

희첩의 Steroid 성분에 관한 연구

吳 世 宗

서울대학교 생약연구소

Studies on Steroids of *Siegesbeckia pubescens* MAKINO

Sea Jong Oh

Natural Products Research Institute, Seoul National University
Seoul, Korea

Five steroids (campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, α -spinasterol and stigmast-7-enol) were isolated as mixture from *Siegesbeckia pubescens* MAKINO and analyzed by mass spectrometry.

서 론

漢方에서 血壓降下劑로 使用하는 희첩(털진득찰, *Siegesbeckia pubescens* MAKINO)의 成分研究에 있어 韓·金 등은 compound A, B, C, D, E 및 F를 각각 分離하여 그중 compound A¹⁾는 pimarane系 diterpene 이며 compound B²⁾ 및 D는 kaurane系에 속하는 diterpene 이고 compound C³⁾는 diterpene glycoside 인을 밝히고 각각 그들의 化學構造를 究明하여 이미 報告하였으며 compound E 및 F에 對하여는 現在 研究가 계속되고 있다.

著者は 本研究 續行中 同植物에서 diterpene 에 속하지 않는 steroid {m. p. 143~145°, $[\alpha]_D^{20}$ -15.46° (c, 0.1% in EtOH), ν_{\max}^{KBr} (cm⁻¹); 3320(OH), 1040(OH), nmr (τ); 8.3, 8.94, 9.0, 9.05, 9.14, 9.23, 9.32, 9.47, 6.2(OH), mass (m/e); M⁺ 400, 412, 414}를 分離하였다. 本物質은 LIEBERMANN-BUCHARD reaction 이 양성으로 나타남으로 steroid 로 推測하였다. 本物質 및 本物質의 acetate m. p. 128-9°는 一般의인 silica gel TLC 에서는 單一한 spot 를 나타내고 있으므로 本物質이 單一한 것으로 인정하였으나 GLC 에서는 이들이 각각 2개씩의 peak 를 나타냄으로 本物質은 數種의 steroid 의 混合物로 推測하였다.

一般적으로 化學的인 方法으로는 steroids 의 純粹分離가 極히 어려움으로 著者は 最近 이 方面研究에 많이 使用되는 mass spectrometrical analysis 에 의한 檢討를

하였으며 또 이 物質은 TORTELLI-JAFFÉ reaction 이 陰性으로 나타남으로 Δ^8 및 $\Delta^8(14)$ steroid 는 함유되어 있지 않았다고⁴⁾ 推測하여 結局 本物質이 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, α -spinasterol 및 stigmast-7-enol 등 5種의 steroid 가 섞여 있는 混合物로 推測하였다.

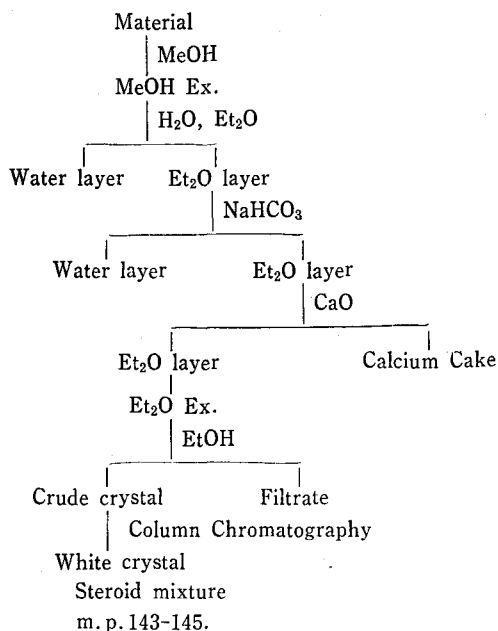
실 험

Gas-liquid chromatography 에는 Yanagimoto GCG-5DH 형을 使用하였으며, IR 은 Japan spectroscopic Co., Ltd. IR-S 형을 使用하여 KBr-disk 로 測定하였다. nmr 은 Jeol, JNM-C-60HL 형을 使用하여 CDCl₃ 용액에서 測定하였고 선광도는 Shimadzu spectroscophotometer QV-50 型用 polarization apparatus 를 使用하여 EtOH 溶液에서 測定하였다. 모든 溶점치는 補正하지 않았다.

1) 抽出分離

材料 5kg 을 18l 의 MeOH 로 冷浸하여 一週日間 放置하고 浸液을 濾過하고 MeOH 를 完全히 溜去한다. MeOH extract 를 물에 溶解시키고 Et₂O 로 抽出하고 Et₂O 층을 飽和 NaHCO₃水로 洗滌하고 CaO 를 加하고 잘 저은後 一週日間 放置後 濾過하고 calcium cake 를 Et₂O 로 더욱 抽出하여 Et₂O 층에 모두 合하여 물로 洗滌한 後 Et₂O 를 溜去하고 그 잔사를 EtOH 에 溶解 放置하여 生成되는 粗結晶을 silica gel column chromatography (solvent system, CHCl₃:MeOH=9:1)에 依하여 白色의 針狀結晶을 얻었다. (Scheme I) m. p. 143~

145°, $[\alpha]_D^{25}$ -15.46° (c, 0.1 % in EtOH), $ir \nu_{max}$ (cm⁻¹); 3320(OH), 1040(OH), $n_{mr}(\tau)$; 8.3, 8.94, 9.00, 9.05, 9.14, 9.23, 9.32, 9.47, 6.2, $mass(m/e)$; M^+ 400, 412, 414.



Scheme I Extraction and isolation of steroid mixture.

2) Colour test

LIEBERMANN-BUCHARD reaction과 TORTELLI-JAFFE reaction을 행하였는데 LIEBERMANN-BUCHARD reaction만이 양성으로 나타났다. 따라서 Δ⁸ 및 Δ⁸⁽¹⁴⁾ steroid는 함유되어 있지 않음⁴⁾을 認定하였다.

3) Acetate

本物質 約 50mg을 pyridine 少量에 溶解시키고 acetic anhydride 1ml를 注加하여 5日間 室溫에서 反應시킨 후 多量の 氷水에 注加하여 生成되는 沈澱을 分取하고 氷水로 洗滌한 다음 EtOH에서 再結晶하였다. m.p. 128~9°, $ir \nu_{max}$ (cm⁻¹); 1736 (ester carbonyl), 1255 (ester), $mass(m/e)$; M^+ 454, 456.

4) TLC

本物質이 單純한가를 알기 위하여 각종 展開劑로 silica gel TLC를 試圖하여 보았으나 (solvent system; CHCl₃:MeOH=9:1, Fig. 1. A, benzene:Et₂O=5:3, Fig. 1. B) 單一한 spot를 나타내었고 acetate도 역시 이들 溶媒에서 單一하게 나타났다. 그러나 20%-AgNO₃-silica gel TLC⁵⁾ (solvent system; petroleum ether:Et₂O=98:2, Fig. 1. C)는 4回 反復 展開시켜도 本物質은 單一한 spot를 나타내었으나 acetate는 R_f치의 근소한

차로서 3개의 spot를 나타내었다. (Fig. 1. a. steroid sample, b. steroid acetate, c. α-spinasterol acetate)

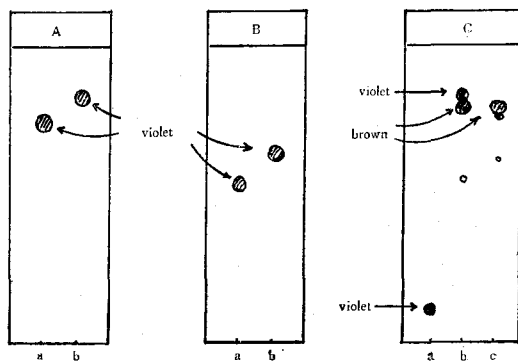


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of sample and its acetate.

5) GLC

本物質 및 그 acetate를 CHCl₃ 溶液으로 하여 이 試液에 對하여 GLC를 행한 결과 각각 2개씩의 peak를 나타내었다. (Fig. 2. a. solvent peak, b. sample peak) (Fig. 3. a. solvent peak, b. sample peak)

GLC의 條件은 column SE-30 (3%), carrier gas 1. 25 cc/min. (N₂ gas), program range (200~270°), detector는 FID이다.

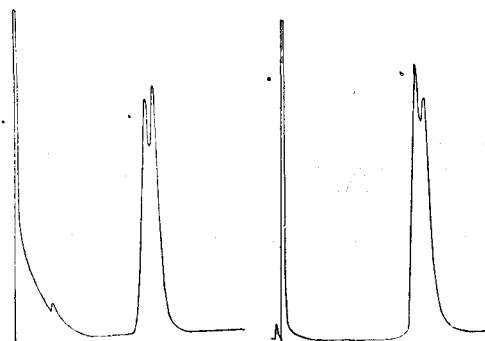


Fig. 2. Gas-Liquid chromatogram of sample.

Fig. 3. Gas-Liquid chromatogram of sample (acetate).

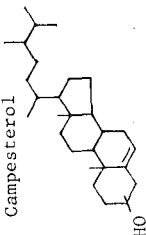
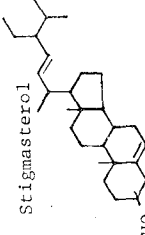
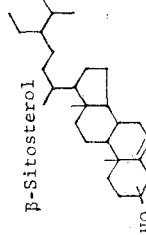
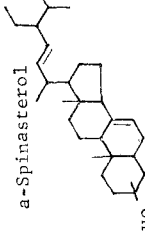
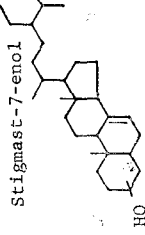
6) Mass spectrometrical analysis

mass spectrometrical analysis에 依하여 얻은 fragmentation data은 TABLE I에 表示하였다.

결과 및 고찰

1) Mass spectrometry에 의한 檢討

Steroids의 純粹分離는 一般의으로 化學的인 方法으로는 매우 어려움으로 最近 이 方面研究에 많이 使用

Fragmentation	Sterols										
	M ⁺ M-CH ₃	M-H ₂ O	M-CH ₃ -H ₂ O	M-43 (isopropyl)	M-43 -H ₂ O	M-CH ₃ -A Ring	M-side chain	M-side chain -C ₂ H ₃	M-side chain -H ₂ O (D Ring)	M-side chain -C ₂ H ₃ -OH	M-side chain -42 -H ₂ O
 Campesterol	400	385	382	367	289	273	255	231	213		
	(400)	(385)	(382)	(367)	(-)	(273)	(-)	(255)	(231)	(-)	(213)
 Stigmasterol	412	397	394	379	369	301	273	246	229	213	300
	(412)	(397)	(394)	(379)	(369)	(301)	(273)	(246)	(255)	(231)	(213)
 β-Sitosterol	414	399	396	381	303	273	255	231	213		
	(414)	(399)	(396)	(381)	(-)	(273)	(-)	(255)	(231)	(-)	(213)
 α-Spinasterol	412	397	394	379	369	351	273	246	229	213	300
	(412)	(397)	(394)	(379)	(369)	(351)	(-)	(273)	(255)	(231)	(213)
 Stigmast-7-enol	414	399	396	381	273	255	231	213			
	(414)	(399)	(396)	(381)	(-)	(273)	(-)	(255)	(231)	(-)	(213)

되는 mass spectrometrical analysis 에 의한 檢討를 試圖하였다. (TABLE I.)

() 안의 數値는 文獻上의 data 를 表示한 것이다. 4, 6, 7, 8.

우선 特徵의으로 나타난 m/e 273 (M-side chain), m/e 255(M-side chain-H₂O), m/e 231 [M-side chain-42 (ring D fragment)], (Fig. 4. a.)와 m/e 213 (231-H₂O) 등에 依해서 不飽和植物 sterol 卽, stigmastane skeleton⁴⁾ 을 갖는 sterol 이 存在함을 推測하였다.

또 m/e 400 (molecular ion)과 m/e 382(M-H₂O), m/e

289(M-CH₃-A ring) (Fig. 4. b.) 등에 依하여 Δ^5 sterol 인 campesterol 의 存在를 推測하였고 m/e 412 (molecular ion)과 m/e 394 (M-H₂O), m/e 369[M-43(isopropyl)] (Fig. 4. c) m/e 351(369-H₂O), m/e 301(M-CH₃-A ring) 등에 依하여 $\Delta^{5,22}$ sterol^{4, 6, 8)} 인 stigmasterol 의 存在를 推測하였다.

그리고 m/e 414(molecular ion), m/e 396 (M-H₂O), m/e 303 (M-CH₃-A ring)에 依하여 Δ^5 sterol 인 β -sitosterol 이 存在함을 推測하였다.

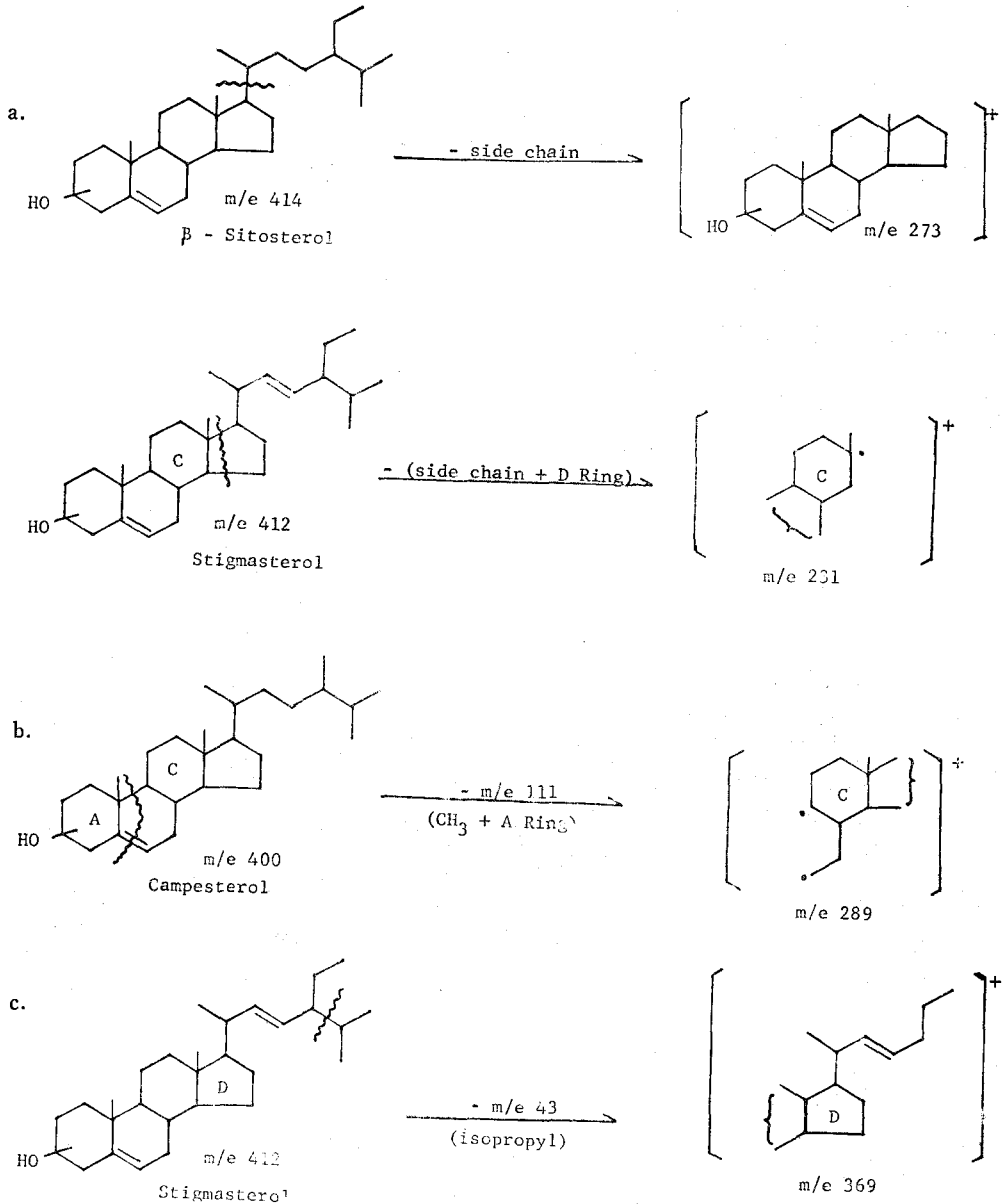


Fig. 4. Fragmentation of sterols with stigmastane skeleton

TABLE I. 에서 比較한 바와 같이 α -spinasterol 및 stigmast-7-enol 의 存在도 推測할 수 있으나 이는 acetate 의 mass spectrum 에서 더욱 분명하게 檢討하였다.

Fig. 5. 는 本物質 및 그 acetate 의 mass spectra 로서 本物質의 molecular ion peak 는 m/e 400, 412, 414 이었고 이들의 acetate 의 molecular ion peak 는 m/e 442, 454, 456 으로 예상되나 m/e 442 에는 peak 가 없는것으로 보아 m/e 400 의 peak 는 Δ^5 sterol^{6,9)}인 campesterol 에 의한 peak 로 推測하였다. 또 m/e 454 와 456 의 peak 는 本物質의 mass spectrum 上에 나타난 m/e 412 및 414 peak 가 Δ^7 sterol 인 α -spinasterol 및 stigmast-7-enol 에 의하여 나타난 것이라 推測하였고 또 acetate 의 mass spectrum 에서 P-60 (molecular ion-acetic acid) peak 即, m/e 394 및 396 peak 를 molecular ion peak (m/e 454 및 456)와 比較할때 그 intensity 의 比率로 보아 m/e 412 및 414 peak 는 Δ^5 sterol 인 β -sitosterol 및 stigmasterol 이 보다 많은 양이 存在할 것으로 推測하였다.

2) nmr 에 의한 檢討

Δ^5 와 Δ^7 sterol 의 $C_{18}-CH_3$ 및 $C_{19}-CH_3$ proton 의 chemical shifts 는 J.W. CLARK 와 I. DAINIS 의 研究⁴⁾에 의하여 Δ^7 sterol 이 Δ^5 sterol 에 比하여 훨씬 higher field

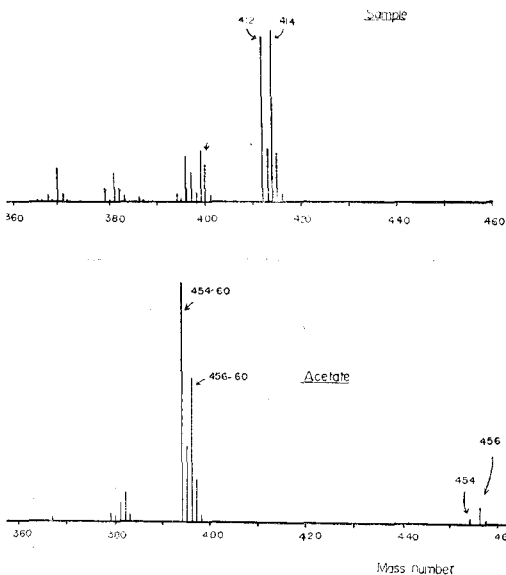


Fig. 5. Mass spectra of sample and its acetate.

에 나타나고 있음이 밝혀졌다. 그런데 本物質의 nmr spectrum 에서 32 c/s 에 나타난 $C_{18}-CH_3$ 의 signal⁵⁾은 분명히 higher field 에 나타나 있으므로 Δ^7 sterol 가 混合되어 있음을 推測하였다. (TABLE II).

또 本質의 nmr spectrum 에 있어서 CH_3 -proton 의 chemical shifts 가 多數 나타나고 있는 것은 本物質이 單一한 steroid 가 아니고 以上과 같이 混合되어 있음을 뒷받침하고 있는 것으로 思料된다.

이상의 檢討로 本物質은 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, α -spinasterol 및 stigmast-7-enol 등 5 種의 sterols 가 混合되어 있다고 推測하였다.

TABLE II. Chemical shifts of angular methyl groups (c/s from TMS)

sterols	Found		Calc.	
	19-CH ₃	18-CH ₃	19-CH ₃	18-CH ₃
Stigmasterol	60	42	63	42.5
β -Sitosterol	60	42	62.5	42.5
Stigmast-7-enol	48-49	32-34	48	33
α -Spinasterol	48-49	32-34	48.5	33

Sample: nmr(c/s); 228, 102, 63.6, 60, 57, 51.6, 43.8, 40.8, 32*.

끝으로 本研究을 지도하여 주신 서울大學校 藥學大學 李善宙박사님께 감사드리며, 아울러 시종일관 지도하여 주신 韓龜東박사님, 禹麟根소장님, 金濟勳 박사님께 深甚한 謝意를 表하며 각종 기기분석 측정을 주신하여준 日本 京都大學 藥學部 生藥學教室 新田先生과 本研究費의 일부를 보조하여 준 保健獎學會에 대하여 감사함을 드립니다.

<1973. 6. 1 접수>

문 헌

1. K.D. HAN and J.H. KIM, *Tetrahedron Letters*, No. 54, 4801(1969)
2. K.D. HAN and J.H. KIM, *ibid.*
3. J.H. KIM, *J. Pharm. Soc. Korea*, 16, 122(1972)
4. J.W. CLARK, LEWIS and I. DAINIS, *Aust. J. Chem.*, 20, 1961(1967)
5. Hiromi TERAUCHI, Shoji TAKEMURA *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 214(1970)
6. B.A. KNIGHTS, *J. Gas Chromat.*, 5, 273(1967)
7. Stephen S. FRIEDLAND and Georgy H. LANE, Jr., *Anal. Chem.*, 31, 169(1959)
8. F.F. KNAPP and H.J. NICHOLAS, *Phytochemistry*, 8, 207(1969)
9. Giovanni GALLI and Candro MARONI, *Steroids*, 10, 189(1967)
10. S.G. WILLIE and Carl DJERASSI, *J. Org. Chem.*, 33, 305(1968)