

홍삼으로부터 새로운 Digalactosyldiglyceride 화합물의 분리

백남인* · 이유희¹ · 위재준¹ · 박종대¹ · 김신일¹

경희대학교 산업대학, ¹한국인삼연초연구원
(1997년 1월 14일 접수, 1997년 3월 6일 수리)

서 론

인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer, Araliaceae)은 오래전 부터 인체에 있어서의 여러가지 신진대사를 좋게하는 효능이 있는 것으로 알려져 왔다.¹⁾ 따라서 인삼의 어떤 성분이 이러한 효능을 발현케하는가에 관한 많은 연구가 이루어졌다.²⁾ 아직 인삼의 효능을 총체적으로 입증할만한 약리활성 성분이 무엇인가가 뚜렷이 판명되지는 않았으나, 사포닌,³⁾ 폴리아세틸렌,⁴⁾ 다당체⁵⁾ 등이 인삼의 주요성분으로 밝혀져 이들의 약리활성에 관한 연구가 주종을 이루었다. 지질성분의 하나인 glyceride 화합물도 인체의 생화학적 및 생리적인 현상을 호전시키는 활성이 있는 것으로 알려져 있는데,⁶⁾ 지금까지 인삼으로부터 3종의 glyceride 화합물이 분리 보고되었다.⁷⁻⁹⁾ 이번에 저자 등은 홍삼의 MeOH 추출물로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 미지의 지질 화합물을 분리하였으며, NMR, IR 등의 스펙트럼 데이터를 해석하고, 산 및 알칼리 분해한 후 gas chromatography와 TLC를 이용하여 그 구조를 분석한 결과, 지금까지 인삼으로부터 분리된 바가 없는 새로운 digalactosyldiglyceride 화합물인 것으로 판명하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60 (70~230 mesh, Merck)을, TLC (Thin Layer Chromatography)는 Kieselgel 60 F₂₅₄를, 그 외의 시약은 모두 일급, 또는 특급을 사용하였다. ¹H- (400 MHz), ¹³C-NMR (100 MHz) 및 DEPT spectra는 BRUKER ARX 400으로, IR spectrum은 Perkin-Elmer Model 599B로 측정하였고, 비선광도는 JASCO DIP-370으로 측정하였다. Gas chromatography는 Hewlett Packard 5890 Series II를 사용하였다.

홍삼시료

이 실험에서 사용한 홍삼은 한국담배인삼공사에서 6년근 수삼 (*P. ginseng*)을 사용하여 제조한 것을 제공받아 사용

하였다.

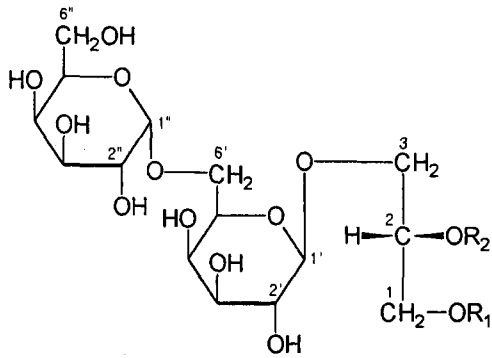
Digalactosyldiglyceride의 분리

홍삼분말(500 g)을 80% 수용성 MeOH (1 L×2)로 실온에서 2회 추출하였고, 여과 농축한 추출물을 물 (700 ml)과 ethyl ether (700 ml×2)로 분배 추출한 후, 물층을 다시 *n*-BuOH (500 ml×2)로 추출하였다. *n*-BuOH 층을 감압 농축한 후, silica gel column chromatography를 반복하여 (CHCl₃-MeOH-H₂O=15 : 3 : 1, CHCl₃-MeOH=6 : 1), TLC 상 (CHCl₃-MeOH-H₂O=10 : 3 : 1, CHCl₃-MeOH=4 : 1)에서 그동안 인삼으로부터 분리되었던 어떤 성분과도 일치하지 않는 미지의 화합물 79 mg을 분리하였다. Digalactosyldiglyceride : colorless oil, IR(CHCl₃) : 3654, 2937, 1736, 1210, 1028 cm⁻¹, ¹H-NMR (400 MHz, d₅-Py.) 5.46 (8H, m, H-9, 10, 12, 13 in linoleoyl), 4.70 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-1'), 4.63(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-1''), 4.51-4.02 (17H, galactosyl, glycerol-oxymethine or oxymethylene), 2.88 (4H, t, *J*=5.8 Hz, linoleoyl-methylene), 2.31(4H, t, *J*=5.9 Hz, linoleoyl-methylene), 2.05(8H, m, linoleoyl-methylene), 1.67 (4H, m, linoleoyl-methylene), 1.32-1.19 (42H, linoleoyl-methylene), 0.82(6H, t, *J*=5.8 Hz, H-18 in linoleoyl); ¹³C-NMR (100 MHz, d₅-Py.) 173.2 (C-1''; '' indicates the number of linoleoyl), 173.1 (C-1'''), 130.4 (C-13'''), 130.3 (C-9'''), 128.35 (C-10'''), 128.33 (C-12'''), 105.4 (C-1'; ' indicates the number of β-D-galactopyranosyl), 101.3 (C-1''; '' indicates the number of α-D-galactopyranosyl), 75.0 (C-5'), 74.5 (C-3'), 72.8 (C-5''), 72.1 (C-2'), 71.6 (C-3''), 70.9 (*sn*-C-2), 70.9 (C-4''), 70.5 (C-2''), 69.8 (C-4'), 68.1 (C-6'), 68.0 (*sn*-C-3), 63.3 (*sn*-C-1), 62.5 (C-6''), 32.1 (C-2'''), 31.6 (C-16'''), 29.94 (C-7'''), 29.87 (C-8'''), 29.5 (C-6'''), 29.4 (C-5'''), 29.3 (C-4'''), 27.5 (C-8'''), 27.4 (C-14'''), 26.0 (C-11'''), 25.2 (C-3'''), 22.8 (C-17'''), 14.2 (C-18''').

Digalactosyldiglyceride의 산가수분해 및 구성당의 동정

Digalactosyldiglyceride 5 mg에 5% HCl (H₂O-MeOH=1 : 1) 3 ml를 가하고 1시간 reflux 하였다. 반응액에 Ag₂CO₃를

찾는말 : 인삼, 홍삼, 디갈락토실디글리세리드, 핵자기공명장치, 가스크로마토그래피
*연락처



(2S)-1-O-linoleoyl-2-O-linoleoyl-3-O-[β -D-galactopyranosyl (1 \rightarrow 6)- α -D-galactopyranosyl]-*sn*-glycerol
 R_1, R_2 =linoleoyl (70.9%), palmitoyl (13.7%), linolenoyl (6.3%), oleoyl (5.1%), stearoyl (4.0%).

가하여 중화시킨 후 여과하였다. 여액 중에 생성된 당의 동정은 silica gel TLC를 이용하여 행하였다. 전개용매: CHCl_3 -MeOH- H_2O =6:4:1, R_f value of galactopyranose: 0.32.

Digalactosyldiglyceride의 알칼리분해 및 구성지방산의 동정

Digalactosyldiglyceride 20 mg을 MeOH 4 ml에 녹인 후, 10% NaOMe/MeOH 0.5 ml를 가하고 3시간 환류하였다. 반응액에 산성수지 (Dowex 50 \times W, H⁺ form)를 가하여 중화시킨 후, 여과하고 감압 농축하였다. 농축물을 무수 MeOH 3 ml로 녹인 후, $\text{CH}_2\text{N}_2/\text{Et}_2\text{O}$ 를 적당량 가하고 하룻밤 방치하였다. Methyl ester화된 반응액을 감압농축한 후 gas chromatography로 구성지방산을 동정하였다. GC 분석 조건: Column; Supelcowax-10 fused silica capillary 0.25 m/m \times 30 m, Split Ratio; 12:1, Oven Temp.; Gradient [Initial temp. ;120 $^\circ\text{C}$ (4 min), Increasing Rate ;3 $^\circ\text{C}/\text{min}$, Final temp ;240 $^\circ\text{C}$ (30 min)], Detector; FID, Inj. Temp.; 220 $^\circ\text{C}$, Detector Temp.; 240 $^\circ\text{C}$, Rt(Kind of fatty acid, Area%); 30.46(palmitic acid, 13.7), 36.80 (Stearic acid, 4.0), 37.45 (Oleic acid, 5.1), 39.11 (Linoleic acid 70.9), 40.88 (Linolenic acid, 6.3).

한편, 위에서 gas chromatography 분석하고 남은 반응액을 silica gel column chromatography (CHCl_3 -MeOH- H_2O =6:5:1) 하여 3-O-[α -D-galactopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl]-*sn*-glycerol¹⁰⁾ (4.2 mg)을 얻었다.

결과 및 고찰

홍삼의 MeOH 추출물의 배당체 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 TLC상에서 배당체로 추정되는 미지의 화합물을 분리하였다. 이 화합물은 silica gel TLC상에서 ginsenoside R_{g3}와 유사한 극성을 가지고 있는 것으로 나타났으나, 10% 황산 수용액을 분무하고 가열하였을 때 인삼의 damarane계 사포닌과는 다른 정색반응을 보였다.

이 화합물에 대하여 IR spectrum (CHCl_3)을 측정된 결과 수산기에서 유래하는 강한 흡수(3654 cm^{-1}) 및 ester 유래의 흡수 (1736 cm^{-1})를 보임에 따라 ester 결합을 가진 배당체로 추정되었다. NMR spectra로부터 이 화합물은 여러 가지 물질의 혼합물로 추정되었는데, 우선은 그중에 가장 주요성분으로부터 유래한 signal을 해석하여 구조를 구명하고자 하였다. ¹H-NMR (400 MHz, d_5 -Py.)에 있어서 2개의 anomeric proton signal이 δ 4.70, 4.63에서 관측되었고, δ 4.51~4.02에서 다수의 signal이 관측되어 2분자의 당이 존재하는 것으로 추정되었다. 또한 δ 5.46에서 관측된 olefinic proton signal과 δ 0.82에서 triplet ($J=5.8$ Hz)으로 관측된 말단 methyl 기 및 δ 2.89~1.19에서 다수의 methylene signal이 관측됨에 따라 불포화 지방산의 존재가 확인되었다. 따라서 이 화합물은 2분자의 당과 불포화지방산으로 이루어진 diglycosyglyceride 화합물인 것으로 추정되었다. ¹³C-NMR spectrum (100 MHz, d_5 -Py.)에 있어서도 2개의 carbonyl signal (δ_c 173.2, 173.1)이 관측되었고, 4개의 olefinic methine signal (δ_c 130.4, 130.3, 128.35, 128.33) 및 2개의 anomeric carbon signal (δ_c 105.4, 101.3)이 관측되었다. 또한 δ_c 75.0~62.5에서 모두 13개의 oxy-carbon signal이 관측되었는데, DEPT 측정결과 그중 9개는 methine carbon이었고, 나머지 4개는 methylene carbon인 것으로 판명되었다. Glycerol에서 유래한 3개의 signal (δ_c 70.9, 68.0, 63.3)을 제하고 남은 signal의 chemical shift를 소상히 검토한 결과 2분자의 D-galactopyranose가 α -1-6 결합하고 있는 것으로 판명되었다. ¹H-NMR에서 2개의 anomeric proton의 coupling constant가 각각 7.0 Hz와 2.2 Hz로 관측되었으므로, glycerol에 직접 결합하고 있는 D-galactose는 β 결합하고 있는 것으로 판명되었다. 한편, 이 화합물의 glycerol의 *sn*-C-3 signal만이 68.0 ppm에서 관측됨으로서 glycosidation shift가 인정되었고, 다른 *sn*-C-1 (δ_c 63.3)과 *sn*-C-2 (δ_c 70.9) signal에서는 큰 변화가 없었으므로 galactose가 직접 결합하고 있는 수산기는 *sn*-C-3 수산기인 것을 알 수 있었다. 고자장 영역에서는 12개의 methylene과 1개의 methyl signal이 31.6~14.2 ppm에서 관측됨에 따라 가장 다량으로 함유되어 있는 구성 지방산은 2중결합 2쌍을 가지고 18개의 탄소로 이루어진 linoleic acid인 것으로 추정되었다.

구성당을 확인하기 위하여 화합물을 수용성 염산으로 가수분해하여 얻어진 반응액을 표준품과 함께 TLC로 검정한 결과 D-galactopyranose만이 검출되었다. 또한 구성지방산의 종류 및 조성비를 결정하기 위하여 화합물의 ester 결합을 NaOMe로 처리하여 끊어내고, 얻어진 지방산 혼합물을 MeOH에 녹이고 diazomethane으로 처리하여 지방산의 methyl ester 화합물을 얻었다. 얻어진 methyl 지방산을 gas chromatography로 분석하여 구성지방산의 종류는 표준품과의 retention time을 비교하여 결정하였고, 조성비는 peak의 면적비로부터 환산하여 구하였는데, linoleic acid가 70.9%로 월등히 많았고, palmitic acid, linolenic acid, oleic acid, stearic acid가 각각 13.7%, 6.3%, 5.1%, 4.0%를 차지

하고 있는 것으로 나타났다. 한편, *sn*-C-2의 입체구조는 이 화합물을 알칼리 처리하여 얻어진 3-O-[α -D-galactopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl]-*sn*-glycerol에 대하여 비선광도를 포함한 각종 데이터를 문헌값¹⁰⁾과 비교하여 S 배치로 판명하였다. 이상의 결과를 종합하여 이번에 분리한 glyceride 화합물의 주성분의 화학구조를 (2S)-1-O-linoleoyl-2-O-linoleoyl-3-O-[α -D-galactopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl]-*sn*-glycerol로 결정하였다.

그동안 인삼으로부터는 3종의 diacylglyceride가 Kitagawa,⁷⁾ Wee,⁸⁾ Baek⁹⁾ 등에 의하여 분리되었다. Kitagawa 등이 분리한 diacylglyceride 화합물은 당으로서 1분자의 galactose로, 주요지방산으로서는 linoleic acid로 이루어져 있었고, Wee 등이 분리한 화합물은 1분자의 glucose와 palmitic acid로 이루어져 있었으며, 백 등이 분리한 화합물은 1분자의 glucose와 linoleic acid로 이루어져 있는 것으로 보고되어, 모두 1분자의 당으로 이루어진 화합물들인데 비해, 이번에 우리가 분리한 diacylglyceride 화합물은 2분자의 galactose로 이루어진 것인 특징적이다. 한편, 다수의 glyceride 화합물에서 유용한 생물학적 활성이 있는 것으로 보고되고 있어⁶⁾ 이 화합물에 대한 활성에 대해서도 추후 계속하여 연구해 볼 만한 가치가 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

1. 相賀徹夫 (1985) 中藥大辭典. p. 2017-2026 (株) 小學館, 東京, 日本.
2. Itoh, T., Y.F. Zang, S. Murai and H. Saito (1989) Effects of *Panax ginseng* root on the vertical and horizontal motor activities and on brain monoamine-related substances in mice. *Planta Medica* **55**(5), 429-433.
3. Himi, T., H. Saito and N. Nishiyama (1989) Effect of gin-

- seng saponins on the survival of cerebral cortex neurons in cell cultures. *Chem. Pharm. Bull.* **37**(2), 481-484.
4. Matsunaga, H., M. Katano, H. Yamamoto, M. Mori and K. Takata (1989) Studies on the panaxytriol of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Isolation, determination and antitumor activity. *Chem. Pharm. Bull.* **37**(5), 1279-1281.
5. Krylova, N. V., N. N. Besednova, T. F. Soloveva, I. N. Loenko, V. S. Faustov, N. A. Konstantinova, T. P. Smolina and G. B. Elyakov (1990) Anti-inflammatory effect of polysaccharide obtained from ginseng cell cultures. *Antibiot Khimioter* **35**(4), 41-42.
6. Shirahashi, H., N. Murakami, M. Watanabe, A. Nagatsu, J. Sakakibara, H. Tokuda, H. Nishino and A. Iwashima (1993) Isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Chem. Pharm. Bull.* **41**(9), 1664-1666.
7. Kitagawa I., T. Taniyama, H. Shibuya, T. Noda and M. Yoshikawa (1987) Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2): Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng preparation from the same *Panax ginseng* root. *Yakugaku Zasshi* **107**, 495-505.
8. 위재준, 박종대, 김만욱, 이형주 (1989) 인삼에서 분리된 glycosyldiglyceride의 특성. *한국농화학회지* **32**(2), 132-136.
9. 백남인, 김신일, 박종대, 이유희, 정소영 (1994) Ginsenoside의 합성 및 분리기술 개발. 한국인삼연구회 인삼연구보고서 (제품분야 효능편) 49-104.
10. Kobayashi, M., K. Hayashi, K. Kawazo and I. Kitagawa (1992) Marine natural products. XXIX. Heterosigma-glycolipids I, II, III, and IV, four diacylglyceroglycolipids possessing ω 3-polyunsaturated fatty acid residues, from the raphidophycean dinoflagellate *Heterosigama akashiwo*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1404-1410.

A Novel digalactosyldiglyceride from Korean red ginseng

Nam-In Baek*, You Hui Lee¹, Jae Joon Wee¹, Jong Dae Park¹ and Shin Il Kim¹ (College of Industry, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea)

key words : *Panax ginseng*, red ginseng, digalactosyldiglyceride, NMR, GC

*Corresponding author