



인삼의 추출조건 및 진세노사이드의 HPLC 분석법 평가

이경희*¹ · 이대영*¹ · 이승은* · 남기열** · 황광보** · 김형돈* · 이재원* · 최재훈* · 안영섭* · 김승유* · 김금숙*[†]

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **쥬우신산업

Evaluation on Extraction Conditions and HPLC Analysis Method for Ginsenosides in *Panax ginseng*

Kyeong Hee Lee*¹, Dae Young Lee*¹, Seung Eun Lee*, Ki Yeul Nam**, Gwang Bo Hwang**, Hyung Don Kim*, Jae Won Lee*, Je Hun Choi*, Young Sup Ahn*, Seung Yu Kim* and Geum Soog Kim*[†]

*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

**Wooshin Industrial Co., Ltd., Geumsan 32721, Korea.

ABSTRACT

Background : A new extraction method-heated ultrasonic extraction was qualitatively and quantitatively analyzed for the extraction of major ginsenosides from ginseng extract; this new high-performance liquid chromatography (HPLC) method was compared with the official extraction method of Korean industrial standards and standard for health functional food.

Methods and Results : Ginsenoside compounds were analyzed for 35 minutes by the new HPLC analysis method using a Halo[®] RP-Amide column. The new HPLC analysis method was validated by the measurement of intra-day and inter-day precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) of each ginsenoside. The correlation coefficients (r2) for the calibration curves of the ginsenoside compounds were over 0.9997 in terms of linearity. The heated ultrasonic extraction method using ultrasonication for 30 minutes at 50°C yielded higher amount of ginsenosides than the extraction method of the Korean industrial standards owing to the enhancement of extraction efficiency.

Conclusions : Compared to the other extraction methods, the heated ultrasonic extraction method yielded a higher amount of ginsenoside Rb1 than Rg1 index compounds for the quality evaluation of ginseng roots.

Key Words : *Panax ginseng*, Extraction Method, Ginsenosides, HPLC Analysis

서 언

인삼은 두릅나무과 식물인 *Panax ginseng* C. A. Meyer의 뿌리로서 한국에서 재배되는 인삼은 해외에서 생산되는 인삼들보다 품질 및 약효가 뛰어난 것으로 인지되어 동서양에서 주로 약재로 널리 사용되어 왔다 (Jo *et al.*, 2014; Kim and Lee, 2011; Park *et al.*, 2007). 그러나 국내에서 인삼은 일반 식품 또는 건강기능식품으로도 널리 소비되고 있다. 인삼의 지상부는 꽃, 열매, 잎, 줄기로 지하부는 너두, 주근, 지근, 세근으로 이루어져 있으며, 너두를 제거한 주근과 지근을 주로 약

용이나 식용으로 많이 사용하고 있으나 (Kim and Lee, 2011), 근피 비율이 높아서 무게단위당 사포닌 함량이 높은 세근도 많이 이용되고 있는데, 세근에서 사포닌 함량이 높은 것은 사포닌 성분이 주로 근피에 많이 분포하기 때문으로 알려져 있다. 최근에는 인삼 열매 또는 잎에서도 특이 사포닌을 분리하여 이용하는 제품이 소개되고 있으며, 열매나 잎도 식품 원료로 인정되고 있기 때문에 점차 인삼 열매나 잎의 소비도 증가할 전망이다.

인삼의 효능으로는 항산화 및 항균작용, 항암 작용, 항당뇨 작용, 항스트레스 작용, 면역력 증대, 항피로 작용, 간기능 회

¹KH Lee and DY Lee contributed equally to this paper.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5582 (E-mail) kimgso725@korea.kr

Received 2015 October 6 / 1st Revised 2015 October 26 / 2nd Revised 2015 December 8 / 3rd Revised 2016 January 4 / Accepted 2016 January 6

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.

복 및 항진 작용, 신경세포보호, 조혈작용, 신경세포보호, 당과 콜레스테롤 흡수 억제 및 체내 지방대사 촉진, 혈압조절 등의 활성이 보고되었다 (Jo *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010; Kim and Lee, 2011). 주요 성분으로는 인삼 사포닌인 ginsenoside 성분을 비롯하여 polyacetylene, 산성다당체, 인삼 단백질, 유리당, 알카로이드, 페놀성분, 지방산, 정유성분 등이 알려져 있으며, 그 이외에 비타민, 무기질 같은 영양성분들이 보고되어 있다 (Jo *et al.*, 2011, 2014; Park *et al.*, 2007). 인삼의 ginsenoside 성분은 다른 식물 사포닌과 달리 과량 투여에 의한 독성이 없으며, 동맥경화 예방, 간기능 촉진, 합압작용, 항산화 및 항당뇨 작용, 두뇌활동 촉진 등의 활성을 나타낸다 (Kim and Lee, 2011; Tark *et al.*, 2009). 지금까지 약 66종의 ginsenoside가 발견되었으며 고려인삼 (*Panax ginseng*)에서 38종 (홍삼 31종, 백삼 25종), 미국삼 (*Panax quinquefolius* L.)에서 19종, 삼칠삼 (*Panax notoginseng* Burkill)에서 29종의 ginsenoside 화학 구조가 밝혀졌다 (Kim *et al.*, 2014). 건강기능식품 전체 생산량의 약 절반을 차지할 정도로 인삼에 대한 관심과 소비가 지속되고 국외 인지도가 높은 만큼 새로운 ginsenoside 분리, 구조분석 및 효능에 대한 연구는 지속적으로 활발히 진행되고 있다.

인삼의 품질관리 기준은 제도적으로 현재 「인삼 산업법」의 시행규칙에 인삼 성분의 검사를 위해 진세노사이드 Rb1과 Rg1 성분에 대한 함량기준이 설정되어 있고, 진세노사이드 성분의 검사방법은 식품의약품안전처장이 고시한 「건강기능식품의 기준 및 규격」 및 국가기술표준원장이 고시한 「한국산업표준 (KS)」의 ‘건조인삼’ 시험방법을 준용하는 것으로 국립농산물품질관리원에서 고시하고 있다. 「한국산업표준 (KS)」에 제시된 HPLC에 의한 진세노사이드 성분 분석시간은 90분으로 다양한 ginsenoside를 동시 분석 가능하고, 「건강기능식품의 기준 및 규격」에서 제시하고 있는 HPLC 분석시간은 70분으로 ginsenoside Rb1과 Rg1의 함량만 정량하도록 되어 있는데 이 두 분석법들은 모두 분석시간이 너무 길다는 단점이 있다. 또한 HPLC 분석을 위한 진세노사이드의 효율적인 추출 방법이 매우 중요한데 (Kim *et al.*, 2008), 「한국산업표준 (KS)」와 「건강기능식품의 기준 및 규격」에서 사용되고 있는 추출법은 시료와 용매의 양이 많이 필요하며 특히 건강기능식품의 기준 및 규격에서는 환류추출 방법을 사용하여 실험 시간이 길며 실험하는 과정이 복잡하다. 따라서 본 연구에서는 짧은 시간 안에 다양한 ginsenoside의 분리능이 양호한 분석법을 확립하고, 동시에 기존의 공정서에 제시한 추출방법과 비교하여 인삼의 주요성분인 ginsenoside를 보다 더 효율적으로 추출할 수 있는 새로운 방법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 분석시료

분석에 사용한 인삼시료는 2개소에서 구입한 피부직삼 건시료로 금산에서 재배하여 수확한 4년근 시료를 사용하였고, 추출조건에 따른 함량 비교를 위해 건시료를 80 - 100 mesh로 분쇄하여 추출에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

인삼 추출물의 성분분석에 사용한 ginsenoside Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1 성분은 ChromaDex사 (Irvine, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. HPLC 이동상 용매인 MeOH과 acetonitrile은 HPLC급 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 인삼 지표성분 정량 분석에는 Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였다.

3. 추출 및 전처리 조건

새롭게 확립한 가온 초음파 추출조건을 비롯하여 KS법의 추출조건 및 건강기능식품의 기준 및 규격의 추출조건에 의해 추출된 추출물은 모두 Sep-pak Plus C18 cartridge (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 solid phase extraction (SPE) 전처리한 후 membrane filter 여과하여 HPLC 분석시료로 사용하였다.

1) 가온 초음파 추출-SPE 전처리법 (Method A)

80 - 100 mesh로 분쇄한 인삼 건조 시료 0.2 g을 원심분리 튜브에 평량해 담고 2 ml 70% MeOH을 넣고 균질하게 혼합 후 50°C에서 초음파추출기 (Powersonic 410, Hwashin Tech, Daegu, Korea)로 30분간 추출한다. 추출 후 원심분리 (15000 rpm, 3분)하여 상징액 1 ml는 SPE 전처리 하였는데 그 과정은 다음과 같다. Sep-pak Plus C18 cartridge를 3 ml MeOH로 서서히 용출시키고 다시 3 ml dd-H₂O로 용출시켜 conditioning 시켰다. 상징액 1 ml를 cartridge에 loading하고 10 ml dd-H₂O로 용출시켰다. Cartridge에 2 ml MeOH을 처리하여 ginsenoside 성분을 용출시켰다. HPLC분석을 위해 0.45 μm membrane filter로 여과 후 사용하였다 (Kim *et al.*, 2008).

2) 한국산업표준 (KS) 추출-SPE 전처리법 (Method B)

80 - 100 mesh로 분쇄한 인삼 건조 시료 1 g을 원심분리 튜브에 평량해 담고 10 ml 50% MeOH을 넣고 균질하게 혼합 후 초음파추출기 (Powersonic 410, Hwashin Tech, Daegu, Korea)에서 30분간 추출한다. 추출 후 원심분리 (3000 rpm, 10분)하여 상징액 1 ml는 가온 초음파 추출법과 동일하게 SPE

전처리 과정을 거친 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC분석에 사용하였다.

3) 건강기능식품의 기준 및 규격의 추출-SPE 전처리법 (Method C)

80 - 100 mesh로 분쇄한 인삼 건조 시료 1g을 원심분리 튜브에 평량해 담고 10 ml 50% MeOH을 넣고 균질하게 혼합 후 80°C의 환류냉각추출기에서 1시간 냉각추출 하였다. 방냉 후 원심분리 (3000 rpm, 10분)한 다음 상정액을 환저플라스크에 취한 후 위와 같은 방법으로 잔류물에 추출을 1회 더 반복하였다. 환저플라스크에 옮긴 상정액을 50°C 수조에서 rotary evaporator를 이용하여 진공농축하였다. 농축물을 증류수 2 ml에 용해 한 후 가운 초음파와 추출법과 동일하게 SPE 전처리 과정을 거친 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다.

4. 지표성분의 HPLC 분석

HPLC 분석은 Advanced Materials Technology사의 Halo[®] RP-Amide (4.6 \times 150 mm, 2.7 μm , Wilmington, DE, USA) 컬럼을 사용하여 50°C에서 실시하였다. 이동상은 acetonitrile을 6분 동안 27%에서 28%로 증가시킨 후, 4분 동안 28%로 유지, 다시 20분 동안 acetonitrile을 28%에서 34%로 증가시켰고 이후 3분 동안 34%에서 80%로 증가시켰으며 그 후에 2분 동안 acetonitrile을 27% 수준으로 유지시키는 조건으로 기울기 용리하였다. 이때 유속은 0.5 - 0.8 ml \cdot min⁻¹으로 하고, UV 검출기의 203 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. 정량분석법 검증 (Validation)

표준정량곡선 작성을 위한 지표성분들은 MeOH에 녹여 표준용액을 제조하였다. Ginsenoside Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1은 1.25 - 80 ng \cdot μl^{-1} 농도 범위에서 HPLC 분석을 하여 회귀식을 구하고 linearity를 검증하였다. 지표성분 표준품에 대하여 3종의 농도조건을 5일 동안 반복 분석하여 inter-day precision를 평가하고, 또한 연속으로 5회

분석하여 intra-day precision를 평가하여 정밀도 (precision) 및 정확도 (accuracy)를 구함으로써 재현성 (reproducibility)을 검증하였다. 각 ginsenoside 성분에 대한 최저 검출한계농도 (LOD), 최저 정량한계농도 (LOQ)는 표준정량곡선을 작성한 후 자동계산 되어지는 시그널 (S) 대비 노이즈 (N) 값인 S/N 값에서 각각 S/N 값이 3, 10일때의 농도로서 구하였다.

6. 통계분석

모든 분석은 3회 반복으로 실험 하였고, 결과 값은 means \pm SD 값으로 나타내었다. 결과 값에 대한 통계처리는 SAS Enterprise guide 4.3 프로그램 (Cary, NC, USA)을 사용하여, 분산분석 (ANOVA)과 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 $p < 0.05$ 수준에서 평균간의 유의적인 차이를 검증 하였다.

결과 및 고찰

인삼의 주요 ginsenoside 성분을 정량하기 위한 새로운 HPLC 조건을 설정하기 위해, 50°C에서 Halo[®] RP-Amide (4.6 \times 150 mm, 2.7 μm , DE, USA) 컬럼을 사용하여 acetonitrile과 H₂O 혼합용매로 기울기 용리하여 Fig. 1에서와 같이 ginsenoside Re, Rg1, Rf, Rb1, Rg2, Rh1, Rc, Rb2, Rb3, Rd의 분리능이 양호한 분석조건을 확립하였다. KS에서 소개한 기존 ginsenoside 분석법에는 주요 진세노사이드 성분인 ginsenoside Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1를 C18 컬럼을 사용하여 90분 동안 분석하는 조건을 제시하고 있으며, 건강기능식품의 기준 및 규격의 분석법에는 분석시간 70분 동안 ginsenoside Rb1, Rg1, Rg3의 함량만을 정량하도록 분석 조건이 제시되어 있다. Hong 등 (2009)은 KS와 건강기능식품의 기준 및 규격에서 제시된 분석법을 비교하여 새로운 신속분석 방법을 제시하였는데, 약 50분의 분석시간을 제시하였다. 그 외에도 Jia 등 (2013)은 Gemini 5 μm C18 column (4.6 \times 250 mm, 5 μm)과 LC-CAD를 사용하여 78분, Li 등 (2010)은 ProntoSIL CN (4.6 \times 250 mm) column, HPLC-ELSD로 130분, Lee 등

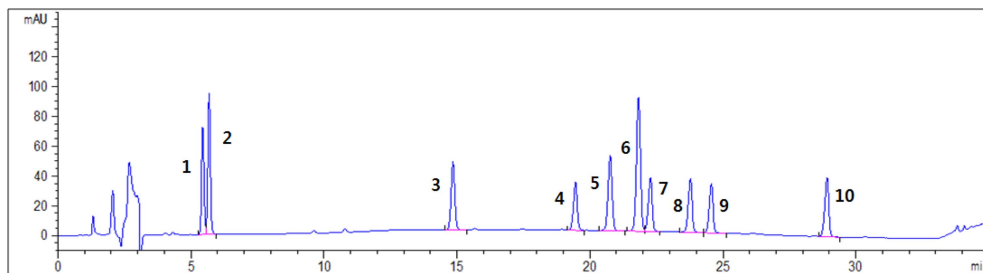


Fig. 1. HPLC profiles of ginsenosides. 1; ginsenoside Re, 2; ginsenoside Rg1, 3; ginsenoside Rf, 4; ginsenoside Rb1, 5; ginsenoside Rg2, 6; ginsenoside Rh1, 7; ginsenoside Rc, 8; ginsenoside Rb2, 9; ginsenoside Rb3, 10; ginsenoside Rd.

Table 1. Calibration data for ten ginsenoside compounds.

| Compound | Calibration curves | Correlation coefficient (r^2) | Concentration range ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) | LOD ¹⁾ ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) | LOQ ²⁾ ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) |
|----------|------------------------|-----------------------------------|--|--|--|
| Re | $y = 1.5374x + 4.8499$ | 0.9989 | 5-80 | 3.37 | 5.57 |
| Rg1 | $y = 2.1369x + 2.5790$ | 0.9994 | 5-80 | 3.10 | 4.75 |
| Rf | $y = 1.6064x + 1.7368$ | 0.9997 | 5-80 | 3.27 | 6.17 |
| Rb1 | $y = 1.1226x + 0.7434$ | 0.9998 | 5-80 | 3.71 | 8.32 |
| Rg2 | $y = 1.9304x + 1.6214$ | 0.9999 | 5-80 | 3.09 | 5.79 |
| Rh1 | $y = 3.4796x + 3.0023$ | 0.9997 | 2.5-80 | 2.41 | 3.95 |
| Rc | $y = 1.2646x + 1.3154$ | 0.9996 | 5-80 | 3.33 | 7.42 |
| Rb2 | $y = 1.2546x + 0.8165$ | 0.9998 | 5-80 | 3.32 | 7.42 |
| Rb3 | $y = 1.1209x + 0.7816$ | 0.9997 | 5-80 | 3.52 | 8.02 |
| Rd | $y = 1.4784x + 1.2913$ | 0.9997 | 5-80 | 2.86 | 6.48 |

¹⁾Limit of detection. ²⁾Limit of quantification.

(2012)은 HPLC-UV와 YMC-Pack ODS AM (4.6 × 250 mm, 5 μm) 컬럼을 사용하여 68분, Shin (2010)은 HPLC-UV, μ -Bondapak™ C18 column (3.9 × 300 mm, 10 μm) 컬럼 조건에서 90분간 분석하는 조건을 보고한 바 있다. 반면에, 이번에 새롭게 제안한 HPLC 분석법은 Halo® RP-Amide 컬럼을 이용하여 35분 이내에 10개 ginsenoside 성분 (ginsenoside Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1) 정량 분석이 가능하였다. 즉, 새롭게 제안한 HPLC 분석법은 KS와 건강기능식품의 기준 및 규격에서 제시한 기존 분석법들 보다 분석 시간이 짧고 다양한 ginsenoside 성분의 정성 및 정량 분석이 가능한 방법이었다.

새롭게 제안한 HPLC 분석법의 분석 조건을 validation 하기 위해, 2.5 - 80 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 농도 범위내에서 HPLC 분석하여 회귀식과 상관계수를 각각 구하였다. 이때 ginsenoside Re, Rg1, Rf, Rb1, Rg2, Rh1, Rc, Rb2, Rb3, Rd 성분의 회귀식은 Table 1에 나타내었으며, 상관계수 (r^2) 값이 각각 0.9989, 0.9994, 0.9997, 0.9998, 0.9999, 0.9997, 0.9996, 0.9998, 0.9997, 0.9997로서 넓은 농도 범위에서 높은 선형성을 나타내었다. 인삼 ginsenoside Re, Rg1, Rf, Rb1, Rg2, Rh1, Rc, Rb2, Rb3, Rd 성분의 S/N비에 의한 검출한계 (LOD)는 각각 3.37, 3.10, 3.27, 3.71, 3.09, 2.41, 3.33, 3.32, 3.52, 2.86 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 이었고, 정량한계농도 (LOQ)는 각각 5.57, 4.75, 6.17, 8.32, 5.79, 3.95, 7.42, 7.42, 8.02, 6.48 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 로 측정되어 (Table 1), 실질적인 백삼 시료에 함유한 주요 10종의 ginsenoside 성분의 정량분석을 위한 적용에는 문제가 없었다.

Ginsenoside Rb1, Rg1를 비롯한 총 10종의 ginsenoside 동시분석법인 새롭게 제안한 HPLC 분석법의 재현성을 검토하기 위해 각 성분에 대한 3종의 농도조건을 하루 동안 5회 분석 (intra-day) 및 5일 동안 반복 분석 (inter-day)으로 정밀도 (precision) 및 정확도 (accuracy)는 각각 상대표준오차 값과

회수율로서 구하여 Table 2에 나타내었다. Intra-day 정밀도는 5.09 - 7.59% 범위였으며, 정확도는 96.40 - 102.48% 범위를 나타내었다. 또한 inter-day 정밀도와 정확도는 각각 0.36 - 2.11%, 93.58 - 105.64 범위로 측정되었다 (Table 2). Intra-day 와 inter-day 결과는 주어진 농도 범위 내에서 약 15%를 벗어나지 않는 정확성을 보여주었다. Park 등 (2013)은 UPLC-PDA 시스템으로 홍삼분말, 홍삼 농축액, 홍삼 발효추출물 등에서 ginsenoside Ro 성분을 비롯한 총 30종의 ginsenoside 성분을 동시 분석하는 분석법을 제시하였는데, LOD, LOQ 값은 각각 0.04 - 1.91, 0.43 - 6.37 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 로서 본 연구의 분석법보다는 저농도까지 검출이 가능하였으나, 회수율은 89 - 118%로서 본 연구의 분석법보다는 정확도와 정밀도가 다소 떨어지는 경향이였다. HPLC 분석법 validation 결과는 새로운 HPLC 분석법이 인삼의 주요 ginsenoside 성분의 정량 분석에 적합하고 재현성이 우수한 방법임을 입증하였다. 따라서 새로운 HPLC 분석법을 이용한 인삼의 주요 ginsenoside 성분의 분석을 통해 인삼 사포닌 추출법, method A, B, C를 비교하여 새롭게 개선된 추출조건을 제시하는데 활용하였다.

기존 공정서상의 추출법인 KS 추출법 및 건강기능식품의 기준 및 규격의 추출법에 기초한 각각의 시료 추출 및 전처리법 method B, C는 1g의 시료와 10 ml의 용매를 사용하여 인삼시료를 추출하였는데, 새로운 시료 추출 및 전처리법인 method A는 0.2g의 시료와 2 ml의 추출용매를 사용하였다. Method A는 method B와 같은 초음파 추출법을 사용하여 추출을 하였지만 초음파 추출시 온도를 50°C로 설정해 주었다는 차이가 있으며, method C 방법보다는 추출방법이 간단하다. Hou 등 (2010)은 초음파 추출을 비롯하여, 초고압추출, 고속용매추출, 전자파 추출, 환류추출, 펄스전기장 추출 방법별 인삼의 ginsenoside 성분 함량을 비교 분석하였는데, 이때 전기장 추출과 초고압 추출에서 가장 함량이 높았다. 그러나, 전기장 추출의 경우는 분석 시료량과 용매가 많이 소요되는 단점

Table 2. Accuracy and precision data for HPLC analysis of ten ginsenoside compounds.

| Ginsenoside | Spiked Conc. (ng · μl ⁻¹) | Intra-day precision (n = 5) | | | Inter-day precision (n = 5) | | |
|-------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|---------|--------------|
| | | Measured (ng · μl ⁻¹) | RSD ¹⁾ (%) | Recovery ²⁾ (%) | Measured (ng · μl ⁻¹) | RSD (%) | Recovery (%) |
| Re | 10.00 | 10.03 ± 0.71 ¹⁾ | 7.07 | 100.30 | 9.36 ± 0.11 | 1.23 | 93.58 |
| | 50.00 | 50.81 ± 2.77 | 5.43 | 101.63 | 50.15 ± 0.29 | 0.57 | 100.31 |
| | 100.00 | 101.82 ± 5.57 | 5.45 | 101.82 | 103.72 ± 0.89 | 0.86 | 103.72 |
| Rg1 | 10.00 | 10.02 ± 0.76 | 7.59 | 100.15 | 9.99 ± 0.07 | 0.71 | 99.88 |
| | 50.00 | 50.83 ± 2.68 | 5.25 | 101.66 | 51.00 ± 0.27 | 0.54 | 102.01 |
| | 100.00 | 101.48 ± 5.36 | 5.26 | 101.48 | 104.51 ± 0.79 | 0.76 | 104.51 |
| Rf | 10.00 | 9.69 ± 0.60 | 6.13 | 96.86 | 10.21 ± 0.11 | 1.08 | 102.05 |
| | 50.00 | 50.64 ± 2.74 | 5.39 | 101.28 | 51.38 ± 0.18 | 0.36 | 102.77 |
| | 100.00 | 101.86 ± 5.50 | 5.37 | 101.86 | 104.92 ± 0.69 | 0.66 | 104.92 |
| Rb1 | 10.00 | 9.86 ± 0.75 | 7.49 | 98.61 | 10.19 ± 0.22 | 2.11 | 101.93 |
| | 50.00 | 50.60 ± 2.74 | 5.38 | 101.20 | 51.32 ± 0.56 | 1.09 | 102.63 |
| | 100.00 | 101.87 ± 5.55 | 5.42 | 101.87 | 105.20 ± 1.02 | 0.97 | 105.20 |
| Rg2 | 10.00 | 9.72 ± 0.71 | 7.21 | 97.23 | 10.38 ± 0.16 | 1.52 | 103.77 |
| | 50.00 | 50.77 ± 2.80 | 5.48 | 101.53 | 51.78 ± 0.21 | 0.41 | 103.56 |
| | 100.00 | 102.01 ± 5.35 | 5.22 | 102.01 | 105.64 ± 0.79 | 0.75 | 105.64 |
| Rh1 | 10.00 | 9.88 ± 0.64 | 6.47 | 98.84 | 10.34 ± 0.10 | 0.94 | 103.41 |
| | 50.00 | 50.96 ± 3.07 | 5.98 | 101.93 | 51.85 ± 0.32 | 0.63 | 103.70 |
| | 100.00 | 102.40 ± 5.35 | 5.20 | 102.40 | 105.38 ± 0.76 | 0.73 | 105.38 |
| Rc | 10.00 | 9.81 ± 0.70 | 7.11 | 98.12 | 10.43 ± 0.13 | 1.26 | 104.30 |
| | 50.00 | 50.88 ± 3.30 | 6.44 | 101.76 | 51.59 ± 0.29 | 0.57 | 103.17 |
| | 100.00 | 102.29 ± 5.45 | 5.30 | 102.29 | 104.59 ± 0.86 | 0.83 | 104.59 |
| Rb2 | 10.00 | 9.64 ± 0.68 | 7.10 | 96.40 | 10.52 ± 0.17 | 1.60 | 105.21 |
| | 50.00 | 50.67 ± 2.87 | 5.63 | 101.34 | 51.60 ± 0.36 | 0.71 | 103.21 |
| | 100.00 | 102.28 ± 5.48 | 5.34 | 102.28 | 104.77 ± 0.87 | 0.83 | 104.77 |
| Rb3 | 10.00 | 9.78 ± 0.62 | 6.32 | 97.83 | 10.39 ± 0.08 | 0.75 | 103.93 |
| | 50.00 | 50.98 ± 2.64 | 5.14 | 101.95 | 51.69 ± 0.39 | 0.75 | 103.37 |
| | 100.00 | 102.48 ± 5.35 | 5.20 | 102.48 | 104.98 ± 0.68 | 0.65 | 104.98 |
| Rd | 10.00 | 9.98 ± 0.63 | 6.28 | 99.76 | 10.33 ± 0.18 | 1.72 | 103.29 |
| | 50.00 | 50.54 ± 2.64 | 5.20 | 101.09 | 51.42 ± 0.41 | 0.80 | 102.83 |
| | 100.00 | 100.81 ± 5.16 | 5.09 | 100.81 | 104.85 ± 0.94 | 0.89 | 104.85 |

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. ¹⁾Relative standard deviation. ²⁾Recovery [% = Mean measured value / Nominal value (spiked amount)] × 100.

이 있었다. 초고압 추출의 경우는 고가의 초고압 추출장비가 필요한 점을 고려할 때, 비교적 간편한 초음파 추출이 품질분석을 위한 소량 시료 추출방법으로는 적합할 것으로 판단된다. 선행연구에서 추출 용매 및 조건별 인삼의 ginsenoside 성분의 추출효율을 비교하여 초음파추출 효율성에 대해 보고하였는데 (Kim *et al.*, 2008), 이는 본 연구의 추출 조건 확립에 바탕이 되었다. Method A와 기존 공정서상의 추출법에 기초한 method B, C를 이용하여 백삼시료 2종 (white ginseng 1, 2)을 추출한 후 ginsenoside를 새로운 HPLC 방법으로 분석한 결과, white ginseng 1에서 각각 추출물의 분리능은 Fig. 2와 같았으며, white ginseng 1, 2의 ginsenoside 함량은 Fig. 3과 같았다. White ginseng 1, 2를 method A 방법으로 추출한 결

과, 각각 ginsenoside Rg1은 0.274 ± 0.003, 0.271 ± 0.0102%, Rb1은 0.283 ± 0.004, 0.252 ± 0.011%를 나타내었고, method B 방법으로 추출한 결과, 각각 ginsenoside Rg1은 0.276 ± 0.004, 0.252 ± 0.010%, Rb1은 0.229 ± 0.008, 0.163 ± 0.005%를 나타내었으며, method C 방법으로 추출한 경우는 각각 ginsenoside Rg1은 0.245 ± 0.004, 0.248 ± 0.002%, Rb1은 0.257 ± 0.003, 0.244 ± 0.005%를 나타내었다. 즉, method A 방법이 기존 추출 및 전처리법 method B, C와 비교하여, ginsenoside Rb1, Rg1 두 성분 함량이 유의성 있게 높거나 비슷한 경향을 나타내었다. 특히, white ginseng 2 시료의 경우는 method B 방법에 의해서만 ginsenoside Rb1의 함량이 인삼 산업법에서 정한 인삼 성분 검사기준인 0.20%에 미달되

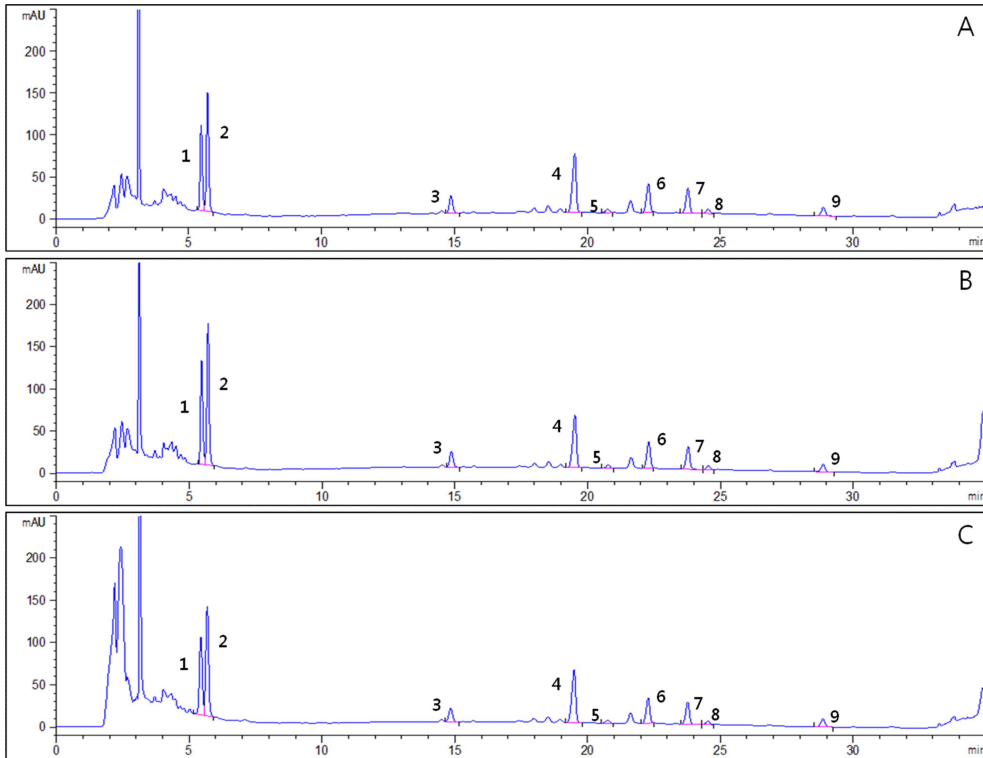


Fig. 2. HPLC profiles of ginsenosides from white ginseng 1 by different extraction. A; method A extraction, B; method B extraction, C; method C extraction. 1; ginsenoside Re, 2; ginsenoside Rg1, 3; ginsenoside Rf, 4; ginsenoside Rb1, 5; ginsenoside Rg2, 6; ginsenoside Rc, 7; ginsenoside Rb2, 8; ginsenoside Rb3, 9; ginsenoside Rd.

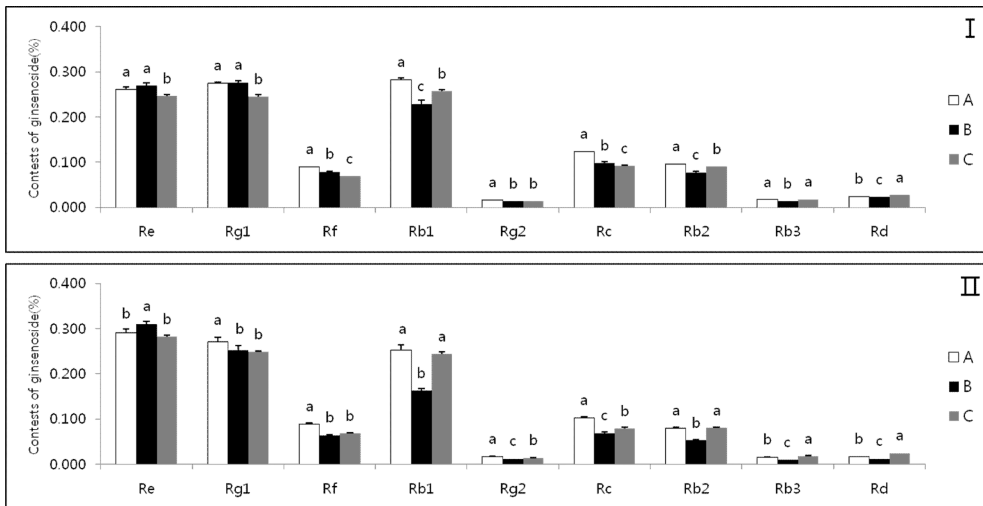


Fig. 3. Contents of ginsenoside compounds in the extracts from ginseng radix by different extraction conditions. I; white ginseng 1, II; white ginseng 2, A; method A, B; method B, C; method C. All values are means \pm SD ($n = 3$). Means with different letter (a - c) within same compound are significantly different at $p < 0.05$.

었는데, 이것은 method A, C 방법이 추출시 가온조건이 들어가는 것에 반해 method B 방법은 가온조건 없이 초음파 추출을 하기 때문에 추출효율이 상대적으로 떨어지는 것에 기인

하는 것으로 해석되었다. 또한, 추출단계의 가온조건은 malonyl-ginsenoside Rb1의 분해를 촉진하여 ginsenoside Rb1의 함량을 증가시킬 수 있음을 추정할 수 있었다 (Choi *et al.*, 2010).

Table 3. Total contents of ginsenoside compounds in the extracts from ginseng radix by different extraction conditions.

| Extraction conditions | White ginseng 1 (%) | RSD (%) | White ginseng 2 (%) | RSD ¹⁾ (%) |
|-----------------------|---------------------|---------|---------------------|-----------------------|
| A | 1.187 ± 0.006a | 0.542 | 1.133 ± 0.037a* | 3.256 |
| B | 1.078 ± 0.028b | 2.630 | 0.943 ± 0.027c | 2.820 |
| C | 1.056 ± 0.014b | 1.300 | 1.054 ± 0.017b | 1.657 |

Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown (n = 3). *Means within a column followed by the same letter are not significantly different based on the DMRT test (p < 0.05). ¹⁾RSD; Relative Standard Deviation. A; method A, B; method B, C; method C.

Method A, B, C 방법으로 추출된 추출물의 total ginsenoside의 함량 값은 Table 3에 나타내었다. White ginseng 1, 2의 total ginsenoside의 함량은 method A 방법으로 추출시 각각 1.187 ± 0.006%, 1.133 ± 0.037%, method B 방법으로 추출시 각각 1.078 ± 0.028%, 0.943 ± 0.027%, method C 방법으로 추출시 각각 1.056 ± 0.014%, 1.054 ± 0.017%를 나타내었는데, white ginseng 1, 2 시료 모두 method A 방법을 적용한 것이 다른 두 추출, 전처리 방법을 적용한 것보다 유의성 있게 높은 함량을 보였다.

이상의 결과들로부터, 새롭게 확립된 새로운 HPLC 분석방법이 기존의 KS 또는 건강기능식품의 기준 및 규격과 같은 공정서에서 제시하는 ginsenoside 분석방법과 비교하여 ginsenoside를 보다 신속하게 분석, 정량 할 수 있는 분석방법이었으며, 또한 새로운 가온 초음파 추출법은 두 공정서에 제시한 추출법보다 ginsenoside 추출효율이 증진되어 ginsenoside 함량이 유의성 있게 높거나 비슷한 경향을 나타내었다. 더욱이 새로운 추출 방법은 시료와 용매의 양을 절감할 수 있고 실험 방법이 간단하여 높은 재현성을 기대할 수 있을 뿐 아니라 분석시간을 단축할 수 있는 장점이 있는 것으로 판단되었다. 현재 인삼 산업법에 근거하여, 인삼 (백삼)의 품질검사를 위한 지표성분으로 ginsenoside Rb1, Rg1의 함량기준이 각각 0.20, 0.10%로 설정되어 있는데, 한 때 ginsenoside Rb1의 함량 기준이 미달되는 제품이 많아 ginsenoside 함량 기준의 개선에 대한 논란이 제기되기도 하였다. 그러나, ginsenoside Rb1, Rg1의 함량 0.20, 0.10% 이상의 기준은 대한약전 뿐 아니라 일본 등 외국 의 약전에도 적용되는 보편적인 기준으로, 이 기준보다 더 낮은 함량으로 인삼 성분 검사기준을 적용시 국내 인삼의 품질 관리 기준이 하향 조정되기 때문에 품질관리가 허술해질 수 있다는 우려가 있다. 본 연구결과는 동일한 인삼 시료일지라도 추출방법에 따라서 ginsenoside Rb1의 함량이 인삼 성분 검사기준에 미달되는 사례가 있을 수 있음을 시사하고 있다. Ginsenoside 성분 추출에는 최소한 50°C 이상의 가온 조건을 추가하여 ginsenoside 성분의 추출효율을 증진시키는 과정이 매우 중요함을 알 수 있었다. 즉, 현재 인삼 성분 검사시 추

출방법으로 사용되는 방법 중에서, KS 추출방법 보다는 건강 기능식품의 기준 및 규격에서 제시하는 인삼 추출방법이 더 적절하다고 판단되어진다. 또한, 새롭게 제안된 가온 초음파 추출법도 ginsenoside 함량이 건강기능식품의 기준 및 규격의 방법보다 떨어지지 않고, 분석 시간도 더 단축되고 실험과정이 간편한 것을 고려하면 매우 효율적인 시료 추출법이라고 판단되었다.

본 연구에서 확립된 새로운 인삼 추출법과 새로운 HPLC 분석법은 백삼 뿐 아니라 다양한 인삼의 품질관리를 위한 ginsenoside 성분검사 방법으로서 매우 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 FTA 대응경쟁력향상기술개발사업의 지원에 의해 수행된 연구과제(과제번호: PJ01077301)의 일부 결과로서 이에 감사드립니다.

REFERENCES

Choi JE, Nam KY, Li X, Kim BY, Cho HS and Hwang KB. (2010). Changes of chemical compositions and ginsenoside contents of different root parts of ginsengs with processing method. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:118-125.

Hong HD, Choi SY, Kim YC, Lee YC and Cho CW. (2009). Rapid determination of ginsenosides Rb1, Rf, and Rg1 in Korean ginseng using HPLC. Journal of Ginseng Research. 33:8-12.

Hou J, He S, Ling M, Li W, Dong R, Pan Y and Zheng Y. (2010). A method of extracting ginsenosides from *Panax ginseng* by pulsed electric field. Journal of Separation Science. 33:2707-2713.

Jia S, Li J, Yunusova N, Park JH, Kwon SW and Lee J. (2013). A new application of charged aerosol detection in liquid chromatography for the simultaneous determination of polar and less polar ginsenosides in ginseng products. Phytochemical Analysis. 24:374-380.

Jo HK, Im BO and Ko SK. (2014). The change of ginsenoside composition in white ginseng and fine white ginseng extract by the microwave and vinegar process. Korean Journal of Pharmacognosy. 45:77-83.

Jo JE, Kim KH, Kim MS, Choi JE, Byun MW and Yook HS. (2011). Antioxidant activity from different root parts of 6-year-old *Panax ginseng* C. A. Meyer(Yun-poong). Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 40:493-499.

Kim AR and Lee MS. (2011). Screening of antimicrobial activity compounds from Korea ginseng fine root. Journal of Life Science. 21:1244-1250.

Kim GS, Hyun DY, Kim YO, Lee SE, Kwon H, Cha SW, Park CB and Kim YB. (2010). Investigation of ginsenosides in different parts of *Panax ginseng* cultured by hydroponics.

- Korean Journal of Horticultural Science and Technology. 28:216-226.
- Kim GS, Hyun DY, Kim YO, Lee SW, Kim YC, Lee SE, Son YD, Lee MJ, Park CB, Park HK, Cha SW and Song KS.** (2008). Extraction and preprocessing methods for ginsenosides analysis of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:446-454.
- Kim JM, Cho WJ, Yoon HS and Bang IS.** (2014). Transcriptome analysis of human HaCaT keratinocytes by ginsenosides Rb1 and Rg1. Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society. 15:6774-6781.
- Lee SW, Park JM, Kim GS, Park KC, Jang IB, Lee SH, Kang SW and Cha SW.** (2012). Comparison of growth characteristics and ginsenosides content of 6-year-old ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) by drainage class in paddy field. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 20:177-183.
- Li X, Kang SJ, Han JS, Kim JS and Choi JE.** (2010). Comparison of growth increment and ginsenoside content in different parts of ginseng cultivated by direct seeding and transplanting. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:70-73.
- Park HW, In G, Han ST, Lee MW, Kim SY, Kim KT, Cho BG, Han GH and Chang IM.** (2013). Simultaneous determination of 30 ginsenosides in *Panax ginseng* preparations using ultra performance liquid chromatography. Journal of Ginseng Research. 37:457-467.
- Park JY, Lee CY and Won JY.** (2007). Analytical optimum of ginsenosides according to the gradient elution of mobile phase in high performance liquid chromatography. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:215-219.
- Shin YS.** (2010). Comparisons of ginsenosides and anti-inflammatory effects of white ginseng and puffed red ginseng. Korean Journal of food and Cookery Science. 26:475-480.
- Tark KM, Son MH and Chae HJ.** (2009). Optimal analytical conditions for *Panax ginseng* ginsenosides using HPLC and ginsenosides content analysis of red ginseng products and their raw materials. Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society. 10:418-424.