

Hemolysis에 의한 人蔘 Saponin 정량방법

고려대학교 농과대학 농학과

박원목 · 손응룡 · 김연하

Quantitative Analysis of Saponins in Ginseng by Hemolysis

Park, W. M., E. R. Son and Y. H. Kim

Department of Agronomy, Korea University, Seoul, Korea

ABSTRACT

The present studies were carried out to develop a simple quantitative analysis for saponins in ginseng by hemolysis. Erythrocytes from pig, rabbit, human and cattle were useful for this purpose. Erythrocytes could be stored at 4°C for 9 days without altering the sensitivity to saponins. Ginsenoside-Rb₁ did hemolysis, but Ginsenoside-Re protected erythrocytes from hemolysis. The following formula is proposed for calculation of saponins from ginseng extract :

$$X = 120 \mu\text{g} \times \frac{V_2}{V_1}$$

緒 言

人蔘의 有效成分이 Saponin이라는 事實이 밝혀진 이래, 이의 分析方法도 여러 가지로 發展되었다. Shibata(5)에 의한 Butanol 추출법이 주로 쓰여지고 있으나 이 方法으로는 Saponin 이외의 各種의 特質이 함께 抽出되므로 순수한 Saponin량을 檢출하는데는 어려움이 있다. 기타 thin layer chromatography, gas chromatography 및 high pressure liquid chromatography 등의 方法이 있으나 이러한 方法은 조작이 복잡하며 고도의 기술을 要할 뿐 아니라 고가의 시약

과 설비가 必要하고 또한 分析期間이 길어서 많은 시료를 短時日내에 처리 할 수 없다. Schloesser⁴는 Saponin의 적혈구 파괴 特性을 利用하여 植物體內的 Saponin함량을 산출하였다. 本研究에서는 Schloesser의 方法을 改良하여 人蔘뿌리내의 Saponin 함량의 간단하며, 신속하고 저렴한 측정 方法을 개발코저 실시하였다.

材料 및 方法

1. 赤血球 分離

신선한 혈액을 닭, 소, 돼지, 사람 및 토끼에서 採取하였다. 採血時 혈액에 抗凝固劑로서 3.8%의 Tri - Sodium - Citrate - 2 - hydrate 용액을 혈액량의 10%를 첨가하여 잘 흔들어 고루 섞이도록 하였다. 위의 혈액을 5,000 rpm에서 15分間 遠心分離 시킨 후(Beckman Model J - 21C, rotor JA 20)상등액을 조심스럽게 除去한 후 남은 血餅에 1 : 1(v/v)의 비율로 생리 식염수 0.9% NaCl 용액을 넣고 잘 섞은 후 다시 15分間 遠心分離시켰다. 이와 같은 과정을 4~5회 反復하여 상등액에 붉은 빛이 없을 때 까지 씻어 적혈구를 분리했다. Saponin에 대한 동물혈액별 민감도 測定 및 血液貯藏試驗은 上記 5種類의 血液을 使用했고 其他의 試驗에서는 토끼피를 使用하였다.

2. 標準 Saponin 및 人蔘 Saponin抽出

人蔘 5g에 생리 식염수 0.9% NaCl 용액 15cc

를 넣고 이를 fissul homogenizer(7,000rpm, 2分間)로 마쇄한 다음 가제로 걸러냈다. 이 여과액을 원심분리기로 5,000 rpm에서 5分間 회전시켜 섬유소 등 불용성 物質을 분리제거하여 맑은 상등액을 구하여 使用하였다.

표준 Saponin으로는 Digitonin purpurea (Digitalis purpurea에서 추출) 0.01 g을 생리 식염수 100 ml에 녹인 용액을 使用하였다. 따라서, 이 용액 10 $\mu\ell$ 는 Digitonin 1 μg 에 해당한다. 순수 인삼 Saponin은 ginsenoside-Rb₁ 과 -Re 를 使用하였다. 이들 人蔘 Saponins 은 서울 대학교 생약 연구소 한 병훈 教授께서 제공하여 주었다.

3. Hemolysis test

분리한 적혈구를 0.9% NaCl 용액으로 1/1000로 희석한 후 희석용액을 test tube에 1 ml씩 넣었다. 이 시험관에 표준 Saponin-용액을 10, 20, 30, ... 100 $\mu\ell$ 씩 넣고 잘 흔들어 섞은 후 30分間 방치하여 두었다. 적혈구 파괴 作用이 일어나 용액이 말갭게 투명해 보이는 것과 本作用이 일어나지 않아 용액이 불투명하게 보이는 것을 육안으로 관찰 구별하였다. 적혈구 파괴를 일으키는 표준 Saponin의 최저양을 구하여 이를 (a)로 표시했다. Saponin 함량을 알고 저하는 인삼뿌리 추출액을 표준 Saponin-용액을 섞은 것과 同一한 方法으로 섞어서 적혈구 희석액 1 ml를 파괴하여 투명하게 하는데 必要한 최저량(V₂)를 구하여 全體 인삼추출액(V₁)에 대한 비례식으로 인삼뿌리에서 추출한 인삼액에 들어있는 Saponins 量(X)를 아래와 같은 수식으로 구하였다.

$$X = a \times \frac{V_1}{V_2}$$

結 果

1. Saponin에 대한 동물혈액별 민감도 측정

상기 5種 동물의 혈액이 Saponin에 대한 민감도를 測定하였다. digitonin에 대해서는 닭혈액이 가장

Table 1. Sensitivity of Erythrocytes to Saponin

Sources	Digitonin	Ginseng Saponins
Chicken	2.1 μg	120 μg
Pig	3.5	72
Human	2.5	96
Cattle	2.8	120
Rabbit	2.3	96

민감한 反應을 보였으며(2.1 μg), 돼지 혈액이 둔감한 反應을 보인 반면(3.5 μg), 인삼 Saponin 용액에 대해서는 돼지혈액이 가장 민감한 반응을 보였고(72 μg), 닭혈액은 둔감했다(120 μg). 사람, 토끼혈액을 digitonin(2.5 μg)과 인삼 Saponin-용액(96 μg)에서 각각 적혈구파괴를 나타내었다(표 1). 여기에 使用한 人蔘은 5年根의 主根을 使用하였다.

2. 혈액의 저장기간이 적혈구파괴作用에 미치는 영향

닭, 돼지, 사람, 소, 토끼에서 혈액을 채취한 후 9日間 4°C에서 저장하여 적혈구 파괴作用에 必要한 digitonin의 최저량을 측정하므로써 각 動物 적혈구가 저장기간이 길어짐에 따라서 Saponin에 대하여 어떠한 反應을 일으키는가를 조사하였다. 닭혈액에서만 저장기간이 길어짐에 따라서 變化가 일어났다. 즉, 採血 당일에는 digitonin 2.1 μg 에서 닭 적혈구가 파괴되었으나 9日 저장후에는 1.0 μg 의 적은 量에서도 파괴되었음을 볼 수 있었다. 반면에 돼지, 사람, 소, 토끼 혈액은 저장 期間이 길어짐에 따라서 아무런 變化도 보여주지 않았다. 즉, 이들 動物 赤血球 破壞에 必要한 digitonin의 양은 採血 당일이나 貯藏後에도 같았다(表 2).

Table 2. Effect of storage period of erythrocytes on sensitivity to saponin, digitonin.

Source	0 day	9 days
Chicken	2.1 μg	1.0 μg
Pig	3.5	3.5
Human	2.5	2.0
Cattle	2.8	3.0
Rabbit	2.3	2.5

3. 인삼 Saponin protopanaxadiol(-Rb₁)과 protopanaxatriol(-Re)의 적혈구 파괴作用 비교

protopanaxadiol은 30 μg 으로 1 ml의 적혈구 희석액을 파괴시키거나 protopanaxatriol은 같은 量에서 전혀 적혈구 파괴作用을 일으키지 않을 뿐 아니라 (表 3) PD:PT를 1:1로 혼합한 용액에서는 PD의 적혈구 파괴作用을 抑制하는 傾向을 보여 줌으로써 PD와 PT가 각각 60 μg (합계 120 μg)씩 섞여졌을 때, 破壞作用이 일어남을 알 수 있었다(表 4). 따라서 인삼 Saponin량을 구할 시는 a=120 μg 을 대입하여 아래와 같은 수식을 成立시

Table 3. Hemolytic activities of ginseng saponins(PD and PT)

Saponin	10	20	30	40	90	100 (μg)
-Rb ₁ (PD)	no *	no	ha **	ha	ha	ha
-Re (PT)	no	no	no	no	no	no

* no : no hemolysis ** ha : hemolysis

Table 4. Hemolytic activity of mixture of PD and PT(1 : 1 by weight)

Saponin	20	40	60	80	100	120	140	160 (μg)
PD+PT	no	no	no	no	no	ha	ha	ha

켰다.

$$X = 120 \mu g \times \frac{V_1}{V_2}$$

4. Cholesterol 이 Saponin의 赤血球 破壞作用을 抑制하는 性質이 있으므로 본 實驗에서 行한 赤血球破壞作用이 과연 Saponin만에 의한 것인지를 규명하기 위하여 Cholesterol 을 添加하여 보았다.

Cholesterol 0.1g 을 dimethy formamide 10cc 에 녹인 후, 이 용액 0.01 ml를 적혈구 회석액 1 ml에 섞고 표준 Saponin용액과 인삼즙액을 넣어 적혈구 파괴작용의 有無를 調査하였다.

Cholesterol 을 添加하지 않았을 때는 digitonin 용액, Saponin용액, 인삼즙액이 각각 30, 30, 20 μl 에서 赤血球破壞作用을 나타냈으나 cholesterol 첨가구에서는 그 以上の 量에서도 전혀 赤血球破壞作用이 일어나지 않았다(表 5).

Table 5. Effect of cholesterol on haemolysis of saponins.

Saponins	Chol.*	10	20	30	40 (μl)
Digitonin (1 mg / 10 ml)	(-)	no	no	ha	ha
	(+)	no	no	no	no
Saponin (10 mg / 10 ml)	(-)	no	no	ha	ha
	(+)	no	no	no	no
Gin. Ext. (1 g / 3 ml)	(-)	no	ha	ha	ha
	(+)	no	no	no	no

* Cholesterol

考 察

5 種類(닭, 돼지, 사람, 소, 토끼)의 動物血液을

蒐集하여 人蔘 Saponin에 가장 敏感한 血液을 選擇하고자 實驗한 바, 그 結果 돼지피에 있어서는 그 회석액 1 ml에 인삼 Saponin 72 μg 을 섞었을 때 赤血球가 破壞되었으며, 其他 動物의 赤血球는 各各 96 μg 混合되었을 때, 破壞되었다(表 1). 따라서 極히 낮은 狀態에 있는 Saponin 농도를 측정하고자 할 때는 돼지피를 使用하는 것이 적합하며 그 다음에는 토끼, 사람, 소 등의 피도 좋은 材料가 된다고 생각되었다.

신선한 血液을 恒시 구하기 어려우므로 血液貯藏 試驗을 하여 貯藏期間에 대한 赤血球의 Saponin에 대한 變化의 敏感度를 觀察하였다. 表 2에서 보는 바와 같이 공시 血液 모두 9日間の 貯藏血液에 대하여는 何等의 變化가 없었으나 닭피의 적혈구만은 약하여졌다(約 2倍의 敏感度를 보임). 따라서 닭피를 除外한 4種類의 血液은 9日間 貯藏하여도 使用이 可能함을 보여 주었다.

Shibata⁴⁾, Namba³⁾, Kaku²⁾는 人蔘 Saponin의 一種인 PD와 PT의 赤血球 破壞作用에 差異가 있다고 했으며 더우기 Namba³⁾는 PT인 ginsenosides -Re, -Rh는 赤血球破壞作用을 하나 PD인 -Rc와 -Rb는 이를 抑制한다고 보고 하였다. 本實驗에서는 -Rb₁은 30 μg 에서 赤血球破壞反應을 보였으나 -Re는 100 μg 以上으로도 그 作用이 일어나지 않았다. 뿐만 아니라, PT는 PD의 赤血球破壞作用을 抑制하였다. PD/PT의 비율을 1.0以下가 되게 PT의 量을 增加시키면 赤血球 破壞作用이 일어나지 않았으나 그 비율이 1.0에서부터 赤血球 破壞作用이 始作되었다. 인삼의 汁액에서 恒시 赤血球破壞作用이 있는 것으로 보아 PD/PT의 비율은 1.0以上인 것으로 생각되었다. PT:PD를 1:1로 혼

합한 용액에서는 PD의 量을 60 μg 以上 增加시켜야 赤血球 破壞作用이 있었다. 즉, 이것을 土臺로 人蔘의 Saponin 量을 구하는 수식을 아래와 같이 세울 수 있었다.

$$X = 120 \mu g \times \frac{V_2}{V_1}$$

Saponins PT와 PD의 合計가 120 μg 부터 赤血球 破壞가 일어났다. 또한 韓¹⁾은 PD/PT가 主根에서는 1.0에 가까우며 細根에서는 1.5에 가깝다고 報告하여 本 試驗結果와 일치하였다. cholesterol을 赤血球 희석액에 넣은 後 赤血球 破壞作用이 일어나기에 충분한 Digitonin 또는 人蔘추출액을 넣었어도 赤血球 破壞作用이 일어나지 않았으므로 本研究에서 일어난 赤血球 破壞作用은 Saponin 단일효과임을 알 수 있었다 (表 5).

Namba³⁾와 Kaku²⁾가 지적한 바와 같이 人蔘成分에는 赤血球 破壞作用을 抑制시키는 成分인 propa-naxadiol 계 Saponin이 들어 있다고 報告되었으므로 diol 계와 triol 계의 成分비가 栽培環境 및 年齡 등의 條件에 따라 變化한다면 本 分析法은 普偏의 方法으로 利用될 수 있는 方法으로는 생각하기 힘든 短點이 있으나 植物體內的 Saponin 量의 測定치를 구하는 方法으로서의 使用이 可能하리라고 思料된다.

摘 要

本研究는 Saponin의 赤血球 破壞作用을 利用하여 人蔘內的 Saponin 量의 간단한 分析法을 개발코져 실시하였다.

1. 혈액으로서서는 돼지, 토끼, 사람, 소피가 적합하다.
2. 닭피를 除外한 其他 血液은 9日間 4°C에 저장하였어도 Saponin 精量검사에 使用 可能하다.
3. ginsenoside Rb₁은 赤血球 破壞作用을 나타내나 ginsenoside -Re는 赤血球 破壞作用을 나타내지 않을 뿐만 아니라 ginsenoside -Rb₁의 作用을 抑制한다.
4. 本試驗 結果 토끼피를 使用하였을 때의 人蔘 Saponin 量 測定 수식을

$$X = 120 \mu g \times \frac{V_2}{V_1}$$

로 策定할 수 있었다.

(X : Sample內的 總Saponin 量

V₁ : 全體人蔘 抽出額量

V₂ : Hemolysis를 일으키는 최저량)

引 用 文 獻

1. Han, B. H. 1975. Chemical and biochemical aspects of dammarane triterpene glycosides of Korean Ginseng. Jour. Pharm. Soc. Korean 19 : 144-158.
2. Kaku, K., T. Miyata, R. Uruno, I. Saka, and A. Kinoshita. 1977. Chemicopharmacological studies of saponins of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Korean Ginseng Studies. II Hwa Co. Ltd. Seoul, Korea. 606-630.
3. Namba, T., M. Yoshizaki, T. Tomimori, K. Kobashi, K. Mitshi, and J. Hase. 1973. Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs (I). Hemolytic and its protective activity of Ginseng saponins. Chem. Pharm. Bull. 21(2) : 459-461.
4. Schloesser, E. 1975. Role of saponins in antifungal resistance. III. Tomatin dependent development of fruit rot organisms on tomato fruits. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz. : 82 : 476-484.
5. Shibata, S., O. Tanaka, T. Ando, M. Sado, S. Tsuchima, and T. Ohsawa. 1966. Chemical studies on oriental plant drugs (XIV). Chem. Pharm. Bull. 14(6) : 595.

SUMMARY

1. The present studies were carried out to develop a simple quantitative analysis for saponins in ginseng root by hemolysis.
 2. The fresh erythrocytes from chicken, pig, rabbit, human and cattle were useful for this purpose.
 3. Erythrocytes from pig, rabbit, human and cattle could be stored at 4°C for 9 days without altering the sensitivity to saponins.
 4. A ginseng saponin, ginsenoside-Rb₁ did hemolysis, but other ginseng saponin, ginsenoside-Re protected erythrocytes from hemolysis.
 5. The following formula is proposed for calculation of total saponins from ginseng root;
- $$X = 120 \mu g \times \frac{V_2}{V_1} \quad (X : \text{Total amount of saponins})$$

V_1 : Total volume of extract,
 V_2 : Minimum volume of extract for hemolysis
of 1 ml of rabbit erythrocytes suspension.)