

얇은막 크로마토그래피에 의한 人蔘의 根·葉 및 莖의 saponin 및 sapogenin 化合物 同定

崔康注·金錫昌·金萬旭·南基烈

韓國人蔘煙草研究所

(1987년 10월 5일 수리)

Identification of Saponin and Sapogenin in Root, Leaf and Stem of Ginseng by Thin Layer Chromatography

Kang-Ju Choi, Seok-Chang Kim, Man-Wook Kim and Ki-Yeul Nam

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Daejeon, Korea

Abstract

Saponins of ginseng root, leaf and stem were identified by TLC. Eleven unknown spots were detected in ginseng leaf and ten unknown spots in ginseng stem on TLC besides seven ginsenosides such as ginsenoside-Rg₁, -Rf, -Re, -Rd, -Rc, -Rb₂, and -Rb₁, which are contained in ginseng root. Ginsenoside-Rg₃ and -Rg₂ were identified on TLC from mild hydrolysates with 50% acetic acid of total saponins from ginseng root, leaf and stem. Meanwhile, panaxadiol, panaxatriol and oleanolic acid were identified from hydrolysates with 7% ethanolic sulfuric acid of total saponin of ginseng root, while panaxadiol and panaxatriol from those of total saponins of ginseng leaf and stem.

緒 論

人蔘은 옛부터 神秘의 靈藥으로 알려져 왔으며 科學的인 研究는 1854년에 Garriques¹⁾가 美國人蔘의 뿌리에서 saponin(配糖體) 混合物을 'panaquilon'이라고 명명한 후부터 有效成分에 관한 研究가 시작되었다고 할 수 있다. 그러나 現代科學的인 研究는 1957년에 소련의 Brekhman²⁾이 人蔘의 adaptogen 活性和 saponin을 有效成分으로 강조한 이래 비로소 많은 研究가 시작되었다.

人蔘 사포닌의 各계성분에 대해서는 Shibata 및 Tanaka 등^{3,4)}이 얇은막 크로마토그래피 패턴상에서 이동거리(Rf치)의 小~大 순으로 ginsenoside -Ro, -Ra, -Rb₁, -Rb₂, -Rc, -Rd, -Re, -Rf, -Rg₁, -Rg₂, -Rg₃ 및 -Rh로 최초로 명명한 후 많은 研究 결과를 통하여 각각의 化學구조를 규명하였다. 이외에도 최근에는 여러가지 분리기기를 이용하여 극히 미량 함유된 사포닌들^{5,6)}까지도 분리되어 그

구조가 규명되었으며 人蔘 saponin은 triterpenoid의 dammarane 骨格을 가진 glycoside로서 aglycone인 protopanaxadiol과 protopanatriol에 glucose, arabinose, xylose 및 rhamnose 등의 糖類가 結合된 中性 配糖體임이 밝혀졌다. 한편 Saito등⁷⁾은 人蔘葉 saponin에 대한 藥理學的 研究를 수행하여 中樞神經抑制作用, 神經移緩作用, 血壓調節作用, 副交感神經興奮作用 외에도 histamine과 유사한 鎮痛作用이 있다고 보고하였는데, 이들 藥理作用 중 일부는 Takagi등⁸⁾이 보고한 人蔘根 사포닌의 藥理作用과 同一한 效果가 있음을 알 수 있었다. 따라서 이와같은 研究結果는 人蔘葉과 人蔘根에는 일부 동일한 藥效를 발현하는 saponin이 함유되었다는 것을 시사해 주었다. 人蔘 地上部의 사포닌 化合物에 대한 研究는 金등⁹⁾이 美國蔘에 대한 조사결과 地上部에도 根사포닌과 동일한 사포닌이 함유되었다고 보고하였으며 葉에서 7종, 莖에서 6종 그리고 果實에서 6종의 사포닌 化合物을 동정하였다. Tanaka⁹⁾는 일본지역에서 채취한 人蔘잎

의 사포닌 화합물의 조사결과 7종의 根사포닌과 地上部에만 함유되는 미량의 사포닌 5종을 동정하였으며, 人蔘葉은 사포닌의 함량이 높고 특히 ginsenoside -Rd, -Re 및 -Rg₁의 함량이 매우 높아서 이들 성분의 추출분리용 원료로서 매우 적합하다고 하였다. 따라서 人蔘의 栽培過程중에 副産物로 얻어지는 다량의 葉이나 莖은 사포닌이나 사포닌의 酸加水分解物 등의 抽出分離用原料로 매우 적합할 것으로 사료되나 우리나라 재배인삼의 地上部에 대해서는 구체적으로 조사 보고된바 없다. 이에 저자들은 人蔘 地上部에 대하여 人蔘根에 함유된 saponin과 동일한 ginsenoside을 동정하고, 또한 사포닌을 酸加水分解하여 생성되는 prosapogenin 및 sapogenin을 동정하여 이와 같은 標準品 分離用試料으로써 地上部の 活用 가능성 여부를 조사하였다. 한편 이와같은 部位別 사포닌化合物들의 패턴조사는 人蔘의 育種研究나 生理研究등에도 곧바로 活用될 수 있을 것으로 생각된다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

試料은 韓國人蔘煙草研究所 증명시험장에서 10月初旬에 채굴한 6年根을 根, 葉 및 莖의 部位로 나누어 세척한 후 日光乾燥시켜 컷팅밀로 분쇄(80mesh)하여 分析用試料로 하였다. 한편 얇은막 크로마토그래피용 TLC plate는 silicagel 60 TLC plate(layer thickness 0.25mm, E. Merck제)를 사용하였고, 展開溶媒類는 1級試藥을 사용하였다. 酸加水分解 試藥類 및 發色劑는 試藥特級을 사용하였다. 사포닌 標準品은 人蔘煙草研究所에서 分離한 표준품 외에 日本 廣島大學의 Tanaka교수로부터 분양받은 사포닌 標準품을 사용하였다.

2. 實驗方法

人蔘의 根, 葉 및 莖의 사포닌 化合物과 그 酸加水分解物의 얇은막 크로마토그래피 방법에 의한 동정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 총 사포닌은 Ando 등의 방법¹⁰⁾으로 추출한 다음 각개 ginsenoside의 조사는 一次元^{3,10)} 및 二次元⁸⁾ 얇은막 크로마토그래피 방법으로 분리한 후 각개 成分을 標準품과 비교하여 同定하였다. 한편 prosapogenin의 추출 및 동정은 Kaku등¹¹⁾과 Sanada등¹²⁾의 방법을 참조하여 50% 초산으로 70°C에서 온화한 조건으로 2시간 酸加水分解시킨 후 hexane으

로 추출하여 脂溶性物質 등을 제거한 다음 prosapogenin이 선택적으로 잘 추출되는 ethyl acetate로 추출분획을 분리하여 ginsenoside -Rg₂ 및 -Rg₃를 각각 동정하였다. sapogenin의 抽出 및 同定은 粗사포닌을 active carbon⁹⁾으로 정제한 다음 Ando 등¹⁰⁾의 방법으로 수욕조에서 50% ethanol性 7%-H₂SO₄으로 6時間 酸加水分解시킨 후 ethyl ether로 抽出하여 sapogenin을 同定하였다.

結果 및 考察

1. Saponin化合物의 同定

人蔘의 根, 葉 및 莖으로부터 粗사포닌¹⁰⁾을 抽出한 다음 먼저 一次元 얇은막 크로마토그래피 방법으로 標準品과 대조하여 同定하였으며 이 때 사용한 4가지 展開溶媒類 組成^{3,10)}은 chloroform : methanol : water=65 : 35 : 10(V/V, 하층), n-butanol : acetic acid : water=5 : 1 : 4(V/V, 상층) n-butanol : ethyl acetate : water = 4 : 1 : 5(V/V, 상층) 및 chloroform : n-butanol : metanol : water = 20 : 40 : 15 : 20(V/V, 하층)을 각각 사용하였다. 그 다음 다시 二次元 얇은막 크로마토그래피 방법으로 표준품 ginsenoside와 대조하여 동정하였으며 TLC패턴은 Fig. 1, 2 및 3과 같다. 전개방법은 먼저 chloroform : methanol : water=65 : 35 : 10(V/V, 하층)으로 1회 전개후 방향을 바꾸어 n-butanol : acetic acid : water=5 : 1 : 4(V/V, 상층)으로 2회 전개하였다. 根에서 추출된 Saponin은 표준품 ginsenosides로 동정하여 12종의 ginsenoside를 同定할 수 있었고 그 외에 9개의 spot가 검출되었다. 한편 葉⁹⁾ 및 莖으로부터 추출된 saponin을 조사결과 7종의 ginsenosides를 同定할 수 있었고 그 외에 葉에서 11개과 莖에서는 10개의 미확인 spot가 각각 검출되었다. Fig. 2 및 3에서 알 수 있듯이 葉과 莖으로부터 추출된 saponin 化合物의 TLC 分析結果 주된 ginsenoside는 대체로 유사하였으나 TLC pattern은 다소 상이하였다.

人蔘 地上部位別 saponin化合物의 抽出 분획물에서 同定된 미지의 spot에 대해서는 標準품 관계로 본 실험에서는 별도의 同定은 못하였으나 Tanaka⁹⁾의 보고에서와 같이 人蔘葉 地上部位에만 미량 함유된 saponin 化合物인 것으로 여겨진다. 그리고 地上部位에 함유된 saponin이 silicagel plate에서 잘 분리되는 점으로 미루어 보아 컬럼 크로마토그래피나 분취용 液體 크로마토그래피를 이용

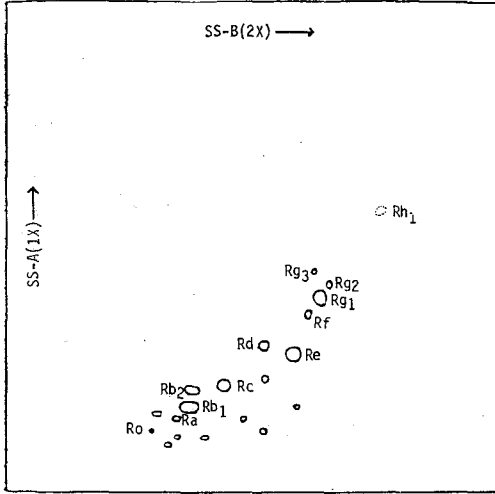


Fig. 1. Two-dimensional thin-layer chromatogram of saponin extracted from ginseng root
 SS-A ; Solvent: system-A (chloroform: methanol: distilled water=65 : 5 : 10, lower layer)
 SS-B ; Solvent system-B(n-butanol: acetic acid: distilled water=5 : 1 : 4, upper layer)
 * Silica gel 60 plate (20×20cm) developed in solvent systems, and detected by spraying 10% sulfuric acid
 * Rx(x=o, a, b₁, b₂, c, d, e, f, g₁, g₂, g₃, h₁): ginsenoside-Rx

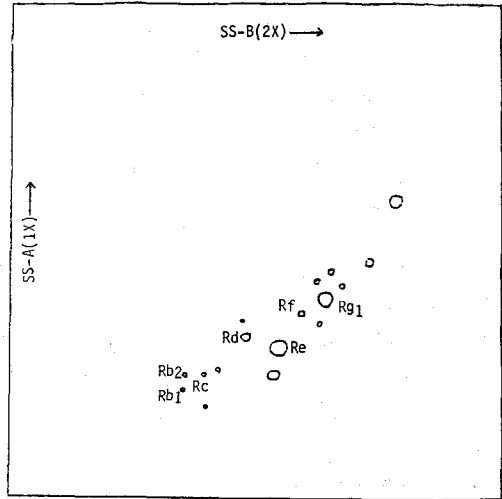


Fig. 3. Two-dimensional thin-layer chromatogram of saponin extracted from ginseng stem
 SS-A ; Solvent: system-A (chloroform: methanol: distilled water=65 : 35 : 10, lower layer)
 SS-B ; Solvent system-B(n-butanol: acetic acid: distilled water=5 : 1 : 4, upper layer)
 * Silica gel 60 plate (20×20cm) developed in solvent systems, and detected by spraying 10% sulfuric acid
 * Rx (x=b₁, b₂, c, d, e, f, g₁): ginsenoside-Rx

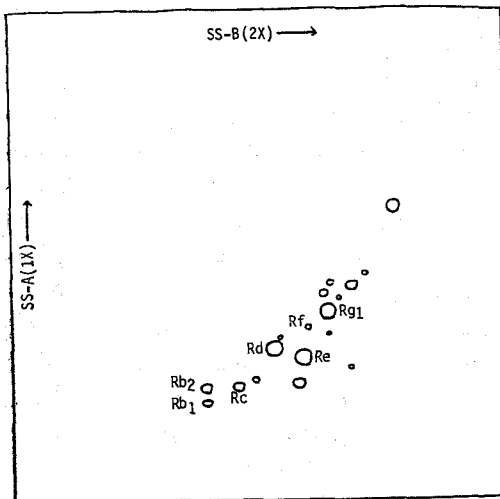


Fig. 2. Two-dimensional thin-layer chromatogram of saponin extracted from ginseng leaf
 SS-A ; Solvent: system-A (chloroform: Methanol: distilled water=65 : 35 : 10, lower layer)
 SS-B ; Solvent system-B (n-butanol: acetic acid: distilled water=5 : 1 : 4, upper layer)
 * Silicagel 60 plate(20×20cm) developed in solvent systems, and detected by spraying 10% sulfuric acid
 * Rx(x= b₁, b₂, c, d, e, f, g₁): ginsenoside-Rx

하여 地上部의 saponin분획물로부터 純品 saponin을 ginsenoside별로 분리가 비교적 용이할 것으로 믿어진다.

2. Prosapogenin化合物의 同定

人蔘의 根, 葉 및 莖으로부터 분리된 粗사포닌을 酸 加水分解후 ethyl acetate 추출분획에 이행된 prosapogenin의 TLC pattern은 Fig. 4와 같다 Shibata³⁾, Kaku등¹¹⁾ 및 Sanada 등¹²⁾의 보고에 의하면 人蔘根 사포닌의 酸 加水分解物에서 사포닌의 cyclopentane ring의 side chain 20번째 탄소에 결합된 糖類만이 선택적으로 加水分解된 prosapogenin이 同定되어 보고되었으며, panaxadiol계 사포닌(ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rc, -Rd)에서 ginsenoside-Rg₃가 생성되고 [ginsenoside-Re에서 ginsenoside-Rg₂가 각각 생성된다고 하였다. 本實驗條件^{3,11,12)}에서도 먼저 panaxadiol계 사포닌 및 ginsenoside-Re에서 ginsenoside-Rg₂ 및 Rg₃가 생성됨을 標準品으로 각각 同定하고, 아울러 根, 葉 및 莖에서 分離한 사포닌의 酸 加水分解物에서도

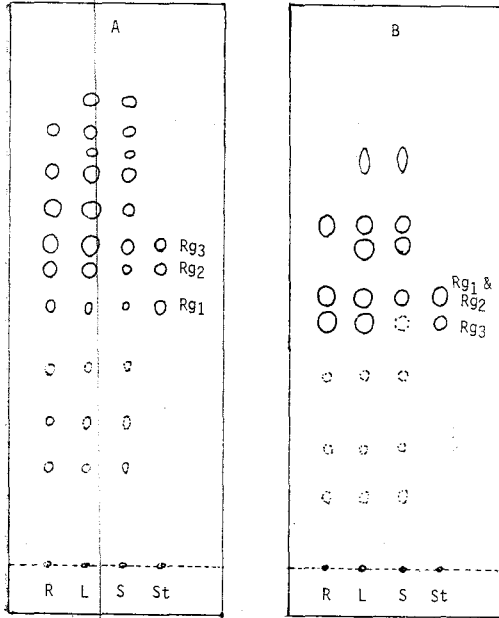


Fig. 4. One-dimensional thin-layer chromatograms of prosapogenin extracted after acid hydrolysis of total saponin from ginseng root, leaf and stem
 Solvent A ; Lower layer of $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 65 : 35 : 10$
 Solvent B ; n-butanol saturated with water
 * Samples ; R: root, L: leaf, S: stem
 ** Standards ; ginsenoside-Rg₁, -Rg₂ and -Rg₃

Fig. 4와 같이 동정할 수 있었다. 인삼근에만 극미량 함유된 ginsenoside-Rg₂와 -Rg₃는分離收率의 매우 낮아서 일정량의 標準品の 확보가 어렵고 따라서 아직까지도 뚜렷한 약리효능은 究明되지 않았다. 그러나 인삼根사포닌^{8,11,12}에서 뿐만 아니라 葉이나 莖사포닌의 酸加水分解物에서도 다량이 동정되어 分離가 용이할 것으로 믿어진다. 특히 ginsenoside-Re와 총사포닌의 함량이 현저히 높은 인삼잎^{9,13}은 이와같은 prosapogenin의 추출분리용 原料로 매우 적합함을 알 수 있었다. 한편 본 실험에서는 별도의 동정은 못하였으나 2종의 prosapogenin 이외에도 사포닌의 酸加水分解物이 생성되어 TLC에서 分離 檢출되었다.

3. Sapogenin化合物的 同定

人蔘의 根, 葉 및 莖으로부터 분리된 粗사포닌을 active carbon¹³으로 精製한 후 7%-H₂SO₄으로

加水分解¹⁰하여 ethyl ether 추출분획물에 移行된 sapogenin의 TLC pattern은 Fig. 5와 같다. 根에 함유된 sapogenin으로는 panaxadiol, panaxatriol 및 oleanolic acid가 檢출되어 Ando등¹⁰의 보고와는 일치하였으나 β-sitosterol이 檢출되었다는 崔¹⁴의 보고와는 상이하였다. 이 밖에도 人蔘에서는 β-sitosterol^{15,16}과 stigmasterol¹⁴이 檢출된다고 보고되었으나 본 실험에서 saponin 분획물을 甾烷으로 加水分解하여 얻은 sapogenin混合物에서는 β-sitosterol과 stigmasterol이 檢출되지 않았다. 이들 유리 sterol成分과 β-sitosterol등은 ethyl ether 抽出物의 不揮發性 物質로 檢출된다는 보고¹⁶를 고찰해 볼 때 saponin추출과정중 ethyl ether추출분획에 제거되어 사포닌의 酸加水分解物에서는 동정되지 않았다. 한편 葉과 莖 사포닌의 酸加水分解物에서는 sapogenin인 panaxadiol과 panaxatriol만 檢출되었고 oleanolic acid는 檢출되지 않았다.

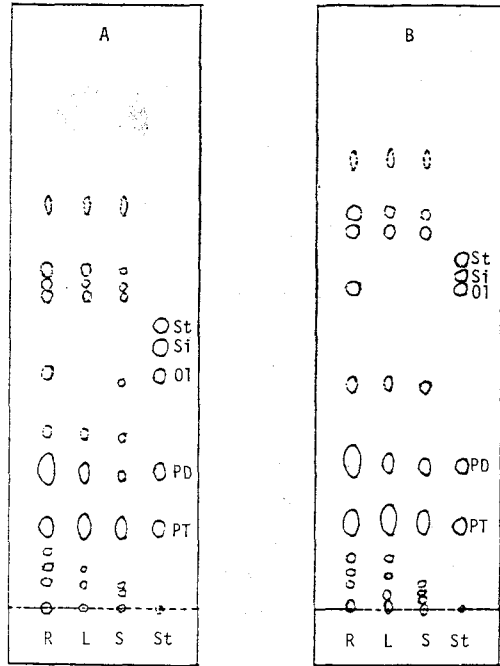


Fig. 5. One-dimensional thin-layer chromatograms of sapogenin extracted after acid hydrolysis of total saponin from ginseng root, leaf and stem
 Solvent A ; Benzene : Acetone=4 : 1
 Solvent B ; Benzene : EtOAc=1 : 1
 * Samples ; R: root, L: leaf, S: stem
 ** Standards ; PT: panaxatriol, PD: panaxadiol, Ol: oleanolic acid, Si: β-sitosterol, St: stigmasterol

따라서 葉⁹⁾과 莖에는 panaxadiol이나 panaxatriol에 糖類가 結合된 사포닌成分만이 함유되고 oleanolic acid에 糖이 結合된 사포닌은 전혀 함유되지 않음을 알 수 있었다.

한편 panaxadiol과 panaxatriol은 오직 人蔘屬植物에만 함유된 sapogenin(aglycone)成分으로 밝혀졌다.^{3,4,5,7)} 따라서 人蔘 成分의 확인 및 定量試驗^{17,18)}의 指標成分으로도 活用되고있는 sapogenin成分을 人蔘根에서 뿐만 아니라 葉이나 莖에서도 용이하게 分離되어 유용하게 活用될 수 있을 것으로 믿는다.

초 록

人蔘의 根 및 地上部 사포닌을 얇은 막 크로마토그래피로 同定한 結果 人蔘根에 함유된 사포닌 중 ginsenoside-Re, -Rg₁, -Rc, -Rf, -Rb₂ 및 -Rb₁은 각각 葉과 莖에서도 同定되었으며 이외에도 葉에서 10개과 莖에서 9개의 unknown spot를 同定할 수 있었다. 또한 部位別 總사포닌을 50% 초산으로 온화한 조건에서 酸 加水分解하여 生成된 prosapogenin의 調査結果, panaxadiol계 사포닌 및 ginsenoside-Re의 酸 加水分解物인 ginsenoside-Rg₂ 및 ginsenoside-Rg₃가 각각 同定되었다. 한편 根, 葉 및 莖의 총사포닌을 황산 加水分解하여 sapogenin 조사결과, 根에서는 panaxadiol, panaxatriol 및 oleanolic acid가 검출되었고, 葉과 莖에서는 panaxatriol 및 panaxadiol만이 同定되었다.

參 考 文 獻

1. Garriques, S.S.: Ann. Chem. Pharm., 90 : 231 (1854)
2. Brekhman, I.I.: Panax ginseng, *Mediz. Leningrad* p.182 (1957)
3. Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S. and Ohsawa, T.: Chem. Pharm. Bull., 14(6) : 595 (1966)
4. Shibata, S.: Proceedings of International Gi-

- nseng Symposium, The Central Research Institute, Office of Monopoly, Seoul, Korea, p. 69 (1974)
5. Kitagawa, I.: Proceedings of The 4th international ginseng symposium, Korea ginseng and tobacco research institute, Daejeon, Korea, p.159 (1984)
6. Saito, H., Morita, M. and Takagi, K.: Japan. J. Pharmacol. 23(1) : 43 (1973)
7. Takagi, K.: Proceedings of International Ginseng Symposium, The Central Research Institute, Office of Monopoly, Seoul, Korea, p.119 (1974)
8. Kim, J.Y. and Stabe, E.J.: Proceedings of International Ginseng Symposium, The Central Research Institute, Office of Monopoly, Seoul, Korea, p.77(1974)
9. Tanaka, O.: Proceedings of the 2nd International Ginseng Symposium, Korea Ginseng Research Institute, Seoul, Korea, p.145 (1978)
10. Ando, T., Tanaka, O. and Shibata, S.: Syoyakugaku Zasshi, 25(1) : 28 (1971)
11. Kaku, T. and Kawashima, Y.: Arzneim-Forsch, 30(1) : 936 (1980)
12. Sanada, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S.: Chem. Pharm. Bull., 22(10) : 2407 (1974)
13. 김만옥, 최강주, 박종대, 김석창, 고성룡 : 인삼연구보고서(제품분야) 한국인삼연구초연연구소 p.179 (1985)
14. 최진호 : 경희대학교대학원박사학위논문(1982)
15. Chung, B.S.: Korean J. Pharmacog., 5(3) : 175 (1974)
16. Takahashi, M., Isoi, K., Yoshikura, M. and Osugi, T.: Yakugaku Zasshi, 81 : 771(1961)
17. Han, B.H.: Korean J. Pharmacog., 3 : 151 (1972)
18. Hiai, S., Oura, H., Odaka, Y. and Nakajima, T.: Planta medica, 18 : 363 (1975)