

영경귀 지상부에서 분리한 후라본 배당체 및 생리활성

박종철[†] · 이종호* · 최종원**

순천대학교 한약자원학과

*경상대학교 식품영양학과

**경성대학교 약학과

Isolation and Biological Activity of Flavone Glycosides from the Aerial Part of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* in Korea

Jong-Cheol Park[†], Jong-Ho Lee* and Jong-Won Choi**

Dept. of Oriental Medicine Resources, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Kyeongsang National University, Jinju 600-701, Korea

**Dept. of Pharmacy, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract

Two flavone glycosides have been obtained from the aerial part of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* Kitamura (Compositae) in Korea and identified by means of spectral analysis as linarin and cirsimarlin. When 10⁻² mg/ml of cirsimas was added, lipid peroxide formation in the rat liver decreased by 12% compare to control.

Key words : *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*, Compositae, flavone glycoside, linarin, cirsimarlin, lipid peroxide

서 론

영경귀(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense* Kitamura)는 국화과에 속하는 식물로서 한방에서는 지상부 또는 지하부를 대개라 하여 약용으로 이용해 왔다. 즉 지상부는 개화기에 베고, 뿌리는 가을철에 채취하여 말려서 경혈, 지혈, 소종의 효능으로 토혈, 혈뇨, 대하, 간염, 고혈압 등의 치료(1)에 사용한다. 이의 기미(氣味)는 양감(涼甘)이며, 흑초(黑炒)하여 사용하기도 한다. 다년생 초본인 영경귀의 잎에는 톱나와 더불어 가시가 있으나, 흔히 봄에 돌아나는 비교적 가시가 연한 어린잎과 부드러운 줄기는 살짝 데쳐서 나물로 식용한다(2). 줄기는 껍질을 벗겨내어 튀김, 무침, 볶음, 데침 등으로 요리하며 특유의 향미가 있고 촉감이 좋아 차로도 사용하는 식물이다(3). 한국산 *Cirsium*속 식물에 관한 성분 연구는 phenol 화합물(4-6)들이 보고되어져 있으나 저자 등은 한국산 영경귀 지상부에서 flavone 배당체를 분리하여 그 구

조를 결정하였으며, 이들 성분이 흰쥐의 과산화지질 생성에 미치는 영향을 검토하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

영경귀는 1992년 4월 경남 산청군에서 채집하여, 음건, 세절하여 사용하였으며 재료는 순천대 한약자원학과에 보관중이다.

시약 및 기기

용매는 특급 및 1급 시약을, column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70-230 mesh, Merck, No. 7734), Sephadex LH-20(Pharmacia), thin layer chromatography는 precoated kieselgel 60 F254(Merck, No. 5735)를 사용하였다. 용점은 Perkin-Elmer Electrothermal Digital MP apparatus, IR spectrum은 Hitachi 270-50을 사용하여 KBr disk법으로, UV spectrum은 Shimadzu Mps-50L spectrophotometer, NMR spectrum은 Bruker AM 200 spec-

[†]To whom all correspondence should be addressed

trometer로서 DMSO-d₆ 용매를 사용하여 측정하였다.

분획 및 분리

영경귀 지상부 (1.5kg)를 음전 후 분쇄하여 methanol (MeOH)로 환류냉각하에서 4시간씩 4회 추출하였다. 용매를 감압제거한 MeOH 엑스에 10% MeOH를 가하여 CHCl₃, n-Buthanol (BuOH)용매로 계통분획을 실시한 후 BuOH 가용부를 silica gel column chromatography [CHCl₃-MeOH-H₂O(7-3-1 하층) 및 CHCl₃-MeOH-H₂O (65-35-10, 하층)]를 실시하여 화합물 1 및 2를 분리하였다.

화합물 1 (linarin)

mp 250~252° C, FeCl₃, Mg/HCl, Zn/HCl 및 Molisch 반응 : 양성, IR, ν_{max} (cm⁻¹) 3422 (OH), 1664 (α, β -unsaturated ketone), 1612, 1487 (aromatic C=C), 1117, 1082 (glycosidic C-O) ; UV, λ_{max} (MeOH)nm (log ϵ) : 269 (4.21), 324(4.29) ; (NaOMe) 292 (4.34), 368(4.30) ; (NaOAc) 270 (4.21), 325 (4.33) ; (NaOAc/H₃BO₃) 271 (4.21), 324 (4.35) ; (AlCl₃) 275 (4.20), 305 (4.18), 345 (4.38), 386 (4.32) ; (AlCl₃/HCl) 279 (4.22), 304 (4.20), 345 (4.39), 386 (4.27) ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz) : 12.90 (1H, s, 5-OH), 8.03 (2H, d, J=8.8Hz, H-2' & 6'), 7.13 (2H, d, J=8.8 Hz, H-3' & 5'), 6.92 (1H, s, H-3), 6.78 (1H, d, J=1.9Hz, H-8), 6.44 (1H, d, J=1.9Hz, H-6), 5.12 (1H, d, J=6.0Hz, anomeric H of glc.), 4.43 (1H, br, s, anomeric H of rha.), 3.85 (3H, s, 4'-OCH₃), 1.02 (3H, d, J=5.9Hz, rha.-CH₃) ; ¹³C-NMR, Table 1.

화합물 2 (cirsimarín)

mp 253~255° C, FeCl₃, Mg/HCl, Zn/HCl 및 Molisch 반응 : 양성, IR, ν_{max} (cm⁻¹) 3322 (OH), 1659 (α, β -unsaturated ketone), 1608, 1498 (aromatic C=C) 1125, 1067 (glycosidic C-O) ; UV, λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ) : 276 (4.30), 326 (4.32) ; (NaOMe) 292 (4.0), 368 (4.34) ; (NaOAc) 278 (4.27), 326 (4.44) ; (NaOAc/H₃BO₃) 278 (4.29), 325 (4.47) ; (AlCl₃) 283 (4.48), 290 sh (4.49), 346 (4.52) ; (AlCl₃/HCl) 278 (4.48), 292 sh (4.50), 338 (4.48) ; ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200MHz), δ 12.85 (1H, s, 5-OH), 8.07 (2H, d, J=8.9Hz, H-2' & 6'), 7.19 (2H, d, J=8.9Hz, H-3' & 5'), 6.98 (1H, s, H-3), 6.96 (1H, s, H-8), 5.38 (1H, d, J=5.2Hz, anomeric H of glc.), 3.92 (3H, s, 6-OCH₃), 3.73 (3H, s, 4'-OCH₃) ; ¹³C-NMR, Table 1.

Table 1. ¹³C-NMR chemical shifts of compounds 1 and 2 (DMSO-d₆)

Carbon No.	1	2
C-2	163.9	163.4
C-3	103.8	103.6
C-4	182.1	182.4
C-5	161.2	152.0
C-6	100.5 ^a	131.9
C-7	157.0	158.7
C-8	94.8	91.7
C-9	163.0	152.7
C-10	105.5	105.2
C-1'	122.7	123.8
C-2'	128.4	128.2
C-3'	114.7	116.6
C-4'	162.4	160.3
C-5'	114.7	116.6
C-6'	128.4	128.2
6-OCH ₃		60.0
7-OCH ₃		56.5
4'-OCH ₃	55.6	
Glc. C-1	100.0 ^a	99.8
C-2	73.1	73.2
C-3	76.3	76.5
C-4	69.8	69.6
C-5	75.9	77.2
C-6	66.1	60.6
Rha. C-1	100.4 ^a	
C-2	70.8 ^b	
C-3	70.4 ^b	
C-4	72.1	
C-5	68.3	
C-6	17.8	

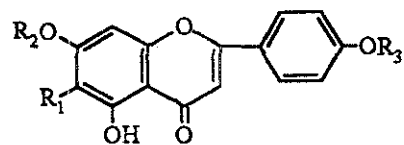
^aAssignments bearing the same superscript may be reversed

산 가수분해

각 화합물 (35mg)을 5% H₂SO₄용액 20ml를 가하여 수욕상에서 4시간 동안 가열하여, 상법(7)에 따라 처리하였다. 비당부는 화합물 1 및 2로부터 acacetin 및 cirsimaritin을 각각 얻었다 (Fig. 1).

동물 및 처치

동물은 체중 150±10g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종의 웅성 흰쥐를 한국 실험동물개발로부터 분



	R ₁	R ₂	R ₃
1	H	Rha. (1→6)Glc.	CH ₃
2	OCH ₃	CH ₃	Glc.

Fig. 1. Structures of linarin (1) and cirsimarín (2).

양반아 일정한 사료 및 조건(온도: $20 \pm 2^\circ \text{C}$, 습도: 50%, 명암: 12시간 light/dark cycle) 하에서 충분히 적응시켰으며, 실험 전 24시간 동안 물만 주고 절식시켰다.

간조직중 과산화지질의 함량 측정

실험동물을 CO_2 gas로 가볍게 마취시킨 후 복부 정 중선을 따라 절개하여 복부대동맥에서 채혈하여 실험 사시킨 후 간을 빙냉의 생리식염수로 관류시켜 조직내 혈액을 제거한 후 적출하여 여지로 혈액 및 기타 이물질 을 제거하고 평량한 다음 Ohkawa 등의 방법(8)에 준하여 간 조직 1g당 9배량의 생리식염수를 가해 마쇄하고 이 마쇄액에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2ml, 20% acetate buffer(pH 3.5)와 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid 및 시료를 가한 후 95°C 에서 1시간 동안 반응시킨 후 실온에서 냉각시켜 n-BuOH:pyridine(15:1)을 첨가하여 15분간 원심분리한 후 홍색의 n-BuOH-pyridine층을 취하여 파장 532nm에서 그 흡광도를 측정 한 다음 표준곡선에서 그 함량을 간 조직 1g당 malondialdehyde n mole 수로 표시하였다.

단백질 함량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법(9)에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다. 실험결과와 통계처리는 Duncan's new multiple range test를 이용하였다.

결과 및 고찰

영경위 지상부에서 column chromatography로서 분리한 화합물 1은 FeCl_3 , Zn/HCl , Mg/HCl 및 Molisch 반응에서 양성을 나타내며, 또한 IR Spectrum에서 OH기, $\text{C}=\text{O}$ 기, 당에 기인한 C-O기 등의 관찰로부터 flavonoid 배당체임을 암시하고 있다. 이 화합물의 UV spectrum은 269, 324nm에서 전형적인 flavone의 흡수를 나타내며, AlCl_3 용매하에서 band I이 bathochromic shift 하고, AlCl_3/HCl 용매에서는 변화없이 386nm를 유지하므로 C-5에 유리 OH기가 존재함을 알 수 있다(10). ^1H -NMR spectrum은 $\delta 6.44$ 및 6.78 에서 2개의 meta coupled doublet($J=1.9$ Hz), $\delta 7.13$ 및 8.03 에서는 2개의 ortho coupled doublet($J=8.8$ Hz), 그리고 $\delta 6.92$ 에서 singlet signal, $\delta 3.85$ 에서 methoxyl기에 기인하는 singlet peak를 보여 주고 있다. 따라서 이 화합물은 C-5, C-7 및 C-4' 위치에 산소로 치환된 flavone 배당체임을 알 수 있다. Anomeric proton은 $\delta 4.43$ 및 5.12 에서 관측되며, $\delta 1.02$ 에서

특징적인 rhamnose의 methyl기에 기인되는 doublet peak($J=5.9$ Hz)가 나타나므로서, 2몰의 당에서 하나는 rhamnose가 존재함을 암시하고 있다. 산 가수분해에서 얻은 aglycone은 NaOAc 용매하의 UV spectrum에서 화합물 1과는 달리 band II에서 bathochromic shift를 보여 주므로, C-7 위치에 유리 OH기가 존재함을 나타낸다. 따라서 당의 결합 위치는 aglycone의 C-7 위치에 결합함을 알 수 있으므로 화합물 1의 aglycone 구조는 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-flavone(acacetin)으로 결정하였다. 화합물 1의 ^{13}C -NMR data에서 2몰의 당은 terminal rhamnose가 glucose의 6번에 결합하는 rutinose임을 알 수 있으며, 각 탄소의 assignment에 의해서 당의 결합 위치도 C-7에 결합함을 뒷 받침하고 있다. 이러한 결과로써 화합물 1은 linarin(acacetin 7-O- β -rutinoside)으로 결정하였으며 문헌치의 ^{13}C -NMR data(11)와 잘 일치하고 있다.

화합물 2도 정성반응, IR spectrum 및 UV spectrum 분석에서 flavone 배당체임을 나타낸다. ^1H -NMR spectrum에서 $\delta 7.19$ 및 8.07 의 2쌍의 ortho coupled doublet($J=8.9$ Hz), 그리고 $\delta 6.96$ 및 6.98 에서 두개의 singlet signal, $\delta 3.73$ 및 3.92 에 있는 두개의 methoxyl기, $\delta 5.38$ 의 anomeric proton에서 당 1몰이 존재함을 알 수 있으며, 이 당은 ^{13}C -NMR data($\delta 99.8, 77.2, 76.5, 73.2, 69.6, 60.6$)에서 D-glucose임을 확인할 수 있다. 따라서 이 화합물은 B-ring의 C-4' 위치가 치환되는 flavone 배당체로 추정하였다. UV spectrum에서 C-7 위치에 유리 OH기가 존재하지 않으며(NaOAc 용매첨가에서 무변화), band I에서 AlCl_3 용매에 대한 AlCl_3/HCl 첨가로서 장 파장 이동(30~40nm)하지 않음은 B-ring에서 ortho di-OH기가 없음을 나타낸다(12). 화합물 2의 ^{13}C -NMR spectrum(DMSO- d_6 , 50, 3MHz)에서는 탄소 23개가 존재함을 나타내며, 이의 assignment는 이미 보고된 구조가 유사한 화합물들의 비교에 의해 결정되어 Table 1에서 나타내고 있다. 즉 A, C-ring의 구조가 비슷한 salvigenin(13)(CDCl_3 용매 측정), galactobuxin(14)(DMSO- d_6 용매 측정), 그리고 B-ring의 환경이 유사한 apigenin 4'-O- β -D-glucoside(15)(DMSO- d_6 용매 측정)의 ^{13}C -NMR data를 비교 분석하여, assignment하였을 때 이 화합물은 cirsimaritin-4'-O- β -D-glucoside가 확실하다. 더우기 이 화합물은 산 가수분해하였을 때 aglycone으로 5,4'-dihydroxy-6,7-dimethoxy flavone이 얻어짐으로써 당은 aglycone의 C-4' 위치에 결합함을 알 수 있어, 화합물 2의 구조는 cirsimarin(cirsimaritin 4'-O- β -D-glucoside)으로 결정하였다.

지질의 과산화반응은 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화현상 및 이에 따른 여러가지 병리현상을 유도한다(16). 지질 과산화 연구의 일환으로서 영경귀에서 분리한 상기 2종의 화합물에 대한 흰쥐에서 과산화지질 생성에 미치는 영향을 검토하였다. 시험관내에 2종의 flavonoid 10^{10} , 10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 mg/ml 농도로 첨가하였을 때 cirsimarin의 10^2 mg/ml 농도에서 대조군에 비해 지질과산화의 생성이 12% 억제되었다(Table 2). Flavonoid들은 식물, 과일, 채소 등에서 생합성되는 페놀성화합물로서 포유동물 세포계에 여러가지 약리작용을 가지는 것으로 알려져 있으며(17,18), 흰쥐의 간 microsome과 mitochondria에서 CCl_4 와 NADPH-의존성 지질과산화 억제(19,20), 사람 적혈구의 지질과산화 억제(21) 등의 작용도 알려져 있다. 세포막 인지질이 불포화지방산의 과산화로 인하여 산화적 손상을 받게 되면 세포손상을 가져오며 이들에 대한 생체세포들의 가장 신속한 방어기구 중에는 glutathione과 glutathione peroxidase로서 이들 과산화물들을 제거하며, 생체내에서 간조직의 glutathione의 농도가 감소하면 지질과산화가 증가하고, phenobarbital과 같은 약물은 glutathione 농도를 고갈시키므로서 지질과산화를 억제하며 이들은 rutin, (+)-catechin, quercetin, naringenin과 같은 flavonoid에 의해서 억제된다고 알려져 있다(22). 그러나 cirsimarin 과 같은 영경귀의 flavonoid 성분에 대한 지질과산화 억제효과는 이번이 처음이다.

Table 2. Effect of flavonoids from the aerial parts of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* on lipid peroxide formation in normal rat liver

Samples (mg/ml)	Malondialdehyde (n moles/g of tissue)	% of control
Control	0	100
Linarin	10^{10}	104
	10^8	110
	10^6	105
	10^4	104
	10^2	107
Control	0	100
Cirsimarin	10^{10}	108
	10^8	105
	10^6	100
	10^4	98
	10^2	88

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for four separated experiments. ^{a-d}Values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$)

요 약

영경귀 (*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*) 지상부를 MeOH로 추출하고 그 엑스를 용매 극성 증가 순에 따라 계통 분류하였으며, 그 중 BuOH 분획을 silica gel 및 Sephadex LH-20 column으로 분리하여 2종의 flavone배당체를 얻었다. 이 배당체들을 각종 이화학적 성질 및 분광학적 방법을 이용하여 linarin (acacetin 7-O-β-D-rutinoside) 및 cirsimarin (cirsimaritin 4'-O-β-D-glucoside)으로 결정하였다. 2종의 flavone 배당체를 시험관내에 10^{10} , 10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 mg/ml 농도로 첨가하였을 때 cirsimarin의 10^2 mg/ml 농도에서 대조군에 비해 지질과산화의 생성이 12% 억제되었다.

문 헌

1. 강소신의학원 : 중약대사전. 소학관, 동경, p.1646(1985)
2. 최영전 : 산나물의 재배와 이용법. 오성출판사, p.337(1987)
3. 윤병국, 장준근, 전길신 : 산야초 여행. 석오출판사, p.32(1988)
4. Yun, H. S. and Chang, I. M. : Separation and identification of cirsimarin from *Cirsium pendulum*. *Kor. J. Pharmacol.*, **2**, 145(1978)
5. 이영주, 박영훈 : *Cirsium*속 식물의 성분연구(V). 생약학회지, **15**, 74(1984)
6. Lee, H. B., Kwak, J. H., Zee, O. P. and Yoo, S. J. : Flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 273(1994)
7. Chi, J. S., Young, H. S., Park, J. C., Choi, J. H. and Woo, W. S. : Flavonoids from the leaves of *Rhododendron brachycarpum*. *Arch. Pharm. Res.*, **9**, 233(1986)
8. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351(1979)
9. Lowry, O. H., Rodebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
10. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. : The systematic identification of flavonoids. Springer, N.Y., p.44(1970)
11. Woo, E. H. and Woo, W. S. : Flavonoid glycosides from *Melandrium firmum*. *Arch. Pharm. Res.*, **12**, 223(1989)
12. Markham, K. R. and Mabry, T. J. : The flavonoids. Harborne, J. B., Mabry T. J. and Mabry, H. (eds.), Academic Press, p.60(1975)
13. Chari, V. H., Grayer-Bakmeijer, R. J., Harborne, J. B. and Osterdahl, B. : An acylated allose-containing 8-hydroxyflavone glycoside from *Veronica filiformis*. *Phytochemistry*, **20**, 1977(1981)
14. Rahaman, A. U., Ahmed, D., Asif, E., Ahmad, S., Sener, B. and Turkoz, S. : Chemical constituents of *Buxus sempervirens*. *J. Nat. Prod.*, **54**, 79(1991)

15. Ansari, F. R., Ansari, W. H., Rahman, W., Seligmann, O., Chari, V. M., Wagner, H. and Osterdahl, B. G. : A new acylated apigenin 4'-O- β -D-glucoside from the leaves of *Lycopodium clavatum*. *Planta Medica*, **36**, 196 (1979)
16. Osamu, I. : Lipid peroxidation and nutrition. Japanese Society of Nutrition and Food Science, Tokyo, p.143 (1986)
17. Harbone, J. B. : Nature, distribution, and function of plant flavonoids. In "Plant flavonoids in biology and medicine : Biochemical, Pharmacological and structure-activity relationships" Cody, V., Middleton, E. and Harbone, J.(eds.), Alan R. Liss, New York, p.15 (1986)
18. Havsteen, B. : Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 1141 (1983)
19. Slater, T. F. and Scott, R. : The free radical scavenging action of (+)-cyanidanol-3 in relation to the toxicity of carbon tetrachloride. *Int. Congr. Symp. Ser-R Soc. Med.*, **47**, 33 (1981)
20. Bindol, A. : A., Cavallini, L. and Silipandri, N. : Inhibitory action of silymarin of lipid peroxidation formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 2405 (1977)
21. Maridonneau-Parini, I., Braquet, P. and Garay, R. P. : Heterogenous effect of flavonoids on K⁺ loss radicals in human red cells. *Pharm. Res. Comm.*, **18**, 61 (1986)
22. Younes, M. and Siegers, C. P. : Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. *Planta Medica*, **43**, 240 (1981)

(1995년 10월 7일 접수)