

산철쭉(*Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*) 꽃으로부터 Terpenoid의 분리·동정

홍윤희 · 송명종 · 한재택 · 장태오 · 이윤형 · 김성훈¹ · 김승애¹ · 박미현² · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹경희대학교 동서의학대학원, ²(주)이룸라이프

(2003년 1월 20일 접수, 2003년 3월 4일 수리)

산철쭉 꽃을 MeOH로 추출하고, 이를 EtOAc, *n*-BuOH과 H₂O로 분배 추출하였다. EtOAc추출물과 *n*-BuOH 추출물에 대하여 silica gel과 ODS column을 이용하여 chromatography하거나, 아세틸화 한 후 silica gel column chromatography를 수행하여 2종의 triterpenoid와 3종의 diterpenoid를 분리하였다. 각 화합물은 ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC와 같은 2D-NMR기법을 포함한 스펙트럼 데이터를 해석하여 2 α , 3 β -dihydroxylolean-12-ene (1), ursolic acid (2), grayanotoxin IV (3), grayanotoxin I (4) 및 grayanotoxin III (5) 등으로 동정하였다.

Key words: 산철쭉, dihydroxylolean-12-ene, ursolic acid, grayanotoxin

서 론

진달래과(Ericaceae) 진달래속(*Rhododendron*)에 속하는 산철쭉(*R. yedoense* var. *poukhanense*)은 한국이 원산지¹⁾이며, 함경 북도를 제외한 우리나라 전 지역에 분포하는 관목이다. 같은 속에 속하는 진달래와는 달리 화경에 뚜렷한 검은 점들을 가지고 있으며, 꽃받침에 끈적끈적한 액이 있다. 꽃은 진달래꽃이 지고 난 후 4-5월에 핀다. 또한 산철쭉은 식용으로 이용하는 진달래와는 달리 독성이 있다고 알려져 있으나^{2,3)} 독성성분은 물론 아직까지 산철쭉에 대한 성분 연구는 이루어진 바가 없다. 따라서 산철쭉의 이차 대사 산물을 분리·동정하는 것은 우리 나라 식물자원의 이용을 위한 기초연구로써 큰 의의가 있을 것으로 판단된다. 본보에서는 철쭉으로부터 5종의 terpenoid 화합물을 분리 하고 그 구조를 동정한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물시료. 본 실험에서 사용한 산철쭉(*Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*) 꽃은 2000년 5월에 경희대학교(수원)에서 채집하였으며 한국생명공학연구원의 이형규 박사가 동정하였다.

기기 및 시약. Column chromatography에는 silica gel 60 (63~200 μ m, Merck, Germany)과 LiChroprep RP-18 (40~63 μ m, ODS, Merck, Germany)을 사용하였다. Thin layer chromatography(TLC)에는 silica gel 60 F₂₅₄(Merck, Germany)와 DC-Fertigplatten RP-18 F_{254s}(Merck, Germany)를, Polarimeter는 P-1010(Jasco, Japan)으로, EI/MS는 JMSAX 505-WA(JEOL, Japan)로 측정하였다. 시료의 추출과 분획에 사

용한 유기용매는 대정화학주식회사와 삼정화학주식회사(Korea)에서 생산한 1급 시약을 사용하였고, 기기분석에 사용된 NMR 용 용매는 Aldrich(USA)의 특급시약을 사용하였다. 그 외는 모두 특급 시약을 사용하였고, TLC 상에서의 시료의 검출에는 UV lamp와 10% H₂SO₄ 수용액을 사용하였다. NMR은 400MHz FT-NMR spectrometer, Unity Inova AS 400, (Varian, USA)로 측정하였고, 융점은 Fisher-Johns melting point apparatus(Fisher Scientific, USA)로, IR은 Spectrum One(Perkin Elmer, USA)로, 비선광도는 P-1010(Jasco, Japan)으로 측정하였다.

Terpenoid의 분리. 산철쭉 꽃 7kg(생체중)을 80% MeOH 수용액(25 l \times 2)으로 실온에서 추출하였다. 추출물을 여과한 후 45°C에서 감압 농축하였다. 얻어진 MeOH 추출물을 EtOAc (1 l \times 2)와 H₂O(1 l)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 *n*-BuOH (750 ml \times 2)로 추출하였다. 추출물을 감압농축하여 EtOAc 분획(CJE, 10 g), *n*-BuOH 분획(CJB, 58 g)과 H₂O 분획(CJH, 289 g)을 얻었다.

EtOAc 분획(CJE 10 g)에 대하여 silica gel(1300 g) column chromatography(7 \times 12 cm), [*n*-hexane-EtOAc = 2.5 : 1(3600 ml) \rightarrow 1.5 : 1(1800 ml) \rightarrow CHCl₃-MeOH = 10 : 1(1600 ml) \rightarrow 8 : 1(1530 ml) \rightarrow 6 : 1(1400 ml) \rightarrow 5 : 1(1200 ml) \rightarrow 2.5 : 1(1100 ml) \rightarrow 1.5 : 1(1000 ml)]하여, 분취하였다. 각 분취액을 TLC(*n*-hexane-EtOAc = 1 : 1, CHCl₃-MeOH = 6 : 1, 3 : 1, 1 : 1)로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 13개의 분획(CJE-1~CJE-13)을 얻었다. CJE-6(968 mg)에 대하여 *n*-hexane-EtOAc(3 : 1, 3800 ml)로 silica gel(120 g) column chromatography(5 \times 12 cm)를 실시하여 5개의 분획(CJE-6-1 ~CJE-6-5)을 얻었다. 이 중에서 CJE-6-3(578 mg)에 대하여 *n*-hexane-EtOAc(2 : 1, 3000 ml)로 silica gel(120 g) column chromatography(5 \times 12 cm)를 실시하여 4개의 분획(CJE-6-3-1 ~CJE-6-3-4)을 얻었다. CJE-6-3-2(313 mg중에서 50 mg)에 pyridine 5 ml와 동량의 acetic anhydride를 빙냉하에서 적가한 뒤 실온에서 하루 동

*연락처

Phone: 82-31-201-2661, Fax: 82-31-201-2157

E-mail: niback@khu.ac.kr

안 교반하였다. 반응액을 EtOAc와 물로 분배 추출한 뒤 유기층을 5% HCl과 포화 NaHCO₃와 NaCl을 가하여 순차적으로 세척하였고, MgSO₄ · anhydrous로 탈수한 뒤 여과, 감압 농축하였다. 농축물을 다시 *n*-hexane-EtOAc [7 : 1(1600 ml) → 6 : 1(1400 ml) → 5 : 1(1200 ml) → 3 : 1(800 ml)]으로 silica gel (100 g) column chromatography (4 × 20 cm)를 실시하여 **1a** (12 mg)와 **2a** (21 mg)를 분리하였다.

화합물 1a (2 α ,3 β -diacetylolean-12-ene): colorless crystals (CHCl₃); mp 183°C; IR ν_{\max} (KBr) 2975, 1735, 1682 cm⁻¹; EI/MS m/z = 526(M⁺), 483, 467, 440, 408, 308, 218; [α]_D²⁴ +29.9° (c = 0.8, CHCl₃); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 5.18 (1H, d, J = 3.5 Hz, H-12), 5.10(1H, ddd, J = 10.4, 10.4, 4.4 Hz, H-2), 4.76(1H, d, J = 10.4 Hz, H-3), 2.04, 1.97(each 3H, both s, acetyl-methyl), 1.10(3H, s, H-27), 1.07(3H, s, H-25), 1.01(3H, s, H-26), 0.92(6H, s, H-23, 24), 0.91(6H, s, H-29, 30), 0.79(3H, s, H-28); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

Table 1.

화합물 2a (ursolic acid monoacetate): colorless crystals (CHCl₃); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 5.23(1H, dd, J = 3.6, 3.4 Hz, H-12), 4.99(1H, dd, J = 8.5, 4.4 Hz, H-3), 2.04(3H, s, acetyl-methyl), 1.07(3H, s, H-23), 0.96(3H, s, H-27), 0.87(3H, s, H-26), 0.86(6H, d, J = 7.0 Hz, H-29, 30), 0.85(3H, s, H-25), 0.77(3H, s, H-24); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): Table 1.

CJE-8 (1690 mg)에 대하여 CHCl₃-EtOH [10 : 1(4400 ml) → 9 : 1(4400 ml)]로 silica gel (350 g) column chromatography (6 × 20 cm)를 실시하여 16개의 분획(CJE8-1-CJE8-16) 및 화합물 3 (CJE 8-8, 45 mg)을 얻었다.

화합물 3 (grayanotoxin IV): colorless needles (MeOH-Et₂O); mp 167~168°C; IR ν_{\max} (KBr) 3570, 3480, 1740, 1632 cm⁻¹; EI/MS m/z = 376(M⁺-H₂O), 358, 316, 298, 283, 280, 255, 113, 93, 55, 43; [α]_D²⁴ -20° (c = 0.7, MeOH); ¹H-

Table 1. ¹³C-NMR (100 MHz, δ_c) data of terpenoids from the flower of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*

No. of Carbon	δ_c					
	1a*	2a*	2*	3*	4**	5**
1	42.04	38.82	39.14	44.28	51.40	51.44
2	70.02	24.05	25.00	38.69	35.53	35.55
3	80.58	80.93	78.12	81.40	82.90	79.86
4	39.48	39.49	40.02	50.31	52.20	52.63
5	58.92	52.52	48.09	82.53	84.93	85.13
6	17.36	18.15	18.88	69.55	74.12	74.45
7	33.63	36.91	33.65	39.70	43.60	43.82
8	39.53	39.01	39.45	47.82	51.14	52.31
9	54.75	47.46	48.09	52.03	56.58	56.44
10	39.27	37.69	37.34	150.66	78.99	79.25
11	23.36	27.98	28.20	23.56	22.64	22.64
12	123.89	125.73	125.57	23.96	27.67	27.21
13	142.37	137.95	139.18	53.10	55.35	56.01
14	40.80	41.89	42.55	82.84	83.56	83.58
15	28.37	30.59	31.16	61.62	60.63	59.91
16	23.12	21.29	23.72	80.42	74.13	81.01
17	47.54	47.95	48.09	24.52	23.94	23.44
18	41.39	55.29	53.58	23.14	23.33	23.32
19	44.18	36.72	39.56	18.07	19.35	19.44
20	28.64	32.83	39.48	113.89	27.73	27.69
21	31.13	29.69	28.77			
22	37.90	38.26	37.52			
23	21.99	23.57	24.02			
24	21.29	16.69	17.55			
25	16.66	17.00	16.71			
26	16.74	15.52	15.79			
27	27.95	28.07	28.91			
28	20.78	170.99	179.78			
29	32.64	21.16	17.65			
30	26.46	23.27	21.55			
acetyl-carbonyl	170.41 170.70	183.53		169.94	172.27	
acetyl-methyl	17.60 18.14	17.10		21.40	21.36	

*1a~4: in CDCl₃, ** 4, 5: in CD₃OD

NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ) 5.35(1H, br. s, H-14), 5.17, 5.00(each 1H, both br. s, H-20), 3.70(1H, dd, $J=9.5$, 6.4 Hz, H-6), 3.67 (1H, br. s, H-3), 2.95(1H, dd, $J=9.5$, 9.5 Hz, H-1), 2.76 (1H, dd, $J=7.3$, 7.3 Hz, H-9), 2.13(3H, s, acetyl-methyl), 2.08(1H, br. d, $J=5.0$ Hz, H-13), 1.38(3H, s, H-17), 1.18 (3H, s, H-18), 0.96(3H, s, H-19); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): Table 1.

위에서 얻은 분획 CJE-8-13 (146 mg)에 대하여 CHCl_3 -EtOH (8:1, 2400 ml)로 silica gel (120 g) column chromatography (4×12 cm)를 실시하여 5개의 분획(CJE-8-13-1~CJE-8-13-5)을 얻었다. 이 중 CJE-8-13-3 (70 mg)을 CHCl_3 -EtOH (7:1, 1800 ml)로 silica gel (200 g) column chromatography (4×12 cm)를 실시하여 6개의 분획 (CJE-8-13-3-1~CJE-8-13-3-6)을 얻었고, 다시 CJE-8-13-3-2 (52.1 mg)에 대하여 MeOH- H_2O (1:2, 900 ml)의 용매를 사용하여 ODS (50 g) column chromatography (4.5×12 cm)하여 화합물 4 (19 mg)를 분리하였다.

화합물 4(grayanotoxin D): colorless needles (MeOH- CHCl_3); mp 240~241°C; IR ν_{max} (KBr) 3590, 3535, 3420, 1735, 1473, 1454, 1404, 1372, 1246, 1102, 1040, 938 cm^{-1} ; EI/MS m/z = 394(M^+ - H_2O), 376, 358, 398, 272, 254; $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -12° (c=0.4, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ) 5.36(1H, br. s, H-14), 3.51(1H, dd, $J=11.2$, 4.4 Hz, H-6), 3.47(1H, dd, $J=4.8$, 4.8 Hz, H-3), 2.45(1H, dd, $J=14.4$, 4.4 Hz, H-7 α), 2.06(3H, s, acetyl-methyl), 1.82(1H, dd, $J=14.4$, 11.2 Hz, H-7 β), 1.26(3H, s, H-20), 1.23(3H, s, H-19), 1.08(3H, s, H-17), 0.87(3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): Table 1.

n-BuOH 분획(20 g)으로부터 silica gel (150 g) column chromatography (5×12 cm) [CHCl_3 -EtOH = 15:1(2800 ml) → 10:1(1800 ml) → CHCl_3 -MeOH- H_2O = 9:3:1(780 ml) → 7:3:1(900 ml)]를 실시하여 19개의 분획 (CJB-1~CJB-19)을 얻었다. CJB-7(1.54 g) 분획에 대해서 CHCl_3 -MeOH- H_2O (12:3:1, 6400 ml)을 용출 용매로 하여 silica gel (150 g) column chromatography(4×12 cm)를 실시하여 13개의 분획(CJB-7-1~CJB-7-13)을 얻었다. 그 중 CJB-7-7(121 mg)을 CHCl_3 -EtOAc-MeOH- H_2O (15:13:5:1, 1800 ml)로 용출 용매를 사용하여 silica gel (80 g) column chromatography (3×12 cm)를 실시하여 화합물 5 (15 mg)를 분리 정제하였다.

화합물 5(grayanotoxin III): colorless needles(MeOH- CHCl_3 , 2:1); mp 232~237°C; IR ν_{max} (KBr) 3380, 1465, 1455, 1420, 1385, 1040, 1000 cm^{-1} ; EI/MS m/z = 352, 334, 316, 298, 280, 272, 254; $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -12° (c=0.4, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ) 4.23(1H, br. s, H-3), 3.90(1H, dd, $J=11.2$, 4.2 Hz, H-6), 3.56(1H, d, $J=4.8$ Hz, H-14), 1.34(3H, s, H-20), 1.29(3H, s, H-19), 1.19(3H, s, H-17), 1.02(3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): Table 1.

화합물 1a의 탈아세틸화. 1a 함유분획(30 mg)을 무수 MeOH에 녹인 후, 5% KOH를 가하고 실온에서 하루 동안 교반하였다. TLC로 전개시켜 반응을 확인한 후, Dowex 50×

8(H^+ form)으로 중화시킨 후 여과하였다. 여액을 감압 농축하고 silica gel (50 g) column chromatography (4×12 cm), (*n*-hexane-EtOAc = 9:1, 1600 ml)로 정제하여 화합물 1(6 mg)를 얻었다.

화합물 1 (2 α , 3 β dihydroxyolean-12-ene): colorless needles (CHCl_3); mp 210°C; IR ν_{max} (KBr) 3520, 2985, 1670 cm^{-1} ; EI/MS m/z = 442(M^+), 302, 224, 218; $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ +79.4° (c=0.6, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ) 5.17(1H, dd, $J=3.6$, 3.6 Hz, H-12), 3.70(1H, ddd, $J=9.1$, 9.1, 4.2 Hz, H-2), 3.01(1H, d, $J=9.1$ Hz, H-3), 1.13(3H, s, H-27), 1.04 (3H, s, H-23), 1.01(3H, s, H-25), 0.96(3H, s, H-26), 0.87 (3H×2, s, H-29, 30), 0.83(3H×2, s, H-24, 28).

화합물 2a의 탈아세틸화. 2a 함유분획(50 mg)을 화합물 1a와 동일하게 처리한 후 silica gel (50 g) column chromatography (4×12 cm), (*n*-hexane-EtOAc = 9:1, 1600 ml)로 정제하여 화합물 2 (22 mg)를 얻었다.

화합물 2 (ursolic acid): colorless needles (CHCl_3); mp 279~281°C; IR ν_{max} (KBr) 3440, 2940, 1700, 1690 cm^{-1} ; EI/MS m/z = 456, 247, 203, 189, 133; $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ +66° (c=1.2, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ) 5.47(1H, dd, $J=3.0$, 3.0 Hz, H-12), 3.45(1H, dd, $J=10.8$, 6.8 Hz, H-3), 1.27(3H, s, H-23), 1.23(3H, s, H-27), 1.03(3H, s, H-26), 1.00(3H, s, H-24), 0.99(3H, d, $J=6.4$ Hz, H-30), 0.94(3H, d, $J=6.0$ Hz, H-29), 0.87(3H, s, H-25); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): Table 1.

결과 및 고찰

산철쭉(*Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*) 꽃의 MeOH 추출물로부터 용매를 사용하여 계통 분획하여 EtOAc 분획(CJE)과 *n*-BuOH 분획(CJB)과 H_2O 분획(CJH)을 각각 0.14%, 0.83%, 4.13%의 수율로 얻었다.

CJE 및 CJB 분획으로부터 column chromatography를 반복 실시하거나 아세틸화 또는 탈아세틸화하여 1a(2 α , 3 β diacetylolean-12-ene), 1(2 α , 3 β dihydroxyolean-12-ene), 2a (ursolic acid monoacetate), 2(ursolic acid), 3(grayanotoxin IV), 4(grayanotoxin I), 5(grayanotoxin III)를 각각 분리, 정제하였다.

화합물 1a는 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) spectrum에서 1개의 olefine methine (δ 5.18), 2개의 oxygenated methine proton (δ 5.10, δ 4.76) signal이 관측되었다. 또한, 2개의 acetyl methyl proton signal이 δ 2.04, δ 1.97에서 관측되었다. 그리고, 8개의 methyl proton signal이 δ 1.10~0.79 ppm사이에서 각각 singlet으로 관측되었다. 따라서, 이 화합물은 1개의 이중결합, 2개의 acetyl기를 가진 triterpeneoid 화합물로 판단되었으며, 8개의 singlet methyl기를 보임으로써 oleanane골격으로 추정되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) spectrum을 보면, 2개의 acetyl기에서 유래한 2개의 carbonyl (δ 170.41, δ 170.70) 및 2개의 methyl proton (δ 18.14, δ 17.60) signal외에 30개의 탄소 signal이 관측되었다. 그리고, 1개의 이중결합 (δ 123.89,

δ142.37)과 2개의 oxygenated methine carbon signal (δ70.02, 880.58)이 관측되었다. 전체적으로 acetyl기를 제외하면 단일 결합 4급 탄소 7개, methine 탄소 6개, methylene 탄소 9개, methyl 탄소 8개가 관측되었다. 이와 같은 data를 문헌과 비교한 결과 화합물 **1a**는 oleanane골격의 2번, 3번 탄소에 2개의 acetyl기가 존재하고 12번과 13번 사이에 이중결합이 위치한 2α,3β-diacetylolean-12-ene이라는 결론을 내리게 되었다. **1a**로부터 알칼리 처리하여 acetyl기를 제거한 화합물 **1** (2α,3β-dihydroxyolean-12-ene)을 얻었으며, 화합물 **1**의 ¹H-NMR data로부터도 이 구조를 확인⁴⁾할 수 있었다. 화합물 **1**은 *Rhododendron macrocephalum*의 눈(bud)에서 분리보고 되어 있다.

화합물 **2a**의 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum에서 한 개의 olefine methine (δ5.23) 및 한 개의 oxygenated methine (δ4.99) signal이 관측되었다. 그리고 5개의 singlet methyl signal (δ1.07, 80.96, 80.87, 80.85, 80.77)과 2개의 doublet methyl proton (δ0.86) signal을 보여 줌으로써 ursane골격의 triterpenoid임을 추측할 수 있었다. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum을 보면, acetyl기에서 유래된 1개의 carbonyl (δ183.53)과 1개의 methyl (δ17.10)을 제외하면 모두 30개의 탄소 signal이 관측되었다. 그 외에 한 개의 carbonyl (δ170.99)과 olefinic quaternary (δ137.95), olefinic methine carbon (δ125.73) signal이 관측되었다. DEPT spectrum을 통해서 7개의 4급탄소, 7개의 methine signal과 9개의 methylene signal 그리고 7개의 methyl signal을 각각 확인하였다. 위의 결과를 문헌과 비교한 결과 화합물 **2a**는 ursolic acid monoacetate

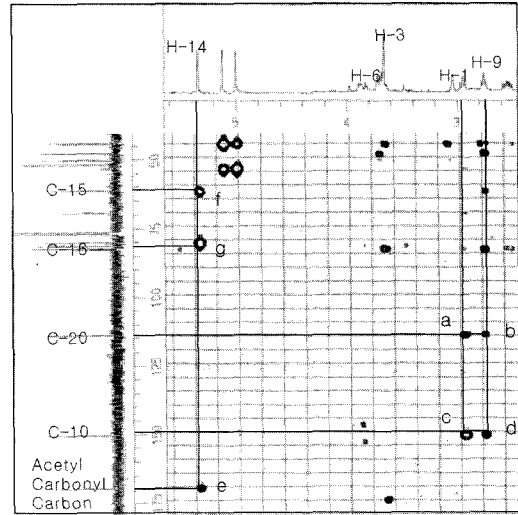


Fig. 1. HMBC spectrum of grayanotoxin IV (**3**) from the flower of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*.

(β-acetoxyurs-12-en-28-oic acid)로 결정하였고, 화합물 **2a**를 알칼리 처리하여 얻은 **2**의 spectrum data는 문헌^{5,6)}의 ursolic acid와 일치하였다.

화합물 **3**의 ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) spectrum에서 olefine 영역에서 geminal coupling을 하는 δ5.17, 5.00 (each 1H, both br. s) signal이 관측되어 exomethylene의 존재가 확인되었다. 또한, δ5.35, 83.70, 83.67의 3개의 oxygenated

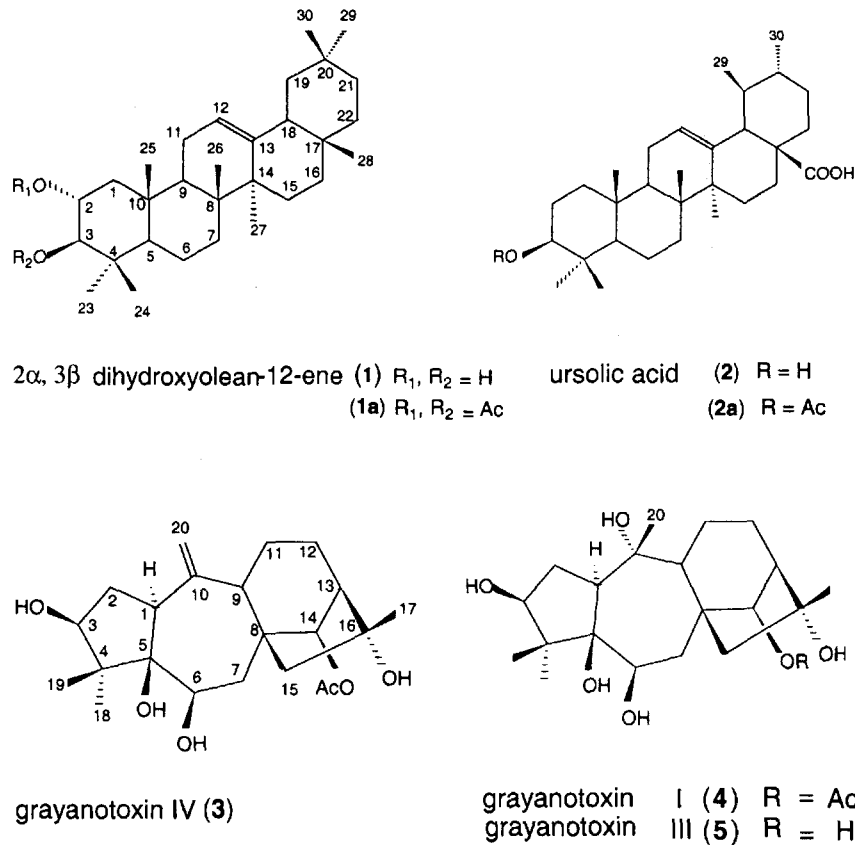


Fig. 2. Chemical structures of terpenoids isolated from the flower of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*.

methine proton signal이 관측되었다. 그리고 acetyl기의 methyl proton signal이 δ 2.13에서 관측되었고 3개의 singlet methyl proton signal이 δ 1.38, δ 1.18, δ 0.96에서 관측되었다. 3개의 oxygenated methine proton signal중 1개가 δ 5.35로 저자장으로 shift된 점으로부터 acetyl기가 치환되어 있는 것을 추측할 수 있었다. ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum에서 acetyl기 유래의 carbonyl과 methyl carbon signal (δ 169.94, δ 21.40)의 20개의 탄소 signal이 관측되어 이 화합물이 diterpenoid임이 확인되었고, 한개의 olefinic quaternary carbon (δ 150.66)과 한개의 exomethylene (δ 113.89) signal이 관측되었다. 또한 3개의 oxygenated methine carbon (δ 82.84, δ 81.40m, δ 69.55)과 2개의 oxygenated quaternary carbon (δ 82.53, δ 80.42)이 관측되었다. 그리고 DEPT spectrum으로부터 4개의 methyl과 5개의 methylene, 6개의 methine 그리고 7개의 quaternary carbon의 존재를 확인하였다. 따라서, 이 화합물은 exomethylene을 갖는 이중결합 1개, hydroxyl기 4개, acetyl기 1개를 갖는 diterpenoid로 판명하였다. 이 화합물의 이중결합, hydroxyl 및 acetyl기의 위치를 규명하기 위하여 HMBC를 측정하였다. 화합물 3의 HMBC spectrum(Fig. 1)에서 H-1(δ 2.95)과 H-9(δ 2.76) signal이 C-20(δ 113.9), C-10(δ 150.6) signal과의 cross peak (Fig. 1의 a~d)를 보여줌으로써 exomethylene이 homo B환의 C-1, C-9사이에 있는 C-10에 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 H-14(δ 5.35)의 oxygenated methine proton signal이 acetyl carbonyl carbon (δ 169.94), C-15(δ 61.62) 및 C-16(δ 80.42) signal과 cross peak (Fig. 1의 e~g)를 보여줌으로써 C-14의 hydroxyl기에 acetyl가 치환되어져 있음을 확인하였다. 또한 H-3이 C-2, C-4와 H-6은 C-5와 C-8과의 correlation을 보여줌으로써 (spectrum 미첨부) 각각 hydroxyl기의 위치를 확인하였다. 이상의 결과를 종합하고 화합물 3의 data를 문헌^{7,8)}과 비교한 결과 화합물 3은 진달래속 식물에서 발견된 A-nor-B-homo골격을 가진 전위 kaurane diterpenoid인 grayanotoxin IV로 동정하였다. 화합물 4의 NMR spectrum(CD_3OD)은 grayanotoxin IV (화합물 3)과 매우 유사하였다. 다만 화합물 3에 비해 이중결합이 관측되지 않은 대신 한 개의 methyl기(δ 27.73)와 oxygenated 4급 탄소 (δ 78.99)가 관측되었다. 따라서 이 화합물은 3 (grayanotoxin IV)의 C-10과 C-20사이의 이중결합이 수화되어 C-10에 hydroxyl기가 치환되고, C-20이 methyl로 환원된 grayanotoxin I로 추정되었으며 문헌⁹⁾과 data를 비교하여 구조를 확인하였다. 화합물 5의 NMR spectrum(CD_3OD)은 grayanotoxin I(화합물 4)과 매우 유사하였다. 다만 acetyl기 signal이 관측되지 않아서 화합물 4로부터 탈아세틸화하여 생성된, 즉 grayanotoxin III로 추정하였고 문헌⁹⁾과도 data가 일치하였다. 화합물 4와 5는 *Rhododendron molle*에서 분리보고 되어 있다.

이번에 분리된 terpenoid 화합물중, oleanane골격을 갖는 terpenoid 화합물은 항균작용¹⁷⁾, 항상성,¹⁸⁾ 항암작용,^{18,19)} 간비대 억제,¹⁸⁾를 갖는다고 보고되어 있고, ursane 골격을 갖는 ursolic acid의 경우는 소염작용,¹⁴⁾ 항균작용,^{15,17)} 고지혈증억제,^{12,15)} 백혈구 내에서 입과구 과다 증가 억제작용,¹⁶⁾ 간비대억제,¹⁵⁾ 돌연변이 억제,^{10,13)} chitin 합성억제를 통한 균류저해활성¹²⁾을 갖는

다고 보고되어 있다. 또한, grayanotoxin류 diterpenoid는 독성을 가진 것으로 알려져 있고,⁷⁾ 곤충에 대한 섭취 억제 활성,⁹⁾ 생장저해⁹⁾를 가지고 있다고 보고 되어 있으며, rat과 mouse를 이용한 실험에서 정맥 주사했을 때 LD₅₀의 수치가 매우 낮으며, GOT와 GPT의 수치를 높이고, 간과 비장의 무게를 감소시키고 기능에 영향을 주며, 백혈구의 수를 감소시키는 것으로 보고된¹¹⁾ 바 있다.

앞으로 이들 terpenoid화합물에 대한 다양한 생리적 및 약리적 활성을 측정할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 Bio Green 21사업과 한국과학재단에서 지원하는 경희대학교 식물대사연구센터(SRC)로부터 지원 받은 연구비로 수행되었습니다.

참고문헌

- Soka, T. (1985) In *Dictionary of Chinese Drugs*. (1st ed), Shanghai Science Technology Shogakukan (eds.), Shogakukan Press, Tokyo, Japan. p. 2545.
- Lee, Y. R. (1998) In *Pictorial Book of the Korean Flora*. Kyohak Press Seoul, Korea. p. 588.
- Kim, T. J. (1996) In *Korean Resource Plant III*. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p. 224.
- Ageta, H and Ageta, T. (1994) Ericaceous constituents: Seventeen triterpenoids isolated from the buds of *Rhododendron macrocephalum*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 369-372.
- Numata, A., Yang P., Takahashi, C., Fujiki, R., Nabae, M and Fujita, E. (1994) Cytotoxic triterpenes from a chinese medicine, goreishi. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 648-651.
- Kang, S. S. (1987) ^{13}C -NMR spectroscopy of amyriins. *Kor. J. Pharmacogn.* **18**, 151-167.
- Burke, J. W. and Doskotch, R. W. (1990) High field ^1H and assignments of grayanotoxins I, IV and XIV isolated from *Kalmia angustifolia*, *J. Nat. Prod.* **53**, 131-137.
- Kakisawa, H., Kurono, M., Takahashi, S. and Hirata, Y. (1961) Structure of grayanotoxin-I and -III. *Tetrahedron Lett.* **2**, 59-67.
- Klocke, J. A., Hu, M. Y., Chui, S. F. and Kubo, I. (1991) Grayanoids diterpene insect antifeedents and insecticides from *Rhododendron molle*, *Phytochem.* **30**, 1797-1800.
- Mahato, S. B., Nandy, A. K. and Roy, G. (1992) Triterpenoids. *Phytochem.* **31**, 2199-2249.
- Hirishi, H., Yashushi, O., Kazuo, H. and Haruki, W. (1979) Subchronic toxicity of ericaceous toxins and *Rhododendron* leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **27**, 874-879.
- Jeong, T. S., Hwang, E. I., Lee, H. B., Lee, E. S., Kim, Y. K., Min, B. S., Bae, K. H., Bok, S. H. and Kim, S. U. (1999) Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Med.* **65**, 261-263.
- Young, H. S., Chung, H. Y., Lee, C. K., Park, K. Y., Yokozawa, T. and Oura, H. (1994) Ursolic acid inhibits aflatoxin B1-induced mutagenicity in a *Salmonella* assay system. *Biol.*

- Pharm. Bull.* **17**, 990-992.
14. Ohigashi, H., Takamura, H., Koshimizu, K., Tokuda, H. and Ito, Y. (1986) Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induce Epstein-Barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from an anti-inflammatory chinese medical plant, *Glechoma hederaceae* L. *Cancer Lett.* **30**, 143-151.
 15. Liu, J. (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* **49**, 57-68.
 16. Lee, K. H., Lin, Y. M., Wu, T. S., Zhang, D. C., Yamagishi, T., Hasashi, T., Hall, I. H., Chang, J. J., Wu, R. Y. and Yang T. H. (1987) The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*; ursolic acid and related derivative. *Planta Med.* **54**, 308-311.
 17. Hernandez-Pereza, M., Lopez-Garciaa, R. E., Rabanala, R. M., Dariasa, V. and Ariasb, A. (1994) Antimicrobial activity of *Visnea mocanera* leaf extracts. *J. Ethnopharmacol.* **41**, 115-119.
 18. Kinjo, J., Yamashita, M. and Nohara, T. (1997) Triterpene saponins from *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, *Canavalia gladiata*, and *Lupinus polyphyllus* × *arboreus*: Their structures, antihepatotoxic activities, and antioxidative inactivity. In *Food Factors for Cancer Prevention*, Ohigashi, H., Osawa, T., Terao, J., Watanabe, S. and Yoshikawa, T. (2nd ed.) Springer-Verlag, Tokyo, Japan, pp. 323-327.
 19. Huang, M. T. and Ho, C. T. (1997) Antitumorigenic activity of rosemary. In *Food Factors for Cancer Prevention*, Ohigashi, H., Osawa, T., Terao, J., Watanabe, S. and Yoshikawa, T. (2nd ed.) Springer-Verlag, Tokyo, Japan, pp. 253-256.

Isolation and Identification of Terpenoids from the Flower of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*

Yoon-Hee Hong, Myoung-Chong Song, Jae-Taek Han, Tae-O Jang, Youn-Hyung Lee, Sung-Hoon Kim¹, Seung-Ae Kim¹, Mi-Hyun Park² and Nam-In Baek* (Graduate School of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, ¹Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Suwon, 449-701; ²Eromlife Co. Ltd., Seoul, 135-010, Korea)

Abstract: Extracts were obtained from the flower of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*. (7 kg) in 80% aqueous MeOH and successively fractionated with solvent of EtOAc, *n*-BuOH and H₂O, successively. Silica gel and ODS column chromatographies of the EtOAc and *n*-BuOH fractions were repeatedly carried out by using the various solvent systems to give five terpenoids. Chemical structures of the isolated terpenoids were determined as 2 α ,3 β -dihydroxylolean-12-ene (**1**), ursolic acid (**2**), grayanotoxin IV (**3**), grayanotoxin I (**4**) and grayanotoxin III (**5**) based on the interpretation of several spectral data including 2D-NMR such as ¹H-¹H COSY, HMQC and HMBC.

Key words: *Rhododendron yedonse* var. *poukhanense*, dihydroxylolean-12-ene, ursolic acid, grayanotoxin

*Corresponding author