

식용 식물자원에서부터 활성물질의 탐색-II. 호박잎(*Cucurbita moschata* DUCH.)으로부터 지방산 및 sterol배당체의 분리

한재택 · 안은미 · 백남인*

경희대학교 산업대학 생명과학부 및 생명과학연구원

(1999년 3월 12일 접수, 1999년 6월 9일 수리)

서 론

호박(*Cucurbita moschata* DUCH.)은 독특한 향미와 약리작용으로 인하여 한국인들이 즐겨 먹는 식용자원이다. 뿐만 아니라 다른 박과 채소에 비하여 기후 환경에 대한 적응력이 높고 병해충에도 비교적 강하여 농약사용이 적은 무공해 식품으로서 그 가치가 높게 평가된다.¹⁾ 호박의 과육에는 혈진증 예방과 두뇌발달에 기여하는 α -linoleic acid가 다량 함유되어 있고,²⁾ vitamin A의 전구체인 β -carotene이 풍부하며, 위장이 약한 사람, 회복기의 환자, 부기가 있는 산모에게 좋은 식품으로 애용되어 왔다.³⁾ 또한 호박씨에는 지방산이 풍부하며⁴⁾ 여러 sterol 성분들이 분리되었다는 보고가 있다.⁵⁾

한편, 호박잎은 특유의 맛과 조직감으로 씹 씹하는 한국인의 독특한 식생활 문화와 어우러져 옛부터 친숙한 식품으로 이용되어져 왔으나, 호박과육과 호박씨의 주요 구성성분과 미량성분에 대해서는 다수 보고된 것^{2,11)}에 비하여 호박잎의 성분에는 아직까지 보고된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 호박잎의 주요 2차 대사산물을 분리하고 그 구조를 밝힘으로써 호박잎의 기능성 식품으로서의 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

호박잎 시료

시료로 사용한 호박(*Cucurbita moschata* DUCH.)은 1997년 여름에 경기도 연천군에서 재배하여 잎만을 채집하여, 그늘에서 풍건하였다.

기기 및 시약

Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60 (70~230 mesh, Merck)을, TLC(Thin layer chromatography)는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck)를, 그 외의 시약은 모두 일급, 또는 특급을 사용하였다. ¹H-NMR(400 MHz), ¹³C-NMR (100 MHz) 및 DEPT spectra는 ZEOL JNM-LA400으로 측정하였고

찾는말 : 호박, sterol 배당체, 지방산, 3-O- β -D-glucopyranosyl 24S-ethyl 5 α -cholesta-7,22E-dien-3 β -ol, 3-O- β -D-glucopyranosyl 24R-ethyl-5 α -cholesta-7-en-3 β -ol, palmitic acid, linolenic acid
*연락처

GC-MS는 HP5890GC/JEOL로, EI/MS는 JEOL JMSAX505-WA로 측정하였다.

활성물질의 분리

풍건 분쇄한 호박잎(1.5 kg)을 80% MeOH 수용액(5 l×2)으로 실온에서 2회 추출하였고, 여과 농축한 후 물과 EtOAc로 분배 추출하였으며, 물층을 다시 n-BuOH로 추출하였다. EtOAc 층에 MgSO₄ anhydrous를 사용하여 탈수하고 여과 농축한 후, silica gel column chromatography하였다. 용매의 극성을 높여가며 (n-hexane-CHCl₃-MeOH = 2 : 12 : 1 → CHCl₃-MeOH = 13 : 1) 용리하여 70 ml씩 분취하였고, 각 분취액을 TLC로 확인하여 유사한 것끼리 합하고 농축하여 9개의 분획으로 나누었다. 그중 5번 분획을 다시 silica gel(100 g) column chromatography(CHCl₃-MeOH = 15 : 2)하여 지방산 혼합물 1을 309 mg 얻었다.

지방산 혼합물 1: Pale yellow oil, ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 5.37(6H, m, olefine), 2.78(2H, t, J=6.0 Hz), 2.32(4H, dd, J=7.6,7.6 Hz), 2.04(2H, q, J=6.8 Hz), 1.60(2H, br. t, J=7.0 Hz), 1.23-1.29(methylene), 0.95(3H, t, J=7.6Hz), 0.85(3H, t, J=6.8 Hz, terminal methyl). ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃, δ c), 189.57, 180.53(carboxyl), 131.88, 130.17, 128.21, 128.17, 127.69, 127.05(olefine), 34.11, 34.09, 31.90, 29.68, 29.65, 29.64, 29.63, 29.58, 29.53, 29.41, 29.35, 29.23, 29.12, 29.04, 29.00, 27.15, 25.57, 25.48, 24.63, 24.61, 22.67, 20.51(methylene), 14.24, 14.09 (terminal methyl).

위에서 용매 추출한 n-BuOH 분획을 다시 감압 농축 후, silica gel(150 g) column chromatography하였는데, 용매의 극성을 높여가며(CHCl₃-MeOH = 10 : 1 → 7 : 1 → 4 : 1 → CHCl₃-MeOH-H₂O = 65 : 35 : 10 → 6 : 4 : 1) 용리하여 분취하였고, TLC로 확인하여 10개의 분획으로 나누었다. 그중 3번 분획을 다시 silica gel(100 g) column chromatography(CHCl₃MeOH= 3 : 1)하여 혼합물 2 (166 mg)를 얻었다.

지방산 혼합물 1의 메틸 에스터화

혼합물 1 (5 mg)을 무수 MeOH(1 ml)에 녹인후 Dowex 50 W×8(H⁺ form)를 소량 가하고 20분간 교반하였다. 여지로 여과한 후 여액에 CH₂N₂/Et₂O를 적당량 가하고 실온에서 하

룻밤 방치하였다. 반응액을 감압농축하여 얻어진 메칠화물 **1a**를 GC/MS로 분석하였다. GC/MS: Mass spectrometer-JEOL JMS/AX505WA, Gas chromatography-HP5890GC, Column-DB-5 capillary column, Initial temp.-50°C, Increasing rate-10°C/min, Final temp.-280°C(10 min), Injector temp.-200°C, Carrier gas-N₂, Split ratio-15:1, Rt (Molecular weight, %)-15' 46"(242, methyl tetradecanoate, 2.1), 17' 33"(268, methyl palmitoleate, 4.2), 17' 59"(270, methyl hexadecanoate, methyl palmitate, 32.1), 19' 27"(292, methyl 9,12,15-octadecatrienoate, methyl linolenate, 43.6), 19' 46"(298, methyl octadecanoate, methyl stearate, 10.2), 21'11"(326, methyl icosanoate, methyl arachidate, 2.8), 22' 68"(354, methyl docosanoate, 1.7).

혼합물 2의 아세틸화

혼합물 **2** (80 mg)을 10 ml의 pyridine에 녹인 후, 빙냉하에서 acetic anhydride 10 ml를 적가하였다. 실온에서 10시간 교반시키고 반응액을 EtOAc(100 ml×3)와 빙수(150 ml)로 분배 추출하였다. 유기층을 4% HCl 수용액, 포화 중조 및 염수로 세척한 후, 무수 MgSO₄로 탈수하고 여과, 농축하였다. 농축물을 silica gel(25 g) column chromatography(*n*-hexane-EtOAc = 3:1)하여 화합물 2의 아세틸화물을 정제하여 화합물 **2a-1**과 **2a-2**의 혼합물 (15 mg)을 얻었다.

화합물 **2a-1**: White powder(CHCl₃-MeOH), ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 5.15(1H, m, H-7), 4.61(1H, d, *J* = 7.8 Hz, anomeric-H), 3.55(1H, m, H-3), 2.08, 2.05, 2.20, 2.01(all 3H, each s, acetyl-methyl), 0.92(3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-21), 0.82(3H, s, H-19), 0.53(3H, s, H-18). ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δc) 170.72, 170.37, 169.42, 169.31(acetyl-carbonyl), 139.65(C-8), 117.19(C-7), 99.62(C-1'), 79.58(C-3), 72.87, 71.60(C-3', 5'), 71.51(C-2'), 68.51(C-4'), 62.10(C-6'), 55.05(C-17), 54.99(C-14), 49.33(C-9), 45.78(C-5), 43.35(C-13), 40.13(C-24), 39.48(C-12), 39.38(C-4), 37.03(C-1), 36.55(C-20), 34.42(C-23), 34.28(C-10), 33.85(C-22), 29.67(C-2), 29.21(C-6), 29.10(C-25), 27.94(C-16), 26.12(C-28), 23.02(C-15), 22.94(C-11), 20.76, 20.73, 20.64, 20.61(acetyl-methyl), 19.81(C-27), 18.97(C-26), 18.88(C-21), 12.95(C-19), 11.95(C-29), 11.82(C-18).

화합물 **2a-2**: White powder(CHCl₃-MeOH); ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 5.19(1H, dd-like, H-23), 5.15(1H, m, H-7), 5.09(1H, dd-like, H-22), 4.61(1H, d, *J* = 7.8 Hz, anomeric-H), 3.55(1H, m, H-3), 2.08, 2.05, 2.20, 2.01(all 3H, each s, acetyl-methyl), 1.02(3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-21), 0.84(3H, s, H-29), 0.80(3H, s, H-19), 0.54(3H, s, H-18). ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δc) 170.72, 170.37, 169.42, 169.31(acetyl-carbonyl), 139.59(C-8), 138.13(C-22), 129.42(C-23), 117.23(C-7), 99.62(C-1'), 79.58(C-3), 72.87, 71.60(C-3', 5'), 71.51(C-2'), 68.51(C-4'), 62.10(C-6'), 55.85(C-17), 55.08(C-14), 51.22(C-24), 49.33(C-9), 43.24(C-13), 40.81(C-20), 40.13(C-5), 39.48(C-12), 39.38(C-4), 37.03(C-1), 34.26(C-10), 31.85

(C-25), 29.67(C-2), 29.21(C-6), 27.94(C-16), 25.38(C-28), 22.99(C-15), 21.48(C-11), 21.36(C-26), 21.08(C-21), 20.76, 20.73, 20.64, 20.61(acetyl-methyl), 19.00(C-27), 12.95(C-19), 12.24(C-29), 12.02(C-18).

결과 및 고찰

EtOAc 분획을 silica gel TLC를 이용하여 전개하였을 때에 뚜렷한 spot을 나타내며, UV흡수 특성을 보이고, 황산 분무 후 가열하였을 때 보라색으로 발색되는 물질을 분리하기 위하여 silica gel column chromatography를 반복하여, 0.021%수율로 혼합물 **1**을 얻었다.

혼합물 **1**은 미황색 oil상의 물질로써 ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃)에서 olefine methine signal(δ5.37)이 관측되었고, 많은 methylene signal이 δ2.78~1.29에서 관측되었으며, 쇠상 화합물의 말단 methyl signal [δ0.95(3 H, t, *J* = 7.6 Hz), δ0.85(3 H, t, *J* = 6.8 Hz)]이 두 개가 관측됨으로써 2중 이상의 지방산 혼합물로 판단되었다. 또한 ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃)에 있어서도, carbonyl(δc 189.57, 180.53)과 olefine methine signal(δc 131.88, 130.17, 128.21, 128.17, 127.69, 127.05)들이 관측되었고, 2개의 말단 methyl(δc 14.24, 14.09) 및 많은 methylene signal(δc 34.11~20.51)들이 주요 peak로 관측되었으며 작은 peak들도 다소 관측되었다. 따라서 혼합물 **1**은 지방산의 혼합물인 것으로 판명되었다. 구성 지방산의 종류 및 조성비를 결정하기 위하여 diazomethane으로 methyl ester화 한 후 GC/MS로 분석한 결과 methyl linolenate(43.6%)와 methyl palmitate(32.1%)가 대부분을 차지하였고 methyl stearate(10.2%), methyl arachidate(2.8%), methyl docosanoate(1.7%)가 소량 함유되어 있는 것으로 결정되었다. *n*-BuOH 분획으로부터도 silica gel column chromatography를 반복하고, 아세틸화 반응을 이용하여 UV흡수 특성을 보이며, TLC상에서 황산 분무 후, 가열시 흑색으로 발색되는 혼합물 **2a**를 0.002%의 수율로 얻었다.

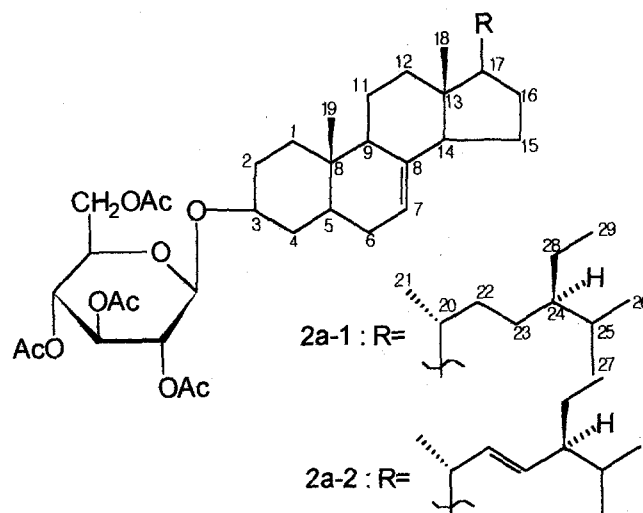


Fig. 1. The chemical structure of the sterol glycosides isolated from the leaves of *Cucurbita moschata*.

혼합물 **2a**는 흰색 분말상의 물질로서, ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) 또는 ¹³C-NMR(100 MHz, CHCl₃) 스펙트럼으로부터 2종의 화합물이 혼재하는 것으로 판명되었으며, 그 조성비는 ¹H-NMR signal의 적분 값으로부터 10 : 7로 나타났다. 그중 주성분인 화합물 **2a-1**의 ¹H-NMR 스펙트럼(400 MHz, CDCl₃)을 보면 1개의 hemiacetal signal(δ 4.61)과 다수의 oxygenated-methine 또는 oxygenated-methylene signal(δ 4.96~3.69)이 관측되어 한 분자의 당이 존재하는 것을 알 수 있었고, 5.15 ppm에서 관측된 olefine signal과 1.02~0.53 ppm에서 관측된 여러 개의 methyl signal의 존재로부터 sterol 배당체임을 예측하였다. 또, 2.08~2.01 ppm에서 관측된 4개의 singlet methyl signal로부터 4개의 acetyl기가 도입되었음을 알 수 있었다. 그리고 ¹³C-NMR spectrum(100 MHz, CDCl₃)에서는 4개의 acetyl기의 도입에서 유래한 4개의 carbonyl(δc 170.72, 170.37, 169.42, 169.31)과 4개의 methyl signal(δc 20.61, 20.64, 20.73, 20.76)이 관측되었고, 2개의 olefine signal로부터 (δc 139.65, 117.19) 한 쌍의 이중결합이 있는 것이 밝혀졌다. 1개의 hemiacetal(δc 99.62)과 5개의 oxygenated-methine 또는 oxygenated-methylene signal(δc 72.87~62.10)은 D-glucopyranose의 signal임이 확인되었으며, aglycone에서 기인한 oxygenated-methine signal(δc 79.58)도 관측되었다. ¹³C-NMR에서는 acetyl기 유래의 signal과 D-glucospyranose의 6개의 signal을 제하면 모두 29개의 signal이 관측되어 aglycone이 sterol인 것으로 확인되었고, 이들의 chemical shift와 DEPT spectrum의 결과를 유사한 sterol 화합물⁹⁾과 소상히 비교함으로써 호박씨의 sterol 성분인 24S-ethyl 5α-cholesta-7-en-3β-ol로 동정하였고, 3번 탄소에서 glycosidation shift가 관측되어, 당이 결합되어 있음을 알 수 있었고, 이때 glucose의 결합양식은 ¹H-NMR의 anomer signal의 coupling constant (J=7.8 Hz)로부터 β로 결정되었다. 따라서 화합물 **2a-1**의 화학구조는 3-O-β-D-glucopyranosyl 24R-ethyl 5α-cholesta-7-en-3β-ol의 acetyl 화합물로 결정되었다.

화합물 **2a-2**는 ¹³C-NMR data가 화합물 **2a-1**과 매우 유사하였으나, 뚜렷한 차이점은 이중결합이 한 쌍 더 있다는 것으로 olefine methine signal (δc 138.13, 129.42)이 관측된 점이다. 이러한 data를 문헌⁹⁾과 비교하였을 때 역시 호박씨의 sterol 성분인 24S-ethyl 5α-cholesta-7,22E-dien-3β-ol과 잘 일치하여, 화합물 **2a-2**의 구조를 3-O-β-D-glucopyranosyl 24S-ethyl 5α-cholesta-7,22E-en-3β-ol의 acetyl 화합물로 결정하였다.

이번에 분리된 sterol 배당체는 그 aglycone은 호박씨에서 분리, 보고되었으나 배당체의 형태로는 호박에서 처음 분리되었다. 천연에서 발견되는 대부분의 sterol 화합물에서는 C-5와 C-6사이에 불포화 결합이 존재하는 것에 비해 이 화합물은 C-7과 C-8사이에 유래하는 것이 특징적이다. 또한 sterol 화합물

은 어느 식물에서나 흔히 발견되어, 이들의 활성에 대해서는 그동안 연구된 바가 없었으나, 최근 식물에 다수 존재하는 β-sitosterol에서 항바이러스 및 항혈전 활성이¹²⁾ 밝혀짐으로서 sterol 화합물의 이용가능성을 시사하고 있어 이번 sterol 화합물의 활성에 관해서도 충분히 검토할 필요가 있을 것으로 본다.

참 고 문 헌

1. Kang, H. Y., Park, S. J., Shin, Y. S., Ho, Y. I., You, K. B. and Jeog, Y. G. (1978) *Olericultural Horticulture*, Hyangmunsa, Seoul, Korea 201.
2. Nam, H. K. and Koh, D. H. (1994) Fatty acid composition of korean Pumpkins, *Kor. J. Food & Nut.* **7**, 98.
3. Hak, W. S. (1965) : *Big Dictionary of Agriculture*, Hakwonsa, Seoul, Korea.
4. Kwon, Y. J., Song, G. S. and Lee, T. K. (1985) Studies on the lipid components of pumpkin seed. *Chunbuk national university* **16**, 107-114.
5. Rodriguez, J. B., Gros, E. G., Bertoni, M. H. and Cattaneo, P. (1996) The sterols of *Cucurbita moschata*("calabacia")seed oil. *Lipids* **31**, 1205-1207.
6. Herrmann, K. (1996) Constituents of cucurbitaceae, including zucchini. *Industrielle Obst- und Gemuseverwertung* **81**, 282-285.
7. Al-khalifa, A. S. (1996) Physicochemical characteristics, fatty acid composition, and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oils. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 964-966.
8. Akihisa, T., Inada, Y., Ghosh, P., Thakur, S., Rosenstein, F. U., Tamura, T. and Matsumoto, T. (1988) Composition of triterpene alcohols of seed and mature plants of family Cucurbitaceae. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 607-610.
9. Khachik, F. and Beecher, G. R. (1988) Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 929-937.
10. Khachik, F., Beecher, G. R. and Lusby, W. R. (1988) Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 938-946.
11. Visser, F. R. and Brrows, J. K. (1983) Composition of New Zealand foods. characteristic fruits and vegetables. *DSIR Bulletin.* **235**, 36.
12. Ko, B. S., Kim, H. K., Moon, H. K., Chun, J. M., Kim, B. H., Kang, B. J. and Park, G. J. (1998) Isolation of anti herpes virus (HVS) compound from *Raphanus sativus*, Abstracts of spring Annual meeting of the *Kor. Soc. Agric. Chem. Biotech.* (Kyungju), 93.

Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources-II. Isolation of Fatty Acids and Sterol Glycosides from the Leaves of *Cucurbita moschata* DUCH.

Jae-Taek Han, Eun-Mi Ahn and Nam-In Baek*(*Department of Life Science & Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea*)

Key words : pumpkin, *Cucurbita moschata*, sterol glycoside, fatty acids, 3-*O*- β -D-glucopyranosyl 24*S*-ethyl 5 α -cholesta-7,22*E*-dien-3 β -ol, 3-*O*- β -D-glucopyranosyl 24*R*-ethyl-5 α -cholesta-7-en-3 β -ol, linolenic acid, palmitic acid.

*Corresponding author