

(20S)-ginsenoside Rs₃ 및 이성질체의 NMR 데이터

백남인* · 김동선¹ · 박종대¹ · 이유희¹ · 김신일¹

경희대학교 생명자원과학부, ¹한국인삼연초연구원 인삼효능부
(1997년 6월 2일)

NMR Data of (20S)-ginsenoside Rs₃ and its Isomers

Nam-In Baek*, Dong Seon Kim¹, Jong Dae Park¹, You Hui Lee¹ and Shin Il Kim¹

Kyung Hee University, Department of Life Resources Sciences, Suwon 449-701,

¹Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea

(Received June 2, 1997)

Abstract : (20S)-ginsenoside Rs₃ and its isomers were chemically prepared from dio I ginseng saponins by partial acid hydrolysis and acetylation. The characteristics of ¹H- and ¹³C-NMR data were compared with each other and fully assigned.

Key words : (20S)-ginsenoside Rs₃, (20R)-ginsenoside Rs₃, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, stereoisomer.

서 론

인삼으로부터 분리된 사포닌중에는 분자구조 중에 에스터 결합을 가진 것들이 있다. 수삼으로부터는 malonyl 기가 결합된 사포닌이 분리되었고¹⁾, 홍삼으로부터는 acetyl 기가 결합된 사포닌이 분리되었다.²⁾ 이들 사포닌들은 그 유기산 잔기 때문에 사포닌 분자의 세포막 투과도에 변화가 있을 것으로 여겨져 주목을 끌었다.

한편, 저자들은 홍삼으로부터 새로운 사포닌을 분리하는 연구를 수행하여 (20E)-ginsenoside Rh₅³⁾, (20E)-ginsenoside Rg₅⁴⁾ 및 (20S)-ginsenoside Rs₃⁵⁾ (1)를 분리하여 그 화학구조를 구명하였다. 이들중에서 (20S)-ginsenoside Rs₃ (1)은 (20S)-ginsenoside Rg₃의 말단당인 D-glucose의 6번 수산기에 acetyl기가 에스터 결합한 구조이다. 이 물질은 홍삼에서만 발견되는데, 홍삼제조과정 중 증숙과정에서 다이올계 사포닌의 20번 결합당이 가수분해되고, 남은 당의 수산기에 유기산이 결합하여 생성된 것으로 여겨진다. 이때 20번 탄소의 결합당은 S_N2 반응에 의하여 수소

로 치환될 것이므로 (20S)와 (20R)의 입체이성질체가 유사한 비율로 얻어질 것으로 예상된다. 또한 인삼 중에 존재하는 acetyl기를 가진 물질이 ginsenoside Rg₃의 수산기와 축합할 때 입체적인 장애 때문에 1차알코올인 D-glucopyranose의 6번 위치에 acetyl기가 우선적으로 도입될 것으로 예상할 수 있다. 저자들은 홍삼으로부터 분리한 (20S)-ginsenoside Rs₃ (1)에 있어서 acetyl기가 도입된 위치를 FAB-MS와 2D-NMR 기법인 HMBC를 이용하여 결정하였다. 아울러 20번 탄소의 입체 배치는 ¹³C-NMR에 있어서의 chemical shift 값을 문헌과 비교하여 결정한 바 있다. 이 과정에서 에스터 결합을 가진 인삼 사포닌에 대하여 ¹H- 및 ¹³C-NMR 데이터를 이용하여 구조를 추정할 필요성이 제기되었다. 에스터 결합을 가진 인삼 사포닌의 NMR 데이터에 관하여 소상히 보고한 논문은 극소수인데⁶⁾, 저자들은 (20S)-ginsenoside Rs₃ (1) 및 3종의 이성질체를 제조하였고, 이들의 ¹H- 및 ¹³C-NMR 데이터를 모두 동정하고 비교하였다. 이번에 정리한 결과가 에스터 결합을 가지는 인삼 사포닌의 구조적 연구에 도움이 될

것으로 기대한다.

재료 및 방법

1. 기기 및 시약

Column chromatography 용 silica gel 은 Kiesel-gel 60 (Merck 사, 70~230 mesh)을 사용하였고, 그 외 모든 시약은 모두 특급을 사용하였다. NMR은 Bruker ARX 400을 사용하여 시료를 pyridine-d₅에 녹여 측정하였고, TMS를 내부 표준물질로 사용하였다.

2. (20S)-ginsenoside Rs₃ (1) 및 이성질체의 제조

저자들이 확립한 방법⁷⁾에 따라 홍삼으로부터 diol계 인삼 사포닌 분획을 제조하였다. 얻어진 분획 10 g을 50% acetic acid (500 ml)에 녹이고 70°C에서 3시간 초음파 처리하였다. 반응액을 70°C에서 감압농축한 후, 50 ml의 methanol을 가하고 30분간 환류하였다. 충분히 식힌 후 -4°C에서 하룻밤 방치하여, 생성된 침전물을 유리 filter 로 여과하였다. 침전물을 차가운 methanol 50 ml로 2회 세척하여 (20R)-ginsenoside Rg₃ 1.20 g을 얻었다. 여액은 모두 합한 후, 포화 NaHCO₃ 용액 100 ml로 2회 세척하고, 감압농축하였다. 농축물을 silica gel column chromatography (CHCl₃-MeOH-H₂O=9:3:1, 하층) 하여 (20S)-ginsenoside Rg₃ 1.42 g을 얻었다.

얻어진 (20S)- 및 (20R)-ginsenoside Rg₃ 각각 1 g을 pyridine 10 ml에 녹이고 acetic anhydride 10 ml를 빙욕상에서 적하한 후, 실온에서 하룻밤 교반하였다. 반응액을 냉수 100 ml에 천천히 가하여 혼합시킨 후, ethyl acetate 50 ml로 3회 추출하였다. 추출액을 5% HCl, 포화 NaHCO₃ 및 NaCl 용액으로 세척하였고, 무수 magnesium sulfate로 탈수한 후 여과하고 감압농축하였다. 각각의 농축물을 silica gel column chromatography (CHCl₃-MeOH-H₂O=15:3:1, 하층) 하여 (20S)-ginsenoside Rs₃ (1, 47 mg), 화합물 2 (32 mg), (20R)-ginsenoside Rs₃ (3, 37 mg) 및 화합물 4 (41 mg)을 각각 얻었다.

결과 및 고찰

홍삼 제조시 (20S)-ginsenoside Rs₃ 와 함께 생성될 가능성이 있는 이성질체는 20번 탄소의 입체구조가 다른 (20R)-이성질체 및 acetyl 기가 첫번째 D-

glucose 의 6번 수산기에 결합한 화합물이다.

인삼의 diol계 사포닌을 초산으로 산가수분해하면, 3번에 결합한 당은 남은채로 20번에 결합한 당만이 이탈된다. 이때 당의 이탈은 당이 S_N2 반응에 의해 수소로 치환되면서 일어나므로 2개의 입체 이성질체가 얻어질 수 있다. 본 실험에서도 (20R & S)-ginsenoside Rg₃ 의 라세미 혼합물이 얻어졌다. 이 두 이성질체는 여러 가지 물리화학적 성질이 유사하나 methanol 에 대한 용해도에 있어서는 차이가 커서, (20S)-계열은 잘 녹으나 (20R)- 계열은 잘 녹지 않는다. 따라서 위에서 얻어진 라세미 혼합물을 가열하여 methanol 에 용해시킨 후 다시 냉각시켜 재결정하였다. 얻어진 침전물로부터는 (20R)-ginsenoside Rg₃를 얻었고, 여액으로부터는 silica gel column chromatography하여 (20S)-ginsenoside Rg₃를 얻었다. 각각의 이성질체를 pyridine 용매하에서 acetic anhydride를 이용하여 아세틸화하여 TLC상에서 주생성물로서 2종의 아세틸화물을 검출하였다. 이들은 silica gel column chromatography 에 의하여 용이하게 분리되었는데, 모두 일치한 아세틸화물로 판명되어, 결과적으로 4종의 ginsenoside Rs₃의 일치한 아세틸화 화합물이 얻어졌다.

각각의 ¹H- 및 ¹³C-NMR을 측정하여, 그 chemical shift 값을 유사한 구조를 갖는 다른 화합물의 값과 비교, 검토하였다(Table 1, 2). 모두 2분자의 당에서 연유하는 2개의 anomer 탄소 및 수소의 signal 이 관측되었고, genin인 protopanaxadiol에서

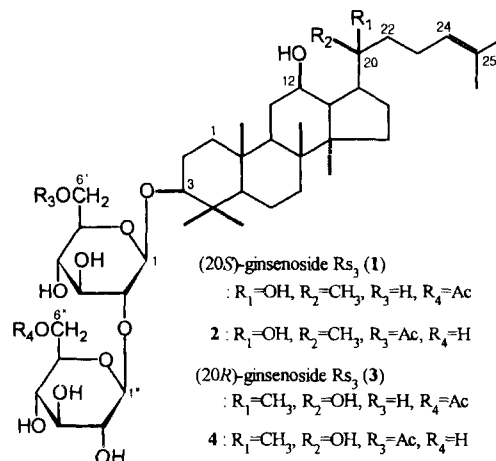


Fig. 1. Chemical structures of (20S)-ginsenoside Rs₃ (1) and its isomers.

Table 1. ¹H-NMR data of (20S)-ginsenoside Rs₃ (**1**) and its isomers (400 MHz, d₅-Py.)

H	(20S)-ginsenoside Rs ₃ (1)	2	(20R)-ginsenoside Rs ₃ (3)	4
3	3.27 (1H, dd, <i>J</i> =4.5, 11.6*)	3.25(1H, dd, <i>J</i> =4.2, 11.7)	3.28 (1H, dd, <i>J</i> =4.3, 11.7)	3.28 (1H, dd, <i>J</i> =4.3, 11.6)
12	3.94 (1H, m)	3.98 (1H, m)	3.93 (1H, m)	3.96 (1H, m)
24	5.31 (1H, t, <i>J</i> =7.0)	5.32 (1H, t, <i>J</i> =6.5)	5.33 (1H, t, <i>J</i> =6.9)	5.32 (1H, t, <i>J</i> =6.7)
18	0.95 (3H, s)	0.94 (3H, s)	1.00 (3H, s)	0.98 (3H, s)
19	1.12 (3H, s)	1.09 (3H, s)	1.14 (3H, s)	1.10 (3H, s)
21	1.42 (3H, s)	1.42 (3H, s)	1.40 (3H, s)	1.40 (3H, s)
26	1.64 (3H, s)	1.64 (3H, s)	1.70 (3H, s)	1.70 (3H, s)
27	1.61 (3H, s)	1.61 (3H, s)	1.66 (3H, s)	1.65 (3H, s)
28	1.34 (3H, s)	1.28 (3H, s)	1.35 (3H, s)	1.30 (3H, s)
29	0.81 (3H, s)	0.81 (3H, s)	0.85 (3H, s)	0.85 (3H, s)
30	0.96 (3H, s)	0.96 (3H, s)	1.02 (3H, s)	1.02 (3H, s)
1'	4.92 (1H, d, <i>J</i> =7.6)	4.87 (1H, d, <i>J</i> =7.2)	4.93 (1H, d, <i>J</i> =7.5)	4.87 (1H, d, <i>J</i> =7.2)
5'		3.89 (1H, m)		3.92 (1H, m)
6'		4.92 (1H, br. d, <i>J</i> =11.2)		4.91 (1H, br. d, <i>J</i> =11.2)
		4.77 (1H, br. d, <i>J</i> =11.3)		4.76 (1H, br. d, <i>J</i> =11.3)
1"	5.33 (1H, d, <i>J</i> =7.6)	5.39 (1H, d, <i>J</i> =7.6)	5.34 (1H, d, <i>J</i> =7.6)	5.38 (1H, d, <i>J</i> =7.6)
5"	4.02 (1H, ddd, <i>J</i> =4.5 4.9 9.5)		4.02 (1H, ddd, <i>J</i> =4.5 4.9 9.5)	
6"	4.96 (1H, dd, <i>J</i> =4.5, 11.7)		4.94 (1H, dd, <i>J</i> =4.4, 11.6)	
	4.80 (1H, dd, <i>J</i> =4.9, 11.7)		4.80 (1H, dd, <i>J</i> =4.9, 11.6)	
acetyl	2.04 (3H, s)	2.01 (3H, s)	2.05 (3H, s)	2.00 (3H, s)

* *J* values : in Hz**Table 2.** ¹³C-NMR data of (20S)-ginsenoside Rs₃ (**1**) and its isomers (100 MHz, d₅-Py.)

C	(20S)-Rg ₃ *	(20S)-Rg ₃ (1)*	2	(20S)-Rg ₃ *	(20S)-Rg ₃ (3)*	4
1	38.51	38.99	39.08	39.01	39.12	39.15
2	26.46	26.78	26.77	26.64	26.77	26.71
3	88.30	89.14	89.33	88.81	89.18	89.34
4	39.37	39.94	39.95	39.90	40.02	40.01
5	55.74	56.34	56.36	56.25	56.39	56.41
6	18.32	18.40	18.42	18.35	18.47	18.45
7	36.29	35.81	35.85	35.07	35.18	35.15
8	37.34	36.87	36.92	36.80	36.93	36.96
9	49.76	50.33	50.37	50.49	50.64	50.65
10	39.09	39.67	39.64	39.61	39.73	39.67
11	31.43	31.97	32.04	32.05	32.17	32.19
12	70.40	70.94	70.95	70.79	70.88	70.87
13	47.94	48.50	48.49	49.10	49.22	49.17
14	51.10	51.64	51.66	51.67	51.75	51.75
15	30.72	31.27	31.29	31.31	31.40	31.40
16	26.24	26.71	26.69	26.53	26.63	26.61
17	54.19	54.75	54.76	50.27	50.38	50.40
18	16.45	16.94	16.94	16.51	17.30	17.28
19	16.26	16.30	16.28	16.31	16.39	16.34
20	72.40	72.89	72.87	71.49	72.94	72.91
21	26.12	27.01	27.00	22.71	22.77	22.74
22	35.27	35.10	35.10	43.16	43.26	43.22
23	22.39	22.93	22.96	22.52	22.60	22.58
24	126.95	126.25	126.27	125.95	126.05	126.04
25	130.16	130.69	130.71	130.71	130.75	130.73
26	25.24	25.75	25.77	25.77	25.81	25.80
27	17.39	17.62	17.63	17.63	17.69	17.67
28	27.51	27.95	28.06	28.02	28.00	28.09
29	15.73	15.77	15.77	15.73	15.83	15.81
30	16.31	16.39	16.54	17.21	16.43	16.56
1'	104.52	104.84	105.12	105.05	104.91	105.05
2'	82.80	84.24	83.00	83.34	84.33	83.11
3'	77.80	78.07	78.02	78.21	78.12	78.03

Table 2. Continued

C	(20S)-Rg ₃ *	(20S)-Rg ₃ (1)*	2	(20S)-Rg ₃ *	(20S)-Rg ₃ (3)*	4
4'	70.99	70.94	71.37	71.51	70.99	71.41
5'	77.33	77.87	74.66	77.84	77.93	74.58
6'	62.05	62.75	64.42	62.56	62.82	64.44
1"	105.45	106.13	106.00	105.98	106.21	106.05
2"	76.55	76.68	77.05	77.07	76.74	77.05
3"	78.21	78.49	78.37	78.37	78.54	78.32
4"	72.36	71.30	71.59	72.89	71.37	71.64
5"	77.52	75.29	77.97	78.04	75.36	77.97
6"	62.21	64.70	62.63	62.73	64.75	62.67
acetyl		107.96	107.75		170.98	170.73
		20.85	20.78		20.89	20.78

* (20S)-Rg₃: (20S)-ginsenoside Rg₃, (20S)-Rg₃: (20S)-ginsenoside Rg₃,
 (20R)-Rg₃: (20R)-ginsenoside Rg₃, (20R)-Rg₃: (20R)-ginsenoside Rg₃

유래하는 8개의 singlet methyl, 2개의 oxy-methine 및 1개의 이중결합 signal 이 관측되었고, 다른 모든 signal로부터도 4종의 화합물이 모두 ginsenoside Rg₃ 골격을 유지하고 있는 것으로 판명되었다. 또한 1개의 acetyl 기로부터 유래한 carbonyl 및 methyl signal도 관측되었다. 2개의 D-glucopyranose에 acetyl 기가 결합된 위치는 이미 저자등이 분리한 (20S)-ginsenoside Rs₃⁵⁾의 결과와 비교함으로써 결정하였다. 즉, genin인 protopanaxadiol의 C-3의 chemical shift 값이 6"-acetyl 의 경우는 89.14 또는 89.18 ppm 이었고 6'-acetyl 의 경우는 89.33 또는 89.34 ppm으로 차이를 보였으며, 당부에 있어서는 6"-acetyl 의 경우 C-5"의 chemical shift 값이 75.29 또는 75.36 ppm인 반면에 6'-acetyl의 경우는 C-5'의 chemical shift 값이 74.66 또는 74.58 ppm 으로 차이를 보였다(Table 3). C-20의 절대배치는 C-17, C-21, C-22 의 ¹³C-NMR에 있어서의 chemical shift 값이 (20S)-의 경우는 대체적

으로 54, 27, 35 ppm 인데 비해(20R)-의 경우는 50, 22, 43 ppm 으로 확실히 차이가 있으므로(Table 2), 비교하여 결정하였다.

4종의 이성질체가 ¹H-NMR 에 있어서는 상호간에 뚜렷한 차이가 인정되지 않았다. 그러나 ¹³C-NMR 에 있어서는 20번 탄소의 입체 이성질체간에는 주변 탄소인 C-17, C-21 및 C-22 의 chemical shift 값에 있어서 뚜렷한 차이를 나타내었고, acetyl 기의 결합 위치가 다른 이성질체간에 있어서는 당부 signal 에서 미세한 차이가 인정되었다(Table 3). 즉, ginsenoside Rg₃와 비교하였을때에 acetyl 기가 첫번째당의 6번 수산기에 결합한 이성질체는 두번째당의 6번 수산기에 결합한 이성질체에 비하여 6번 탄소의 저자장으로의 이동정도와 4번 탄소의 고자장으로의 이동정도가 작은 반면, 5번 탄소의 고자장으로의 이동정도는 크게 나타났다.

이상과 같이 동정한 ¹H- 및 ¹³C-NMR 데이터를 Table 1 및 Table 2와 같이 정리하였다.

Table 3. Comparison of ¹³C-NMR chemical shifts (ppm) among ginsenoside Rg₃, Rg₃, and its isomers

C	(20S)-Rs ₃ *	(20S)-Rs ₃ * (1)		2		(20S)-Rs ₃ *	(20S)-Rs ₃ * (3)		4	
	(A)	1	1-A**	2	2-A**	(B)	3	3-B**	4	4-B**
6"	62.21	64.70	+2.49			62.73	64.75	+2.02		
5"	77.52	75.29	-2.23			78.04	75.36	-2.68		
4"	72.36	71.30	-1.06			72.89	71.37	-1.52		
6'	62.05			64.42	+2.37	62.56			64.44	+1.88
5'	77.33			74.66	-2.67	77.84			74.58	-3.26
4'	70.99			71.37	+0.38	71.51			71.41	-0.10

* (20S)-Rs₃: (20S)-ginsenoside Rs₃, (20S)-Rs₃: (20S)-ginsenoside Rs₃,

(20R)-Rs₃: (20R)-ginsenoside Rs₃, (20R)-Rs₃: (20R)-ginsenoside Rs₃,

**Differences of chemical shifts between each compounds and (20S)-ginsenoside Rs₃

요 약

인삼의 diol계 사포닌 분획을 초산으로 가수분해한 후 재결정 및 silica gel column chromatography하여 순수한 (20R)- 및 (20S)-ginsenoside Rg₃를 제조하였다. 이어서 각각을 acetic anhydride로 일치환 아세틸화한 후 silica gel column chromatography 하여 (20S)-ginsenoside Rs₁를 비롯한 3종의 이성질체를 제조하였다. 각각의 이성질체의 ¹H- 및 ¹³C-NMR 데이터를 소상히 비교검토하여 acetyl기의 위치와 NMR 자료와의 관련성을 검토하였다.

인 용 문 헌

1. Kitagawa, I., Taniyama, T., Hayashi, T. and Yoshikawa, M. : *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 3353 (1983).
2. Morita, T. : Hiroshima Univ. Doctoral Thesis, p. 13 (1986).
3. Baek, N. -I., Kim, D. S., Lee, Y. H., Park, J. D., Lee, C. B. and Kim, S. I. : *Planta Med.* **62**, 87 (1996).
4. Kim, S. I., Park, J. H., Ryu, J. -H., Park, J. D., Lee, Y. H., Park, J. -H., Kim, T. -H., Kim, J. M. and Baek, N. -I. : *Arch. Pharm. Res.* **19**, 551 (1996).
5. Baek, N. -I., Kim, J. M., Park, J. H., Ryu, J. -H., Kim, D. S., Lee, Y. H., Park, J. D. and Kim, S. I. : *Arch. Pharm. Res.*, to be submitted.
6. Danieli, B., Riva, S., Bertinotti, A., Ragg, E., Scaglioni, L. and Bombardelli, E. : Proceedings of the 6th International Ginseng Symposium, Seoul, Korea, p. 195 (1993).
7. Baek, N. -I., Kim, D. S., Lee, Y. H., Park, J. D., Lee, C. B. and Kim, S. I. : *Arch. Pharm. Res.* **18**, 164 (1995).