

山菊의 자유라디칼 소거 물질 분리 및 동정

한 완 수[†]

목원대학교 자연과학대학 화학과

Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from *Chrysanthemum boreale* Makino

Wan Soo Han[†]

Department of Chemistry, Natural Science College, Mokwon University Daejeon 302-729

ABSTRACT : Two antioxidative compounds in *Chrysanthemum boreale* were isolated by a bioassay using a 2, 2-diphenyl-1-picryldrazyl(DPPH) free radical. They were identified as apigenin, linarin(acacetin-7-O-rutinoside) on the basis of ¹H and ¹³C-NMR and MS data. The DPPH radical scavenging activity(RC₅₀: 13.3μg) of apigenin was similar to that of α-tocopherol (12.1μg) and L-ascorbic acid(13.1μg)

Key words : *Chrysanthemum boreale*, 2, 2-diphenyl-1-picryldrazyl(DPPH), apigenin, linarin.

緒 言

생체내의 자유라디칼이 생체막의 불포화지방산을 공격하여 지질과산화물을 일으키고, 대사과정을 통하여 생성되는 DNA 분절 그리고 단백질의 불활성화를 통하여 노화, 암, 당뇨병, 뇌졸중 및 동맥경화 등 광범위한 질병과 밀접한 관계가 (Halliwell & Gutteridge, 1984; Packer & Glazer, 1993) 있다고 보고된 이래로 자유라디칼 소거능을 조절할 수 있는 물질을 개발하기 위한 연구가 오랫동안 꾸준히 진행되어 왔다. 식물체에는 많은 종류의 자유라디칼 소거능 물질의 존재가 하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 천연물로부터 자유라디칼 소거물질의 개발할 목적으로 예비 검색을 실시하여 산국 지상부의 메탄올 추출물에 유의성 있는 결과를 나타냄을 알 수 있었다.

山菊 (*Chrysanthemum boreale* Makino)는 菊花科 (Compositae)의 여러해살이풀로 한국, 일본, 중국 북부 산지에서 자란다. 줄기에 달린 잎은 어긋나고 긴 타원형의 달걀 모양이며, 꽃은 9~10월에 노란색으로 피는데, 두화(頭花)는 지름 1.5cm 정도로서 가지와 줄기 끝에 산형(傘

形) 비슷하게 달린다 (고, 1991). 한방에서 山菊의 꽃잎은 중추신경 진정작용, 혈압강하작용, 결핵균 및 각종바이러스에 대한 억제효과, 두통과 어지럼증에 사용한다고 알려져 있으며 (최, 1992; Danbensky & Andrew, 1986), 산국에 대한 주요성분으로는 camphor, chrysanthemine 등의 정유 (송, 1984), flavonoid 배당체 (Ryu et al, 1994), lactone류 (Jang et al, 1998) 그리고 sesquiterpene (Lee et al, 1994)등이 보고되었다. 저자는 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성 검색에서 유의성 있는 효과를 나타낸 산국 지상부의 메탄올 추출물로부터 자유라디칼 소거능을 가지는 2종의 flavone을 분리하여 보고하고자 한다.

材料 및 方法

實驗材料

본 연구에 사용된 山菊은 2001년 10월 전북 김제군 진봉면 방해사 일대에서 채집한 것을 정확히 감정 후 음건한 후 세절하여 사용하였다.

[†] Corresponding author(phone) : 042-829-7563, E-mail : wshan@Mokwon.ac.kr
Received 11 October 2002 / Accepted 19 February 2003

試藥 및 器機

融點은 Buhi (Model B-540, Switzerland)사의 融點測器를 사용하였으며 보정하지 않았다. IR은 FT/IR-300 (Jasco)를, UV는 Varian DMS 200 spectrometer를, ^1H -, ^{13}C -NMR 그리고 2D-NMR spectrum은 Bruker DRX-600 spectrometer를 FAB-MS spectrum은 Concept-1S (KRATOS)를 사용하였다. Column chromatography용 담체는 silica gel (70-230 mesh, Merck)을, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plate (0.2mm, Merck)를 사용하였다. 시약 및 용매는 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였고, HPLC용 용매는 HPLC grade를 사용하였다. DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)와 L-ascorbic acid와 α -tocopherol (vitamin E)은 Sigma사 제품을 사용하였다.

추출 및 분리

음건한 식물체 지상부(1.2kg)를 세절하여 실온에서 MeOH(6l)로 7일 간격으로 2회 반복 추출하여 MeOH 추출물(173g)을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수에 현탁시켜 *n*-hexane, chloroform (CHCl_3), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH)을 사용하여 순차적으로 용매 분획·농축하여 *n*-hexane 분획물 38.2g, CHCl_3 분획물 19g, EtOAc 분획물 9g, BuOH 분획물 32g 및 H_2O 분획물 89g을 얻었다.

자유라디칼 소거 물질의 분리

Ethyl acetate 분획물을 methanol/chloroform 혼합용액에 용해시키고, 여기에 silica gel을 가한 후 coevaporation 하였다. 이것을 silica gel(400g)을 충전시킨 내경 6cm 컬럼에 loading하여, CHCl_3 -MeOH(25/1, 12/1, 9/1, 5/1, 3/1, 1/1)의 용매계로 전개하였다. 첫 시료가 용출될 무렵부터 50ml씩 용출액을 받기 시작하여 모두 80개의 분획을 받았다. 이를 전부 TLC pattern에 따라서 11개의 소분획으로 분리하였다. 이들을 각각 rotary evaporator에서 감압농축하여 용출된 순서대로 CB-1부터 CB-11까지 labelling하였다. 그 중에서 CB-2에서 MeOH로 노란색의 침전물로 화합물 1을 얻었으며, CB-4의 fraction에서 MeOH로 백색의 침전물을 형성하여 단일물질임을 확인되어 이를 화합물 2이라 하였다.

라디칼 소거 활성

항산화활성 검색은 DPPH법을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하는 Blois법을 활용하였다. 1.5×10^{-4} M DPPH (Aldrich) 메탄올 용액 0.5 mL에 여러 농도의 시료 메탄올 용액 1 mL에 첨가하고 섞은 다음 30분간 실온에서 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환

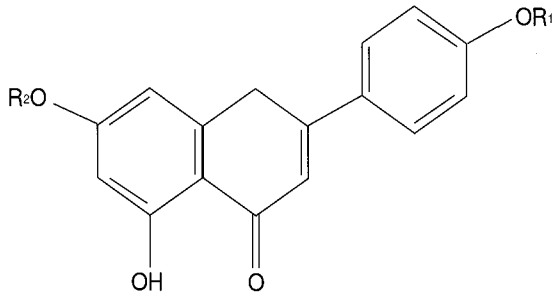
원력의 크기는 라디칼 소거활성 (scavenging activity, RC_{50})으로 표시하며, RC_{50} 은 DPPH의 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양(μg)으로 나타내으며, 기존의 라디칼 소거제인 L-ascorbic acid 및 α -tocopherol와 비교하였다.

구조동정

Compound 1.(apigenin): Yellow powder (recrystallized from MeOH); m.p. 347-349°C, $\text{IR}_{\nu_{\text{max}}}$ (KBr) cm^{-1} 3325 (OH), 1658 (C=O), 1608, 1580, 1498, 1458 (aromatic C=C); $\text{UV}_{\lambda_{\text{max}}}$ (MeOH) nm : 267, 335, λ_{max} (MeOH + NaOMe) nm : 273, 325, 393, λ_{max} (MeOH + AlCl_3) nm : 273, 300, 348, 382, λ_{max} (MeOH + NaOAc) nm : 274, 308, 386, λ_{max} (MeOH + NaOAc + H_3BO_3) nm : 268, 320, 342; ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ) 12.94 (1H, br s, 5-OH), 7.92 (2H, d, $J=8.7\text{Hz}$, H-2',6'), 6.93 (2H, d, $J=8.7\text{Hz}$, H-5',3'), 6.75 (1H, s, H-3), 6.49 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-6). ^{13}C NMR (150MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ) δ 163.7 (C-2), 102.6 (C-3), 181.6 (C-4), 161.1 (C-5), 98.7 (C-6), 164.1 (C-7), 93.7 (C-8), 157.6 (C-9), 103.6 (C-10), 121.2 (C-1'), 128.5 (C-2'), 115.7 (C-3'), 161.5 (C-4'), 115.7 (C-5'), 128.5 (C-6')

Compound 2. (acacetin-7-O-rutinoside): Light yellow amorphous powder, m.p. 249-251°C, Mg/HCl, Zn/HCl test : red, FeCl_3 solution : dark green, UV λ_{max} (MeOH) nm : 286, 326, λ_{max} (MeOH + NaOMe) nm : 292, 370, λ_{max} (MeOH + AlCl_3) nm : 277, 299, 348, 380, λ_{max} (MeOH + AlCl_3 + HCl) nm : 278, 298, 344, 380 λ_{max} (MaOAc) nm : 268, 327, λ_{max} (MaOAc + H_3BO_3) nm : 268, 328, ^1H -NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ) 12.91 (1H, br s, 5-OH), 8.06 (2H, d, $J=9.0\text{Hz}$, H-2' and 6'), 7.15 (2H, d, $J=9.0\text{Hz}$, H-5' and 3'), 6.95 (1H, s, H-3), 6.79 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$, H-8), 6.45 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$, H-6), 5.06 (1H, d, $J=7.4\text{Hz}$, H-1"), 4.55 (1H, s, H-1"), 3.92 (1H, m, H-6"), 3.86 (3H, s, 4'- OCH_3), 3.73 (1H, m, H-2"), 3.65 (1H, m, H-5"), 3.52 (1H, m, H-3"), 3.49 (1H, m, H-6"), 3.45 (1H, m, H-5"), 3.38 (1H, m, H-2"), 3.35 (1H, m, H-3"), 3.19 (1H, m, H-4"), 3.18 (1H, m, H-4"), 1.08 (3H, d, $J=6.2\text{Hz}$, 6"- CH_3), 5.44 (1H, d, $J=4.9\text{Hz}$, 3"-OH), 5.21 (1H, dd, $J=5.4, 4.9\text{Hz}$, 4"-OH), 4.70 (1H, d, $J=5.5\text{Hz}$, 4"-OH), 4.60 (1H, d, $J=4.4\text{Hz}$, 2"-OH), 4.45 (1H, d, $J=5.5\text{Hz}$, 3"-OH); ^{13}C NMR (150MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ) δ 164.5 (C-2), 104.4 (C-3), 182.6 (C-4), 161.7 (C-5), 100.2 (C-6), 163.5 (C-7), 95.4 (C-8),

157.6 (C-9), 106.1 (C-10), 123.3 (C-1'), 129.0 (C-2'), 115.3 (C-3'), 163.0 (C-4'), 115.3 (C-5'), 129.0 (C-6'), 100.5 (C-1''), 73.6 (C-2''), 76.2 (C-3''), 70.9 (C-4''), 76.8 (C-5''), 66.6 (C-6''), 101.1 (C-1'''), 71.3 (C-2'''), 70.2 (C-3'''), 72.6 (C-4'''), 68.9 (C-5'''), 56.2 (4'-OCH₃), 18.4 (6''-CH₃); HRFBAMS m/z : 593.1870 [M+1]⁺ (calc. for C₂₈H₃₃O₁₄, 593.1870).



1 : R₁=H, R₂=H
2 : R₁=CH₃, R₂=glu-rha

結果 및 考察

山菊의 地上部의 MeOH 추출물을 蒸溜水에 현탁시켜 n-hexane, CHCl₃, EtOAc, n-BuOH로 분획하여 bioactivity-guided fractionation에 의해 EtOAc층을 silica gel column으로 분리된 화합물 compound 1과 2를 단일물질로 각각 분리하였다.

화합물 1은 FeCl₃ 반응 및 Mg-HCl 반응에 양성반응을 나타내었으며, ¹H-NMR spectrum에서는 flavonoid의 골격의 특징인 proton signal들이 나타났다. 즉, 5개의 방향족 proton에 기인된 이들 중 δ6.19 (1H, d, J=2.0Hz) 및 6.49 (1H, d, J=2.0Hz)ppm에서 나타난 meta-couple된 2개의 signal은 A ring의 각각 6번과 8번 탄소 위치에 결합한 수소로 예상되었으며, δ7.92 (2H, d, J=8.7Hz)와 6.93 (2H, d, J=8.7Hz)에서 나타난 proton signal의 coupling constant를 검토한 결과 이들은 B ring에 A₂B₂ type으로 H-3', H-5' 및 H-2', H-6'에 해당하는 signal로 관찰되었으며, δ12.94에서 1H의 signal이 나타나는 것으로 보아 유리 OH기가 존재함을 알 수 있었다. 또한 ¹³C-NMR, DEPT 그리고 2D-NMR (¹H-¹H COSY, HMQC) spectrum을 검토한 결과와 문헌치(Lee et al., 1994)를 비교하여 화합물 1의 구조를 apigenin으로 동정하였다.

화합물 2는 미황색의 부정형 고체물질로 Mg/HCl, Zn/HCl test와 FeCl₃ solution에 양성반응을 나타내며, shift reagent에 의한 UV 흡수 spectrum의 이동을 살펴

보면 NaOMe에 의해 band 1의 흡수 peak가 장파장으로 이동하고, AlCl₃와 AlCl₃+HCl에 의해 band 1, 2의 흡수 peak가 장파장으로 이동하였다. 따라서 이 화합물을 flavone계 화합물로 추정하였다(Markham, 1982). 이 화합물의 ¹H-NMR spectrum에서 δ3.86에서 methoxy signal이 관찰되었으며, δ5.06과 δ4.55에서 2 mole의 당에 의한 anomeric proton의 signal이 나타나는데 이중 δ 5.06는 coupling constant가 J=7.4Hz인 double signal로 당이 β결합을 하고 있음을 추정할 수 있었다. 그리고 δ 1.08에서는 coupling constant가 J=6.2Hz인 rhamnosyl의 CH₃의 signal이 나타났다. 또한 δ6.79과 6.45에 나타나는 coupling constant가 J=2.1Hz인 2개의 doublet signal는 meta-coupling을 하는 A ring의 proton으로 δ 6.79은 H-8, δ6.45은 H-6으로 추정할 수 있었으며, δ 8.06과 7.15에 나타나는 coupling constant가 J=9.0Hz인 2개의 doublet signal는 ortho-coupling을 하는 B ring의 proton으로 δ8.06은 H-2'와 6'로, δ7.15은 H-3'와 H-5'으로 추정할 수 있었다. 그리고 δ6.95에서 나타나는 singlet signal은 C ring의 H-3로 추정할 수 있었다. δ12.94에서 1H의 signal이 나타나는 것으로 보아 유리 OH기가 존재함을 알 수 있었다. 또한 TLC를 이용한 산 가수분해 실시에 의해서 aglycone이 glucose와 rhamnose임을 확인할 수 있었으며 ¹³C-NMR에서 δ 66.6m의 chemical shift 값은 glucose의 C-6'로 glucose와 rhamnose가 1→6의 결합을 한다는 사실을 확인할 수 있었다. 이상의 결과와 기존의 문헌 data (Lee et al., 1994 ; Do et al., 1991 ; Chari et al., 1977)를 비교하여 화합물 2의 구조를 acacetin-7-O-rutinoside 즉 linarin으로 동정하였다.

이상과 같이 산국의 지상부로부터 2종의 라디칼 소거활성 물질 동정하였다. 이들 두 화합물을 모두 기준에 밝혀진 화합물이며 DPPH 대한 자유라디칼 소거활성을 검토한 결과 Table 1에 나타났다. 1과 2는 각각 13.3 및 42.1μg의 농도에서 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 활성을 나타내었으며, 화합물 1은 양성 대조양물인 L-ascorbic acid (RC₅₀=13.1μg)에 유사한 활성을 나타내었다.

Table 1. DPPH free radical scavenging activity of compounds isolated from aerial part of *Chrysanthemum boreale* Makino

Compound	RC ₅₀ (μg)
Compound 1	13.3
Compound 2	52.1
α-tocopherol	12.1
L-ascorbic acid	13.1

摘 要

천연물로부터 항산화 활성물질을 목적으로 DPPH 자유 라디칼 소거활성 검색법을 이용하여 검색을 실시하고, 유의한 활성을 나타낸 산국 메탄올 추출물로부터 2종의 화합물을 분리하고 기기분석을 이용하여 화합물 1과 2의 구조를 apigenin과 acacetin-7-O-rutinoside (Linarin)으로 동정하였다. 이들 화합물은 각각 13.3 및 42.1 μ g의 농도에서 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 활성을 나타내었으며, 화합물 1은 양성 대조양물인 L-ascorbic acid ($RC_{50} = 13.1\mu$ g)에 비하여 강한 활성을 나타내었다.

LITERATURE CITED

- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 : 1199-1200.
- Chari VM, Jordan M, Wagner H, Thiest (1977) A ^{13}C -NMR study of the structure of an acyl-linarin from *valeriana wallichii*. *Phytochemistry*, 16 : 1110-1112.
- Danbensky R, Andrew G (1986) Chinese herbal medicine, Estland Press Seattle. p.120-137.
- Do JC, Chai JK, Son KJ (1991) Studies on the constituents of *Lycopus lucidus*(II). *Kor. J. Pharmacogn.*, 22: 166-170.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and anti-oxidant therapy. *Lancet*, 23 : 1396-1397.
- Jang DS, Yang MS, Ha TJ, Park KH (1998) Structural Analogues of Cumambrin B from the Flower of *Chrysanthemum boreale*. *Arch. Pharm. Res.* 21(5) : 591-594.
- Kumar VP, Shashidhara S, Kumar MM, Sridhara BY (2002) Effect of *Luffa echinata* on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. *J. Pharm. Pharmacol.* 52(7) : 891-894.
- Lee HB, Kwak JH, Zee OP, Yoo SJ (1994) Flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Arch. Pharm. Res.* 17(4) : 273-277.
- Lee CO, Son KH, Kim YH, Kang SS, Kim JS (1996) Isolation of handelin from *Chrysanthemum boreale*. *Arch. Pharm. Res.* 19(5) : 406-410.
- Markham KR (1982) Techniques of flavonoid identification, Academic Press, London. p. 230.
- Packer L, Glazer AN (1993) Oxygen radicals in biological system : Oxygen radicals and Antioxidants. Academic Press, Inc., New York. pp 1-855.
- Ryu SY, Chio SU, Lee CO, Lee SH, Ahn JW, Zee OP (1994) Antitumor activity of some phenolic components in plants. *Arch. Pharm. Res.* 17(1) : 42-48.
- Shin KH, Kang SS, Seo EA, Shin SW (1995) Isolation of aldose reductase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum boreale*. *Arch. Pharm. Res.* 18(2) : 65-68.
- 고경식. 1991. 한국동·식물검색도감, 아카데미서적, 서울, p149.
- 송주석. 1984. 한국자원식물. 미도출판사. p1048.
- 최영진. 1992. 한국민속식물, 아카데미서적, 서울, p53.