

HPLC를 이용한 고려인삼 중 진세노사이드 Rb₁, Rf 및 Rg₁의 신속분석 방법 개발

홍희도 · 최상윤 · 김영찬 · 이영철 · 조장원[#]

한국식품연구원

(2009년 1월 14일 접수; 2009년 3월 12일 수리)

Rapid Determination of Ginsenosides Rb₁, Rf, and Rg₁ in Korean Ginseng Using HPLC

Hee-Do Hong, Sang Yoon Choi, Young-Chan Kim, Young-Chul Lee and Chang-Won Cho[#]

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

(Received January 14, 2009; Accepted March 12, 2009)

Abstract : A simple gradient HPLC method for rapid determination of major ginsenosides (Rg₁ and Rb₁) and unique ginsenoside (Rf) of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) was developed. Within 50 min, three ginsenosides have been separated and identified on μ -Bondapak C₁₈ column (3.9×300 mm, 10 μ m) with gradient elution using water and acetonitrile as a mobile phase. The method was validated in terms of linearity, accuracy, and precision. The correlation coefficients (r^2) for calibration curves of ginsenosides were over 0.9997. The developed HPLC method was successfully applied to the analysis of ginseng samples and the recoveries of ginsenosides were in the range of 101.1~115% with RSD<3.2%. The developed method could be used for rapid evaluation of the ginsenosides Rg₁, Rb₁, and Rf.

Key Words : Korean ginseng, ginsenosides, HPLC-UV, method validation

서 론

인삼(人蔘, *Panax ginseng* C.A. Meyer)은 두릅나무과 인삼속에 속하는 다년생 초본류로서 많은 아시아 국가들에서 전통의약품으로 사용되어져 왔으며, 최근에는 세계적으로 널리 사용되고 있는 대표적인 약용작물 중에 하나이다.^{1,2)} 인삼에는 다양한 성분들이 존재하는데 그 중 주요한 활성성분중의 하나로 진세노사이드가 알려져 있다.³⁾ 많은 연구들이 항암, 항당뇨, 항산화, 위손상보호 그리고 신생혈관생성과 같은 진세노사이드의 유용활성을 보고한 바 있다.⁴⁻⁸⁾ 현재까지 고려인삼으로부터 약 30여종의 진세노사이드가 분리되었는데,⁹⁾ 비당부의 구조적 특징에 따라 diol계, triol계 및 oleanane계로 구분되어 진다. 이 중 diol계와 triol계가 대부분을 점하고 있고, oleanane계로는 진세노사이드 Ro 1종만이 알려져 있으며 함량도 전체 진세노사이드의 0.6%에 불과하다.¹⁰⁾ 30여종의

진세노사이드 중 비교적 함량이 높은 것으로는 diol계에 속하는 진세노사이드 Rb₁, Rb₂, Rc 및 Rd와 triol계에 속하는 진세노사이드 Rg₁과 Re가 있다. 또한 고려인삼에 존재하는 진세노사이드 중 Rf는 서양삼에는 존재하지 않는다고 알려져 있다.¹¹⁾

진세노사이드 Rb₁, Rg₁의 경우 인삼의 주요 지표성분으로서 건강기능식품의 기준 및 규격,¹²⁾ KS¹³⁾등 국내 주요 규격뿐만 아니라 현재 등록이 진행되고 있는 Codex등 국제 규격에서도 주요한 품질지표 인자로 활용되고 있다. 최근 인삼 중의 진세노사이드를 정확하게 정량하기 위하여 고속액체크로마토그래프(HPLC)법이 많이 사용되고 있는데,¹⁴⁾ 이러한 분석법들은 인삼 내에 존재하는 다양한 진세노사이드들을 동시에 분리, 분석할 수 있는 장점이 있는 반면 총 분석시간이 80분이 넘을 정도로 긴 분석시간을 필요로 한다. 특히 Rb₁과 Rg₁의 함량만을 정량하도록 명시되어 있는 건강기능식품의 기준 및 규격¹²⁾과 KS¹³⁾에 제시되어 있는 HPLC 분석법의 경우에도 분석시간이 각각 70분, 90분으로 매우 길다는 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는, 기존의 HPLC분석조건^{15,16)}을 변경

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-780-9312; (팩스) 031-780-9312
(E-mail) cwcho@kfri.re.kr

하여 고려인삼 중의 주요 진세노사이드인 Rb₁, Rg₁ 및 고려인삼 특이 진세노사이드인 Rf를 단시간에 확인, 정량할 수 있는 최적의 HPLC 분석 방법을 확립하고, 개발된 분석법의 검증 및 다양한 인삼시료의 분석에 적용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 표준품 및 시약

본 실험에 사용된 진세노사이드 표준품 Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rh₁, Rh₂는 모두 Fleton Reference Substance Co., Ltd.(Chengdu, P.R.China) 제품을 사용하였고, water, acetonitrile, methanol(SK chemicals, Ulsan, Korea)은 HPLC용을 사용하였다.

2. 표준용액 제조 및 표준검정곡선의 작성

진세노사이드 표준품 각각 10 mg을 정밀히 달아 50 mL 용량의 volumetric flask에 취하고 메탄올로 용해 시켜 2 mg/mL 농도로 만들어 표준원액으로 하였다. 표준용액은 표준원액을 메탄올로 희석하여 0.01, 0.125, 0.25, 0.5 및 1 mg/mL 농도가 되도록 만든 후 HPLC-UV에 주입하여 얻은 농도 별 피크면적으로 회귀곡선을 작성하여 검정곡선을 얻었다.

3. 시험용액의 조제

진세노사이드 Rb₁, Rf 및 Rg₁ 분석을 위한 시험용액은 건장기능식품의 기준 및 규격¹²⁾에 따라 제조하였다.

1) 백삼분말의 시험용액

시료 약 1 g을 정밀히 달아 250 mL의 환류용 플라스크에 취하였다. 50% 메탄올 용액 50 mL를 가하여 70~80°C의 수욕에서 1시간 환류냉각추출한 후 식히고 원심분리한 다음 상정액을 농축플라스크에 취하였다. 잔류물에 대하여 위의 조작을 1회 더 반복하였다. 농축플라스크에 옮긴 상정액을 수욕 중에서 60°C 이하에서 감압농축 하였다. 농축물을 물-아세트니트릴 혼합용매(80:20) 2 mL에 용해한 다음 막필터로 여과(0.45 μm)하여 시험용액으로 사용하였다.

2) 홍삼농축액의 시험용액

시료 약 2 g을 정밀히 달아 물 50 mL에 완전히 용해한 다음 막필터로 여과(0.45 μm)하여 시험용액으로 하였다.

4. HPLC 조건의 최적화

인삼 중 진세노사이드의 분석을 위해 사용된 기기는 Jasco HPLC로 degasser가 장비된 PU-2089 Plus gradient pump,

Table 1. Composition of the mobile phase employed in the gradient HPLC system

Time(min)	Composition of mobile phase(%)	
	Water	Acetonitrile
0	80	20
5	80	20
25	72	28
35	67	33
40	59	41
45	20	80
47	20	80
50	80	20

AS-2075 Plus autosampler, 그리고 UV-2075 Plus UV-vis detector로 구성되었다. 분석 컬럼은 μ-Bondapak C₁₈(3.9×300 mm i.d., 10 μm, Waters)를 사용하였고, 주입량은 20 μL, 유속은 1.6 mL/min, 컬럼온도는 35°C, 자외선검출기 흡광과장은 203 nm로 설정하여 분석하였다. 이동상으로는 (A) water 와, (B) acetonitrile을 초음파 세척기로 탈기하여 사용하였고, 기울기 용리조건(gradient system)을 이용하여 분석하였다 (Table 1).

5. 분석법 검증

진세노사이드 Rb₁, Rf 및 Rg₁ 표준원액을 메탄올에 희석한 후 혼합하여 제조된 진세노사이드 표준용액을 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL의 농도가 되도록 홍삼농축액 시험용액에 각각 spike한 후 HPLC-UV에 주입하여 얻은 피크면적에서 홍삼농축액 시험용액의 피크면적을 제한 후 표준검정곡선에 대입하여 얻은 농도를 이용하여 회수율을 계산하였다. 그리고, 하루에 실험을 3회 반복 시행하여 일내 정밀도와 정확도를 측정하였고, 3일간 동일 실험을 반복 수행하여 일간 정밀도를 측정하였다.

결과 및 고찰

인삼 중의 진세노사이드 중 최근 건장기능식품 기준 및 규격¹²⁾과 기술표준원에서 발표한 KS 방법¹³⁾에서 함량을 측정하게 되어 있는 Rb₁, Rg₁ 및 고려인삼 특이 진세노사이드인 Rf의 신속분석을 위하여, 이전에 본 연구진에서 개발한 진세노사이드 HPLC 분석방법(KFRI 방법, Fig. 1B)^{14,15)}의 기울기 용리조건 및 유속 등의 분석조건을 변경하여 새로운 분석조건을 확립하였다. 이전의 분석조건은 12종의 진세노사이드를 비교적 높은 정확성으로 분리할 수 있었지만, 총 분석시간이 80분으로 Rb₁, Rf, Rg₁만을 정량할 경우에는 분석시간이 지나치게 길다는 단점이 있었다(Fig. 1B). 또한 Rb₁ 과 Rg₁

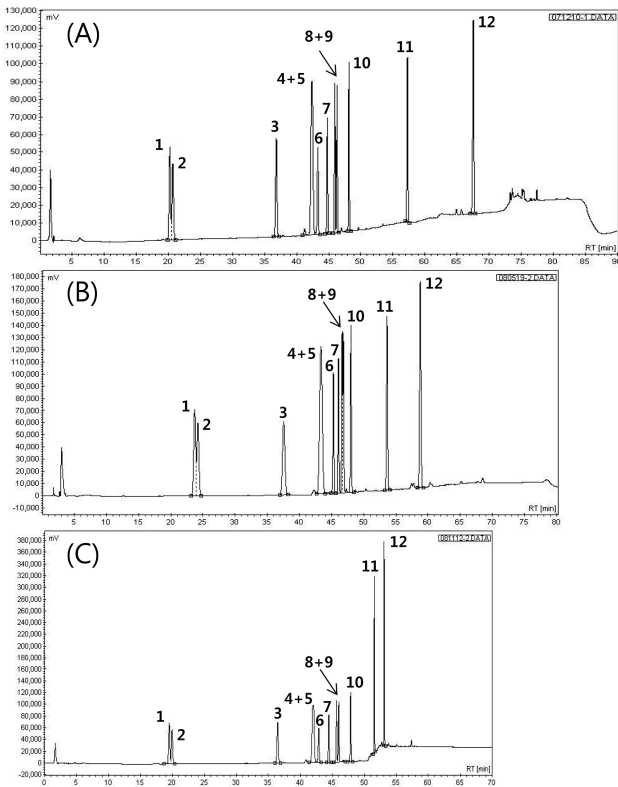


Fig. 1. HPLC chromatograms for 12 ginsenosides standards analyzed by (A) KS method, (B) KFRI method, (C) Korean health food law method. Peaks: 1, Rg₁; 2, Re; 3, Rf; 4, Rg₂; 5, Rh₁; 6, Rb₁; 7, Rc; 8, Rb₂; 9, Rb₃; 10, Rd; 11, Rg₃; 12, Rh₂.

의 함량만을 정량하도록 명시되어 있는 KS 및 건강기능식품의 기준 및 규격에 제시되어 있는 HPLC 분석법의 경우에도 분석시간이 각각 90분, 70분으로 매우 길다는 단점이 있다 (Fig. 1AC). 새로운 분석조건을 이용한 결과, 3종의 진세노사이드의 머무름 시간은 Rg₁ 17.9분, Rf 30.3분, Rb₁ 39.3분으로 40분 내에 모두 검출되었으며 총 분석시간도 50분으로 단축할 수 있었다. 개발된 분석방법으로 얻어진 진세노사이드 표준품의 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. Fig. 2A에서 알 수 있듯이 개발된 HPLC 방법으로 인삼내의 주요 진세노사이드 12종을 동시에 분석 시 서로간의 간섭이 생기지 않는다는 것을 확인하였다. 하지만 홍삼 특이 진세노사이드인 Rg₃, Rh₂의 경우 43분 이후부터 급격한 베이스라인의 상승에 의해 정성분석에는 문제가 없으나, 정량분석은 불가능할 것으로 예측되었다.

본 연구에서 개발된 진세노사이드 Rb₁, Rf, Rg₁ 신속분석 조건의 정량 분석 직선성(linearity)을 개별 진세노사이드별로 살펴보고 개별 진세노사이드의 정량곡선을 구한 다음 상관계수값(r²)을 구해본 결과, 세 가지 진세노사이드에서 0.9997이

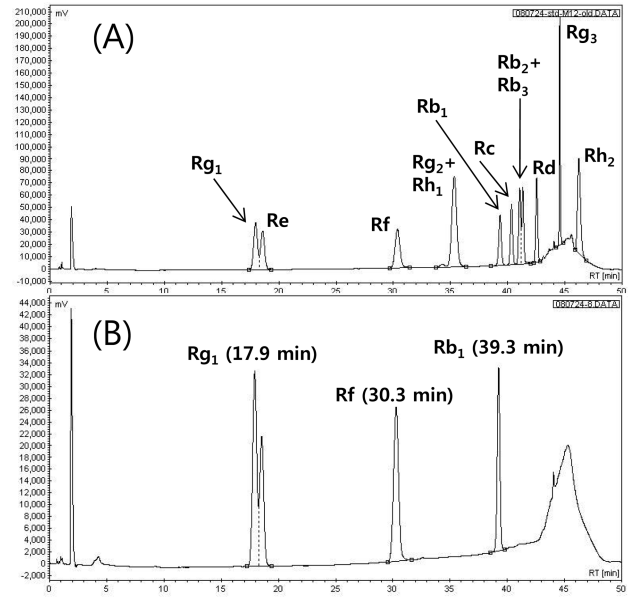


Fig. 2. HPLC chromatograms for (A) 12 ginsenosides standards and (B) 4 ginsenosides standards analyzed by newly developed method.

Table 2. Calibration data of the three examined ginsenosides

Analyte	Calibration equation		r ²
	a	b	
Standard solutions			
Rg ₁	93254	632.4	0.9997
Rf	93781	572.2	0.9997
Rb ₁	65714	371.8	0.9997

상으로 나타나 대체로 높은 직선성을 나타내었다(Table 2).

진세노사이드 표준용액을 이용하여, 하루에 실험을 6회 반복 시행하여 일내(intra-day) 정밀도(precision)를 구하였고, 3일간 실험을 반복 수행하여 일간(inter-day) 정밀도를 구하였다. 개발된 방법의 일내 정밀도는 RSD값이 1.6% 이하, 일간 정밀도는 1.4% 이하로 매우 높은 정밀도와 정확도를 나타내었다(Table 3). 이러한 결과는 개발된 방법이 정량분석에 가능한 재현성을 가지고 있다는 것을 증명해준다고 할 수 있다.

개발된 방법의 정확도(accuracy)를 검증하기 위하여 세 가지 다른 농도의 진세노사이드 표준품을 홍삼 농축액에 spiking한 후 건강 기능 식품 기준 및 규격에 고시된 추출방법을 이용하여 추출한 후 Rg₁, Rf, Rb₁의 회수율을 구해본 결과 회수율은 0.125~0.575 mg/mL의 농도범위에서 101.1~115.0%으로 양호하였다(Table 4). 하루에 실험을 각 농도별로 3회 반복 시행하여 일내(intra-day) 정밀도를 구하였고, 3일간 실험을 반복 수행하여 일간(inter-day) 정밀도(RSD)를 구하였다. 본 실험 방법의 일내와 일간 정밀도는 RSD값이 0.1~2.8%,

Table 3. Intra- and inter-day accuracy and precision of the newly developed method

Analyte	Conc. (mg/ml)	Intra-day(n=6)		Inter-day(n=3)	
		Measured (mg/ml)	RSD(%) ^{a)}	Measured (mg/ml)	RSD(%)
Rg ₁	0.144	0.146±0.002	1.6	0.145±0.002	1.4
Rf	0.138	0.140±0.002	1.5	0.139±0.002	1.3
Rb ₁	0.125	0.126±0.002	1.3	0.126±0.002	1.3

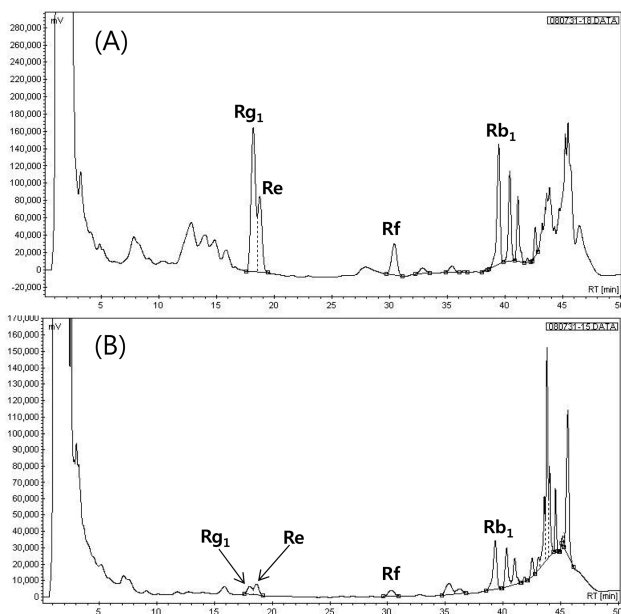
^{a)} RSD(%) = 100×SD/mean

Table 4. Intra- and inter-day accuracy and precision, and recovery of the newly developed method

Analyte	Added (mg/ml)	Intra-day(n=3)			Inter-day(n=3)		
		Measured (mg/ml)	RSD ^{a)}	Recovery (%) ^{b)}	Measured (mg/ml)	RSD	Recovery (%)
Rg ₁	0.144	0.156±0.001	0.9	108.5	0.162±0.005	3.2	112.4
	0.288	0.305±0.002	0.6	106.0	0.307±0.003	1.0	106.9
	0.575	0.622±0.007	0.5	108.2	0.621±0.006	1.0	108.1
Rf	0.138	0.150±0.004	2.8	109.0	0.150±0.004	2.4	109.4
	0.275	0.282±0.001	0.4	102.5	0.281±0.006	2.0	102.1
	0.550	0.556±0.003	0.5	101.1	0.556±0.005	0.9	101.1
Rb ₁	0.125	0.144±0.000	0.1	115.0	0.142±0.002	1.6	113.4
	0.250	0.262±0.002	0.7	105.4	0.262±0.002	0.8	104.9
	0.500	0.515±0.002	0.5	103.0	0.514±0.004	0.7	102.8

^{a)} RSD(%) = 100×SD/mean

^{b)} Recovery(%) = 100×(amount found - amount contained)/amount added.

**Fig 3.** HPLC chromatograms for (A) white ginseng powder and (B) red ginseng concentrate analyzed by newly developed method.

0.7~3.2%이었다(Table 4).

개발된 방법의 시료 적용성을 알아보기 위하여 건강 기능 식품 기준 및 규격에 고시된 추출방법을 이용하여 제조된 백

Table 5. The contents of three ginsenosides analyzed by newly developed method in two different types of ginseng products(n=5)

Compound	White ginseng		Red ginseng concentrate	
	Conc.(mg/g)	RSD(%) ^{a)}	Conc.(mg/g)	RSD(%)
Rg ₁	1.61±0.02	1.4	0.45±0.01	2.1
Rf	0.40±0.00	0.8	0.36±0.01	2.3
Rb ₁	1.33±0.01	0.6	4.04±0.02	0.5

^{a)} RSD(%) = 100×SD/mean

삼 분말 및 홍삼 농축액 시험용액을 개발된 HPLC 방법에 적용한 크로마토그램은 Fig. 3과 같다. 결과에서 보듯이 백삼 분말 및 홍삼 농축액 시험용액에서 Rg₁, Rf 및 Rb₁이 다른 진세노사이드들에 의한 간섭 없이 분리된 것을 확인할 수 있었다. 또한 시험용액을 5회 반복 분석하여 반복성을 시험해 본 결과 백삼 분말 및 홍삼 농축액 시험용액내의 Rg₁, Rf 및 Rb₁ 함량의 RSD(%) 값은 각각 0.6~1.4, 0.5~2.3로 상당히 높은 수준을 나타내었다(Table 5).

요 약

진세노사이드 Rb₁, Rg₁의 경우 인삼의 주요 지표성분으로서 건강기능식품법 등 국내 주요 규격 뿐 만 아니라 Codex 등 국제 규격에서도 주요한 품질지표 인자로 활용되고 있다.

그러나 최근 기술표준원에서 발표한 KS 방법 및 2008년 8월부터 실효된 개정된 건강기능식품법에 제시되어 있는 HPLC를 이용한 Rb₁, Rg₁ 분석법의 경우 분석시간이 각각 90분, 70분으로 매우 길다는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 기존에 제시되어 있는 HPLC 방법을 개선하여 진세노사이드 Rb₁, Rg₁ 및 고려인삼 특이 진세노사이드 Rf를 단시간(50분)에 분석할 수 있는 새로운 방법을 개발한 후 개발된 분석법에 대한 평가를 수행하였다. 컬럼은 μ -Bondapak C₁₈ column(3.9 × 300 mm, 10 μ m), 이동상 용매는 water, acetonitrile로 기울기 용리를 사용하였으며, 검출파장은 203 nm, 이동상의 유속은 1.6 mL/min이었으며 분석온도는 35°C, 시료주입량은 20 μ L로 설정하여 분석하였다. 확립된 분석조건에서의 각 진세노사이드 머무름 시간(RT)은 Rg₁(17.6분), Rf(18.2분), Rb₁(39.1분)이었다. 진세노사이드 3종에 대한 표준검정곡선은 0.01~1.00 mg/mL 농도범위에서 상관계수가 0.9997 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. 회수율은 0.125~0.575 mg/mL의 농도범위에서 101.1~115.0%으로 양호하였으며, 일내(intra-day)와 일간(inter-day) 정밀도(RSD)는 0.1~2.8%, 0.7~3.2%이었다. 따라서, 확립된 분석방법은 인삼 중의 진세노사이드 Rb₁, Rg₁, Rf를 신속하고 효과적으로 분석하는데 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ha, D. C. and Ryu, G. H. : Chemical components of red, white and extruded root ginseng. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **34**(2), 247-254 (2005).
- Attele, A. S., Wu, J. A. and Yuan, C. S. : Ginseng pharmacology, multiple constituents and multiple actions. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1685-1693 (1999).
- Han, S. T., Shin, C. G., Yang, B. W., Hahm, Y. T., Sohn, U. D., Im, B. O., Cho, S. H., Lee, B. Y. and Ko, S. K. : Analysis of ginsenoside composition of woods-grown ginseng roots. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 281-284 (2007).
- Xie, J. T., McHendale, S. and Yuan, C. S. : Ginseng and diabetes. *Am. J. Chin. Med.* **33**, 397-404 (2005).
- Kim, K. T., Yoo, K. M., Lee, J. W., Eom, S. H., Hwang, I. K. and Lee, C. Y. : Protective effect of steamed American ginseng (*Panax quinquefolius L.*) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J. Ethnopharmacol.* **111**, 443-450 (2007).
- Kim, Y. M., Namkoong, S., Yun, Y. G., Hong, H. D., Lee, Y. C., Ha, K. S., Lee, H., Kwon, H. J., Kwon, Y. G. and Kim, Y. M. : Water extract of Korean red ginseng stimulates angiogenesis by activating the PI3K/Akt-dependent ERK1/2 and eNOS pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1674-1679 (2007).
- Bachran, C., Bachran, S., Sutherland, M., Bachran, D. and Fuchs, H. : Saponins in tumor therapy. *Mini Rev. Med. Chem.* **8**, 575-584 (2008).
- Yeo, M., Kim, D. K., Cho, S. W. and Hong, H. D. : Ginseng, the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer, protects ethanol-induced gastric damages in rat through the induction of cytoprotective heat-shock protein 27. *Dig. Dis. Sci.* **53**, 606-613 (2008).
- Kim, S. N., Ha, Y. W., Shin, H., Son, S. H., Wu, S. J. and Kim, Y. S. : Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* C.A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 164-170 (2007).
- Ping, H., Luo, G. A., Wang, Q., Zhao, Z. Z., Wang, W. and Jiang, Z. H. : The retention behavior of ginsenosides in HPLC and its application to quality assessment of radix ginseng. *Arch. Pharm. Res.* **31**(10), 1265-1273 (2008).
- Ando, T., Tanaka, O. and Shibata, S. : Comparative studies on the saponin and sapogenin of ginseng and related crude drugs. *Shoyakugaku Zssshi* **25**, 28-32 (1971).
- 건강기능식품의 기준 및 규격 전면 개정(식품의약품안전청 고시 제 2008-12호), 식품의약품안전청 (2008).
- 인삼 및 인삼제품-진세노사이드(Rb₁, Rg₁)함량 측정-고속액체크로마토그래프법(KS H 2153), 산업자원부 기술표준원 (2007).
- Fuzzati, N. : Analysis methods of ginsenosides. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **812**(1-2), 119-133 (2004).
- Han, C. K., Hong, H. D., Kim, Y. C., Kim, S. S. and Shim, G. S. : Effect of puffing on quality characteristics of red ginseng tail root. *J. Ginseng Res.* **31**(3), 147-153 (2007).
- Cho, C. W., Kim, S. W., Rho, J., Rhee, Y. K. and Kim, K. : Extraction characteristics of saponin and acidic polysaccharide based on the red ginseng particle size. *J. Ginseng Res.* **32**(3), 179-186 (2008).