

Ginsenoside Rg₁의 NMR 데이터 동정

이대영 · 조진경 · 이민경 · 이재웅* · 박희정 · 이윤형* · 양덕춘 · 백남인#

경희대학교 생명공학원 및 한방재료가공학과, *경희대학교 원예생명공학과
(2008년 9월 15일 접수; 2008년 12월 9일 수리)

Identification of NMR Data for ginsenoside Rg₁

Dae-Young Lee, Jin-Gyeong Cho, Min-Kyung Lee, Jae-Woong Lee*, Hee-Jeong Park,
Youn-Hyung Lee*, Deok-Chun Yang and Nam-In Baek#

Graduate School of Biotechnology and Department of Oriental Medicinal Materials & Processing,
Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

*Department of Horticultural Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

(Received September 15, 2008; Accepted December 9, 2008)

Abstract : The fresh ginseng roots were extracted in aqueous methanol (MeOH), and the obtained extracts were partitioned using ethyl acetate (EtOA), *n*-butanol (*n*-BuOH), and water, successively. The repeated silica gel column chromatography for *n*-BuOH fraction afforded a purified ginsenoside Rg₁. The physico-chemical, spectroscopic and chromatographic data of ginsenoside Rg₁, such as crystallization characteristics, melting point, specific rotation, infrared spectrometry (IR) data, fast atom bombardment/mass spectrometry (FAB/MS) data, nuclear magnetic resonance (NMR) data, retention factor (Rf) in thin layer chromatography (TLC) experiment, and retention time (r.t.) in HPLC analysis, were measured and compared with those reported in literatures. Especially, the previous literatures reported different data for ginsenoside Rg₁ in the ¹H- and ¹³C-NMR experiments. This paper gives the exactly assigned NMR data through 2D-NMR experiments, such as ¹H-¹H correlation spectroscopy (COSY), hetero nuclear single quantum correlation (HSQC), and hetero nuclear multiple bond connectivity (HMBC).

Key words : ginsenoside Rg₁, NMR, HMBC, melting point, specific rotation, FAB/MS, IR, TLC, HPLC

서 론

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 이름에서 가리키듯이 만병을 치료하는 효능이 있는 것으로 알려져 왔으며, 이를 입증하기 위하여 인삼의 약리효능에 관한 많은 연구결과가 보고되고 있다. 인삼의 여러 성분 중에서 이러한 약리활성을 나타내는 주요한 물질이 무엇인가에 대하여 관심이 집중되었고, 그 중에서 인삼의 주요성분으로 알려진 사포닌이 약리활성을 나타내는 가장 중요한 화합물 중의 하나로 인식 되고 있다.

사포닌은 배당체의 하나로 그 수용액을 저으면 비누(Soap)처럼 지속성 거품이 생긴다는 데에서 이름이 유래하였다. 따라서 비누처럼 비극성 부분과 극성 부분을 동일 분자 내에

가지고 있어야 한다. 비극성 부분인 aglycone은 triterpenoid나 steroid처럼 탄소의 개수가 28개에서 30개 정도는 되어야 하며, 극성 부분은 당이 담당하게 되는데 보통 2개 이상은 되어야 한다. 인삼 사포닌인 ginsenoside는 대부분은 dammarane 계열의 triterpenoid인 protopanaxadiol(PPD)과 protopanaxatriol(PPT)이 aglycone이며, ginsenoside Ro만이 oleanolic acid이다. 현재까지 *Panax ginseng*에서는 70여종 이상의 사포닌이 분리 보고되었다. 하지만 문헌에 보고된 사포닌에 대한 물리화학적 data가 서로 상이하게 보고되는 경우가 많이 있다. 본 논문에서는 ginsenoside Rg₁에 대하여 표준화한 방법으로 측정하여 데이터를 얻었고, 특히 nuclear magnetic resonance (NMR)의 경우에는 2D NMR 실험을 통하여 정확하게 각 signal을 동정하고자 하였다.

인삼의 PPT계열 사포닌 중에서 가장 다량으로 함유되어 있는 사포닌인 ginsenoside Rg₁은 aglycone은 protopanaxatriol

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-201-2661; (팩스) 031-201-2157
(E-mail) nibaek@khu.ac.kr

이며 6번과 20번 탄소의 수산기에 D-glucopyranose가 모두 β -결합하고 있는 bisdesmoside이다. 문헌¹⁻⁶⁾을 보면 ginsenoside Rg₁에 대한 NMR data에서 methyl기를 포함하여 수산기가 결합한 탄소 및 olefine 탄소 signal이 서로 다르게 동정되어 있다. 2D NMR 특히 hetero nuclear single quantum correlation(HSQC)와 hetero nuclear multiple bond connectivity(HMBC)를 이용하여 각 signal들을 정확하게 동정하였다. 또한 녹는점, 비선광도, infrared spectrometry(IR) 및 mass spectrometry(MS) data에 대해서도 측정방법을 표준화하여 측정하였으며, 측정값을 문헌^{1,6-9)} 값과 비교 고찰하였다. 또한 ginsenoside Rg₁의 순상 및 역상 thin layer chromatography(TLC) 실험에서의 retention factor(Rf) 값과, octadecyl silica gel(ODS) 및 carbohydrate column을 사용한 high performance liquid chromatography(HPLC) 실험에서의 머무름시간(retention time, rt.)도 표준화한 값을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 인삼시료

충남 금산 인삼시장에서 2007년 10월에 6년근 수삼을 구입하여 사용하였다.

2. 시약, 기기 및 측정방법

Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. TLC는 Kieselgel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254S}를 사용하였는데, 전자의 경우는 전개 용매로 CHCl₃-MeOH-H₂O(65:35:10)을 사용하였고, 후자의 경우는 MeOH-H₂O(3:1)을 사용하였다. TLC 상의 물질 검출에는 UV lamp(Spectroline, Model ENF-240 C/F, Spectronics Corporation, New York, USA)로 보거나, 10% aq. H₂SO₄를 분무한 후 가열하여 발색양상을 조사하였다. HPLC 분석은 Shimadzu LC-20A(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였으며, 검출기는 evaporative light scattering detector(ELSD, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였는데, 50°C, 30 psi에서 측정하였다. HPLC 분석용 column은 Carbohydrate ES(5 μ m, 250 \times 4.6 mm, Grace, Deerfield, USA)와 Dscouvert C18(5 μ m, 250 \times 4.6 mm, Atlantis, Massachusetts, USA)을 각각 사용하였다. 용출용매는 전자 column의 경우는 A 용매(acetonitrile-H₂O-isopropanol=80:5:15)와 B 용매(acetonitrile-H₂O-isopropanol=60:25:15)를 조제한 후 Fig. 1-A와 같이 stepwise-gradient 법으로 0.8 ml/min의 유속으로 용출하였으며, 후자 column의 경우에는 H₂O와 acetonitrile을 사용하여

Fig. 1-B와 같이 stepwise-gradient 법으로 1.5 ml/min의 유속으로 용출하였다.

NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400(400 MHz, Varian, California, USA)으로 측정하였다. Ginsenoside Rg₁ 50.0 mg(0.0625 mol)을 0.75 ml(0.083 M)의 pyridine-d₅에 녹인 후, 지름 5 m/m의 NMR 측정용 tube(Norell, Landisville, USA)로 40°C에서 측정하였다. Tetramethylsilane(TMS)를 표준 물질로 사용하여 0 ppm으로 맞추었다. IR 스펙트럼은 Perkin model 599B(Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)로 측정하였는데, 시료 10 mg을 MeOH 1 ml에 녹인 후, 용액 한 방울을 CaF₂ 염판(Spectral systems, New York, USA)에 떨어뜨려 도포한 후 상온에서 용매를 날린 다음 다섯 방울을 동일한 방법으로 처리한 후 측정하거나, 시료 4 mg을 KBr 100 mg과 혼합한 후 pellet 제조기(PIKE, Wisconsin, USA)를 사용하여 만들어진 pellet을 이용하여 측정하였다. Fast atom bombardment/mass spectrometry(FAB/MS)는 JMS-700(JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였으며, matrix는 glycerol을 사용하였다. 녹는점은 Stanford Research System 용점측정기(SRS, Sunnyvale, USA)를 사용하여 측정하였다. 비선광도는 Polarimeter P-1020(JASCO, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다. 시료 50 mg을 MeOH 10 ml에 녹인 후 부피 10 ml, 길이 1 dm의 cell을 사용하여 측정하였다.

3. Ginsenoside Rg₁의 분리

6년근 수삼 20 kg(생체중)을 세절한 후 90% MeOH 용액(50 L)에 24시간 담가서 실온에서 추출하였다. 추출물을 여과지로 여과하고, 남은 것을 80% MeOH 용액(50 L)으로 2회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 45°C에서 감압 농축하여 농축물 2.2 kg을 얻었다. 얻어진 농축물을 ethyl acetate(EtOAc, 3 L \times 3)/H₂O(3 L)로 분배 추출하였으며, EtOAc층을 제하고 남은 H₂O층을 *n*-butanol(*n*-BuOH, 2.8 L \times 3)로 추출하였다. 각층을 감압 농축하여 EtOAc(25 g), *n*-BuOH(162 g) 및 H₂O 분획물을 얻었다.

n-BuOH 분획물 160 g에 대하여 silica gel column chromatography(c.c.) (ϕ 10 \times 24cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=10:3:1 \rightarrow 8:3:1 \rightarrow 6:4:1)를 실시하여, 24개의 분획물(PGB1~PGB24)을 얻었다. 그 중, PGB8 분획(2.88 g, Ve/Vt=0.30~0.34; Ve 해당분획 용출용매의 부피; Vt 용출에 사용한 전체 용출용매의 부피)에 대하여 silica gel c.c.(ϕ 4 \times 15cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=8:3:1 \rightarrow 6:4:1)를 실시하여 17개의 분획물(PGB8-1~PGB8-17)과 함께 ginsenoside Rg₁[PGB8-10, Ve/Vt=0.59~0.65, TLC R_f=0.55(RP-18 F_{254S}, MeOH-H₂O=3:1), R_f=0.75(Kieselgel 60 F₂₅₄, CHCl₃-MeOH-H₂O=65:35:10),

467 mg]을 분리하였다. Ginsenoside Rg₁의 물리화학적 및 분광학적 데이터는 Table 1, Table 2 및 Table 3과 같다.

결과 및 고찰

6년근 수삼을 MeOH 수용액으로 추출, 농축하여 추출물을 얻었으며, 얻어진 MeOH 추출물에 대하여 H₂O와 EtOAc로 분획하여 EtOAc 층으로 전이한 지질을 포함한 비극성 물질을 제거하였다. 남은 H₂O 층은 다시 *n*-BuOH로 추출하여 조사포닌 분획을 얻었다. 조사포닌 분획인 *n*-BuOH 추출물에 대하여 순상인 silica gel로 column chromatography를 2회 반복하여 ginsenoside Rg₁을 순수하게 분리 정제하였다. 이때 용출용매는 CHCl₃-MeOH-H₂O 혼합용매를 사용하였는데 stepwise-gradient 법으로 용출하였다. 분리한 화합물의 순도는 HPLC 및 ¹H-NMR data로부터 99% 이상인 것으로 나타났다.

Ginsenoside Rg₁을 포함하여 대부분의 인삼 사포닌은 column chromatography를 이용하여 분리할 때 순상인 silica gel의 경우는 CHCl₃-MeOH-H₂O이나 *n*-BuOH-EtOAc-H₂O을 사용하고, 역상인 ODS의 경우는 MeOH-H₂O이나 acetonitrile-H₂O을 사용하며, Sephadex를 이용하는 경우에는 MeOH, EtOH, H₂O 또는 이들의 혼합용매를 사용하게 된다. 따라서 농축 시에 최종적으로 끓는점이 높은 H₂O 또는 *n*-BuOH이 남게 되고, 이 상태에서 결정이 형성되게 되는데 무색결정 혹은 무색분말보다는 수분을 흡수하여 대부분 백색분말(White powder)로 얻어 진다. Ginsenoside Rg₁의 경우

대부분의 문헌⁷⁻⁹⁾에 백색분말 혹은 무색분말(Colorless powder)로 얻어지는 것으로 되어 있으며, 이번 실험에서는 백색분말로 얻어졌다.

Ginsenoside Rg₁의 녹는점은 최저 190°C에서 최고 196.5°C까지로 보고되어 있다^{1,6,7,9)}. 이번에 Stanford Research System 용점측정기를 사용하여 측정한 ginsenoside Rg₁의 녹는점은 193-195°C로 나타났다.

비선광도는 보통 sodium lamp를 광원으로하여 589.6 nm의 빛을 사용하여 측정하고, 이를 [α]_D 값으로 나타내는데, 문헌^{1,7,9)}에서는 각각 +225, +32, +19.5로 나타나 큰 차이 값을 보이고 있다. 이번에 우리가 측정한 ginsenoside Rg₁의 [α]_D 값은 +14.5(30°C, *c* = 0.50, MeOH)로 나타나, 문헌¹⁾에서 보고된 +225는 틀린 것으로 판단된다.

IR 측정 시 화합물을 용매에 녹여 용액으로 만들어서 측정하는 경우가 일반적이는데, 특이한 관능기가 없어서 적외선을 흡수하지 않는 CCl₄나 CHCl₃를 용매로 사용한다. 하지만 ginsenoside와 같은 사포닌의 경우에는 극성을 유도하는 수산기를 많이 가지고 있어서 비극성 용매인 CCl₄나 CHCl₃에 거의 녹지 않는다. 또한 사포닌에 대하여 용해도가 높은 MeOH이나 H₂O과 같은 용매의 경우에는 용매 자체의 수산기에 대한 흡수강도가 너무 높아서 IR 측정 용매로 사용하지 않는다. 따라서 그 동안은 주로 사포닌을 KBr과 혼합한 후 감압 하에서 압축하여 pellet을 만들어서 측정하였다. 이 경우에도 pellet이 공기 중의 수분을 쉽게 흡수하여 수산기의 흡수밴드가 크게 나오는 경우가 대부분이다. 다른 방법으로는 사포닌을 MeOH에 녹인 용액을 KBr이나 CaF₂로 만들어진

Table 1. Comparison of physico-chemical characteristics for ginsenoside Rg₁ with those reported in literatures

No.	ginsenoside Rg ₁	1968 ⁷⁾	1995 ¹⁾	2003 ⁸⁾	2003 ⁹⁾	2007 ⁶⁾
crystals	white powder (H ₂ O-MeOH)	colorless powder (pyridine)	-	colorless powder	white powder	colorless fine crystals (<i>n</i> -BuOH-EtOAc)
mp(°C)	193-195	194-196.5	190-193	-	191-194	194-195
[α] _D	+14.5 (30°C, <i>c</i> = 0.50, MeOH)	+32 (19.5°C, pyridine)	+225 (27°C, <i>c</i> = 0.50, THF)	-	+19.5 (27°C, <i>c</i> = 0.68, MeOH)	-
IR(cm ⁻¹)	3377, 2933, 1606, 1075, 1032 ^{a)} , 3399, 2932, 1635, 1072, 1036 ^{b)}	-	-	-	-	-
FAB/MS(<i>m/z</i>)	823, 801, 621, 603, 441, 423, 405 ^{c)} , 799, 783, 637, 475, 447, 381, 279, 183 ^{d)}	-	-	823, 423, 304	800, 637	-
TLC(Rf)	0.75 ^{e)} , 0.55 ^{f)}	-	-	-	-	-
HPLC(r.t. min)	20.43 ^{g)} , 16.65 ^{h)}	-	-	-	-	-

^{a)}CaF₂ salt plate window; ^{b)}KBr pellet; ^{c)}positive FAB/MS; ^{d)}negative FAB/MS; ^{e)}Kieselgel 60 F₂₅₄, CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10); ^{f)}Kieselgel RP-18 F_{254S}, MeOH-H₂O (3:1); ^{g)}Carbohydrate ES (5 μm, 250 × 4.6 mm), solvent A (acetonitrile-H₂O-isopropanol=80:5:15), solvent B (acetonitrile-H₂O-isopropanol=60:25:15), gradient elution (Fig. 1), 0.8 ml/min; ^{h)}Discovet C18 (5 μm, 250 × 4.6 mm), solvent A (H₂O), solvent B (acetonitrile), gradient elution (Fig. 1), 1.5 ml/min.

염판(Salt plates)에 떨어뜨린 후 용매를 날려 보내고 측정하는 방법이 있다. Ginsenoside Rg₁의 경우에는 IR 스펙트럼에서 수산기의 산소와 수소간의 σ -결합의 신축진동, sp³ 탄소와 수소간의 σ -결합의 신축진동, sp² 탄소와 수소간의 σ -결합의 신축진동, 두 개의 탄소의 *p*-orbital 전자간의 π -결합의 신축진동, 포화 탄화수소의 굽힘진동 및 탄소와 산소간의 굽힘진동의 흡수밴드가 주요 흡수밴드로 관측될 것으로 추정된다. Ginsenoside에 관련된 문헌¹⁰⁾을 보면 대부분 KBr pellet을 만들어서 측정하였는데, ginsenoside Rg₁에 대하여는 IR data가 거의 보고되고 있지 않다. 이번에 우리가 측정한 ginsenoside Rg₁의 IR 스펙트럼에서는 KBr pellet법의 경우에는 3399(O-H stretching), 2932(C-H stretching), 1635(C=C stretching), 1072(C-H bending) 및 1036(C-O bending)의 흡수가, 염판을 이용한 경우에는 3377, 2933, 1606, 1075 및 1032의 흡수가 관측되었다.

유기화합물에 대한 질량분석은 비극성 유기화합물의 경우에는 EI/MS(Electron Ionization/Mass Spectrometry)를 사용하는 것이 가장 일반적이다. 하지만 사포닌과 같이 수산기를 많이 가지고 있는 배당체의 경우는 휘발성이 매우 낮아서 EI/MS로 측정할 수가 없다. 거의 대부분의 극성 유기화합물의 경우에는 FAB/MS를 사용하게 되는데, 시료를 감압 하에서 기화시켜서 측정하지 않고, glycerol과 같은 물질을 matrix로 하여 화합물과 혼합물을 만든 다음 Ar과 같은 원소를 빠른 속도로 충돌시켜 이온화시키는 방법인 흡착법(Desorption method)을 사용하여 측정한다. FAB/MS의 경우는 EI/MS에 비하여 연식이온화(Soft ionization)법에 해당되므로 주로 분자이온피크가 크게 나타나며 조각이온피크는 작게 나타난다. 사포닌의 질량분석에 관한 문헌^{8,9)}을 보면 모두 FAB/MS로 측정하였으며, 분자이온피크는 m/z 823([M+Na]⁺)과 m/z 800([M+1]⁺)가 주로 보고되었고, 조각이온피크는 m/z 637([M+H-Glc]⁺), m/z 423([M+H-2Glc-3H₂O]⁺) 및 m/z 304가 보고되었으나, 조각이온피크는 제시되지 않는 경우가 더 많았다. 이번에 우리가 측정한 ginsenoside Rg₁의 FAB/MS 데이터에서는 positive 방법으로 측정하였을 때는 분자이온피크로는 m/z 823([M+Na]⁺)과 m/z 801([M+H]⁺)이 관측되었고, 조각이온피크로는 m/z 621([M+H-Glc-H₂O]⁺), m/z 603([M+H-Glc-2H₂O]⁺), m/z 441([M+H-2Glc-2H₂O]⁺), m/z 423([M+H-2Glc-3H₂O]⁺) 및 m/z 405([M+H-2Glc-4H₂O]⁺)가 관측되었다. Negative 방법으로 측정하였을 때는 분자이온피크로는 m/z 799([M-H]⁻), 조각이온피크로는 m/z 783([M-OH]⁻), m/z 637([M-H-Glc]⁻), m/z 475([M-H-2Glc]⁻), m/z 447([M-H-2Glc-2CH₂]⁻), m/z 381([M-H-2Glc-CH₃CH₂-H₂O-3OH]⁻), m/z 279 및 m/z 183이 관측

되었다.

NMR 측정 시 ¹³C-NMR은 ¹H-NMR에 비하여 감도가 매우 낮아서 낮은 농도의 시료로는 측정이 어렵다. ¹H-NMR의 경우는 시료의 농도가 낮아도 측정 가능하고, 높아도 물론 가능하지만 너무 높은 경우에는 기기 측정환경의 최적화 작업 시 shimming이 잘 되지 않아 좋은 스펙트럼을 얻지 못하는 경우도 많이 있다. 보통 동일한 시료로 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 및 2D-NMR을 모두 측정하는 경우가 대부분이기 때문에, 시료의 농도를 적절하게 맞추는 것이 매우 중요하다. 또한 사포닌의 경우는 비극성 유기화합물에 비하여 분자량이 크기 때문에 필요한 시료의 양도 많아야 한다. 사포닌의 NMR 측정 용매로는 용해도의 면에서 보면 MeOH-d₄이나 pyridine-d₅이 적당하다. MeOH-d₄의 경우에는 용매 자체의 signal이 49.0 ppm 주변에서 7개가 관측되기 때문에 사포닌 화합물에서 유래하는 다른 signal들과 겹칠 가능성이 높다. 그에 비하여 pyridine-d₅은 olefine 영역에 해당하는 149.2, 135.5, 123.5 ppm 주변에서 각각 3개씩 모두 9개의 signal이 관측되지만 saponin의 경우에는 이중결합 탄소의 개수가 많지 않아 그다지 문제가 되지 않는다. 다만 pyridine-d₅의 경우에는 용액의 점도가 MeOH에 비하여 높아서 상온에서 측정 시 shimming이 잘 되지 않아 좋은 스펙트럼을 얻을 수 없기 때문에 40-50°C 정도까지 온도를 높여서 측정하는 것이 좋다. NMR spectrometer의 분해능을 보면 1970년대 이전에는 100 MHz 이하의 저분해능 NMR spectrometer가 주로 사용되었는데, ¹³C-NMR의 경우는 signal의 S/N ratio가 높은 즉, 깨끗한 signal을 얻기가 매우 어려웠고, ¹H-NMR의 경우는 해석하기에 좋은 coupling pattern을 보이는 signal을 얻기가 어려웠다. Saponin의 경우는 그 동안의 경험이나 문헌 등으로부터 판단할 때, 시료를 pyridine-d₅에 녹이고, 시료 용액의 농도를 0.07-0.09 M, 400 MHz 이상의 고분해능 NMR로 40°C 이상에서 측정하며, scan 횟수는 ¹H-NMR의 경우는 8, ¹³C-NMR의 경우는 1024 이상이면 좋은 스펙트럼을 얻을 수 있다. 시료가 부족하여 시료용액의 농도가 낮을 때에는 ¹³C-NMR의 scan 횟수를 10,000 이상으로 올려야 할 때도 있다.

Ginsenoside Rg₁에 대한 NMR data를 보면 ¹H-NMR에서는 주로 관능기, 즉 olefine 탄소나 산소를 가진 탄소에 결합한 수소 signal에 대한 것이 주로 assign되어 있고, 포화 탄화수소로만 이루어진 탄소는 methyl기 수소 이외에는 assign되어 있지 않다. Methyl기의 경우도 3개의 탄소 signal이 모두 같거나(δ_H 1.59, H-21, H-26, H-27)²⁾, 매우 비슷한 chemical shift [δ_H 1.26 (H-21), δ_H 1.28 (H-26), δ_H 1.58 (H-27), δ_H 1.62 (H-21), δ_H 1.60 (H-26, H-27)]^{1,3)}를 보여

Table 2. Comparison of ¹H NMR data for ginsenoside Rg₁ with those reported in literatures (in pyridine-*d*₅)

Proton No.	ginsenoside Rg ₁ (400 MHz)	1995 ^{1a)} (300 MHz)	2002 ²⁾ (500 MHz)	2003 ^{3a)} (400 MHz)
3	3.493 dd (11.6, 4.8)	3.48 dd (10.0, 5.0)	3.49 br. d (10.0)	3.52 dd -
6	4.343 m	3.95 td	4.37	4.51 dd
12	4.196 m	3.55 td	4.09	3.95 m
18	1.164 s	0.91 s	1.13 s	1.17 s
19	1.035 s	0.91 s	1.00 s	1.04 s
21	1.582 s	1.26 ^{c)} s	1.59 s	1.62 ^{d)} s
24	5.255 t (6.8)	5.1 br. t (7.0)	5.24 t (6.6)	5.25 t -
26	1.610 s	1.28 ^{c)} s	1.59 s	1.60 ^{d)} s
27	1.610 s	1.58 ^{c)} s	1.59 s	1.60 ^{d)} s
28	2.054 s	1.65 s	2.03 s	2.07 s
29	1.572 s	0.99 s	1.57 s	1.59 s
30	0.827 s	0.87 s	0.79 s	0.82 s
1'	4.988 d (8.0)	4.27 d (7.8)	4.98 d (7.7)	5.03 d (7.8)
1''	5.135 d (7.6)	4.49 d (7.5)	5.21 d (8.2)	5.18 d (7.7)

^{a)}Each proton signal was identified by comparison of chemical shifts with those of literature²⁾. ^{b)}It represents chemical shift (ppm), coupling pattern and coupling constants (Hz). ^{c,d)}They are exchangeable each other.

assign이 쉽지 않다. 1980년대 이전에는 2D-NMR의 사용이 쉽지 않아 이를 이용한 signal의 정확한 assign이 어려웠고, 그 이후에는 이전 data를 그대로 인용하거나 혹은 methyl기의 경우는 assign하지 않고 발표하는 경우가 많았다. ¹³C-NMR의 경우에는 aglycone인 protopanatriol과 2개의 D-glucopyranose의 signal에 대한 기존의 data 값이 많아서 이를 인용하여 assign하더라도 문제는 없다. 하지만 문헌마다 chemical shift나 coupling pattern이 다르게 나타나는데 (Table 1, Table 2), 이는 측정조건이 다르거나, 측정상태가 최적화-shimming이나 locking의 최적화되지 못하거나, 기기적 오차에 따른 것으로 생각된다.

본 실험에서는 ginsenoside Rg₁ 50.0 mg(0.0625 mol)을 0.75 ml의 pyridine-*d*₅에 녹여서(0.083 M) 40°C에서 측정하여 NMR 스펙트럼을 얻었다. ¹H-NMR의 scan 수는 8 회로 하였고 ¹³C-NMR은 1024회로 하였다. Table 2에서 보는 것처럼 문헌^{1,2,4,6)}마다 ¹³C-NMR의 chemical shift 값에 있어서 순서는 다르지 않지만 수치 자체는 많은 차이를 보여주고 있다. 저자 등은 문헌과 비교하고, distortionless enhancement by polarization transfer NMR(DEPT-NMR), ¹H-¹H-COSY, HSQC 및 HMBC NMR 스펙트럼을 면밀히 분석하여 모든 signal을 정확하게 동정하였다. ¹H-NMR 스펙트럼에서는 protopanatriol의 methyl기 signal과 β-D-glucopyranose의 anomer 수소의 signal이 문헌¹⁻³⁾마다 다르게 나와 있다. 본 실험에서는 HMBC와 HSQC 실험을 통하여 각 signal을 정확하게 동정하였다. Fig. 3-A를 보면 HMBC spectrum에서 가장 고자장에서 관측되는 methyl proton signal(δ_H 0.827)이

C-14(δ_C 51.335), C-13(δ_C 49.113), C-8(δ_C 41.106) 및 C-15(δ_C 30.680) carbon signal들과 cross peak를 보여 H-30 methyl로 동정하였다. C-14 signal과는 *J*2 correlation을 그 외의 signal과는 *J*3 correlation을 보였다. δ_H 1.035에서 관측되는 methyl proton signal은 C-5(δ_C 61.337, *J*3), C-9(δ_C 49.955, *J*3), C-10(δ_C 39.665, *J*2) 및 C-1(δ_C 36.423, *J*3) carbon signal들과 correlation을 보여 H-19 methyl로 동정하였다. δ_H 1.164에서 관측되는 methyl proton signal은 C-14(*J*3), C-9(*J*3), C-7(δ_C 45.110, *J*3) 및 C-8(*J*2) carbon signal들과 cross peak를 보여 H-18 methyl로 동정하였다. Fig. 3-B를 보면 δ_H 1.572에서 관측된 methyl proton signal이 C-3(δ_C 78.602, *J*3), C-5(*J*3), C-4(δ_C 40.279, *J*2) 및 C-28(δ_C 31.688, *J*3) carbon signal들과 correlation을 보여 H-29 methyl로 동정하였다. 또한 δ_H 1.582에서 관측되는 methyl proton signal이 C-20(δ_C 83.228, *J*2), C-17(δ_C 51.578, *J*3) 및 C-22(δ_C 36.079, *J*3) carbon signal들과 correlation을 보여 H-21 methyl로 동정하였다. 한편, δ_H 1.610에서 관측된 proton signal은 integration 값으로부터 2개의 methyl기의 signal로 추정되었는데, C-27(δ_C 17.744, *J*3), C-26(δ_C 25.698, *J*3), C-24(δ_C 125.782, *J*3, not shown in Fig.) 및 C-25(δ_C 130.749, *J*2, not shown in Fig.) carbon signal들과 correlation을 보여 H-26과 H-27 methyl로 동정하였다. δ_H 2.054에서 관측되는 methyl proton signal은 C-3(*J*3), C-5(*J*3), C-4(*J*2) 및 C-29(δ_C 16.326, *J*3) carbon signal들과 correlation을 보여 H-28 methyl로 동정하였다. 두 분자의 D-glucopyranose의 1번 탄소인

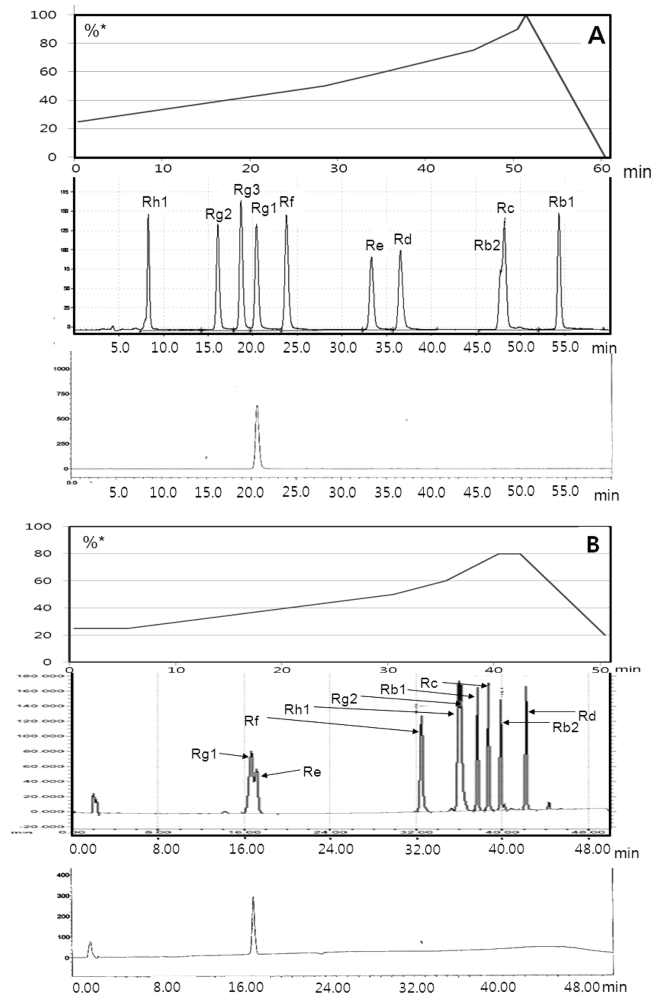


Fig. 1. HPLC chromatograms of ginsenosides and ginsenoside Rg₁.

hemiacetal 탄소에 결합한 수소의 signal은 각각 δ_H 4.988과 δ_H 5.135에서 관측되었는데, Fig. 3-C에서 보면 전자는 δ_C 79.983에서 관측된 C-6 탄소와 correlation을 보였고, 후자는 C-20 탄소와 correlation을 보여, 각각 H-1과 H-1"의 signal로 동정하였다. 한편 H-26과 H-27, 혹은 H-28과 H-29는 서로 이웃하고 있어 HMBC spectrum에서 동일한 탄소들과 correlation을 나타낼 수 있기 때문에 동정에 오류가 생길 수도 있다. 하지만 ginsenoside Rg₁의 ¹³C-NMR에서의 각 탄소의 chemical shift는 확실하게 결정이 되어 있기 때문에, HSQC 실험을 통하여 위의 methyl proton signal을 확인할 수 있었다. 즉 Fig. 4에서처럼 C-26, C-27, C-28 및 C-29의 ¹³C-NMR signal과의 사이에 cross peak를 보인 각 proton signal을 H-26, H-27, H-28 및 H-29 methyl로 각각 확인, 동정하였다.

Ginsenoside의 TLC 분석에서 순상인 silical gel의 경우는 전개용매로 주로 CHCl₃-MeOH-H₂O 혼합용매를 사용하고, 역상인 ODS의 경우에는 MeOH-H₂O 혼합용매를 사용한다.

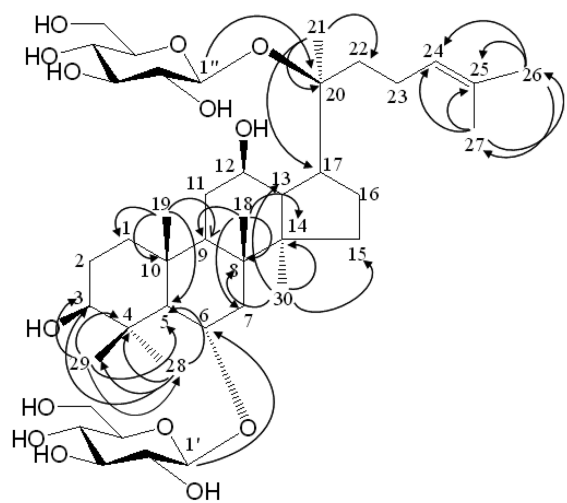


Fig. 2. Chemical structure of ginsenoside Rg₁ and key correlation in the HMBC experiment. Arrows indicate correlations between ¹H-NMR signals and ¹³C-NMR signals in the HMBC spectrum.

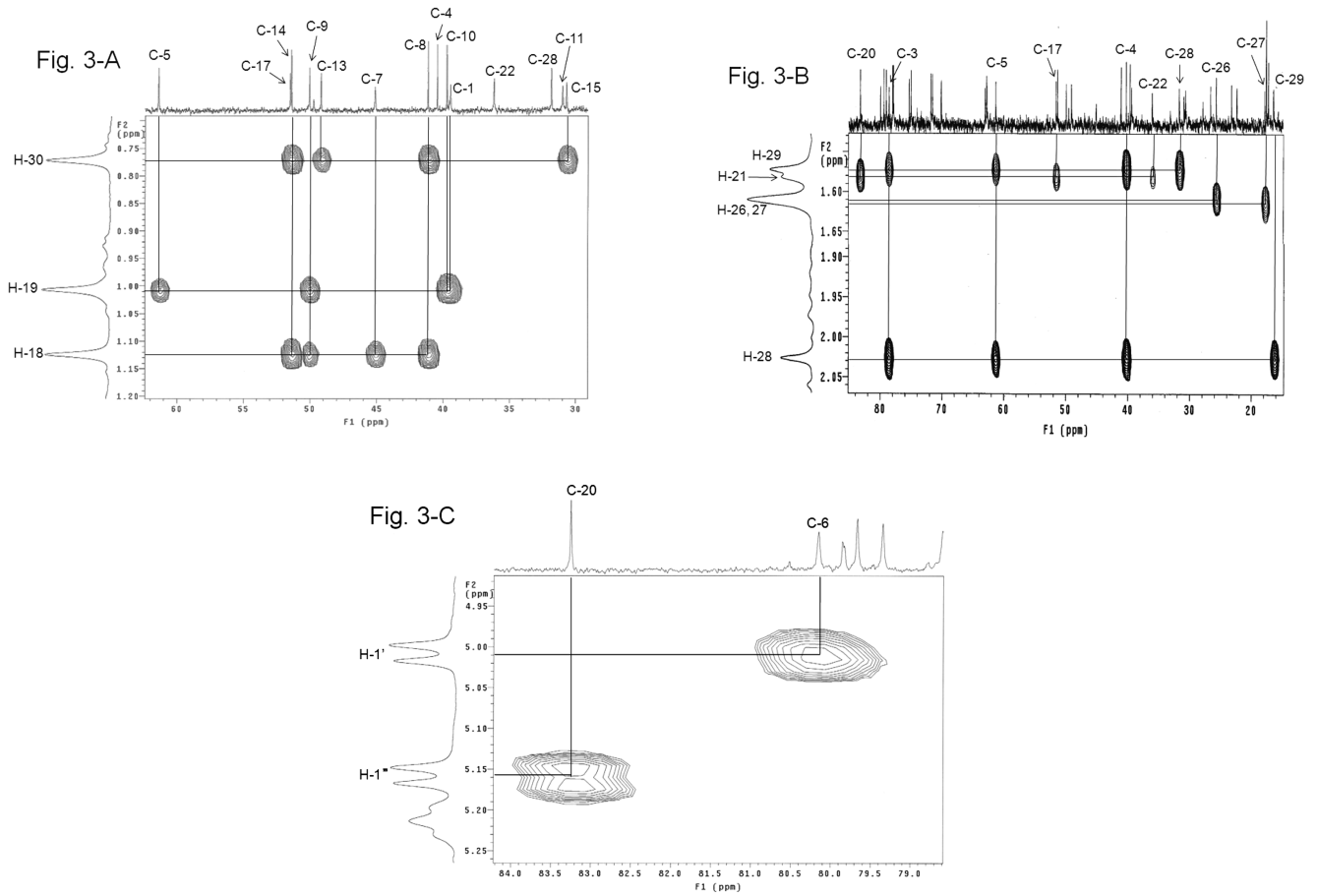


Fig. 3. HMBC spectra of ginsenoside Rg₁.

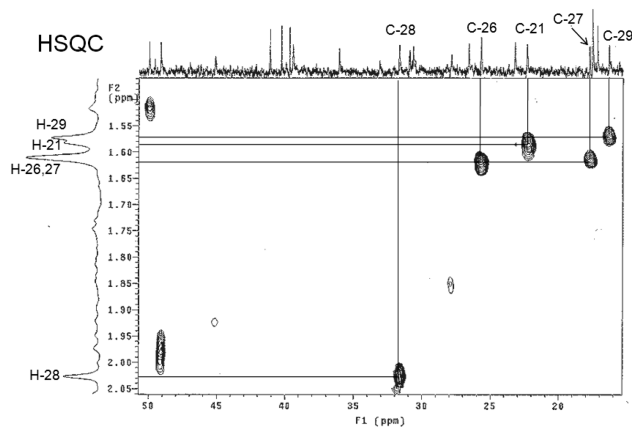


Fig. 4. HSQC spectrum of ginsenoside Rg₁.

TLC 전개 후 UV 램프 하에서 ginsenoside는 형광을 내지 않고, 10% H₂SO₄를 분무하고 가열하면 자주색으로 발색한다. 이번 실험에서 ginsenoside Rg₁은 silica gel TLC를 CHCl₃-MeOH-H₂O(6:4:1)로 전개하였을 때 R_f 값이 0.75로 나타났고, ODS TLC를 MeOH-H₂O(3:1)로 전개하였을 때, R_f 값

이 0.55로 나타났으며, 10% 황산으로 분무 후 가열하였을 때 밝은 자주색으로 발색하였다.

인삼시료 중의 ginsenoside 분석은 주로 HPLC를 이용하고 있는데, 지금까지는 대부분 ODS column을 사용하고, 용출용매로는 H₂O, MeOH, acetonitrile 등을 사용하며 isocratic

Table 3. Comparison of ^{13}C -NMR data for ginsenoside Rg₁ with those reported in literatures (in pyridine-*d*₅)

Carbon NO.	ginsenoside Rg ₁ (100 MHz)	1979 ⁴⁾ (25.2 MHz)	1995 ¹⁾ (75.2 MHz)	1999 ⁵⁾ (125 MHz)	2002 ²⁾ (125 MHz)	2007 ⁶⁾ (150 MHz)
1	39.423	39.5	38.81	39.5	39.5	39.5
2	27.859	27.6	26.90	27.6	28.0	27.6
3	78.602	78.6	76.51	78.6	78.8	78.4
4	40.279	40.1	39.99	40.1	40.4	40.1
5	61.337	61.3	60.45	61.3	61.5	61.3
6	79.983	77.8	78.58	77.8	80.2	77.9
7	45.110	44.9	44.20	44.9	45.2	44.9
8	41.106	41.0	40.44	41.0	41.2	41.0
9	49.955	49.9	49.07	49.9	50.1	49.9
10	39.665	39.5	39.03	39.5	39.8	39.5
11	30.930	30.8	30.16	30.8	31.0	31.8
12	70.155	70.3	69.24	70.3	70.4	70.8
13	49.113	48.9	48.45	48.9	49.2	48.9
14	51.335	51.3	50.76	51.3	51.5	51.6
15	30.680	30.6	30.43	30.6	30.8	31.9
16	26.608	26.4	25.90	26.4	26.7	26.9
17	51.578	51.6	50.80	51.6	51.8	54.6
18	17.531	17.4	17.50	17.4	17.6	17.4
19	17.531	17.4	16.95	17.4	17.6	17.2
20	83.228	83.3	82.34	83.3	83.5	83.3
21	22.339	22.3	21.78	22.3	22.5	22.5
22	36.079	35.9	35.61	35.9	36.2	35.9
23	23.211	23.2	22.37	23.2	23.4	23.2
24	125.782	125.8	125.40	125.8	126.0	126.2
25	130.749	130.9	130.11	130.9	131.1	130.6
26	25.698	25.7	25.31	25.7	25.9	25.7
27	17.744	17.7	17.12	17.7	17.9	17.7
28	31.688	31.6	30.86	31.6	31.8	28.5
29	16.326	16.2	16.95	16.2	16.5	16.2
30	17.175	17.0	15.52	17.0	17.2	17.0
1'	105.787	105.7	104.25	105.7	106	106.3
2'	75.349	75.3	74.28	75.3	75.5	75.3
3'	79.065	80.0	77.82	80.0	79.7	80.0
4'	71.824	71.6	70.70	71.6	71.9	71.6
5'	79.444	79.3	77.60	79.3	78.3	79.3
6'	62.808	62.9	61.69	62.9	63.2	62.9
1''	98.098	98.1	96.79	98.1	98.3	98.1
2''	75.031	74.9	74.09	74.9	75.2	74.9
3''	78.026	78.8	77.40	78.8	79.2	78.8
4''	71.581	71.3	70.70	71.3	71.6	71.3
5''	77.920	77.8	76.51	77.8	78.2	77.8
6''	63.050	62.6	61.69	62.6	63.2	62.9

법으로 용출하거나 gradient 법으로 용출한다. 검출기의 경우는 ginsenoside가 공역이중결합을 가지고 있지 않기 때문에, UV 검출기에서 203 nm 파장의 자외선을 이용하여 검출한다. IR 검출기를 사용할 수도 있지만, UV 검출기에 비하여 감도도 떨어지고 안정화시키는데 시간도 많이 걸리며, 안정성도

떨어지고, 특히 gradient 용출법을 사용할 수 없기 때문에 불편한 점이 많다. 근래에 들어 ginsenoside와 같이 분자구조 중에 공역이중결합을 갖고 있지 않은 화합물을 검출하는데 ELSD 검출기를 사용하여 분석한다. Column으로부터 나온 용출액을 열과 압력을 가하여 분사시킨 뒤 빛을 조사하여 화

합물에 의하여 빛이 분산된 정도로부터 화합물의 양을 검출한다. 분산을 이용하기 때문에 모든 화합물에 대하여 검출이 가능하고, IR 검출기에 비하여 감도도 좋고, 용출용매에 gradient 법을 사용할 수 있다는 장점이 있다. 한편 최근 들어 사포닌의 HPLC 분석용 column으로 carbohydrate column을 사용하여 분석한 결과가 보고되고 있다¹¹⁾. 이번 실험에서는 ODS column과 carbohydrate column을 이용하여 ginsenoside를 분석하였으며, 검출기는 ELSD 검출기를 사용하였다. Carbohydrate column의 경우 column으로는 Carbohydrate ES(5 µm, 250 × 4.6 mm)를 사용하였고, 용출용매는 acetonitrile-H₂O-isopropanol(80:5:15, A)과 acetonitrile-H₂O-isopropanol(60:25:15, B)을 사용하였다. 10종의 주요 인삼사포닌이 가장 잘 분리되는 용출용매를 찾기 위하여 여러 가지로 gradient를 주어 실험하였다. 최종적으로 Fig. 1-A와 같이 stepwise-gradient를 주어 용출하였을 때 좋은 분리결과를 보여 주었다. Fig. 1에서 보는 것처럼 이전의 어떤 문헌에서 보고된 결과보다 사포닌이 훨씬 깨끗하게 분리되었다. 용출용매의 유속은 0.8 ml/min으로 하였으며 이 조건에서 ginsenoside Rg₁의 rt.은 20.43 min으로 나타났다. ODS column은 Discover C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm)을 사용하였고, 용출용매는 A용매는 H₂O, B용매는 acetonitrile을 사용하여 Fig. 1-B와 같이 stepwise-gradient를 주어 용출하였다. 용출용매의 유속은 1.5 ml/min으로 하였으며, 이 조건에서 ginsenoside Rg₁의 rt.은 16.65 min으로 나타났다.

이상과 같이 순수하게 분리 정제한 ginsenoside Rg₁을 이용하여 분석조건을 표준화한 상태에서 결정학적 성상, 녹는점, 비선광도, IR, FAB/MS 및 NMR과 같은 물리화학적 및 분광학적 data를 제시하였고, TLC 및 HPLC에서의 R_f 값과 rt. 값을 제시하였다.

요 약

수삼으로부터 용매추출, 용매분획 및 silica gel column chromatography를 반복하여 ginsenoside Rg₁을 분리하였다. Ginsenoside Rg₁의 결정특성, 녹는점, 비선광도, IR 데이터, FAB/MS 데이터, TLC에서의 R_f 값, HPLC에서의 rt. 및 NMR 데이터를 표준화한 조건으로 측정하여 문헌 값과 비교 고찰하였다. 특히 ginsenoside Rg₁의 ¹H- 및 ¹³C-NMR 데이터를 HSQC 및 HMBC와 같은 2D-NMR 실험을 통하여 정확하게 동정하였다.

사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업에 의해 선정된 경희대학교 고려인삼명품화사업단(GRCMVP)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

인용문헌

- Danieli, B. and Luisetti, M. : Regioselective enzyme-mediated acylation of polyhydroxy natural compounds. A remarkable, highly efficient preparation of 6'-O-acetyl and 6'-O-carboxyacetyl ginsenoside Rg₁. *J. Org. Chem.* **60**, 3637-3642 (1995).
- Teng, R., Li, H., Chen, J., Wang, D., He, Y. and Yang, C. : Complete assignment of ¹H and ¹³C NMR data for nine protopanaxatriol glycosides. *Mag. Res. Chem.* **40**, 483-488 (2002).
- Ko, S.-R., Choi, K.-J., Suzuki, K. and Suzuki, Y. : Enzymatic preparation of ginsenosides Rg₂, Rh₁, and F₁. *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 404-408 (2003).
- Yahara, S., Kaji, K. and Tanaka, O. : Further study on dammarane-type saponins of root, leaves, flower-buds, and fruits of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chem. Pharm. Bull.* **27**, 88-92 (1979).
- Wei, G. M., Masanori, M., Karl, E. M., Shao, L. L., Bertrand, D. and Satoshi, T. : Saponins from the roots of *Panax notoginseng*. *Phytochemistry* **52**, 1133-1139 (1999).
- Wei, W., Yuqing, Z., Elizabeth, R. R., Donald, L. H., Hui, W. and Ruiwen, Z. : *In vitro* anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **59**, 589-601 (2007).
- Iida, T., Tanaka, O. and Shibata, S. : Studies on saponins of ginseng: The structure of ginsenoside-Rg₁. *Tetrahedron Letters.* **52**, 5449-5453 (1968).
- Quzhen, D., Gerold, J., Reiner, W. and Peter, W. : Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chroma. A* **1008**, 173-180 (2003).
- Wang, H., Tong, Y. X., Ye, W. C. and Zhao, S. X. : Studies on chemical constituents in roots of *Polygala tenuifolia*. *China J. Chin. Materia Medica* **28**, 830-833 (2003).
- Ryu, J.-H., Park, J.-H., Eun, J.-H., Jung, J.-H. and Sohn, D. H. : A dammarane glycoside from Korean red ginseng. *Phytochemistry* **44**, 931-933 (1997).
- Kim, S.-R., Choi, K.-J., Suzuki, K. and Suzuki Y. : Enzymatic preparation of ginsenosides Rg₂, Rh₁ and F₁. *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 404-408 (2003).