

## 동충하초의 Diketopiperazine 성분

김선범 · 황방연 · 이미경\*

충북대학교 약학대학

### Diketopiperazines from *Cordyceps militaris*

Seon Beom Kim, Bang Yeon Hwang, and Mi Kyeong Lee\*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract** – In a continuation of investigation on *Cordyceps militaris*, thirteen compounds were isolated from the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and *n*-BuOH-soluble fraction of *C. militaris*. They were identified as twelve diketopiperazines such as cyclo(L-Gly-L-Pro) (**1**), cyclo(L-Ala-L-Pro) (**2**), cyclo(L-Ser-L-Pro) (**3**), cyclo(L-Val-L-Pro) (**4**), cyclo(L-Thr-L-Pro) (**5**), cyclo(L-Pro-L-Pro) (**6**), cyclo(L-Thr-L-Leu) (**7**), cyclo(L-Tyr-L-Ala) (**8**), cyclo(L-Phe-L-Ser) (**9**), cyclo(L-Phe-L-Pro) (**10**), cyclo(L-Tyr-L-Pro) (**11**) and brevianamide F (**13**), and an amino acid, tryptophan (**12**). Their structures were identified on the basis of chemical evidences and spectroscopic analysis including 1D-NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), 2D-NMR (HSQC, HMBC) and MS spectral data. Among the isolated compounds, compounds **1**, **2**, **6-11** are first reported from *C. militaris*.

**Key words** – *Cordyceps militaris*, Diketopiperazine

동충하초(*Cordyceps*)는 맥각균과(Hypocreaceae)에 속하는 동충하초균(*Cordyceps sinensis*)이 박쥐나방과(Hepialidae)의 *Hepialus armoricanus*의 유충에서 기생하여 자란 자실체와 유충의 몸체를 일컫는다. 동충하초 이름의 유래는 계절에 따라 겨울에는 벌레이고 여름에는 풀로 자란다는 의미에서 비롯되었으며, 동충하초 균은 죽은 애벌레와 몇몇 곤충의 유충에서 기생하여 자란다. 모양은 곤봉형 또는 여러 가지 모양의 자좌(stroma)를 형성하는 버섯으로, 자좌의 길이는 3~10 cm 정도로 원통형 또는 긴 곤봉형이다. 분지는 1개 또는 여러개이고, 1~6 cm의 크기에 원통형이며 등황색을 나타내고 기부로 갈수록 엷어진다. 자실층은 자실체 상부에 있으며, 하부의 대와 경계가 불분명하다. 포자는 주로 원주상 방추형이다.<sup>1)</sup>

*Cordyceps* 속에는 *C. sinensis* 외에도 *C. militaris*, *C. pruinosa* 및 *C. ophioglossoides* 등을 포함하여 700여 종이 보고되어 있으며, 우리나라에서는 *C. militaris*가 주로 사용되고 있다. 동충하초는 중국에서는 녹용, 인삼과 함께 주요한 자양강장 소재로 취급되어 ‘천연의약품 대사전’, ‘증류본초’, ‘동의보감’, ‘본초강목’ 등 다양한 문헌에 기록되어 있

으며 원기를 보충하고 피로, 식은땀, 성욕감소, 고혈당증, 고지혈증, 무력증, 호흡기 질병, 신장 기능 장애, 신부전, 부정맥, 심장질환, 간질병 등에 사용되어졌다.<sup>2,3)</sup> 성분 연구로는 nucleosides와 다당류가 주성분 계열로 보고되어 있으며 항암, 항염, 노화방지, 항산화 등의 효능이 보고되어 있다.<sup>4-8)</sup>

이러한 동충하초는 주로 제한된 서식지로 인하여 수요에 비하여 공급이 턱없이 부족한 실정이며 이에 동충하초를 확보하려는 다양한 연구가 진행되고 있다. 최근에는 배양과정을 통해서 동충하초를 확보하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며 이를 통하여 동충하초의 확보 및 새로운 동충하초의 개발 등의 성과가 보고되었다.<sup>9,10)</sup>

본 연구자들도 동충하초를 확보하고자 현미배지, 번데기 배지 등 다양한 배양환경에서 동충하초를 배양하여 이들의 효능 및 성분을 규명하려는 연구를 진행하였으며 새로운 nucleotide 성분 및 항비만 활성에 대하여 규명하였다.<sup>11-13)</sup>

본 연구에서는 동충하초의 성분에 대한 연구를 추가적으로 진행하여 배양 동충하초 자실체로부터 추가적인 성분을 규명하였다. 본 논문에서는 동충하초의 diketopiperazine 성분에 대하여 분리 과정 및 그 구조 규명에 대한 연구 결과를 보고하고자 한다.

\*교신저자(E-mail): mkleee@chungbuk.ac.kr  
(Tel): +82-43-261-2818

## 재료 및 방법

**실험재료** - 실험에 사용한 동충하초(*C. militaris*)의 시료는 2009년 10월 농촌진흥청으로부터 제공받았고, 생산방법은 이전에 보고된 논문에 따라 진행하였다.<sup>14-16</sup> 시료의 표본은 충북대학교 약학대학 약초원 표본실에 보관되어 있다(CBNU200811-CM).

**시약 및 기기** - NMR 스펙트럼은 Bruker DRX 500 MHz NMR spectrometer를 이용하여 측정하였다. Semipreparative HPLC는 Waters HPLC system(Waters 600 Q-pumps, a 996 photodiode array detector, and Waters Empower software)을 이용하여 Gemini-NX ODS-column(5  $\mu$ m, 10  $\times$  150 mm)을 사용하여 물질 분리를 시도하였다. MPLC는 Biotage의 Isolera one system을 이용하여 수행하였다.

**성분 분리** - 건조된 가루형태의 동충하초 자실체 1.5 kg을 실온에서 50% EtOH로 2회 추출하였다. 추출액을 여과한 후에 여액을 회전 감압 농축기로 농축하여 50% EtOH 추출물(183.7 g)을 얻었으며, 이를 물에 현탁시켜  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, *n*-BuOH로 순서대로 분획하여  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (18.9 g), EtOAc(4.9 g), *n*-BuOH(69.7 g) 분획물을 얻었다.

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  분획물을 MPLC silica gel(10 $\times$ 25 cm, *n*-hexane  $\rightarrow$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $\rightarrow$  MeOH gradient)를 시행하여 총 22개의 분획(M1-M22)으로 나누었다. 분획 M16을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH(1:1)을 이동상으로 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 수행하여, 총 4개의 소분획(M16A-M16D)을 얻었다. 이 중 소분획 M16D를 semi-preparative HPLC(MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 30 : 70)를 수행하여 화합물 **4**(2.7 mg), **6**(1.4 mg) 및 **10**(1.2 mg)를 얻었다. 화합물 **13**(1.4 mg)은 분획 M18을 semi-preparative HPLC(MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 12 : 88)를 수행하여 정제하였다.

*n*-BuOH 분획물을 HP-20 컬럼크로마토그래피( $\text{H}_2\text{O}$   $\rightarrow$  MeOH 20% gradient)를 수행하여 6개의 분획(B1-B6)을 얻었다. B2 분획을 MPLC silica gel 컬럼크로마토그래피( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $\rightarrow$  MeOH gradient)를 이용하여 총 10개의 분획(B2A-B2J)으로 나누었다. 소분획 B2A를 semi-preparative HPLC(MeCN :  $\text{H}_2\text{O}$  = 20 : 80)를 사용하여 화합물 **5**(6.6 mg)와 화합물 **12**(8.0 mg)를 분리하였다. 소분획 B2B에 대하여 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피 및 semi-preparative HPLC(MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 10 : 90)를 이용하여 화합물 **1**(6.4 mg) 및 **3**(1.1 mg)을 얻었으며 화합물 **7**은 B2C분획을 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피(MeOH)을 수행한 후 재결정(MeOH)을 이용하여 정제하였다. B3분획을 MPLC silica gel( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $\rightarrow$  MeOH gradient)을 이용하여 총 12개의 분획(B3A-B3L)으로 나누었다. 이들 분획 중 B3A 분획으로부터 semi-preparative HPLC(MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 20 : 80)를 수행하여 화합물 **2**(4.8 mg)를 분리하였고, 화합물 **8**(3.7 mg) 및 **9**(0.8 mg)는 B3D 분획을 semi-preparative HPLC(MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  =

30 : 70)를 수행하여 정제하였다. 화합물 **11**(1.7 mg)은 B3A 분획을 semi-preparative HPLC(MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  = 25 : 75)를 수행하여 정제하였다.

**Compound 13:**  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$ 7.59 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-5'), 7.12 (1H, s, H-3'), 7.11 (1H, dt,  $J$  = 1.0, 7.0 Hz, H-6'), 7.03 (1H, dt,  $J$  = 1.0, 7.0 Hz, H-7'), 7.35 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-8'), 4.43 (1H, m, H-2), 4.02 (1H, dt,  $J$  = 1.5, 6.5 Hz, H-4), 3.49 (1H, m, H-7a), 3.31 (2H, m, H-1'), 3.28 (1H, m, H-7b), 2.00 (1H, m, H-5a), 1.70 (1H, m, H-6), 1.51 (1H, m, H-5b);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$ 169.3 (C-3), 166.0 (C-1), 136.5 (C-9'), 127.2 (C-4'), 124.1 (C-3'), 121.1 (C-7'), 118.4 (C-6'), 118.3 (C-5'), 110.8 (C-8'), 108.1 (C-2'), 58.6 (C-4), 55.8 (C-2), 44.5 (C-7), 27.7 (C-1'), 27.7 (C-5), 21.1 (C-6) ppm.

## 결과 및 고찰

동충하초의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  분획 및 *n*-BuOH 분획에 대하여 silica gel, Sephadex LH-20 및 semi-preparative 컬럼크로마토그래피 등을 이용하여 성분 분리를 시도하여 총 13종의 화합물을 분리하였다. 분리한 화합물은 NMR, MS 등의 분광학적 분석법을 통하여 그 구조를 규명하였다(Fig. 1).

화합물 **1**은 무색의 액상 형태로 분리, 정제되었으며, ESI-MS spectrum( $m/z$  155 [M+H] $^+$ )을 통해 분자식  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ 으로 추정하였다.  $^1\text{H-NMR}$  및 HSQC spectrum을 통하여 4개의 methylene 수소와 1개의 methine 수소를 확인하였으며  $^{13}\text{C NMR}$  spectrum에서  $\delta_c$  45.6(C-2), 27.9(C-5), 21.9(C-6) 및 44.9(C-7)에서 4개의 methylene 탄소와  $\delta_c$  58.4(C-4)에서 1개의 methine 탄소를 관찰할 수 있었다. 또한  $^{13}\text{C NMR}$  spectrum에서  $\delta_c$  165.0 및  $\delta_c$  170.1 피크로부터 2개의 carbonyl기에 존재를 예측하였다. HMBC spectrum에서 H-2( $\delta_H$  4.13, 3.76)/C-1( $\delta_C$  165.0)의 correlation을, H-4( $\delta_H$  4.25)/C-5( $\delta_C$  27.9), C-3( $\delta_C$  170.6)의 correlation을, H-5( $\delta_H$  2.32)/C-6( $\delta_C$  21.8), C-7( $\delta_C$  44.9)의 correlation을 관찰할 수 있었다. 이상의 분석 결과를 통하여 화합물 **1**은 L-glycine과 L-proline의 cyclization을 통하여 합성된 화합물로 추측하였고 문헌<sup>17)</sup>과 비교하여 화합물 **1**의 구조를 cyclo(L-Gly-L-Pro)으로 동정하였다.

화합물 **2**는 ESI-MS spectrum( $m/z$  169[M+H] $^+$ )을 통해 분자식을  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ 으로 추정하였다. 화합물 **2**의 NMR spectrum은 화합물 **1**과 유사하였으며,  $\delta_H$  4.21(H-2)와 correlation을 나타내는  $\delta_H$  1.40(3H, d,  $J$  = 6.5 Hz)의 추가적인 methyl기가 관찰되었다. 이상의 결과로 화합물 **2**는 L-alanine과 L-proline의 cyclization을 통하여 합성된 화합물임을 추측하였고 문헌<sup>17)</sup>과 비교하여 화합물 **2**의 구조는 cyclo(L-Ala-L-Pro)으로 동정하였다.

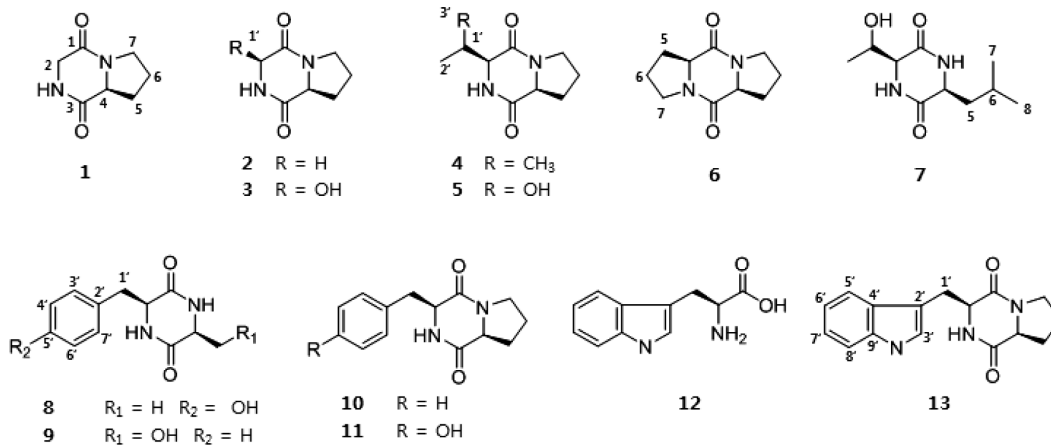


Fig. 1. Structures of compounds 1-13 isolated from *C. militaris*.

화합물 3은 ESI-MS spectrum( $m/z$  185  $[M+H]^+$ )을 통해 분자식  $C_8H_{12}N_2O_3$ 을 추정하였다. 화합물 3의  $^1H$ -NMR spectrum은 화합물 2와 매우 유사하였으나, 화합물 2에서 관찰되던 methyl기 대신 hydroxymethyl기에 해당하는  $\delta_H$  3.92 (2H, dd,  $J = 4.8, 1.6$  Hz) 피크의 존재를 확인하였다. 따라서 화합물 3은 화합물 2의 methyl기가 hydroxymethylene으로 치환된 구조로 예상하였으며 문헌<sup>17)</sup>과 비교하여 cyclo(L-Ser-L-Pro)로 동정하였다.

화합물 4는 ESI-MS spectrum( $m/z$  197  $[M+H]^+$ )을 통해  $C_{10}H_{16}N_2O_2$ 의 분자식을 추정하였으며  $^1H$  및  $^{13}C$  NMR spectrum은 화합물 2와 유사하였다. 다만 화합물 4의  $^{13}C$  NMR spectrum에서 2개의 탄소가 추가된 9개의 피크가 관찰되었으며  $^1H$  NMR spectrum에서  $\delta_H$  0.96(3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-2'), 1.12(3H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-3') 및 2.35(1H, m, H-1')의 피크로부터  $(CH_2)_2CH$ -기의 존재를 추정할 수 있었다. 이상의 결과를 문헌<sup>17)</sup>과 비교하여 화합물 4는 L-valine과 L-proline이 cyclization을 통하여 합성된 cyclo(L-Val-L-Pro)로 동정하였다.

화합물 5는 ESI-MS spectrum( $m/z$  199  $[M+H]^+$ )을 통해 분자식을  $C_9H_{14}N_2O_3$ 으로 추정하였다.  $^1H$ -NMR spectrum은 화합물 4와 매우 유사 하였으나,  $\delta_H$  1.35(3H, d,  $J = 6.4$  Hz)의 1개의 methyl기만이 관찰되었고 화합물 4의  $\delta_H$  2.35(1H, m, H-1')의 피크가  $\delta_H$  4.31(1H, m)로 downfield 된 것을 관찰할 수 있었다. 이를 바탕으로 L-threonine과 L-proline이 cyclization을 통하여 형성된 화합물임을 예측할 수 있었고, 이를 문헌<sup>17)</sup>과 비교하여 cyclo(L-Thr-L-Pro)로 동정하였다.

화합물 6은 무색의 액상 형태로 분리, 정제되었으며, ESI-MS spectrum( $m/z$  195  $[M+H]^+$ )을 통해 분자식  $C_{10}H_{14}N_2O_2$ 을 추정하였다.  $^1H$ -NMR spectrum은 화합물 2와 매우 유사 하였으나, methyl기가 관찰되지 않았으며 -proline에 해당하는 피크만 존재하였다. 따라서 두 개의 -proline가 결합된 cyclo(-Pro--Pro)으로 예상하였으며, ESI-MS 값과 문헌<sup>17)</sup>을

통해 동정하였다.

화합물 7은 ESI-MS spectrum( $m/z$  215  $[M+H]^+$ )을 통해 분자식  $C_{10}H_{18}N_2O_3$ 으로 추정하였다. 화합물 7의  $^1H$ -NMR spectrum은 화합물 5와 유사하였으나,  $\delta_H$  0.96(3H, d,  $J = 6.4$  Hz), 0.98(3H, d,  $J = 6.8$  Hz) 피크로부터 2개의 추가적인 methyl기의 존재를 확인하였으며  $\delta_H$  1.75(1H, m) 및 1.88 (2H, m)의 피크로부터 L-lucine과 L-threonine이 cyclization된 화합물로 추측하였다. 이를 문헌<sup>17)</sup>과 비교하여 화합물 7은 cyclo(-Thr--Leu)으로 동정하였다.

화합물 8은 흰색 무정형 분말 형태로 분리, 정제되었으며, ESI-MS spectrum( $m/z$  233  $[M-H]^-$ )을 통해 분자식  $C_{12}H_{14}N_2O_3$ 으로 추정하였다.  $^1H$ -NMR spectrum에서  $\delta_H$  6.73(2H, d,  $J = 8.4$  Hz) 및 7.03(2H, d,  $J = 8.4$  Hz)의 피크로부터 1,4-disubstituted aromatic의 존재를 추측하였으며  $\delta_H$  2.87(1H, dd,  $J = 14.0, 4.8$  Hz) 및 3.20(1H, dd,  $J = 14.0, 4.8$  Hz)의 methylene기의 존재로 화합물 8은 L-tyrosine의 구조를 포함하는 것을 예측할 수 있었다. 또한  $\delta_H$  0.62(3H, d,  $J = 7.2$  Hz) 및  $\delta_C$  19.0(C-5)의 methyl기와  $^{13}C$ -NMR spectrum의  $\delta_C$  169.2 및 197.3의 두 개의 carbonyl 피크로부터 -alanine의 존재를 예측하였고, 문헌<sup>17)</sup>과 비교하여 화합물 8을 cyclo(L-Tyr-L-Ala)로 동정하였다.

화합물 9의 ESI-MS spectrum( $m/z$  233  $[M-H]^-$ )은 화합물 8과 동일한 분자식  $C_{12}H_{14}N_2O_3$ 을 나타내었다. 화합물 9는 NMR 스펙트럼 역시 화합물 8과 유사하였으나,  $\delta_H$  7.25-7.30 사이의 5개의 피크로부터 monosubstitued aromatic의 존재를 추정할 수 있었다. 또한  $\delta_H$  2.89(1H, dd,  $J = 6.0, 6.0$  Hz) 및 3.45(1H, dd,  $J = 10.8, 3.2$  Hz)의 피크로부터 화합물 8의 methyl기가 methylene으로 치환된 것을 확인하였으며 이로부터 화합물 9는 L-phenylalanine과 L-serine이 서로 cyclization되어있는 것으로 예측하였고, 문헌<sup>17)</sup>과의 비교를 통해 cyclo(L-Phe-L-Ser)로 동정하였다.

화합물 10은 흰색 무정형 분말 형태로 분리, 정제되었으

**Table I.** <sup>1</sup>H-NMR spectral data of compounds **1** - **7** ( $\delta$  in ppm, *J* in Hz)

No.	Compounds (Chemical Shifts)						
	<b>1</b> <sup>a</sup>	<b>2</b> <sup>b</sup>	<b>3</b> <sup>a</sup>	<b>4</b> <sup>b</sup>	<b>5</b> <sup>a</sup>	<b>6</b> <sup>a</sup>	<b>7</b> <sup>a</sup>
<b>2</b>	4.13 (1H, dd, 16.8, 0.4)	4.21 (1H, q, 5.6)	4.18 (1H, m)	4.06 (1H, t, 2.5)	4.05 (1H, d, 1.6)	4.36 (1H, t, 8.0)	3.74 (1H, dd, 2.4, 0.8)
	3.76 (1H, d, 16.8)						
<b>4</b>	4.25 (1H, t, 7.2)	4.28 (1H, t, 5.6)	4.26 (1H, m)	4.23 (1H, m)	4.24 (1H, t, 7.2)	4.36 (1H, t, 8.0)	3.90 (1H, dd, 9.6, 4.4)
<b>5</b>	2.32 (1H, m)	2.32 (1H, m)	2.34 (1H, m)	2.34 (1H, dp, 7.0, 2.5)	2.33 (1H, m)	2.32 (1H, m)	1.88 (2H, m)
	2.04 (1H, m)	2.03 (1H, m)	2.05 (1H, m)	2.04 (1H, m)	2.03 (1H, m)	2.01 (1H, m)	1.88 (2H, m)
<b>6</b>	1.96 (2H, m)	1.98 (2H, m)	1.98 (2H, m)	1.96 (2H, m)	1.97 (2H, m)	2.09 (2H, m)	1.75 (1H, m)
<b>7</b>	3.55 (2H, m)	3.54 (2H, m)	3.62 (1H, m)	3.59 (1H, m)	3.64 (1H, m)	3.51 (2H, m)	0.98 (3H, d, 6.4)
			3.52 (1H, m)		3.50 (1H, m)		
<b>8</b>	-	-	-	-	-	-	0.96 (3H, d, 6.8)
<b>1'</b>	-	1.40 (3H, d, 6.5)	3.92 (2H, dd, 4.8, 1.6)	2.35 (1H, m)	4.31 (1H, m)		4.19 (1H, dq, 6.4, 2.4)
<b>2'</b>	-	-	-	1.12 (3H, d, 7.5)	1.35 (3H, d, 6.4)		1.25 (3H, d, 6.4)
<b>3'</b>	-	-	-	0.96 (3H, d, 7.0)	-		-

<sup>a</sup>Recorded at 400 MHz in CD<sub>3</sub>OD<sup>b</sup>Recorded at 500 MHz in CD<sub>3</sub>OD

**Table II.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data of compounds 1-7 ( $\delta$  in ppm)

Carbon No	Chemical Shift(ppm)						
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
1	165.0	167.6	165.0	166.1	165.5	167.2	168.0
2	45.5	50.7	56.8	58.6	58.7	60.3	60.8
3	170.5	171.2	170.4	171.1	170.5	167.2	170.4
4	58.4	59.0	58.8	60.1	59.8	60.3	53.2
5	27.9	27.7	28.1	28.1	28.1	27.3	45.0
6	21.8	22.3	21.8	21.8	21.8	22.7	23.6
7	44.9	45.0	44.7	44.7	18.8	44.7	22.2
8	-	-	-	-	-	-	20.2
1'	-	14.3	60.3	28.4	65.4	-	67.3
2'	-	-	-	17.4	18.8	-	18.5
3'	-	-	-	15.2	-	-	-
4'	-	-	-	-	-	-	-
5'	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Recorded at 100 MHz in CD<sub>3</sub>OD<sup>b</sup>Recorded at 125 MHz in CD<sub>3</sub>OD

며, ESI-MS spectrum( $m/z$  245 [M+H]<sup>+</sup>)을 통해 분자식 C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>으로 추정하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum의 화합물 1와 유사하였으나  $\delta_{\text{H}}$  7.23-7.29에서 추가적인 5개의 aromatic 수소와  $\delta_{\text{H}}$  3.19(2H, dd,  $J = 5.0, 2.0$  Hz)에서 methylene기를 존재를 통하여 L-phenylalanine의 구조를 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 문헌<sup>17)</sup>과 비교하여 화합물 10의 구조를 cyclo(L-Phe-L-Pro)으로 동정하였다.

화합물 11은 ESI-MS spectrum( $m/z$  259 [M-H]<sup>-</sup>)을 통해 분자식 C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>으로 화합물 10에 산소가 하나 추가된 구조임을 추정할 수 있었다. 화합물 11의 NMR spectrum은 화합물 10과 매우 유사하였으나  $\delta_{\text{H}}$  7.03(2H, d,  $J = 8.4$  Hz) 및 6.73(2H, d,  $J = 8.4$  Hz)의 피크를 통하여 monosubstituted aromatic ring이 1,4-substituted aromatic ring로 치환된 것으로 추정하였다. 이상의 결과를 문헌<sup>17)</sup>과의 비교를 통해 화합물 11은 cyclo(L-Tyr-L-Pro)로 동정하였다.

화합물 12는 갈색 분말 형태로 분리, 정제되었으며, ESI-MS spectrum( $m/z$  205 [M+H]<sup>+</sup>)을 통해 분자식 C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>으로 추정하였다. <sup>1</sup>H NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  7.06(1H, dt,  $J = 8.0, 0.8$  Hz), 7.14(1H, dt,  $J = 8.0, 0.8$  Hz), 7.38(1H, d,  $J = 8.0$  Hz) 및 7.71(1H, d,  $J = 7.6$  Hz) 피크를 통하여 1,2-disubstituted aromatic ring의 존재를,  $\delta_{\text{H}}$  3.16(1H, dd,  $J = 15.2, 9.6$  Hz), 3.52(1H, dd,  $J = 15.2, 4.4$  Hz)와  $\delta_{\text{C}}$  27.0 (C-10)로부터 methylene기를 확인하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  173.4(C-11)로부터 carbonyl기를 확인하였으며, 이상의 결과를 문헌<sup>12)</sup>과 비교하여 화합물 12는 tryptophan으로 동정하였다. 화합물 13은 분말 형태로 분리, 정제되었으며, ESI-MS spectrum ( $m/z$  282[M-H]<sup>-</sup>)을 통해 C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 분자식을 추정하였

다. 화합물 13의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 화합물 12의 저자장 영역의 aromatic 수소가 서로 유사하여 tryptophan의 존재를 추정하였으며 <sup>13</sup>C-NMR에서 화합물 1의 -proline에 해당하는 21.1(C-4'), 27.7(C-3') 및 44.5(C-5')의 피크를 통하여 L-proline의 존재를 추정하였다. 그리고  $\delta_{\text{C}}$  166.0(C-11), 169.3 (C-1')에서 carbonyl 피크를 확인하여, tryptophan과 L-proline이 cyclization된 구조임을 예측하였고, 문헌<sup>18)</sup>과 비교하여 brevianamide F로 동정하였다.

이상의 결과로 동충하초의 자실체로부터 총 13개의 화합물을 분리하여 그 구조를 동정하였다. 본 연구결과 분리 보고되는 diketopiperazine 계열의 경우 cyclic dipeptide 유도체로 아미노산의 축합으로 생성된다.<sup>19)</sup> 동충하초의 경우 근층의 유충에서 나타나며 이로 인하여 핵산을 포함하여 다양한 종류의 아미노산이 분리 보고되었다.<sup>12)</sup> 본 연구를 통하여 분리된 diketopiperazine 계열의 화합물 중 화합물 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10 및 11의 8종의 화합물은 동충하초에서 처음 분리 보고되는 화합물이며 이들은 동충하초에 다량 포함되어 있는 아미노산의 cyclization으로 합성되었음을 추정할 수 있다.

Diketopiperazine 계열의 물질은 식물에서는 코코아, 밀 등에서 분리 보고되었으며 곰팡이나 박테리아에서도 다수 분리 보고되었다.<sup>17,20-22)</sup> 또한 diketopiperazine 계열의 물질은 항암, 항균, 신경보호 등 다양한 활성을 나타내어 이들의 유도체를 합성하려는 연구도 활발히 진행되고 있다.<sup>19,23)</sup> 동충하초의 경우 항암, 노화방지 등의 다양한 활성이 보고되어 있으며, 따라서 본 연구를 통하여 분리된 diketopiperazine 물질의 활성에 대한 추가적인 연구를 통하여 동충하초의 효능 규명에 기여할 것으로 기대된다.

**Table III.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data of compounds **8-11** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz)

No.	Chemical Shift							
	<b>8</b>		<b>9</b>		<b>10</b>		<b>11</b>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
<b>1</b>	-	169.2	-	168.1	-	165.5	-	165.5
<b>2</b>	4.24 (1H, dt, 4.8, 0.8)	56.1	4.23 (1H, dt, 4.4, 1.2)	56.2	4.46 (1H, dt, 2.0, 1.0)	56.2	4.38 (1H, t, 4.0)	56.5
<b>3</b>	-	167.3	-	166.8	-	169.5	-	169.3
<b>4</b>	3.78 (1H, dq, 7.2, 1.6)	50.3	3.85 (1H, dq, 2.4, 0.8)	57.3	4.08 (1H, dq, 4.5, 2.0)	58.6	4.07 (1H, dd, 6.5, 4.5)	58.6
<b>5</b>	0.62 (3H, d, 7.2)	19.0	3.45 (1H, dd, 10.8, 3.2)	63.3	2.12 (1H, m)	27.9	2.11 (1H, m)	27.9
			2.89 (1H, dd, 6.0, 6.0)		1.24 (1H, m)		21.3	
<b>6</b>					1.82 (2H, m)	21.3	1.82 (2H, m)	21.3
<b>7</b>					3.56 (1H, m)	44.5	3.56 (1H, m)	44.5
					3.39 (1H, m)		36.8	
<b>8</b>								
<b>1'</b>	3.20 (1H, dd, 13.6, 3.6)	38.1	3.25 (1H, dd, 2.8, 2.8)	40.2	3.19 (2H, dd, 5.0, 2.0)	36.8	3.08 (2H, dq, 15.5, 5.0)	36.2
	2.87 (1H, dd, 14.0, 4.8)		3.13 (1H, dd, 11.2, 2.0)					
<b>2'</b>		125.6		135.8		135.9		126.2
<b>3', 7'</b>	7.03 (2H, d, 8.4)	131.3	7.25 (2H, m)	129.8	7.23 (2H, m)	129.6	7.06 (2H, d, 8.5)	130.7
<b>4', 6'</b>	6.73 (2H, d, 8.4)	114.8	7.30 (2H, m)	128.2	7.29 (2H, m)	128.0	6.72 (2H, d, 8.5)	114.7
<b>5'</b>		156.5	7.28 (1H, m)	126.8	7.26 (1H, m)	126.6		156.2

 $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR were recorded at 500 MHz and 125 MHz, respectively.

## 결 론

본 연구에서는 배양 동충하초의 자실체로부터 성분분리를 수행하여 13종의 화합물을 분리 정제하였으며, 분리한 화합물의 구조는 다양한 분광학적 방법을 이용하여 12종의 diketopiperazines, cyclo(L-Gly-L-Pro) (1), cyclo(L-Ala-L-Pro) (2), cyclo(L-Ser-L-Pro) (3), cyclo(L-Val-L-Pro) (4), cyclo(L-Thr-L-Pro) (5), cyclo(L-Pro-L-Pro) (6), cyclo(L-Thr-L-Leu) (7), cyclo(L-Tyr-L-Ala) (8), cyclo(L-Phe-L-Ser) (9), cyclo(L-Phe-L-Pro) (10), cyclo(L-Tyr-L-Pro) (11) 및 brevianamide F(13)와 1종의 아미노산, tryptophan (12)으로 동정하였다. 분리한 화합물 중 화합물 1, 2 및 6-11는 이 식물에서 처음으로 분리 보고되는 화합물이다.

## 사 사

본 연구는 2013년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Li, S. P., Yang, F. Q. and Tsim, W. K. (2006) Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **41**: 1571-1584.
- Zhu, J. S., Halpern, G. M., Johns, K. and Alt, J. (1998) The Scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part I. *J. Alt. Comp. Med.* **4**: 289-303.
- Zhu, J. S., Halpern, G. M., Johns, K. and Alt, J. (1998) The Scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part I. *J. Alt. Comp. Med.* **4**: 429-457.
- Wu, J., Zhang, Q. and Leung, P. (2007) Inhibitory effects of ethyl acetate extracts of *Cordyceps sinensis* mycelium on various cancer cells in culture and B16 melanoma in C57BL/6 mice. *Phytomedicine* **1**: 43-49.
- Khan, M. A., Tania, M., Khang, D. Z. and Chen, H. C. (2010) *Cordyceps* mushroom: A potent anticancer nutraceutical. *Open Nutraceuticals J.* **3**: 179-183
- Kim, H. S., Kim, J. Y., Kang, J. S., Kim, H. M., Kim, Y. O., Hong, I. P., Lee, M. K., Hong, J. T., Kim, Y. and Han, S. B. (2010) Cordlan polysaccharide isolated from mushroom *Cordyceps militaris* induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4 signalings. *Food Chem. Toxicol.* **48**: 1926-1933.
- Yang, M. L., Kuo, P. C., Hwang, T. L. and Wu, T. S. (2011) Anti-inflammatory principles from *Cordyceps sinensis*. *J. Nat. Prod.* **74**: 1996-2000.
- Chen, X. C., Wang, S., Nie, S. and Marcone, M. (2013) Properties of *Cordyceps sinensis*: A review. *J. Funct. Foods.* **5**: 550-569.
- Hamburger, M. (2007) Comment on comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 7213-7214
- Dong, C. H. and Yao, Y. J. (2005) Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 483-492.
- Liu, Q., Hong, I. P., Ahn, M. J., Yoo, H. S., Han, S. B., Hwang, B. Y. and Lee, M.K. (2011) Anti-adipogenic activity of *Cordyceps militaris* in 3T3-L1 cells. *Nat. Prod. Commun.* **12**: 1839-1841.
- Liu, Q., Hong, I.P., Han, S. B., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. (2012) Analysis of anti-adipogenic constituents of *Cordyceps militaris* using high performance liquid chromatography-diode array detection in different samples: Comparison with anti-adipogenic activity. *Nat. Prod. Sci.* **18**: 171-176.
- Kim, S. B., Ahn, B., Kim, M., Ji, H. J., Shin, S. K., Hong, I. P., Kim, C. Y., Hwang, B. Y. and Lee, M. K. (2013) Effect of *Cordyceps militaris* extract and active constituent on metabolic parameters of obesity induced by high-fat diet in C58BL/6J mice. *J. Ethnopharmacol.* (in press, DOI: 10.1016/j.jep.2013.10.064)
- Hong, I. P., Kang, P. D., Kim, K. Y., Nam, S. H., Lee, M. Y., Choi, Y. S., Kim, N. S., Kim, H. K., Lee, K. G. and Humber, R. A. (2010) Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. *Mycobiology* **38**: 128-132.
- Choi, I. Y., Choi, J. S., Lee, W. H., Yu, Y. J., Joung, G. T., Ju, I. O. and Choi, Y. K. (1999) The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* **27**: 243-248.
- Sung, J. M., Choi, I. S., Shrestha, B. and Park, Y. J. (2002) Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* **30**: 6-10.
- Stark, T. and Hofmann, T. (2005) Structure, sensory activity and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) *J. Agric. Food Chem.* **53**: 7222-7231.
- Carolina, T. G., Mireia, D., Daniel, B., Immaculada, F., Irene, F., Xavier, A., Jaume, F., Paul, L. W., Miriam, R. and Ernesto, N. (2012) Side chain anchoring of tryptophan to solid supports using a dihydropyranyl handle: synthesis of brevianamide F. *J. Pept Res Ther.* **18**: 7-19
- Borthwick, A. D. (2012) 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chem. Rev.* **112**: 3641-3716.
- Wang, Y., Li, Z. L., Bai, J., Wu, X., Pei, Y. H., Jing, Y. K. and Hua, H. M. (2012) 2,5-diketopiperazines from the marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus* YK-7. *Chem. Biodivers.* **9**: 385-393.
- Ryan, L. A., Dal Bello, F., Arendt, E. K. and Koehler, P. (2009) Detection and quantitation of 2,5-diketopiperazines in

- wheat sourdough and bread. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 9563-9568.
22. Kumar, N., Mohandas, C., Nambisan, B., Kumar, D. R. and Lankalapalli, R. S. (2013) Isolation of proline-based cyclic peptides from *Bacillus sp.* N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 355-364.
23. Campo, V. L., Martins, M. B., da Silva, C. H. T. P. and Carvalho, I. (2009) Novel and facile solution-phase synthesis of 2,5-diketopiperazines and *O*-glycosylated analogs. *Tetrahedron.* **65**: 5343-5349
- (2013. 11. 15 접수; 2013. 12. 12 심사; 2013. 12. 13 게재확정)