

# 약쑥의 유용성분 정량분석

류수노<sup>†</sup> · 강삼식\*

<sup>†</sup>한국방송통신대학교 \*서울대학교

## I. 서 언

Artemisia 속 식물인 쑥은 국화과 식물로서 지구 북반구에 200여종이 있고 국내에서는 38종이 보고되어 있으나 종이 명확하지가 않다. 쑥, 물쑥, 산쑥, 사철쑥, 뽕쑥 및 덩불쑥은 다년생 초본이며 인진쑥은 예외로 다년생 목본에 속한다. 줄기와 잎자루는 약용이며 어린잎은 식용, 보통잎은 뜸쑥을 만들때 사용된다.

우리나라에서는 약쑥(*A. asiatica*)이 공정서에 수재되어 있으며 약쑥은 식용뿐만 아니라 한방에서는 출혈 및 지혈약으로 자궁출혈, 임신중의 출혈, 코피 지혈 등에 효과가 크다고 알려져 왔으며 그 외에도 강장보혈, 부인병과 건위, 설사치료 등의 목적으로 사용되어온 생약이다. 특히 항암활성이 알려져 있으며 HeLa cell에 대한 억제작용도 보고되고 있다.

우리나라에서 애엽으로 시판되고 있는 약쑥의 성분연구는 지금까지 정유성분 이외에는 밝혀진 것이 없으나 최근 시판약쑥의 MeOH 엑스가 HCl-EtOH 유발법, 1%암모니아수용액 유발법, HCl-aspirin 유발법 등에 의하여 유발된 위 손상에 대하여 강한 억제작용을 나타내고 있으며 이의 유효성분은 flavonoid의 일종인 eupatilin으로 확인 보고된 바 있다(장, 1992).

Koshibara 등(1983)은 eupatilin이 5-lipoxygenase inhibitor( $ID_{50} = 14 \times 10^{-6} M$ )임을 보고한 바 있으며, prostaglandin synthase의 활성도가 억제된다고 보고하고 있다.

개똥쑥(*A. annus*)에서 분리한 artemisinin은 현재 각광받고 있는 신약으로 항말라리아 치료제로 개발되었으며 곧 시판될 예정이다. 또한, artemisinin 생합성 중간 산물인 amorpho-4,11-diene을 생성하는 유전자를 분리하여 특성분석 결과를 보고한 바 있다(Chang et al., 2000).

본 연구는 쑥으로부터 eupatilin과 jacosidin을 추출·분리하고 이들의 물리화학적 성질과 정량분석법을 개발하여 보고한다.

## II. 분석방법

2003년 강화산 사자발쑥 지상부 6 kg을 acetone으로 3회 수욕상에서 추출하여 농축하고 잔사에 MeOH을 가하여 3시간씩 3회 추출하였다. acetone 엑스(120 g)을 silicagel column(Merck, 7734)에 걸여  $CHCl_3$ 으로 용출시킨후  $CHCl_3$  - MeOH로 gradient elution 시켜 얻은 Subfraction

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-2-3668-4631 (E-mail) ryusn@knou.ac.kr

NO.15 분획을 농축한 후 방치하여 생성된 결정을 decantation 시켜 MeOH로 재결정을 반복하여 미황색 침상결정의 순수한 화합물 1 480 mg을 얻었다. Subfraction No.17 분획을 silicagel Column(Merck, 7729)에 걸고 EtOAc-hexane = 1:1로 용출시켜 얻은 분획 7을 MeOH로 재결정을 반복하여 미황색분말인 화합물 2를 얻었다.

사자발쑃의 잎 3.6 kg에 acetone을 가하여 3시간씩 3회 수욕상에서 추출하여 얻은 acetone엑스에 MeOH 및 hexane을 거의 동량 가하여 분획여두를 사용하여 분획하였다. MeOH가용분획 154g을 상기와 같이 silicagel column에 걸어 얻은 분획을 재결정하여 735 mg의 순수한 화합물 1을 얻었다. 모액은 농축하여 15.2g을 얻고 이를 다시 silicagel column에 걸어 hexane-EtOAc=8:5로 용출시켜 재결정을 반복하여 0.5g의 화합물 1을 얻었다.

사자발쑃 지상부의 hexane 분획 43.9 g을 silicagel column(Merck 7734)에 걸어 hexane-EtOAc=8:5로 용출시켜 얻은 화합물 1 함유 분획을 재결정하여 0.32 g의 순수한 화합물 1을 얻었다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 화합물 1의 물리화학적 성질

mp 234°, IR<sub>v</sub> max(KBr) 3395(OH), 3266(OH), 1655(α,β-unsaturated C=O), 1618, 1582, 1514(aromatic C=C), 1464, 1377, 1267, 1159, 1024cm<sup>-1</sup>; UV λ<sub>max</sub>(logε)<sub>in</sub> MeOH 275(4.18), 340(4.34)nm; in MeONa 276(4.36), 313(4.11), 372(4.22); in NaOAc 276(4.35), 315(4.10), 371(4.21); in NaOAc+ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 278(4.22), 339(4.23), 402(sh, 3.85); in AlCl<sub>3</sub> 261(4.13), 283(4.14), 297(sh, 4.09), 372(4.35); in AlCl<sub>3</sub> + HCl 259(4.08), 289(4.16), 364(4.33), <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 3.77(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.85(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.88(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.62(1H, s, H-3), 6.92(1H, s, H-8), 7.11(1H, d, J = 8.6Hz, H-5'), 7.54(1H, d, J = 2.1Hz, H-2'), 7.65(1H, dd, J = 8.6, 2.1Hz, H-6'), 10.64(ca 0.8H, 7-OH), 13.02(1H, brs, 5-OH).

<sup>13</sup>C-NMR (75.5MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 163.28(C-2), 103.29(C-3), 182.08(C-4), 152.63(C-5), 131.31(C-6), 157.16(C-7), 94.25(C-8), 152.34(C-9), 104.09(C-10), 122.91(C-1'), 109.49(C-2'), 148.98(C-3'), 152.09(C-4'), 111.68(C-5'), 119.93(C-6'), 59.85, 55.81, 55.66(OCH<sub>3</sub>).

MS *m/z* (rel. int., %) 344[M]<sup>+</sup> (64.7), 329[M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (45.2), 326[M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (61.6), 301[M-CH<sub>3</sub>-CO]<sup>+</sup> (100), 298[M-H<sub>2</sub>O-CO]<sup>+</sup> (24.8), 183[A<sub>1</sub>+H]<sup>+</sup> (3.9), 165[B<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (12.5), 163[M-H<sub>2</sub>O]<sup>++</sup> (55.1), 162[B<sub>1</sub>]<sup>+</sup> (11.8), 139(38.9), 69(68.6)

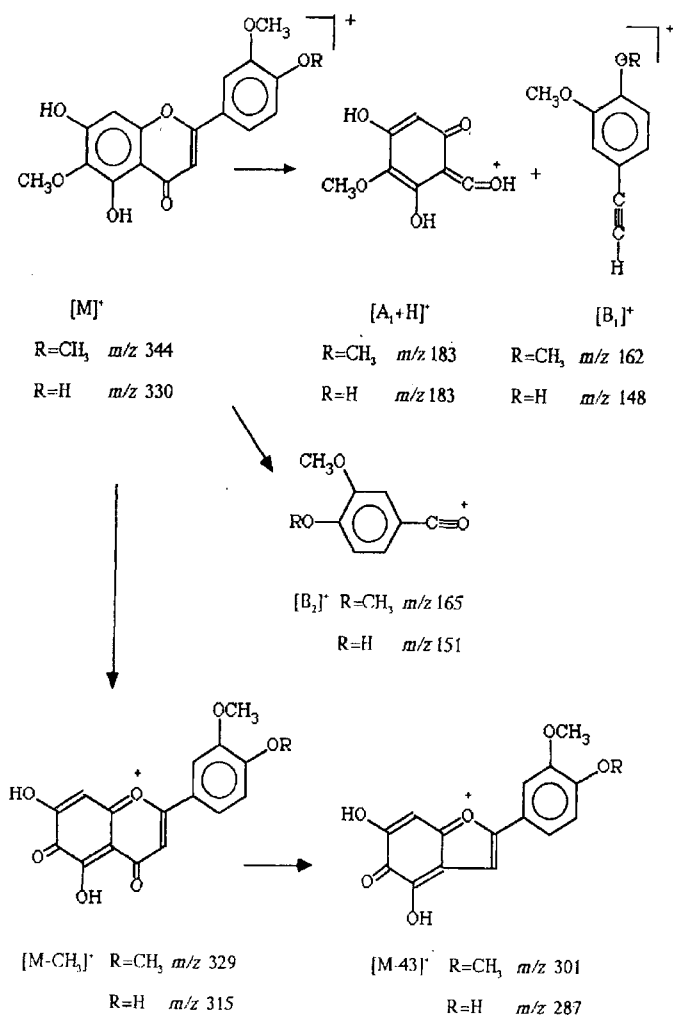
#### 2. 화합물 2의 물리화학적 성질

mp 225~8°, IR<sub>v</sub> max(KBr) 3430(OH), 1665(α,β-unsaturated C=O), 1620, 1578 (aromatic C=C), 1495, 1460, 1429, 1372, 1275, 1215, 1161, 772 cm<sup>-1</sup>

UV λ<sub>max</sub>(logε) in MeOH 274(4.29), 344(4.48)nm; in MeONa 262(sh, 4.30), 274(sh, 4.29), 335(4.15), 408(4.59); in NaOAc 276(4.38), 325(4.22), 363(4.33); in NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 275(4.30),

344(4.44); in AlCl<sub>3</sub> 262(4.23), 280(4.25), 298(sh, 4.13), 377(4.48); in AlCl<sub>3</sub>+HCl 259(4.19), 286(4.26), 366(4.45). <sup>1</sup>H-NMR (80MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 3.75(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.88(3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.60(1H, s, H-8), 6.86(1H, s, H-3), 6.92(1H, d, *J* = 9.4Hz, H-5'), 7.55(1H, d, *J* = 2.0Hz, H-2'), 7.55(1H, dd, *J* = 8.8, 2.0Hz, H-6'), 13.05(5-OH).

MS *m/z* (rel. int., %) 330[M]<sup>+</sup> (27.9), 315[M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (18.2), 312[M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (13.2), 287[M-CH<sub>3</sub>-CO]<sup>+</sup> (56.3), 272[M-2CH<sub>3</sub>-CO]<sup>+</sup> (8.7), 183[A<sub>1</sub>+H]<sup>+</sup> (7.9), 151[B<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (12.6), 148[B<sub>1</sub>]<sup>+</sup> (10.8), 136[M-2CH<sub>3</sub>-CO]<sup>++</sup> (16.9)



**Scheme 1.** Selected mass fragmentation ions from eupatilin(R=CH<sub>3</sub>) and iaceosidin(R=H)

### 3. 화합물 1.2의 물리화학적 성질 고찰

약속으로부터 얻은 화합물 1 과 2는 모두 미황색 화합물들로서 flavonoid 정색반응에 각각

양성을 나타내며 IR spectrum이 두 화합물 모두 flavonoid의 특이적인 흡수 band를 나타내고 있는 것으로 보아 두 화합물 모두 flavonoid 계 화합물로 추정되었다.

화합물 1 및 2의 UV spectrum을 보면 band I이 각각 340nm 및 344nm에서 나타나고 있는 것으로 보아 flavone계 화합물로 추정되며 NaOAc에 의해 bandII가 모두 bathochromic shift 되는 것으로 보아 C-7위치에 OH기가 존재하는 것으로 추정되었다. NaOH에 의해 bandI이 모두 bathochromic shift 되나 화합물 1은 흡수강도가 감소하므로 4'-OH는 존재하지 않는 것으로 추정할 수 있으나 화합물2는 64nm bathochromic shift 되어 나타나고 있는 band I의 흡수강도가 증가하는 것으로 보아 4'-OH가 존재하는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 AlCl<sub>3</sub>에 의해 화합물 1,2 모두 bathochromic shift 되어 있으므로 두 화합물에서 5-OH가 존재함을 추정할 수 있었다<sup>8)</sup>.

화합물1의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 보면 3.77, 3.85, 3.88ppm에서 3개의 OCH<sub>3</sub>가 singlet signal로 각각 나타나고 있으며 6.62 및 6.92에서 각각 나타나는 1H분의 singlet signal은 각각 H-3 및 H-8 또는 H-6 proton으로 추정할 수 있었다. B-ring proton은 H-2', 5' 6'로 추정되는 ABX type의 splitting pattern이 나타나는 것으로 보아 C-3' 및 4' 위치에 OH 또는 OCH<sub>3</sub>기가 존재하고 있음을 추정할 수 있었으며, C-5 및 C-7위치에 결합되어 있을 것으로 추정되었던 두 개의 OH기의 signal은 13.02 및 10.64ppm에서 나타남을 확인할 수 있었다.

이 화합물의 mass spectrum을 보면 Scheme1에서 볼 수 있는 것과 같이 retro Diels-Alder 분해에 의해 생성된 Fragment ion인 [A<sub>1</sub>+H]<sup>+</sup> ion이 m/z 183에서 [B1]<sup>+</sup> ion이 m/z 162에서 나타나는 것으로 보아 OCH<sub>3</sub>기는 B ring에 2개, A ring에 1개씩 결합되어 있으며, [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 및 [M-CH<sub>3</sub>-CO]<sup>+</sup> ion이 각각 m/z 329 및 m/z 301에서 강하게 나타나는 것으로 보아 A ring의 OCH<sub>3</sub>기는 C-6에 결합되어 있음을 추정할 수 있었다<sup>10)</sup>. 따라서 화합물 1의 화학구조는 5, 7-dihydroxy-6,3', 4'-trimethoxyflavone 즉 eupatilin으로 결정할수 있었으며 이를 <sup>13</sup>C-NMR data의 해석에 의하여 증명 할 수 있었다.

화합물2의 <sup>1</sup>H-NMR data는 화합물1과 매우 유사하나 1보다 OCH<sub>3</sub>기가 하나 적으며, mass spectrum에 의해서 B ring에 하나의 OH와 OCH<sub>3</sub> 존재함을 할 수 있었다. B ring proton의 <sup>1</sup>H-NMR data와 shift reagent에 의한 UV spectral data를 종합하여 화합물2는 eupatilin의 4'-OCH<sub>3</sub>기가 OH로 치환된 jaceosidin으로 결정할 수 있었다.

#### 4. Eupatilin과 Jaceosidin의 정량분석법 개발

##### 1) HPLC의 분석조건

Spectra-Physics, Inc.(USA)의 HPLC System [Sp8800 ternary' HPLC pump, SP 4270 integrator, Spectra 100 UV-Vis variable wavelength detector, Rheodyne 7125 10μl injection loop; Column: Spheri-5 RP-18 column(5 μm, 220×46 mm), Detector: 340 nm, Solvent: MeOH-0.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Flow rate: 1ml/min, Sensitivity: 0.05 AUFS Chart speed: 0.5 cm/min.

Time(min)	MeOH(%)	0.4% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)
0	50	50
10	70	30
30	70	30

2) HPLC용 검체의 조제

검체 3.877 g을 취하여 MeOH 100 ml를 가하여 수욕상에서 3시간씩 3회 추출하여 여과하여 얻은 여액을 감압농축하고 항량이 될 때까지 desiccator에서 감압 건조하여 MeOH엑스 508mg을 얻었다. 이 MeOH엑스에 pyridine 2ml을 가하여 용해시킨 후 MeOH을 가하여 정확히 50ml로 한후 0.45 μm membrane filter를 사용하여 여과하여 사용하였으며 이액 10 μl를 취하여 얻은 chromatogram은 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에서  $t_R = 14.72$ 분에서 나타나는 피크가 jaceosidin이고,  $t_R = 17.42$ 분에서 나타나는 강한 피크가 eupatilin임을 spike test를 실시하여 확인 할 수 있었다.

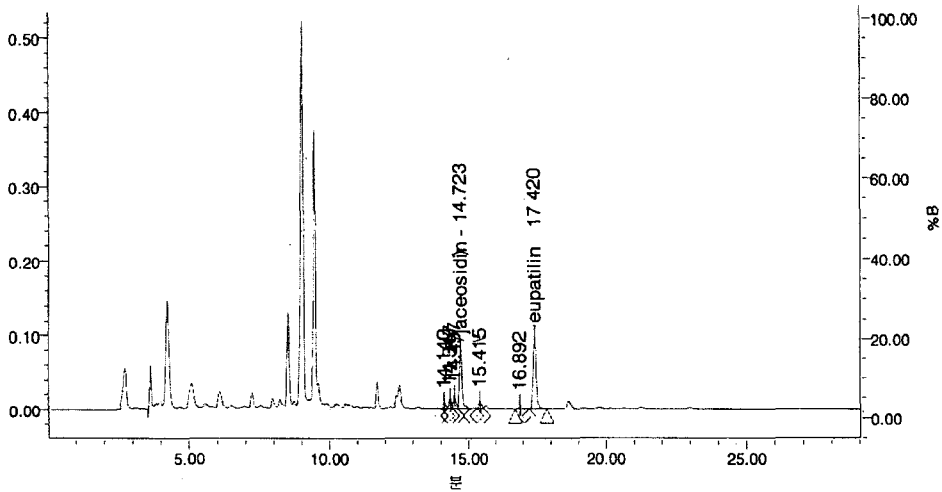


Fig.1. HPLC chromatogram of the MeOH extract from Artemisiae Herba

3) 표준검량선의 작성 및 정량

Eupatilin 2mg을 정량하여 소량의 pyridine에 용해한 후 MeOH을 가하여 10ml로 희석하여 200 μg/ml의 stock solution을 만들고 이를 일정량씩 취하여 MeOH로 희석시켜 150, 50, 30, 15 및 5ppm 농도의 표준용액을 조제하였다. 각 표준용액 10 μl를 취하여 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 각각의 면적을 구한 후 이들 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다. 이때 jaceosidin의 검량선 회귀직선 방정식은  $y=76651x + 77399$ 이며 상관계수  $r=0.9996$ 로 1.0에 접근하므로 직선성이 인정되었으며 eupatilin의 회귀직선 방정식은  $y=76069x + 107329$ 이며 상관계수  $r=0.9999$ 로 1.0에 접근하므로 직선성이 역시 인정되었다. Fig. 1의 chromatogram상에서 나타나는 eupatilin의 peak( $t_R = 17.4$ min) 면적으로부터 구한 함량은 100 g 강화사자발쑤에는 240 mg, 싸주아리 쑤에는 330 mg 함유되어 있었다. 한편, jaceosidin ( $t_R = 14.7$ )은 100 g의 강화사자발쑤에는 10 mg, 싸주아리쑤에는 123 mg 함유되어 있음을 알았다. 따라서 향후 쑤의 종류별, 생육시기, 수확후 저장조건등에 따른 이들 성분의 체계적인 분석 연구가 필요할 것으로 판단된다.

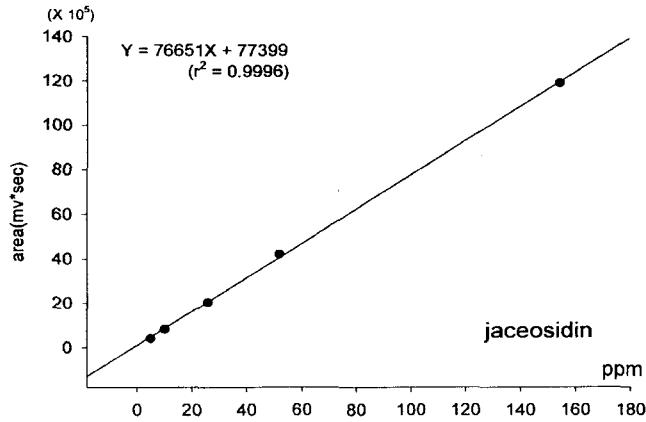


Fig. 2. Calibration curve for jaceosidin.

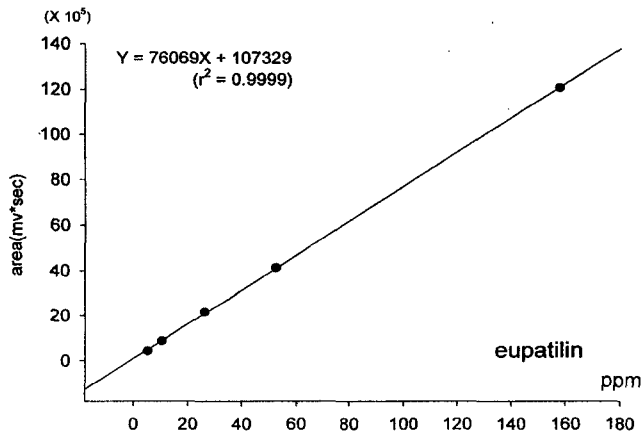


Fig. 3. Calibration curve for eupatilin.

#### IV. 적 요

동의보감에 수재되어 있는 약속은 식용뿐만이 아니고 한방에서는 출혈 및 지혈약으로 자궁출혈, 임신중의 출혈, 코피지혈 등에 효과가 크다고 알려져 왔다. 또한 부인병과 건위, 설사 치료와 항암활성, HeLa cell에 대한 억제작용도 보고되어 있다. MeOH엑스가 HCl-EtOH유발법, 1% 암모니아 수용액 유발법, HCl-aspirin 유발법등에 의하여 유발된 위 손상에 대하여 강한 억제 작용을 나타내고 있는데 이는 flavonoid의 일종인 eupatilin으로 확인된 바 있다. 이 물질이 5-lipoxygenase inhibitor ( $ID_{50} = 14 \times 10^{-6}M$ ) 작용과 prosta glandin synthase의 활성을 약간 억제한다고 보고되었다.

약속의 eupatilin과 jaceosidin을 분리하여 그 화학구조를 구명하였다. 이를 지표물질로 하여 HPLC 분석조건과 HPLC용 검체의 조제, 표준검량선을 작성하였다. 강화사자발속 100 g의 잎에는 eupatilin은 240 mg, jaceosidin은 10 mg함유되어 있고 싸주아리속에는 eupatilin은 330 mg, jaceosidin은 123 mg 함유되어 있음이 확인되었다.

## 참고문헌

1. 장혜옥 : 약속 추출물의 항 위염 및 위궤양 작용, 박사학위 청구논문, 서울여자대학교 대학원(1992).
2. 지형준, 이상인 : 大韓藥典外 韓藥(生藥) 規格集 註解書, 한국메디칼 인텍스사, 서울, pp. 242-243 (1988).
3. Chinese Herbal Medicine, Eastland Press, Seattle, pp. 71-2 (1991).
4. 許浚 : 東醫寶鑑, 南山堂, 서울, p. 1002 (1991).
5. 金洙哲 : 抗癌本草, 바람과 물결, 서울, pp. 174-175 (1992).
6. Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S.-I., Lao, A.-N., Fugimoto, Y. and Tatsuno, T.: FEBS Lett., 158, 41 (1983).
7. Kupchan, S.M., Sigel, C.W., Hemingway, R.J., Knox, J.R. and Udayamurthy, M.S. : Tetrahedron 25, 1603 (1969).
8. Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B.: The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin (1970).
9. Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Manglano, E., Sancenon, F., Rustaiyan, A. and Kardar, M. : Phytochemistry 34, 1561 (1993).
10. Porter, Q.N.: Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds(2nd Ed.). Wiley Interscience, New York, pp. 238-248 (1985).
11. 上海科學技術出版社 : 中藥大辭典, vol. 1, 小學館, pp. 234-8 (1985).
12. Tang, W. and Eisenbrand, G. : Chinese Drugs of Plant Origin, Springer-Verlag, Berlin, pp. 159-183 (1992).
13. Tsumura, A.: KAMPO, Japan Pulications, Inc., Tokyo, pp. 146-7 (1991).

## *Analysis of Available Component in Artemisiae Herba*

*Su-Noh Ryu<sup>†</sup> and Sam Sik Kang\**

<sup>†</sup>*Department of Agricultural Science, KNOU, Seoul 110-791, Korea*

*\*College of Pharmacy, Department of Manufacturing Pharmacy, Natural Product Research Institute, SNU, Seoul 110-460, Korea  
+82-2-3668-4631, ryusn@knou.ac.kr  
+82-2-740-8925, sskang@snu.ac.kr*