

춘란(*Cymbidium goeringii* REICHB. fil)의 메탄올 추출물로부터 Sterol 화합물의 분리

이진희 · 김동현 · 방면호 · 양혜정 · 방성훈¹ · 정인식 · 권병목²
김성훈³ · 김대근⁴ · 박미현⁵ · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹경희대학교 원예학과, ²한국생명공학연구원,
³경희대학교 동서의학대학원, ⁴우석대학교 약학대학, ⁵(주)이룸라이프

Isolation of Sterols from the Methanol Extracts of *Cymbidium goeringii* REICHB. fil

Jin-Hee Lee, Dong-Hyun Kim, Myun-Ho Bang, Hye-Joung Yang, Sung-Hoon Bang¹,
In-Sik Chung, Byoung-Mog Kwon², Sung-Hoon Kim³, Dae-Keun Kim⁴,
Mi-Hyun Park⁵ and Nam-In Baek*

Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center

¹Horticulture, KyungHee University, Suwon 449-701, Korea

²Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

³Graduate School of East-West Medical Science, KungHee University, Suwon 449-701, Korea

⁴Department of Pharmacy, Woosuk University, Jeonju, 565-701; ⁵Erom Life Co. Ltd., Seoul 135-825, Korea

Received March 25, 2005; Accepted July 11, 2005

Cymbidium goeringii REICHB. fil was extracted with 80% MeOH and solvent-fractionated with EtOAc, *n*-BuOH and H₂O, successively. From EtOAc fraction, three sterols were isolated on repeated silica gel and ODS column chromatographies. The chemical structures were determined as β -sitosterol (1), daucosterol (2) and ergosterol peroxide (3) by NMR, MS and IR, which is the first to be isolated from *Cymbidium goeringii* REICHB. fil.

Key words: *Cymbidium goeringii*, sterol, β -sitosterol, daucosterol, ergosterol peroxide

서 론

춘란(*Cymbidium goeringii*)은 난과(Orchidaceae)에 속하는 다년생 초본식물로, 우리나라 남부지역의 겨울철 기온이 높고 햇볕이 잘들며 습기가 적당한 숲속에 자생하며, 일본, 중국, 한국에 분포하는 것으로 알려져 있다. 개화기는 3-4월이며, 칼 모양의 잎 사이에서 나온 꽃줄기 끝에 황록색 꽃이 핀다. 민간에서는 봄을 알려주는 꽃이라 하여 보춘화라고도 하며, 효능으로는 지혈, 손발이 틀때, 화상, 동상, 외상출혈등에 치료 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 지금까지 춘란에 대한 식물화학적 연구나 생리활성에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서, 본 연구는 춘란으로부터 활성이 기대되는 이차대사산물을 분리·동정하고자 실시하였다. 본 논문에서는 춘란에서 stigmastane 골격을 갖는 β -sitosterol, daucosterol과 ergostane 골격을 갖는

ergosterol peroxide을 분리, 동정하였다. 이 sterol 화합물은 저자 등이 춘란으로부터 처음으로 분리하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용한 춘란(*Cymbidium goeringii* REICHB. fil)는 2003년 4월 말 전라남도 정읍에서 수집하였고, 공저자(경희대 방성훈)가 동정하였다.

시약 및 기기. Column chromatography(c.c.)용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Germany)을 사용하였고, octadecyl silica gel(ODS)은 LiChroprep RP-18(Merck, Germany)을 사용하였다. Thin layer chromatography(TLC)는 Merck사에서 생산한 silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였고, octadecyl silica gel TLC는 Merck사에서 생산한 DC-Fertigplatten RP-18 F_{254S}를 사용하였다.

NMR은 400 MHz FT-NMR spectrometer(Varian Inova AS 400, Varian, USA)로 측정하였고, IR spectrum은 Perkin model 599B(Perkin-Elmer, USA)로 측정하였으며, 비선광도는 Polarimeter P-1020(JASCO, Japan)으로, EI/MS와 FAB/MS는 JMSAX

*Corresponding author
Phone: +82-31-201-2661; Fax: +82-31-201-2157
E-mail: nibaek@khu.ac.kr

505-WA(JEOL, Japan)를 사용하여 측정하였다. 용점은 Fisher-Johns 용점측정기(Fisher Scientific, USA)를 사용하여 측정하였으며, 미보정하였다.

춘란의 용매 추출 및 분획. 춘란 전초 생체 10 kg을 약 4 cm 정도의 크기로 잘라서, 80% MeOH 수용액(18 l)에 24시간 침지하여 실온에서 추출하였다. 추출물을 여과하고, 남은 것은 동일한 방법으로 1회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압·농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물을 EtOAc(2 l×2)/H₂O(2 l)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 n-BuOH(2 l×2)/H₂O(2.5 l)로 분배 추출하였다. 각층을 감압·농축하여, EtOAc 분획(SOE, 21 g)과 n-BuOH 분획(SOB, 23 g)과 H₂O 분획을 얻었다.

EtOAc분획(21 g)으로부터 silica gel c.c.(n-hexane-EtOAc = 7:1 → 5:1 → 3:1 → 1:1 → CHCl₃-MeOH = 17:1 → 10:1)를 실시하여 분획하였고, 이 분획을 TLC로 확인하여 유사한 것끼리 모아 28개의 분획(SOE-1~SOE-28)으로 나누었다. 그 중에서 SOE-8 분획(1.6 g)에 대하여 silica gel c.c.(CHCl₃-MeOH = 5:1 → 3:1)를 실시하여 11개의 분획(SOE-8-1~SOE-8-11)으로 나누었고, 이 중에서 SOE-8-4(485 mg)분획을 다시 silica gel c.c.(CHCl₃-MeOH = 20:0.1)를 실시하여 화합물 1(22 mg, β-sitosterol)을 분리하였다^{2,3)}.

화합물 1(β-sitosterol): white powder(CHCl₃); m.p. 140°C; [α]_D -3.7°(c=0.6, CHCl₃); EI/MS m/z: 414 [M]⁺; IR(KBr, ν) 3400(-OH), 1640(-C=C), 1050(C-O), 845, 802, 830 cm⁻¹; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 5.25(1H, br. d, J=4.8 Hz, H-6), 3.46(1H, m, H-3), 0.98(3H, s, H-19), 0.90(3H, d, J=6.4 Hz, H-21), 0.82(3H, t, J=7.6 Hz, H-29), 0.81(3H, d, J=7.6 Hz, H-26), 0.79(3H, d, J=6.8 Hz, H-27), 0.66(3H, s, H-18); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ_c) (Table 1).

SOE-27 분획(469 mg)에 대하여 silica gel c.c.(CHCl₃-MeOH = 9:1)를 실시하여 8개의 분획(SOE-27-1~SOE-27-8)으로 나누었고, 이 중에서 SOE-27-3+4(130 mg)분획을 다시 ODS c.c.(MeOH-H₂O = 20:1)를 실시하여 화합물 2(52 mg, daucosterol)을 분리하였다⁴⁾.

화합물 2(daucosterol): colorless crystals(pyridine-MeOH-H₂O); m.p. 285-286°C; [α]_D -44.6°(c=0.9, pyridine); pos. FAB/MS m/z: 577 [M+1]⁺; IR(KBr, ν) 3320, 3030, 2935, 1645 cm⁻¹; ¹H-NMR(400 MHz, pyridine-d₅, δ) 5.35(1H, br. d, J=4.8 Hz, H-6), 5.04(1H, d, J=7.6 Hz, H-1'), 3.59(1H, m, H-3), 0.98(3H, d, J=6.8 Hz, H-21), 0.93(3H, s, H-19), 0.882(3H, d, J=9.6 Hz, H-26), 0.880(3H, d, J=8.4 Hz, H-27), 0.85(3H, t, J=6.8 Hz, H-29), 0.66(3H, s, H-19); ¹³C-NMR(100 MHz, pyridine-d₅, δ_c) (Table 1).

앞과 같은 SOE-8분획에서 동일한 과정을 통해 얻은 SOE-8-9의 화합물 3(195 mg, ergosterol peroxide)을 분리하였다^{5,7)}.

화합물 3(ergosterol peroxide): yellow needles(CHCl₃); m.p. 180-181°C; [α]_D +59°(c=0.2, CHCl₃); EI/MS m/z: 428 [M]⁺, 410[M-H₂O]⁺, 396[M-O₂]⁺, 253, 69; IR(KBr, ν) 3360, 1460, 1380, 1040, 1030, 960, 940 cm⁻¹; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 6.48(1H, d, J=8.4 Hz, H-7), 6.22(1H, d, J=8.4 Hz, H-

Table 1. ¹³C-NMR data (100 MHz) of sterols from the whole plants of *Cymbidium goeringii* REICHB. fil

No. of Carbon	Compound 1*	Compound 2*	Compound 3*
1	37.39	37.04	39.36
2	31.94	29.80	30.14
3	71.79	77.61	66.49
4	42.35	38.89	51.08
5	140.63	140.31	80.01
6	121.63	121.33	130.64
7	31.94	31.74	135.29
8	31.70	31.62	82.13
9	50.14	49.88	34.72
10	36.55	35.95	36.93
11	21.15	20.87	20.69
12	39.81	38.88	39.37
13	42.33	42.03	44.58
14	56.77	56.36	51.69
15	24.36	24.09	28.71
16	28.31	28.11	23.46
17	56.06	55.78	56.20
18	11.94	11.56	12.94
19	19.94	19.00	18.24
20	36.19	35.95	39.78
21	18.85	18.59	20.94
22	33.98	33.76	132.19
23	26.11	25.95	135.08
24	45.85	45.58	42.80
25	29.19	29.80	33.10
26	19.88	18.79	20.02
27	19.09	19.55	19.71
28	23.12	22.97	17.63
29	12.06	11.74	
1'		102.01	
2'		74.80	
3'		78.06	
4'		71.17	
5'		77.93	
6'		62.33	

*1: in CDCl₃, 2: in pyridine-d₅, 3: in CDCl₃

6), 5.20(1H, dd, J=8.4, 15.3 Hz, H-22), 5.12(1H, dd, J=8.4, 15.3 Hz, H-23), 3.95(1H, m, H-3), 0.98(3H, d, J=6.8 Hz, H-21), 0.89(3H, d, J=6.8 Hz, H-28), 0.86(3H, s, H-19), 0.81(3H, d, J=6.4 Hz, H-26), 0.80(3H, s, H-18), 0.79(3H, d, J=7.2 Hz, H-27); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ_c) (Table 1).

결과 및 고찰

화합물 1은 TLC에 전개하고, 10% 황산 발색 시 붉은색으로 발색되었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ5.25의 signal로부터 1개의 olefinic methine을 확인하였고 δ3.46의 signal로부터 oxygenated methine을 확인하였다. 또한 δ2.30-δ1.00에서 다수의 methylene과 methine proton signal을 관측하였고, δ0.66(3H, s), 0.98(3H, s)에서 2개의 singlet, δ0.90(3H, d, J=6.4 Hz),

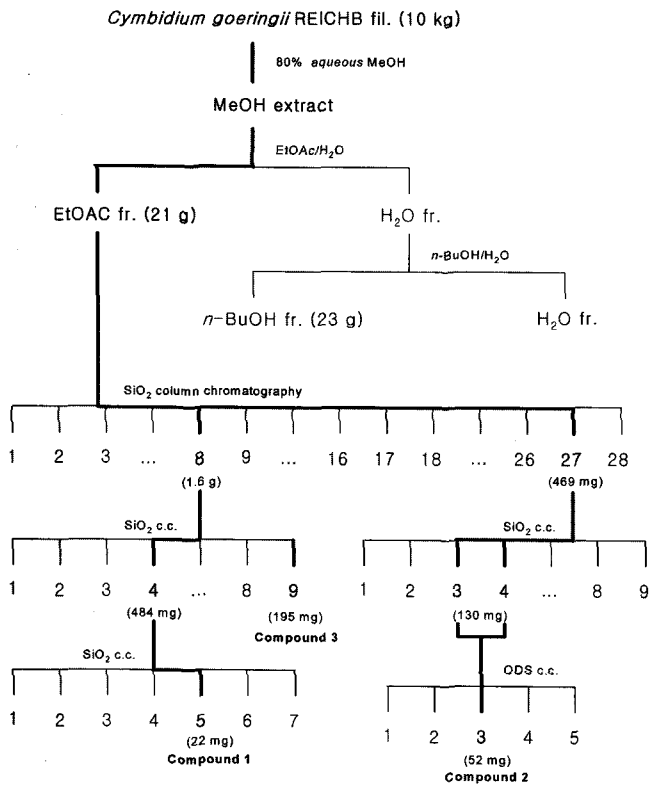


Fig. 1. Isolation procedure of secondary metabolites from the whole plant of *Cymbidium goeringii* REICHB. fil.

δ 0.81(3H, d, $J=7.6$ Hz) 및 δ 0.79(3H, d, $J=6.8$ Hz)에서 3개의 doublet, 그리고 δ 0.82(3H, t, $J=7.6$ Hz)에서 1개의 triplet methyl proton signal을 확인하였다. 13 C-NMR 스펙트럼에서 탄소수가 29개이고 methyl carbon이 6개 있는 것을 통해 sterol 화합물인 것을 확인하였다. δ 140.63, δ 121.63을 통해 1개의 이중 결합이 존재하는 것과 δ 71.79을 통해 oxygenated methine carbon을 확인하였다. 또한 δ 19.89, δ 19.46, δ 19.10, δ 18.85, δ 12.06, δ 11.94에서 6개의 methyl carbon을 확인하였다. 이를 종합하여 화합물 1은 대부분의 식물에 함유되어 있는 sterol인 β -sitosterol($\text{stigmasterol-5-ene-3-}\beta\text{-ol}$)로 구조 결정하였다^{2,3}.

화합물 2는 TLC에 전개하고, 10% 황산 발색 시 자색으로 발색되었다. NMR 스펙트럼을 보면 화합물 1의 스펙트럼과 거의 일치하였고, 다만 화합물 2에서 당 한분자의 signal들이 더 관측되었다. 13 C-NMR 스펙트럼에서 당 signal들의 chemical shift를 검토한 결과 D-glucopyranose로 동정되었다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 에서 δ 5.04에서 관측되는 anomeric proton의 coupling constant 값이 7.6 Hz인 것을 통해 β -결합하고 있는 것을 확인하였다. 그러므로 화합물 2는 β -sitosterol의 C-3의 OH기에 D-glucopyranose가 β -결합하고 있는 daucosterol로 구조 결정하였다^{2,4}. 한편, stigmasterane골격을 갖는 β -sitosterol 또는 daucosterol의 경우 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 6개의 methyl기의 chemical shift가 문헌마다 일치하지 않게 나타나고 있다^{2,4,9}. 또한, β -sitosterol과 daucosterol의 1개의 methyl기의 chemical shift도 서로 일치하지 않는 경우가 있어, 이번에 정확히 동정하였다. 화합물 1과 2은 같은 stigmasterane골격의 sterol이지만, 당이 결합함으로

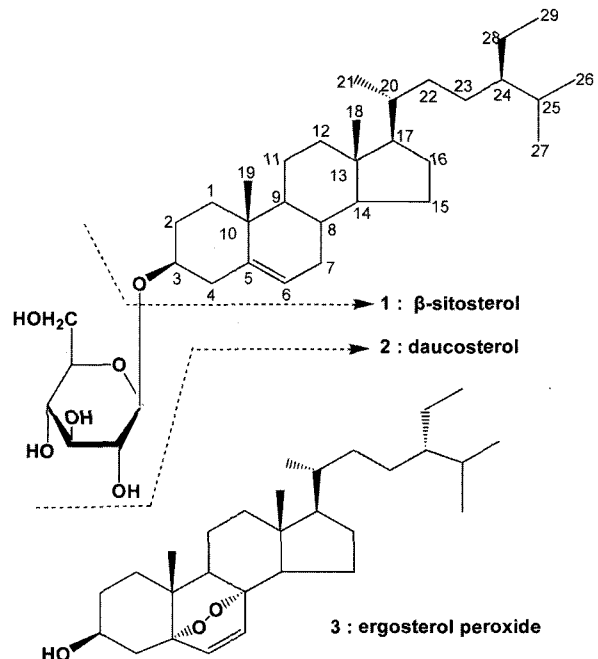


Fig. 2. Chemical structures of sterols from the whole plants of *Cymbidium goeringii* REICHB. fil.

써 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 H-19와 H-21의 peak의 위치가 서로 달라지는 것을 확인하였다.

화합물 3은 10% 황산 발색 시, 짙은 회색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ 6.48(1H, d, $J=8.4$ Hz), δ 6.22(1H, d, $J=8.4$ Hz), δ 5.20(1H, dd, $J=8.4, 15.3$ Hz), δ 5.12(1H, dd, $J=8.4, 15.3$ Hz)의 signal을 통해 olefinic methine proton이 4개 존재하는 것을 확인하였다. 또한, δ 3.95(1H, m)의 signal을 통해 1개의 oxygenated methine를 확인하였고, δ 0.80- δ 1.00에서 다수의 methylene과 methine proton을 관측하였다. 그리고 δ 0.86(3H, s), δ 0.80(3H, s)에서 2개의 singlet, δ 0.98(3H, d, $J=6.8$ Hz), δ 0.89(3H, d, $J=6.8$ Hz), δ 0.81(3H, d, $J=6.4$ Hz), δ 0.79(3H, d, $J=7.2$ Hz)에서 4개의 doublet의 methyl proton signal을 관측하였다. 따라서 sterol 화합물임을 알 수 있었다. 13 C-NMR 스펙트럼에서 본 화합물이 모두 28개의 탄소를 가지고 있는 것을 확인하였고, δ 135.29, δ 130.64, δ 135.08, δ 132.19을 통해 2개의 이중결합이 존재하는 것을 확인하였다. 그리고, δ 82.13, δ 80.01을 통해 2개의 oxygen이 결합하고 있는 4급탄소를 확인하였고, δ 66.49을 통해 oxygenated methine carbon을 확인하였다. 그리고 δ 12.94, δ 17.63, δ 18.24, δ 19.71, δ 20.02, δ 20.94에서 6개의 methyl carbon을 확인하였다. 2개의 oxygen이 결합하고 있는 형태를 규명하기 위해 EI/MS를 측정하였다. 그 결과 M^+ 가 $m/z=428$ 에서 관측된 사실로부터 두개의 산소가 peroxide 형태를 띠는 것을 확인하였다^{5,6}. 이를 종합한 결과, 화합물 3은 ergosterol의 C-5와 C-8에 peroxide 결합한 ergosterol peroxide로 구조 결정하였다. Ergosterol peroxide는 균류등에서 처음 분리되었으며, 지금까지 식물에서 분리된 예는 매우 적었다. 그리고 β -sitosterol, daucosterol, ergosterol peroxide는 춘란에서는 이번에 처음으로 분리, 동정되었다.

춘란으로부터 분리한 sterol 화합물 중 β -sitosterol, daucosterol

은 많은 식물에 존재하는 물질이다. 문헌에 의하면 β -sitosterol 이 자궁에 존재하는 acid phosphate 활성을 촉진시키므로서 uterotrophic 효과가 있음을 보고하였으며, 항바이러스작용 항염증과 해열작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다¹⁰. 그리고 daucosterol은 암세포에 대한 세포독성작용¹⁰, 암세포 발생과 관련된 활성인 FPTase 저해효과² 및 살충효과와 관련된 항섭취 효과¹¹가 보고되어진 바 있다. 그리고 ergosterol peroxide는 세포독성 효과,¹⁰ 다양한 항암활성^{7,12} 및 항보체활성⁵이 보고되었다. 앞으로 춘란에서 단리된 sterol 화합물에 대해 ACAT, 항암 활성 등 다양한 활성 검색을 수행할 예정이다.

초 록

춘란을 80% MeOH로 추출하고, 얻어진 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O로 용매 분획하였다. EtOAc 분획에 대하여 column chromatography를 반복하여 3종의 sterol을 분리하였다. 각각에 대하여 2D-NMR을 포함한 스펙트럼 데이터의 해석과 문헌 자료를 조사하여 β -sitosterol, daucosterol, ergosterol peroxide로 구조를 결정하였다. 이 화합물들은 춘란에서 이번에 처음 분리, 보고되었다.

Key words: 춘란, sterol, β -sitosterol, daucosterol, ergosterol peroxide

감사의 글

본 연구는 과학기술부 · 한국과학재단 지정 우수연구센터인 경희대학교 식물대사연구센터와 농촌진흥청 바이오그린 21 사업에서 지원하는 연구비로 수행되었음.

참고문헌

- Jung, B. S. and Shin, M. K. (1990) In *Hyang Yak Dae Sa Jun*. Young Lim Sa (3rd ed.) Seoul, Korea.
- Kim, D. H., Song, M. J., Han, K. M., Bang, M. H., Kwon, B. M., Kim, S. H., Kim, D. K., Chung, I. J., Park, M. H., Baek, N. I. (2004) Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources-X. Isolation of Lipids from the Flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. and their onhobitory Effect on FPTase, *J. Korea Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 357-360.
- Song, M. J., Hong, Y. H., Kim, D. H., Kim, D. K., Chung, I. J., Lee, Y. H., Kim, S. H., Park, M. H., Kim, I. H., Kwon, B. M. and Baek, N. I. (2003) Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources-VI. Isolation of Sterol Compounds from the Aerial Parts of Garland (*Chrysanthemum Coronarium* L.), *J. Korea Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 376-379.
- Ahn, E. M., Lee, M. H., Rho, Y. D., and Baek N. I. (1998) Isolation of daucosterol from the rice hull of *Oryza sativa* L., *J. Korea Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 486-488.
- Kim, D. S., Baek, N. I., Oh, S. R., Jung, K. Y., Lee, I. S., Kim, J. H. and Lee, H. K. (1997) Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of nmr data, *Arch. Pharm. Res.* **20**, 201-205.
- Nam, S. N., Jo, Y. S., Kim, Y. H., Hyun, J. W. and Kim, H. W. (2001) Cytotoxic activities of acetoxyscripenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*, *Life Sci.* **69**, 229-237.
- Bok, J. W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H. G. and Neil Tower, G. H. (1999) Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*, *Phytochemistry* **51**, 891-898.
- Takaishi, Y., Adachil R., Murakami, Y., Ohashi, R., Nakano, K. and Tomimatsu, T. (1992) A polyoxygenated steroid from *Lasioisphaera nipponica*, *Phytochemistry* **31**, 243-246.
- Lee, S. H., Kim, K. S., Jang, J. M., Park, Y. M., Kim, Y. B. and Kim, B. K. (2002) Phytochemical constituents from the Herb of *Artemisia apiacea*, *Arch. Pharm. Res.* **25**, 285-288.
- Hyun, J. W., Yang, Y. M., Sung, M. S., Chung, H. S., Paik, W. H., Kang, S. S., Park, J. G. (1996) The Cytotoxic Activity of Sterol Derovatives from *Pulsatilla Chinensis* Regal, *J. Korean Cancer* **28**, 145-150.
- Carlos, R. P., Matias, G., Jose, C. G., Marta, E. S. and Carlis, E. T. (2005) Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae*, *J. Stored Prod. Res.* **41**, in press.
- Kim, H. W., Kim, Y. H., Fu, C. X., Nam, K. S., Lee, S. J., An, H. S., Jung, E. H., Yun, S. U., Sung, S. K., Lee, S. J., Hyun, J. W. (2001) *In vitro* Antitumor of ergosterol Peroxide Isolated from *Cordyceps militaris* on Cancer Cell Lines from Korean Patients, *Kor. J. Myceology* **29**, 61-66.