

# 人蔘屬과 五加皮屬의 Nucleobases 및 Nucleosides 의 分析

曹榮鉉 · 洪淳根 · 朴來正\*

韓國人蔘煙草研究所 · \*弘益大學校 工科大學 化學工學科  
(1982년 10월 15일 수리)

## Determination of Nucleobases and Nucleosides in Panax and Acanthopanax genus

Yung Hyun Cho, Soon Keun Hong and \*Nae Jung Park

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, \*Dept. of Chemical Engineering,  
College of Engineering, Hong-ik University

(Received October 15, 1982)

### Abstract

Nucleobases and nucleosides in Panax and Acanthopanax genus were determined by high-performance liquid chromatography. Chromatography was performed on a reversed-phase system with  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> column using phosphate buffer and 80% methanol gradient. Content of each nucleobase in two genera was about 0-2mg/100g. Panax was contained guanosine and/or adenosine ca. 15-22mg/100g; and Acanthopanax guanosine ca. 3-8mg/100g and adenosine ca. 2-7mg/100g. Considerable amounts of cytidine, uridine, inosine, and thymidine were also detected in two genera.

### 序 論

人蔘과 五加皮는 같은 五加科식물로서 人蔘은 dammarane系 사포닌, 五加皮는 steroid系 사포닌을 주성분으로 함유하고 있다.<sup>1)</sup> 人蔘이 갖는 여러 가지의 效能중 일부는 사포닌이 아닌 다른 成分의 活性에 기인한다고 보고 최근에 이에 대한 研究가 이뤄지고 있다.<sup>3-6)</sup> Okuda 등<sup>6)</sup> 은 人蔘의 펩타이드 分劃을 硯회에 투여하면 脂肪分解抑制效果가 있음을 입증하고 있으며, 이 分劃에서 核酸成分인 adenosine이 分離되어 관심을 끌고 있다. 核酸은 動物細胞의 代謝, 成長, 增殖등 生體活動을 지배한다는 사실은 이미 잘 알려져 있으며, 최근 수년간의 연구보고에서 몇 가지의 核酸成分들이 藥理作用을 나타낸다는 사실이 發表되고 있다. adenosine과 thymidine의 mouse pancreatic islet에서 인슐린 分泌促進<sup>7)</sup>, deoxypurine 또는 deoxypyrimidine化合物의 血管弛緩效果,<sup>8)</sup> inosine의 低酸素症抑制效果<sup>9)</sup> 등이 알려져 있으며 특히 adenosine은 인슐린 分泌促進은 물론 冠狀動脈弛緩<sup>10)</sup>과 抗脂肪分解效果<sup>6, 11, 12)</sup>

가 있음이 보고되어 核酸成分에 대한 관심이 높아지고 있다.

이러한 核酸塩基나 nucleoside가 高等植物에 있어서 穀類 등의 種子에 다수 존재하는 것<sup>13)</sup>으로 알려져 있으며 생약류에서 Hiyama 등<sup>14)</sup>이 白蔘에서 uracil, adenine, uridine을 分析하여 보고하였을 뿐이다. 본 研究에서는 核酸塩基나 nucleoside가 人蔘 및 五加皮의 生理活性研究<sup>15-17)</sup>나 品質評價에 중요한 意義를 부여하게 될것으로 생각되어 고속액체크로마토그래피에 의하여 그 含量 및 profile을 比較 分析하였다.

### 材料 및 方法

#### 1. 材 料

紅蔘과 白蔘은 竹坪人蔘試驗場産 6年根水蔘(1981년 9월 채굴)으로 常法<sup>18)</sup>에 따라 製造하였으며 美國蔘(*Panax quinquefolium* L.), 三七蔘(*Panax notoginseng*), 日本 및 中國産 人蔘(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 등은 海外市販品을, 지리산 五加皮, 가시오가피 및 서울 五加皮는 市中 生藥劑를 使用하였다.

### 2. 方法

#### 1) 試藥

cytosine, uracil, guanine, thymine, adenine, adenosine 등은 E. Merck 製 (獨逸), inosine 과 thymidine 은 Aldrich 製 (美國), cytidine 과 uridine 은 Sigma 製 (美國), hypoxanthine 은 東京化成製 (日本) 特級試藥을 利用하였으며 기타 試藥 및 溶媒는 市販特級을 利用하였다.

#### 2) 試料液의 調製

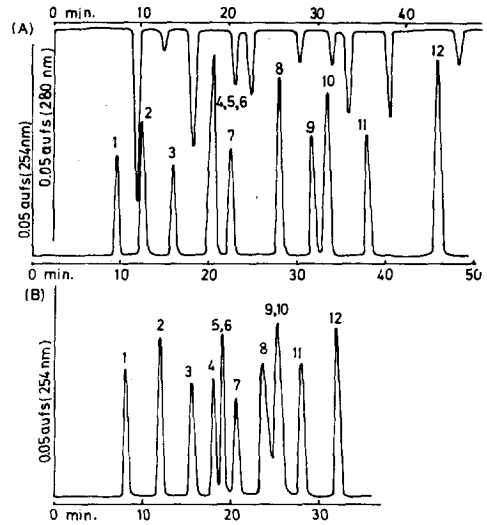
材料를 細末로 한 후 約 3g을 精秤하여 100ml 삼각 플라스크에 넣고 0.01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10ml와 3% trichloroacetic acid 20ml를 加하여 때때로 진탕하면서 하루밤 放置한후 遠心分離 (6000 r.p.m., 30分) 시켰다. 上澄液을 分액여두에 취하여 ether 30ml로 세척하고 水層을 다시 ethyl ether로 2회 더 세척한후 水層을 취하여 대략 半量으로 減壓濃縮한 후 0.01M KOH液으로 25ml로 定容하여 試料液으로 하였다.

#### 3) 試料分析

2개의  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (3.9mm $\phi$  × 30cm, Waters Associates, Inc., U.S.A) column을 ALC-244 (Waters Associates, Inc.)에 設置하고 標準液 또는 試料液 10~20 $\mu$ l를 注入하여 磷酸第 2 수소칼륨과 80% 메타놀을 linear gradient시켜 各成分을 UV254nm 및 UV280nm에서 同時에 分析하였다. peak는 半值幅法과 檢量線에서 그 含量을 算出하였다.

**Table 1.** Absorbance ratio ( $\epsilon_{254}/\epsilon_{280}$ ), capacity factor ( $K'$ ) and separation factor ( $\alpha$ ) calculated from two  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> columns in series. Analytical condition same as in Fig. 1 (A)

	$\epsilon_{245} / \epsilon_{280}$	$K'$	$\alpha$
Cytosine	0.60 ± 0.02	1.12	1.54
Uracil	6.16 ± 0.19	1.72	1.44
Cytidine	0.76 ± 0.11	2.48	1.44
Uridine	2.30 ± 0.18	3.57	1.00
Guanine	1.61 ± 0.15	3.57	1.00
Hypoxanthine	12.81 ± 0.24	3.57	1.09
Thymine	1.72 ± 0.10	3.89	1.31
Inosine	5.71 ± 0.21	5.09	1.20
Adenine	7.98 ± 0.17	6.12	1.03
Guanosine	2.03 ± 0.13	6.28	1.16
Thymidine	1.18 ± 0.08	7.26	1.24
Adenosine	6.52 ± 0.21	9.00	



**Fig. 1** Separation of some nucleobases and nucleosides. (A) column,  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (3.9mm  $\phi$  × 30cm) × 2; eluent, (I) 0.01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.16), (II) MeOH-H<sub>2</sub>O (800 : 20); gradient, 0-20% of pump (II) (linear) in 30min; flow rate, 1.0ml/min; (B) column,  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (3.9mm  $\phi$  × 30cm) × 2; eluent, (I) 0.01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.10), (II) MeOH-H<sub>2</sub>O (82:18); gradient 0-25% of pump (II) (linear) in 30min; flow rate, 1.0ml /min. keywords: 1. cytosine, 2. uracil, 3. cytidine, 4. uridine, 5. guanine, 6. hypoxanthine, 7. thymine 8. inosine, 9. adenine, 10. guanosine, 11. thymidine 12. adenosine

### 結果 및 考察

#### 1. Column의 選擇性과 分離能

$\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> column에 0.01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.16) 과 methanol-water (80/20) 의 溶媒系를 linear gradient시키면 uridine, guanine, hypoxanthine 외에는 核酸成分들이 Fig. 1(A)와 같이 良好하게 分離되었다. 한편 0.01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.10) 과 methanol-water (82/18) solvent system (條件 (B))를 linear gradient시키면 uridine은 分離가 가능했고 guanine 과 hypoxanthine은 亦是 分離되지 않았다. 또 이 조건에서는 guanosine과 adenine의 peak가 중첩되었다

Fig. 1(A)의 各成分의 吸光度比 ( $\epsilon_{254}/\epsilon_{280}$ ), 分離係數 (separation factor), 容量係數 (capacity factor)를 算出하여 Table 1에 표시하였다.

2. 檢量線의 作成

核酸標品 (authentic sample)을 Fig. 1 (A)와 같은 條件에서 0.1~1.0 $\mu$ g을 注入하여 UV 254nm에서 peak面積을 測定하여 檢量線을 作成했다.

guanine 및 hypoxanthine은 Fig. 1 (B)의 條件에서 254nm와 280nm에서 나타나는 peak의 面積을 既知量의 guanine과 hypoxanthine을 주입하여 다음 式과 같이 적용하면 두 成分이 分離되지 않더라도 guanine이나 hypoxanthine에 의한 面積을 算出할 수 있었다.

$$A_{254} = 1963 W_G + 296 W_H$$

$$A_{280} = 1330 W_G + 217 W_H$$

$A_{254}$  : 254nm에서 나타나는 peak 面積

$A_{280}$  : 280nm에서 나타나는 peak 面積

$W_G$  : guanine의 含量( $\mu$ g)

$W_H$  : hypoxanthine의 含量( $\mu$ g)

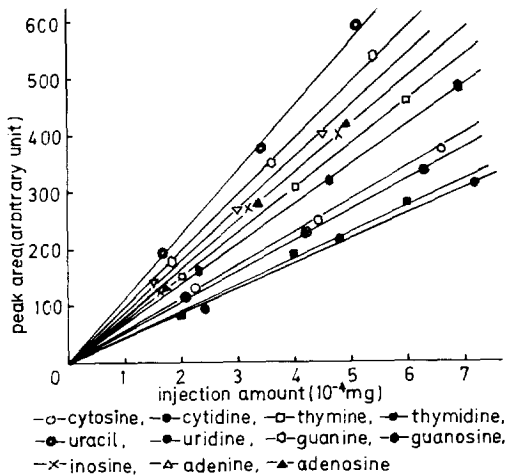


Fig. 2 Relationship between the peak area and the injection amount of nucleobase or nucleoside.

The area was calculated from the peak height multiplied by the half-height width. Analytical conditions same as in Fig. 1 (A). Only uridine curve was obtained from condition same as in Fig. 1 (B).

3) 回收率

回收率測定은 白蔘 5g에 cytosine, uracil, uridine, cytidine, thymine, inosine 및 thymidine을 각각 2mg씩, 가시五加皮 5g에 guanine, adenine, adenosine 및 guanosine을 각 2mg씩 添加한후 前述 方法에 따라 分析試料液을 調製하여 分析하여 Table 2에 表示하였다.

nucleoside의 回收率은 thymidine 89.5%~inosine 98.5%로서 약간의 損失이 있었으나 本실험에서 이에 대한 補正은 하지 않았다.

4. 人蔘 및 五加皮中 遊離核酸塩基와 뉴클레오사이드의 分析

人蔘 및 五加皮中 遊離核酸塩基와 nucleoside를 分析한 chromatogram은 Fig. 3~Fig. 7과 같고, 그들의 含量은 Table 3과 Table 4와 같았다. 核酸成分을 勻配溶出法으로 分析하면 비교적 장시간이 소요되고<sup>19, 20)</sup>, 칼람상태 分析溫度등에 따라 各成分들의 保持時間( $t_R$ )이 항상 일정하지는 않다. 따라서 모든 試料液중 核酸成分의 peak를 同定하는 方法으로서 容量係數와 吸光度比( $\epsilon_{254}/\epsilon_{280}$ )를 검토하는 것 외에도 Fig. 3에서와 같은 co-chromatography, 分析 條件의 변경 등에 의한 同定을 병행하였다.

人蔘과 五加皮는 같은 五加科이기는 하나 異屬으로서 遊離核酸塩基와 遊離 nucleoside들의 組成이나 液體크로마토그램의 profile에 큰 차이를 보이고

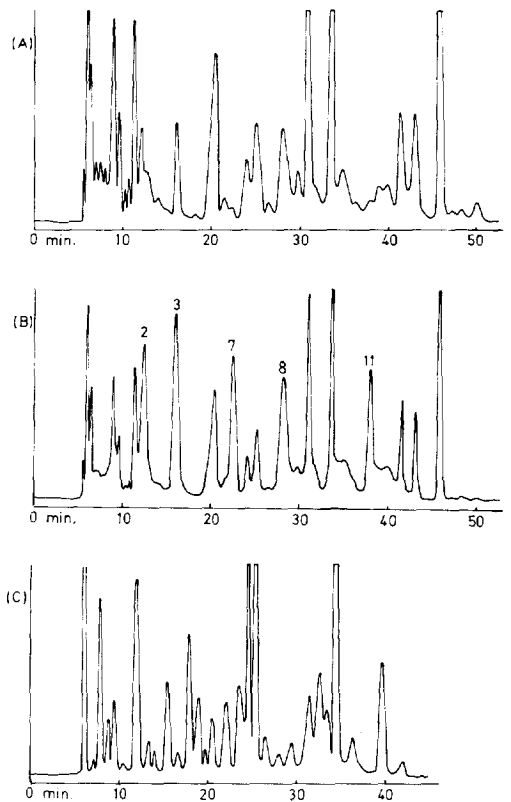


Fig. 3 Liquid chromatographic profiles of TCA-ether extract from Korean white ginseng(A, C), and co-chromatogram of the same extract and 5 authentic samples(B). Conditions of chromatograms (A, B) same as in Fig. 1(A); and chromatogram (C), in Fig. 1(B). Keywords: 2. uracil, 3. cytidine, 7. thymine, 8. inosine, 11. thymidine.

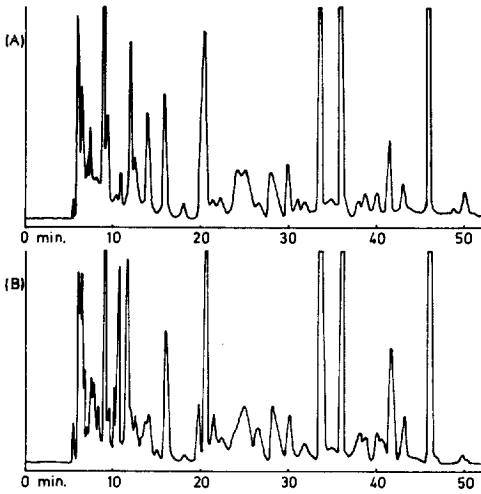


Fig. 4 Liquid chromatographic profiles of TCA-ether extracts from Korean red ginseng(A) and Japanese red ginseng(B). Conditions same as in Fig. 1 (A)

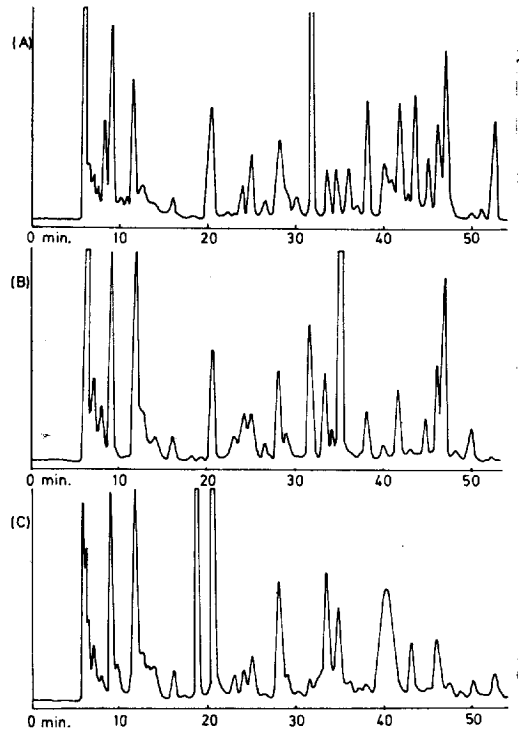


Fig. 7 Liquid chromatographic profiles of TCA-ether extracts from *Acanthopanax seoulense* (A), *A. chiisanensis* (B), and *A. senticosus* (C). Conditions same as in Fig.1 (A).

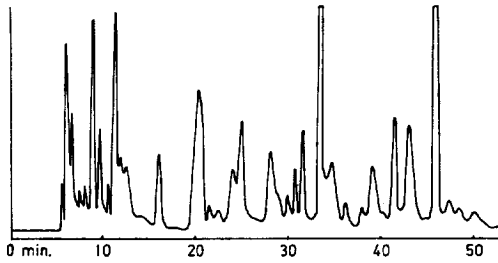


Fig. 5 Liquid chromatographic profile of TCA-ether extract from American cultivated ginseng. Condition same as in Fig.1 (A)

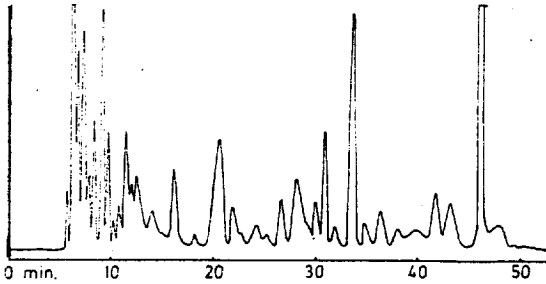


Fig. 6 Liquid chromatographic profile of TCA-ether extract from Sanchi ginseng. Condition same as in Fig. 1 (A)

있다. adenosine, guanosine, cytidine 등은 人蔘屬이 五加皮屬보다 3 배 이상의 分布를 나타냈으며, thymidine과 inosine은 五加皮屬이 다소 많았다. 遊離塩基는 人蔘이나 五加皮에 대체적으로 모두 1~2 mg/100g 정도 함유되어 兩屬間에 별다른 차이를 보이지 않고 있다. cytidine과 uridine은 高麗人蔘이 美國蔘이나 三七蔘보다 많이 함유하였으나 다른 nucleoside는 異種人蔘間에 뚜렷한 含量差가 없었다. 遊離核酸塩基는 nucleoside에 비해 적게 함유되었으며 異種人蔘間에 含量차이가 없었으나 전체적인 液體크로마토그램의 profile로서 高麗人蔘과 美國蔘 또는 三七蔘과 다소의 차이는 있었으나 產地만 다른 同種의 曾坪産 紅蔘과 日本産 紅蔘의 크로마토그램의 패턴은 거의 같고 역시 同種間인 美國栽培蔘과 野生蔘과도 거의 同一함을 알수 있었다. 同一한 原料水蔘에서 製造한 白蔘과 紅蔘의 遊離

Table 2. Recovery

	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)		Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
Cytidine	2	1.89	94.5	Cytosine	2	2.08	104.0
Uridine	2	1.88	94.0	Uracil	2	1.95	97.5
Guanosine	2	1.93	96.5	Guanine	2	1.77	88.5
Thymidine	2	1.79	89.5	Thymine	2	1.74	87.0
Adenosine	2	1.82	91.0	Adenine	2	2.05	102.5
Inosine	2	1.97	98.5				

Table 3. Nucleoside content (unit ; mg/100g)

	Cytidine	Uridine	Guanosine	Thymidine	Adenosine	Inosine
<i>Panax ginseng</i>						
Korean white ginseng	6.51	13.12	21.67	1.64	20.44	5.30
Korean red ginseng	8.89	16.75	17.46	2.08	22.68	3.79
Japanese red ginseng	9.04	21.27	19.80	2.31	19.19	2.81
Chinese red ginseng	8.69	14.78	15.82	1.85	16.21	3.04
<i>P. quinquefolium</i>						
American wild ginseng	5.36	9.26	18.28	0.63	18.58	2.45
American cultivated ginseng	5.02	8.81	19.62	1.46	20.91	3.92
<i>P. notoginseng</i> (ginseng Sanchi)	3.41	5.46	11.19	1.00	19.21	2.43
<i>Acanthopanax seoulense</i>	0.92	8.28	2.59	9.73	6.52	4.98
<i>A. chiisanensis</i>	1.64	6.87	5.74	3.67	4.31	6.12
<i>A. senticosus</i>	1.90	26.28	8.13	1.72	2.27	7.74

Table 4. Nucleobase content (unit ;mg/100g)

	Cytosine	Uracil	Guanine	Thymine	Adenine	Hypoxanthine
<i>Panax ginseng</i>						
Korean white ginseng	*	1.20	1.12	0.98	*	0.58
Korean red ginseng	*	1.32	1.25	1.14	0.68	4.28
Japanese red ginseng	*	1.01	1.08	1.33	1.08	2.09
Chinese red ginseng	*	1.45	1.35	1.48	0.75	2.30
<i>P. quinquefolium</i>						
American wild ginseng	*	0.97	1.01	1.21	*	0.76
American cultivated ginseng	*	1.10	1.34	1.23	*	1.63
<i>P. notoginseng</i> (ginseng Sanchi)	*	1.59	1.49	0.87	0.80	1.02
<i>Acanthopanax seoulense</i>	-	0.84	1.58	0.69	*	0.67
<i>A. chiisanensis</i>	-	0.74	2.54	-	*	0.64
<i>A. senticosus</i>	0.31	0.63	1.02	-	1.26	-

\* non-calculated due to overlapping other peaks.

塩基나 nucleoside의 組成이 거의 같았는데 이것은 이 성분들이 人參과 紅蔘의 製造過程中 特히 現

에 安定하다는 사실과도 일치한다. 그러나 크로마토그램상에서 Fig.3과 Fig.4에서 보는 바와 같이

$t_R$  31.2인 peak는 白蔘에만 나타나고,  $t_R$  36.0인 peak는 紅蔘에서 막 크게 나타나고 있다. 白蔘에서 나타나는  $t_R$  31.2인 peak는 열에 不安定한 成分으로 가열하면 分解되어 紅蔘에만 나타나는 점으로 보아 이 두 성분은 紅白蔘을 區分할 수 있는 흥미 있는 성분으로 생각된다

五加皮屬 植物은 遊離 nucleoside의 含量이 人蔘屬보다 적으나 서울 五加皮는 thymidine 9.73mg/100g 가시 五加皮는 uridine의 含量이 26.28mg/100g 으로 다른 五加皮나 人蔘보다 많이 存在하였다. 서울 五加皮, 지리산 五加皮, 가시 五加皮의 액체크로마토그램의 패턴은 서로 相異하였으며 人蔘과는 다른 核酸成分들이 상당수가 존재하는 것으로 생각된다.

要 約

人蔘과 五加皮中の 核酸系 成分을 HPLC로 分離 定量하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동일한 原料수삼에서 제조한 白蔘과 紅蔘의 核酸遊離塩基와 nucleoside의 조성은 거의 같았다.
2. 人蔘과 五加皮중의 nucleosides 含量에서 adenosine, guanosine, cytidine 등이 特徵的인 差異를 나타냈으며 人蔘屬이 約 3倍이상 많게 나타났다. 그러나 thymidine과 inosine은 五加皮屬이 다소 많았다.
3. nucleobase 含量면에서는 人蔘이나 五加皮間에 비슷한 含量으로 1~2mg/100g를 함유했다.

文 獻

1. Han, B. H., Woo, L. K. : *Kor. J. Pharmacog.*, 5 (1), 31 (1974)
2. Choi, J. H. : *Ginseng Sci.*, Vol. 3, No 2, P. 57 (1981)
3. Lee, K. D., Huemer, R. P. : *Japan. J. Pharmacol.* 21, 299 (1971)
4. Kimura, M., Waki, I., Tanaka, O., Nagi, Y. and Shibata, S. : *J. Pharm. Dyn.*, 4, 402 (1981)

5. Han, B. H., M. H. Park., Han Y. N. and L. K. Woo: 제31차 大韓藥學會 學術發表 抄錄集, 58 (1982)
6. Ohminami, H., Kimura, Y., Okuda, H., Tani, T., Arichi, S., Hayashi, T. : *Planta Medica*, 41, 351 (1981)
7. Anderson, A. : *Horm. Metab. Res., Suppl. Ser.*, 10 (Biochem. Biophys. Pancreatic  $\beta$ -cell), 14 (1980)
8. Scholar, Eric M. : *J. Pharm. Pharmacol.*, 31 (10) 726 (1980)
9. Stupin, I. V., Novokshonov, A.I., Kaplan, E. Ya., Skuzovatova, N. M., Sokolv, I. K., S. S. Nurmagoaev: *Cor Vasa*, 23(5), 381 (1981) (CA. 96, 6276q (1982))
10. Mustafa, S., Ghai, G. : *Basic Res. Cardiol.* 76 (4), 380 (1981) (CA. 96, 5066i (1982))
11. Solomon, S. S., Turpin, B. P., Duckworth, W. C. : *Horm. Metab. Res.*, 12 (11), 601 (1980) (CA. 94, 58606j (1981))
12. T. Ohisalo, Jorma, J. : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52(2), 359 (1981) (CA. 94, 96744k (1981))
13. Karrer, W. : "Konstitution und Vorkommender Organischen Pflanzen Stoffe," Birkhauser Verlag, Basel, 1958
14. Hiyama, C., Miyai, S., Yoshida, H., Yamasaki, K. and Tanaka, O : *藥學雜誌* 98(8), 1132 (1978)
15. Han, Y. N., Kwon, Y. K., Han, B. H. ; *Kor. J. Pharmacog.*, 12(1), 26 (1981)
16. Fain, J. N., Pointer, R. H., Ward, R. F. : *J. Biol. Chem.*, 247, 6866 (1972)
17. Fain, J. N. : *Molec. Pharmac.*, 9, 595 (1973)
18. 專賣廳編, 人蔘關係法令集, 111, 서울 (1980)
19. Taylor, K. : *J. Liquid Chromag.*, 1(6), 849 (1978)
20. Rustum, Y. : *Anal. Biochem.*, 90, 289 (1978)