

碩士學位論文

제주산 두릅의
사포닌 성분 분리에 관한 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

金 精 美

2000年 8月

제주산 두릅의 사포닌 성분 분리에 관한 연구

指導教授 李南昊

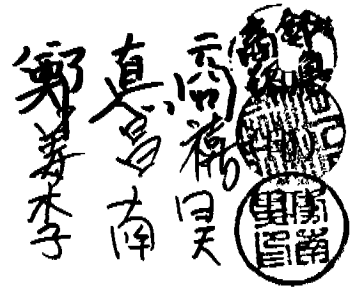
金精美

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2000 年 8 月

金精美의 理學 碩士學位 論文으로 認准함

審査委員長
委員
委員



濟州大學校 大學院

2000年 8月

Study on the Seperation of Saponin
Components using *Aralia elata*
Collected in Cheju

Jung-Mi Kim

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIOAL UNIVERSITY

2000. 8.

Abstract

Young shoot of *Aralia elata* SEEM., a garnish foodstuff, was studied to isolate saponin components which been reported to have potent hypoglycemic activity in the oral glucose tolerance in rats. The aq. methanol extracts of the *Aralia elata* collected in Cheju island were subjected to chromatographic separations including preparative HPLC. Analysis of the components using the NMR spectra showed the presence of the saponin coponents. Further study is necessary to identify the active components in more detail.

목 차

Abstract-----	i
List of figures-----	iii
List of tables-----	vi
I. 서론-----	1
II. 재료 및 방법-----	8
1. 재료-----	8
2. 시약 및 기기-----	8
3. 두릅나무 새순으로부터 단일 물질의 분리 과정-----	9
4. 역상 silica gel에 의한 분리 과정-----	9
5. 순상 silica gel에 의한 분리 과정-----	10
6. HPLC에 의한 분리 과정-----	11
III. 결과 및 고찰-----	12
1-1. 분리 과정에서 얻어진 양-----	12
1-2. 각 분획에 대한 HPLC 결과 및 NMR-----	13
1-3. TLC 결과-----	15
2-1. 분리 과정에서 얻어진 양-----	19
2-2. 각 분획에 대한 HPLC 결과 및 NMR-----	20
2-3. TLC 결과-----	23
IV. 결론-----	36
V. 참고문헌-----	38

List of Figures

- Figure 1.** Structures of Elatosides **A**, **C**, **E** and **F**
- Figure 2.** Structures of Elatoside **G** and **H**
- Figure 3.** Structures of Elatoside **I** and **K**
- Figure 4.** Isolation procedure of saponins
- Figure 5.** Separation of **I-1-2-(1)** and **I-1-2-(3)** fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.
- Figure 6.** Separation of **I-1-2-(4)** fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.
- Figure 7.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **I-1-2-(1)-③** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 8.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **I-1-2-(3)-②** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 9.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **I-1-2-(4)-①** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 10.** Separation of **II-1-2-A+B** and **II-1-2-B** fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.
- Figure 11.** Separation of **II-1-2-C** and **II-1-2-C'** fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.
- Figure 12.** Separation of **II-1-2-D** fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.
- Figure 13.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-(A+B)-①** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 14.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-(A+B)-②** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.

- Figure 15.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-(A+B)-③** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 16.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-B-⑥** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 17.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-B-⑥** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 18.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-C-①** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 19.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-C-⑤** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 20.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-C-⑥** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 21.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-C-⑦** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 22.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-C'-②** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 23.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-C'-③** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 24.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-C'-④** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 25.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-C'-⑤** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 26.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-C'-⑥** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 27.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-D-②** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.
- Figure 28.** $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of **II-1-2-D-③** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.

Figure 29. ^1H -NMR Spectrum of **II-1-2-D-④** fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.

Figure 30. ^1H -NMR Spectrum of **Oleanolic acid**

Figure 31. ^1H -NMR Spectrum of **Oleanolic acid**

List of Tables

Table 1. 두릅나무의 부위별 추출물에 대한 활성도

Table 2. 활성과 구조와의 관계

1. 서 론

두릅나무(*Aralia elata* SEEMANN)는 두릅나무과(科)에 속하는 낙엽 활엽 관목으로 참두릅나무라고도 불린다. 두릅나무는 높이가 3~4m가 되며 잎은 어긋나고 길이 40~90cm쯤으로 기수 2회 우상복엽(奇數二回羽狀複葉)이며 엽축(葉軸)과 작은 잎에 가시가 있다. 잎은 끝이 뾰족하고 밑은 둥글며 길이 5~11cm, 나비 2~7cm쯤으로 큰 톱니가 있고 양면의 맥(脈) 위에 잔털이 나 있으며 앞면은 녹색이고 뒷면은 회색이다. 길이가 큰 잎은 잎자루의 아랫부분이 줄기를 감싸고 있고, 작은 잎은 넓은 계란형 또는 타원형이고, 8월까지 끝에 길이 30~45cm쯤의 산형화서(繖形花序)를 이루고 흰꽃이 핀다. 꽃은 양성(兩性)이거나 수꽃이 섞여 있으며 지름이 3mm쯤이며 잘다. 열매는 핵과(核果)로 9~10월에 지름 3mm의 둥글고 검은 장과속에 장타원 평평형의 종자가 들어있다. 씨방은 하위(下位)이고 둥글며 10월에 검게 익고 씨는 뒷면에 좁쌀 같은 돌기가 약간 있다. 이 종의 일종으로 잎이 작고 둥글며 엽축의 가시가 크며, 잎의 앞과 뒷면에 회색이나 황색의 가는 털이 나 있는 것을 둥근잎두릅나무(var. *rotundata* Nakai)라 하며, 잎과 잎 자루에 가시가 없는 것을 애기두릅나무(var. *canescens* Nakai)라 한다.^{1,2}

두릅나무는 바다기준 높이 90~1,600m되는 산의 양지쪽 계곡 및 골짜기, 산기슭, 또는 자갈 쌓인 곳 등의 비옥한 곳에서 자라며, 내한성은 종류에 따라 차이가 크며, 음지에서도 잘 자라지만 천근성 양지 식물이고 토양 적응성은 넓으나 배수 불량지는 생육이 힘들며 가을에 낙엽되면서 휴면에 들어가 일정기간 저온을 경과하여야 생육을 시작한다. 한국(전국 각지), 일본, 사할린, 중국, 만주 등지에 분포한다.^{1,2}

두릅나무는 한방과 민간요법 그리고 식용으로 이용되어져왔다. 두릅나무 껍질을 벗겨서 말린 것을 생약명으로 「총목피」라 하고, 뿌리의 껍질을 「총근피」라 하여 같은 목적으로 쓴다. 한방에서는 뿌리, 과실, 수피 등을 강

장·강정·신경안정제로 신경불안, 류마티스 관절염(rheumatic arthritis), 간염바이러스(hepatitis virus), 당뇨병, 음위, 신장병, 위암, 위장장애, 건위, 이뇨, 진통, 거풍, 수종, 신경쇠약(neurathenia), 말기력 부족, 해수(咳嗽), 소화제 등의 치료약으로 쓰이고 있다.

민간에서는 총목피를 위장병, 신경통, 당뇨병에 달여서 마시고, 총근피를 당뇨병의 묘약으로 쓴다. 가시를 달여 마시면 고혈압증에 효과가 크다고 하며 잎은 건위정장제로 쓴다.^{4,5} 우리나라 뿐만 아니라 일본인들의 민간요법 중에서 두릅나무는 당뇨병에 대해 유용하게 사용되어 왔다. 그리고 중국의 전통적인 약에서도 강장제(tonic), 항관절염(antiarthritic)과 항당뇨(antidiabetic)의 목적으로 두릅나무가 사용되어 왔다.¹¹

식용으로는 4월에 7, 8센티미터쯤 된 새순을 데침, 튀김, 나물, 셀러드, 연한뿌리 무침, 생즙가공(염장 조림)등 반찬과 안주로 쓰인다. 목재는 붉은 색을 띠고 가볍고 부드러워 뉘시의 부표로도 사용되고, 성냥개비 나무 자루 같은 것을 만드는데 사용한다.⁴

두릅나무에 관한 연구는 주로 약리학적 측면에서 수행되어왔다. 두릅나무로부터 분리된 주성분으로는 수피에 β -sitosterol, α, β -taralin, oleanolic acid, choline이, 잎에는 hederagenin이, 종자에는 pertoselinic acid, palmitic acid등이 보고되어 있다. 이외에도 Stigmasterol, α -terline, β -sitosterol, Limolcinic acid, Peterpse Lidinic acid, 3-Saponins, Protocate chuic acid 등이 있으며 풍부한 비타민 A등의 영양소가 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다.³ 또한 천연약초들로부터 확인되어진 생리활성 이론을 연구하는 과정에서 두릅나무는 hypoglycemic effect, ethanol absorption inhibitor effect, cytoprotective effect가 있음이 확인되었다. 이은방 등은 두릅나무 근피 추출물이 위염 및 위궤양에 효과가 있음을, Cheryn 등은 두릅나무 추출물의 첨가에 의해 누에의 성장과 저항력이 증가됨을, Samochovice 등은 두릅나무의 saponoside가 쥐의 total lipid, cholesterol, triglyceride의 함량을 감소시킴을 보고한 바 있으며, 또한 Seifulla 등과 이명렬 등은 두릅나무 추출물이 당뇨병에 효과가 있음을, 김옥경 등은 두릅나무 근피의 ethyl acetatecncnfanf에서 혈당을 강화시키는 화합물로 oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranoside

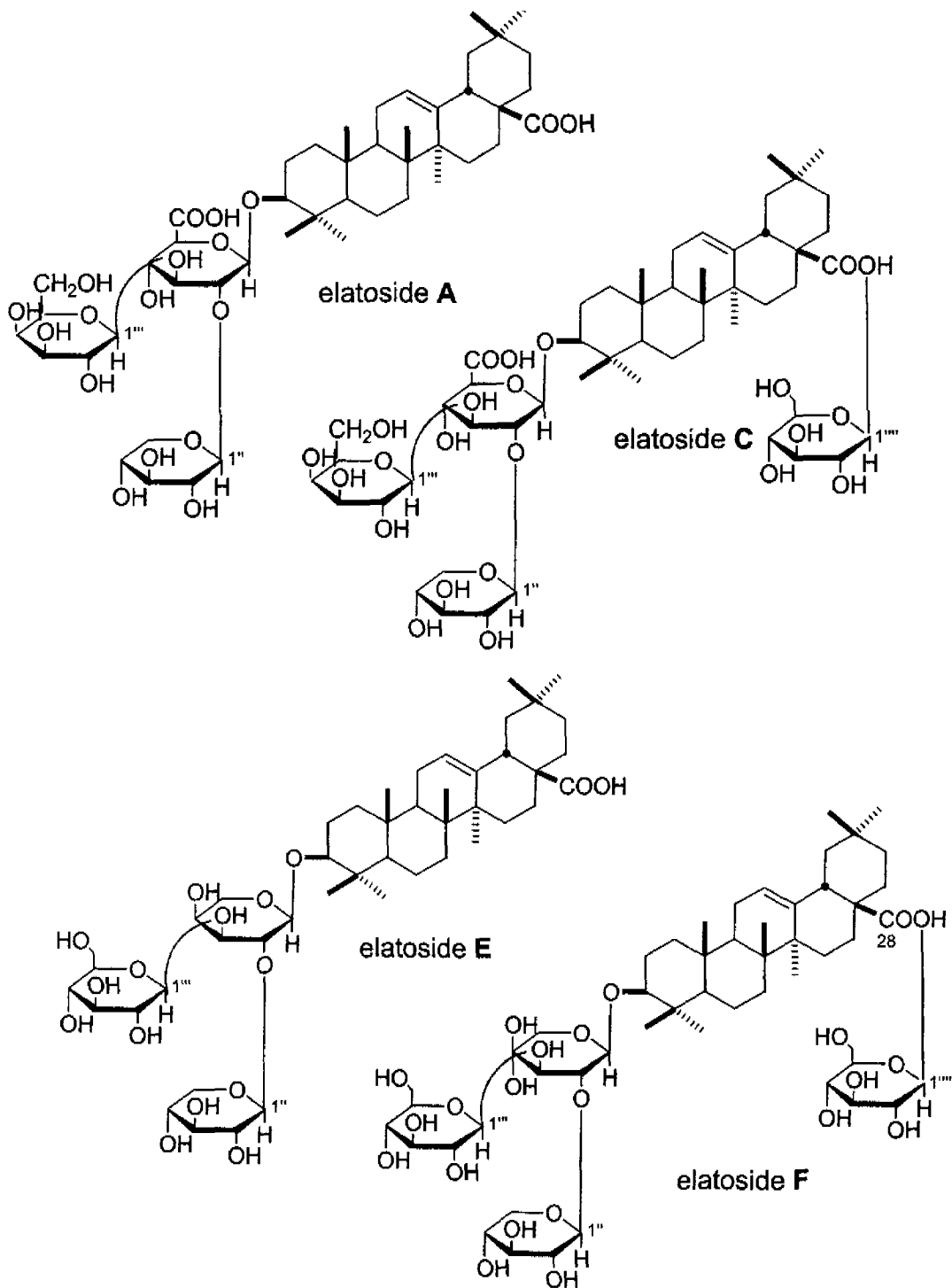
를 보고한 바 있다.⁶ 두릅나무와 유사한 특징 및 효과를 가지며 제주에서 자생하고 있는 섬오갈피나무 또한 그 성분이나 약효등에 대한 연구 결과가 보고되어 있고,¹⁶ oleanolic acid bisdesmoside가 우슬에서 추출·분리되어 보고된바 있다.¹⁷

두릅나무에서 약리학적으로 활성을 갖는 물질은 새순, 나무껍질, 뿌리, 잎 등의 부분으로부터 그 주성분들이 분리된다. 두릅나무의 각 부위별 추출물에 대한 활성도를 Table 1에 나타내었다. 분리된 추출물들에 대한 구조-활성 관계 실험에 의해서, oleanolic acid 3-*O*-monodesmoside 구조는 활성에 중요하다는 것을 알게되었다. 저혈당 활성 및 에탄올 흡수 저해 효과에 있어서의 활성과 구조 관계에 관한 내용을 Table 2에 나타내었다.

[Table 1. 두릅나무의 부위별 추출물에 대한 활성도]

부위	추출물	활성	참고문헌
새순	Elatoside G, H, I, K	Hypoglycemic effect	7, 11
껍질	Elatoside A, B, C, D	Hypoglycemic effect Cytoprotective effect Ethanol absorption inhibitor effect	8, 9, 10
잎	oleanolic acid, hederagenin oligoglycoside	Hypoglycemic effect Cytoprotective effect	9, 10
뿌리 표층	Elatoside E, F oleanolic acid oligoglycoside	Hypoglycemic effect Cytoprotective effect Ethanol absorption inhibitor effect	11, 12, 13, 14

Table 2에서 보는 것처럼 hypoglycemic effect와 ethanol absorption inhibitor에 있어서 oleanolic acid 3-*O*-monodesmoside moiety는 활성을 증가시키고, 28-ester glucoside moiety는 활성을 감소시킨다는 것을 알 수 있다. 그리고, oleanolic acid 자체는 활성을 보이지 않았다. 반면에, cytoprotective effect에서는 전자와는 반대로 3-*O*-monodesmoside moiety보다 28-*O*-bisdesmoside가 더 유력한 활성을 보였다.

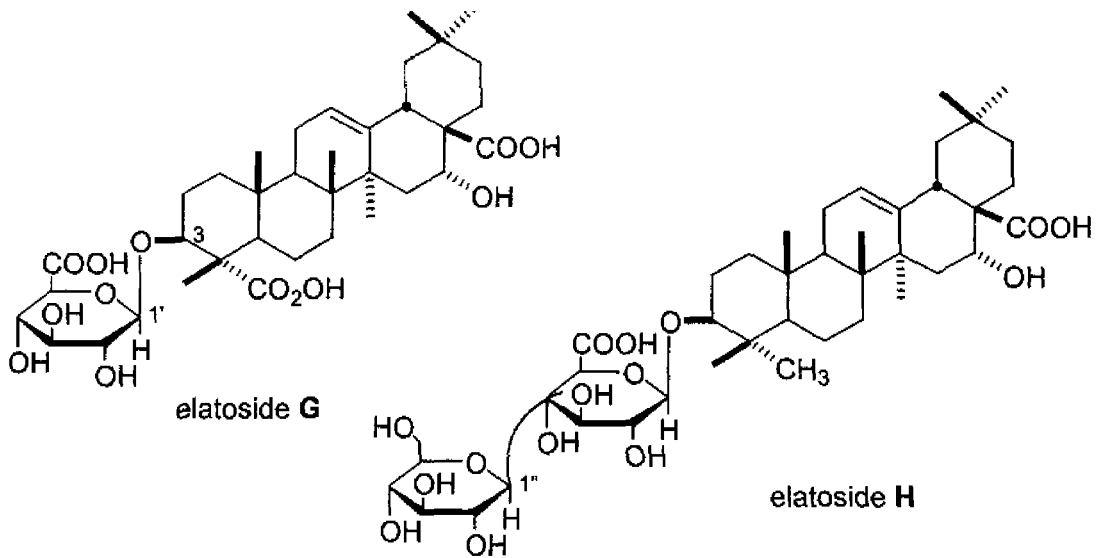


[Figure 1. Structures of Elatosides A, C, E, and F]

[Table 2. 활성과 구조와의 관계]

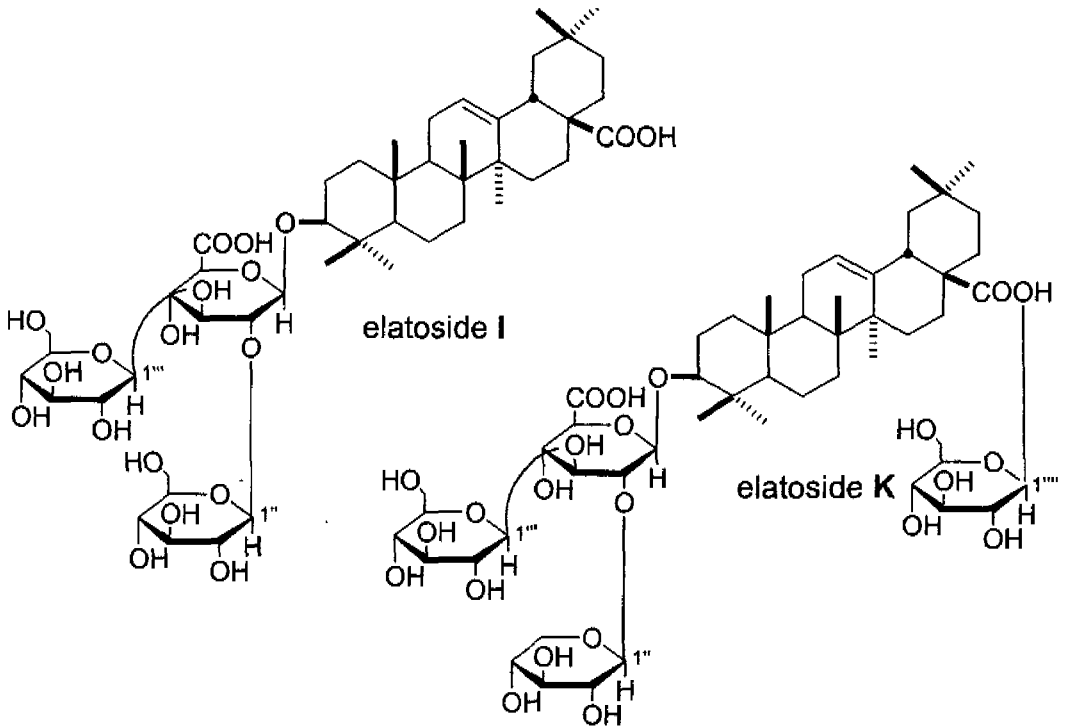
구분	Compound	moiety	activity
Hypoglycemic effect	ElatosideG	hedergenin, 3- <i>O</i> -glucuronic acid	활성증가
	ElatosideH	echinocystic acid, 3- <i>O</i> -glucuronic acid, 3' - <i>O</i> -glucopyranosyl	"
	Elatoside I	oleanolic acid, 3' - <i>O</i> -glucopyranosyl, 2' - <i>O</i> -glucopyranosyl, 3- <i>O</i> -glucopyranosiduronic acid,	"
	ElatosideK	oleanolic acid, 2' - <i>O</i> -xyloside, 3- <i>O</i> -glucopyranosiduronic acid, 3' - <i>O</i> -glucopyranosyl, 28- <i>O</i> -glucopyranoside	활성감소
	Oleanolic acid	oleanolic acid	"
Ethanol absorption inhibitor effect	ElatosideE	oleanolic acid, 4' - <i>O</i> -arabinoside 2' - <i>O</i> -xyloside, 3' - <i>O</i> -glucoside	활성증가
	ElatosideF	oleanolic acid, arabinoside, 28-ester glucoside, xyloside, glucoside,	활성감소
	ElatosideA	oleanolic acid, 3- <i>O</i> -glucuronide, 3' - <i>O</i> -galactoside, 2' - <i>O</i> -xyloside	활성증가
	Elatoside C	oleanolic acid, 3- <i>O</i> -glucuronide, 3' - <i>O</i> -galactoside, 2' - <i>O</i> -xyloside, 28- <i>O</i> -glucoside	활성감소
	Oleanolic acid	oleanolic acid	"

결론적으로 oleanolic acid의 *O*-3과 *O*-28 위치에 당성분들이 결합되어 있어야 강력한 활성을 보인다는 것을 알 수 있다.



[Figure 2. Structures of Elatoside G and H]

이와 같이 두릅은 옛부터 나물로 식용되어 왔기에 안전성에 문제가 없을 것으로 예상되며 한약재로 이용되어 왔던 식물이므로 생리활성을 갖는 성분의 존재 가능성이 시사된다. 일본, 중국 등지에서는 두릅에 대한 연구가 많이 되어있으나, 현재 우리나라에서는 미비한 실정이다. 게다가 중국의 많은 전통 의학자들은 많은 종류의 에탄올 중독(intoxication)에 대한 예방과 치료학적인 효과를 알고는 있으나 그것들의 활성 성분을 아직 규명하지 못하고 있다. 실제로, 앞의 연구들도 일부 약리학적 측면에서 생리 활성에 관한 부분에 대한 연구에 한정되어 있다. 이에 본 연구는 생리활성을 나타내는 부분구조를 좀더 명확히 하고자 시도하였다. 특히 식물은 매우 다양한 유용성분을 함유하고 있으며 이러한 식물자원에서 생리활성물질을 찾으려는 시도가 계속되어 왔으나 우리나라에서 자생하고 있는 식물을 대상으로 한 연구는 빈약한 실정이다. 두릅나무는 우리나라 전국 각지에서, 특히 제주지역 에도서 자생할 뿐만 아니라 생산이 되고 있으므로 활발한 연구가 진행될 수 있는 조건이라 여겨진다.



[Figure 3. Structures of Elatoside I and K]

본 연구는 앞서 보고된 자료를 바탕으로 제주도에서 자생하는 두릅나무를 이용하여 궁극적으로는 저혈당 효과와 에탄올 흡수 저해 물질등의 생리활성을 보이는 물질의 구조와 활성 정도를 확인하고자 하였다. 더 나아가 새로운 물질을 연구하고자 하는 바램에서 이에 앞서 그 명확한 구조를 밝히기 위해 단일 물질로의 분리를 시도했다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

두릅나무는 산골짜기나 계곡 등 양지바른 곳에서 자생하는 식물이다. 본 연구에 사용되는 두릅나무의 새순은 제주도 북제주군 광령에서 노지재배한 것을 4월에 채취한 것이다. 3kg의 새순을 깨끗하게 씻어서 1kg을 제외한 나머지는 3주정도 실온에서 자연 건조시켰다. 완전히 마른 두릅나무의 새순을 분쇄하여 분말상태로 만든 다음 저온 냉장고(-20℃)에 보관했다. 1kg의 젖은 두릅나무의 새순은 12시간 정도 실온에서 건조시켰다. 어느 정도 건조된 새순을 잘게 자르고, 80% MeOH을 용매로 12시간 정도 침출시켜 본 실험에 사용했다.

2. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 용매 methyl alcohol은 Hyman Limited사의 제품을 사용했다. 그리고 reverse-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 100(C₁₈-reverse phase, Merck)을 사용하여 분리했다. normal-phase Silica gel column chromatography에는 Silica gel 60(230-400mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며 분리 과정에 사용된 TLC (Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60F₂₅₄, 0.2mm, Merck)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위해 UV lamp를 사용하거나 혹은 visualizing agent를 침적시킨 후 plate를 dry gun을 이용하여 건조시켰다. visualizing agent는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 그리고 0.25% NaOH을 혼합한 수용액을 사용하였다. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)는 Waters 2487 (Dual λ absorbance detector,

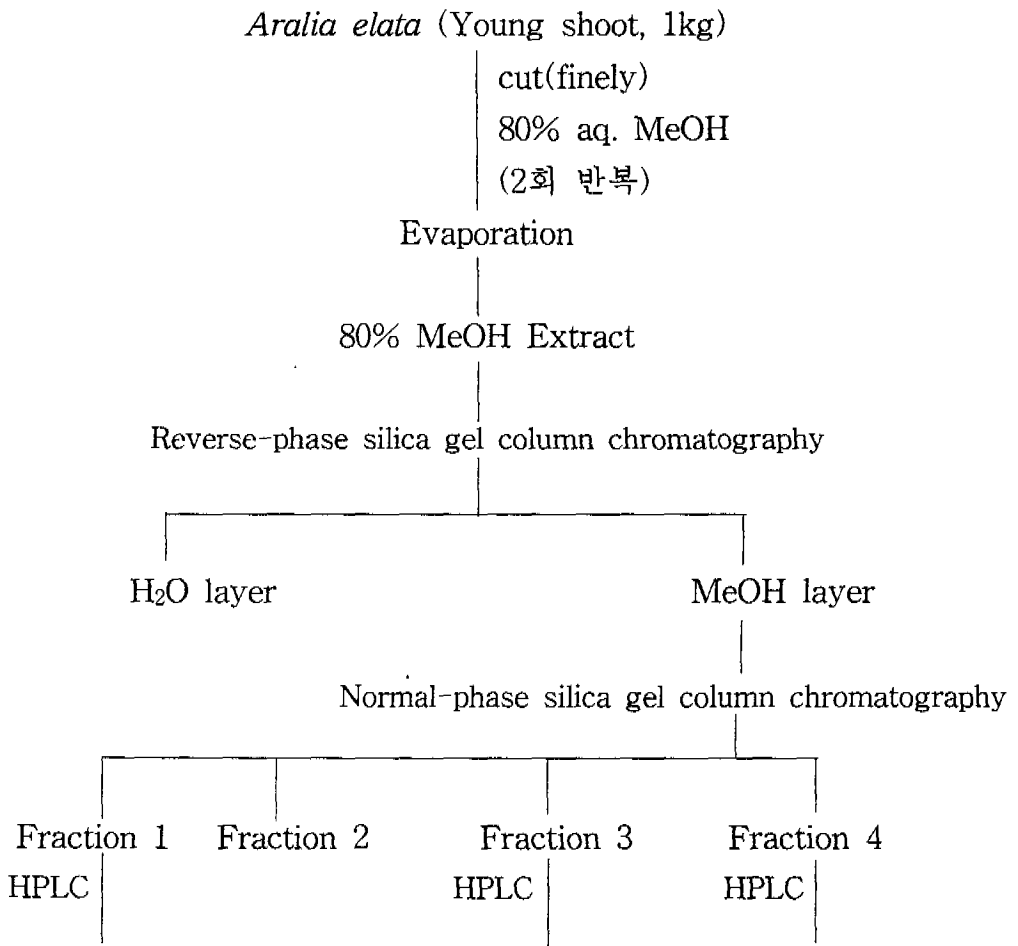
Waters)를 사용하였고, OSD column을 장착하여 분리했다. NMR (Neuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA400 (FT NMR system, JEOL)을 이용하여 확인했다.

3. 두릅나무 새순으로부터 단일물질의 분리과정

추출은 Figure 4과 같이 수행하였다. 젓은 시료(두릅나무의 새순)를 취하여 건조시킨 후 미세하게 잘라서 둥근플라스크에 넣고 80% MeOH 1000ml를 가하여 12시간동안 침출시킨다. 침출시킨 시료를 24시간동안 reflux 시키면서 추출한다. 감압 흡입 여과기를 이용하여 여과한다. 이와 같은 방법으로 잔사에 대하여 2회 반복 실시하여 용매 추출액을 얻는다. 이때 용매는 1000 ml씩 가한다. 여과 후 얻어진 용액을 회전농축기로 농축하여 추출물을 얻는다. 이 추출물에 Reverse-phase silica gel column chromatography (H₂O → MeOH)를 실시하여 H₂O층과 MeOH층을 얻는다. MeOH층을 회전농축기로 농축하여 추출물을 얻은 후 일부를 Normal-phase column chromatography 시킨다. 이 과정에서 얻은 분획들에 대하여 각각 ODS column을 이용한 HPLC를 실시하고 여러개의 분획들을 얻는다. 얻어진 분획들을 회전농축기로 농축하여 추출물을 얻는다.

4. Revers-phase column chromatography에 의한 분리 과정

MeOH층의 분리를 위하여 glass column (2.5×60)에 ODS (Octa Desyl Silica)를 충전한다. 시료(80% MeOH extract)를 일정량 흡착시킨 후 H₂O와 MeOH을 차례로 elution 시켜 각각의 분획들을 얻는다. 얻어진 분획들을 감압 농축시켜 추출물을 얻는다.



[Figure 4. Isolation procedure of saponins]

5. Normal-phase Silica gel column chromatography에 의한 분리 과정

I. MeOH 추출물에서의 분리를 위해 glass column (2.5×60)에 silica gel을 충전한다. MeOH추출물 중 일부를 소량의 용매에 녹인후 충전된 column에 흡착시킨다. 전개용매(CHCl₃/MeOH/H₂O=7/3/1 → lower layer)로 elution

시킨다. 분리되어 얻어지는 각각의 분획들을 회전농축기로 농축시켜 추출물을 얻는다.

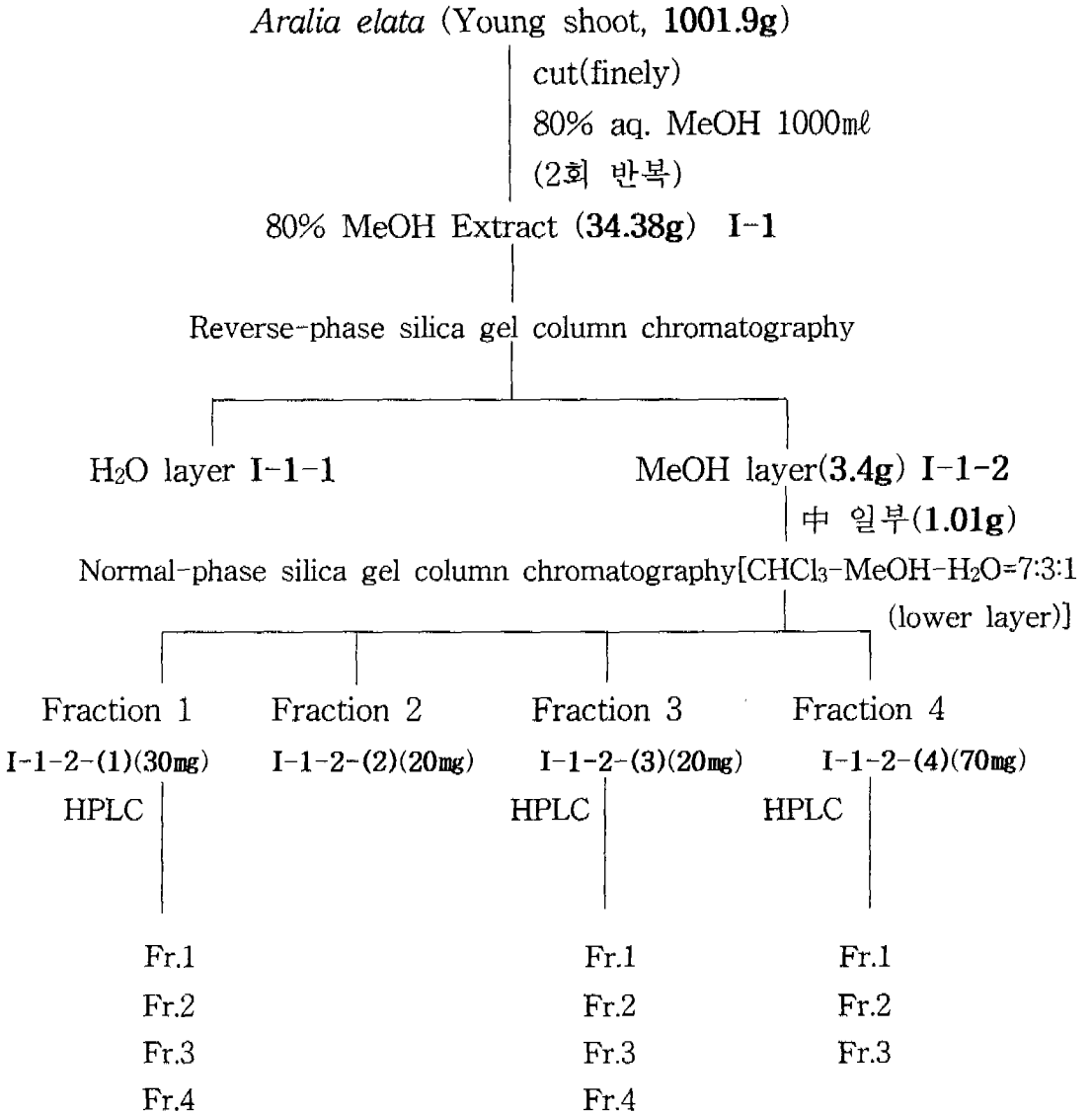
II. MeOH추출물 중 일부를 소량의 용매에 녹인후 충전된 column에 흡착시킨다. 전개용매(CHCl₃/MeOH/H₂O=6/4/1)로 elution 시킨다. 분리되어 얻어지는 각각의 분획들을 회전농축기로 농축시켜 추출물을 얻는다.

6. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)에 의한 분리

얻어진 분획들은 ODS column(μ Bondapak, 7.8×300mm)을 장착한 HPLC [Waters 2487]를 이용하여 각각의 fraction들로 분리했다. 이동상으로 사용한 용매는 methyl alcohol (HPLC용, Fisher)-1% acetic acid 이며 각 분획에 따라 60%~80% aq. MeOH 이 쓰였다. 그리고, flow rate는 분획에 따라 1.5ml/min~2.5ml/min사이의 조건으로 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1-1. 분리과정에서 얻어진 양(I)

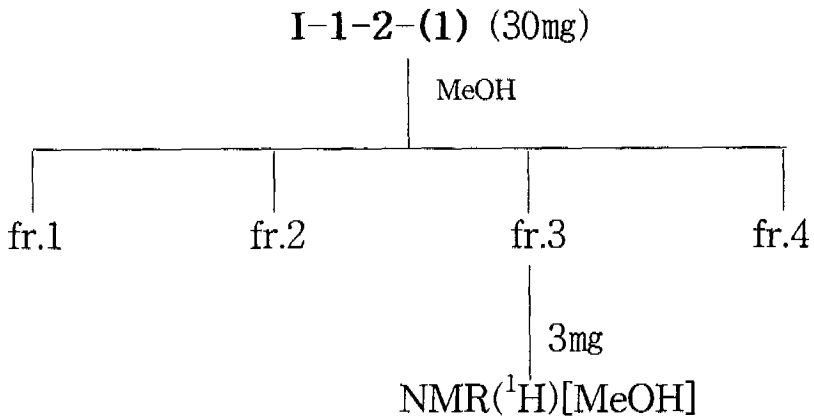


젖은 시료(두릅나무의 새순) 1001.9g을 취하여 12시간 건조시킨 후 미세하게 잘라서 2000ml 둥근플라스크에 넣고 80% MeOH 1000ml를 가하여 12시간동안 침출시킨다. 침출시킨 시료를 24시간동안 reflux 시키면서 추출한다. 감압 흡입 여과기를 이용하여 여과한다. 이와 같은 방법으로 잔사에 대하여 2회 반복 실시하여 용매 추출액을 얻는다. 이때 용매는 1000ml씩 가한다. 여과후 얻은 추출액을 순상 실리카겔(CHCl₃/MeOH/H₂O=6/4/1)로 감압 filter시켜 용액을 얻는다. 이 용액을 회전농축기로 농축하여 34.38g(I-1)의 추출물을 얻었다. I-1을 reverse-phase silica gel column chromatography (H₂O → MeOH)를 실시하여 H₂O층(I-1-1)과 MeOH층(I-1-2)을 얻는다. I-1-2 중 1.01g을 가지고 normal-phase column chromatography (CHCl₃/MeOH/H₂O=7/3/1(lower layer))를 실시하여 4개의 fractions [I-1-2-(1)~I-1-2-(4)]을 얻었다. 얻어진 4개의 fraction 중 I-1-2-(2)(20mg)는 I-1-2-(1)과 I-1-2-(3)이 함께 나타난 fraction이므로 HPLC를 하지 않았고, 나머지 fraction들에 대해서는 ODS column을 장착한 HPLC를 실시하여 여러 개의 분획들을 얻었다.

1-2. 각 분획에 대한 HPLC 결과 및 NMR

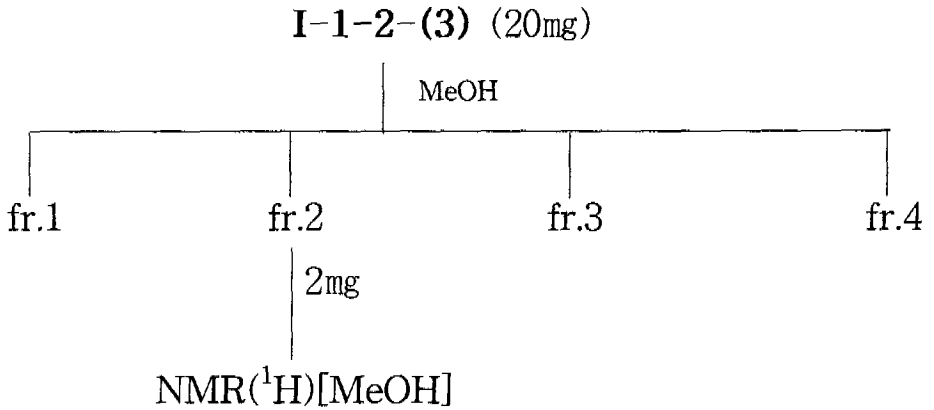
1) I-1-2-(1)

4개의 fraction 중 I-1-2-(1)(30mg)은 70% aq. MeOH을 이동상으로 하고, flow rate는 2.0ml/min로 하여 4회에 걸쳐 분리하여 4개의 분획들을 얻었다. 4개의 분획 중 I-1-2-(1)-③(3mg)을 MeOH을 용매로 하여 NMR spectrum을 얻었다.



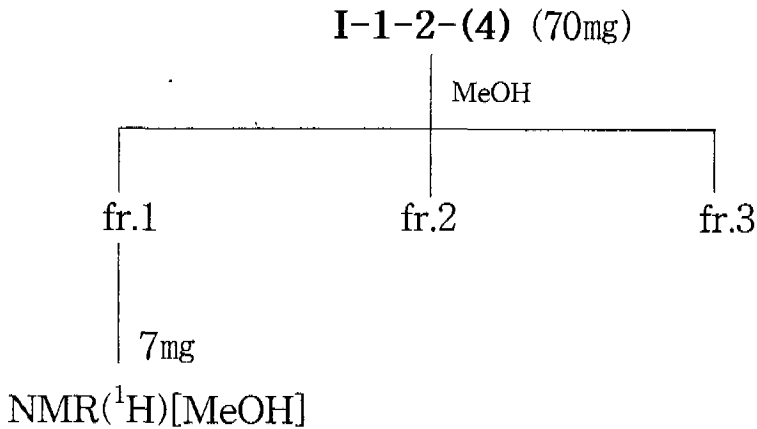
2) I-1-2-(3)

4개의 fraction 중 I-1-2-(3)(20mg)은 60% MeOH을 이동상으로 하고, flow rate는 2.5ml/min, 1970~1980psi로 실시하여 4개의 분획을 얻었다. 25회에 걸쳐 분리하여 4개의 분획을 얻었다. 4개의 분획 중 I-1-2-(1)-②(2mg)을 MeOH을 용매로 하여 NMR spectrum을 얻었다.

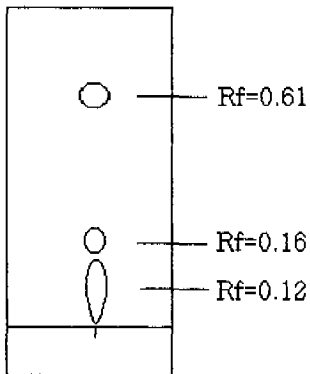


3) I-1-2-(4)

4개의 fraction 중 I-1-2-(4)(70mg)을 60% MeOH을 이동상으로 하고, flow rate는 0.5~0.55ml/min, 1800~1900psi로 실시하여 3개의 분획을 얻었다. 14회 반복 실시하였고, 그 중 I-1-2-(4)-①(7mg)을 MeOH을 용매로 NMR spectrum을 얻었다.



1-3 TLC 결과



Thin-Layer Chromatography는 Silica gel 60F₂₅₄를 사용하였으며, CHCl₃/MeOH/H₂O=7/3/1 (lower layer)의 전개용매를 사용하여 확인하였다. visualizing agent는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH을 혼합한 수용액을 사용하였다. 위에서부터 차례로 I-1-2-(1), I-1-2-(3), I-1-2-(4)이다.

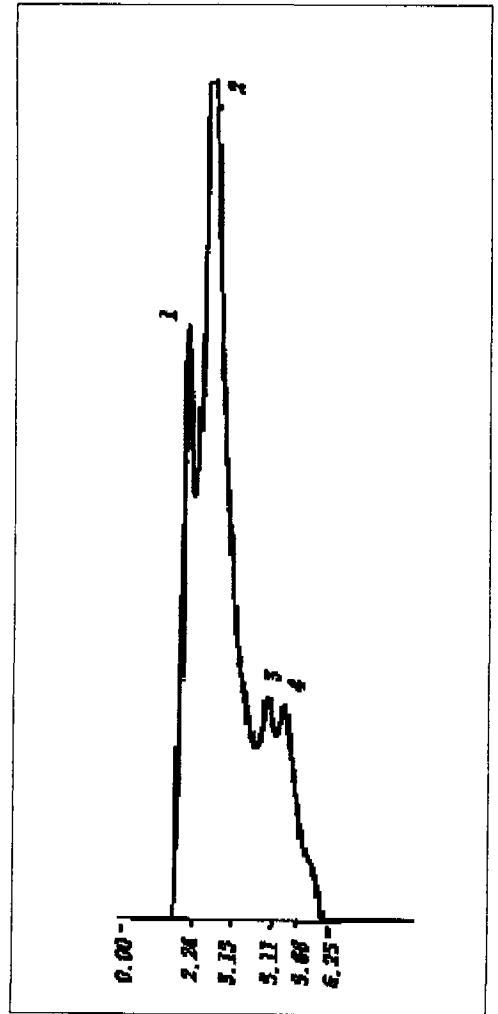
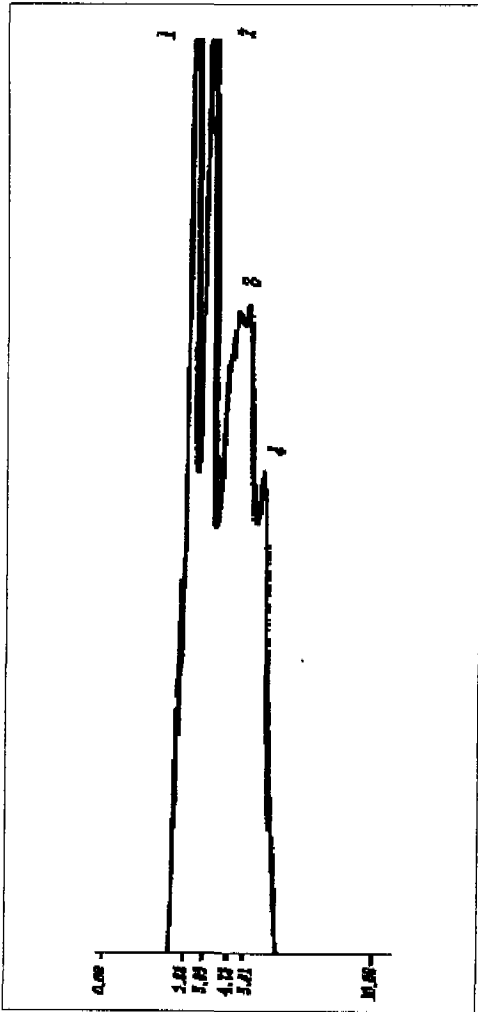


Figure 5 . Separation of I-1-2-(1) and I-1-2-(3) fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.

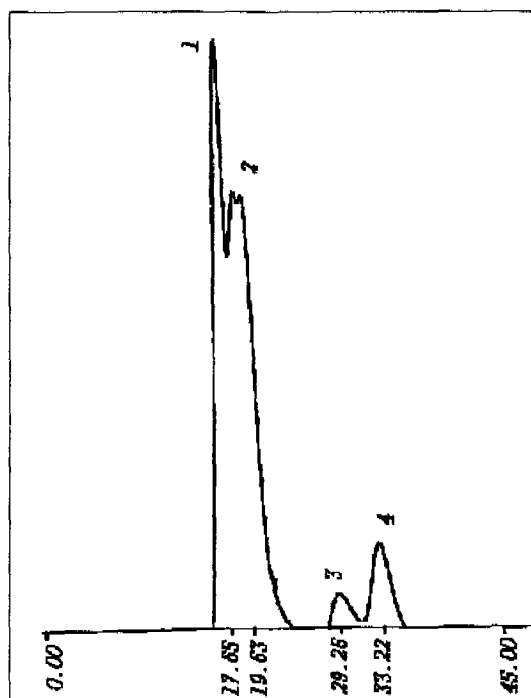
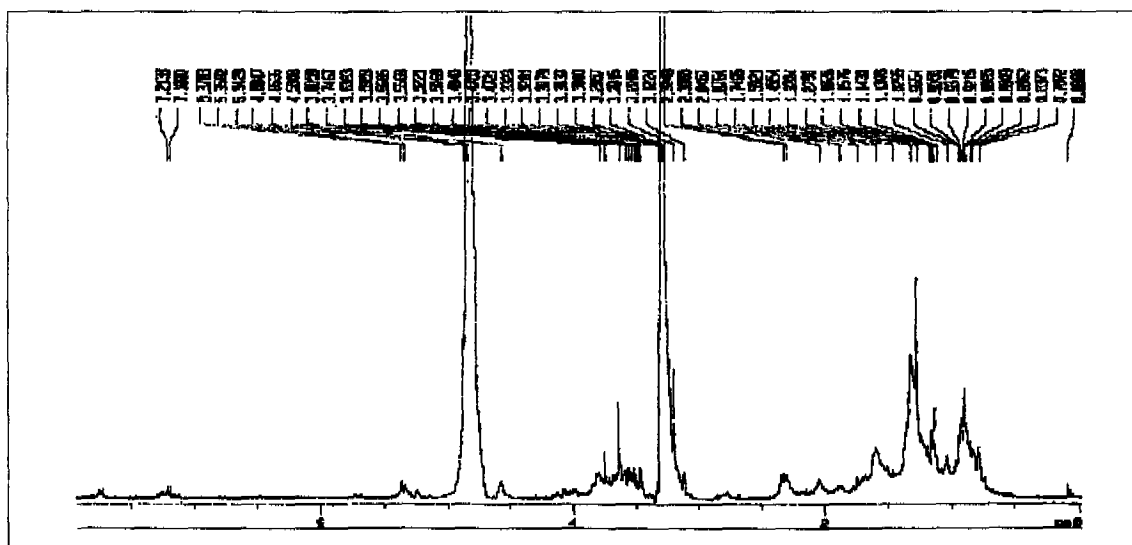
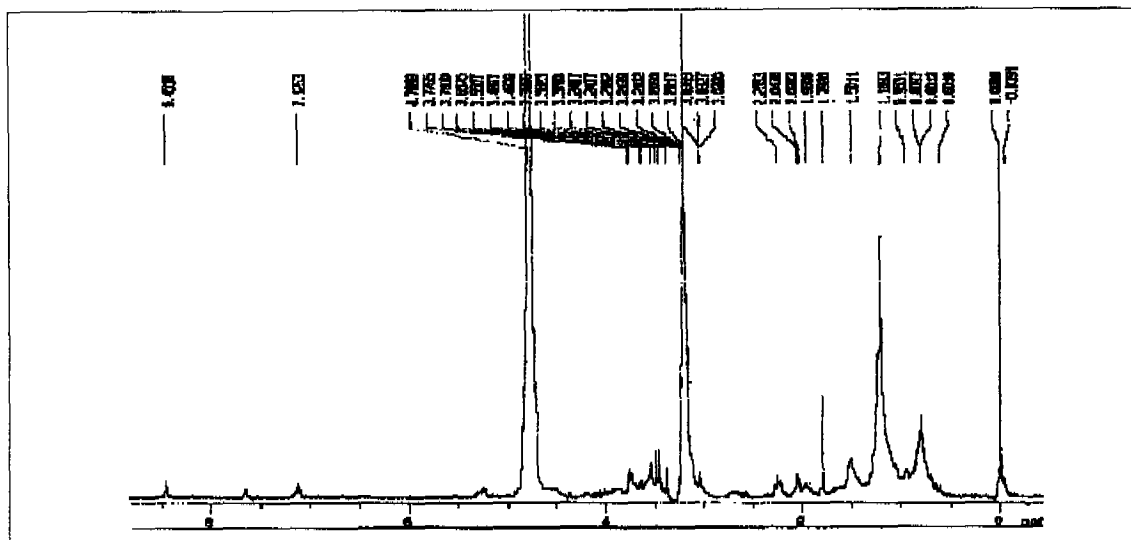


Figure 6. Separation of I-1-2-(4) fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.



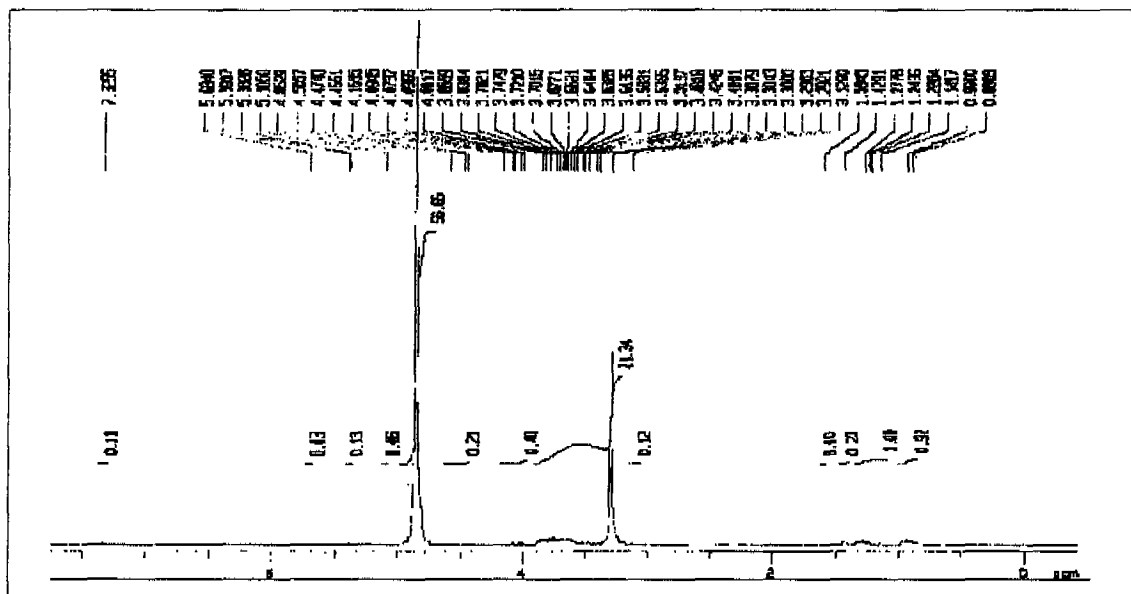
400MHz, CD3OD.

Figure 7. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of I-1-2-(1)-(3) fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



400MHz, CD3OD.

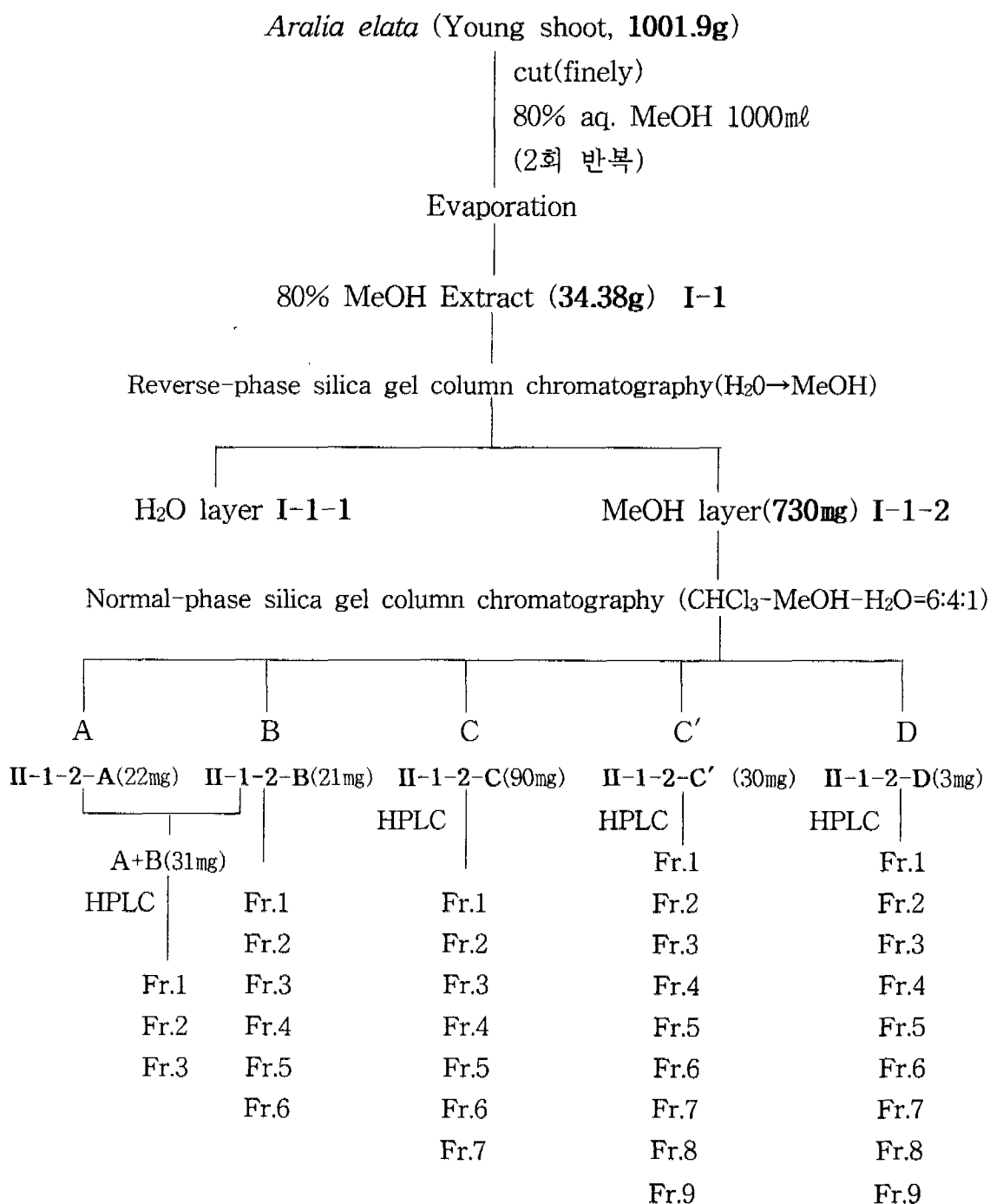
Figure 8. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of I-1-2-(3)-② fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



400MHz, CD3OD.

Figure 9. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of I-1-2-(4)-① fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.

2-1. 분리과정에서 얻어진 양(II)



젓은 시료(두릅나무의 새순)를 취하여 34.38g(I-1)의 80% MeOH 추출물을 얻는 과정까지는 I의 방법과 동일하다. I-1을 reverse-phase silica gel column chromatography (H₂O → MeOH)를 실시하여 H₂O층(II-1-1)과 MeOH층(II-1-2)을 얻는 과정까지도 I의 방법과 동일하다. I-1-2 중 730mg을 가지고 CHCl₃/MeOH/H₂O=6/4/1의 eluent를 사용하여 normal-phase silica gel column chromatography를 실시하였다. 그 결과 5개의 fractions [II-1-2-A~I-1-2-D]을 얻었다. 얻어진 5개의 fraction 중 동시에 나타나는 II-1-2-A와 II-1-2-B를 합쳐서 II-1-2-(A+B)로 HPLC를 실시하였고, 나머지 fraction들에 대해서도 ODS column을 장착한 HPLC를 실시하여 여러 개의 분획들을 얻었다.

2-2. 각 분획에 대한 HPLC 결과 및 NMR

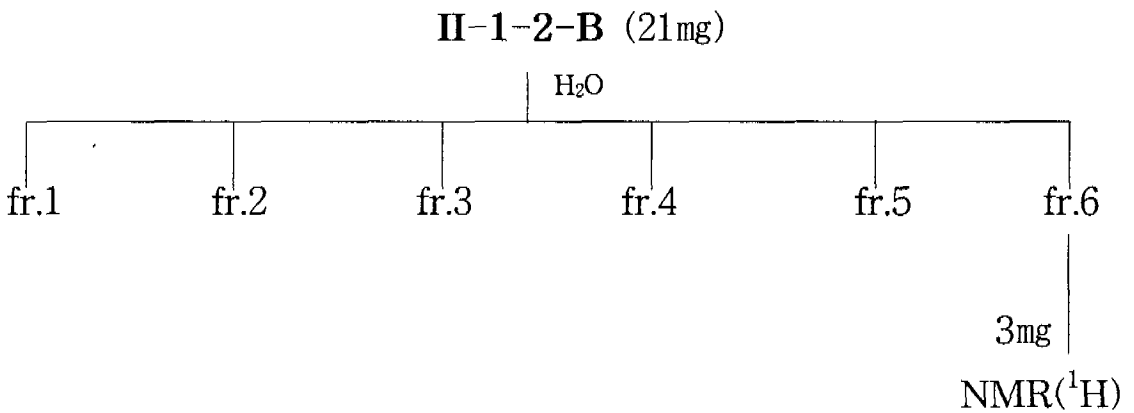
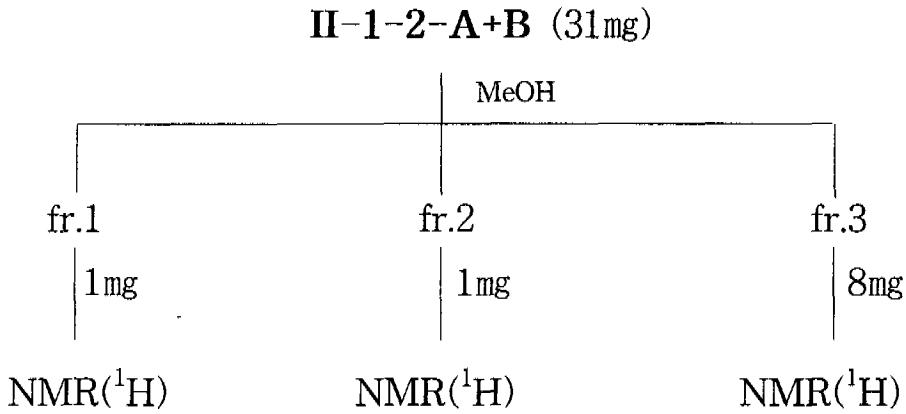
1) II-1-2-A+B

5개의 분획 중 A+B분획은 60% MeOH을 이동상으로 하고, flow rate는 2.0ml/min로 하고, 압력은 1170~1190psi로 실시하여 3개의 분획을 얻었다. 17회 반복하여 HPLC를 하였고, 3개의 분획들 II-1-2-(A+B)-①(8mg), II-1-2-(A+B)-②(1mg), II-1-2-(A+B)-③(1mg)을 H₂O를 용매로 하여 각각의 NMR spectrum을 얻었다.

2) II-1-2-B

II-1-2-B(21mg)는 60% MeOH-1% AcOH을 이동상으로 하고, flow rate는 2.0ml/min, 1330~1350psi로 7회 반복 실시하여 6개의 분획들을 얻었다. 6개의 분획들 중 II-1-2-B-⑥(3mg)을 H₂O를 용매로 하여 NMR spectrum을

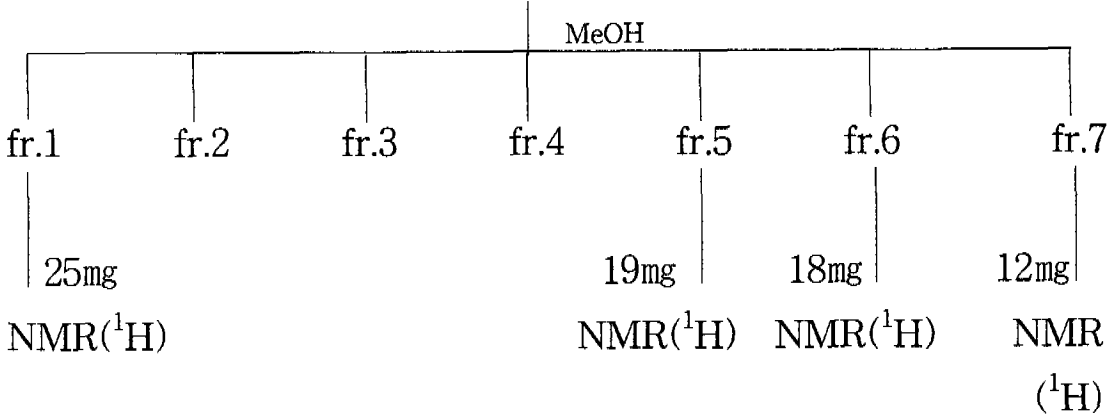
얻었다. 같은 fraction에 대해 pyridine을 용매로 하여 NMR spectrum을 얻었다.



3) II-1-2-C

II-1-2-C(90mg)는 얻어진 양에서 70mg을 가지고 60% MeOH-1% AcOH을 이동상으로 하고, flow rate는 2.0ml/min, 1170~1200psi로 HPLC를 실시하여 7개의 분획을 얻었다. 39회 반복하여 실시하였고, 얻어진 분획들 중 II-1-2-C-①(25mg), II-1-2-C-⑤(19mg), II-1-2-C-⑥(18mg), II-1-2-C-⑦(12mg)들에 대해 H₂O를 용매로 하여 NMR spectrum을 얻었다.

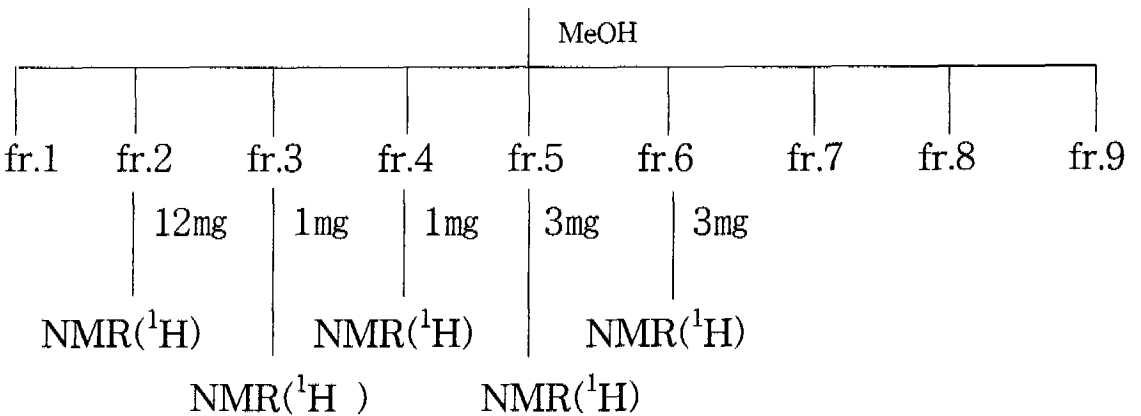
II-1-2-C (70mg)



4) II-1-2-C'

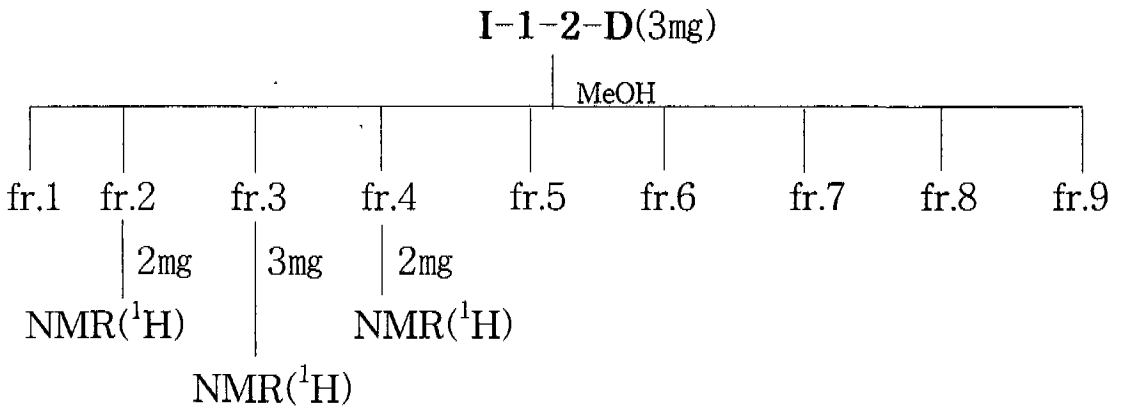
II-1-2-C' (30mg)은 60% MeOH-1% AcOH을 이동상으로 하고, flow rate는 2.0ml/min, 1230~1300psi로 실시하여 9개의 분획을 얻었다. 10회 반복하여 실시하였으며 얻어진 분획들 중 II-1-2-C' -②(12mg), II-1-2-C' -③(1mg), II-1-2-C' -④(1mg), II-1-2-C' -⑤(3mg), II-1-2-C' -⑥(3mg)들에 대해 H₂O를 용매로 하여 NMR spectrum을 얻었다.

II-1-2-C' (30mg)

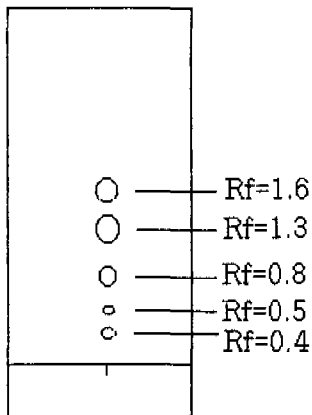


5) II-1-2-D

II-1-2-D(3mg)은 60% MeOH-1% AcOH을 이동상으로 하고, flow rate 는 2.0ml/min, 1200~1280psi로 실시하여 9개의 분획을 얻었다. 5회 반복하여 실시하였으며 얻어진 분획들 중 II-1-2-D-②(2mg), II-1-2-D-③(3mg), II-1-2-D-④(2mg)들에 대해 H₂O를 용매로 하여 NMR spectrum을 얻었다.



2-3 TLC 결과



Thin-Layer Chromatography는 Silica gel 60F₂₅₄를 사용하였으며, CHCl₃/MeOH/H₂O=7/3/1 (lower layer)의 전개용매를 사용하여 확인하였다. visualizing agent는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH을 혼합한 수용액을 사용하였다. 위에서부터 차례로 II-1-2-A, II-1-2-B, II-1-2-C, II-1-2-C', II-1-2-B이다.

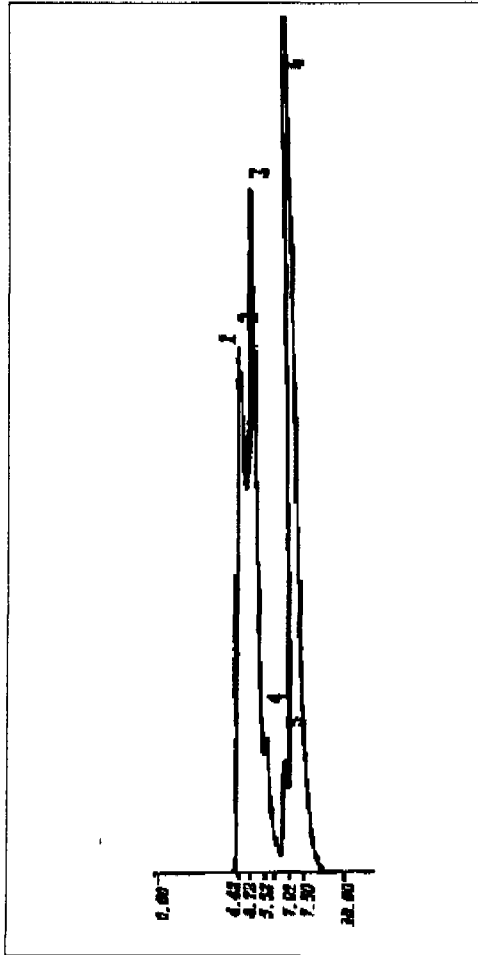
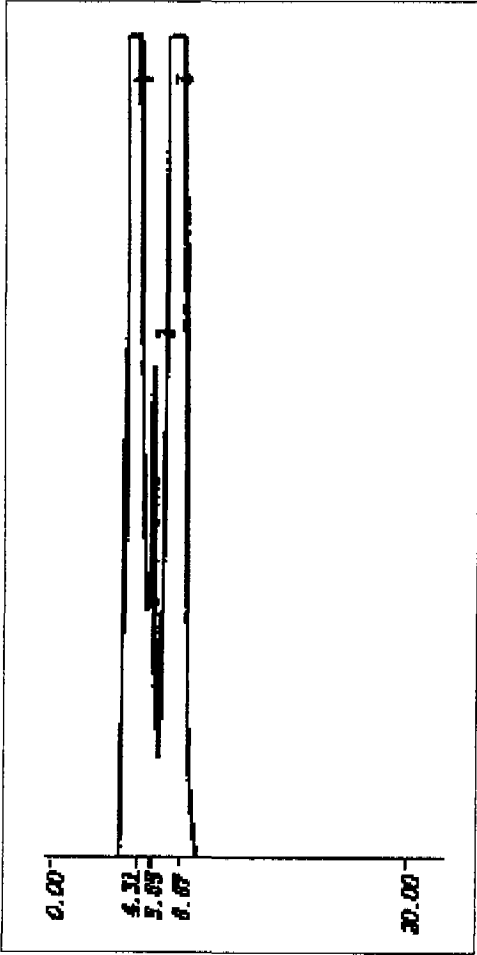


Figure 10 . Separation of II-1-2-A+B and II-1-2-B fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.

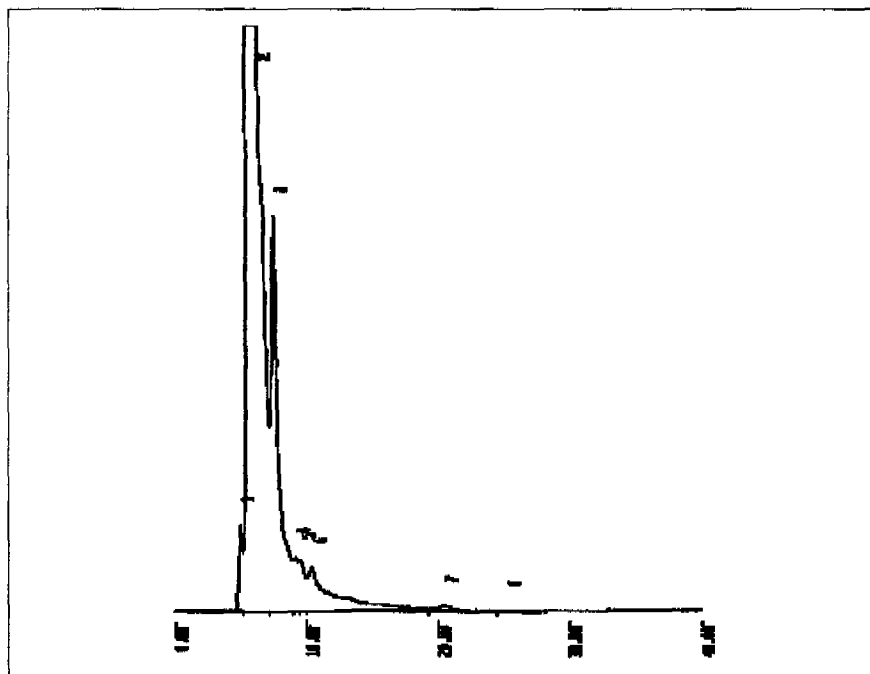
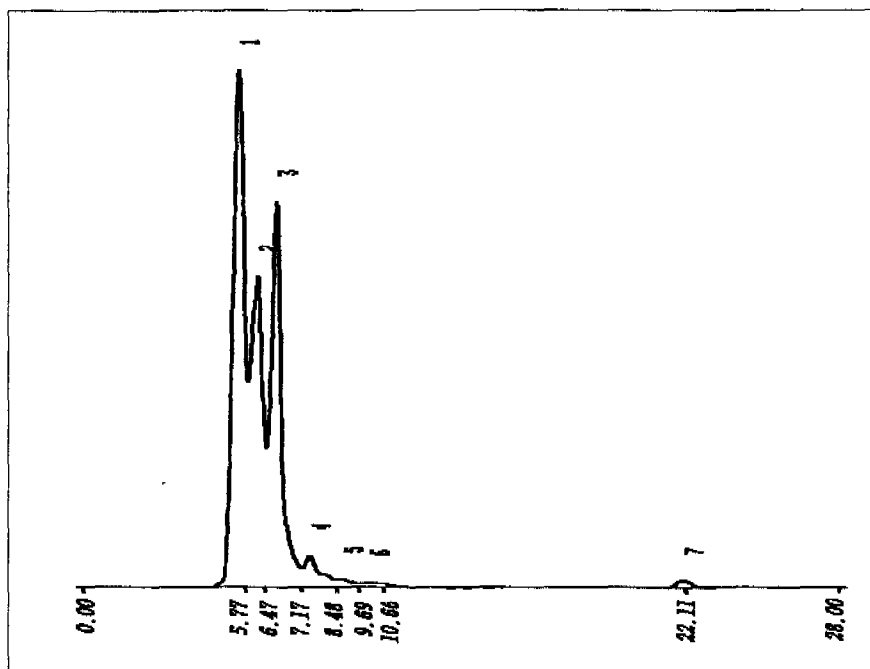


Figure 11. Separation of II-1-2-C and II-1-2-C' fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.

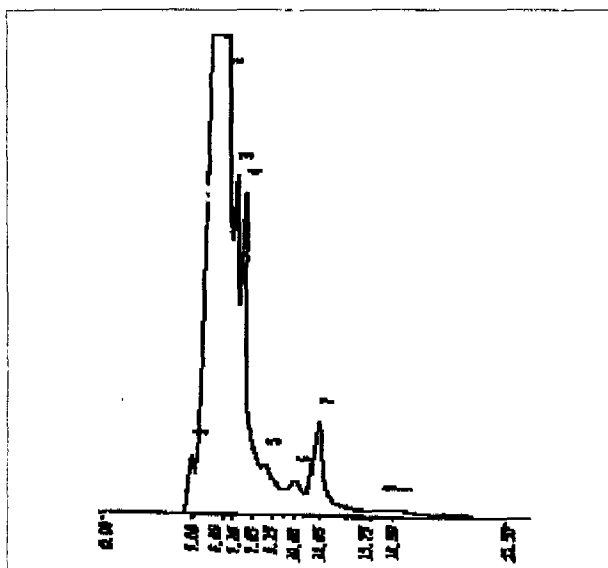
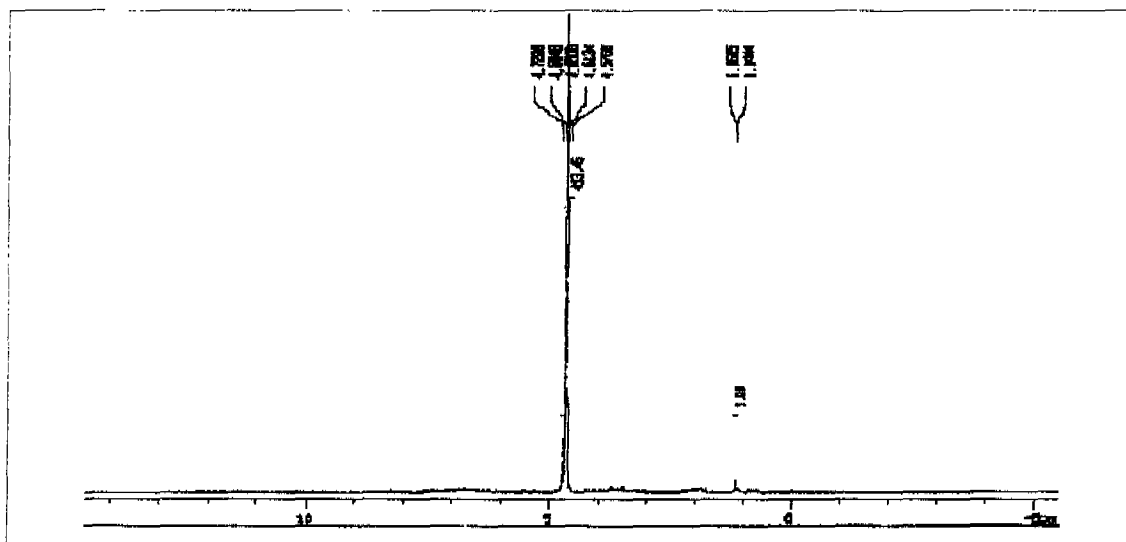
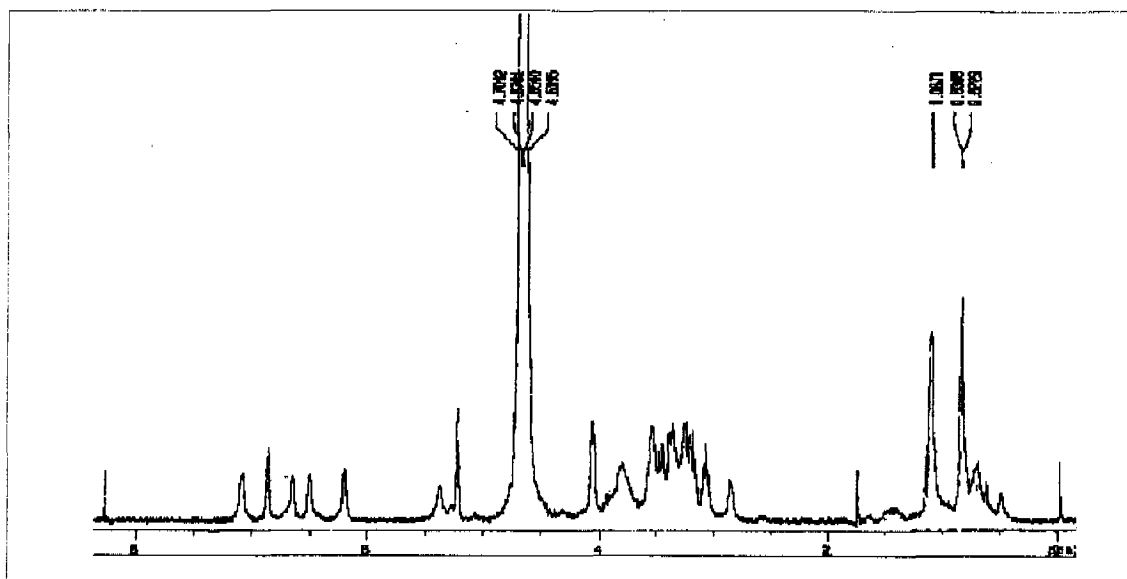


Figure 12. Separation of II-1-2-D fraction of MeOH extract from *Aralia elata* using HPLC.



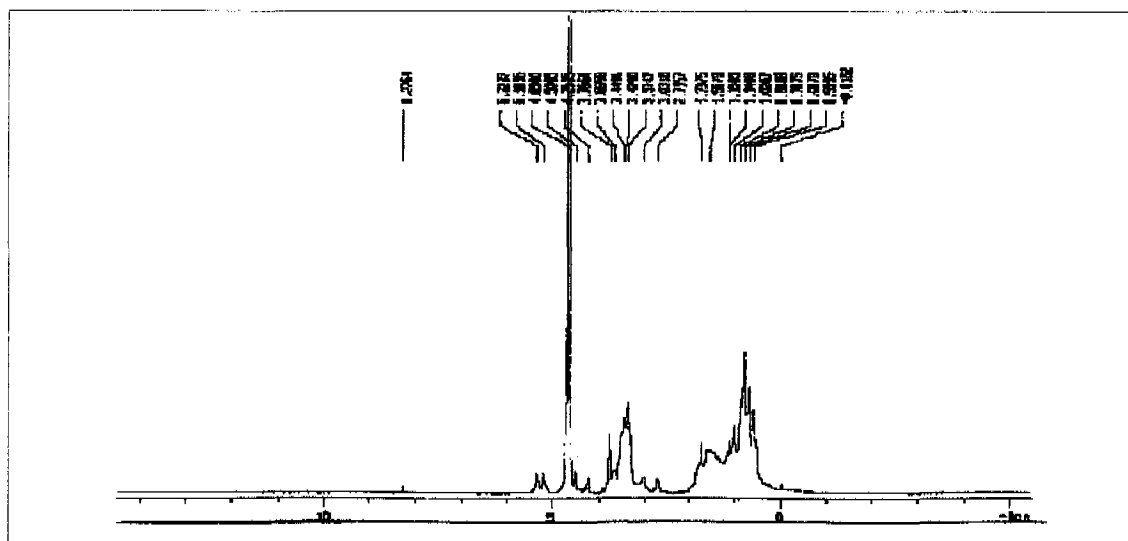
400MHz, D2O

Figure 13. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of II-1-2-(A+B)-ⓐ fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



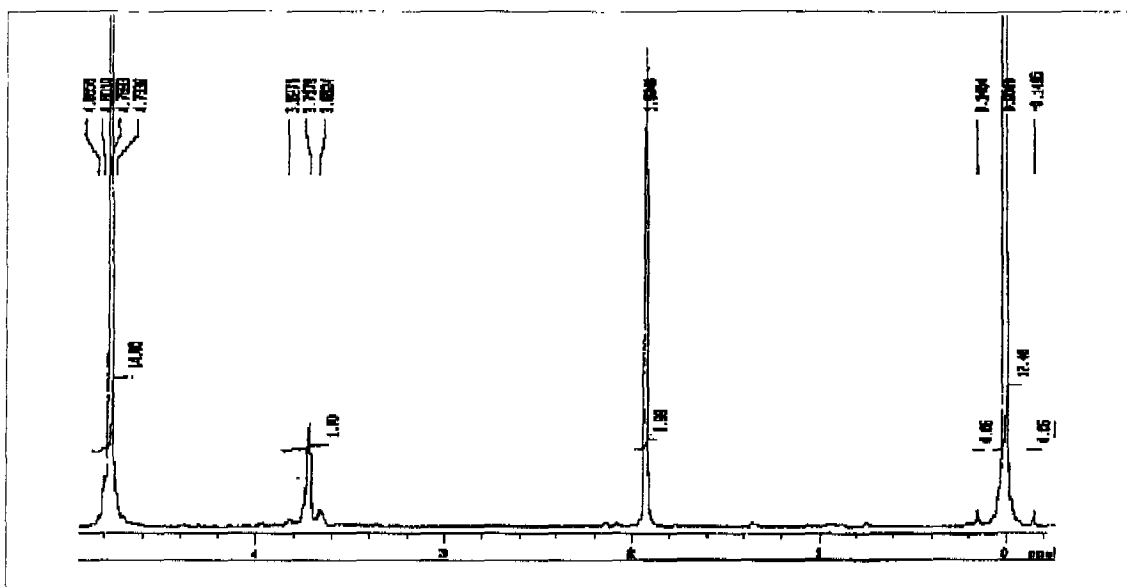
400MHz, D2O

Figure 14. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of II-1-2-(A+B)-② fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



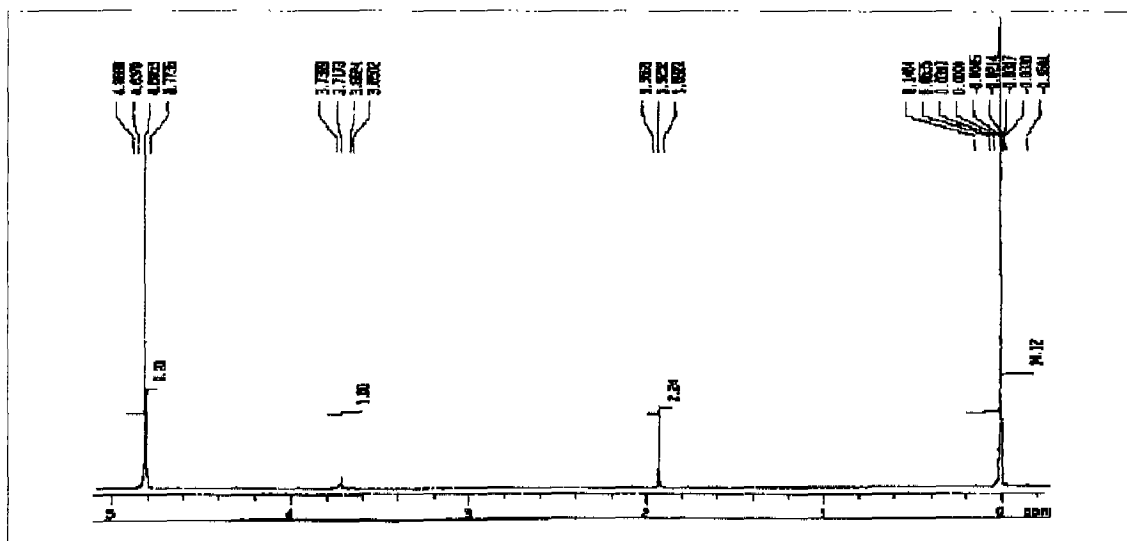
400MHz, D2O

Figure 15. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of II-1-2-(A+B)-③ fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



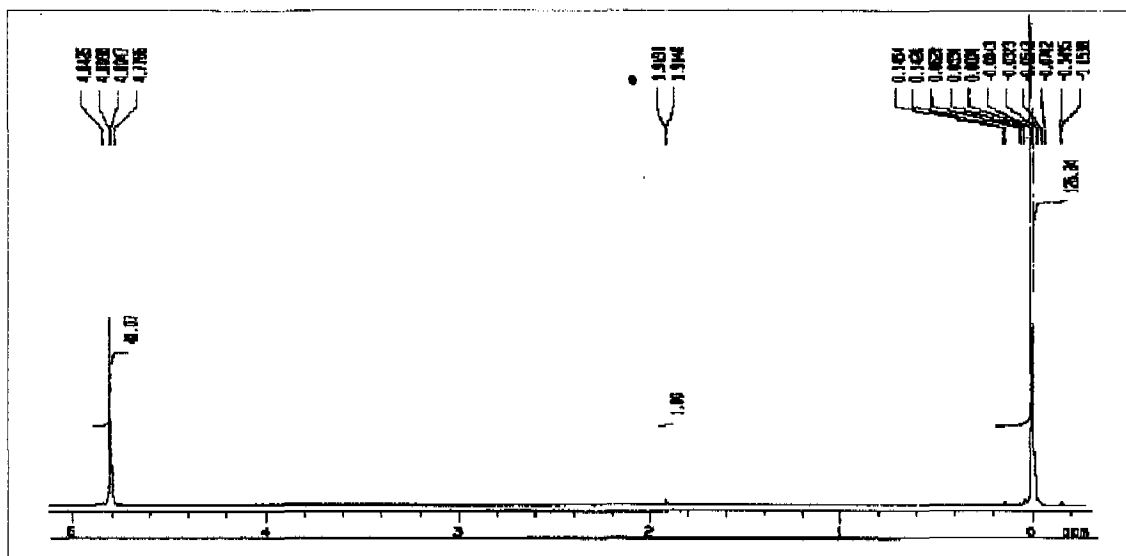
400MHz, D2O

Figure 18. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of II-1-2-C-① fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



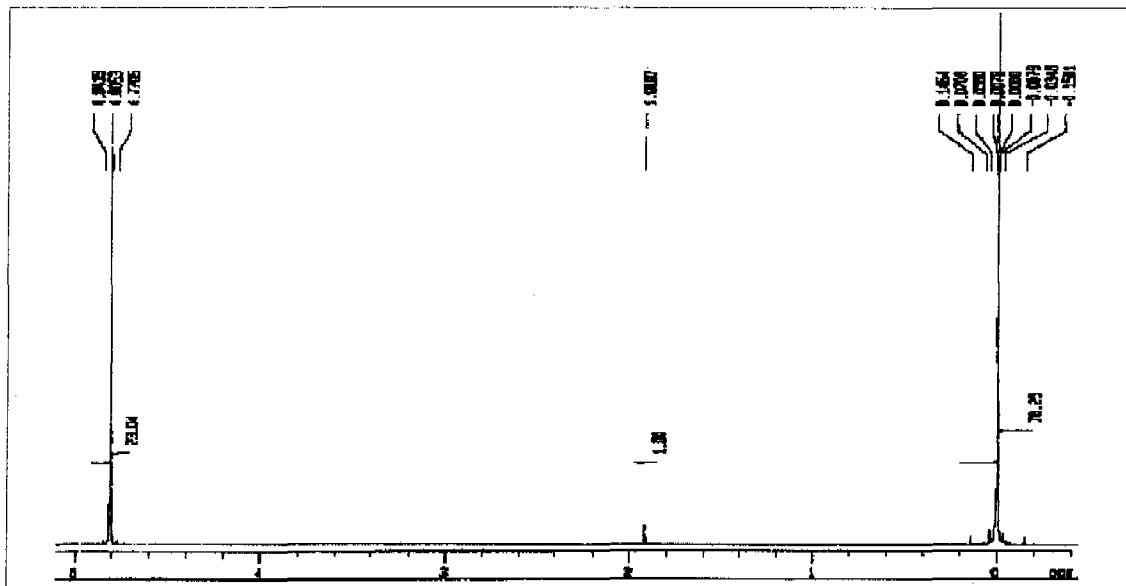
400MHz, D2O

Figure 19. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of II-1-2-C-⑤ fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



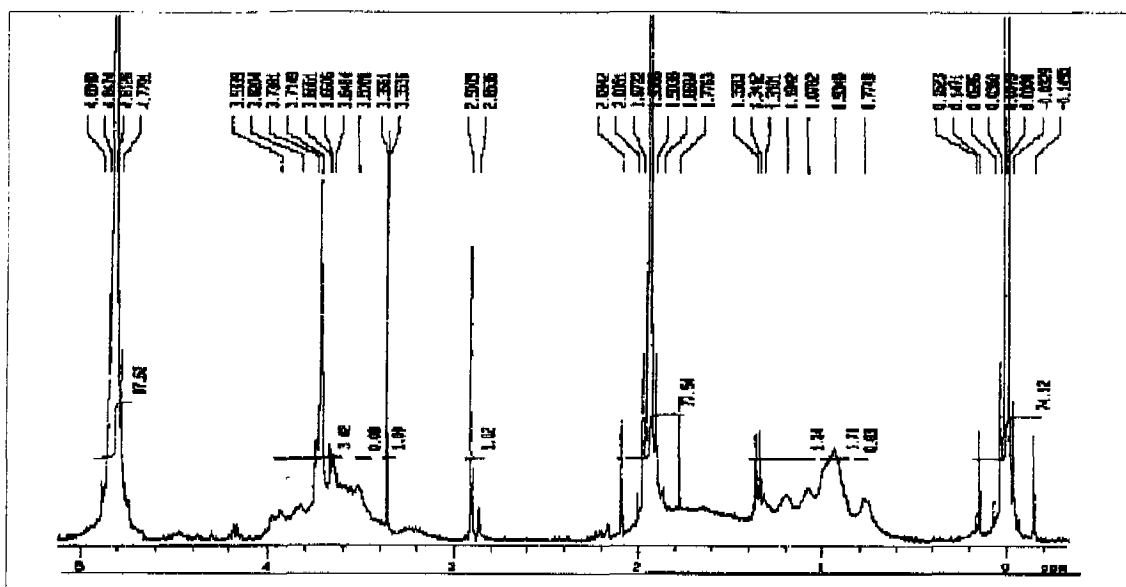
400MHz, D2O

Figure 24. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of II-1-2-C'-④ fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



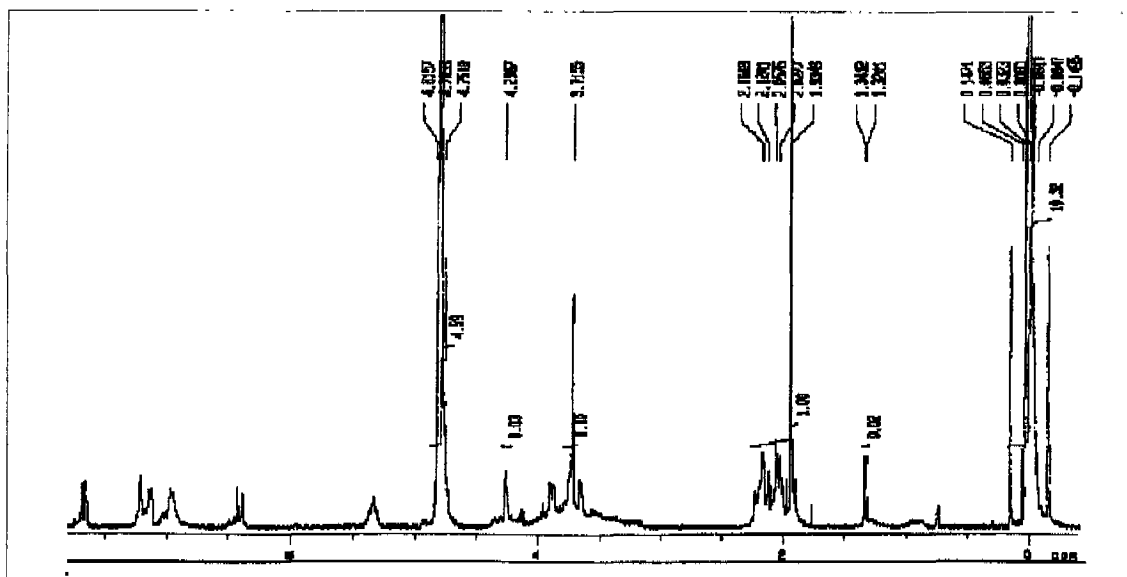
400MHz, D2O

Figure 25. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of II-1-2-C'-⑤ fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



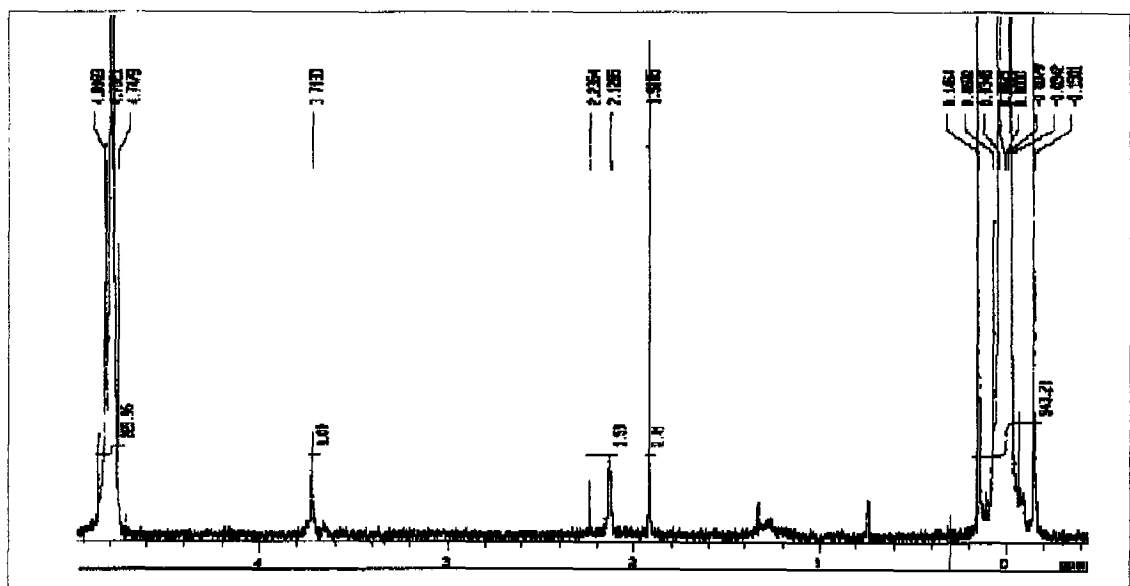
400MHz, D2O

Figure 26. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of II-1-2-C'-⑥ fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



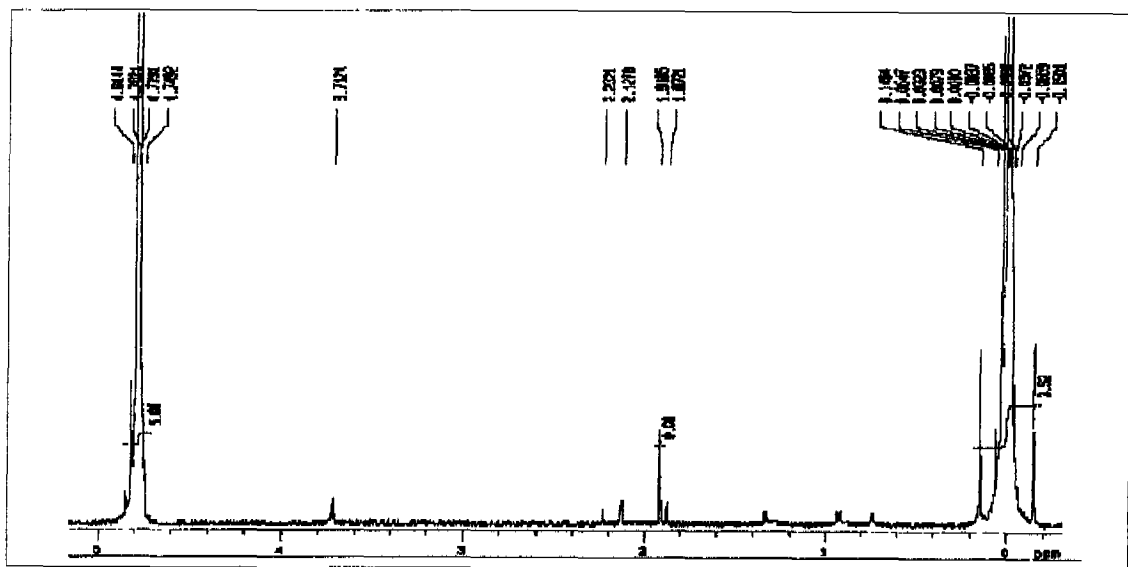
400MHz, D2O

Figure 27. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of II-1-2-D-② fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



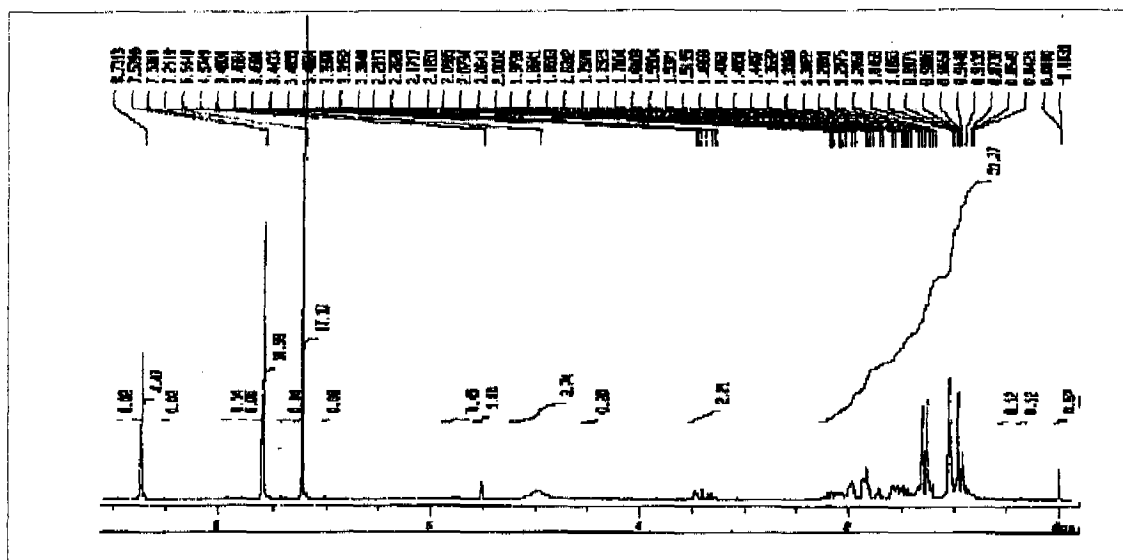
400MHz, D2O

Figure 28. ^1H -NMR Spectrum of II-1-2-D-③ fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



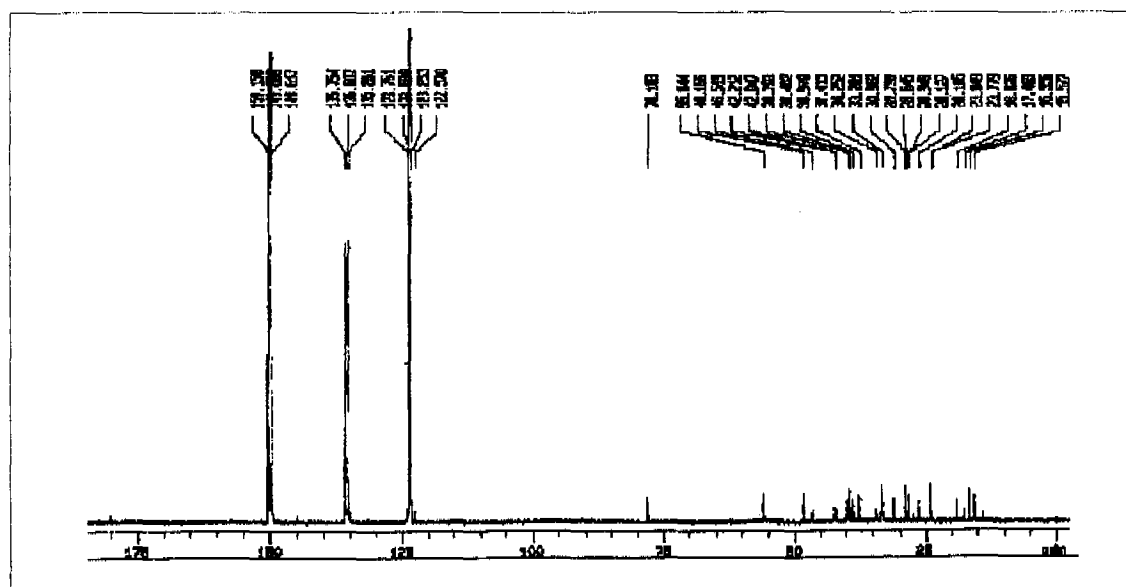
400MHz, D2O

Figure 29. ^1H -NMR Spectrum of II-1-2-D-④ fraction of MeOH extract from *Aralia elata*.



400MHz, pyridine

Figure 30. ^1H -NMR Spectrum of Oleanolic acid.



400MHz, pyridine

Figure 31. ^{13}C -NMR Spectrum of Oleanolic acid.

V. 결 론

두릅의 사포닌 성분에서 aglycon 성분으로 oleanolic acid, hederagenin, echinocystic acid 등의 triterpenoid가 알려져 있다. 사포닌의 구성 당성분으로는 glucose, galactose, xylose, arabinose 등의 pyranoside가 주류를 이루고 있다. sapogenin의 구조를 보면, 모두 cyclohexane ring이 5개 연결되어 있는 형태를 취하고 있으며, C₁₂-C₁₃에 이중결합이 존재하고 있다. ¹H-NMR을 살펴보면, 12-H는 δ 5.5부근에서 broad한 singlet으로 나타남을 알 수 있다. 또한, 특징적으로 6-7개의 methyl 기의 피크가 singlet으로 δ 0.9-1.4에서 나타나고 있다. 그외 cyclohexane의 methylene peak는 δ 1.2-2.4에서 보여지고 있다. 이와 같은 특징적인 피크의 관찰로 두릅의 성분 중의 sapogenin의 존재를 유추할 수 있다. 구성 당성분의 존재는 더욱 독특하게 NMR 상에서 관찰된다. 일반적으로 당성분의 anomeric 위치의 수소는 δ 5.0-5.6에 걸쳐서 doublet(J=8Hz 내외)으로 명확히 구분되어진다. 그 외 수소들은 OH기에 인접하여 있기 때문에 δ 3.5 ppm을 전후하여 관찰된다. 이러한 특징적인 피크들의 존재를 관찰함으로써 특정 fraction에 배당체의 존재 여부를 관찰할 수 있게 되는 것이다.

분취용 HPLC 등을 이용하여 단일 성분을 순수하게 분리하려고 노력하였으나, 성분들의 극성이 매우 유사하여 원하는 정도의 결과를 얻을 수는 없었다. 또한 얻어지는 HPLC의 분획이 극미량이기 때문에 HPLC의 반복 사용을 통하여서도, 충분한 시료를 얻을 수 없는 점이 가장 큰 어려움이었다. 그러나 얻어진 sample의 NMR 스펙트럼을 통하여, 최소한, 어느 분획에서 saponin성분의 존재 여부는 확인 할 수 있었으며 향후 계속된 정제과정을 통하여 단일 성분을 분리할 수 있는 예비적 데이터를 확보하였다는 데 연구의 의의가 있다고 하겠다. 이에 대한 HPLC의 데이터는 그림 4-6과 그림 12-16에 표시하였다.

본 과제에서 분리된 성분들의 ^1H NMR 스펙트럼을 그림 8-10과 그림 16-34에 걸쳐서 나열하였다. 위에서 언급한 NMR 분석의 원리에 따라 oleanolic 배당체 및 유사물질이 존재하는 fraction은 그림 8, 9, 17, 19, 25, 30에 해당하는 시료라고 판단된다.

위에서 살펴 본 바와 같이 oleanolic 배당체 및 유사물질의 존재 가능성이 있는 fraction을 가지고 계속된 정제과정을 거쳐 완전한 단일 물질로의 분리가 계속되어야 할 것이며, ^1H NMR spectrum 뿐만 아니라 ^{13}C NMR spectrum 및 Mass spectrum, IR spectrum을 이용한 구조 확인 과정을 거쳐 정확한 구조를 확인할 수 있도록 앞으로의 연구가 계속되어야 할 것이다.

V. 참고 문헌

1. 김문홍, 제주식물도감, 1992, 320
2. 동아출판사 편찬위원 동아 원색 대백과 사전, 1982, 32
3. 차진현 실용동의약학, 1990, 92-93
4. 육창수 원색 한국 약용 식물 사전(coloured medicinal plants of korea), 1989, 374-375
5. 정필근 생약초, 1993, 133-134
6. 마승진, 고병섭, 박근형, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL, 1995, 27(5), 807-812
7. Yoshikawa, M; Yoshizumi, S; Ueno, T; Matsuda, H; Murakami, T; Yamahara, J; Murakami, N. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 1995 Nov, 43(11), 1878-1882
8. Kuang, HX; Sun, H; Zhang, N; Okada, Y; Okuynma, T. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 1996, 44(11), 2183-2185
9. Yoshikawa, M; Murakami, T; Harada, E; Murakami, N; Yamahara, J; Matsuda, H. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 1996, 44(10), 1915-1922
10. Yoshikawa, M; Murakami, T; Harada, E; Murakami, N; Yamahara, J; Matsuda, H. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 1996, 44(10), 1923-1927
11. Yoshikawa, M; Murakami, T; Harada, E; Murakami, N; Yamahara, J; Matsuda, H. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 1996, 42(6), 1354-1356
12. Sakai, S; Katsumata, M; Satoh, Y; Satoh, Y; Nagasao, M; Ida, Y; Miyaloshi, M; Shoji, J. *Phytochemistry*, 1994, 35(5), 1319-1324
13. Satoh, Y; Sakai, S; Katsumata, M; Nagasao, M; Miyaloshi, M; Ida, Y; Shoji, J. *Phytochemistry*, 1994, 36(1), 147-152

14. Saito, S; Ebashi, J; Sumita, S; Furumoto, T; Nagamura, Y; Nishida K; Isiguro, I. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, **1993**, 41(8), 1395-1401
15. Yoshikawa, M; Matsuda, H; Harada, E; Murakami, T; Murakami N; Yamahara, J. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, **1993**, 41(11), 2069-2071
16. 정지연, 한덕룡, *약학회지*, 제 53권 제 3호, **1991**, 240-244
17. 한덕룡, 이민원, *약학회지*, 제 35권 제 6호, **1991**, 457-460