

왕불류행의 Ecdysteroid 성분

김호경[#] · 전원경 · 고병섭

한국한의학연구원 검사사업부

(Received August 31, 2001; Revised September 26, 2001)

Ecdysteroids from Melandrii Herba

Ho Kyoung Kim[#], Won Kyung Jeon and Byoung Seob Ko

Quality Control of Herbal Medicine Department, Korea Institute of Oriental
Medicine, Seoul 135-100, Korea

Abstract — Melandrii Herba has been used for tympanitis, sore throat, dysentery and dehumidifying diuretic. From the BuOH fraction of methanol extracts, three ecdysteroids (ecdysterone, ecdysterone 22-acetate and inokosterone) were isolated by column chromatography using Amberlite XAD-4, ODS and Sephadex LH-20 gel and by HPLC method. The structures of these compounds were identified on the basis of spectroscopic methods.

Keywords □ Melandrii Herba, ecdysterone, ecdysterone 22-acetate, inokosterone, HPLC method

왕불류행(王不留行, Melandrii Herba)은 장구채 (*Melandrium firmum* Rohrbach) 및 그 밖의 동속근 연식물(석죽과, Caryophyllaceae)의 열매가 익었을 때 지상부를 건조한 것으로 줄기가 가늘고 볼록한 마디가 있으며 마디에서 가지와 잎이 마주 났고, 길이는 20~40 cm이다. 잎은 피침형~타원형이고 끝은 뾰족하며 엷은 황록색~녹색을 띤 황갈색을 나타낸다. 꽃대는 가지 끝에 나며, 길이 1 cm의 병모양의 삭과를 맺고 그 속에 매우 작은 흑갈색~흑색의 둥근 씨가 들어 있다. 씨를 확대경으로 보면 작은 돌기가 있고 한쪽은 패여졌고 자른면은 유백색이며 가루질이다. 풀냄새가 나고 맛은 조금 쓰며 씨는 처음에는 달다가 뒤에 쓰다. 전국 각지에 야생하며, 지리적으로는 시베리아, 중국, 만주, 일본에 분포하며, 통혈맥(通血脈), 유소(乳少), 청열해독, 치금창지혈(治金瘡止血), 치열(治熱), 중이염, 인후통, 이질, 제습이뇨 등에 쓰이는 약재이다.¹⁻³⁾

주성분으로는 melandrigenin,⁴⁾ gypsogenin, gypso-genic acid, quillaic acid, 3 β , 21 β -dihydroxy-16, 23-dioxo-28-nor-17 α , 18 β -olean-12-ene 및 3 β , 16 α -dihydroxy-23-oxo-olean-13(18)-en-28-oic acid,⁵⁾ 3- β -D-glucuronopyranosylmelandrigenin methyl ester, 2 β , 21 β -dihydroxy-16, 23-dioxo-28-norolean-13(18)-ene,⁶⁾ melandrioid⁷⁾ 등이 보고되었다.

이상과 같이 왕불류행에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으나 왕불류행의 품질을 평가할 수 있는 지표물질의 선정이나 이를 이용한 성분함량에 관한 연구는 보고된 바 없어 본 연구자는 생약의 품질규격화 연구의 일환으로 왕불류행에 대하여 천연물 약품 화학적 방법으로 성분분리를 실시하여 본 식물에서 처음 분리된 3종류의 ecdysteroid를 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 왕불류행 *Melandrium firmum*은 2000년 5월 경동시장 정도물산에서 구입한 후 중앙대학교 황원균 교수에게 식물학적 감정을 거친

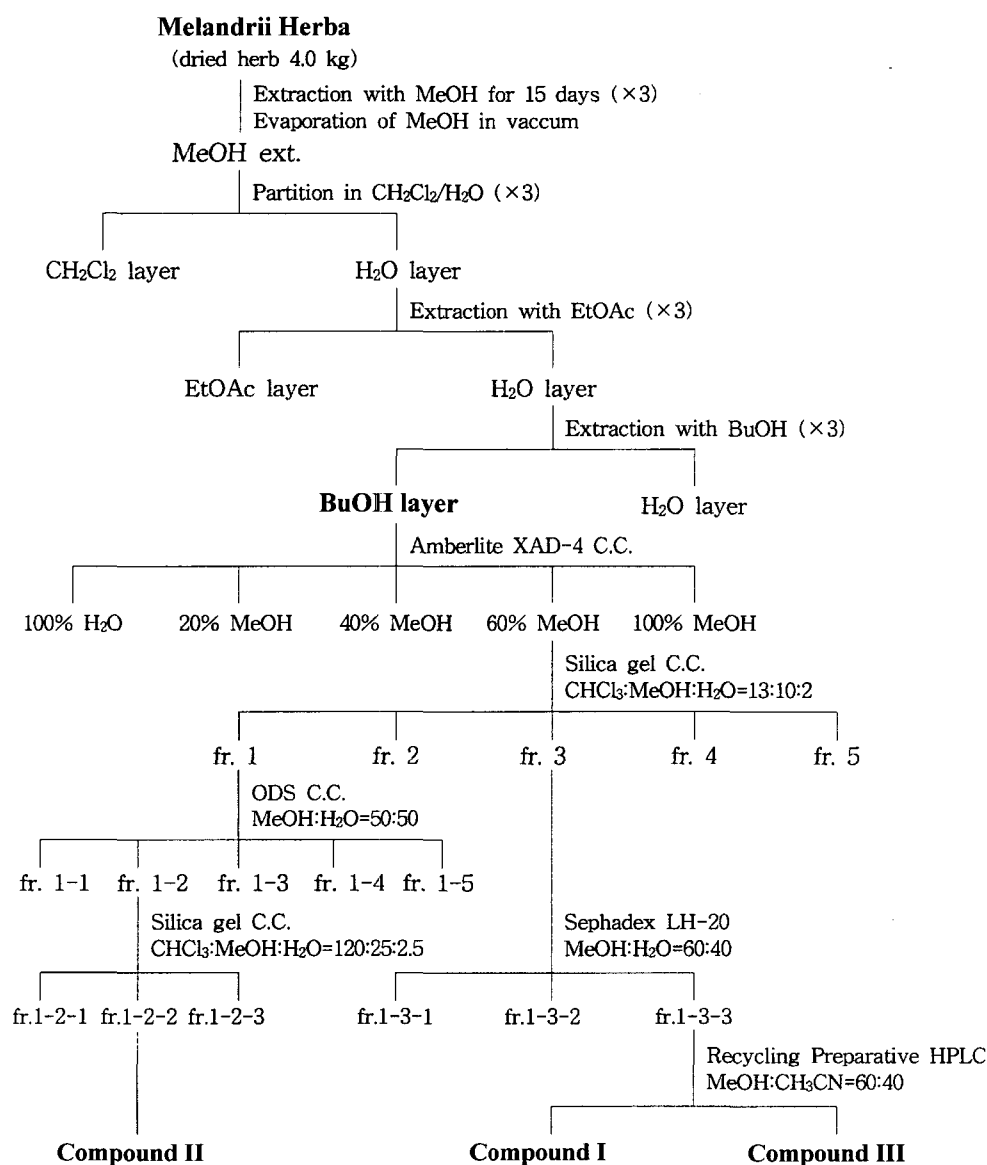
[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-3442-1994 (팩스) 02-3442-0220

후 사용하였으며 표본(검사2000-25)은 한국한의학연구원 검사사업부 표본실에 보관하고 있다.

시약 및 기기 - Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70~230 mesh, Merck), ODS (Lichroprep RP-18, Merck), Sephadex LH-20 (Pharmacia)을 사용하였고, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck)와 RP-18 F_{254s}(Merck)를 사용하였다. 시약과 용매는 특급 또는 1급 시약을 사용하였으며, HPLC용 용매는 HPLC grade(Merck)를 사용하였다.

Negative-ion FAB-Mass(matrix : glycerol)는 VG70-VSEQ(England)를, ¹H 및 ¹³C-NMR은 Bruker AM-500(Germany)를 사용하였다. HPLC는 JAI Recycling Preparative HPLC LC-908 W(Japan)를 사용하였다.

추출 및 화합물의 분리 - 왕불류행(4.0 kg)을 MeOH로 15일간 실온에서 3회 반복 추출, 여과 및 감압 농축하여 MeOH 엑스(100.9 g)를 제조하였다. MeOH 추출물을 증류수로 현탁시킨 다음 동량의 methylene chloride(CH₂Cl₂)를 가하여 진탕하고 3회 분획하여



Scheme 1 - Extraction and isolation of Compound I-III from the Melandrii Herba.

CH₂Cl₂층으로 하였다. H₂O층은 다시 EtOAc로 앞의 방법과 같이 3회 분획하여 EtOAc층을 얻었고, H₂O층은 다시 n-BuOH로 3회 분획하여 n-BuOH층과 H₂O층을 얻었다. n-BuOH분획물(25.5 g)을 Amberlite XAD-4를 사용한 column chromatography를 실시하여 H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH 및 100% MeOH 분획으로 나누었다. 그 중 60% MeOH 분획(4.67 g)을 silica gel column chromatography(CHCl₃:MeOH:H₂O=13:10:2)를 실시하여 5개의 fraction을 얻었고 그 중 fr. 1을 ODS gel column에 loading 한 후 50% MeOH을 elution 시켜 fr. 1-1~fr. 1-5를 얻었다. 다시 fr. 1-2를 silica gel과 용매(CHCl₃:MeOH:H₂O=120:25:2.5)를 이용한 column chromatography를 실시하여 compound II를 분리하였으며 fr. 1-3을 Sephadex LH-20 (MeOH:H₂O=60:40)을 이용한 column chromatography와 Recycling Preparative HPLC(MeOH:CH₃CN=60:40)를 실시하여 compound I과 compound III를 분리하였다. 각종 spectral data와 비교 검토한 결과 compound I은 ecdysterone, compound II는 ecdysterone 22-acetate, compound III는 inokosterone 으로 확인되었다.^{9,10)}(Scheme 1)

HPLC 조건 - HPLC는 JAI Recycling Preparative HPLC LC-908 W(Japan)를 사용하였으며 Column은 JAIGEL W-252 (20φ×500 mm), JAIGEL W-253 (20φ×500 mm)를 사용하였고 이동상으로는 MeOH:CH₃CN=60:40(v/v)이 되도록 하였다. 유속은 3.5 ml/min으로, UV Detector 파장은 254 nm에서 고정하여 실시하였다.

Compound I의 물리 화학적 성상 - 백색 침상결정; FAB(-)Mass(m/z): 479[M-H]⁻; ¹H-NMR (Pyridine-*d*₅, 500 MHz): δ 1.10, 1.25, 1.62 (each 3H, s, H-19, H-18, H-21), 1.40 (6H, s, H-26 and H-27), 3.03 (1H, m, H-9), 3.91 (1H, brd, *J*=9.6 Hz, H-22), 4.22 (1H, m, H-2), 4.26 (1H, brs, H-3); ¹³C-NMR (Pyridine-*d*₅, 125 MHz): 38.5 (C-1), 68.5 (C-2), 68.6 (C-3), 32.9 (C-4), 51.9 (C-5), 204.0 (C-6), 122.1 (C-7), 166.6 (C-8), 34.9 (C-9), 39.1 (C-10), 21.6 (C-11), 32.3 (C-12), 48.6 (C-13), 84.7 (C-14), 32.5 (C-15), 21.6 (C-16), 50.6 (C-17), 18.4 (C-18), 24.9 (C-19), 77.3 (C-20), 22.2 (C-21), 78.0 (C-22), 28.0 (C-23), 43.1 (C-24), 70.0 (C-25), 30.5 (C-26), 30.6 (C-27)

Compound II의 물리 화학적 성상 - 백색 결정; FAB(-) Mass(m/z): 521[M-H]⁻, 479[M-(Ac+H)]⁻; ¹H-NMR (Pyridine-*d*₅, 500 MHz): δ 1.08 (3H, s, H-19), 1.19 (3H, s, H-18), 1.37 (6H, s, H-26 and H-27), 1.65 (3H, s, H-21), 2.56 (1H, dt, *J*=13.3, 5.6 Hz, H-12), 3.02 (2H, m, H-5 and H-17), 3.61 (1H, brt, *J*=8.2 Hz, H-9), 4.22 (1H, brdt, *J*=11.4, 3.4 Hz, H-2), 4.26 (1H, brs, H-3), 5.52 (1H, dd, *J*=1.8, 10.6 Hz, H-22), 6.26 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-7); ¹³C-NMR (Pyridine-*d*₅, 125 MHz): 38.0 (C-1), 68.1 (C-2), 68.2 (C-3), 32.5 (C-4), 51.4 (C-5), 203.5 (C-6), 121.8 (C-7), 165.9 (C-8), 34.4 (C-9), 38.7 (C-10), 21.1 (C-11), 31.7 (C-12), 48.1 (C-13), 84.1 (C-14), 32.0 (C-15), 21.6 (C-16), 50.5 (C-17), 17.9 (C-18), 24.5 (C-19), 76.3 (C-20), 22.3 (C-21), 80.5 (C-22), 26.1 (C-23), 41.7 (C-24), 69.2 (C-25), 29.7 (C-26), 30.1 (C-27), 171.3 and 21.3 (OAc)

Compound III의 물리 화학적 성상 - 백색 결정; FAB(-)Mass(m/z): 479[M-H]⁻; ¹H-NMR (Pyridine-*d*₅, 500 MHz): δ 1.10, 1.26, 1.61 (each 3H, s, H-19, H-18, H-21), 1.07 (3H, d, *J*=6.4 Hz, H-27), 3.05 (1H, m, H-9), 3.89 (1H, brd, *J*=9.7 Hz, H-22), 4.20 (1H, m, H-2), 4.26 (1H, brs, H-3); ¹³C-NMR (Pyridine-*d*₅, 125 MHz): 38.5 (C-1), 68.5 (C-2), 68.6 (C-3), 32.9 (C-4), 51.9 (C-5), 203.9 (C-6), 122.2 (C-7), 166.6 (C-8), 34.9 (C-9), 39.2 (C-10), 21.6 (C-11), 32.2 (C-12), 48.6 (C-13), 84.7 (C-14), 32.5 (C-15), 22.0 (C-16), 50.5 (C-17), 17.5 (C-18), 24.9 (C-19), 77.3 (C-20), 22.1 (C-21), 77.7 (C-22), 30.4 (R-epimer: 30.7, C-23), 32.4 (C-24), 37.3 (R-epimer: 36.9, C-25), 67.8 (C-26), 18.4 (R-epimer: 18.3, C-27)

실험결과 및 고찰

왕불류행을 메탄올을 용매로 하여 상온에서 냉침법으로 추출, 여과하여 감압 농축하고 메탄올엑스를 증류수로 현탁 시킨 다음 CH₂Cl₂, EtOAc 및 n-BuOH로 용매분획한 후 n-BuOH 분획물을 Amberlite XAD-4, ODS, Sephadex LH-20 및 silica gel을 사용한 column chromatography를 실시하여 한 개의 단일 물질과 단일 반점의 혼합물을 얻었다. 이 혼합물을 HPLC를 실시하여 확인한 결과 2개의 화합물이 혼합되어 있어 Recycling Preparative HPLC(methanol:

acetonitrile=60 : 40)를 실시하여 2종류의 단일 물질로 분리하였다. 이들의 각종 기기분석 FAB-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 소견을 종합한 결과 compound I은 ecdysterone, compound II는 ecdysterone 22-acetate, compound III는 inokosterone으로 확인, 동정하였다.

Compound I은 백색 침상 결정이고 Negative FAB-MS spectrum에서는 m/z 479에서 $[\text{M-H}]^-$ 의 molecular ion peak, m/z 463 $[\text{M-OH-H}]^-$ 에서 hydroxyl기가 탈락된 fragment peak가 관찰되었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.10, 1.25, 1.62 ppm에서 각각 19- CH_3 , 18- CH_3 , 21- CH_3 에 기인하는 signal이 singlet으로, δ 1.40 ppm에서 26- CH_3 , 27- CH_3 에 기인하는 signal이 singlet으로 나타나고 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 δ 18.4, 22.2, 24.9, 30.5 및 30.6 ppm에서 5개의 methyl기를 관찰할 수 있었으며 20-hydroxy group을 제외하면 ecdysone과 구조가 같아 20-hydroxy group에 근접해 있는 C-16, C-17, C-20, C-21을 제외한 모든 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum이 동일하였으며 또한, 20-hydroxy group은 extra γ -effect을 일으켜 C-16 signal을 고자장으로 5~10 ppm shift시키고 extra β -effect을 일으켜 C-17과 C-21 signal을 저자장으로 10 ppm까지 shift시키는데,⁸⁾ C-16(δ 21.6 ppm)을 ecdysone의 C-16(δ 27.0 ppm)보다 고자장으로 shift시키고 C-17(δ 50.5 ppm)과 C-21(δ 22.3 ppm)을 ecdysone의 C-17(δ 48.8 ppm)과 C-21(δ 13.3 ppm)보다 저자장으로 shift시켰다. 이상의 기기분석 결과 문헌^{9,10,11)}과의 비교로 Compound I은 ecdysterone(20-hydroxyecdysone)으로 확인, 동정하였다.

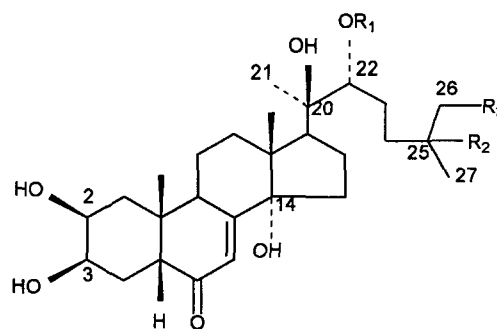
Compound II는 백색 결정이고 Negative FAB-MS spectrum에서는 m/z 521에서 $[\text{M-H}]^-$ 의 molecular ion peak, m/z 479 $[\text{M-(Ac+H)}]^-$ 에서 acetyl기가 탈락된 fragment peak가 관찰되었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.08, 1.19, 1.65 ppm에서 각각 19- CH_3 , 18- CH_3 , 21- CH_3 에 기인하는 signal이 singlet으로, δ 1.37 ppm에서 26- CH_3 , 27- CH_3 에 기인하는 signal이 singlet으로 나타나고 δ 2.06 ppm에서 acetate methyl signal을 확인하고 H-22(δ 5.52 ppm)은 ecdysterone의 H-22(δ 4.84 ppm)보다 저자장 shift되어 있음을 관찰 할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 δ 17.9, 22.3, 24.5, 29.7 및 30.1 ppm에서 5개의 methyl기를 확인할 수 있었

으며 δ 21.3 ppm에서 acetate methyl signal을, δ 171.3 ppm에서 acetyl기를 관찰할 수 있었으며 C-22(δ 80.5 ppm)는 ecdysterone의 C-22(δ 77.7 ppm)보다 저자장 shift되어 C-22에 acetyl기가 결합되어 있음을 알 수 있었다. 이상의 기기분석 결과 문헌⁹⁾과의 비교로 Compound II는 ecdysterone 22-acetate로 확인, 동정하였다.

Compound III는 백색 결정이고 Negative FAB-MS spectrum에서는 m/z 479에서 $[\text{M-H}]^-$ 의 molecular ion peak, m/z 463 $[\text{M-OH-H}]^-$ 에서 hydroxyl기가 탈락된 fragment peak가 관찰되었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.10, 1.26, 1.61 ppm에서 각각 19- CH_3 , 18- CH_3 , 21- CH_3 에 기인하는 signal이 singlet으로, δ 1.07 ppm에서 27- CH_3 에 기인하는 signal이 doublet($J=6.4$ Hz)으로 나타나고 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 C-25에 근접해 있는 C-23, C-25, C-27은 2종류의 signal로 관찰되었으며 HPLC ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}=20 : 80$)로 확인한 결과 25-[S]=1 : 1의 C-25 epimer의 혼합물임을 알 수 있었다.^{12,13)} 또한, extra hydroxy group은 C-24와 C-27에 γ -effect를 일으키고 C-25에 β -effect를 일으켜 C-24(δ 32.2 ppm)와 C-27(δ 18.3 ppm, 18.4 ppm R-epimer)를 ponasterone의 C-24(δ 37.2 ppm)와 C-27(δ 30.0 ppm)보다 고자장으로 shift시키고 C-25(δ 36.9 ppm, 37.3 ppm R-epimer)를 ponasterone의 C-25(δ 28.3 ppm)보다 저자장으로 shift시키고 있었으며 다른 carbon은 ponasterone과 일치하였다. 이상의 기



- I. $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$,
- II. $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$,
- III. $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$

Fig. 1 - The structure of Compounds I-III.

기분식 결과와 문헌¹¹⁾과의 비교로 Compound III는 inokosterone으로 확인, 동정하였다.

결 론

왕불류행의 품질을 평가할 수 있는 지표물질의 선정이나 이를 이용한 성분함량에 관한 연구는 보고된 바 없어 본 연구자는 생약의 품질규격화 연구의 일환으로 본 식물에 대해 천연물 화학적 방법으로 성분분리를 실시하였다.

왕불류행의 메탄올 추출물을 증류수로 현탁시킨 다음 CH₂Cl₂, EtOAc 및 n-BuOH로 용매분획하여 n-BuOH 분획물을 Amberlite XAD-4, ODS 및 silica gel을 사용한 column chromatography과 Recycling Preparative HPLC(methanol : acetonitrile=60 : 40)를 실시하여 3종류의 ecdysteroid를 분리하였다. 이들의 각종 물리학적 성상과 기기분석의 소견을 종합한 결과 compound I은 ecdysterone, compound II는 ecdysterone 22-acetate, compound III는 inokosterone으로 확인 동정하였으며 이상 3종의 화합물은 왕불류행에서 처음 분리된 물질이다.

감사의 말씀

본 연구는 2000년도 생약·한약재 품질표준화연구(식품의약품안전청)의 지원에 의하여 이루어졌으며, HPLC는 한국 JAI의 도움을 받아 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 육창수 : 원색한국약용식물도감, 아카데미서적, 서울 p. 167 (1993).
- 2) 문관심 : 약초의 성분과 이용, 일월서각, 서울 p. 191 (1994).
- 3) 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울, p. 335 (1993).
- 4) Woo, W. S., Choi, J. S. and Chang, H. S. : Phytochemical Study on *Melandrium firmum*. *Arch. Pharm. Res.* **8**(8), 133 (1985).
- 5) Chang, I. S., Han, Y. B., Woo, W. S., Kang, S. S., Lotter, H. and Wagner, H. : Sapogenins from *Melandrium firmum*. *Planta Med.* **55**, 544 (1989).
- 6) Woo, E. H. and Woo, W. S. : A novel prosapogenin from the methanolizate of *Melandrium crude* saponins. *Kor. J. Pharmacogn.* **22**(4), 211 (1991).
- 7) Woo, E. H. and Woo, W. S. : Melandrioid A, a saponin from *Melandrium firmum*. *Journal of natural products* **55**(6), 786 (1992).
- 8) Wehrli, F. W., Marchand, A. P. and Wehrli, S. : Interpretation of carbon 13 NMR spectra., 2nd., John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 52 (1989).
- 9) Ratnayake, B. M., Jayasinghe, L., Kaurnaratne, V., Wannigama, G. P., Bokel, M., Kraus, W. and Sotheeswaran, S. : Ecdysterone from stem of *Diploclisia Glaucescens*. *Phytochemistry* **28**(4), 1073 (1989).
- 10) Nishimoto, N., Shiobara, Y., Fujino, M., Inoue, S. S., Takemoto, T., de Oliveira, F., Akisue, G., Akisue, M. K., Hashimoto, G., Tanaka, O., Kasai, R. and Matsuura, H. : Ecdysteroids from *Pfaffia Iresinoides* and reassignment of some ¹³C-NMR chemical shifts. *Phytochemistry* **26**(9), 2505 (1987).
- 11) Lee, S. S. and Nakanishi, K. : ¹³C-NMR assignments of some insect molting hormones. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **5**, 564 (1989).
- 12) Hikino, H., Mohri, M., Hikino, Y., Arihara, S., Takemoto, T., Mori, H. and Shibata, K. : Inokosterone, an insect metamorphosing substance from *Achyranthes fauriei*. *Tetrahedron* **32**, 3015 (1976).
- 13) Ogawa, S., Yoshida, A. and Kato, R. : Analytical studies on the active constituents in crude drugs. III. High-speed liquid chromatographic determination of ecdysterone and inokosterone in *Achyranthis Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 904 (1977).