



Ginsenosides from the fruits of *Panax ginseng* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines

Jung Eun Gwag¹ · Yeong-Geun Lee¹ · Jeon Hwang-Bo¹ · Hyoung-Geun Kim¹ ·
Seon Min Oh^{1,2} · Dae Young Lee² · Nam-In Baek¹

인삼(*Panax ginseng*) 열매로부터 분리한 ginsenoside의 동정 및 암세포독성 효과

곽정은¹ · 이영근¹ · 황보진¹ · 김형근¹ · 오선민^{1,2} · 이대영² · 백남인¹

Received: 2 October 2018 / Accepted: 2 November 2018 / Published Online: 31 December 2018

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

Abstract The fruits of *Panax ginseng* were extracted with 80% aqueous MeOH and the concentrates were partitioned into EtOAc, *n*-BuOH, and H₂O fractions. The repeated SiO₂ and octadecyl SiO₂ column chromatographies for the EtOAc fraction led to isolation of five ginsenosides. The chemical structures of these compounds were determined as ginsenoside F1 (**1**), ginsenoside F2 (**2**), ginsenoside F3 (**3**), ginsenoside Ia (**4**), notoginsenoside Fe (**5**) based on spectroscopic analyses including nuclear magnetic resonance, MS, and infrared. Compounds **2-5** were isolated for the first time from the fruits of *P. ginseng* in this study. All isolated compounds were evaluated for cytotoxic activities against human cancer cell lines such as HCT-116, SK-OV-3, human cervix adenocarcinoma (HeLa), HepG2, and SK-MEL-5. Among them compounds **2**, **4**, and **5** showed significant cytotoxicity on cancer

cells. Compound **2** exhibited cytotoxicity on SK-MEL-5, HepG2, and HeLa cells with IC₅₀ values of 82.8, 86.8, and 78.3 μM, respectively. Compound **4** showed cytotoxicity on HCT-116, SK-MEL-5, SK-OV-3, HepG2, and HeLa cells with IC₅₀ values of 24.5, 25.4, 26.3, 22.0, and 24.9 μM, respectively. Compound **5** did on SK-MEL-5 cell with IC₅₀ value of 81.7 μM. The cytotoxicity of ginsenoside **2**, **4**, and **5** isolated from the fruits of *Panax ginseng* showed strong inhibition effect against on cancer cells, all of which have a glucopyranosyl moiety on C-3.

Keywords Cytotoxicity · Fruit · Ginsenoside · Human cancer cells · *Panax ginseng*

Nam-In Baek (✉)
E-mail: nibaek@khu.ac.kr

Dae Young Lee (✉)
E-mail: dylee0809@gmail.com

¹Graduate School of Biotechnology and Department of Oriental Medicine Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

²Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

우리나라의 인삼은 고려인삼 (*Panax ginseng*)이라 불리며, Gillis의 연구[1]에 따르면 인삼은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 여러해살이 초본 식물이다. 인삼의 속명인 *Panax*는 모든 것을 뜻하는 ‘Pan’과 치료를 뜻하는 ‘Axos’로 이루어져있다. 속명으로 알 수 있듯이 인삼은 뿌리가 주로 한방에서 이용되는 대표적인 약용식물로 Li와 Li의 연구[2]에 따르면 예로부터 강장제, 피로회복제로 사용되었으며 항암, 항산화, Singh 등의 연구[3]에서 면역 증진의 효능이 보고 되어있다. Choi의 연구[4]에서 인삼은 주요성분인 ginsenoside를 비롯하여 다양한 종류의 이차대사산물을 함유하고있다. 특히 인삼의 사포닌인 ginsenoside는 Kim 등의 연구[5]에서 항암, 항산화, 항고혈압, Kim 등의 연구

[6]에서 항당뇨 등의 활성이 보고되었으며, Lee 등의 연구[7]에서 현재까지 수십 여종 이상이 분리 및 보고되었다. 최근 Wang 등의[8] 인삼 열매 성분 함량 연구에 의하면, 인삼 열매가 뿌리에 비해 사포닌 함량이 2배 이상 많은 것을 알 수 있다. 또한 Yahara 등의 연구[9]에 따르면 인삼 열매에는 뿌리에는 존재하지 않는 ginsenoside가 함유되어 있다. Ginsenoside에는 주요 ginsenoside인 ginsenoside Rb1, Rb2, Re, Rg1 등과, 미량 ginsenoside인 ginsenoside F1, F2, compound K 등이 존재한다. 그 중 미량 ginsenoside는 주요 ginsenoside에 비해 흡수율이 높고, Chae 등의 연구[10]에서 약리 활성이 좋다고 알려져 있으며, ginsenoside F2는 Mai 등의 연구[11]에서 항암 활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 인삼 열매로부터 미량 ginsenoside를 분리 및 구조 동정 하고, 그들에 대한 항암 활성을 평가하고자 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에서 사용한 인삼(*P. ginseng*)의 열매는 2013년 2월에 농촌진흥청에서 제공받아 실험을 진행하였으며, 표본시료(KNPCL-HP-201302)는 경희대학교 생명과학대학 천연물화학실에 보관되어 있다.

시약 및 기기

Column chromatography (c.c.)용 silica gel (SiO₂) resin은 Kiesel gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany)을 octadecyl SiO₂ (ODS)은 Lichroprep RP-18 (40-60 μM, Merck)을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 Kiesel gel 60 F254와 RP-18 F254s (Merck)을 사용하였다. Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼은 400 MHz FT-NMR spectrometer (Varian Inova AS-400, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, infrared (IR) spectrum은 Perkin model 599B (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. Fast atom bombardment mass spectrometry (FAB/MS)는 JEOL JMS-700 (Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다. UV lamp는 Spectroline (Model ENF-240 C/F, Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA)을 사용하였다. 세포독성 실험에서 사용한 배지 RPMI 1640와 Penicillin-Streptomycin은 GIBCOBRL, Life Technologies Inc. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (Logan, UT, USA) 제품을 사용하였고, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

추출 및 분리

건조한 인삼의 열매 6.3 kg을 80% MeOH 수용액(30 L)으로 실온에서 24시간씩 3회 반복 추출하였다. 얻어진 여액을 감압농축하여 1.4 kg의 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물은 H₂O (3.0 L)와 ethyl acetate (EtOAc, 3.0 L×3), *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH, 2.6 L×3)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압농축하여 EtOAc 분획(PGE, 75.0 g), *n*-BuOH 분획(PGB, 470.0 g) 및 H₂O 분획

(PGH, 855.0 g)을 얻었다. PGE (75.0 g)에 대하여 SiO₂ c.c. (φ 14.0×16.0 cm, CHCl₃-MeOH=30:1→CHCl₃-MeOH-H₂O=15:3:1, 각 60 L)를 실시하여, 총 24개의 분획(PGE-1-PGE-24)을 얻었다. 그 중에서 PGE-20 분획 [1.6 g, elution volume/total volume (Ve/Vt) 0.62-0.69]에 대하여 SiO₂ c.c. (φ3.5×12.0 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=13:3:1, 3.0 L)를 실시하여, 총 16개의 분획(PGE-20-1-PGE-20-16)을 얻었다. 이 중 PGE-20-7 분획(86.4 mg, Ve/Vt 0.19-0.22)에 대하여 ODS c.c. (φ2.0×7.0 cm, MeOH-H₂O=2:1, 300 mL)를 실시하여, 총 9개의 분획(PGE-20-7-1-PGE-20-7-9)을 얻었고, 화합물 1 (PGE-20-7-7, 59.6 mg, Ve/Vt 0.33-0.61, ODS TLC R_f 0.5, MeOH-H₂O=7:2)을 분리하였다. PGE-20-11 분획(835.5 mg, Ve/Vt 0.48-0.69)에 대하여 ODS c.c. (φ 4.0×9.0 cm, MeOH-H₂O=3:2→4:1, 각 2.5 L)를 실시하여, 총 18개의 분획(PGE-20-11-1-PGE-20-11-18)을 얻었고, 화합물 2 (PGE-20-11-16, 49.8 mg, Ve/Vt 0.86-0.90, ODS TLC R_f 0.4, MeOH-H₂O=6:1)을 분리하였다. PGE-20-11-11 분획 (84.0 mg, Ve/Vt 0.28-0.43)에 대하여 ODS c.c. (φ3.0×5.0 cm, acetone-H₂O=2:3, 450 mL)를 실시하여, 총 10개의 분획(PGE-20-11-11-1-PGE-20-11-11-10)을 얻었다. PGE-20-11-11-4 분획(54.0 mg, Ve/Vt 0.34-0.48)에 대하여 SiO₂ c.c. (φ1.5×8.0 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=10:3:1, 800 mL)를 실시하여, 총 4개의 분획(PGE-20-11-11-4-1-PGE-20-11-11-4-4)을 얻었고, 화합물 3 (PGE-20-11-11-4-2, 41.0 mg, Ve/Vt 0.43-0.69, SiO₂ TLC R_f 0.5, CHCl₃-MeOH-H₂O=65:35:10)을 분리하였다. PGE-22 분획 (985.0 mg, Ve/Vt 0.80-0.89)에 대하여 SiO₂ c.c. (φ3.0×12.0 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=16:3:1, 2.2 L)를 실시하여, 총 18개의 분획(PGE-22-1-PGE-22-18)을 얻었다. PGE-22-16 분획 (205.5 mg, Ve/Vt 0.59-0.63)에 대하여 ODS c.c. (φ3.0×9.0 cm, MeOH-H₂O=2:5, 4.0 L)를 실시하여 총 20개의 분획 (PGE-22-16-1-PGE-22-16-20)을 얻었고, 화합물 4 (PGE-22-16-4, 7.3 mg, Ve/Vt 0.13-0.15, ODS TLC R_f 0.5, MeOH-H₂O=1:2)와 화합물 5 (PGE-22-16-17, 39.7 mg, Ve/Vt 0.84-0.87, ODS TLC R_f 0.5, MeOH-H₂O=1:1)를 얻었다.

화합물 1 (ginsenoside F1): 하얀색 가루 (MeOH); [α]_D²⁵ +36.6° (c 1.12, MeOH); positive FAB/MS *m/z* 661.4 [M+Na]⁺; IR (KBr, ν) 3398, 1660, 1380, 1080 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N, δ_H) 5.22 (1H, dd, *J*=6.0, 6.0 Hz, H-24), 5.12 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1'), 4.41 (1H, br d, *J*=11.6 Hz, H-6'a), 4.35 (1H, m, H-6), 4.25 (1H, dd, *J*=11.6, 4.4 Hz, H-6'b), 4.16 (1H, m, H-3'), 4.14 (1H, m, H-12), 4.09 (1H, m, H-4'), 3.92 (1H, dd, *J*=8.4, 7.6 Hz, H-2'), 3.86 (1H, m, H-5'), 3.47 (1H, dd, *J*=10.8, 4.4 Hz, H-3), 2.49 (1H, m, H-17), 2.46 (1H, overlapped, H-23a), 2.32 (1H, overlapped, H-22a), 2.22 (1H, overlapped, H-23b), 2.05 (1H, overlapped, H-11a), 1.94 (1H, m, H-13), 1.91 (3H, s, H-28), 1.88 (1H, overlapped, H-7a), 1.87 (1H, overlapped, H-2), 1.82 (1H, overlapped, H-7b), 1.82 (1H, overlapped, H-16a), 1.78 (1H, overlapped, H-22b), 1.70 (1H, overlapped, H-1a), 1.58 (1H, overlapped, H-11b), 1.57 (1H, m, H-9), 1.57 (3H, s, H-26), 1.57 (3H, s, H-27), 1.56 (3H, s, H-21), 1.50 (1H, overlapped, H-15a), 1.39 (3H, s, H-29), 1.30 (1H, overlapped, H-16b), 1.17 (1H,

d, $J=10.0$ Hz, H-5), 1.06 (3H, s, H-18), 1.01 (1H, overlapped, H-1b), 0.98 (3H, s, H-19), 0.95 (1H, overlapped, H-15b), 0.94 (3H, s, H-30); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ_{C}) 130.8 (C-25), 125.8 (C-24), 98.1 (C-1'), 83.2 (C-20), 78.4 (C-3), 78.4 (C-3'), 78.0 (C-5'), 75.0 (C-2'), 71.6 (C-4'), 70.1 (C-12), 67.7 (C-6), 62.8 (C-6'), 61.7 (C-5), 51.6 (C-17), 51.3 (C-14), 49.8 (C-9), 49.1 (C-13), 47.4 (C-7), 41.1 (C-8), 40.2 (C-4), 39.3 (C-1), 39.3 (C-10), 36.0 (C-22), 31.9 (C-28), 30.8 (C-11), 30.7 (C-15), 28.0 (C-2), 26.5 (C-16), 25.6 (C-26), 23.1 (C-23), 22.3 (C-21), 17.7 (C-27), 17.5 (C-30), 17.3 (C-18), 17.3 (C-19), 16.4 (C-29).

화합물 2 (ginsenoside F2): 하얀색 가루 (MeOH); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +29.6^\circ$ (c 1.01, MeOH); positive FAB/MS m/z 807.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR (KBr, ν) 3410, 1657, 1355, 1080 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ_{H}) 5.24 (1H, dd, $J=6.8, 6.4$ Hz, H-24), 5.20 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1"), 4.95 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 4.54 (1H, dd, $J=11.2, 2.4$ Hz, H-6"a), 4.44 (1H, dd, $J=11.6, 2.4$ Hz, H-6'a), 4.35 (1H, dd, $J=11.2, 4.8$ Hz, H-6"b), 4.28 (1H, dd, $J=11.6, 5.6$ Hz, H-6'b), 4.20 (1H, m, H-3'), 4.19 (1H, m, H-3"), 4.18 (1H, m, H-4"), 4.15 (1H, m, H-12), 4.13 (1H, m, H-4'), 4.03 (1H, m, H-2"), 3.98 (1H, m, H-2'), 3.95 (1H, m, H-5"), 3.88 (1H, m, H-5'), 3.36 (1H, dd, $J=11.6, 4.0$ Hz, H-3), 2.54 (1H, m, H-17), 2.48 (1H, overlapped, H-23a), 2.35 (1H, overlapped, H-22a), 2.24 (1H, overlapped, H-24b), 1.98 (1H, overlapped, H-11a), 1.97 (1H, m, H-13), 1.87 (1H, overlapped, H-2b), 1.84 (1H, overlapped, H-16a), 1.80 (1H, overlapped, H-22b), 1.61 (3H, s, H-21), 1.60 (1H, overlapped, H-1a), 1.60 (3H, s, H-26), 1.60 (3H, s, H-27), 1.59 (1H, overlapped, H-11b), 1.53 (1H, overlapped, H-6a), 1.50 (1H, overlapped, H-7a), 1.50 (1H, overlapped, H-15a), 1.42 (1H, overlapped, H-6b), 1.42 (1H, m, H-9), 1.38 (1H, overlapped, H-16b), 1.29 (3H, s, H-28), 1.20 (1H, overlapped, H-7b), 1.03 (1H, overlapped, H-15b), 0.99 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-30), 0.82 (3H, s, H-19), 0.82 (1H, overlapped, H-1b), 0.75 (1H, d, $J=11.6$ Hz, H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ_{C}) 130.8 (C-25), 125.9 (C-24), 106.8 (C-1'), 98.4 (C-1"), 88.7 (C-3), 83.2 (C-20), 79.1 (C-3"), 78.6 (C-3'), 78.2 (C-5"), 78.1 (C-5'), 75.7 (C-2"), 75.0 (C-2'), 71.9 (C-4"), 71.6 (C-4'), 63.0 (C-6"), 62.8 (C-6'), 56.4 (C-5), 50.1 (C-9), 49.4 (C-13), 40.0 (C-8), 39.6 (C-4), 39.2 (C-1), 36.9 (C-10), 36.1 (C-22), 35.1 (C-7), 30.9 (C-15), 30.7 (C-11), 28.1 (C-28), 26.7 (C-2), 26.6 (C-16), 25.6 (C-26), 23.1 (C-23), 22.3 (C-21), 18.4 (C-6), 17.7 (C-27), 17.3 (C-30), 16.7 (C-29), 16.2 (C-18), 15.9 (C-19), 15.6 (C-17), 15.4 (C-14).

화합물 3 (ginsenoside F3): 하얀색 가루 (MeOH); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +26.5^\circ$ (c 0.98, MeOH); positive FAB/MS m/z 793.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; infrared spectroscopy (IR) (KBr, ν) 3469, 1655, 1462, 1076 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ_{H}) 5.29 (1H, dd, $J=6.4, 5.6$ Hz, H-24), 5.05 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1'), 4.93

(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1"), 4.61 (1H, br d, $J=10.8$ Hz, H-6'a), 4.39 (1H, m, H-3"), 4.37 (1H, m, H-6), 4.32 (1H, m, H-2"), 4.26 (1H, d, $J=11.6$ Hz, H-5"a), 4.19 (1H, m, H-6'b), 4.16 (1H, m, H-4"), 4.11 (1H, m, H-12), 4.08 (1H, m, H-3'), 3.99 (1H, m, H-4'), 3.97 (1H, m, H-5'), 3.84 (1H, dd, $J=8.0, 8.0$ Hz, H-2'), 3.74 (1H, br d, $J=11.6$ Hz, H-5"b) 3.46 (1H, dd, $J=11.2, 5.2$ Hz, H-3), 2.51 (1H, overlapped, H-23a) 2.49 (1H, m, H-17), 2.33 (1H, overlapped, H-23b) 2.31 (1H, overlapped, H-22a), 2.04 (1H, overlapped, H-11a), 1.95 (1H, m, H-13), 1.91 (3H, s, H-28), 1.88 (1H, overlapped, H-7a), 1.82 (1H, overlapped, H-2), 1.82 (1H, overlapped, H-7b), 1.80 (1H, overlapped, H-16a), 1.78 (1H, overlapped, H-22b), 1.68 (1H, overlapped, H-1a), 1.63 (3H, s, H-27), 1.60 (3H, s, H-21), 1.58 (3H, s, H-26), 1.49 (1H, m, H-9), 1.47 (1H, overlapped, H-11b), 1.45 (1H, overlapped, H-15a), 1.38 (3H, s, H-29), 1.34 (1H, overlapped, H-16b), 1.16 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-5), 1.06 (3H, s, H-18), 0.98 (1H, overlapped, H-1b), 0.97 (3H, s, H-19), 0.96 (1H, overlapped, H-15b), 0.92 (3H, s, H-30); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ_{C}) 131.0 (C-25), 125.8 (C-24), 104.4 (C-1"), 98.0 (C-1'), 83.4 (C-20), 79.0 (C-3'), 78.4 (C-3), 76.5 (C-5'), 74.8 (C-2'), 73.9 (C-3"), 72.0 (C-4'), 71.7 (C-2"), 70.1 (C-12), 69.1 (C-4"), 68.3 (C-6'), 67.6 (C-6), 65.3 (C-5"), 61.6 (C-5), 51.6 (C-17), 51.2 (C-14), 49.8 (C-9), 49.0 (C-13), 47.4 (C-7), 41.4 (C-8), 40.2 (C-4), 39.3 (C-1), 39.3 (C-10), 36.1 (C-22), 31.8 (C-28), 30.6 (C-11), 30.6 (C-15), 28.0 (C-2), 26.6 (C-16), 25.7 (C-26), 23.1 (C-23), 22.2 (C-21), 17.8 (C-27), 17.5 (C-30), 17.3 (C-18), 17.3 (C-19), 16.4 (C-29).

화합물 4 (ginsenoside Ia): 하얀색 가루 (MeOH); positive FAB/MS m/z 823.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR (KBr, ν) 3401, 1649, 1462, 1076 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ_{H}) 5.23 (1H, dd, $J=6.4, 6.8$ Hz, H-24), 5.12 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1"), 4.93 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 4.53 (1H, overlapped, H-6"a), 4.42 (1H, dd, $J=11.2, 2.4$ Hz, H-6'a), 4.29 (1H, m, H-6), 4.28 (1H, overlapped, H-3"), 4.25 (1H, dd, $J=11.2, 5.6$ Hz, H-6"b), 4.24 (1H, overlapped, H-4"), 4.21 (1H, m, H-3'), 4.14 (1H, m, H-12), 4.12 (1H, m, H-4'), 4.11 (1H, overlapped, H-6"b), 4.08 (1H, overlapped, H-2"), 3.97 (1H, m, H-2'), 3.87 (1H, overlapped, H-5"), 3.83 (1H, m, H-5'), 3.42 (1H, dd, $J=4.4, 10.8$ Hz, H-3), 2.48 (1H, m, H-17), 2.47 (1H, overlapped, H-23a), 2.31 (1H, overlapped, H-22a), 2.24 (1H, overlapped, H-23b), 2.06 (1H, overlapped, H-11a), 2.00 (3H, s, H-28), 1.95 (1H, m, H-13), 1.88 (1H, overlapped, H-7a), 1.87 (2H, overlapped, H-2), 1.85 (1H, overlapped, H-7b), 1.83 (1H, overlapped, H-16a), 1.75 (1H, overlapped, H-22b), 1.71 (1H, overlapped, H-1a), 1.58 (1H, overlapped, H-11b), 1.57 (1H, m, H-9), 1.57 (3H, s, H-21), 1.57 (3H, s, H-26), 1.57 (3H, s, H-27), 1.51 (1H, overlapped, H-15a), 1.36 (3H, s, H-29), 1.34 (1H, overlapped, H-16b), 1.20 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-5), 1.06 (3H, s, H-18), 1.01 (1H,

overlapped, H-1b), 0.96 (3H, s, H-30), 0.91 (3H, s, H-19); ¹³C-NMR (100 MHz, C₃D₅N, δ_C) 130.8 (C-25), 125.8 (C-24), 107.1 (C-1''), 98.1 (C-1'), 88.8 (C-3), 83.2 (C-20), 78.2 (C-3''), 78.6 (C-3'), 78.2 (C-5'), 78.1 (C-5''), 75.8 (C-2'), 75.0 (C-2''), 71.9 (C-4'), 71.6 (C-4''), 70.1 (C-12), 67.5 (C-6), 63.1 (C-6'), 62.8 (C-6''), 61.7 (C-5), 51.5 (C-17), 51.3 (C-14), 49.7 (C-9), 49.1 (C-13), 47.4 (C-7), 41.1 (C-8), 40.4 (C-4), 39.1 (C-1), 38.8 (C-10), 36.0 (C-22), 31.3 (C-28), 30.8 (C-11), 30.7 (C-15), 26.5 (C-16), 26.5 (C-2), 25.6 (C-26), 23.1 (C-23), 22.3 (C-21), 17.7 (C-27), 17.5 (C-18), 17.4 (C-19), 17.3 (C-30), 16.9 (C-29).

화합물 **5** (notoginsenoside Fe): 하얀색 가루 (MeOH); positive FAB/MS *m/z* 939.5 [M+Na]⁺; IR (KBr, ν) 3401, 1649, 1462, 1076 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, C₃D₅N, δ_H) 5.59 (1H, br s, H-1''), 5.24 (1H, dd, *J*=6.8, 6.4 Hz, H-24), 5.06 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1''), 4.87 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1'), 4.78 (1H, m, H-2''), 4.72 (1H, m, H-3''), 4.68 (1H, m, H-4''), 4.59 (1H, br d, H-6'a), 4.28 (1H, dd, *J*=11.6, 5.6 Hz, H-6'b), 4.25 (1H, dd, *J*=12.0, 2.4 Hz, H-5'a), 4.23 (1H, m, H-5'b), 4.20 (1H, m, H-3'), 4.19 (1H, m, H-3''), 4.18 (1H, m, H-4''), 4.15 (1H, m, H-12), 4.13 (1H, m, H-4'), 4.03 (1H, m, H-2''), 4.00 (1H, m, H-6'b), 3.98 (1H, m, H-2'), 3.95 (1H, m, H-5''), 3.88 (1H, m, H-5'), 3.36 (1H, dd, *J*=11.6, 4.0 Hz, H-3), 2.54 (1H, m, H-17), 2.48 (1H, overlapped, H-23a), 2.35 (1H, overlapped, H-22a), 2.24 (1H, overlapped, H-24b), 1.98 (1H, overlapped, H-11a), 1.97 (1H, m, H-13), 1.87 (1H, overlapped, H-2b), 1.84 (1H, overlapped, H-16a), 1.80 (1H, overlapped, H-22b), 1.61 (3H, s, H-21), 1.60 (1H, overlapped, H-1a), 1.60 (3H, s, H-26), 1.60 (3H, s, H-27), 1.59 (1H, overlapped, H-11b), 1.53 (1H, overlapped, H-6a), 1.50 (1H, overlapped, H-7a), 1.50 (1H, overlapped, H-15a), 1.42 (1H, overlapped, H-6b), 1.42 (1H, m, H-9), 1.38 (1H, overlapped, H-16b), 1.29 (3H, s, H-28), 1.20 (1H, overlapped, H-7b), 1.03 (1H, overlapped, H-15b), 0.99 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-30), 0.82 (3H, s, H-19), 0.82 (1H, overlapped, H-1b), 0.75 (1H, d, *J*=11.6 Hz, H-5); ¹³C-NMR (100 MHz, C₃D₅N, δ_C) 130.9 (C-25), 125.9 (C-24), 110.0 (C-1''), 106.8 (C-1'), 97.9 (C-1''), 88.8 (C-3), 86.1 (C-4''), 83.1 (C-2''), 83.1 (C-20), 79.1 (C-3'), 78.8 (C-3''), 78.8 (C-3''), 78.2 (C-5'), 76.4 (C-5''), 75.7 (C-2'), 74.9 (C-2''), 72.0 (C-4'), 71.9 (C-4''), 70.2 (C-12), 68.4 (C-6'), 63.1 (C-6'), 62.6 (C-5''), 56.4 (C-5), 51.6 (C-17), 51.4 (C-14), 50.1 (C-9), 49.4 (C-13), 39.9 (C-8), 39.6 (C-4), 39.2 (C-1), 36.9 (C-10), 36.1 (C-22), 35.1 (C-7), 30.7 (C-15), 30.7 (C-11), 28.1 (C-28), 26.7 (C-2), 26.6 (C-16), 25.7 (C-26), 23.1 (C-23), 22.3 (C-21), 18.4 (C-6), 17.8 (C-27), 17.3 (C-30), 16.7 (C-29), 16.2 (C-18), 15.9 (C-19).

세포배양

대장암(human colon adenocarcinoma; HCT-116), 난소암(human

ovarian adenocarcinoma; SK-OV-3), 자궁암(human cervix adenocarcinoma; HeLa), 간암(human hepatoma; HepG2) 및 피부암(human melanoma; SK-MEL-5)은 한국 세포주 은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 제공받았다. 세포독성 측정을 위한 세포주는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여, 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다.

세포독성

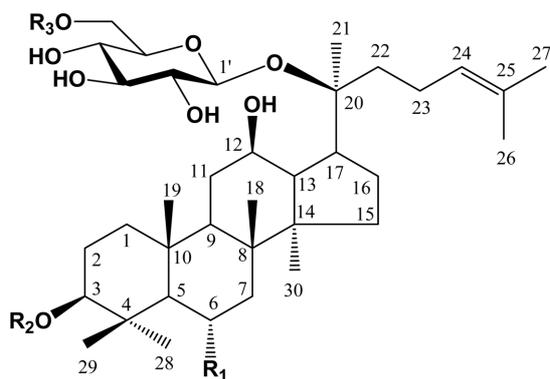
인삼 열매로부터 분리한 화합물들의 세포독성 실험은 Skehan 등의 연구[12] MTT colorimetric assay 방법으로 진행하였다. 배양된 cell에 RPMI-1640 배지와 분리한 다섯 종의 ginsenoside를 각각 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 75.0, 및 100.0 μM의 농도 별로 잘 혼합하여 seeding 하였으며, cell수를 1×10⁴ cells/mL로 조정 하였다. 준비한 cell을 plate에 100 μL씩 첨가하고 12시간 배양 하였다. 배양 후 각 cell에 50 μL의 MTT [5 mg/mL in phosphate buffered saline] 시약을 첨가하여 37°C에서 다시 2시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 배지를 제거하고 100 μL의 DMSO를 첨가하여 용해시켰다. Cell plate reader (Bio-Rad Co., Westbury, NY, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식 억제효과는 다음과 같이 계산하였다.

Cell viability (%)

$$= [\text{OD}(\text{compound}) - \text{OD}(\text{Blank}) / \text{OD}(\text{Control}) - \text{OD}(\text{Blank})] \times 100$$

결과 및 고찰

화합물 **1**은 positive FAB/MS에서 *m/z* 661.4 [M+Na]⁺의 분자 이온 peak가 관측되어 분자량을 638로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3398 cm⁻¹)와 이중결합(1660 cm⁻¹)이 있는 것으로 확인되었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 8개의 methyl proton signal [δ_H 1.91 (3H, s, H-28), 1.57 (3H, s, H-26), 1.57 (3H, s, H-27), 1.56 (3H, s, H-21), 1.39 (3H, s, H-29), 1.06 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, s, H-30)]로부터 화합물 **1**의 aglycone이 4개의 환을 가지는 tetracyclic triterpene, 즉 dammarane 골격임을 예상하였다. Shen 등의 연구[13]에서 일반적으로 28번 proton signal은 δ_H 1.30에서 관측되는데, 해당 화합물의 경우 δ_H 1.91까지 저자장으로 이동하는 것을 알 수 있었다. 따라서, 이 화합물이 protopanaxatriol (PPT)-type인 것을 예상하였다. 또한 한 개의 olefin methine proton signal [δ_H 5.22 (1H, dd, *J*=6.0, 6.0 Hz, H-24)]과, 세개의 oxygenated methine proton signal [δ_H 4.35 (1H, m, H-6), 4.14 (1H, m, H-12), 3.47 (1H, dd, *J*=10.8, 4.4 Hz, H-3)]을 관측하였으며, 1개의 hemiacetal proton signal [δ_H 5.12 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1')]과 4개의 oxygenated methine proton signal [δ_H 4.16 (1H, m, H-3'), 4.09 (1H, m, H-4'), 3.92 (1H, dd, *J*=8.4, 7.6 Hz, H-2'), 3.86 (1H, m, H-5')]과 1개의 oxygenated methylene proton signal [δ_H 4.41 (1H, br d, *J*=11.6 Hz, H-6'a), 4.25 (1H, dd, *J*=11.6, 4.4 Hz, H-6'b)]로부터 한 개의 육탄당이 존재함을 알 수 있었다. Anomer proton signal의 결합 정수(*J*=7.6 Hz)로부터 당의 1번과 2번 수소가 서로 axial-axial 형태를 이루는 것을 알 수 있었으며, 이를 통해 이 화합



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|------------------------|----------------|----------------|-------------------|
| ginsenoside F1 (1) | OH | H | H |
| ginsenoside F2 (2) | H | β -glc | H |
| ginsenoside F3 (3) | OH | H | α -ara (p) |
| ginsenoside Ia (4) | OH | β -glc | H |
| notoginsenoside Fe (5) | H | β -glc | α -ara (f) |

* β -glc: β -D-glucopyranose, α -ara (p): α -L-arabinopyranose, α -ara (f): α -L-arabinofuranose

Fig. 1 Chemical structures of ginsenosides 1-5 from the fruits of *Panax ginseng*

물이 PPT-type dammarane triterpene monoglycoside임을 예상하였다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 당 유래 signal을 제외한 총 카본 수는 30개로 ¹H-NMR에서 예상한 triterpenoid임이 확인되었다. 이때 당으로부터 유래한 1개의 hemiacetal δ_c 98.1 (C-1'), 4개의 oxygenated methine [δ_c 78.4 (C-3'), 78.0 (C-5'), 75.0 (C-2'), 71.6 (C-4')], 1개의 oxygenated methylene δ_c 62.8 (C-6') carbon signal결과와 구성당의 ¹H-NMR 및 HSQC를 종합분석하여 이 당이 β -glucopyranose임을 확인하였다. 한 개의 olefin quaternary carbon signal δ_c 130.8 (C-25), 한 개의 olefin methine carbon signal δ_c 125.8 (C-24), 한 개의 oxygenated quaternary carbon signal δ_c 83.2 (C-20), 3개의 oxygenated methine carbon signal [δ_c 78.4 (C-3), 70.1 (C-12), 67.7 (C-6)], 4개의 quaternary carbon signal [δ_c 51.3 (C-14), 41.1 (C-8), 40.2 (C-4), 39.3 (C-10)], 4개의 methine carbon signal [δ_c 61.7 (C-5), 51.6 (C-17), 49.8 (C-9), 49.1 (C-13)], 8개의 methylene carbon signal [δ_c 47.4 (C-7), 39.3 (C-1), 36.0 (C-22), 30.8 (C-11), 30.7(C-15), 28.0 (C-2), 26.5 (C-16), 23.1 (C-23)], 8개의 methyl carbon signal [δ_c 31.9 (C-28), 25.6 (C-26), 22.3 (C-21), 17.7 (C-27), 17.5 (C-30), 17.3 (C-18), 17.3 (C-19), 16.4 (C-29)]을 관측하여, Wu 등의 연구 [14]에서 보고된 문헌 값과 비교하여 PPT-type임을 확인하였다. 또한 Peng 등의 연구[15]에서 C-20의 carbon signal은 대개 72.9 ppm에서 관측되나, δ_c 83.2까지 저자장으로 이동한 것으로 보아 β -D-glucopyranose가 C-20의 수산기와 결합하여 glycosidation shift가 일어난 것임을 알 수 있었다. gHMBC 스펙트럼에서 glucopyranose의 anomer proton signal δ_H 5.12 (H-1')이 aglycone의 oxygenated quaternary carbon signal δ_c 83.2 (C-20)과 cross peak를 보여 glucopyranose가 20번 수산기

에 결합하는 것을 확인하였다. 두개의 methyl proton signal [δ_H 1.57 (3H, s, H-26), 1.57 (3H, s, H-27)]이 olefin methine carbon signal δ_H 5.22 (1H, dd, $J=6.0, 6.0$ Hz, H-24)과 cross peak가 확인되어 이중결합의 결합 위치를 결정하였다. 위 결과를 종합하여, 화합물 1을 Su 등 [16]이 보고한 문헌과 비교 분석한 결과, ginsenoside F1으로 구조 동정하였다.

화합물 2는 positive FAB-MS에서 m/z 807.5 [M+Na]⁺의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 784로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3410 cm^{-1})와 이중결합 (1657 cm^{-1})이 있는 것으로 확인되었다. 화합물 1과의 분자량 차이가 146인 것으로 보아 수산기가 하나 빠지고 육탄당이 하나 더 존재함을 예상하였다. NMR 데이터는 추가된 육탄당을 제외한 나머지 signal들이 화합물 1과 매우 유사한 값을 가지는 것을 확인하였다. 다만 NMR 스펙트럼에서 화합물 1과 비교하여 oxygenated methine signal이 사라지고 methylene signal [δ_H 1.53 (1H, H-6a), 1.42 (1H, H-6b); δ_c 18.4 (C-6)]이 관측됨에 따라 이 화합물의 aglycone이 protopanaxadiol (PPD)-type인 것을 예상하였다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 당으로부터 유래한 1개의 hemiacetal carbon signal δ_c 98.4 (C-1'), 4개의 oxygenated methine [δ_c 79.1 (C-3"), 78.2 (C-5"), 75.7 (C-2"), 71.9 (C-4")], 1개의 oxygenated methylene δ_c 63.0 (C-6") carbon signal이 추가로 관측됨에 따라, 이 당이 β -glucopyranose임을 확인하였다. 또한 Peng 등의 연구[15]에서 C-3 signal은 대개 78.5 ppm에서 관측되나, δ_c 88.7까지 저자장으로 이동한 것으로 보아 β -D-glucopyranose가 C-3에 위치할 것으로 예상되었고, gHMBC 스펙트럼에서 glucopyranose의 anomer proton signal δ_H 5.20 (H-1")이 aglycone의 oxygenated methine carbon signal δ_c 88.7 (C-3)과 cross peak를 보여 glucopyranose가 3번 수산기에 결합하는 것을 다시 한번 확인하였다. 위 결과를 종합하여 화합물 2를 Yang 등 [17]이 보고한 ginsenoside F2로 구조 동정하였다.

화합물 3은 positive FAB/MS 에서 m/z 793.5 [M+Na]⁺의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 770으로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3469 cm^{-1})와 이중결합(1655 cm^{-1})이 있는 것으로 확인되었다. 화합물 1과의 분자량 차이가 132인 것으로 보아 오탄당이 하나 더 존재함을 예상하였다. NMR 데이터는 추가된 오탄당을 제외한 나머지 signal들이 화합물 1과 매우 유사한 값을 가지는 것을 확인하였다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 당으로부터 유래한 1개의 hemiacetal carbon signal δ_c 104.4 (C-1"), 3개의 oxygenated methine [δ_c 73.9 (C-3"), 71.7 (C-2"), 69.1 (C-4")], 1개의 oxygenated methylene δ_c 65.3 (C-5") carbon signal이 추가로 관측됨에 따라, 추가로 결합한 당이 α -arabinopyranose임을 확인하였다. 또한 Seo 등의 연구[18]에서 C-6' carbon signal은 대개 62.5 ppm에서 관측되나, δ_c 68.3까지 저자장으로 이동한 것으로 보아 α -L-arabinopyranose가 C-6'의 수산기와 결합하여 glycosidation shift가 일어난 것임을 알 수 있었다. gHMBC 스펙트럼에서 arabinopyranose의 anomer proton signal δ_H 4.93 (H-1")이 glucopyranose의 oxygenated methylene carbon signal δ_c 68.3 (C-6')과 cross peak를 보여 arabinopyranose가 6번 수산기에 결합하는 것을 다시 한번 확인하였다. 위 결과를 종합하여 화합물 3을 ginsenoside F3 로 구조 동정 하였고, Li 등의 연구[19]에서 보고된 문헌 값과 비

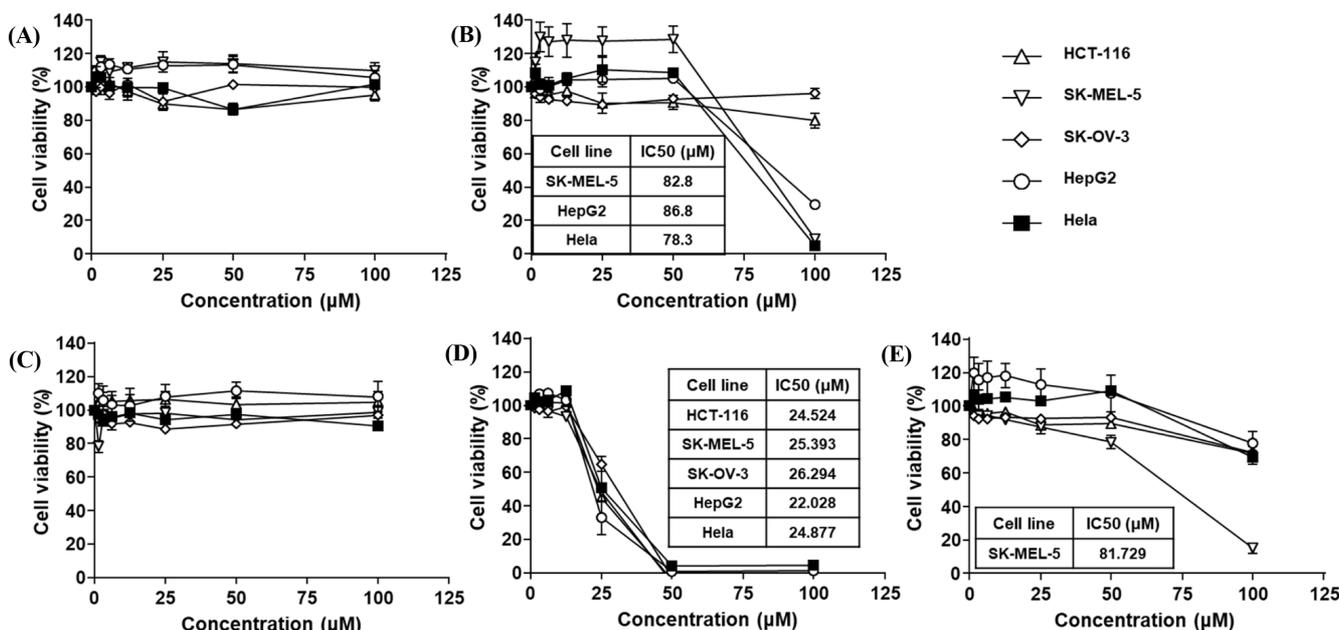


Fig. 2 The cytotoxicity of ginsenosides 1-5 isolated from the fruits of *Panax ginseng* against HCT-116, SK-OV-3, HeLa, HepG2, SK-MEL-5 cancer cell lines. A: ginsenoside F1, B: ginsenoside F2, C: ginsenoside F3, D: ginsenoside Ia, E: notoginsenoside Fe

교하였다.

화합물 4는 positive FAB/MS에서 m/z 823.5 $[M+Na]^+$ 의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 800으로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3401 cm^{-1})와 이중결합(1649 cm^{-1})이 있는 것으로 확인되었다. 화합물 1과의 분자량 차이가 162인 것으로 보아 육탄당이 하나 더 존재함을 예상하였다. NMR 데이터는 추가된 육탄당을 제외한 나머지 signal들이 화합물 1과 유사한 값을 가지는 것을 확인하였다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 당으로부터 유래한 1개의 hemiacetal carbon signal δ_{C} 107.1 (C-1"), 4개의 oxygenated methine [δ_{C} 78.2 (C-3"), 78.1 (C-5"), 75.0 (C-2"), 71.6 (C-4")], 1개의 oxygenated methylene δ_{C} 62.8 (C-6") carbon signal이 추가로 관측됨에 따라, 추가로 결합한 당이 β -glucopyranose임을 확인하였다. 또한 Peng 등의 연구[15]에서 C-3, C-20의 carbon signal은 대개 78.5, 72.9 ppm에서 관측되나, δ_{C} 88.8, 83.2까지 저자장으로 이동한 것으로 보아 β -D-glucopyranose가 각각 C-3과 C-20의 수산기에 결합하여 glycosidation shift가 일어난 것임을 알 수 있었다. gHMBC 스펙트럼에서 glucopyranose의 anomer proton signal δ_{H} 5.12, d, $J=7.8\text{ Hz}$, (H-1")이 aglycone의 oxygenated methylene carbon signal δ_{C} 90.8 (C-3)과 cross peak를 보여 glucopyranose가 3번 수산기에 결합하는 것을 다시 한번 확인하였다. 위 결과를 종합하여 화합물 4를 ginsenoside Ia로 구조 동정 하였고, Dou 등의 연구[20]에서 보고된 문헌 값과 비교하였다.

화합물 5는 positive FAB/MS에서 m/z 939.5 $[M+Na]^+$ 의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 917로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3401 cm^{-1})와 이중결합(1649 cm^{-1})이 있는 것으로 확인되었다. 화합물 2와의 분자량 차이가 133인 것으로 보아 오탄당이 하나 더 존재함을 예상하였다. NMR 데이터는 추가된 오탄당을 제외한 나머지 signal들이 화합물 2와 유

사한 값을 가지는 것을 확인하였다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 당으로부터 유래한 1개의 hemiacetal carbon δ_{C} 110.0 (C-1"), 3개의 oxygenated methine [δ_{C} 86.1 (C-4"), 83.1 (C-2"), 78.8 (C-3")], 1개의 oxygenated methylene δ_{C} 62.6 (C-5") carbon signal이 추가로 관측됨에 따라, 추가로 결합한 당이 α -arabinofuranose임을 확인하였다. 또한 Seo 등의 연구[18]에서 C-6" carbon signal은 대개 62.5 ppm에서 관측되나, δ_{C} 68.4까지 저자장으로 이동한 것으로 보아 α -L-arabinofuranose가 C-6"에 위치함을 예상하였고, gHMBC 스펙트럼에서 arabinofuranose의 anomer proton signal δ_{H} 5.59 (H-1")이 β -glucopyranose의 oxygenated methylene carbon signal δ_{C} 68.4 (C-6")과 cross peak를 보여 arabinofuranose가 6번 수산기에 결합하는 것을 다시 한번 확인하였다. 위 결과를 종합하여 화합물 5는 Wang 등 [21]이 보고한, notoginsenoside Fe로 구조결정하였다. 그러나, 화합물 2-5는 인삼열매에서는 이번이 처음 분리 보고되었다.

인삼 열매로부터 분리한 5종의 화합물을 5종의 인체 암세포주(HCT-116, SK-OV-3, HeLa, HepG2, SK-MEL-5)에 처리하여 세포독성을 측정하였다(Fig. 2). Ginsenoside F2는 SK-MEL-5 (82.8 μM), HepG2 (86.8 μM), HeLa (78.3 μM) 농도에서 각 암세포주의 세포 생존율이 50% 이하로 감소하였다. Ginsenoside Ia는 HCT-116 (24.5 μM), SK-MEL-5 (25.4 μM), SK-OV-3 (26.3 μM), HepG2 (22.0 μM), HeLa (24.9 μM) 농도에서 각 암세포주의 세포 생존율이 50% 이하로 감소하였다. Notoginsenoside Fe는 SK-MEL-5: 81.7 μM 농도에서 각 암세포주의 세포 생존율이 50% 이하로 감소하였다. 위 결과에 따르면 ginsenoside Ia는 5종의 모든 인체 암세포주에 대해 세포독성이 있었으며, ginsenoside F2는 피부암, 간암 및 자궁암에, notoginsenoside Fe는 피부암에 대한 세포독성이 나타났다. 화합물 2, 4, 5의 구조 모두 3번 수산기에 glucopyranose가 결합 되어있는 것을 확

인하였고, 위 결과에 따라 3번 수산기에 당이 결합되면 인체 암 세포주에 대해 세포독성이 나타나는 것을 알 수 있었다. 실험을 통해 인삼 열매로부터 분리한 5종의 ginsenoside가 인체 암 세포주에 대해 세포독성을 저해시키는 것을 확인하였다.

초 록

인삼(*Panax ginseng*) 열매를 80% MeOH 수용액으로 3회 반복 추출한 뒤, 감압 농축한 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH과 H₂O 층으로 계통 분획을 실시하였다. EtOAc분획에 대하여 SiO₂ 및 ODS column chromatography를 반복실시하여 5종의 ginsenoside 화합물을 분리 및 정제하였다. NMR, IR, FAB/MS 데이터를 해석하여, 각각 ginsenoside F1 (1), ginsenoside F2 (2), ginsenoside F3 (3), ginsenoside Ia (4) 및 notoginsenoside Fe (5)로 구조 동정 하였다. 화합물 2-5는 인삼열매에서는 이번이 처음 분리 보고되었다. 분리한 5종의 화합물을 인체 암세포주 (HCT-116, SK-OV-3, HeLa, HepG2, SK-MEL-5)에 처리하여 세포독성을 측정하였다. 이 중 화합물 2, 4, 및 5가 인체 암세포주에 대해 세포독성을 저해시키는 것을 알 수 있었다. 화합물 2는 SK-MEL-5, HepG2, HeLa세포에서 IC₅₀값이 82.8, 86.8, 78.3 μM로 확인되었다. 화합물 4는 HCT-116, SK-MEL-5, SK-OV-3, HepG2, HeLa 세포에서 IC₅₀ 값이 24.5, 25.4, 26.3, 22.0, 24.9 μM로 확인되었다. 화합물 5는 SK-MEL-5 세포에서 IC₅₀ 값이 81.7 μM로 확인되었다. 인삼 열매에서 분리한 화합물 2, 4, 및 5가 암세포주에 대해 강한 세포독성을 나타내는 것을 확인하였으며, 이 화합물들은 공통적으로 3번 수산기에 glucopyranose를 가지고 있음을 확인하였다.

Keywords 암세포독성 · 인삼 · 인삼열매 · 인체암세포주 · Ginsenoside

감사의 글 본 논문은 농림축산식품부 수출전략기술개발사업(과제번호: 314026-03-2-HD020)의 지원에 의해 이루어진 것입니다. 지원에 감사드립니다.

References

1. Gillis CN (1997) *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link. *Biochem Pharmacol* 54: 1–4
2. Li CP, Li RC (1973) An introductory note to ginseng. *Am J Chin Med* 1: 249–261
3. Singh VK, Agarwal SS, Gupta BM (1984) Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract. *Planta Med* 50(6): 462–465
4. Choi KT (2008) Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C A Meyer. *Acta Pharmacol Sin* 29(9): 1109–1118
5. Kim YS, Kang KS, Kim SI (1990) Study on antitumor and immunomodulating activities of polysaccharide fractions from *Panax*

- ginseng*: comparison of effects of neutral and acidic polysaccharide fraction. *Arch Pharm Res* 13(4): 330–337
6. Kim MH, Byon YY, Ko EJ, Song JY, Yun YN, Shin TK, Joo HG (2009) Immunomodulatory activity of ginsan, a Polysaccharide of *Panax ginseng*, on dendritic cells. *Korean J Physiol Pha* 13: 169–173
7. Lee DY, Kim HG, Lee YG, Kim JH, Lee JW, Choi BR, Jang IB, Kim GS, Baek NI (2018) Isolation and quantification of ginsenoside Rh23, a new anti-melanogenic compound from the leaves of *Panax ginseng*. *Molecules* 23(2): 267–278
8. Wang CZ, Wu JA, Mcentee E, Yuan CS (2006) Saponins composition in American ginseng leaf and berry assayed by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 54(6): 2261–2266
9. Yahara S, Tanaka O, Komori T (1976) Saponins of the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chem Pharm Bull* 24: 2204–2208
10. Chae SW, Kang KA, Chang WY, Kim MJ, Lee SJ, Lee YS, Kim HS, Kim DH, Hyun JW (2009) Effect of compound K, a metabolite of ginseng saponin, combined with α -ray radiation in human lung cancer cells in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 57: 5777–5782
11. Mai TT, Moon JY, Song YW, Viet PQ, Phuc PV, Lee JM, Yi TH, Cho MJ, Cho SK (2012) Ginsenoside F2 induces apoptosis accompanied by protective autophagy in breast cancer stem cells. *Cancer Lett* 321(1): 144–153
12. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahan J, Warren TJ, Bokesch H, Kenny S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82(13): 1107–1112
13. Shen R, Laval S, Cao X, Yu B (2018) Synthesis of A^{20} -ginsenosides Rh₄, (20*E*)-Rh₃, Rg₆, and Rk₁: a general approach to access dehydrated ginsenosides. *J Org Chem* 83(5): 2601–2610
14. Wu W, Qin Q, Guo Y, Sun J, Liu S (2012) Studies on the chemical transformation of 20(*S*)-protopanaxatriol (PPT)-type ginsenosides R_e, R_{g2}, and R_f using rapid resolution liquid chromatography coupled with quadruple-time-of-flight mass spectrometry (RRLC-Q-TOF-MS). *J Agr Food Chem* 60(40): 10007–10014
15. Peng M, Yi YX, Zhang D, Ding Y, Le J (2018) Stereoisomers of saponins in *Panax notoginseng*(Sanqi):a review front. *Pharmacol* 9(188): 1–18
16. Su L, Mo JG, Wei YL, Chen QH, Pan YK (2012) Chemical constituents of saponins from leaves of *Camellia euphlebica*. *Zhongcaoyao* 43(5): 877–879
17. Yang MC, Seo DS, Hong JK, Hong SH, Kim YC, Lee KR (2008) Ginsenosides from the roots of Korean cultivated-sild ginseng. *Nat Prod Sci* 14(3): 171–176
18. Seo S, Tomita Y, Tori K, Yoshimura Y (1977) Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shifts in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc* 100(11): 3331–3339
19. Li KK, Xu F, Gong XJ (2016) Isolation, purification and quantification of ginsenoside F5 and F3 isomeric compounds from crude extracts of flower buds of *Panax ginseng*. *Molecules* 21(3): 315/1-315/12
20. Dou D, Wen Y, Pei Y, Yao X, Chen Y, Kawai H, Fukushima H Ginsenoside-Ia: a novel minor saponin from the leaves of *Panax ginseng*. *Planta Med* 62(2): 179–181
21. Wang HP, Yang XB, Yang XW, Liu JX, Wang YP, Zhang LX (2013) Chemical constituents from roots and rhizomes of *Panax ginseng* cultivated in Jilin province. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 38(17): 2807–2817