

콩 Hypocotyl에서 Acetyl Soyasaponin A₁의 분리 및 구조 분석

김선림[†] · 방면호* · 김정태** · 지희연 · 정일민** · 김현복*** · Mark A. Berhow****

작물과학원, *경희대학교 생명공학원, **건국대학교 생명환경과학대학, ***농업과학기술원, ****USDA-ARS

Isolation and Structural Analysis of Acetyl Soyasaponin A₁ from Hypocotyl of Soybean

Sun-Lim Kim[†], Myun-Ho Bang*, Jung-Tae Kim**, Hee-Youn Chi, Ill-Min Chung**
Hyun-Bok Kim***, and Mark A. Berhow****

National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

*The Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung-Hee University,
Suwon 449-701, Korea

**Department of Applied Life Science, College of Life and Environment Science, Konkuk University,
KwangJinKu HwaYangDong, Seoul 143-701, Korea

***National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

****National Center of Agricultural Utilization Research, USDA-ARS, 1815N, Peoria, Illinois 61604, USA

ABSTRACT Soyasaponins are phytochemicals of major interest for their health benefits. Chemical investigation of a soybean phytochemical concentrate resulted in the isolation and identification of triterpenoid saponins. The MeOH extraction of defatted hypocotyl separated from soybeans was performed by the automated solvent extractor (ASE). Fractionation was performed on a flash column (150 mm × 40 mm i.d.) packed with a preparative C₁₈ reverse phase bulk packing material (125 Å, 55-105 μm) and monitored at 210 nm, and collected 14 fractions. Consequent Fsat preparative column liquid chromatography (Fast PCLC) was performed for the purification of Fraction-I (Fr-I) collected from the fraction 8 and 9 of flash chromatography. Fsat PCLC was performed on a Luna C₁₈ 10 μm, 100 Å, semipreparative reverse phase column (250 cm × 50 mm i.d.) for the purification of isolated unknown compound (Fr-I-2). Chemical structure of acetyl soyasaponin A₁ (MW : 1436.6, C₆₇H₁₀₄O₃₃) was identified and determined by a combination of extensive NMR (¹H-NMR, 400 MHz; ¹³C-NMR, 100 MHz; DEPT), IR, UV, and ESI-MS analysis.

Keywords : soybean, acetyl soyasaponin A₁, flash chromatography, fast PCLC, ESI-MS, NMR

Saponin은 식물체에 함유된 배당체 화합물로서 콩의 saponin인 soyasaponin은 aglycone인 soyasapogenol A, B, E 및 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one

(DDMP)과 이들에 부착되는 sugar chain에 의하여 다양하게 분류 된다(Berhow *et al.*, 2006; Burrows *et al.*, 1987; Kitagawa *et al.* 1988a, b; Taniyama *et al.*, 1988a, b; Shiraiwa *et al.*, 1991a, b; Kudou *et al.*, 1992).

Group A saponin은 C-22 oligosaccharyl chain의 sugar 말단에 acetyl group이 부착되어 있는 것으로 추정되고 있으며(Shiraiwa *et al.*, 1991b) group B saponin은 C-22 위치에 DDMP가 부착되어 있으나 이와 같은 DDMP saponin은 온도, pH 등 각종 환경조건에 불안정하여 이들의 고리가 쉽게 파괴되면서 DDMP가 maltol과 saponin B로 유리된다고 한다(Kudou *et al.*, 1992; Heng *et al.*, 2006).

Soyasaponin은 학자에 따라 group A saponin을 Aa, Ab, Ad, Ae, Af로 group B saponin을 DDMP가 부착된 ag, βg, βα, γg, γa와 DDMP가 부착되지 않은 Ba, Bb, Bb', Bc로 group E saponin은 Bd와 Be로 구분하거나(Shiraiwa *et al.*, 1991a, b; Tsukamoto *et al.*, 1993) DDMP가 부착되지 않은 group B saponin을 soyasaponin I~V, DDMP가 부착된 saponin을 ag, βg, βα, γg, γa로, group A saponin을 soyasaponin A₁~A₈로 각각 분류하고 있으나(Kitagawa *et al.*, 1988a, b; Kudou *et al.*, 1992; Yoshikoshi *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 2002) 최근 새로운 soyasaponin(Berhow *et al.*, 2006)이 동정되면서 명명법도 조금씩 다르게 표현되고 있다.

콩 함유 soyasaponin은 쓴맛을 나타내기 때문에 식미를 저하시킬 뿐만 아니라(Kitagawa *et al.* 1988a, b; Taniyama *et al.*, 1988a, b) 항 영양물질로 알려졌으나(Kikuchi *et al.*,

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6886
(E-mail) kimsl@rda.go.kr

1999), 최근 혈중 cholesterol 감소효과(Hendrich, *et al.*, 2000; Rao & Sung, 1995; Sirtori *et al.*, 1995)를 비롯한 항산화활성(Jiang *et al.*, 1993; Yoshikoshi *et al.*, 1996), 항바이러스(Shiraiwa *et al.*, 1991c; Hayashi *et al.*, 1997), 간독성물질제거(Kinjo *et al.*, 1998; Miyao *et al.*, 1998), 항종양활성(Konoshima *et al.*, 1992; Berhow *et al.*, 2000), 항암활성(Jeon & Sung, 2000; Sung & Park, 2000), 면역증진효과(Korathkar & Rao, 1997; Vlietinck *et al.*, 1998) 등 각종 생리활성이 밝혀짐에 따라 새롭게 주목을 받고 있다.

콩에는 약 0.1~0.5%의 saponin이 함유되어 있으나 종실의 부위별로 볼 때 cotyledon과 hypocotyl에는 각각 0.2~0.3%와 2%의 saponin이 함유되어 있으며(Anderson *et al.*, 1995; Berhow *et al.*, 2006), group A saponin은 hypocotyl에만 함유되어 있고 DDMP saponin은 hypocotyl과 cotyledon에 모두 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다(Kudou *et al.*, 1992; Yumiko *et al.*, 1996).

Soyasaponin에 관한 연구는 지금까지 지속되고 있으나 triterpene saponin의 검출이 용이하지 않고 DDMP saponin이 온도, pH 등 각종 환경조건에 불안정하여 DDMP-conjugated soyasaponin과 non-DDMP soyasaponin의 정확한 분석이 어려울 뿐만 아니라 다양한 형태로 존재하는 soyasaponin isomer의 표준물질 확보가 쉽지 않은 실정이다(Hu *et al.*, 2002; Kim, 2003).

최근 HPLC 및 LC-MS를 이용한 soyasaponin의 정성 및 정량에 관한 연구가 이루어지고 있으나 이들 대부분이 콩에 비교적 다량으로 함유된 group B 계열의 soyasaponin에 관한 것이며 group A soyasaponin의 경우 aglycone에 관한 내용이 주류를 이루고 있다(Berhow *et al.*, 2006).

Group B soyasaponin이 각종 생리활성을 나타내는 물질로 인식되면서 그동안 수많은 연구들이 집중되어 왔던 반면 과거부터 group A soyasaponin은 강한 쓴맛을 나타낼 뿐만 아니라 반 영양적 요소로 알려져 있어 이를 제거하기 위한 노력이 이루어져 왔다(Kitagawa *et al.* 1988a, b; Taniyama *et al.*, 1988a, b; Kikuchi *et al.*, 1999). 그러나 최근 group A soyasaponin에 관련한 각종 생리활성이 보고(Yumiko *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 1989; Nishida *et al.*, 1993)되고 있어 이들에 관한 정확한 이해가 요구되는 실정이다.

따라서 본 연구는 국내육성 콩 품종 및 전통식품의 우수성을 입증하고, 생리활성이 우수한 고품질의 신제품 육성을 위한 기초기반기술 확립의 일환으로 group A soyasaponin의 분리 및 정제에 관한 연구를 수행하여 얻어진 결과이다.

재료 및 방법

시료의 준비 및 hexane 탈지

본 시험에 사용된 콩은 2004년 작물과학원에서 생산된 신팔달콩2호 5 kg을 사용하여 -70℃의 초저온 냉장고에 약 4시간 동결시킨 후 대형동결건조기에서 24시간 동결건조하였다. 건조된 콩을 disk mill(Glen Mills S500, USA)로 분쇄를 하였는데 이때 체의 크기는 4.1 mm로 조절하였다. 분쇄 후 풍구를 이용하여 종피를 제거하고 수거된 분쇄시료는 USA standard testing sieve로 sieving하여 hypocotyl 120 g을 얻었다. 분리된 hypocotyl은 100 mesh로 분쇄 후 Soxtherm automatic system(Gerhardt, Hoffmannstre, Germany)으로 탈지 하였다. 탈지된 시료는 hume-hood에서 12시간 방치하여 hexane을 완전히 제거 후 extraction thimble에 남아있는 시료를 saponin분리를 위해 사용하였다.

자동용매추출장치(ASE)에 의한 조사포닌 추출

Hexane 탈지 시료로부터 조사포닌을 추출하기 위하여 automated solvent extractor system ASE 300(Dionex, Hercules, CA)를 사용하였으며, 탈지시료 100 g에 Celite 545(Baker, Phillipsburg, NJ) 20 g, acid-washed sand(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 10 g을 첨가하여 교반기를 이용하여 시료와 Celite 및 acid-washed sand가 균일하게 섞이도록 약 5분간 교반을 하였다. 혼합된 시료를 ASE cell에 채우고 1500 PSI N₂ 기류하에서 MeOH로 자동추출을 하였는데, 이때 ASE cell의 온도는 100℃로 조절을 하였으며 동일 시료에 대하여 30분간 3회 추출하였다. ASE로 추출된 MeOH 조추출물은 saponin 이외에도 MeOH에 용해성이 높은 물질들을 다량 함유하고 있으므로 이들을 제거하기 위하여 hume hood내에 24시간 동안 실온에 방치하여 saponin 이외 물질의 침전을 유도하고 이를 No. 2 filter paper로 2회 여과하였다. 또한 2차로 여과된 MeOH 추출물은 -4℃에서 10,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 당류계열의 물질을 제거하였다.

Flash chromatography

원심분리후 상등액을 취하여 flash chromatography와 Buchi fraction collector C-650(Buchi, Newcastle, DE)를 이용하여 조사포닌을 분리하였다. 이때 사용된 flash column cartridge(40 mm × 150 mm)는 90의 preparative C₁₈ reverse phase bulk packing material, 125 Å, 55-105 μm(Waters, Milford, MA)으로 충전하였다. 이동상으로는 0.5% HoAC

용액과 100% acetonitrile 용액을 사용하여 0.5% HoAC 용액 30%용액으로부터 100% acetonitrile이 될 때 까지 30분간 gradient 조건으로 분리 하였다. C₁₈ flash column cartridge에 20 mL의 추출물을 주입하고 이동상의 유속은 25 mL/min, detector(UV photometer C-635)의 파장은 210 nm, 각 fraction은 40 mL가 되도록 조절하였다.

Fast preparative column liquid chromatography (Fast PCLC)

Buchi fraction collector로 분리된 3종의 fraction은 감압 농축하여 분취형 LC를 이용하여 분리를 하였는데, 이때 사용된 Fast PCLC system은 Shimadzu LC-8A Fast PCLC, SCL-10A, SPD-M10A Diode array detector, SIL-10 Injector (Shimadzu, Kyoto, Japan)였다. 이동상으로 0.5% HoAC와 100% acetonitrile을 사용하여 0.5% HoAC 용액을 30%로부터 100% acetonitrile이 될 때 까지 53분간 gradient 조건으로 분리 하였다. 이때 사용된 preparative column은 Luna C₁₈ 10 μm, 100 Å, 250 cm × 50 mm i.d., semipreparative reverse phase column(Phenomenex, Torrance, CA)으로서 이동상의 유속은 50 mL/min이었으며 detector의 파장은 210 nm로 분리가 이루어지는 동안 육안으로 chromatogram의 변화를 관찰하면서 fraction을 취하였다.

화학구조 해석

NMR은 600 MHz FT-NMR spectrometer, Varian Inova AS 400(Varian, USA)으로 측정하였고, IR spectrum은 Perkin model 599B(Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)로 측정하였으며, 비선광도는 Polarimeter P-1020(JASCO, Japan)으로, 용점은 Fisher-Johns 용점측정기(Fisher scientific, USA)를 사용하였다. ESI-MS는 Micromass electrospray interface ZMD 4000(Micromass, Manchester, UK)로 측정하였는데, N₂를 nebulizing gas로 사용하였고 이때 source block과 desolvation temperature는 150 및 250°C를 각각 유지하였다. Mass의 조건은 electrospray ionization(positive mode)로서, cone voltage ramp를 10-50 V; acceleration lens potential 0.5 kV; scan rate 0.4 scan s⁻¹, multiplier voltage 650 V이었다.

결과 및 고찰

Flash chromatography에 의한 조사포닌 분리

Fig. 1은 fraction collector(C-660)로 수거된 fraction들의

chromatogram을 나타낸 것이다. 0.5% HoAC 30%용액으로부터 100% acetonitrile이 될 때 까지 30분간 gradient 조건으로 분리하여 14개의 fraction을 얻을 수 있었는데, fraction 2 ~ fraction 7은 HPLC로 그 조성을 검토하여본 결과 당을 비롯한 각종 phenolic 물질 및 isoflavone을 다량 함유하고 있는 fraction인 것으로 나타났으며 fraction 8 ~ fraction 14는 각종 soyasaponin을 함유하고 있는 fraction으로 나타났다(결과 미제시). 따라서 얻어진 결과를 근거로 saponin 관련 fraction을 3종으로 구분하였는데 fraction 8과 9를 Fraction-I (Fr-I), fraction 10과 11을 Fraction-II(Fr-II), fraction 12과 13을 Fraction-III(Fr-III)으로 구분하여 이들을 혼합하였다. 혼합된 fraction중 Fr-I은 group A 계열의 soyasaponin을 함유하고 있는 fraction으로 나타났고, Fr-II는 상온에서 24시간 보관할 경우 group B 계열의 soyasaponin이 석출되었으며 Fr-III는 DDMP를 다량 함유하고 있는 fraction으로 나타났다(결과 미제시). 그러나 Fr-I과 Fr-III의 경우 soyasaponin이 불순물과 혼합되어 있었기 때문에 Fast PCLC에 의한 soyasaponin의 정제를 시도하였다.

Fast PCLC에 의한 soyasaponin 정제

Fig. 2는 flash chromatography에서 얻어진 Fr-I을 Fast PCLC를 이용하여 0.5% HoAC 30% 용액으로부터 100% acetonitrile이 될 때 까지 210 nm에서 53분간 gradient 조건으로 분리하면서 얻어진 fraction들의 chromatogram을 나타낸 것이다.

Fast PCLC에 의한 분취는 Luna C₁₈ column(250 cm ×

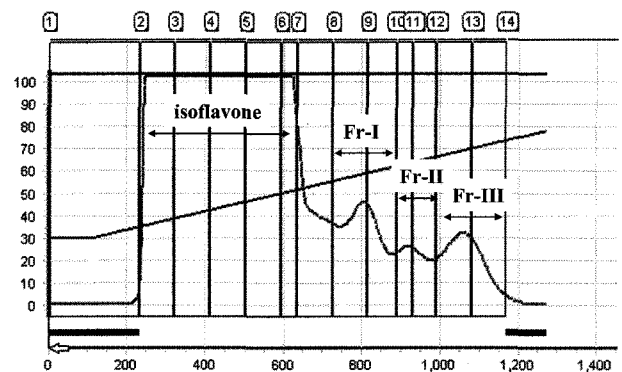


Fig. 1. Flash chromatography chromatogram of the extract obtained from the hypocotyl of soybeans. Fractionation was performed on a flash column cartridge (150 mm × 40 mm i.d.) packed with a preparative C₁₈ reverse phase bulk packing material (125 Å, 55-105 μm) and monitored at 210 nm, and recorded with Buchi Sepacore Record program.

50 mm i.d.)으로 시료가 분리되는 동안 육안으로 monitoring하면서 해당 fraction을 수집하여 총 7종의 fraction을 얻을 수 있었고, 이들 중 가장 많은 양의 fraction이 수집된 Fr-I-2를 감압농축하여 미지화합물(unknown compound : UKC)을 얻고 IR, NMR, ESI-MS등 화학구조 분석을 실시하였다.

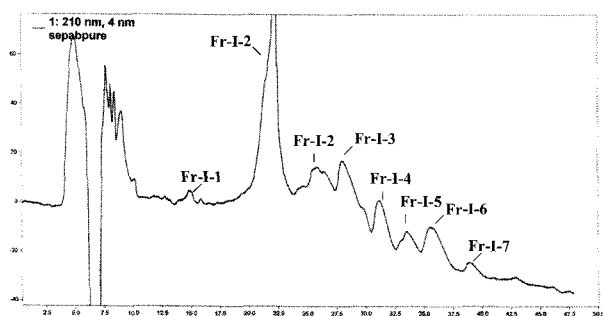


Fig. 2. Fast preparative column liquid chromatography (Fast PCLC) chromatogram of the Fraction-I (Fr-I) obtained from the fraction 8 and 9 of flash chromatography. Fractionation was performed on a Luna C₁₈ 10 μ m, 100 \AA , semipreparative reverse phase column (250 cm \times 50 mm i.d.).

화학구조 결정

Fig. 3.은 Fast PCLC로 얻어진 UKC(Fr-I-2)의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR의 분석결과를 나타낸 것이다. UKC(Fr-I-2)의 물리화학적 성질은 다음과 같다.

UKC(Fr-I-2) : mp=263-265 $^{\circ}$ C (white powder from EtOH), $[\alpha]_D^{25} + 17.0$ (c=0.6, MeOH). IR = 3422(br), 2926, 1745, 1606(cm^{-1}), ¹H-NMR(CD₃OD, 600 MHz, δ) : 0.85 ppm (3H, s, H-25), 0.89 ppm (3H, s, H-28), 0.94 ppm (3H, s, H-29), 0.95 ppm (3H, s, H-30), 0.97 ppm (3H, s, H-23), 1.13 ppm (3H, s, H-26), 1.20 ppm (3H, s, H-27), 1.93 (6H, s, 3'''-CH₃ and 4'''-CH₃), 1.97 ppm (6H, s, 5'''-CH₃ and 6'''-CH₃), 3.92 ppm (1H, m, 5'''-H), 4.10 ppm (1H, m, 6'''-H), 4.13 ppm (1H, m, 6'''-H), 4.22 ppm (1H, d, J=7.2, 1'''-H), 4.51 ppm (1H, d, J=7.6, 1'-H), 4.54 ppm (1H, d, J=8.0, 1''-H), 4.80 ppm (1H, d, J=8.0, 1'''-H), 4.92 ppm (1H, d, J=8.0, 1''''-H), 4.95 ppm (1H, t, J=9.2, 9.6 Hz, 3'''-H), 5.00 ppm (1H, t, J=10.0, 9.2 Hz, 4'''-H), 5.16 ppm (1H, Brs, 12-H), 5.22 ppm (1H, t, J=8.0, 9.2 Hz, 2'''-H), ¹³C-NMR(CD₃OD, 100 MHz, δ) : 39.7(C-1), 27.1(C-2), 92(C-3), 42.7(C-4), 57.2(C-5), 19.5(C-6), 31.3(C-7), 39.9(C-8),

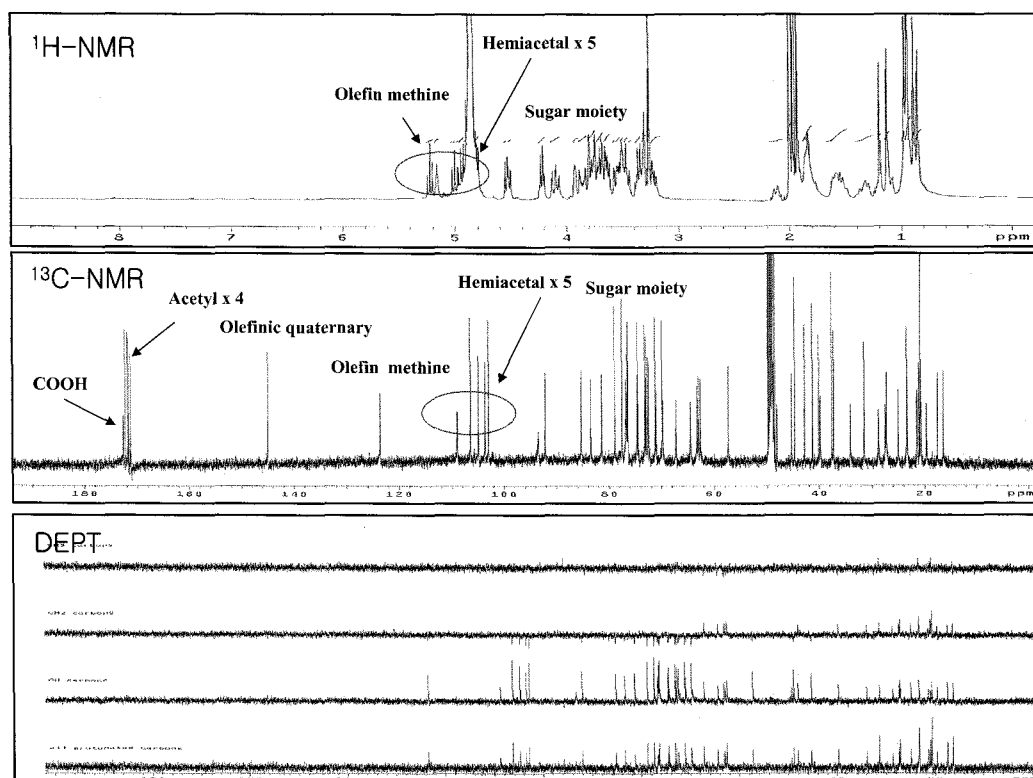


Fig. 3. ¹H-NMR (600 MHz), ¹³C-NMR (100 MHz) and DEPT spectra of acetyl soyasaponin A₁ in CD₃OD isolated from the hypocotyl of soybeans.

48(C-9), 37.1(C-10), 23.3(C-11), 123.4(C-12), 144.8(C-13), 41.1(C-14), 27.1(C-15), 28.6(C-16), 37.4(C-17), 44.6(C-18), 45.2(C-19), 3.13(C-20), 76.6(C-21), 93.4(C-22), 23.3(C-23), 64.3(C-24), 16.3(C-25), 17.4(C-26), 24.9(C-27), 21.3(C-28), 33.8(C-29), 27.3(C-30). 3-O- β -D-glucopyranosyl moiety : 104.7(C-1'), 81.3(C-2'), 76.6(C-3'), 73(C-4'), 78.8(C-5'), 172.5(C-6') 2'-O- β -D-galactopyranosyl moiety : 103.5(C-1''), 83.4(C-2''), 74.5(C-3''), 70.9(C-4''), 77.4(C-5''), 62.8(C-6''); 2''-O- β -D-glucopyranosyl moiety : 106.3(C-1'''), 76.5(C-2'''), 76.7(C-3'''), 71.0(C-4'''), 78.8(C-5'''), 63.1(C-6'''), 22-O- β -L-arabinopyranosyl moiety : 108.8(C-1'''), 72.8(C-2'''), 85.2(C-3'''), 69.7(C-4'''), 67.2(C-5'''); 3''''-O- β -D-glucopyranosyl moiety : 102.8(C-1''''), 72.4(C-2''''), 102.8(C-3''''), 69.6(C-4''''), 74.3(C-5''''), 62.5(C-6'''). δ 20.6, 20.7, 20.9, 20.9 (3H, 3''''-O- β -D-glucopyranosyl moiety, 2,3,4,6-CH₃). UKC (Fr-I-2 : white powder : CD₃OD)은 $[\alpha]_D$ 값이 +17.0°이고 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV 흡수가 없고, 10% aq. H₂SO₄로 분무, 건조 및 가열하였을 경우, 푸른색으로 발색되었다. IR로부터 수산기(3422 cm⁻¹) 및 carbonyl(1745 cm⁻¹) 작용기를 갖는 것으로 확인되었다. ¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) spectrum에서 δ_H 5.12(1H, br. s)의 signal로부터 olefinic methine proton이 존재함을 관측하였다. 또한 4개의 acetyl methyl proton signal이 δ_H 1.93~1.97 ppm 사이에서 각각 singlet으로 관측되었으며, δ_H 4.92, 4.54 및 4.51에서 3 mole의 glucose에 anomeric proton signal과 δ_H 4.80에서 1 mole의 galactose와 1 mole의 arabinose anomeric proton signal이 관찰되어 5 mole의 당이 결합되어 있음을 알 수 있었다. 3.44-3.99 사이에서 당에서 비롯한 oxygenated methine proton들이 관측되었다. 고자장 영역에서는 triterpene moiety에서 비롯한 methylene과 methine proton signal을 확인할 수 있었다. δ_H 1.20, 1.13, 0.97, 0.95, 0.94, 0.89,

0.85에서 7개의 singlet methyl proton signal을 확인하였다. 따라서 UKC는 이중결합 1개와 singlet methyl기 6개를 가진 ursane 골격의 triterpenoid배당체 화합물로 추정할 수 있었다. ¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD) spectrum을 보면, 4개의 acetyl기에서 유래한 4개의 carbonyl δ_C 172.14, 171.64, 171.48, 171.09 및 7개의 methyl carbon signal δ_C 33.8, 27.3, 24.9, 23.3, 21.3, 17.4, 16.3 signal이 관측되었다. 그리고 1개의 이중결합 δ_C 123.4, 144.8과 2개의 oxygenated methine carbon signal(δ_C 76.6, 92.0)이 관측되었다. δ_C 106.3, δ_C 104.7, δ_C 102.8 및 δ_C 108.8에서 각각 3 mole의 glucose, 1 mole의 arabinose와 δ_C 103.5에서 1 mole의 galactose에 해당하는 anomeric carbon을 관찰할 수 있었으며, δ_C 60과 δ_C 81사이에서 5 mole의 당에서 기인하는 carbon signal을 관찰할 수 있었다. 또한 C-3과 C-22 carbon signal이 aglycone인 hederagenin의 carbon signal보다 각각 δ_C 7.8 downfield, δ_C 3.2 upfield chemical shift되어 당이 C-3-O와 C-22-O에 결합된 bisdesmoside acylglycoside임을 추측할 수 있었다. Anomeric proton의 coupling constant값이 8.0 Hz인 점으로부터 D-glucopyranose가 β 결합하고 있음을 알 수 있었고 당의 및 수산기의 결합위치의 확인을 위하여 2D-NMR 기법을 이용하였다. 따라서 UKC는 당 다섯 분자와 이중결합 1개, 2개의 수산기를 가진 triterpenoid saponin 구조로 추정되었다. 또한 UKC는 ESI-MS spectrum 1437.6 m/z에서 [M+H]⁺ molecular ion peak를 나타내어 분자량(MW)이 1436.6(C₆₇H₁₀₄O₃₃)임을 확인할 수 있었고, 이와 같은 결과를 기존의 보고(Isao *et al.*, 1985; 1988)와 비교하여 종합적으로 판단하여본 결과 UKC는 acetyl soya-saponin A₁임을 최종적으로 확인할 수 있었다.

본 연구를 통하여 분리된 triterpenoid saponin 화합물은 콩 등의 식물에서 분리(Isao *et al.*, 1985; 1988)된 바 있으며 항산화활성(Yosshiki *et al.*, 1996)항바이러스(Jung *et al.*, 2005), 항염증(Jahromi *et al.*, 1999) 및 각종 생리활성

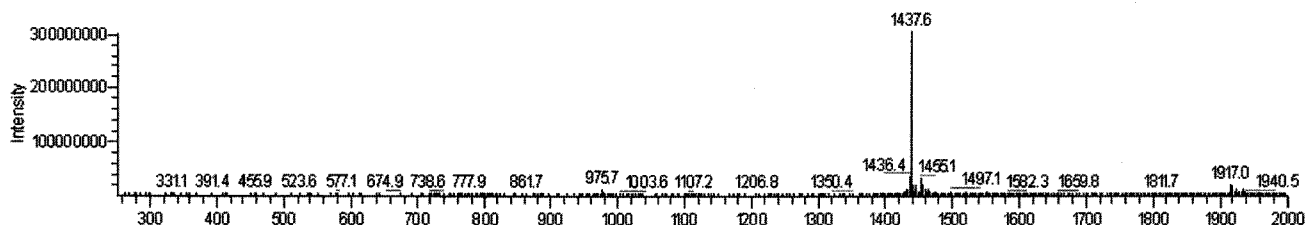


Fig. 4. Characteristics of positive ion ESI-MS spectrum and molecular mass, m/z 1439.15 [M+H]⁺, of acetyl soya-saponin A₁ isolated from the hypocotyl of soybeans.

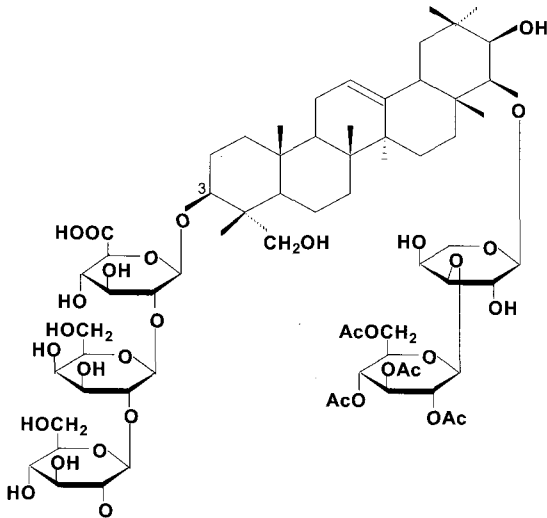


Fig. 5. Structure of acetyl soyasaponin A₁ isolated from the hypocotyl of soybeans.

(Yumiko *et al.*, 1998)과 C-22위치에 결합된 당은 cytotoxicity 활성을 증가시키(Mohammed & Roszza, 2002)는 것으로 보고되었다. 특히 ursane 골격의 terpenoid 화합물은 소염작용(Jeong *et al.*, 1979), 고지혈증억제(Liu, 1995; Mahato *et al.*, 1992), 항돌연변이활성(Young *et al.*, 1994)이 보고 된 바 있다. 따라서 앞으로 우리나라의 전통식품으로 널리 사용되고 있는 콩에 대한 triterpenoid saponin 화합물의 다양한 생리적 및 약리적 활성을 검토함으로써 건강기능성 식품 또는 의약품의 소재로서의 충분한 가치가 있다고 여겨지며 추후 이의 활용과 관련된 연구가 활발히 추진될 것으로 기대된다.

적 요

본 연구는 국내육성 콩 품종 및 전통식품의 우수성을 입증하고, 생리활성이 우수한 고품질의 신품종 육성을 위한 기초기술 확립의 일환으로 group A soyasaponin의 분리 및 정제에 관한 연구를 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 콩 종실로부터 hypocotyl을 분리하고 탈지한 후 automated solvent extractor(ASE)를 이용하여 MeOH 추출 후 flash column(150 mm × 40 mm i.d.)을 이용하여 총 14개의 fraction을 분리하였다.

2. Flash column으로 얻어진 8 및 9번 fraction(Fraction-I)을 Luna C₁₈ semipreparative reverse phase column(250 cm × 50 mm i.d.)을 이용하여 Fast PCLC로 정제하여 미지화

합물(unknown compound : UKC)(Fr-I-2)을 분리하였다.

3. Compound 1을 NMR(¹H-NMR, 600 MHz; ¹³C-NMR, 100 MHz; DEPT), IR, UV 및 ESI-MS 분석을 통하여 구조를 동정한 결과 분자량(MW)이 1436.6이며, 분자식이 C₆₇H₁₀₄O₃₃인 group A 계열의 acetyl soyasaponin A₁으로 확인되었다.

인용문헌

- Anderson, R. L. and W. J. Wolf. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 125 : 581S-588S.
- Berhow, M. A., D. W. Elizabeth, S. F. Vaughn, and J. P. Michael J. Plewa. 2000. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutation Research.* 448 : 11-22.
- Berhow, M. A. S. B. Kong, K. E. Vermillion, and S. M. Duval. 2006. Complete quantification of group A and group B soyasaponins in soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 54 : 2035-2044.
- Burrows, J. C., K. R. Price, and G. R. Fenwick. 1987. Soyasaponin IV, an additional monodesmosidic saponin isolated from soybean. *Phytochemistry* 26 : 1214-1215.
- Hayashi, K., H. Hayashi, N. Hiraoka, and Y. Ikeshiro. 1997. Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication in vitro. *Planta Med.* 63 : 102-105.
- Hendrich, S., T. T. Song, S. O. Lee, and P. A. Murphy. 2000. Are saponins and/or other soybean components responsible for hypocholesterolemic effects of soybean foods. *J. Nutr.* 130 : 674S.
- Heng, L., J. P. Vincken, K. Hoppe, G. A. van Koningsveld, K. Decroos, H. Gruppen, M. A. J. S. van Boekel, and A. G. J. Voragen. 2006. Stability of pea DDMP saponin and the mechanism of its decomposition. *Food Chemistry.* 99(2) : 326-334.
- Hu, J., S. O. Lee, S. Hendrich, and P. A. Murphy. 2002. Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 2587-2594.
- Isao, K., S. Masayuki, T. Toshio, and Y. Masayuki. 1985. Saponin and sapogenol. structure of soyasaponin A₁, a bisdesmoside of soyasapogenol A, from soybean the seeds of *Glycine max* Merrill. *Chem. Pharm. Bull.* 33(3) : 1069-1076.
- Isao, K., T. Toshio, N. Yoshiko, O. Kazuyoshi, and Y. Masayuki. 1988. Structures of acetyl-soyasaponins A₁, A₂, and A₃ astringent partially acetylated bisdesmosides of soyasapogenol A, from american soybean the seeds of *Glycine max* Merrill. *Chem. Pharm. Bull.* 36(8) : 2819-2828.

- Jahromi, M. A., M. Gupta, M., Manickam, A. B. Ray, and J. P. Chansouria. 1999. Hypolipidemic activity of pedunculoside a constituent of *Ilex doniana*. *Pharmaceutical Biology*. 37(1) : 37-41.
- Jeon, H.S. and M.K. Sung. 2000. Soybean saponins inhibit the formation of DNA adducts in human colon and liver cells. *J. Nutri.* 130 : 687S.
- Jeong, T. S., E. I. Hwang, H. B. Lee, E. S. Lee, Y. K. Kim, B. S. Min, K. H. Bae, S. H. Bok, and S. U. Kim. 1979. Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Med.* 65, 261-263.
- Jiang, Y., G.G. Zhong, H. Qi, X. Y. Ma. 1993. Antioxidative action of soyasaponin monomers I, A1, A2, and their inhibitory effects on action potential and beating of myocardiocytes in culture. *Chung-Kuo Yao Li Hsueh Pao* 14 : 269-273.
- Jung, H. J., J. H. Nam, J. Choi, K. T. Lee, and H. J. Park. 2005. α -Hydroxyursane-Type triterpenoids: antinociceptive anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. *Biol. Pharm. Bull.* 28(1) : 101-104.
- Kim, Y. H. 2003. Biological activities of soyasaponins and their genetic and environmental variation in soybean. *Korean J. Crop Sci.* 48(S) : 49-57.
- Kikuchi, A., C. Tsukamoto, K. Tabuchi, T. Adachi, and K. Okubo. 1999. Inheritance and characterization of a null allele for group A acetyl saponins found in a mutant soybean. *Breeding Sci.* 49 : 167-171.
- Kinjo, J., M. Imagire, M. Udayama, T. Arao, and T. Nohara. 1998. Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I~IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Med.* 64 : 233-236.
- Kitagawa, I., T. Taniyama, Y. Nagahama, K. Okubo, F. Yamauchi, and M. Yoshikawa. 1988a. Saponin and sapogenol XLII. Structures of acetyl-soyasaponins A1, A2, and A3, astringent partially acetylated bisdesmosides of soyasapogenol A, from american soybean, the seeds of *Glycine max* Merrill. *Chem. Pharm. Bull.* 36 : 2819-2828.
- Kitagawa, I., H. K. Wang, T. Taniyama, and M. Yoshikawa. 1988b. Saponin and sapogenol XLI. Reinvestigation of the structures of soyasapogenol A, B, and E, oleanene-sapogenols from soybean. Structures of soyasaponins I, II, and III. *Chem. Pharm. Bull.* 36 : 153-161.
- Konoshima, T., M. Kokumai, M. Kozuka, H. Tokuda, H. Nishino, and A. Iwashima. 1992. Anti-tumor-promoting activities of afromosin and soyasaponin I isolated from *Wistaria brachybotrys*. *J. Nat. Prod.* 55 : 1776-1778.
- Korathkar, R., and A.V. Rao. 1997. Effect of soya bean saponins on zoxy methane-induced preneoplastic lesions in the colon of mice. *Nutr. Cancer* 27 : 206-209.
- Kudou, S., M. Toromura, C. Tsukamoto, M. Shimoyamada, T. Uchida, and K. Okubo. 1992. Isolation and structural elucidation of the major genuine soybean saponins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 : 142-143.
- Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49 : 57-68.
- Mahato, S. B., A. K. Nandy, and G. Roy. 1992. Triterpenoids. *Phytochem.* 31 : 2199-2249.
- Miyao, H., T. Arao, M. Udayama, J. Kinjo, and T. Nohara. 1998. Kaikasaponin III and soyasaponin I, major triterpene saponins of *Abrus cantoniensis*, act on GOT and GPT: influence on transaminase elevation of rat liver cells concomitantly exposed to CCl₄ for one hour. *Planta Med.* 64 : 5-7.
- Mohammed, H. and J. P. N. Rosazza. 2002. New isoflavone and triterpene glycosides from soybeans. *J. Nat. Prod.* 65 : 805-813.
- Nakashima, H., K. Okubo, Y. Honda, T. Tamura, S. Matsuda, and N. Yamamoto. 1989. Soybean saponin and isoflavonoids against HIV in vitro. *AIDS.* 3 : 655-658.
- Nishida, K., Y. Araki, Y. Nagamura, Y. Ohta, M. Ito, and I. Ishiguro. 1993. Preventive effect of saponin fractions separated from hypocotyl of soybean on CCl₄-induced injury in isolated rat hepatocytes. *Med. Biol.* 126: 87-90.
- Rao, A.V. and M.K. Sung. 1995. Saponins as anticarcinogens. *J. Nutr.* 125 : 717S-724S.
- Shiraiwa, M., K. Harada, and K. Okubo. 1991a. Composition and structure of "group B saponin" in soybean seed. *Agric. Biol. Chem.* 55 : 911-917.
- Shiraiwa, M., S. Kudo, M. Shimoyamada, K. Harada, and K. Okubo. 1991b. Composition and structure of "group A saponin" in soybean seed. *Agric. Biol. Chem.* 55 : 315-322.
- Shiraiwa, M., H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Tamura, S. Matsuda, and K. Okubo. 1991c. Soybean saponin; structure and physiological properties, especially antiviral activity on HIV in vitro. *Proceedings of the International Conference of Soybean Processing and Utilization*. Gongzhuling, China. p 95-101.
- Sirtori, C. R., M. R. Lovati, C. Manzoni, M. Monetti, F. Pazzucconi, and E. Gatti. 1995. Soy and cholesterol reduction: Clinical experience. *J. Nutr.* 125 : 598S-605S.
- Sung, M.K. and M.Y. Park. 2000. Effects of soybean saponins on the growth and antioxidant defense of human hepatocarcinoma cells. *J. Nutri.* 130 : 687S.
- Taniyama, T., Y. Nagahama, M. Yoshikawa, and I. Kitagawa. 1988a. Saponin and sapogenol XLIII. Acetyl-soyasaponins A4, A5, and A6, new astringent bisdesmosides of soyasapogenol A, from japanese soybean, the seeds of *Glycine max* Merrill. *Chem. Pharm. Bull.* 36 : 2829-2839.
- Taniyama T, M. Yoshikawa, and I. Kitagawa. 1988b. Saponin and sapogenol. XLIV. Soyasaponin composition in soybeans of various origins and soyasaponin content in various organs of soybean. Structure of soyasaponin V from soybean hypocotyl. *Yakugaku Zasshi* 108 : 562-571.

- Tsakamoto, C., A. Kikuchi, K. Harada, K. Kitamura, and K. Okubo. 1993. Genetic and chemical polymorphisms of saponins in soybean seed. *Phytochemistry* 34(5) : 1351-1356.
- Vlietinck, A.J., T.D. Bruyne, S. Apers, and L.A. Pieters. 1998. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus(HIV) infection. *Planta Med.* 64 : 97-109.
- Yoshikoshi, M., Y. Yoshiki, K. Okubo, J. Seto, and Y. Sasaki. 1996. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts. *Plant Med.* 62 : 252-255.
- Young, H. S., H. Chung, C. K. Lee, K. Y. Park, T. Yokozawa, and H. Oura. 1994. Ursolic acid inhibits aflatoxin B₁-induced mutagenicity in a *Salmonella* assay system. *Biol. Pharm. Bull.* 17 : 990-992.
- Yumiko, Y., M. Kinumi, T. Kahara, and K. Okubo. 1996. Chemiluminescence of soybean saponins in the presence of active oxygen species. *Plant Science.* 116 : 125-129.
- Yumiko, Y. K. Sigemitsu, and O. Kazuyoshi. 1998. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(12) : 2291-2299.