

## Simultaneous Analysis Method for Polar and Non-polar Ginsenosides in Cultivated Wild Ginseng by Reversed-phase HPLC-CAD

Seon Ok, Jae Seon Kang and Kang Min Kim\*

Department of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea

Received December 14, 2015 / Revised January 23, 2016 / Accepted January 24, 2016

Cultivated wild ginseng is a widely used dietary supplement and medicinal herb. The aim of this study was to optimize the ginseng using high performance liquid chromatography (HPLC)- charged aerosol detection (CAD) for ginsenoside analysis. CAD measures the physical property of an analyte and responds to almost all non-volatile species, independent of their nature, spectral properties, or particle size. It has become widely employed in pharmaceutical analysis. The cultivated wild ginseng extracts were analyzed for compositions of ginsenosides Rb1, Rd, Rg1, Rf, Re, and Rh1. The optimal analysis condition was set up from an experiment using a gradient. Ten grams of cultivated wild ginseng were extracted with 95% EtOH 100 ml for 24 hr at 80°C. The contents of the six major ginsenosides in the cultivated wild ginseng extract were Rb1 (5.48±0.12 mg/g), Rd (5.33±0.14 mg/g), Rg1 (12.80± 0.05 mg/g), Rf (19.08±0.68 mg/g), Re (19.87±0.05 mg/g), and Rh1 (16.47±0.16 mg/g), respectively. HPLC showed that the protopanaxatriol group (Rg1, Rf, Re, Rh1) had more content than the protopanaxadiol group (Rb1, Rd) in cultivated wild ginseng extract. In summary, the ginsenosides were identified with HPLC-CAD analysis, and their presence and quantity imply the importance of quality control, as well as the pharmacological activity of the ginseng root.

**Key words** : Cultivated wild ginseng, charged aerosol detection, ginsenoside content

### 서 론

산양삼(Korean *Panax ginseng*)은 산삼의 씨앗이나 어린 뿌리를 인위적으로 산에서 재배한 것을 말한다. 또한, 뿌리의 굵기와 길이, 몸통에서의 태 존재에 따라 너두의 개수에 따라 수명이 다르다[10]. 최근에는 산양삼의 재배와 효능에 대한 연구가 많이 보고 되고 있는데, *in vitro* 연구 결과에서는 결장암 세포, 폐암세포, 혈액암세포에서 증식 및 사멸효과가 있다[1, 6, 14]. *In vivo* 연구 결과로는 흑색종 유발 생쥐의 종양억제 및 복강암 유발 생쥐의 생존을 연장시켰다[19]. 산양삼의 효능은 재배 인삼보다 효과 및 약리활성이 높다고 알려져 있으며, 사포닌인 ginsenoside의 함량이 높은 것으로 보고 되었다[18].

Ginsenoside는 dammarane 계열의 triterpenoid인 식물에만 존재하는 특유의 사포닌으로서 glucose, arabinose, xylose 및 rhamnose 등이 결합되어 있는 배당체 화합물로 이러한 당류는 C-3과 C-20 position에 결합되어 있다. Protopanaxadiol (PD) 과 protopanaxatriol (PT) 의 2가지 그룹으로 나누어 지는

데, Rx의 이름을 가진다. 여기에서 R은 root를 의미하며, x는 화합물의 chromatographic polarity를 나타낸다. PD 그룹은 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rb3 등의 화합물을 PT 그룹은 Re, Rf, Rg1, Rh1 등의 화합물을 가진다[5, 9, 20, 25, 26]. Ginsenoside는 또한 극성(Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb, Rd) 및 비극성(Rg6, F4, Rk3, Rh4, Rk1, Rg5) 부분을 가지는 화합물들로 나누어 지는데, 이러한 성질들의 화합물을 분석 및 정량화하기 위하여 gas chromatography [2], thin-layer chromatography [8], capillary electrophoresis [23]을 일반적으로 사용 되었고, 최근에는 liquid chromatography에 ultraviolet [16] 또는 evaporative light scattering detection [11, 24]을 이용하여 ginsenoside를 정량 및 분석 연구하였다. 하지만, 이 방법들은 비극성을 가지는 ginsenoside는 낮은 분석 파장으로 인해 검출 감도가 떨어져 정확한 분석이 어려웠다[13].

미량 사포닌의 검출이 어려운 점의 한계점으로 인해 정량분석을 위한 연구가 더욱 필요한 실정인데, 본 실험에서는 산양삼을 에탄올 용매로 추출하여 얻어진 추출물내의 ginsenoside 종류를 Charged Aerosol Detection (CAD)를 이용하여 ginsenoside를 분석 및 정량화 연구를 진행하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약 및 기기

Ethanol은 Merck (Germany)로부터 구입하였고, Ginsenoside 표준품 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rf, Rg1 Rg3, Rh1는 Aembo

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-663-4882, Fax : +82-51-663-4809

E-mail : kkij79@hanmail.net

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Solvent gradient program of HPLC analysis

Time	Water (%)	Acetonitrile (%)
0	20	80
30	20	80
60	45	55

Institute (Daejeon, Korea)로부터 구입하였다. 내부표준물질인 Digoxin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 분석용 acetonitrile, methanol, water은 Duksan Chemica Co. Ltd (Ansan, Korea)로부터 구입하였다.

**산양삼 ginsenoside 추출**

산양삼은 경상남도 함양군에 위치한 농장으로부터 획득하였고, 산양삼은 불순물을 제거한 후 -80°C에서 실험 전까지 보관하였다. 산양삼은 mechanical slicer를 이용하여 잘게 부순 후 80°C에서dry tray (VISION, Kyungki, Korea)를 이용하여 건조하였다. 건조된 산양삼을 다시 갈고 난 뒤 건조된 산양

삼 10 g에 95% EtOH 100ml을 넣어 80°C에서 24시간 동안 추출하였다. EtOH에 의해 추출된 추출물은 불순물을 제거하기 위하여Whatman No. 1 filter paper를 이용하여 1차 필터하고 다시 한번 불순물을 완전히 제거하기 위하여 0.2 µm Nylon membrane filter (Baden Bath, Germany)로 필터 후 용매는 Rotary vacuum evaporator (Eyela Tokyo Co.)에 의해 완전히 제거되었다.

**HPLC-CAD 분석**

분석용 HPLC로는 Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, USA), 검출기는 Corona® CAD (Thermo Scientific) detector를 이용하였고 질소는 35 psi로 도입되었다. HPLC분석은 C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 µm particle size, Phenomenex, USA) 컬럼을 사용하였고 이동상은 water과 acetonitrile를 이용하여 gradient를 이용하여 분석하였다(Table 1). 이동상의 유속, 분석시간, 검출파장은 각각 1 ml/min, 60분, 230 nm로 분석하였다. 이러한 분석 조건으로

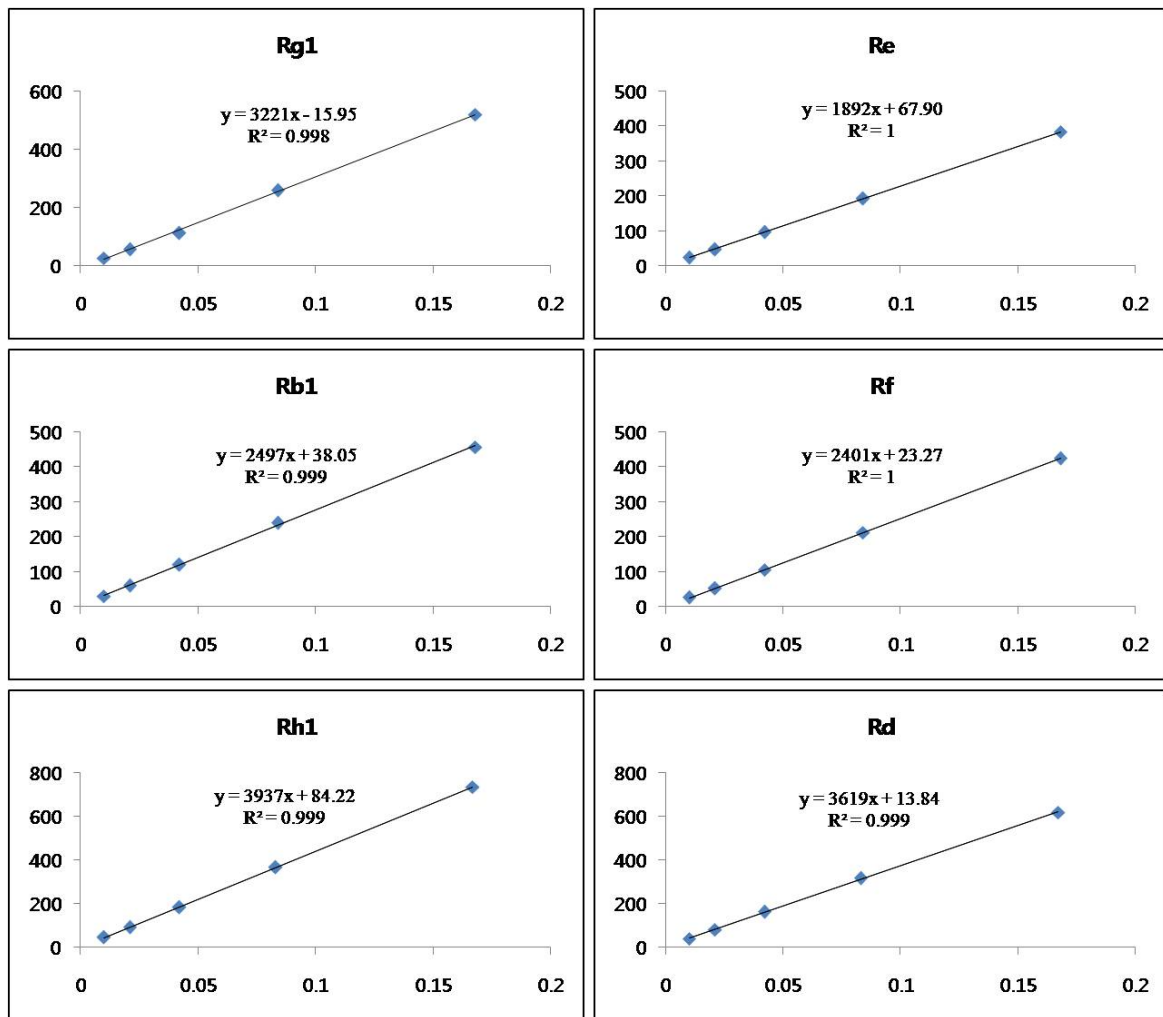


Fig. 1. Calibration curve of ginsenosides.

ginsenoside 표준품들은 MeOH를 이용하여 용해 시킨 뒤 HPLC-CAD 분석법에 의해 함량 및 산양삼 시료의 ginsenoside 함량을 정량 분석하였으며, 내부표준물질로는 digoxin을 이용하였다.

**통계처리**

모든 실험은 3회 반복으로 진행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계 프로그램은 Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, USA)를 사용하였다. 유의차 검증은 분산분석 (Analysis of variance ANOVA)을 한 후,  $P < 0.05$  수준에서 Student's *t*-test에 의해 유의성을 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**분석법 확립**

Table 1과 같은 gradient 방법으로 분석 시 모든 표준품들의 peak가 중첩되는 현상 없이 분리능이 우수한 결과를 나타내었으며, 60분 내에서 분석이 가능한 분석법을 확립할 수 있었다. 이 분석법을 토대로 표준품 ginsenoside Rg1, Re, Rb1, Rc, Rb, Rd은 10, 21, 42, 84, 168 µg/ml 농도로 희석하여 분석하고 여기에서 얻은 주성분에 대한 피크 표준품 농도(X축)와 면적비(Y축)에 대한 검량선을 각각 작성하여 함수와 상관계수 R값을 나타내었다(Fig. 1). Fig. 1과 같이 6종의 ginsenoside의 표준곡선에 대한 각각의 R<sup>2</sup> 값이 0.998-1.000 범위의 수치를 나타내었다. 따라서 이 표준곡선을 기준으로 시료의 ginsenoside 함

Table 2. Accuracy and precision of Re quantification

	Low (10 µg/ml)	Low (21 µg/ml)	Middle (42 µg/ml)	High (168 µg/ml)
Accuracy and precision				
Mean	10.09	21.52	42.56	168.55
S.D.	0.05	0.06	0.31	0.62
%CV	1.45	0.33	0.10	0.11
%Deviation	1.22	1.79	1.40	1.71
n	5	5	5	5

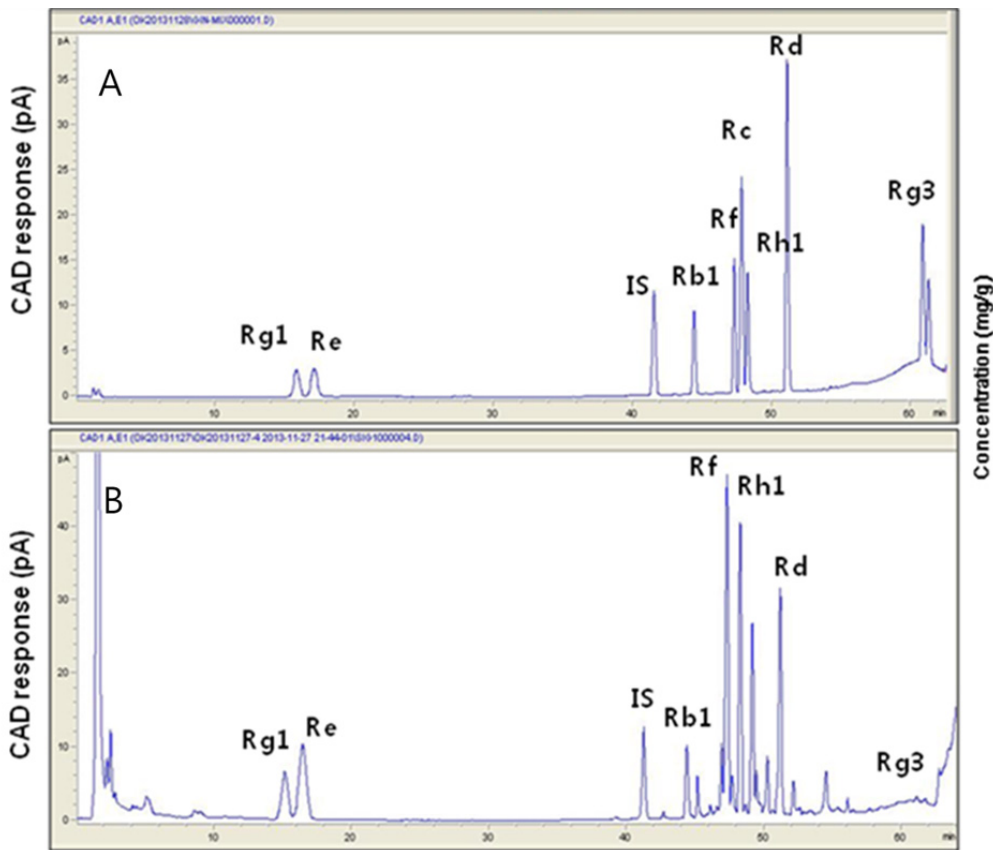


Fig. 2. HPLC profiles of ginsenosides from standard (A) and cultivated wild ginseng extracts (B). IS: Internal standard.

량을 정량 할 수 있었다. 또한, 분석의 정확성, 정밀성, 분석의 정량한계를 확인하기 위하여 표준곡선에 사용된 4가지 농도를 이용하였다. 대표적으로 ginsenoside의 Re를 이용하여 확인 하였으며, 정확성에 있어서는 사용된 이론적인 농도값을 나타내었으며, 정밀성에 있어서는 the coefficients of variation (%CV) 값이 적절한 범위 내에 있음을 확인하였다(Table 2). 최근에는 ginsenoside 관련 시료 및 가공품들에 있어서의 함량을 정량화하기 위하여 LC/MS 또는 LC/MS/MS 방법을 이용하여 함량을 정량분석화 하였다[17]. 본 저자는 새로운 CAD 검출기를 이용하여 산양삼내의 ginsenoside 함량을 검량선을 토대로 정량화 하고자 한다.

**산양삼 추출물의 ginsenoside 확인**

100% MeOH로 80°C에서 추출한 추출물을 HPLC-CAD로 acetonitrile를 Table 1과 같이 기울기 용리로 하여 분리능이 양호한 chromatogram을 구할 수 있었다(Fig. 2). Corbit [7] 등은 100% MeOH로 60°C에서 환류추출이 ginsenoside 함량이 높다는 보고가 있어 본 실험에서도 정확한 분리능을 확인하기 위하여 95% MeOH로 80°C로 추출하였다. 10 g의 건조 산양삼을 이용하여 추출하였을 때 0.996~1.005 g의 추출물이 나왔으며, 이 중 산양삼 추출물의 구성 ginsenoside 함량을 보면 Rb1 (5.48±0.12 mg/g), Rd (5.33±0.14 mg/g), Rg1 (12.80±0.05 mg/g), Rf (19.08 ±0.68 mg/g), Re (19.87±0.05 mg/g), 및 Rh1 (16.47±0.16 mg/g)으로 나타났다(Fig. 3). PT 그룹이 PD 그룹의 ginsenosides의 함량보다 높게 나타났다.

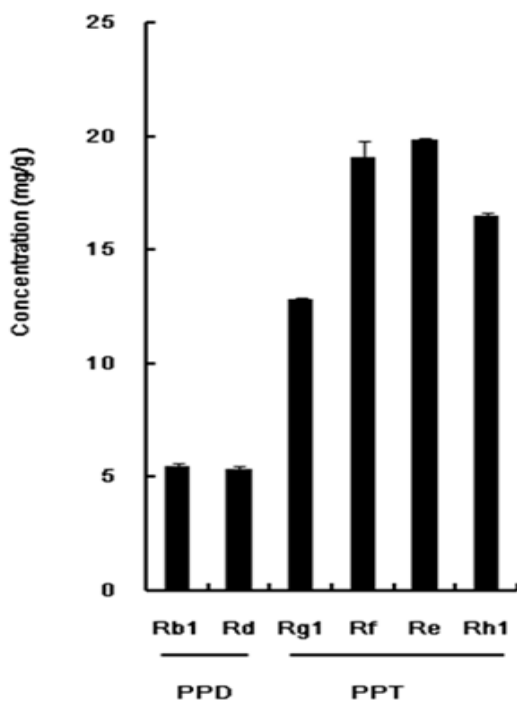


Fig. 3. Ginsenosides contents on the cultivated wild ginseng extracts.

Woo [27] 등은 추출 농도와 온도가 높음에 따라 ginsenoside 함량이 높게 나타나며, Kim [10] 등의 연구에 의하면 80% EtOH의 추출물의 경우는 Re 함량이 높게 나타났다고 보고 하였던 결과로 볼 때 유사한 경향을 나타내었다. 또한, 홍삼의 경우 Rg3를 고온에서 3시간 동안 추출하였을 때 높은 함량을 나타내는 반면, Rb1은 현저히 감소하는 우리의 결과와 유사한 경향을 나타냄을 확인하였다[15]. 또한, 중추신경계 약리작용에 있어서의 진정작용을 나타내는 protopanaxadiol group과 완만한 흥분작용을 나타내는 protopanaxatriol group의 비율 (PD/PT)에 있어서는 인삼종별로 많은 차이가 있지만, 0.158로 다소 낮은 결과를 가졌다[3]. 일반적으로 증숙/건조 과정을 거치거나 수삼이 사포닌 함량이 높다[4]. 현, 실험에서도 산양삼을 건조가 아닌 증숙/건조 과정을 거쳐 PD/PT 비율을 높일 수 있는 연구가 필요 할 것으로 사료된다. PD/PT 비율은 최근 당뇨병에 관한 치료에 있어 중요한 약리작용을 나타낸다는 보고가 되고 있어 중요한 요소로 평가 받고 있다[21]. 중추 신경계에 작용하여 진정효과를 보이는 Rb1은 0.55%, 항피로작용을 나타내는 Rg1은 1.30%로 다소 높게 나타났다. Rb1은 홍삼을 이용하여 식품공전법으로부터 추출한 결과와 유사하였다[12]. 항 당뇨병성분으로 알려져 있는 Re는 1.98%로 함량이 높게 차지함을 확인하였다. 혈관이완효과와 혈관신생억제효과가 있는 것으로 알려져 있는 Rg3는 아주 미량으로 검출되어 정량화는 하지 않았으며, 여러 추출방법을 통하여 정량화 하여야 할 것이다[4]. 중화인민공화국약전[22]에 따르면, 인삼의 기준으로 Rg1과 Re의 합은 ≥0.25%이며, Rb1기준 ginsenoside 총량 ≥0.5%이다. 현재의 결과에서는 3.26%, 3.81%로 인삼의 기준인 중국수입의약품 등록기준에도 적합함을 확인 하였다. Ginsenoside 함량은 가공삼의 종류, 추출 방법등에 의해 함량이 크게 차이가 난다. 산양삼의 추출물에 대하여 여러 약리 활성을 확인하고 제품화 하기 위하여서는 정확한 Ginsenoside 분석법을 제공하여야 할 것이다.

**감사의 글**

이 논문은 2015년도 부산시의 Busan Brain 21 사업 및 경성대의 학술연구비 지원을 받아 수행되었음.

**References**

- Ahn, Y. M., Park, H. S. and Kwon, K. R. 2007. Anti-cancer and anti-oxidant efficacies of wild ginseng of Korea and China. *J. Pharmacopuncture* **10**, 5-16.
- Bombardelli, E, B. A., Gabetta, B. and Martinelli, E. M. 1980. Gas-liquid chromatographic method for determination of ginsenosides in Panax ginseng. *J. Chromatogr. A* **196**, 121-132.
- Choi, K. T. 2008. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean ginseng. *Acta Pharmacol.* **29**, 1109-1118.

4. Choi, J. E., Nam, K. Y., Li, X., Kim, B. Y., Cho, H. S. and Hwang, K. B. 2010. Changes of chemical compositions and ginsenoside contents of different root parts of ginseng with processing method. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **18**, 118-125.
5. Christensen, L. P. 2009. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Adv. Food Nutr. Res.* **55**, 1-99.
6. Chu, C. S., Lee, S. G. and Kwon, K. R. 2004. An experimental study on apoptosis of cultivated wild ginseng distilled herbal acupuncture by controlled pH and electrolyte. *J. Kor. Acupunct. Mox. Med. Sci.* **21**, 1-17.
7. Corbit, R. M., Ferreira, J. F. S., Ebbs, S. D. and Murphy, L. L. 2005. Simplified extraction of ginsenosides from American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) for high-performance liquid chromatography-ultraviolet analysis. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 9867-9873.
8. Corthout, J., Naessens, T., Apers, S. and Vlietinck, A. J. 1999. Quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng* roots and ginseng preparations by thin layer chromatography-densitometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**, 187-192.
9. Jia, L. and Zhao, Y. 2009. Current evaluation of the millennium phytomedicine-ginseng (I): etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations. *Curr. Med. Chem.* **16**, 2475-2484.
10. Kim, J. H. and Kim, J. K. 2006. Antioxidant activity and functional component analysis of korean mountain ginseng's different sections. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 1315-1321.
11. Kim, S. N., Ha, Y. W., Shin, H., Son, S. H., Wu, S. J. and Kim, Y. S. 2007. Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* C.A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 164-170.
12. Kwon, K. S., Lee, C. R., Choi, Y. E., Im, B. O., Sung, J. H. and Yoon, K. R. 2003. Analysis of ginsenosides of white and red ginseng concentrates. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**, 536-539.
13. Kwon, H. J., Jeong, J. S., Sim, H. J., Lee, Y. M., Kim, Y. S. and Hong, S. P. 2009. Sensitive high-performance liquid chromatography method of non-polar ginsenosides by alkaline-enhanced pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **1216**, 4445-4450.
14. Labonte, P., Kadhim, S., Bowlin, T. and Mounir, S. 2000. Inhibition of tumor growth with doxorubicin in a new orthotopically implanted human hepatocellular carcinoma model. 2003. *Hepatol. Res.* **18**, 72-85.
15. Lee, S. H., Kang, J. I. and Lee, S. Y. 2008. Saponin composition and physico-chemical properties of Korean red ginseng extract as affected extracting conditions. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 256-260.
16. Li, L., Zhang, J. L., Sheng, Y. X., Guo, D. A., Wang, Q. and Guo, H. Z. 2005. Simultaneous quantification of six major active saponins of *Panax notoginseng* by high-performance liquid chromatography-UV method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, 45-51.
17. 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. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1642-1647.
18. Lui, J. H. C. and Staba, E. J. 1980. The ginsenosides of various ginseng plants and selected products. *J. Nat. Prod.* **43**, 340-346.
19. Min, B. I., Kim, H. H., Seo, I. B. and Kwon K. R. 2007. Antitumor effects and protective effects against doxorubicin-induced testicular toxicity of cultivated wild ginseng extract in the B16/F10 melanoma-bearing C57BL/6 mice. *J. Pharmacopuncture* **10**, 85-100.
20. Qu, C., Yang, L., Yu, S., Wang, S., Bai, Y. and Zhang, H. 2009. Investigation of the interactions between ginsenosides and amino acids by mass spectrometry and theoretical chemistry. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **74**, 478-483.
21. Sievenpiper, J. L., Sung, M. K., DiBuono, M., Seung-Lee, K., Nam, K. Y., Arnason, J. T., Leiter, L. A. and Vuksan, V. 2006. Korean red ginseng rootlets decrease acute postprandial glycemia: results from sequential preparation- and dose-finding studies. *J. Am. Coll. Nutr.* **25**, 100-107.
22. The grade quality standards of products of processed ginseng. 1995. Beijing, China. GB/T 15517.1-15517.6.
23. Tian, Y., Lu, Y., Xie, J., Cheng, Y., Qi, R., Wu, Y. and Zhang, S. 2009. Rapid determination of ginsenoside Rg1, Re and Rb1 in ginseng samples by capillary electrophoresis. *Anal. Methods* **1**, 203-207.
24. Wan, J. B., Yang, F. Q., Li, S. P., Wang, Y. T. and Cui, X. M. 2006. Chemical characteristics for different parts of *Panax notoginseng* using pressurized liquid extraction and HPLC-ELSD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1596-1601.
25. Wang, A., Wang, C. Z., Wu, J. A., Osinski, J. and Yuan, C. S. 2005. Determination of major ginsenosides in *Panax quinquefolius* (American ginseng) using high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **16**, 272-277.
26. Wang, C. Z. and Yuan, C. S. 2008. Potential role of ginseng in the treatment of colorectal cancer. *Am. J. Chin. Med.* **36**, 1019-1028.
27. Woo, I. H., Yang, C. B. and Sung, H. S. 1986. Effect of different extraction procedures on chemical composition of ginseng extract. *Kor. J. Ginseng Sci.* **10**, 36-44.

**초록 : HPLC-CAD에 의한 산양삼의 극성 및 비극성 ginsenoside 동시 분석**

옥 선 · 강재선 · 김강민\*  
(경성대학교 약학과)

산양삼은 식품 또는 약초로써 많이 사용되고 있다. 이번 연구의 목표는 high performance liquid chromatography (HPLC) - charged aerosol detection (CAD)에 의해 산양삼의 추출물에 사포닌들의 분석을 최적화 하는 것이다. CAD는 물리적인 특성은 물론이고 입자크기, 스펙트럼 특성과는 무관하게 비휘발성 물질도 분석할 수 있다. 산양삼 추출물 중 Gensenoside Rb1, Rd, Rg1, Rf, Re 및 Rh1을 분석하였다. HPLC-CAD분석을 위한 사포닌 추출물은 건조 산양삼 10 g에 95% 에탄올 100 ml을 넣어 80°C에서 24시간 동안 추출하여 사포닌을 얻었다. 6개의 주요한 사포닌을 정량화하였을 경우 값은 다음과 같다. 사포닌들의 함량은 Rb1 (5.48±0.12 mg/g), Rd (5.33±0.14 mg/g), Rg1 (12.80±0.05 mg/g), Rf (19.08±0.68 mg/g), Re (19.87± 0.05 mg/g), 및 Rh1 (16.47±0.16 mg/g)로 확인하였다. 대체적으로 산양삼 추출물의 사포닌은 protopanaxatriol (Rg1, Rf, Re, Rh1)의 값이 protopanaxadiol (Rb1, Rd)보다 높게 확인 되었다. 이번 연구에서는 산양삼 사포닌의 분석조건을 HPLC-CAD를 이용하여 최적화 하였고 제품화를 위해 약리활성에 관한 연구도 매우 중요할 것이다.