

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)으로 부터 분리한 이차대사산물 및 이들의 항염증 활성

김혜지^{1,2} · 구만형^{1,2} · 이준혁^{1,3} · 서승석⁴ · 윤의중^{3,5*}

¹극지연구소 극지유전체 사업단, ²인천대학교 생명과학과, ³한국과학기술연합 대학원 대학교, ⁴목포대학교 생명과학과, ⁵극지 연구소 극지 생명과학연구부

Secondary Metabolites Isolated from *Ganoderma lucidum* and Their Anti-inflammatory Activity

Hye Ji Kim^{1,2}, Man Hyung Koo^{1,2}, Jun Hyuck Lee^{1,3}, Sung-Suk Suh⁴, and Ui Joung Youn^{3,5*}

¹Unit of Polar Genomics, Korea Polar Research Institute, KIOST, Incheon 21990, Korea

²Incheon National University, Biology, Incheon 22012, Korea

³Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 21990, Korea

⁴Department of Life Sciences, Mokpo National University, Jeonnam 58554, Korea

⁵Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, KIOST, Incheon 21990, Korea

Abstract – Phytochemical study of *Ganoderma lucidum* (Polyporaceae) led to the isolation of five lanostane triterpenoid (1-5), along with two nitrogen derived phenolic compounds, N-phenylethylformamide (6) and N-acetylphenethylamine (7). The structures of the compounds were determined by 1D and 2D NMR, and MS experiments, as well as by comparison of their data with published values. Compounds 6 and 7 were isolated for the first time from the genus *Ganoderma* and this species. All the compounds were evaluated for cancer chemopreventive potential based on their ability to inhibit nitric oxide (NO) production induced by lipopolysaccharide (LPS) in mouse macrophage RAW 264.7 cells in vitro. Among the isolates, compounds 2 and 3 showed moderate inhibitory activity against NO production.

Keywords – *Ganoderma lucidum*, Polyporaceae, Lanostane triterpenoid, Anti-inflammatory

Ganoderma 종은 주로 온대 지역에 분포하고 있으며, 아열대 및 열대 지역에서도 발견된다.^{1,2)} *G. lucidum*(Curitis) P. Karst는 면역 강화, 고혈압, 불면증, 현기증 및 만성 간염 치료 효능이 보고되었다.³⁾ 예로부터 중국, 일본, 대만 및 다른 아시아 지역에서 전통 의약으로 사용하고 있고,^{4,5)} 한국에서는 ‘Yeongji’, 일본에서는 ‘Reishi’, 중국에서는 ‘Lingzhi’로 불리고 있다. 또한, 영지(*G. lucidum*)는 혈장내의 항산화 활성을 증가시키는 것으로 보고되었으며,⁶⁾ 우리나라 한방에서는 장부에 에너지를 보충해주며 몸과 마음을 안정시키고 소화기를 건강하게 해주며, 가래 및 천식 제거와 같은 호흡기 질환, 암의 성장 억제, 혈중 콜레스테롤 함량을 낮추며 혈압을 감소시키는 효과가 보고되었다.⁷⁾ 영지버섯으로부터 ganoderic acid 류, lucidenic acid 류, ergosterol, terpene 류,

polysaccharide 류 등과 같은 다양한 화학성분들이 분리되었으며,^{8,9)} 항암치료와 관련된 연구 및 앞으로 다양한 생리작용들이 밝혀질 것으로 기대된다.

약용으로 사용되고 있는 천연자원들에 대한 이차 대사산물 및 항염증에 관한 연구에서 영지의 에틸아세테이트 (EtOAc) 분획이 LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성을 억제하는 활성을 보였다. 본 연구에서 영지(*G. lucidum*)의 EtOAc 분획물에 대한 이화학적 연구를 통하여 5종의 lanostane triterpenoid들을 분리하였으며, 질소가 치환된 두 개의 벤젠 화합물 유도체들을 영지에서 처음 분리하여 구조를 동정하였다. 특히, 탄소 24 개로 이루어진 nortriterpenoid들은 본 연구에서 처음으로 항염증 활성을 보고한다.

*교신저자(E-mail): ujjoun@kopri.re.kr
(Tel): +82-32-760-5562

재료 및 방법

실험재료 - 연구에 사용된 *G. lucidum*은 2018년 8월 서울 경동시장에서 구입하였으며, 충남대학교 약학대학, 배기환 명예교수님께서 동정하였다. 연구 시료(no. GL001)는 극지연구소 생명과학 연구부에 보존되었다.

시약 및 기기 - 1D 및 2D NMR은 Bruker AVANCE (600 MHz) spectrometer를 사용하였다. Mass spectra는 BioTOF II ESI mass spectrometer를 이용하였다. TLC는 Merck precoated silica gel F254 plates를 사용하였으며, 역상 TLC로는 RP-C18 F254s plates가 이용되었다. UV light를 이용하여 254 nm와 365 nm 파장에서 1차적으로 확인하고 10% sulfuric acid를 이용하여 발색을 확인하였다. Column chromatography에 이용한 충전제는 silica gel 60 (230-400 mesh, Merck, Germany), RP-C18 silica gel (YMC GEL ODS-A, 12 nm, S-75 μ m, Japan)과 Sephadex LH-20(Pharmacia Co. Japan)가 이용되었다. Semi-preparative HPLC는 YL9100 HPLC system(Young Lin, South Korea)을 이용하였고, column으로는 Alltech reversed-phase YMC-PakC-18 column(10 μ m, 20 \times 250 mm, Japan)을 사용하였다.

추출 및 분리 - 건조된 *G. lucidum* 1.5 kg을 상온(25°C)에서 methanol(MeOH)을 3 L를 사용하여 1일, 3회 반복하여 추출하였고, 감압농축기를 사용하여 27.6 g의 추출물을 얻었다. 추출물은 증류수(H₂O, 500 ml)로 현탁시킨 후, 극성에 따라 Hex(hexane), EtOAc(ethylacetate), BuOH(butanol) 순으로 각 0.5 L, 3회씩 차례대로 분획하여 Hex 분획물(4 g), EtOAc(7.4 g), BuOH(1.8 g) 및 H₂O 분획물(8.56 g)을 얻었다. 이들 중 EtOAc 분획물(7.0 g)을 silica gel column chromatograph법으로 CHCl₃:MeOH(39:1-1:1) 이동상 용매 조건으로 분리를 한 결과 17개의 분획물들을 얻었다(ES. 1-ES. 17). 분획물 중 ES. 1을 silica gel column과 이동상으로는 CHCl₃:MeOH(39:1-3:2) 용매를 사용하여 18개의 소분획(ES. 1.1-ES. 1.18)들을 얻었고, 그 중에서 ES. 1.4(675 mg)을 sephadex-LH-20 gel column과 이동상 용매, H₂O:MeOH(60:40-0:100)를 이용하여 11개의 소분획(ES. 1.4.1-ES. 1.4.11)들을 얻었으며, 그 중 분획물 ES. 1.4.1(675 mg)을 semi-preparative HPLC, 이동상 용매(H₂O:MeOH, 70:30-100%MeOH)를 사용하여 화합물 **2**(1 mg), **3**(1 mg), **4**(3 mg), **6**(1 mg)을 분리하였다. 분획물 ES. 9는 CHCl₃:MeOH(39:1-4:1)의 용매조건에서 silica gel column을 사용하여 8개의 소분획물(ES. 9.1-ES. 9.8)들을 얻었고, 소분획물들 중 Fr. 9.6번은 semi-preparative HPLC(H₂O:MeOH-70:30-100%MeOH)사용하여 화합물 **1**(2.5 mg), **5**(1.5 mg), **7**(1.0 mg)을 분리하였다.

Lucidone A (1) : white amorphous powder; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 4.88 (1H, overlapping, H-7), 3.55

(1H, t, J =8.9 Hz, H-17), 3.21 (1H, d, J =16.5 Hz, H-12a), 3.18 (1H, dd, J =13.3, 4.5 Hz, H-3), 2.94 (1H, dd, J =19.8, 9.5 Hz, H-16a), 2.82 (1H, m, H-1b), 2.72 (1H, d, J =16.5 Hz, H-12b), 2.58 (1H, dd, J =19.8, 9.5 Hz, H-16b), 2.22 (3H, s, CH₃-21), 2.21 (1H, m, H-6b), 1.62 (2H, m, H-2), 1.57 (1H, m, H-6a), 1.44 (3H, s, CH₃-24), 1.23 (3H, s, CH₃-19), 1.06 (1H, m, H-1a), 1.05 (3H, s, CH₃-22), 0.97 (1H, dd, J =13.3, 1.4 Hz, H-5), 0.86 (3H, s, CH₃-23), 0.86 (3H, s, CH₃-18); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 216.8 (C-15), 208.4 (C-20), 199.3 (C-11), 158.4 (C-8), 144.2 (C-9), 78.9 (C-3), 67.8 (C-7), 59.9 (C-14), 54.7 (C-17), 50.4 (C-5), 50.0 (C-12), 46.2 (C-13), 40.1 (C-10), 39.8 (C-4), 37.0 (C-16), 36.0 (C-1), 31.4 (C-21), 28.7 (C-22), 28.3 (C-2), 28.1 (C-6), 25.3 (C-24), 19.6 (C-18), 18.8 (C-19), 16.2 (C-23); (+)ESI-MS: m/z 403 [M+H]⁺.

Lucidone B (2) : white amorphous powder; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 4.89 (1H, ddd, J =9.5, 7.7, 4.7 Hz, H-7), 3.33 (1H, t, J =8.9 Hz, H-17), 3.11 (1H, dd, J =20.1, 9.3 Hz, H-16a), 3.04 (1H, d, J =16.8 Hz, H-12a), 2.96 (1H, ddd, J =13.2, 7.5, 5.1 Hz, H-1a), 2.83 (1H, d, J =16.8 Hz, H-12b), 2.56 (1H, m, overlapping, H-2a), 2.55 (1H, m, overlapping, H-16b), 2.49 (1H, m, H-2b), 2.25 (3H, s, H-21), 2.15 (1H, m, H-6a), 1.71 (1H, m, H-6b), 1.6 (1H, br d, J =1.6 Hz, H-5), 1.49 (1H, m, H-1), 1.43 (3H, s, CH₃-24), 1.29 (3H, s, CH₃-19), 1.16 (3H, s, CH₃-23), 1.13 (3H, s, CH₃-22), 0.93 (3H, s, CH₃-18), 4.01 (1H, d, J =4.7 Hz, 7-OH); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 217.9 (C-3), 217.7 (C-15), 206.4 (C-20), 197.8 (C-11), 158.8 (C-8), 142.8 (C-9), 67.7 (C-7), 60.3 (C-14), 55.6 (C-17), 50.4 (C-5), 50.4 (C-12), 48.3 (C-4), 46.1 (C-13), 39.8 (C-10), 37.4 (C-16), 37.1 (C-1), 35.7 (C-2), 32.7 (C-21), 29.1 (C-6), 28.4 (C-23), 22.3 (C-22), 26.4 (C-24), 20.9 (C-18), 19.6 (C-19); (+)ESI-MS: m/z 401 [M+H]⁺.

Lucidone F (3) : white amorphous powder; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 4.82 (1H, dd, J =9.5, 7.4 Hz, H-15), 4.62 (1H, dd, J =10.4, 6.7 Hz, H-7), 3.28 (1H, dd, J =10.6, 6.7 Hz, H-17), 3.11 (1H, d, J =15.6 Hz, H-12a), 2.78 (1H, ddd, J =13.7, 8.0, 5.6 Hz, H-2a), 2.71 (1H, ddd, J =14.1, 9.5, 6.9 Hz, H-16a), 2.60 (1H, ddd, J =15.2, 8.9, 5.6 Hz, H-1a), 2.55 (1H, d, J =15.6 Hz, H-12b), 2.44 (1H, ddd, J =13.7, 8.0, 7.4 Hz, H-2b), 2.14 (3H, s, CH₃-21), 2.08 (1H, ddd, J =12.9, 6.7, 1.8 Hz, H-6a), 1.82 (1H, dd, J =12.9, 1.8 Hz, H-5), 1.68 (1H, m, overlapping, H-6b), 1.69 (1H, m, overlapping, H-16b), 1.58 (1H, m, H-1b), 1.35 (3H, s, CH₃-24), 1.27 (3H, s, CH₃-19), 1.15 (3H, s, CH₃-23), 1.11 (3H, s, CH₃-22), 0.85 (3H, s, CH₃-18); ¹³C-

NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 220.1 (C-3), 210.5 (C-20), 200.8 (C-11), 161.1 (C-8), 141.3 (C-9), 73.3 (C-15), 69.3 (C-7), 57.2 (C-17), 55.5 (C-14), 51.7 (C-12), 49.6 (C-5), 47.9 (C-13), 47.8 (C-4), 39.3 (C-10), 36.7 (C-1), 35.2 (C-2), 31.4 (C-21), 30.7 (C-16), 29.9 (C-6), 27.8 (C-23), 21.1 (C-22), 20.3 (C-24), 19.9 (C-19), 19.4 (C-18); (+)ESI-MS: m/z 403 [M+H]⁺.

Lucidadiol (4) : white amorphous powder; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.40 (1H, t, $J=6.6$ Hz, H-24), 4.01 (2H, s, H-26), 3.28 (1H, br d, $J=12.0$ Hz, H-3), 2.44 (1H, overlapping, H-6b), 2.41 (1H, overlapping, H-6a), 2.28 (1H, overlapping, H-11b), 2.24 (1H, overlapping, H-11a), 2.09 (1H, overlapping, H-23a), 2.06 (2H, m, H-15), 1.95 (1H, m, H-16a), 1.95 (1H, overlapping H-23b), 1.86 (1H, dt, $J=12.6, 3.6$ Hz, H-1b), 1.79 (1H, m, H-2a), 1.75 (1H, m, H-2b), 1.72 (1H, overlapping, H-12a), 1.69 (1H, overlapping, H-12b), 1.67 (3H, s, CH₃-27), 1.63 (1H, dd, $J=13.2, 4.2$ Hz, H-5), 1.43 (1H, m, H-17), 1.41 (1H, overlapping, H-1a), 1.41 (1H, overlapping, H-20), 1.35 (1H, m, H-16b), 1.17 (3H, s, CH₃-19), 1.00 (3H, s, CH₃-29), 0.93 (3H, d, $J=6.0$ Hz, CH₃-21), 0.92 (3H, s, CH₃-30), 0.89 (3H, s, CH₃-28), 0.66 (3H, s, CH₃-18); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 199.0 (C-7), 164.7 (C-9), 138.9 (C-8), 134.3 (C-25), 126.9 (C-24), 77.9 (C-3), 69.0 (C-26), 49.8 (C-5), 48.9 (C-17), 47.7 (C-14), 44.9 (C-13), 39.7 (C-10), 38.9 (C-4), 36.6 (C-6), 36.1 (C-20), 35.9 (C-22), 34.7 (C-1), 31.9 (C-15), 30.1 (C-12), 28.7 (C-16), 27.4 (C-29), 24.9 (C-28), 27.4 (C-2), 24.4 (C-23), 23.6 (C-11), 18.6 (C-21), 18.3 (C-19), 15.7 (C-18), 15.2 (C-30), 13.6 (C-27); (+)ESI-MS: m/z 457 [M+H]⁺.

Methyl lucidenate C (5) : white amorphous powder; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 4.78 (1H, ddd, $J=9.0, 9.4, 3.0$ Hz, H-7), 4.37 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-12), 3.18 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-3), 2.67 (1H, m, H-1b), 2.61 (1H, dd, $J=13.8, 3.0$ Hz, H-16a), 2.48 (1H, m, H-17), 2.42 (1H, m, H-23b), 2.31 (1H, m, H-23a), 2.27 (1H, m, H-16b), 2.23 (1H, m, H-6a), 1.94 (1H, m, H-20), 1.85 (1H, m, H-22b), 1.67 (1H, overlapping, H-6b), 1.62 (2H, m, overlapping, H-2), 1.45 (3H, s, CH₃-27), 1.31 (3H, s, CH₃-19), 1.24 (1H, m, H-22a), 1.12 (3H, d, $J=6.6$ Hz, CH₃-21), 1.02 (3H, s, CH₃-25), 0.98 (1H, m, H-1a), 0.89 (1H, m, H-5), 0.86 (3H, s, CH₃-26), 0.79 (3H, s, CH₃-18), 3.68 (3H, s, COOCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 217.3 (C-15), 199.3 (C-11), 174.3 (C-24), 156.8 (C-8), 141.9 (C-9), 77.9 (C-3), 77.8 (C-12), 66.1 (C-7), 60.0 (C-14), 51.5 (C-13), 49.8 (C-5), 46.3 (C-17), 38.3 (C-4), 38.0 (C-10), 37.2 (C-

16), 34.3 (C-1), 31.8 (C-23), 31.3 (C-20), 29.5 (C-22), 27.8 (C-27), 26.9 (C-2), 26.4 (C-6), 22.9 (C-25), 20.3 (C-26), 18.5 (C-21), 15.1 (C-19), 11.7 (C-18), 51.6 (COOCH₃); (+)ESI-MS: m/z 491 [M+H]⁺.

N-(Phenethyl)formamide (6) : white amorphous powder; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.02 (1H, s, H-9), 7.30-7.22 (5H, m, H-2 to H-6), 3.47 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-7), 2.83 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-8); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 163.8 (C-9), 140.3 (C-1), 129.9 (C-2 and C-6), 129.6 (C-3 and C-5), 127.5 (C-4), 42.6 (C-7), 37.5 (C-8); (+)ESI-MS: m/z 150 [M+H]⁺.

N-Acetylphenethylamine (7) : white amorphous powder; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.34-7.22 (5H, m, H-2 to H-6), 3.55 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-8), 2.85 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-7), 1.97 (3H, s, COCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 171.53 (C-9), 130.2 (C-2 and C-6), 130.2 (C-3 and C-5), 140.4 (C-1), 128.0 (C-4), 42.1 (C-7), 37.1 (C-8), 24.9 (COCH₃); (+)ESI-MS: m/z 164 [M+H]⁺.

Nitric Oxide(NO) 생성 억제 활성 측정¹⁰⁾ - Raw 264.7 대식세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다(<http://cellbank.snu.ac.kr>). 1% Penicillin/streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다. LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성이 각 시료에 의해 억제되는 것을 측정하기 위해 배양된 세포를 4×10⁵ cells/well 수준으로 24 well plate에 1 ml씩 배양한 다음 24시간 동안 배양하고, 24시간 후 medium을 제거한 후 RPMI1640으로 희석된 각 농도 별 시료 처리 후 LPS(1 µg/ml)를 처리하여 24시간 후 세포에서 medium으로 분비되어 나온 NO의 양을 Griess 시약[0.1% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid]을 사용하여 반응하였다. 반응 후 ELISA microplate reader(Bio Rad Laboratories Inc., California, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정 하였다(Fig. 3).

결과 및 고찰

영지버섯의 EtOAc 추출물을 다양한 column chromatography로 분획 후 semi-preparative HPLC를 실시하여 7 종의 이차대사산물들을 분리하였다(Fig. 1).

화합물 1은 ESIMS 분석에서 m/z 403 [M+H]⁺ 에서 molecular ion을 관측하였다. 이 화합물의 ¹H-NMR spectrum 분석은 lanostane-type triterpenoid로부터 유도된 C₂₄-nortriterpenoid 구조에서 6개의 특징적인 singlet methyl 작용 기[δ_{H} 2.22(H-21), 1.44(H-24), 1.23(H-19), 1.05(H-22), 0.86(H-23), 0.86(H-18)]들을 보였으며, δ_{H} 3.18(H-3)와

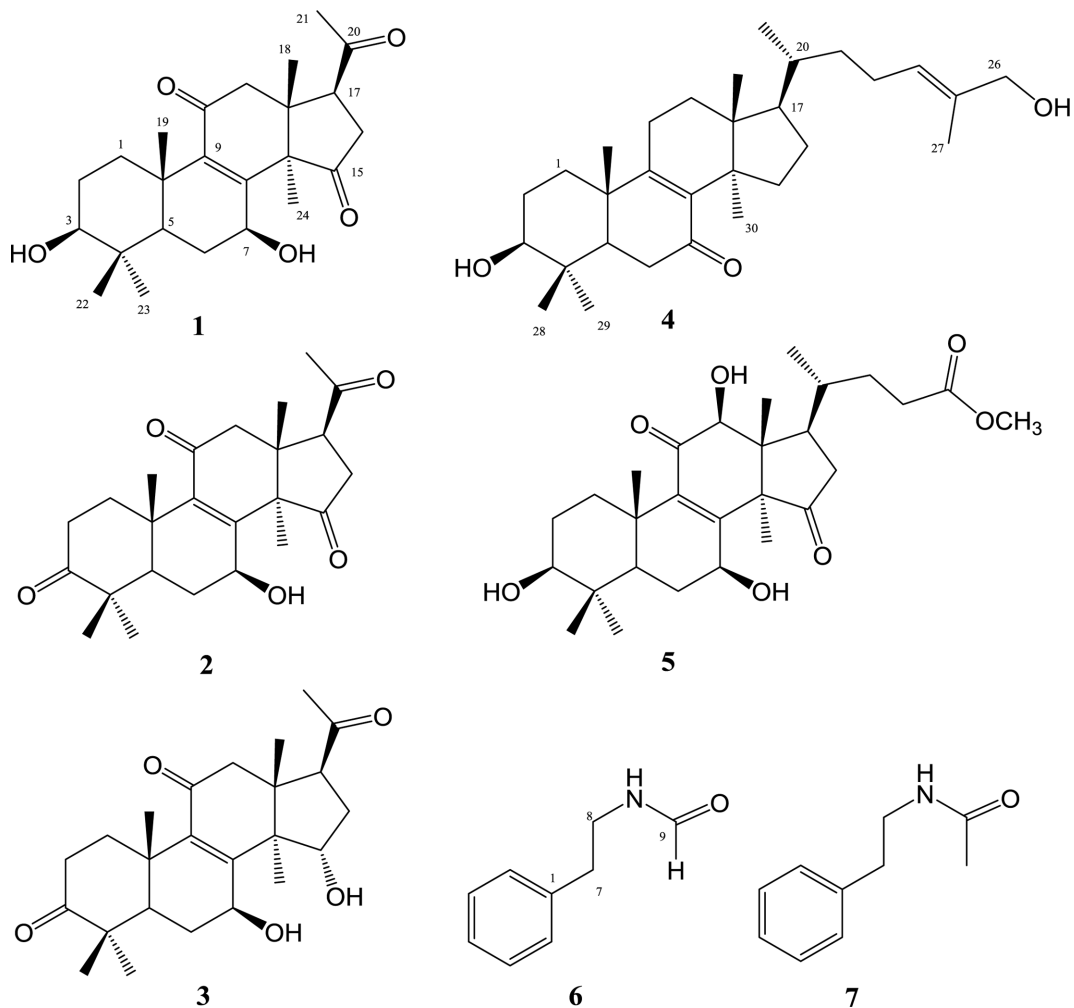


Fig. 1. Chemical structures of 1-7.

4.88(H-7)에서 2개의 oxygenated methine group을 확인하였고, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum은 δ_{C} 216.8(C-15), 208.4(C-20), 199.3(C-11)에서 3개의 ketone group의 존재를 보였고, δ_{C} 158.4(C-8)와 144.2(C-9)에서 4 치환된 olefinic carbon signal들을, 그리고 δ_{C} 78.9(C-3)와 67.8(C-7)에서 2개의 oxygenated methine 및 6개의 methyl carbon들을 포함하여 총 24개의 탄소를 나타냈다. 따라서 화합물 1은 C_{24} -nortriterpenoid 구조로 확인하였다. $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC 실험에서 H-7(δ_{H} 4.86)은 C-6(δ_{C} 28.0)/C-9(δ_{C} 144.2)/C-14(δ_{C} 59.9), δ_{H} 3.18(H-3)은 C-4(δ_{C} 39.8)/C-5(δ_{C} 50.4)/C-1(δ_{C} 36.0)들과의 상관관계를 보였으며, 추가로 H-21(δ_{H} 2.22)은 C-17(54.7)/C-20(208.4), H-24(δ_{H} 1.44)는 C-8/C-15, H-12는 C-11과의 상관관계들을 확인하였다(Fig. 2). 화합물 1의 NMR 데이터 및 문헌 값과 비교하여 이 화합물은 영지버섯에서 보고된 lucidone A, (3 β ,7 β -dihydroxy-4,4,14 α -trimethyl-11,15,20-trioxo-5 α -pregn-8-en)의 구조로 확인하였다.^{11,12)}

화합물 2의 NMR spectra는 화합물 1 번의 chemical shift 들과 유사한 패턴을 보였으나, $^{13}\text{C-NMR}$ 분석에서 화합물 2번은 화합물 1의 3번 탄소위치의 oxygenated methine group [δ_{H} 3.18/ δ_{C} 78.9(C-3)] 대신 하나의 carbonyl carbon (δ_{C} 217.9)이 더 관찰 되었으며, HMBC 실험을 통해 H-1/H-22/H-23이 C-3(δ_{C} 217.9)과 상관관계를 확인함으로써 C-3번에 ketone group이 치환되어 있음을 확인 하였다. 따라서, 화합물 2번은 화합물 1과의 NMR data와의 비교 및 2D-NMR analysis와 함께 lucidone B(7 β -hydroxy-4,4,14 α -trimethyl-3,11,15,20-tetraoxo-5 α -pregn-8-en B)의 구조로 동정 하였다.^{11,12)}

또한, lucidone B의 $^1\text{H-}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ data는 본 연구에서 2D 분석을 통하여 처음으로 제시하였다.

화합물 3의 NMR spectra는 화합물 2와 유사한 패턴을 보였지만, δ_{H} 4.82/ δ_{C} 73.3(C-15) 위치에서 oxygenated methine group을 보였다. $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC 실험에서 δ_{H} 4.82/ δ_{C} 73.3

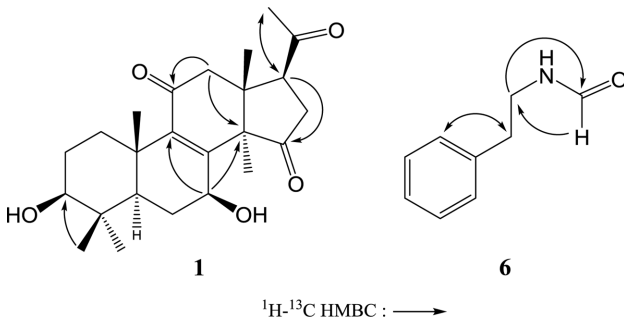


Fig. 2. The key HMBC correlations of **1** and **6**.

(C-15)은 C-17 위치의 methine group과 서로 상관 관계를 확립 함으로써 화합물 **2**에서의 C-15번 위치가 ketone group 대신 hydroxy group으로 치환되어 있음을 알 수 있었다. 따라서, 화합물 **3**의 NMR 결과와 문헌 값과의 비교에 의하여 lucidone F(7 β ,15 α -dihydroxy-4,4,14 α -trimethyl-3,11,20-trioxo-5 α -pregn-8-ene)의 구조로 확인하였다.¹³⁾

화합물 **4**의 ¹H-NMR spectrum은 δ_H 1.67(s, H-27), 1.17(s, H-19), 1.00(s, H-29), 0.92(s, H-30), 0.89(s, H-28), 0.66(s, H-18)에서 6개의 singlet 및 δ_H 0.93(d, $J=$ Hz, H-21)에서 하나의 doublet methyl proton들을 보였으며, δ_H 3.28(H-3)에서 1개의 oxygen-bearing methine proton, δ_H 4.01(2H, H-26)에서 oxygenated methylene group 그리고, δ_H 5.40/ δ_C 126.9(C-24)로부터 3 치환된 olefinic group의 존재를 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서는 δ_C 199.0(C-7)에서 1개의 ketone group과 δ_C 164.7(C-9)/138.9(C-8)와 134.3(C-25)/126.9(C-24)에서 두 쌍의 olefinic group들을 포함한 총 30개의 탄소를 확인할 수 있었다. 화합물 **4**의 NMR 및 MS 분석 결과와 문헌 값을 바탕으로 lucidiol(5 α -lanosta-8,24-dien-3 β ,26-dihydroxy-7-one)의 구조로 동정하였다.^{14,15)}

화합물 **5**의 NMR spectra는 화합물 **4** 번의 signal들과 비

교하여 28개의 탄소들로 구성되었으며, 화합물 **5**은 δ_H 3.68(3H, s)에서 관측된 chemical shift에 의하여 1개의 methoxy group(COOCH₃)과 δ_H 4.78(H-7), 4.37(H-12), 3.28(H-3)에서 3개의 oxygen-bearing methine proton들을 보였으며, ¹³C-NMR spectrum은 δ_C 217.3(C-15)와 199.3(C-11)에서 두 개의 carbonyl carbon, δ_C 174.3(C-24)에서 한 개의 ester carbonyl carbon, δ_C 156.8(C-8)와 141.9(C-9)에서 1개의 사 치환된 olefinic group들 보였다. 위의 특징적인 chemical shift들을 바탕으로 문헌에 보고된 결과와 비교하여 화합물 **5**는 methyl lucidenate C의 NMR data와 일치함을 확인하여 구조를 동정하였다.^{16,17)}

화합물 **6**의 ESIMS 분석에서 m/z 150 [M+H]⁺에서 molecular ion을 관측하였다. ¹H-NMR 분석에서 δ_H 7.22부터 7.30까지 5개의 aromatic proton들이 관측되었다. 고 자장 영역에서 δ_H 2.83(2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8)과 3.47(2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7)의 관측은 ethyl(-CH₂CH₂-) 기의 존재를 유추하였고, δ_H 8.02(1H, s, H-9)에서 aldehyde의 특징적인 proton signal을 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서 δ_C 127.5부터 140.3까지의 영역에서 5개의 aromatic carbon signal들, δ_C 42.6(C-7)와 37.5(C-8)에서 2개의 CH₂ carbon 들을 관측하였다. δ_C 163.8(C-9)에서 고 자장 영역으로 shifted된 aldehyde carbon이 관측되었는데 이는 MS분석과 함께 nitrogen이 치환되어 있음을 예상하였다. ¹H-¹³C HMBC 분석에서 δ_H 2.83(H-7)은 δ_C 129.9(C-6)과 δ_H 3.47(H-8)은 δ_C 140.3(C-1)과 서로 상관관계를 확인하여 benzene ring에 methylene group이 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, δ_H 3.47(H-8)과 고 자장 영역으로 이동된 carbonyl carbon [δ_C 163.8(C-9)]과의 three-bond HMBC 상관관계를 확인하여 methylene은 NH bridge를 통하여 aldehyde group 과 연결되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이상의 데이터를 종합하여 문헌과 비교에 의하여 N-(phenethyl)formamide 구조로 동정 하였다.¹⁸⁾

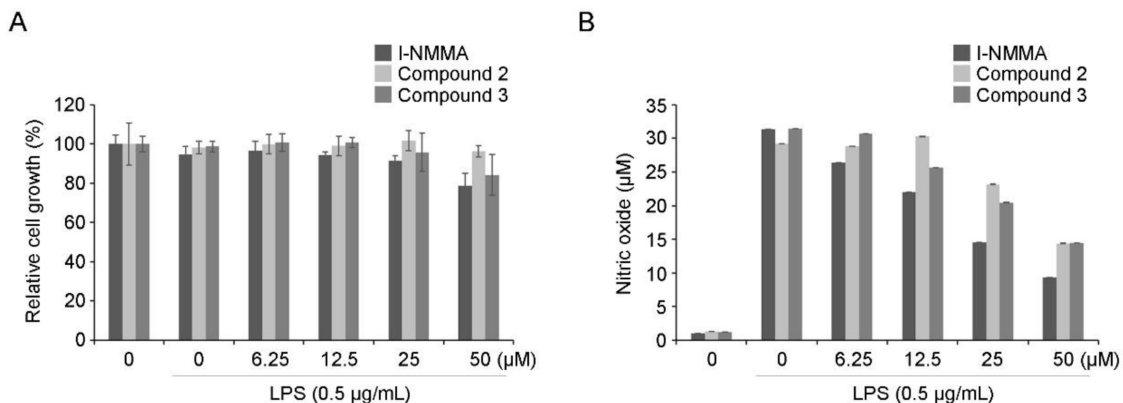


Fig. 3. Inhibition effect of compounds **2** and **3** against the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells (I-NMMA was used as a positive control).

화합물 7의 ^1H - 및 ^{13}C -NMR spectra는 화합물 6의 그것과 매우 유사하였으나, 화합물 6에서의 aldehyde proton 대신 화합물 7은 δ_{H} 1.97(3H, s, H-7)에서 methyl 작용기의 존재를 보였다. 따라서, 화합물 7은 carbonyl carbon에 methyl group이 치환된 구조임을 알 수 있었다. 화합물 7의 NMR 결과들과 문헌 값과의 비교에 의하여 N-acetylphenethylamine 구조로 동정 하였다.¹⁹⁾

분리된 화합물들에 대하여 LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 억제 실험을 측정하였다. 이들 중 Fig. 3에서 보여지는 것처럼 50 M 처리농도에서 양성대조군으로 사용된 L-N^G-monomethyl arginine citrate(73.6%의 억제 활성)와 비교하여 화합물 2번과 3번이 각각 38% 및 45%로 중간 정도의 활성을 보이는 것으로 나타났으며, 나머지 화합물들은 활성이 없는 것으로 나타났다.

결 론

본 연구는 영지버섯 추출물을 오픈 컬럼크로마토그래피와 분취용 HPLC를 이용하여 lucidone A(1), lucidone B(2), lucidone F(3), lucidadiol(4), methyl lucidenate C(5), N-(phenethyl)formamide(6), N-acetylphenethylamine(7)들을 분리 하였다. 이들 중 N-(phenethyl)formamide(6)와 N-acetylphenethylamine(7)은 영지버섯(*G. lucidum*) 및 *Ganoderma* 속에서 처음으로 분리되었다.

지금까지 영지로부터 다양한 lanostane-type triterpenoid들이 분리되었는데 이들 중 lucidenate P, lucidenate D₂, butyl lucidenate N, methyl ganoderate A, methyl ganoderate J, ganoderic acid G, ganoderic acid E 및 ganoderic acid K 등의 C₃₀-lanostane triterpenoid들이 NO를 억제하는 것으로 보고되었다.^{20,21)} 본 연구에서 영지로부터 분리된 화합물들 중 lanostane-type triterpenoid로부터 side chain의 degradation으로 인해 탄소 24개(C₂₄)로 구성된 nortriterpenoid, lucidone A(1), lucidone B(2), lucidone F(3)들이 얻어졌으며, 이들 화합물들에 대하여 LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 억제 실험을 처음으로 실시하였다. 이 중 화합물 2번과 3번에서 양성대조군으로 사용된 L-N^G-monomethyl arginine citrate와 비교하여 중간 정도의 억제 활성을 나타냈다. 영지에서 분리된 3종의 nortriterpenoid 화합물들 외에도 여러가지 유도체들이 보고되고 있으며,^{11,13)} 앞으로 이들 화합물들에 대한 다양한 화학적 그리고 생리활성 연구가 필요하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 극지연구소, KOPRI(PE19210)의 지원을 받아 연구 되었습니다.

인용문헌

- Hapuarachchi, K. K., Wen, T. C., Deng, C. Y., Kang, J. C. and Hyde, K. D. (2015) Mycosphere essays 1: Taxonomic confusion in the *Ganoderma lucidum* species Complex. *Mycosphere* **6**: 542-559.
- Pilotti, C. A., Sanderson, F. R., Aitken, E. A. B. and Armstrong, W. (2004) Morphological variation and host range of two *Ganoderma* species from Papua New Guinea. *Mycopathologia* **158**: 251-265.
- Taofiq, O., Heleno, S. A., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Gonzalez-Paramas, A. M., Barreiro, M. F. and Ferreira, I. C. (2017) The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. *Food Chem. Toxicol.* **108**: 139-147.
- Shiao, M. S. (2003) Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *Chem. Rec.* **3**: 172-180.
- Hennicke, F., Cheikh-Ali, Z., Liebisch, T., Maciá-Vicente, J. G., Bode, H. B. and Piepenbring, M. (2016) Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. *Phytochemistry* **127**: 29-37.
- Copot, O. and Tanase, C. (2017) Maxent modelling of the potential distribution of *Ganoderma lucidum* in North-Eastern region of Romania. *J. Plant Develop.* **24**: 133-143.
- Jing, S. I., Ge, M., Yi, W., Ma, H.-F., Cui, B.-K. and Dai, Y.-C. (2019) Medium composition optimization, structural characterization, and antioxidant activity of exopolysaccharides from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi*. *Int. J. Biol. Macromol.* **124**: 1186-1196.
- Liang, C., Tian, D., Liu, Y., Li, H., Zhu, J., Li, M., Xin, M. and Xia, J. (2019) Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y. *Eur. J. Med. Chem.* **174**: 130-141.
- Gullett, N. P., Amin, A. R., Bayraktar, S., Pezzuto, J. M., Shin, D. M., Khuri, F. R., Aggarwal, B. B., Surh, Y.-J. and Kucuk, O. (2010) Cancer prevention with natural compounds. *Semin. Oncol.* **37**: 25-281.
- Park, E.-J., Kondratyuk, T. P., Morrell, A., Kiselev, E., Conda-Sheridan, M., Cushman, M., Ahn, S., Choi, Y., White, J. J., van Breemen, R. B. and Pezzuto, J. M. (2011) Induction of retinoid X receptor activity and consequent upregulation of p21WAF1/CIP1 by indenoisoquinolines in MCF7 cells. *Cancer Prev. Res (Phila).* **4**: 592-607.
- Chen, X. Q., Chen, L. X., Zhao, J., Tang, Y. P. and Li, S. P. (2017) Nortriterpenoids from the fruiting bodies of the mushroom *Ganoderma resinaceum*. *Molecules* **22**: 1073.
- Nishitoba, T., Sato, S. and Sakamura, S. (1985) New Triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their bitterness. *Agric.*

- Biol. Chem.* **49**: 1549-1985.
13. Peng, X. R., Liu, J. Q., Han, Z. H., Yuan, X. X., Luo, H. R. and Qiu, M. H. (2013) Protective effects of triterpenoids from *Ganoderma resinaceum* on H₂O₂-induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chem.* **141**: 920-926.
 14. González, A. G., León, F., Rivera, A., Muñoz, C. M. and Bermejo, J. (1999) Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *J. Nat. Prod.* **62**: 1700-1701.
 15. Liu, L.-Y., Yan, Z., Kang, J., Chen, R.-Y. and Yu, D.-Q. (2017) Three new triterpenoids from *Ganoderma theae-colum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **19**: 847-853.
 16. Kikuchi, T., Kanomi, S., Murai, Y., Kadota, S., Tsubono, K. and Ogita, Z. I. (1986) Constituents of the fungus *Ganoderma lucidum* structure of ganoderic acids F, G and H, lucidenic acids D2 and E2 and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 4018-4029.
 17. Nguyen, V. T., Tung, N. T., Cuong, T. D., Hung, T. M., Kim, J. A., Woo, M. H., Choi, J. S., Lee, J.-H. and Min, B. S. (2015) Cytotoxic and anti-angiogenic effects of lanostane triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochem. Lett.* **12**: 69-74.
 18. Ito, Y. and Ushitora, H. (2006). Trapping of carbamic acid species with (trimethylsilyl) diazomethane. *Tetrahedron* **62**: 226-235.
 19. Hooper, J. and Watts, P. (2007). Expedient synthesis of deuterium-labelled amides within micro-reactors. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **50**: 189-196.
 20. Ito, Y. and Ushitora, H. (2006). Trapping of carbamic acid species with (trimethylsilyl) diazomethane. *Tetrahedron* **62**: 226-235.
 21. Hooper, J. and Watts, P. (2007). Expedient synthesis of deuterium-labelled amides within micro-reactors. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **50**: 189-196.
- (2019. 9. 4 접수; 2019. 9. 11 심사; 2019. 9. 18 게재확정)