (ginsenoside Rg₂, Rg₃, Rh₁, Rh₂)류의 함량에 있어서는 BG-1이 0.941%, BG-2가 0.891%, BG-3가 0.300%, BG-4가 0.575%로, 추출 용매의 ethyl alcohol의 함량이 높을수록 많은 함량을 나타내었다. 이와 같은 결과는 BG-1의 경우, 홍삼의 인삼 prosapogenin 함량으로 보고된 0.044%⁸⁾에 비해서 약 20배 이상의 함량을 나타내고 있다.

한편, 흑미삼의 인삼 사포닌 함량 분포는 Table II에서 보는 바와 같이 총 사포닌(total saponin)은 FBG-4가 7.083% 다음으로 FBG-2가 6.063%, FBG-1이 5.580%, FBG-3가 4.363%의 순이었다. protopanaxadiol group과 protopanaxatriol group의 비율 (PD/PT)에 있어서는 FBG-1이 1.657, FBG-2가 1.622, FBG-3가 1.166, FBG-4가 1.412로, protopanaxadiol group의 함량 비율이 많은 것을 확인할 수 있었으며, 흑삼과는 다른 성분 함량 패턴을 보여주었다. 또한, 추출 용매의 ethyl alcohol의 함량이 높아질수록

protopanaxadiol group ginsenosides의 함량이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg₂, Rg₃, Rh₁, Rh₂)류의 함량에 있어서는 FBG-4가 3.277%, FBG-3가 2.703%, FBG-1이 2.110%, FBG-2가 2.093%이었다.

결론

이와 같은 결과로부터, 인삼 사포닌 및 인삼 prosapogenin 성분을 이용한 고부가가치 인삼제품의 개발에 있어서, 흑삼을 대상으로 할 경우는 95% ethyl alcohol 추출물이 가장 높은 총 사포닌 함량(1.966%)과 prosapogenin함량(0.941%)을 나타내므로서, 가장 효율적인 추출가공물로 사료되며, 흑미삼을 대상으로 할 경우는 95% ethyl alcohol과 증류수의 1, 2차 혼합 추출물의 총 사포닌 함량(7.083%)과 prosapogenin함량(3.277%)이 가장 높은 함량을 나타내므로서, 가장 효과적인 추출가공물로 판단된다. 또한, 흑삼류 생약이 protopanaxatriol group ginsenosides 함량 비율이 상대적으로 높기 때문에, 추후, 백삼 및 홍삼류 생약과는 또 다른 생리활성에 대한 비교 검토가 필요하다.

감사의 말씀

"이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음"(KRF-2003-005-E00015).

문헌

- 1) Namba, T. : The encyclopedia of wakan-yaku with color

Table II - Composition of ginsenosides of FBG (fine black ginseng)

(%, w/w)

Ginsenosides	Fine black ginseng (FBG)			
	FBG-1	FBG-2	FBG-3	FBG-4
Rb ₁	1.047±0.148	1.067±0.017	0.225±0.070	0.883±0.047
Rb ₂	0.362±0.027	0.541±0.049	0.058±0.148	0.304±0.064
Rc	0.258±0.049	0.244±0.157	0.048±0.246	0.232±0.038
Rd	0.543±0.078	0.626±0.046	0.234±0.184	0.594±0.046
Re	0.115±0.054	0.168±0.037	0.042±0.004	0.083±0.091
Rf	0.240±0.019	0.260±0.084	0.281±0.028	0.321±0.024
Rg ₁	0.905±0.028	1.064±0.138	0.772±0.049	1.389±0.147
Rg ₂	0.525±0.098	0.521±0.083	0.561±0.093	0.717±0.092
Rg ₃	1.029±0.061	1.082±0.087	1.537±0.146	1.827±0.034
Rh ₁	0.315±0.048	0.299±0.007	0.358±0.003	0.427±0.004
Rh ₂	0.241±0.047	0.191±0.027	0.247±0.047	0.306±0.203
Total ginsenosides ^{a)}	5.580	6.063	4.363	7.083
Diol/Triol ^{b)}	1.657	1.622	1.166	1.412
Prosapogenin ^{c)}	2.110	2.093	2.703	3.277

^{a)}Sum of individual ginsenosides content.

^{b)}Ginsenoside Rb₁+Rb₂+Rc+Rd+Rg₃+Rh₂/Re+Rf+Rg₁+Rg₂+Rh₁.

^{c)}Ginsenoside Rg₂+Rg₃+Rh₁+Rh₂.

Values represent the mean±S.E. (n=3).

- pictures (I). *Hoikusha*, Osaka, p. 5 (1980).
- 2) Lee, D. C., Lee, M. O., Kim, C. Y. and Clifford, D. H. : Effect of ether, ethanol and aqueous extracts of ginseng on cardiovascular function in dogs. *Can. J. Comp. Med.* **45**, 182 (1981).
 - 3) Jie, Y. H., Cammisuli, S. and Baggolini, M. : Immunomodulatory effects of *Panax* ginseng C.A. Meyer in the mouse. *Agents Actions.* **15**, 386 (1984).
 - 4) Kim, Y. C., Kim, S. R., Markelonis, G. J. and Oh, T. H. : Ginsenosides Rb₁ and Rg₃ protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* **53**(4), 426 (1998).
 - 5) Joo, C. N., Koo, J. D., Kim, D. S. and Lee, S. J. : Biochemical studies of ginseng saponins. XI. The effects of ginseng saponins on alcohol dehydrogenase. *Hanguk Saenghwa Hakhoe Chi.* **10**, 109 (1977).
 - 6) Tahara, M., Kono, H., Mune, S. and Odashima, S. : Action of ginsenosides on tumor cells. Growth inhibition and redifferentiation of neoplasia. *Wakan Yaku Gakkaishi.* **2**, 170 (1985).
 - 7) Yokozawa, T., Kobayashi, T., Oura, H. and Kawashima, Y. : Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb₂ in streptozotocin-diabetic rats. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 869 (1985).
 - 8) Park, J. D. : Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng. *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 389 (1996).
 - 9) Sanata, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S. : Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginseng-R₀, Rb₁, Rb₂, Rc and Rd. *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 421 (1974).
 - 10) Kitagawa, I., Taniyama, T., Shibuya, H., Nota, T. and Yoshikawa, M. : Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2) : Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *Yakugaku Zasshi.* **107**, 495 (1987).
 - 11) Keum, Y. S., Park, K. K., Lee, J. M., Chun, K. S., Park, J. H., Lee, S. K., Kwon, H. and Surh, Y. J. : Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett.* **150**(1), 41 (2000).
 - 12) Kim, S. E., Lee, Y. H., Park, J. H. and Lee, S. K. : Ginsenoside-Rs₃, a new diol-type ginseng saponin, selectively elevates protein levels of p53 and p21WAF1 leading to induction of apoptosis in SK-HEP-1 cells. *Anticancer Res.* **19**(1A), 487 (1999).
 - 13) Kim, W. Y., Kim, J. M., Han, S. B., Lee, S. K., Kim, N. D., Park, M. K., Kim, C. K. and Park, J. H. : Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J. Nat. Prod.* **63**(12), 1702 (2000).
 - 14) Bao, H. Y., Zhang, J., Yeo, S. J., Myung, C. S., Kim, H. M., Kim, J. M., Park, J. H., Cho, J. S. and Kang, J. S. : Memory enhancing and neuroprotective effects of selected ginsenosides. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 335 (2005).
 - 15) Jung, K. Y., Kim, D. S., Oh, S. R., Lee, I. S., Lee, J. J., Park, J. D., Kim, S. I. and Lee, H. K. : Platelet activating factor antagonist activity of ginsenosides. *Biol. Pharm. Bull.* **21**(1), 79 (1998).
 - 16) Korea Food and Drug Administration: Code of Korea Food Regulation 2001., Seoul, p. 396 (2001).
 - 17) Ko, S. K., Lee, K. H., Hong, J. K., Kang, S. A., Sohn, U. D., Im, B. O., Han, S. T., Yang, B. W., Chung, S. H. and Lee, B. Y. : The change of ginsenoside composition in ginseng extract by the vinegar process. *Food Sci. & Biotechnol.* **14**(4), 509 (2005).
 - 18) Jang, J. G., Lee, K. S., Kwon, D. W. and Oh, H. K. : Chemical compositions of Korean ginseng with special reference to the part of ginseng plant. *Korean J. Ginseng Sci.* **11**, 84 (1987).
 - 19) Kim, M. W., Ko, S. R., Choi, K. J. and Kim, S. C. : Distribution of saponin in various sections of *Panax ginseng* root and changes of its contents according to root age. *Korea J. Ginseng Sci.* **11**, 10 (1987).
 - 20) Kim, S. C., Choi, K. J., Ko, S. R. and Joo, H. K. : Content comparison of proximate compositions, various solvent extracts and saponins in root, leaf and stem of *Panax ginseng*. *Korean J. Ginseng Sci.* **11**, 118 (1987).