

구절초 꽃의 항균성 물질

장대식 · 박기훈 · 최상욱¹ · 남상해² · 양민석*

경상대학교 농화학과, ¹경상대학교 공동실험실습관, ²진주 산업대학교 식품가공학과,
식물분자생물학 및 유전자조작연구소

초록 : *Chrysanthemum*屬 식물의 성분 및 생리활성물질에 대한 연구의 일환으로, 구절초 꽃의 chloroform 분획물을 재료로 *B. subtilis*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus*에 대한 activity-guided fractionation을 실시하여 항균성 물질 두가지를 얻었다. 항균력실험 결과, 화합물 I은 100 µg/disk의 농도에서 세가지균주 모두에 활성이 있었고 화합물 II는 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에만 활성이 나타났다. 화합물 I과 화합물 II는 현재 식품보존료로 사용되는 benzoic acid 및 sorbic acid와 비교해볼 때, *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 대략 5배정도 강한 항균력을 나타내었다. ¹H, ¹³C NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H COSY 및 Mass spectrum 등을 분석한 결과, 화합물 I과 II는 sesquiterpene lactone인 angeloylcumambrin B(C₂₈H₄₆O₈, MW=346)와 cumambrin A(C₁₇H₂₆O₈, MW=306)로 각각 동정되었으며 이들은 구절초에서는 처음 분리되었다.(1996년 9월 20일 접수, 1996년 11월 11일 수리)

서 론

새로운 생리활성물질의 개발과 국내자생식물에 대한 성분연구의 일환으로, 저자 등은 *Chrysanthemum*屬 식물 5종 9부위를 수집하여 이들에 대한 항균성을 조사한 결과, 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura) 꽃의 chloroform 분획물이 산국(*Chrysanthemum boreale* Makino)과 함께 강한 항균활성이 있음을 확인하였다.¹⁾ 따라서, 구절초 꽃의 chloroform 분획물에 대해 activity-guided fractionation을 실시하여 항균유효성분으로 예상되는 두가지 화합물을 분리하여 ¹H, ¹³C NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H COSY 및 Mass spectrum 등을 토대로 화학구조를 결정하였기에 그 결과를 보고한다.

구절초는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 전초를 부인병 및 위장병 등^{2,3)}에 사용하여 왔다. 감국(*C. indicum* L.)과 속갯(*C. coronarium*)을 제외한 다른 *Chrysanthemum*屬 식물과 마찬가지로, 구절초의 경우 민간이나 한방에서의 비교적 폭넓은 사용에도 불구하고, 신⁴⁾ 등이 정유성분인 bornyl acetate, borneol 및 chamazulene을 검출한 것 등을 제외하면 아직까지 약효성분에 대한 보고가 별로 없다.

재료 및 방법

식물체 재료

본 실험에 사용한 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitam.)의 꽃은 대한식물도감⁵⁾과 원색한국식물도감⁶⁾ 등을 참고로 하여 진주시 부근의 자생지에서 채취, 동정하여 음건하였고, 음건된 식물체는 세절하여 분쇄한 후 실험재료로 사용하였다.

사용균주 및 재료

실험에 사용한 균주는 gram 양성균으로서 *Staphylococcus aureus* ATCC 13301과 *Bacillus subtilis* ATCC 9372, gram 음성균으로서 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844를 한국중균협회에서 분양받아 사용하였다. 균 생육배지로는 nutrient agar를 사용하였는데 *V. parahaemolyticus*의 경우에는 nutrient agar배지에 3% NaCl을 첨가하여 사용하였다.

항균력 실험

시료의 항균력 검색은 한천배지확산법(disk-agar plate diffusion method)으로 측정하였다.⁷⁾ 즉, 시료용액을 0.45 µm membrane filter (Milipore社, USA)로 여과하여 제균하고 멸균된 filter paper disk (Toyo, 8 mm, Japan)에 20 µl씩을 흡수시킨 후, 용매를 완전히 휘산시키고 시험용 평판배지위에 놓아 밀착시키고 4°C 냉장고에서 1시간 방치한 후, 30°C의 incubator에서 24~48시간 배양한 다음 disk 주변의 clear zone의 직경(mm)을 측정하였다.⁸⁾ 양성 대조구로서 현재 식품보존료로 사용하고 있는 benzoic acid와 sorbic acid⁹⁾를 사용하였다.

유효성분의 분리

구절초 꽃(500 g)의 chloroform 분획물 20 g을 소량의 chloroform에 용해시킨 후 silica gel(70~230 mesh ASTM)로 충전시킨 column(5×20 cm)에 loading을 하여 methanol/chloroform의 비율을 순차적으로 높이면서 column chromatography를 실시하여 얻어진 분획물들에 대한 항균실험을 수행하였다. 활성분획을 chloroform : methanol=99 : 1을 용매로 한 2차 column chromato-

찾는말 : 구절초, 항균성, angeloylcumambrin B, cumambrin A
*연락처

Table 1. Physico-chemical data of the compounds I and II isolated from the flower of *Chrysanthemum zawadskii* Herbach var. *latilobum* Kitam

Compounds	Rf value*		Colorization**			Appearance	[α] _D ²⁵ (CHCl ₃ , c 0.68)	M ⁺	mp (°C)	UV λ_{max} (EtOH)
	H:E=6:4	C:M=19:1	H ₂ SO ₄	PMA	SbCl ₃					
I	0.60	0.85	purple	gray	purple	colorless oil	+105°	346	-	215 nm
II	0.20	0.50	purple	gray	purple	white powder	+101°	306	182	235 nm

*H: n-hexane, E: ethyl acetate, C: chloroform, M: methanol **H₂SO₄: 10% H₂SO₄ (in H₂O) spray, 100°C, 5 min. PMA: 10% Phosphomolybdic acid (in H₂O) spray, 100°C, 5 min. SbCl₃: 5% SbCl₃ (in CHCl₃) spray, 100°C, 5 min.

graphy(silica gel 70~230 mesh, column 3×20 cm)를 통해 보다 정제된 다음, chloroform : methanol=199 : 1을 용매로 하여 3차 column chromatography(silica gel 230~400 mesh column 2×15 cm)를 실시하여 활성분획을 모았다. 이것을 chloroform : methanol=49 : 1을 용매로 한 preparative TLC(silica gel, 0.25 mm, Merck)를 실시하여 화합물 I(30 mg)과 diethyl ether로 재결정하여 화합물 II (360 mg)를 얻었다.

구조분석

적외선 스펙트럼은 Bruker IFS66 분광기(FT-IR)를 사용하여 얻었으며, 자외선-가시광선 스펙트럼은 Beckman DU-70 분광기를 이용하여 얻었다. 핵자기 공명(¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H COSY) 스펙트럼은 Bruker-AW500 분광기를 이용하여 측정하였다. 화학적 이동값(chemical shift)은 tetramethylsilane(TMS)을 기준물질로 하여 ppm으로 나타내었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 나타난 단일선, 이중선, 삼중선, 다중선을 각각 s, d, t, m으로 표시하였다. 질량스펙트럼은 JMS-DX300 분광기를 사용하여 얻었다.

결과 및 고찰

항균물질의 분리 및 항균활성

구절초 꽃의 chloroform 분획물에 존재하고 있는 항균성 물질을 분리하기 위해, silica gel column chromatography를 반복적으로 실시한 후, preparative TLC를 이용하여 화합물 I을 얻었으며 diethyl ether로 재결정을 반복하여 화합물 II를 얻었다. 화합물 I과 화합물 II에 대한 물리·화학적 인 자료는 Table 1과 같다. 두가지 화합물 모두 황산발색시약에서 자주색으로 나타났으며 phosphomolybdic acid 및 SbCl₃에 양성반응을 보였다.

분리된 두 화합물에 대한 항균력실험 결과(Table 2), 화합물 I은 100 µg/disk의 농도에서 세가지 세균 모두에 활성이 있었고, 화합물 II는 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 만 활성이 나타났다. 화합물 I과 화합물 II는 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 현재 식품보존료로 사용되는 benzoic acid 및 sorbic acid를 500 µg/disk의 농도로 하였을 때와 비슷한 활성을 보여 이들 보존료에 비하여 대략 5배정도 더 강한 항균력을 나타내었다.

유효성분의 구조분석

Table 2. Antibacterial activities of the compounds isolated from the flower of *Chrysanthemum zawadskii* Herbach var. *latilobum* Kitamura

Compounds	Diameter of clear zone (mm)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Compound I*	12	10	11
Compound II*	13	-	12
Benzoic acid**	12	13	12
Sorbic acid**	11	11	10

*100 µg/disk, **500 µg/disk

Table 3. ¹H-NMR spectral data of compounds I and II (in CDCl₃, 500 MHz, chemical shifts in ppm)

Proton No.	Compound I	Compound II
H-1a	2.23 m	2.23 m
H-1b	2.21 m	2.09 m
H-2	5.52 m	5.51 m
H-4	2.79 dd (9, 8)	2.77 dd (9, 8)
H-5	2.61 m	2.58 m
H-6	4.04 dd (10, 9)	4.00 dd (11, 9)
H-7	3.96 m	3.99 m
H-8	5.28 m	5.16 ddd (9, 1)
H-9a	2.36 dd (6, 17)	1.85 dd
H-9b	1.92 m	2.31 dd (16, 11)
H-13a	6.18 d (6)	6.18 d (3.5)
H-13b	5.52 d	5.51 d
H-14(-CH ₃)	1.93 d	1.85 d
H-15(-CH ₃)	1.26 s	1.24 s
H-18	6.21 m	
H-19	2.06 m	
H-20	1.94 d (2)	
OAc		2.16 s

Coupling constants(J=Hz) are given in parentheses

화합물 I과 II의 기본골격은 ¹H-¹H COSY 스펙트럼과 ¹³C-¹H COSY 및 DEPT 90, 135을 이용하여 분석하였으며 ¹H-NMR data와 ¹³C-NMR data를 Table 3과 4에 각각 나타내었다. 화합물 I과 II는 적외선 스펙트럼에서 3500 cm⁻¹ 부근의 O-H 흡수띠와 1750 cm⁻¹에서 lactone carbonyl group의 흡수띠가 관찰되었다. 또한 자외선 스펙트럼에서 λ_{max} =215(화합물 I)와 λ_{max} =235(화합물 II)로부터 이들 화합물이 α,β -unsaturated carbonyl group을 가지고 있음을 알 수 있었다(Table 1). 질량스펙트럼에서 분자이온(M⁺) peak가 화합물 I에서는 angeloyl group이 m/z 83에서 관찰되었으며 화합물 II에서는 acetyl group이 m/z 43에서 관찰되었다. 이상

Table 4. ¹³C-NMR spectral data of compounds I and II (in CDCl₃, 125 MHz, chemical shifts in ppm)

Carbon No.	Compound I	Compound II
1	39.0	38.9
2	125.5	125.5
3	143.8	143.7
4	54.5	54.3
5	54.2	54.4
6	72.9	73.4
7	46.8	46.5
8	80.4	80.4
9	33.6	33.5
10	73.8	73.6
11	138.7	138.5
12	166.9	169.5
13	121.2	121.3
14	33.6	33.5
15	17.9	17.9
1'	169.5	170.2
2'	127.2	21.4
3'	139.9	-
4'	15.9	-
5'	20.6	-

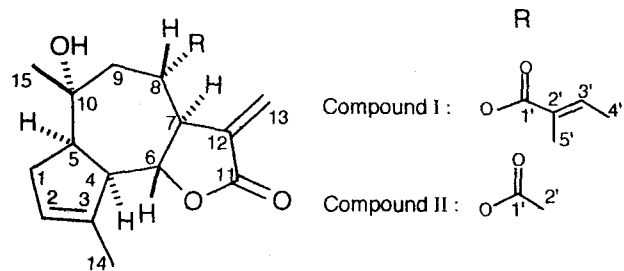


Fig. 1. Chemical structures of compounds I and II.

의 분광학적 자료와 문헌조사결과를 비교할 때 화합물 I과 II는 각각 angeloylcumambrin B(C₂₀H₂₆O₅, MW=346)와 cumambrin A(C₁₇H₂₂O₅, MW=306)임이 밝혀졌다(Fig. 1). Angeloylcumambrin B와 cumambrin A는, Haruna¹⁰⁾ 등이 *Chrysanthemum ornatum* var. *spontaneum*에서, 그리고 Masry¹¹⁾ 등이 *Chrysanthemum coronarium*에서 분리 보고한 바 있으나, 구절초로부터는 처음으로 분리되었다.

감사의 글

이 논문은 경상대학교 식물분자생물학 및 유전자조작연구소(PMBBRC)의 연구비와 농림수산부의 첨단농업기술개발연구비에 의하여 수행된 연구결과와 일부로서 깊은 감사를 드립니다. 아울러 본 연구의 구조동정부분에 많은 도움을 주신 기초과학지원센터 고려대분소의 방은정 선생님께도 감사드립니다.

참고 문헌

- 장대식, 남상해, 최상욱, 양민석 (1996) *Chrysanthemum*屬 식물의 항균력. 한국농화학회지, **39**(4), 315-319.
- 육창수 (1990) 원색한국약용식물도감. P. 539, 아카데미서적, 서울.
- 안덕균 (1993) 빛깔있는 책들-민간요법. P. 125, 대원사, 서울.
- 신숙희, 최영임(1986) 구절초의 정유성분 및 동속생약 정유와의 비교 연구. 생약학회지, **13**(4), 153-156.
- 이창복 (1989) 대한식물도감. P. 754, 향문사, 서울.
- 고경식, 김윤식 (1991) 원색한국식물도감. P. 328, 아카데미서적, 서울.
- Piddok L. J. V. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 307-318.
- Bauer A. W., M. M. Kibby, J. C. Sherris and M. Truck (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493-496.
- 芝崎勳 (1983) 抗菌性天然添加物開發の 現状と使用上の問題點. *New Food Industry* **25**, 28.
- Haruna M., M. Kato, K. Ito, T. Nakai, H. Stugihara, and H. Murata (1981) Angeloylcumambrin-B, An antimicrobial sesquiterpene lactone from *Chrysanthemum ornatum* var. *spontaneum*. *Phytochem.* **20**(11), 2583-2584.
- Sawsan E. L., A. D. A. Amina, D. F. Fikria, A. K. Mohamed, G. Michael, and B. Ferdinand (1984) Sesquiterpene lactones from *Chrysanthemum coronarium*. *Phytochem.* **23**(12), 2953-2954.

Antibacterial Substances of the Flower of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitamura

Dae-Sik Jang, Ki-Hun Park, Sang-Uk Choi¹, Sang-Hae Nam² and Min-Suk Yang* (*Department of Agricultural Chemistry; ¹Central Laboratory, Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea; ²Department of Food Processing, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea*)

Abstract : In order to isolate antibacterial substances from the flower of *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* Kitam., the chloroform fraction was fractionated according to the activity against *B. subtilis*, *S. aureus* and *V. parahaemolyticus*. Two antibacterial substances were isolated and purified by preparative TLC and recrystallization. Compound I showed activity against all the tested bacteria and compound II exhibited the activity against *B. subtilis* and *V. parahaemolyticus* except *S. aureus*. Compared to benzoic acid and sorbic acid which are being used as food preservatives, compounds I and II showed about five-fold stronger antibacterial activity against *B. subtilis* and *V. parahaemolyticus*. On the basis of spectrometric studies including ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H COSY and Mass, compounds I and II were identified as angeloylcumambrin B and cumambrin A, respectively. This is the first report of the isolation of angeloylcumambrin B and cumambrin A from this plant.

*Corresponding author