

## HPLC의 이동상 용매조건에 따른 인삼 Ginsenoside 분석

박지영\* · 이충열\*† · 원준연\*\*

\*부산대학교 생명자원과학부, \*\*중부대학교 교양학과

### Analytical Optimum of Ginsenosides according to the Gradient Elution of Mobile Phase in High Performance Liquid Chromatography

Ji Yeong Park\*, Chung Yeol Lee\*†, and Jun Yeon Won\*\*

\*School of Bio-Resources, Pusan Natl. Univ. Miryang 627-906, Korea

\*\*Dept. of Liberal Arts, Joongbu Univ. Kumsan 312-702, Korea

**ABSTRACT :** This study was conducted to analyze not only for the quality guaranteed of red ginseng but also for the minor ginsenosides. Although several studies have reported to analyze ginseng saponins, those were focused to major saponins, including 6 to 7 ginsenosides. As increase of interest in medicinal effect of ginseng products, anasis of various ginsenosides in both red and white ginseng are strongly demanded. To perform optital condition of 12 ginsenoside analysis, We controlled HPLC conditions, such as the gradient elution of the mobile phase. We found the adequate separation method for 12 ginsenosides. The optimum condition was as following : H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN ratios were 82/18, 70/30, 55/45 and 50/50, respectively. Solvent flow rate was 1.00 ml/min. Column temperature was kept to 35 °C. UV detector was set to 203 nm.

**Key Words :** ginsenoside, HPLC, gradient elution, saponin, analysis

## 서 언

인삼 (*Panax ginseng*)은 오가과 (五加科)에 속하는 다년생 초본류로 오래전부터 그 효능을 인정받아 명약으로서 사용되어 온 약용식물이다. 인삼의 주요 생리활성 성분은 사포닌을 비롯하여 정유 성분, 폴리아세틸렌 (polyacetylenes), 페놀 성분, 다당체 및 산성펩티드 등이 있으며, 그밖에도 비타민, 당류, 무기질과 같은 다양한 영양 성분들이 함유되어 있다 (고려삼의 이해, 1995).

인삼에 이와 같은 성분이 들어있는 것이 알려지면서 인삼의 효능이 과학적으로 인정되고 있고, 특히 기능성 건강식품의 소재로 크게 응용이 되면서 국제시장에서의 인삼 유통량은 급격한 증가 추세를 나타내고 있다 (Attele *et al.*, 1999).

그러나 중국, 캐나다 등 다른 나라의 인삼 경쟁력이 강화되면서 국내 고려인삼의 고품질화에 의한 차별화가 시급한 실정이다. 이를 위하여 그 동안 재배법 (Lee *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2005), 생산성향상 (An *et al.*, 2002a), 품질 (An *et al.*, 2002b)과 인삼의 주성분인 사포닌함량 및 분석방법 등 많은 연구 (Jang *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 2004)가 되어 있으나, 품질평가로 중요시 되는 사포닌함량의

분석에 대해서는 대부분이 정성 확인만이 가능한 TLC 방법 (Y. Saruwatari *et al.*, 1979), 바닐린-황산 비색법 (H. Oura *et al.*, 1975), 기체-액체 크로마토그래피법 (O. Sticher *et al.*, 1979), UV-labeling법 (M.K. Park *et al.*, 1993) 등의 연구이며 이들 방법은 분리능이 양호하지 못하고 실용도가 낮은 결점이 있으며 물과 같은 용매를 사용하기 곤란한 단점이 있다. (Seung-Il Jeong *et al.*, 1998) 최근에는 고속 액체크로마토그래피를 이용한 분석 방법이 많이 시도되고 있고 사포닌의 화학적 특성상 역상 column을 사용하여 분석하는 방법도 연구되고 있다.

국내에서 재배되고 있는 고려인삼이 중국이나 일본 및 미국 등지에서 생산되는 인삼에 비해 그 약효가 훨씬 뛰어나다고 하는 것은 이미 잘 알려져 있는 바 (고려인삼, 1994), 이는 고려인삼에 들어있는 다양한 종류의 주요 사포닌과 미량 사포닌에 의한 것이다. 따라서 사포닌성분의 합리적이고 과학적인 다양한 분석법의 확립으로 고려인삼의 고품질로서의 국제적 경쟁력을 키우는 것이 매우 시급하다. 현재의 성분 분석 실태는 인삼뿐만 아니라 홍삼까지도 분석이 용이하고 주로 수삼에서 확인 할 수 있는 주요 사포닌만 측정되고 있는 실정이며, 미량 사포닌 등을 포함한 다양한 ginsenosides에 대한 분석

†Corresponding author: (Phone) +82-55-350-5503 (E-mail) cylee@pusan.ac.kr

Received May 10, 2007/ Accepted May 30, 2007

방법의 연구는 아직까지 미흡하며 특히, 미량 사포닌은 주요 사포닌에 비해 Retention time (RT)이 늦거나, 주요 사포닌과 Peak 겹침이 심하여 분리하기가 용이하지 않은 어려움이 있다.

따라서, 본 연구에서는 HPLC의 역상 칼럼을 사용하여 이동상 용매를 다양하게 gradient elution의 변화를 주어, 주요 사포닌과 분리가 용이하지 않은 미량 사포닌의 최적 분리 조건과 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>의 12종의 ginsenosides를 완전하게 분리하여 정확한 Area를 얻음으로써 정량분석 방법을 최적화하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 기기 장치 및 조건

본 실험에서 사용한 고속 액체크로마토그래피 (HPLC)는 Perkin elmer series 200 Pump, Peltier column oven, UV/VIS Detector, Vacuum Degasser, 그리고 Series 600 LINK를 연결하여 사용하였으며, Series 200 Autosampler로 시료를 주입하였다. HPLC의 Column은 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5-Micron)을 사용하였고 실험에서 기기의

Table 1. Chromatographic condition of the control factors

Control factor	Condition
Injection volume	10 $\mu$ l
Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5-Micron)
Mobile phase	Solvent A: Water, Solvent B: ACN
Flow rate	1.00 ml/min
Column Temperature	35°C
Wavelength	203 nm

조건은 peak의 분리를 위해 pump program에서 gradient를 준 것과 Detector time의 변화를 준 것 외에는 모두 동일한 조건에서 실험을 하였다 (Table 1).

### 2. 시약

실험에 이용된 모든 시약은 HPLC Grade 용매를 사용하였다. H<sub>2</sub>O와 CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>3</sub>OH 모두 SK Chemical의 Burdick & Jackson 제품을 사용하였으며, H<sub>2</sub>O와 CH<sub>3</sub>CN는 혼합하지 않고 이동상으로 사용하였다. 그리고 HPLC 분석에 사용된 표준품은 시중에서 판매하는 Sigma-Aldrich (St. Louis USA)와 EXTRASYNTHÈSE (France)의 제품을 사용하였다.

### 3. 실험 방법

실험에 사용한 사포닌의 표준품은 Sigma와 EXTRASYNTHÈSE에서 생산된 ginsenoside (Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>) 총 12종으로 이들 표준품을 각 5 mg씩 Balance로 정밀하게 정량하여, 메탄올 1 ml에 용해시켜 표준용액을 조제하였다. 표준용액을 각각 100  $\mu$ l을 정량한 후 여기에 메탄올 900  $\mu$ l를 혼합하여 총 1 ml로 조제하였다. 이렇게 조제된 용액을 5배, 10배로 희석하여 총 3개의 vial을 만들어 Autosampler로 용액들을 10  $\mu$ l 씩을 주입하여 이동상 조성을 pump program에서 변화시키면서 용리시켰다. 희석하여 만든 용액들을 주입하면서 크로마토그램을 얻고 Peak area와 Injection volume으로 검량선을 만들었다. 각 사포닌의 비슷한 RT 때문에 생기는 peak의 겹침을 해결하기 위하여 이동상 용매의 조성 시간과 비율을 Table 2에서 보는 바와 같이 바꾸어 가면서 12종의 사포닌을 분리할 수 있도록 하였다. 분리 후, 재현성 검증을 위하여 홍삼 시료 분말 1 g에 70%의 메탄올 수용액 10 ml를 가하여 80°C 항온 수조에서 환

Table 2. Changes of HPLC gradient elution on the separation for mixture of ginsenosides

	Step	Time (min)	Water (%)	ACN (%)	Curve		Step	Time (min)	Water (%)	ACN (%)	Curve
A	0	Initial	80.0	20.0	0.0	D	0	Initial	82.0	18.0	0.0
	1	22.0	80.0	20.0	1.0		1	22.0	82.0	18.0	0.0
	2	40.0	50.0	50.0	1.0		2	32.0	70.0	30.0	1.0
	3	50.0	45.0	55.0	1.0		3	70.0	55.0	45.0	1.0
B	0	Initial	82.0	18.0	0.0	E	0	Initial	82.0	18.0	0.0
	1	20.0	82.0	18.0	0.0		1	22.0	82.0	18.0	0.0
	2	30.0	70.0	30.0	1.0		2	32.0	75.0	25.0	1.0
	3	60.0	60.0	40.0	1.0		3	60.0	60.0	40.0	1.0
C	4	70.0	55.0	45.0	1.0	4	85.0	50.0	50.0	0.0	
	0	Initial	82.0	18.0	0.0	F	0	Initial	82.0	18.0	0.0
	1	22.0	82.0	18.0	0.0		1	22.0	82.0	18.0	0.0
	2	37.0	70.0	30.0	1.0		2	32.0	70.0	30.0	1.0
3	70.0	50.0	50.0	1.0	3		60.0	55.0	45.0	1.0	
						4	85.0	50.0	50.0	0.0	

HPLC의 이동상 용매조건에 따른 인삼 Ginsenoside 분석

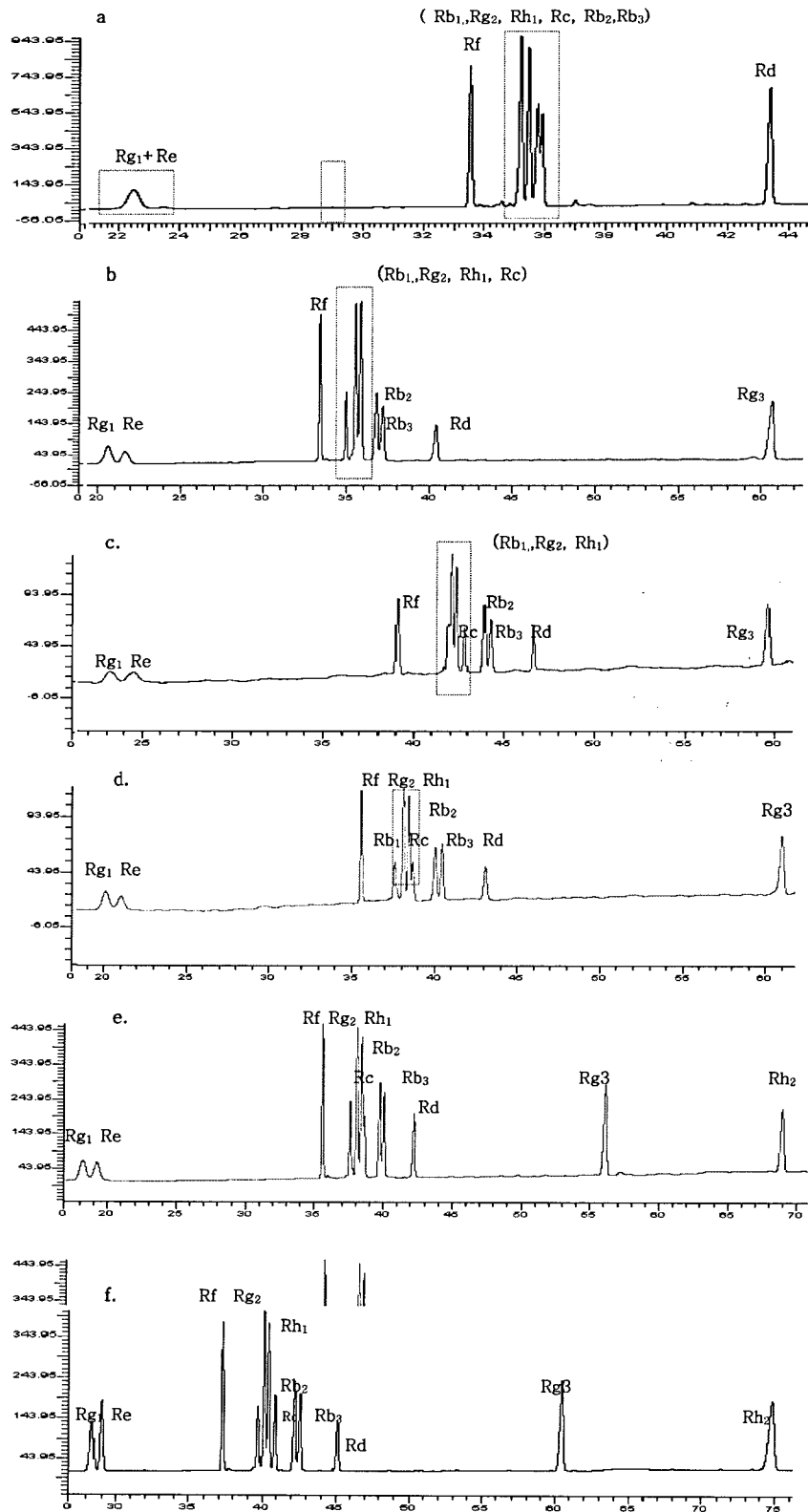


Fig. 1. HPLC Chromatograms of ginsenosides a: Chromatogram by the condition of table 2-A b: Chromatogram by the condition of table 2-B c: Chromatogram by the condition of table 2-C d: Chromatogram by the condition of table 2-D e: Chromatogram by the condition of table 2-E f: Chromatogram by the condition of table 2-F.

류 냉각시키는 방법으로 3회 추출하고, 추출액을 합하여 여과하고 추출액을 감압 건조하여 10 mL의 증류수를 더하고, 여기에 같은 양의 diethyl ether를 가하여 분액법으로 지용성 성분을 제거 한 후에, 수포화 n-butanol 추출 방법으로 사포닌 성분을 3회 추출하여 감압 농축하였다. methanol 2 mL를 가하여 용해시킨 후 0.20  $\mu$ m로 여과하였다. 이후 1회에 10  $\mu$ L씩 5회 HPLC로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 기울기 용리 조건에 따른 크로마토그램의 변화

인삼의 주요 사포닌을 정확히 정량, 정성하기 위해서는 용매의 기울기 용리조건이 중요하다. 기울기 용리에 따라 얻어진 크로마토그램은 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

a의 조건에서는 RT가 같은 Rg<sub>1</sub>, Re가 분리되지 않았고, 유기용매를 짧은 시간에 대폭 증가시킨 결과, 밀집되어 있는 피크가 겹치는 현상이 나타났다. b의 조건에서는 근소한 용매의 비율 차이로 Rg<sub>1</sub>, Re의 분리에는 성공하였으나 피크 하나가 겹쳐서 나타나 program time을 늘렸지만 Rh<sub>2</sub>의 피크가 나타나지 않았다. CH<sub>3</sub>CN를 천천히 증가시킨 c의 조건에서는 밀집되어 있던 피크를 모두 확인할 수 있었으나, 피크가 완전히 분리되지 않았고, Rh<sub>2</sub>는 여전히 확인되지 않았다. d의 조건에서는 c의 조건에서 완전히 분리되지 않은 밀집되어진 피크들을 모두 분리하였지만, 그 결과 가장 뒤에 나온 Rg<sub>3</sub>의 RT가 느려지면서 더욱 밀리게 되어 Rh<sub>2</sub>의 피크가 정상적으로 확인되지 않았다. 그래서 program time을 25분 더 늘렸던 결과, 얻어진 크로마토그램 e의 조건에서는 모든 피크를 분리할 수 있었다. 그러나 Rc의 Area가 안정적이지 않아서 전체의 시간을 동일하게 하고 CH<sub>3</sub>CN의 비율을 천천히 증가시켜 본 바, 모든 피크가 완전히 분리되는 크로마토그램 f의 조건을 얻을 수 있게 되었다.

이상의 12종의 사포닌 피크의 최적화 분리는 f조건으로가 초기에는 H<sub>2</sub>O과 CH<sub>3</sub>CN의 비율이 82/18에서 점차 50/50 비율의 용매 조건이 되도록 용리시키면서 크로마토그램을 얻었고 이때 Rg<sub>1</sub>과 Re는 RT가 거의 일치하여 80/20 (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN)의 조건에서도 분리되지 않아서 82/18에서만 비로소 완전하게 분리가 되었다. Rb<sub>1</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rc, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>은 아주 비슷한 RT를 가지고 있어서 Peak의 겹침이 심하였으나, 극성이 약한 CH<sub>3</sub>CN의 비율을 천천히 높이게 하여 이들의 분리에 성공하였으며, 안정적인 Peak area를 얻을 수 있었다. 또한 Rh<sub>2</sub>의 Peak 검출이 어려워 Step 3, 4에서는 그전 단계보다 CH<sub>3</sub>CN의 비율을 대폭적으로 크게 하였던 바, Rh<sub>2</sub>를 찾을 수 있었다.

### 2. 표준 검량선의 작성

사포닌 표준품 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>,

Table 3. Quantitative data of ginsenoside on HPLC

Ginsenoside	Calibration lines	Regression coefficient
Rb <sub>1</sub>	$y = 4033x + 29.79$	0.9986**
Rb <sub>2</sub>	$y = 6468x + 34.85$	0.9995**
Rb <sub>3</sub>	$y = 5481x + 31.37$	0.9994**
Rc	$y = 5013x + 21.15$	0.9996**
Rd	$y = 3664x + 13.84$	0.9997**
Re	$y = 5976x + 17.65$	0.9997**
Rf	$y = 8051x + 39.29$	0.9996**
Rg <sub>1</sub>	$y = 5251x + 16.53$	0.9997**
Rg <sub>2</sub>	$y = 10080x + 46.40$	0.9996**
Rg <sub>3</sub>	$y = 8984x + 36.79$	0.9997**
Rh <sub>1</sub>	$y = 9147x + 44.18$	0.9996**
Rh <sub>2</sub>	$y = 11068x + 19.33$	0.9999**

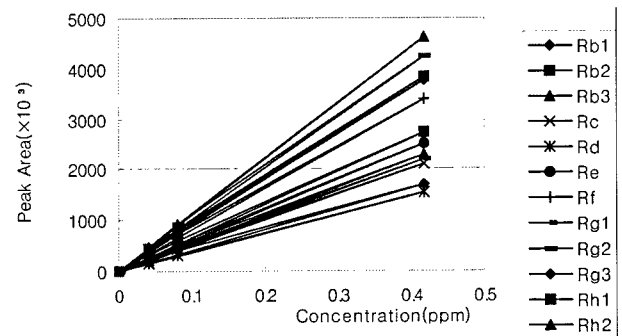


Fig. 2. Calibration curves of ginsenosides Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub> and Rh<sub>2</sub>.

Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>을 10  $\mu$ L씩 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 농도와 피크 면적을 계산한 값은 Table 3 및 Fig. 2에 나타난 바와 같다.

12종의 모든 사포닌 표준품에서 농도와 피크면적간에는 모두 고도로 유의성이 인정되는 1차회귀식으로 나타났고 Rh<sub>2</sub>가 가장 넓은 면적을 차지하고 있었으며 Rd가 가장 좁게 나타나는 경향을 보였다. 12종의 사포닌 표준품은 농도가 증가함에 따라 피크의 면적도 증가하는 경향을 보였는데, 그 크기는 Rh<sub>2</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rf, Rb<sub>2</sub>, Re, Rb<sub>3</sub>, Rg<sub>1</sub>, Rc, Rb<sub>1</sub> 및 Rd의 순이었다.

### 3. 시료의 재현성

홍삼시료에서 추출한 용액을 5회 HPLC로 분석한 결과, Table 4에 나타난 바와 같다. 표에서 보는 바와 같이 5회 분석해 본 결과, 반복간의 표준편차가 0.01이하로 매우 차이가 적은 것으로 나타났으며 사포닌 총량에서도 표준편차가 적어 재현성이 매우 양호한 것으로 나타나, 12종의 ginsenoside 분석 시 가장 적합한 분석방법이라고 사료된다.

Table 4. Ginsenoside contents in red ginseng

(Unit : % of dry basis)

Sam-ple	Ginsenoside												Total
	Rb <sub>1</sub>	Rb <sub>2</sub>	Rb <sub>3</sub>	Rc	Rd	Re	Rf	Rg <sub>1</sub>	Rg <sub>2</sub>	Rg <sub>3</sub>	Rh <sub>1</sub>	Rh <sub>2</sub>	
1	0.49	0.25	0.08	0.22	0.20	0.27	0.07	0.36	0.04	0.06	0.05	0.04	2.13
2	0.48	0.25	0.09	0.23	0.20	0.25	0.06	0.35	0.05	0.06	0.06	0.04	2.12
3	0.49	0.27	0.09	0.21	0.18	0.27	0.06	0.34	0.04	0.07	0.05	0.03	2.10
4	0.50	0.26	0.09	0.22	0.19	0.26	0.06	0.36	0.04	0.06	0.06	0.03	2.13
5	0.50	0.26	0.08	0.22	0.19	0.27	0.07	0.35	0.05	0.06	0.06	0.04	2.15
Av.	0.49	0.26	0.09	0.22	0.19	0.26	0.06	0.35	0.04	0.06	0.06	0.04	2.12
±SD	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02

## 적 요

HPLC에 의한 미량 Ginsenoside의 분석법을 확립하고자 본 연구를 수행하였던 바, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

인삼 ginsenoside의 분석은 많이 시도되어 왔으나 주요 사포닌 및 미량 사포닌의 분석법이 정립되지 않고 있는 실정인 바, 본 연구에서는 이동상 용매의 기울기 용리를 다양하게 변화를 주어 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>의 총 12종의 사포닌을 양호하게 분리하는데 성공하였다. 이동상의 흐름 속도는 1.00 ml/min이고 column 온도는 35 °C, UV detector의 파장은 203 nm로 모두 일정하게 한 결과였으며, 최적의 분석조건은 H<sub>2</sub>O와 CH<sub>3</sub>CN의 용매 조성이 82/18, 70/30, 55/45, 50/50으로 각각의 ginsenosides의 안정적인 Area 값을 얻을 수 있었고 재현성을 시도해본 결과, 반복간 편차가 적어 재현성이 매우 양호한 것으로 나타났다.

## 사 사

본 연구는 농림부에서 시행한 2004-2007년도의 농림기술개발사업 연구 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## LITERATURE CITED

- An YN, Lee SY, Choung MG, Kang KH (2002a) Optimum Harvesting time based on growth characteristics of four-year ginseng. Korean J. Crop Sci. 47(3):211-215.
- An YN, Lee SY, Choung MG, Choi KJ, Kang KH (2002b) ginsenoside concentration and chemical component as affected by harvestin time of four-year ginseng root. Korean J. Med. Crop Sci. 47(3):216-220
- Attele, S, Wu J, Yuan CS (1999) Ginseng phasrmacology : multiple constituents and multiple actions. Biochem. Pharmacol. 58:1685-1693
- Jang JG, Lee KS, Kwon DW, Nam KY, Choi JH (1983) Study on the changes of saponin contents in relation to root age of Panax ginseng. Korean J. Food & Nutrition 12(1):37-40.
- Jeong CM, Bae KK (1999) Effect of CO<sub>2</sub> enrichment on the differentiation of multi-shoots and saponin contents in tissue culture of korea ginseng. Korean J. Med. Crop Sci. 7(4):296-302.
- Jeong SI, Kim CS, Lee NW, Lee YG, Lee HS, Kim IK (1998) Separation of 20 (R&S) prosaponins isomers of ginsenoside-Rg<sub>2</sub> and Rg<sub>3</sub> from ginseng saponins by reversed-phase high performance liquid chromatography. Analytical Science & Technology vol. 11(5):404-408.
- Kim CS, Kim SB (2001) Determination of ginseng saponins by reveesed-phase high performance liquid chromatography. Korean J. Med. Crop Sci. 9(1):21-25.
- Kim MW, Ko SR, Choi KJ, Kim SC (1987) Distribution of saponin in various section of Panax ginseng root and changes of its contents according to root age. Korean J. Ginseng Sci.11(1):10-16.
- Lee SE, Lee SW, Bang JK, Yu YJ, Seong NS (2004) Antioxidant activities of leaf, stem and root of panax ginseng C. A. Meyer. Korean J. Med. Crop Sci. 12(3):237- 242.
- Lee SW, Kang SW, Kim DY, Seong NS, Park HW (2004) comparison of growth characteristics and compounds of ginseng cultivated by paddy and upland cultivation. Korean J. Med. Crop Sci. 12(1):10-16.
- Lee SW, Cha SW, Hyun DY, Kim YC, Kang SW, Seung NS (2005) Comparison of growth characteristics, and extract and crude saponin contents in 4-Year-Old ginseng cultured by direct seeding and transplanting cultivation. Korean J. Med. Crop Sci. 13(6):241-244.
- Park MK, Park JH, Kang JS, Lee MY, Park YI, Yu SJ, Han BH (1993) Rapid hydrolysis of ginseng saponin by microwave oven reaction. Kor. J. Ginseng Sci., 17(1):35-38.
- Shibata S, Tanaka O, Soma K, Iita Y, Ando T, Nakamura H (1965) Studies on saponins and sapogenins of ginseng: the structure of panaxatriol. Tetrahedron Lett 3:207-213.
- Shibata S, Tanaka O (1966) Protopanaxadiol a genuine sapogenins of ginseng saponins. Chem Pharm Bull 14:595-600.
- 고려삼의 이해 (1995) 고려인삼학회 p. 9-16.
- 고려인삼 (1994) 한국인삼연초연구원, p. 63-88.