

人蔘의 加工方法에 따른 Vitamin B 群의 安定性에 관한 研究

崔鎮浩·朴吉童·成鉅淳·李光承·吳成基*

韓國人蔘煙草研究所, *慶熙大學校 產業大學

(1982년 2월 1일 수리)

Study on Stability of B-Vitamins in Processing Methods of Ginseng

Jin Ho Choi, Kil Dong park, Hyun Soon Sung, Kwang Sang Lee and Sung Ki Oh*

Korean Ginseng & Tobacco Research Institute, Seoul, 110

*College of Industry, Kyunghee University, Seoul, 131

(Received February 1, 1982)

Abstract

B-vitamin contents in ginsengs ranged from 55.9 to 65.5 r/g and from 13.2 to 14.5 r/g for niacin and niacin amide, from 4.9 to 5.4 mr/g for cobalamine, and from 3.9 to 8.2 r/g and from 6.9 to 8.2 r/g for riboflavin and thiamine regardless processing. Especially, cobalamine was detected in ginseng.

It is found that the contents of B-vitamins somewhat decreased according to processing methods, washing-dried and steaming-dried of fresh ginseng. Niacin, niacin amide and cobalamine decreased by 6~9%. Therefore, it is approved that B-vitamins were stable in processing methods.

序 論

人蔘 및 人蔘製品이 健康食品으로 脚光을 받게 됨으로써 食品學의 安定性에 대한 研究가 妥當되어 著者들은 熱處理에 의한 成分變化¹⁾, 色相變化²⁾, 製品의 乾燥와 賯藏條件^{3~4)} 및 사포닌의 反應速度論의 研究⁵⁾ 등을 報告하였고 또 HPLC에 의한 사포닌^{6~11)} 및 遊離糖¹²⁾의 定量法 등을 報告한 바 있다.

지금까지의 人蔘의 藥理効能研究는 主로 사포닌中心으로 研究되어 왔으나 사포닌成分만으로는 神秘스러운 人蔘의 藥理効能을 만족하게 설명할 수 없다. 최근 들어 非사포닌成分에 대한 學者들의 關心이 높아져서 韓¹³⁾ 등은 人蔘의 ethyl acetate割分에서 maltol이란 成分를 分離하였는데 이것은 抗酸化作用에 의한 老化抑制効能을 갖는다고 報告하였고 黃¹⁴⁾, 尹¹⁵⁾ 등은 petroleum ether割分에 抗癌作用이 있다고 報告하였으며 okuda¹⁶⁾는 insulin-like substance에 의한 抗糖尿病作用을 報告

하였다. 한편 後藤^{17~18)} 등은 生藥中에서 niacin 및 pantothenic acid를 微生物法에 의해 分析하였고 金^{19~20)} 등도 같은 方法을 利用, 人蔘中에서 biotin, pantothenic acid, niacin, folic acid 및 cobalamine을 分析하여 報告한 바 있다.

非사포닌成分으로서 vitamin은 體內合成이 거의 不可能한 微量有機營養素로서 各種 代謝에 關與하는 등 중요한 生理作用을 갖고 있으며 이 중 vitamin B群의 分析은 主로 微生物學的方法에 의하고 있으나 著者들은 HPLC法을 利用, 人蔘類중의 vitamin B群의 含量變化를 調査하여 人蔘加工方法에 따른 安定性을 調査하여 그 結果를 報告한다.

材料 및 方法

1. 材 料

1981年度 金浦產 6年根水蔘을 市中에서 購入하여 常法에 따라 白蔘 및 紅蔘을 製造하여 試料로 사용하였다.

2. 方 法

1) 試料의 抽出 및 分割

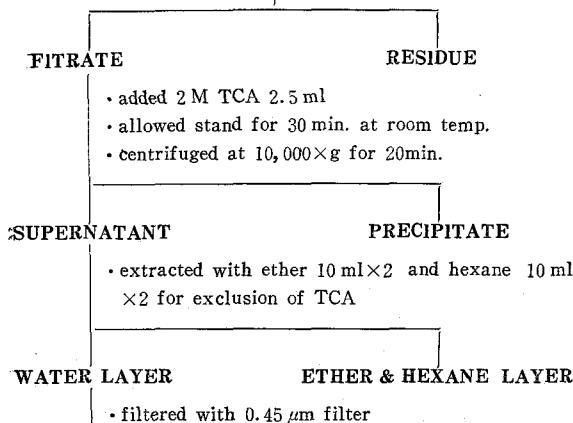
水蓼을 水洗, 細切한 후 20g 을 秤量하고 白蓼 및 紅蓼은 100 mesh로 粉碎한 후 각각 5g 쪽 을 秤量하여 Fig. 1의 方法에 따라 抽出 및 分割하여 vitamin B群 分析用 試料로 사용하였다.

2) 試薬 및 標準溶液의 調製

Vitamin B群의 標準品은 Sigma製 特級試藥을, 移動相(mobile phase)으로 사용한 메탄올과 증류수는 和光純藥製 HPLC用을, 緩衝溶液調製를 위해 사용한 PIC A, PIC B 등은 Waters製 試藥을 사용하였으며 抽出用試藥은 전부 1級試藥을 사용하였다.

GINSENG (5-20g)

- homogenized with 0.1N HCl (50ml) for 5min.
- hydrolyzed in autoclave for 20min. at 121°C
- adjusted pH 4.5 with 2M sodium acetate
- filtered with Whatman No. 1



B-VITAMINS ANALYSIS

Fig. 1. Flow sheet for extraction and analysis of vitamin B group in ginseng

HPLC用 移動相은 PIC(paired ion chromatography)試藥 1 vial 을 water/methanol 溶液(74/26, 78/22) 1,000 ml에 용해하여 0.005 M 緩衝溶液을 調製하여 사용하였고 vitamin B群의 標準溶液은 標準品을 5mg 쪽 秤量하여 0.01 N HCl 5ml에 녹여 Al-foil로 遮光하여 冷藏庫에 보관하였으며 사용하기 직전에 다시 0.01N HCl 으로 10倍 稀釋하고(100 μg/ml) 0.45 μm membrane filter(Millipore Inc.)로 濾過하여 사용하였다.

3) HPLC의 條件 및 定量

HPLC는 analytical HPLC/ALC-244(Waters Associates Inc., Milford Mass., USA)를 사용하였으며 檢出器는 UV detector(model 440)을 사용하여 recorder는 data module에 연결, 2 pen system을 사용하였다. 이 때 HPLC의 分析條件은 다음과 같다.

Packing: μ Bondapak C₁₈

Column: 4.0 mm ID×30 cm

Mobile phase: water/methanol with PIC B-6
(pH 3.5) (74/26, 78/22, v/v)

Flow rat: 0.9 ml/min, 1.2 ml/min

Detector: UV at 254 nm, 0.1 aufs

定量은 external standard quantitation 方法에 따라 모든 試料는 HPLC에 注入하기 전에 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 10 μl 쪽 injection하였고 vitamin B群의 標準溶液은 2.5~25 μl로 injection하여 data module에 의해 기록, 計算된 數值로써 標準檢量線을 作成, 試料의 數值와 比較하여 計算하였다.

結果 및 考察

1. 抽出條件의 檢討

試料중의 vitamin B群의 抽出은 水溶性 vitamin이기 때문에 물로써 加溫抽出하였다. 그러나 vitamin B群中에서 niacin, niacin amide, pyridoxine, riboflavin, thiamine 및 cobalamine은 대체로 酸性溶液 중에서 熱에 安定하며 補酵素로서 結合型으로 되어 있는 것이 많기 때문에 pH를 酸性으로 調整하여 加溫抽出하였다.

따라서 抽出方法은 Ang²¹ 등의 肉製品, Gregory²² 및 Toma²³ 등의 穀類製品 中의 vitamin B群의 抽出方法을 일부 修正하여 Fig. 1과 같은 方法으로 0.1N HCl을 사용, 121°C에서 20分間 autoclave內에서 加熱抽出하였다. 물론 抽出中에 热에 의한 다소간의 損失이 예상되며 또한 抽出 중에 光이나 酸化劑에 의한 分解도 고려해야 한다. 또 folic acid, pantothenic acid 및 biotin 등은 酸性에서 不安定하므로 同時에 安定하게 抽出할 수는 없었다.

抽出溶液 중에 混在하는 灰分은 濾紙로써 濾過하여 去除하였고 HPLC分析時 分離能에 가장 影響을 주는 것은 蛋白質이므로 著者¹² 등은 HPLC에 의한 遊離糖의 定量에서 TCA를 사용하여 除蛋白을 試圖하였으나 여분의 TCA가 rhamnose와 같은 位置에서 RI detector에 檢出되므로 TCA에 의한 除蛋白이 不可能하여 80%에 탄을을 사용하여 遠心分離(8,000 r.p.m.)에 의해 除蛋白을 하였다. 그러나 vitamin 分析時는 UV 檢出器를 사용하는데, TCA에 의한 除蛋白이 가능할 것이나

TCA 가 強酸性이고 分離能에 영향을 줄 것을 예상하여 吉田²⁴⁾ 등의 方法에 따라 과방의 TCA 를 에테르로抽出, 除去하고 이 때 에테르가 일부 물에 混入되기 때문에 핵산으로 에테르를抽出, 除去함으로써 TCA에 의한 妨害物質을 完全 除去할 수 있었다. 또한 抽出過程이 複雜한 뿐만 아니라 試料 중에 混在할 可能성이 있는 妨害物質을 除去하여 分離能을 좋게 하기 위한 方法으로 메탄올로써 Celite 545(Hayashi Co.)를 사용한 column chromatography 를 함으로써, 또 SEP-PAK C₁₈(sample-enrichment and purification) cartridge (Waters Associates Inc.)를 사용함으로써, 極性調節에 의한 妨害物質의 除去가 可能함을 알 수 있었다.

2. 分離條件의 選定

Vitamin B群은 抽出뿐만 아니라 分離條件의 選定에서도 溶液의 液性과 檢出器의 波長選擇이 무엇보다 중요하다. 波長選擇을 위하여 中性領域에서는 PIC A(tetrabutyl ammonium phosphate)로써 pH를 7.0으로 조정하고 또 酸性領域에서는 PIC B-6(l-hexane sulfonic acid)로써 pH를 3.5로 조정한 후 水溶性 vitamin 標準品을 溶解(100 μg/ml)하여 細胞한 후 UV吸收를 비교한結果는 Table 1과 Fig. 2, 3과 같다.

Table 1. Ultraviolet absorption of water soluble vitamins in a aqueous solution(pH 7.0) at various wavelength

Vitamins	UV detector wavelength(nm)				
	254	280	313	340	365
Ascorbic acid	0.580	0.425	0.065	0.060	0.060
Niacin	0.460	0.082	0.053	0.050	0.050
Niacin amide	0.442	0.080	0.052	0.050	0.050
Pyridoxine HCl	0.274	0.450	0.385	0.250	0.055
Cobalamine	0.182	0.192	0.123	0.140	0.290
Riboflavin	0.960	0.610	0.139	0.290	0.428
Thiamine	0.495	0.378	0.065	0.062	0.062
Folic acid	0.182	0.298	0.180	0.158	0.150
Biotin	0.048	0.051	0.057	0.056	0.060
Pantothenic acid	0.032	0.040	0.048	0.049	0.051

Table 1은 中性溶液(pH 7.0)에서의 UV吸收를 본 것으로서 ascorbic acid 와 vitamin B群중에서 niacin, niacin amide, riboflavin 및 thiamine은 254 nm에서, pyridoxine과 folic acid는 280 nm에서 또 cobalamine은 365 nm에서 最大吸收를 나타내고 있으므로 UV detector의 波長을 각각 달리해서 分析하는 것이 바람직하였다. 그러나 biotin과 pantothenic acid는 어느 波長에서도 거의吸收가 되지 않으므로 中性溶液을 移動相으로 하여 UV detector로써는 分析할 수 없었다.

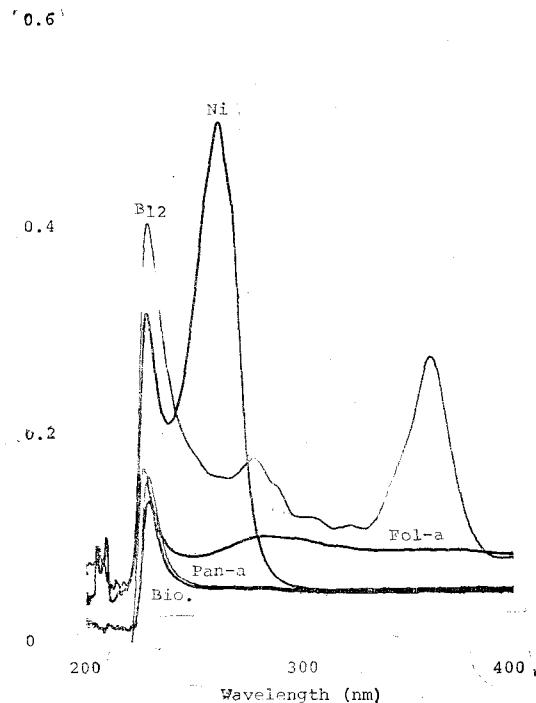


Fig. 2. Ultraviolet absorption of water soluble vitamins in a mobile phase (pH 3.5) at various wavelengths

Fig. 2 및 3은 酸性溶液(pH 3.5)에서의 UV吸收를 본 것으로서 中性溶液과 거의 같은 경향을 나타내지만 다만 folic acid만은 中性溶液에서 280 nm에서 最大吸收를 나타내던 것이 酸性溶液에서는 거의吸收가 되지 않으므로 酸性溶液을 移動相으로 하여 分析할 수는 없었다. 또한 biotin과 pantothenic acid는 中性溶液과 마찬가지로 酸性溶液에서도吸收가 되지 않아서 이를 溶液을 移動相으로 해서는 分析할 수 없음을 알 수 있었다.

따라서 vitamin B群分析에 사용하는 μ Bondapak C₁₈ column은 pH 2.0~8.0에서 安定하므로 抽出 및 分析中의 vitamin B群의 分解를 防止하기 위하여 移動相의 液性를 pH 3.5 부근의 缓衝溶液으로 하여 HPLC로 分析함이 이상적이었는데 이 때 適正波長은 niacin, niacin amide, riboflavin 및 thiamine은 254 nm, pyridoxine은 280 nm, cobalamine은 365 nm가 效果的이었다. 그러나 folic acid, biotin 및 pantothenic acid는 適正波長을 설정할 수 없었다.

Vitamin B群의 分離能도 移動相의 液性에 크게 影響을 받을뿐만 아니라 UV吸收에 의한 妨害物質 등으로 인하여 分析에 어려움이 많았으므로 이온교환크로

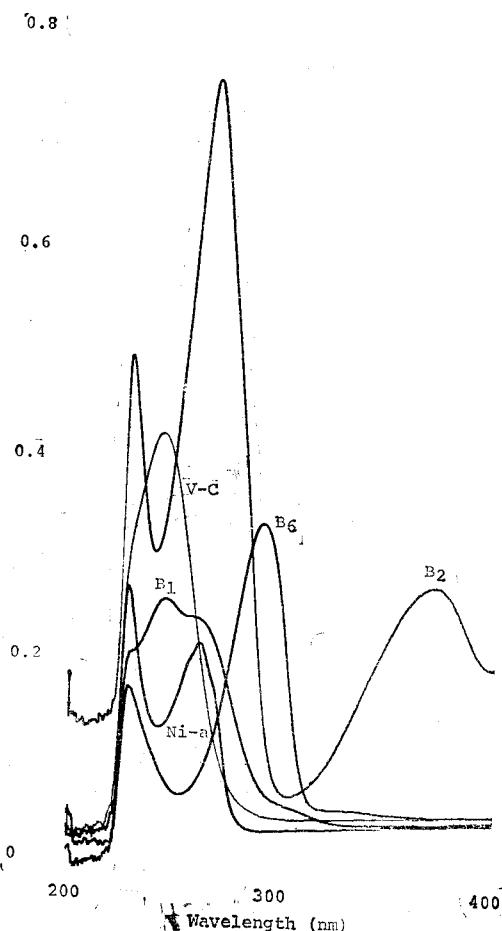


Fig. 3. ultraviolet absorption of water soluble vitamins in a mobile phase(pH 3.5) at various wavelengths

마토그래피에 의한 分離가 어려운 일부 醫藥品, 染料, vitamin 등의 分離에 應用되고 있는 쌍이온크로마토그래피(paired ion chromatography) 方法을 導入하였다. pH 7.5 부근의 緩衝溶液인 PIC A(tetrabutyl ammonium phosphate) 및 pH 3.5 부근의 緩衝溶液인 PIC B-5(l-pentane sulfonic acid), PIC B-6(l-pentane sulfonic acid), PIC B-7(l-heptane sulfonic acid)을 사용한 water/methanol system을 利用한 分析을 檢討하였던 바 PIC B-6가 緩衝溶液으로서의 安定性이 가장 높고 分離能도 良好하였다.

따라서 vitamin B群 중에서 niacin, niacin amide, pyridoxine, cobalamine, riboflavin 및 thiamine의 分析에서는 PIC B-6를 사용한 water/methanol system을 이용하였으며 移動相의 比와 流速은 78/22와 1.2

mL/min으로서 niacin, niacin amide 및 Cobalamine는, 74/26과 0.9 mL/min으로서 riboflavin 및 thiamine을 각각 分析하였다. 또 이 때 UV 檢出器의 波長은 pyridoxine과 Cobalamine은 다소 문제가 있었지만 254 nm에서 分析하였다.

Fig. 4는 PIC B-6을 사용한 water/methanol(74/26)을 移動相으로 流速은 0.9 mL/min으로 하여 水溶性 vitamin 標準溶液 2.5 μ L 씩을 injection 하여 얻은 HPLC chromatogram이다. 標準品의 分離能은 아주 양호하였으나 實際 試料에서는 niacin과 niacin amide가 overlap 되기 때문에 riboflavin 및 thiamine分析에만 利用하였다.

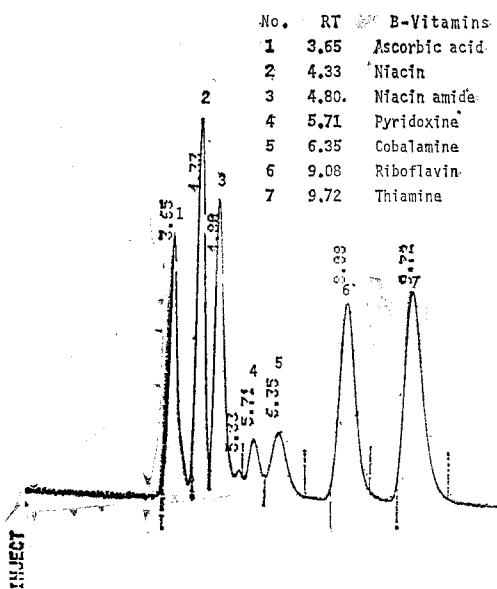


Fig. 4. HPLC chromatogram of standard B-vitamins; Mobile phase; water/methanol(74/26) with PIC B-6, Flow rate; 0.9mL/min, UV detector; at 254nm 0.1 aucts

Fig. 5는 역시 PIC B-6을 사용한 water/methanol(78/22)을 移動相으로 流速을 1.2 mL/min으로 하고 水蓼試料를 10 μ L 씩 injection 하여 얻은 HPLC chromatogram을 나타낸 것으로서 niacin, niacin amide 및 cobalamine은 分離가 可能하였으나 RT 13.95 부근의 riboflavin은 分離가 어려웠으며 pyridoxine은 6.01 부근에서 妨害物質이混在하므로 定量이 不可能하였다. 따라서 niacin, niacin amide 및 cobalamine의 分析에만 利用하였다.

3. 回收率 및 再現性의 檢討

試料에 添加한 vitamin B群의 回收率을 檢討하기 위

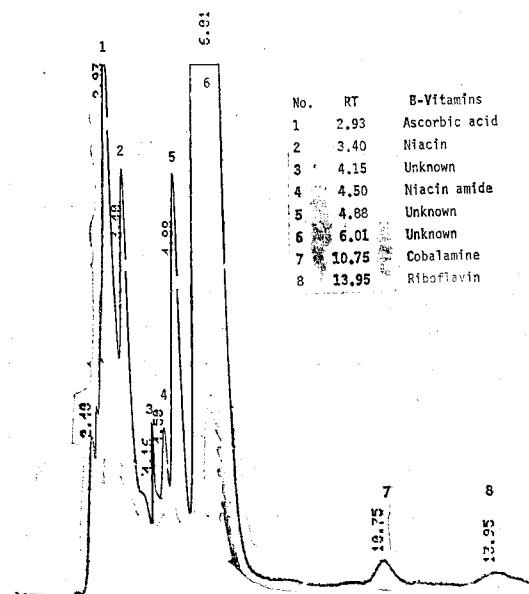


Fig. 5. HPLC chromatogram of B-vitamins extracted in fresh ginseng: Mobile phase; water/methanol(78/22) with PIC B-6, Flow rate; 1.2 ml/min, UV detector; at 254 nm 0.1 aufs

하여 白蔘試料에 vitamin B群의 標準溶液을 각각 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 添加하여 Fig. 1과 같은 操作으로 處理한 試料를 10 μl 씩 injection 하여 얻은 數值로써, 標準檢量

線을 이용 定量하여 回收率을 比較하여 본 結果, 大부분 83~94%의 回收率을 나타냈으나 folic acid, biotin 및 pantothenic acid는 거의 回收되지 않았다. 이는 이들 vitamin B群의 pH 3.5 부근의 酸性溶液에서 UV吸收가 거의 되지 않아, UV 檢出器로써는 檢出이 不可能하기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 檢出이 可能한 niacin, niacin amide, cobalamin, pyridoxine, thiamine 및 riboflavin 등은 대체로 높은 回收率을 나타내고 있었다. 이러한 사실은 許²⁵⁾가 報告한 vitamin B群의 酸性溶液에서 煎에 대단히 安定하다는 것과 일치하고 있다. 또 3종류의 人蔘類에서 製造한 試料溶液을 5回씩 반복 측정하여 再現性을 검討한 結果, 再現性은 94% 이상의 높은 値을 나타내고 있었다.

4. 加工方法에 따른 含量變化

同一한 6年根原料水蔘을 사용하여 水洗, 日光乾燥한 白蔘과 蒸蔘日光乾燥한 紅蔘 등 加工方法을 달리한 人蔘類의 vitamin B群의 含量變化는 Table 2와 같다.

niacin 含量은 대체로 55.9~61.5 r/g 으로서 後藤¹⁷⁾가 報告한 60 r/g과 거의 비슷한 値을 나타내지만 金²⁰⁾등이 報告한 15.5 r/g보다 약 4倍 정도의 높은 値을 나타내었다. niacin amide의 含量은 13.2~14.5 r/g으로 이 値은 後藤¹⁷⁾가 報告한 30 r/g보다 훨씬 낮은 値을 보여주고 있었다. 또 加工方法에 의한 含量變化는 6~9%로서 加工中の niacin 및 niacin amide의 손실이 크지 않음을 알 수 있었다.

Table 2. B-vitamin contents in fresh, white and red ginseng

Ginsengs	B-vitamin contents (mean \pm SD)				
	Niacin(r/g)	Niacin amide(r/g)	Cobalamin(mr/g)	Riboflavin(r/g)	Thiamine(r/g)
Fresh ginseng	61.5 \pm 2.4	14.5 \pm 0.52	5.4 \pm 0.20	4.8 \pm 0.16	8.2 \pm 0.24
White ginseng	59.8 \pm 1.8	13.9 \pm 0.43	5.1 \pm 0.15	4.4 \pm 0.10	7.4 \pm 0.18
Red ginseng	55.9 \pm 2.8	13.2 \pm 0.61	4.9 \pm 0.21	3.9 \pm 0.18	6.9 \pm 0.25

일부 豆類醣酵食品에만 微量 存在할 뿐 植物性食品에는 거의 없는 것으로 알려진 cobalamin이 人蔘에 存在하고 있다는 사실은 대단히 紹美있는 일로서, 人蔘의 惡性貧血治療 및 防禦作用과 밀접한 관계가 있다고 생각된다. 人蔘類中的 cobalamin 含量은 4.9~5.4 mr/g으로서, 金¹⁹⁾등이 報告한 0.6 mr/g보다 약 8~9 배의 높은 値을 나타내고 있는데 이는 分析方法에 의한 差異때문인 것으로 생각된다. 또 加工方法에 따른 cobalamin의 含量變化도 niacin, niacin amide와 거의 비슷한 경향을 나타내고 있었다.

人蔘類中的 riboflavin과 thiamine의 含量變化를 보면 3.9~4.8 r/g 및 6.9~8.2 r/g으로서 다른 vitamin B群에 비해 다소 높은 경향을 나타내고 있는데 이는

niacin, niacin amide 및 cobalamin 등에 비해 安定性이 다소 낮기 때문인 것으로 생각된다.

要 約

人蔘의 非사포닌成分인 vitamin 중 生體內에서 補酵素로서 各種代謝 및 生理作用과 關係가 깊은 vitamin B群의 含量變化를 HPLC法으로 定量하여 人蔘加工方法에 따른 vitamin B群의 安定性을 檢討한 結果는 다음과 같다.

- 人蔘類中的 vitamin B群의 定量은 逆相 column인 μ Bondapak C₁₈을 사용한 HPLC方法이 效果的이다.
- UV 檢出器의 適正波長은 移動相의 液性을 pH-

3.5로 調整하였을 때 niacin, niacin amide, riboflavin 및 thiamine 은 254 nm, pyridoxine 은 280 nm, cobalamine 은 365 nm 에서 分析함이 効果의하였다.

3. 移動相은 PIC B-6 을 사용한 water/methanol system 을 利用하여 混合比와 流速은 78/22, 1.2 ml/min 으로 하여 niacin, niacin amide, 및 cobalamine 을, 또 74/26, 0.9 ml/min 으로 하여 riboflavin 및 thiamine 을 分析함이 効果의하였다.

4. 人蔘加工方法에 따른 vitamin B群의 含量變化를 보면 niacin 및 niacin amide 는 55.9~61.5 r/g 및 13.2~14.5 r/g 이고 cobalamine 은 4.9~5.4 mr/g 이며 riboflavin 및 thiamine 은 3.9~4.8 r/g 및 6.9~8.2 r/g 으로서, 含量變化의 폭이 크지 않았다. 따라서 vitamin B群의 安定性은 대체로 높은 傾向을 나타내고 있었다.

文 獻

1. 崔鎮浩, 金友政, 梁宰源, 成鉤淳, 洪淳根: 韓國農化學會誌, 24(1), 50(1981)
2. 崔鎮浩, 金友政, 朴吉童, 成鉤淳: 高麗人蔘學會誌, 4(2), 165(1980)
3. 朴吉童, 崔鎮浩, 金玉燦, 朴澤奎: 韓國食品科學會誌, 13(3), 202(1981)
4. 朴吉童, 金友政, 崔鎮浩, 梁宰源, 成鉤淳: 高麗人蔘學會誌, 5(1), 1(1981)
5. 崔鎮浩, 金友政, 金斗河, 成鉤淳, 吳成基: 韓國食品科學會誌, 14(1), 投稿中
6. Choi, J.H., Nagasawa, T., Nishino, Y. and Oura, H.: The 100th Annual Meeting of pharmaceutical of Japan(Tokyo), Apr. 2-5, (1980)
7. Nagasawa, T., Oura, H., Choi, J.H. and Bae, H.W.: The 3rd International Ginseng Symposium(Seoul), Sept. 8-10, (1980)
8. Nagasawa, T., Choi, J.H., Nishino, Y. and Oura, H.: Chem. Pharm. Bull., 28(12), 3701

- (1980)
9. 崔鎮浩, 金友政, 裴孝元, 吳成基, 大浦彥吉: 韓國農化學會誌, 23(4), 199(1980)
10. 崔鎮浩, 金友政, 洪淳根, 吳成基, 大浦彥吉: 韓國農化學會誌, 23(4), 206(1980)
11. 崔鎮浩, 金友政, 洪淳根, 吳成基, 大浦彥吉: 韓國食品科學會誌, 13(1), 57(1981)
12. 崔鎮浩, 張辰奎, 朴吉童, 朴明漢, 吳成基: 韓國食品科學會誌, 13(2), 107(1981)
13. Han, B.H., Park, M.H., Woo, L.K., Woo, W.S. and Han, Y.N.: The 2nd International Ginseng Symposium(Seoul), 13(1978)
14. Hwang, W.I. and Cha, S.M.: The 2nd International Ginseng Symposium(Seoul), 43(1978)
15. Yoon, R.S., Lee, S.Y. and Yun, T.K.: The 2nd International Ginseng Symposium(Seoul), 51(1978)
16. Okuda, H.: The 2nd International Ginseng Symposium(Seoul), 75(1978)
17. 後藤 實: 日本藥學雜誌, 77(5), 467(1957)
18. 後藤 實: 日本藥學雜誌, 77(5), 471(1957)
19. 金泳根, 田桂秀, 安丙俊: 大韓藥學會誌, 8, 80(1964)
20. 金泳根, 許武彥: 大韓藥學會誌, 8, 85(1964)
21. Ang, C.Y.W. and Moseley, F.A.: J. Agric. Food Chem., 28(3), 483(1980)
22. Gregory, J.F.: J. Agric. Food Chem., 28(3), 486(1980)
23. Toma, R.B. and Tabekhia, M.M.: J. Food Sci., 44(1), 263(1979)
24. 吉田繼親, 柚木伸夫, 中鴨由紀, 海東常敏, 安茂壽夫: 日本藥學雜誌, 98(10), 1319(1978)
25. 許滿昊: 慶熙大學校大學院 碩士學位請求論文, 11(1981)