

人蔘사포닌의 免疫化學的 分析法(I)

人蔘사포닌-蛋白質 結合體의 合成

韓 秉 勳·韓 龍 男*

서울대학교 藥學大學·江原대학교 自然科學大學*

(Received May 30, 1981)

Byung Hoon Han and Yong Nam Han*

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110 and *Department of Chemistry, Kangweon National University, Chuncheon 200, Korea

Immunochemical Assay for Korean Ginseng Saponins I Synthesis of Ginsenoside-Protein Conjugate

Abstract—In an attempt to obtain a saponin antigen, ginsenoside Rg₁ of Korean ginseng was condensed with bovine serum albumin through a series of modification in the side chain structure of ginsenoside Rg₁ to prepare a reactive intermediate Rg₁ azide. The modification of ginsenoside Rg₁ [I] yielded Rg₁ decacetate [II], mp 252, Rg₁ acetate-glycol [III], mp 263, Rg₁ acetate-trisnorldehyde [IV], mp 231, Rg₁ acetate-carboxylic acid [V], mp 282, Rg₁ acetate-methyl ester [VI], mp 271, Rg₁ hydrazide [VII], mp 220, and finally a reactive intermediate Rg₁ azide [VIII].

人蔘 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 有效成分으로 알려지고 있는 담마렌系 사포닌은 파낙스屬 식물에서 발견되는 인삼 특유의 성분이다. 이 人蔘사포닌은 현재 13종 이상 알려져 있으며¹⁾, 그 중에서 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rc, Rd, Re Rf, Rg₁, Rg₂, Rh₁ 및 20-O-glucosyl ginsenoside Rf의 化學構造가 밝혀졌다^{2~4)}.

인삼사포닌의 定量分析法로서는 vanillin-황산에 의한 比色法^{5,6)} gas chromatography法^{7,8)}, thinchromatography法^{9,10)}, TLC-scanner法¹¹⁾, HPLC法^{12,13)}, GC-Mass法¹⁴⁾ 등이 알려져 있다. 그러나 이러한 분석법들은 인삼사포닌이 미량 존재하거나 다른 종류의 배당체와 혼재하여 있을 경우, 인삼사포닌의 생리작용 연구시 동물 생체의 물질 중에서 분석할 경우 등에 있어서 적용하기 어려운 점이 많다. 이러한 면을 해결하기 위하여 특이성이 높고 미량분석이 가능한 免疫化學的 分析法의 개발이 요청된다. 본 연구에서는 ginsenoside-抗原을 제조하기 위하여 ginsenoside의 구조에 있어서 공통 부위인 측쇄의 二重結合을 화학적으로 수식한 후 단백질에 공유결합시켰다.

實驗 方法

Ginsenoside Rg₁[I]의 분리²⁾, deca-O-acetyl ginsenoside Rg₁[II]²⁾, Rg₁·acetate-glycol [III]¹⁵⁾, Rg₁·acetate-trisnorldehyde[IV]¹⁵⁾의 합성은 이미 보고한 방법에 따랐다.

Rg₁ · acetate-carboxylic acid [V]의 합성 : IV 500mg을 acetone 2ml에 녹인 용액에 KMnO₄ 125mg을 acetone 8 ml에 녹인 용액을 가하고 실온에서 1 시간 반응시켰다.

Methanol 2ml를 반응액에 가하여 반응을 끝내고, 원심분리하여 상등액을 취하고 농축하였다. 건고물을 benzene-acetone (2:1)의 silica gel 컬럼을 통하여 정제하였다. 용출액을 모아 농축하고 methanol로 재결정하여 용점 282°의 침상 결정 570mg[V]을 얻었다.

Rg₁ · acetate-methyl ester[VI]의 합성—V 570mg을 소량의 ethyl ether에 녹이고, 과량의 diazomethane으로 methyl化하였다. Ether를 증류하여 제거한 후, 잔사를 methanol로 재결정하여 용점 271°의 침상결정[VI] 620mg을 얻었다.

Rg₁ · hydrazide[VII]의 합성—VI 300mg에 無水 hydrazine 2ml를 가하여 용융하고 수욕상에서 6시간 가열하였다. 반응 종료후 과잉량의 hydrazine을 질소 기류로 증발 제거시키고, 미량의 hydrazine을 황산 desiccator 중에서 감압하에서 제거시켰다. 건고물을 소량의 methanol에 녹이고 다시 황산 desiccator 중에서 감압하였다. hydrazine이 완전히 제거될 때까지 이 조작을 반복하였다. 이 반응 생성물을 chloroform/methanol/water (=75:25:2.5)의 혼합용매로 재결정하여 용점 220°의 판상 결정 [VII] 180mg을 얻었다.

Rg₁—蛋白質 結合體의 합성—VII 79mg을 0°에서 1N HCl 1ml에 녹이고, 1.4% NaNO₂ 50μl을 가하여 3분 동안 반응시키고 40% K₂CO₃ 용액 200μl를 가하여 약 알칼리성 (pH 7.5)으로 조절하였다. 이 반응생성물(Rg₁-azide[VII])¹⁶⁾의 용액에 bovine serum albumin(Sigma, 96~99%) 200mg을 0.1M 붕산-K₂CO₃ 완충액(pH 9.5) 3ml에 녹인 용액을 가하여 0~4에서 12시간 반응시켰다. 이 반응 혼합물을 0.05M NH₄HCO₃ 완충액으로 평형화한 Sephadex G-50(medium, 3×90cm) 컬럼을 통과하였다. 각 분획(14ml per tube)에 대하여 280nm에서 蛋白質의 吸光度를 측정하였고 anthrone—황산 비색법¹⁷⁾으로 사포닌의 糖을 측정하였다. Rg₁-albumin 結合體 분획을 모아 동결 건조하여 240mg의 백색 분말을 얻었다.

IR 스펙트라는 JASCO model IR-S 형을 사용하여 KBr-disk 法으로 측정하였고 UV 흡광도는 Shimazu-MPS-50L UV-spectrophotometer로 측정하였다. 용점은 Mitamura의 Heat block model-MRK로 측정하고 측정치는 보정하지 않았다.

實驗結果 및 考察

人蔘사포닌은 항원성이 없으므로 hapten으로서 항원성을 발휘할 수 있도록 담체 단백질에 공유결합시키는 방법을 연구하였다. dammarene-saponin에 있어서 공통 구조 부분인 측쇄의 이중결합을 화학적으로 수식하였다. ginsenosides 중 대표적인 성분의 하나인 ginsenoside Rg₁을 우선 선택하였다.

Ginsenoside Rg₁을 acetic anhydride-pyridine으로 처리하여 Rg₁-decaacetate [II]를 얻고, II를 원료로 하여 Woo의 방법에 따라 Rg₁acetate-glycol [III], Rg₁ · acetate-trisnoralddehyde[IV]를 합성하였다. III과 IV는 Woo가 합성한 것과 같은 용점, IR 스펙트럼을 보여 주었다.

Ginsenoside Rg₁ · acetate-carboxylic acid[V]는 IV를 아세톤 용매중에서 KMnO₄로 산화시켜 정량적으로 얻었다. silica gel TLC(용매 : benzene / acetone=2:1)에서 V (Rf=0.21)는 IV (Rf=0.68) 보다 높은 극성을 나타내었고 V의 IR 스펙트럼에서 —COOH의 —OH에 의한 3400cm⁻¹에서의 강한 흡수대, 1777, 1765, 1750cm⁻¹에서—C=O에 의한 흡수대를 나타내었다.

V를 diazomethane으로 methyl ester化한 VI은 TLC에서 Rf값이 급상승(0.21→0.76)하였고 또

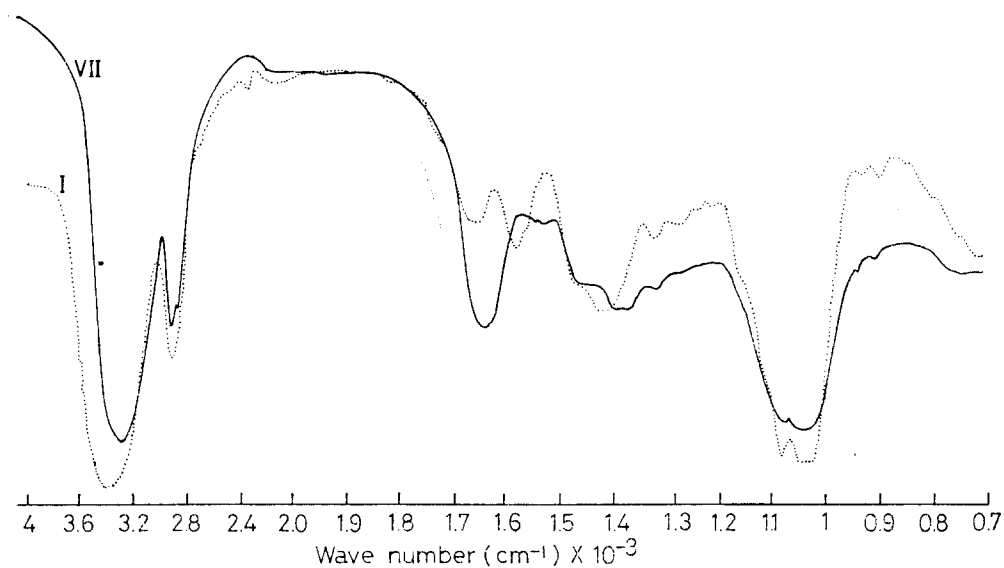


Fig. 1—Infrared spectra of ginsenoside Rg₁ [I] and Rg₁-hydrazide[VII] in KBr.

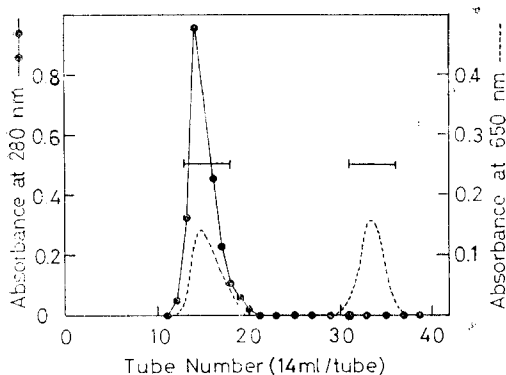


Fig. 2—Gel-filtration of the coupling mixture on a Sephadex G-50 (medium) column (3 × 90cm) equilibrated with 0.05M NH₄ HCO₃ buffer.

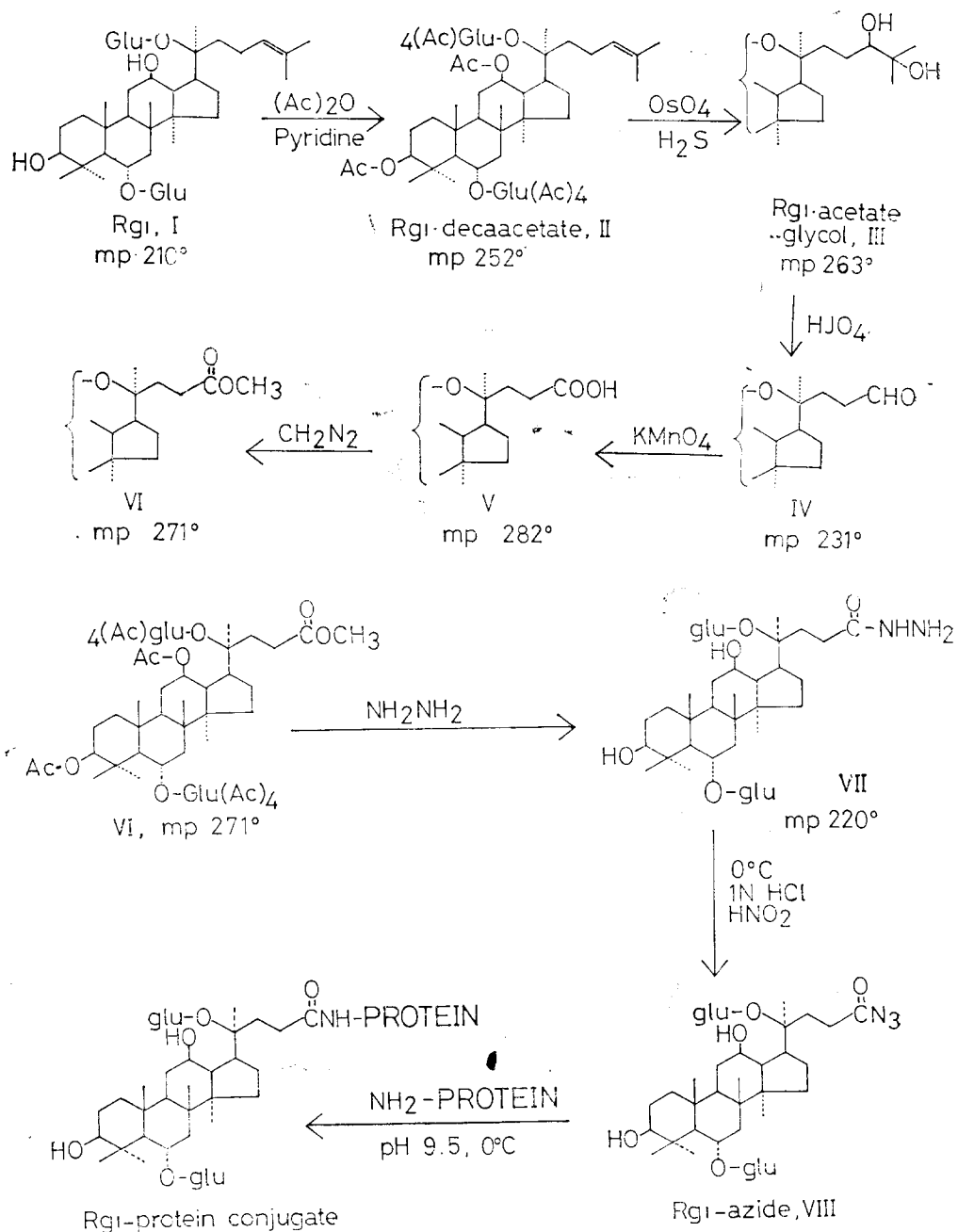
한 정량적으로 얻어졌다.

Rg₁-hydrazide[VII]는 VI를 무수 hydrazine로 처리 하므로써 얻어졌다. VI의 hydrazine 분해는 Rg₁의 측쇄에 -COHNHNH₂기를 도입시키

는 동시에 dammarene 모핵의 hydroxyl 기와 糖의 hydroxyl 기를 보호하기 위하여 유도하였던 acetyl기를 모두 제거하는데 성공하였다. VII의 RI 스펙트럼을 ginsenoside Rg₁의 그것과 비교하였다(Fig. 1).

VII의 IR 스펙트럼에는 VI의 $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\cdot$ 의 $\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$ -에 기인하는 1780~1750 cm⁻¹의 흡수대가 완전히 소멸하였으며 VII의 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{NHNH}_2$ 의 $\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$ -에 기인하는 1650cm⁻¹, NH에 기인하는 3270cm⁻¹의 흡수대를 보여 주고 있다. 또한 VII은 silica gel TLC (전개용매 : chloroform / methanol / water = 75:25:2.5)에서 Rg₁ (R_f = 0.36) 보다 극성이 훨씬 컸다(R_f = 0.06).

VII을 0°에서 NaNO₂-HCl로 diazo화하여 Rg₁-azide[VIII]를 제조한 후 pH 9.5에서 albumine과 결합시켜 Rg₁-albumine conjugate를 제조하였다. 이상의 전 합성과정을 Scheme 1에 요약하였다.



Scheme. 1-Synthetic process of ginsenoside Rg₁-protein conjugate.

이 conjugate의 반응 혼합물로부터 과잉량의 VIII, 무기염을 제거하기 위하여 Sephadex G-50에 의한 분자여과를 실시하였다(Fig. 2).

Fig. 2에서와 같이 단백질의 peak(tube no. 13~18)와 일치하는 사포닌의 peak와 미반응의 사포닌 유도체의 peak (tube no. 31~36)로 분리되었다. 단백질의 분획을 모아 동결 건조하여 R_{g1}-albumine conjugate를 얻었다. 이 conjugate에 대하여 silica gel TLC (전개 용매 : chloroform/methanol/water=2:1:0.2)를 실시한 결과 원점에만 사포닌의 발색이 있는 것으로 보아 R_{g1}이 알부민과 공유결합한 것을 확인하였다. 알부민에 결합된 R_{g1}의 몰수는 anthrone-황산법¹⁷⁾으로 분석한 결과 약 13몰임이 판명되었다.

최근 저자들은 이 R_{g1}-albumine conjugate를 complete Freund's adjuvant에 현탁시키고 토끼에 일정한 시일을 두고 반복 주사한 결과 R_{g1}에 대한 특이적인 항체가 생성하였음을 확인하였다.

文 獻

1. S. Shibata, O. Tanaka, T. Ando, M. Sadao, S. Tsushima, and T. Ohsawa, *Chem. Pharm. Bull.* **14**, 595 (1966).
2. B. H. Han, Y. N. Han, and L. K. Woo, *J. Pharm. Soc. Korea* **16**, 129(1972); B. H. Han, and Y. N. Han, *Kor. J. Pharmacog.* **3**, 211(1972).
3. S. Sanata, N. Kondo, T. Shoji, O. Tanaka, and S. Shibata, *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 421(1974), *ibid* **22**, 2407(1974).
4. O. Tanaka, *Proc. 2nd Inter. Korean Ginseng Symp.* 145, Seoul, Korea(1978).
5. L. K. Woo, B. H. Han, D. W. Baik, and D. S. Park, *J. Pharm. Soc. Korea* **16**, 148(1972).
6. S. Hiai, A. Oura, H. Hammanaka, and S. Odaka, *Planta Medica* **28**, 131(1975).
7. J. Sakamodo, K. Morimoto, and O. Tanaka, *Yakugaku Zasshi*, **95**, 1456(1975).
8. C. Brieskoru, and A. Mosandl, *Proc. 2nd Inter. Korean Ginseng Symp.* **99**, 99, Seoul Korea(1978).
9. T. Namba, M. Yoshizaki, T. Tomimori, K. Kobashi, and J. Hasse, *Yakugaku Zasshi*, **94**, 252(1974).
10. H. J. Kim, S. H. Nam, F. Yosiaki, and S. K. Lee, *Korean J. Giruseng Sci.* **1**, 79(1976).
11. S. Sanada, J. Shoji, and S. Shibata, *Yakugaku Zasshi*, **98**, 1048(1978).
12. W. S. Woo, and K. H. Shin, *Annual Report of Natural Products Res. Ins., Seoul Nat. Univ.*, Seoul Korea, **16**, 1(1977).
13. S. K. Hong, E. K. Park, C. Y. Lee and M. U. Kim, *Yakhak Hoeji*, **23**, 181(1979).
14. E. Bombardelli, A. Bonati, B. Gabetta, E. M. Martinelle, and G. Mustich: *Fitofesapia*, **3**, 99(1976); *ibid.*, *Proc. 2nd. Inter. Korean Ginseng Symp.*, Seoul, Korea, 29(1978)
15. L. K. Woo, *J. Pharm. Soc. Korea*, **17**, 123(1973).
16. T. Curtius, *Ber.*, **35**, 3226(1902); *J. Prakt. Chem.*, **70**, 57(1944).
17. R. Dreywood, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **28**, 499(1946).