

역상 고속액체크로마토그래피를 이용한 홍삼 사포닌의 정량

김천석[†] · 김세봉

한국인삼연구초연구원, 중부대학교

Determination of Ginseng Saponins by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Cheon Suk Kim[†] and Se Bong Kim

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea
Joongbu University Chungnam 312-940, Korea

ABSTRACT : Major saponins in ginseng were analysed using reverse phase high performance liquid chromatography with binary mobile phase gradient control system instead of normal phase column. The optimum condition were as following : reverse phase column; μ bondapak C₁₈ column(Waters, 3.9mm \times 300 mm, 5 μ m), methyl cyanide/water binary mobile phase gradient control system, solvent flow rate; 1.5 ml/min, and UV(203 μ m) detector. The complete separation of ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf and Rg₁ was achieved within 55 min. The Regression coefficients of the calibration curves for seven ginsenosides were 0.99.

Key words : ginseng, ginsenoside, saponins, reverse phase, high performance liquid chromatography

서 론

사포닌 배당체가 인삼 약효의 주성분임이 강조되므로써 인삼 사포닌에 대한 연구가 집중적으로 시작되어 현재 31종 ginsenoside의 화학구조가 해석되었다. (Park, 1996) 인삼의 사포닌을 분석하는 방법으로 정성적 확인을 위하여 TLC 방법 (Kim 등, 1998)이 사용되어왔으나 다양한 사포닌 및 미량사포닌의 분리확인에는 한계가 있었다. 정량방법으로는 1960년대 시작하여 현재에도 간이적 비교를

위하여 사용하고 있는, 용매 분리에 의한 조사포닌 중량분석을 시초로 하여, 전체 ginsenoside의 합을 정량하는 수준의 마닐린 황산 비색법 (Oura 등, 1975, 1979) 등이 개발되었다. 고속액체크로마토그래피 (high performance liquid Chromatography : 이하 HPLC)의 개발로 사포닌의 정성 정량분석은 비약적 발전을 하였으며, Hong 등(1979) 등은 순상 컬럼과 혼합물 이동상 CH₃CN/H₂O/BuOH(80 : 20 : 15)으로 분석하였으나 머무름시간의 분리도가 좋지 않았고 굴절을 검출기를 사용하기 때문에 각

[†] Corresponding author (Phone) E-mail : 042 - 866 - 5603, Cskim@gr.kgtri.re.kr
Received Jan. 13, 2001

ginsenoside가 고농도여야 한다는 문제점이 있었다.

인삼에는 각종 농도의 사포닌뿐만 아니라 매우 다양한 화합물이 혼합되어있기 때문에 액상분리방법으로 조사포닌을 추출하여 분리하여도 다양한 물질의 혼재로 분석에 어려움이 있다. UV-VIS 비색법은 사포닌에 적용할 수 있는 발색단이 개발되지 않아 이용되지 못하였다.

HPLC용 UV-VIS 비색 검출기의 발전과 더불어 자외부 단파장에서의 비색정량이 가능해짐에 따라 Sticher(1979)와 Soldati(1980)는 각 ginsenoside의 머무름시간 겹침 및 감도를 해결하기 위하여 역상컬럼으로 diol 사포닌과 triol 사포닌을 2회로 나누어 HPLC로 분리하여 자외부 단파장을 이용하여 검출하는 분석방법을 개발하였다. 이 방법은 감도농도 한계를 낮추는 면과 머무름시간 겹침을 해결하는 면에서 많은 발전을 이루었으나 사포닌과 함께 추출되는 혼합물로 인하여 재현성에 방해를 받았고 각 ginsenoside의 머무름시간을 충분히 해결하지 못했으며 한가지 시료를 2회에 걸쳐 분석해야 하는 불편이 있었다. 이러한 문제를 개선하기 위하여 박 등(1996)은 순상컬럼과 이동상의 기율기 용리 조건, 그리고 evaporative light scattering 검출기(ELSD)를 사용하여 감도와 분리도가 좋은 결과를 얻었다. 그러나 이방법은 다량의 분무용 기체가 필요하고 물과 같이 증발잠열이 큰 용매를 사용하기 곤란하다는 단점이 있었다. 본 연구는 역상컬럼과 이동상의 기율기 용리 조건으로 인삼사포닌을 분리하여 UV-VIS 비색 검출기를 이용하여 자외부 단파장에서 사포닌을 분석하는 방법을 인삼시료의 사포닌 정량에 적용하여 인삼사포닌중에서 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf 및 Rg₁ 7종 주종 사포닌을 정량코자 하였다.

재료 및 방법

1. 기기장치

본 실험에서 사용한 고속 액체 크로마토그래피

(HPLC)는 Waters 510 HPLC 펌프와 Waters 484 UV 검출기, 그리고 Waters 746 integrator를 연결하여 사용했으며, 시료 주입은 주입오차를 줄이기 위하여 자동주입기(Waters 717 plus)를 사용하였다. HPLC의 컬럼은 μ bondapak C18 (Waters, 3.9 × 300mm)를 사용하였다.

2. 시약 및 재료

실험에서 사용한 사포닌 표준품은 한국인삼연초 연구원에서 Syuichi 등(1974)과 Nagasawa 등(1980)의 방법으로 분리 정제된 것이며, 정제된 순품(99.8% 이상)을 사용하여 잘 알려진 HPLC 방법들(Hong 등, 1993, Yamaguchi 등, 1993, Samukawa 등, 1995)로 표준화하였다. 물은 1차 증류수를 Milli-RO 60으로 탈 이온화시키고 0.5 μ m 필터로 여과하여 사용하였다. 사포닌 정량을 위하여 추출된 시료는 직경 13 mm의 0.22 μ m nylon syringe filter이 용하여 여과후 HPLC에 주입하였다. 용매로 쓰인 methanol과 methyl cyanaide는 덕산제 gradient급을 0.5 μ m 필터로 여과 한 후 진공 조건에서 초음파 진동을 주어 가스를 제거하고 사용하였다.

3. 실험방법

한국인삼연초연구원에서 생산하여 표준화된 사포닌 표준품 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf 및 Rg₁ (7종의 ginsenosides)을 각각 5mg/ml로 용해시켜 표준용액을 제조하였으며, 필요에 따라 희석하여 사용하였다. 혼합 이동 상은 기율기 제어장치로 기율기 용리조건을 변화시키면서 7종 사포닌의 머무름시간 분리에 대한 적정 조건을 비교하였다. 표준용액을 희석하여 주입하면서 크로마토그램을 얻고, 봉우리 면적당 주입량의 관계로 검정곡선을 작성하였다. 이 결과를 수포화 부탄을 층으로부터 추출한 사포닌 시료의 성분별 분리에 적용하였다.

4. 기율기 용리

인삼에서 주종 사포닌을 분석하기 위한 몇가지 이

동상 용매의 기울기 용리에서 (A) methyl cyanaide (B) 8% methyl cyanaide를 사용하여 0-10 min, 10-12% A-90-88% B, 1.3-1.4 ml/min; 10-36 min, 12-25% A-88-75% B, 1.4-1.5 ml/min; 36-52 min, 25-34% A, 75-66% B, 1.5-1.6 ml/min으로 유지하는 조건이 7종의 ginsenoside의 머무름 시간에 따른 분리도가 가장 좋았다.

결과 및 고찰

1. Column 및 용매조건의 선택

인삼의 주종 사포닌은 panaxadiol 또는 panaxatriol과 같이 서로 극성이 다른 두 집단의 aglycone 구조를 갖는 배당체로 구성되어 있으므로, 이러한 인삼 사포닌의 구조적 특성을 분리하기에 적합한 방법을 찾기 위하여, 본 연구에서는 지금까지 주로 사용하던 정상컬럼과는 반대 극성인 역상컬럼인 $\mu\beta$ ondapak C₁₈ 컬럼을 이용하여 인삼의 주종 사포닌인 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁ 등 7종 사포닌을 분석하였다. 이동상으로 단일 혼합용매를 이용하는 방법(Hong 등, 1979)으로는 역상컬럼을 이용하여도 각 ginsenoside의 머무름시간이 겹치게 되므로, 저자는 용매의 극성을 변화시키기 위하여 8% methyl cyanaide 수용액과 100% methyl cyanaide를 이용하여 극성이 강한 용매조건으로 시작하여 시료의 추출 과정에서 혼입되는 당 및 색소 물질 등은 ginsenoside에 비하여 극성이 강하므로 극성이 강한 용리액으로 시작하는 초기 용리조건에서 제거하고 서서히 비극성 용리액의 비율을 증가시켜 사포닌이 극성별로 용리되도록 하는 조건이 되도록 하여 초기에 Rg₁, Re, Rf가 전개되고, 그후 Rb₁, Rc, Rb₂, Rd 순으로 전개되는 크로마토그램을 얻었으며, 그 결과를 Fig. 1에 보였다. 이러한 조건에서 봉우리의 대칭성도 양호하였다.

2. 표준검량곡선 작성

사포닌 표준품 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf 및 Rg

를 1.0~50.0 μ g의 농도범위가 되도록 20 μ l씩 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 농도와 봉우리 면적의 계산 값을 검량선 및 검량선의 직선식을 보였으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 검량선에서 농도에 따른 회귀계수(R) 검정결과 1.0~75.0 μ g구간에서는 Table 1에 나타낸 바와 같이 7종 ginsenoside 모두 R값이 0.99로 1에 근접하여 정량성이 양호하였다.

Table 1. Quantive analysis data

Ginsenoside	Calibration curve	Regression Coefficient
Ginsenoside-Rb ₁	Y=190.67X-153.3	0.9985
Ginsenoside-Rb ₂	Y=186.00X-57.6	0.9995
Ginsenoside-Rc	Y=178.07X-118.6	0.9993
Ginsenoside-Rd	Y=159.94X-10.9	0.9999
Ginsenoside-Re	Y=148.63X-64.6	0.9997
Ginsenoside-Rf	Y=139.66X-87.8	0.9991
Ginsenoside-Rg ₁	Y=106.07X-69.5	0.9990

Table 2. Recovery test of ginsenosides contents of the red ginseng

(Unite : % of dry basis)

sample injection No.	ginsenoside							
	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rf	Rg ₁	Total
1	0.60	0.28	0.30	0.16	0.29	0.08	0.63	2.34
2	0.61	0.27	0.32	0.14	0.31	0.10	0.66	2.41
3	0.59	0.28	0.31	0.17	0.28	0.10	0.66	2.39
4	0.62	0.29	0.32	0.16	0.30	0.09	0.61	2.39
5	0.63	0.31	0.33	0.15	0.28	0.09	0.64	2.43
Av.	0.61	0.29	0.32	0.16	0.29	0.09	0.64	2.40
\pm SD	0.016	0.015	0.011	0.011	0.013	0.083	0.021	

3. 재현성

Ando 등(1971)의 방법에 준하여 홍삼시료 분말 5g에 60% 메탄올 수용액 50ml를 가하여 80 $^{\circ}$ C 수조에서 환류시키는 방법으로 3회 추출하고, 추출액을

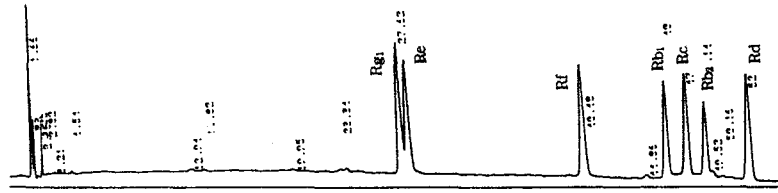


Fig. 1. HPLC Chromatogram on mixture of standard ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf and Rg₁ for μ Bondapak C₁₈ chromatographic condition : mobile phase : 100% acetonitrile and 8% acetonitrile (gradient) flow-rate : 1.3 ml/min, detection : UV 203nm.

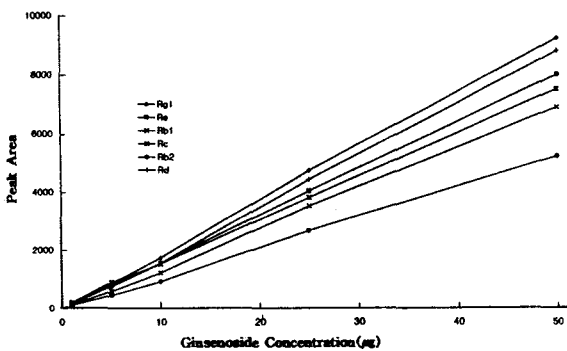


Fig. 2. Calibration curves of ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf and Rg₁ by HPLC Chromatogram on mixture of standard with μ Bondapak C₁₈ column

계를 보였다.

적 요

인삼의 주종 사포닌인 7종 사포닌(Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf 및 Rg₁)을 고속액체크로마토그래피로 분석하는 일반적인 방법인 순상 column에서 Rg₁, Re 및 Rf가 명확히 분리되지 않는 문제점을 개선하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 고속액체크로마토그래피를 이용하여 역상 μ Bondapak ODS컬럼으로 인삼중 주종 사포닌인 7종 ginsenosides Rg₁, Re, Rf, Rb₁, Rc, Rb₂ 및 Rd를 양호하게 분리하였다. 이때 분석 조건으로 이동상 용매 조성은 (A) H₂O, (B) methyl cyanide을 (A) 90/(B) 10에서 (A) 0/(B) 100으로 기울기 용리를 이용하였으며, 기울기 용리 제어장치를 사용하여 용리시켰다. 용매 흐름속도는 1.5ml/min, 검출기는 UV detector (203nm)이었다. 이 방법은 분리능과 재현성 및 회수율이 양호하므로, 앞으로 인삼중 ginsenosides 분석에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

LITERATURE CITED

1. Hong S. K., E. K. Park, C. Y. Lee and M. U. Kim, 1979. 인삼사포닌의 High Performance Liquid Chromatography 에 의한 分離. *Yakhak Hoeji*, 23(3&4), 181
2. Kim S. K., Y. S. Kwak, and S. W Kim, 1998. Improved Method for the Preparation of Crude

합하여 여과 후, 감압건조하여 50ml 증류수를 가하여 녹인 후 50ml 디에틸 에테르를 가하여 분액법으로 지용성 성분을 3회 제거한 후, 수포화 n-buthanol 추출방법으로 사포닌 성분을 추출한 후 감압농축하여 홍삼중 사포닌 분석용 시료로 사용하였다. 이 시료를 고속액체크로마토그래피(HPLC)로 분석하기 위하여 methanol을 가하여 사포닌의 농도가 검량선 구간의 농도에 포함되도록 용해시킨 후 0.22 μ m 필터로 여과하였다. 사포닌 분석을 위하여 HPLC에 1회에 20 μ l씩 취하여 주입하였으며, 5회 주입하여 얻은 주입횟수별 결과를 Table 2에 나타내었으며 반복에 따른 편차와 재현성이 양호한 것으로 나타났다. 이 방법의 검출한계(S/N=3)는 7종 ginsenoside 모두 2.5 ng이었으며, ELSD 검출기를 사용한 박 등(1996)의 경우보다 매우 좋은 검출한

- Ginseng Saponin *Kor. J. Ginseng Sci.*, 22, (3) 155-160.
3. Nagasawa T., J. H. Choi, J. Nishino and H. Oura, 1980. Application of High-performance Liquid Chromatography to the Isolation of Ginsenoside-Rf, -Rg₂, and -Rh₁ from a crude Saponin Mixture of Ginseng. *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 3701
 4. Oura H., S. Hiai, Y. Odaka and T. Nakajima. 1975. *Planta Medica*, 28, 363
 5. Oura H., S. Hiai, H. Hamanaka and Y. Odaka. 1975. *Planta Medica*, 28, 361
 6. Park J. D. 1996. Recent study on the chemical constituents of Korea ginseng (*Panax ginseng C. A Mayer*) 20, (4) 389
 7. Park M. K., J. H. Park, S. B. Han, Y. G. Shin and I. H. Park, J. 1996. *High-performance Liquid Chromatographic analysis of ginseng saponins using evaporative light scattering detection. J. Chromatography. A.* 736, 77-81
 8. Samukawa J., H Yamashita, H. Matsuda and M. Kubo, 1995. Simultaneous Analysis of Saponins in Ginseng Radix by High-performance Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, 43(1) 137-141.
 9. Soldati F., 1980. HPLC separation and quantitative determination of ginsenosides from *Panaxa Quinquefolium* and from ginseng drug preparations. Proc. 3rd *International Ginseng Symposium* 59
 10. Sticher O., and F. Soldati, 1979. HPLC separation and quantitative determination of ginsenosides from *Panaxa Quinquefolium* and from ginseng drug preparations. *Planta Medica*, 36, 30
 11. Syuchi S., K. Noriko, S. Junzo, 1974. Studys on the Saponins of Ginseng. II. Structures of Ginsenoside-Re, -Rf and Rg₂ *Chem. Pharm. Bull.* 22(10) 2407
 12. Yamaguchi H., R. Kasai, H. Matsuura, O. Tanaka and T. Fuwa, 1988. *High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Acidic Saponins of Ginseng and Related Plants. Chem. Pharm. Bull.*, 36 (9), 3468-3473.