

= 단 신 =

인삼 사포닌에서 Ginsenoside-Rg₂와 -Rg₃의 이성질체인 20(R&S)
Prosapogenin들의 역상 고속 액체 크로마토그래피에 의한 분리

정승일 · 김천석[†] · 이용구[†] · 이호섭^{††} · 김일광^{*}

^{*}원광대학교 자연과학대학 화학과

[†]한국인삼연초연구원

^{††}원광대학교 한의과대학 생리학교실

(1998. 5. 21 접수)

Separation of 20(R&S) Prosapogenin Isomers of Ginsenoside-Rg₂
and -Rg₃ from Ginseng Saponins by Reversed-Phase High
Performance Liquid Chromatography

Seung-Il Jeong, Cheon-Suk Kim[†], Yong-Gu Lee[†], Ho-Sup Lee^{††} and Il-Kwang Kim^{*}

^{*}Department of Chemistry Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

[†]Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea

^{††}College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

(Received May 21, 1998)

Abstract: Using a reversed-phase high performance liquid chromatography, the separation of 20(S)-, 20(R)-prosapogenin stereo-isomers of ginsenoside-Rg₂ and of ginsenoside-Rg₃ in ginseng saponins has been carried out with binary solvent system. The optimum conditions for the isomer separation are as following: Nova-Pak[®]C₁₈ (Waters, 3.9×150 mm) column, CH₃CN/CH₃CN (100:8, v/v) binary solvent system and the flow rate was 1.7 mL/min. The stereoisomers were separated with change of the mixture ratio of the solvent system, the solvent elution by gradient program, and then detected at 203 nm of UV detector. The simultaneous separation of mixture that were the Rg₂, Rg₃ isomers was easily performed in nonpolar solvent for Rg₂, polar solvent for Rg₃ at the same optimum conditions.

Key words: ginsenoside, saponin, reversed-phase HPLC

1. 서 론

우리 나라 대표적 특산물 중 인삼은 수 천년 전부터 불로장생의 영약으로 널리 알려져 한방에서는 강장, 강정 혈당강화,¹ 각종 스트레스에 대한 방어작용 등이 알려져 있고, 인삼의 생리 활성화와 관련되어 함유 성분의 화학적 및 생물 활성화에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다.²⁻⁴

인삼에 대한 과학적 연구는 1960년대 후반 본격적으로 시작되어 Brekman 등⁵ Sanada 등⁶ 사포닌 성분을 인삼의 주성분으로 강조한 이후 사포닌을 중

심으로 많은 연구가 이루어지고 있다. 인삼 saponin을 얇은 막 크로마토그래피(TLC)하여 그 Rf 값이 커지는 순서로 ginsenoside Ro, Ra, Rb, Rc, Rd, Re, Rf, Rg, Rh로 명명한 이래,^{7,8} 각종 사포닌의 구조가 밝혀지고 정제 방법이⁹ 확립됨으로서 순수 분리된 개별 사포닌의 약리작용이 인삼의 약효와 연관되어 검토되기 시작하였다. 최근 고려 홍삼에서는 주로 포함되어 있거나 홍삼에만 미량으로 존재하며 인삼제품 제조과정에서 입체 반전을 일으키는 것으로 알려진 ginsenoside-Rg₂, -Rg₃가 혈소판응집억제작용,¹⁰ 암세포 전이억제작용,^{11,12} plasmin활성화작용¹³ 등에 영향을

주는 것으로 보고되었다. 이들의 입체구조는 20(S&R)-prosapogenin으로 확인되었지만 약리 연구는 거의 없는 실정이다. 그 이유는 화학적 물리적 성질이 유사한 daucosterin이 다량 혼재하여 있기 때문에 얇은 막 크로마토그래피나 silica gel판 크로마토그래피 방법으로는 직접 분리가 거의 불가능하여 시료를 확보할 수 없었기 때문인 것으로 사료된다. 한편 김 등은¹⁴⁻¹⁶ 사포닌 분획으로부터 20(R&S)-ginsenoside Rg₃ 혼합물 이성체를 제조한 후 분리 및 구조결정에 대하여 보고를 하였으나, acetyl화 등 복잡한 여러 단계를 거쳤다. 본 연구에서는 지금까지 제시되었던 복잡한 분리 및 정제방법을 간소화하여, 분취용컬럼과 역상컬럼을 이용하는 방법으로 이들 이성체를 분석하였다. 사포닌 중의 미량 성분인 ginsenoside-Rg₂와 ginsenoside-Rg₃ 각각의 입체이성질체 20(S&R)를 고속 액체크로마토그래피(HPLC)에서 이성분 이동상을 사용하는 gradient elution으로 20(S)-와 20(R)-로 분리하였다. 최적 조건하에서 얻어진 좋은 크로마토그램으로부터 각각의 이성질체들을 성공적으로 분리하였고, 유도체화시켜 분리하는 기존의 방법¹³⁻¹⁵으로 Rg₂-ginsenoside-20(S), -20(R)과 Rg₃-ginsenoside-20(S), -20(R)을 표준품으로하여 각각의 피크를 확인하였다.

2. 실험

2.1. 기기장치

본 실험에서 사용한 고속 액체 크로마토그래프(HPLC)는 Waters 510형 펌프와 Waters 484형 UV 검출기, 그리고 Waters 746 integrator를 연결하여 사용했으며, 시료 주입은 Waters U6K injector를 이용했다. HPLC의 역상컬럼은 Nova-Pak[®] C₁₈ (Waters, 3.9×150 mm)을, 분취용컬럼은 J' sphere ODS-H180 JH 08SO4-2520WT(250×20 mm I.D., S-4 μm, 80 Å)을 사용하였다.

2.2. 시약

실험에 사용한 사포닌 표준품은 한국 인삼연초연구원에서 얻거나, 자체 제조하여 분리 결과를 확인하는데 사용하였다. 사용한 물은 1차 증류수를 Milli-RO 60(Millipore Co., U.S.A.)의 초순수장치로 탈이온화시킨 후 0.5 μm 필터로 여과하여 사용하였으며,

HPLC의 용매로 쓰인 acetonitrile은 HPLC용을 구입하여 0.5 μm 필터로 여과하고 기체를 제거한 후에 사용하였다.

2.3. (20R&S)-ginsenoside Rg₂, Rg₃ 표준품의 제조

Kim¹⁴⁻¹⁶ 등과 Kaku¹⁷ 등의 방법에 따라(Fig. 1), 조사포닌 ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc 그리고 Rd의 혼합물(10g)에 50% acetic acid 250 mL를 가하고, 70°C에서 2시간 동안 저어 주면서 가수분해하였다. 반응물을 여과하여 증류수 200 mL로 희석시킨 후 ethyl acetate 70 mL로 3회 추출하였다. 추출액을 감압농축하고 methanol 30 mL에 녹였다. 하루 뒤에 여과하여 감압농축시키고 silica gel판 크로마토그래피(전개액: CHCl₃/MeOH/H₂O=100:30:10)로 분리하였다. 20(R)-prosapogenin은 methanol에 제한적으로 녹고, 20(S)-prosapogenin은 잘 녹는다. 20(R)-prosapogenin은 60% dioxane 수용액에서 재결정하였으며 ([α]_D²⁴= -14.0°), 20(S)-prosapogenin은 90% isopropanol 수용액에서 재결정하였다([α]_D²⁴=+16.5°).

2.4. Gradient elution

20(R&S)-ginsenoside Rg₂, Rg₃의 입체 이성질체를 분리하기 위해 용리액 (A) CH₃CN (100%) 그리고

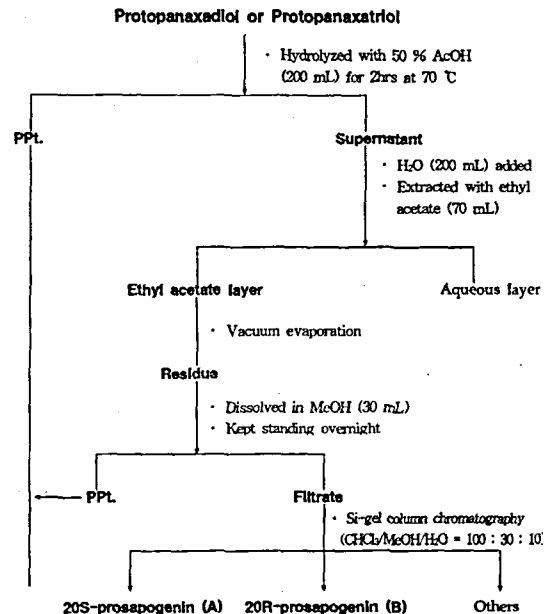


Fig. 1. The processes for preparation of prosapogenin standard.

Table 1. HPLC gradient elution on the separation for each of prosapogenin-Rg₂(20R), (20S) and prosapogenin-Rg₃(20R), (20S)

Time, min	Flow rate (mL/min)	Eluent A	Eluent B
Initial	1.3	25	75
50	1.5	60	40
60	2.0	100	0

* Mobile phase: 100% acetonitrile (A) +8% acetonitrile-water (B)

Table 2. HPLC gradient elution on the separation for mixture of prosapogenin-Rg₂, Rg₃(20R), (20S)

Time, min	Flow rate (mL/min)	Eluent A	Eluent B
Initial	1.5	25	75
30	1.5	40	60
50	1.5	90	10

* Mobile phase: 100% acetonitrile (A) +8% acetonitrile-water (B)

(B) CH₃CN-water(8:92, v/v)를 혼합하여 이성분 이동상으로 하였다. Gradient elution은 분리되는 시료에 따라 다르게 조절되었으며 Table 1, 2에 각각의 내용을 나타내었다. 이동상의 유속은 1.7 mL/min. 이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Ginsenoside-Rg₂에서 20(S)- & 20(R)-prosapogenin의 분리

Ginsenoside-Rg₂의 20(S&R)-prosapogenin의 혼합물 입체이성질체를 분취용 컬럼 J' sphere ODS-H 180 JH 08SO4-2520WT을 이용하여 20(R)-과 20(S)로 분취하였다. 분취된 Rg₂-20(R)과 -20(S)의 분리 거동을 조사하기 위해 Nova-Pak[®] C₁₈의 역상컬럼과 CH₃CN(100%)/CH₃CN(8%)-water 이성분 이동상을 이용하여 Table 1의 gradient elution에 따라 얻은 크로마토그램을 Fig. 2에 보여주었다. Fig. 2에서 A는 Rg₂(S)-prosapogenin, B는 Rg₂(R)-prosapogenin이다. 분취용 컬럼만으로도 Rg₂-20(S)와 Rg₂-20(R) 이성질체가 어느 정도 분리되었지만, Table 1의 이성분 이동상을 이용한 역상컬럼상에서 이들 이성질체가 양호하게 분리되는 결과를 얻었다.

3.2. Ginsenoside-Rg₃에서 20(S)- & 20(R)-prosapogenin의 분리

Ginsenoside-Rg₃의 20(S&R)-prosapogenin의 혼합물 입체이성질체를 분취용 컬럼 J' sphere[®]으로 분취한 후 각각의 입체이성질체 분리거동을 조사하기 위해 Nova-Pak[®] C₁₈의 역상컬럼과 이성분 CH₃CN(100%)/CH₃CN(8%)-water 이성분 이동상을 이용하여 Table 1의 gradient elution에 따라 얻은 크로마토그램을 Fig. 3에 보여주었다. Fig. 3에서 A는 Rg₃(R)-prosapogenin, B는 Rg₃(S)-prosapogenin이다. 이 결과 역시 분취용컬럼만으로도 Rg₃-20(S)와 Rg₃-20(R) 이성질체를 분리할 수 있음을 보여 주었다. Table 1의 이성분 이동상을 이용한 역상컬럼상에서 Rg₂-20(S), Rg₂-

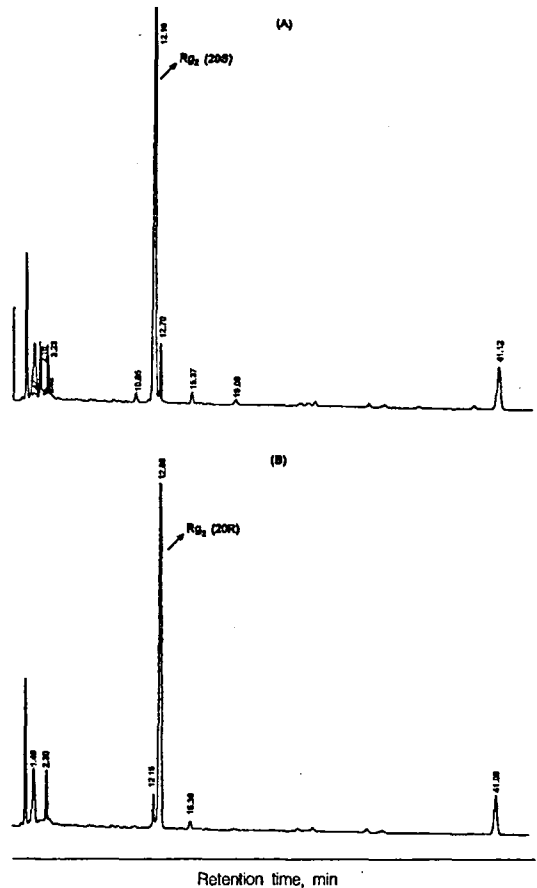
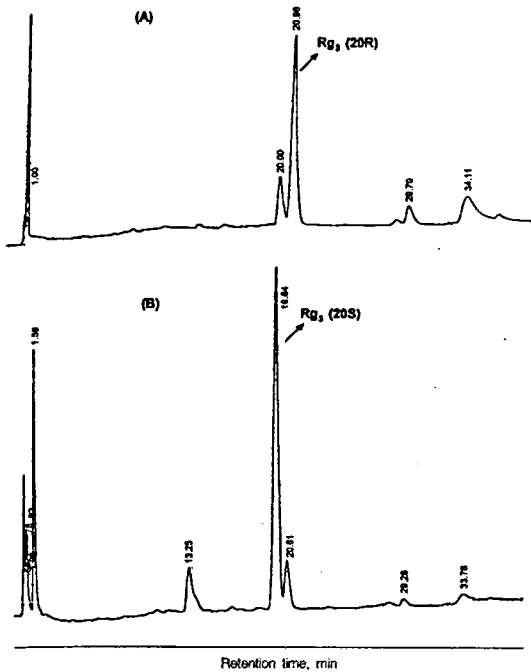


Fig. 2. HPLC chromatogram of a ginsenoside-Rg₂. A: Ginsenoside-Rg₂(20S), B: Ginsenoside-Rg₂(20R). Conditions: Nova-Pak[®] C₁₈(Waters, 3.9×150 mm), mobile phase: 100% CH₃CN/8% CH₃CN-water, detector: UV at 203 nm.



- (1973).
7. S. Shibata, *Proc. 1st Int. Ginseng Symp.*, 69 (1974).
 8. O. Tanaka, *Proc. 2nd Int. Ginseng Symp.*, 145 (1978).
 9. M. O. Kim, K. J. Choi, J. D. Park, J. J. Wee, S. L. Koh, S. J. Kim and K. B. Rho, 人蔘研究報告書, 韓國人蔘煙草研究院, 145 (1986).
 10. W. Tang and G. Eisenbrand, "Chines Drugs of Plant Origin", p. 891, Springer-verlag, New York, 1992.
 11. H. Hasegawa, J. H. Sung, S. Matsumiya, M. Uchiyama, Y. Inouye, R. Kasai and K. Yamasaki, *Plants Med.*, **61**, 409 (1995).
 12. H. Oura, S. Hiai and K. Nakashima, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 453 (1971).
 13. W. I. Hwang, *Kor. J. Biochem.*, **8**, 1 (1976).
 14. S. I. Kim, N. I. Baek, D. S. Kim, Y. H. Lee, K. S. Kang and J. D. Park, *Yakkhak Hoeji*, **35**(5), 423 (1991).
 15. N. I. Baek, D. S. Kim, Y. H. Lee, J. D. Park, S. Y. Jeong, C. B. Lee and S. I. Kim, *Korean J. Ginseng Sci.*, **19**(1), 45 (1995).
 16. D. S. Kim, N. I. Baek, J. D. Park, Y. H. Lee, S. Y. Jeong, C. B. Lee and S. I. Kim, *Yakkhak Hoeji*, **39**(1), 85 (1995).
 17. T. Kaku and Y. Kawashima, *Arzneim. Forsch./Drug. Res.*, **30**, 936-934 (1980).