

식용 식물자원에서부터 활성물질의 탐색 XIII. 개망초(*Erigeron annuus* L.) 꽃으로부터 triterpenoid의 분리

김동현 · 정성제 · 방명호 · 정인식 · 김성훈¹ · 권병목² · 김대근³ · 박미현⁴ · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹경희대학교 동서의학대학원,

²한국생명공학연구원, ³우석대학교 약학대학, ⁴(주)이롭라이프

(2004년 11월 1일 접수; 2004년 12월 9일 수리)

개망초의 꽃을 80% MeOH 용액으로 추출하고, 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배, 추출하였다. 이 중 EtOAc 분획을 silica gel, octadecylsilica gel(ODS) column chromatography 및 high performance liquid chromatography(HPLC)로 정제하여 3종의 화합물을 분리하였다. 각 화합물의 화학구조는 NMR, MS 및 IR 등의 스펙트럼 데이터를 해석하여, α -amyrenone(1), α -amyrin(2) 및 β -amyrin(3)으로 동정하였다. 이들 3종의 triterpenoid는 개망초에서는 처음 분리되었다.

Key words: 개망초, α -amyrenone, α -amyrin, β -amyrin

서 론

개망초(*Erigeron annuus* L.)는 국화과(Compositae)에 속하는 북아메리카 원산의 귀화식물로서, 우리나라 전국 각지의 산야지를 뒤덮고 자라는 잡초이다. 2년생 초본(草本)으로 높이가 30~100 cm이고 줄기는 곧추서며 전체에 짧은 털이 있으며 가지가 많이 갈라진다. 월동 시에도 근생엽(根生葉)이 살아 있다가 이듬해 봄에 다른 식물보다 일찍 생장을 시작하고, 6~8월에 백색 또는 연한 자줏빛의 꽃이 피는 식물이다. 두화(頭花)는 가지 끝과 원줄기 끝에 산방상(繖房狀)으로 달리며, 지름 2 cm 정도의 설상화(舌狀花)가 둘러싸고 있다. 한방에서는 개망초의 전초 및 뿌리를 달여서 소화불량, 장염에 의한 설사, 전염성 간염, 임파절염 및 혈뇨치료에 쓴다.¹⁾ 개망초의 주요 성분으로는 잎과 줄기로부터 상추 종자의 발아 억제 활성을 가진 4-hydroxycinnamic acid 및 3,4-dihydroxycinnamic acid methyl ester와 꽃으로부터 3-hydroxy-pyran-4-one 및 5-butyl-3-oxo-2,3-dihydrofuran-2-yl acetic acid가 분리 보고되어 있고,²⁾ 암세포 전이 억제 활성을 가진 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid와 methyl 3,5-di-*O*-caffeoylquinic³⁾ 등의 물질이 분리되어 보고된 바 있다. 하지만 그 외의 화합물에 대하여는 성분연구가 이루어지지 않았다.

본 실험에서 저자 등은 개망초 꽃 MeOH 추출물의 EtOAc 분획으로부터 3종의 triterpenoid 화합물을 분리하였다. 분리된 3종의 triterpenoid 화합물은 개망초에서는 처음 분리되었다. 각 화합물의 chromatography를 이용한 분리, 정제 및 NMR 등을 이용한 구조 동정에 관해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

기기 및 시약. NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400 (Varian, USA)으로, IR 스펙트럼은 Spectrum One(Perkin-Elmer, USA)으로, polarimeter는 P-1010(JASCO, Japan)으로, EI/MS는 JMSAX 505-WA(JEOL, Japan)로 측정하였다. HPLC는 LC-10AT(Shimadzu, Japan)로, 녹는점은 Fisher-John's Melting Point Apparatus(Fisher Scientific, USA)를 사용하여 측정하였고, 미보정하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Germany)을 octadecylsilica gel(ODS)은 LiChrorep RP-18(Merck, Germany)을 사용하였다. TLC는 Kieselgel 60 F₂₅₄와 RP-18 F₂₅₄를 사용하였고, 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

식물시료. 용인 산야지에서 개망초의 꽃 부분을 직접 채취하였고, 표본시료(KHU020219)는 경희대학교 생명공학원 천연물 화학실에 보관되어 있다.

활성물질의 추출 및 용매분획. 개망초 꽃 1.2 kg에 80% MeOH 용액(15 l×2)을 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 얻어진 여액을 45°C에서 감압농축하고, 이 농축물을 물(2 l)과 ethyl acetate(EtOAc, 2 l×2)로 분배 추출하였으며, 물층은 다시 *n*-butanol(*n*-BuOH, 2 l×2)로 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 EtOAc분획(50 g), *n*-BuOH 분획(76 g) 및 물분획(130 g)을 얻었다.

화합물 1의 분리. EtOAc 추출물(EAE)을 silica gel column (Φ9×20 cm) chromatography(*n*-hexane : EtOAc = 7 : 1→5 : 1→3 : 1→1 : 1)를 실시하여 23개의 분획물(EAE1~EAE23)을 얻었다. 그 중 EAE3(997 mg) 분획을 silica gel column chromatography (c.c., *n*-hexane : EtOAc = 40 : 1→30 : 1, Φ5.5×11 cm)하여 12개의 분획물(EAE3-1~EAE3-12)을 얻었고, EAE3-6(46 mg)을 다시 ODS c.c.(MeOH : H₂O = 35 : 1, Φ3.8×9 cm)로 정제하여 화합물 1(EAE3-6-7, 21 mg)을 분리하였다.

*연락처

Phone: 82-31-201-2661, Fax: 82-31-201-2157
E-mail: nibaek@khu.ac.kr

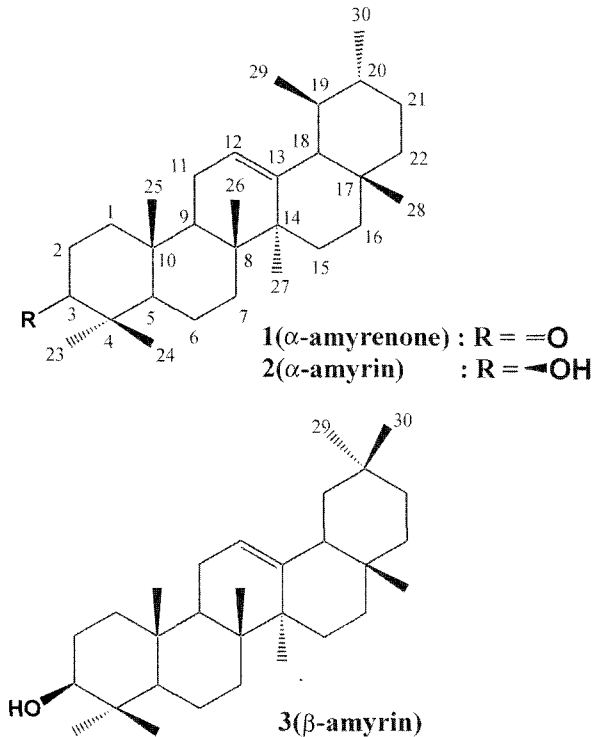


Fig. 1. Chemical structures of triterpenoids from the flower of *Erigeron annuus* L.

화합물 1: White powder(CHCl₃-MeOH), mp 125-126°C, EI/MS *m/z*: 424(M⁺), 218; [α]_D +96.0° (*c*=0.7, CHCl₃); IR_v (CHCl₃, cm⁻¹) 1715, 1385, 1370; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 5.13(1H, dd, *J*=4.0, 3.2 Hz, H-12), 1.07(3H, s, H-23), 1.06(6H, s, H-25, 27), 1.06(3H, d, *J*=6.8 Hz, H-29), 1.03(6H, s, H-24, 26), 0.88(3H, d, *J*=6.8 Hz, H-30), 0.79(3H, s, H-28); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ_c) 216.5(C-3), 139.6(C-13), 124.1(C-12), 59.1(C-18), 55.3(C-5), 46.9(C-9), 42.3(C-14), 41.5(C-22), 40.0(C-8), 39.7(C-19), 39.6(C-20), 39.5(C-1), 36.7(C-10), 34.3(C-2), 33.8(C-17), 32.5(C-7), 32.0(C-21), 29.4(C-4), 28.8(C-28), 28.1(C-15), 26.6(C-23), 23.7(C-16), 23.6(C-27), 23.6(C-29), 21.5(C-24), 21.4(C-30), 19.7(C-6), 16.9(C-1), 16.9(C-26), 15.5(C-25).

화합물 2와 3의 분리. EAE6(764 mg) 분획을 silica gel c.c. (*n*-hexane : EtOAc = 10 : 1, Φ 4.5×16 cm)하여 10개의 분획물(EAE6-1~EAE6-10)을 얻었고, EAE6-5(456 mg)를 다시 silica gel c.c. (*n*-hexane : EtOAc : MeOH = 70 : 1 : 1, Φ 3.5×15 cm)하여 11개의 분획물(EAE6-5-1~EAE6-5-11)을 얻었으며, 그 중 EAE6-5-4(217 mg)를 ODS c.c. (MeOH : H₂O = 10 : 1→20 : 1→30 : 1, 3.5×13 cm)로 정제하여 EAE6-5-4-9(103 mg)를 분리하였다.

시료 EAE6-5-4-9(25 mg)로부터 HPLC를 이용하여 화합물을 분리하였다. 분리용 컬럼은 Luna 5 μ C₁₈(250×4.6 mm)을 사용하였고, 이동상으로서 MeOH : H₂O(50 : 1)의 용매 조합을 사용하여 용출하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 하고 검출기는 refractive index detector(RID-10A, Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 이 결과 retention time이 각각 26분 30초와 28분 57초에

서 두개의 peak가 관측되었다. 각 peak를 반복 분취 한 후, 감압 농축하여 화합물 2(EAE6-5-4-9-1, 10 mg)와 화합물 3(EAE6-5-4-9-2, 6 mg)을 분리하였다.

화합물 2: White powder(CHCl₃-MeOH), mp 183-184°C, EI/MS *m/z*: 426(M⁺), 218; [α]_D +88.0 (*c*=0.4, CHCl₃); IR_v (CHCl₃, cm⁻¹) 3320, 1645; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 5.21(1H, dd, *J*=4.0, 4.0 Hz, H-12), 3.44(1H, dd, *J*=10.0, 6.0 Hz, H-3), 1.08(3H, s, H-27), 1.02(3H, s, H-26), 1.00(3H, s, H-23), 0.98(3H, s, H-25), 0.90(3H, d, *J*=6.4 Hz, H-30), 0.81(6H, s, H-24, 28), 0.81(3H, d, *J*=6.4 Hz, H-29); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ_c) 139.3(C-13), 124.4(C-12), 77.6(C-3), 58.8(C-18), 55.3(C-5), 47.6(C-9), 41.9(C-14), 41.4(C-22), 39.9(C-8), 39.4(C-20), 39.5(C-19), 39.0(C-4), 38.8(C-1), 36.7(C-10), 33.6(C-17), 32.9(C-7), 31.1(C-21), 29.6(C-15), 28.6(C-28), 28.4(C-23), 27.9(C-2), 26.5(C-16), 23.2(C-27), 23.1(C-29), 21.2(C-30), 18.4(C-6), 17.4(C-11), 16.7(C-26), 15.6(C-25), 15.6(C-24).

화합물 3: White powder(CHCl₃-MeOH), mp 193-194°C, EI/MS *m/z*: 426(M⁺), 218; [α]_D +89.0 (*c*=0.3, CHCl₃); IR_v (CHCl₃, cm⁻¹) 3300, 1663; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 5.25(1H, dd, *J*=4.0, 4.0 Hz, H-12), 3.52(1H, m, H-3), 1.22(3H, s, H-27), 1.00(3H, s, H-26), 0.96(3H, s, H-23), 0.94(3H, s, H-25), 0.87(6H, s, H-29, 30), 0.82(3H, s, H-28), 0.77(3H, s, H-24); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ_c) 144.6(C-13), 121.8(C-12), 77.6(C-3), 55.3(C-5), 47.6(C-9), 47.1(C-18), 46.6(C-19), 41.5(C-14), 39.0(C-4), 39.0(C-8), 38.7(C-1), 37.0(C-22), 36.8(C-10), 34.5(C-21), 33.1(C-29), 32.6(C-7), 32.3(C-17), 30.8(C-20), 28.4(C-28), 28.2(C-23), 26.8(C-2), 26.8(C-16), 26.1(C-15), 25.8(C-27), 23.4(C-30), 23.5(C-11), 18.4(C-6), 16.7(C-26), 15.4(C-25), 15.4(C-24).

결과 및 고찰

개망초로부터 얻어진 MeOH 추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O로 순차 분획하고 각 분획은 감압농축하여 3개의 분획을 얻었다. EtOAc 분획을 silica gel column chromatography 및 ODS column chromatography 로 정제하여 화합물 1을 분리하였고, 화합물 2와 3이 함유된 분획 EAE6-5-4-9를 얻었다.

화합물 1은 흰색의 분말로서 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 5.13(1H, dd)의 signal로부터 olefinic methine proton을 관측 할 수 있었고, δ 2.57~ δ 1.00에서 다수의 methylene과 methine proton signal을 확인할 수 있었다. 또한 1.07(3H, s), 1.06(6H, s), 1.03(6H, s) 및 0.79(3H, s)에서 6개의 singlet, 1.06(3H, d)과 0.88(3H, d)에서 2개의 doublet methyl proton signal을 확인하였다. 따라서 화합물 1은 이중결합 1개를 가진 pentacyclic triterpenoid로 추정되었다.

¹³C-NMR 스펙트럼에서 탄소수 30개의 탄소 signal이 확인되었으며, 216.50에서 ketone signal이 관측되었다. δ 139.61와 δ 124.10에서 1개의 이중결합을 확인하였고, δ 59.14~ δ 16.89 사이

에서 다수의 methine과 methylene signal을 관측할 수 있었으며, δ 28.82, 26.64, 23.60, 23.60, 21.57, 21.45, 16.89 및 15.50에서 8개의 methyl signal이 관측되었다. 따라서 화합물 1은 doublet methyl기 2개와 singlet methyl기 6개를 가진 ursane 골격의 triterpenoid 화합물이라는 것을 추정할 수 있었다. 이와 같은 자료들을 종합하여 NMR spectrum을 비교한 결과⁴⁾ 화합물 1은 pentacyclic triterpenoid인 α -amyrin의 3번 hydroxyl기가 산화하여 ketone기가 형성된 α -amyrenone으로 동정하였다.

한편, EAE6-5-4-9(103.2 mg)는 thin layer chromatography (TLC) 상에서 단일 물질로 확인되어 NMR 스펙트럼을 분석해 본 결과 2개의 화합물이 혼합되어 있는 것을 알 수 있었다. 따라서 HPLC를 이용하여 재료 및 방법에서 제시한 조건으로 retention time이 각각 26분 30초와 28분 57초인 peak를 보이는 물질을 분취하여 화합물 2 및 3을 분리하였다.

화합물 2는 흰색의 분말로서 화합물 1(α -amyrenone)과 ¹H-, ¹³C-NMR 스펙트럼을 비교해본 결과 화합물 1의 3번 ketone이 환원된 것으로 추정되었다. 즉, ¹H-NMR 스펙트럼에서 화합물 1에서는 보이지 않던 oxygenated methine proton signal이 3.44(1H, dd)에서 관측되었으며, ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 δ 216.5의 ketone signal이 사라진 대신 δ 77.56에서 oxygenated methine carbon이 발견되었다. 따라서 화합물 2는 ursane계의 α -amyrin으로 동정하였다.^{4,5)}

화합물 3은 흰색 분말로 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 5.25(1H, dd)의 signal로부터 olefinic methine proton과 δ 3.52(1H, dd)의 signal로부터 oxygenated methine proton을 확인하였다. 또한 δ 2.03~ δ 1.02에서 다수의 methylene과 methine proton signal을 확인하였고, δ 1.22(3H, s), 1.00(3H, s), 0.96(3H, s), 0.94(3H, s), 0.87(6H, s), 0.82(6H, s) 및 0.77(3H, s)에서 8개의 singlet methyl proton signal을 확인하였다. 이러한 methyl기의 coupling 형태는 화합물 2와는 다른 양상으로 화합물 3은 ursane과는 다른 골격을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.

¹³C-NMR 스펙트럼에서 탄소수 30개의 탄소 signal이 확인되었으며, δ 144.60와 δ 121.80에서 1개의 이중결합, δ 77.56에서 1개의 oxygenated methine signal을 확인하였다. 또한 δ 33.08, 28.35, 28.21, 25.81, 23.43, 16.66, 15.39 및 15.39에서 8개의 methyl signal이 관측되었다. 또한 DEPT 스펙트럼에서 3급 탄소가 5개, 4급 탄소가 7개 인 것을 확인할 수 있었다. 따라서 화합물 3은 앞서 밝힌 methyl기의 coupling 형태와 3·4급 탄소의 개수로 미루어 oleanane 골격이라는 것을 알 수 있었다. 화합물 3은 문헌치와의 대조에 의하여 singlet methyl기 8개를 가지고 3번 위치에 hydroxyl기가 β -결합한 oleanane 골격의 pentacyclic triterpenoid인 β -amyrin으로 동정하였다.^{4,6)}

이번에 분리된 triterpenoid 화합물들은 *Isodon japonicus* H.⁴⁾와 *Alibertia macrophylla*⁷⁾ 등과 같은 식물에서 분리, 보고되었으나 개망초에서는 처음 분리되었다. 분리된 α -amyrin과 β -

amyrin은 최근 가려움증을 완화시키는 활성⁸⁾이 보고 된 바 있고 우리 나라에서 매우 쉽게 구할 수 있다는 점에서, 개망초의 폭넓은 이용가능성을 시사하고 있다. 또한 이번 실험에서 분리된 3종의 triterpenoid와 비슷한 골격을 가진 ursolic acid와 oleanolic acid에서 항암 및 항염증^{9,10)} 활성이 밝혀짐으로서 이와 유사한 활성에 관해서도 검토할 필요가 있을 것으로 본다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 및 한국과학재단 우수연구센터사업(경희대 식물대사연구센터)에서 지원하는 연구비로 수행되었음.

참고문헌

- Jung, B. S. and Shin, M. K. (1990) In *Hyang Yak Dae Sa Jun*, Young Lim Sa (3rd ed.) Seoul, Korea.
- Oh, H. C., Lee, S. U., Lee, H. S., Lee, D. H., Lee, S. Y., Chung, H. T., Kim T. S. and Kwon, T. O. (2002) Germination inhibitory constituents from *Erigeron annuus*. *Phytochemistry* **61**, 175-179.
- Oh, H. C., Kang, D. G., Lee, S. Y. and Lee, H. S. (2002) Angiotensin converting enzyme inhibitors from *Cuscuta japonica* Choisy. *J. Ethnopharmacol.* **83**, 105-108.
- Seo, S., Tomita, Y. and Tori, K. (1975) Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* H. tissue cultures. *Tetrahedron lett.* **1**, 7-10.
- Hinge, V. K., Wagh, A. D., Paknikar, S. K. and Bhattacharyya, S. C. (1965) Terpenoids-LXXI Constituents of Indian black dammar resin. *Tetrahedron* **21**, 3197-3203.
- Hui, W. H., Ko, P. D. S., Lee, Y. C., Li, M. M. and Arthur, H. R. (1975) Triterpenoids from ten *Lithocarpus* species of Hong Kong. *Phytochemistry* **14**, 1063-1066.
- Bolzani, V. D. S., Trevisan L. M. V. and Young, M. C. M. (1991) Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. *Phytochemistry* **30**, 2089-2091.
- Oliveira, F. A., Lima-Junior, R. C. P., Cordeiro, W. M., Vieira-Junior, G. M., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Silva, R. M., Santos, F. A. and Rao, V. S. N. (2004) Pentacyclic triterpenoids, α , β -amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacol. Biochem. Be.* **78**, 719-725.
- Hah, J. C., Rhew, T. H., Choe, E. S., Chung, H. Y. and Park, K. Y. (1992) Antitumor effect of ursolic acid against inbred hepatoma in CBA/J mouse. *J. Korean Cancer* **24**, 790-794.
- Liu, J. (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* **49**, 57-68.

Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources XIII. Isolation of Triterpenoids from the Flower of *Erigeron annuus* L.

Dong-Hyun Kim, Sung Je Jung, Myun-Ho Bang, In-Sik Chung, Sung-Hoon Kim¹, Byoung-Mog Kwon², Dae-Keun Kim³, Mi-Hyun Park⁴ and Nam-In Baek* (*Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Reserch Center; ¹Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Suwon, 449-701; ²Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejon 305-333; ³Department of Pharmacy, Woosuk University, Jeunbuk 565-701; ⁴Erom Life Co. Ltd., Seoul 135-825, Korea*)

Abstract: The flower of *Erigeron annuus* L. was extracted with 80% aqueous MeOH, and the concentrated extract was partitioned with EtOAc, *n*-BuOH and H₂O, successively. From the EtOAc fraction, three compounds were isolated through the repeated silica gel, ODS column and high performance liquid chromatographies. From the result of physico-chemical data including NMR, MS and IR, the chemical structures of the compounds were determined as α -amyrenone, α -amyrin and β -amyrin. These three compounds were isolated for the first time from the flower of *Erigeron annuus* L.

Key words: *Erigeron annuus* L., α -amyrenone, α -amyrin, β -amyrin

*Corresponding author