

인삼의 Protopanaxadiol계 사포닌으로부터 20(R)-Ginsenoside Rh₂ 및 20(S) 이성체의 제조

김신일 · 백남인 · 김동선* · 이유희 · 강규상 · 박종대
한국인삼연구연구소 인삼효능부, *충남대학교 자연과학대학 생화학과
(Received September 26, 1991)

Preparation of a 20(R)-Ginsenoside Rh₂ and the 20(S) Epimer from Protopanaxadiol Saponins of *Panax ginseng* C.A. Meyer

Shin Il Kim, Nam In Baek, Dong Seon Kim*, You Hui Lee,
Kyu Sang Kang and Jong Dae Park
Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea
*Department of Biochemistry, College of Natural Sciences,
Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

Abstract—A mixture of 20(R)- and 20(S)-ginsenoside Rg₃ was obtained under mild acidic hydrolysis from protopanaxadiol saponins, ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc and Rd. The product was acetylated to give the peracetates, which were further converted into 20(R)-ginsenoside Rg₃, 20(S)-ginsenoside Rg₃, 20(R)-ginsenoside Rh₂ and 20(S)-ginsenoside Rh₂ by the direct alkaline treatment depending upon two kinds of temperature conditions respectively. The structure and physicochemical properties of a prosapogenin, 20(R)-ginsenoside Rh₂, were investigated.

Keywords □ 20(R)-ginsenoside Rg₃, 20(S)-ginsenoside Rg₃, 20(R)-ginsenoside Rh₂, 20(S)-ginsenoside Rh₂, ginseng saponin, prosapogenin, protopanaxadiol, ¹³C NMR.

인삼사포닌 구조에 관한 연구는 Shibata,¹⁾ Tanaka²⁾ 등에 의하여 활발하게 진행되어 왔다. 인삼 saponin을 크로마토그래피하여 그 Rf값이 커지는 순서로 ginsenoside Ro, Ra, Rb, Rc, Rd, Re, Rf, Rg, Rh(이하 ginsenoside는 생략, 기호만 표시)라 명명한 이래 각종 사포닌의 구조가 밝혀지고 단리방법³⁾이 확립됨으로서 순수분리된 개별 사포닌의 약리작용이 인삼의 약효와 연관되어 검토되기 시작하였다. 그러나 인삼(수삼, 백삼, 홍삼)에 많이 포함되어 있는 주요 saponin 성분과 관련하여는 약리 연구가 많으나 홍삼에 주로 포함되어 있거나 홍삼에만 존재하는 Rg나 Rh group의 미량성분⁴⁾에 관한 약리 연구는 거의 없는 실정이다.

최근에 암세포와 관련지워 인삼을 연구하는 학자들은 이들 성분에 대하여 관심을 가지고 있다.^{5,6)} Rh₂는 B₁₆ melanoma cell의 증식을 억제하며, Rh₁과 Rg₃

는 증식을 억제하지 않으나 melanine 합성을 농도의존적으로 촉진한다는 보고가 있다. Kitagawa 등⁴⁾은 Rh₂가 B16 뿐 아니라 Lewis lung cancer cell (3LL), Morris hepatoma cell(MH₁C₁)과 HeLa cell의 성장을 억제한다고 보고하였다.

수삼을 수증기처리(steamng)하면 다마렌(dammarane)계 사포닌은 구조적으로 불안정한 C-20의 제 3급 알콜의 배당체 결합이 쉽게 가수분해 되어 prosapogenin이 된다.^{7,8)} 이때 수산기는 반전평형반응을 일으켜 C-20(R), C-20(S)의 혼합물이 된다. 이렇게 하여 생성된 Rg₂, Rg₃, Rh₁과 Rh₂는 백삼에서 보다 홍삼쪽이 2~30배 많은 양으로 존재하는 것이 이를 증명해 주는 것이다.⁹⁾ 특히 Rh₂는 홍삼의 특유성분으로서 극히 미량 존재하기 때문에 이들 성분을 확보하기엔 많은 어려움이 있다. Rh₂의 순품을 얻기

위하여 Rg₃로부터 효소적인 방법^{9,10)}을 동원한 예가 있으나 수득률이 적어 실용성이 없다.

본 실험은 인삼사포닌을 약산으로 처리하여 C-20 epimer를 만들고 당 및 aglycone의 수산기를 acetyl화하여 두 epimer를 분리하고자 하였다. 최종산물인 두 화합물중 20(R)-Rh₂를 새로운 사포닌으로 동정하였다.

실험방법

재료—인삼 시료는 한국인삼연초연구소 증평시험장에서 재배한 88년산 6년근을 상법^{11,12)}에 따라 제조한 백삼(표피부착)을 사용하여 확립된 단리방법¹³⁾에 따라 필요한 ginsenoside를 분리 사용하였다.

시약—인삼사포닌 분리에 사용된 column chromatography용 packing material은 Kieselgel 60(70~230 mesh, Merck)을, 그외 시약은 모두 일급시약을 사용하였으며 각종 기기분석에 사용된 시약은 특급 또는 규정된 시약을 사용하였다.

기기—사용된 기기는 다음과 같다.

¹H&¹³C NMR : BRUKER Model AC300F

FAB MASS : VG-VSEQ(EBqQ type)/VG Analytical

Polarimeter : JASCO, DIP-370

HPLC : Waters Model 244 Equipped with Model 6000 pump

Elemental analyzer : Perkin-Elmer Model 240C

20(R&S)-ginsenoside Rg₃(5)의 제조—Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 각각 1.5g의 혼합물 6g을 50% acetic acid 200 ml에 용해시키고 2시간 동안 70°C에서 교반하면서 가열한 후 반응혼합물을 상온까지 식혔다. 반응액을 증류수 200 ml로 희석하고 n-butanol 100 ml로 3회 추출하였다. 추출액을 합하여 포화 NaHCO₃ 용액으로 2회 세척한 다음 n-butanol층을 감압 농축시켰다. 반응혼합물을 silica gel column chromatography(eluent ; CHCl₃ : MeOH : H₂O = 100 : 30 : 10)으로 분리하여 20(R&S) 혼합물을 얻었다(yield : 2.25g).

20(R&S)-ginsenoside Rg₃-peracetate(6)의 제조 및 R.S form의 분리—5 혼합물 1g을 acetic anhydride 20 ml, pyridine 20 ml로 4°C에서 하룻밤 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응생성물을 ethyl acetate 30 ml로 3회 추출하고 d-HCl 20 ml로서 3회, 포화

NaHCO₃ 20 ml로서 3회 세척한 다음 ethyl acetate 층을 감압농축하였다. 반응혼합물을 silica gel column chromatography(eluent ; CH₂Cl₂ : ethyl acetate = 6 : 1)로 분리하여 20(R)-Rg₃-peracetate(6a)와 20(S)-Rg₃-peracetate(6b)를 각각 730 mg, 670 mg을 얻었다.

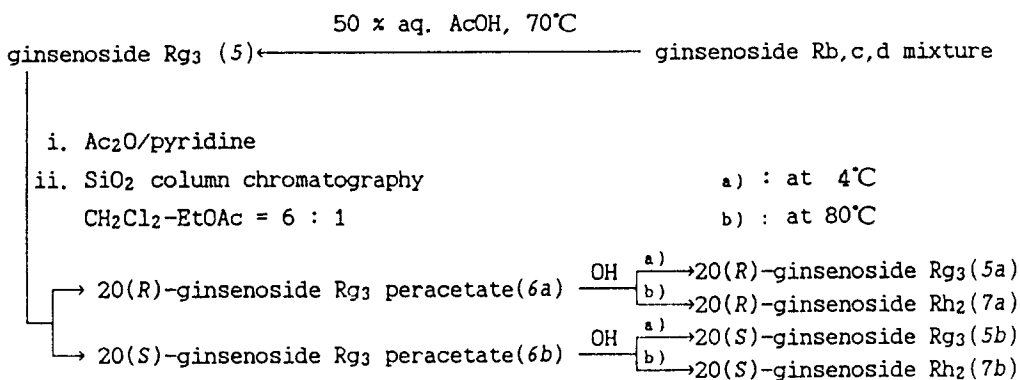
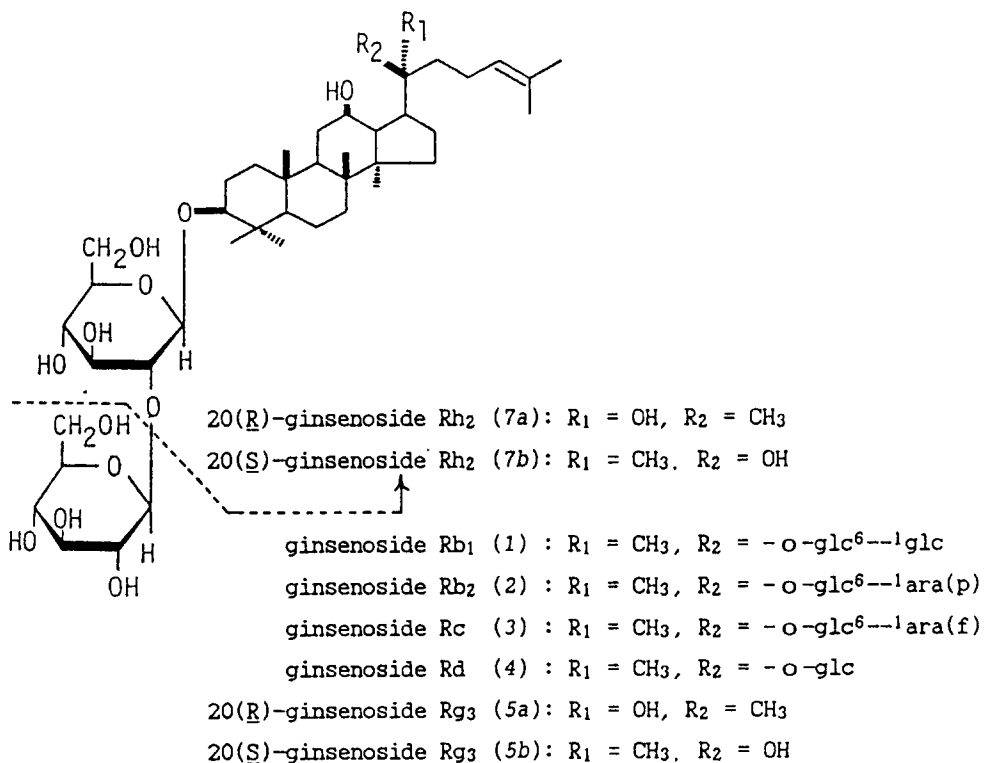
20(R)-Ginsenoside Rg₃(5a)와 20(S)-Ginsenoside Rg₃(5b)의 제조—6a 200 mg과 6b 200 mg을 각각 따로 4°C에서 NaOH-butanol(5%) 10 ml에 용해시키고 교반하면서 하룻밤 방치하였다. 반응혼합물을 증류수로 세척하고 butanol층을 감압 농축하였다. 이하 5의 제조 때와 같은 방법으로 5a와 5b를 semipreparative column(1×30 cm, Alltech-NH₂/eluent ; CH₃CN : H₂O = 90 : 10, Detector RI)을 이용한 HPLC로 순수분리하여 각각 84.2, 80.8 mg을 얻었다.

20(R)-Ginsenoside Rh₂(7a)와 20(S)-Ginsenoside Rh₂(7b)의 제조—6a 200 mg과 6b 200 mg을 각각 따로 NaOH-butanol(5%) 10 ml에 용해시키고 80°C에서 6시간 교반하면서 반응시켰다. 이하 20(R&S)-ginsenoside Rg₃의 제조 때와 같은 방법으로 7a와 7b를 얻고 semipreparative column(1×30 cm, Alltech-NH₂/eluent = CH₃CN : H₂O = 90 : 10, Detector RI)을 이용한 HPLC로 순수분리하여 각각 41.6 및 21.6 mg을 얻었다. 7a : colorless fine crystals(MeOH-aq. dioxane), mp. 208~210°C, $[\alpha]_D^{25}$ 6.2°(c=3.08, pyridine), IR ν(KBr, cm⁻¹) : 3420, 2940, 1630, pos. FAB MS(m/z) : 623(M+H)⁺, 443, 426, Anal. Calcd. for C₃₆H₆₂O₈·H₂O : C, 67.45 ; H, 10.07 Found : C, 67.38 ; H, 9.93, ¹H-NMR(300 MHz, d₅-Py., δ_c) 0.816, 0.976, 1.005, 1.034, 1.289, 1.384(21-CH₃), 1.646, 1.689(all 3H, all s, -CH₃), 3.35(1H, ddd-like, 12-H), 3.92(1H, dd-like, 3-H), 4.93(1H, d, J=7.6, 1'-H), 5.31(1H, t, J=6.8, 24-H).

결과 및 고찰

Ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc 그리고 Rd는 aglycone 즉 protopanaxadiol의 C-20 위치의 당의 배열이 다를 뿐이다. 이들 사포닌을 50% acetic acid로 가수분해하면 Scheme 1과 같이 C-20 위치의 epimer(R&S)가 생성된다. 이들 두 광학이성체는 직접 TLC나 silica gel column chromatography로 분리가 불가능하다.

Chen¹³⁾의 방법에 따라 두 이성체 혼합물을 acetic



Scheme I—Degradation of Ginseng Saponins

anhydride-pyridine으로 acetyl화 하면 쉽게 silica gel column chromatography로 분리할 수 있다. 분리된 peracetate 화합물들은 5% NaOH/butanol로 저온(4°C)에서 Rg₃, 고온(80°C)에서 반응시켜 Rh₂를 얻었다. 최종적으로 semipreparative column(1×30 cm, Alltech-NH₂ column/eluent; CH₃CN : H₂O=90 : 10)을 이용한 HPLC로 순수하게 모든 이성체를 분리하여 물리화학적 조사를 실시하였다.

순수분리된 두 이성체간의 비교는 ¹³C-NMR로서 쉽게 구별될 수 있다. Table I에서와 같이 Rg₃(R&S)는 42개의 carbon signal이, Rh₂(R&S)는 36개의 carbon signal이 각각 확인되었다. 즉 protopanaxadiol의 30개의 signal과 6개 또는 12개의 당의 signal도 쉽게 확인되었다. Anomeric carbon signal은 Rh₂의 경우 R과 S form은 각각 δ 106.94와 δ 106.92, Rg₃는 R과 S form이 각각 δ 105.12, δ 106.05와 δ 105.03, δ 105.92

Table I—¹³C-NMR chemical shift of 20(R)-Rg₃, 20(S)-Rg₃, 20(R)-Rh₂ and 20(S)-Rh₂ (75 MHz, d₅-Py., δ_c)

Compounds	20(R)-Rg ₃	20(S)-Rg ₃	20(R)-Rh ₂	20(S)-Rh ₂	
Aglycone	C-1	39.13	39.07	39.12	39.12
	C-2	26.72	26.66	26.70	27.05
	C-3	88.91	88.89	88.77	88.78
	C-4	39.70	39.64	39.68	39.66
	C-5	56.36	56.30	56.36	56.35
	C-6	18.44	18.37	18.46	18.43
	C-7	35.17	35.10	35.16	35.13
	C-8	40.00	39.93	40.02	40.00
	C-9	50.37	50.31	50.38	50.38
	C-10	36.91	36.85	36.94	36.94
	C-11	32.15 ^{a)}	31.95 ^{a)}	32.15 ^{a)}	32.02 ^{a)}
	C-12	70.88	70.95	70.85	70.96
	C-13	49.21	48.50	49.19	49.54
	C-14	51.76	51.64	51.69	51.69
	C-15	31.41 ^{a)}	31.28 ^{a)}	31.42 ^{a)}	31.32 ^{a)}
	C-16	26.63	26.78	26.62	26.70
	C-17	50.62	54.71	50.62	54.77
	C-18	16.59 ^{b)}	16.54 ^{b)}	16.77 ^{b)}	16.77 ^{b)}
	C-19	15.82 ^{b)}	15.76 ^{b)}	15.82 ^{b)}	15.61 ^{b)}
	C-20	72.97	72.93	72.96	72.94
	C-21	22.60	27.00	22.75	26.83
	C-22	43.25	35.81	43.24	35.88
	C-23	22.76	22.93	22.95	22.97
	C-24	126.05	126.24	126.05	126.30
	C-25	130.77	130.71	130.76	130.73
	C-26	25.62 ^{b)}	25.77 ^{b)}	25.62 ^{b)}	25.78 ^{b)}
	C-27	17.70	17.63	17.69	17.66
	C-28	28.11	28.05	28.13	28.14
	C-29	16.37 ^{b)}	16.29 ^{b)}	16.37 ^{b)}	16.34 ^{b)}
	C-30	17.30 ^{b)}	16.95 ^{b)}	17.31 ^{b)}	17.65 ^{b)}
β-D-gluco-pyranosyl	C-1	105.12	105.03	106.94	106.92
	C-2	83.45	83.27	75.76	75.76
	C-3	78.25 ^{c)}	78.27 ^{c)}	78.72 ^{c)}	78.72 ^{c)}
	C-4	71.62	71.54	71.65	71.65
	C-5	77.14 ^{c)}	77.03 ^{c)}	78.34 ^{c)}	78.34 ^{c)}
	C-6	62.64	62.76	63.05	63.05
β-D-gluco-pyranosyl	C-1	106.05	105.92		
	C-2	77.95	77.89		
	C-3	78.33 ^{c)}	78.27		
	C-4	71.64	71.59		
	C-5	78.11 ^{c)}	78.03		
	C-6	62.69	62.65		

a), b) and c) assignments may be interchangeable within the same vertical column.

에서 각각 나타났다. Asymmetric carbon(C-20)을 중심으로 인접한 C-17, C-21, C-22의 chemical shift는 Rh₂의 두 이성체간 δ 54.77과 δ 50.62, δ 26.83과 δ

22.75, δ 35.88과 δ 43.24로서 각각 4.15, 4.08, 7.36 ppm의 차이가 인정되었다. 마찬가지로 Rg₃의 경우 두 이성체간 δ 54.71과 δ 50.62, δ 27.00과 δ 22.60,

Table II—The differences of the proton chemical shift for various methyl groups between two epimers of Rg₃ and Rh₂, respectively.

20(R)-Rg ₃	20(S)-Rg ₃	Difference	20(R)-Rh ₂	20(S)-Rh ₂	Difference
0.784	0.782	0.002	0.816	0.801	0.015
0.980	0.977	0.003	0.976	0.959	0.017
0.980	0.977	0.003	1.005	0.978	0.027
1.007	1.025	0.018	1.034	1.052	0.018
1.310	1.300	0.010	1.289	1.291	0.002
1.360	1.412	0.052	1.384	1.436	0.052
1.606	1.606	—	1.646	1.632	0.014
1.633	1.647	0.014	1.689	1.667	0.022

Table III—The specific rotation of 20R-, and 20S-Prosapogenin

Product	$[\alpha]_D^{25}$	$[\alpha]_D^{25}$ ^{a)}	$[\alpha]_D^{25}$ ^{b)}
20(R)-Ginsenoside Rg ₃	-11.5°(C=1.30, pyridine)	-14.0°(C=0.26, pyridine)	
20(S)-Ginsenoside Rg ₃	+15.8°(C=1.80, MeOH)	+16.5°(C=1.00, MeOH)	
20(R)-Ginsenoside Rh ₂	-6.2°(C=3.08, pyridine)		
20(S)-Ginsenoside Rh ₂	+20.4°(C=1.91, MeOH)		+21.8(C=0.93, MeOH)

a) Kaku, b) Kitagawa

δ 35.81과 δ 43.25로서 각각 4.09, 4.40, 7.44 ppm의 차이가 인정되며 비교되는 두 이성체가 명백히 R form과 S form으로 구별됨을 알 수 있었다.

이러한 자료들은 Rg₃(R&S)와 Rh₂(S)의 경우 Kitagawa,⁴⁾ 松浦¹⁴⁾ 등이 보고한 chemical shift 값과 잘 일치하였다.

¹H-NMR의 경우 두 이성체간 당이나 aglycone 골격의 proton chemical shift가 거의 차이가 없으나 골격에 붙어있는 각종 methyl기의 값이 Table II와 같이 약간의 shift가 인정되었다. 특히 C-20에 붙어 있는 methyl기는 Rg₃나 Rh₂ 두 입체이성체간 약 0.5 ppm의 shift가 인정되었다. 이는 C-20에서 C-27까지의 입체구조가 모핵과 가장 안정한 상태에 있을 때 C-20과 C-12의 hydroxy기의 수소결합에 의하여 S form이 다소 downfield shift한 것으로 사료된다.

두 이성체간의 명백한 차이는 비선광도 값으로 판정할 수 있었다. Table III에서 Kitagawa 등,⁴⁾ Kaku 등¹⁵⁾이 보고한 비선광도 값과 비교하였다. 20(R)-Rg₃의 비선광도 값이 Kaku 등이 보고한 값과 2.5° 정도 차이가 있으나 이는 이성체간의 분리방법의 차이 즉 Kaku 등은 20(S)-, 20(R)-Rg₃의 혼합물을 methanol의 용해도 차이에 의하여 분리하였기 때문이라 생각된다. 20(S)-Rh₂는 Kitagawa 등이 보고한 data와 거의 일치하였다. 20(R)-Rh₂값은 -6.2°로서 이는 20

(S)-Rh₂값과 명백히 차이가 나고, FAB MASS에서 [M+H]⁺가 623에서 확인되었으므로, 위에서 언급한 모든 자료를 종합하여 이 물질을 20(R)-protopanaxadiol-3-[O-β-D-glucopyranoside]로 결정하였다.

결 론

인삼사포닌 중 protopanaxadiol계 saponin인 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc 그리고 Rd의 혼합물을 50% acetic acid로 가수분해하여 C-20 위치의 epimer 혼합물인 C-20(R&S)-ginsenoside Rg₃를 얻었다. 이 혼합물은 acetic anhydride/pyridine으로 peracetyl화하여 silica gel column chromatography 하면 쉽게 입체이성체를 분리할 수 있다. 각각의 이성체를 5% NaOH/butanol로 처리하여 저온(4°C)에서 Rg₃를, 고온(80°C)에서 Rh₂를 얻었다.

새로운 사포닌인 20(R)-ginsenoside Rh₂의 물리화학적 자료를 종합하였다.

문 헌

- 1) Shibata, S.: Some Chemical Studies on Ginseng, Proc. 1st Int. Ginseng Symp. 69(1974).
- 2) Tanaka, O.: Chemistry of Ginseng-saponin, Proc.

- 2nd Int, Ginseng Symp. 145(1978).
- 3) 김만옥, 최강주, 박종대, 위재준, 고성룡, 김석창, 노길봉: 사포닌 화합물 및 비사포닌 분획중 활성 성분의 분리 및 정제연구, 인삼연구보고서, 한국인삼연구연구소, 145(1986).
 - 4) a) Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Yoshihara, M., Hayashi, T. and Taniyama, T.: Chemical Studies on Crude Drug Procession. *Yakugaku Zasshi* **103**, 612 (1983).
b) Kitagawa, I.: Chemical Studies on Crude Drug Processing. Proc. 4th Int. Ginseng Symp., 159(1984).
 - 5) 太原充子, 甲野裕之, 宗志平, 小田島肅夫, 北川勳, 阿部博子, 林輝明, 有地滋: Ginsenoside의 癌細胞에 對する作用 (癌細胞의 增殖抑制及 び 再分化誘導에 對하여). 和漢醫藥學會誌 **2**, 170(1985).
 - 6) 太田隆英, 松田建志, 石井永一, 小田島肅夫, 西川克三, 北川勳, 阿部博子, 有地滋, 林輝明: Ginsenoside의 癌細胞에 對する作用(癌細胞의 增殖動態에 對する作用中心에). 和漢醫藥學會誌 **2**, 172(1985).
 - 7) Shibata, S., Ando, T. and Tanaka, O.: Chemical Studies on the Oriental Plant Drugs. XVII. The Prosapogenin of the Ginseng Saponins. *Chem. Pharm. Bull.* **14**, 1157(1966).
 - 8) Han, B.H., Park, M.H., Han, Y.N., Woo, L.K., Sankawa, U., Yahara, S. and Tanaka, O.: Degradation of Ginseng Saponins Under Mild Acidic Conditions. *Planta Medica* **44**, 146(1982).
 - 9) Koizumi, H., Sanada, S., Ida Y. and Shoji, J.: Study on the Saponins of Ginseng, On the Structure and Enzymatic Hydrolysis of Ginsenoside-Ra₁. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 2293(1982).
 - 10) Kohda, H. and Tanaka, O.: Enzymatic Hydrolysis of Ginseng Saponins and Their Related Glycosides, *Yakugaku Zasshi* **95**, 246(1975).
 - 11) 고려인삼연구소: 고려인삼, 삼화인쇄, 서울, 180(1978).
 - 12) 전매청: 인삼 및 인삼제품 규제에 관한 법률, 홍삼사업법(1973).
 - 13) Chen, Y., Nose, M. and Ogihara, Y.: Alkaline Cleavage of Ginsenosides. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1653 (1987).
 - 14) 松浦廣道: 藥用人蔘および近縁植物配糖體の化學的研究. 廣島大學醫學部 藥學科 博士學位論文, 130 (1985).
 - 15) Kaku, T. and Kawashima, Y.: Chemical Studies of Saponin of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Arzneim. Forsch. Drug Res.*, **30**, 936(1980).