

인삼의 Diol계 및 Triol계 사포닌의 분리분석

박정일 · 박만기 · 한병훈*
서울대학교 약학대학, *생약연구소

Analysis of Diol- and Triol-Saponins in Ginseng

Jeong Hill Park, Man Ki Park and Byung Hoon Han*

College of Pharmacy, Seoul National University

*Natural Products Research Institute, Seoul National University

서 론

인삼 사포닌은 Fig. 1에서처럼 크게 protopanaxadiol계와 protopanaxatriol계의 사포닌으로 나눌 수 있으며 그 구조는 dammarane 골격에 몇개의 당이 결합되어 있다.^{1,2)} 이들 사포닌중 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Re, Rf₁, Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rhi들은 인삼 엑스를 부탄올로 추출하면 부탄올 층으로 이행된다. 그러나 malonyl-Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 등의 사포닌은 부탄올로 추출되지 않고 수층에 남아있게 된다.²⁾

이제까지 인삼 사포닌의 정량법으로는 UV/Vis 발색법,⁴⁾ GC,^{5, 9)} HPLC,¹⁰⁾ radioimmunoassay¹¹⁾법 등이 개발되어 왔다. UV/Vis 발색법은 사포닌을 적당한 발색시약을 이용하여 발색시킨 후 흡광 광도법으로 정량하는 방법으로 총 사포닌의 정량이 가능하나 선택성이 적으며 각각의 사포닌을 분리 정량할 수 없다. HPLC법은 컬럼에서 개개 사포닌을 분리한 후 UV 또는 RI 검출기를 이용하여 검출하는 방법으로 UV 검출기를 사용하는 경우 인삼 사포닌 자체가 chromophore가 없어 단파장에서 검출해야 하므로 조건설정이 까다롭고 복합제제의 경우 방해물질의 영향을 배제하기 어렵고, RI 검출기의 경우 감도가 낮다.

위의 두가지 방법은 모두 인삼의 부탄올 분획을 분석대상으로 해야 하는 경우가 많아 부탄올로 추출되지 않고 수층에 남아있는 malonyl-Rb₁, malonyl-Rb₂ 등의 사포닌은 정량대상에서 제외되며 또한 복합제제에서는 제제 등에 함유된 다른 생약성분이나 비타민등과의 분리가 어려우므로 실제 제제에 응용하기

에는 많은 문제점이 있다. 또한 인삼 사포닌은 휘발성이 낮으므로 그대로 GC에 적용할 수 없다.

한편 사포닌을 산으로 가수분해하면 Fig. 1에서처럼 panaxadiol(PD)과 panaxatriol(PT)로 되는데 이것을 TMS화 하여 GC로 분석하면 다른 혼재물의 방해받지 않으면서도 다른 정량법에서는 놓치기 쉬운 malonyl-ginsenoside 계통의 사포닌도 모두 정량할 수 있을 뿐만 아니라 모든 인삼 사포닌이 panaxadiol-TMS와 panaxatriol-TMS 2개의 피크로 압축되기 때문에 감도 또한 월등히 증가한다.

또 미삼의 경우 백삼에 비해 사포닌의 함량이 높는데 특히 diol계의 사포닌의 함량이 높다. 이 점을 이용하여 시료중의 diol계 사포닌과 triol계 사포닌의 함량을 구함으로써 백삼과 미삼의 이론적 혼재량을 구할 수 있다.

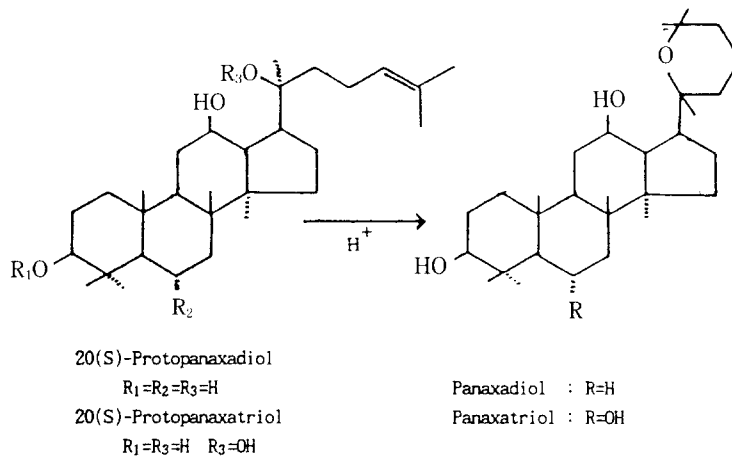
이러한 GC를 이용한 panaxadiol계, panaxatriol계의 분리분석은 인삼제품의 품질관리에 이용할 수 있다고 생각하며 GC에 적용하기 위한 여러가지 조건을 검토해 보았다.

실험방법

1. 재료

백삼 표준품은 전매청 고려 인삼 4년근(곡삼, 50편 금산)을 사용하였고 미삼 표준품은 본 실험실 소유 미삼을 사용하였다. TMS화에 사용된 TMCS 및 HMDS는 Pierce chemical사의 제품을 사용하였다.

2. 기기



Group		R ₁	R ₂	R ₃	Contents(%)*
A	Re	H	O-glu-rham	glu	0.15
	Rf	H	O-glu-glu	H	0.09
	Rg ₁	H	O-glu	glu	0.39
	Rg ₂	H	O-glu-rham	H	0.02
B	Rb ₁	glu-glu	H	glu-glu	0.34
	Rb ₂	glu-glu	H	glu-ara	0.13
	Rc	glu-glu	H	glu-ara	0.19
C	mal-Rb ₁ *	glu-glu-mal	H	glu-glu	0.82
	mal-Rb ₂	glu-glu-mal	H	glu-ara	0.41
	mal-Rc	glu-glu-mal	H	glu-ara	0.30
	mal-Rd	glu-glu-mal	H	glu	0.12

Fig. 1. Structure of ginseng saponins. *Contents in white ginseng. #mal= -COCH₂COOH.

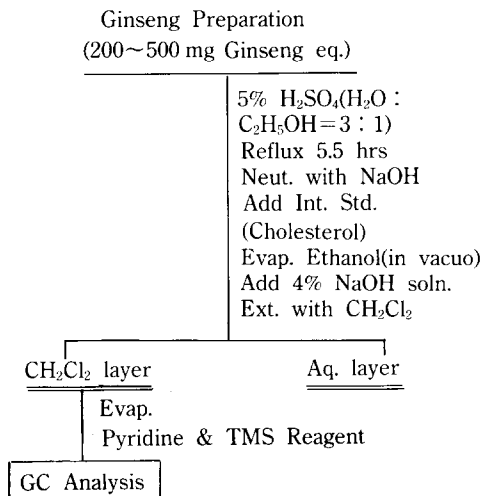


Fig. 2. Preparation of GC sample.

Hewlett-Packard Model 5840A GC를 사용하였으며 column은 OV-101 fused silica capillary column을 사용하였고 280°C 항온에서 분석을 실시하였으며 carrier gas는 He($\mu=21$ cm/sec)을 사용하였다.

3. 시료의 처리

백삼과 미삼 추출액 일정량을 평저 플라스크에 넣고 에탄올성 황산(H₂O : EtOH=3 : 1) 용액을 가하여 전체농도가 5% 황산용액이 되도록 하여 5.5시간 수욕상에서 환류시킨 후 45% NaOH 용액을 가하여 중화시켰다. 여기에 cholesterol 표준용액 500 μ l(cholesterol 0.5 mg 해당량)를 가한후 감압하여 에탄올을 날려보낸 후 4% NaOH 용액 40 ml를 가하고 300 ml 분액 여두에 옮긴 후 평저 플라스크를 소량의 물로 2~3회 세척하여 세척액을 합쳤다. 이 액을 CH₂Cl₂ 100 ml씩으로 3회 추출하고 추출액을 모아 농축하여

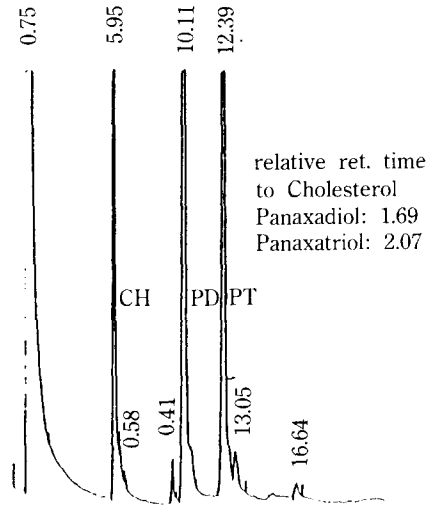


Fig. 3. Chromatogram of standard PD-TMS, PT-TMS and cholesterol-TMS.

약 100 ml가 되게 한 후 추출액을 300 ml 분액 여두에 옮기고 4% NaOH 용액 100 ml와 증류수 100 ml로 차례로 세척하였다. CH_2Cl_2 층을 삼각 플라스크에 옮기고 무수망초로 탈수시킨 후 농축 플라스크에 옮겨 CH_2Cl_2 를 날려 보냈다. 잔사를 TMS화용 용기에 옮기고 질소 기류하에 용매를 제거하고 여기에 무수 pyridine 250 μl 와 TMS화제 (HMDS : TMCS=2 : 1) 250 μl 를 가하여 마개를 한 후 80°C에서 40분간 반응시킨 용액을 GC 분석용 시료로 하였다.

결과 및 고찰

1. Cholesterol, PD, PT의 크로마토그램

내부 표준 물질로는 구하기 쉬우며 다른 피크들과 겹치지 않아야 하는데 본 실험에서는 cholesterol이 적합하였다. Fig. 3의 피크 1은 내부 표준물질로 넣은 cholesterol이며 피크 2는 PD-TMS, 피크 3은 PT-TMS의 피크이다. PD-TMS와 PT-TMS의 cholesterol에 대한 상대 용리 시간은 각각 1.69, 2.07이었다.

2. 가수분해 조건의 검토

Fig. 4는 백삼 표준액 10 ml(백삼 500 mg 해당)에 5% 황산($\text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}=3 : 1$)용액 50 ml를 가하고 환류 가수분해 시간을 2~7시간까지 30분 간격으로 변화시켰을 때 얻어지는 PD-TMS와 PT-TMS피크의 상대적 강도를 표시한 것이다.

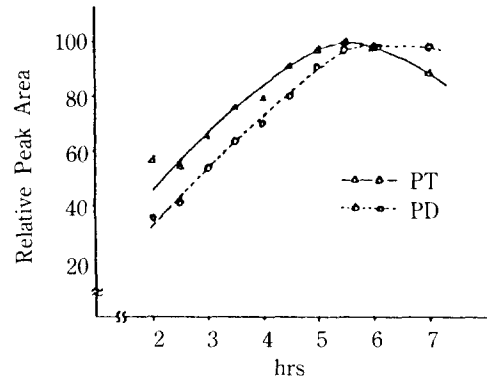


Fig. 4. Effect of hydrolyzing time of white ginseng extract(5% H_2SO_4).

Fig. 4에서 나타난 바와 같이 PD는 5.5시간에 최고치에 오른 후 거의 일정하게 되는 반면 PT는 5.5시간에 최고치에 오른 후 점차 피크 강도가 감소하였다.

이는 panaxadiol이 panaxatriol에 비해서 산에 약하기 때문으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 시료를 5.5시간 가수분해시킨 후 즉시 알칼리로 중화시켰다.

3. 표준 사포닌의 GC 분석용 시료의 크로마토그램

Fig. 5는 표준품 ginsenoside Rb_1 과 Rg_1 각각 일정량을 취하여 GC 분석용 시료의 조제법에 따라 처리하여 얻은 가스 크로마토그램이다.

4. 표준품 인삼 사포닌의 검량선

Fig. 6은 표준품 ginsenoside Rb_1 , Rg_1 을 0~6 mg까지 변화시키면서 5% 황산으로 가수분해한 후 TMS화하여 얻은 PD-TMS와 PT-TMS의 상대적 강도를 그래프로 표시한 것이다. 이때 검량선의 상관계수는 Rb_1 의 경우 99.8%, Rg_1 의 경우 98.2%로 양호한 직선성을 나타내었다.

5. 회수율 시험

실제 인삼제제에 표준품 ginsenoside Rb_1 및 Rg_1 을 일정량씩 첨가한 후 가수분해하여 얻어진 GC data로부터 Rb_1 , Rg_1 의 회수율을 측정하였다. 그 결과 Table 1과 같이 93~114%의 양호한 회수율을 나타내었다.

6. 백삼/미삼 혼합비의 계산

본 실험에서 사용된 표준품 백삼과 미삼의 기체 크로마토그램은 Fig. 7과 같다. 이 그림에서 나타난

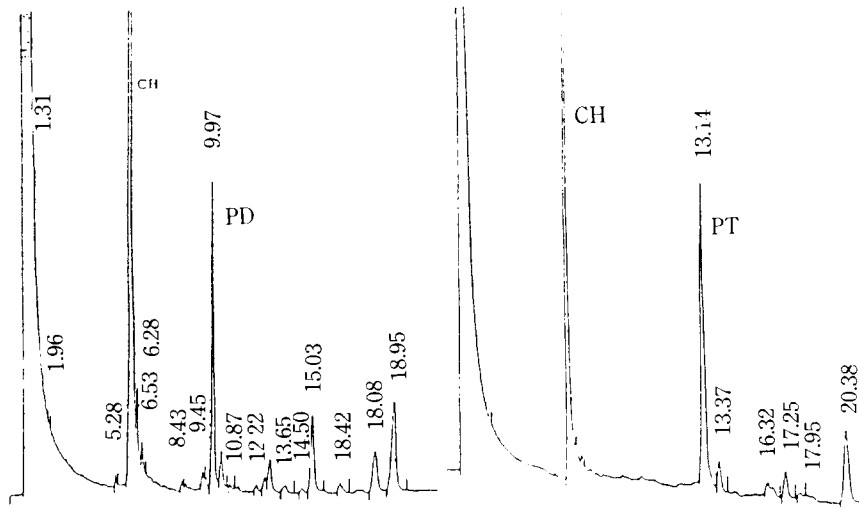


Fig. 5. Chromatogram of trimethylsilylated hydroxylates of ginsenoside Rb₁(left) and Rg₁(right), (CH: cholesterol, PD: panaxadiol, PT: panaxatriol).

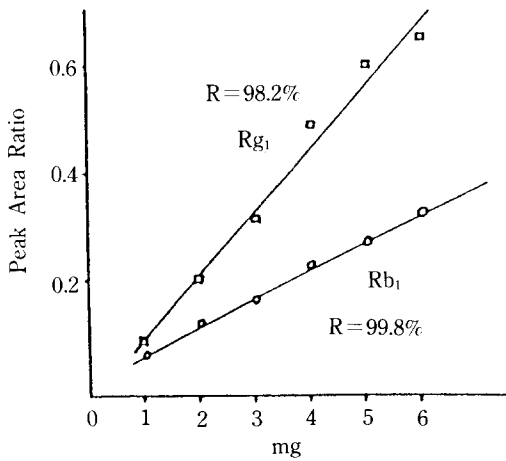


Fig. 6. Calibration curves of hydrolyzates of ginsenoside Rb₁ and Rg₁(PD-TMS, PT-TMS) R=correlation factor.

바와 같이 미삼은 백삼에 비해 사포닌 함량이 많은데 특히 diol계 사포닌의 함량이 많다.

실제 백삼과 미삼의 전체량을 500 mg으로 고정시키고 그 함량비를 변화시켰을 때 얻어지는 diol계 사포닌과 triol계 사포닌의 양은 Table 2와 같으며 Fig. 8은 이것을 그래프로 표시한 것이다(상관계수 99%).

이것을 PD/PT ratio로 검량선을 그려보면 Fig. 9와 같은데 이때 상관계수는 98.1%로 직선성이 양호하였다.

실제 시료중의 PD와 PT의 양은 다음식으로 표시할 수 있다.

$$M_D = W_W \times W_d + W_R \times R_d \tag{1}$$

$$M_T = W_W \times W_t + W_R \times R_t \tag{2}$$

Table 1. Recovery test of standard Rb₁ and Rg₁

Test No.	Added*		Founded		Recovery %	
	Rb ₁	Rg ₁	PD	PT	PD	PT
1	0	0	8.40	1.46		
2	3.00	2.93	11.82	4.49	114	103
3	2.78	1.26	10.98	2.81	93	107
4	6.55	6.00	15.28	7.42	105	99
5	6.21	4.25	15.03	5.80	107	102
6	5.20	2.78	13.50	4.34	98	104

*Standard ginsenoside Rb₁ and Rg₁ were added to 50 ml ginseng drink preparation

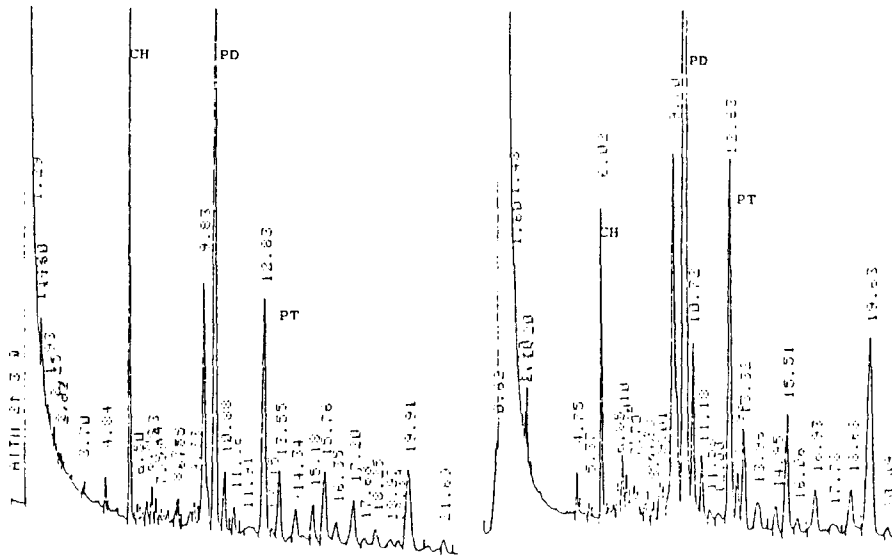


Fig. 7. Chromatogram of white ginseng(left) and root hair ginseng(right) (CH: cholesterol, PD: panaxadiol, PT: panaxatriol).

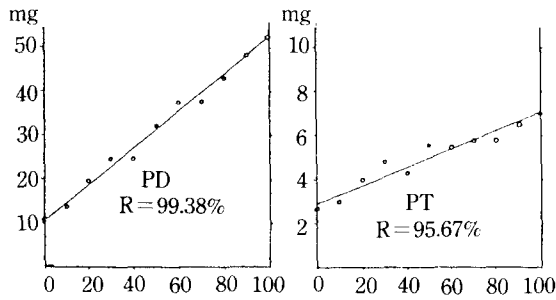


Fig. 8. Root hair ginseng/white ginseng ratio in ginseng sample(500 mg) and the amounts of PD, PT(mg).

Table 2. Root hair ginseng/white ginseng ratio and PD/PT ratio*

No.	RG/WG	PD(mg)	PT(mg)	PD/PT
1	0/100	10.6	2.60	4.08
2	10/90	14.2	2.90	4.90
3	20/80	20.0	3.98	5.02
4	30/70	24.8	4.84	5.12
5	40/60	24.6	4.28	5.75
6	50/50	32.2	5.73	5.62
7	60/40	37.2	5.51	6.75
8	70/30	37.9	5.83	6.50
9	80/20	42.5	5.82	7.30
10	90/10	48.0	6.47	7.42
11	100/0	54.3	6.90	7.87

*Total amount of ginseng(root hair ginseng+ white ginseng) was 500 mg.

M_D : 시료중 PD의 양 W_d : 백삼중 PD의 함량

M_T : 시료중 PT의 양 W_t : 백삼중 PT의 함량

W_w : 시료중 백삼의 양 R_d : 미삼중 PD의 함량

W_R : 시료중 미삼의 양 R_t : 미삼중 PT의 함량

$$W_R = \frac{M_t \times W_d - M_d \times W_t}{R_t \times W_d - R_d \times W_t}$$

(1), (2)식으로부터 백삼과 미삼의 이론적 함량(W_w , W_R)은 다음과 같이 된다.

$$\text{미삼의 함량\%} = \frac{W_R}{W_w + W_R}$$

$$W_w = \frac{M_D \times R_t - M_t \times R_d}{R_t \times R_d - W_t \times R_d}$$

따라서 표준품 백삼과 미삼중의 PD와 PT의 함량을 알면 시료중의 백삼과 미삼의 이론적 함량을 구할수 있다.

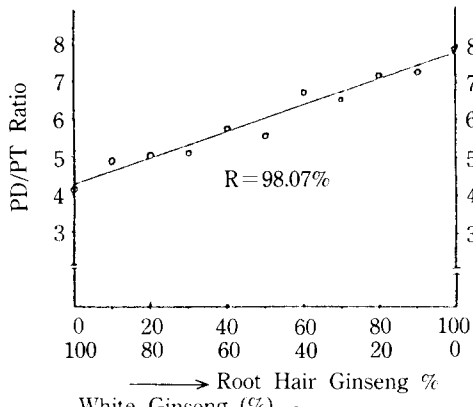


Fig. 9. Root hair ginseng/white ginseng ratio and PD/PT ratio.

요 약

1) 인삼 사포닌을 5% 황산으로 가수분해하여 TMS화 한 후 GC로 분석한 결과 인삼중의 모든 사포닌을 diol계 사포닌과 triol계 사포닌으로 나누어 분석할 수 있었다.

2) 시료중의 전체 diol계(PD)와 triol계(PT) 사포닌을 ginsenoside Rb₁과 Rg₁의 양으로 각각 환산하여 표시하고 미삼에는 백삼에 비해 diol계 사포닌의 함량이 많은 것을 이용하여 PD/PT를 구하고 여기에서 구해진 비를 이용하여 시료중의 백삼 및 미삼의 이론적 함량을 구할 수 있었다.

3) 이 방법의 검출 한계는 백삼의 양으로 0.14 μ g 이었다.

인용문헌

1. Shibata, S.: *Proceedings of Int'l. Ginseng Sym.*, p. 69 (1974).
2. Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S. and Ohsawa, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 595 (1966).
3. Kitagawa, I., et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3353 (1983).
4. Woo, L.K., et al.: *Yakhak Hoeji*, **17**, 129 (1973).
5. Tanaka, O., et al.: *Yakugaku Zashi*, **95**, 1456 (1975).
6. Bombardelli, E., et al.: *J. of Chromatog.*, **196**, 121 (1980).
7. Yahara, S., Kashi, R. and Tanaka, O.: *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2041 (1977).
8. Sakamoto, I., Moromoto, K. and Tanaka, O.: *Yakugaku Zasshi*, **95**, 1456 (1975).
9. Bombardelli, E., Bonati, A., Gobetta, B. and Martinielli, E.M.: *Proceedings of the 2nd Int'l. Ginseng Sym.* p. 29 (1978).
10. Brieskorn, C.H. and Mosandl, A.: *Proceedings of the 2nd Int'l. Ginseng Sym.*, p. 49 (1978).
11. Besao, H., et al.: *Planta Medica*, **37**, 226 (1979).
12. Han, B.H., et al.: *Yakhak Hoeji*, **25**, 43 (1981).