

식용식물자원으로부터 활성물질의 탐색-VI. 쑥갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)으로부터 sterol의 분리

송명종 · 홍윤희 · 김동현 · 김대근¹ · 정인식 · 이윤형
김성훈² · 박미현³ · 김인호⁴ · 권병욱⁵ · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹우석대학교 약학대학,
²경희대학교 동서의학대학원, ³(주)이룸라이프, ⁴한국식품개발연구원, ⁵한국생명공학연구원

(2003년 6월 10일 접수, 2003년 6월 30일 수리)

쑥갓의 지상부를 MeOH로 추출하고, 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배, 추출하였다. EtOAc 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 3종의 sterol을 분리하였다. 각각의 화학구조는, NMR 및 MS 등의 스펙트럼을 해석하여, stigmast-5-en-3 β -ol (1, β -sitosterol), stigmast-4-en-6 β -ol-3-one (2), stigmast-4-en-6 α -ol-3-one (3)으로 동정하였다. 화합물 2와 3은 육상식물에서는 처음으로 분리되었다.

Key words: 쑥갓, sterol, stigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol), stigmast-4-en-6 β -ol-3-one, stigmast-4-en-6 α -ol-3-one

서 론

일상 생활에서 식용으로 이용되는 식물 중에는 영양적인 면에서의 효용성뿐만 아니라, 인체기능을 향상시키거나 약리학적인 활성을 가지고 있는 것들이 많이 있다. 그러나, 아직까지는 대부분의 식품에 대하여 영양학적인 가치 이외의 약리 활성에 관해서는 밝혀진 바가 매우 적다. 따라서, 이런 식품들의 인체에 미치는 여러 가지 활성을 밝히게 되면, 수요층이 더욱 확대되고, 부가가치가 높아져 농업에 있어서의 주요한 소득작물로 자리잡을 수 있을 것이다. 저자 등은 고구마,¹⁾ 호박잎,²⁾ 달래,^{3,4)} 및 상추로부터⁵⁾ 기능성 이차대사산물을 분리한 바가 있다. 쑥갓은 동아시아 지역에서 많이 섭취되고 있는데, 그 성분연구는 어느 정도 이루어져 있으나, 각 성분에 대한 활성에 관한 연구는 거의 보고되고 있지 않다. 따라서, 쑥갓의 이차대사산물에 대한 활성을 규명하기 위하여 본 연구를 시작하게 되었다.

쑥갓은 국화과(Compositae)에 속하는 1년생 초본 식물로 우리 나라 전역에서 재배하고 있다. 쑥갓은 식용으로 뿐만 아니라 한방에서는 쑥갓의 경엽을 동호(동蒿)라 부르며, 심기를 편하게 하며 비위를 보양하고, 담즙을 삭히는 효능이 있다고 알려져 있다.⁶⁾ 쑥갓에는 향긋한 맛이 있어 입맛을 돋우고 장의 기능을 활발히 해준다 하여 변비 치료에 이용되기도 한다.⁶⁾ 주요 성분으로는 essential oil,⁷⁾ quercetin, quercetagenin, luteolin,⁸⁾ polyacetylene,^{9,11)} cyclopentanoid 화합물인 chrycorin, chrycolide¹¹⁾ 등의 물질이 분리되어 보고된 바 있다.

본 실험에서 저자 등은, 쑥갓 지상부 MeOH 추출물의 EtOAc 분획으로부터 3종의 sterol 화합물을 분리하였다. 이 중 2종의 sterone 화합물은 육상식물에서는 처음 분리되었다. 각

화합물의 chromatography를 이용한 분리, 정제 및 NMR 등을 이용한 구조 동정에 관해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

기기 및 시약. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70~230 mesh)를 사용하였고, TLC는 Kiesel gel 60 F₂₅₄(Merck, Germany)를 사용하였다. 시료의 추출과 분획에 사용한 유기용매는 대정화학주식회사와 삼정화학주식회사에서 생산한 1급 시약을 사용하였다. 기기분석에 사용된 NMR용 용매는 CDCl₃(Merck, Germany)의 특급시약을 사용하였다. TLC 상의 물질 검출에는 UV lamp와 10% aq. H₂SO₄를 사용하였다. Melting point는 Fisher-John's Melting Point Apparatus (Fisher scientific, USA)를 사용하여 측정하였으며, 미보정하였다. 흡광도는 UV-1601, UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를, 비선광도는 Polarimeter P-1010(JASCO, Japan)로, EI/MS는 JMSAX 505-WA(JEOL, Japan)를 사용하여 측정하였다. IR은 Spectrum One, FT-IR spectrophotometer (Perkin-Elmer, UK)로 측정하였고, NMR은 400 MHz, Inova AS 400, FT-NMR spectrometer(Varian, USA)로 측정하였다.

실험재료. 본 실험에서 사용한 쑥갓(*Chrysanthemum coronarium* L.)은 2000년 12월 경기도 양주시의 쑥갓 농장에서 구입한 것으로, 판매가 가능할 정도의 성숙단계였으며, 초장(뿌리 포함)은 약 1m에 가까운 상태였다.

활성물질의 분리. 생체 100 kg을 먼저 지하부(뿌리 20 kg)와 지상부(줄기, 잎 80 kg)로 나누고, 그 중 지상부만을 100% MeOH(40 l x 3)로 24시간, 3번 반복하여 추출하였다. 얻어진 추출물을 감압농축하고, 얻어진 농축액을 EtOAc(2 l x 3)와 H₂O (2 l)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 *n*-BuOH(2 l x 3)로 분배 추출하였다. 이를 감압 농축하여, EtOAc 분획(168 g), *n*-BuOH 분획(92 g) 및 H₂O 분획을 얻었다.

*연락처
Phone: 82-31-201-2661; Fax: 82-31-201-2157
E-mail: nibaek@khu.ac.kr

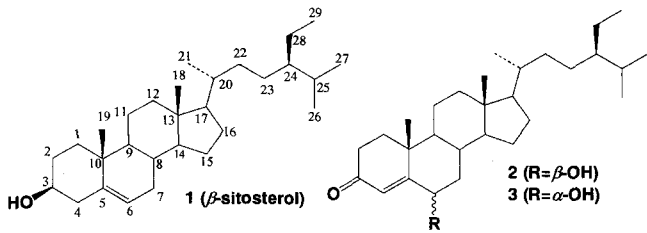


Fig. 1. Chemical structure of the steroid compounds from the aerial parts of the *Chrysanthemum coronarium* L. (Garland).

EtOAc분획(168 g)으로부터 silica gel(1500 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOAc = 7 : 1 → 6 : 1 → 5 : 1 → 4 : 1 → 3 : 1 → 2 : 1 → 1 : 1)하여 150 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC(*n*-hexane-EtOAc = 6 : 1, 4 : 1, 2 : 1)로 확인하여, 유사한 부분들을 함께 모으고, 농축하여 12개의 분획물(CSE1~CSE12)을 얻었다.

6번째 분획물(CSE-6, 12.45 g)에 대하여 다시 silica gel(450 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOAc = 6 : 1)하여 7개의 분획물(CSE-6-1~CSE-6-7)을 얻었고, 그 중에서 5번째 분획물(CSE-6-5, 3.0 g)에 대하여 다시 silica gel(400 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOAc-MeOH = 10 : 1 : 1)하여, 화합물 1(450 mg, β -sitosterol)¹²⁾을 분리하였다.

화합물 1(β -sitosterol)¹²⁾: white powder(*n*-hexane-CHCl₃); mp 140°C; UV λ_{max} (CHCl₃) 190 nm, 215 nm(weak); [α]_D -37° (21°C, c = 0.6, CHCl₃).

위에서 얻어진 8번째 분획(CSE-8, 2.4 g)에 대하여 silica gel(300 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOAc = 4 : 1 → 3 : 1)하여 6개의 분획물(CSE-8-1~CSE-8-6)을 얻었으며, 이 중 3번째 분획물(CSE-8-3, 910 mg)에 대하여 silica gel(200 g) column chromatography(*n*-hexane-CHCl₃-EtOAc = 4 : 2 : 1)하여 10개의 분획물(CSE-8-3-1~CSE-8-3-10)을 얻었다. 이 중에서, 3 번째 분획물(CSE-8-3-6, 124 mg)에 대하여 silica gel(150 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOAc = 3 : 1)하여 화합물 2 (24 mg, stigmast-4-en-6 β -ol-3-one)와 화합물 3(60 mg, stigmast-4-en-6 α -ol-3-one)를 분리하였다.¹²⁾

화합물 2(stigmast-4-en-6 β -ol-3-one); white powder(CHCl₃); mp 186°C; UV λ_{max} (CHCl₃) 238 nm(weak); [α]_D +11°(21°C, c = 0.7, CHCl₃); EI/MS *m/z* (70 eV): 428 [M⁺], 413, 410, 287; IR(KBr, cm⁻¹): 3570, 1675, 1640; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 5.78 (1H, br. s, H-4), 4.31 (1H, br. s, H-6), 1.34 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-21), 0.81 (3H, t, *J* = 7.6 Hz, H-29), 0.80 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-27), 0.78 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.71 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 200.40(C-3), 168.53(C-5), 126.17(C-4), 73.19(C-6), 56.04(C-14), 55.87(C-17), 53.61(C-9), 45.82(C-24), 42.52(C-13), 39.61(C-12), 38.57(C-7), 38.02(C-10), 37.10(C-1), 36.15(C-20), 34.29(C-22), 33.91(C-2), 29.75(C-8), 29.16(C-25), 28.23(C-16), 26.10(C-23), 24.20(C-15), 23.10(C-28), 21.02(C-11), 19.88(C-26), 19.55(C-19), 19.08(C-27), 18.78(C-21), 12.08(C-29), 12.04(C-18).

화합물 3(stigmast-4-en-6 α -ol-3-one); white powder(CHCl₃); mp 120°C; UV λ_{max} (CHCl₃) 243 nm(weak); [α]_D +100° (21°C, c = 0.5, CHCl₃); EI/MS *m/z* (70 eV): 428 [M⁺], 413, 410, 287; IR(KBr, cm⁻¹): 3570, 1675, 1640; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ): 6.17 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-4), 4.32 (1H, ddd, *J* = 12.0, 5.6, 1.6 Hz, H-6), 1.17 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-21), 0.86 (3H, t, *J* = 7.6 Hz, H-29), 0.85 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.82 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-27), 0.71 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ): 199.50(C-3), 171.71(C-5), 119.52(C-4), 68.66(C-6), 55.94(C-14), 55.55(C-17), 53.74(C-9), 45.81(C-24), 42.46(C-13), 41.46(C-7), 41.46(C-12), 39.46(C-10), 36.27(C-1), 36.12(C-20), 34.17(C-22), 33.82(C-2), 29.75(C-8), 29.15(C-25), 28.19(C-16), 26.06(C-23), 24.23(C-15), 23.10(C-28), 21.07(C-11), 19.87(C-26), 19.07(C-19), 18.75(C-27), 18.33(C-21), 12.04(C-29), 12.00(C-18).

결과 및 고찰

식용 식물자원으로부터 활성물질을 탐색하기 위한 연구로써, 쑥갓을 MeOH로 추출하였고, 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH, H₂O로 분배 추출하였다. 3개의 분획중 EtOAc 분획에 대하여, silica gel column chromatography를 반복하여 3개의 sterol 화합물 1(수율; 5.6 × 10⁻⁶ %), 2(수율; 0.3 × 10⁻⁶ %), 3(수율; 0.8 × 10⁻⁶ %)을 분리하였다.

화합물 1은 NMR spectrum을 비교한 결과, 여러 가지 식물에서 널리 함유되어있는 sterol인, stigmast-5-en-3- β -ol(β -sitosterol)로 동정하였다.

화합물 2, white powder(CHCl₃), [α]_D +11.4°,는 IR로부터 수산기(3570 cm⁻¹), 이중결합(1675 cm⁻¹) 및 ketone(1640 cm⁻¹)의 작용기를 갖는 것으로 확인하였다. ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) spectrum의 olefine 영역에서 δ_H 5.78(1H, br. s)이, oxygenated methine proton 영역에서 δ_H 4.31(1H, br. s)이 관측되었다. 또한, 2.60~1.00 ppm에서 복잡한 methine과 methylene proton signal이 관측되었으며, 6개의 methyl proton이 δ_H 1.34과 δ_H 0.71에서 singlet으로, δ_H 0.89, δ_H 0.80 및 δ_H 0.78에서 doublet으로, δ_H 0.81에서 triplet으로 관측되었다. 따라서, 이 화합물 2는 이중결합이 1개, 수산기가 1개 결합하고 있는 steroid 화합물로 판단되었다.

¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) spectrum에서, 29개의 탄소 signal이 관측되었으며, δ_C 200.40에서 ketone signal이 관측되었고, δ_C 168.53에서 olefinic quaternary와 δ_C 128.17에서 olefinic methine signal이 관측되었다. 또한, δ_C 73.19에서 oxygenated methine signal이 관측되었다. 그리고, 고자장 영역에서, quaternary 2개와 methine 7개, methylene 10개, methyl 6개의 signal이 관측되었다. 이와 같은 결과를 종합하여, 화합물 2는 이중결합, 수산기 및 ketone을 각각 1개씩 갖는 탄소수 29개의 sterone 화합물로 동정하였다. 이중결합, 수산기, ketone, 6개의 methyl기의 위치를 확인하기 위해서, ¹H-¹H gCOSY, gHSQC, gHMBC등의 2D-NMR을 측정하였다.

화합물 2의 gHSQC spectrum을 토대로, $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 triplet으로 관측된 H-29(δ_{H} 0.81) methyl signal과 doublet으로 관측된 H-21(δ_{H} 0.89), H-26(δ_{H} 0.78), H-27(δ_{H} 0.80) 3개의 methyl signal, 그리고, singlet으로 관측된 H-18(δ_{H} 0.71), H-19(δ_{H} 1.34) 2개의 methyl signal을 정확히 assign 할 수 있었다. gHMBC spectrum에서, H-4(δ_{H} 5.78)의 signal과 C-2(δ_{C} 33.92), C-6(δ_{C} 73.19), C-10(δ_{C} 38.02)의 signal과의 사이에서 cross peak가 관측된 점으로부터, 이중 결합과 수산기의 위치를 각각 C4/C5와 C6로 확인할 수 있었다. 또한, 수산기가 치환된 위치를 확인하기 위하여, gCOSY를 측정하였는데, gCOSY spectrum에서 δ 4.31에서 관측된 signal(H-6)이, methylene의 H-7 및, methine의 H-8과 correlation하고 있음이 확인되어, 6번 위치에 수산기가 치환되어져 있음을 확인하였다. 또한, gHMBC spectrum을 통해서, ketone의 C-3 carbon signal(δ_{C} 199.50)이 H-2의 methylene과 H-4의 이중결합 signal과 서로 correlation함을 확인하였고, 이중결합의 H-4가 ketone의 C-3, 이중결합의 quaternary carbon인 C-5와 correlation함을 확인하였다. 또한, 수산기의 H-6이 이중결합의 methine carbon인 C-4와 quaternary carbon인 C-5, 그리고, methylene인 C-7와 correlation함을 보여줌으로써, ketone carbon(C-3), olefinic methine carbon(C-4), olefinic quaternary carbon(C-5), oxygenated methine carbon(C-6)으로 이어지는 일련의 순서를 결정할 수 있었다. 이를 종합하여, 화합물 2는 stigmast-4-en-6-ol-3-one으로 동정하였다.

화합물 3, white powder(CHCl_3), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +100^\circ$,은 NMR spectrum을 비교한 결과, 화합물 2와 매우 유사하였다. 다만, 다른 점은 oxygenated methine 탄소인 C-6의 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서의 chemical shift(2: 73.19, 3: 68.66)와 $^1\text{H-NMR}$ 에 있어서의 chemical shift(2: 4.31, 3: 4.32)와 coupling pattern(2: br. s, 3: ddd, $J = 12.0, 5.6, 1.6$ Hz)만이 다르게 관측되어, 2개의 화합물은 6번 수산기의 입체배치만이 다른 입체이성질체로 판명되었다. Coupling pattern으로부터, 화합물 2는 수산기가 β 결합하고, 화합물 3은 α 결합하고 있는 것으로 추정되었다. 이를 확인하기 위하여 화합물 3에 대하여 NOESY를 측정할 결과, β 배치를 취하고 있는 H-19 methyl signal과 H-6 signal 사이에서 cross peak가 관측되어 H-6도 β 배치를 취하고 있음이 판명되었다. 따라서, 6번에 결합된 수산기가 화합물 2의 경우는 β 결합, 화합물 3의 경우는 α 결합하고 있는 것으로 밝혀져, 최종적으로 각각의 구조를 stigmast-4-en-6 β -ol-3-one(2), stigmast-4-en-6 α -ol-3-one(3)로 결정할 수 있었다.

화합물 1(β -sitosterol)은 거의 모든 지상 식물에 포함되어 있는 sterol로 잘 알려져 있다. 화합물 2와 3은 화합물 1을 골격으로 하여, C3의 수산기가 산화되어져, ketone으로 변하였고, C5/C6 사이의 이중결합이, C6에 수산기가 치환되면서, C4/C5로 이동하여 생성된 것으로 추정되었다. 화합물 2, 3은 해상식물에서는 Greca 등에 의해서 분리, 보고되었으나,¹²⁾ 육상식물에서는 이번에 처음 분리되었다. 또한, sterone 화합물 중에서, 화합물 2, 3과 같이 공역 ketone을 이루는 sterone으로 ecdysone¹³⁾이 잘 알려져 있다. 이 화합물은 곤충 탈피 호르몬으로써, 이 물질의 조절에 따라서, 곤충 방제가 가능하다고 알려져 있다.

육상 식물에서 얻은 이 화합물 2와 3은 공역 ketone을 이루는 구조로써, 여러 가지 생리 활성을 보일 것으로 기대되어 현재, 항산화 활성을 비롯한 여러 가지 활성을 검증하고 있다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업과 경희대 식물대 사연구센터(한국과학재단)에서 지원하는 연구비로 수행되었음.

참고문헌

- Baek, N.-I., Ahn, E. M., Bang, M. H. and Kim, H. Y. (1997) Deveolpment of biologically active compounds from edible plant sources-I. Isolation of major components from the tuber of *Ipomoea batatas* Lam. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **40**, 583-587.
- Han, J. T., Ahn, E. M. and Baek, N.-I. (1999) Deveolpment of biologically active compounds from edible plant sources-II. Isolation of fatty acids and sterol glycosides from the leaves of *Cucurbita moschata* DUCH. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 267-270.
- Ahn, E. M., Jang, T. H. and Baek, N.-I. (2000) Deveolpment of biologically active compounds from edible plant sources-III. Isolation of flavonoid-glycosides from the *Allium monanthum* Max. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 314-316.
- Baek, N.-I., Ahn, E. M., Kim, H. Y., Park, Y. D., Chang, Y. J. and Kim S. Y. (2001) Deveolpment of biologically active compounds from edible plant sources-IV. Isolation of galactosyldiglycerides from the *Allium monanthum* Max. *Korean J. Life Sci.* **11**, 93-96.
- Jang, T. O., Bang, M. H., Song, M. C., Hong, Y. H., Kim, J. Y., Chung, D. K., Pai, T. K., Kwon, B. M., Kim, Y. K., Lee, H. S., Kim, I. H. and Baek, N.-I. (2003) Deveolpment of biologically active compounds from edible plant sources-V. Phytol, ACAT (Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase) inhibitory diterpenoid from the leaves of *Lactuca sativa* L. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 267-270.
- Jung, E. B. and Shin, M. K. (1990) In '*Hyang Yak Dae Sa Jun*', Young Lim Sa(3rd ed.), Seoul, Korea.
- Kameoka, H., Kitagawa, C. and Husebe, Y. (1975) The constituents of the steam volatile oil from *Chrysanthemum coronarium* L. var *spatiosum*. *J. Agri. Chem. Soc. Japan* **49**, 652-657.
- Anyos, T. and Steelink, C. (1960) Fluresent petal constituents of *Chrysanthemum coronarium* L. *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 63-67.
- Bohlmann, F. and Fritz, U. (1979) *Neue lyratolester aus chrysanthemum coronarium*. *Phytochem.* **18**, 1888-1889.
- Sanz, J. F., Falco, E. and Marco, J. A. (1990) New acetylenes from *Chrysanthemum coronarium* L. *Liebigs Ann. Chem.* **90**, 303-305.
- Mahahiro, T. and Kazuhiro, C. (1984) Novel plant growth inhibitors and an insect antifeedant from *Chrysanthemum coronarium* L. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1367-1369.
- Greca, M. D., Monaco, P. and Previtiera, L. (1990) Stigmaterols from *Typha latifolia*. *J. Nat. Prod.* **53**, 1430-1435.
- James, A. and Svoboda. (1994) Steroid metabolism as a target for insect control. *Lipid Biochem. Pesti. Act.* **22**.

Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources-VI. Isolation of Sterol Compounds from the Aerial Parts of Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.)

Myoung-Chong Song, Yoon-Hee Hong, Dong-Hyun Kim, Dae-Keun Kim¹, In-Sik Chung, Youn-Hyung Lee, Sung-Hoon Kim², Mi-Hyun Park³, In-Ho Kim⁴, Byoung Mog Kwon⁵ and Nam-In Baek* (*Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, KyungHee University, Suwon, 449-701; ¹Department of Pharmacy, Woosuk University, Jeonbuk, 565-701; ²Graduate School of East-West Medical Science, KungHee University, Suwon, 449-701; ³Erom Life Co. Ltd., Seoul, 135-825; ⁴Korea Food Research Institute, Sungnam, 463-746, Korea; ⁵Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea*)

Abstract: The aerial parts of the Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.) were extracted in MeOH and solvent fractionated with EtOAc, *n*-BuOH and water, successively. EtOAc fractions gave three steroid compounds through application of silica gel column chromatographies. The chemical structures of the steroids were determined by the interpretation of several spectral data, including NMR and MS as stigmast-5-en-3 β -ol (**1**, β -sitosterol), stigmast-4-en-6 β -ol-3-one (**2**), stigmast-4-en-6 α -ol-3-one (**3**). Compounds **2** and **3** have been so far reported only in the aquatic plants, were isolated for the first time from the land plants.

Key words: garland, *Chrysanthemum coronarium* L., sterol, stigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol), stigmast-4-en-6 β -ol-3-one, stigmast-4-en-6 α -ol-3-one

*Corresponding author