

인삼에서 분리된 glycosyldiglyceride의 특성

위재준 · 박종대 · 김만욱 · 이형주*
한국인삼연초연구소, *서울대학교 식품공학과

Characterization of a Glycosyldiglyceride Purified from *Panax ginseng*

Jae-Joon Wee, Jong-Dae Park, Man-Wook Kim and Hyong-Joo Lee*

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon, Korea

*Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

A new glycosyldiglyceride was purified from the ethylacetate soluble fraction of *Panax ginseng* extract by silica gel column chromatography and chemical structure of the compound was studied with IR, MS, ¹³C-NMR spectroscopy and degradation method. The carbohydrate moiety was identified as β -D-glucose, and palmitic acid occupied about 70% of the acyl groups. This compound was first purified from *Panax ginseng*.

서 론

저자들은 前報^{1,2)}에서 인삼의 에칠아세테이트추출 분획을 silica gel column chromatography 및 알칼리 처리하여 산성분획, 중성분획등으로 나누는 다음 이중 항산화 활성 분획인 산성 분획에서 gentisic acid, caffeic acid 등 phenolic acid를 분리 동정한 바 있다. 한편 이러한 성분들의 분리에 사용되지 않았던 중성분획은 에칠아세테이트 추출분획 전체의 약 30%(w/w)를 차지하였으며 분획 과정을 볼 때 당지질 또는 인지질 등 극성지질이 함유되어 있을 것으로 예상되었다. 인삼에서 이에 관한 연구³⁾로 thin layer chromatography(TLC)에 의해 monogalactosyldiglyceride(MGDG), digalactosyldiglyceride(DGDG) 또는 phosphatidylethanolamine등이 동정되었으나 순수분리되어 그 화학구조가 구명된 예는 드물다. 따라서 본 연구에

서는 위 분획에서 silica gel column chromatography에 의해 새로운 당지질 성분을 분리정제하여 IR, MS 및 ¹³C-NMR등으로 구조를 분석한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재 료

1) 인삼 추출 분획

앞의 실험¹⁾에서 인삼의 에칠아세테이트 추출 분획을 silica gel column으로 용매극성 순으로 세개의 분획, 즉 Fr. I, Fr. II 및 Fr. III으로 나누는 다음 Fr. I 및 Fr. II는 다시 5% NaHCO₃ 수용액으로 추출함으로써 산성분획(Fr. IA, Fr. IIA) 및 중성분획(Fr. IIN, Fr. IIN)으로 나누었는데 이 중 Fr. IIN을 사용하였다.

2) 시약

Column chromatography용 용매는 시중 일급시약을 사용하였고 trimethylsilylation 시약은 Pierce사의 N-trimethylsilylimidazole을, Molish반응 시

1989년 2월 15일 수리

Corresponding author: J.J. Wee

약은 Merck사 및 Fluka사의 특급을 사용하였다. NMR분석용 DMSO-d₆는 Fluka사 제품을 사용하였다.

Fr. IIN 중 성분 분리

사용한 column은 $\phi 2 \times 76$ cm glass column, 충전제는 Silica gel 60(70~230mesh, Merck), 용매는 EtOAc-CH₃COOH-H₂O(25 : 1 : 8, v/v, upper layer) 혼합용매, 유속은 약 1ml/min이며 10 ml씩 분획한 후 Merck사의 precoated silica gel plate로 TLC하였다. 이때 전개용매는 CHCl₃-MeOH-EtOAc-H₂O(2 : 2 : 4 : 1, v/v, lower layer)이고 검출은 50%-H₂SO₄분무 후 가열건조하였다. 이러한 방법으로 Fr. IIN 약 7g을 silica gel column chromatography 하여 fraction number 92~130으로 부터 CHCl₃와 CH₃CN혼합용매에서 백색 침전의 Compound A를 40mg 얻었다.

분리된 성분의 동정

Compound A는 Molish 반응⁴⁾에 양성이었다고 IR 분석 결과 glycosidic bond 및 carbonyl기가 있는 배당체로 추정되었다. 따라서 5mg을 먼저 4N-NaOH로 실온에서 4 시간 비누화 시킨후 2N-HCl로 중화시키고 에테르로 추출한 다음 상법⁵⁾에 따라 methylation 하여 Varian Aerograph 3700으로 GC 분석하였다. 분석 조건은 column : SE-30 fused silica capillary (0.25mm i.d. \times 20m), injector temp. : 250°C, detector temp. : 270°C, column pressure(N₂) : 0.6kg/cm²이었으며 column 온도는 초기온도 170°C이고 3°C/min로 승온시켰다. 수층은 계속해서 5% HCl로 산 가수분해한 후 유리된

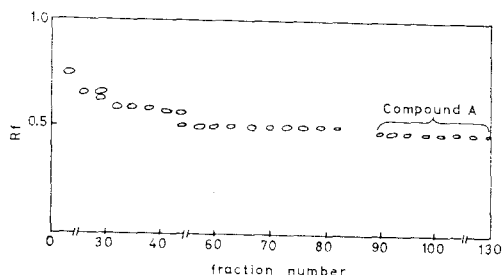


Fig. 1. Thin layer chromatogram of the fractions obtained by silica gel column chromatography of Fr. IIN, of which fractions 92~130 were used to isolate Compound A by precipitation in CHCl₃-CH₃CN

당을 최⁶⁾의 방법으로 TLC 분석하거나 trimethylsilylation⁷⁾ 한 후 위와 같은 조건에서 GC 분석하였는데 다만 column의 초기온도를 130°C로 하였다. IR분석은 분석시료를 DMSO에 녹여서 Perkin Elmer 599B spectrometer로 측정하였고 MS 분석은 Varian Model MAT212 GC/MS spectrometer를 사용하여 70eV에서 Electron Impact(EI) method로 측정하였다. NMR분석은 tetramethylsilane을 내부 표준물질로 첨가한 DMSO-d₆에 녹여 Bruker FT(300MHz) spectrometer를 사용하여 측정하였고 chemical shift는 δ (ppm)로 나타내었다.

결과 및 고찰

Fr. IIN 중 성분 분리

에칠아세테이트 가용성 중성분획 Fr. IIN을 silica gel column chromatography 하여 얻어진 130개 fraction을 TLC한 결과 Fig. 1과 같았다. 그림에서 fraction number 92~130에 의해 나타난 Rf치 0.41인 spot가 Compound A이다.

Compound A의 구조

이 화합물은 Molish 반응에 양성이었다고 IR spe-

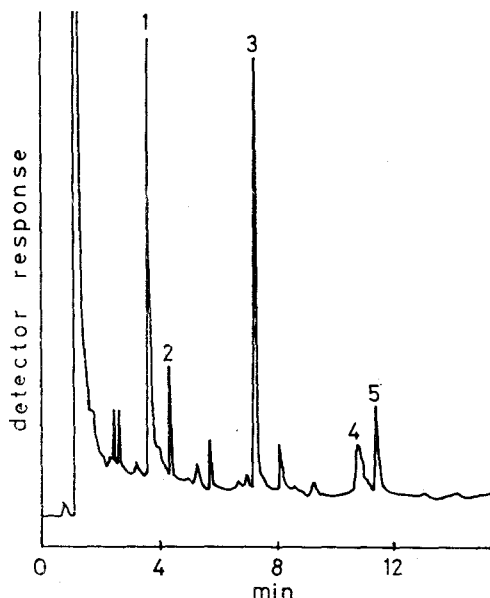


Fig. 2. Gas chromatogram of methyl esters of the fatty acids liberated from Compound A by alkaline hydrolysis
1 : unidentified, 2 : myristic acid, 3 : palmitic acid, 4 : linoleic acid and 5 : stearic acid

Table 1. ¹³C-NMR chemical shifts of fatty acid moiety of Compound A in DMSO-d₆⁸⁾

Carbon No.	16 : 0 (in CDCl ₃)	Compound A	Carbon No.	18 : 0 (in CDCl ₃)	18 : 2 (in CDCl ₃)	Compound A
C-1	170.80	173.78	C-1	180.58	180.56	
2	33.93	34.14	2	34.24	34.22	
3	24.56	24.44	3	24.81	24.78	
4	28.94	28.77	4	29.23	29.21	
5	29.12	29.13	5	29.38	29.21	
6	29.31	29.13	6	29.56	29.21	
7	29.47	29.13	7	29.82	29.72	
8	29.55	29.13	8	29.82	27.32	26.69
9	29.55	29.13	9	29.82	130.01	129.86
10	29.55	29.13	10	29.82	128.24	129.68
11	29.55	29.13	11	29.82	25.77	25.66
12	29.55	29.13	12	29.82	128.08	129.28
13	29.25	29.13	13	29.82	130.20	130.28
14	31.81	31.34	14	29.82	27.32	26.69
15	22.57	22.13	15	29.51	29.48	
16	14.01	13.95	16	33.07	31.67	
			17	22.79	22.69	
			18	14.12	14.08	

Table 2. ¹³C-NMR chemical shifts of sugar moiety of Compound A in DMSO-d₆

Carbon No.	Glycoside*	Compound A	Carbon No.	Glycolipid**	Compound A
D-Glucopyranosyl			Glycerol		
C-1'	103.0	103.50	C-1	67.8	69.96
C-2'	73.5	73.45	C-2	70.8	70.91
C-3'	76.7	76.88	C-3	63.0	
C-4'	70.1	70.50			
C-5'	76.7	76.49			
C-6'	61.0	61.04			

* 3-0-α-L-arabinopyranosyl hederagenin-28-0-β-D-glucopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside⁹⁾

** Glycero-galactolipid⁹⁾

trum에서 1000~1100cm⁻¹에 glycosidic bond 흡수 피크가 나타나 분자내 당이 있음을 알 수 있었고 1650cm⁻¹의 흡수 피크는 분자내 carbonyl기가 있음을 시사하였다. 이 화합물을 알칼리 처리하여 지용성 부분을 GC 분석한 결과 Fig. 2와 같이 palmitic acid가 68.5%로서 주성분이었고 stearic acid, 14.1%, myristic acid, 8.9%, linoleic acid, 8.4%의 비율로 되어 있었다. 수층을 계속해서 산 처리하여 TLC 및 GC 한 결과 D-glucose가 확인

되었다.

이러한 사실은 ¹³C-NMR data와 잘 일치하였는데 Table 1에서 보는 바와 같이 고자장에서 palmitic acid의 carbon signal이 δ13.95(C-16), δ22.13(C-15), δ24.44(C-3), δ34.14(C-2) 그리고 C-5에서 C-13까지의 signal은 중첩되어 δ29.13에서 나타나 있다⁸⁾. GC에서 검출된 다른 소량의 지방산의 carbon signal도 대개는 이와 중첩되고 있으나 다만 linoleic acid의 double bond car-

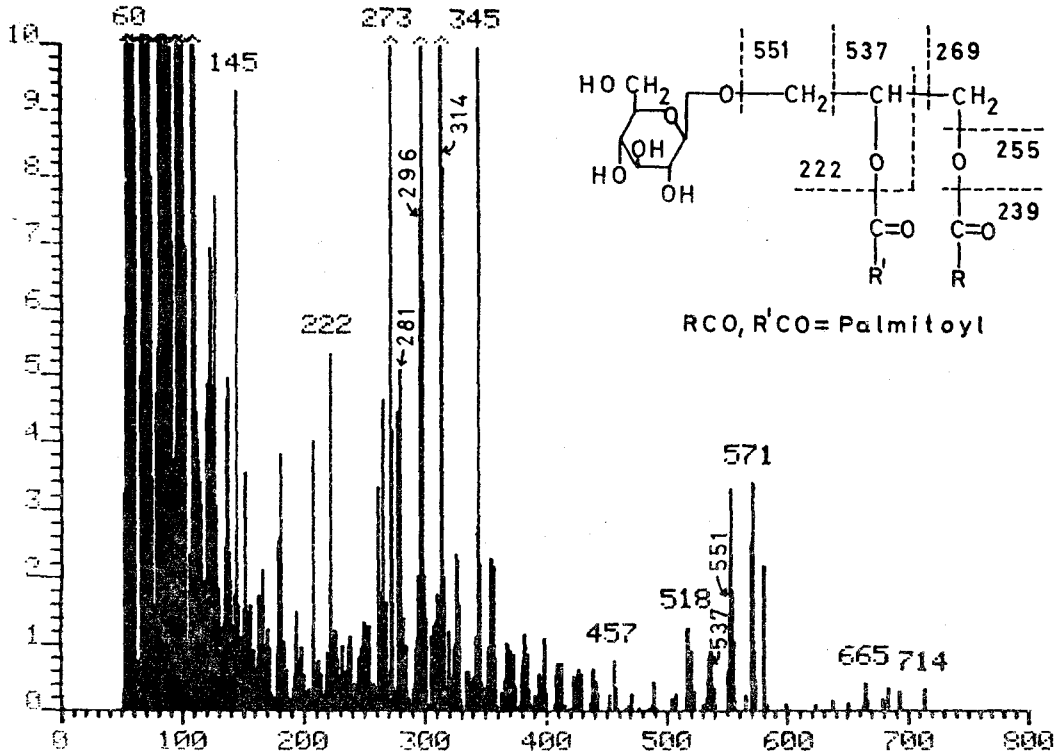


Fig. 3. EI-MS spectrum of Compound A
 RCO, R'CO = palmitoyl(68.5%), stearoyl(14.1%), myristoyl(8.9%) and linoleoyl(8.4%)

bon의 signal을 $\delta 129.28 \sim 130.28$ 에서 볼 수 있다. $\delta 173.78$ 의 signal은 ester carbonyl기의 chemical shift로서 palmitic acid의 carbonyl기 (C-1)의 $\delta 170.80$ 보다 저자장 이동된 것으로 나타나 palmitic acid가 ester 결합하고 있음을 시사하였다.

D-glucose 한분자의 carbon signal은 Table 2와 같이 $\delta 103.50$ (C-1'), $\delta 73.45$ (C-2'), $\delta 76.88$ (C-3'), $\delta 70.50$ (C-4'), $\delta 76.49$ (C-5') 및 $\delta 61.04$ (C-6')에서 확인되었고⁹⁾, $\delta 69.96$ 및 $\delta 70.91$ 의 signal은 glycerol carbon 3개중 2개의 signal로 추정되며⁹⁾, 나머지 탄소 한개의 chemical shift는 확실하지 않다.

MS spectrum(Fig. 3)을 살펴보면 예상되는 분자량 730(M_1)이 나타나 있지는 않지만 m/z 551(M_2)은 M_1 에서 glucose가 떨어진 ($M_1 - C_6H_{11}O_6$)⁺이고, m/z 537은 ($M_2 - CH_2$)⁺, m/z 222는 ($M_1 - RCOOCH_2 - R'CO$)⁺, m/z 296은 ($M_2 - RCOO$)⁺로 해석된다. m/z 281은 ($M_2 - RCOOCH_2 - H$)⁺, m/z 314는 triacylglycerol의 일반적인 fragmentation¹⁰⁾과 유사한 과정을 거쳐 생성된 (RCO or R'CO + 74 + H)⁺라고 생각된다. ¹H-NMR 분석을 하였을 때

glucose의 anomeric proton의 signal이 $\delta 5.61$ 에서 $J=4.96$ Hz의 doublet로 나타나고 ¹³C-NMR data에서도 anomeric carbon의 signal이 $\delta 103.50$ 에서 나타난 점으로 볼 때 glucose는 β 결합¹¹⁾을 하고 있음을 알 수 있었다. 이상과 같은 사실을 종합해볼 때 Compound A는 acyl group의 약 70%가 palmitic acid로 당은 한 분자의 D-glucose로 구성되어 있는 glycosyldiglyceride로 볼 수 있다.

인삼중 당지질에 관한 연구는 1964년 Takahashi 등¹²⁾이 β -sitosterol- β -D-glucoside를, 최근 Kitagawa 등⁹⁾이 sterol glucoside의 지방산 에스테르 및 MGDG를 분리 동정하였을 뿐이다. Sterol 배당체는 triterpene배당체와 더불어 80과(科) 이상의 식물체에서 검출된다고 보고된 바 있고¹³⁾ 식물체에 함유된 glycosyl diacylglycerol의 당은 MGDG 및 DGDG와 같이 주로 galactose인데 본 실험에서 분리한 당지질인 Compound A는 당이 galactose가 아닌 glucose인 점이 특이하다. 인삼의 유리 및 결합지질을 가수분해하여 지방산 조성을 분석한 결과⁹⁾를 보면 linoleic acid가 50~60%이고, palmitic acid가 10~20%로서 linoleic acid가 주성분이

있으며 Kitagawa등이 분리한 MGDG중 지방산 조성도 linoleic acid가 72.9%로서 가장 많았다. 그러나, Compound A를 가수분해하여 GC 분석한결과 palmitic acid가 68.5%로서 주된 지방산인 점도 특징적이었다.

초 록

인삼의 에칠아세테이트 가용성 중성분획에서 지질 성분을 분리 정제하여 이화학적 성질 및 분광학적 특성을 조사한 결과 acyl group의 약 70%가 palmitic acid로, 당은 1분자의 β -D-glucose로 구성되어 있는 glycosyldiglyceride였다. 이 물질은 인삼에서는 처음으로 분리 정제되었다.

참 고 문 헌

1. 위재준, 박종대, 김만옥, 이형주 : 한국 농화학회지, 32 : 44(1989)
2. 위재준, 박종대, 김만옥, 이형주 : 한국 농화학회지, 32 : 50(1989)
3. 최강주 : 고려대학교 박사 학위 논문(1983)
4. Jacin, H. and Mishkin, A.R.: J. Chromatog., 18 : 170(1965)
5. Metcalf, L.D., Schmitz, A.A. and Pelka, J. R.: Anal. Chem., 38 : 514(1966)
6. 최재수 : 서울대학교 박사 학위 논문(1984)
7. Knapp, D.R.: Handbook of Analytical Derivatization Reactions, John Wiley & Sons, Inc., p. 551(1979)
8. Gunstone, F.D. and Norris, F.A.: Lipids in Foods, Pergamon Press, p. 48(1983)
9. Kitagawa, I., Taniyama, T., Shibuya, H., Noda, T. and Yoshikawa, M.: Yakugaku Zasshi, 107 : 495(1987)
10. Hasegawa, D. and Suzuki, T.: Lipids, 8 : 631(1973)
11. Pavia, D.L., Lampman, G.M. and Kriz, G. S.: Introduction to Spectroscopy, W.B. Saunders Co., p. 116(1979)
12. Takahashi, M., Isoi, K., Yoshikura, M. and Osugi, T.: Yakugaku Zasshi, 81 : 771(1961)
13. Basu, N. and Rastogi, R.P.: Phytochem., 6 : 1249(1967)