

식용식물자원으로부터 활성물질의 탐색 -XV. 머위 (*Petasites japonicus*) 잎으로부터 Triterpene 배당체의 분리

방면호 · 박진규¹ · 송명종 · 양혜정 · 유종수 · 안은미² · 김대근³ · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹(주)파마코디자인, ²(주)싸이제닉, ³우석대학교 약학대학

Development of Biologically Active Compound from Edible Plant Sources-XV. Isolation of Triterpene Glycosides from the Leaf of *Petasites japonicus*

Myun-Ho Bang, Jin-Kyu Park¹, Myoung-Chong Song, Hye-Joung Yang, Jong-Su Yoo,
Eun-Mi Ahn², Dae-Keun Kim³ and Nam-In Baek*

The Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Suwon 449-701, Korea

¹Pharmaco Design Co. Ltd., Daejeon 305-811, Korea

²Scigenic Co. Ltd., Seoul 137-787, Korea

³Department of Pharmacy, Woosuk University, Jeonbuk 565-701, Korea

Received August 30, 2005; Accepted November 7, 2005

The leaf of *Petasites japonicus* was extracted with 80% aqueous MeOH and solvent fractionated with EtOAc, *n*-BuOH and water successively. From the EtOAc fractions, two triterpenoids were isolated through the repeated silica gel and ODS column chromatographies. The chemical structures of the isolated terpenoids were determined as rosamutin (1) and peduncloside (2) through the interpretation of several spectral data including 2D-NMR such as ¹H-¹H gCOSY, gHSQC and gHMBC.

Key words: *Petasites japonicus*, Compositae, triterpenoid, rosamutin, peduncloside

서 론

머위(*Petasites japonicus*)는 중국, 일본 및 우리나라의 제주도, 울릉도, 남부지방과 중부 지방의 산야지 특히 햇볕이 잘 드는 산비탈의 숲이나 계곡 주변의 습지에서 자생하는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본식물이다. 머위는 30 cm의 높이로 자라고 꽃은 5, 6월에 피며 암수의 구별이 있어 암그루는 꽃이 희고 수그루는 황백색 으로 구별이 가능하다. 화경과 잎자루는 식용으로 사용하는데 특유한 향기와 쓴맛이 있으며, 한방에서는 꽃봉오리를 관동화라 하여 한약재로 사용한다. 민간에서는 진해, 거담, 건위의 효과로 사용되고 또 진정, 소증, 이뇨, 풍한 등의 치료에 오랫동안 사용하여 왔다.¹⁾

머위의 주요 성분으로는 꽃으로부터 angelic acid, capronic acid, caprylic acid, procatechuic acid를,²⁾ 잎과 줄기에서는 petasin과 hemicellulose 등이 분리되었다.³⁾ 꽃눈에서는 sesquiterpenoid인 fukinanolide, fukinolide, petasin, isopetasin 등이 분리되었으며,³⁾ 최근에는 뿌리 및 줄기에서 sesquiterpenoid

인 eremopetasidione과⁴⁾ phenolic compound인 petasiphenone⁵⁾ 및 eremophilinolide⁶⁾ 등이 분리되었다. 약리학적 연구로는 *in vitro*에서 머위 추출물의 항알레르기 효과를 확인되었으며,⁷⁾ 머위를 먹인 rat과 mouse에 대한 병리학적 관찰 등이 보고되었다.⁸⁾ 저자 등은 머위 잎으로부터 2종의 triterpenoid 화합물을 분리, 동정하였으며, 각각의 화합물은 머위에서 처음으로 분리되었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용한 머위(*Petasites japonicus*) 잎은 2003년 5월에 경남 밀양 농가에서 자생하고 있는 것을 채취하였고, 우석대학교 약학대학 김대근 교수가 동정하였다. 표본시료는(KHU-03046) 경희대학교 생명공학원 천연물화학실에 보관되어 있다.

시약 및 기기. Column chromatography-용 silica gel은 Merck (Germany)사에서 생산한 silica gel 60(63~200 μm)을 사용하였고, octadecyl silica gel(ODS)은 Merck 사에서 생산한 Lichroprep RP-18(40~63 μm)을 사용하였다. Thin layer chromatography(이하 TLC라고 함)는 Merck사에서 생산한 silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였고, octadecyl silica gel TLC는 Merck사에서 생산한

*Corresponding author

Phone: +82-31-201-2661; Fax: +82-31-201-2157

E-mail: nibaek@khu.ac.kr

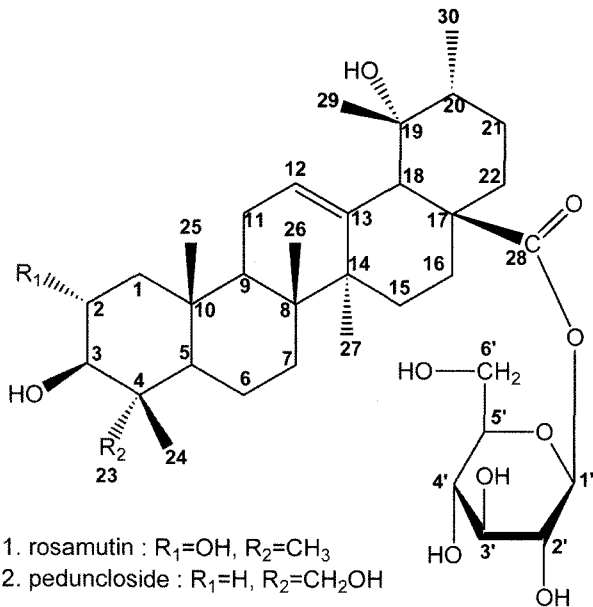


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1 and 2 from the leaf of *Petasites japonicus*.

DC-Fertigplatten RP-18 F_{254s}를 사용하였다.

NMR은 400 MHz FT-NMR spectrometer(Varian Inova AS 400, Varian, USA)로 측정하였고, IR spectrum은 Perkin model 599B(Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)로 측정하였으며, 비선 광도는 Polarimeter P-1020(JASCO, Japan)으로, EI/MS는 JMSAX 505-WA(JEOL, Japan)를 사용하여 측정하였다. Lamp는 Spectroline(Model ENF-240 C/F, Spectronics Corporation, USA)을 사용하였다. 용점은 Fisher-Johns 용점측정기(Fisher Scientific, USA)를 사용하여 측정하였으며, 미보정하였다.

머위 잎의 용매 추출 및 분획. 머위 잎 생체 12 kg을 약 2 cm 정도의 크기로 잘라 80% MeOH 수용액(18 l×4)에 24시간 담가서 실온에서 추출하였다. 추출물을 여과하고, 남은 것은 동일한 방법으로 2회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물을 ethyl acetate(EtOAc, 2 l×2)/H₂O로 분배 추출하였으며, 물층을 다시 *n*-butanol(*n*-BuOH, 2 l×2)/H₂O로 분배 추출하였다. 각 층을 감압농축하여, EtOAc 분획(PJE, 238 g), *n*-BuOH 분획(PJB, 230 g)과 H₂O 분획(PJW, 850 g)을 얻었다.

EtOAc 분획으로부터 triterpene 배당체의 분리. EtOAc 분획(202 g)으로부터 silica gel(550 g) column(φ 10 cm) chromatography (*n*-hexane-EtOAc = 10 : 1 → 7 : 1 → 5 : 1 → 3 : 1 → 1 : 1, CHCl₃-MeOH = 10 : 1 → 7 : 1 → 5 : 1 → 3 : 1 → 1 : 1)를 실시하여 30개의 분획물(PJE-1~PJE-30)을 얻었다. 그 중 PJE-26(1.02 g)분획을 silica gel(230 g) column(φ 7 cm) chromatography (CHCl₃-MeOH = 9 : 1 → 3 : 1 → 1 : 1)하여 16개의 분획물(PJE-26-1~PJE-26-16)을 얻었고, PJE-26-6(123 mg)을 다시 ODS(80 g) column(φ 3 cm) chromatography(MeOH-H₂O = 2 : 1)로 정제하여 화합물 1(PJE-26-6-3, 54 mg)을 분리하였다.

화합물 1(rosamutin), white powder(*n*-hexane-CHCl₃); m.p. 211~212°C; IR(KBr, cm⁻¹): 3436(-OH), 1765(C=O); [α]_D +2.9°

(*c* = 0.8, MeOH); EI/MS *m/z*(70 eV): 488 [M-Glc]⁺, 442, 370, 264, 246, 218, 187; ¹H-NMR(400 MHz, C₅D₅N, δ): 6.29(1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 5.52(1H, br. s, H-12), 4.11(1H, m, H-2), 3.59(1H, s, H-18), 3.37(1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3), 4.0-4.49(6H, sugar moieties), 1.66(3H, s, H-27), 1.38(3H, s, H-29), 1.24(3H, s, H-23), 1.20(3H, s, H-24), 1.08(3H, s, H-26), 1.06(3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-30), 1.04(3H, s, H-25); ¹³C-NMR(100 MHz, C₅D₅N, δ): 176.31(C-28), 138.66(C-13), 127.73(C-12), 95.28(C-1'), 83.30(C-3), 78.72(C-5'), 78.40(C-3'), 73.51(C-2'), 72.12(C-19), 70.68(C-4'), 61.80(C-6'), 68.12(C-2), 55.46(C-5), 53.91(C-18), 48.13(C-9, 17), 47.52(C-1), 41.66(C-14, 20), 40.14(C-8), 39.37(C-10), 38.02(C-4), 37.25(C-22), 33.03(C-7), 28.90(C-15), 28.74(C-23), 26.55(C-21), 26.24(C-29), 25.65(C-16), 24.13(C-27), 23.72(C-11), 18.60(C-6), 17.23(C-25), 17.02(C-24), 16.55(C-26), 16.27(C-30).

PJE-26-8분획(103 mg)에 대하여 ODS(120 g) column(φ 3 cm) chromatography(MeOH-H₂O = 2 : 1)를 수행하여 화합물 2(41 mg)을 분리 하였다.

화합물 2(peduncloside), white powder(*n*-hexane-CHCl₃); m.p. 213~214°C; IR(KBr, cm⁻¹): 3460(-OH), 1766(C=O), 1690(COOR); [α]_D +22°(*c* = 1.05, MeOH); EI/MS *m/z*(70 eV): 650 [M]⁺, 489, 471, 425, 407; ¹H-NMR(400 MHz, C₅D₅N, δ): 6.30(1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 5.55(1H, br. s, H-12), 4.23(1H, m, H-3), 4.17(1H, m, H-23α), 4.04-4.50(7H), 3.69(1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-23β), 2.91(1H, s, H-18), 1.62, 1.37, 1.22(3H×3, each s, H-27, 29, 23), 1.04(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-30), 1.04, 1.00(3H×2, each s, H-26, 25); ¹³C-NMR(100 MHz, C₅D₅N, δ): 176.69(C-28), 139.02(C-13), 128.16(C-12), 95.63(C-1'), 79.13(C-5'), 78.76(C-3'), 73.86(C-2'), 73.21(C-3), 72.40(C-19), 70.59(C-4'), 67.55(C-23), 62.07(C-6'), 54.28(C-18), 48.47(C-5), 48.34(C-17), 47.67(C-9), 42.77(C-4), 41.97(C-14, 20), 40.40(C-8), 38.76(C-1), 37.61(C-22), 37.04(C-10), 33.09(C-7), 29.14(C-15), 27.59(C-29), 26.87(C-21), 26.58(C-16), 25.97(C-27), 24.45(C-11), 23.98(C-2), 18.64(C-6), 17.37(C-25), 16.63(C-26), 16.02(C-30), 13.05(C-24).

결과 및 고찰

머위잎으로부터 얻어진 MeOH추출물에 대하여 용매의 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O로 순차 분획하고 각 분획을 감압농축하여 3개의 분획물을 얻었다. EtOAc분획을 silica gel column chromatography 및 ODS column chromatography로 정제하여 화합물 1과 2를 분리하였다.

화합물 1(white powder)은 [α]_D 값이 +2.9°이고 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV 흡수가 없고, 10% aq. H₂SO₄로 분무, 건조 및 가열시, 보라색으로 발색되었다. IR로부터 수산기(3436 cm⁻¹) 및 carbonyl(1765 cm⁻¹) 작용기를 갖는 것으로 확인되었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ_H 5.12(1H, br. s)의 signal로부터 olefinic methine proton과 δ_H 6.29(1H, d, *J* = 8.0 Hz)의 signal로부터 anomeric proton이 존재함을 관측하였다. 또한, δ_H

4.11(1H, m)과 δ_{H} 3.37(1H, d, $J=8.8$ Hz)에서 oxygenated methine proton과 δ_{H} 3.59(1H, s)의 저자장 영역에서 관측된 methine proton을 비롯하여, δ 4.04–4.49 사이에서 당에서 유래된 oxygenated methine proton들이 관측되었다. 고자장 영역에서는 triterpene moiety에서 유래된 methylene과 methine proton signal을 확인할 수 있었다. 또한 δ_{H} 1.66, 1.38, 1.24, 1.20, 1.08, 1.04에서 6개의 singlet methyl proton signal과 δ_{H} 1.06에서 1개의 doublet methyl proton signal을 확인하였다. 따라서 화합물 1은 doublet methyl기 1개와 singlet methyl기 6개를 가진 ursane 골격의 triterpenoid배당체 화합물로 추정할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 36개의 탄소 signal이 관측되었으며, δ_{C} 176.31에서 한 개의 carbonyl 탄소와 δ_{C} 138.66의 olefine quaternary carbon과 δ_{C} 127.73의 olefine methine carbon signal에서 이중결합의 존재를 확인하였다. 그리고 oxygenated methine carbon signal(δ_{C} 83.30, 68.12)과 oxygenated quaternary carbon(δ_{C} 72.12)이 관측되었다. δ_{C} 55.46–18.60 사이에서 다수의 methine과 methylene signal을 관측할 수 있었으며, δ_{C} 28.74, 26.24, 24.13, 17.23, 17.02, 16.55 및 16.27에서 7개의 methyl signal이 관측되었다. 또한 δ_{C} 95.28의 anomeric carbon을 비롯하여, 당에서 비롯한 methine 및 methylene carbon signal(δ_{C} 78.72, 78.40, 73.51, 70.68, 61.80)을 종합하여, 당의 chemical shift로부터 glucopyranose로 판명되었으며, δ_{H} 6.29에서 나타난 anomeric proton의 coupling constant값이 8.0 Hz인 점으로부터 D-glucopyranose가 β 결합하고 있음을 알 수 있었다. 당의 결합위치 및 수산기의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR 기법을 이용하였다. gCOSY spectrum으로부터, H-2(δ_{H} 4.11)이 H-1a(δ_{H} 3.37), H-1b(δ_{H} 3.37) 및 H-3(δ_{H} 3.37)과 coupling함을 확인하여, triterpene A환의 부분구조를 확인하였으며, 각 H-2 및 H-3의 coupling constant값으로부터, H-2의 β 배향과 H-3의 α 배향을 각각 확인하였다. gHSQC spectrum으로부터 각 proton과 carbon의 assign을 하였으며, 이를 바탕으로 gHMBC를 통하여, 각 결합의 연결관계를 확인하였다. 먼저, 당의 anomeric proton(δ_{H} 6.29)이 C-28(δ_{C} 176.31)의 carboxyl기와 cross peak를 나타내어, 당이 triterpene 화합물에 ester bond로 결합되어 있음을 확인하였다. 또한, H-12(δ_{H} 5.52)가 C-13(δ_{C} 138.66), C-11(δ_{C} 23.72), C-18(δ_{C} 53.91) 사이에서 cross peak가 관측되어, 이중결합의 위치를 결정하였다. 또한, H-29(δ_{H} 1.38)이 C-19(δ_{C} 72.12)와 cross peak를 보임으로써, 4급 탄소의 수산기가 C-19임을 알 수 있었다. 따라서, 화합물 1은 당 한 분자와 이중결합 1개, 3개의 수산기를 가진 pentacyclic triterpenoid 배당체인 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid에 당이 C-28번에 결합한 구조로 확인 되었다. 이와 같은 데이터를 문헌과⁹⁾ 비교해 본 결과 화합물 1은 장미과 식물인 큰오이풀에서 분리 보고된 rosamutin으로 동정하였다.

화합물 2(white powder)는 $[\alpha]_{\text{D}}$ 값이 +22°이고 TLC에 전개시켜 관찰한 결과 UV 흡수가 없고 10% aq. H_2SO_4 로 발색하였을 경우 보라색으로 발색되었다. IR로부터 수산기(3460 cm^{-1}) 및 carbonyl(1766 cm^{-1})의 작용기를 갖는 것으로 확인되었다. 화합물 2의 NMR data는 rosamutin(화합물 1)와 매우 유사하였다. ^1H -NMR spectrum을 비교해본 결과 화합물 1의 2번 수산기가

환원된 것으로 추정되었으며, 새로운 oxygenated methylene proton(δ_{H} 3.69, 4.17)이 관측되어, methyl가 산화된 것으로 추정하였다. ^{13}C -MNR spectrum에서도 δ_{C} 68.12의 수산기가 사라진 대신 δ_{C} 23.98에서 methylene carbon signal이 관측되었다. 또한, δ_{C} 68.12에서 oxygenated methylene carbon signal이 관측되었고, methyl carbon signal가 6개 관측 되었다. 이와 같은 결과를 종합하여 화합물 2는 3 β ,19 α ,23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid의 28번 carboxyl기에 D-glucopyranosyl가 ester 결합한 배당체로 확인되었다. 이와 같은 데이터는 문헌¹⁰⁾과 비교해본 결과 감탕나무과 식물인 먼나무에서 분리된 적이 있는 pedunculoid로 동정하였다.

이번에 분리된 triterpenoid화합물들은 큰오이풀(*Sanguisorba alpina*)⁹⁾과 먼나무(*Ilex rotunda*)¹⁰⁾ 등의 식물들에서 분리 되었으며, 항바이러스,¹¹⁾ 항염증,¹²⁾ hyperlipidemia activity¹³⁾ 등에 대한 활성이 보고되어 있다. 또한, Triterpenoid 화합물중 ursane 골격의 terpenoid 화합물은 소염작용,¹⁴⁾ 고지혈증억제,^{15,16)} 돌연변이 억제^{17,18)} 작용이 보고 된 바 있다. 따라서 우리나라에서 매우 쉽게 구할 수 있으며 식용으로 쓰이고 있다는 점에서 머위의 폭넓은 이용가능성을 시사한다고 할 수 있다. 앞으로 이들 triterpenoid 화합물에 대한 다양한 생리적 및 약리적 활성을 검토함으로써 건강기능성 식품 또는 의약품의 소재로서의 충분한 가치가 있다고 여겨지며, 추후 이의 활용과 관련된 연구가 활발히 추진될 것으로 기대된다.

초 록

머위 잎을 80% MeOH수용액으로 추출하고, 얻어진 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O 로 용매 분획하였다. EtOAc 분획에 대하여 silica gel과 ODS column chromatography를 반복하여 2종의 triterpenoid 화합물을 분리하였다. 각 화합물은 ^1H - ^1H gCOSY, gHMBC 및 gHSQC와 같은 2D-NMR기법을 포함한 스펙트럼 데이터를 해석하여 rosamutin(1) 및 pedunculoid(2)로 구조를 결정하였다.

Key words: 머위, 국화과, triterpenoid, rosamutin, pedunculoid

감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 우수연구센터인 경희대학교 식물대사연구센터와 농촌진흥청 바이오그린 21 사업에서 지원하는 연구비로 수행되었음.

참고문헌

- Soka, T. (1985) In *Dictionary of Chinese Drugs* (1st ed.) Shanghai Science Technology Shogakukan Press, Tokyo.
- Kikuchi, M. (1973) Studies on the constituents of the flower stalk of *Petasites japonicus* Maxim VII. on the components of the volatile oil. *Yakugaku Zasshi*, **93**, 123-126.
- Jung, E. B. and Shin, M. K. (1990) In *HyangYakDaeSaJun* (3rd ed.), Young Lim Sa Press, Seoul.

4. Yaoita, Y. and Kikuchi, M. (1994) Eremopetasidione a Nor-sesquiterpenoid from the rhizomes of *Petasites japonicus*. *Phytochem.* **37**, 1765-1766.
5. Yaoita, Y. and Kikuchi, M. (1994) Petasiphenone a phenolic compound from rhizomes of *Petasites japonicus*. *Phytochem.* **37**, 1773-1774.
6. Yaoita, Y. and Kikuchi, M. (1994) Structures of six new eremophilenolides from the rhizomes of *Petasites japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 1944-1947.
7. Choi, O. B. (2002) Anti-allergic effects of *Petasites japonicus*. *Korean J. Food Nutr.* **15**, 382-385.
8. Jee, Y. H. and Lee, C. S. (1996) Pathological changes on rats and mice fed with *Petasites japonicus*. *Maxim. Korean J. Vet. Res.* **36**, 417-428.
9. Zhong, J. J., Xiang, Q. L. and Zi, M. L. (1993) Triterpenoids from *Sanguisorba alpina*. *Phytochem.* **32**, 155-159.
10. Nakatani, M., Miyazaki, Y., Iwashita, T., Naoki, H. and Hase, T. (1989) Triterpenoids from *Ilex rotunda* fruits. *Phytochem.* **28**, 1479-1482.
11. Simoes, C. M. O., Amoros, M. and Girre, L. (1999) Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytother. Res.* **13**, 323-328.
12. Jung, H. J., Nam, J. H., Choi, J., Lee, K. T. and Park, H. J. (2005) 19 α -Hydroxyursane-Type triterpenoids: antinociceptive anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 101-104.
13. Jahromi, M. A., Gupta, M., Manickam, M., Ray, A. B. and Chansouria, J. P. (1999) Hypolipidemic activity of pedunculoside a constituent of *Ilex doniana*. *Pharm. Biol.* **37**, 37-41.
14. Ohigashi, H., Takamura, H., Koshimizu, K., Tokuda, H. and Ito, Y. (1986) Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from an antiinflammatory chinese medical plant, *Glechoma hederaceae* L. *Cancer Lett.* **30**, 143-151.
15. Jeong, T. S., Hwang, E. I., Lee, H. B., Lee, E. S., Kim, Y. K., Min, B. S., Bae, K. H., Bok, S. H. and Kim, S. U. (1979) Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Med.* **65**, 261-263.
16. Liu, J. (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* **49**, 57-68.
17. Mahato, S. B., Nandy, A. K. and Roy, G. (1992) Triterpenoids. *Phytochem.* **31**, 2199-2249.
18. Yang, H. S., Chung, H., Lee, C. K., Park, K. Y., Yokozawa, T. and Oura, H. (1994) Ursolic acid inhibits aflatoxin B1-induced mutagenicity in a *Salmonella* assay system. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 990-992.