

홍삼의 가열추출 과정중 유기산 중화에 의한 사포닌의 가수분해 억제

김천석* · 최강주 · 김석창 · 고성룡 · 성현순 · 이용구¹

한국인삼연구센터, ¹한국화학연구소

(1998년 7월 6일 접수)

Controls of the Hydrolysis of Ginseng Saponins by Neutralization of Organic Acids in Red Ginseng Extract Preparations

Cheon Suk Kim*, Kang Ju Choi, Seok Chang Kim, Sung Young Ko,
Hyun Soon Sung and Yong Gu Lee¹

*Korea Ginseng & Tobacco Research Institute Taejeon 305-345, Korea

¹Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-600, Korea

(Received July 6, 1998)

Abstract : Glucosidic bonds at the C₂₆ position of the saponin were hydrolyzed easily in the lower pH, higher temperatures and longer times to give prosapogenins and sugars. The glucosidic bond of saponin at the C₃ of ginsenoside-Rb₁, which is secondary carbon, was relatively stable due to the low electron density of -0.2. But the bond of saponin at the C₂₆ position, which is tertiary carbon with the relatively high electron density of -0.3, was liable to be hydrolyzed even in weakly acidic solution by the increase of heating time. On the other hand, red ginseng contained 13.34 mg/g of citric acid, 8.78 mg/g of malonic acid, 3.70 mg/g of oxalic acid, 2.13 mg/g of malic acid and 0.44 mg/g of succinic acid. Ginseng saponins were very stable in ginseng extract neutralized with sodium carbonate or sodium bicarbonate corresponding to the equivalent amount of the total organic acid in the red ginseng.

Key words : Organic acids, saponin, hydrolysis property, electron density, extraction, pH, red ginseng.

서 론

오갈피나무과(Araliaceae)에 속하는 인삼은 上品藥으로 부작용 및 독성이 없고 大補元氣, 補益肺, 生津止渴, 安神益智 등의 효능이 인정되어 왔지만 화학성분에 대해서는 1957년 러시아의 Brekhman¹⁾에 의하여 사포닌 배당체가 사포닌 약효의 주성분임을 강조함으로써 사포닌 연구가 집중적으로 시작되었다. 현재 31종의 진세노사이드의 화학 구조가 해석되었고 새로운 미량 진세노사이드의 연구가 계속되고 있다.²⁾

인삼엑스의 제조 방법은 물을 추출 용매로 하고 가

온추출하는 전래적인 한방적 물추출 방법이 인삼이나 인삼과 생약제가 혼합된 한방 제제의 제조 방법으로 가장 널리 애용되고 있다. 그러나 근래에는 인삼 엑스제제의 구매력 증대와 더불어, 인삼 엑기스의 제조 과정이 공업화되었으며 전래 한방의 열탕 물추출에서 전분 추출을 줄이고 사포닌 분해를 억제하기 위하여 에탄올 수용액을 이용하여 가온추출하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 이러한 알코올 추출 방법은 추출물의 향미가 좋지 않은 단점이 있다. 또한 알코올을 용매로 추출하는 경우에 불추출에 비하여 추출물의 수율이 낮고 흙냄새 등 이취미가 강하며 구수

한 향미가 약화된다. 인삼의 물 추출은 장시간 수용매에서 고온 처리되므로 제조과정중에서 인삼 자체에 함유되어 있는 유기산들의 영향으로 인삼의 유효 성분인 사포닌의 분해가 심하게 일어나는 단점이 있다. 추출 과정에서 인삼중의 saponin성분을 분해시키는 물리적 요인으로는 추출 온도와 추출 시간이 있고 화학적 요인으로는 추출중 추출액의 pH 및 용매효과 등이 있다. 이중 하나의 요인만 변화되어도 saponin의 분해사포닌 분해율은 크게 변화된다.

본 연구는 홍삼 엑스를 제조할 때 열수추출, 농축 및 숙성과정 등의 열처리과정중 홍삼이 함유한 유기산류에 의하여 인삼의 주된 유효성분으로 밝혀진 사포닌이 가수분해되어 감소하는 것을 방지하기 위하여, 홍삼에 함유된 총 유기산량을 각각 정량하고 그에 해당하는 당량의 중화제로써 인체에 무해한 약염기인 중탄산나트륨 또는 탄산나트륨 등을 추출용매인 물에 가하여 중화시키고자 하였다. 이러한 방법으로 추출하므로써 추제인 물중에 존재하는 유기산을 나트륨 염의 형태로 중화시키고³⁾ 첨가된 탄산나트륨 및 중탄산나트륨의 탄산기는 홍삼중의 유기산과 반응 후 인체에 해롭지 않은 탄산가스로 전환되어 휘발되므로 탄산기의 잔존을 없애며 인삼자체가 함유하고 있는 유기산으로 인한 saponin의 가수분해를 방지하여 약리효능이 높은 인삼엑스를 생산하는 방법을 개발코자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험 재료

(1) 홍삼 시료

본 실험에 재료로 쓰인 수삼은 1994년산 증평시험장에서 재배된 시료이며 10월에 채굴된 6년근을 사용하였고, 홍삼 시료는 담배인삼공사 고려인삼장에서 蒸蓆한 후 가온건조시켜 42~80 mesh로 분쇄한 후 시료로 사용하였다.

(2) 시약류

사포닌 분석용 표준품은 한국인삼연초연구원에서 분리 제조한 ginsenoside 표준품을 사용하였으며, 유기산 표준품은 Sigma회사 제품을, TLC plate는 silica gel 60(layer thickness 0.20 mm, E. Merck제)를 사용하였다. 기타 탄산염, 황산 및 추출용매 등은 대정화급사 일급시약을 사용하였다.

2. 시험방법

(1) 유기산 분석

홍삼시료의 유기산 분석은 시료를 분쇄한 후 60°C에서 건조시킨 다음 약 5 g를 정확하게 취하여 Court와 Hendel의 방법⁴⁾에 준하여 12%의 황산/메탄올(V/V)로 실온에서 20시간 추출하여 메칠에스터화 시켜 기체크로마토그래피(GC) 방법으로 유기산을 정량분석하였다. 유기산이 정량된 각각의 분쇄시료는 추출농축물 제조를 위하여 대조군은 500 ml 플라스크에 분말 인삼시료 20 g에 200 ml의 증류수를 가하여 콘덴서를 장치한 수조에서 85±2°C로 온도를 유지시키면서 30시간 추출하였고, 시험군은 500 ml 플라스크에 시료 중량 20 g과 각 인삼중에 함유된 총 유기산의 당량으로 탄산나트륨 또는 중탄산나트륨을 가하고 증류수 200 ml를 가하여 콘덴서를 장치한 수조에서 85±2°C로 온도를 유지시키면서 30시간 추출한 다음 각각의 추출액을 9,200×g(10,000 rpm)으로 원심분리하고 여액을 동일량(200 ml)으로 정용하여 분석하였다.

(2) 사포닌 분석

Ando⁵⁾ 등의 방법에 준하여 사포닌 성분을 *n*-butanol 추출법으로 추출한 다음 조사포닌은 감압농축법으로 측정하였고, 각 ginsenoside 함량은 HPLC로 정량 하였으며 펌프는 Waters사 Model 510을, 검출기는 Differential Refractometer RI 410를, 칼럼은 Lichrosorb NH₂(E. Merck, 250×4.6 mm I.D., 10 μm)를 사용하였고 이동상은 acetonitrile/water/1-butanol(80/20/10, v/v)로 하였다.

(3) 인삼 saponin의 당 에테르 결합부위 산소의 Electron density 계산

Electron density 계산은 Hyperchem[®] Release 3 for Windows를 사용하였고, 주종 사포닌인 Ginsenoside-Rb₁을 선택하여 인삼 saponin의 당 에테르 결합부위중 C₃와 C₂₀에 결합된 산소의 Electron density를 계산하였다.

4. 기타 분석

추출물의 수율은 중량법으로 하였고, 추출 후 pH를 측정하고, 9단계 기호 척도법을 이용하여 맛, 향기 등을 분석하였다.

결과 및 고찰

홍삼의 추출방법중 추출율이나 엑스의 향미가 가

Table 1. Contents of organic acids in red ginseng

Organic acid	Contents (mg/g) [*]	Mole ^{**} concentration (mole/g)	Normal ^{**} concentration (normal/g)
Oxalic Acid	3.70	4.11×10^{-5}	8.22×10^{-5}
Malic Acid	2.13	2.05×10^{-5}	4.10×10^{-5}
Succinic Acid	0.44	3.73×10^{-6}	7.46×10^{-6}
Malonic Acid	8.78	6.55×10^{-5}	1.31×10^{-4}
Citric Acid	13.34	6.94×10^{-5}	2.08×10^{-4}
Total	28.39	2.00×10^{-4}	4.70×10^{-4}

^{*} Organic acid contents were determined by GC with Supelcowax 10 fused silica capillary column (60 m, 0.32 mm I.D.) and flame ionization detector.

^{**} Mole and normal concentrations were calculated with organic acid contents per 1 g of red ginseng.

장 좋으며 기타 물리성 등이 양호한 방법인 물 추출 방법으로 추출하면서 인삼중 주된 유효성분으로 밝혀진 사포닌 분해에 관여하는 요인을 살펴보면 물리화학적 요인인 추출 온도, 추출 시간, 추출액의 pH 등이 있다. 이들 요인 중에서 홍삼중 유기산에 의한 산도 증가에 의한 가수분해를 알아보기 위하여 인삼중 유기산의 함량을 측정한 결과(Table 1)에서 유기산은 oxalic acid, malonic acid, succinic acid, malic

acid, citric acid등이 있었으며, 그중 citric acid 와 malonic acid가 주된 유기산이었다. 홍삼중 이들 유기산의 당량 함량은 4.70×10^{-4} N이었으며 pH는 약 4.6이었다. 이들 유기산의 Normal 농도(N)에 해당하는 염기로서 이들을 중화시키는 방법 등이 있겠으나 강염기의 경우 시료별 유기산의 농도 차이 등에 따른 염기도의 급격한 증가를 야기시켜 오히려 강염기에 의한 가수분해를 일으킬 수 있다. 이러한 문제를 해결하고 인체에도 무해하고 맛에도 변화가 적으며^{3,15)} 각 시료의 유기산 함량의 차이에 의하여 당량비가 일치하지 않아도 산도가 과도하게 감소하지 않는 약염기로서 중탄산나트륨과 탄산나트륨을 중화제로 사용하여 인삼중 유기산을 나트륨 염의 형태로 전환시켰다.³⁾ 또한 반응후 탄산기는 열수추출온도에 의하여 용해하여 탄산으로 전환되지 못하고 쉽게 휘발하게 된다.

홍삼 고유의 맛과 향을 9단계 기호척도법^{13,14)}으로 비교한 결과(Table 2), 탄산염의 첨가 후 물 추출물과 일반 물 추출물간에는 차이점이 나타나지 않았다. 특히 홍삼 물 추출물에 대하여 중화시킨 추출물의 갈색도를 비교하면 중탄산나트륨 첨가시험구가 1.66배,

Table 2. The comparison of extract yield, taste, flavor, brown color, intensity and pH in ginseng extract preparations

Extraction method	Extract	Taste ²⁾	Flavor ²⁾	Absorbance ³⁾	pH ⁴⁾
Water extract	48.2	8.5	8.2	0.89	4.58
Water extract added with sodium carbonate ¹⁾	53.4	8.4	8.4	1.48	6.14
Water extract added with sodium bicarbonate ¹⁾	50.7	8.5	8.3	1.54	6.19

¹⁾ Sodium carbonate or sodium bicarbonate was added by the equivalent amount corresponding to the total amount of organic acids in red ginseng, and then extracted with water at $85 \pm 2^\circ\text{C}$ for 40 hrs.

²⁾ Taste and flavor were evaluated by quantitative descriptive analysis.

³⁾ The absorbance (browning color intensity) of red ginseng was measured at 470 nm.

Table 3. The comparison of saponin contents in red ginseng extract preparations

Extraction method	Major ginsenosides (mg/g) ^{**}							Total
	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rf	Rg ₁	
Saponin contents in water extract (red ginseng 20 g)	0.43	0.16	0.18	0.05	0.17	1.17	1.03	3.14
Saponin contents in water extract neutralized with sodium carbonate 0.49 g/(red ginseng 20 g) [*]	6.64	3.01	2.62	0.97	2.17	1.28	3.53	20.22
Saponin contents in water extract neutralized with sodium bicarbonate 0.78 g/(red ginseng 20 g)	6.93	3.16	2.79	1.05	2.37	1.30	3.58	21.18

^{*} Sodium carbonate or sodium bicarbonate was added by the equivalent amount corresponding to the total amount of organic acids in red ginseng, and then extracted with water by the same method at $85 \pm 2^\circ\text{C}$ for 40 hrs.

^{**} Major ginsenoside contents were determined by HPLC with Lichrosorb NH₂ column and solvent system of acetonitrile/water/n-butanol (80/20/10, v/v).

탄산타트륨 첨가시험구는 1.73배로 현저한 증가를 보였다. 종래의 물추출방법에 의하면 추출물의 pH가 4.58인데 비하여, 탄산타트륨 및 중탄산타트륨 첨가구의 pH는 6.14와 6.19로 중성에 가까웠다.

홍삼 추출물 중 주종 사포닌 함량^{6,7,8,9)} 분석 결과 (Table 3)에서 보는 바와 같이, 7종 사포닌 함의 비율이 종래의 물추출방법에 비하여 탄산타트륨 첨가구에서는 5.9배, 중탄산타트륨 첨가구에서는 6.2배로써 함량이 높아 탄산타트륨 와 중탄산타트륨 첨가로 사포닌 성분의 분해가 현저하게 억제됨을 알 수 있었다.^{3,10,11,12)}

홍삼엑스 추출 및 제조과정중 사포닌 성분의 주된

분해 위치는 C₂₀ 위치이며, glucoside 결합이 가수분해되면서 prosapogenin으로 변화되는 것이 주된 사포닌 분해 요인이다. 인삼중의 유기산은 추출액의 산도를 증가시켜, 결과적으로 인삼 사포닌은 약산성용액(pH=4.5)중에서 가열되며 사포닌의 구조중 C₂₀-O-결합의 가수분해가 일어나며 C₃-O-결합과 C₆-O-결합의 경우에는 결합이 끊어지는 현상은 발견되지 않는다고 보고되었다.

인삼 사포닌의 효소에 의한 가수분해 특성을 살펴보면 사포닌의 C₃-(C₁)glc, C₆-(C₁)glc, C₂₀-(C₁)glc 결합과 glc(C₆)-(C₁)glc, glc(C₂)-(C₁)glc, glc(C₆)-(C₁)ara(p), glc(C₆)-(C₁)ara(f) 및 glc(C₆)-(C₁)rha 결합

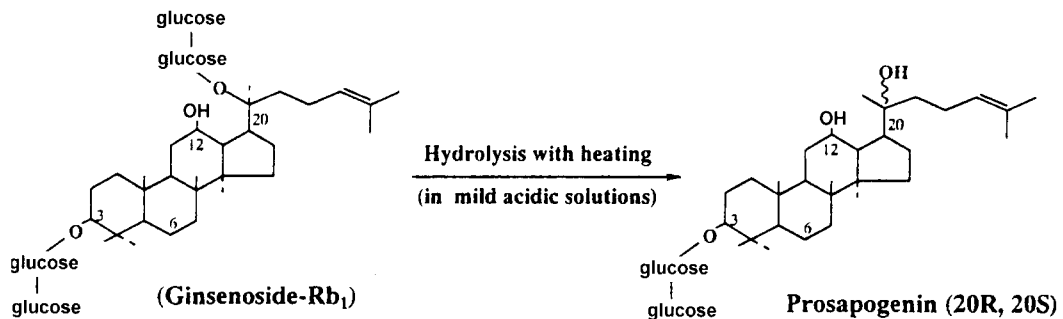


Fig. 1. The hydrolysis properties of glucoside bond of saponin

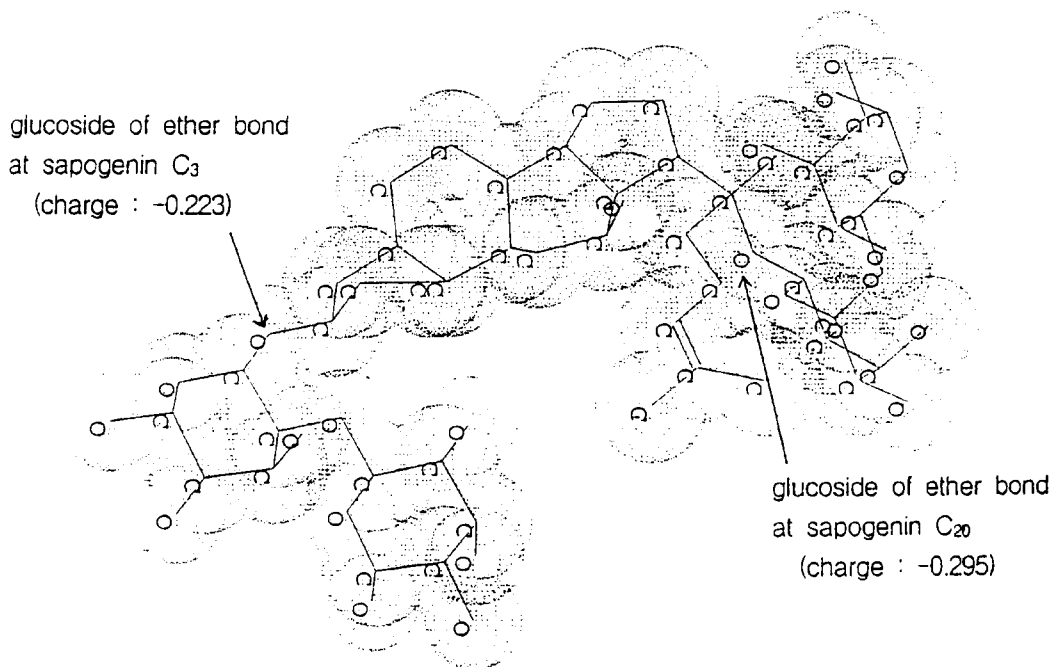


Fig. 2. Three dimensional structure and electron density of saponin.

에 대한 가수분해 효소류의 의한 분해 결과 C₂₀-(C₁) glc은 가수분해가 없었다. 이러한 결과는 C₂₀ 위치는 3차원 구조에서 입체 장애가 클것이 예상되므로 효소의 접근이 어려운 것이 원인으로 생각된다.^{1,16)}

이러한 가수분해 반응의 선택성은 C₂₀에 결합되어 있는 산소 원자(전하; -0.3)가 C₄에 결합되어 있는 산소 원자(전하; -0.2)보다 전하 밀도가 크기 때문에 약산성 조건에서는 C₂₀에 산소 원자에 더 빨리 양성자화가 일어날 뿐 아니라, 속도 결정 단계에서 양성자화된 산소 원자가 C₂₀으로부터 이탈된 후 물이 공격하여 가수분해가 일어날 경우 중간체로써 생성된 C₂₀의 탄소 양이온은 3차 탄소 양이온으로써, 2차 탄소인 C₄과 C₆ 탄소에 결합된 산소 원자의 가수분해 시 중간체로써 얻어질 수 2차 탄소 양이온보다 안정하므로 C₂₀의 탄소에 결합된 산소의 에테르 결합이 C₄과 C₆의 에스테르 결합보다 가수분해 반응이 커진 원인으로 예상된다.¹⁴⁾ 이러한 결과로 인삼중의 유기산은 열수추출 과정중 추출액의 산도를 증가시켜 C₂₀ 위치 glucoside의 에테르 결합을 분해시키므로 홍삼 물엑스 제조 과정중 인삼 사포닌 분해의 주된 요인으로 작용하는 것으로 생각된다. 이러한 산 가수분해 원인을 제거하기 위하여 유기산 농도에 해당하는 당량의 탄산타트륨(Na₂CO₃)나 중탄산타트륨(NaHCO₃)를 첨가하여 중화 후, 추출을 위하여 가열할 경우에는 추체의 산도가 감소되어 Table 3에 나타난 바와 같이 추출 과정중 사포닌의 분해가 거의 없이 추출·농축할 수 있었다.³⁾

요 약

물을 추제로 홍삼을 열수추출방법으로 추출, 농축하여 extract를 제조할 때 산 가수분해를 억제하기 위하여 인체에 무해한 중탄산타트륨, 탄산타트륨 등의 약염기를 홍삼에 함유된 유기산 당량대비로 첨가한 결과, 유기산(함량: citric acid 13.34 mg/g, malonic acid 8.78 mg/g, oxalic acid 3.70 mg/g, malic acid 2.13 mg/g, succinic acid 0.44 mg/g)을 중화하여 인삼의 주된 유효성분중의 하나인 사포닌을 분해 없이 추출할 수 있었으며, 갈색화 반응을 촉진하여 홍삼 추출물의 갈색도를 높일 수 있었다. 이와 같은 가수분해 현상은 C₂₀ 위치의 가수분해가 주된 요인이었으며, protopanaxadiol과 protopanaxatriol의 C₄과

C₆에 결합된 glucoside결합은 전자 밀도 계산 결과 전기음성도가-0.223으로 낮은 제2급 탄소에 결합되어 대체로 안정하였으나 C₂₀ 위치의 glucoside 결합은 전기음성도가-0.295로 높은 제3급 탄소에 결합되어 약산 용액 가열 조건에서도 산 가수분해가 용이하였으며, 사포닌의 3번, 6번과 20번째 탄소의 산과 효소에 의한 가수분해와 차이는 전기음성도와 입체 장애에 의한 차이에 의한 것으로 생각되었다.

인 용 문 헌

1. Brekhman, I. I. and Dardymov, I. V. : *Ann. Rev. Pharm.*, **9**, 419 (1969).
2. Jong Dae Park : *Korean J. Ginseng Sci.* **20**(4), 389-415(1996).
3. 김천석, 최강주, 고성룡, 김석창, 성현순 : 대한민국 특허 출원 12. 21. 출원번호 95-53549 (1995).
4. Count, W. A. and Handel, J. G. : *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 314 (1978).
5. Ando, T., Tanaka, O. and Shibata, S. : *Syoyakugagu Zasshi*, **25**(1), 28 (1971).
6. Takagi, K. : *Proceedings of International Ginseng Symposium*, The Central Research Institute, Office of Monopoly, Seoul, pp. 119-127 (1974).
7. Shibata, S., Itokawa, H., Sankawa, U., Shoji, J. and Takido, M. : Natural products for medicinal use, Nanzando Company, Limited, Tokyo, pp. 386-445 (1982).
8. Kasai, R., Besso, H., Tanaka, O., Saruwatari, Y. and Fuwa, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2120 (1983).
9. Kitagawa, I. : *Proceedings of the 4th International Ginseng Symposium*, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon, Korea, pp. 159-168 (1984).
10. Masuura, H. : Chemical studies on glycosides of Panax ginseng and its related plants, Hiroshima Univ., ph. D. thesis, p. 130 (1985).
11. Kim, S. I., Kim, D. S., Lee, Y. H., Park, J. D. and Baek, N. I. : *Proceedings of '95 Korean-Japan Ginseng Symposium*, pp. 107-116. Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon (1995).
12. Soldati, F. : *Proceedings of the 3rd International Ginseng Symposium*, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Seoul, Korea (1980).
13. H. Tanizawa, M. Karikura, T. Miyase and Y.

- Takino : *Proceedings of the 6th International Ginseng Symposium*, Seoul Korea, pp. 187-194 (1993).
14. Y. Tanino, T. Odani, H. Tanizawa and T. Hayashi : *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2196 (1982).
15. Jerry March *Advanced Organic Chemistry : Reactions, Mechanism, and Structure* second edition 303-304 (1977).
16. Hughes : *Q. Rev., Chem. Soc.* **2**, 107-131 (1948).
17. Swain and Lupton : *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4328 (1968).