

인삼의 진세노사이드 분석을 위한 추출 및 전처리법

김금숙*[†] · 현동윤* · 김영옥* · 이성우* · 김영창* · 이승은* · 손영득*
이민정** · 박충범* · 박호기* · 차선우* · 송경식***

*농진청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **KT&G중앙연구원, ***경북대학교 생명과학대학

Extraction and Preprocessing Methods for Ginsenosides Analysis of *Panax ginseng* C.A. Mayer

Geum Soog Kim*[†], Dong Yun Hyun*, Young Ock Kim*, Sung Woo Lee*, Young Chang Kim*, Seung Eun Lee*, Yeong Deck Son*, Min Jeong Lee**, Chung Berm Park*, Ho Ki Park*, Seon Woo Cha*, and Kyung-Sik Song***

*Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Eumseng 369-873, Korea.

**KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-805, Korea.

***College of Agriculture and Life Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea.

ABSTRACT : An advanced extraction method by ultrasonic extraction with applied solid phase extraction (SPE) has been developed for the determination of simultaneous eight major ginsenosides, namely ginsenosides Rg1, Re, Rf, Rb1, Rg2, Rc, Rb2, and Rd in the root of *Panax ginseng*. Four extraction methods including *n*-BuOH reflux extraction (Method A), 70% EtOH reflux extraction (Method B), 50% MeOH reflux extraction with SPE (Method C), and 50% MeOH ultrasonication with SPE clean-up process (Method D) were investigated for the determination of eight major ginsenosides. Total contents of ginsenosides were highest by extraction of Method C as 2.408 ± 0.011%. However, Method D was evaluated as relatively simpler and more efficient method due to short extraction time, small solvent consumption and less expensive, compared to conservative reflux method. Ginsenosides were also satisfactorily separated with good resolution and the accuracy range was between 1.05 and 4.06% as relative standard deviation (RSD) by Method D. SPE condition and HPLC condition were further optimized for determination of eight major ginsenosides by the ultrasonic extraction method. Conclusively, ultrasonic extraction of 2 g sample of ginseng using ultrasonic bath and 1 loading for SPE was evaluated as proper condition for extraction of ginseng.

Key Words : *Panax ginseng*, Ginsenoside, Extraction Method, Ultrasonic extraction

서 언

한국의 인삼 (*Panax ginseng*)의 다양한 효능에 대하여 수많은 연구결과가 보고되고 그 우수성이 전세계적으로 인정되고 있는 반면, 효능에 대한 과학적 입증의 부족으로 현재 건강기능식품으로서의 면역력 증진과 피로회복 2종의 기능성에 대해서만 고시형으로 인정되고 있다. 홍삼은 여기에 혈소판 응집 억제에 의한 혈류개선 기능이 더 추가되어 3종의 고시형 기능이 인정되고 있다. 이러한 인삼의 고시형 기능성 이외에, 인삼의 효능으로는 향당뇨 (Tetsutani *et al.*, 2000; Vuksan *et al.*, 2008), 항산화 (Cho *et al.*, 2006; Keum *et al.*, 2000), 항암 (Kim *et al.*, 2004; Suh *et al.*, 2007; Surh *et al.*,

2001), 신경세포보호 (Kampen *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2007), 간기능 개선 (Kang *et al.*, 2007; Kwon and Jang, 2004), 항스트레스 (Kim *et al.*, 2003a; 2003b) 등의 활성이 보고되었다. 그러나 이러한 인삼의 효능들이 건강기능성식품의 기능성으로 인정받기 위해서는 효능에 대한 보다 과학적인 입증이 요구되고 있는 것이다. 과학적인 효능 입증을 위해 임상연구의 중요성이 부각되고 있지만 인삼시료의 표준화도 무척 중요한 요소가 될 수 있다. Ginsenoside 함량 등 품질이 표준화된 시료를 사용하여 효능에 대한 연구를 수행함으로써 연구결과의 재현성을 높일 수 있기 때문이다. 현재는 인삼산업법에 근거하여 인삼의 동체와 지근의 비율을 감안한 체형 또는 무게 등의 외형적 요인을 기준으로하여 인삼을 등급화하

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5582 (E-mail) kimg@rda.go.kr
Received October 31, 2008 / Revised December 9, 2008 / Accepted December 10, 2008

고 있는 실정이므로 인삼 품질에 대한 성분 기준을 고려한 등급 설정이 필요하다고 할 수 있다. 품질이 표준화된 시료의 사용은 효능연구 결과의 재현성을 높이고 과학적 효능 입증을 위한 연구에 기본 요소로 작용할 수 있다. 인삼의 품질 표준화를 위해서는 ginsenoside 함량 분석 방법 설정이 중요하다고 할 수 있으며 최근에는 기기분석 기법의 발전으로 HPLC-UV 또는 LC/MS/MS 기법 등이 ginsenoside 함량 분석방법으로 사용되고 있다. 그런데 기기분석에 앞서 인삼으로부터 ginsenoside를 효율적으로 추출하고 전처리하는 과정이 무척 중요하다. 여러 연구보고에서 알 수 있듯이, 인삼의 추출과 전처리 방법에 따라서 ginsenoside 함량의 변이가 매우 커질 수 있기 때문이다 (Corbit *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2006a; 2006b). 따라서 본 연구에서는 HPLC-UV 분석에 의한 인삼의 ginsenoside 정량을 위하여 인삼시료의 적절한 추출 방법 및 전처리법에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 식물재료

추출조건 및 전처리법 개선 연구의 인삼시료는 경기도 수원시 당수리에서 위치한 KT&G 중앙원료연구소의 시험포장에서 재배된 4년근 천풍 인삼으로서 2006년 10월에 수확한 것을 뇌두만 제거하고 세근과 지근은 분리하지 않고 전체 뿌리를 동결 건조한 후 분쇄하여 사용하였다. 인삼 초음파 추출방법의 정밀 조건 검토를 위한 시험에는 2005년에 부여농가에서 수확한 4년근 연풍 품종의 인삼 시료를 사용하였다. 이때 인삼시료는 세근과 지근이 분리된 동체만을 선별하여 동결건조 후 분쇄한 시료를 사용하였다.

2) 표준품 및 시약

인삼의 ginsenoside 성분은 Chromadex사 (Santa Anna, USA) ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2를 구입하여 사용하였다. HPLC 분석용 MeOH은 Merck사 (Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였고 그 외 인삼시료의 추출에는 GR급 용매를 사용하였다. SPE (Solid-Phase Extraction) 처리용 카트리지는 Waters사 (Milford, Mass USA) Sep-Pak Plus C18 cartridge를 사용하였다.

2. 추출 및 전처리 조건

1) 수포화 부탄올 환류추출법 (Method A)

인삼분말시료 0.50 g을 농축용 플라스크에 평량해 넣고 수포화부탄올 50 ml를 첨가하고 80°C 환류냉각추출기에서 1시간 추출하였다. 10분간 방냉 후 추출액을 여과하고 잔사에 다시 동량의 용매를 넣어 2번 더 반복 추출하였다. 총 3회 추출

된 추출액은 분액깔대기에 옮기고 150 ml 증류수를 첨가하여 진탕한 후 부탄올 층과 물 층을 분리하고 물 층을 제거하였다. 남은 부탄올 층을 농축플라스크에 모아 45°C 수조에서 rotary evaporator를 이용하여 진공 농축하였다. 농축 후 플라스크내 잔류물은 20 ml 50% MeOH에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과하였다.

2) 70% EtOH 환류냉각추출법 (Method B)

인삼분말시료 0.5 g을 농축용 플라스크에 평량하고 50 ml 70% EtOH을 첨가한 후 80°C의 환류냉각추출기에서 1시간 추출하였다. 30분간 방냉 후 추출액을 여과한 후 45°C 수조에서 rotary evaporator를 이용하여 진공농축하였다. 농축 후 잔류물은 20 ml 50% MeOH에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과하였다.

3) 50% MeOH 환류추출-SPE 전처리법 (Method C)

인삼분말시료 1.0 g을 농축용 플라스크에 평량하고 70 ml 50% MeOH을 첨가한 후 80°C의 환류냉각추출기에서 1시간 추출하였다. 방냉 후 추출액을 원심분리 (4000 rpm, 10분)하였고, 잔사에 다시 70 ml 50% MeOH을 첨가한 후 80°C의 환류냉각추출기에서 1시간 추출한 후 원심분리하여 상정액을 얻었다. 1, 2차 추출과 원심분리로 얻은 추출물은 합쳐서 45°C 수조에서 rotary evaporator를 이용하여 진공농축하였다. 농축 후 잔류물은 100 ml 20% acetonitrile에 녹여 시료를 준비하였다. 이 시료액 1 ml는 Fig. 1와 같은 과정으로 SPE 전처리하였는데 그 과정은 다음과 같다. 즉, Sep-Pak Plus C18 cartridge을 먼저 3 ml MeOH로 서서히 용출시켜 conditioning을 하고 다시 3 ml dd-H₂O로 2차 conditioning 시켰다. 추출 시료액 1 ml를 cartridge에 loading하고 10 ml dd-H₂O로 서서히 용출하여 당류 등을 제거하였다. 이 cartridge에 2 ml MeOH를 처리하여 서서히 ginsenoside 성분을 용출시켰다. 정확히 부피를 2 ml로 조절한 후 시료액은 0.45 µm membrane filter로 여과하였다.

4) 50% MeOH 초음파 추출-SPE 전처리법 (Method D)

인삼분말시료 2 g을 50 ml 원심분리 튜브에 평량해 담고, 40 ml 50% MeOH을 첨가한 후 뚜껑을 닫고 ultrasonic bath (Powersonic 410, 화신테크, 한국) 넣은 후 15분 동안 초음파 추출한 후 여과하였다. 이렇게 총 2회 추출한 후 여과액을 합쳐서 100 ml 정용 플라스크에 담아 부피를 정확히 100 ml로 맞추었다. 이 시료액 1 ml를 취하여 Method C의 SPE 전처리 과정을 동일하여 실시한 후 최종 HPLC 시료액을 준비하였다. 한편, 초음파 추출을 위한 장비로서 ultrasonic bath의 효율성을 검증하기 위해 일반 ultrasonicator (VCX500, Sonics & Materials, INC. USA)에 의한 초음파 추출을 함께

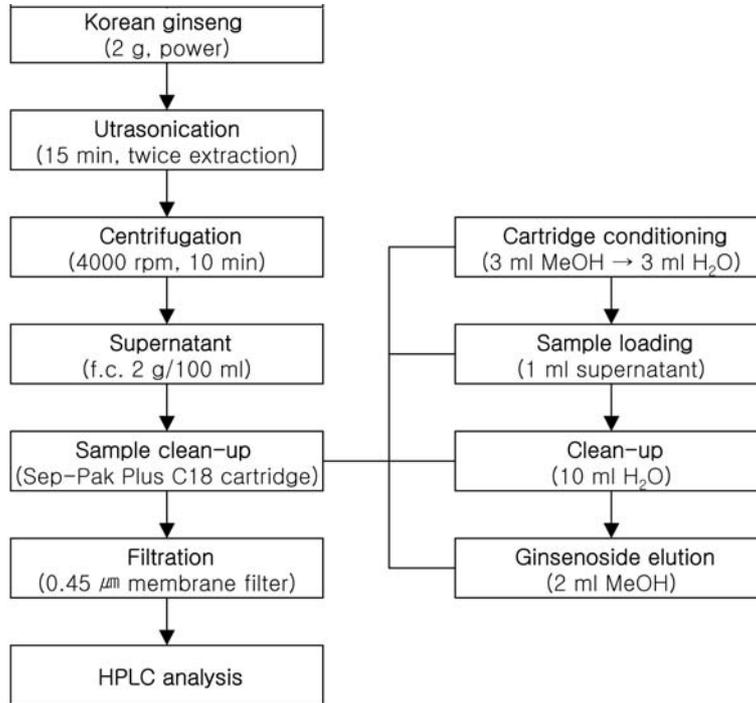


Fig. 1. Procedures of ultrasonication using ultrasonic bath and SPE using Sep-Pak C18 cartridge of *P. ginseng*.

Table 1. Solvent gradient program of HPLC analysis.

Time	Acetonitrile (%)	Water (%)
0	27	73
10	27	73
45	42	68
47	95	5
63	95	5

비교하였다. 즉, ultrasonicator를 사용하여 추출시간은 동일하게 하지만 시료 tube에 probe를 꽂고 시료 1개씩 15분 동안 추출을 하였고, ultrasonic bath에서는 8개 시료를 동시에 추출하였다.

3. HPLC-UV 분석

Ginsenoside 함량은 Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, USA)를 이용하여 측정하였다. HPLC 분석은 YMC-Pack ODS AM (250 × 4.6 mm, 5 µm, YMC, Inc. USA) 컬럼을 사용하여 최종 Table 1과 같은 이동상의 조건으로 실시하였다 (Lee *et al.*, 2007). 이때 이동상의 유속과 컬럼 온도는 각각 0.8 ml/min, 43°C로 하였고, UV 검출기의 검출파장은 203 nm로 하여 분석하였다. 이때 Fig. 2과 같이 Rg1과 Re 성분의 resolution Rs 값이 1 이상이면서 8종 ginsenoside의 분리능이 양호한 chromatogram을 얻을 수 있었다. 이러한 HPLC 분석 조건으로 인삼 시료의 ginsenoside 함량을 정량 분석하였다.

4. 통계분석

Total ginsenoside 함량은 mean±SEM로 나타내었다. 통계분석 및 유의성 검증은 분산분석 (ANOVA)법과 Tukey's post-hoc test로 실시하였으며 이때 $P < 0.05$ 이면 통계적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

1. Ginsenoside 분석을 위한 추출법 및 전처리법 검토

8종의 주요 ginsenoside 함량을 정량분석하기 위해 HPLC 조건을 Fig. 2과 같이 최적화하고 표준품으로 표준곡선을 작성한 결과, Table 2에서 제시한 바와 같이 8종의 ginsenoside의 표준곡선에 대한 각각의 R^2 값이 0.9996-1.000 범위의 수치를 나타내었다. 따라서 이 표준곡선을 기준으로 시료의 ginsenoside 함량을 정량할 수 있었다. Ginsenoside의 분석법에는 그 동안 TLC-densitometry법 (Corthout *et al.*, 1999), HPTLC법 (Vanhaelen-Fastre *et al.*, 2000), HPLC-ELSD법 (Park *et al.*, 1996; Wan *et al.*, 2006b)등이 사용되어왔는데, 최근에는 주로 HPLC-UV (Kim & Kim, 2001), LC/MS 또는 LC/MS/MS 방법 (Liu *et al.*, 2006)을 많이 사용하여 인삼시료와 인삼 가공품의 ginsenoside를 분석하고 있는 추세이다. 박 등 (2007)은 203 nm 파장에서 다양한 기율기 용리를 시도하여 HPLC법으로 홍삼에서 12종의 ginsenoside 함량을 정량분석하였다. 본 저자들도 앞선 연구에서 인삼을 수포화 부

인삼의 ginsenoside 추출 및 전처리법

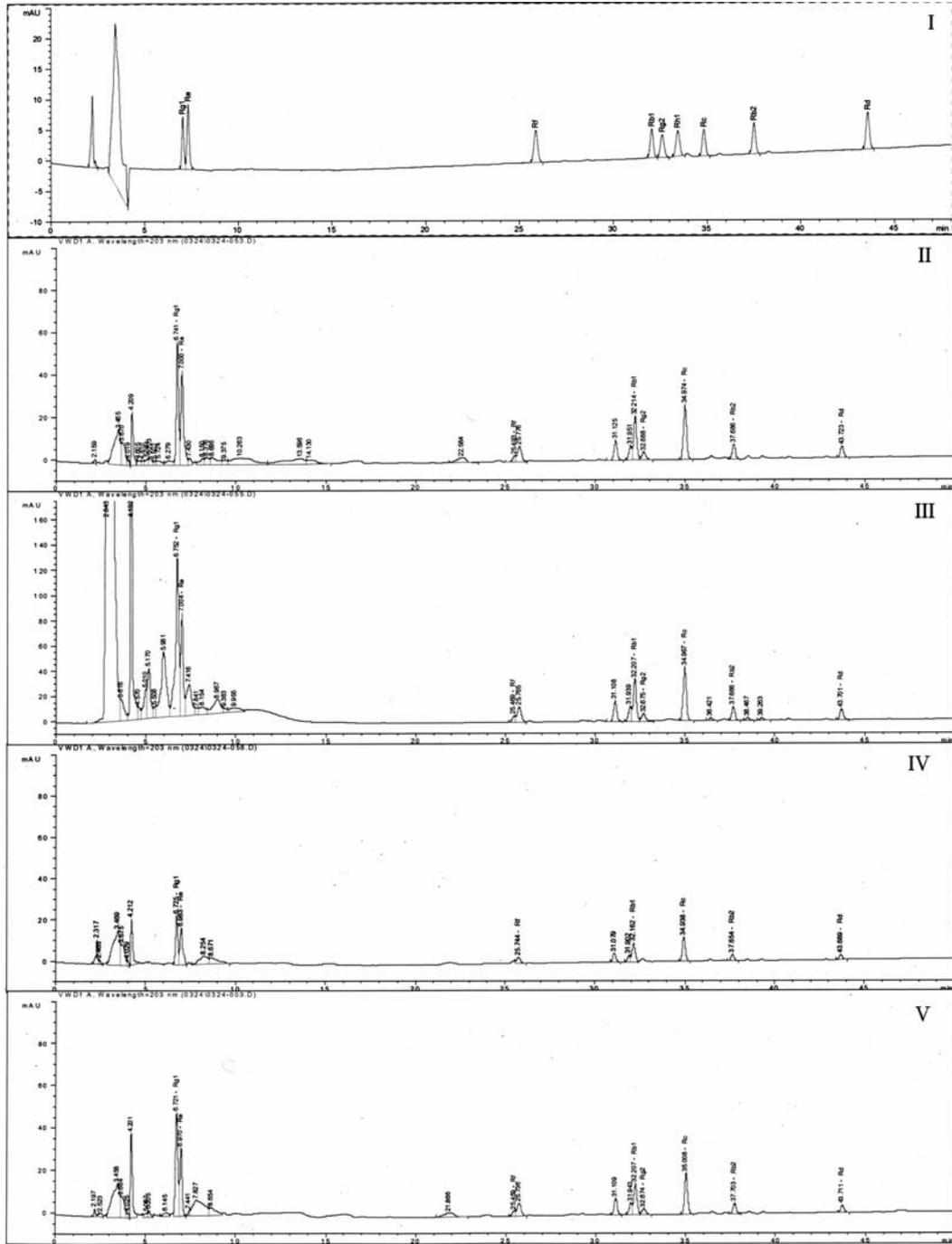


Fig. 2. HPLC profiles of ginsenosides from *P. ginseng* by different extraction conditions. I: standard ginsenoside; II: Method A; III: Method B; IV: Method C; V: Method D.

탄올로 환류냉각추출을 한 후 ginsenoside를 정량하기 위해 acetonitrile를 Table 1과 같이 기울기 용리로 하여 분리능이 양호한 chromatogram을 구할 수 있었다 (Lee et al., 2007). 그러나 이 추출방법은 시간이 많이 소요되고 분배와 농축과정이 있어 속련도에 따른 함량변이가 큰 것이 단점이었다. 따라

서 본 연구는 수포화 부탄올 환류냉각추출법과 대비하여 추출 시간과 재현성이 우수한 인삼 추출 및 전처리법이 검토되었다.

추출방법을 달리한 시료들의 ginsenoside 조성 및 함량 비교를 위해 50% MeOH 초음파 추출-SPE 전처리법을 포함한 4가지 방법으로 인삼시료를 추출하였다. 50% MeOH 초음파

Table 2. Calibration plots and sensitivity for the determination of eight ginsenosides.

Ginsenoside	Calibration plot [†]	Correlation coefficient
G-Rg1	$y = 6.6505x + 0.1935$	0.9999
G-Re	$y = 8.8309x - 0.4890$	0.9999
G-Rf	$y = 7.1985x - 0.1453$	0.9999
G-Rb1	$y = 5.7102x - 2.1050$	0.9996
G-Rg2	$y = 5.0801x - 0.7712$	0.9999
G-Rc	$y = 5.1342x - 0.1920$	1.0000
G-Rb2	$y = 5.9297x - 0.4092$	0.9999
G-Rd	$y = 7.1525x + 0.0574$	1.0000

[†]y = peak area, x = concentration (ng/μl).

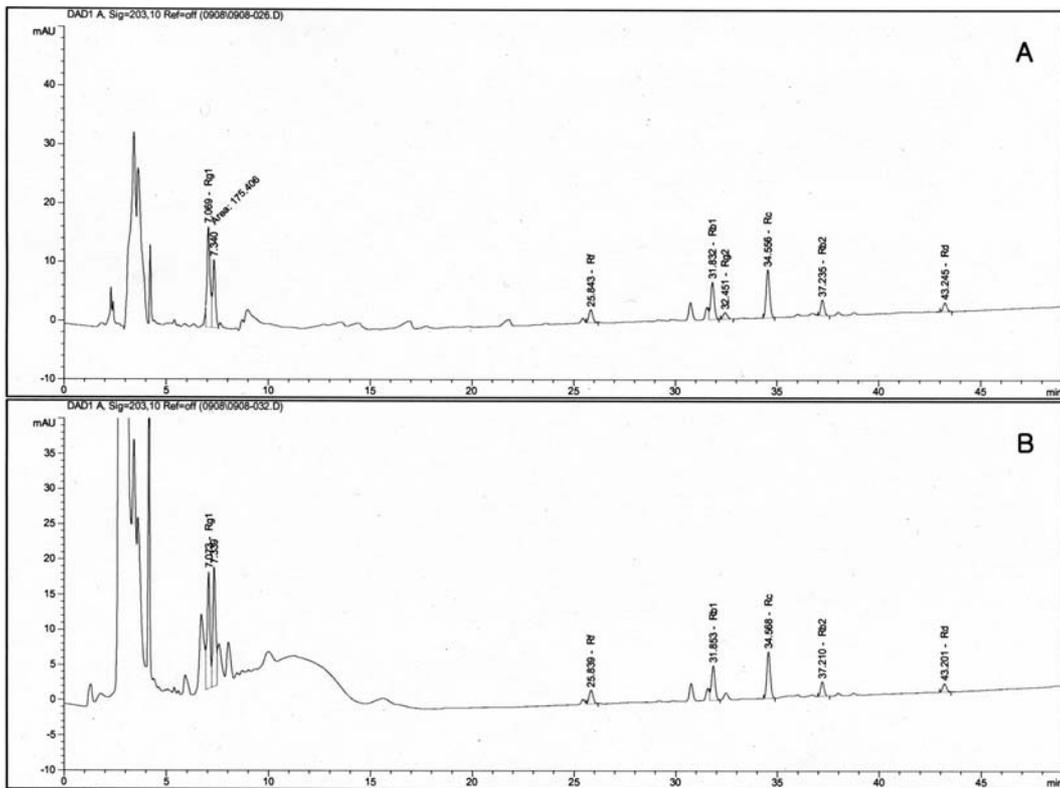


Fig. 3. HPLC chromatograms of 50% MeOH extract from ultrasonic extraction with SPE (A) or without SPE (B).

추출한 후 SPE 전처리한 시료는 그렇지 않은 시료에 비하여 당류 등 극성물질의 정제효과 때문에 HPLC chromatogram의 앞부분에서 Rg1과 Re의 분리능이 증진되는 효과가 있었으며 반면 SPE 전처리를 하지 않는 경우는 Rg1, Re의 분리능이 상당히 불량하여 정확한 정량이 어려웠다 (Fig. 3).

Method A에서 D까지의 추출방법별 HPLC chromatogram 양상을 비교한 결과 (Fig. 2), Method A의 추출 시료액은 용매분배과정에서 시료의 1차 정제가 되었고, Method C, D에 의한 추출 시료액은 추출 후 Sep-pak plus C-18으로 SPE 전처리하였기 때문에 이들 시료의 HPLC chromatogram에서는 Rg1, Re의 분리능이 1 이상으로 양호한 분리능을 나타내었다.

이들 추출 및 전처리 방법이 극성이 높은 당성분을 제거하여 다른 사포닌보다 극성이 높은 사포닌인 Rg1, Re 성분의 분리능을 향상시켰기 때문이다. 반면, 70% 에탄올로 환류추출한 Method B의 추출액은 SPE 전처리 과정이 없으므로 극성이 높은 당류 성분들이 제거 되지 않고 컬럼에서 먼저 용출되기 때문에 역시 다른 ginsenoside보다 빨리 용출되는 ginsenoside Rg1, Re 성분의 용출 peak와 오버랩되는 부분이 발생할 수 있다. 이러한 요인으로 앞부분의 base line도 전체적으로 상당히 들뜬 현상을 나타내었다 (Fig. 2).

분리능이 양호한 Method A, C, D의 추출 및 전처리 방법 중에서 수포화 부탄올을 이용한 환류추출법인 Method A 방

Table 3. Total contents and composition of ginsenoside of *P. ginseng* by different extraction methods.

Ginsenoside	Method A [†]		Method B		Method C		Method D	
	% w/w [‡]	RSD [§] (%)	% w/w	RSD (%)	% w/w	RSD (%)	% w/w	RSD (%)
Rg1	0.681±0.022	3.19	0.739±0.019	2.51	0.653±0.003	0.49	0.719±0.029	4.06
Re	0.310±0.020	6.40	0.325±0.003	1.02	0.366±0.014	3.92	0.325±0.013	3.93
Rf	0.119±0.006	4.86	0.104±0.001	0.99	0.125±0.001	0.60	0.123±0.003	2.45
Rb1	0.345±0.012	3.41	0.293±0.013	4.37	0.405±0.006	1.43	0.327±0.006	1.70
Rg2	0.088±0.001	0.57	0.072±0.006	7.93	0.095±0.003	2.69	0.087±0.001	1.05
Rc	0.480±0.011	2.28	0.416±0.016	3.87	0.557±0.004	0.66	0.460±0.008	1.81
Rb2	0.109±0.002	2.20	0.093±0.004	3.96	0.125±0.001	0.59	0.101±0.002	2.38
Rd	0.076±0.003	4.36	0.062±0.003	4.29	0.082±0.001	1.25	0.062±0.001	1.80
Total	2.208±0.057	2.59	2.103 [*] ±0.061	2.91	2.408 ^{**} ±0.011	0.47	2.206±0.037	1.69
PD/PT	0.842±0.021	2.52	0.696±0.014	2.01	0.945±0.021	2.24	0.758±0.003	0.40

[†]Method A: *n*-BuOH reflux extraction; B: 70% EtOH reflux extraction; C: 50% MeOH reflux extraction with SPE; D: 50% MeOH ultrasonication with SPE.

[‡]All values are means±SD (n = 3).

[§]Relative standard deviation. Data are expressed as mean±SEM. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 vs. Method A.

법은 수포화부탄올 환류추출 후 1차 정제를 위해 물과 분배하여 물층을 제거하는 과정과 농축하는 과정까지 여러 실험단계를 거치게 되므로 재현성 확보를 위해 상당히 숙련도가 요구되는데, 숙련도에 따라 실험오차가 큰 것이 단점으로 지적되고 있다. 또한 이 추출법은 시간이 많이 소요되고 용매도 초음파 추출 (Method D)보다 더 많이 소요되는 단점이 있다. 또 50% 메탄올 환류 추출법인 Method C 방법은 환류추출과 농축과정이 포함되어 역시 숙련도에 따라 실험오차 또는 함량변이가 커지는 방법이다. 반면, 50% MeOH 초음파추출법인 Method D 방법은 분배나 농축과정이 생략되고 추출원액을 SPE 전처리과정만으로 1차 정제를 하므로 오차발생 가능성이 적고 무엇보다 용매 분배와 농축에 소요되는 시간이 단축되어 상대적으로 분석시간을 단축시키는 이점이 있다. 이러한 추출과 전처리 과정의 이점 때문에 많은 연구자들이 인삼의 ginsenoside 분석을 위해 초음파 추출을 하거나 또는 초음파 추출법과 다른 추출방법을 비교하였다 (Corbit *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2005; Morinaga *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2006a).

Method A에서 D까지의 추출방법별 ginsenoside 함량면이 및 조성을 살펴보면 (Table 3), 50% 환류추출 후 SPE 전처리한 Method C가 total ginsenoside 함량이 2.408±0.011%로서 유의성 인정되는 수준에서 다른 방법보다 함량이 높았다. 그 외 방법에 의한 total ginsenoside 함량은 Method A, B, D의 시료액이 각각 2.208±0.057%, 2.103±0.061%, 2.206±0.037%로 측정되었는데 Method A와 D의 시료액은 유사한 정도인 반면, 70% 에탄올 환류추출법인 Method B가 가장 함량이 낮았다. 동일한 환류추출 방법을 사용하더라도 70% 에탄올보다는 50% 메탄올이 ginsenoside의 추출용매로 더 적합함을 알 수 있었다 (Table 3). Corbit 등 (2005)은 서양삼의 ginsenoside를 분석을 위해 100% MeOH로 60°C에서 환류추출하는 것이 100% MeOH 또는 70% MeOH로 초음파

추출하는 방법보다 Rg1을 제외한 모든 ginsenoside 함량이 높다고 보고하였다. 이것은 초음파 추출이 진탕추출이나 가온환류추출 또는 전자파 이용 추출방법보다 더 효율적이고 시료 손실이 적다는 Shu 등 (2003)의 보고와는 상반된 것이다. 본 연구에서는 50% MeOH로 초음파 추출과 환류추출을 비교할 때 Corbit 등의 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

Ginsenoside 조성면에서 Method C의 시료액은 50% MeOH 초음파추출 후 SPE 전처리한 Method D의 시료액과 비교하면, 특히 PD (protopanaxdiol) 계열의 Rb1, Rc, Rb2의 함량이 높은 것이 특징이었다. 즉 50% 메탄올로 고온 환류추출 하는 조건이 이러한 성분들의 용출을 용이하게 하였으며 이러한 요인으로 Method C 방법이 total ginsenoside 함량 높고 PD/PT (protopanaxiaol/protopanaxtriol) 비율이 0.945로 가장 높은 결과를 가져온 것으로 추론되었다 (Table 3). 70% 에탄올로 환류추출한 Method B의 추출액은 극성이 높은 당류 성분 피크와 ginsenoside Rg1, Re 성분의 용출 피크가 오버랩되는 가능성이 높는데, 이러한 요인 때문인지 특히 ginsenoside Rg1의 함량이 다른 추출방법에서보다 높게 측정되면서 PD/PT ratio가 0.696으로 다른 추출방법보다 낮은 수치를 나타내었다 (Table 3). 따라서 Method B는 ginsenoside Rg1, Re의 정확한 정량에 부적합한 것으로 판단되었다. 그 외 Method A와 D의 시료액에서 PD/PT ratio는 각각 0.842, 0.758의 값으로 측정되었다. Method C, D가 모두 50% 메탄올을 추출용매로 사용하고 있지만 Method C가 가온 환류추출의 경우이고 Method D가 가온하지 않는 초음파 추출인 것을 감안하면, 가온 환류추출 방법이 초음파 추출방법에 비해 PD계 사포닌의 용출에 더 용이할 수도 있음을 시사하였다. 이것은 Corbit 등 (2005)의 ginsenoside 분석결과와도 일치하는 것으로, 그들의 연구에서는 초음파 추출법 등 다른 방법에 의한 추출보다 가온 환류추출법에 의해 Rb1과 Rd 같은 PD계 사포

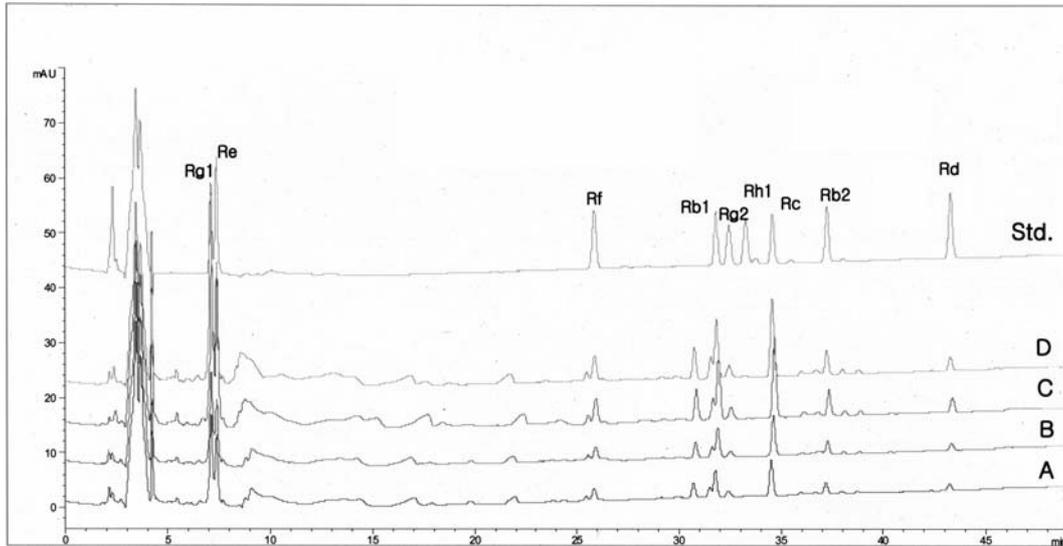


Fig. 4. HPLC profiles of 50% MeOH extracts of *P. ginseng* by different extraction conditions. Std: standard ginsenoside; A: ultrasonic extraction using ultrasonicator and 0.5 ml loading for solid phase extraction (SPE) with Sep-Pak Plus C18 cartridge; B: ultrasonic extraction using ultrasonic bath and 0.5 ml loading for SPE; C: ultrasonic extraction using ultrasonicator and 1 ml loading for SPE; D: ultrasonic extraction using ultrasonic bath and 1 ml loading for SPE.

닌 함량이 더 높게 분석되었다.

다양한 *Panax* 속 식물의 추출방법에 대해서는 이미 많은 보고가 있었는데, Wan 등 (2006a; 2006b)은 중국에서 주로 생산되는 전칠삼 (*Panax notoginseng*)의 ginsenoside 분석을 위해 soxhlet 추출, 초음파 추출, 침지 추출, 가압 추출법 등을 비교하여 보고하였다. 이들은 가속용매추출장치를 사용한 가압 추출법이 추출과정을 자동화하므로써 손조작을 줄여주므로 실험자에 의한 실험오차를 감소시켜주고 용매 소모량도 적어 다른 추출방법보다 유용하다고 하였다. 그러나 ASE (accelerated solvent extraction, 가속용매추출) 장비가 고가장비라는 점에서 범용으로 적용하기에는 한계성이 있는 반면 ultrasonic bath에서의 초음파 추출은 범용으로 적용하기 용이할 뿐 아니라 용매 사용량도 유사하다.

서양삼 (*Panax quiquefolius*)의 ginsenoside 분석에서도 초음파 추출법, 환류추출 추출법, 가속용매추출법 등 앞에서 소개한 다양한 추출법이 적용되어 있다 (Court *et al.*, 1996; Corbit *et al.*, 2005; Christensen *et al.*, 2006; Ligor *et al.*, 2005). Lou 등 (2005)은 인삼의 다양한 제품에 함유된 ginsenoside를 분석하기 위해 초음파 추출과 solid-phase extraction (SPE) 과정으로 시료를 정제하였다. 이들은 SPE 카트리지를 사용하여 시료를 전처리하는 것이 다른 전통적인 방법보다 시료의 1차 정제가 용이하고 경제적이고 재현성이 높다고 보고하였다. 본 연구에서도 Method A와 같이 전통적인 용매분배에 의한 정제방법과 Method D와 같이 SPE 카트리지를 이용한 정제방법에서 total ginsenoside 함량의 RSD 값이 각각 2.59%, 1.69%로 나타나 SPE cartridge 사용에 의한 시

료정제 방법이 비교적 간편하고 재현성과 정밀도가 높음을 시사하였다 (Table 3). 한편, Kwon 등 (2000)과 Shu 등 (2003)은 인삼 (*P. ginseng*)의 추출방법에 대해서는 microwave를 이용한 추출법을 소개하였으며, Wang 등 (2001)은 CO₂ 가스를 이용한 초임계 추출법으로 인삼을 추출하는 것을 보고하였다. 특히 초임계 추출의 경우 total ginsenoside 함량이 환류추출이나 초음파 추출의 경우보다 적게 분석되었는데 약간의 에탄올 용매와 혼용하여 CO₂ 초임계 추출을 하면 total ginsenoside 추출 함량이 다른 추출법으로 하는 경우와 비슷한 수준으로 증가한다고 하였다. 본 연구결과에서는 50% MeOH를 추출용매로 한 Method C, D 추출법에서 total ginsenoside의 함량이 각각 2.408 ± 0.011%, 2.206 ± 0.037%로 측정되어 Method C가 다소 total ginsenoside 함량을 높여주는 하였다. 그런데 추출과정 복잡성과 경제성, 시간 등의 효율성을 고려할 때 초음파 추출 및 SPE 전처리법인 Method D가 ginsenoside 추출법으로 적합할 것으로 판단되었다.

2. 50% 초음파 추출-SPE 전처리법의 정밀 검토

50% 메탄올 초음파 추출법의 재현성을 높이고 또 범용으로 적용하기 용이한 분석법을 찾기 위해 좀 더 세부적으로 초음파 추출법에 대해 검토하였다. 인삼시료는 연풍 4년근 시료를 사용하였으며 초음파 추출기로서 ultrasonicator와 ultrasonic bath을 각각 비교하고 또 SPE 과정에서 cartridge에 loading하는 시료액이 0.5 ml 또는 1 ml 일 때의 경우에 대해서 각각 재현성과 정밀도를 비교하여 적절한 초음파 추출-전처리방법을 정립하였다.

Table 4. Total contents and composition of ginsenoside of *P. ginseng* by different extraction method using ultrasonic extraction.

Ginsenoside	A [†]		B		C		D	
	% w/w [‡]	RSD [§] (%)	% w/w	RSD (%)	% w/w	RSD (%)	% w/w	RSD (%)
Rg1	0.370±0.014	3.89	0.385±0.023	6.01	0.399±0.016	3.96	0.425±0.016	3.67
Re	0.231±0.008	3.26	0.237±0.010	4.40	0.216±0.018	8.11	0.189±0.008	4.33
Rf	0.066±0.002	2.77	0.066±0.001	1.93	0.069±0.001	2.03	0.066±0.002	3.37
Rb1	0.175±0.006	3.22	0.197±0.006	3.17	0.202±0.007	3.50	0.202±0.004	2.17
Rg2	0.031±0.001	2.62	0.030±0.001	4.69	0.034±0.006	17.84	0.031±0.001	3.09
Rc	0.238±0.008	3.36	0.268±0.006	2.08	0.270±0.009	3.30	0.272±0.006	2.13
Rb2	0.073±0.002	3.13	0.082±0.003	3.77	0.083±0.003	3.99	0.082±0.004	4.60
Rd	0.037±0.002	4.38	0.042±0.002	4.39	0.043±0.002	4.16	0.043±0.001	2.07
Total	1.215±0.028	2.29	1.307±0.028	2.13	1.315±0.026	1.96	1.311±0.022	1.71
PD/PT	0.753±0.021	2.82	0.822±0.030	3.68	0.830±0.024	2.82	0.843±0.023	2.71

[†]Different extraction methods, A: ultrasonic extraction using ultrasonicator and 0.5 ml loading for solid phase extraction (SPE) with Sep-Pak C18 cartridge; B: ultrasonic extraction using ultrasonic bath and 0.5 ml loading for SPE; C: ultrasonic extraction using ultrasonicator and 1 ml loading for SPE; D: ultrasonic extraction using ultrasonic bath and 1 ml loading for SPE.

[‡]All values are means±SD (n = 6).

[§]Relative standard deviation.

그 결과, 우선 Fig. 4에서와 같이 모든 처리에서 양호한 분리능의 HPLC chromatogram을 나타내었다. 그러나 A, B 방법의 경우, 0.5 ml 시료액을 SPE처리하는 것으로 1 ml 시료액을 SPE 처리하는 C, D 경우보다 peak가 상대적으로 작아서 분석 조건으로는 0.5 ml 보다는 1 ml SPE 처리조건이 더 좋을 것으로 예측하였다. 더구나 Table 4에서와 같이, total ginsenoside의 함량과 PD/PT ratio가 시료액의 SPE 처리 loading량에 따라 변이를 보이지 않았기 때문에 0.5 ml 보다는 1 ml 시료액의 SPE 처리조건이 더 적합할 것으로 판단되었다. Total ginsenoside의 함량과 PD/PT ratio는 ultrasonicator를 이용하여 추출 후 0.5 ml의 시료액을 SPE 처리하여 분석한 경우(A), 각각 1.215±0.028%, 0.753±0.021%로 가장 낮은 수치를 나타내었다. 그 외 다른 처리 (B~D)에서는 total ginsenoside의 함량과 PD/PT ratio가 각각 1.307~1.315%, 0.822~0.843%으로 측정되어 큰 변이를 보이지 않았다. 한편, ultrasonicator는 probe를 시료 추출 튜브에 침지하여 추출하는데 실험오차는 Table 4에서와 같이 ultrasonic bath를 사용하는 경우와 큰 차이를 보이지는 않았지만 추출시 1개의 probe에 시료 1개씩 추출되므로 전체 시료 추출시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 반면에 ultrasonic bath는 뚜껑을 닫은 상태의 여러 개의 시료 tube를 동시에 bath에 넣고 안전하게 추출하게 되므로 실험오차를 줄이고 전체 시료 추출시간을 단축하는 이점이 있었다. 결론적으로, 실험의 재현성과 정밀도가 유사하다는 점을 고려하면, ultrasonicator보다는 ultrasonic bath를 사용하여 초음파 추출을 하는 것이 시간의 단축과 추출과정의 간편성에서 더 효율적인 것으로 판단되었다. 이상의 연구결과를 통해 인삼의 ginsenoside를 분석하기위한 추출조건으로는 50% MeOH 초음파 추출 및 SPE 전처리 조건인 Method D가 가장 적합한 것으로 판단된다.

LITERATURE CITED

- Cho WCS, Chung WS, Lee SKW, Leung AWN, Cheng CHK and Yue KKM.** (2006). Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 550:173-179.
- Christensen LP, Jensen M and Kidmose U.** (2006). Simultaneous determination of ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng root (*Panax quinquefolium* L.) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:8995-9003.
- Corbit RM, Ferreira JFS, Ebbs, SD and Murphy LL.** (2005). Simplified extraction of ginsenosides from American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) for high-performance liquid chromatography-ultraviolet analysis *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:9867-9873.
- Corthout J, Naessens T, Apers S and Vlietinck AJ.** (1999). Quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng* roots and ginseng preparations by thin layer chromatography-densitometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 21:187-192.
- Court WA, Hendel JG and Elmi J.** (1996). Reversed-phase high performance liquid chromatography determination of ginsenosides of *Panax quinquefolium*. *Journal of Chromatography A*. 755:11-17.
- Kampen JV, Robertson H, Hagg T and Drobitch R.** (2003). Neuroprotective actions of the ginseng extract G115 in two rodent models of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*. 184:521-529.
- Kang KS, Yamabe N, Kim HY and Yokozawa T.** (2007). Effect of sun ginseng methanol extract on lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *Phytomedicine*. 14:840-845.
- Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H and Surh YJ.** (2000). Antioxidant and anti-tumor

- promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Letters*. 150:41-48.
- Kim CS and Kim SB.** (2001). Determination of ginseng saponins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 9:21-25.
- Kim DH, Moon YS, Jung JS, Mind SK, Son BK, Suh HW and Song DK.** (2003a). Effects of ginseng saponin administered intraperitoneally on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in mice. *Neuroscience Letters*. 343:62-66.
- Kim DH, Moon YS, Lee TH, Jung JS, Suh HW and Song DK.** (2003b). The inhibitory effect of ginseng saponins on the stress-induced plasma interleukin-6 level in mice. *Neuroscience Letters*. 353:13-16.
- Kim HS, Lee EH, Ko SR, Choi KJ, Park JH and Im DS.** (2004). Effects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells. *Archives of Pharmacal Research*. 27:429-435.
- Kwon JH, Kim KE and Lee GD.** (2000). Optimization of microwave-assisted extraction under atmospheric pressure condition for soluble ginseng components. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 32:117-124.
- Kwon YS and Jang KH.** (2004). The effect of Korean red ginseng on liver regeneration after 70% hepatectomy in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*. 66:193-195.
- Lee SW, Kim GS, Lee MJ, Hyun DY, Park CG, Park HK and Cha SW.** (2007). Effect of blue and yellow polyethylene shading net on growth characteristics and ginsenoside contents in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:194-198.
- Ligor T, Ludwiczuk A, Wolski T and Buszewski B.** (2005). Isolation and determination of ginsenosides in American ginseng leaves and root extracts by LC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 383:1098-1105.
- Liu Y, Yang J and Cai Z.** (2006). Chemical investigation on Sijunzi decoction and its two major herbs *Panax ginseng* and *Glycyrrhiza uralensis* by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41:1642-1647.
- Lopez MVN, Cuadrado PGS, Ruiz-Poveda OP, Fresno AMVD and Accame EC.** (2007). Neuroprotective effect of individual ginsenosides on astrocytes primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1770:1308-1316.
- Lou DW, Saito Y and Jinno K.** (2005). Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of important bioactive ginsenosides in pharmaceutical preparations. *Chromatographia* 62:349-354.
- Morinaga O, Tanaka H and Shoyama Y.** (2006). Detection and quantification of ginsenoside Re in ginseng samples by a chromatographic immunostaining method using monoclonal antibody against ginsenoside Re. *Journal of Chromatography B*. 830:100-104.
- Park JY, Lee CY and Won JY.** (2007). Analytical optimum of ginsenosides according to the gradient elution of mobile phase in high performance liquid chromatography. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:215-219.
- Park MK, Park JH, Han SB, Shin YG and Park IH.** (1996). High-performance liquid chromatographic analysis of ginseng saponins using evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*. 736:77-81.
- Shu YY, Ko MY and Chang YS.** (2003). Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. *Microchemical Journal*. 74:131-139.
- Suh SO, Boo YJ, Park JM, and Kim J.** (2007). Prospective study for Korean red ginseng extract as an immune modulator following a curative surgery in patients with advanced colon cancer. *Journal of Ginseng Research*. 31:54-59.
- Surh YJ, Na HK, Lee JY and Keum YS.** (2001). Molecular mechanisms underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16(Suppl):S38-41.
- Tetsutani T, Yamamura M, Yamaguchi T, Onoyama O and Kono M.** (2000). Can red ginseng control blood glucose in diabetic patients. *Ginseng Review*. 28:44-47.
- Vanhelen-Fastre R, Faes ML and Vanhaelen MH.** (2000). High-performance thin-layer chromatography determination of six major ginsenosides in *Panax ginseng*. *Journal of Chromatography A*. 868:269-276.
- Vuksan V, Sung MK, Sievenpiper JL, Stavro PM, Jenkins AL, Buono MD, Lee KS, Leiter LA, Nam KY, Arnason JT, Choi M and Naeem A.** (2008). Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves glucose and insulin regulation in well-controlled, type 2 diabetes: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 18:46-56.
- Wan JB, Lai CM, Li SP, Lee MY, Kong LY and Wang YT.** (2006a). Simultaneous determination of nine saponins from *Panax notoginseng* using HPLC and pressurized liquid extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41:274-279.
- Wan JB, Yang FQ, Li SP, Wang YT and Cui XM.** (2006b). Chemical characteristics for different parts of *Panax notoginseng* using pressurized liquid extraction and HPLC-ELSD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41:1596-1601.
- Wang HC, Chen CR and Chang CJ.** (2001). Analytical, nutritional and clinical methods section. *Food Chemistry*. 72:505-509.