

Hymenoxys brachyactis의 화학성분에 관한 연구(III)

이상준 · 김성한 · 김정한*

연세대학교 식품생물공학과 생물산업소재연구센터

초록 : *Hymenoxys brachyactis* 지상부의 디클로로메탄 추출액으로부터 3개의 sesquiterpene lactone들과 새로운 lactone화합물인 isohymenograndin을 확인하였다. 그리고 2개의 sesquiterpene lactone화합물인 biennine C와 독성이 있는 것으로 알려진 flavone화합물인 hispidulin을 분리하여 각각을 고자장 NMR, Mass등의 기기를 이용하여 구조결정 하였다. Biennine C는 gas chromatography와 Mass분석을 통하여 독성화합물 hymenoxon과 화합물 8과의 Diels-Alder축합물임을 확인하였다. biennine C를 포함한 이상의 lactone화합물들은 α, β -unsaturated lactone으로서 독성화합물군으로서 알려진 hymenovin과 공통적인 구조를 갖고 있어서 생체독성을 나타낼 가능성이 높은 화합물들로 사료된다(1995년 8월 11일 접수, 1995년 10월 10일 수리).

서 론

“The Poisonous Plants of the United States and Canada”에 의하면 *Hymenoxys* 중 *H. richardsonii*, *H. odorata* 그리고 *H. lemmonii* 등 3가지가 매우 유독한 종으로 양이나 소등의 가축에 피해를 주는 식물로서 알려져왔다.¹⁾ W. Herz 등²⁾은 이들 식물의 독성이 sesquiterpene lactone들에 기인할 것이라고 추정하였다. 그 후 *H. odorata* DC로부터 양에게 치명적인 독성이 있는 lactone 혼합물로서 알려진 hymenovin이 분리되었고,³⁾ hymenoxon이 hymenovin의 주성분임이 밝혀졌다.⁴⁾

본 연구에서 이용된 *Hymenoxys brachyactis*는 주요한 *Hymenoxys*종임에도 불구하고 지금까지 이들 화학성분들의 연구가 되어오지 않았으며 최근 본 연구진들이 이 식물로부터 새로운 성분을 포함한 몇 가지 sesquiterpene lactones을 분리, 구조동정하여 보고한 바 있다.⁹⁾ 본 연구에서는 *Hymenoxys brachyactis*의 화학성분에 관한 계속 연구로서 이 식물의 추출액으로부터 얻어진 몇 가지 화합물들과 이들물질의 독성가능성에 대하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 식물인 *Hymenoxys brachyactis*는 Mark W. Bierner박사에 의해서 확인되었고 1988년 8월 1일 미국 New Mexico주에 있는 Torrance County의 Manzano시로부터 남서쪽으로 약 4마일 떨어져 있는 Manzano주립공원을 지나서 Red Canyon으로가는 비포장 도로변에서 채집된 것이다. 본 시료의 보증시료(Bierner 88-77)는 Plant Resource Center of the University of Texas at Austin에 보관되어 있다.

본 실험에서 사용된 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-COSY 및 NOE실험들은 500 MHz NMR spectrum에 의하여 기록되었다.

화합물의 분리 및 정제

건조된 *Hymenoxys brachyactis* 지상부를 잘게 자른 다음 CH₂Cl₂으로 추출한 후 용매를 감압하에 제거하여 갈색의 syrup을 얻었다. 갈색 syrup을 충분한 acetone으로 용해시킨 후 냉장고속에 24시간 보관하였다가 celite를 통하여 여과하여 얻은 여과액을 농축하여 진공 건조하여 30.4 g의 노란색을 띤 분말을 얻었다. 이 분말의 일부를 NMR(35 mg in CDCl₃ with TMS)로 monitoring한 결과 α, β -unsaturated γ lactone(δ 6.2 및 5.3 d)류의 존재를 쉽게 확인할 수 있었다. Fig. 1에서와 같이 상기분말 30 g을 silica gel 칼럼 상단에 올린 후 100% n-hexane에서 100% EtOAc에 이르는 n-hexane과 EtOAc 혼합용액으로 용출한 후 계속해서 EtOAc와 MeOH 혼합액으로 용출하되 EtOAc에 대한 MeOH양은 0%에서 70%까지 증가시키면서 모두 95 fraction(각 fraction은 500 ml)을 받았으며 80번째 fraction이후부터 MeOH을 혼합하기 시작했다. 각 fraction을 TLC로 monitoring하여 fraction 42~45로부터 색이없는 결정체 화합물 (1)(mp 216~219°C, CH₂Cl₂로 부터 재결정)을 얻었고 fraction 46~48에서 노란색의 결정체인 hispidulin(6)(mp 285°C, CH₂Cl₂/ MeOH로 부터 재결정)을 얻었다. fraction 41은 농축하여 silica gel column chromatography (CH₂Cl₂-Acetone용매)로 재 분리하여 isohymenograndin(3)과 화합물 4를 얻었다. Fraction 50-54는 silica gel column chromatography로 재 분리하고 Sephadex LH 20 column(cyclohexane : CH₂Cl₂ : MeOH=7 : 4 : 1)을 이용해 재정제하여 화합물 2와 biennin C(5)를 얻었다.

찾는말 : *Hymenoxys brachyactis*, sesquiterpene lactones, biennin C, hispidulin, 독성물질

*연락처

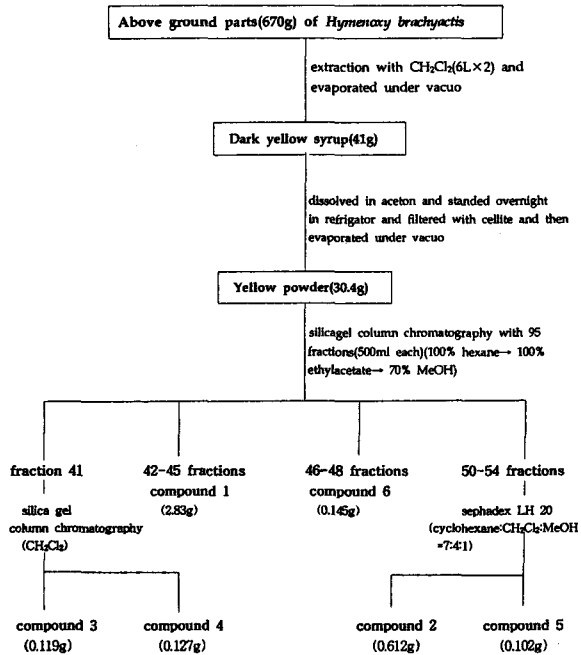


Fig. 1. Isolation of sesquiterpene lactones and hispidulin from *Hymenoxys brachyactis*.

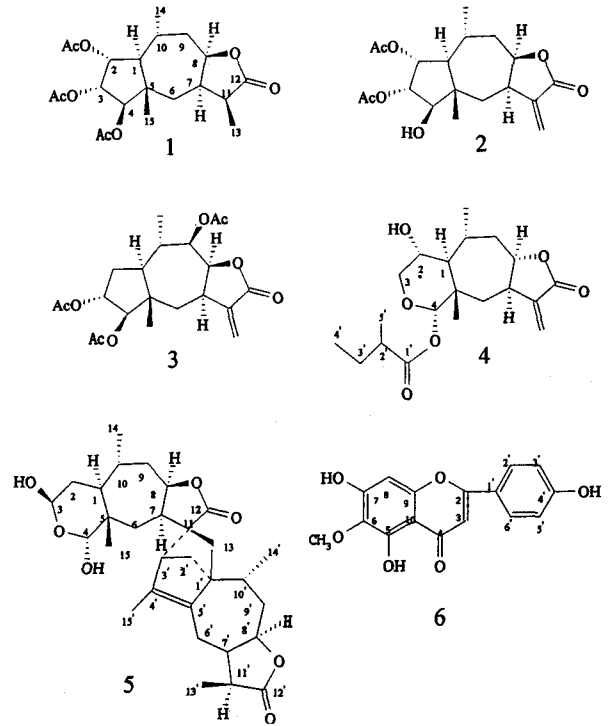


Fig. 2. Sesquiterpene lactones and flavone in *Hymenoxys brachyactis*.

화합물 5

EIMS(probe) 70 eV, m/z(rel. int.): 264[C₁₅H₂₀O₄, hymenoxon-H₂O]⁺(1), 232[C₁₅H₂₀O₂, compound 8]⁺(50) CIMS (probe, methane, 0.4torr), m/z(rel. int.): 497[M+H-H₂O]⁺(3.2)(C₃₀H₄₂O₇, 514), 265 [C₁₅H₂₂O₅+H-H₂O]⁺(17.6), 247[265-H₂O]⁺, 233[C₁₅H₂₀O₂+H]⁺(100)

화합물 6

EIMS(probe) 70 eV, m/z(rel. int.): 300[M]⁺(100) (C₁₆H₁₂O₆), 285[M-CH₃]⁺(42), 272[M-CO]⁺(3.1), 257[285-CO]⁺(32.7)

결과 및 고찰

Hymenoxys brachyactis 지상부의 CH₂Cl₂추출액으로 부터 Fig. 1에서와 같이 화합물 1~6을 분리하여 NMR, Mass spectrometry 등을 사용하여 그 화학구조를 동정 하였다(Fig. 2). 화합물 1~4는 최근 본 연구실에서 보고한 바 있다.⁹⁾ 이들 화합물들은 sesquiterpene lactone 화합물들로서 isohymenograndin(3)을 제외하고는 대개의 *Hymenoxys*속에 존재하는 화합물로 알려져왔다. 본 연구에서는 biennin C(5)와 hispidulin(6) 화합물에 대한 구조동정을 행하였다.

Biennin C(5)

¹³C-NMR data에서 2개의 lactone carbonyl 탄소(δ 180.58, 178.89)의 존재를 확인하였고 2개의 lactone ester 형태의 탄소를 77.05와 80.43에서 확인하였다(Table 1). ¹H-NMR data에서는 2개의 lactone 수소(δ 4.84, 4.58)가

Table 1. NMR Spectral Data of Biennin C(5)

Carbon	¹ H NMR	¹³ CNMR	Carbon	¹ H NMR	¹³ CNMR
1	1.80	38.25	1'	—	59.45
2α	1.85 m	32.13	2'α	1.73 brd(8.1)*	35.25
β	1.28 dt(10,5,11,11)	—	β	1.20 brd(8.1)	—
3α	5.20 ddd(3,7,7,11)	90.84	3'α	2.85 brs	55.37
4	4.46 d(3.7)	102.30	4'	—	138.09
5	—	38.05	5'	—	143.29
6α	1.34 brd(14.4)	42.18	6'α	1.64 brtd(13.5)	34.94
β	1.12 dd(13,14.4)	—	β	2.29 brd(13.5)	—
7	2.56 brdd(6,13)	42.15	7'	2.33 m	45.10
8	4.84 ddd(5,6,12)	77.05	8'	4.58 brs	80.43
9α	1.95	36.05	9'α	1.99	35.01
β	1.95	—	β	1.88	—
10	1.61 m	26.17	10'	2.17 brm	36.19
11	—	61.52	11'	2.98 dq(7.7)	41.70
12	—	180.58	12'	—	178.89
13α	1.11	20.05	13'	1.13 d(7.2)	9.78
β	1.96 brd(12)	—	14'	0.99 d(6.6)	20.50
14	1.11 d(6.9)	17.66	15'	1.89 brs	15.00
15	1.00 s	20.59			
3-OH	4.99 d(7.7)				
4-OH	5.22				

¹H NMR data recorded at 500 MHz in acetone-d₆/CDCl₃(TMS as internal standard) and ¹³C NMR data at 125 MHz in pyridine-d₆ *Values in parentheses are coupling constants in Hz

나타나며, CIMS에서 m/z 497, 265와 233의 fragmentation pattern과 EIMS에서는 m/z 264과 232로 나타났다. 이러한 NMR과 Mass data는 화합물 5가 2개의 비슷한

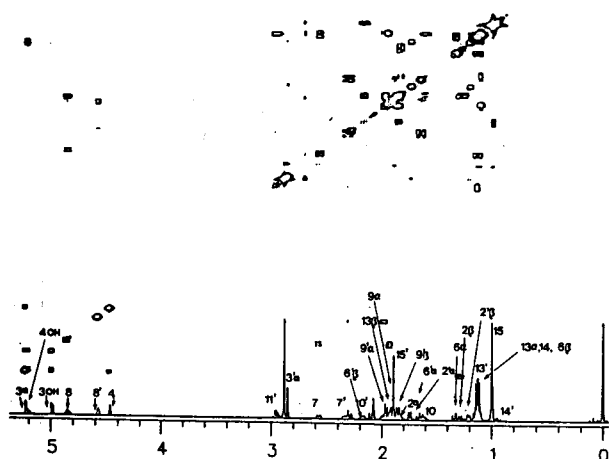


Fig. 3. 2D-COSY of biennin C(5)(2D-FT homonuclear J-correlation recorded at 500 MHz in CDCl₃)

크기의 sesquiterpene으로 이루어진 축합물임을 시사하였다. ¹H-NMR에서 3개의 doublet methyl signal(δ 0.99, 1.11, 1.13), 1개의 singlet methyl signal(δ 1.00), 1개의 vinylic methyl signal(δ 1.89)을 보여주고 있다.

δ 5.20(1H, ddd, J=3, 7.7, 11 Hz)과 4.46(1H, d, J=3.7 Hz)의 2개의 methine signal은 C-4, C-3에 결합된 dihemiacetal의 proton임이 추정된다. Fig. 3의 ¹H-¹H COSY에서 C-3, C-4의 위치에 hydroxy기의 치환을 명백하게 볼 수 있다. H-3은 C-2의 2개의 α , β proton과 coupling함을 알 수 있으며, H-4는 C-5가 4°탄소임을 보여준다. 또한 H-7 proton과 H-8 proton이 강하게 coupling함을 보여주고, 이때 H-8(δ 4.84)은 lactone 수소임을 보여준다. H-7은 H-6과 H-8 이외에 다른 어떤 proton signal과도 coupling하지 않은 것으로 보아서 C-11은 4°탄소임을 알 수 있다. 이상과 같이 ¹H-¹H COSY를 소상히 검토하여 관련된 다른 수소를 확인할 수 있었으며, NMR과 mass data를 통하여 hymenoxon의 존재를 명확하게 알 수 있었다.

Hymenoxon과 결합된 다른 부위의 화합물은 위에서 언급한 것과 같이 hymenoxon과 마찬가지로의 sesquiterpene화합물로서, δ 1.13의 methyl signal(d)과 δ 2.98의 methine signal(dq)의 split의 형태 및 coupling constant로 보아 C-11'과 C-13'이 dihydro형태인 것으로 보인다. 두 개의 sesquiterpene lactone의 축합물인 화합물 5는 hymenoxon의 C-11, C-13의 exocyclic methylene의 특징적인 signal이 없는 것으로 보아서 이 부위가 다른 하나의 lactone과 중합된 부위로 추정된다. Fig. 3의 2D COSY spectrum에서 H-3' signal은 단지 H-2'의 두개의 proton signal과 coupling하고 있으며, H-13의 α , β 두개의 proton들은 각각의 proton이외에 그 어떤 proton signal과도 coupling하고 있지 않음으로 양쪽이 모두 4°탄소에 연결되어 있음을 보여준다. 또한 NOE difference spectra에서 H-8(δ 4.84)의 lactonic signal을 saturation시켰을 때 H-3'(δ 2.85)의 signal값이 크게 증가되는 사실로서 H-3'의

Table 2. NMR Spectral Data of Hispidulin(6)

Carbon	¹ H NMR	¹³ C NMR
2		163.70(s)
3	6.68 s	102.40(d)
4		182.10(s)
5		152.80(s)
6		131.30(s)
7		157.10(s)
8	6.51 s	94.20(d)
9		152.40(s)
10		104.10(s)
1'		121.00(s)
2'	6.87 d(8)*	128.40(d)
3'	7.4 d(8)	115.90(d)
4'		161.00(s)
5'	7.4 d(8)	115.90(d)
6'	6.87 d(8)	128.40(d)
6-OCH ₃	3.75 s	59.90(q)

¹H-NMR data recorded at 500 MHz and ¹³C-NMR at 125 MHz in DMSO-d₆(TMS as internal standard) *Values in parentheses are coupling constants in Hz

stereochemistry가 β 위치임을 알 수 있었다. 그리고 H-8'은 H-7', H-11'과 NOE가 관찰됨에 따라 H-11'과 같이 α 임을 알 수 있었다.

이상과 같은 NMR data를 F. Gao가⁵⁾ Hymenoxys biennis로부터 분리, 구조결정하여 보고한 biennin C의 NMR data와 비교하였을 때 잘 일치하였다.

Hispidulin(6)

황색을 띠는 결정으로서 EIMS에서 m/z 300[M]⁺(100%, C₁₆H₁₂O₆), 285 [M-CH₃]⁺(42%), 272[M-CO]⁺(3.1%) 그리고 257[285-CO]⁺(33%)의 peak를 나타내었다.

NMR(Table 2) 및 Mass data를 문헌의 data⁷⁾와 비교하여 6-methoxy-4', 5, 7-trihydroxy flavone (hispidulin)으로 동정하였다.

화합물들의 독성 가능성

Gao는 biennin C가 hymenoxon과 화합물 8의 두 가지의 sesquiterpene lactone화합물의 Diels-Alder축합물로 추정된 바 있다.⁵⁾ 따라서 biennin C는 생체 내에서 retro Diels-Alder반응을 거쳐 이미 Hymenoxys속 식물의 주요한 독성물질로서 알려진 hymenoxon으로 분해되어 인체에 독성을 나타낼 가능성이 있다. 본 연구에서는 biennin C가 실제로 GC분석시 hymenoxon과 화합물 8로 분해되는 것을 확인하였다(Fig. 4).

Hymenoxys속으로부터 독성화합물들로 추정되는 물질군은 hymenovin이라고 불리는 sesquiterpene lactone들의 혼합물이다. 이들 혼합물을 구성하는 sesquiterpene lactone들의 구조적인 공통점은 모두 α , β -unsaturated carbonyl기를 갖는 것이 특징적이다.³⁾ 본 실험에 사용된 식물인 H. brachyactis속에서도 몇 가지의 sesquiterpene

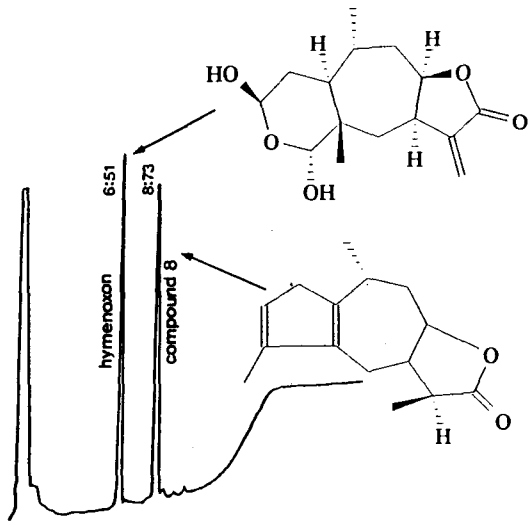


Fig. 4. GC chromatogram of biennin C. Conditions: HP-1 fused silica capillary column 530 μ m, initially at 150°C for 2 min, then programmed to 280°C at 10°C/min; He as the carrier gas at 5.8 ml/min, Injector temperature at 280°C, FID at 300°C.

lactone류의 화합물을 검출하였으며 2, 3, 4 화합물의 구조에서 볼 수 있듯이 이들 lactone류도 hymenovin의 독성을 나타내는 lactone성분들과 같이 α , β -unsaturated carbonyl기의 구조적 유사성을 갖는 것을 확인하였다. 특히 4번 화합물은 생체 내에서 esterase에 의한 butanoly기가 떨어져나가 생성된 가수분해생성물이 hymenovin의 구성성분중 하나가 됨으로써 그 독성가능성은 높다 하겠다.

hymenovin이 나타내는 실험동물에 대한 급성독성의 강력한 antidote는 cystein으로 알려졌다.⁸⁾ hymenovin을 구성하는 α , β -unsaturated lactone들이 동물의 생체에 존재하는 key enzyme의 sulfhydryl기에 alkylation되는 기작에 의해서 생체에 강한 독성을 나타내는 것으로 추정된다. 따라서 *H. brachyactis*에서 얻은 sesquiterpene lactone들 역시 이들 unsaturated 부위와 생체내 효소와의 결합에 의해서 심각한 독성을 나타낼 가능성이 매우 높을 것으로 추정된다.

Hispidulin(6)은 *Eupatorium species*의 주요한 독성성분으로 알려졌다¹¹⁾ *Hymenoxys*속에서도 상당히 많이 발견되어온 주요한 flavone이다. 대개 *Hymenoxys*속에서 존재하는 flavonoids계통의 화합물들은 hispidulin을 포함하여 scaposin, quercetin류, kaempferol, patulitrin류 등 매우 다양하게 검출되어 왔다.¹⁰⁾ 본 연구에서도 *H. brachyactis*속으로부터 여러 가지 flavonoids로 추정되는 화합물들을 검출하였다.

결 론

본 연구에서는 *Hymenoxys brachyactis* 지상부의 CH_2Cl_2

추출물로부터 sesquiterpene lactone류의 화합물들과 그 축합물, 그리고 flavone의 하나인 hispidulin(6)을 동정하였다. 화합물 2, 3, 4 등 exocyclic methylene기를 가진 γ -lactone류의 화합물들과 세포독성이 있는 hispidulin의 존재는 *H. brachyactis*의 독성을 시사해준다. 특히 biennin C(5)의 검출은 *H. brachyactis*가 가축에 대한 주요한 독성화합물인 hymenoxon의 생성을 예상할 수 있다. 따라서 *Hymenoxys brachyactis* 역시 이미 독성이 알려진 다른 *Hymenoxys*속과 마찬가지로 양이나 소등의 가축에 독성을 나타낼 수 있는 식물로서의 가능성은 높다고 하겠다.

참 고 문 헌

1. Kingsburg, J. M. (1964) In "Poisonous Plants of The United States and Canada", pp 414, Prentice-Hall, Englewood Cliffe, NJ, U.S.A.
2. Herz, W., Aota, K., Holub, M. and Samek, Z. (1970) Sesquiterpene lactones and lactone glycosides from *hymenoxys species*. *J. Org. Chem.* **35**, 2611-2623.
3. a) Ivie, G. W., Witzel, D. A., Herz, W., Kannan, R., Norman, J. D., Rushing, D. D., Johnson, J. H., Rowe, L. D. and Veech, J. A. (1975) Hymenovin, major toxic constituent of western bitterweed. *J. Agri. Food Chem.* **23**, 841. b) Ivie, G. W., Witzel, D. A. Herz, W., Sharman, R. P. and Johnson, A. E. (1976) Isolation of hymenovin from *Hymenoxys richardsonii* and *Dugaldia hoopesii*. *J. Agric. Food Chem.* **24**, 3, 681-682.
4. Ortega, A. Romo De Vivar and Romo, J. (1968) Odoratin: A New Psedoguaianolide isolated from *Hymenoxys odorata DC.* *Can. J. of Chem.* **46**, 1539-15414.
5. Gao, F., Wang, H. and Mabry, T. J. (1990) Sesquiterpene lactones aglycones and glycosides and inositol derivatives from *Hymenoxys biennis*. *Phytochemistry* **29**, 3875-3880.
6. Kim, H. L., Rowe, L. D. and Camp, B. J. (1975) Isolation of a poisonous lactone from bitterweed, *Hymenoxys odorata* (compositae). *Res. Comm. Chem. Pahnol Pharmacol.* **11**, 647.
7. Rao, M. M., Kingston, D. G. I. and Spittler, T. D. (1970) Flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry* **9**, 27.
8. Kupchan, S. M., Fessler, D. C., Eakin, M. A. and Giacobbe, T. J. (1971) Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. *Science* **168**, 376.
9. Kim, J. H., Lee, S. J., Lin, Q., Bierner, M. and Mabry, T. J. (1995) Sesquiterpene lactones from *Hymenoxys brachyactis*. *Phytochemistry*. submitted.
10. Wagner, H., Iyengar, M. A., Horhammer, L. and Herz, W. (1972) Flavonol-3-glycosides in eight *Hymenoxys* species. *Phytochemistry*. **11**, 3087-3088.
11. Rao, M. M., Kingston, D. G. I. and Spittler, T. D. (1970) Flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*. **9**, 227-228.

The study of chemical substances in *Hymenoxys brachyactis*(II)

Sang-Jun Lee, Sung-Han Kim and Jung-Han Kim* (*Department of Food and Biotechnology & Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749*)

Abstract: The dichloromethane extracts of the above ground parts of *Hymenoxys brachyactis* afforded three sesquiterpene lactones already reported, one new sesquiterpene lactone, biennin C and hispidulin as known toxic flavone. Structures of all compounds were established by spectroscopy and biennin C was determined as an adduct of the modified pseudoguanolide and hymenoxon by Gas Chromatography and MS spectrometer. These sesquiterpene lactones have the same α,β -unsaturated functional group like that of hymenovin which has been known as major toxic constituent of important livestock poison. And biennin C is also considered as toxic compound because of toxic hymenoxon.

*Corresponding author