creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사 학위논문

인삼 계통의 대사체 프로파일링과 다변량 분석

Metabolic profiling and multivariate analysis of *Panax ginseng* accessions

2016 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 생약학전공

김 대 현

국문초록

인삼은 고대로부터 다양한 약리적 활성이 인정되어 전세계적으로 가장 널리 사용되고 있는 약용 작물중의 하나이다. 인삼은 ginsenosdie 를 비롯한 다양한 대사체를 함유하고 있으며, 이들은 품종, 재배환경 등 다양한 내외부적 요인에 따라 큰 변동성을 보이는 것으로 알려져 있다. 특히 최근에는 고분해능 분석장비를 활용한 식물대사체학 연구를 통해, 우수한 대사체 특성을 보유한 우수한 인삼 계통을 발굴하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 본 연구에서는, 국내연구기관에서 공급받은 60 계통의 인삼열매와 뿌리에 대해 NMR 과 UPLC/MS 를 기반한 일차 및 이차대사체 프로파일링과 다변량 분석을 통해 계통별 인삼의 대사체 특성을 파악하고자 하였다.

인삼 60 계통 각각의 열매와 뿌리에 대해 일차와 이차대사산물에 대한 프로파일링을 수행한 결과, 일차대사산물로서 당, 아미노산, 유기산 등이 확인되었으며, 특징적으로 뿌리의 주된 당류인 sucrose 가 열매에서 확인되지 않았다. 인삼의 독특한 이차대사산물인 ginsenoside 의 경우, 뿌리와 열매에서 서로 다른 특성을 보였다. 열매의 경우, 뿌리에서 일반적으로 보고되지 않는 것으로 알려진 드문 ginsenoside 계열 화합물들이 다수 발견되었으며, 뿌리에 비해 ginsenoside Re 의 상대적 양이 월등히 많은 것이 특징이다. 또한, 60 여종의 계통간에서도 일차 및 이차대사산물의 프로파일이 분명한 차이를 보이는 것을 확인하였다.

이상의 결과를 주성분분석 (Principal component analysis:PCA)을 시행하여, 인삼 계통의 특성 연구에 적용가능한지 알아보고자 하였다. 열매의 경우, 대사체에 따른 계통의 그룹화가 이루어지지 않았으며, 뿌리는 sucrose 함량에 따라 뚜렷하게 나뉘는 것을 확인할 수 있었다. 이에 주성분 분석 결과에 따라, 전체 계통을 HSG (High sucrose group)와 LSG (Low sucrose group)의 하위그룹으로 나눈 후 각

그룹에 대해 추가적인 PCA 를 진행하였다. 또한 일차대사산물에서 당의 함유량이 절대적이므로, 이를 제외한 다른 성분들에 대한 계통 구분 경향성을 관찰하기 위하여 2 개의 하위그룹에서 당을 제외하고 또 다른 PCA 를 실시하였다. 열매의 경우 하위그룹에서도 계통 간 명확한 구분은 관찰할 수 없었고, 뿌리에서는 하위그룹의 연속적인 분류와 함께 다양한 마커 발굴이 가능했다. 뿌리의 경우, ginsenoside Rd 와 이 계열의 배당체인 ginsenoside Rb_1, Rb_2, Rc 가 동일한 경향성을 보였다. 또한 ginsenoside Rb_2 와 Rc 에 xylose 가 결합한 ginsenoside Ra_1 과 Ra_2 의 경우, ginsenoside Rb_2 와 Rc 의 함량이 높은 계통은 ginsenoside Ra_1 과 Ra_2 의 함량이 낮은 것으로 나타났고, 이는 ginsenoside Rb_2 와 Ra_1, Rc 와 Ra_2 가 인삼 뿌리에서 상호보완적으로 존재한다는 것을 유추할 수 있다.

이상의 연구 결과는, 추후 인삼의 일차대사산물과 ginsenoside 생합성의 상관관계에 대한 특성을 파악하는 기반 자료로 활용될 수 있을 뿐 아니라, 우수한 특성을 갖는 인삼의 계통 선발의 유용한 근거 자료로 활용될 것으로 기대된다.

주요어 : 인삼 (*Panax ginseng*), 인삼 열매 (Ginseng berry), UPLC-QTOF MS, NMR, 주성분분석 (PCA)

학 번 : 2013-23455

Contents

국문초록..... i
Contents.....iii
List of Tables..... v
List of Figures..... vi
List of Abbreviations.....viii

Ⅰ. 서 론.....1

Ⅱ. 인삼의 일차와 이차대사체 프로파일링.....4
A. 실험 재료 및 방법.....4
1. 실험재료.....4
2. 시약 및 기기.....4
2.1. 시약.....4
2.1.1. NMR 측정용 시약.....4
2.1.2. UPLC/MS 측정용 시약.....5
2.2. 기기.....5
3. 시료의 제조.....9
3.1. NMR 측정용 시료의 제조.....9
3.2. UPLC/MS 측정용 시료의 제조.....9
4. 기기분석 방법.....9
4.1. NMR 측정과 분석.....9
4.2. UPLC/MS 측정과 분석.....10
B. 결과 및 고찰.....12
1. NMR 을 이용한 인삼의 일차대사체 분석.....12
1.1. 전처리 조건 최적화.....12
1.2. 대사산물의 동정.....13

1.2.1. 열매 13
1.2.2. 뿌리 17
1.3. 대사산물의 정량 21
1.3.1. 열매 21
1.3.2. 뿌리 26
2. UPLC/MS 를 이용한 인삼의 이차대사체 분석 31
2.1. 대사산물의 동정 31
2.1.1. 열매 32
2.1.2. 뿌리 38
2.2. 인삼 열매의 진세노사이드 44
3. 열매와 뿌리의 일차대사체와 이차대사체 비교 46
3.1. 일차대사체 비교 46
3.2. 이차대사체 비교 48

Ⅲ. 다변량 분석 52
A. 분석 방법 52
B. 결과 및 고찰 53
1. 주성분 분석 53
2. 하위 그룹의 주성분 분석 55

Ⅵ. 계층적 군집 분석 69
A. 분석 방법 69
B. 결과 및 고찰 69

Ⅴ. 결 론 74

Ⅵ. 참고문헌 75

Abstract 82

List of Tables

Table 1. List of 60 ginseng accessions 6
Table 2. Morphological information of the ginseng accessions 6
Table 3. Identified metabolites in berries 15
Table 4. Identified metabolites in roots 19
Table 5. Contents of primary metabolites in berry extracts 22
Table 6. Contents of primary metabolites in root extracts 27
Table 7. Components that were identified from ginseng berries 34
Table 8. Components that were identified from ginseng roots 40
Table 9. Top 10 accessions of relative amount of ginsenosides 50
Table 10. Metabolic markers contributing to discrimination of HSG 64
Table 11. Metabolic markers contributing to discrimination of LSG 66

List of Figures

Figure 1. ^{1}H NMR spectra of berry extracts 12

Figure 2. Representative ^{1}H-NMR spectrum of berry extracts..... 14

Figure 3. Representative ^{1}H-NMR spectrum of root extracts..... 18

Figure 4. MS spectral data and fragmentation patters of acetyl ginsenoside Re..... 32

Figure 5. Representative BPI chromatograms of berry extracts..... 33

Figure 6. Representative BPI chromatograms of root extracts..... 39

Figure 7. Chemical structures of identified ginsenosdies in berries..... 44

Figure 8. Contents of primary metabolites in berries and roots 47

Figure 9. Relative contents of ginsenosides and identified ginsenosides in berries and roots 49

Figure 10. PCA Score plots of berries (A), (B) and roots (C), (D) using LC-MS data (A), (C) and NMR data (B), (D) 53

Figure 11. S-plot of OPLS-DA from roots using NMR data 55

Figure 12. PCA Score plots of berries using NMR data (A), (B), (C), (D) and LC-MS data (E), (F) 56

Figure 13. PCA Score plot (A), OPLD-DA (B) and s-plot (C) of HSG of roots using NMR data 59

Figure 14. PCA Score plot (A) and s-plot (B) of LSG of roots using NMR data ... 60

Figure 15. PCA Score plot and loading plot of HSG of roots using NMR data (Excluding sugars) 61

Figure 16. PCA Score plot (A) and loading plot (B) of LSG of roots using NMR data (Excluding sugars) 62

Figure 17. PCA Score plot (A), OPLD-DA (B) and s-plot (C) of HSG of roots using LC-MS data..... 63

Figure 18. PCA Score plot (A), PLD-DA (B) and loading plot (C) of LSG of roots using LC-MS data..... 65

Figure 19. Relation with biosynthetic pathway of ginsenosides 67
Figure 20. HCA of HSG and LSG of berries (A), (B) and roots (C), (D) using NMR data..... 70
Figure 21. HCA of HSG and LSG of berries (A), (B) and roots (C), (D) using LC-MS data..... 72

List of Abbreviations

AcCN : acetonitrile

D_2O : deuterium oxide

DSS : 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid

ESI : electron spray ionization

MeOH : methanol

G : ginsenoside

HPLC : high performance liquid chromatography

HSQC : heteronuclear single quantum coherence

HMBC: heteronuclear Multiple Bond Correlation

Hz : hertz

LC : liquid chromatography

m : malonyl

Ac : acetyl

MeOH : methanol

MS : mass spectrometry

NMR : nuclear magnetic resonance

OPLS-DA : orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis

PCA : principal component analysis

HCA: hierarchical cluster analysis

HSG: high sucrose group

LSG: low sucrose group

PPD : protopanaxadiol

PPT : protopanaxatriol

QC : quality control

QTOF : quadrupole time of flight

t_R : retention time (RT)

UPLC : ultra performance liquid chromatography

VIP : variable importance in projection

Ⅰ. 서 론

인삼(Panax ginseng C. A. Meyer (Araliaceae))은 고대 이후 일찍부터 약용식물로서의 효능을 인정받아 왔으며 현재까지 세계적으로 널리 사용되고 있는 약초이다. ginsenoside 는 다양한 생물학적 활성과 약물학적 효과를 가지는 인삼의 주요 성분이며 (Carlini, 2003, Xie et al., 2005, Nah et al., 2007, Choi, 2008) 당이 결합한 위치에 따라 protopanaxadiol (PPD)과 protopanaxatriol (PPT)로 분류된다 (Yang et al., 2014b). PPD 타입은 3 번 혹은 20 번 위치에 당이 결합하고 ginsenoside Rb_1, Rb_2, Rc, Rd 등이 여기에 속하며 PPT 타입은 대부분 6 번 혹은 20 번 위치에 당이 결합하고 ginsenoside Re, Rf, Rg_1, Rg_2 등이 여기에 속한다.

본 연구에서는 인삼근과 동일계통을 가지는 인삼 열매를 함께 연구하였다. 인삼 열매는 4 년근 인삼에서만 재배될 수 있으나 일반적으로 뿌리 생장을 위해 제거되고, 수급과 보관이 어려워 그 동안 널리 사용되지 못하였다. 인삼 열매에서도 인삼근에서 알려진 주요 성분들을 포함하고 있으며 특이적으로 ginsenoside Re 의 함량이 높다고 보고되었다 (Wang et al., 2006, Sugimoto et al., 2009, Kim et al., 2011b). ginsenoside Re 는 특히 항비만 효능이 우수하고 암세포에 대한 항증식능을 가지는 것으로 알려져 있다 (Xie et al., 2002, Peng et al., 2012). 또한 당뇨모델 및 고혈당 동물모델에서 인삼열매가 인삼뿌리보다 우수한 항당뇨활성과 항고혈당효과가 있음을 입증하였고, ginsenoside 함량 비교에서 인삼열매의 ginsenoside Re 를 뿌리와 구분되는 인삼열매의 특징인 것으로 보고하였다 (Attele et al., 2002, Dey et al., 2003).

본 연구에서 인삼의 열매와 뿌리의 대사산물을 대사체학의 관점으로 접근하였다. 대사체학은 생물학, 식물 생리 연구, 농작물의 품질 관리를

포함한 농업 분야 등 광범위한 범위에서 이용되고 있고 약용식물에서 대사체학은 대사체 분석과 프로파일링에 효과적인 도구가 될 수 있다. 대표적인 장비는 질량 분광분석과 결합한 액체나 기체 크로마토그래피와 핵자기공명과 같은 분광기법을 포함하며 이것은 약용식물의 품질 관리로 주로 사용된다 (Lee et al., 2009, Kim et al., 2012, Yang et al., 2012, Zhang et al., 2013, Cui et al., 2016). 현재까지 LC-MS, GC-MS, HPLC-ESI-MS/MS, UPLC-(Q)TOF-MS (/MS) 등을 포함하는 수많은 하이픈 기술 (hyphenated techniques)이 인삼 분석에 적용되고 있다. 이 중에서 UPLC-Q-TOF-MS (/MS)는 약용식물의 화학적 프로파일링을 빠르게 나타내는 데에 가장 수준 높은 기술이다. UPLC 는 유지시간을 재현성 있게 향상시키고, 분리능과 감도를 증가시킨다. 또한 Q-TOF-MS 는 낮은 에너지의 충돌유도해리 (collision-induced dissociation)를 가지며 분석물의 정확한 질량 값을 제공하기 때문에 UPLC-Q-TOF-MS(/MS)는 인삼의 ginsenoside 분석에 있어 가장 널리 사용되는 방법 중의 하나이다. (Sun et al., 2012).

대사체학에서 ^{1}H NMR 은 시료에서 당질, 유기산, 아미노산, 지방질, 페놀 화합물 등의 화학적 성분들을 동시에 확인할 수 있다는 장점이 있다. 또한 시료 제조가 간단하고 재현성이 우수하며 분자에 상관없이 모든 proton 이 동등한 signal 을 내기 때문에 검량선 없이도 내부 표준 물질과의 비교를 통해 대사체의 함량을 결정할 수 있다 (Kim et al., 2011a).

본 연구에서는 60 계통의 인삼 열매와 뿌리에 대해 NMR 과 UPLC/MS 를 기반한 일차대사체와 이차대사체 프로파일링을 수행하였다. 이를 토대로 다변량 분석 (multivariate analysis)을 실시하여 대사체에 따라 계통간에 구분이 있는지 확인하고 구분에 크게 영향을 주는 마커를 발굴하였다.

이러한 결과들로 인삼 뿌리와 열매의 대사체 차이, 계통 간의 구분, 대사체의 경향성이 인삼에서 의미하는 바를 도출하고, 나아가 연구영역을 확장하여 우수한 계통 선발의 기반 자료로의 활용 및 인삼 대사체 간의 세부 관계를 밝히는 데에 이용되고자 하였다.

Ⅱ. 인삼의 일차대사체와 이차대사체 프로파일링

A. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 *Panax ginseng* 의 열매와 뿌리는 농촌진흥청 인삼특작부에서 제공받은 것으로, 모두 고려인삼, 6 년생이며 음성에서 재배되었고, 파종방법은 이식, 포장구분은 밭포장이며 적색의 열매색을 가진 인삼이다. 엽색, 소엽 모양 등 14 개의 형태학적 특성에 따라서 각 계통이 구분된 서로 다른 계통의 60 개 샘플 (Table 1)로, 열매와 뿌리 모두 균질하게 분쇄하여 사용하였다. 60 개 계통의 형태학적 정보는 Table 2 에 나타내었다. 열매 60 종, 동일 계통을 가진 뿌리까지 총 120 종의 시료를 실험재료로 사용하였다.

2. 시약 및 기기

2.1. 시약

2.1.1. NMR 측정용 시약

인삼의 일차대사체 추출에 사용된 용매는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)에서 구입한 Deuterium oxide (D_2O)와 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) 에서 구입한 1% (w/w) DSS 가 포함된 D_2O 를 사용하였다. Potassium phosphate buffer 제조를 위해 KH_2PO_4 (Jusei Chemical, Tokyo, Japan)와 K_2HPO_4 (Yakuri Pure Chemicals, Kyoto, Japan)를 사용하였다.

2.1.2. UPLC/MS 측정용 시약

실험재료의 추출과 시료 제조 및 UPLC 분석에 사용한 아세토나이트릴, 메탄올과 물은 J.T. Baker®의 HPLC grade 용매 (Avantor Performance Materials. Inc., USA)를 사용하였고 질량분석용 포름산은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

2.2. 기기

NMR: Bruker AVANCE 600 (600 MHz), Bruker Biospin, Germany

- 5 mm TXI probe at 298K

Centrifuge: Micro 17TR micro high speed centrifuge, Hanil, Korea

Sonicator: Branson 8510, USA

UPLC-QTOF MS system

- Waters Acquity UPLC® system, Waters Co., Milford, MA, USA
- Column : Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 mm x 100 mm, 1.7 μm
- Waters Xevo G2 QTOF mass spectrometer, Waters MS Technologies, Manchester, UK

Analytical balance: Mettler AE 50, Switzerland

Drying oven: CO-2D-1S, Wooju Sci. Co., Korea

Sonicator: Branson 8510, USA

Table 1. List of 60 ginseng accessions

번호	시료명	번호	시료명	번호	시료명
1	G03004	21	G03045	41	G03078
2	G03005	22	G03047	42	G03079
3	G03007	23	G03049	43	G03080
4	G03009	24	G03052	44	G03081
5	G03010	25	G03054	45	G03083
6	G03012	26	G03055	46	G03084
7	G03015	27	G03056	47	G03086
8	G03017	28	G03058	48	G03089
9	G03021	29	G03059	49	G03092
10	G03022	30	G03060	50	G03093
11	G03026	31	G03061	51	G03096
12	G03029	32	G03062	52	G03105
13	G03030	33	G03063	53	G03107
14	G03031	34	G03064	54	G03109
15	G03035	35	G03065	55	G03110
16	G03036	36	G03067	56	G03111
17	G03037	37	G03069	57	G03112
18	G03039	38	G03072	58	G03114
19	G03040	39	G03075	59	G03118
20	G03042	40	G03076	60	G03119

Table 2. Morphological information of the ginseng accessions

시료명	줄기색 (1~4)	줄기 자색 분포 위치 (1~5)	탁엽 발생 정도 (1~3)	잎면 주름 정도 (1~4)	엽색 (1~3)	소엽 모양 (1~7)	소엽 자른면 (1~3)
G03004	2	4	3	3	1	1	2
G03005	1	4	2	3	2	1	2
G03007	1	4	3	3	3	1	3
G03009	3	2	3	4	2	1	2
G03010	2	3	3	4	2	7	3
G03012	1	4	3	3	2	6	3
G03015	3	2	2	3	2	4	1
G03017	2	3	2	2	2	7	2
G03021	1	4	1	3	2	4	2
G03022	2	3	1	3	2	1	3
G03026	2	2	3	3	2	7	3
G03029	3	2	2	2	3	6	3
G03030	1	4	2	3	2	2	3
G03031	1	4	2	3	3	5	3
G03035	1	4	2	3	3	4	3
G03036	1	4	3	4	2	1	2
G03037	2	3	1	3	2	4	2
G03039	3	2	2	3	2	4	3

G03040	3	3	2	2	2	1	2
G03042	3	2	2	3	3	4	2
G03045	1	4	1	3	3	1	3
G03047	3	2	2	3	2	1	3
G03049	3	2	2	3	2	1	2
G03052	2	3	2	2	2	1	3
G03054	2	3	2	3	2	3	3
G03055	1	4	2	2	2	7	3
G03056	2	3	3	3	2	4	2
G03058	3	1	3	2	2	1	2
G03059	3	2	2	3	2	4	2
G03060	1	4	2	2	2	1	1
G03061	3	1	2	2	2	1	2
G03062	3	2	3	4	3	1	3
G03063	1	4	2	4	3	1	2
G03064	1	4	2	3	3	1	3
G03065	3	2	2	3	2	1	2
G03067	2	3	3	3	2	4	2
G03069	3	2	2	2	2	2	3
G03072	1	4	2	3	2	1	3
G03075	3	2	2	3	2	3	2
G03076	1	4	3	2	2	7	3
G03078	2	3	3	3	2	1	2
G03079	1	4	2	4	3	7	3
G03080	1	4	1	4	3	7	3
G03081	2	4	3	2	2	2	2
G03083	1	4	2	2	2	4	2
G03084	3	2	2	2	2	4	2
G03086	3	2	2	2	2	6	2
G03089	2	4	2	2	2	7	3
G03092	2	4	2	4	2	2	2
G03093	1	4	2	2	2	1	3
G03096	2	3	2	2	2	1	2
G03105	2	3	2	4	2	1	1
G03107	3	3	2	2	2	1	3
G03109	3	3	3	2	2	1	2
G03110	2	4	2	2	3	1	2
G03111	1	4	2	2	3	1	3
G03112	2	4	2	2	2	1	2
G03114	4	3	2	2	2	1	2
G03118	1	4	3	2	2	7	2
G03119	1	4	3	3	2	1	2

Table 2. (continued)

시료명	소엽거치 (1~3)	꽃송이 모양 (1~7)	소화경 자세 (1~3)	다경유무 (1~4)	열매색 (1−7)	열매모양 (1~4)	종자성숙기 (1−5)
G03004	2	1	1	2	5	2	2
G03005	2	3	1	2	4	2	2
G03007	2	3	2	2	4	2	2.5
G03009	3	1	1	2	4	3	2.5
G03010	3	1	2	3	5	2	5
G03012	2	1	1	3	4	2	3

G03015	3	3	1	2	5	2	1.5
G03017	2	1	1	2	4	2	3.5
G03021	2	1	1	2	5	2	3
G03022	2	3	1	1	4	2	4
G03026	2	3	2	2	4	2	3
G03029	2	1	2	2	3	2	3
G03030	2	1	1	3	4	2	3
G03031	2	1	2	1	5	2	2.5
G03035	2	1	2	1	5	2	3
G03036	3	3	1	1	5	2	1.5
G03037	2	1	2	4	4	3	2
G03039	2	1	1	4	4	3	4
G03040	2	3	1	2	4	2	3.5
G03042	2	3	1	2	5	3	1.5
G03045	2	1	1	2	5	3	1
G03047	2	1	2	1	4	2	3
G03049	2	1	1	1	5	2	5
G03052	2	3	1	2	5	2	2.5
G03054	2	1	1	1	5	2	2
G03055	2	1	1	1	5	2	3.5
G03056	2	3	1	3	4	3	2.5
G03058	2	3	1	2	5	2	3.5
G03059	2	1	1	1	5	2	3.5
G03060	2	1	2	2	5	2	4.5
G03061	2	1	1	3	4	2	2.5
G03062	2	3	1	2	5	3	3
G03063	2	3	1	3	5	2	4
G03064	2	1	1	1	5	3	3.5
G03065	2	3	1	3	5	2	4.5
G03067	2	3	2	1	4	3	4
G03069	2	1	2	3	4	2	1.5
G03072	2	3	1	1	5	2	3.5
G03075	2	3	1	3	4	3	3.5
G03076	2	1	1	1	5	2	3.5
G03078	2	3	1	3	5	2	3
G03079	2	3	1	4	4	2	4
G03080	2	1	2	3	5	2	4.5
G03081	2	3	1	3	5	2	2.5
G03083	2	3	2	2	5	2	3.5
G03084	2	3	2	2	5	2	3
G03086	2	1	1	2	4	2	3
G03089	2	1	2	4	4	2	3
G03092	3	1	3	2	4	2	5
G03093	2	1	3	2	4	2	3
G03096	2	1	1	1	5	2	3
G03105	2	1	2	3	5	2	3.5
G03107	2	3	1	1	4	2	5
G03109	2	3	1	3	4	1	4.5
G03110	2	1	1	4	4	2	3
G03111	2	3	1	3	5	2	3.5
G03112	2	3	1	3	4	2	4.5
G03114	2	3	1	2	5	2	5
G03118	2	1	3	2	5	2	3
G03119	2	3	1	2	5	2	2.5

3. 시료의 제조

3.1. NMR 측정용 시료의 제조

각 성분의 정량을 위해 KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 를 사용하여 중수소로 치환된 물을 pH 6.0 으로 일정하게 pH 를 조정하였다. 여기에 internal standard 를 첨가하였고 전체에서 0.05%를 차지하게 제조하였다 (Yang et al., 2014; Lee et al., 2009).

분말화한 인삼 샘플 10 mg 을 정밀하게 달아 Eppendorf tube 에 옮긴 후, 1 mL 의 중수소로 치환된 물 (Deuterium oxide, 0.05% DSS, 0.1M potassium phosphate buffer)을 가하여 5 분간 초음파 추출하였다. 추출물은 3 분간 원심분리 후 상층액을 0.2 ㎛ nylon filter 로 여과하였다. 이 중 600 ㎕를 5mm NMR tube 에 담아 NMR 측정용 시료로 사용하였다.

3.2. UPLC/MS 측정용 시료의 제조

분쇄한 파우더를 정밀하게 달아 eppendorf tube 에 옮겨 HPLC 용 용매 70 % MeOH 수용액으로 25 mg/mL 로 만든 후 90 분씩 2 회 초음파 추출하였다. 추출 후에 원심 분리하여 그 상층액을 HPLC 용 물을 사용해 1→5 로 희석하고 이를 0.20 μm membrane filter (Minisart RC 15, Sartorius Stedim Boitech, Germany)로 여과하여 제조하였다.

4. 기기분석 방법

4.1. NMR 측정과 분석

600 MHz 에서 총 120 개 시료에 대하여 NMR 을 측정하였고, 모든 측정은 Water suppression sequence (1D NOE sequence)를 사용하여 물 peak 를 제거하고 스펙트럼을 얻었다.

얻어진 ^{1}H-NMR 데이터에 대한 phase correction, baseline correction 은 MestreNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain) 소프트웨어를 사용하였다. 각 성분의 identification 은 Chenomx NMR Suite 8.2 proffessional (Chenomx Inc., Edmonton, Canada) 소프트웨어와 Human Metabolome Database (HMDB, http://www.hmdb.ca/) 데이터를 사용하였다. Chemonx 소프트웨어로 해당 chemical shift 에서 나타난 peak 의 후보물질들을 나열할 수 있으며, 측정한 1D 와 2D NMR 데이터를 HMDB 에서 library 된 정보와 비교하여 최종적으로 각 성분들을 identification 하였다 (Krishnan et al., 2005, Kim et al., 2011c, Yuk et al., 2013, Yang et al., 2014a, Kwon et al., 2015).

각 성분에 대한 정량은 Chemonx 소프트웨어를 이용하였다. internal standard 인 DSS 의 농도, 샘플 pH 를 지정해주고 소프트웨어안에 library 된 성분과 chemical shift, coupling constant 가 일치하면 internal standard 의 몰농도를 기준으로 각 성분들의 몰농도를 계산하였다. 계산된 몰농도를 각 성분의 분자량과 사용한 샘플의 농도로 다시 계산하여 성분들을 정량하였다.

4.2. UPLC/MS 측정과 분석

액체크로마토그래피의 이동상은 0.1% 포름산을 포함한 물 (A)과 AcCN (B)을 사용하여 유속 0.3 mL/min 로 흘려주었고, 칼럼 온도 40℃, 시료 온도 20℃에서 분석을 시행하였으며 각 시료는 2 μL 씩 주입하였다. 이동상의 gradient 조건은 다음과 같다. 0-9 분 isocratic 20%B, 9-14 분 gradient 20-30% B, 14-17 분 isocratic 30%B, 17-21 분 gradient 30-32% B, 21-26 분 gradient 32-42.5% B, 26-29 분 gradient 42.5-90%B, 29-30 분 gradient 90-20%B. 이후 분석 시작 상태이자 칼럼 평형상태를 위하여 20% B 를 2 분간 흘려주었다.

질량분석은 ESI source 로 negative mode 에서 진행되었다. 분무기와 보조 가스로 고순도 질소 가스, 충돌 가스로 아르곤 가스를 사용하였다. 질량 분석 범위는 100-1500 *m/z* 로 모세관전압은 3.5 kV, 샘플 cone 전압은 45 V 로 조절하였으며, source 와 desolvation 온도는 각각 120℃, 350℃로 정하였다. cone 가스와 desolvation 가스 유속은 각각 50 L/hour, 800 L/hour, 이온 획득 속도는 0.2 초로 정하였다. 대사체 규명단계를 위하여 CID(collision-induced dissociation)용 조건으로 MS^E 모드를 사용하였고, 전구체 이온을 얻기 위한 낮은 충돌에너지는 4V, MS/MS 조각 정보를 위한 강한 충돌에너지의 ramp 값은 40 에서 45 V 로 설정하였다 (Zheng et al., 2009). 정확성 확보를 위한 calibration 물질로 sodium formate 를 사용하였으며, lock-mass 로 leucine enkephalin 을 5 μL/min 로 흘려주며 검출된 값을 동시적이면서도 독립적으로 보정하였다.

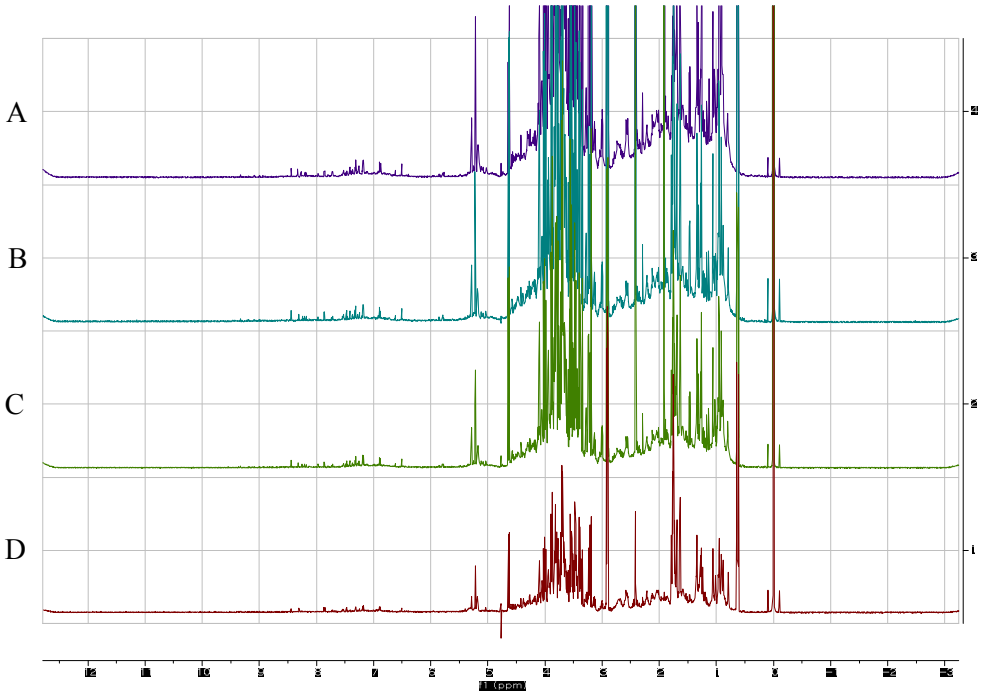
각 시료로부터 얻어진 크로마토그램과 질량분석 데이터는 MassLynx™ (version 4.1, Waters Co., Milford, MA, USA) 소프트웨어를 이용하여 in-house library 를 제작하는데 활용되었다. MarkerLynx™ XS (version 4.1, Waters Co., Milford, MA, USA)로 이용할 피크를 수집하였다. 시료 표본의 피크들은 머무름 시간, 질량 대 전하 비 (RT-*m/z*)로 표시하고 이온 강도는 면적 값으로 나타내었다. 머무름 시간의 범위는 3-29.5 분, 질량 범위는 400-1400 Da, XIC Window 는 0.03 Da 로 설정하였고, 마커 강도 역치 10 으로 시료 간에 같은 머무름 시간 (허용오차 0.20 분)과 질량 대 전하 비 (허용오차 0.05 Da)인 피크는 동일한 이온으로 수집되었다. 5% 높이에서의 피크 폭, 피크-피크 baseline noise 는 피크의 적분값에 따라 자동으로 계산되도록 하였고, noise 제거 수치는 100 으로 설정하였다. 수집된 각 피크의 이온강도 값은 각 분석 내 모든 피크의 이온 강도 합으로 normalize 하였다.

B. 결과 및 고찰

1. NMR 을 이용한 인삼의 일차대사체 분석

1.1. 전처리 조건 최적화

시료의 농도와 필터 종류를 달리하여 최적 조건을 설정하였다. 10, 20, 30, 50mg/ml 로 제조하여 시료의 농도를 비교하였고, nylon 과 PVDF 로 필터 종류를 비교하였으며 figure 1 에 나타내었다. Baseline shift 가 가급적 일어나지 않고 가장 향상된 peak resolution 을 보인 10mg/ml 의 농도로 전처리 조건을 결정하였다. 인삼 열매는 일차대사체 전처리 시 지질과 부유물에 의한 문제로 필터에 의한 여과가 불가피하다. PVDF 에 비해 더 많은 peak 가 검출된 nylon 필터로 선택하였다.



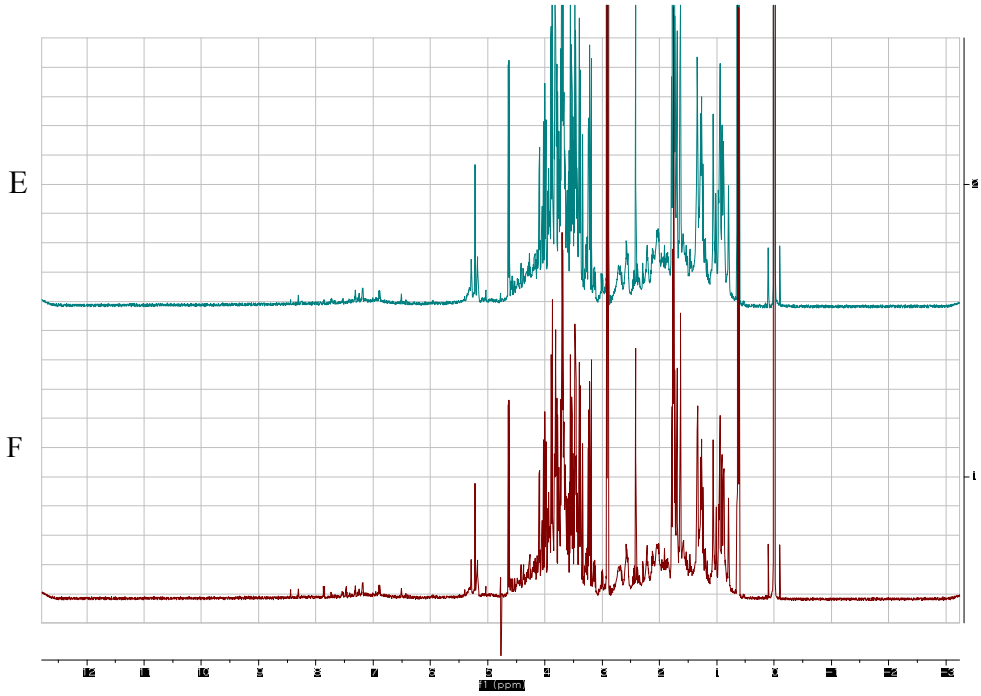


Figure 1. ^{1}H NMR spectra of berry extracts. A: 50mg/ml, B: 30mg/ml, C: 20mg/ml, D: 10mg/ml, E: PVDF filter, F: Nylon filter

1.2. 대사산물의 동정

1.2.1. 열매

인삼 열매의 ^{1}H-NMR 스펙트럼 (Figure 2)에서 internal standard 인 DSS 의 chemical shift 영역은 회색으로 표시하였으며, 3.3-4.1 ppm 영역에서 복잡한 탄수화물 시그널이 관찰되었다. 인삼 열매에서 identification 된 대사체들을 table 3 에 나타내었고 glucose, fructose 와 같은 sugar 와 alanine, valine, leucine 등의 아미노산, succinate, fumarate 등의 유기산이 검출되었다.

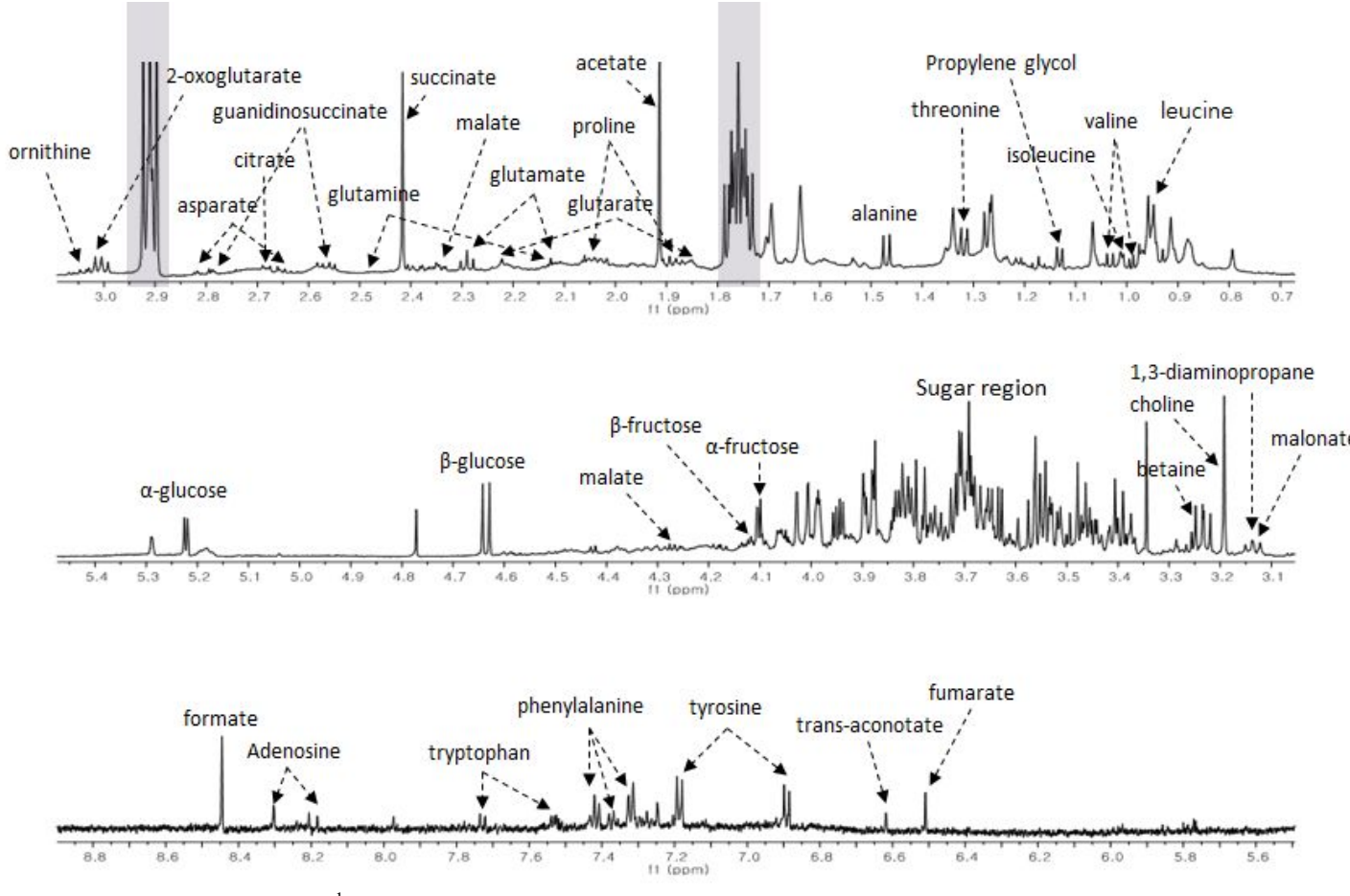


Figure 2. Representative ^{1}H-NMR spectrum of berry extracts

Table 3. Identified primary metabolites in berries

No	Metabolites	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	COSY	HSQC
1	Leucine	0.95	d (*J*= 6.3)		25.80
2	Valine	0.99	d (*J*= 4.7)		
		1.03	d (*J*= 7.1)	2.25	
3	Isoleucine	1.01	d (*J*= 2.9)		17.83
4	Threonine	1.32	d (*J*= 7.0)	4.09	
5	Alanine	1.47	d (*J*= 7.3)	3.77	
6	Acetate	1.91	s		22.72
7	Glutamate	2.10-2.16	m	2.34	
		2.29	t (*J*= 7.3)		
		2.40-2.48	m	2.19	
8	Glutamine	2.10-2.16	m	2.34	
		2.40-2.48	m	2.19	
9	Malate	2.36	dd (*J*= 2.8, 19.5)	4.29	
		4.29	dd (*J*= 2.3, 9.5)	2.36	70.04
10	Succinate	2.41	s		33.19
11	Aspartate	2.65	d (*J*= 3.3)	3.88	36.37
		2.82	d (*J*= 3.7)		
12	Citrate	2.68	dd (*J*= 3.0, 8.8)	2.40	
13	2-Oxoglutaric acid	3.00	t (*J*= 7.4)		38.58
14	Choline	3.19	s		53.36
15	α-fructose	4.10	d (*J*= 3.5)		74.88
16	β-fructose	4.12	d (*J*= 3.6)		73.57
17	β-glucose	4.63	d (*J*= 8.0)		95.44
18	α-glucose	5.22	d (*J*= 3.7)	3.53	91.59
19	Fumarate	6.51	s		134.48

No	Metabolites	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	COSY	HSQC
20	Tyrosine	6.89	d (*J*= 8.6)	7.18	
		7.18	d (*J*= 8.3)	6.88	
21	Phenylalanine	7.32	d (*J*= 7.5)		
		7.37	t (*J*= 7.0)		
		7.42	t (*J*= 6.8)		
22	Tryptophan	7.27	m		
		7.53	d (J= 3.8)	7.26	
		7.72	d (J= 7.6)	7.19	
23	Formate	8.44	s		169.77
24	Propylene glycol	1.13	d (J= 6.1)		16.34
25	Ornithine	1.83	m	3.04	
		1.93	m		
		3.04	t (J= 3.0)	1.83	38.67
26	Glutarate	1.86	m		

		2.21	t (J= 4.7)		34.75
27	Proline	1.97	m		
		2.05	m	2.35	
		2.34	m	2.06	31.64
28	1,3-diaminopropane	2.07	m		
		3.13	t (J= 8.8)		38.60
29	Guanidinosuccinate	2.56	d (J= 6.2)		44.10
30	Malonate	3.13	s		47.32
31	Betaine	3.25	s		52.83
32	trans-Aconotate	6.61	s		131.46

1.2.2. 뿌리

인삼 뿌리의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 figure 3 에 나타내었고 internal standard 인 DSS 의 chemical shift 영역은 회색으로 표시하였다. 인삼 뿌리에서 identification 된 대사체들은 열매와 마찬가지로 glucose, fructose 와 같은 sugar 와 alanine, valine, leucine 등의 아미노산, succinate, fumarate 등의 유기산이 검출되었고, 열매에서는 검출되지 않았던 sucrose 가 존재하는 것이 뿌리의 일차대사체 특징이다 (Table 4).

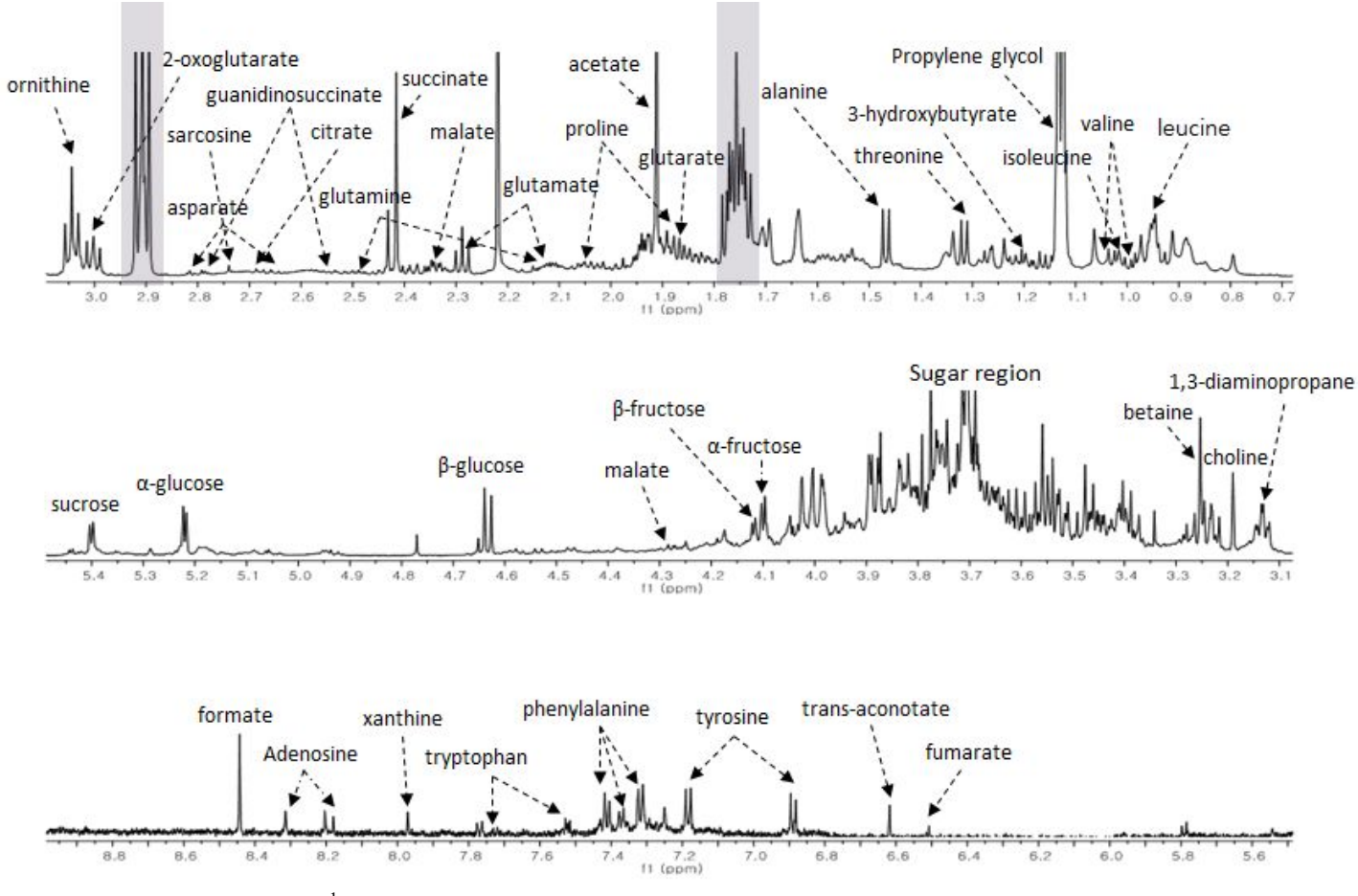


Figure 3. Representative ^{1}H-NMR spectrum of root extracts

Table 4. Identified metabolites in roots

No	Metabolites	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	COSY	HSQC
1	Leucine	0.95	d (*J*= 5.0)		24.59
2	Valine	0.99	d (*J*= 7.0)	2.27	17.79
		1.03	d (*J*= 7.0)	2.27	
3	Isoleucine	1.01	d (*J*= 3.3)		20.96
4	Threonine	1.32	d (*J*= 7.0)	4.10	
5	Alanine	1.47	d (*J*= 7.2)	3.77	
6	Acetate	1.92	s		25.97
7	Glutamate	2.10-2.16	m	2.35	
		2.29	t (*J*= 7.4)		
		2.40-2.48	m	2.14	
8	Glutamine	2.10-2.16	m	2.35	
		2.40-2.48	m		
9	Malate	2.38	dd (*J*= 2.4, 8.8)	4.29	43.11
		4.29	dd (*J*= 2.3, 8.4)	2.37	73.54
10	Succinate	2.42	s		36.44
11	Aspartate	2.66	d (*J*= 2.5)	2.80	
		2.82	d (*J*= 3.7)	2.67	35.47
12	Citrate	2.68	dd (*J*= 2.9, 8.8)	2.38	
13	2-Oxoglutaric acid	3.00	t (*J*= 7.6)		39.71
14	Choline	3.19	s		53.55
15	α-fructose	4.10	d (*J*= 3.8)		77.21
16	β-fructose	4.12	d (*J*= 3.7)		
17	β-glucose	4.63	d (*J*= 7.5)		98.57
18	α-glucose	5.22	d (*J*= 3.8)		94.72
19	Fumarate	6.51	s		138.35
20	Tyrosine	6.89	d (*J*= 8.3)	7.18	
		7.18	d (*J*= 7.8)	6.89	

No	Metabolites	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	COSY	HSQC
21	Phenylalanine	7.32	d (*J*= 7.6)		132.16
		7.37	t (*J*= 7.0)		
		7.42	t (*J*= 6.8)		130.62
22	Tryptophan	7.27	m		
		7.53	d (J= 4.6)	7.27	
		7.72	d (J= 7.6)	7.19	125.20
23	Formate	8.44	s		169.30
24	Propylene glycol	1.13	d (J= 6.3)		19.61
25	3-Hydroxybutyrate	1.20	d		
26	Ornithine	1.83	m	3.73	25.87
		1.93	m		30.19
		3.04	t (J= 7.5)	1.77	41.54

27	Glutarate	1.86	m		26.16
		2.21	t		
28	Proline	1.97	m		
		2.05	m		
		2.34	m	2.12	36.00
29	1,3-diaminopropane	2.07	m		
		3.12	t (J= 7.1)		41.89
30	Guanidinosuccinate	2.57	d (J= 6.9)		42.83
31	Sarcosine	2.73	s		32.96
32	Betaine	3.25	s		55.87
33	Sucrose	5.40	d (J= 3.9)		94.81
34	trans-Aconotate	6.61	s		135.89
35	Xanthine	7.97	s		142.04

1.3. 대사산물의 정량

1.3.1. 열매

정량값 (Table 5)은 소프트웨어에서 지정된 limit of quantification (LOQ) 미만은 0 으로 나타내었다. 확인된 성분들 중 propylene glycol 은 polypropylene 재질인 eppendorf tube 로부터 온 것으로 추정되어 이 성분은 제외하였다.

Table 5. Contents of primary metabolites in berry extracts (mg/g)

	Glucose	Fructose	Acetate	Malate	Succinate	Choline	Glutamate	Alanine	Formate	Glutamine	Valine	Isoleucine	Fumarate	Betaine
1	1.5681	1.4018	0.3514	0.0000	0.1744	0.0825	0.0000	0.0458	0.0545	0.1023	0.0312	0.0257	0.0046	0.0037
2	2.0634	1.5578	0.0560	0.2930	0.2000	0.0780	0.0000	0.0247	0.0056	0.1266	0.0223	0.0000	0.0101	0.0043
3	1.0574	1.8989	0.1938	0.0000	0.0681	0.0890	0.0000	0.0360	0.0138	0.0000	0.0288	0.0241	0.0062	0.0059
4	0.5943	0.8457	0.2637	0.0000	0.0537	0.0684	0.0803	0.0377	0.0130	0.0000	0.0173	0.0173	0.0043	0.0076
5	0.8399	1.1372	0.3603	0.1428	0.1218	0.0677	0.0553	0.0251	0.0127	0.0000	0.0157	0.0000	0.0000	0.0066
6	1.9488	1.1770	0.2960	0.0000	0.1443	0.1175	0.0000	0.0394	0.0165	0.0000	0.0294	0.0291	0.0095	0.0067
7	1.0669	1.5759	0.3188	0.0000	0.1865	0.0935	0.0000	0.0502	0.0000	0.0000	0.0228	0.0000	0.0045	0.0090
8	0.7536	0.9577	0.3840	0.0000	0.2502	0.0935	0.0968	0.0508	0.0216	0.0000	0.0370	0.0328	0.0087	0.0091
9	0.9392	1.9769	0.0512	0.0000	0.0918	0.0816	0.0000	0.0437	0.0071	0.1061	0.0282	0.0000	0.0082	0.0212
10	0.6430	0.7617	0.2589	0.0000	0.0350	0.0630	0.0000	0.0284	0.0188	0.0650	0.0218	0.0210	0.0044	0.0028
11	1.0601	1.3847	0.2005	0.0000	0.0497	0.0840	0.0000	0.0377	0.0149	0.0903	0.0315	0.0290	0.0059	0.0037
12	0.5727	0.6851	0.1870	0.0000	0.0328	0.0611	0.0000	0.0357	0.0110	0.0000	0.0244	0.0218	0.0041	0.0088
13	1.4705	1.1020	0.2233	0.0000	0.1169	0.0713	0.0858	0.0390	0.0231	0.0000	0.0255	0.0000	0.0063	0.0041
14	0.8082	1.6728	0.3149	0.0000	0.1526	0.0930	0.0000	0.0549	0.0212	0.0826	0.0309	0.0000	0.0071	0.0093
15	1.0981	1.4897	0.1943	0.0000	0.0838	0.0932	0.1315	0.0586	0.0202	0.0912	0.0344	0.0281	0.0057	0.0070
16	1.2835	0.8999	0.2375	0.0000	0.1320	0.0696	0.0000	0.0383	0.0129	0.0000	0.0173	0.0307	0.0059	0.0063
17	1.0127	1.3402	0.2283	0.0000	0.0642	0.0700	0.0849	0.0384	0.0240	0.0000	0.0314	0.0329	0.0044	0.0036
18	0.9248	1.4451	0.3868	0.0000	0.1658	0.1008	0.0000	0.0634	0.0176	0.0000	0.0442	0.0000	0.0080	0.0114
19	1.3568	1.7416	0.2529	0.0000	0.1036	0.0803	0.2378	0.0514	0.0272	0.0000	0.0342	0.0401	0.0075	0.0056
20	1.3253	1.2683	0.2366	0.2045	0.2336	0.0752	0.0000	0.0422	0.0452	0.0000	0.0184	0.0000	0.0143	0.0057
21	0.7140	1.5737	0.5509	0.0000	0.1584	0.0882	0.0000	0.0679	0.0749	0.0000	0.0390	0.0338	0.0060	0.0128
22	1.1119	1.4654	0.2966	0.0000	0.0729	0.0775	0.1134	0.0519	0.0628	0.0000	0.0380	0.0373	0.0056	0.0142
23	2.1760	1.9437	0.1838	0.3486	0.3007	0.1113	0.1795	0.0952	0.0076	0.0000	0.0437	0.0000	0.0201	0.0089
24	2.0520	1.2880	0.1231	0.0000	0.1357	0.0876	0.0000	0.0357	0.0067	0.0000	0.0240	0.0000	0.0182	0.0036
25	1.9755	1.4917	0.1499	0.0000	0.1645	0.0880	0.1115	0.0489	0.0096	0.0000	0.0353	0.0000	0.0131	0.0028
26	2.7372	2.2225	0.3169	0.0000	0.2065	0.1127	0.1505	0.0580	0.0134	0.0000	0.0439	0.0429	0.0144	0.0082
27	1.8677	1.4002	0.0425	0.0000	0.1641	0.0879	0.0000	0.0220	0.0064	0.1146	0.0171	0.0000	0.0188	0.0034
28	1.0900	1.9144	0.1742	0.0000	0.0764	0.0947	0.1538	0.0752	0.0136	0.0000	0.0486	0.0479	0.0106	0.0046
29	2.3574	2.0753	0.0906	0.2880	0.1297	0.1211	0.2244	0.0600	0.0100	0.0000	0.0398	0.0000	0.0201	0.0000
30	1.8086	1.5915	0.5010	0.0000	0.2143	0.1011	0.0000	0.0794	0.0145	0.0000	0.0433	0.0000	0.0104	0.0100
31	1.7710	1.8360	0.0753	0.3615	0.2389	0.0979	0.1691	0.0501	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0158	0.0096

32	1.6142	1.2139	0.3199	0.0000	0.1715	0.0890	0.1052	0.0603	0.0163	0.0000	0.0426	0.0000	0.0092	0.0121
33	0.7516	1.3015	0.2618	0.0000	0.2270	0.0982	0.1218	0.0625	0.0584	0.0000	0.0395	0.0000	0.0113	0.0108
34	1.2159	0.9457	0.4037	0.0000	0.1245	0.0538	0.1270	0.0658	0.0208	0.0000	0.0532	0.0459	0.0065	0.0114
35	2.1356	1.4413	0.1772	0.3092	0.1992	0.0897	0.1096	0.0686	0.0164	0.0000	0.0358	0.0000	0.0158	0.0082
36	1.2184	1.1024	0.6023	0.0000	0.1586	0.0710	0.0946	0.0618	0.0205	0.0000	0.0336	0.0000	0.0000	0.0216
37	0.3909	0.9842	0.0658	0.0000	0.1637	0.0500	0.1777	0.0616	0.0188	0.0000	0.0497	0.0390	0.0149	0.0294
38	1.1325	1.2584	0.1168	0.2894	0.2284	0.0804	0.0000	0.0470	0.0097	0.0000	0.0201	0.0000	0.0108	0.0061
39	1.0779	1.4600	0.2721	0.1746	0.2726	0.0961	0.0000	0.0576	0.0000	0.0000	0.0264	0.0000	0.0072	0.0107
40	1.9791	1.6002	0.2320	0.2597	0.2044	0.0866	0.0664	0.0494	0.0000	0.0000	0.0220	0.0000	0.0000	0.0082
41	0.7383	1.0356	0.2340	0.0000	0.1728	0.0690	0.0000	0.0453	0.0130	0.0000	0.0207	0.0000	0.0060	0.0057
42	1.4018	1.3107	0.5848	0.0000	0.2605	0.0751	0.0000	0.0524	0.0116	0.0000	0.0259	0.0000	0.0064	0.0264
43	1.6108	1.0354	0.0701	0.2768	0.0868	0.0630	0.0000	0.0454	0.0068	0.0000	0.0000	0.0000	0.0099	0.0145
44	1.0267	1.0997	0.2858	0.0000	0.1010	0.0670	0.0000	0.0370	0.0108	0.0855	0.0204	0.0237	0.0055	0.0089
45	0.7592	0.7911	0.1689	0.0000	0.0730	0.0556	0.0000	0.0476	0.0092	0.0000	0.0259	0.0000	0.0101	0.0045
46	0.4173	0.4904	0.2662	0.0000	0.0491	0.0568	0.0000	0.0375	0.0135	0.0000	0.0176	0.0210	0.0000	0.0026
47	2.4109	2.3163	0.3154	0.0000	0.1587	0.1050	0.0000	0.0611	0.0094	0.0000	0.0340	0.0000	0.0114	0.0108
48	1.5535	1.2699	0.4383	0.0000	0.1542	0.1014	0.0796	0.0712	0.0155	0.0000	0.0396	0.0446	0.0099	0.0129
49	2.5889	1.7712	0.0150	0.2572	0.1401	0.0755	0.0000	0.0262	0.0095	0.1565	0.0310	0.0000	0.0133	0.0108
50	1.7782	1.6903	0.0482	0.2623	0.1218	0.0850	0.0000	0.0276	0.0084	0.0000	0.0000	0.0000	0.0100	0.0030
51	2.5846	2.1999	0.0291	0.0000	0.1774	0.0988	0.0000	0.0392	0.0071	0.0000	0.0264	0.0000	0.0157	0.0053
52	1.2359	1.1728	0.4012	0.0000	0.2590	0.0641	0.0000	0.0466	0.0126	0.0627	0.0241	0.0000	0.0059	0.0091
53	1.8070	1.5184	0.5206	0.0000	0.3131	0.0795	0.0000	0.0607	0.0156	0.1578	0.0278	0.0000	0.0091	0.0207
54	2.0025	1.5899	0.0479	0.2544	0.1179	0.0859	0.0000	0.0328	0.0078	0.1514	0.0307	0.0000	0.0118	0.0060
55	0.0000	1.3827	0.1855	0.0000	0.2088	0.0915	0.1056	0.0652	0.0136	0.0000	0.0252	0.0000	0.0135	0.0107
56	1.3395	0.8543	0.2989	0.0000	0.1189	0.0786	0.0858	0.0572	0.0321	0.0000	0.0377	0.0350	0.0059	0.0090
57	0.6237	1.5180	0.2424	0.0000	0.2038	0.0910	0.1023	0.0780	0.0258	0.0000	0.0450	0.0000	0.0100	0.0125
58	1.6254	1.3011	0.2370	0.1920	0.1582	0.1005	0.0000	0.0592	0.0261	0.0000	0.0424	0.0000	0.0121	0.0117
59	1.0981	1.2460	0.1256	0.0000	0.1750	0.0729	0.0000	0.0434	0.0171	0.0836	0.0225	0.0000	0.0093	0.0052
60	1.9915	1.4020	0.1109	0.2569	0.1835	0.1007	0.0000	0.0543	0.0276	0.0000	0.0213	0.0000	0.0110	0.0105

Table 5. (Continued)

	Tyrosine	Malonate	Tryptophan	Threonine	Leucine	Ornithine	Guanidinosuccinate	trans-Aconitate	Aspartate	2-Oxoglutarate	Phenylalanine	Proline
1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.0515	0.0285	0.0529	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	0.0328	0.0118	0.0300	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0089	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
6	0.0000	0.0000	0.0202	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
8	0.0390	0.0000	0.0231	0.0000	0.0000	0.0000	0.0548	0.0000	0.0202	0.0000	0.0000	0.0000
9	0.0000	0.0247	0.0000	0.0287	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
13	0.0000	0.0000	0.0278	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1158	0.0000	0.0000	0.0000
14	0.0638	0.0000	0.0331	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16	0.0000	0.0000	0.0214	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
17	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18	0.0515	0.0275	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
20	0.0578	0.0248	0.0335	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0186	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
21	0.0424	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
22	0.0328	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
23	0.0000	0.0636	0.0735	0.1041	0.0000	0.0474	0.0000	0.0235	0.0000	0.0186	0.0000	0.0000
24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0115	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
25	0.0487	0.0000	0.0386	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
26	0.0565	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1368	0.0291	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
27	0.0000	0.0249	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0244	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
28	0.0417	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0445	0.0000	0.0091	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
29	0.0591	0.0000	0.0000	0.0485	0.0000	0.0000	0.1272	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
30	0.0502	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0157	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31	0.0958	0.0387	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0976	0.0225	0.2168	0.0000	0.0000	0.0000

32	0.0734	0.0316	0.0553	0.1398	0.0000	0.0000	0.0000	0.0413	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
33	0.0448	0.0412	0.0000	0.1005	0.0000	0.0406	0.0000	0.0124	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
34	0.0535	0.0235	0.0000	0.0000	0.0000	0.0447	0.0000	0.0146	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
35	0.1230	0.0000	0.0000	0.1451	0.0000	0.0272	0.1161	0.0345	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
36	0.0000	0.0211	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
37	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0427	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
38	0.0596	0.0367	0.0000	0.1314	0.0000	0.0000	0.0858	0.0249	0.0000	0.0538	0.0000	0.0000
39	0.0569	0.0000	0.0270	0.0767	0.2726	0.0000	0.0000	0.0188	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
40	0.3999	0.0410	0.0392	0.0700	0.0000	0.0000	0.0615	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
41	0.0482	0.0236	0.0359	0.0671	0.0000	0.0000	0.0000	0.0091	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
42	0.0000	0.0370	0.0380	0.0000	0.3425	0.0000	0.0000	0.0317	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
43	0.0647	0.0608	0.0445	0.0861	0.2473	0.0000	0.0000	0.0099	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
44	0.0000	0.0263	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
45	0.0000	0.0291	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
46	0.0000	0.0260	0.0000	0.0000	0.1234	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
47	0.0397	0.0445	0.0282	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
48	0.0000	0.0300	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
49	0.0739	0.0398	0.0556	0.0305	0.3286	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1886
50	0.0000	0.0315	0.0290	0.0242	0.2972	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
51	0.0920	0.0362	0.0553	0.0000	0.3194	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
52	0.0556	0.0234	0.0321	0.0865	0.0000	0.0000	0.0000	0.0148	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
53	0.0000	0.0000	0.0378	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0258	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
54	0.0861	0.0383	0.0515	0.0334	0.2238	0.0000	0.0970	0.0106	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
55	0.0699	0.0459	0.0439	0.0000	0.0000	0.0460	0.0000	0.0181	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
56	0.0348	0.0173	0.0000	0.0000	0.0000	0.0256	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
57	0.0535	0.0293	0.0272	0.0000	0.0000	0.0325	0.0000	0.0200	0.0000	0.0000	0.0383	0.0000
58	0.0745	0.0457	0.0437	0.1013	0.3515	0.0444	0.0000	0.0158	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
59	0.0310	0.0348	0.0294	0.0648	0.1624	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
60	0.0757	0.0000	0.0457	0.1240	0.0000	0.0464	0.1343	0.0193	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

1.3.2. 뿌리

소프트웨어에서 지정된 limit of quantification (LOQ) 미만은 0 으로 나타내었고, propylene glycol 은 정량값에서 제외하였다. 뿌리의 정량값은 table 6 에 나타내었다.

Table 6. Contents of primary metabolites in root extracts (mg/g)

	Fructose	Glucose	Sucrose	Glutamine	Alanine	Acetate	Ornithine	Choline	Betaine	Threonine	Succinate	Glutamate	Valine	Formate
1	2.0598	1.5337	0.1698	0.0000	0.1539	0.1942	0.4528	0.0338	0.0745	0.1605	0.1226	0.2298	0.0834	0.0294
2	3.4807	3.9181	0.2639	0.0000	0.1811	0.4566	0.5312	0.0420	0.0776	0.0000	0.2413	0.1829	0.0968	0.0532
3	1.7978	3.4202	0.3871	0.4142	0.1648	0.1332	0.1513	0.0507	0.0526	0.0000	0.0693	0.0000	0.0000	0.0082
4	1.5906	1.5820	0.2037	0.0000	0.1821	0.4537	0.6785	0.0122	0.0999	0.3809	0.2046	0.0000	0.0675	0.0390
5	1.6746	1.7733	0.1526	0.0000	0.1679	0.6242	0.8412	0.0249	0.0911	0.2441	0.1828	0.2248	0.0000	0.0200
6	1.1437	0.0000	9.4115	0.5828	0.2201	0.0000	0.0225	0.1276	0.0786	0.0596	0.0496	0.0000	0.0000	0.0090
7	2.0354	1.8257	0.3332	0.0000	0.1778	0.5723	0.6633	0.0365	0.0874	0.1028	0.2631	0.0000	0.0000	0.0632
8	1.5514	1.1611	1.4885	0.0000	0.1115	0.1526	0.1303	0.0574	0.0369	0.1512	0.1398	0.0000	0.0000	0.0074
9	0.3663	0.6543	0.2455	0.0000	0.1763	0.9296	0.0000	0.0396	0.1050	0.3244	0.5581	0.0000	0.0000	0.0188
10	0.5628	0.7161	0.1991	0.0000	0.1515	1.2104	0.0000	0.0080	0.0929	0.1219	0.5687	0.2298	0.0655	0.0240
11	1.3647	2.3642	0.5127	0.0000	0.1217	0.2761	0.1587	0.0667	0.0807	0.0760	0.0641	0.0000	0.0000	0.0000
12	1.4321	1.5110	0.3252	0.0000	0.1683	0.4984	0.5524	0.0354	0.0968	0.4776	0.3105	0.0000	0.0902	0.0242
13	0.8604	0.0000	10.4312	0.6179	0.2820	0.0000	0.0000	0.0868	0.0648	0.0000	0.0358	0.0000	0.0458	0.0084
14	2.3608	1.5087	0.3119	0.0000	0.1705	0.3416	0.6501	0.0322	0.0893	0.4806	0.2684	0.0000	0.0000	0.0358
15	1.1462	1.0395	0.2237	0.0000	0.1226	0.3730	0.4912	0.0411	0.0929	0.1657	0.1630	0.0000	0.0751	0.0280
16	0.6565	1.4924	10.4844	0.6078	0.1943	0.0000	0.0000	0.0747	0.0821	0.0472	0.0144	0.0000	0.0000	0.0073
17	1.9254	1.1601	0.3184	0.0000	0.1425	0.4019	0.7548	0.0177	0.1102	0.0603	0.0498	0.0000	0.1027	0.0310
18	1.5975	1.4926	0.1575	0.0000	0.1522	0.4215	0.4003	0.0138	0.0940	0.2627	0.1925	0.1830	0.0654	0.0556
19	2.7984	5.2120	0.6736	0.4804	0.2281	0.1024	0.0000	0.0795	0.0119	0.0559	0.0353	0.0000	0.0000	0.0100
20	0.9478	1.4589	6.9899	0.4833	0.1870	0.0000	0.0000	0.0559	0.0612	0.0409	0.0159	0.0000	0.0000	0.0075
21	1.7767	1.6582	0.1695	0.0000	0.1438	0.2692	0.4102	0.0357	0.0736	0.1713	0.1608	0.0000	0.0665	0.0122
22	1.7764	1.8066	0.1705	0.0000	0.1613	0.4800	0.7562	0.0516	0.0974	0.1664	0.2513	0.2523	0.0634	0.0341
23	4.4615	1.8279	0.3211	0.3091	0.1677	0.0889	0.0000	0.0747	0.1133	0.0521	0.0298	0.0000	0.0000	0.0081
24	1.0813	1.1033	8.4197	0.4267	0.1720	0.0793	0.0116	0.0785	0.0836	0.0418	0.0230	0.0000	0.0000	0.0066
25	3.6992	4.6771	0.2664	0.1767	0.1531	0.1565	0.2651	0.0755	0.0254	0.1919	0.0582	0.0000	0.0828	0.0186
26	0.6579	0.9466	0.1893	0.0000	0.1433	0.2157	0.5955	0.0032	0.0761	0.3493	0.1108	0.0000	0.0647	0.0406
27	0.7307	1.0064	0.2039	0.0000	0.1550	0.2182	0.6330	0.0043	0.0780	0.3932	0.1112	0.0000	0.0622	0.0381
28	1.8263	2.2055	7.7917	0.5979	0.2461	0.0742	0.0000	0.0853	0.0817	0.0000	0.0282	0.0000	0.0000	0.0080
29	1.5359	1.5189	0.1819	0.0000	0.1671	0.8321	0.0000	0.0420	0.0542	0.1833	0.6563	0.1220	0.0747	0.0388
30	1.2031	0.9285	8.7417	0.5914	0.1939	0.0000	0.0000	0.0668	0.0807	0.0000	0.0190	0.0000	0.0000	0.0063
31	0.7896	16.8493	0.0000	0.4931	0.2431	0.0000	0.0000	0.0847	0.0831	0.0000	0.0195	0.0000	0.0000	0.0073

32	6.5036	3.9900	0.0700	0.0000	0.1412	0.1794	0.1240	0.0771	0.0571	0.1111	0.0874	0.3046	0.0000	0.0097
33	0.7999	0.4843	8.5830	0.4479	0.1417	0.0597	0.0000	0.0673	0.0628	0.0386	0.0244	0.0000	0.0000	0.0069
34	2.6815	6.8264	1.4172	0.4742	0.1798	0.1527	0.2278	0.0778	0.0225	0.1898	0.0444	0.0000	0.0000	0.0092
35	0.9997	1.0494	9.3598	0.4887	0.2364	0.0000	0.0161	0.0789	0.0630	0.0501	0.0178	0.0000	0.0000	0.0068
36	2.4014	2.6426	0.2414	0.0000	0.1864	0.2103	0.6776	0.0663	0.0390	0.2397	0.0474	0.4442	0.0656	0.0131
37	4.0300	5.0973	0.0000	0.0000	0.1365	0.1261	0.1775	0.0756	0.0261	0.1423	0.0575	0.0000	0.0000	0.0133
38	4.4777	5.1740	0.1743	0.0000	0.1375	0.1141	0.1145	0.0758	0.0300	0.1259	0.0391	0.0000	0.0000	0.0106
39	4.2473	4.7281	0.2005	0.0000	0.1823	0.1351	0.2059	0.0675	0.0354	0.1379	0.0745	0.0000	0.0880	0.0137
40	1.7829	2.6642	7.5108	0.4272	0.1858	0.0670	0.0000	0.0801	0.0778	0.0434	0.0182	0.0000	0.0000	0.0075
41	0.7968	12.4424	0.0000	0.4751	0.1673	0.0688	0.0000	0.0599	0.0526	0.0000	0.0152	0.0000	0.0000	0.0060
42	2.9539	3.1944	0.2191	0.0000	0.1506	0.1238	0.4197	0.0560	0.0653	0.1918	0.0497	0.2448	0.0506	0.0102
43	0.6851	1.1280	0.1465	0.0000	0.1324	0.6319	0.6025	0.0151	0.0678	0.0000	0.2581	0.1179	0.0603	0.0357
44	0.8450	0.3769	10.3013	0.4273	0.2260	0.1009	0.0000	0.0697	0.0674	0.0000	0.0159	0.0000	0.0000	0.0066
45	1.0952	0.5329	0.3315	0.6946	0.2214	0.0818	0.0000	0.0932	0.0705	0.0687	0.0274	0.0000	0.0831	0.0067
46	0.5284	0.6077	7.4671	0.7192	0.3040	0.0993	0.0000	0.0674	0.0870	0.0000	0.0266	0.0000	0.0000	0.0046
47	0.7740	0.6844	7.4541	0.5661	0.1784	0.0000	0.0000	0.0607	0.0907	0.0523	0.0240	0.0000	0.0000	0.0053
48	1.5490	0.8140	0.3027	0.5118	0.1703	0.0760	0.0000	0.0659	0.0763	0.0519	0.0226	0.0000	0.0000	0.0064
49	0.5688	0.4998	0.2676	0.6961	0.2236	0.0766	0.0000	0.0798	0.0418	0.0622	0.0170	0.0000	0.0000	0.0062
50	0.5194	0.5390	6.8062	0.8527	0.2578	0.0000	0.0533	0.0911	0.0812	0.0562	0.0249	0.0000	0.0000	0.0057
51	1.7261	1.9765	7.8382	0.5904	0.1671	0.0000	0.0000	0.0760	0.0969	0.0557	0.0148	0.0000	0.0456	0.0057
52	1.4036	1.8989	6.2964	0.5752	0.2128	0.0906	0.0000	0.0697	0.0647	0.0584	0.0222	0.0000	0.0000	0.0068
53	2.8824	1.1919	0.2397	0.5721	0.2198	0.0788	0.0000	0.0857	0.0933	0.0560	0.0223	0.0000	0.0521	0.0059
54	1.2847	1.7535	0.4694	0.5641	0.2538	0.0821	0.0000	0.0640	0.0713	0.0000	0.0281	0.0000	0.0690	0.0049
55	2.2588	1.0410	0.4079	0.4872	0.3709	0.0889	0.0000	0.0804	0.0813	0.0904	0.0255	0.0000	0.0872	0.0067
56	1.0040	1.0833	0.3064	0.7310	0.2312	0.1056	0.0000	0.0882	0.0875	0.0630	0.0262	0.0000	0.0000	0.0071
57	1.0698	1.1038	7.8184	0.8172	0.2626	0.0982	0.0000	0.0690	0.0824	0.0768	0.0194	0.0000	0.0841	0.0054
58	0.9282	0.8361	6.8672	0.5035	0.3354	0.0896	0.0000	0.0699	0.0574	0.0650	0.0281	0.0000	0.0000	0.0055
59	0.8604	1.2244	0.3389	0.8900	0.2543	0.0000	0.0363	0.0892	0.0863	0.0693	0.0252	0.0000	0.0731	0.0056
60	1.4002	2.0623	7.5162	0.5086	0.2570	0.0779	0.0000	0.0752	0.0627	0.0577	0.0210	0.0000	0.0000	0.0054

Table 6. (Continued)

	Tyrosine	Isoleucine	Aspartate	Phenylalanine	Fumarate	Tryptophan	Sarcosine	trans-Aconitate	2-Oxo glutarate	Xanthine	Adenosine	1,3-Diamino propane	Malate	3-Hydroxy butyrate
1	0.0339	0.1524	0.0000	0.0507	0.0045	0.0000	0.0119	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.0623	0.0000	0.0000	0.0743	0.0108	0.0345	0.0120	0.0216	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	0.0768	0.0000	0.0000	0.0550	0.0275	0.0408	0.0103	0.0094	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4	0.0500	0.0379	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0106	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	0.0475	0.0000	0.1344	0.0000	0.0086	0.0265	0.0000	0.0383	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
6	0.0352	0.0000	0.0000	0.0000	0.0287	0.0212	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
7	0.0718	0.0000	0.0000	0.0591	0.0072	0.0249	0.0118	0.0287	0.0000	0.0368	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
8	0.0656	0.0357	0.0000	0.0000	0.0077	0.0000	0.0117	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
9	0.0638	0.0506	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0111	0.0458	0.0000	0.0491	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10	0.0000	0.0400	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0088	0.0496	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11	0.0000	0.0000	0.0936	0.0712	0.0000	0.0000	0.0199	0.0000	0.3340	0.0000	0.0000	0.0000	0.3737	0.0572
12	0.0708	0.0414	0.1402	0.0705	0.0000	0.0000	0.0180	0.0000	0.0000	0.0380	0.0000	0.1511	0.0000	0.0000
13	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0267	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0123	0.0214	0.0000	0.0461	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0611	0.0433	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0112	0.0167	0.0000	0.0376	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16	0.0600	0.0000	0.0000	0.0000	0.0197	0.0000	0.0000	0.0000	0.0706	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
17	0.0574	0.0000	0.0000	0.0709	0.0059	0.0000	0.0130	0.0000	0.0000	0.0490	0.0000	0.0859	0.0000	0.0000
18	0.0000	0.0358	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0110	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19	0.0868	0.0411	0.0000	0.0000	0.0230	0.0000	0.0067	0.0000	0.0437	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
20	0.0399	0.0000	0.0000	0.0000	0.0187	0.0000	0.0038	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
21	0.0542	0.0487	0.0000	0.0702	0.0050	0.0253	0.0123	0.0245	0.0725	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
22	0.0547	0.0454	0.0000	0.0629	0.0000	0.0000	0.0102	0.0399	0.0694	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
23	0.0650	0.0000	0.0000	0.0360	0.0283	0.0229	0.0053	0.0000	0.0643	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
24	0.0390	0.0323	0.0000	0.0000	0.0435	0.0221	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
25	0.0515	0.0488	0.0000	0.0000	0.0218	0.0000	0.0081	0.0186	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0620
26	0.0210	0.0492	0.0000	0.0453	0.0048	0.0000	0.0086	0.0108	0.0000	0.0176	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
27	0.0440	0.0471	0.0000	0.0517	0.0039	0.0000	0.0086	0.0122	0.0000	0.0646	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
28	0.0658	0.0000	0.0000	0.0390	0.0277	0.0235	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
29	0.0576	0.0544	0.0000	0.0624	0.0035	0.0000	0.0094	0.0273	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
30	0.0585	0.0000	0.0000	0.0000	0.0289	0.0292	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31	0.0274	0.0000	0.0000	0.0000	0.0241	0.0000	0.0000	0.0000	0.0386	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

32	0.0438	0.0000	0.0000	0.0469	0.0217	0.0000	0.0082	0.0000	0.0659	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
33	0.0471	0.0251	0.0000	0.0000	0.0276	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
34	0.0578	0.0346	0.0000	0.0000	0.0274	0.0210	0.0055	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
35	0.0491	0.0000	0.0000	0.0000	0.0189	0.0000	0.0047	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
36	0.0384	0.0000	0.1870	0.0000	0.0226	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
37	0.0484	0.0000	0.0000	0.0634	0.0253	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0493
38	0.0496	0.0000	0.0000	0.0679	0.0232	0.0000	0.0122	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
39	0.0799	0.0000	0.1957	0.0000	0.0247	0.0290	0.0111	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
40	0.0506	0.0000	0.0000	0.0000	0.0234	0.0210	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
41	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0226	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
42	0.0361	0.0392	0.1327	0.0467	0.0060	0.0000	0.0072	0.0000	0.0421	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
43	0.0386	0.0451	0.0659	0.0575	0.0000	0.0000	0.0087	0.0265	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
44	0.0569	0.0361	0.0000	0.0314	0.0250	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
45	0.1109	0.0000	0.0000	0.0618	0.0255	0.0468	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
46	0.0824	0.0454	0.0000	0.0496	0.0273	0.0462	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0134	0.0000	0.0000	0.0000
47	0.0504	0.0268	0.0000	0.0000	0.0203	0.0359	0.0000	0.0000	0.0311	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
48	0.0708	0.0374	0.0000	0.0477	0.0186	0.0366	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
49	0.0592	0.0337	0.0000	0.0362	0.0238	0.0212	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
50	0.0551	0.0352	0.0000	0.0324	0.0377	0.0231	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
51	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0200	0.0294	0.0000	0.0000	0.0394	0.0000	0.0200	0.0000	0.0000	0.0000
52	0.0727	0.0332	0.0000	0.0362	0.0344	0.0265	0.0044	0.0000	0.0000	0.0000	0.0120	0.0000	0.0000	0.0000
53	0.0698	0.0421	0.0000	0.0492	0.0281	0.0280	0.0000	0.0000	0.0288	0.0000	0.0259	0.0000	0.0000	0.0000
54	0.0754	0.0341	0.0000	0.0000	0.0247	0.0282	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0107	0.0000	0.0000	0.0000
55	0.0915	0.0000	0.0000	0.0856	0.0268	0.0304	0.0086	0.0000	0.0286	0.0000	0.0214	0.0000	0.0000	0.0000
56	0.0866	0.0403	0.0000	0.0464	0.0289	0.0304	0.0000	0.0000	0.0396	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
57	0.0924	0.0530	0.0000	0.0641	0.0360	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0227	0.0000	0.0000	0.0000
58	0.0756	0.0000	0.0000	0.0515	0.0396	0.0259	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0283	0.0000	0.0000	0.0000
59	0.0848	0.0000	0.0000	0.0415	0.0262	0.0343	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
60	0.0614	0.0000	0.0000	0.0370	0.0229	0.0265	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0235	0.0000	0.0000	0.0

2. UPLC/MS 를 이용한 인삼의 이차대사체 분석

2.1. 대사산물의 동정

UPLC-QTOF MS 로 측정하여 얻어진 고해상도 분자량, 머무름 시간, MS/MS fragmentation 정보를 바탕으로 대사체를 동정하였다. Elemental composition 을 통해 tolerance 10 ppm 이내에서 분자식 후보를 얻고 화합물 데이터베이스인 SciFinder®로부터 인삼에서 해당 분자식의 물질이 발견되는지 확인하였다. Figure 4 에서 대표적으로 보여지는 MS/MS fragmentation 패턴과 같이 aglycone 에 결합된 분자와 당의 종류를 추정할 수 있었다. Acetyl-ginsenoside Re 의 MS/MS fragmentation 패턴을 보면 acetyl 이 떨어진 매스 값, 당이 순차적으로 떨어진 매스 값이 확인이 되어, ginsenoside aglycone 에 acetyl 기가 결합하고 glucose 2 개와 rhamnose 1 개가 결합한 것을 알 수 있다. 이러한 방법과 함께 문헌을 뒷받침하여, 희귀한 ginsenoside 가 해당 문헌을 참조하여 동정되었고 (Li et al., 2010, Kim, 2012, Song et al., 2014, He et al., 2015), 동일한 분자식을 가지면서 유사한 fragment 패턴을 보이는 성분들은 문헌의 용출 순서와 비교하여 동정할 수 있었다 (Noh and Oh, 2009, Sun et al., 2012, Wang et al., 2014, Ru et al., 2015, Li et al., 2016).

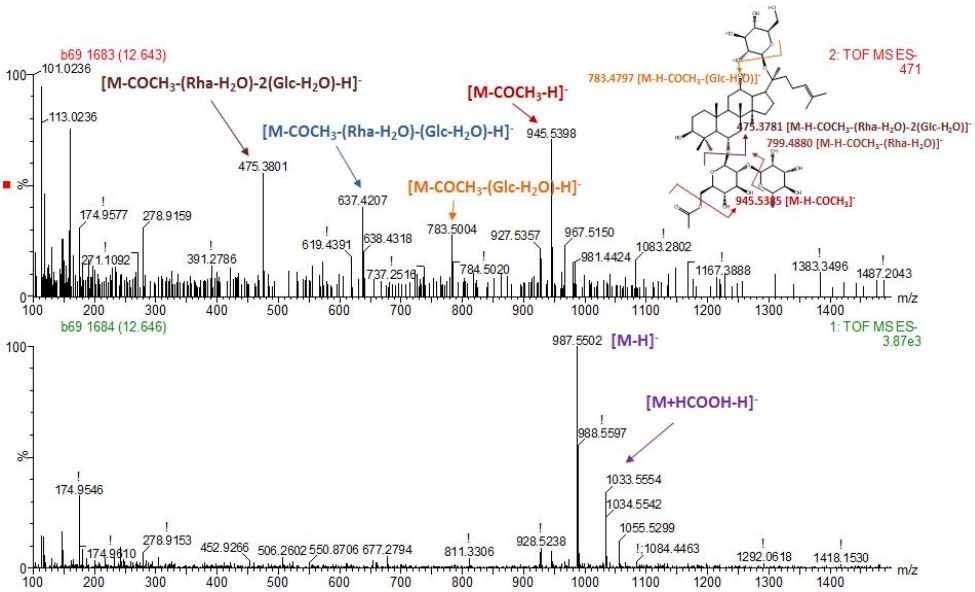


Figure 4. MS spectral data and fragmentation patterns of acetyl ginsenoside Re

2.1.1. 열매

인삼 열매 추출물의 대표적인 UPLC/MS 크로마토그램을 figure 5 에 나타내었다. 인삼 열매에서 51 개 성분이 확인되었고 모두 진세노사이드로 추정되었다. 샘플 간 각 성분들의 비율 차이가 있는 것을 볼 수 있으며 이것으로 계통 간에 진세노사이드의 발현 양이 다르다는 것을 알 수 있고, 인삼 열매에서 identification 된 대사체는 table 7 에 나타내었다.

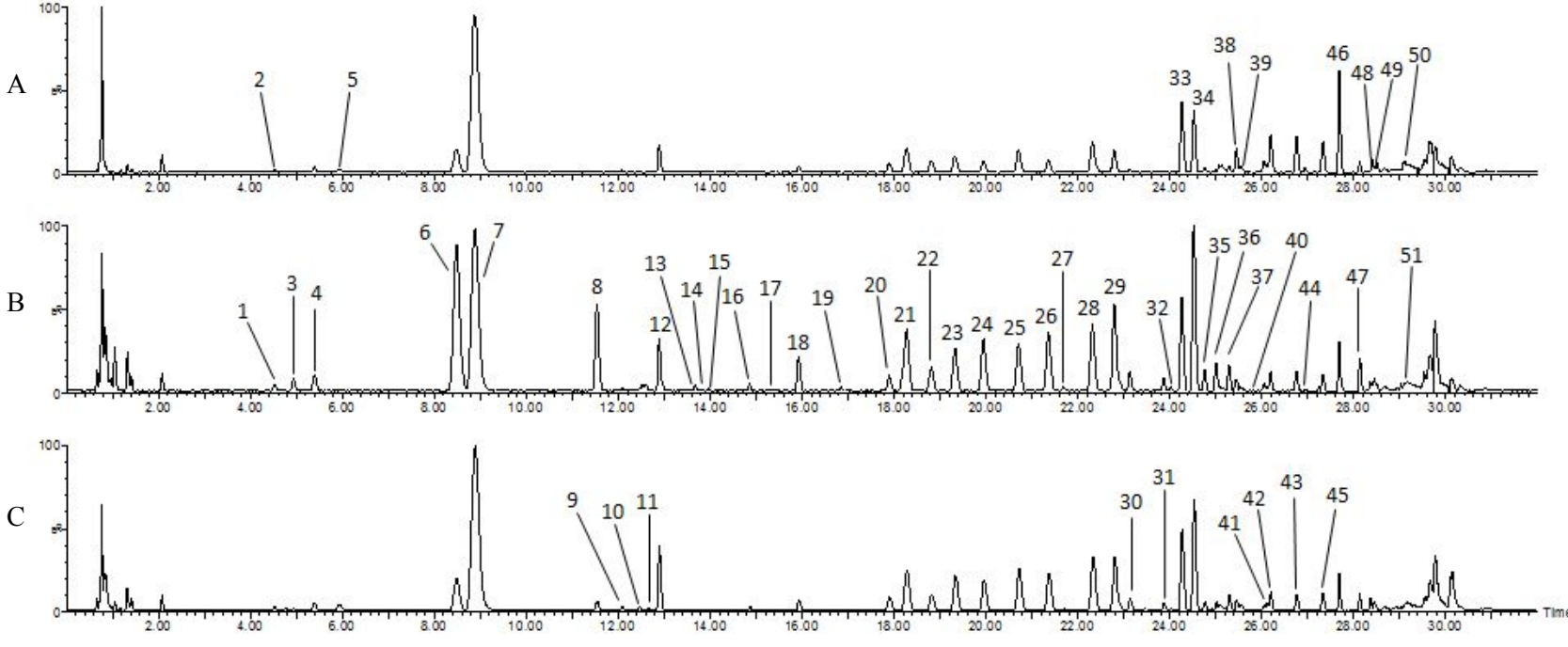


Figure 5. Representative BPI chromatograms of berry extracts. A: G03039, B: G03042, C: G03059

Table 7. Components that were identified from ginseng berries

No.	Identity	t_R	Measured mass $[M-H]^-$	Theorical mass $[M-H]^-$	Error (ppm)	Molecular formular	Fragment ions of $[M-H]^-$
1	G-Re_4/isomer	4.50	931.5253	931.5266	-1.4	$C_{47}H_{80}O_{18}$	799.4474 $[M-H-(Ara-H_2O)]^-$, 637.4131 $[M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3922 $[M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]^-$
2	FloralG-M/FloralG-N	4.76	1077.5836	1077.5845	-0.8	$C_{53}H_{90}O_{22}$	799.4769 $[M-H-(Ara-H_2O)-(Rha-H_2O)]^-$, 637.4309 $[M-H-(Ara-H_2O)-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3776 $[M-H-(Ara-H_2O)-(Rha-H_2O)-2(Glc-H_2O)]^-$
3	20-Glc-G-Rf	4.93	961.5372	961.5372	0.0	$C_{48}H_{82}O_{19}$	799.4798 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 637.4401 $[M-H-2(Glc-H_2O)]^-$, 475.3852 $[M-H-3(Glc-H_2O)]^-$
4	G-Re_4/isomer	5.39	931.5258	931.5266	-0.9	$C_{47}H_{80}O_{18}$	637.4220 $[M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3898 $[M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]^-$
5	FloralG-M/FloralG-N	5.94	1077.5854	1077.5845	0.8	$C_{53}H_{90}O_{22}$	931.5398 $[M-H-(Rha-H_2O)]^-$, 637.4202 $[M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3768 $[M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]^-$
6	G-Rg_1	8.47	799.4848	799.4844	0.5	$C_{42}H_{72}O_{14}$	637.4335 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3763 $[M-H-2(Glc-H_2O)]^-$
7	G-Re	8.88	945.5432	945.5423	1.0	$C_{48}H_{82}O_{18}$	783.4862 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 637.4295 $[M-H-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3771 $[M-H-2(Glc-H_2O)-(Rha-H_2O)]^-$
8	Ac-G-Rg_1 /isomer	11.55	841.4939	841.4949	-1.2	$C_{44}H_{74}O_{15}$	637.4387 $[M-H-acetyl-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3770 $[M-H-acetyl-2(Glc-H_2O)]^-$
9	m-G-Re isomer	12.09	1031.5435	1031.5427	0.8	$C_{51}H_{84}O_{21}$	987.5540 $[M-H-CO_2]^-$, 945.5408 $[M-H-malonyl]^-$, 637.4316 $[M-H-(m-Glc-H_2O)-(Rha-H_2O)]^-$, 475.3786 $[M-H-(m-Glc-H_2O)-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$
10	Ac-G-Re /isomer	12.45	987.5540	987.5529	1.1	$C_{50}H_{83}O_{19}$	945.5385 $[M-H-acetyl]^-$, 799.4880 $[M-H-acetyl-(Rha-H_2O)]^-$, 783.4797 $[M-H-acetyl-(Glc-H_2O)]^-$, 637.4257 $[M-H-acetyl-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3781 $[M-H-acetyl-(Rha-H_2O)-2(Glc-H_2O)]^-$
11	Ac-G-Re /isomer	12.66	987.5521	987.5529	-0.8	$C_{50}H_{83}O_{19}$	945.5395 $[M-H-acetyl]^-$, 799.4936 $[M-H-acetyl-(Rha-H_2O)]^-$, 783 $[M-H-acetyl-(Glc-H_2O)]^-$, 637.4399 $[M-H-acetyl-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3818 $[M-H-acetyl-(Rha-H_2O)-2(Glc-H_2O)]^-$

12	m-G-Re	12.89	1031.5405	1031.5427	-2.1	$C_{51}H_{84}O_{21}$	987.5516 [M-H-CO_2]$^-$, 945.5439 [M-H-malonyl]$^-$, 799.4832 [M-H-malonyl-(Rha-H_2O)]$^-$, 783.4905 [M-H-(m-Glc-H_2O)]-, 637.4296 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Rha-H_2O)]$^-$, 475.3782 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
13	Unknown1	13.68	883.5037	883.5055	-2.0	$C_{46}H_{76}O_{16}$	821.4571, 637.4274, 475.3761
14	FloralG-P	13.80	1093.5785	1093.5795	-0.9	$C_{53}H_{90}O_{23}$	961.5414 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 799.4736 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 637.4228 [M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$, 475.3777 [M-H-(Ara-H_2O)-3(Glc-H_2O)]$^-$
15	FloralG-E/FloralG-F	13.95	815.4809	815.4793	2.0	$C_{42}H_{72}O_{15}$	637.4474 [M-OH-(Glc-H_2O)]$^-$, 475.7112 [M-OH-2(Glc-H_2O)]$^-$
16	NotoG-N	14.87	961.5374	961.5372	0.2	$C_{48}H_{82}O_{19}$	799.4699 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 637.4350 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$, 475.3803 [M-H-3(Glc-H_2O)]$^-$
17	Unknown2	15.35	929.5466	929.5474	-0.9	$C_{48}H_{82}O_{17}$	783.4906, 637.4345, 619.4246, 488.7774
18	G-Rf	15.94	799.4850	799.4844	0.8	$C_{42}H_{72}O_{14}$	637.4155 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 475.3788 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$
19	G-F_3	16.86	769.4733	769.4738	-0.6	$C_{41}H_{70}O_{13}$	637.4516 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 475.3731 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
20	G-F_5	17.90	769.4740	769.4738	0.3	$C_{41}H_{70}O_{13}$	637.4165 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 475.3821 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
21	G-Rg_2	18.29	783.4881	783.4895	-1.8	$C_{42}H_{72}O_{13}$	637.4406 [M-H-(Rha-H_2O)]$^-$, 475.3751 [M-H-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
22	NotoG-R_2	18.81	769.4756	769.4738	2.3	$C_{41}H_{70}O_{13}$	475.3775 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
23	G-Rb_1	19.33	1107.5945	1107.5951	-0.5	$C_{54}H_{92}O_{23}$	945.5423 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 783.4929 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4365 [M-H-3(Glc-H_2O)]$^-$
24	m-G-Rb_1	19.94	1193.5945	1193.5955	-0.8	$C_{57}H_{94}O_{26}$	1149.6045 [M-H-CO_2]$^-$, 1107.5940 [M-H-malonyl]$^-$, 1089.5848 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.5399 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 783.4919 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
25	G-Rc	20.71	1077.5833	1077.5845	-1.1	$C_{53}H_{90}O_{22}$	945.5390 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 783.4847 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4366 [M-H-(Ara-H2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
26	m-G-Rc	21.37	1163.5824	1163.5849	-2.1	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5967 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.5856 [M-H-malonyl]$^-$, 1059.5786 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.5461 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 783.4963 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$, 621.4382 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$

27	m-G-Rb_1 isomer	21.70	1193.5979	1193.5955	2.0	$C_{56}H_{94}O_{26}$	1149.6028 [M-H-CO_2]$^-$, 1107.6012 [M-H-malonyl]$^-$, 945.5565 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 783.4921 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
28	G-Rb_2	22.34	1077.5854	1077.5845	0.8	$C_{53}H_{90}O_{22}$	945.5410 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 783.4905 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4396 [M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
29	m-G-Rb_2	22.80	1163.5851	1163.5849	0.2	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5929 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.5797 [M-H-malonyl]$^-$, 945.5502 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 783.4825 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$
30	m-G-Rb_3	23.14	1163.5840	1163.5849	-0.8	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5948 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.4874 [M-H-malonyl]$^-$, 1059.5750 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.5317 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 915.5339 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 783.4852 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$
31	m-G-Rb_2/m-G-Rb_3 isomer	23.87	1163.5854	1163.5849	0.4	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5952 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.5846 [M-H-malonyl]$^-$, 1059.5680 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.5519 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 783.4842 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$
32	m-G-Rb_2/m-G-Rb_3 isomer	24.03	1163.5807	1163.5849	-3.6	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5948 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.5851 [M-H-malonyl]$^-$, 1059.5607 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.554 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 915.5427 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 783.4919 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$
33	G-Rd	24.27	945.5414	945.5423	-1.0	$C_{48}H_{82}O_{18}$	783.4876 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4361 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3849 [M-H-3(Glc-H_2O)]$^-$
34	m-G-Rd	24.53	1031.5439	1031.5427	1.2	$C_{51}H_{84}O_{21}$	987.5520 [M-H-CO_2]$^-$, 945.5431 [M-H-malonyl]$^-$, 927.5325 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 783.4885 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 621.4376 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3849 [M-H-(m-Glc-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
35	m-G-Rd isomer	24.77	1031.5438	1031.5427	1.1	$C_{51}H_{84}O_{21}$	987.5539 [M-H-CO_2]$^-$, 945.5413 [M-H-malonyl]$^-$, 927.5306 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 783.5009 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 765.4701 [M-H-malonyl-H_2O-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4401 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$_-$
36	2m-G-Rd	25.01	1117.5414	1117.5431	-1.5	$C_{54}H_{85}O_{24}$	1073.5536 [M-H-CO_2]$^-$, 1029.5630 [M-H-2CO_2]$^-$, 987.5529 [M-H-malonyl-CO_2]$^-$, 945.5414 [M-H-2malonyl]$^-$, 783.4905 [M-H-(2m-Glc-H_2O)]$^-$, 621.4384 [M-H-(2m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3840 (2m-Glc-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$

37	m-G-Rd isomer	25.29	1031.5422	1031.5427	-0.5	$C_{51}H_{84}O_{21}$	987.5536 [M-H-CO_2]$^-$, 945.5421 [M-H-malonyl]$^-$, 927.5298 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 783.4952 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 765.4795 [M-H-malonyl-H_2O-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4368 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
38	Gypenoside XVII	25.45	945.5398	945.5423	-2.6	$C_{48}H_{82}O_{18}$	783.4770 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4326 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3922 [M-H-3(Glc-H_2O)]$^-$
39	Ac-G-Rd	25.57	987.5525	987.5529	-0.4	$C_{50}H_{84}O_{19}$	945.5216 [M-H-acetyl]$^-$, 621.4430 [M-H-acetyl-2(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3894 [M-H-acetyl-3(Glc-H_2O)]$^-$
40	Ac-m-G-Rd/isomer	25.76	1073.5502	1073.5532	-2.8	$C_{53}H_{86}O_{22}$	1029.5588 [M-H-CO_2]$^-$, 945.5530 [M-H-acetyl-malonyl]$^-$, 765.4617 [M-H-acetyl-m-Glc]$^-$, 621.4489 [M-H-acetyl-m-2(Glc-H_2O)]$^-$
41	Ac-m-G-Rd/isomer	26.12	1073.5552	1073.5532	1.9	$C_{53}H_{86}O_{22}$	1029.5616 [M-H-CO_2]$^-$, 945.5261 [M-H-acetyl-malonyl]$^-$, 783.5035 [M-H-acetyl-m-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4398 [M-H-acetyl-m-2(Glc-H_2O)]$^-$
42	Compound Mc_1	26.20	915.5302	915.5317	-1.6	$C_{47}H_{80}O_{17}$	783.4933 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 621.4391 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3835 [M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
43	Gypenoside IX	26.76	915.5320	915.5317	0.3	$C_{47}H_{80}O_{17}$	783. 4947 [M-H-(Xyl-H_2O)]$^-$, 621.4409 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3921 [M-H-(Xyl-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
44	Gypenoside IX isomer	26.93	915.5311	915.5317	-0.7	$C_{47}H_{80}O_{17}$	783.4964 [M-H-(Xyl-H_2O)]$^-$, 621.4282 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3676 [M-H-(Xyl-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
45	Unknown3	27.33	989.5308	989.5321	-1.3	$C_{49}H_{82}O_{20}$	883.4983, 621.4377, 459.3900
46	$G\text{-}F_2$	27.69	783.4880	783.4895	-1.9	$C_{42}H_{72}O_{13}$	621.4369 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3835 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$
47	$G\text{-}Rs_3$	28.13	825.4987	825.5000	-1.6	$C_{44}H_{74}O_{14}$	783.4912 [M-H-acetyl]$^-$, 765.4833 [M-H-acetyl-H_2O]$^-$, 621.4434 [M-H-acetyl-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3858 [M-H-acetyl-2(Glc-H_2O)]$^-$
48	Compound Mc	28.36	753.4810	753.4789	2.8	$C_{41}H_{70}O_{12}$	621.3466 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 459.3823 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
49	Compound Y	28.50	753.4796	753.4789	0.6	$C_{41}H_{70}O_{12}$	459.3904 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
50	$20(S)\text{-}G\text{-}Rh_2$	29.09	621.4357	621.4366	-1.4	$C_{36}H_{62}O_8$	459.3839 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$
51	$20(R)\text{-}G\text{-}Rh_2$	29.28	621.4351	621.4366	-2.4	$C_{36}H_{62}O_8$	459.2561 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$

G: ginsenosdie, m: malonyl, Ac: acetyl, Glc: β-D-glucose, Ara: α-L-arabonise, Rha: α-L-rhamnose, Xyl: β-D-xylos

2.1.2. 뿌리

뿌리에서 대표적인 UPLC-MS 크로마토그램을 figure 6 에 나타내었고, 인삼 뿌리에서 50 개 성분이 확인되었으며 모두 일반적으로 인삼에서 보고되는 성분으로 추정되었다 (Qiu et al., 2009, Zhang et al., 2012a, Zhang et al., 2012b, Sun et al., 2015, Yang et al., 2015). 뿌리 또한 샘플 간 각 성분들의 비율 차이가 있는 것으로 보아 계통 간 성분들의 양상이 매우 다르다는 것을 알 수 있고 인삼 뿌리에서 identification 된 대사체는 table 8 에 나타내었다.

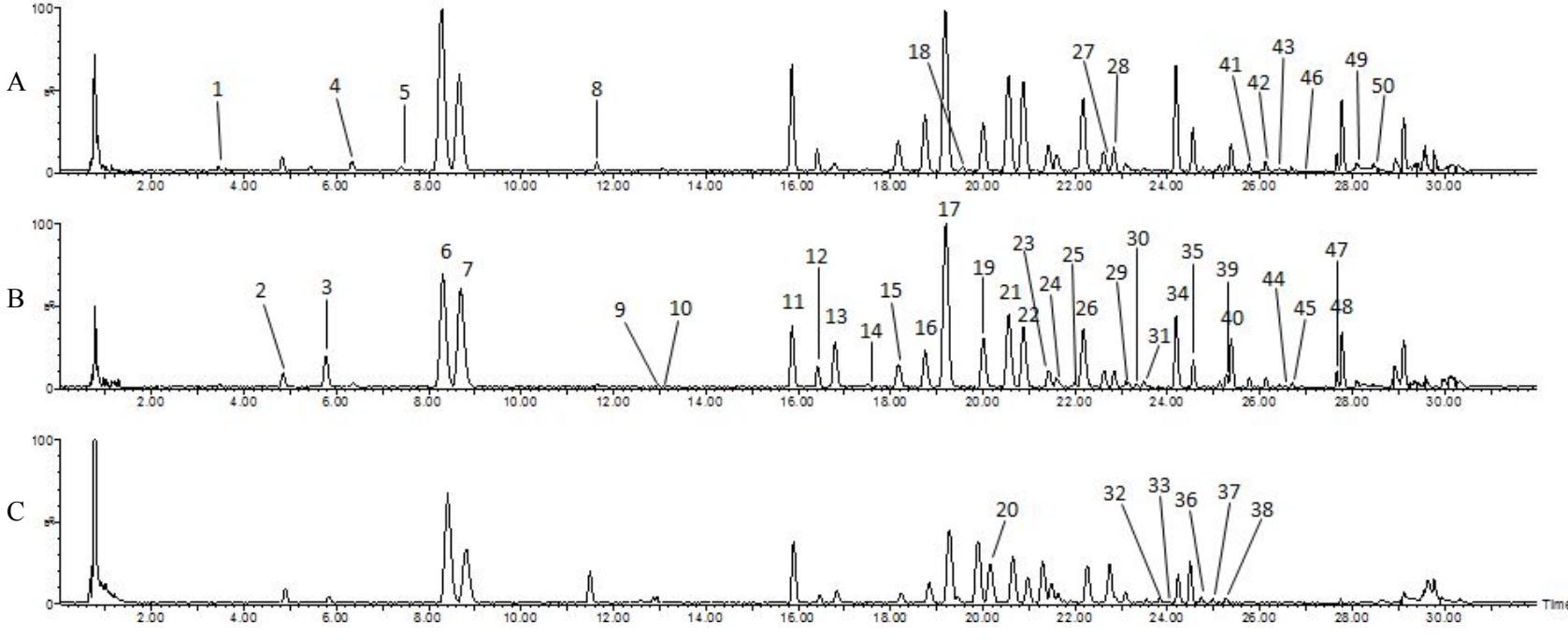


Figure 6. Representative BPI chromatograms of root extracts. A: G03005, B: G03004, C: G03084

Table 8. Components that were identified from ginseng roots

No.	Identity	t_R	Observed MS $[M-H]^-$	Calculated MS $[M-H]^-$	Error (ppm)	Molecular formular	Major fragment ions (m/z)
1	G-Re_3	3.45	961.5363	961.5372	0.2	$C_{48}H_{82}O_{19}$	637.4158 $[M-H-2(Glc-H_2O)]^-$, 475.3692 $[M-H-3(Glc-H_2O)]^-$
2	20-Glc-G-Rf	4.85	961.5374	961.5372	-2.4	$C_{48}H_{82}O_{19}$	799.4753 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 637.4242 $[M-H-2(Glc-H_2O)]^-$, 475.3818 $[M-H-3(Glc-H_2O)]^-$
3	NotoG-R_1	5.77	931.5236	931.5266	-3.2	$C_{47}H_{80}O_{18}$	799.4776 $[M-H-(Xyl-H_2O)]^-$, 637.4275 $[M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$
4	G-Re_1	6.36	961.5349	961.5372	-2.4	$C_{48}H_{82}O_{19}$	799.5049 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 637.4368 $[M-H-2(Glc-H_2O)]^-$, 475.3761 $[M-H-3(Glc-H_2O)]^-$
5	G-Re_2	7.45	961.5356	961.5372	-1.7	$C_{48}H_{82}O_{19}$	637.4313 $[M-H-2(Glc-H_2O)]^-$, 475.3781 $[M-H-3(Glc-H_2O)]^-$
6	G-Rg_1	8.30	799.4821	799.4844	-2.9	$C_{42}H_{72}O_{14}$	637.4314 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3783 $[M-H-2(Glc-H_2O)]^-$
7	G-Re	8.70	945.5425	945.5423	0.2	$C_{48}H_{82}O_{18}$	783.4865 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 637.4291 $[M-H-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3793 $[M-H-2(Glc-H_2O)-(Rha-H_2O)]^-$
8	Ac-G-Rg_1/isomer	11.67	841.4951	841.4949	0.2	$C_{44}H_{74}O_{15}$	822.4716 $[M-2H-H_2O)]^-$, 637.4382 $[M-H-acetyl-(Glc-H_2O)]^-$, 475.4013 $[M-H-acetyl-2(Glc-H_2O)]^-$
9	Ac-G-Rg_1/isomer	12.84	841.4946	841.4949	-0.4	$C_{44}H_{74}O_{15}$	637.7949 $[M-H-acetyl-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3716 $[M-H-acetyl-2(Glc-H_2O)]^-$
10	NotoG-A	12.96	1123.5919	1123.59	1.7	$C_{54}H_{92}O_{24}$	637.4270 $[M-H-3(Glc-H_2O)]^-$, 475.3792 $[M-H-4(Glc-H_2O)]^-$
11	G-Rf	15.87	799.4847	799.4844	0.4	$C_{42}H_{72}O_{14}$	637.4255 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 475.3765 $[M-H-2(Glc-H_2O)]^-$
12	G-Ra_3	16.42	1239.6366	1239.6374	-0.6	$C_{59}H_{100}O_{27}$	1107.6128 $[M-H-(Xyl-H_2O)]^-$, 1077.5900 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 987.0839 $[M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$
13	G-F_3	16.80	769.4726	769.4738	-1.6	$C_{41}H_{70}O_{13}$	637.4408 $[M-H-(Ara-H_2O)]^-$, 475.3790 $[M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$
14	G-Ra_0	17.25	1269.6455	1269.6421	-1.9	$C_{60}H_{102}O_{28}$	1107.5635 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 945.5555 $[M-H-2(Glc-H_2O)]^-$
15	G-Rg_2	18.18	783.4902	783.4895	0.9	$C_{42}H_{72}O_{13}$	637.4335 $[M-H-(Rha-H_2O)]^-$, 475.3786 $[M-H-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)]^-$
16	G-Ra_2	18.74	1209.6260	1209.6268	-0.7	$C_{58}H_{98}O_{26}$	1077.5902 $[M-H-(Xyl-H_2O)]^-$, 1047.5559 $[M-H-(Glc-H_2O)]^-$, 945.5043 $[M-H-(Xyl-H_2O)-(Ara-H_2O)]^-$, 783.4882 [M-H-

							(Xyl-H_2O)-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
17	G-Rb_1	19.21	1107.5928	1107.5951	-2.1	$C_{54}H_{92}O_{23}$	945.5402 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 783.4871 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4355 [M-H-3(Glc-H_2O)]$^-$
18	m-G-Ra_2	19.58	1295.6262	1295.6272	-0.8	$C_{61}H_{100}O_{29}$	945.5043 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$, 783.4882 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
19	m-G-Rb_1	20.00	1193.5964	1193.5955	0.8	$C_{57}H_{94}O_{26}$	1149.6014 [M-H-CO_2]$^-$, 1107.5961 [M-H-malonyl]$^-$, 1089.5870 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.5419 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 783.4921 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
20	G-Ro	20.17	955.4896	955.4903	-0.7	$C_{48}H_{76}O_{19}$	793.4397 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 631.3987 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$, 613.3736 [M-H-2(Glc-H_2O)-H_2O]$^-$, 455.3536 [M-H-2(Glc-H_2O)-(GlcA-H_2O)]$^-$
21	G-Rc	20.56	1077.5828	1077.5845	-1.6	$C_{53}H_{90}O_{22}$	945.5424 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 783.4388 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4357 [M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
22	G-Ra_1	20.88	1209.6263	1209.6268	-0.4	$C_{58}H_{98}O_{26}$	1077.5715 [M-H-(Xyl-H_2O)]$^-$, 1047.5685 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 945.5428 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$, 915.5547 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 783.5032 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
23	m-G-Rc	21.44	1163.5822	1163.5849	-2.3	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5918 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.5809 [M-H-malonyl]$^-$, 1059.5652 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.5412 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 765.4761 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)-H_2O]$^-$, 621.4464 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
24	m-G-Ra_1	21.61	1295.6252	1295.6272	-1.5	$C_{61}H_{100}O_{29}$	1151.5864 [M-H-CO_2]$^-$, 1031.5975 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$, 869.5914 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
25	m-G-Rb_1 isomer	21.63	1193.5940	1193.5955	-1.3	$C_{56}H_{94}O_{26}$	1149.6083 [M-H-CO_2]$^-$, 1107.5980 [M-H-malonyl]$^-$, 1089.5865 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.5443 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 783.4919 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
26	G-Rb_2	22.18	1077.5826	1077.5845	-1.8	$C_{53}H_{90}O_{22}$	945.5417 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 783.4904 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4387 [M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
27	G-Rb_3	22.63	1077.5818	1077.5845	-2.5	$C_{53}H_{90}O_{22}$	945.5421 [M-H-(Xyl-H_2O)]$^-$, 915.5377 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 783.4865 [M-H-(Xyl-Glc-H_2O)]$^-$

28	m-G-Rb_2	22.85	1163.5830	1163.5849	-1.3	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5968 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.5841 [M-H-malonyl]$^-$, 1059.5757 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.5369 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 915.5276 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 783.4901 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$
29	m-G-Rb_3	23.10	1163.5836	1163.5849	-1.1	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5950 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.5885 [M-H-malonyl]$^-$, 1059.5778 [M-H-malonyl-H_2O]-, 945.5313 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 783.5021 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$
30	G-Rb_2/G-Rb_3 isomer	23.32	1077.5829	1077.5845	-1.5	$C_{53}H_{90}O_{22}$	945.5474 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 783.4910 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4363 [M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
31	Quinquenoside R_1	23.49	1149.6052	1149.6057	-0.4	$C_{56}H_{94}O_{24}$	1107.5989 [M-H-acetyl]$^-$, 945.5396 [M-H-(6-O-acetyl-Glc-H_2O)]$^-$, 783.4866 [M-H-(6-O-acetyl-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
32	m-G-Rb_2/m-G-Rb_3 isomer	23.84	1163.5834	1163.5849	-1.3	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5991 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.5880 [M-H-malonyl]$^-$, 1059.5770 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 945.5500 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 915.5352 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 783.3883 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Ara-H_2O)]$^-$
33	m-G-Rb_2/m-G-Rb_3 isomer	24.01	1163.5862	1163.5849	1.1	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1119.5922 [M-H-CO_2]$^-$, 1077.5757 [M-H-malonyl]$^-$, 1059.5814 [M-H-malonyl-H_2O]-, 945.5556 [M-H-malonyl-Ara]$^-$, 915.5348 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$
34	G-Rd	24.18	945.5400	945.5423	-2.4	$C_{48}H_{82}O_{18}$	783.4836 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4340 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$
35	m-G-Rd	24.55	1031.5415	1031.5427	-1.2	$C_{51}H_{84}O_{21}$	987.5538 [M-H-CO2]-, 945.5380 [M-H-malonyl]-, 927.5311 [M-H-malonyl-H2O]-, 783.4916 [M-H-(m-Glc-H2O)]-, 621.4418 [M-H-(m-Glc-H2O)-(Glc-H2O)]-
36	m-G-Rd isomer	24.78	1031.5402	1031.5427	-2.4	$C_{51}H_{84}O_{21}$	987.5526 [M-H-CO_2]$^-$, 945.5542 [M-H-malonyl]$^-$, 927.5379 [M-H-malonyl-H_2O]$^-$, 783.5106 [M-H-(m-Glc-H_2O)]$^-$, 621.4477 [M-H-(m-Glc-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
37	G-Rs_1/G-Rs_2	24.98	1119.5929	1119.5951	-2.0	$C_{55}H_{92}O_{23}$	1077.5776 [M-H-acetyl]$^-$, 945.5455 [M-H-acetyl-(Ara-H_2O)]$^-$, 783.4860 [M-H-acetyl-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4512 [M-H-acetyl-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
38	NotoG-O	25.11	1047.5724	1047.5740	-1.5	$C_{52}H_{88}O_{21}$	915.5578 [M-H-(Xyl-H_2O)]$^-$, 753.5652[M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
39	G-Rb_2/G-Rb_3 isomer	25.28	1077.5837	1077.5845	-0.7	$C_{53}H_{90}O_{22}$	945.5474 [M-H-(Ara-H_2O)]-, 783.4910 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]-, 621.4363 [M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]-
40	Gypenoside XVII	25.38	945.5420	945.5423	-0.3	$C_{48}H_{82}O_{18}$	783.4916 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 621.4359 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3809 [M-H-3(Glc-H_2O)]$^-$

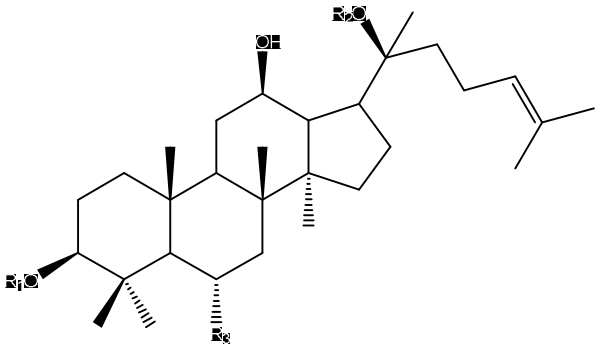
41	NotoG-O isomer	25.77	1047.5713	1047.5740	-2.6	$C_{52}H_{88}O_{21}$	915.5345 [M-H-(Xyl-H_2O)]$^-$, 753.5622[M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$
42	Compound Mc_1	26.13	915.5294	915.5317	-2.5	$C_{47}H_{80}O_{17}$	783.4733 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 621.4409 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3837 [M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
43	Compound O	26.41	915.5323	915.5317	0.7	$C_{47}H_{80}O_{17}$	783.4794 [M-H-(Ara-H_2O)]$^-$, 621.4384 [M-H-(Ara-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3852 [M-H-(Ara-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
44	VinaG-R_{16}	26.55	915.5322	915.5317	0.5	$C_{47}H_{80}O_{17}$	783.4997 [M-H-(Xyl-H_2O)]$^-$, 621.4278 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3851 [M-H-(Xyl-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
45	Gypenoside IX	26.69	915.5306	915.5317	-1.2	$C_{47}H_{80}O_{17}$	783.4874 [M-H-(Xyl-H_2O)]$^-$, 621.4325 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3818 [M-H-(Xyl-H2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
46	Gypenoside IX isomer	26.87	915.5311	915.5317	-0.7	$C_{47}H_{80}O_{17}$	621.4093 [M-H-(Xyl-H_2O)-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3884 [M-H-(Xyl-H_2O)-2(Glc-H_2O)]$^-$
47	G-F_2	27.66	783.4900	783.4895	0.6	$C_{42}H_{72}O_{13}$	621.4415 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3964 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$
48	Chikusetsusaponin Iva	27.78	793.4370	793.4374	-0.5	$C_{42}H_{66}O_{14}$	613.3721 [M-H-(Glc-H_2O)-H_2O]$^-$, 455.3506 [M-H-(Glc-H_2O)-(GlcA-H_2O)]$^-$
49	G-Rg_3	28.12	783.4877	783.4895	-2.3	$C_{42}H_{72}O_{13}$	621.4249 [M-H-(Glc-H_2O)]$^-$, 459.3773 [M-H-2(Glc-H_2O)]$^-$
50	Calenduloside E	28.45	631.3840	631.3846	-1.0	$C_{36}H_{56}O_9$	455.3374 [M-H-(GlcA-H_2O)]$^-$

G: ginsenosdie, m: malonyl, Ac: acetyl, Glc: β-D-glucose, Ara: α-L-arabonise, Rha: α-L-rhamnose, Xyl: β-D-xylose

2.2. 인삼열매의 진세노사이드

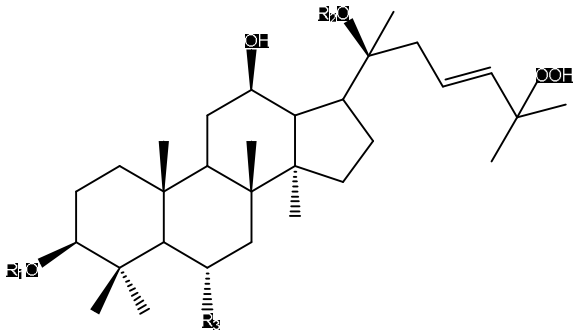
뿌리에서 확인된 ginsenoside 는 모두 인삼에서 일반적으로 잘 알려진 성분이므로, 열매에서 확인된 ginsenoside 의 화학적 구조를 figure 7 에 나타내었다.

열매에서는 일반적인 PPT, PPD 타입의 ginsenoside 와 함께, 특징적으로 25 번 위치에 hydrogen peroxide 가 붙은 floralginsenoside 와 acetyl 기가 결합된 ginsenoside 가 다수 확인되었다. 이러한 floralginsenoside 는 인삼 꽃에서 주로 분리 보고되었던 성분들로 (Tung et al., 2010, Mao et al., 2014, Shin et al., 2015), 일반적으로 뿌리에서는 분리되는 성분들이 아니다. 또한, PPT 타입의 ginsenoside 의 경우 일반적으로 6 번 혹은 20 번 위치에 당이 결합하는 경우가 흔하지만, 열매에서는 floralginsenoside P 와 같이 3 번 위치에 당이 결합한 ginsenoside 도 확인되었다.



No.	Name	R_1	R_2	R_3
1	G-Re_4	H	Glc	Glc^2-^{1}Rha(f)
2	FloralG-M/FloralG-N	H	Glc^6-^{1}Ara(f)/Glc^6-^{1}Ara(p)	Glc^2-^{1}Rha
3	20-Glc-G-Rf	H	Glc	Glc^2-^{1}Glc
5	FloralG-M/FloralG-N	H	Glc^6-^{1}Ara(f)/Glc^6-^{1}Ara(p)	Glc^2-^{1}Rha
6	G-Rg_1	H	Glc	Glc
7	G-Re	H	Glc	Glc^2-^{1}Rha

10	Ac-G-Re	H	Glc/Glc-Acetyl	Glc^{2}-$^{1}Rha^{6}$-Acetyl/Glc^{2}-^{1}Rha
12	m-G-Re	H	Glc	Glc^{2}-$^{1}Rha^{6}$-Malonyl
14	FloralG-P	Glc^{2}-^{1}Glc	Glc^{6}-$^{1}Ara(p)$	H
16	NotoG-N	H	Glc	Glc^{4}-^{1}Glc
18	G-Rf	H	H	Glc^{2}-^{1}Glc
19	G-F_3	H	Glc^{6}-$^{1}Ara(p)$	H
20	G-F_5	H	Glc^{6}-$^{1}Ara(f)$	H
21	G-Rg_2	H	H	Glc^{2}-^{1}Rha
22	NotoG-R_2	H	H	Glc^{2}-^{1}Xyl
23	G-Rb_1	Glc^{2}-^{1}Glc	Glc^{6}-^{1}Glc	H
24	m-G-Rb_1	Glc^{2}-$^{1}Glc^{6}$-Malonyl	Glc^{6}-^{1}Glc	H
25	G-Rc	Glc^{2}-^{1}Glc	Glc^{6}-$^{1}Ara(f)$	H
26	m-G-Rc	Glc^{2}-$^{1}Glc^{6}$-Malonyl	Glc^{6}-$^{1}Ara(f)$	H
28	G-Rb_2	Glc^{2}-^{1}Glc	Glc^{6}-$^{1}Ara(p)$	H
29	m-G-Rb_2	Glc^{2}-$^{1}Glc^{6}$-Malonyl	Glc^{6}-$^{1}Ara(p)$	H
30	m-G-Rb_3	Glc^{2}-$^{1}Glc^{6}$-Malonyl	Glc^{6}-^{1}Xyl	H
33	G-Rd	Glc^{2}-^{1}Glc	Glc	H
34	m-G-Rd	Glc^{2}-$^{1}Glc^{6}$-Malonyl	Glc	H
36	2m-G-Rd	Glc^{2}-$^{1}Glc^{6}$-Malonyl	Glc-Malonyl	H
38	Gypenoside XVII	Glc	Glc^{6}-^{1}Glc	H
39	Ac-G-Rd	Glc^{2}-^{1}Glc-Acetyl/Glc^{2}-^{1}Glc	Glc/Glc-Acetyl	H
40	Ac-m-G-Rd	Glc^{2}-^{1}Glc-Malonyl-Acetyl/Glc2-1Glc-Acetyl/Glc^{2}-^{1}Glc-Malnonyl/Glc2-1Glc	Glc/Glc-Malonyl/Glc-Glc-Acetyl/Glc-Glc-Malonyl-Acetyl	H
42	Compound Mc_1	Glc	Glc^{6}-$^{1}Ara(f)$	H
43	Gypenoside IX	Glc	Glc^{6}-^{1}Xyl	H
44	NotoG-Fe	Glc	Glc^{6}-$^{1}Ara(f)$	H
46	G-F_2	Glc	Glc	H
47	G-Rs_3	Glc^{2}-$^{1}Glc^{6}$-Acetyl	Glc^{6}-$^{1}Ara(f)$	H
48	Compound Mc	H	Glc^{6}-$^{1}Ara(f)$	H
49	Compound Y	H	Glc^{6}-$^{1}Ara(p)$	H
50	G-Rh_2	Glc	H	H



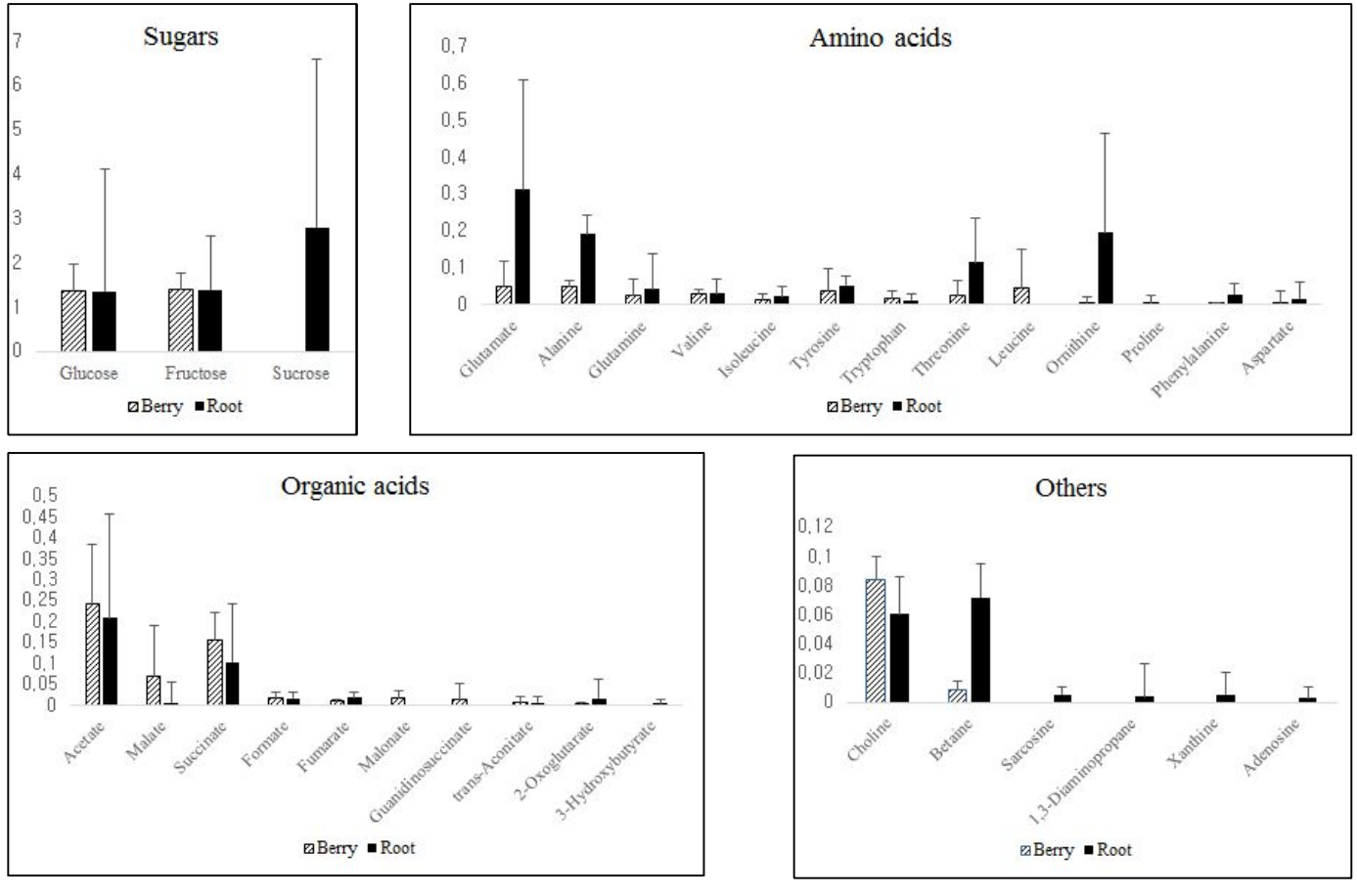
No.	Name	R_1	R_2	R_3
15	FloralG-E/FloralG-F	Glc^{2}-^{1}Glc/Glc	H/Glc	H

Figure 7. Chemical structures of identified ginsenosdies in berries
G: ginsenoside, m: malonyl, Glc: glucose, Ara(p): arabinopyranose, Ara(f): arabinofuranose, Xyl: xylose, Rha: rhamnose,

3. 열매와 뿌리의 일차대사체와 이차대사체 비교

3.1. 일차대사체 비교

일차대사산물의 종류와 함량에 대해 figure 8 에 나타내었다. 열매와 뿌리 모두 일차대사체 중 대부분을 당류가 차지하고 있으며, 특징적으로 뿌리에서는 sucrose 가 주성분으로 확인되었으나, 열매의 경우 검출되지 않았다. 이는 열매에서 이당류 분해를 통해 단당류가 공급되는 것이 아니라, 다른 기관에서 분해된 (생합성된) 단당류가 열매로 이동하는 것으로 짐작할 수 있다. 또한 계통간 뿌리의 sucrose 함유량의 표준 편차 값이 매우 큰 것으로 확인되어, 단당류의 가장 중요한 공급원이 뿌리인 것으로 짐작할 수 있다. 전반적으로 아미노산은 열매에서보다 뿌리에서 높은 함량을 보이고, 유기산은 뿌리에서보다 열매에서 더 함량이 높았으며 당, 아미노산, 유기산 외 다른 성분들은 뿌리에서 더 많이 발견되었다.

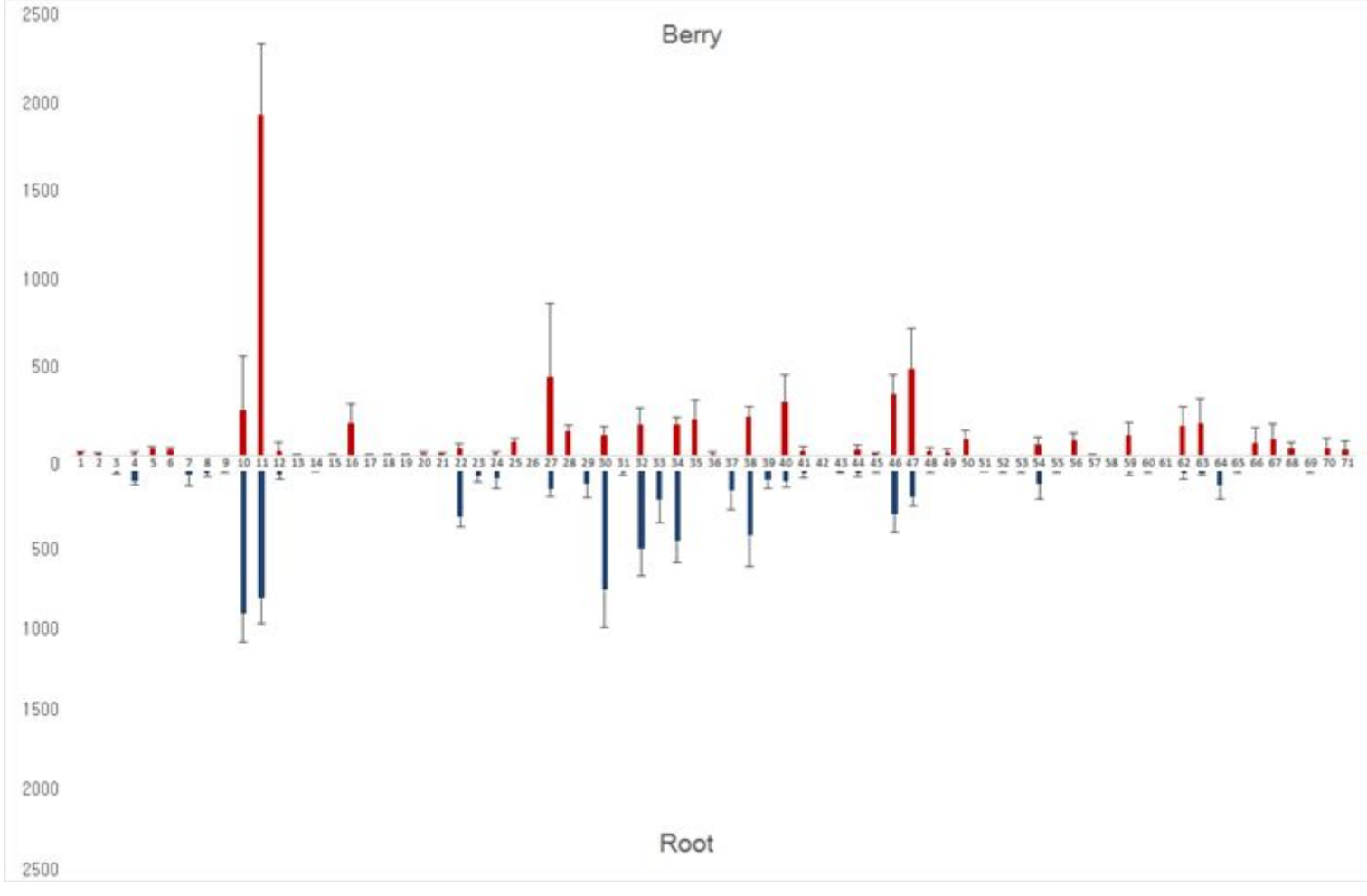


0Figure 8. Contents of primary metabolites in berries and roots

3.2. 이차대사체 비교

열매와 뿌리의 ginsenosdie 의 프로파일링 및 상대적 함유량에 대한 비교는 figure 9 에 나타내었다. 열매에서 뿌리에 비해 ginsenoside Re 의 상대적 양이 월등히 많은 것이 특징이다. 또한 각 성분의 표준편차가 심해 계통 간 ginsenoside 성분비가 매우 큰 차이를 보인다는 것을 알 수 있고, 특히 미량 ginsenoside 는 계통 간에 수배 이상의 차이가 있었다.

Table 9 와 같이 전체 ginsenoside, PPT 타입의 ginsenoside 의 합, PPD 타입의 ginsenoside 의 합으로서 상대적 ginsenoside 양으로 상위 10 개 계통을 선정했을 때, 뿌리에서 ginsenoside 가 많은 계통이 열매에서도 많지는 않다는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 같은 계통의 열매와 뿌리이더라도 ginsenoside 의 양은 같은 경향성을 가지지 않는다는 것을 의미한다.


Berry
Root
2500
2000
1500
1000
500
0
500
1000
1500
2000
2500

1	G-Re4/isomer	**19**	FloralG-E/FloralG-F	**37**	G-Ra1	**55**	NotoG-O isomer
2	FloralG-M/FloralG-N	**20**	NotoG-N	**38**	G-Rb2	**56**	Ac-G-Rd
3	G-Re3	**21**	Unknown2	**39**	G-Rb3	**57**	Ac-m-G-Rd/isomer
4	20-Glc-G-Rf	**22**	G-Rf	**40**	m-G-Rb2	**58**	Ac-m-G-Rd/isomer
5	G-Re4/isomer	**23**	G-Ra3	**41**	m-G-Rb3	**59**	Compound Mc1
6	FloralG-M/FloralG-N	**24**	G-F3	**42**	G-Rb2/G-Rb3 isomer	**60**	Compound O
7	NotoG-R1	**25**	G-F5	**43**	Quinquenoside R1	**61**	VinaG-R16
8	G-Re1	**26**	G-Ra0	**44**	m-G-Rb2/m-G-Rb3 isomer	**62**	Gypenoside IX
9	G-Re2	**27**	G-Rg2	**45**	m-G-Rb2/m-G-Rb3 isomer	**63**	G-F2
10	G-Rg1	**28**	NotoG-R2	**46**	G-Rd	**64**	Chikusetsusaponin Iva
11	G-Re	**29**	G-Ra2	**47**	m-G-Rd	**65**	G-Rg3
12	Ac-G-Rg_1/isomer	**30**	G-Rb1	**48**	m-G-Rd isomer	**66**	G-Rs3
13	m-G-Re isomer	**31**	m-G-Ra2	**49**	2m-Rd	**67**	Compound Mc
14	NotoG-A	**32**	m-G-Rb1	**50**	m-G-Rd isomer	**68**	Compound Y
15	Ac-G-Re/isomer	**33**	G-Ro	**51**	G-Rs1/G-Rs2	**69**	Calenduloside E
16	m-G-Re	**34**	G-Rc	**52**	NotoG-O	**70**	G-20(S)-Rh2
17	Unknown1	**35**	m-G-Rc	**53**	G-Rb2/G-Rb3 isomer	**71**	G-20(R)-Rh2
18	FloralG-P	**36**	m-G-Rb1 isomer	**54**	Gypenoside XVII		

Figure 9. Relative contents of ginsenosides in berried and roots

Table 9. Top 10 accessions of relative amount of ginsenosides

Berries

Total		PPT		PPD	
47	G03086	**37**	G03069	**40**	G03076
52	G03105	**10**	G03022	**36**	G03067
51	G03096	**46**	G03084	**54**	G03109
55	G03110	**17**	G03037	**51**	G03096
35	G03065	**34**	G03064	**16**	G03036
53	G03107	**44**	G03081	**52**	G03105
54	G03109	**33**	G03063	**43**	G03080
40	G03076	**48**	G03089	**35**	G03065
49	G03092	**47**	G03086	**42**	G03079
41	G03078	**21**	G03045	**38**	G03072

Roots

Total		PPT		PPD	
4	**G03009**	**27**	**G03056**	**4**	**G03009**
10	**G03022**	**22**	**G03047**	**10**	**G03022**
12	**G03029**	**1**	**G03004**	**18**	**G03039**
18	**G03039**	**3**	**G03007**	**20**	**G03042**
22	**G03047**	**12**	**G03029**	**14**	**G03031**
20	**G03042**	**17**	**G03037**	**7**	**G03015**
14	**G03031**	**5**	**G03010**	**12**	**G03029**
21	**G03045**	**21**	**G03045**	**11**	**G03026**
15	**G03035**	**25**	**G03054**	**6**	**G03012**
3	G03007	**10**	G03022	**21**	G03045

Ⅲ. 다변량 분석

A. 분석 방법

다변량 분석은 Simca-P+ (version 13, Umetrics, umea, Sweden) 프로그램을 사용하였다. 각 variable 은 noise 는 증폭시키지 않으면서 적은 양의 이온들에 비중을 주기 위하여 pareto scaling 을 적용하였다. 각 LC-MS 데이터와 NMR 데이터 모두에 대하여 시행한 주성분 분석 (PCA, Principal Component Analysis)는 가장 대표적이고 기본적인 다변량 통계 분석법으로, 차원을 축소하여 주성분을 찾아내는 unsupervised 분석법으로 경향성을 파악하는데 유용한 방법이다 (Park et al., 2014, Suberu et al., 2016, Worley and Powers, 2013).

본 연구에서는 인삼의 일차와 이차대사체의 주요 성분을 모두 identification 하였다. 일차대사체의 경우, bininig 을 거친 데이터와 ID 된 성분만을 변수로 정한 데이터로 PCA 를 수행하여 비교해 본 결과, binning 한 데이터는 sugar region 의 영역이 영향을 가장 크게 끼치는 것으로 나타났다. 이차대사체의 경우, MassLynx 로 프로세싱한 데이터와 ID 된 성분만을 변수로 정한 데이터로 PCA 를 수행하여 비교해 본 결과, 군집이 이루어지는 경향의 차이가 없었고, ID 된 성분만의 데이터에서 쉽게 마커들을 찾을 수 있었다. 따라서 일차와 이차대사체의 확인된 성분만을 가지고 PCA 를 실시하였다. PCA 결과 군집을 이루는지의 여부를 확인한 후, 군집 패턴을 보이는 변인에서는 OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis)를 추가로 시행해 다른 군 간의 명확한 판별을 재평가하였다. OPLS-DA 는 종속변수로서 각 그룹의 정보를 부여하여 판별에 기여하는 변수의 영향력을 높이는 supervised 분석법이다 (Kim et al., 2014). OPLS-DA 의 loading S-plot 로부터 각 그룹

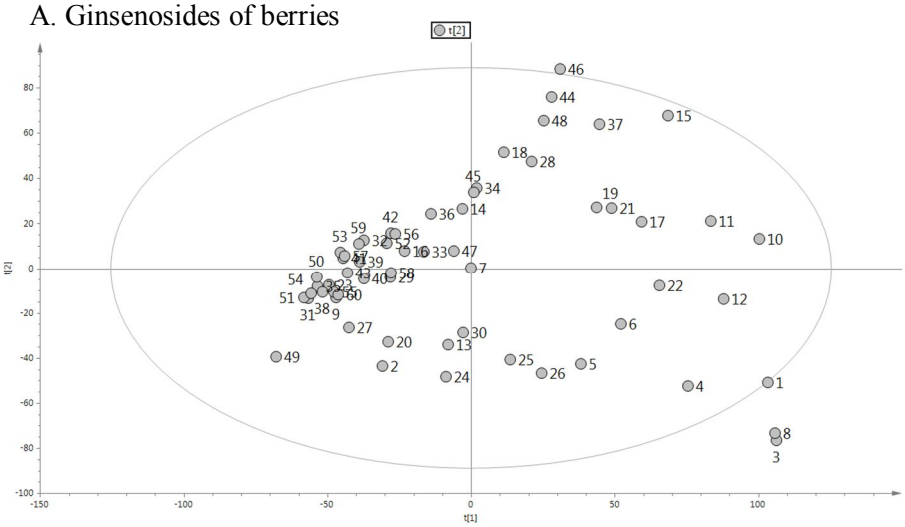
간 가장 확연하게 차이 나는 대상을 추출하고자 cut off 수치를 covariance p[1] ≥ | 0.1 | 이면서 correlation 의 p(corr)[1] ≥ | 0.5 | 로 정하였다. 이로부터 확보한 대사체는 보다 신뢰성 있는 검출을 위하여 VIP (Variable Importance on Projection) 값이 1.2 이상임을 확인하였다.

B. 결과 및 고찰

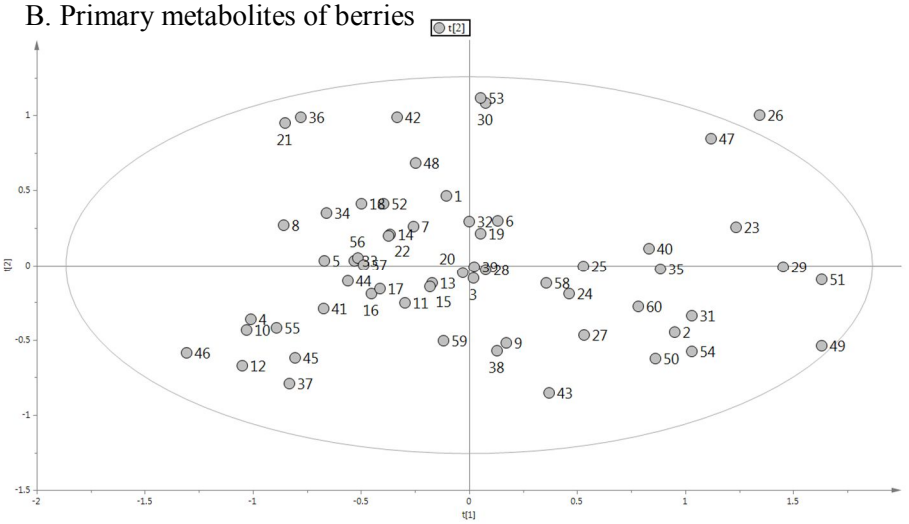
1. 주성분분석

열매의 경우, 대사체를 통한 계통 간 구분을 확인할 수 없었으며, 뿌리의 경우, 일차대사체에 대한 PCA 결과에서 figure 10 과 같이 두 그룹으로의 뚜렷한 구분을 확인할 수 있었다. OPLS-DA 를 통한 S-plot 결과 sucrose 의 함량 차이가 두 그룹으로 구분 짓는데 큰 영향을 끼친 것으로 확인되었다 (Figure 11).

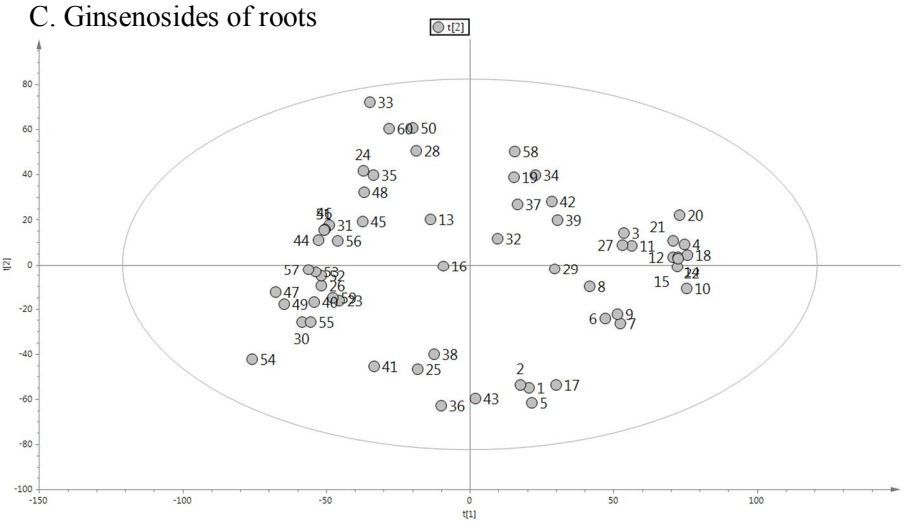
A. Ginsenosides of berries



B. Primary metabolites of berries



C. Ginsenosides of roots



D. Primary metabolites of roots

Figure 10. PCA Score plots of berries (A), (B) and roots (C), (D) using LC-MS data (A), (C) and NMR data (B), (D)

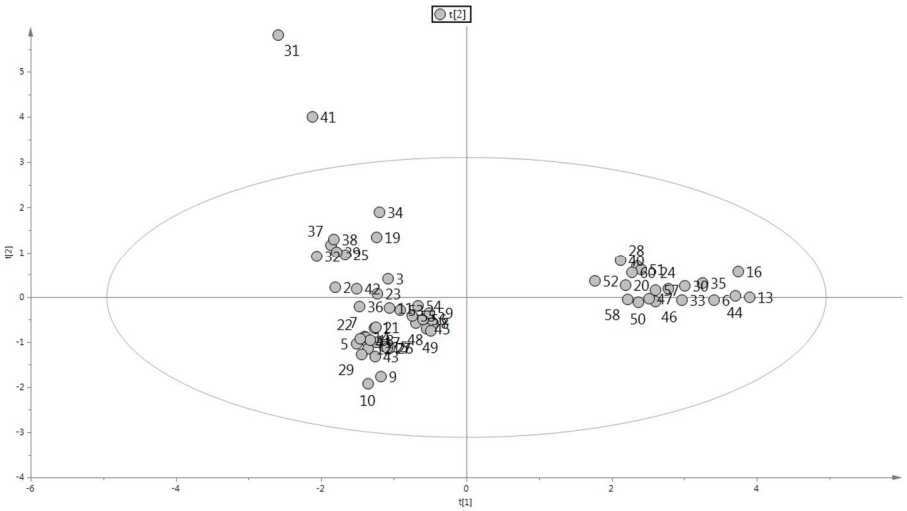
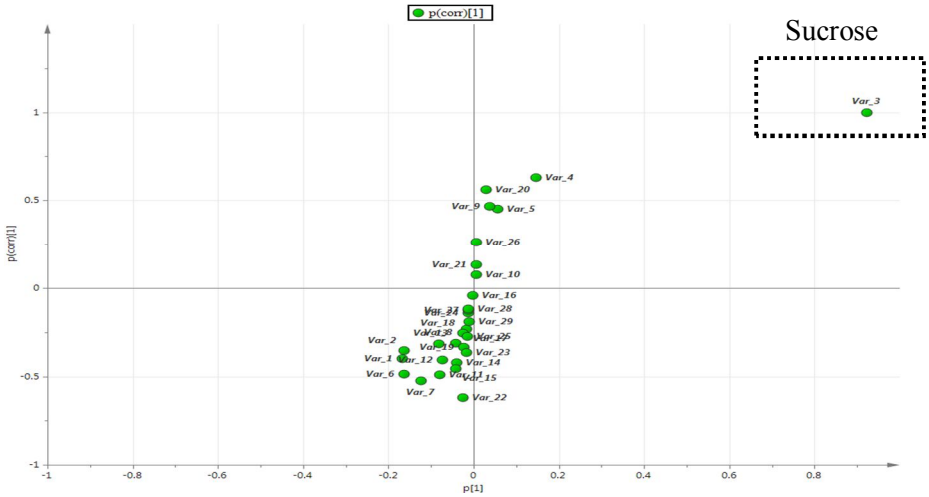


Figure 11. S-plot of OPLS-DA from roots using NMR data

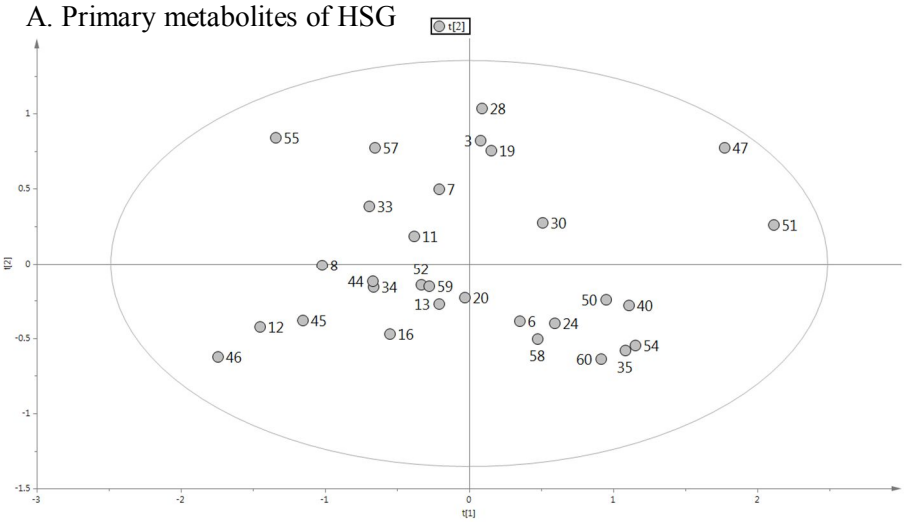


2. 하위그룹의 주성분 분석

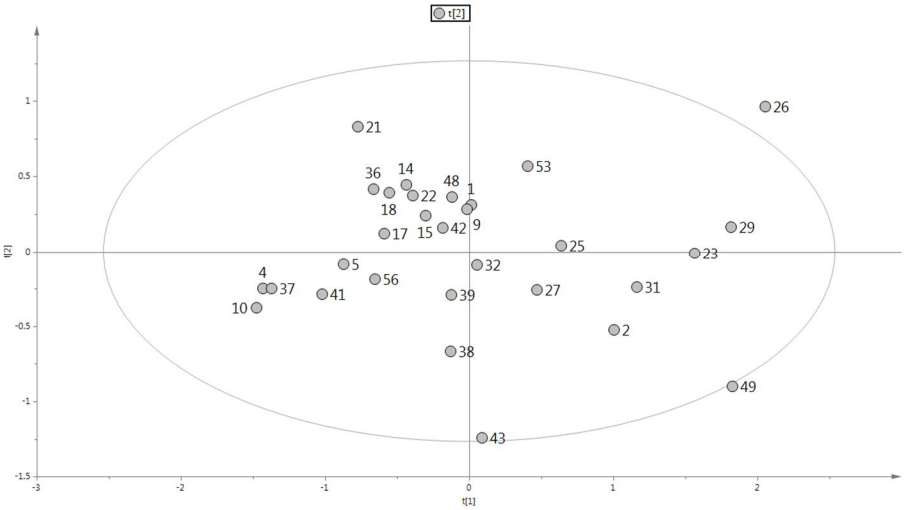
인삼의 전체 대사체 PCA 에서 sucrose 가 크게 영향을 미치므로 전체 계통을 HSG(High sucrose group)와 LSG(Low sucrose group)로 2 개의 하위그룹으로 나눈 후 각 그룹에서 일차와 이차대사체 대해 PCA 를 진행하였다. 또한 일차대사체에서 당이 대부분을 차지하므로 당 외에 다른 성분들에 대한 계통 구분 경향성을 관찰하기 위하여 2 개의 하위그룹에서 당을 제외하고 또 다른 PCA 를 실시하였다.

열매의 경우 하위그룹에서도 계통 간 명확한 구분은 관찰할 수 없었다 (Figure 12).

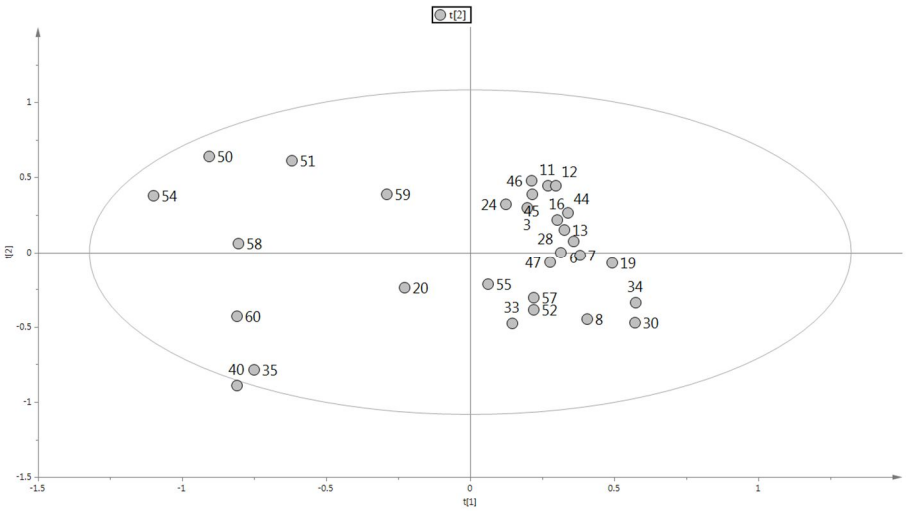
A. Primary metabolites of HSG



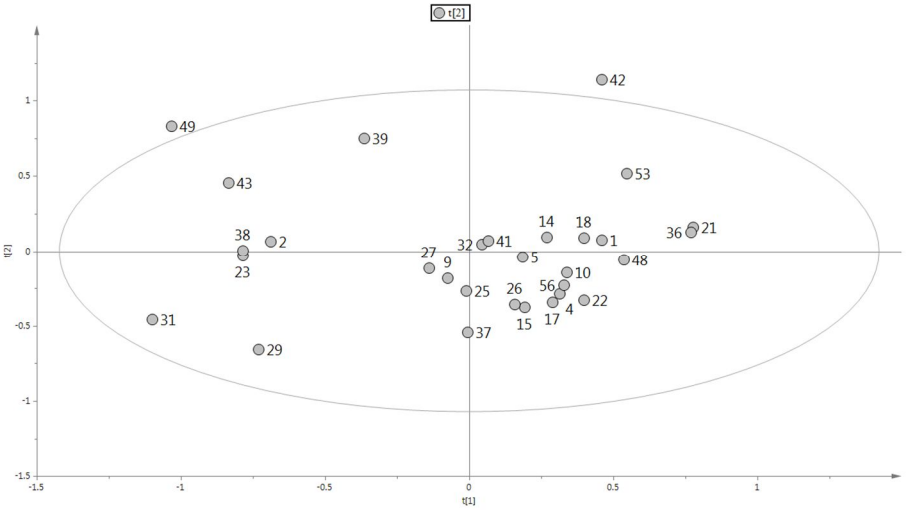
B. Primary metabolites of LSG



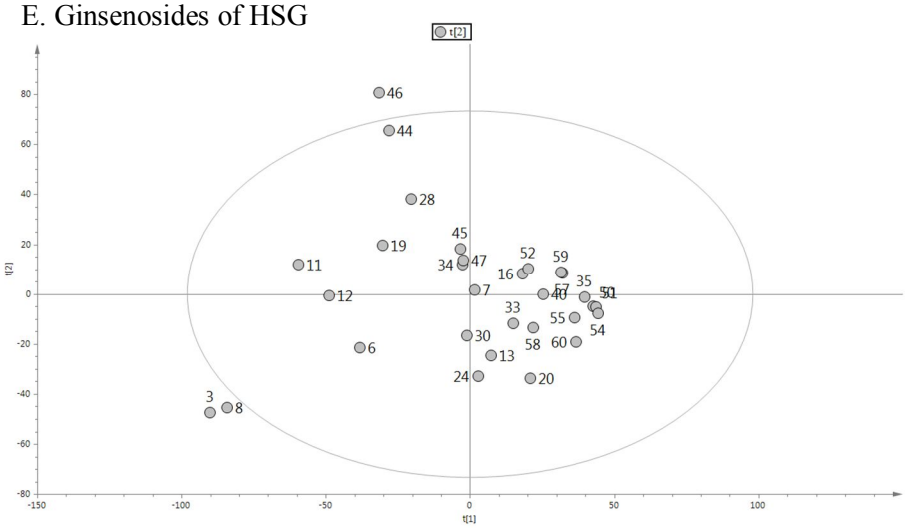
C. Primary metabolites of HSG (excluding sugars)



D. Primary metabolites of LSG (excluding sugars)

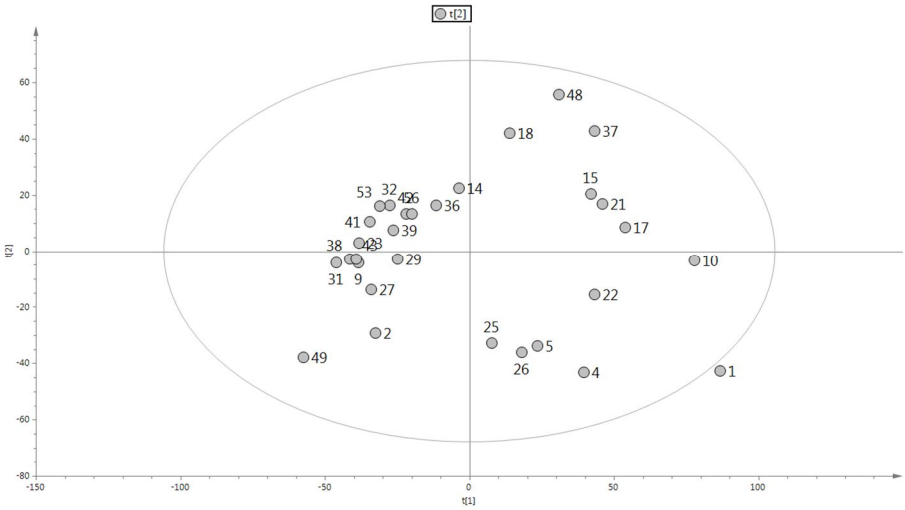


E. Ginsenosides of HSG



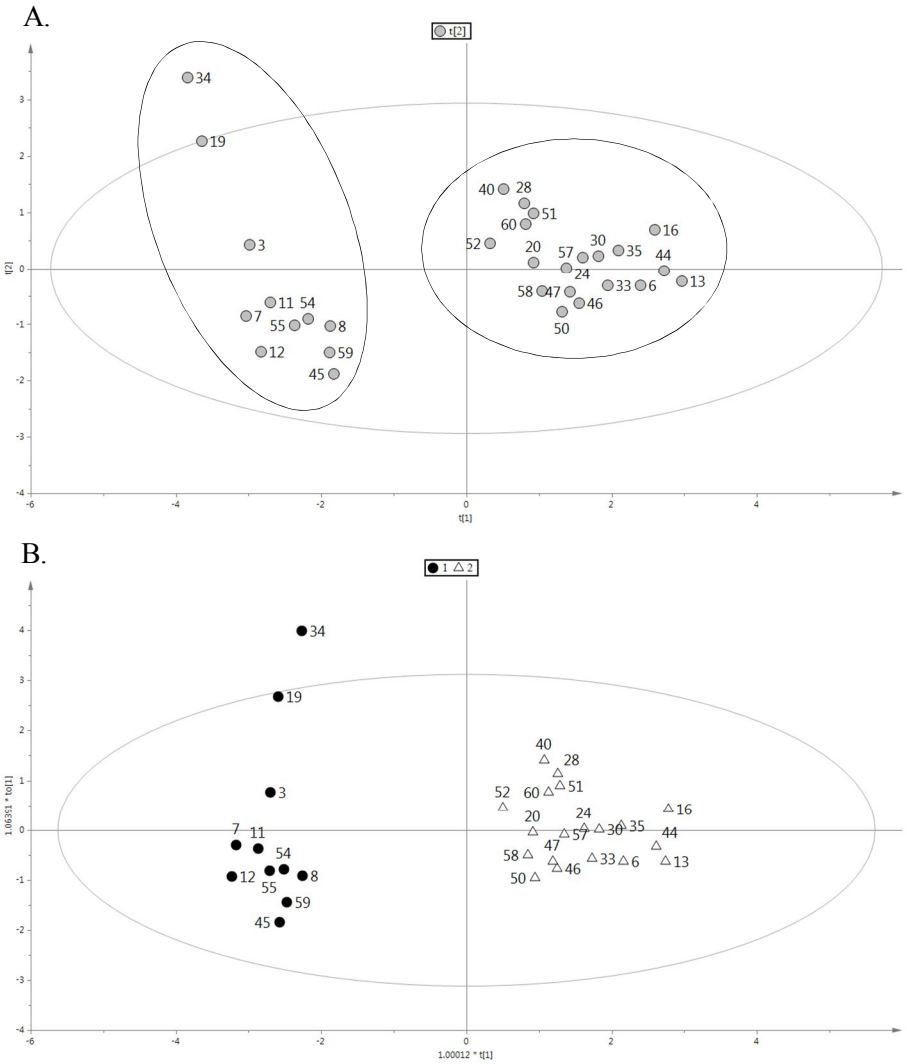
F. Ginsenosides of LSG

Figure 12. PCA Score plots of berries using NMR data (A), (B), (C), (D) and LC-MS data (E), (F)



뿌리의 경우 HSG 에서 일차대사체의 PCA 는 sucrose 에 따라 뚜렷하게 두 그룹으로 나뉘었고 (Figure 13), 다시 말해 sucrose 의 함량이 높은 그룹에서 다시 sucrose 의 함량으로 두 그룹으로 나뉘었다. LSG 에서 일차대사체 PCA 는 30 종 중 2 개가 outlier 로 나타났고, 이 샘플들은

OPLS-DA 를 통한 S-plot 결과 glucose 의 함량이 다른 샘플보다 매우 높은 것으로 확인되었다 (Figure 14).



C.

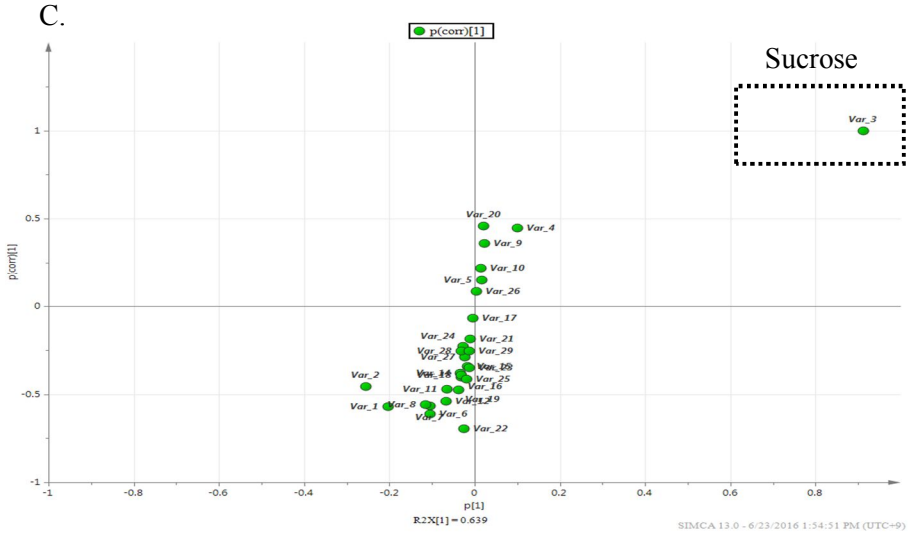


Figure 13. PCA Score plot (A), OPLD-DA (B) and s-plot (C) of HSG of roots using NMR data

A.

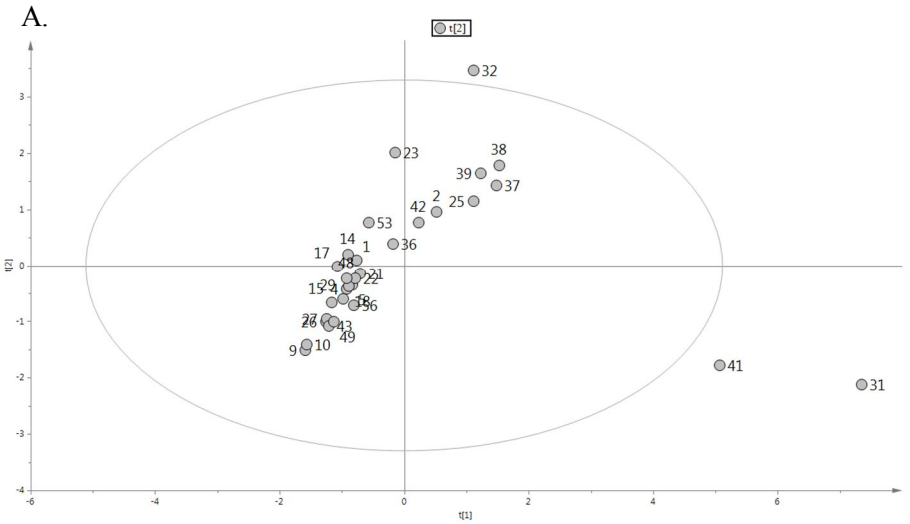
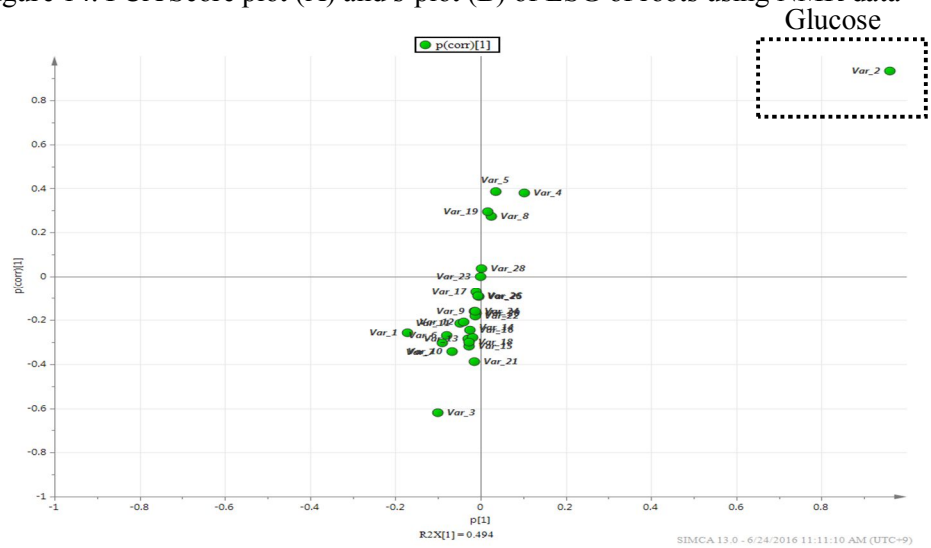
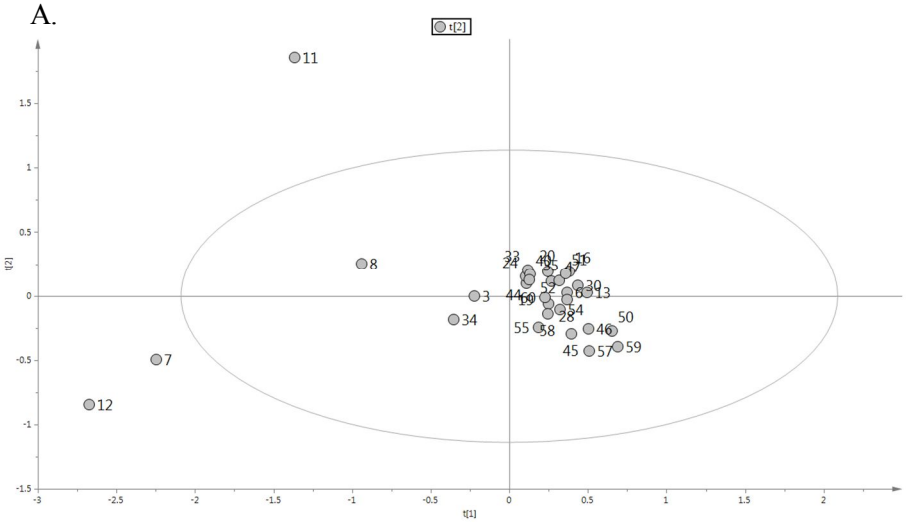


Figure 14. PCA Score plot (A) and s-plot (B) of LSG of roots using NMR data



뿌리의 HSG 에서 일차대사체 중 당을 제외하고 실시한 PCA 결과에서는 3 개 샘플이 outlier 로 나타났다. 이 샘플들을 loading plot 의 변수들의 분포로 확인한 결과 11 번 (G03026)은 타 계통보다 malate 와 2-oxoglutarate 에 대해 높은 함량을 가지고, 7 번 (G03015)과 12 번 (G03029)은 acetate 와 ornithine 에 대해 높은 함량을 가지는 것으로 확인되었다 (Figure 15).

A.



B.

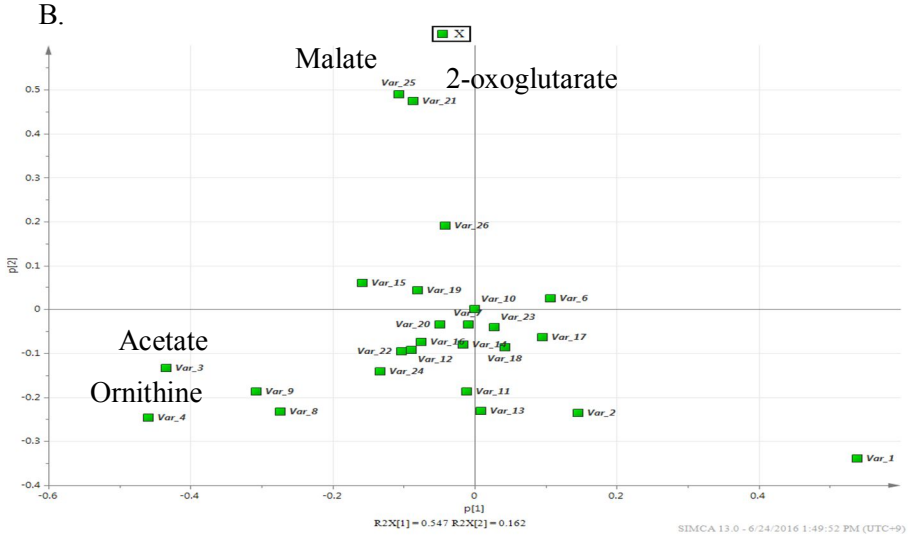
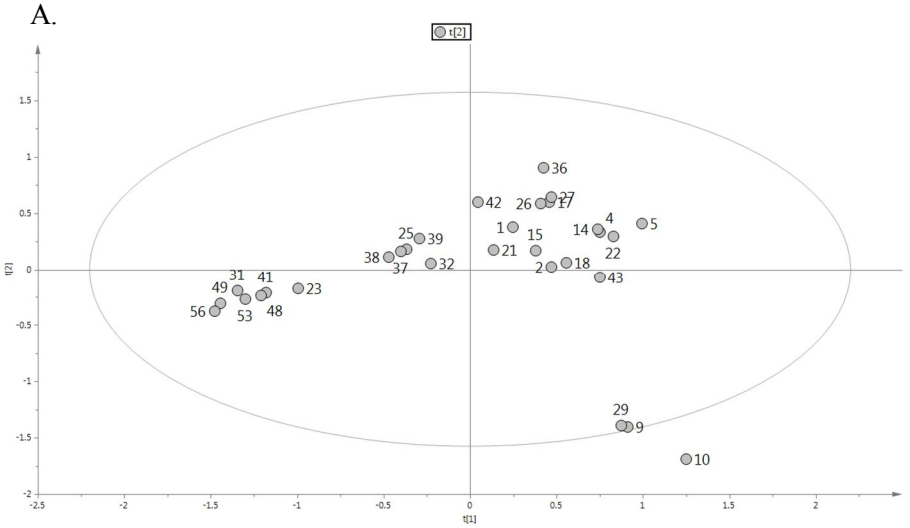


Figure 15. PCA Score plot and loading plot of HSG of roots using NMR data (Excluding sugars)

당을 제외한 LSG 에서는 3 개의 outlier 가 같은 방향성이 있고, S-plot 결과 9 번 (G03021), 10 번 (G03022), 29 번 (G03059) 샘플은 타 계통보다 succinate 와 acetate 의 함량이 높고, ornithine 은 없는 것으로 확인되었다 (Figure 16).

A.



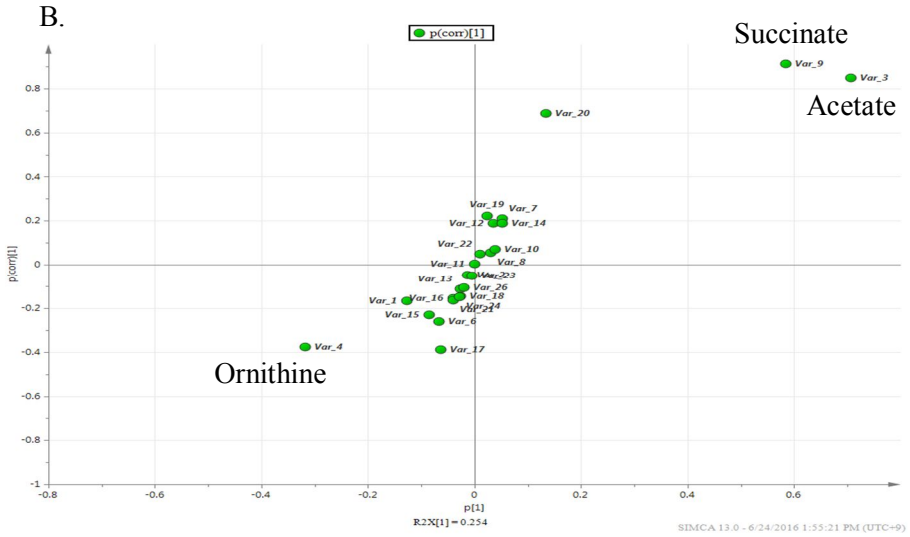
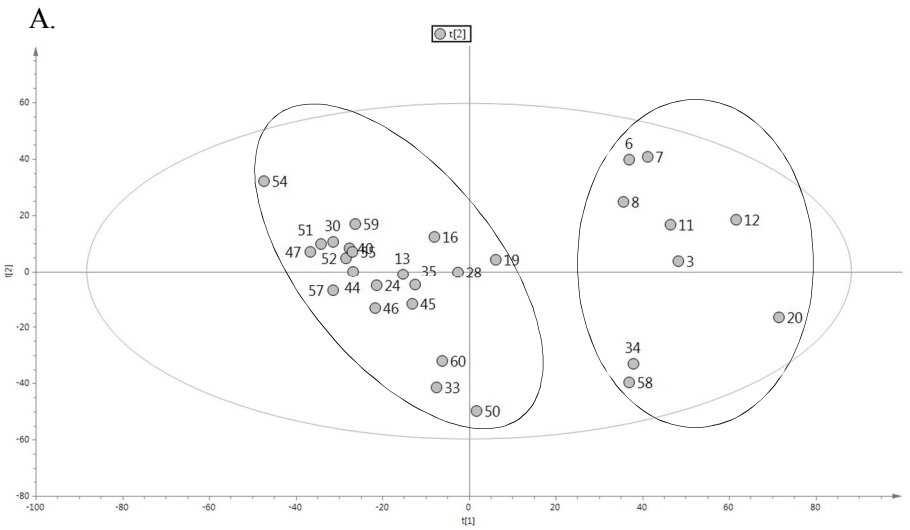


Figure 16. PCA Score plot (A) and loading plot (B) of LSG of roots using NMR data (Excluding sugars)

뿌리의 HSG 에서 이차대사체에 대한 PCA 는 두 그룹으로 나뉘었고 (Figure 17), 이에 대한 marker 는 table 10 에 나타내었다. LSG 의 이차대사체 PCA 는 세 그룹으로 나뉘었고 (Figure 18), 이에 대한 marker 는 table 11 에 나타내었다.



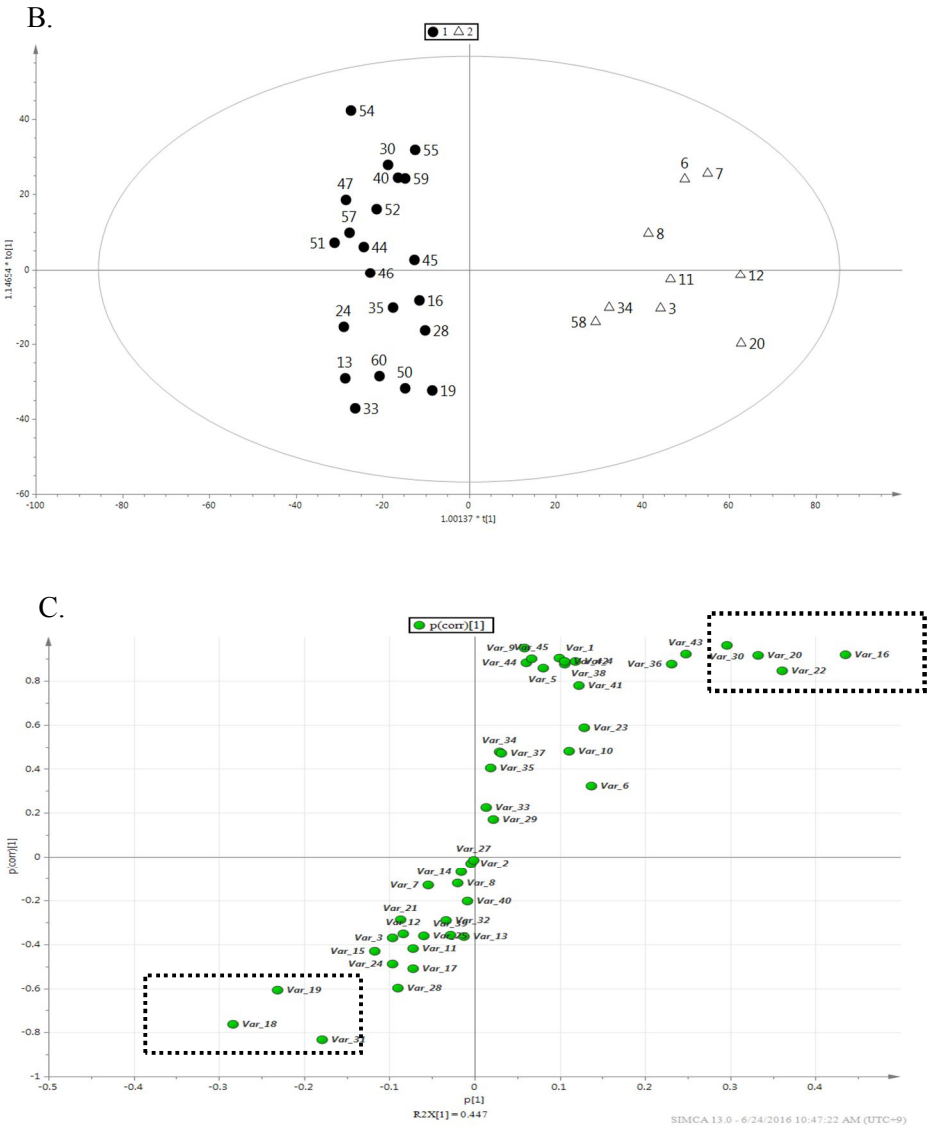


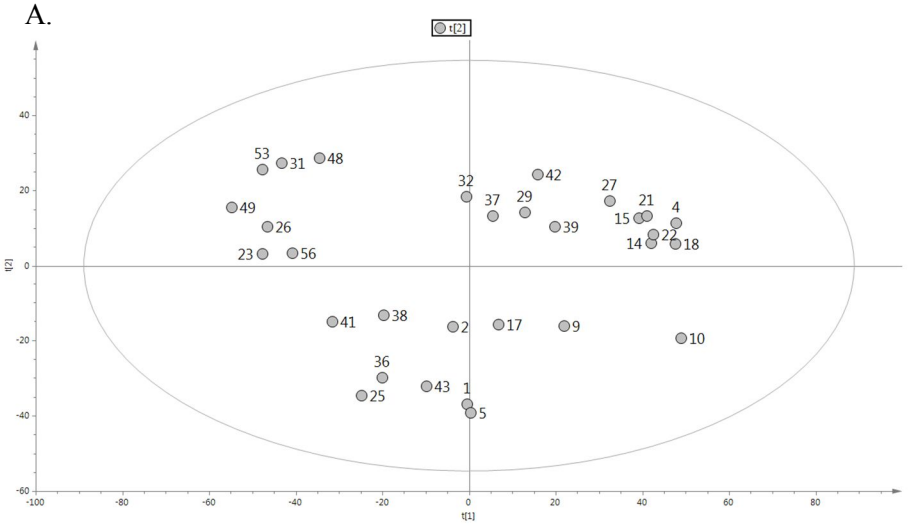
Figure 17. PCA Score plot (A), OPLS-DA (B) and s-plot (C) of HSG of roots using LC-MS data

Table 10. Metabolic markers (ginsenosides) contributing to discrimination of HSG

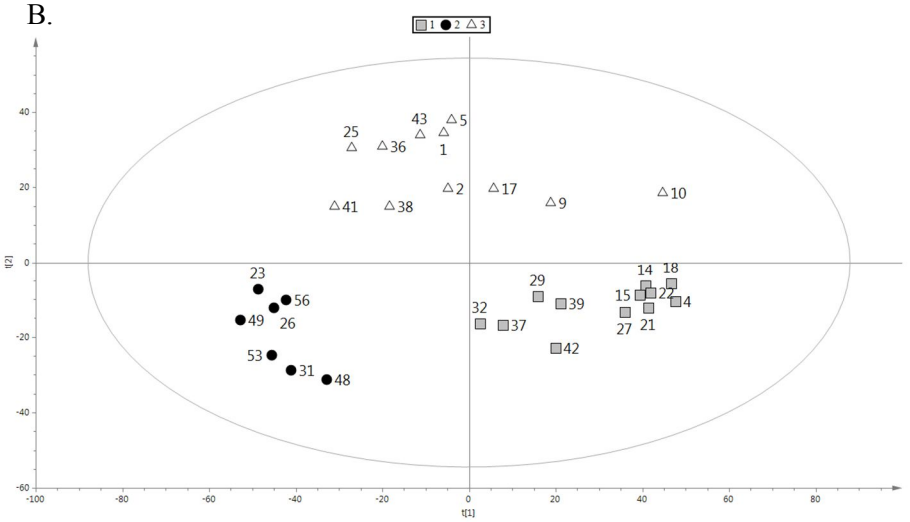
Sample no.	Variable no.	Proposed Identity	VIP value
3, 6, 7, 8, 11, 12, 20, 34, 58	16	G-Rb_1	2.88
	22	G-Rb_2	2.42
	20	G-Rc	2.21
	30	G-Rd	1.99

13, 16, 19, 24, 28, 30, 33, 35, 40, 44, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 54, 55, 57, 59, 60	18	m-G-Rb_1	1.99
	19	G-Ro	1.36
	31	m-G-Rd	1.22

A.



B.



C.

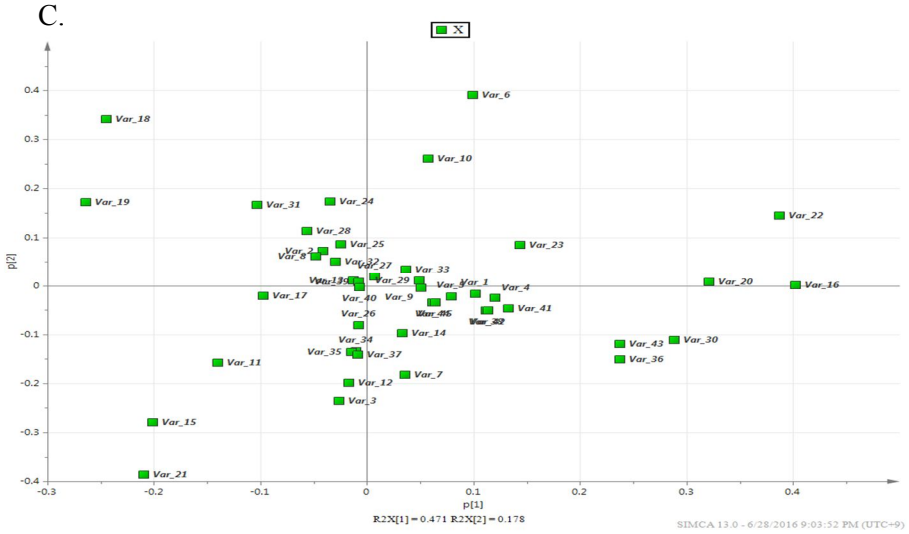
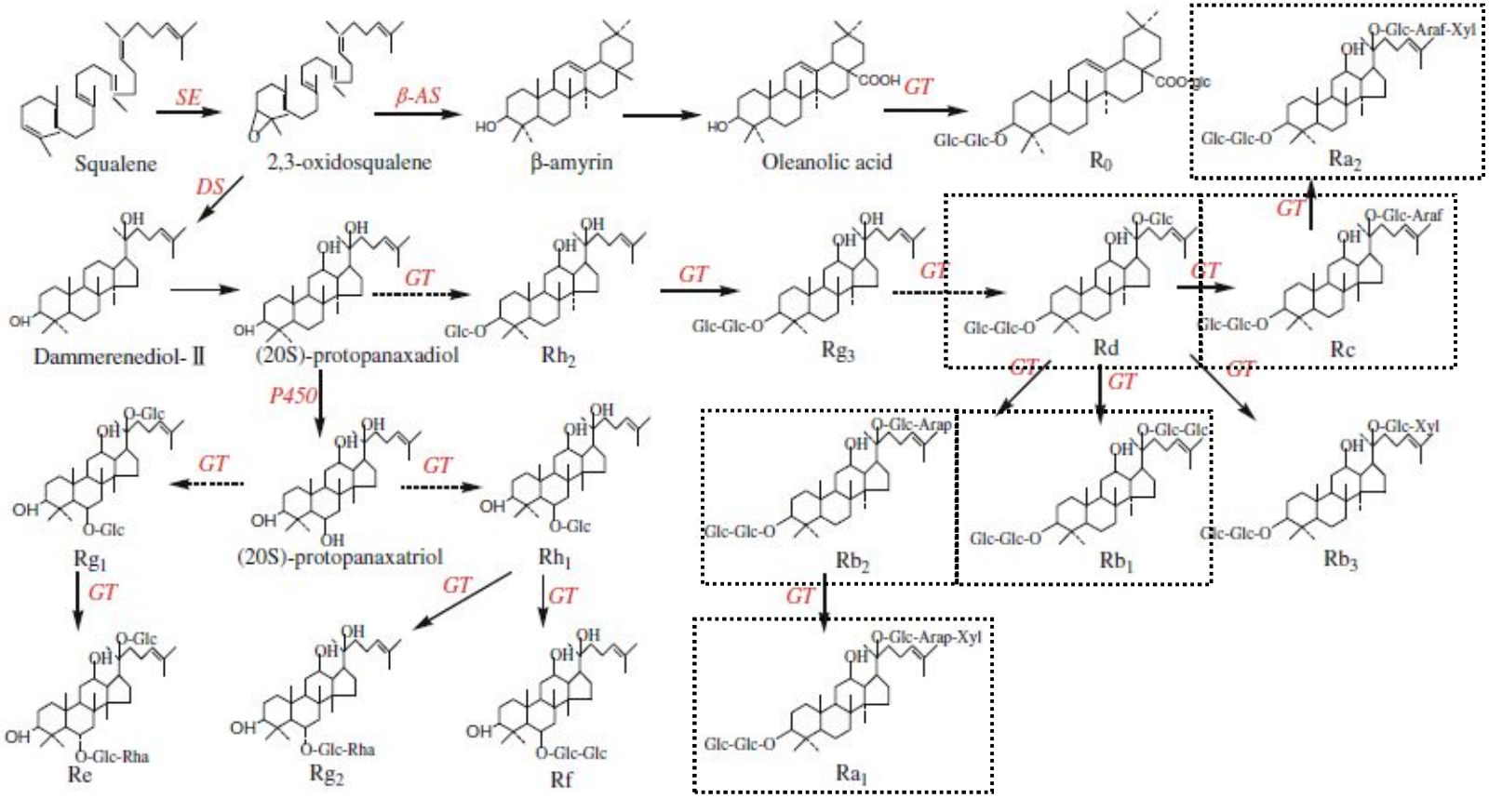


Figure 18. PCA Score plot (A), PLD-DA (B) and loading plot (C) of LSG of roots using LC-MS data

Table 11. Metabolic markers (ginsenosides) contributing to discrimination of LSG

Sample no.	Variable no.	Proposed Identity	VIP value
4, 14, 15, 18, 21, 22, 27, 29, 32, 37, 39, 42	22	G-Rb_2	1.88
	16	G-Rb_1	1.72
	20	G-Rc	1.54
1, 2, 5, 9, 10, 17, 25, 36, 38, 41, 43	21	G-Ra_1	2.21
23, 26, 31, 48, 49, 53, 56	18	m-G-Rb_1	2.36
	19	G-Ro	1.55

Figure 19. Relation with biosynthetic pathway of ginsenosides



Ginsenoside 생합성 (Figure 19, Wang et al., 2012))에서 ginsenosdie Rb_1, Rb_2, Rb_3, Rc 는 ginsenoside Rd 에 당이 추가적으로 결합하여 만들어진 형태이다. 뿌리의 ginsenoside PCA 결과를 ginsenoside 의 생합성으로 접근하여 볼 때, ginsenoside Rd 와 Rb_1, Rb_2, Rc 는 같은 경향성을 보인다는 것을 알 수 있었다. 이것은 60 개의 계통에서 이 4 개의 ginsenoside 는 함량이 같이 높거나 낮은 동일한 경향성을 가진다는 의미와 같다.

또한 ginsenoside Rb_2와 Rc에 xylose가 결합한 ginsenoside Ra_1과 Ra_2의 경우, ginsenoside Rb_2와 Rc의 함량이 높은 계통은 ginsenoside Ra_1과 Ra_2의 함량이 낮은 것으로 나타났고, 이는 ginsenoside Rb_2와 Ra_1, Rc와 Ra_2가 인삼 뿌리에서 상호보완적으로 존재한다는 것을 유추할 수 있다.

Ⅳ. 계층적 군집 분석

A. 분석 방법

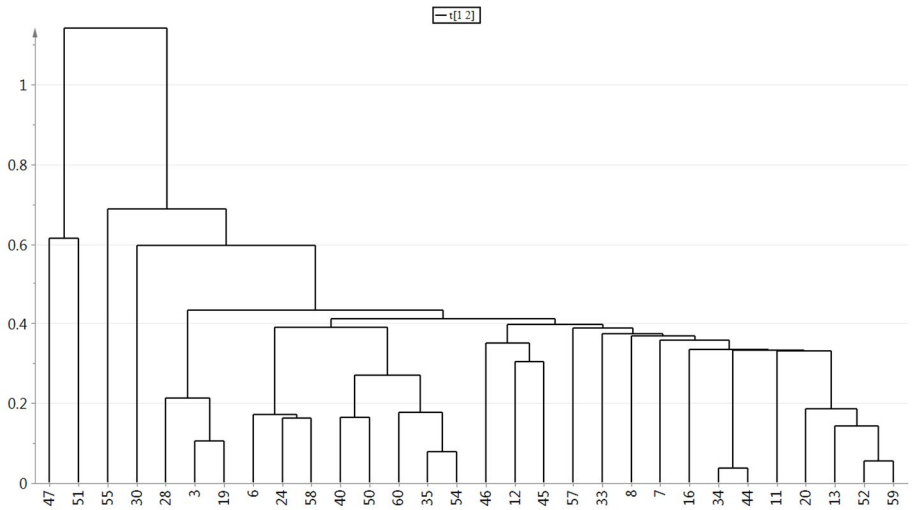
계층적 군집 분석 (Hierarchical cluster analysis:HCA)은 유사한 성향을 가진 개체를 모아 군집을 형성하여 기준이 밝혀지지 않은 상태에서 유사성이 높거나 낮은 개체들을 파악하는데에 유용하게 이용될 수 있다.

계층적 군집 분석은 Simca-P+ (version 13, Umetrics, umea, Sweden) 프로그램을 사용하였으며, single linkage를 이용하여 거리 계산을 하였고, 각 개체의 사이즈로 트리를 형성하였다.

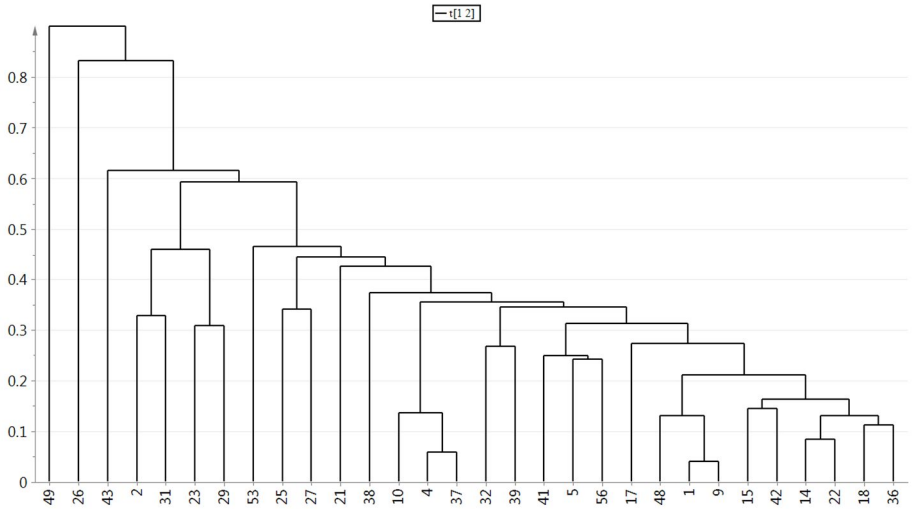
B. 결과 및 고찰

앞서 수행한 열매와 뿌리의 다변량 분석에서 인삼 계통 간에 어떠한 근연 관계가 있는지 계층적 군집 분석 (HCA)을 수행하였다 (Figure 20, 21). HSG, LSG 의 일차와 이차대사체 각각의 HCA 에서 큰 상관성을 발견하지는 못하였지만 개별적인 계통 간의 근연 관계를 알아볼 수 있었으며, 추후 형태학적 특성이나 유전체 정보를 부가하여 서로 상관성이 큰 계통을 파악하는데에 정보를 제공할 수 있다.

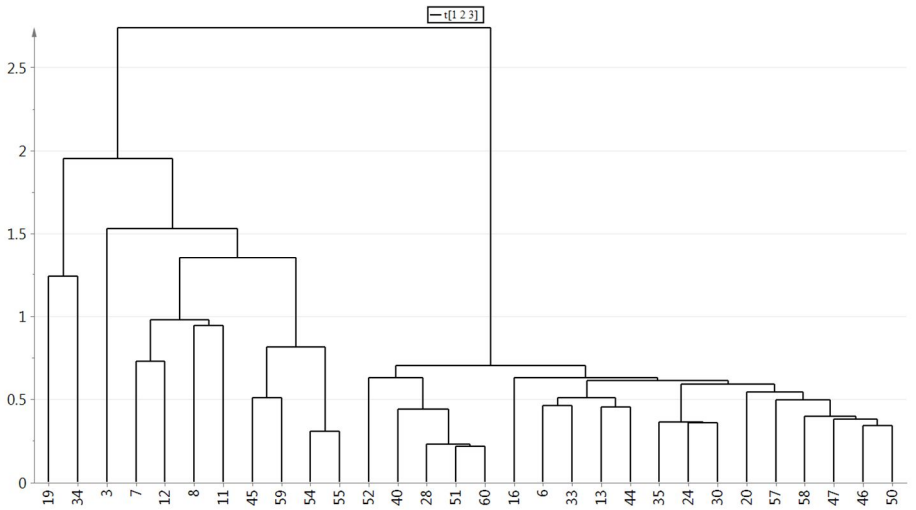
A. HSG of berries



B. LSG of berries



C. HSG of roots



D. LSG of roots

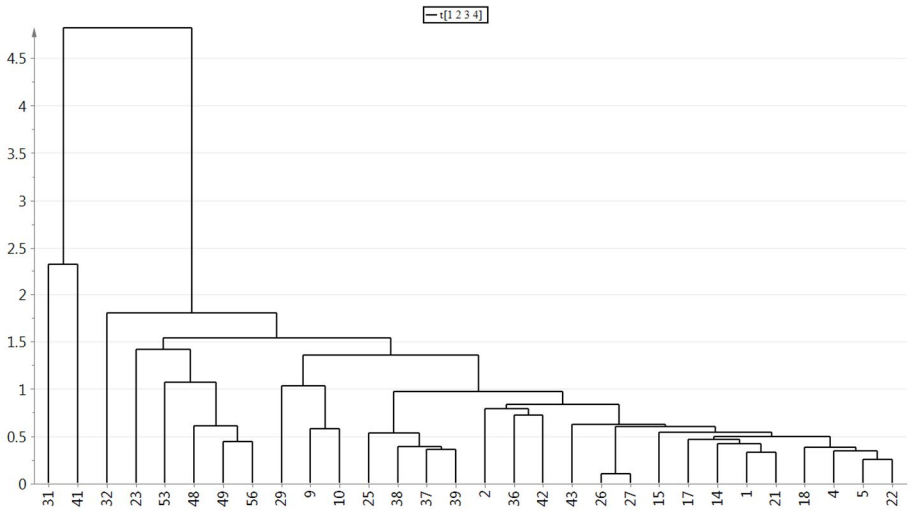
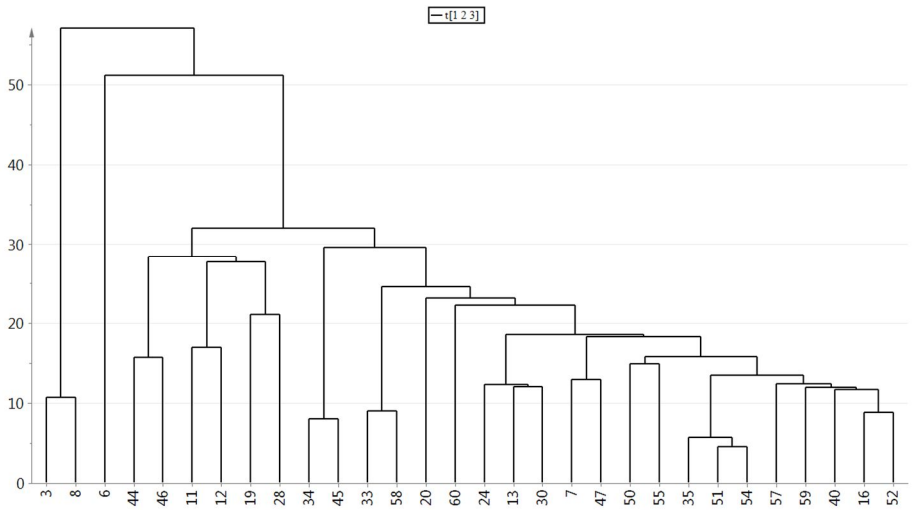
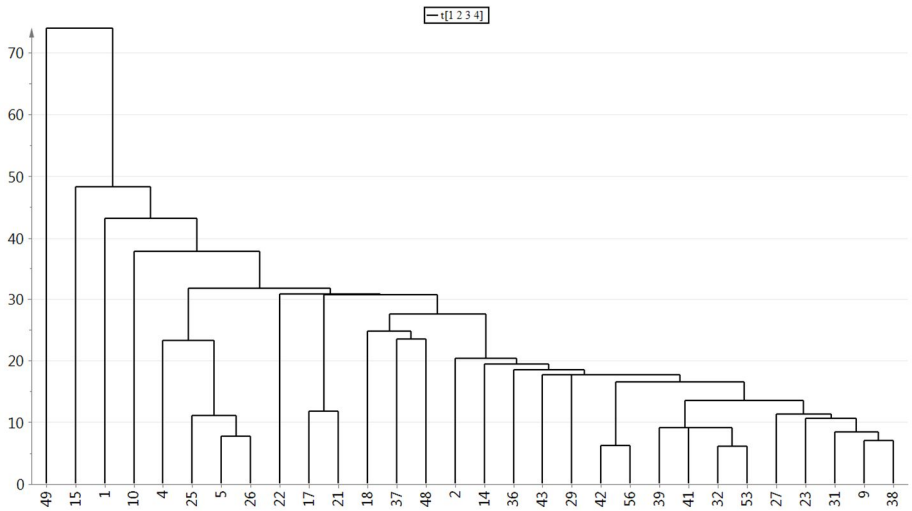


Figure 20. HCA of HSG and LSG of berries (A), (B) and roots (C), (D) using NMR data

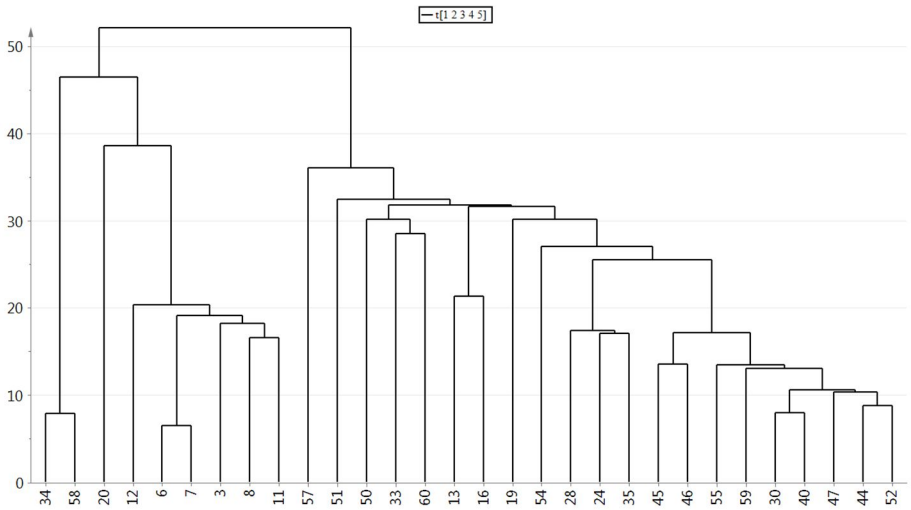
A. HSG of berries



B. LSG of berries



C. HSG of roots



D. LSG of roots

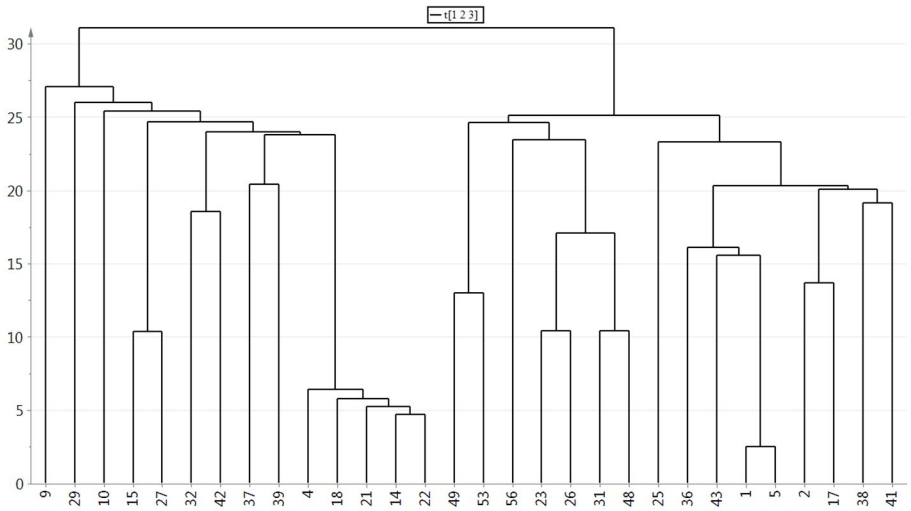


Figure 21. HCA of HSG and LSG of berries (A), (B) and roots (C), (D) using LC-MS data

Ⅳ. 결 론

1. 인삼 뿌리에 관한 연구는 그 동안 수많이 보고되어왔으나 다수의 인삼 계통을 확보하여 열매 대사체를 연구한 경우는 드물다. 이상의 연구결과로 인삼 열매에 대한 대사체 프로파일링이 체계적으로 진행되었다고 할 수 있다.

2. UPLC 기반 프로파일링에서 ginsenoside Rg_1 과 Re 에 대한 효율적인 분석법을 제시하였고, 한층 향상된 유지시간과 분리능으로 인삼 ginsenoside 의 UPLC-QTOF MS 분석 조건을 확립하였다.

3. ^{1}H-NMR 기반 일차대사체 분석을 통해 당, 아미노산, 유기산 등 인삼의 대표적인 일차대사산물이 동시에 프로파일링되었다.

4. 일차와 이차대사체의 프로파일링을 토대로 한 다변량분석으로 인삼 계통 간 대사체에 의한 패턴과 경향성을 파악하고, 계통을 구분 짓는 마커를 발굴하였다.

5. 이상의 연구결과로 동일한 재배 조건에서도 계통마다의 명확한 차이가 확인되었고, 향후 추가 연구를 통해 인삼의 대사체 특성을 파악하는 기틀을 마련하고 우수한 계통 선발의 기반 자료로 활용될 것으로 기대된다.

V. 참고 문헌

ATTELE, A. S., ZHOU, Y. P. & XIE, J. 2002. Antidiabetic Effects of Panax ginseng Berry Extract and the Identification of an Effective Component. *DIABETES,* 51**,** 1851-1858.

CARLINI, E. A. 2003. Plants and the central nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* 75**,** 501-512.

CHOI, K. T. 2008. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean Panax ginseng C A Meyer. *Acta Pharmacol Sin,* 29**,** 1109-18.

CUI, S., WU, J., WANG, J. & WANG, X. 2016. Discrimination of American ginseng and Asian ginseng using electronic nose and gas chromatography–mass spectrometry coupled with chemometrics. *Journal of Ginseng Research*.

DEY, L., XIE, J. T., WANG, A., WU, J., MALECKAR, S. A. & YUAN, C. S. 2003. Anti-hyperglycemic effects of ginseng: comparison between root and berry. *Phytomedicine,* 10**,** 600-5.

HE, C., LI, J., XU, N., WANG, R., LI, Z., YANG, L. & WANG, Z. 2015. Pharmacokinetics, bioavailability, and metabolism of Notoginsenoside Fc in rats by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal,* 109**,** 150-7.

KIM, D. H. 2012. Chemical Diversity of Panax ginseng, Panax quinquifolium, and Panax notoginseng. *J Ginseng Res,* 36**,** 1-15.

KIM, E. J., KWON, J., PARK, S. H., PARK, C., SEO, Y. B., SHIN, H. K., KIM, H. K., LEE, K. S., CHOI, S. Y., RYU DO, H. & HWANG, G. S. 2011a. Metabolite profiling of Angelica gigas from different geographical origins using 1H NMR and UPLC-MS analyses. *J Agric Food Chem,* 59**,** 8806-15.

KIM, G., KIM, S. & HAN, S. 2011b. Yield and Quality Characteristics of Ginseng's First Byproducts. *Korean J. Medicinal Crop Sci.,* 19**,** 313-318.

KIM, H. J., SEO, Y. T., PARK, S.-I., JEONG, S. H., KIM, M. K. & JANG, Y. P. 2014. DART–TOF–MS based metabolomics study for the discrimination analysis of geographical origin of Angelica gigas roots collected from Korea and China. *Metabolomics,* 11**,** 64-70.

KIM, H. K., CHOI, Y. H. & VERPOORTE, R. 2011c. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol,* 29**,** 267-75.

KIM, S. T., KIM, H. B., LEE, K. H., CHOI, Y. R., KIM, H. J., SHIN, I. S., GYOUNG, Y. S. & JOO, S. S. 2012. Steam-dried ginseng berry fermented with Lactobacillus plantarum controls the increase of blood glucose and body weight in type 2 obese diabetic db/db mice. *J Agric Food Chem,* 60**,** 5438-45.

KRISHNAN, P., KRUGER, N. J. & RATCLIFFE, R. G. 2005. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J Exp Bot,* 56**,** 255-65.

KWON, D.-J., JEONG, H.-J., MOON, H., KIM, H.-N., CHO, J.-H., LEE, J.-E., HONG, K. S. & HONG, Y.-S. 2015. Assessment of green coffee bean metabolites dependent on coffee quality using a 1H NMR-based metabolomics approach. *Food Research International,* 67**,** 175-182.

LEE, E. J., SHAYKHUTDINOV, R., WELJIE, A. M., VOGEL, H. J., FACCHINI, P. J., PARK, S. U., KIM, Y. K. & YANG, T. J. 2009. Quality assessment of ginseng by (1)H NMR metabolite fingerprinting and profiling analysis. *J Agric Food Chem,* 57**,** 7513-22.

LI, K. K., XU, F. & GONG, X. J. 2016. Isolation, Purification and Quantification of Ginsenoside F(5) and F(3) Isomeric Compounds from Crude Extracts of Flower Buds of Panax ginseng. *Molecules,* 21.

LI, S. L., LAI, S. F., SONG, J. Z., QIAO, C. F., LIU, X., ZHOU, Y., CAI, H., CAI, B. C. & XU, H. X. 2010. Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach. *J Pharm Biomed Anal,* 53**,** 946-57.

MAO, Q., BAI, M., XU, J. D., KONG, M., ZHU, L. Y., ZHU, H., WANG, Q. & LI, S. L. 2014. Discrimination of leaves of Panax ginseng and P. quinquefolius by ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach. *J Pharm Biomed Anal,* 97**,** 129-40.

NAH, S., KIM, D. & LIM, H. 2007. Ginsenosides: Are Any of them Candidates for Drugs Acting on the Central Nervous System? *CNS Drug Reviews,* 13**,** 381-404.

NOH, K. & OH, D. 2009. Production of the Rare Ginsenosides Compound K, Compound Y, and Compound Mc by a Thermostable b -Glycosidase from Sulfolobus acidocaldarius. *Biol. Pharm. Bull.,* 32**,** 1830-1835.

PARK, H. W., IN, G., KIM, J. H., CHO, B. G., HAN, G. H. & CHANG, I. M. 2014. Metabolomic approach for discrimination of processed ginseng genus (Panax ginseng and Panax quinquefolius) using UPLC-QTOF MS. *J Ginseng Res,* 38**,** 59-65.

PENG, L., SUN, S., XIE, L. H., WICKS, S. M. & XIE, J. T. 2012. Ginsenoside Re: pharmacological effects on cardiovascular system. *Cardiovasc Ther,* 30**,** e183-8.

QIU, Y. K., DOU, D. Q., CAI, L. P., JIANG, H. P., KANG, T. G., YANG, B. Y., KUANG, H. X. & LI, M. Z. 2009. Dammarane-type saponins from Panax quinquefolium and their inhibition activity on human breast cancer MCF-7 cells. *Fitoterapia,* 80**,** 219-22.

RU, W., WANG, D., XU, Y., HE, X., SUN, Y. E., QIAN, L., ZHOU, X. & QIN, Y. 2015. Chemical constituents and bioactivities of Panax ginseng (C. A. Mey.). *Drug Discov Ther,* 9**,** 23-32.

SHIN, B. K., KWON, S. W. & PARK, J. H. 2015. Chemical diversity of ginseng saponins from Panax ginseng. *J Ginseng Res,* 39**,** 287-98.

SONG, H. H., MOON, J. Y., RYU, H. W., NOH, B. S., KIM, J. H., LEE, H. K. & OH, S. R. 2014. Discrimination of white ginseng origins using multivariate statistical analysis of data sets. *J Ginseng Res,* 38**,** 187-93.

SUBERU, J., GROMSKI, P. S., NORDON, A. & LAPKIN, A. 2016. Multivariate data analysis and metabolic profiling of artemisinin and related compounds in high yielding varieties of Artemisia annua field-grown in Madagascar. *J Pharm Biomed Anal,* 117**,** 522-31.

SUGIMOTO, S., NAKAMURA, S. & MATSUDA, H. 2009. Chemical Constituents from Seeds of Panax ginseng: Structure of New Dammarane-Type Triterpene Ketone, Panaxadione, and HPLC Comparisons of Seeds and Flesh. *Chem. Pharm. Bull.,* 57**,** 283-287.

SUN, B. S., XU, M. Y., LI, Z., WANG, Y. B. & SUNG, C. K. 2012. UPLC-Q-TOF-MS/MS Analysis for Steaming Times-dependent Profiling of Steamed Panax quinquefolius and Its Ginsenosides Transformations Induced by Repetitious Steaming. *J Ginseng Res,* 36**,** 277-90.

SUN, T.-T., LIANG, X.-L., ZHU, H.-Y., PENG, X.-L., GUO, X.-J. & ZHAO, L.-S. 2015. Rapid separation and identification of 31 major saponins in Shizhu ginseng by ultra-high performance liquid chromatography–electron spray ionization–MS/MS. *Journal of Ginseng Research.*

TUNG, N. H., SONG, G. Y., NHIEM, N. X., DING, Y., TAI, B. H., JIN, L. G., LIM, C. M., HYUN, J. W., PARK, C. J., KANG, H. K. & KIM, Y. H. 2010. Dammarane-type saponins from the flower buds of Panax ginseng and their intracellular radical scavenging capacity. *J Agric Food Chem,* 58**,** 868-74.

WANG, C., WU, J. & YUAN, C. 2006. Saponins Composition in American Ginseng Leaf and Berry Assayed by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.,* 54**,** 2261-2266.

WANG, H. Y., HUA, H. Y., LIU, X. Y., LIU, J. H. & YU, B. Y. 2014. In vitro biotransformation of red ginseng extract by human intestinal microflora: metabolites identification and metabolic profile elucidation using LC-Q-TOF/MS. *J Pharm Biomed Anal,* 98**,** 296-306.

WORLEY, B. & POWERS, R. 2013. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics,* 1**,** 92-107.

XIE, J., YUAN, C. & MEHENDALE, S. 2005. Ginseng and Diabetes. *The American Journal of Chinese Medicine,* 33**,** 397-404.

XIE, J. T., ZHOU, Y. P., DEY, L., ATTELE, A. S., WU, J. A., GU, M., POLONSKY, K. S. & YUAN, C. S. 2002. Ginseng berry reduces blood glucose and body weight in db/db mice. *Phytomedicine,* 9**,** 254-8.

YANG, H., LEE, D. Y., KANG, K. B., KIM, J. Y., KIM, S. O., YOO, Y. H. & SUNG, S. H. 2015. Identification of ginsenoside markers from dry purified extract of Panax ginseng by a dereplication approach and UPLC-QTOF/MS analysis. *J Pharm Biomed Anal,* 109**,** 91-104.

YANG, S. O., PARK, H. & SOHN, E. 2014a. Classification of ginseng berry (Panax ginseng C.A.MEYER) extract using 1H NMR spectroscopy and its inhibition of lipid

accumulation in 3 T3-L1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine,* 24**,** 455-460.

YANG, S. O., SHIN, Y. S., HYUN, S. H., CHO, S., BANG, K. H., LEE, D., CHOI, S. P. & CHOI, H. K. 2012. NMR-based metabolic profiling and differentiation of ginseng roots according to cultivation ages. *J Pharm Biomed Anal,* 58**,** 19-26.

YANG, W. Z., HU, Y., WU, W. Y., YE, M. & GUO, D. A. 2014b. Saponins in the genus Panax L. (Araliaceae): a systematic review of their chemical diversity. *Phytochemistry,* 106**,** 7-24.

YUK, J., MCINTYRE, K. L., FISCHER, C., HICKS, J., COLSON, K. L., LUI, E., BROWN, D. & ARNASON, J. T. 2013. Distinguishing Ontario ginseng landraces and ginseng species using NMR-based metabolomics. *Anal Bioanal Chem,* 405**,** 4499-509.

ZHANG, H. M., LI, S. L., ZHANG, H., WANG, Y., ZHAO, Z. L., CHEN, S. L. & XU, H. X. 2012a. Holistic quality evaluation of commercial white and red ginseng using a UPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach. *J Pharm Biomed Anal,* 62**,** 258-73.

ZHANG, Y., LYU, X., LIU, T., LUO, J., ZHANG, W. & MU, Q. 2013. Analysis of Nonpolar Components from Ginseng of Different Ages. *American Journal of Plant Sciences,* 04**,** 92-97.

ZHANG, Y., PI, Z. & LIU, C. 2012b. Analysis of Low-polar Ginsenosides in Steamed Panax Ginseng at High-temperature by HPLC-ESI-MS/MS. *CHEM. RES. CHINESE UNIVERSITIES,* 28**,** 31-36.

ZHENG, C., HAO, H., WANG, X., WU, X., WANG, G., SANG, G., LIANG, Y., XIE, L., XIA, C. & YAO, X. 2009. Diagnostic fragment-ion-based extension strategy for rapid screening and identification of serial components of homologous families contained in

traditional Chinese medicine prescription using high-resolution LC-ESI- IT-TOF/MS: Shengmai injection as an example. *J Mass Spectrom,* 44**,** 230-44.

Abstract

Metabolic profiling and multivariate analysis of the *Panax ginseng* accessions

Dae Hyun Kim
Department of Pharmacy
The Graduate School
Seoul National University

In this paper, LC/MS and NMR-based metabolic profiling and multivariate analysis were performed for panax ginseng berries and roots that have different accessions.

60 samples of panax ginseng berries that have different accessions respectively and 60 samples of roots that have the same accessions with berries were analysed to investigate primary and secondary metabolites through the metabolic profiling. The various ginsenosides were identified in berries and roots and some rare ginsenosides were discovered in berries using LC-MS-based profiling. Sugars, amino acids and organic acids were identified using NMR-based profiling. The relative content of ginsenoside Re in berries is much more compared with roots. Sucrose was detected in roots and not detected in berries and there was distinct differences among ginseng accessions.

Principal component analysis (PCA) was performed to investigate discriminations among accessions for primary and secondary metabolites. The score plots showed no discrimination in berries and divided reliably into two

groups according to the contents of sucrose in roots. Since the result of PCA is significantly affected by the contents of sucrose, ginseng accessions were divided into high sucrose group (HSG) and low sucrose group (LSG) according to the contents of sucrose. Then PCA was performed again and OPLS-DA models for discriminated cases were used to obtain the markers that contributed to the difference between groups and metabolite markers were determined by S-plot.

In this study, the UHPLC chromatographic condition for analyses of ginsenosides were developed, in which ginsenoside Rg1 and Re were separated with a good resolution. Major primary metabolites were identified in berries and roots based on NMR spectroscopy as well as ginsenosides. Multivariate analysis is also performed on the basis of metabolic profiling among different ginseng accessions. Therefore, these results could be the reference data for discovery of accessions of superior quality of ginseng and valuable base data for comparison among ginseng accessions of various factors later.

Keywords : *Panax ginseng*, Ginseng berry, UPLC-QTOF MS, NMR, PCA
Student Number : 2013-23455