

## 인삼의 열처리 과정 중 생성되는 3종의 수산화진세노사이드에 대한 연구

이상명\*

목원대학교 첨단소재학과

### Three Hydroxylated Ginsenosides from Heat Treated Ginseng

Sang Myung Lee\*

Division of Advanced Materials, Mokwon University, Daejeon 35349, Korea

**Abstract** – Ginsenosides are considered to be the most important ingredients in ginseng. They are chemically converted by endogenous organic acids contained in ginseng and the heat applied during red ginseng processing. During this procedure, various converted ginsenosides are produced through hydrolysis of substitute sugars of ginsenosides and forming double bonds through dehydration in the dammarane skeleton. In order to study the conversion mechanism of protopanaxadiol-type ginsenosides during the heat treatment process of ginseng, we purified the three final converted ginsenosides by heating fresh ginseng for a long time. The three isolated ginsenosides were identified as 25(OH)-ginsenoside Rg5, 25(OH)-ginsenoside Rz1 and 25(OH)-ginsenoside Rg3 through NMR spectrum analysis. As a result of quantification of ginseng heated at 100 °C for 0 to 6 days by HPLC/UV and TLC methods, the content of 25(OH)-ginsenosides tended to increase in proportion to the time exposed to heat. In particular, the content of 25(OH)-ginsenosid Rg5 was confirmed to be noticeably increased.

**Keywords** – 25(OH)-ginsenoside Rg5, 25(OH)-ginsenoside Rz1, 25(OH)-ginsenoside Rg3, Hydroxy ginsenosides

진세노사이드는 흔히 인삼사포닌이라고 하며 *Panax* 속 식물에서 가장 널리 알려진 2차 대사물질이다. 고려인삼(*Panax ginseng* Meyer, Araliaceae)에는 두 가지 형태의 사포닌으로서 dammarane계와 oleanane계 사포닌이 존재한다.<sup>1,2)</sup> 수삼 또는 건삼의 뿌리 또는 전초에 함유된 천연성분으로서 oleanane계 사포닌은 ginsenoside Ro와 polyacetylene ginsenoside Ro 두 종이 존재하며<sup>3)</sup> dammarane계 사포닌은 protopanaxadiol로서 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd 및 Ra1, Ra2, Ra3 및 protopanaxatriol로서 ginsenoside Rg1, Re 및 Rf가 존재한다.<sup>1)</sup> 또한 경작지에서 채굴하여 시간이 경과되지 않은 수삼은 다양한 종류의 malonyl ginsenoside를 함유 한다.<sup>4)</sup> 수삼을 가열 건조한 홍삼은 열에 의해 변성된 다양한 종류의 전환 사포닌을 함유 한다.<sup>5-7)</sup> 전환 사포닌으로서 ginsenoside Rg1의 당가수분해에 의해 생성된 ginsenoside Rh1과 이로부터 전환된 ginseoside Rk3 및 Rh4가 있고 ginsenoside Re의 당가수분해에 의해 생성된 ginsenoside Rg2와 ginsenoside Rg2의 탈수 반응으로 생성되는 ginsenoside F4, Rg6 및 20(E)-F4가 대표적인

protopanaxatriol계 전환 사포닌이다. 열적으로 비교적 안정한 ginsenoside Rf 조차 유기산 존재 하에 가열하면 ginsenoside Rg9, 20Z-Rg9 및 Rg10으로 변성되는 것으로 알려져 있다.<sup>8-10)</sup> 인삼에 존재하는 protopanaxdiol ginsenoside로서 ginsenoside Rb1, Rc, Rb2, Rd, Ra1, Ra2, Ra3는 홍삼제조과정 중 열에 의하여 ginsenoside Rg3로 전환된다.<sup>5)</sup> ginsenoside Rg3는 dammalane 골격의 20번 위치에 탈수반응에 의하여 2중결합이 형성되며 3종의 구조 이성질체인 ginsenoside Rk1, Rg5 및 Rz1로 전환된다.<sup>5)</sup> 그러므로 protopanaxadiol계로서 ginsenoside Rg3, Rg5, Rk1, Rz1은 홍삼에 특이적으로 존재하는 전환 사포닌으로 간주 된다.<sup>1)</sup> 그러나 protopanaxatriol 및 -diol계 전환사포닌인 ginsenoside Rh4, F4, Rg5 및 이의 이성질체들의 이후 전환과정은 명확하게 규명되어 있지 않다.

본 연구는 protopanaxadiol계 품질지표성분인 ginsenoside Rb1이 열에 의하여 최종적으로 생성되는 화학종을 규명하고 인삼 원재료인 수삼의 가열시간에 비례하여 측정되는 진세노사이드의 총 함량이 낮아지는 원인을 고찰하였으며 수삼의 가열공정으로 생산되는 홍삼과 흑삼에 대한 합리적인 protopanaxadiol 계 품질지표성분을 제시하고자 한다.

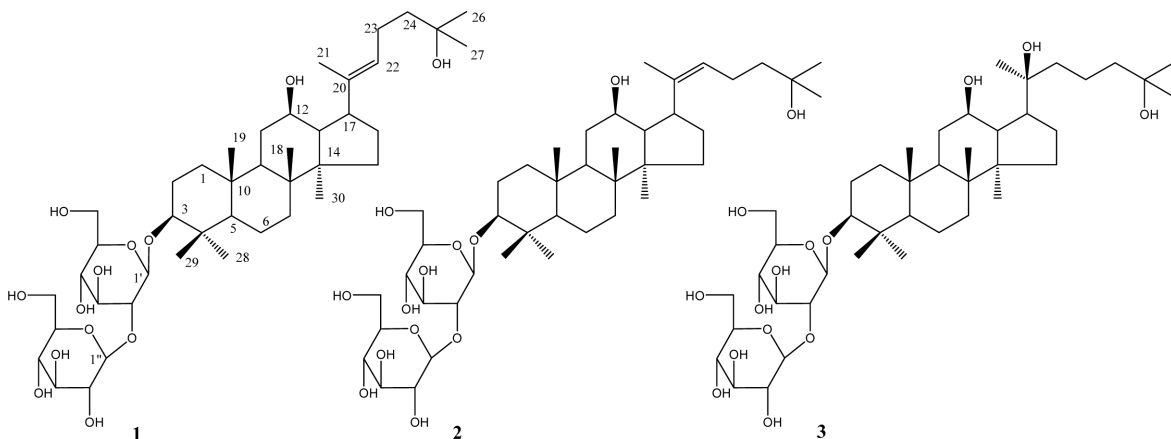
\*교신저자(E-mail): smlee@mokwon.ac.kr  
(Tel): +82-42-829-7566

## 재료 및 방법

**기기 및 시약** - 25(OH)-ginsenoside Rg5(**1**)<sup>11,12</sup>, 25(OH)-ginsenoside Rz1(**2**) 및 25(OH)-ginsenoside Rg3(**3**)<sup>13,14</sup>를 분리하기 위한 원재료로서 홍삼추출물은 홍삼정(KGC 인삼공사, 대한민국)을, 가열 조건에 따른 인삼 원재료의 ginsenoside 함량변화 측정을 위한 시료는 금산 인삼시장에서 6 년근 수삼을 구입하여 사용하였다. 순수하게 분리한 전환사포닌(**1**, **2**, **3**)의 용접측정은 Fisher-John Apparatus(USA)를 사용하여 측정하였으며 정량분석에 사용된 HPLC는 Agilent 1200 Series(Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. 분석용 컬럼은 Sunfire C8, 4.6 mm×75 mm, 3.5 μm(Waters, USA)을 사용하였다. 함량분석에 사용한 지표성분은 12종 ginsenoside(Rg1, Re, Rf, Rg2, Rh1, Rb1, Rc, Rb2, Rd, Rg3(S), Rg3(R))가 일정 농도로 용해된 표준용액을 KGC 인삼공사(Korea)에서 제공 받아 사용하였다. 지표성분을 확보할 수 없는 ginsenoside Rk1, Rg5는 Rg3의 반응계수를 이용하여 간이 정량하였다. 전환사포닌 **1**, **2**, **3**의 순수분리는 Shimadzu MPLC system으로서 LC-6AD, SCL-10AVP, 및 FRC-10A(Shimadzu, Japan)에 YMC-Gel ODS-A, 5-150 μm(YMC, Japan) 컬럼을 적용하여 사용하였다. 순수하게 분리된 전환사포닌의 질량분석을 위하여 UPLC-Xevo QToF MS system(Waters, USA)을 사용하였으며 UPLC용 컬럼은 ACQUITY BEH C18, 100 mm×2.1 mm, 1.7 μm(Waters, USA)를 사용하였다. 분리한 전환사포닌의 NMR 스펙트럼을 측정하기 위하여 Bruker Avance 600 MHz NMR spectrometer(BRUKER, Germany)를 사용하였으며 NMR 분석에 사용한 용매로서 pridine-*d*<sub>5</sub>(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다. 분리 및 분석에 사용한 용매로서 증류수는 18 MΩ 이상의 탈이온수를 Milli-Q RG(USA) 초순수수 제조장치를 이용하였으며 acetonitril(Merck, USA)은 HPLC 등급으로 구입하여 사용하였다. Ginsenoside 전환반응에 사용한 유기산

은 구연산(Sigma-Aldrich, USA)으로서 특급시약을 사용하였다. Crude protopanaxadiol을 얻기위해 Diaion HP-20(Sigma-Adrich, USA) 수지를 사용하였으며 화합물의 분리를 위한 고정상 수지로서 Octadecyl(C18) Aqua Silica gel(Yamazen Corporation, Japan)을, 정량 및 확인 및 정량시험에 사용된 박층크로마토그래피용 재료로서 TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>(Merck, Germany)을 사용하였다. 수삼 가열처리 및 건조에 사용한 가열건조기는 강제순환식 정밀건조기(대한국학, Korea)를 사용하였다.

**표준물질 1, 2, 3 분리 및 정제** - 화학 구조 확인 및 함량 분석을 위한 표준물질로써, 25(OH)-ginsenoside Rg5(**1**), 25(OH)-ginsenoside Rz1(**2**) 및 25(OH)-ginsenoside Rg3(S)(**3**)(Fig. 1)를 다음과 같은 방법으로 제조 분리하였다. 홍삼 추출물(1 kg)을 물(1 L)에 녹여 활성화 된 Diaion HP-20 수지(500 g)를 가한 후 물(5 L)로 세척하여 수용성 성분을 제거하고 protopanaxatriol ginsenoside를 제거하기 위해 30% 에탄올 1 L로 세척한 후 70% 에탄올 3 L로 용출하고 용출액을 70°C에서 감압 농축시킬 때 crude protopanaxadiol ginsenoside를 다량 함유한 추출물(26 g)을 얻을 수 있었다. 건조한 crude protopanaxadiol ginsenoside(10 g)을 25 mL methanol에 용해시킨 후 1 M 구연산수 100 mL를 가하였다. 이 반응액을 100°C에서 12 시간 동안 가열한 후 100 mL 증류수를 가하고 200 mL의 butanol로 3회 추출하고 탈수제를 가하여 탈수한 butanol 층을 감압 농축하면 전환사포닌의 함량이 농후한 시료(**1**, **2**, **3** 혼합물로서 10 g)를 얻을 수 있었다. 시료 10 g을 methanol 적정량에 용해하여 ODS 수지(80 g)로 채워진 유리 컬럼(2×20 cm)에 가하고 35-40%의 acetonitril 약 2 L를 용출하고 TLC를 근거로 전환사포닌인 **1**, **2**, **3**의 함량이 농후한 분획으로 나누었다. 전환사포닌의 순수분리는 Shimadzu MPLC system과 YMC-Gel ODS-A 컬럼을 이용하였다. 이동상은 단일농도로서 45% acetonitrile를 사용하였으며 유속은 3 mL/min이며 화합물 **1**, **2**, **3** 각



**Fig. 1.** Chemical structures of 25(OH)-ginsenoside Rg5 (**1**) and 25(OH)-ginsenoside Rz1 (**2**), and 25(OH)-ginsenoside Rg3(S) (**3**).

**Table 1.** NMR spectroscopic data<sup>a,b</sup> of 25(OH)-ginsenosideRg5 (**1**), 25(OH)-ginsenoside Rz1 (**2**), 25(OH)-ginsenoside Rg3 (**3**)

No. C	1		2		3	
	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1.51 (ov), 0.77 (m)	39.8	1.52 (ov), 0.60 (m)	39.8	1.49 (ov), 0.77 (m)	39.3
2	1.84 (ov), 2.22 (m)	27.3	1.84 (ov), 2.23 (m)	27.3	1.84 (ov), 2.23 (m)	26.9
3	3.31 (dd, 11.4, 3.6)	89.4	3.31 (dd, 11.4, 3.6)	89.4	3.36 (dd, 11.2, 3.6)	89.1
4		40.2		40.2		39.9
5	0.70 (br. d, 12.0)	56.9	0.70 (br. d, 12.0)	56.9	0.72 (br. d, 12.0)	56.6
6	1.38 (ov), 1.51 (ov)	18.9	1.35 (ov), 1.52 (ov)	18.9	1.35 (ov), 1.52 (ov)	18.6
7	1.50 (ov), 1.25 (m)	35.9	1.53 (ov), 1.25 (m)	35.9	1.41 (ov), 1.21 (m)	35.4
8		40.8		40.8		40.2
9	1.45 (ov)	51.3	1.45 (ov)	51.3	1.38 (ov)	50.6
10		37.5		37.5		37.1
11	1.43 (ov), 1.94	32.7	1.47 (ov), 1.93 (ov)	33.1	1.45 (ov), 1.89 (ov)	32.2
12	3.95 (ov)	73.1	3.92 (ov)	72.9	3.91 (ov)	71.2
13	2.01 (t, 10.8)	51.5	2.10 (ov)	49.1	2.00 (ov)	48.8
14		51.4		51.7		51.9
15	1.68 (m), 1.10 (m)	33.2	1.43 (ov), 1.10 (ov)	33.2	1.50 (ov), 1.05 (ov)	31.6
16	1.50 (m), 1.95 (m)	29.3	1.54 (ov), 2.01 (ov)	28.9	1.95 (ov), 1.45 (m)	27.1
17	2.83 (q, 6.6)	51.0	2.39 (q, 6.6)	51.3	2.34 (m)	54.9
18	1.04 (s)	16.3	1.00 (s)	17.5	0.99 (s)	16.0
19	0.84 (s)	17.0	0.85 (s)	16.9	0.80 (s)	16.6
20		140.1		139.8		73.6
21	1.85 (s)	13.6	1.85 (s)	20.6	1.40 (s)	27.4
22	5.63 (t, 6.6)	126.1	5.36 (t, 7.2)	126.3	2.00 (m), 1.63 (m)	36.7
23	2.40 (m)	24.2	2.59 (m)	23.8	1.83 (m), 2.16 (m)	19.3
24	1.77 (m)	44.8	1.82 (m)	45.5	1.71 (m)	45.9
25		70.0		70.1		69.9
26	1.38 (ov)	30.3	1.43 (s, ov)	30.4	1.36 (s)	30.1
27	1.39 (ov)	30.5	1.43 (s, ov)	30.5	1.38 (s)	30.4
28	1.13 (s)	17.1	1.31 (s)	17.1	1.28 (s)	28.3
29	1.32 (s)	28.6	1.14 (s)	28.6	1.08 (s)	16.8
30	0.98 (s)	17.5	1.05 (s)	16.3	0.98 (s)	17.2
1'	4.96 (d, 7.2)	105.6	4.95 (d, 7.2)	105.7	4.91 (d, 7.2)	105.3
2'	4.28 (t, 7.8)	83.9	4.28 (ov)	83.9	4.28 (t, 7.8)	83.5
3'	4.35 (t, 9.6)	78.9	4.35 (ov)	78.9	4.35 (ov)	78.4
4'	4.35 (ov)	72.2	4.28 (ov)	72.2	4.28 (ov)	71.8
5'	3.95 (ov)	78.8	4.27 (ov)	78.8	3.88 (ov)	78.1
6'	4.60 (d, 11.4)	63.4	4.58 (ov)	63.3	4.58 (ov)	63.0
1''	5.41 (d, 7.8)	106.5	5.41 (d, 7.8)	106.5	5.35 (d, 7.8)	106.2
2''	4.16 (ov)	77.6	4.15 (d, 7.8)	77.6	4.12 (ov)	77.3
3''	3.96 (ov)	78.5	3.96 (ov)	78.5	3.96 (ov)	78.5
4''	4.17 (ov)	72.1	4.18 (t, 8.0)	72.1	4.20 (t, 8.0)	71.8
5''	3.96 (ov)	78.6	3.95 (ov)	78.6	3.95 (ov)	78.2
6''	4.51 (ov)	63.2	4.51 (ov)	63.2	4.51 (ov)	62.9

<sup>a</sup>Spectra were measured in pyridine-*d*<sub>5</sub> (<sup>1</sup>H:600 MHz, <sup>13</sup>C:150 MHz). <sup>b</sup>All assignments were confirmed by <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC, and ROESY spectra. ov: overlapped with other signals.

각의 농도가 농후한 시료(crude sample로서 약 10 mg/mL)를 회당 5 mL씩 주입, 해당 물질을 반복 분취 한 후 합하고 감압농축 하여 25(OH)-ginsenoside Rg5(120 mg, **1**), 25(OH)-ginsenoside Rgz1(40 mg, **2**) 및 25(OH)-ginsenoside Rg3(310 mg, **3**)를 순수하게 얻었다.

25(OH)-ginsenoside Rg5 (**1**): white needle (in MeOH), mp. 190-195°C, ESI-Q-TOF-MS  $m/z$  784.4972 [M+H]<sup>+</sup>; (calcd for C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>, 784.4973). <sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, pyridine-*d*<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, pyridine-*d*<sub>3</sub>) see Table 1.

25(OH)-ginsenoside Rz1 (**2**): white needle (in MeOH), mp. 191-196°C, ESI-Q-TOF-MS  $m/z$  784.4971 [M+H]<sup>+</sup>; (calcd for C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>, 784.4973). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, pyridine-*d*<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, pyridine-*d*<sub>3</sub>) see Table 1.

25(OH)-ginsenoside Rg3 (**3**): white powder (in MeOH), mp. 198-200°C, ESI-Q-TOF-MS  $m/z$  802.5076 [M+H]<sup>+</sup>; (calcd for C<sub>42</sub>H<sub>72</sub>O<sub>13</sub>, 802.5079). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, pyridine-*d*<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, pyridine-*d*<sub>3</sub>) see Table 1.

**질량분석** - 화합물 **1**, **2**, **3**의 질량을 확인하기 위하여 액체크로마토그래피에 의해 분리된 각 성분은 Park 등<sup>13)</sup>이 사용한 전자분무이온화법 및 비행체시간(ESI-TOF) 분석법을 사용하였다. 시료분석을 위하여 Waters ACQUITY UPLC system에 BEH C18 colum을 사용하였으며 이동상은 물(A)과 아세트니트릴(B)를 각각 0.001% phosphoric acid로 제조하여 다음과 같은 농도기울기로 표적물질을 용출하였다. 0-0.5 min(15% B), 14.5 min(30% B), 15.5 min(32% B), 18.5 min(38% B), 24.0 min(43% B), 27.0 min(55% B), 27.0-31.0 min(55% B), 35.0 min(70% B), 38.0 min(90% B), 38.1 min(15% B), 38.1-43.0 min(15% B). 유속은 0.6 mL/min였으며 시료주입량은 2.0 mL였다. 이온화는 ESI 방식이며 탈 용매 가스는 질소로서 120°C로 유지하였다. nebulizer와 cone 가스의 유속은 각각 800 및 50 L/h로 설정하였으며. capillary와 cone 전압은 2300 V 및 40 V로 조정하였다.

**가열시간에 따른 인삼 시료제조** - 가열시간에 따른 ginsenoside의 함량변화와 전환사포닌 **1**, **2**, **3**의 생성과 함량을 확인하기 위하여 조절한 수삼 20 g을 내열성 밀폐용기(15 mL Conical Tube, 15 개)에 담고 100°C로 조정된 가열건조기에서 0, 1, 2, 3, 6 day 동안 각 3개의 시료로 가열처리하였다. 가열처리가 완료된 시료는 40°C에서 12 시간 건조하고 분쇄하여 함량분석을 위한 시료전처리법에 따라서 시료를 제조하였다.

**시료 전처리 및 HPLC 분석법** - 각 시료에서 화합물 **1**, **2**의 함량 분석을 위하여 다음과 같이 HPLC 분석을 수행하였다. 각 인삼 시료분말 1 g에 10 mL의 메탄올을 가하고 60

분간 초음파 추출하여 정량적으로 여과하여 추출한 메탄올 시료용액을 0.25 μm 막여과기로 여과하여 검액으로 하였다. HPLC는 Agilent 1200 Series로서 분석용컬럼 Sunfire C<sub>8</sub> 컬럼을 40°C에서 사용하였다. 이동상은 acetonitrile/water(v/v%)로서 20-32%(0-40 min), 32-50%(40-55 min), 50-65%(55-70 min), 그의 유속은 1.6 mL/min로서 UV<sub>203nm</sub>에서 검출된 각 피크의 넓이를 외부표준법으로 검량 하였다. 각 ginsenoside의 직선범위는 기존에 보고된 분석법<sup>14,15)</sup>에 의하여 제시된 분석 유효성 자료에 의하여 정의되어 있으므로 직선범위 내에서 단일농도로 하였으며 각 농도의 조성은 홍삼시료의 일반적 함량에 근거하여 조정하여 최종농를 정하였다.

**박층 크로마토그래피** - 각 시료에서 화합물 **1**, **2**, **3**의 함량 분석을 위하여 다음과 같이 박층 크로마토그래피 분석을 수행하였다. 전개용매는 chloroform - ethyl acetate - methanol - water 15/40/22/9(v/v/v/v)로 제조하여 전개조에 가하고 밀폐 후 40°C, 10 min 동안 정치하여 전개조 내의 증기압을 안정화 하였다. TLC plate는 Silica gel 60 F<sub>254</sub>으로서 시료의 개수에 맞게 자르되 시료 간 점적 간격은 0.5 cm로 하고 전개 거리는 8 cm가 되도록 한다. HPLC 분석용 시료제조 방법으로 제조된 각 시료를 1 μL씩 TLC판에 점적하고 전개한 후에 발색시약용액(0.5 mL *p*-anisaldehyde, 10 mL glacial acetic acid, 85 mL methanol, 5 mL sulfuric acid)에 신속하게 담겼다 뺀후 105°C 오븐에서 5 min간 가열하여 발색시킨다. TLC 결과를 평판스캐너(HP Scanjet 200, USA)로 이미지화하여 SWEDAY JustTLC software (Sweden)를 사용하여 정량 하였다.

## 결과 및 고찰

인삼 원재료의 가열에 의해서 생성되는 것으로 추정하는 화합물 **1**, **2**, **3**의 존재를 확인하기 위하여 다양한 실험을 수행하였다. Ginsenoside들은 중성 조건에서 쉽게 변성되지 않는 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup> 그러나 인삼 원재료인 수삼 또는 그의 추출물은 구연산, 말론산 등과 같은 내인성 유기산에 의해서 약 pH 4.3의 약산성 조건을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>10)</sup> 인삼원재료가 다양한 목적에 의하여 가열될 때 산에 의하여 ginsenoside의 20번 위치의 당은 쉽게 가수 분해되며 연속적인 탈수반응으로 20번 위치에 이중결합이 형성되어 protopanaxadiol 계는 ginsenoside Rg5 및 그의 이성질체와 protopanaxatriol 계는 ginsenoside Rh4, F4, Rg9 및 그의 이성질체로써 생성되며 이로써 전환과정이 종결되는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 그러나 보고에 의하면 ginsenoside Rf의 전환형인 ginsenoside Rg9는 산성 조건에서 25번 위치의 수화반응에 의해 25(OH)-ginsenoside Rg9으로 전환된다는 것이 밝혀졌다.<sup>10)</sup> 따라서 ginsenoside Rg5 및 그의 이성질

체에서도 동일하게 25번 위치에 수산화반응이 일어날 것으로 예측되며 결과적으로 25(OH)-ginsenoside Rg5 및 그의 이성질체가 인삼원재료의 가열과정 중에 지속적으로 생성될 것으로 예상하고 이에 대한 실험결과를 고찰하였다.

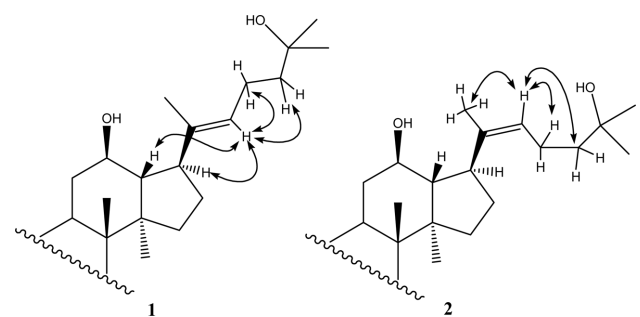
화합물 **1**, **2**, **3**의 화학적 구조 확인과 인삼 원재료의 가열에 의한 생성량을 측정하기 위해 **1**, **2**, **3**의 표준물질을 다음과 같이 제조하였다. Protopanaxatriol계 진세노사이드와 함께 전환반응을 진행하면 다양한 trio계 전환사포닌의 생성으로 인해 **1**, **2**, **3**의 정제가 용이하지 않으므로 protopanaxadiol 분획만을 전환하기 위하여 인삼추출액을 HP-20수지에 가하고 용출하여 protopanaxadiol계 진세노사이드가 농후한 분획을 단리 하였다. Protopanaxadiol 분획을 구연산조건에서 열처리하여 얻은 **1**, **2**, **3** 혼합물을 ODS를 고정상으로 충전한 유리컬럼에 가하고 35-40% acetonitrile로 용리하여 TLC로 목적물질의 반점을 확인한 후 반복적으로 크로마토그래피를 실시하여 반응 혼합물로부터 화합물 **1**, **2** 및 **3**을 순수하게 정제할 수 있었다.

25(OH)-ginsenoside Rg5 (**1**); 8 개의 메틸기 ( $\delta_{H-18}$  1.04,  $\delta_{C-18}$  16.3), ( $\delta_{H-19}$  0.84,  $\delta_{C-19}$  17.0), ( $\delta_{H-26}$  1.38,  $\delta_{C-26}$  30.3), ( $\delta_{H-27}$  1.39,  $\delta_{C-27}$  30.5), ( $\delta_{H-28}$  1.13,  $\delta_{C-28}$  17.1), ( $\delta_{H-29}$  1.32,  $\delta_{C-29}$  28.6), ( $\delta_{H-30}$  0.98,  $\delta_{C-30}$  17.5)로 부터 기인한 양성자와 탄소의 화학적 이동은 화합물 **1**이 propanaxadiol ginsenoside 골격을 그대로 유지하고 있음을 보여주고 있다. 또한 1-14번 위치의 양성자와 탄소의 화학적 이동은 ginsenoside Rg5와 거의 동일한 값을 나타내며 3번 위치에 치환된 2 분자의 glucose에서 2개의 anomeric 양성자  $\delta_{H-1'}$  4.96(d, 7.2 Hz),  $\delta_{H-1''}$  5.41(d, 7.8 Hz)가 나타나는 것으로 당의 가수분해반응은 없었던 것을 확인할 수 있다. 20-27번 위치의 화학적 이동은 문헌에 보고된 25(OH)-ginsenoside Rg<sup>9</sup>과 유사한 수치를 보여주고 있으며 이는 ginsenoside Rg5의 24, 25번 위치에 존재하는 이중결합에 수화반응이 일어났다는 것을 추정할 수 있다.  $\delta_{H-22}$  5.63(t, 6.6 Hz) 및  $\delta_{C-22}$ , C-20 126.1, 140.1는 C-20, -22 사이에 이중결합이 존재함을 보여주며  $\delta_{H-24}$  1.77(m),  $\delta_{C-24}$ , 25 44.8, 70.0는 24 및 25 위치의 탄소가 단일결합으로 연결되고 25번 위치의 탄소에 OH기가 존재하는 25(OH)-ginsenoside Rg<sup>9</sup>와 마찬가지로 25(OH)-ginsenoside임을 보여준다. 21번 위치에 존재하는 탄소의 화학적 이동 값은 ginsenoside Rg5, Rh3 및 Rh4.<sup>5,6,9</sup>와 유사한 값으로 13.6 ppm에서 나타난다. 이는 20, 22번에 존재하는 이중결합의 방향성이 E형 일 경우 C-21이 약 13 ppm의 화학적 이동을 보여주는 문헌치<sup>5,9</sup>와 일치하며 ROESY 스펙트럼에서 22번 위치의 양성자는 13, 17, 23, 24번 위치에 존재하는 양성자와 강한 NOE 상관성을 나타내지만 H-21의 메틸 양성자와는 상관성이 나타나지 않는 것으로 20(E) 배향을 가지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 화합물 **1**은 25(OH)-ginsenoside Rg5로 확인되었다. 화합물 **1**은

Zhou 등<sup>13</sup>, Wang 등<sup>12</sup>이 LC/MS방법으로 홍삼중에 그의 존재를 추정한 바 있으나 본 실험에서는 화합물 **1**을 순수하게 분리하고 NMR과 Mass spectrum 자료를 토대로 그의 화학적 구조를 확인하였다.

25(OH)-ginsenoside RZ1(**2**); 8개의 메틸기 ( $\delta_{H-18}$  1.00,  $\delta_{C-18}$  17.5), ( $\delta_{H-19}$  0.85,  $\delta_{C-19}$  16.9), ( $\delta_{H-26}$  1.43,  $\delta_{C-26}$  30.4), ( $\delta_{H-27}$  1.43,  $\delta_{C-27}$  30.5), ( $\delta_{H-28}$  1.31,  $\delta_{C-28}$  17.1), ( $\delta_{H-29}$  1.14,  $\delta_{C-29}$  28.6), ( $\delta_{H-30}$  1.05,  $\delta_{C-30}$  16.3)로 부터 기인한 양성자와 탄소의 화학적 이동은 화합물 **2**는 화합물 **1**과 마찬가지로 propanaxadiol ginsenoside 골격을 유지하고 있음을 보여주고 있다. 또한, 1-14번 위치의 양성자와 탄소의 화학적 이동은 ginsenoside RZ1과 거의 동일한 값을 나타내며 3번 위치에 치환된 2 분자의 glucose에서 2개의 anomeric 양성자  $\delta_{H-1'}$  4.95(d, 7.2 Hz),  $\delta_{H-1''}$  5.41(d, 7.8 Hz)가 나타나는 것으로 화합물 **1**과 마찬가지로 당의 가수분해반응은 없었던 것을 확인할 수 있다. 화합물 **2**의 1-14번 위치의 양성자 및 탄소의 화학적 이동은 ginsenoside RZ1 그리고 20-27번 위치의 양성자 및 탄소의 시그널은 화합물 **1**과 거의 동일한 화학적 이동을 보이며 이는 25번 위치에 OH기가 존재함을 알려준다. 그리고  $\delta_{C-30}$  20.6은 ginsenoside RZ1에 존재하는 Z 배향 이중결합과 유사한 값을 나타내는데 일반적으로 Z 배향일 경우 C-21의 화학적 이동은 약 20-30 ppm에 나타나게 하는 것으로 알려져 있다.<sup>5,9</sup> 화합물 **2**는 화합물 **1**의 입체이성질체이며 Z 배향을 이루는 것을 ROESY 스펙트럼의 NOE 상관성(Fig. 2)을 통하여 확인하였다. 즉, H-22의 양성자는 H-21, 23, 24와 강한 NOE 상관관계를 갖지만 H-13, 17의 메틸 양성자와는 상관관계를 보이지 않으며 이는 20(Z) 이중결합이 Z형 입체 배향을 갖는 것을 의미하는 것으로 확인하였다. 결론적으로, 화합물 **2**는 25(OH)-ginsenoside RZ1으로 확인되었다.

25(OH)-ginsenoside Rg3(S)(**3**); ginsenoside Rb1의 FeCl<sub>3</sub>

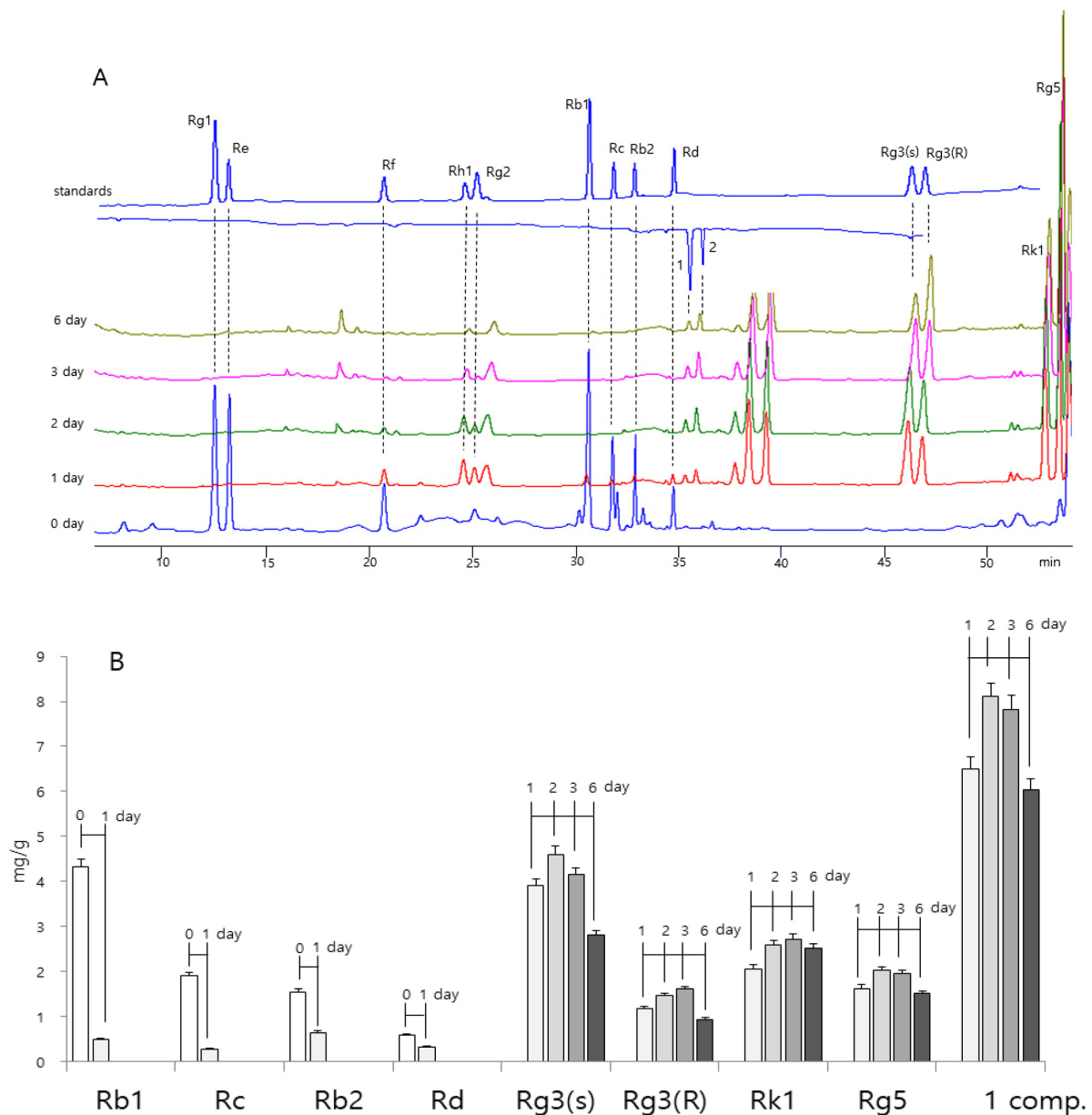


**Fig. 2.** Selective NOE correlations for the hydrogen located at 22-carbon of 25(OH)-ginsenoside Rg5 (**1**) and 25(OH)-ginsenoside RZ1 (**2**). The indications ( $\leftrightarrow$ ) are NOE correlation that selectively expresses the stereochemistry of the 20(22)-double bond from the ROESY spectrum measured at 600 MHz in pyridine-*d*<sub>5</sub>.

축매반응으로 생성된 25(OH)-ginsenoside Rg3(S)<sup>16</sup>와 화합물 3의 탄소의 화학적이동이 같음을 확인하였다. 양성자의 화학적이동은 탄소의 화학적이동과 HMQC 상관성을 통하여 확정하였다. 또한 화합물 3에 존재하는 양성자의 화학적이동은 23, 24번 위치의 탄소 및 양성자를 제외하고 ginsenoside Rg3(S)<sup>17</sup>와 극히 유사하나  $\delta_{C-23,-24,-25}$  19.3, 45.9, 69.9 및  $\delta_{H-23,-24}$  ca. 1.99(m), 1.71(m)은 ginsenoside Rg3와는 다르게 24, 25 위치에 이중결합이 존재하지 않음을 확

인할 수 있었다. 따라서 화합물 3은 1, 2와 마찬가지로 25번 위치에 수산기가 존재하는 25(OH)-ginsenoside Rg3(S)로 확인되었다. 화합물 3은 Zhou 등<sup>11</sup>, Wang 등<sup>12</sup>이 LC/MS방법으로 홍삼 또는 사포닌 대사물질 중에서 그의 존재를 추정하 바 있으나 본 실험에서는 화합물 3을 순수하게 분리하고 NMR과 Mass 스펙트럼 자료를 토대로 그의 화학적 구조를 확인하였다.

재배지에서 채굴하여 세절한 후 냉동 보관한 인삼 원재료



**Fig. 3.** Comparison of HPLC chromatograph from five ginseng samples, which were 0, 1, 2, 3 and 6 day heated ginseng samples (A). Comparison of ginsenosides concentration each samples (B). The used column is Sunfire C8, 4.6 mm x 75 mm, 3.5  $\mu$ m and the mobile phase consisted acetonitrile/water % using a gradient elution of 20 – 32% at 0 – 40 min, 32 – 50% at 40 – 55 min, 55 – 65% at 55 – 70 min flow rate 1.6 mL/min, detected at UV<sub>203</sub> nm. Each sample was tested in triplicate and its standard deviation was indicated.

를 100°C에서 0, 1, 2, 3, 6 day 가열한 후 건조한 인삼 시료를 이용하여 가열시간에 따른 ginsenoside 함량변화를 관찰하였다(Fig. 3). 가열하지 않은 시료(0 day)에서는 ginsenoside Rb1, Rc, Rb2, Rd가 주성분으로 검출이 되었으며 이들은 흔히 주중사포닌이라고 하는 인삼의 2차 대사물질이었다. 시간이 경과(1-2 day)함에 따라 이들 주중사포닌의 함량은 감소하였으며 2 day에는 주중사포닌은 거의 사라지고 3 day 부터는 검출되지 않았다. 반면, 2 day 부터 전환사포닌(ginsenoside Rg3, Rk1, Rg5)의 함량이 지속적으로 증가하고 있음을 보여주고 있으며 6 day에서는 ginsenoside Rg3, Rg5, Rk1의 함량이 다소 감소하는 것으로 나타났다. 특히 가장 높은 농도를 보여주고 있는 25(OH)-ginsenoside Rg5(1)의 함량은 Rk1, Rg5과 비례하여 증가하는 것을 알 수 있으며 6 day에서 함량감소가 약하게 일어난 것으로 나타났다. 즉, 화합물 1은 주중사포닌의 변성에 의하여 쉽게 생성되지만 장시간의 가열에도 불구하고 비교적 안정하게 함량을 유지하고 있는 것으로 나타났다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 화합물 1은 주중사포닌보다 UV<sub>203nm</sub>에서의 반응도가 현저히 낮으므로 HPLC/UV<sub>203nm</sub>으로 정량시 피크의 크기가 작아 함량이 높은 사실을 간과할 수가 있다. 따라서 UV흡광도에 영향을 받지 않는 HPTLC 또는 증기화광산란검출기(ELSD)를 이용한 검량법을 개발하는 것이 요구된다. 화합물 2는 주어진 HPLC 조건에서 다른 성분과 중첩되어서 정량할 수 없었다. UV<sub>203nm</sub>에서 전혀 검출되지 않는 화합물 3

과 주어진 HPLC법에 의한 분석특이성의 문제로인해 검량할 수 없었던 화합물 2는 화합물 1과 함께 TLC로서 검량하였다(Fig. 4). 전개용매로서 chloroform—ethyl acetate—methanol—water 15:40:22:9(v/v/v/v)를 이용하여 각 시료를 전개하였을 때 화합물 1, 2 및 3은 인접한 반점에 의하여 간섭받지 않고 선택적으로 검출할 수 있었으며 표준물질로서 화합물 1, 2 및 3을 각 2000, 100, 500, 250 µg/mL의 농도로 제조하여 직선성을 조사한 결과 화합물 1, 2, 3의 검량식은 순서대로  $y=0.267x+30.19$ ,  $y=0.229x+43.22$ ,  $y=0.228x+13.79$  이며 결정계수( $r^2$ )는 각 0.9866, 0.9859, 0.9958로서 양호한 직선성은 확보되지 않았다. 주어진 조건에 의해 전개된 시료 중의 화합물 1의 검량값은 1 day( $6.41 \pm 0.64$  mg/g), 2 day( $4.65 \pm 0.60$  mg/g), 3 day( $5.15 \pm 0.62$  mg/g), 6 day( $4.70 \pm 0.43$  mg/g)으로서 HPLC 분석에 의한 검량값 1 day( $6.50$  mg/g), 2 day( $8.11$  mg/g), 3 day( $7.82$  mg/g), 6 day( $6.03$  mg/g)보다 다소 낮게 측정되었다. TLC법에 의한 정량값의 상대표준편차는 8~15%로서 HPLC법에 의한 정량값의 상대표준편차 3~8%보다 높게 나타났다. 화합물 2는 1 day( $1.15 \pm 0.16$  mg/g), 2 day( $1.33 \pm 0.20$  mg/g), 3 day( $1.67 \pm 0.15$  mg/g), 6 day( $1.940 \pm 0.15$  mg/g)로서 평균 1.52 mg/g 이었으며 상대표준 편차는 8~15%이다. 화합물 3은 1 day( $2.73 \pm 0.35$  mg/g), 2 day( $1.50 \pm 0.16$  mg/g), 3 day( $1.65 \pm 0.18$  mg/g), 6 day( $0.82 \pm 0.11$  mg/g)이며 평균함량 1.67 mg/g, 상대표준편차는 11~14%로서 화합물 2의 평균함

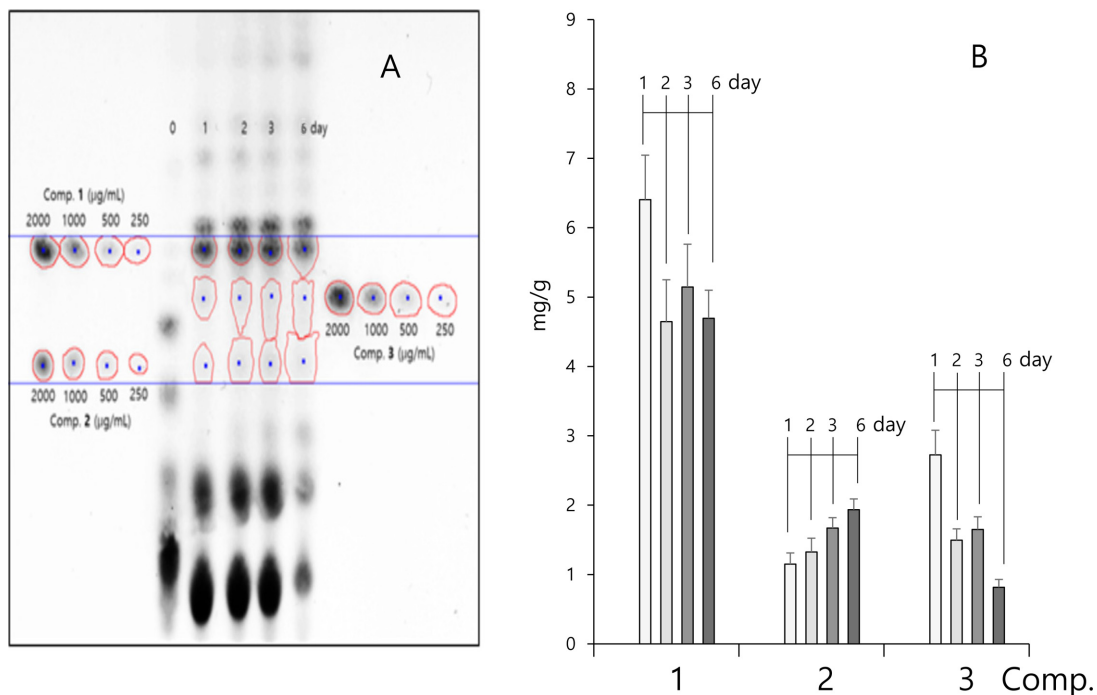


Fig. 4. Thin layer chromatography of compound 1, 2, 3 in ginseng samples (A) and the content change with the passage of heat treatment time by TLC scan (B). Each sample was tested in triplicate and its standard deviation was indicated.

량과 유사하였다. HPLC 분석법보다 TLC법의 상대표준편차가 높게 나타나는 이유는 TLC 전개시 해당 반점의 확산으로 인한 검출오차에 기인된 것으로 추정한다. 따라서 정확한 함량평가를 위해서 향후 고분리능박층크로마토그래피(HPTLC)를 사용하는 등 분리조건을 개선하여 TLC 정량법에 대한 분석법 유효성 검정이 필요할 것이다. 이상의 결과에 의하면 인삼을 가열 처리할 경우 주종사포닌 중 protopanaxadiol 계 사포닌은 대부분 ginsenoside Rg3, Rg5 및 25(OH)-ginsenoside Rg5(1)으로 변화하는 것으로 밝혀졌다. 이상과 같이 우리는 인삼의 각 제품류에 대한 합리적인 지표성분을 제시하기 위하여 ginsenoside 전환기전을 연구하던 중 수삼이 열에 노출되는 시간에 따라 HPLC/UV<sub>203nm</sub> 정량법에 의한 진세노사이드의 함량이 현저히 변화함을 관찰하였다.

산업적 측면에서 고려할 때 인삼사포닌의 열적 불안정성은 품질평가에 부정적인 영향을 미치게 된다. 수삼을 홍삼 또는 흑삼으로 가공하기 위해 지속적인 열이 가해지므로 이로 인해 인삼사포닌은 품질평가 지표성분인 ginsenoside Rg1, Rb1이 검출 또는 정량이 쉽지 않은 미지 사포닌으로 전환된다.<sup>18)</sup> 결과적으로 인삼제품에 규정된 ginsenoside 함량이 줄어들며 지표성분 함량규격(ginsenoside Rg1 1.10%이상, Rb1 0.20% 이상)<sup>19)</sup>을 맞추기 위해서 인삼원재료의 소모량이 상승하는 바람직하지 않은 결과를 초래하게 된다. 따라서 가열공정이 요구되는 인삼제품류의 경우 열에 의하여 쉽게 변성되는 주종사포닌 (ginsenoside Rg1, Rb1)을 지표성분으로 하는 것은 재고 되어야 하며 가열공정시 고농도로 생성되며 안정적으로 함량이 유지되는 25(OH)-ginsenoside rg5(1) 또는 ginsenoside Rg3를 열에 의해 가공된 인삼제품에서의 protopanaxadiol계 품질지표성분으로 선택하는 것이 타당할 것으로 판단되며 향후 25(OH)-ginsenoside rg5(1)의 대한 다양한 생리활성연구가 요구된다.

## 결 론

인삼추출물로부터 분획하여 ginsenoside Rb1, Rc, Rb2 및 Rd 등의 주종사포닌이 농후한 protopanaxadiol 혼합액을 구연산 조건에서 가열하여 그 반응액에 25(OH)-ginsenoside Rg5, 25(OH)-ginsenoside Rz1, 25(OH)-ginsenoside Rg3(S)가 존재함을 컬럼크로마토그래피와 분광학적 분석법을 이용하여 규명하였다. 또한, 가열처리한 인삼뿌리에서 주종사포닌의 함량은 극단적으로 감소하며 규명되어진 3종의 hydroxylated ginsenoside의 함량이 증가함을 확인하였다. 특히 25(OH)-ginsenoside Rg5의 농도는 ginsenoside Rg3와 함께 가열 처리된 인삼 뿌리에서 주도적인 함량을 차지함을 관찰하였다. 따라서 ginsenoside Rg5의 수화물인 25(OH)-ginsenoside Rg5는 ginsenoside Rg3와 함께 가열 처리된 인

삼제품의 지표성분으로서 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

## 사 사

본 실험에 사용된 분석기기 및 시약 그리고 귀중한 시간을 제공하여주신 KGC 인삼공사의 고 박희원 박사에게 감사의 말씀을 드립니다.

## 인용 문헌

- Christensen, L. P. (2009) Ginsenosides: chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Adv. Food Nutr. Res.* **55**: 1-73.
- Lee, S. M., Bae, B. S., Park, H. W., Ahn, N. G., Cho, B. G., Cho, Y. L. and Kwak, Y. S. (2015) Characterization of Korean Red ginseng (*Panax ginseng* Meyer): history, preparation method, and chemical composition. *J. Ginseng Res.* **39**: 384-391.
- Zhang, H., Lu, Z., Tan, G. T., Qiu, S., Farnsworth, N. R., Johan, M. and Fong, H. H. S. (2002) Polyacetyleneginsenoside-Ro, a novel triterpene saponin from *Panax ginseng*. *Tetrahedron Lett.* **43**: 973-977.
- Kitagawa, I., Taniyama, T., Hayash, T. and Yoshikawa, M. (1983) Malonyl ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, and Rd, four new malonylated dammarane-type triterpene oligoglycosides from Ginseng radix. *Chem. Pharm. Bull.* **31**: 3353-3356
- Lee, S. M., Shon, H. J., Choi, C. S., Hung, T. M., Min, B. S. and Bae, K. W. (2009) Ginsenosides from heat processed ginseng. *Chem. Pharm. Bull.* **57**: 92-94.
- Lee, S. M., Kim, S. C., Oh, J. S., Kim, J. H. and Na, M. K. (2013) 20(R)-Ginsenoside Rf: A new ginsenoside from red ginseng extract. *Phytochem. let.* **6**: 620-624.
- Kim, S. I., Park, J. H., Ryu, J. H., Park, J. D., Lee, Y. H., Park, J. H., Kim, T. H., Kim, J. M. and Baek, N. I. (1996) Ginsenoside Rg5, a genuine dammarane glycoside from Korean red ginseng. *Arch. Pharm. Res.* **19**: 551-553.
- Lee, S. M., Seo, H. K., Oh, J. S. and Na, M. K. (2013) Updating chemical profiling of red ginseng via the elucidation of two geometric isomers of ginsenosides Rg9 and Rg10. *Food Chem.* **141**: 3920-3924.
- Lee, S. M. (2015) The mass balance of protopanaxatriol ginsenosides in red ginseng process. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**: 223-228.
- Lee, S. M. (2014) The mechanism of acid-catalyzed conversion of ginsenoside Rf and two new 25-hydroxylated ginsenosides. *Phytochem. let.* **10**: 209-214.
- Zhou, Q. L., Zhu, D. N., Yang, X. W., Xu, W. and Wan, Y. P. (2018) Development and validation of UFLC-MS/MS method for simultaneous quantification of sixty-six saponins and their six aglycones: Application to comparative analysis of red ginseng and white ginseng. *J. Pharm. Biomed. Anal.*



- 159: 153-165.
12. Wang, J. R., Yau, L. F., Zang, R., Xia Y., Ma, J., Ho, H. M., Hu, P., Hu, M., Liu, L. and Jiana, Z. H. (2014) Transformation of ginsenosides from notoginseng by artificial gastric juice can increase cytotoxicity toward cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **62**: 2558-2573.
  13. Park, H. W., In, G., Kim, J. H., Cho, B. G., Han, G. H. and Chang, I. M. (2014) Metabolomic approach for discrimination of processed ginseng genus *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. *J. Ginseng Res.* **38**: 59-65.
  14. Park, H. W., In, G., Han, S. T., Lee, M. W., Kim, S.,Y., Kim, K. T. and Cho, B. G. (2013) Simultaneous determination of 30 ginsenosides in *Panax ginseng* preparations using ultra performances liquid chromatography. *J. Ginseng Res.* **37**: 457-467.
  15. In, G., Ahn, N. G., Bae, B. S., Han, S. T., Noh, K. B. and Kim, C. S. (2012) New method for simultaneous quantification of 12 ginsenosides in red ginseng powder and extract: in-house method validation. *J. Ginseng Res.* **36**: 205-210.
  16. Yu, H., Wang, Y., Liu, C., Yang, J., Xu, L., Li, G., Song, J. and Jin, F. (2018) Conversion of ginsenoside Rb1 into six types of highly bioactive ginsenoside Rg3 and its derivatives by FeCl<sub>3</sub> catalysis. *Chem. Pharm. Bull.* **66**: 901-906.
  17. Yang, H. J., Kim, J. Y., Kim, S. O., Yoo, Y. H. and Sung, S. H. (2014) Complete <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectral analysis of the pairs of 20(S) and 20(R) ginsenosides. *J. Ginseng Res.* **38**: 194-202.
  18. Lee, S. M. (2014) Thermal conversion pathways of ginsenoside in red ginseng processing. *Nat. Prod. Sci.* **20**: 119-125.
  19. 손현주, 이상명, 권예림, 박민경, 조은지, 조재혁, (2019) 국제공통기술문서(CTD)-요구수준의 인삼제품 품질평가 자료 해설과 사례, p199. 에덴문화사, 대전
- (2020. 9. 14 접수; 2020. 10. 14 심사;  
2020. 11. 5 게재확정)