

국내 자생버섯, *Phellinus ribis* 중 Ceramide 성분

문동철[†] · 황경화 · 최규열 · 이용문 · 김정훈 · 김재길 · 박영현* · 김미란* · 지옥표**

충북대학교 약학대학

*순천향대학교 식품영양학과

**성균관대학교 약학대학

(1994. 10. 11. 접수)

Constituents of Ceramide of a Native Mushroom, "*Phellinus ribis*" in Korea

Dong-Cheul Moon[†], Kyung-Hwa Hwang, Kyu-Reul Choi, Yong-Moon Lee, Jung-Hoon Kim, Jae-Gil Kim, Young-Hyun Park*, Mi-Ran Kim*, and Ok-Pyo Zee**

College of Pharmacy, Chungbuk Nat'l Univ. Cheongju 360-763, Korea

*Dept. of Food Sci. and Nutr., Soonchunhyang University

**College of Pharmacy, Sunkyunkwan University, Suwoen, Korea

(Received 10. 11, 1994)

요약 : 국내 자생 담자균, *Phellinus ribis*부터 ceramide 성분들이 존재함을 확인하고 실리카 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 분리하고 prep.-TLC로 재차 정제한 다음, 그 구조 및 조성을 검토하였다. FAB-MS 및 GC-MS를 이용하여 그 구성성분을 분석한 결과 지방산 주성분은 hydroxy fatty acid(C_{22:0}, C_{25:0}, C_{24:0}, C_{23:0})이고 sphingoid 염기는 (tri-hydroxy-sphinganine 및 동족체 염의 아민으로 확인되었다.

Abstract : Ceramide components were detected from a native mushroom, "*Phellinus ribis*" growing in Korea. Cerebroside fractions were isolated by silica column chromatography. The ceramide fraction were purified by preparative TLC and their constituents were analyzed by using GC-MS and FAB-MS. The fatty acid components consisted of mainly hydroxy fatty acids(C_{22:0}, C_{25:0}, C_{24:0}, C_{23:0}) : The major components of long-chain base were trihydroxy-bases, principally 4-hydroxy sphinganine analogues.

Key words : *Phellinus ribis*, ceramide, FAB-MS, GC-MS, fatty acids, long-chain base

I. 서론

Sphingolipid는 plasma membrane bilayer의 외측 옆에 존재하는 매우 흔한 성분으로서 특정 생리활성물질의 receptor로 작용하며 양이온 수송계에 역할을 한

다고 알려져 있으며^{1,2}, 세포-표면 사이에 작용하는 물질로서의 transducer, cell antigen, cell-surface marker로 작용하여 세포인식의 receptor 역할을 주로 한다고 알려져 있다. 동물성 sphingolipid에 대해서는 그 구조, 체내분포, 대사, 기능 등이 비교적 많이 알려

져 있으나, 식물 유래 sphingolipid는 그 종류가 매우 적고 glyceride 및 sterol계 lipid 등 타계열의 lipid에 비해 함량이 적고 그 구조에 대해서도 아직 충분히 밝혀지지 않은 실정이다.

그러나 특정 식물성 sphingolipid 및 cerebroside에서 최근 담자균의 발아 촉진효과^{3,4}, 항균양작용⁵, 특정 효소의 활성화⁶, 항균작용⁷, 항암작용⁷, 신경증식인자 (nerve growth factor : NGF)작용⁸ 등 여러 가지 생리활성이 발견되어 비상한 관심을 모으고 있다. 특히 동물성 sphingolipid에서는 cerebroside의 구성분인 당-잔기가 생리활성 발현의 주요 부위라고 알려져 있는 것과는 달리 식물 유래 sphingolipid에서는 그 구성 ceramide 잔기가 생리활성 발현에 중요한 역할을 하고 있다고 보고된 바 있다.¹⁰ 따라서 균사체 유래 sphingolipid의 생리활성은 매우 흥미로운 관심의 대상이 되어 왔다.

Ceramide는 sphingolipid 생합성과 분해중간체의 전구체로서 in vitro에서 sphingoid 염기와 지방산으로 효소분해되며, 특정 ceramide는 그 자체로서 지질막의 차단 및 보습기능에 매우 중요한 역할을 하여 고급 향장품의 원료물질로 이용되고 있다.¹¹ sphingoglycolipid계 물질을 분류하여 Fig. 1에 보인다.

본 연구자들은 국내 자생 담자균, *Phellinus ribis* 자실체 추출물에 대한 생리활성을 검토한 결과 특히 항암, 항염증 및 항균활성이 있음을 확인하고¹², 영지, 표고버섯 등 몇 가지 담자균류에서 보고된 바 있는 sterol 및 terpenoid류 생리활성 성분들을 단리목표로 하여 컬럼분리조작 중 예상외로 많은 양의 cerebro-

side ceramide 성분들이 존재함을 발견하였다. 이 중 비교적 많이 검출되는 ceramide 성분을 분취용-TLC로 분리 정제한 다음 FAB-MS와 GC-MS 분석을 통하여 그 조성을 확인하였다. 이들 ceramide 및 관련 cerebroside 각 성분들에 대한 생리활성이 별도로 검토되어야 할 것으로 사료된다.

II. 실험

1. 실험 재료

본 연구 대상인 버섯은 국내 자생 담자균으로, 일본 북해도대학 조림학교실에서 *Phellinus ribis*로 동정하였고 93년 가을 충북 일원에서 채취하여 음건, 보관하고 세절하여 실험재료로 사용하였다.

2. 기기 및 시약

본 연구에서 사용한 질량분석기는 JMS-AX505H (E/B geometry, Jeol Ltd. Japan) Mass Spectrometer를 사용하였다. cerebroside 성분의 분리에 사용한 GC는 HP-5890 seriesII(Hewlett-Packard, Ltd, USA)를 이용하였고, 분리컬럼으로는 HP-5 fused silica capillary column(0.32mm i. d.×25m)을 사용, split ratio, 1/60에서 He을 운반기체(유속 2ml/min)로 하여 160℃에서 320℃까지 승온조작(속도 4℃/min)하여 분석하였다.

Cerebroside의 확인에 이용한 IR spectrometer는 Perkin Elmer사의 Model 782를 이용하였고 박막법(liquid thin film method)으로 측정하였다.

분리 및 정제목적으로 사용한 실리카 컬럼은 silica gel(200-400mesh Merck 9385)을 주로 이용하였고 TLC는 pre-coated glass plate(silica gel 60, Merck 5721)을 사용하였다.

본 실험에 사용한 모든 용매는 재증류하여 사용하였고 시약 등은 모두 시판 특급을 그대로 사용하였다.

3. 실험방법

Cerebroside 성분의 컬럼분리 및 정제 : 자실체 4kg hot-MeOH로 3회 추출하고 감압 건조하여 얻어진 MeOH 추출분획 206g을 물과 hexane으로 분배하였다(hexane 분획, 24.5g). 물층을 CHCl₃으로 분배하여 CHCl₃ 분획(27.5g)을 얻고 나머지 물층을 재차 EtOAc로 분획(12.4g)하였다. 물층을 다시 BuOH로

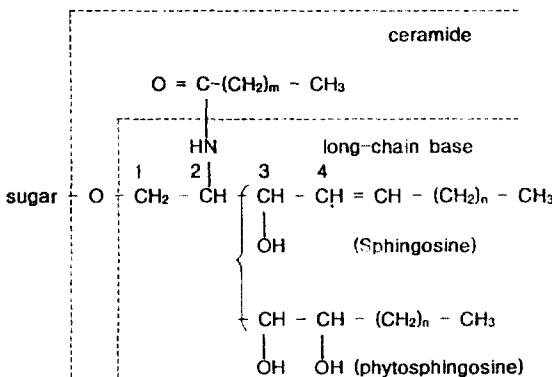


Fig. 1. Fundamental Structure of Sphingoglycosyl Lipid

분획(19g)하였다. CHCl₃ 분획(22.4g)을 실리카겔럼에서 단계적으로 용리하였다(용리액 : CHCl₃ : MeOH : H₂O=100 : 0 : 0 → 6 : 4 : 1, v/v). 이 중 C-6(임의 표기) 분획에서 조 ceramide(C6-F로 임의 표기)가 용리되었다(용리액 : CHCl₃ : MeOH=100 : 1, v/v). C 6-F는 TLC(전개용매 CHCl₃ : MeOH : H₂O=65 : 25 : 4 v/v)로 전개하여 5% 황산에 의한 흑갈색의 두 성분 band로 나타났다(band A Rf 0.75; band B Rf 0.72). 이 시료를 MeOH에서 재결정하였으나(흑갈색 분말, 1.5g) TLC에서 순수하게 단일 spot로 나오지 못하고 재차 prep.-TLC를 시행, band A 및 B를 각각 분리한 다음 sonicator에서 혼합용매(CHCl₃ + MeOH=2 : 1 v/v)를 사용, 추출하여 각 band A 및 B에 해당되는 물질을 얻었다. band A를 MeOH에서 재결정하였다(흰색 점조성 분말). 컬럼 분리조작 중 C-6의 타용출 분획에서도 여러 가지 cerebroside계 화합물을 얻고 동일한 방법으로 분리정제하였다. 본 연구에서는 ceramide 성분인 band A의 조성을 분석하였다.

FAB-MS에 의한 분석 : FAB-MS 스펙트럼 측정은 3-nitrobenzylalcohol-Li complex(Li-NOBA)¹³를 매트릭스로 사용하여 양이온검출법(positive ion mode)에서 매트릭스 3μ와 시료 혼적량을 혼화하여 static mode로 측정하였으며, 이 때 Xe를 primary beam으로 하여, 가속전압 3kV, 주사속도 30sec/1-2300amu, gun voltage 1kV, filament current 5mA로, 질량 주사범위 50-200amu에서 MS 스펙트럼을 측정하였다.

GC-MS에 의한 분석 : ceramide를 2M-HCl/MeOH 용액으로 75°C에서 12시간 반응시켜 지방산-메틸 에스테르와 sphingoid 염기 및 당으로 가수분해하였다. 지방산 메틸-에스테르는 hexane에 추출 이행시켜, GC-MS로 분석하였고, long-chain 염기는 MeOH 용액을 증발 건조시킨 다음 3M-NaOH로 용액을 알칼리성으로 하여 Et₂O로 추출하고 용매를 완전히 증발시킨 다음 피리딘에 재차 녹이고 HMDS : TMCS (=2 : 1 v/v)를 사용 TMS 유도체화하여 GC-MS 분석하였다. Scheme 1에 조작법을 보인다.

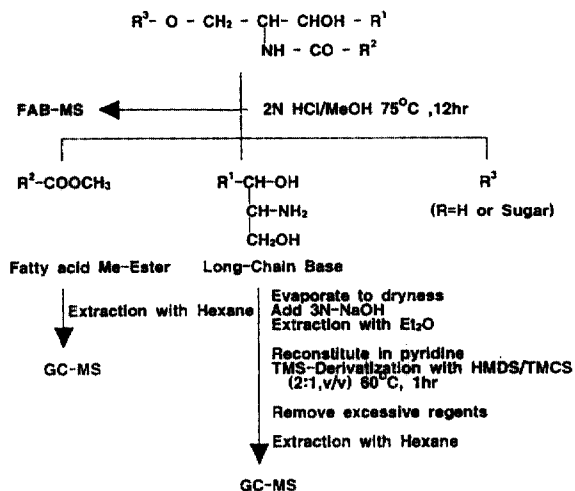
III. 결과 및 고찰

Ceramide 분획의 확인 : C-6-F는 혼합용매(CHCl₃ : MeOH=2 : 1 v/v)에 잘 용해되며, IR 스펙트럼에서

1640cm⁻¹과 1540cm⁻¹ 등 amide에 의한 흡수대를 비롯한 스펙트럼의 전체 pattern을 cerebroside계 물질들의 IR 스펙트럼들과 비교 검토한 결과, C6-F의 주성분이 ceramide 성분임을 확인할 수 있었다.

이 화합물을 TLC 전개시 UV 흡수는 없고 5% 황산 또는 몰리브덴시액에 의해 흑갈색으로 나타나는 두 band(band A, Rf 0.75 ; band B, Rf 0.72)로 분리되며, 대조물질로 사용한 galacto-cerebroside(bovine spleen 유래)의 Rf값(Rf=0.64, 0.60)과 비교할 때 ceramide임을 확인할 수 있었다. 동물성 cerebroside는 TLC 분리에서의 low band의 성분이 수산기가 더 포함된 analoges인 점¹⁴과는 달리 본 실험에서의 band B(low band)는 다른 계통의 물질로 추정되었다(MS 분석 결과만의 해석으로 data 표시는 하지 않았음).

지방산 조성의 분석 : Scheme 1의 방법에 따라 가수분해하여 얻어진 지방산 Me-ester의 GC-MS 분석 결과를 검토하였다. Fig. 2에 TIC 크로마토그램과 주성분 피크들의 EI-MS 스펙트럼을 보인다. α-cleavage에 의한 조각이온들(m/z 339, 325, 311)로부터 Me-ester임을 확인하였다. compd. a, b, c, d는 머무름 시간이 일정 간격(각 RT, 20.7-, 19.7-, 18.7-, 21.7 min)이며, 16amu 차이가 나는 점 외에 조각이온 pattern이 모두 동일하다는 점에서 동족 계열의 hydroxy-saturated fatty acid임을 알 수 있고, 그 조성비는 약 a : b : c :



Scheme 1. Analytical Procedure of Cerebroside(Band A)

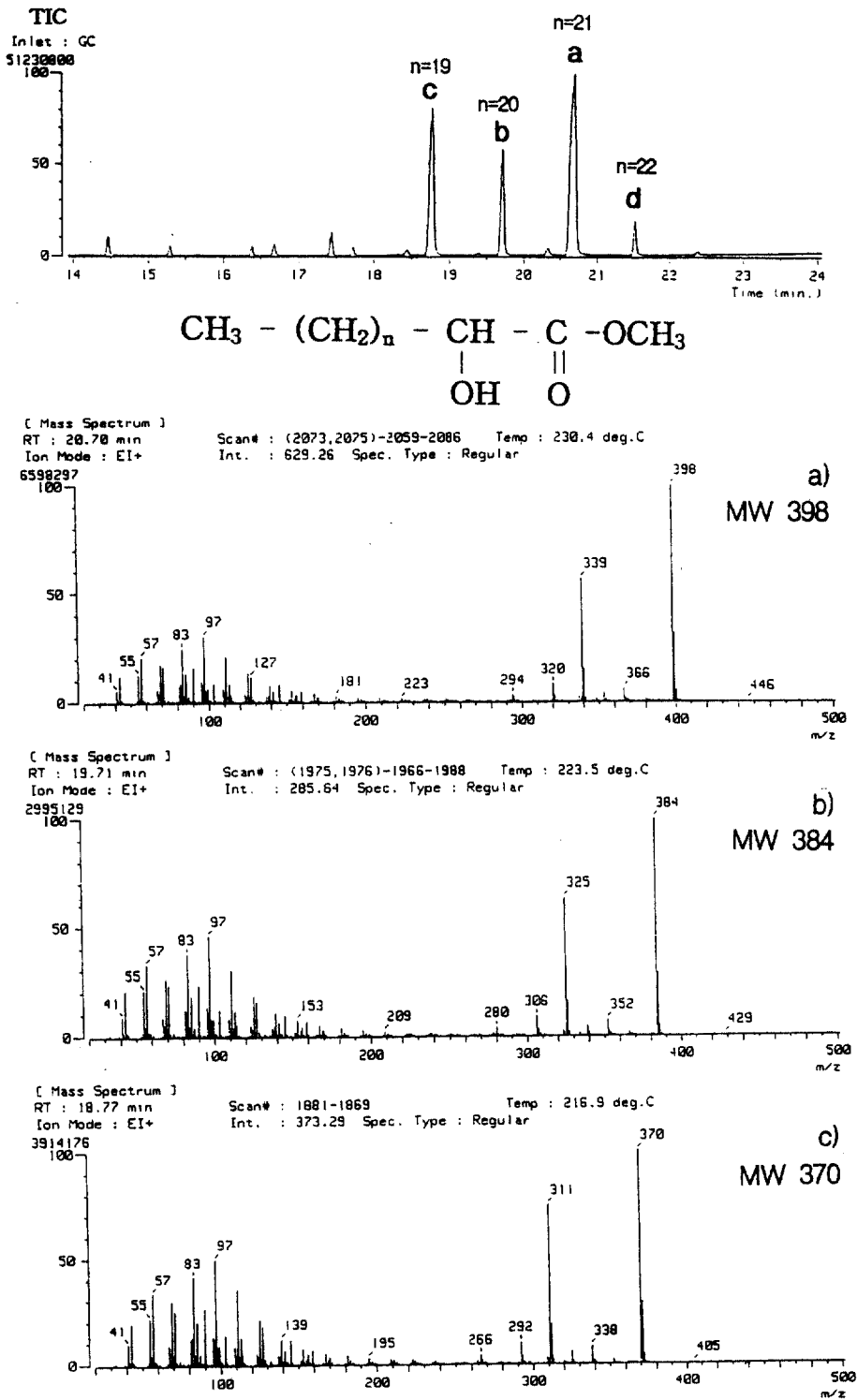


Fig. 2. TIC Chromatogram and EI-MS Spectrum of Fatty acid Components of the Ceramide

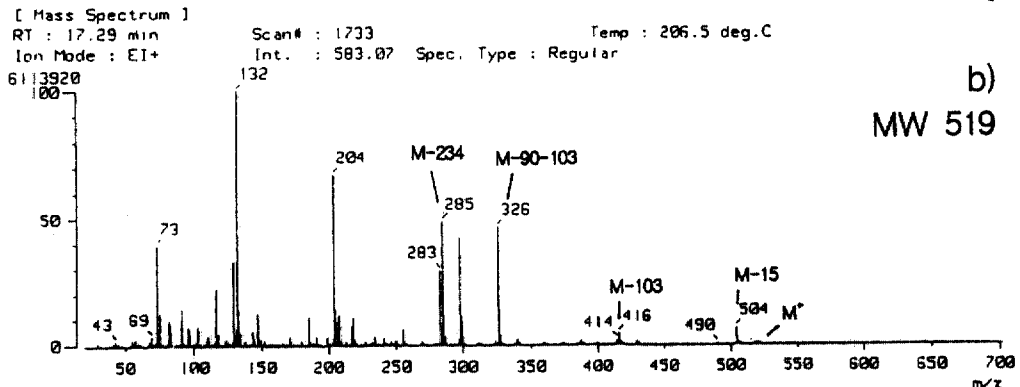
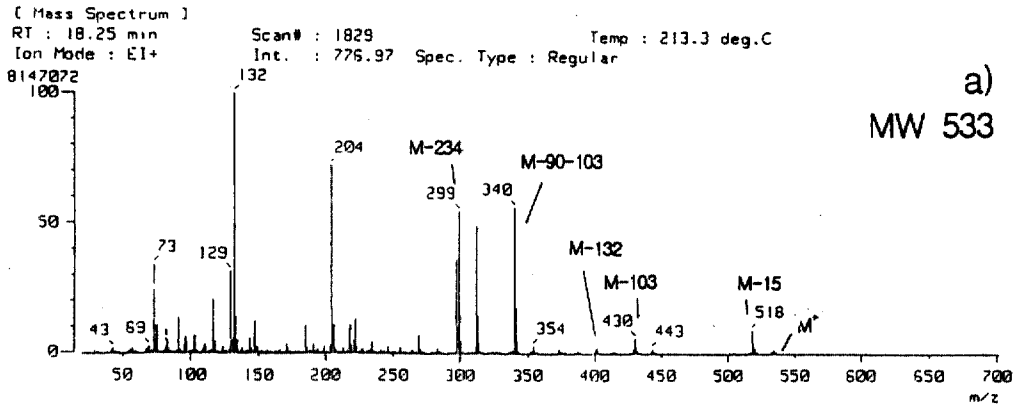
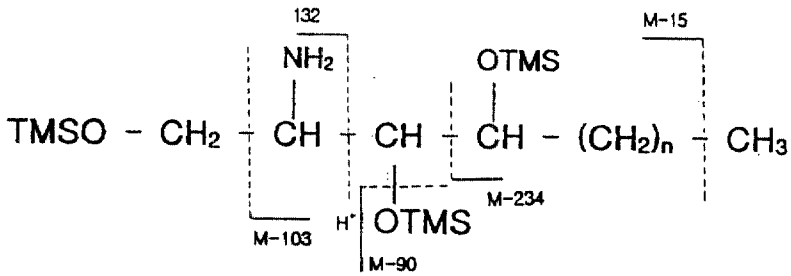
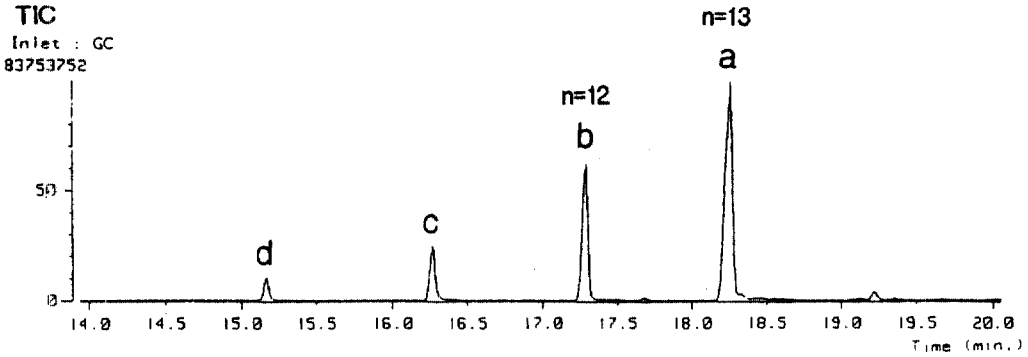


Fig. 3. TIC Chromatogram and EI-MS Spectrum of Long-Chain Bases of the Ceramide

$d=9:6:10:1$ 임을 확인할 수 있다.

compd. a는 α -hydroxylignoceric acid 표준품의 스펙트럼과 비교하여 동일한 구조임을 확인하였다. 따라서 ceramide 중 지방산의 조성은 α -OH group을 가진 $C_{25:0}$, $C_{24:0}$, $C_{23:0}$, $C_{22:0}$ 지방산으로 결론내렸다.

일반적으로 동·식물 유래 ceramide의 주요 지방산이 짝수 개의 탄소 수를 가진 지방산임에 비하여 본 연구대상 버섯의 ceramide에서 탄소 수가 25 및 23인 지방산이 주요 구성성분으로 발견됨은 매우 특이한 사실로 여겨진다.

Sphingoid 염기분석 : Scheme 1의 방법대로 하여 TMS 유도체를 GC-MS 분석한 결과 TIC 크로마토그램과 주성분 피크, a 및 b의 EI-MS 스펙트럼은 Fig. 3에서 보인다. 피크 a, b에서 m/z 518(M-15), m/z 132, 204와 299(M-234)로부터 tri-hydroxyl group이

존재함을 나타낸다.¹⁵ m/z 430(M-103), 401(M-132), 340(M-90-103)으로부터 피크 a의 hydrocarbon이 포함 C_{18} 임을 알 수 있다. 한편, phytosphingosine-(tm s),의 표준 spectrum과 일치하므로 피크 a는 4-hydroxy-sphinganine(phytospinganine)임을 알 수 있고 피크 b는 탄소 수가 1개 적은 4-hydroxysphinganine으로 결론내렸다. a와 b의 조성비는 크로마토그램으로부터 약 1.6:1이다. 피크 c, d는 EI-MS에서 cerebroside 구조해석상 특징적인 조각이온 pattern을 보이지 않고 steryl glycoside 성분으로 추정되었다.

FAB-MS 분석에 의한 Ceramide 조성비 확인 : 화학적 유도체화에 의한 GC-MS 분석의 보완적인 수단으로 Li-NOBA 매트릭스로 사용한 FAB-MS법에 의한 ceramide 분석을 시도하였으며, compd. C-6-F의 정제물, band A의 FAB-MS 스펙트럼은 Fig. 4에 보인다

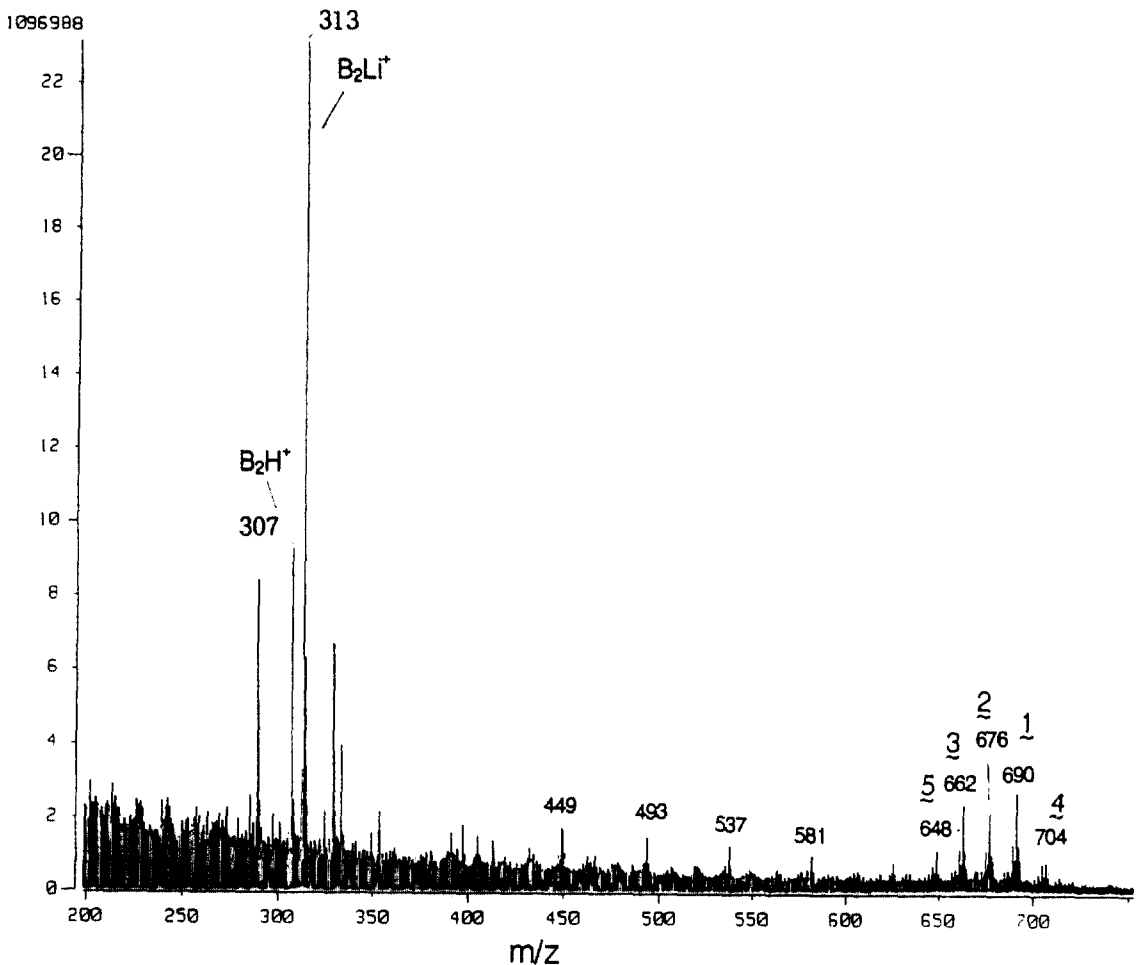
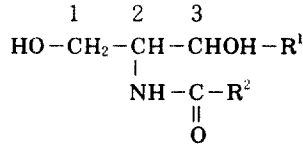


Fig. 4. FAB-MS Spectrum of the Ceramide

Table 1. Composition of Fatty acids and Sphingoid Bases of the Ceramide



	MW	Composition Ratio	Remark	
<u>Fatty acid(R²)</u>				
A1	C _{24:0} -OH acid	384	10	hydroxy-lignoceric acid
A2	C _{23:0} -OH acid	370	6	
A3	C _{22:0} -OH acid	356	9	
A4	C _{25:0} -OH acid	398	1	
<u>Long-Chain Base(R¹)</u>				
B1	C ₁₅ -OH (C _{18:0} -tri-OH)	317	32	phytosphingosine (4-D-hydroxy sphinganine)
B2	C ₁₄ -OH (C _{17:0} -tri-OH)	303	20	
Compd.	Composition (Fatty acid-Base)	[M+Li] ⁺ m/z	MW m/z	Rel. Intensity
1	A1-B1 A4-B2	690	683	1.13
2	A2-B1 A1-B2	676	669	0.92
3	A3-B1 A2-B2	662	655	1.01
4	A4-B1	704	697	0.26
5	A3-B2	648	641	0.35

Calculated from the eq. $[M+Li]^+ m/z = m/z MW_{base} + m/z MW_{acid} - 18 + 7$

다. $[M+Li]^+$ 피크에서 nominal mass가 각각 648, 662, 676, 690, 704(분자량 각 641, 655, 669, 683, 697)으로 hydroxy-fatty acid 4종과 sphingoid base 2종으로 이루어진 5개의 주요 ceramide 성분 혼합물(각 성분의 조성비, 약 4 : 11 : 10 : 13 : 3)임을 확인할 수 있다.

Ceramide의 구조 및 조성: FAB-MS 및 GC-MS 분석결과로부터 ceramide의 조성을 요약한 결과는 Table 1에 보인다. 주요 지방산 조성은 hydroxy fatty acids로서, hydroxy-lignoceric acid(C_{24:0}), hydroxy-behenic acid(docosanoic acid: C_{22:0}) 외에 C_{23:0} 및 C_{25:0}의 홀수탄소의 hydroxy-fatty acid가 발견됨이 매우 특이하고 흥미를 끈다. 한편, long-chain 염기의 조성

분으로는 식물 sphingosine인 phytosphingosine(4-hydroxy sphinganine : C_{18:0}-tri-OH)과 4-hydroxy-heptadeasphinganine(C_{17:0}-tri-OH)으로 확인되었다.

따라서 Table 1의 하단에 그 결과를 요약하였다. 즉 분자량(nominal mass) 각 683, 669, 655, 641 및 697인 ceramide 성분이 일정비로 혼합된 것으로 결론내릴 수 있으며, 그 구성 지방산과 sphingoid 염기의 조합으로부터 8가지 다양한 조성의 ceramide isomer가 존재할 수 있다고 결론내릴 수 있다.

IV. 결론

국내 자생 담자균, *Phellinus ribis*로부터 합압 및 항균활성을 나타내는 CHCl_3 추출 분획에서 ceramide 성분을 분리, 그 조성을 확인하였다. ceramide의 가수분해 및 TMS 유도체화에 의한 GC-MS 분석과 FAB-MS 분석결과, ceramide 구성 지방산의 주성분은 hydroxy fatty acid($\text{C}_{22:0}$, $\text{C}_{25:0}$, $\text{C}_{24:0}$, $\text{C}_{23:0}$)이고 sphingoid 염기는 tri-hydroxy-sphinganine 및 동족 계열의 amine으로 확인되었다. 본 연구대상 버섯에 다량 포함된 주요 ceramide 성분은 FAB-MS 결과로부터 지방산 및 sphingoid base로 구성된 8가지 ceramide 성분이 혼합되어 있음이 확인되었고, 특이하게 $\text{C}_{25:0}$, $\text{C}_{23:0}$ 등 홀수 개의 탄소 수를 가진 지방산 잔기로 이루어진 ceramide가 주요 성분으로 함유되어 있음이 밝혀졌다. 이들 ceramide들에 대한 생리활성에 대해서는 앞으로 연구 검토할 과제라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육부지원 학술진흥재단의 '93 대학부설 연구소지원 학술연구조성비 지원과 1993년도 한국과학재단지원 특정기초연구과제(과제번호 : 93-0400-07-01-3) 연구비의 일부로 수행된 것으로 관계기관에 감사드립니다.

참고문헌

1. Hakomori, S., *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 733(1981).
2. K. -A. Karlson *Biological Membranes*(Chapman, D., ed) Vol. **4**, 1-74p, Academic press, London (1982).
3. G. Kawai, M. Ohnishi, Y. Fujino, and Y. Ikeda, *J. Biol. Chem.*, **261**, 779(1986).
4. G. Kawai, and Y. Ikeda, *Biochim. Biophys. Acta.*, **719**, 612(1982).
5. E. Okuyama, and M. Yamazaki, *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2209(1983).
6. P. A. Clapshaw and W. Seifert, *J. Neurochem.* **35**, 164(1980).
7. G. T. Carter, and K. L. Reihhart, Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 7441(1978).
8. S. Tsuji, M. Arita and Y. Nagai, *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**, 303(1983).
9. S. Hakomori, *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 733(1981).
10. M. Ohnishi, S. Ito and Y. Fujino, *油化學*, **38**(8), 53(1989).
11. G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima and A. Hiedano, *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 523(1991).
12. D. C-Moon et al. *Unpublished Data(Manuscript in Preparations)* (1994).
13. Qinghong Ann and J. Adama, *Anal. Chem.* **65**, 7 (1993).
14. J. H. Kim, S. Y. Chang, Y. K. Kim, *J. Kor. Soc. Anal. Sci.*, **6**(3), 335(1993).
15. K. A. Karson, *Acta. Chem. Scan.*, **20**, 2884(1966).