

황기뿌리에서 분리한 Astragaloside I, II 및 Isoastragaloside I의 HMBC와 1D-TOCSY data를 포함한 nmr assignments

김진숙,*¹⁾ 박진서,¹⁾ 김정숙,²⁾ 김종문¹⁾

한국한의학연구원, 검사사업팀,¹⁾ 신약개발팀²⁾

NMR assignments including HMBC and 1D-TOCSY data of Astragaloside I, II and Isoastragaloside I from the Roots of *Astragalus membranaceus*

Jin Sook Kim,*¹⁾ Jin Seo Park,¹⁾ Chungsook Kim²⁾ and Jong Moon Kim¹⁾

Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea

Abstract – Three compounds were isolated from the roots of *Astragalus membranaceus* (Leguminosae). On the basis of spectroscopic evidences, the structures were characterized as 3-O-β-D-xylopyranosyl-(2',3'-O-diacetyl)-6-O-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,25-tetrahydroxy-20(R),24(S)-epoxy-cycloartane (Astragaloside I), 3-O-β-D-xylopyranosyl-(2'-O-acetyl)-6-O-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,25-tetrahydroxy-20(R),24(S)-epoxy-cycloartane (Astragaloside II), 3-O-β-D-xylopyranosyl-(2',4'-O-diacetyl)-6-O-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,25-tetrahydroxy-20(R),24(S)-epoxy-cycloartane (Isoastragaloside I). Full data of NMR including HMBC and 1D-TOCSY experiment of these compounds were reported for the first time.

Key words – *Astragalus membranaceus*; Leguminosae; astragaloside I, astragaloside II, isoastragaloside I, HMBC; selective 1D-TOCSY.

황기는 콩과(Leguminosae)에 속하며 우리나라에서는 옛부터 황기뿌리를 인삼 다음의 보기약으로 민간에서 많이 사용되고 있다. 또한 한방에서도 십전대보탕, 팔보회춘탕, 청서익기탕 등 수백가지 처방에 사용된다. 저자 등은 비극성 성분연구의 일환으로 몇 종의 화합물을 분리, 보고한 바 있다^{1,2)}. 이번에는 극성 성분 연구 일환으로 EtOAc분획으로부터 astragaloside I, II 및 isoastragaloside I을 분리하였다. 이들 화합물들은 Kitagawa 등³⁾에 의해서 *n*-BuOH분획에서 이미 분리, 보고되었으나, 특히 HMBC와 1D-TOCSY experiment를 포함한 full nmr data는 처음이므로 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 – 강원도 정선군 신동읍에서 조광호에 의해 재배된 황기뿌리를 직구입하여 감점 후 사용하였다(한

*교신저자 : Fax 02-3442-0220

국한의학연구원, 표본번호 96-0-0001).

기기 및 시약 – Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(9385, Merck, Germany)을, Rp₁₈ silica gel preparative TLC(1.05717, Merck, Germany)와 normal silica gel preparative TLC(15423, Merck, Germany) 및 1급 유기용매를 사용하였다.

방법 – 황기뿌리 80% EtOH추출물의 EtOAc분획의 일부(40 g)를 silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH:H₂O=8:5:2)하여 4개의 fraction으로 전분리하였다(A1→4). fraction A1(20 g)을 다시 CHCl₃:MeOH(8.5:1.5), EtOAc:Me₂CO:H₂O(8.3:1.2; 10:6:2), EtOAc:EtOH:H₂O(10:0.8:1.8; 10:1.2:1.8) 등의 조건으로 여러번 silica gel column chromatography한 후, 마지막으로 Rp₁₈ silica gel preparative TLC(MeOH:H₂O=8:2)로 astragaloside I(3.5 mg, white pulver)를 분리하였고, silica gel preparative TLC(EtOAc:MeOH:H₂O=8:1:2)로 astragaloside II(18.8 mg, yellow pulver), isoastragaloside I(9.6 mg, yellow pul-

ver)를 각각 분리하였다.

Astragaloside I(A) – $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): 1.20-1.30, 1.40-1.60(each m, H1a, 1b), 1.85-1.95, 2.20-2.15(each m, H-2a, 2b), 3.38-3.42(dd, 4.2, 11.8 Hz, H-3), 1.85-1.95(d, 8.9, H-5), 3.75-3.82(ddd, 3.3, 8.8, 8.8Hz, H-6), 2.30-2.40, 1.80-1.90(each m, H-7a, 7b), 1.90-2.00(m, H-8), 1.55-1.60, 1.75-1.85 (each m, H-11a, 11b), 1.50-1.70(m, H-12), 2.30-2.40, 1.80-1.90(each m, H15a, 15b), 4.98-5.10(ddd, 6.6, 7.9, 7.9Hz, H-16), 2.53-2.54(d, 7.7Hz, H-17), 1.43(s, H-18), 0.20-0.23(d, 4.2Hz, H-19a), 0.56-0.58 (d, 4.2Hz, H-19b), 1.20-1.40(s, H-21), 3.10-3.20 (q, 10.8Hz, H-22a), 1.60-1.75(m, H-22b), 2.30-2.50, 2.10-2.20(each m, H-23a, 23b), 3.85-3.90(dd, 5.4, 8.8Hz, H-24), 1.20-1.40(s, H-26), 1.59(s, H-27), 0.95 (s, H-28), 1.79(s, H-29), 1.20-1.40(s, H-30), 4.80-4.83(d, 7.8Hz, H1'), 5.42-5.47(dd, 7.8, 9.8Hz, H₂'), 5.62-5.70(t, 9.7Hz, H-3'), 4.15-4.26(m, H-4'), 3.60-3.70(t, 11.0Hz, H-5'a), 4.28-4.32(dd, 5.4, 11.0Hz, H-5'b), 2.05(s, 2'-COCH₃), 1.96(s, 3'-COCH₃), 4.90-4.95 (d, 7.8Hz, H1''), 4.00-4.07(dd, 7.4, 9.8Hz, H-2''), 4.15-4.26(m, H-3''), 4.15-4.26(m, H-4''), 3.85-3.95(m, H5''), 4.46-4.50(dd, 2.0, 11.7Hz, H6''a), 4.33-4.40 (dd, 5.4, 11.4Hz, H-6''b), 5.75, 6.00, 6.45, 6.80, 7.00, 7.45(7× OH, disappear after D₂O addition); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 30.02(C-1) 27.76(C-2), 87.22 (C-3), 40.21(C-4), 50.46(C-5), 77.21(C-6), 32.84(C-7), 43.95(C-8), 20.90(C-9), 26.95(C-10), 26.19(C-11), 31.40(C-12), 43.08(C-13), 44.24(C-14), 44.36(C-15), 71.39(C-16), 56.28(C-17), 19.20(C-18), 27.17(C-19), 85.26 (C-20), 26.57(C-21), 32.94(C-22), 24.47(C-23), 79.73(C-24), 69.26 (C-25), 26.32(C-26), 26.17(C-27), 17.91(C-28), 26.32(C-29), 14.53(C-30), 102.03(C-1'), 71.13(C-2'), 74.86(C-3'), 66.81(C-4'), 64.71(C-5'), 167.85 (2'-COCH₃), 18.81(2',3'-COCH₃), 168.49(3'-COCH₃), 103.22(C-1''), 73.61(C-2''), 77.31(C-3''), 69.95(C-4''), 76.13(C-5''), 61.15(C-6''); positive FAB-MS (matrix: m-NBA); 891[M+Na]⁺.

All signals were assigned on the basis of 1D, 2D-nmr data including HMBC and 1D-TOCSY experiments.

Astragaloside II(B) – $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 1.50-1.60, 1.18-1.28(each m, H-1a, 1b), 2.25-2.35, 1.87-2.00(each m, H-2a, 2b), 3.40-3.43(dd, 4.7, 11.4

Hz, H-3), 1.85-1.95(m, H-5), 3.75-3.80(ddd, 3.8, 9.5, 9.5Hz, H-6), 2.30-2.50, 1.54-1.70, (each m, H-7a, 7b), 1.90-2.00(m, H-8), 1.75-1.90, 1.20-1.30(each m, H-11a, 11b), 1.54-1.70(m, H-12), 2.30-2.50, 1.75-1.85 (each m, H15a, 15b), 5.00-5.10(overlapped with H₂O peak, H-16), 2.52-2.53(d, 7.7Hz, H-17), 1.40 (s, H-18), 0.18-0.20(d, 4.4Hz, H-19a), 0.50-0.60 (d, 4.4Hz, H-19b), 1.20-1.40(s, H-21), 3.10-3.17, 1.54-1.70(each m, H-22a, 22b), 2.30-2.40, 2.00-2.05(each m, H-23a, 23b), 3.87-3.90(dd, 5.5, 9.0Hz, H-24), 1.20-1.40(s, H-26), 1.59(s, H-27), 0.94(s, H-28), 1.83 (s, H-29), 1.20-1.40(s, H-30), 4.80-4.82(d, 8.0Hz, H1'), 5.56-5.60(dd, 8.2, 9.2Hz, H2'), 4.15-4.18(t, 9.2 Hz, H-3'), 4.15-4.25(m, H-4'), 3.64-3.69(t, 11.0Hz, H-5'a), 4.30-4.33(dd, 5.3, 11.0Hz, H-5'b), 2.04(s, CO CH₃), 4.92-4.95(d, 7.8Hz, H1''), 4.05-4.10(dd, 5.3, 11.0Hz, H-2''), 4.15-4.25(m, H-3''), 4.15-4.25(m, H-4''), 3.90-3.95(m, H5''), 4.48-4.50(dd, 1.5, 10.9Hz, H6''a), 4.30-4.33(m, H-6''b), 5.79, 6.15, 6.52, 6.85, 7.10, 7.43, 7.50(8×OH, disappear after D₂O addition); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 31.73(C-1) 29.33 (C-2), 88.58(C-3), 41.95(C-4), 52.19(C-5), 78.89 (C-6), 34.49(C-7), 45.52(C-8), 22.61 (C-9), 28.68 (C-10), 25.80(C-11), 33.05(C-12), 44.73(C-13), 45.90 (C-14), 45.97(C-15), 73.06(C-16), 57.91(C-17), 20.85 (C-18), 28.62(C-19), 86.93(C-20), 28.25(C-21), 34.58 (C-22), 26.16(C-23), 81.37(C-24), 70.95(C-25), 26.75 (C-26), 27.88(C-27), 19.55(C-28), 28.00(C-29), 16.25 (C-30), 104.43(C-1'), 75.32(C-2'), 75.95(C-3'), 71.02 (C-4'), 66.80(C-5'), 169.99(COCH₃), 20.92 (COCH₃), 104.93(C-1''), 75.32(C-2''), 78.84(C-3''), 71.57(C-4''), 77.85(C-5''), 62.78(C-6''); positive FAB-MS(matrix: m-NBA): 849[M+Na]⁺(58%), 827[M+H]⁺; IR(KBr): 3400, 1040(OH), 2900, 1730, 1250, 1050(CO), 1238 (COCH₃).

Isoastragaloside I(C) – $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 1.50-1.70, 1.10-1.25 (each m, H-1a, 1b), 2.10-2.13, 1.80-1.90(each m, H-2a, 2b), 3.30-3.40(dd, 4.4, 11.6, H-3), 1.80-2.00(m, H-5), 3.70-3.80(m, H-6), 2.20-2.40, 1.80-1.90(each m, H-7a, 7b), 1.85-2.00 (m, H-8), 1.85-1.90, 1.20-1.40(each m, H-11a, 11b), 1.50-1.70(m, H-12), 2.20-2.40, 1.75-1.90(each m, H15a, 15b), 4.90-5.30(overlapped with H₂O peak, H-16), 2.50-2.60(d, 7.8Hz, H-17), 1.40-1.50(s, H-

18), 0.15-0.25(d, 4.4Hz, H-19a), 0.50-0.65(d, 4.4Hz, H-19b), 1.25-1.35(s, H-21), 3.10-3.17, 1.60-1.70 (each m, H-22a, 22b), 2.20-2.40, 2.00-2.10(each m, H-23a, 23b), 3.84-3.90(dd, 5.4, 8.9Hz, H-24), 1.25-1.35(s, H-26), 1.59(s, H-27), 0.85-1.00(s, H-28), 1.80-1.90 (s, H-29), 1.30-1.40(s, H-30), 4.80-4.83(d, 7.8Hz, H1'), 5.50-5.65(dd, 7.8, 9.5Hz, H2'), 4.25-4.35(m, H-3'), 5.30-5.45(ddd, 5.4, 9.5, 9.7Hz, H-4'), 4.50-4.60(dd, 5.4, 11.0Hz, H-5'a), 3.50-3.60 (t, 11.0Hz, H-5'b), 1.90-2.00(s, COCH₃), 2.00-2.10 (s, COCH₃), 4.90-4.95(d, 7.7Hz, H1''), 4.00-4.10 (m, H-2''), 4.18-4.25 (m, H-3''), 4.18-4.25(m, H-4''), 3.90-4.00(m, H5''), 4.50-4.60(dd, 1.5, 11.3Hz, H6'a), 4.25-4.40(m, H-6'b), 5.79, 6.15, 6.52, 6.85, 7.10, 7.43, 7.50(8 × OH, disappear after D₂O addition); ¹³C-NMR(125 MHz, C₅D₅N): δ 32.00(C-1) 29.84(C-2), 89.06(C-3), 42.25(C-4), 52.47(C-5), 79.21(C-6), 34.91 (C-7), 45.90 (C-8), 20.80(C-9), 28.92(C-10), 26.13 (C-11), 33.30 (C-12), 42.25(C-13), 45.05(C-14), 46.22(C-15), 73.39 (C-16), 58.25(C-17), 21.10(C-18), 29.04(C-19), 87.26 (C-20), 28.56(C-21), 34.90(C-22), 26.49(C-23), 81.69 (C-24), 71.28(C-25), 27.09(C-26), 28.22(C-27), 19.89 (C-28), 28.32(C-29), 16.52(C-30), 104.21(C-1'), 75.64 (C-2'), 72.62(C-3'), 72.78(C-4'), 63.09(C-5'), 169.96 (COCH₃), 20.76 (COCH₃), 170.42(COCH₃), 21.17 (COCH₃), 105.25(C-1''), 75.36(C-2''), 79.32 (C-3''),

71.90(C-4'), 78.20(C-5'), 63.08(C-6'); positive FAB-MS(matrix : m-NBA): 869[M+H]⁺, 891[M+Na]⁺; HMBC(125MHz, C₅D₅N): Table 1, Figure참조.

All signals were assigned on the basis of ¹H-¹H cosy, HMQC, DEPT, and the correlation of HMBC.

결 과

세 화합물의 NMR spectrum에서 각각 7개의 tertiary methyl group과 두개의 anomeric 수소(탄소) 및 1개의 cyclopropane-ring methylene group들의 peak 들이 나타난 것을 통해서 cycloartane glycoside 계 통임을 추측할 수 있었다. 그리고 acetoxy group은 화합물 A와 C가 2개인 반면에, 화합물 B는 1개임을 알 수 있었다. 특히 화합물 A는 HMBC(Table 1, Figure)와 selective 1D-TOCSY spectrum을 포함한 1D-, 2D-NMR data를 통하여 glucose과 xylose분자의 분석 과 이들의 aglycone에서의 결합위치가 확인되었다. 즉 δ 3.50 ppm-δ 4.70 ppm 사이에는 두개의 당분자 peak 들이 중첩이 되어있으나 selective 1D-TOCSY experiment로 δ 4.80-4.83 ppm에 나타난 peak(d, J=7.8Hz) 가 xylose분자의 anomeric 수소임을 확인되고, 이어서 H2'-H5'와 H2''-H6''의 정확한 chemical shift 분석이 가능하였다. HMBC data(Table 1, Figure)를 통하여, aglycone 3번 수소가 xylose분자의 anomeric 탄소와 correlation되었으며, 또한 1번 수소(δ 4.80-4.83)와 ag-

Table 1. ¹H-¹³C Long Range Correlations of Compound A, B and C from HMBC Spectra(C₅D₅N, 125MHz)

Compound A				Compound B			Compound C			
H	C	H	C	H	C	H C	H	C	H	C
3	1'	3'	2', 3'Ac, 4'	3	30, 1'	1'' 6	5	6	5'	4'
5	4, 6	3'Ac	3'Ac	5	19, 30		7	6	1''	6
15	16	4'	3'	16OH	15, 16		15	14, 16	3''	2'', 4''
16	13, 14	5'	3', 4'	17	13, 16, 18, 22		16	13, 15		
16 OH	14	1''	6, 3''	18	13, 14, 17		16OH	15		
17	12, 13, 16, 20, 22	2''	1''	21	20, 22		17	12, 14, 16, 18, 20, 22		
18	12, 13, 17	4''	3''	22	20		18	12, 13, 14, 17, 27		
19	5			24	25		21	13, 17, 20, 22		
21	17, 20, 22			25OH	24, 25, 26		23	21		
24	25			26	24, 25		25OH	24, 25, 26, 27		
26	24, 25			27	24, 25, 26		26	24, 25		
27	24, 25			29	3, 4, 30		27	24, 25, 26		
28	13, 14			30	3, 4		28	14, 15		
29	3, 4, 5			1'	3		29	3, 4, 5, 30		
30	3, 4, 5			2'	1', 3'		30	3, 4, 5		
1'	3			2'Ac	2'Ac		1'	3		
2'	1', 2'Ac, 3'			3'	2', 4'		2'Ac	2'Ac		
2'Ac	2'Ac			5'	1', 3', 4'		4'Ac	4'Ac		

Ac means COCH₃

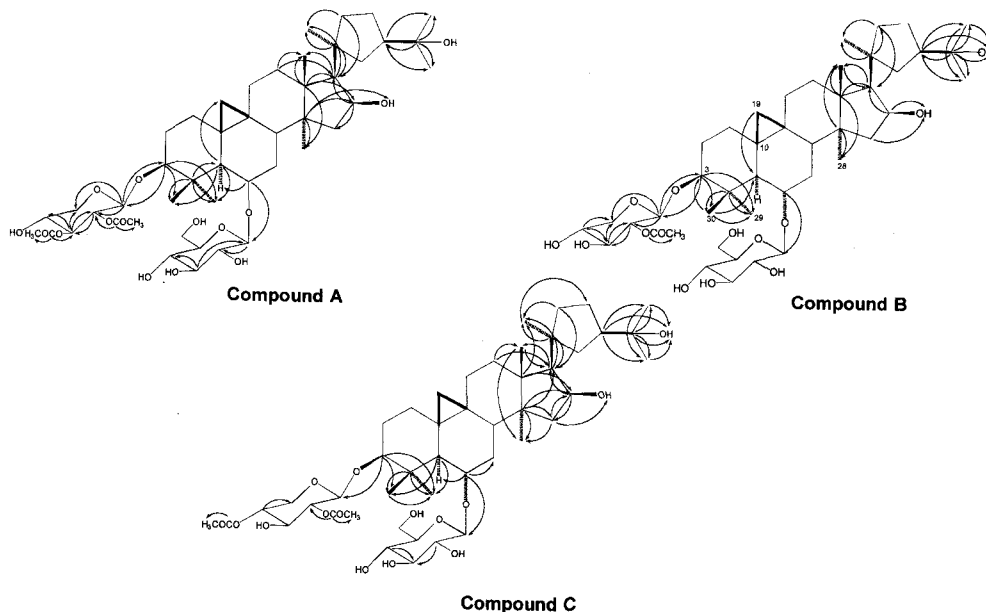


Fig. 1. Structures and Correlations of HMBC of Compound A, B, C.

lycone 3번 수소와 5번 탄소가 correlation됨이 확인되었고, glucose의 anomeric 수소(δ 4.90-4.95)가 aglycone의 6번 탄소와 correlation됨도 확인되었다(Table 1, Figure). 이로써 aglycone 3번에 xylose분자가, 6번에 glucose분자가 결합된 화합물임이 확인되었고, 3번과 6번 수소의 configuration도 coupling constant로 확인할 수 있었다. 즉 axial위치의 3번 수소(α)가 2번의 axial위치의 수소(β)와 coupling하여 11.8Hz의 coupling constant값이 측정되었으며, 2번의 equatorial 위치의 수소와 coupling하여 4.2Hz의 coupling constant값이 나온 것을 통하여 3번 수소는 axial(α)위치에, xylose분자는 equatorial(β)위치에 결합된 것임을 알 수 있었다. 6번의 수소도 5번 수소와 7번 수소간의 coupling constant값(3.3, 8.8, 8.8Hz)를 통하여 glucose 분자가 equatorial(α)위치에 결합된 것임을 알 수 있었다. 또한 positive FAS MS spectrum에서 m/z 891에서 분자량을 나타내는 $[M+Na]^+$ 를 확인할 수 있었다. 화합물 B, C도 1D-NMR spectrum과 HMBC, HMQC 등을 포함한 2D-NMR, IR 및 positive FAS MS spectrum들을 종합분석하였다. 이와같이 세 화합물을 모든 기기 data를 비교 분석한 결과 astragaloside I, II 및 isoastragaloside I의 문헌과 일치되었으며¹⁾, 이 화합물들의 1D-TOCSY 및 HMBC experiment data를 포함한 NMR full data는 처음으로 보고된다.

고 찰

황기의 80% EtOH추출물의 EtOAc분획에서 3-O- β -D-xylopyranosyl-(2',3'-O-diacetyl)-6-O- β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydroxy-20(R),24(S)-epoxy-cycloartane(astragaloside I), 3-O- β -D-xylopyranosyl-(2'-O-acetyl)-6-O- β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydroxy-20(R),24(S)-epoxy-cycloartane(astragaloside II), 3-O- β -D-xylopyranosyl-(2',4'-O-diacetyl)-6-O- β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydroxy-20(R),24(S)-epoxy-cycloartane(isoastragaloside I) 3종의 화합물들을 분리하였다. 1D-TOC SY 및 HMBC experiment data를 포함한 NMR full data는 처음으로 보고된다.

사 사

본 연구는 보건의료기술연구개발사업 공모과제(HMP-97-M-6-0062, HMP-98-D-4-0043)에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. 김진숙, 김연태, 김정숙(1996) 황기(*Astragalus membranaceus* BUNGE)뿌리의 성분연구 (I), 생약학회지,

- 27(4), 336-341.
2. 김진숙, 김정숙(1996) 황기(*Astragalus membranaceus* BUNGE)뿌리의 성분연구(II), 생약학회지, 28(2), 75-79.
 3. Kitagawa, I., Wang, H.K., Saito, M., Tagagi, A. and Yoshikawa, M.(1983) Saponin and sapogenol. XX XV¹⁾ Chemical constituents of Astragali Ra-

dix, the roots of *Astragalus membranaceus* bunge(2). astragaloside I, II and IV, acetylastragaloside I and isoastragaloside I and II. *Chem. Pharm. Bull.*, 31(2): 698-708.

(1999년 12월 16일 접수)