

## Ginsenoside의 새로운 분리·정제 방법

김세원<sup>1</sup> · 황석연<sup>2</sup> · 고영수<sup>1</sup> · 유종명<sup>2</sup> · 김시관\*

한국인삼연초연구원 인삼효능부, <sup>1</sup>한양대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>한남대학교 생물학과  
(1998년 8월 31일 접수)

### New Efficient Method for Isolation and Purification of Ginsenosides

Se-Won Kim<sup>1</sup>, Geonseek Ryu, Seok-Yeon Hwang<sup>2</sup>, Young-Su Ko<sup>1</sup>,  
Chong-Myung Yoo<sup>2</sup> and Si-Kwan Kim\*

*Department of Ginseng Pharmacol., Korea Ginseng & Tobacco Res. Inst.,  
Yousong-ku, Taejon, 305-345 Korea*

*<sup>1</sup>Department of Food & Nutrition, Hanyang University, Seoul, Korea*

*<sup>2</sup>Department of Biology, Han Nam University, Taejon, Korea*

(Received August 31, 1998)

**Abstract :** This study was carried out to establish a new efficient method for isolation and purification of ginsenosides. Silica gel column chromatography, having been used for the isolation of ginsenosides, is advantageous to obtain a large amount of ginsenosides. However, it has a disadvantage to isolate ginsenosides to their highest purity. In addition, normal- or reverse-phase HPLC method thus far reported are confined to quantitative analysis. Especially, it has not been possible to isolate racemic 20(S)- and 20(R)-ginsenoside Rg<sub>2</sub>. In this experiment, isolation and purification of ginsenosides were accomplished by Diaion HP-20 adsorption chromatography, silica gel column chromatography, recrystallization and Prep. HPLC with or without Prep. TLC. From this study, we could establish a new efficient method for isolation and purification of 9 major and/or minor ginsenosides.

**Key words :** Isolation, new method, ginsenosides, HPLC, recrystallization.

## 서 론

사포닌은 인삼의 주된 약리활성물질로 인삼뿌리 건물중량의 3~6%를 차지한다.<sup>1,2)</sup> 인삼에 관한 과학적 연구는 1854년 미국의 Garriques<sup>3)</sup>가 서양삼으로부터 무정형의 배당체를 분리하여 panaquilon이라 명명하면서 부터라고 할 수 있다. 그 후 2차대전을 계기로 한국 인삼이 서양에 알려지기 시작하였으며 당시 소련 극동 과학 아카데미의 Brekhman박사<sup>4)</sup>는 인삼의 "아답토겐설 (adaptogen theory)"을 제창하면서 활성성분은 사포닌일 것이라고 암시하였다. 인삼사포닌의 화학적 연구가 본격적으로 추진된 것은 1960년대 이후로서 일

본의 Shibata 등<sup>5)</sup>은 인삼의 메탄올 추출물로부터 13종의 사포닌을 분리하여 ginsenosides로 명명하였으며 이후 Besso,<sup>6)</sup> Matsuura<sup>7)</sup> 등에 의해 총 20여종이 분리되었다. 1971년 ginsenoside Rg<sub>1</sub>의 화학구조가 처음으로 보고<sup>8)</sup>된 후, 백 등<sup>9)</sup>에 의해 홍삼으로부터 Rh계열과 김 등<sup>10)</sup>에 의해 ginsenoside Rg<sub>2</sub>가, 유 등<sup>11)</sup>에 의해 홍삼으로부터 20(E)-ginsenoside F가 분리, 동정됨으로써 지금까지 고려인삼으로부터는 총 34종의 ginsenoside가 분리, 동정되고 있다.

Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc 및 Rd와 같이 함량이 비교적 많은 주종 사포닌의 약리활성에 대하여는 그동안 활발한 연구가 수행되어 지금까지 광범위한 영역

에서 다양한 약리활성을 나타내는 것으로 밝혀지고 있다.<sup>12)</sup> 그러나 이러한 주종 사포닌의 분리는 주로 silica gel column chromatography에서 이루어지는 관계로 다량의 사포닌을 얻는데는 유리하나 순도면에서 다소 떨어지는 것이 사실이다. 이러한 이유에서 현재 생화학용 시약으로 시판되고 있는 고순도(95% 이상)의 단일 사포닌은 매우 고가이다. 또한, 미량 사포닌의 경우 다량으로 분리할 수 있는 방법이 확립되지 않아 동물실험을 위한 시료의 다량 확보가 매우 어렵다. 특히, ginsenoside Rg<sub>2</sub>의 경우 입체 이성체로 silica gel column chromatography로는 사실상 분리할 수 없다. 이에 본 연구는 주종 사포닌과 미량 사포닌을 포함한 9종의 단일 사포닌을 비교적 다량으로 분리, 정제할 수 있는 preparative HPLC 분취방법을 정립하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 인삼시료

사포닌의 분리, 정제를 위한 인삼시료는 1996년 한국인삼연초연구원 증평시험장에서 재배한 6년근 수삼을 원료로 사용하였다.

### 2. 시약

추출 및 물질 분리에 사용한 유기용매는 일급 또는 특급 시약을 사용하였으며 HPLC 용매는 HPLC grade를 사용하였다.

### 3. 사용기기

HPLC system : Waters 600E with 484 tunable absorbance UV detector

Column : YMC Pack J'shpere ODS-H80, 250×20 mm I.D.

NMR spectrophotometer : Bruker ARX 400

### 4. 진세노사이드의 분리 및 정제

수삼 10 Kg을 얇게 썰은 다음 70% MeOH 20리터에 담가 실온에서 7일간 추출하였다. 메탄올 추출물은 농축하여 유기용매를 제거한 다음 김 등의 방법<sup>13)</sup>에 따라 Diaion HP-20(Mitsubishi Kasei) chromatography 10리터에 통과시킴으로서 사포닌을 흡착시켰다. 흡착되지 않은 유리당과 수용성 화합물은 증류수 40리터로 수지를 세척함으로써 제거하였으며 흡착된 사포닌에 대하여는 100% 메탄올 40리터로 용출, 농축하여 담갈색의 조사포닌 분말(100 g)을 얻었

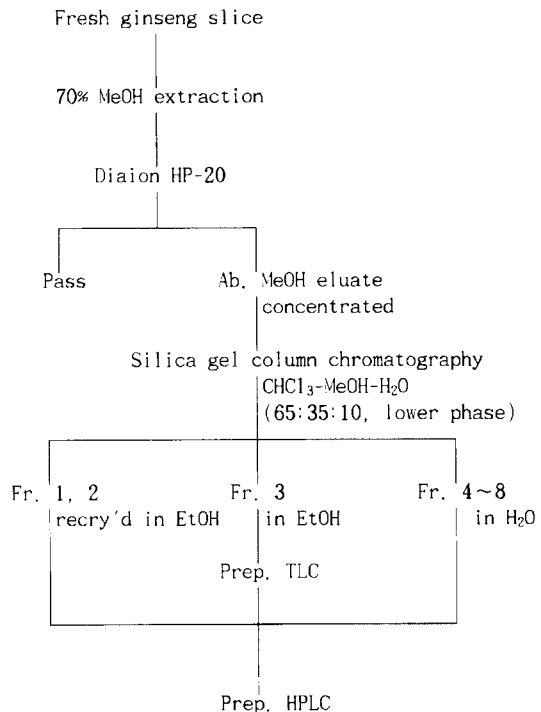


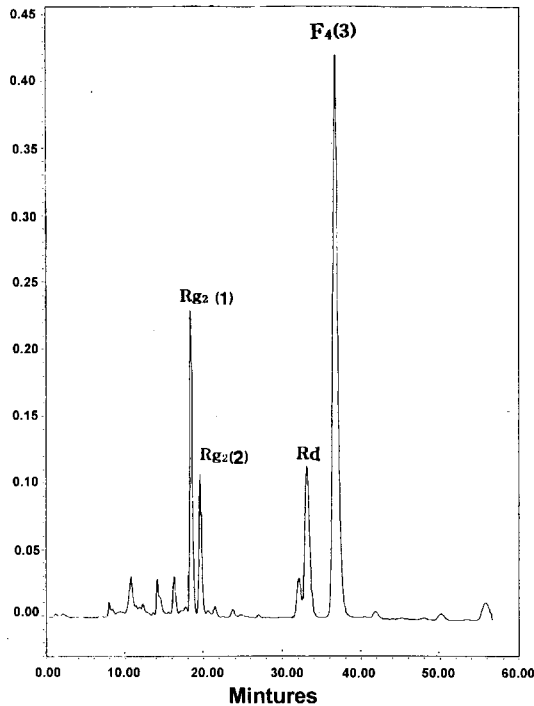
Fig. 1. Isolation and purification procedure for ginsenosides.

다. 조사포닌 분말로부터 20 g을 취하여 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(65:35:10, lower phase)을 용매계로 silica gel(70~230 mesh) column chromatography를 행하였다.

분획은 500 ml씩 분취, TLC(동일 용매계, Merck F<sub>254</sub>)로 확인한 후 8개 분획으로 나누었다. 분획 1~4는 EtOH에서 재결정하여 백색분말을 얻었으며, 5~8은 H<sub>2</sub>O에서 재결정하였다. 이들 결정은 MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O를 기본용매계로 하여 Prep. HPLC(203 nm, 5 ml/min)를 수행함으로써 총 9종의 ginsenosides를 얻었다(Fig. 1).

## 결과 및 고찰

분획 1, 2를 MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O(7:1:2) 용매계로 하여 HPLC(10×250 mm, 203 nm, 1 ml/min) 분석 결과 Fig. 2와 같은 HPLC 크로마토그램을 얻었다. 피크 1, 2는 TLC 분석결과 Rg<sub>2</sub>로 추정되었으나<sup>14)</sup> 어느 것이 20(S)-, 20(R)-ginsenoside Rg<sub>2</sub>인지에 대하여는 확인할 수 없었으며 피크 3의 경우는 표준품이



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of fraction 1 and 2. ODS H80 (10×250 mm), YMC-Pack, Solvent system: MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (7:1:2), Flow rate: 1 ml/min, UV: 203 nm.

없는 관계로 NMR 측정을 통한 구조동정을 시도하였다. 그 결과 피크 1은 <sup>1</sup>H NMR: 8 singlet methyls (0.83, 0.85, 1.08, 1.22, 1.26, 1.50, 1.54, 2.17), 2.49 (1H, m, H-17), 3.37(1H, dd, 0.2, 3.6, H-3), 2 anomeric protons [5.16(1H, br.s., H-1'), 4.86(1H, d, 5.6, H-1')], 5.23 (1H, t, 7.4, H-24); <sup>13</sup>C NMR: 131.2(C-25), 126.8(C-24), 35.6(C-22), oxymethine [78.4(C-3), 74.1(C-6), 70.9(C-12)], 72.8(C-20), sugar [(102.4, 79.3, 78.2, 72.4, 78.3, 62.9), (102.2, 72.6, 72.4, 74.3, 69.4, 18.7)]로서 20(S)-ginsenoside Rg<sub>2</sub>로, 피크 2는 <sup>1</sup>H NMR: 8 singlet methyls [0.96(×2), 1.23, 1.35, 1.36, 1.62, 1.66, 2.11], 3.50(1H, dd, 10.5, 3.0, H-3), 2 anomeric protons [(4.94, d, 5.5, H-1'), 5.25(1H, br.s., H-1')], 5.27(1H, t, 7.3, H-24); <sup>13</sup>C NMR: 131.3(C-25), 126.5(C-24), 72.9(C-20), oxymethine [71.0(C-12), 78.5(C-6), 79.4(C-3)], 43.4(C-22), sugar (103.1, 79.5, 78.3, 72.2, 78.3, 63.1), (102.9, 72.6, 72.4, 74.2, 69.4, 18.7)]로서 20(R)-ginsenoside Rg<sub>2</sub>로

확인되었다.

한편, 피크 3의 경우는 <sup>1</sup>H NMR: 8 singlet methyls(0.86, 0.88, 1.15, 1.26, 1.47, 1.52, 1.69, 2.02), 3.38(1H, dd, 10.8, 3.2, H-3), 2 anomeric protons [5.17(1H, d, 5.8, H-1'), 6.34(1H, br.s., H-1'')], 5.11(1H, t, 7.4, H-24), <sup>13</sup>C NMR: 131.25(C-25), 124.0(C-24), 140.1(C-20), oxymethine [72.3(C-12), 74.4(C-6), 78.4(C-3)], sugar(101.8, 79.4, 78.3, 72.4, 78.5, 63.1), (101.9, 72.6, 74.2, 69.5, 18.8)]로서 20(E)-ginsenoside F<sub>4</sub>로 동정되었다.

20(S, R)-Ginsenoside Rg<sub>2</sub>의 경우 C-20에 결합된 OH moiety의 방향에 따라 S와 R-form의 이성체가 존재하나 이러한 입체 이성체는 silica gel column chromatography로는 분리되지 않는 것이 특징이다. Nagasawa 등<sup>15)</sup>은 HPLC를 이용하여 Rg<sub>2</sub>를 분리하였으나 이는 S, R 이성체를 구분하지 않고 분리한 것이며 김<sup>16)</sup>은 ginsenoside Re를 이용하여 20(S)-와 20(R)-입체 이성체 혼합물을 제조한 다음 이것을 다시 아세틸화하여 dichloromethane과 ethyl acetate 혼합용매를 사용, silica gel column chromatography로 분리하는 방법을 제시하였다. 그러나 본 실험에서는 EtOH에서 재결정을 유도한 다음 MeOH-CH<sub>3</sub>-CN-H<sub>2</sub>O(6:1:3) 용매계로 하여 ODS Prep. HPLC로 분취함으로써 매우 효율성 있게 20(S)-와 20(R)-ginsenoside Rg<sub>2</sub> 입체 이성체를 분리할 수 있었다.

20(E)-ginsenoside F<sub>4</sub>는 Zhang 등<sup>17)</sup>이 인삼 잎으로부터 처음 분리하였으며 최근 유 등<sup>11)</sup>은 홍삼에도 존재한다고 보고하였다. 이로서 본 실험에서 분리한 20(E)-ginsenoside F<sub>4</sub>의 경우 수삼으로부터 분리한 것이므로 잎이나 홍삼에만 특이하게 존재하는 사포닌은 아닌 것으로 밝혀졌다. 또한, 분획 1과 2에서 ginsenoside Rd도 함께 분리하였다.

한편, 분획 3에는 TLC 정성분석 결과 ginsenoside Re와 Rg<sub>1</sub>이 함유되어 있음을 알았다. 그러나 Fig. 3에서 보는 바와 같이 ginsenoside Re 및 Rg<sub>1</sub>의 경우 MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O(7:1:2) 용매계에서는 분리되지 않을 뿐만 아니라 순상 NH<sub>2</sub> column에서도 역시 분리능이 좋지 않았다. 따라서 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(12:3:1, lower phase)을 용매계로 하여 preparative TLC를 수행, Re와 Rg<sub>1</sub> 분획으로 나눈 다음 다시 40% aqueous acetonitrile을 용매계로 하여 Prep. ODS HPLC 분취를 행하였다.

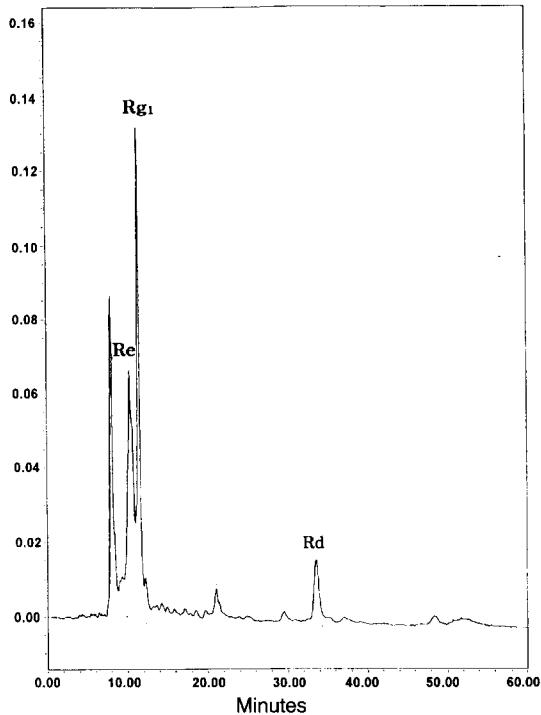


Fig. 3. HPLC chromatogram of fraction 3. LC conditions are the same as in Fig. 2.

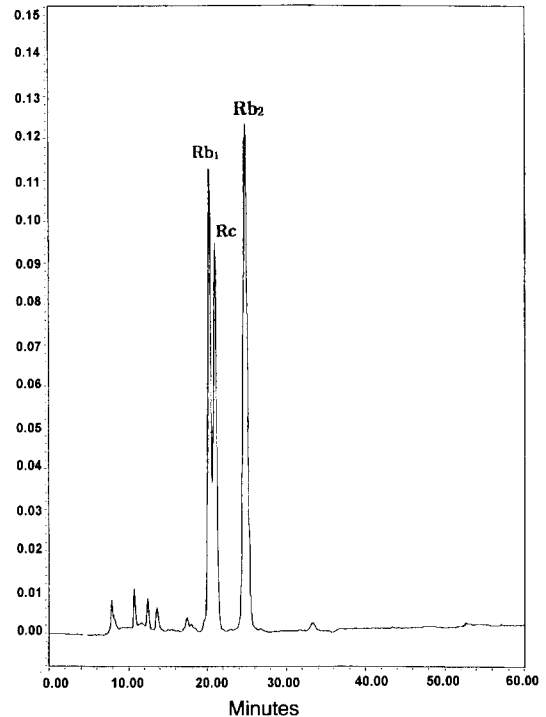


Fig. 4. HPLC chromatogram of fraction 4. LC conditions are the same as in Fig. 2.

또한, 분획 4에서 8까지의 백색 결정에는 주종사포닌인 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub> 및 Rc가 약간씩 혼재되어 있거나 거의 단일 성분으로 함유되어 있었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 Rb<sub>1</sub>과 Rc가 분리되지 않는 것은 MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 용매계의 혼합비를 6.5:1:2.5로 조절함으로써 효율적으로 분리할 수 있었다. 한편, Nagasawa 등<sup>15)</sup>은 주종사포닌의 분리를 위하여 순상 HPLC column을 이용한 80% CH<sub>3</sub>CN을 용매계로 사용하는 방법을 제시하였으나 이 경우 Rg<sub>1</sub>, Re, Rd 모두 retention time이 10분 미만으로 정량 분석 방법으로는 이용할 수 있을지 모르나 99% 이상의 순도로 분리하기란 어렵다고 판단된다. 또한, 기존에 사용하여 온 RI detector의 경우 당과 결합된 화합물만이 선택적으로 검출되기 때문에 사포닌의 정량 분석에는 유리할 수 있으나, 천연 유기화합물의 분리, 정제 시에는 RI로 검출되지 않는 화합물도 다량 함유되어 있으므로 고순도의 화합물 정제 방법으로는 적합하지 않다고 사료된다.

이에 본 실험에서는 재결정한 시료를 UV detector (203 nm)를 이용하여 검출하였으므로 위의 단점을 보

완할 수 있었으며 시료를 재결정한 후 MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O를 기본으로 하여 6:1:3 비율부터 7:1:2 비율로 이동상을 조절함으로써 ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, 20(S, R)-Rg<sub>2</sub>, 20(E)-ginsenoside F<sub>4</sub>를 분리할 수 있었다. 또한, Re와 Rg<sub>1</sub>의 경우 순상 및 역상 HPLC에서 분리되지 않으나 Prep. TLC에서는 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(12:3:1) 혼합용매계를 사용할 경우 용이하게 분리된다는 사실을 알았다. 이로서 open column을 사용하여 획득하는 것에 비해 순도가 높은 사포닌을 비교적 다량으로 분취할 수 있는 조건을 확립할 수 있었다. 그러나 본 방법 역시 ginsenoside Rf, Rg<sub>3</sub>, Rh 등과 같은 미량 사포닌의 결정화 유도에는 성공하지 못하였으므로 금후 보다 적절한 결정화 용매계의 발견이 요구된다.

## 요 약

본 연구는 ginsenoside의 새로운 분리, 정제 방법을 확립코저 수행하였다. 그동안 단일 사포닌의 분리를 위하여는 주로 silica gel column chromatography 방

법이 이용되어 왔으나 이 방법의 경우 다량의 사포닌을 얻는데는 유리할 수 있으나 고순도의 개별 사포닌을 분리하기에는 용이하지 않았다. 또한, 순상 혹은 역상 HPLC 방법이 보고되고 있으나 ginsenoside의 정량분석에만 국한되어 응용되고 있다. 특히, 20(S, R)-ginsenoside Rg<sub>2</sub>의 경우 입체 이성체로 지금까지 보고된 방법으로는 분리할 수 없는 것이 사실이다. 이에 본 연구는 사포닌의 분리, 정제를 위하여 Diaion HP-20 adsorption chromatography, silica gel chromatography, 재결정, Prep. TLC, Prep. HPLC 분취를 통하여 9종의 주종 및 미량 사포닌을 효율성 있게 분리, 정제하였다. 본 방법의 특징은 조사포닌을 얻기 위하여 Diaion HP-20 chromatography를 이용하였다는 점과 silica gel column chromatography에서 분획화한 조사포닌 분획을 재결정화함으로써 UV detector를 이용한 Prep. HPLC 분취가 가능하다는 점이다. 이상의 결과로부터 저자들은 인삼 단일 사포닌의 효율적인 분리, 정제방법을 제시한다.

## 인 용 문 헌

1. Morita, T. : Doctoral Thesis, Hiroshima Univ., (1986).
2. Florence, C. L. : Facts about Ginseng, Hollym Corp., Seoul, Korea, (1982).
3. Garrigues, S. S. : *Ann. Chem. Pharm.*, **90**, 231 (1854).
4. Brekhman, I. I. : Gosudarst Isdatet Med., Leningrad, 182 (1957).
5. Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsumishima, S. and Tanaka, O. : *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 595 (1966).
6. Besso, H., Kasai, R., Saruwatari, Y., Fuwa, T. and Tanaka, O. : *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2380 (1982).
7. Matsuura, H., Kasai, R., Saruwatari, Y., Fuwa, T., Kunihiro, K. and Tanaka, O. : *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1188 (1984).
8. Nagai, Y., Tanaka, O. and Shibata, S. : *Tetrahedron*, **27**, 881 (1971).
9. 백담인, 김동선, 이유희, 박종대, 김신일 : *Planta Medica*, **62**(1), 86 (1996).
10. 김신일, 박정일, 유재하, 박종대, 이유희, 박재훈, 김태희, 김종문 : *Arch. Pharm. Res.*, **19**(5), 51 (1996).
11. 유재하, 박재현, 김태희, 손동환, 김종문, 박정일 : *Arch. Pharm. Res.*, **19**(4), 335 (1996).
12. Lacaille-Bubosis, M. A. and Wagner, H. : *Phytomedicine*, **2**, 363 (1996).
13. 김시관, 광이성, 김세원, 황석연, 고영수, 유종명 : 인삼 조사포닌의 제조방법 개선, 고려인삼학회지, **22**(3), 155 (1998).
14. Sanata, S., Shoji, J. and Shibata, S. : *Yakugaku Zasshi*, **98**, 1048 (1978).
15. Nagasawa, T., Choi, J. H., Nishino, Y. and Oura, H. : *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3701 (1980).
16. 김동선 : 홍삼 사포닌류의 분리, 제조 및 항암작용, 충남대학교 박사학위논문 (1996).
17. Zhang, S., Takeda, T., Chen, Y., Yao, X., Tanaka, O. and Ogihara, Y. : *Planta Medica*, **56**, 298 (1990).