

산국 꽃의 Germacranolides

장대식, 박기훈, 양민석*

경상대학교 농과대학

Germacranolides from Flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino

Dae Sik Jang, Ki Hun Park and Min Suk Yang*

College of Agricultural, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract—Two sesquiterpene lactones were isolated from the flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino by the silica gel column chromatography and recrystallization. On the basis of spectrometric studies including $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, $^{13}\text{C-}^1\text{H COSY}$, IR and Mass, compounds 1 and 2 were identified as germacranolide, tulipinolide and costunolide, respectively. And they showed antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. This is the first report that *Chrysanthemum boreale* contained tulipinolide and costunolide.

Key words—*Chrysanthemum boreale*: Compositae; germacranolide; costunolide; tulipinolide; antibacterial activity.

산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)은 10~11월에 걸쳐 전국의 야산에서 1~1.5 cm 크기의 노란 꽃을 피우는 국화과(Compositae)의 다년생 초본으로서 꽃을 야국화(野菊花)이라 하여 감국(甘菊, *C. indicum*)과 함께 한방에서 주로 두통, 재풍열, 청혈해독 등에 주로 사용되어왔으며, 산국을 주성분으로 하는 국화주나 국화차는 신라시대부터 오늘날까지 음용하여 왔다.^{1,2)} 산국 꽃의 추출물에 대해서는 중추신경 진정작용이나, 혈압강화작용, 결핵균과 각종 바이러스에 대한 억제효과 및 폐암과 간암에 대한 효과를 비롯한 다양한 생리활성들이 알려져 있으나,³⁻⁵⁾ tetracosane과 같은 몇 가지 정유 성분⁶⁾이나 배당체인 acacetin-7-rhamnoglucoside⁷⁾가 검출된 바가 있을 뿐 아직까지 약효성분에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구자 등은 산국 꽃의 생리활성물질에 대한 연구의 일환으로, guaianolide계 sesquiterpene lactone인 cumambrin A를 분리하여 화학적 구조를 규명함바 있다.⁸⁾ 이 식물에 대한 계속적인 연구에 의해 2종의 germacranolide계 sesquiterpene lactone을 분리하여, 이화학적 성상과 분광학적인 자료를 토대로 이들의 화학적 구조를 동정하였으며, *Vibrio parahaemolyticus*를 비롯한 10종의 세균에 대한 항균활성을 시험하였기에 그 결과들을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료—1996년 10월~11월, 진양군과 함양군 일대에서 산국의 꽃을 채취하여 음건 세절한 후 분말로 하여 사용하였으며, 증거표본은 함양약초시험장 식물표본실에 보관되어있다.

*교신저자 : Fax 0591-57-0178

기기 및 시약-UV/Vis 실험은 Beckman DU-70 spectrophotometer, MS 실험은 DX300(JMX) mass spectrometer 그리고 IR 실험은 Bruker IFS66 spectrophotometer를 사용하였다. NMR 실험은 Bruker AW500을 사용하였으며, 내부표준 물질로는 tetramethylsilane(TMS)을, 용매로는 CDCl_3 를 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70~230, 230~400 mesh)을, 분리확인용 TLC는 Merck사의 No. 5715를 사용하였으며, 기타 시약은 특급 및 일급을 사용하였다.

추출 및 분리-음건·세절한 산국의 꽃 3 kg을 CH_2Cl_2 에 1일 침지하여 3회 추출한 후, lead acetate를 처리하여 색소나 페놀화합물이 어느 정도 제거된 조추출물을 얻었다. 조추출물은 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 0/1 \rightarrow 9/1$ 의 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 TLC pattern에 따라서 12개의 subfraction(F1~F15)으로 나누었으며, subfraction F5와 F6으로부터 반복적인 silica gel column chromatography와 재결정법을 이용하여 compound 1과 2를 각각 분리하였다.

화합물 1-F6 분획을 n-hexane/ethyl acetate = 9/1의 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시한 후 petroleum ether로 재결정하여 백색의 침상결정 99 mg을 얻었다.

mp: 185°C dec.; UV $\lambda_{\text{max}}(\text{CHCl}_3)$: 227 nm; MS $m/z(\text{EI}, 70 \text{ eV, rel. int.})$: 230($\text{M}^+ - 60$), 215, 119; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 2939, 2842, 1752, 1745, 1657; $^1\text{H-NMR}(500 \text{ MHz, CDCl}_3)$ δ : 1.57(d, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 3H), 1.71(d, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 3H), 2.06(m, 1H), 2.08(s, 3H), 2.18(m, 1H), 2.27(m, 1H), 2.30(m, 1H), 2.41(m, 1H), 2.51(m, 1H), 3.02(m, 1H), 4.75(m, 1H), 4.83(m, 1H), 4.91(m, 1H), 5.01(m, 1H), 5.81(d, $J = 2.3 \text{ Hz}$, 1H), 6.34(d, $J = 3.1 \text{ Hz}$, 1H); $^{13}\text{C-NMR}(125 \text{ MHz, CDCl}_3)$ δ : 17.0, 17.4, 21.2, 25.5, 38.6, 49.2, 52.8, 72.6, 78.4, 125.0, 127.5, 129.9, 131.9, 135.8, 142.2, 169.7, 169.9

화합물 2-F5 분획을 n-hexane/ethyl acetate = 19/1의 유출용매로 silica gel column chromatography와 toluene/ethyl acetate = 9/1을 전개 용매로 한 preparative TLC를 실시한 후 petro-

leum ether로 재결정하여 무색의 침상결정 30 mg을 얻었다.

mp: 172~174°C; UV $\lambda_{\text{max}}(\text{CHCl}_3)$: 227 nm; MS $m/z(\text{FAB}^+, \text{NBA})$: 232(M^+), 217, 109, 81; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 2945, 2820, 1754, 1620; $^1\text{H-NMR}(500 \text{ MHz, CD}_3\text{OD})$ δ : 1.42(s, 3H), 1.69(m, 1H), 1.70(d, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 3H), 2.04(m, 1H), 2.08(m, 1H), 2.12(m, 1H), 2.18(m, 1H), 2.23(m, 1H), 2.30(m, 1H), 2.45(dd, $J_1 = 13.5 \text{ Hz}$, $J_2 = 6.2 \text{ Hz}$, 1H), 2.57(m, 1H), 4.56(dd, $J_1 = 9.9 \text{ Hz}$, $J_2 = 8.7 \text{ Hz}$, 1H), 4.76(m, 1H), 4.85(m, 1H), 5.52(d, $J = 3.2 \text{ Hz}$, 1H), 6.25(d, $J = 3.6 \text{ Hz}$, 1H); $^{13}\text{C-NMR}(125 \text{ MHz, CDCl}_3)$ δ : 16.1, 17.4, 26.2, 28.1, 39.5, 41.1, 50.5, 81.9, 119.6, 127.1, 127.4, 137.0, 140.2, 141.5, 170.4

항균활성 실험-실험에 사용한 균주는 gram 양성균으로서 *Bacillus subtilis*(ATCC 9372), *Bacillus cereus*(ATCC 27348), *Staphylococcus aureus*(ATCC 13301), *Staphylococcus epidermidis*(ATCC 12228) 및 *Streptococcus faecalis*(IFO 3971), gram 음성균으로서 *Escherichia coli*(ATCC 15489), *Salmonella typhimurium*(ATCC 14028), *Vibrio parahaemolyticus*(ATCC 33844), *Klebsidia pneumoniae*(ATCC 13883) 및 *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 10490)를 한국중균협회에서 분양받아 사용하였다.

시료의 항균력은 한천배지확산법(disk-agar plate diffusion method)으로 측정하였다.⁹⁾ 즉, 시료용액을 0.45 μm membrane filter(Milipore, USA)로 여과하여 멸균된 filter paper disk(Toyo, 8 mm, Japan)에 흡수시킨 후, 용매를 완전히 휘산시키고 시험용 평판배지위에 놓아 밀착시키고 30°C의 incubator에서 24시간 배양한 다음 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하였다.

결과 및 고찰

산국의 꽃 3 kg으로부터 compound 1(99 mg)과 compound 2(30 mg)를 분리하였으며 이들은 10% 황산에 의하여 붉은 색으로 발색되었다.

Compound 1은 무색의 침상결정(mp 185°C

dec.)으로 IR spectrum에서 1752와 1745 cm^{-1} 에서 2개의 carbonyl group이 관찰되었다. MS spectrum에서 분자이온 peak $m/z=290$ 은 EI(70 eV)에서 관찰되지 않았지만 $m/z=248(\text{M}^+-42)$ peak와 $m/z=230(\text{M}^+-42-18)$ peak로부터 acetyl group이 존재함을 추정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 δ 5.52 ppm과 δ 6.23 ppm에서의 2개의 doublet으로부터 γ -lactone의 exocyclic α -methylene group이 존재함을 예상할 수 있었다. 그리고 $^{13}\text{C-NMR}$ 과 DEPT spectrum에서 3개의 CH_3 , 4개의 CH_2 , 5개의 CH 그리고 5개의 4차 탄소가 관찰되었으며, 이와 같은 결과들을 통해 compound 1의 분자식은 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4$ 로 추정할 수 있었다. $^{13}\text{C-}^1\text{H}$ COSY spectrum에서는 vinylic methylene 1개와 endo methylene 3개가 존재함을 알았으며, $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum에서, H 13a/b(5.80 ppm, 6.34 ppm)는 allylic 위치의 H7(3.02 ppm)과, H7은 H8(5.02 ppm) 및 H6(4.83

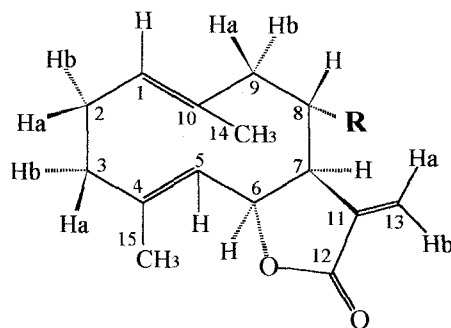
ppm)과, H8은 H9a/b(2.42 ppm, 2.52 ppm)와의 상관관계가 각각 관찰되었다. H6은 H5(4.74 ppm)와, H5는 allylic 위치에 있는 H15(1.68 ppm)와 상관관계가 관찰되었으며, H1(4.91 ppm)은 H2a/b(2.32 ppm, 2.27 ppm) 및 allylic 위치의 H14(1.57 ppm)와, H2a/b는 H3a/b(2.08 ppm, 2.32 ppm)와 각각 상관관계가 관찰되었다. HMBC 스펙트럼에서는 C1(129.9 ppm)이 H9a/b(2.52 and 2.42 ppm)와 강한 상관관계가 나타났으며, 또한 C5(127.5 ppm)는 H3a(2.32 ppm)와 상관관계가 나타났다. 이상의 분광학적 결과와 문헌의 자료를 비교해 본 결과, compound 1은 *Liriodendron tulipifera* 등의 식물에서 분리된 germacranolide인 tulipinolide¹⁰⁾로 동정하였으며, 이 화합물은 산국에서는 처음으로 분리 보고 되는 것이다.

Compound 2는 무색의 침상결정(mp 99~101 $^{\circ}\text{C}$)으로, IR spectrum에서 1754 cm^{-1} 의 carbonyl group이 관찰되었고, MS spectrum에서는 분자이온 peak가 $m/z=233(\text{M}^++\text{H})$ 에서 관찰되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 sesquiterpene lactone임을 예상하게 하는 2개의 doublet peak가 δ 5.51 ppm과 δ 6.26 ppm에서 관찰되었으며, 이와 같은 자료를 토대로 compound 2의 분자식은 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4$ 로 추정할 수 있었다. Compound 2의 $^{13}\text{C-}^1\text{H}$ COSY와 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum은 compound 1의 경우와 거의 유사하여 두 화합물의 골격이 같을 것으로 예상하였으며, 이상의 분광학적 결과를 문헌의 자료와 비교해 본 결과, compound 2는 *Peucephyllum schottii* 등의 식물로부터 분리

Table I. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data of compounds 1 and 2

Position	$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$	
	compound 1	compound 2	compound 1	compound 2
1	5.01 m	4.85 m	129.9	127.4
2	2.18 m	2.18 m	25.5	26.2
	2.27 m	2.23 m		
3	2.06 m	2.04 m	38.6	39.5
	2.30 m	2.30 m		
4	-	-	131.9	137
5	4.75 m	4.76 m	127.5	127.1
6	4.83 m	4.56 dd(9.9, 8.7)	78.4	81.9
7	3.02 m	2.57 m	52.8	50.5
8	5.01 m	2.08 m	72.6	28.1
		1.69 m		
9	2.41 m	2.45 dd(13.5, 6.2)	49.2	41.1
	2.51 m	2.12 m		
10	-	-	135.8	140.2
11	-	-	142.2	141.5
12	-	-	169.9	170.4
13	6.34 d(3.1)	6.25 d(3.6)	125.0	119.6
	5.81 d(2.3)	5.52 d(3.2)		16.1
14	1.57 d(1.4)	1.42 s	17.0	17.4
15	1.71 d(1.4)	1.70 d(1.4)	17.4	-
1'	-	-	169.7	-
2'	2.08 s	-	21.2	-

Coupling constants ($J=\text{Hz}$) are given in parentheses



Compound 1 R = OAc

Compound 2 R = H

Fig. 1. Chemical structures of compounds 1 and 2.

Table II. Antibacterial activity of compounds 1 and 2 isolated from flowers of *C. boreale* against 10 bacteria

Bacteria	Compounds	
	Compound 1	Compound 2
<i>E. coli</i>	-	-
<i>S. typhymurium</i>	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	14*(4)**	11(15)
<i>K. pneumoniae</i>	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	9(50)	-
<i>B. subtilis</i>	18(6)	11(15)
<i>B. cereus</i>	13(10)	10(25)
<i>S. aureus</i>	11(16)	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-
<i>S. faecalis</i>	-	-

*Diameter of clear zone (mm), 100 µg/disk

**MIC by paper disk-agar diffusion method (µg/disk)

된 costunolide¹¹⁾인 것으로 동정하였으며 이 화합물 역시 산국에서는 처음으로 분리되는 화합물이다.

Compound 1(tulipinolide)과 compound 2(costunolide)에 대한 항균성 실험결과(Table II), 두 물질 모두 실험에 사용한 10종의 세균 중에서 *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* 및 *Staphylococcus aureus*에 대해 활성을 나타내었으며, compound 1이 compound 2보다 더 강한 항균활성을 보였다.

결 론

산국 꽃의 CH₂Cl₂ 추출물에 lead acetate를 처리하여 얻어진 조추출물로부터 silica gel column chromatography와 재결정법을 이용하여 2종의 화합물을 분리하였다. 이 화합물들에 대한 항균성 실험결과, 실험에 사용한 10종의 세균 중에서 *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* 및 *Staphylococcus aureus*에 대해 활성을 나타내었으며, 1D-NMR 및 2D-NMR을 비롯한 분광학적 자료와 문헌의 자료를 비교해 본 결과 germacranolide계 sesquiterpene lactone인 tulipinolide와 costunolide인 것으로 동정되

었다. 이들은 산국에서는 처음으로 분리·보고되는 화합물이다.

사 사

이 연구는 1997년도 농림부에서 시행한 농림수산 특정연구사업의 연구결과 중 일부입니다.

인용문헌

- 고경식, 김민석 (1991) 원색한국식물도감, 329. 아카데미서적, 서울.
- 김태성 (1993) 약이 되는 야생초, 19. 대원사, 서울.
- 우원식 (1975) 국산생약(식물)의 생물학적 검색. 서울대학교 생약연구소 업적집 14: 69-74.
- 竹谷孝一, 系川秀治 (1993) 東洋資源植物學會, 1993年度 天然抗癌資源의 開發에 關한 國際學術會議 生物活性 스크리닝による 天然物 資源からの 抗腫瘍活性物質의 分離, 同定.
- 김수철 (1993) 東洋資源植物學會, 1993年度 天然抗癌物質의 開發에 關한 國際學術會議 백두산 향암식물 유전자원의 조사연구.
- 육창수 (1990) 원색한국약용식물도감, 536. 아카데미서적, 서울.
- Dan, B. and Andrew, G. (1986) Chinese herbal medicine, 59. Eastland Press, Seattle.
- Yang, M. S., Park, K. H., Jang, D. S., Choi, S. U., Nam, S. H. and Mooto, S. (1996) Cumambirin A in *Chrysanthemum boreale* Makino. *Kor. J. Pharmacogn.* 27(3): 207-211.
- Piddok, L. J. V. (1990) Techniques used for the determination of antibacterial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 307-318.
- Raymond, W. D. and Farouk, S. E. F. (1970) The structure of tulipinolide and epitulipinolide. Cytotoxic sesquiterpenes from *Liriodendron tulipifera* L. *J. Org. Chem.* 35(6): 1928-1936.
- Adewole, L. O., Shichih, L., Alice, M. C., Charles, D. H. and Robin, D. R. (1994) Sesquiterpene lactones from *Peucephyllum schottii*. *Phytochem.* 35(1): 191-194.

(1998년 3월 20일 접수)