

## 2D-NMR 기법을 이용한 (20S)와 (20R)-Protopanaxadiol의 <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR 완전 동정

백남인 · 김동선<sup>1</sup> · 이유희 · 박종대 · 정소영 · 이천배<sup>1</sup> · 김신일  
한국인삼연구소연구원 인삼효능부, <sup>1</sup>충남대학교 자연과학대학 생화학과  
(1994년 2월 10일 접수)

### Complete Assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR Signals for (20S) and (20R)-Protopanaxadiol by 2D-NMR Techniques

Nam-In Baek, Dong Seon Kim<sup>1</sup>, You Hui Lee, Jong Dae Park, So Young Jeong,  
Chun Bae Lee<sup>1</sup> and Shin Il Kim

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chung Nam University, Taejeon 305-764, Korea

(Received February 10, 1995)

**Abstract** (20S)- and (20R)-protopanaxadiol were prepared from crude ginseng saponin by chemical treatment. The <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR signals of these compounds were fully assigned by various NMR techniques such as DEPT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC and NOESY.

**Key words** (20S)-protopanaxadiol, (20R)-protopanaxadiol, 2D-NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC, NOESY.

#### 서 론

사포닌은 인삼뿌리 중에 3~4%나 함유되어 있는<sup>1)</sup> 주성분으로, 인삼의 약효를 나타내는 주요물질의 하나로 알려져 있다. 지금까지 29종의 사포닌이 인삼으로부터 분리되어,<sup>2)</sup> ginsenoside로 명명<sup>3)</sup>되어 있으며, 그 비당부의 구조에 따라 3종으로 대별된다. Protopanaxadiol을 비당부로 갖는 사포닌이 20종, protopanaxatriol이 8종이며, oleanolic acid의 경우는 ginsenoside Ro 1종 뿐이다.

Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc 및 Rd와 같은 protopanaxadiol(PPD)계 주종 사포닌에 대하여는 약리효능 연구가 활발히 이루어져, 인체의 광범위한 영역에서 약효를 나타내는 것으로 밝혀져 있으나, 대부분의 미량 사포닌은 시료 공급이 제한되어 있어 약리효능에 관하여 연구보고된 바가 아주 적다. 최근 들어 미량

사포닌인 ginsenoside Rh<sub>2</sub>가 항암활성과 관련하여 여러 가지 유용한 약리효능을 가지고 있음이 보고됨<sup>4-7)</sup>에 따라, 이러한 미량 사포닌을 화학적으로 합성하고자 하는 연구가 이루어지고 있다.<sup>8,9)</sup> 이때 가장 문제가 되는 것이 그 비당부인 protopanaxadiol의 제조인데, 보통 배당체는 산으로 가수분해하면 쉽게 그 비당부를 얻을 수 있으나, protopanaxadiol과 같은 dammarane계의 경우는 산가수분해할 때 C-20의 수산기와 C-25의 이중결합 사이에서 tetrahydropyran 환구조가 형성되면서 panaxadiol이라는 새로운 유사 비당부가 주로 얻어진다.

저자 등은 protopanaxadiol을 3번의 입체구조만이 다른 betulafolienetril을 자작나무잎으로부터 분리한 후, 화학적 반응을 이용하여 protopanaxadiol을 제조하였고,<sup>10)</sup> 인삼의 PPD계 조사포닌을 알칼리 처리하여 protopanaxadiol을 제조하는 몇 가지 방법을 확립<sup>10)</sup>



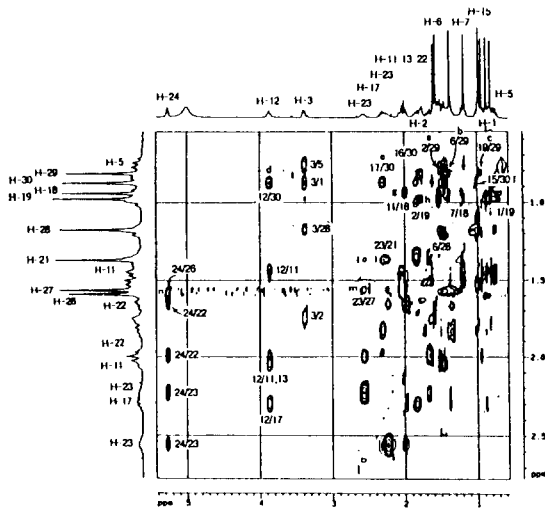


Fig. 2. NOESY Spectrum of (20S)-protopanaxadiol(1).

ginsenoside Rg<sub>3</sub>로부터 제조된(20R&S)-protopanaxadiol의 혼합물을 용출용매로 *n*-hexane-EtOAc(1:1)을 사용하여 silica gel column chromatography 하였을 때에 용이하게 분리할 수 있었다.

(20S)-protopanaxadiol(1)의 <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, d<sub>5</sub>-Py)에 있어서의 대부분의 signal이 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY(Fig. 1-1, 1-2)로부터 동정되었다. 3.34 ppm에서 관측된 H-3 signal로부터 H-2와 H-1의 methylene signal이, 3.83 ppm에서 관측된 H-12 signal로부터 H-11, H-9 및 H-13, H-17, H-16, H-15 signal을 각각 동정할 수 있었다. 또한 H-24(δ 5.22)의 olefinic proton으로부터 H-23과 H-22 methylene signal을 동정할 수 있었을 뿐만 아니라, 원격 coupling하고 있는 H-26과 H-27 (peak a 및 b)의 singlet methyl signal을 동정할 수 있었다. 한편, H-5 methine signal은 가장 고자장(δ 0.72)에서 관측이 되었는데, 이 signal로부터 H-6과 H-7 methylene signal이 동정되었다.

다른 signal들과 겹쳐서 나타나 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY에 의해서는 동정이 모호했던 몇 개의 signal과, singlet으로 관측이되는 8개의 methyl signal은 NOESY(Fig. 2) spectrum으로부터 확인할 수 있었다. 즉, CH<sub>3</sub>-29 signal은 peak a(H-29/H-2), peak b(H-29/H-6) 및 peak c(H-29/H-19)로부터, CH<sub>3</sub>-30 signal은 peak d(H-30/H-12), peak e(H-30/H-17) 및 peak f(H-30/H-15)로부터, CH<sub>3</sub>-18 signal은 peak g(H-18/H-11)로부터, CH<sub>3</sub>-19 signal은 peak h(H-19/H-2) 및 peak i(H-19/H-

Table 1. <sup>1</sup>H-NMR of (20S)-(1) and (20R)-protopanaxadiol(2) (400 MHz, d<sub>5</sub>-Py).

No. of H	(20S)-protopanaxadiol(1)	(20R)-protopanaxadiol(2)
H-1	0.87(1H, ddd-like) 1.57(1H, ddd-like)	0.84(1H, ddd-like) 1.57(1H, ddd-like)
H-2	1.72(1H, m) 1.78(1H, m)	1.71(1H, m) 1.74(1H, m)
H-3	3.44(1H, dd, J=5.3, 10.8)	3.34(1H, dd, H=5.2, 10.6)
H-5	0.72(1H, dd, J=2.0, 11.0)	0.74(1H, dd, J=2.1, 10.1)
H-6	1.37(1H, m) 1.42(1H, m)	1.41(1H, m) 1.51(1H, m)
H-7	1.15(1H, ddd-like) 1.47(1H, ddd-like)	1.18(1H, br.dd, J=2.6, 12.0) 1.49(1H, ddd-like)
H-9	1.43(1H, dd-like)	1.48(1H, ddd-like)
H-11	1.45(1H, ddd-like) 2.00(1H, ddd-like)	1.44(1H, ddd-like) 2.02(1H, br.dd, J=4.2, 6.2)
H-12	3.83(1H, ddd, J=5.2, 10.4, 10.4)	3.85(1H, ddd, J=5.2, 10.5, 10.5)
H-13	1.97(1H, dd, J=10.4, 10.4)	1.94(1H, dd, J=10.5, 10.5)
H-15	0.95(1H, ddd-like) 1.49(1H, ddd-like)	0.98(1H, ddd-like) 1.52(1H, ddd-like)
H-16	1.32(1H, m) 1.82(1H, m)	1.30(1H, m) 1.85(1H, m)
H-17	2.26(1H, ddd, J=7.4, 10.4, 10.4)	2.30(1H, ddd, J=7.3, 10.5, 10.5)
H-18	0.90(3H, s)	0.95(3H, s)
H-19	0.94(3H, s)	0.96(3H, s)
H-21	1.33(3H, s)	1.31(3H, s)
H-22	1.63(1H, ddd-like) 1.93(1H, ddd-like)	1.61(1H, ddd-like) 1.64(1H, ddd-like)
H-23	2.21(1H, m) 2.51(1H, m)	2.32(1H, m) 2.39(1H, m)
H-24	5.22(1H, dd, J=7.0, 7.0)	5.23(3H, s)
H-26	1.55(3H, s)	1.60(3H, s)
H-27	1.53(3H, s)	1.56(3H, s)
H-28	1.44(3H, s)	1.15(3H, s)
H-29	0.78(3H, s)	0.81(3H, s)
H-30	0.84(3H, s)	0.88(3H, s)

1)으로부터 동정이 되었고, CH<sub>3</sub>-28 signal은 peak i(H-28/H-3) 및 peak k(H-28/H-6)로부터 CH<sub>2</sub>-21 signal은 peak l(H-21/H-23)로부터, CH<sub>3</sub>-27과 CH<sub>3</sub>-26은 각각 peak m(H-27/H-23)과 peak n(H-26/H-24)으로부터 동정이 되었다. 이밖에 미확인된 signal들은 HMQC spectrum을 상세히 조사하여, (20S)-protopanaxadiol(1)의 전 수소의 signal을 Table 1과 같이 동정하였다.

(20S)-protopanaxadiol(1)의 <sup>13</sup>C-NMR에 있어서의 각 탄소의 chemical shift는 이전에 보고된 바<sup>11)</sup>에 따르면(Table 2) C-1과 C-4가 구별되어 있지 않고,

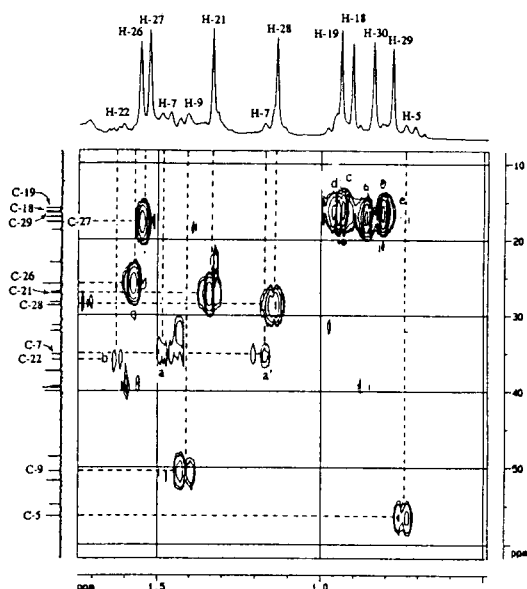


Fig. 3. HMQC Spectrum of (20S)-protopanaxadiol(1).

C-18, C-19, C-29는 사람에 따라 다른 결과<sup>11, 12)</sup>를 보여주고 있다. 본 논문에서는 DEPT와 HMQC(Fig. 3)를 측정하여 각 탄소의 chemical shift를 명확하게 동정하였다. C-7과 C-22의 chemical shift는 1의 HMQC에 있어서의 peak a와 peak b로부터 각각  $\delta$  35.17과  $\delta$  35.86로 동정하였고, C-1과 C-4의 경우는 <sup>13</sup>C-NMR에 있어서의 두 signal이 서로 근접하여 HMQC spectrum에서는 구별하기가 힘들었으나, DEPT로부터 methylene과 quaternary 탄소를 측정하여 각각  $\delta$  39.32과  $\delta$  39.54로 동정할 수 있었다. 또한 C-18, C-19 및 C-29의 chemical shift는 Fig. 3의 HMQC spectrum에 있어서의 peak c, d 및 e로부터 각각  $\delta$  16.31,  $\delta$  15.84,  $\delta$  16.44로 동정되었다. 그외의 탄소의 chemical shift도 HMQC를 상세히 조사하여 동정하였으나 다만 4급 탄소의 경우 수산기가 결합하고 있는 C-20이나 olefinic 탄소인 C-25와 같이 저자장측에서 관측되어 구별이 용이한 것을 제외하면 HMQC로는 동정이 불가능하다.

4급 탄소의 <sup>13</sup>C-NMR에 있어서의 chemical shift를 동정하기 위하여 화합물 1에 대하여 HMBC(Fig. 4)를 측정하였다. C-10은 Fig. 4의 peak a(C-10/H-29)로부터, C-4는 peak b(C-4/H-28)와 peak c(C-4/H-29)로부터, C-8은 peak d(C-8/H-18) 및 peak e(C-8/H-30)

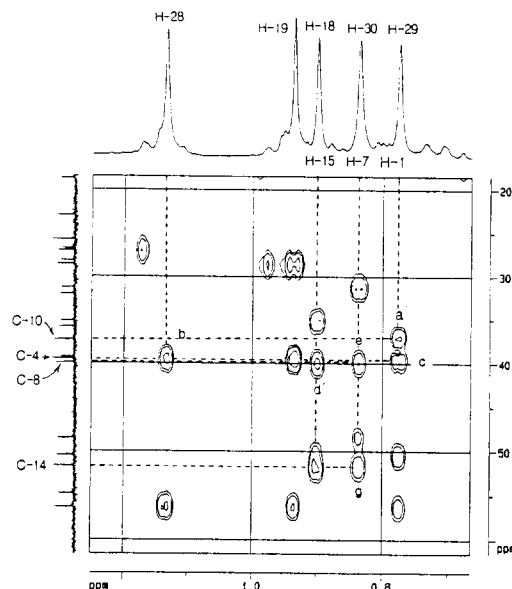


Fig. 4. HMBC Spectrum of (20S)-protopanaxadiol(1).

로부터, 그리고 C-14는 peak f(C-14/H-18) 및 peak g(C-14/H-30)로부터 각각 동정되었다.

위의 결과를 종합하여 (20S)-protopanaxadiol(1)의 <sup>13</sup>C-NMR의 chemical shift를 Table 2와 같이 명확하게 동정하였다.

(20R)-protopanaxadiol(2)은 (20S) 배치를 가진 diol계 인삼 사포닌의 20번 수산기에 결합되어 있던 당이 SN1 반응 기작에 의해 수산기로 치환되며 (20S)-protopanaxadiol(1)과 함께 생성된 것으로 추정된다. (20R)-protopanaxadiol(2)의 <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, d<sub>5</sub>-Py)에 있어서 각 수소의 chemical shift는 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY를 측정하여 동정하였으며, singlet으로 관측되는 8개의 methyl기는 NOESY를 이용하여 결정하였다.

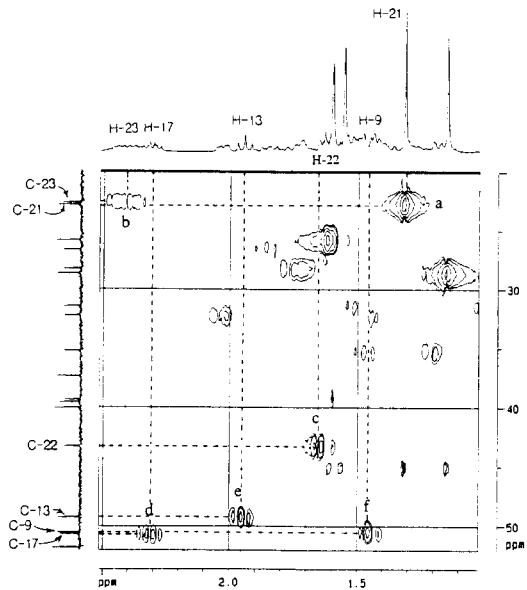
(20S)-protopanaxadiol(1)과 <sup>1</sup>H-NMR을 비교해 보면, C-20의 입체구조가 바뀌에 따라 주변의 전체적인 형태가 변한 것을 알 수 있다. 물론 C환과 D환의 경우가 가까이 위치해 있지만, 환구조의 경우 입체적 장애 때문에 거의 변화가 없었고, C-20에서 C-27까지의 사슬구조의 경우는 뚜렷이 바뀐 것을 알 수 있다. 즉, 화합물 1의 경우 22번과 23번 methylene의 각 2개의 수소 signal이 H-22의 경우 1.63 ppm과 1.93 ppm, 그리고 H-23의 경우 2.21 ppm과 2.51 ppm에서 관측이 되어, geminal 위치의 수소들끼리 chemical shift 값의

**Table 2.**  $^{13}\text{C}$ -NMR of (20S)-(1) and (20R)-protopanaxadiol(2) (400 MHz,  $d_5$ -Py).

No. of H	(20S)-protopanaxadiol(1)		(20R)-protopanaxadiol(2)	
	Past <sup>11)</sup>	Present	Past <sup>11)</sup>	Present
1	39.5	39.32	39.5	39.24
2	28.2	28.24	28.2	28.25
3	77.9	77.94	78.0	77.94
4	56.3	56.32	56.4	39.55
5	56.3	56.32	56.4	56.34
6	18.7	18.74	18.8	18.77
7	35.2	35.17	35.3	35.21
8	40.0	40.00	40.1	40.03
9	50.4	50.47	50.6	50.48
10	37.3	37.33	37.4	37.35
11	32.0	32.08	42.2	32.22
12	70.9	71.00	70.8	70.88
13	48.5	48.55	49.2	49.21
14	51.6	51.70	51.7	51.77
15	31.8	31.33	31.5	31.43
16	26.8	26.83	26.6	26.63
17	54.7	54.80	50.6	50.63
18	16.2	16.31	16.3	16.31
19	15.8	15.84	15.9	15.86
20	72.9	72.91	72.9	72.94
21	26.9	27.06	22.7	22.78
22	35.8	35.86	43.2	43.25
23	22.9	22.98	22.7	22.60
24	126.2	126.30	126.0	126.03
25	130.6	130.75	130.6	130.76
26	25.8	25.81	25.9	25.82
27	17.6	17.67	17.7	17.69
28	28.6	28.66	28.7	28.67
29	16.4	16.44	16.5	16.47
30	17.0	17.00	17.3	17.32

차가 0.3 ppm으로 비교적 컸으나, 화합물 2의 경우 H-22의 두개의 수소 signal이 2.36 ppm 부근에서 함께 관측이 되어, geminal 수소간에 chemical shift 값의 차이가 아주 작았다. 또한 2의 8개의 singlet methyl signal 중 7개의 signal이 모두 1에 비해 약 0.01 ppm에서 0.05 ppm까지 저자장으로 이동되어 관측이 되었으나, 유독 21번의 methyl기만은 0.02 ppm 고자장으로 이동되어 관측된 것을 알 수 있다.

(20R)-protopanaxadiol(2)의  $^{13}\text{C}$ -NMR(100 MHz,  $d_5$ -Py)에 있어서의 chemical shift 값은 (20S)-protopanaxadiol(1)과 거의 유사하였으나, 다만 C-20의 입체구조가 변함에 따라 주위에 위치한 C-17, C-21, C-22의 값이 크게 변하게 되는데, HMQC(Fig. 5)를 이용하여,

**Fig. 5.** HMQC Spectrum of (20R)-protopanaxadiol(2).

각각 동정하였다. C-21은 peak a로부터 동정하였고, 이와 근접하여 관측되는 C-23은 peak b로부터 동정하였다. 이때 두 signal은 chemical shift 값의 차이가 0.18 ppm 밖에 나지 않아 HMQC로부터는 확실히 동정하기 어려웠으나, DEPT에 의해 methyl 탄소인 C-21과 methylene 탄소인 C-23을 구별할 수 있었다. 또한 C-22는 peak c로부터 동정하였고, C-17 및 그와 유사한 chemical shift 값을 보이는 C-13과 C-9는 각각 peak d, peak e 및 peak f로부터 동정하였다. 위와 같이 하여 동정된  $^1\text{H}$ - 및  $^{13}\text{C}$ -NMR의 data를 Table 1과 2에 정리하였다.

## 요 약

인삼의 다이올계 조사포닌 분획으로부터 몇 단계의 화학반응을 이용하여 (20S)-protopanaxadiol 및 그 입체이성질체인 (20R)-protopanaxadiol을 제조하였다. 또한 DEPT,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COST, HMQC, HMBC 및 NOESY와 같은 여러 가지 NMR 기법을 이용하여 두 화합물의  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR의 signal들을 완전히 동정하였다.

## 인 용 문 헌

1. 이광승, 도재호, 장진규, 노길봉, 이성계, 한중순, 임순빈 : 한국인삼연초연구소 인삼연구보고서(효능 및 제품분야), p. 232 (1991).
2. Morita, T. : *Hiroshima Univ. Doctoral Thesis*, p. 6 (1986).
3. Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsuchishima, S. and Ohsawa, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 595 (1966).
4. Kitagawa, I. : *Proc. 4th Int'l Ginseng Symp.*, p. 159 (1984).
5. Odashima, S., Ohta, T., Kohno, H., Matsuda, T., Kitagawa, I., Abe, H. and Arichi, S. : *Cancer Research*, **45**, 2781 (1985).
6. Ota, T., Fujikawa-yamamoto, K., Zong, Z., Yamazaki, M., Odashima, S., Kitagawa, I., Abe, H. and Arichi, S. : *Cancer Research*, **47**, 3863 (1987).
7. Lee, H. Y., Kim, S. I., Lee, S. K., Chung, H. Y. and Kim, K. W. : *Proc. 6th Int'l. Ginseng Symp.*, p. 127 (1993).
8. Kim, S. I., Baek, N.-I., Kim, D. S., Lee, Y. H., Kang, K. S. and Park, J. D. : *Yakhak Hoeji*, **35**, 432 (1991).
9. Cha, B. C. and Lee, S. G. : *Yakhak Hoeji*, **38**, 425 (1994).
10. 김신일, 박종대, 백남인, 이유희, 정소영 : 한국인삼연초연구원 인삼연구보고서(제품분야), 인쇄중 (1994).
11. Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Yoshihara, M., Hayashi, T. and Taniyama, T. : *Yakugaku Zasshi*, **103**, 612 (1983).
12. Asakawa, J., Kasai, R., Yamasaki, K. and Tanaka, O. : *Tetrahedron*, **33**, 1935 (1977).