

## 쓴쭈 지상부의 화학성분과 RAW264.7 및 BV2 미세아교세포에서 Nitric Oxide 생성 억제효과

고해주 · 이 환 · 이동성 · 우은란\*  
조선대학교 약학대학

### Chemical Constituents from the Aerial Parts of *Artemisia absinthium* and Its Inhibitory Effects of Nitric Oxide Production in RAW264.7 and BV2 Microglia

Hae Ju Ko, Hwan Lee, Dong-Sung Lee, and Eun-Rhan Woo\*  
College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 61452, Korea

**Abstract** – Six compounds, eupatilin (1), dammaradienyl acetate (2), glutinol acetate (3), 3 $\beta$ -acetoxyoleanan-12-one (4), taraxasterol (5) and quercetin-3,4'-dimethyl ether (6) were isolated from the aerial parts of *Artemisia absinthium*. The chemical structures of compounds 1-6 were determined by the basis of physico-chemical properties and spectroscopic methods such as 1D and 2D NMR. Among them, compounds 2-5 were isolated from this plant for the first time. The inhibitory effects of these isolated compounds against nitric oxide (NO) production in LPS-induced RAW264.7 cells or BV2 microglia were also examined. Among the tested compounds, compound 1, eupatilin, inhibited the production of NO in LPS-induced RAW264.7 cells and BV2 microglia, respectively.

**Keywords** – *Artemisia absinthium*, Aerial parts, Compositae, RAW264.7 cells, BV2 microglia

쓴쭈(*Artemisia absinthium* L.)은 초롱꽃목 국화과에 속하는 여러해살이 반관목 식물이다. 유럽이 원산지로서 2,100 m 고도의 카슈미르 지역에서 발견되며 높이가 약 150 cm 정도에 이른다.<sup>1)</sup> 밑에서 가지가 많이 갈라지고 전체에 잿빛을 띠고 있으며, 잎은 어긋나고 2~3회 깃꼴로 갈라지며 흰 털이 많이 나고 씹으면 쓴맛이 강한 것이 특징이다.<sup>1)</sup> 여름에 꽃이 피고 많은 두화가 원추형 꽃차례에 달린다. 전통적으로 간질, 위장, 비장, 비노기 질환 치료 및 상처치유에 사용되었다.<sup>2)</sup> 쓴쭈에 대한 성분연구로는 sesquiterpene, dimeric guaianolide, flavone, lignan, volatile oil 등 다양한 성분이 보고되고 있다.<sup>3-5)</sup>

Nitric oxide(NO)는 염증과정에서 분비되는 생성물질로 nitric oxide synthases(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 염증상태나 자가면역과 같은 면역반응에서 중요한 염증조절매개인자로 잘 알려져 있다.<sup>6)</sup> RAW264.7세

포는 대표적인 대식세포로 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하였을 때, 염증관련 인자인 NO를 비롯하여 tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ ), interleukin(IL)-1 $\beta$ , IL-6 등의 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)을 증가시킨다고 보고되어 있다.<sup>7)</sup> 또한, 뇌에 존재하고 있는 대식세포인 미세아교세포는 뇌염증을 조절하는 중요한 세포로 알려져 있다. BV2 미세아교세포는 마우스 유래 미세아교세포로 LPS를 처리하여 세포가 과도하게 활성화되면 염증관련 인자인 NO를 분비하며, 이와 더불어 전염증매개체(proinflammatory mediators), 사이토카인(cytokine), 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등이 증가하여 뇌조직을 파괴하는 것으로 알려져 있다.<sup>8)</sup>

본 연구에서는 쓴쭈의 메탄올 추출물을 용매분획한 후 얻어진 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획에 대해 실리카겔, RP-18, MCI-gel등의 컬럼층진제를 이용한 컬럼 크로마토그래피를 반복적으로 수행하여 6종의 화합물 eupatilin(1), dammaradienyl acetate(2), glutinol acetate(3), 3 $\beta$ -acetoxyoleanan-12-one(4), taraxasterol (5), quercetin-3,4'-dimethyl ether(6)을 분리, 동정하였다. 이

\*교신저자(E-mail): woer@chosun.ac.kr  
(Tel): +82-62-230-6369

들 화합물중 triterpene계 화합물인 **2-5**는 쓴쭉에서 처음으로 분리된 화합물들이다. 또한, 분리된 6종의 화합물에 대해 RAW264.7 대식세포와 BV2 미세아교세포에서 NO억제 효과를 탐색하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 사용한 쓴쭉(*A Artemisia absinthium* L.)은 조선대학교 약학대학 약초원에서 채취하여 전문가(우은란 교수, 조선대 약학과)의 동정과정을 거쳐 사용하였으며, 표본은 조선대학교 약학대학 표본실에 보관하고 있다.

**기기 및 시약** - 용점측정기는 Fisher Scientific(Model 307N0043, Canada)를 사용하였고 선광도는 AUTOPOL<sup>®</sup> automatic polarimeter(Rudolph Research Flangers, NJ07836, U.S.A.)를 사용하였으며 IR 스펙트럼은 JASCO FT/IR-300E (JASCO Co., Japan)를 사용하였다. ESI-MS는 JMS 700 (JEOL, Japan)을 사용하였고 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR은 Varian Unity Inova 500(KBSI-광주분원) 및 JEOL JNM-LA 300을 사용하였다. 분취용 컬럼 크로마토그래피의 충전제로는 Kieselgel 60(63-200 μm, Art. 7734, Merck), Kieselgel 60(40-63 μm, Art. 9385, Merck), Sephadex LH-20(Beads size 25-100 μm, Sigma), MCI gel CHP20P(75-150 μm, Mitsubishi Chemical Co.)을 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60 F<sub>254</sub> plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18 F<sub>254</sub> S plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5423, Merck)를 사용하였으며 추출 및 컬럼 크로마토그래피용 용매는 1급 시약을 기타시약은 1급 또는 특급을 각각 사용하였으며 발색시약으로는 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다.

**추출 및 분리** - 쓴쭉(*A. absinthium*) 지상부 6.2 kg을 MeOH로 3시간, 3회 반복 환류냉각 추출하고 여과, 감압농축하여 482 g의 MeOH extract를 얻었다. MeOH extract를 증류수에 현탁하고 methylene chloride(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol(BuOH), H<sub>2</sub>O 순으로 계통분획하여 각각 140.5 g, 44.4 g, 98.4 g, 198.8 g의 분획물을 얻었다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획 19 g에 대해 실리카젤 컬럼 크로마토그래피(Hexane:EtOAc=20:1→1:1, CHCl<sub>3</sub>:EtOAc=10:1→5:1, CHCl<sub>3</sub>:MeOH=10:1→1:1)를 실시하여 36개의 소분획(D-1, D-2 ... D-36)을 얻었다. 소분획 D-4(271 mg)에 대해 실리카젤 및 RP-18 컬럼 크로마토그래피(Hexane:EtOAc=70:1→5:1, 95:1→90:1, Acetone:H<sub>2</sub>O=4:1)를 반복 실시하여 각각 화합물**2**(8.65 mg), **3**(6.09 mg)을 얻었다. 소분획 D-7(410.9 mg)와 D-3(156 mg)에 대해 실리카젤 및 RP-18 컬럼 크로마토그래피(Hexane:EtOAc=80:1→1:1, Hexane:Acetone=70:1, Acetone:H<sub>2</sub>O=4:1)를 반복 실시하여 각각 화합물 **4**(7.39 mg), **5**(2.93 mg)를

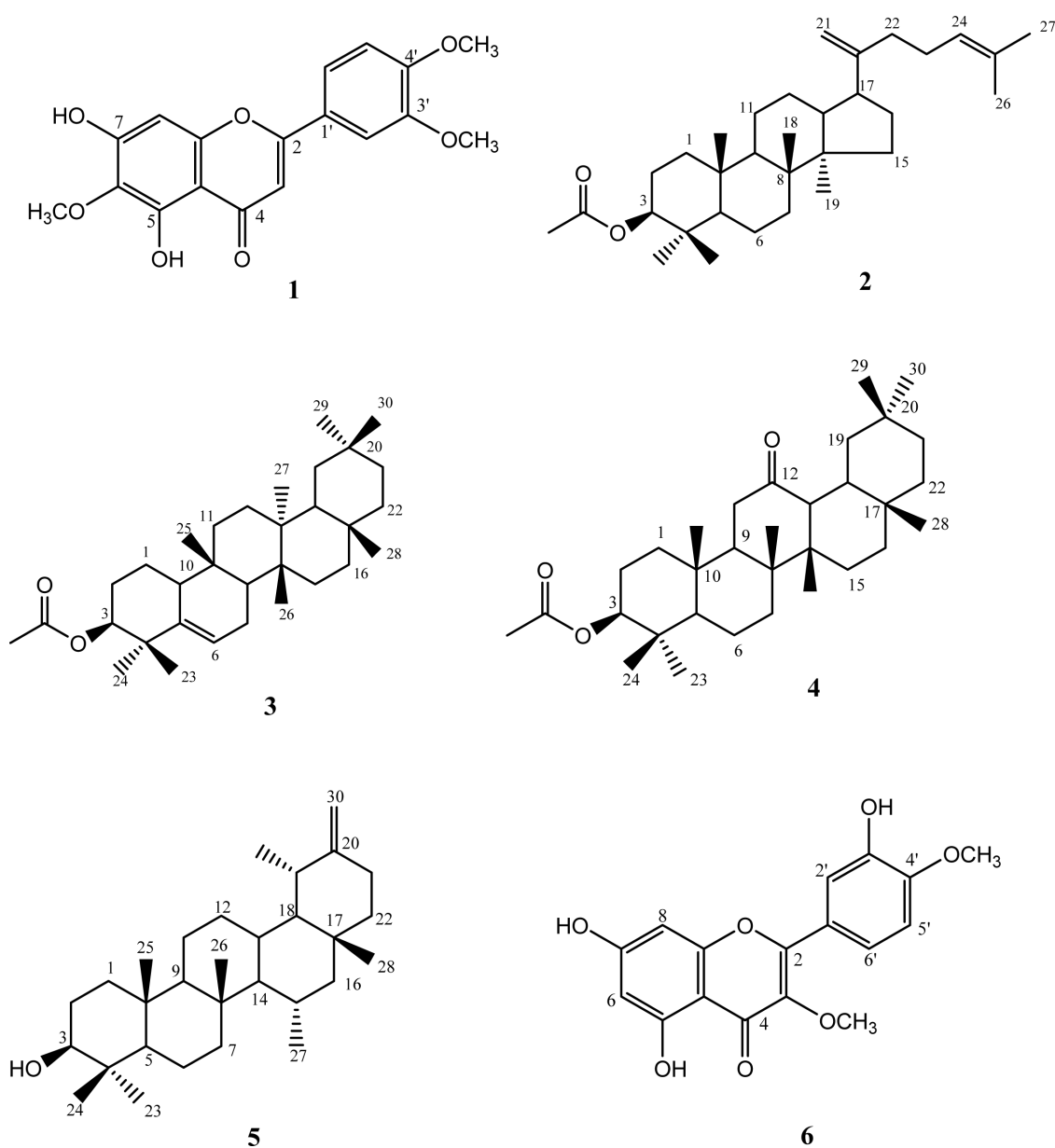
얻었다. 소분획 D-19(1.3 g)에 대해 MCI gel 및 RP-18 컬럼 크로마토그래피(MeOH:H<sub>2</sub>O=100:1, MeOH:H<sub>2</sub>O=3:1→10:1)를 반복 실시하여 화합물**1**(5.47 mg)을 얻었다. 소분획 D-28(1.7 g)에 대해 실리카젤 컬럼 크로마토그래피(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=40:1→5:1, CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>CN=1:3→1:1)를 반복 실시하여 화합물 **6**(3.22 mg)을 얻었다.

**화합물 1** - Yellow amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.52 (1H, dd, *J*=1.8, 8.5 Hz, H-6'), 7.33 (1H, s, H-2'), 6.98 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 6.61 (1H, s, H-3), 6.58 (1H, s, H-8), 4.05 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.96 (6H, -OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 182.8 (C-4), 164.0 (C-2), 155.0 (C-7), 153.1 (C-5), 152.2 (C-9), 152.0 (C-4'), 149.2 (C-3'), 130.3 (C-6), 123.7 (C-1'), 120.0 (C-6'), 111.1 (C-5'), 108.7 (C-2'), 105.6 (C-10), 104.0 (C-3), 93.3 (C-8), 60.8 (-OCH<sub>3</sub>), 56.0 (-OCH<sub>3</sub>); ESI-MS (positive mode), *m/z* 345 [M+H]<sup>+</sup>.

**화합물 2** - White Needles; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.13 (1H, dd, *J*=1.5, 6.5 Hz, H-24), 4.74 (1H, br s, H-21a), 4.70 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-21b), 4.50 (1H, dd, *J*=5.5, 10.5 Hz, H-3), 2.04 (3H, s, -COCH<sub>3</sub>), 1.69 (3H, s, H-26), 1.62 (3H, s, H-27), 0.97 (3H, s, H-18), 0.87 (3H, s, H-19), 0.86 (6H, s, H-28, 30), 0.85 (3H, s, H-29); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 152.7 (C-20), 131.4 (C-25), 124.4 (C-24), 107.4 (C-21), 80.9 (C-3), 55.9 (C-5), 50.8 (C-9), 49.4 (C-14), 47.7 (C-17), 45.2 (C-13), 40.4 (C-8), 38.7 (C-22), 37.8 (C-4), 37.1 (C-10), 35.3 (C-7), 34.1 (C-1), 31.3 (C-15), 28.8 (C-23), 27.9 (C-28), 27.0 (C-2), 25.7 (C-26), 24.9 (C-16), 23.6 (C-12), 21.4 (C-11), 18.1 (C-6), 17.7 (C-27), 16.4 (C-30), 16.2 (C-19), 15.8 (C-18), 15.6 (C-29), 170.9 (-COCH<sub>3</sub>), 21.32 (-COCH<sub>3</sub>); EI-MS, *m/z* 468 [M]<sup>+</sup>.

**화합물 3** - Colorless needles; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.56 (1H, d, *J*=6.0 Hz, H-6), 4.70 (1H, t, *J*=3.5 Hz, H-3), 2.01 (3H, s, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.16 (3H, s, H-28), 1.10 (3H, s, H-27), 1.07 (3H, s, H-23), 1.04 (3H, s, H-24), 1.01 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-29), 0.85 (3H, s, H-25); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 142.0 (C-5), 119.8 (C-6), 78.5 (C-3), 49.8 (C-10), 47.3 (C-18), 43.0 (C-8), 39.2 (C-9), 39.2 (C-14), 39.0 (C-4), 38.9 (C-22), 37.8 (C-13), 35.9 (C-16), 35.1 (C-19), 34.7 (C-29), 34.6 (C-11), 34.5 (C-21), 33.0 (C-15), 32.3 (C-30), 32.0 (C-28), 30.3 (C-12), 30.0 (C-17), 29.0 (C-23), 28.2 (C-20), 25.4 (C-17), 25.0 (C-24), 23.4 (C-1), 19.5 (C-27), 18.8 (C-2), 18.4 (C-26), 16.0 (C-25), 170.9 (-OCOCH<sub>3</sub>), 21.2 (-OCOCH<sub>3</sub>); EI-MS, *m/z* 468 [M]<sup>+</sup>.

**화합물 4** - White needles; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Fig. 1.** Chemical structures of compounds **1-6** from *A. absinthium*

$\delta$ : 4.56 (1H, dd,  $J=5.0, 11.0$  Hz, H-3), 2.01 (3H, s, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.10 (3H, s, H-26), 1.09 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-25), 0.90 (3H, s, H-28), 0.89 (3H, s, H-23), 0.87 (3H, s, H-27), 0.86 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-29); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 215.5 (C-12), 80.6 (C-3), 52.1 (C-13), 48.7 (C-8), 47.8 (C-5), 47.1 (C-9), 45.2 (C-14), 40.7 (C-4), 39.4 (C-10), 37.5 (C-19), 35.7 (C-18), 35.4 (C-1), 32.8 (C-11), 31.5 (C-22), 30.1 (C-21), 29.7 (C-7), 28.0 (C-17), 26.7 (C-20), 26.4 (C-16), 25.9 (C-29), 25.7 (C-24), 25.3 (C-15), 20.8 (C-2), 20.0 (C-27), 19.2 (C-28), 18.0 (C-25), 18.3 (C-30), 18.2 (C-26), 17.9 (C-6),

15.1 (C-23), 170.9 (-COCH<sub>3</sub>), 21.3 (-COCH<sub>3</sub>); EI-MS, 484  $m/z$  [M]<sup>+</sup>.

**화합물 5** – White needles crystal; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 4.75 (1H, br s, Ha-30), 4.66 (1H, br s, Hb-30), 3.28 (1H, dd,  $J=5.0, 11.0$  Hz, H-3), 1.03 (3H, d,  $J=7.0$  Hz, H-29), 1.02 (3H, s, H-28), 0.97 (6H, s, H-23, 24), 0.90 (3H, s, H-25), 0.89 (3H, s, H-26), 0.81 (3H, s, H-27); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 157.1 (C-20), 105.9 (C-30), 78.8 (C-3), 52.2 (C-5), 48.7 (C-9), 47.9 (C-18), 47.1 (C-14), 45.3 (C-8), 40.5 (C-19), 36.1 (C-13), 35.5 (C-1), 34.9 (C-22), 33.8 (C-4), 31.9 (C-16), 31.2 (C-10),

30.3 (C-17), 29.8 (C-7), 28.1 (C-2), 26.5 (C-15), 26.1 (C-12), 26.0 (C-21), 25.4 (C-23), 21.9 (C-29), 21.8 (C-28), 21.1 (C-11), 19.9 (C-6), 19.3 (C-25), 18.3 (C-26), 18.0 (C-24), 13.9 (C-27); EI-MS,  $m/z$  426  $[M]^+$ .

**화합물 6** – Yellow powder;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.46 (1H, dd,  $J=1.8, 8.5$  Hz, H-6'), 7.44 (1H, s, H-2'), 6.92 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5'), 6.58 (1H, br s, H-6), 6.51 (1H, br s, H-8), 3.95 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.87 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 182.6 (C-4), 164.6 (C-7), 158.6 (C-5), 153.4 (C-9), 152.4 (C-2), 150.7 (C-3'), 148.0 (C-4'), 131.7 (C-3), 122.2 (C-1'), 120.2 (C-6'), 115.3 (C-5'), 109.0 (C-2'), 103.9 (C-10), 102.2 (C-6), 94.2 (C-8), 59.4 ( $-\text{OCH}_3$ ), 55.2 ( $-\text{OCH}_3$ ); ESI-MS (positive mode),  $m/z$  331  $[M+H]^+$ .

**세포 배양** – RAW264.7 대식세포는 ATCC에서 동결상태로 구입하였고, BV2 미세아교세포는 원광대학교 약학대학 김윤철 교수님으로부터 분양 받아 사용하였다. RAW264.7 대식세포와 BV2 미세아교세포( $5 \times 10^5$  cells/well)를 10% heat-inactivated FBS, penicillin G(100 IU/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ), L-glutamine(2 mM)을 함유한 DMEM배지에 분주하고 5%  $\text{CO}_2$  배양기내에서 37°C의 온도로 배양하였다.

**세포 독성** – 본 실험에서 RAW264.7 대식세포와 BV2 미세아교세포에 대한 세포독성 및 실험 시 처리 농도를 결정하고, 6종 화합물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT assay를 사용하였다. 간단히 기술하면 먼저 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well로 동일하게 분주하고 12시간 동안 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고 새로운 배지를 넣어준 후 DMSO에 녹인 시료를 다양한 농도(1-40  $\mu\text{M}$ )로 DMEM 배지에 희석하여 첨가하였다. DMSO의 처리 농도는 배지 대비 0.1% 이하가 되도록 하였다. 이를 다시 48시간 배양한 후에 배지를 제거하고 MTT시약(5 mg/ml)을 넣고, 4시간 동안 방치한 후 상등액을 제거하였다. 형성된 formazan의 각 well에 DMSO 20  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 orbital shaker를 이용하여 녹이고, 30분 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

**Nitrite Assay** – 배양된 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well 수준으로 24 well plate에 100  $\mu\text{l}$ 씩 접종한 다음 12시간 동안 배양하였다. 배양후 medium을 제거하고 DMEM으로 농도별(1-40  $\mu\text{M}$ )로 희석된 화합물 1-6을 넣은 다음 이어서 LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ )를 처리하였다. 24시간 동안 배양을 마친 다음 세포에서 배양액으로 분비된 NO의 양을 Griess시약[0.1% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1%(w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid]을 사용하여 반응시켰다. 반응이 완료된 후 ELISA micro plate reader(Bio Rad Laboratories Inc., CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

**통계처리** – 본 실험의 통계처리는 GraphPad Prism, version 3.03(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 각 실험군간의 결과는 평균치와 표준오차로 나타냈으며, 각 실험군간의 결과는 ANOVA test를 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다.

## 결과 및 고찰

화합물 1은 황색의 분말상태로서  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 벤젠환의 ABX-type의 수소피크가  $\delta$  7.52, 7.33, 6.98에 나타나며 벤젠환의 수소피크가  $\delta$  6.61, 6.58에 나타났고 3개의 메톡시 피크가  $\delta$  4.05, 3.96에 나타나 flavonoid계열의 화합물로 추정되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서  $\delta$  182.8에 카르보닐 피크가,  $\delta$  60.8, 56.0에 메톡시 피크가 나타났고 벤젠환의 수산기로 치환된 4급 탄소가  $\delta$  153.1, 155.0에 나타났다. 또한 ESI-MS 스펙트럼에서 분자이온이  $m/z$  345  $[M+H]^+$ 에 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하고 기존에 보고된 문헌과 비교하여 화합물 1은 eupatilin으로 동정하였다.<sup>9)</sup>

화합물 2는 백색의 침상결정으로  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 7개의 메틸기가  $\delta$  1.69, 1.62, 0.97, 0.87, 0.86, 0.85에 나타났고 exo-methylene기의 피크가  $\delta$  4.74, 4.70에 나타났으며,  $\delta$  4.50에 oxy methine 피크가,  $\delta$  5.13에 이중결합의 수소피크가  $\delta$  2.04에,  $-\text{OCOCH}_3$ 기에 유래하는 피크가 관찰되어 화합물 2는 dammarane type의 triterpenoid 화합물로 추정되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서  $\delta$  80.9에서 수산기의 존재를,  $\delta$  124.4, 131.4의 피크로 이중결합의 존재를,  $\delta$  152.7, 107.4의 피크로 exo-methylene기의 존재를  $\delta$  170.9, 21.2의 피크로 아세테이트기의 존재를 각각 확인하였다. EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온이  $m/z$  468  $[M]^+$ 에 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하고 기존에 보고된 문헌과 비교하여 화합물 2는 dammaradienyl acetate 로 동정하였다.<sup>10)</sup>

화합물 3은 무색의 침상결정으로서  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 8 개의 angular 메틸기가  $\delta$  1.16, 1.10, 1.07, 1.04, 1.01, 0.99, 0.95, 0.85에 관찰되었고 oxy methine 수소피크가  $\delta$  4.70에 나타났다.  $-\text{OCOCH}_3$ 기에 유래하는 피크가  $\delta$  2.01에 나타났고 이중결합에 유래하는 수소피크가  $\delta$  5.56에 나타나 화합물 3은 oleanane type 의 triterpenoid 계열의 화합물임을 예상할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서  $\delta$  78.5에서 수산기의 존재를,  $\delta$  142.0, 119.8의 피크로 이중결합의 존재를,  $\delta$  170.9, 21.2의 피크로 아세테이트기의 존재를 각각 확인하였다. EI-MS스펙트럼에서는 분자이온이  $m/z$  468  $[M]^+$ 에 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하고 기존에 보고된 문헌과 비교하여 화합물 3은 glutinol acetate로 확인 동정하였다.<sup>11,12)</sup>

화합물 4는 백색 침상결정으로서  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서

8 개의 angular 메틸기가  $\delta$  1.10, 1.09, 0.95, 0.90, 0.89, 0.87, 0.86, 0.85에 관찰되었고 oxy methine 수소피크가  $\delta$  4.56에 나타났다.  $-\text{OCOCH}_3$ 기에 유래하는 피크가  $\delta$  2.01에 나타나 화합물 4는 화합물 3과 마찬가지로 oleane type의 triterpenoid 계열의 화합물임을 예상할 수 있었다. 화합물 3과는 달리  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서  $\delta$  215.5의 피크로 카르보닐기의 존재를 확인하였고,  $\delta$  80.6에서 수산기의 존재를,  $\delta$  170.9, 21.3에서 아세테이트기의 존재를 각각 확인하였다. EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온이  $m/z$  484[M]<sup>+</sup>에 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하고 기존에 보고된 문헌과 비교하여 화합물 4는 3 $\beta$ -acetoxyoleanan-12-one로 확인 동정하였다.<sup>13)</sup>

화합물 5는 백색의 침상결정으로서  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 7 개의 angular 메틸기가  $\delta$  1.03, 1.02, 0.97, 0.90, 0.89, 0.81에 관찰되었고 oxy methine 수소피크가  $\delta$  3.28에 나타났다. 또한 exo-methylene기에 유래하는 피크가  $\delta$  4.75, 4.66에 나타나 화합물 5는 ursane type의 triterpenoid 계열의 화합물임을 예상할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서 7개의 angular 메틸 피크가  $\delta$  25.4, 21.9, 21.8, 19.3, 18.3, 18.0, 13.9에 나타났고 oxy methine 피크가  $\delta$  78.8에 나타났다. 또한  $\delta$  157.1, 105.9의 피크로 exo-methylene 기의 존재를 확인할 수 있었다. EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온이  $m/z$  426[M]<sup>+</sup>에 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하고 기존에 보고된 문헌과 비교하여 화합물 5는 taraxasterol로 동정하였다.<sup>14,15)</sup>

화합물 6은 황색의 분말상태로서  $^1\text{H-NMR}$  data가 화합물 1과 매우 유사한 것으로 나타나 flavonoid계 화합물임을 예상할 수 있었다. 벤젠환의 ABX-type의 수소피크가  $\delta$  7.46, 7.44, 6.92에 나타났으며 벤젠환의 수소피크가  $\delta$  6.58, 6.51에 나타났고 2개의 메톡시 피크가  $\delta$  3.95, 3.87에 나타났다.  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서  $\delta$  182.6에 카르보닐 피크가,  $\delta$  59.4, 55.2에 메톡시 피크가 나타났고 벤젠환의 수산기로 치환된 4급 탄소가  $\delta$  164.6, 158.6, 150.7에 나타났다. ESI-MS 스펙트럼에서는 분자이온이  $m/z$  331[M+H]<sup>+</sup>에 나타났다. 이와 같은 모든 data를 종합하고 기존에 보고된 문헌과 비교하여 화합물 6은 quercetin-3,4'-dimethyl ether로 동정하였다.<sup>16)</sup>

NO는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS 등과 같은 염증유발인자에 의해 발현되는 iNOS 단백질에 의해 과량 발생하며, 생성된 NO의 지속적인 축적은 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 급성 또는 만성 염증성 질환을 유도한다고 알려졌다.<sup>17)</sup> 본 연구에서는 쓴쭉에서 분리된 6종 화합물의 NO생성 억제 효과를 RAW264.7 대식세포와 BV2 미세아교세포에서 탐색하였다. 먼저, 쓴쭉에서 분리된 6종의 화합물을 RAW264.7 대식세포와 BV2 미세아교세포에 농도별(1-40  $\mu\text{M}$ )로 48시간 처리하였고, 6종의 화합물 모두가 40  $\mu\text{M}$ 까지 세포 독성이 없음을 확인하였다(Data not shown). 이에 RAW264.7 대

**Table I.** Effects of compounds 1-6 from *A. absinthium* on NO production with IC<sub>50</sub> values in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were pre-treated for 3 hr with compounds 1-6 and stimulated 24 hr with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Butein was used as a positive control

Compounds	IC <sub>50</sub>
Butein	2.45±0.44 $\mu\text{M}$
Compound 1	22.3±1.21 $\mu\text{M}$
Compound 2	> 40 $\mu\text{M}$
Compound 3	> 40 $\mu\text{M}$
Compound 4	> 40 $\mu\text{M}$
Compound 5	> 40 $\mu\text{M}$
Compound 6	> 40 $\mu\text{M}$

**Table II.** Effects of compounds 1-6 from *A. absinthium* on NO production with IC<sub>50</sub> values in LPS-induced BV2 microglia. Cells were pre-treated for 3 hr with compounds 1-6 and stimulated 24 hr with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Butein was used as a positive control

Compounds	IC <sub>50</sub>
Butein	3.2±0.94 $\mu\text{M}$
Compound 1	35.21±2.65 $\mu\text{M}$
Compound 2	> 40 $\mu\text{M}$
Compound 3	> 40 $\mu\text{M}$
Compound 4	> 40 $\mu\text{M}$
Compound 5	> 40 $\mu\text{M}$
Compound 6	> 40 $\mu\text{M}$

식세포와 BV2 미세아교세포에 쓴쭉에서 분리된 6종의 화합물을 처리하고 LPS로 24시간동안 염증반응을 유발한 후 NO생성 억제여부를 측정하였다. 그 결과 6종 가운데 eupatilin (1)만 RAW264.7 대식세포(Table I)와 BV2 미세아교세포(Table II)에서 NO생성 억제효과를 보였다. Eupatilin(1)의 NO생성억제 IC<sub>50</sub> 값을 각각의 세포에서 확인하였다(Table I and II). Eupatilin(1)의 RAW264.7 대식세포에서 NO생성억제 IC<sub>50</sub> 값은 22.3±1.21 mM으로 나타났으며(Table I), BV2 미세아교세포에서의 IC<sub>50</sub> 값은 35.21±2.65 mM으로 나타났으며(Table II). Eupatilin은 RAW264.7 대식세포와 BV2 미세아교세포에서 nitrite, IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> 등의 항염증 인자들을 억제하는 효과가 우수함이 기 보고되었으며,<sup>18,19)</sup> 본 연구에서도 eupatilin(1)의 RAW264.7 대식세포와 BV2 미세아교세포에서 NO생성억제 효과가 기존 연구결과들과 유사하게 나타났다. 하지만 eupatilin(1)을 제외한 다른 5종의 화합물에서는 두 가지 세포 모두에서 NO생성억제 효과가 나타나지 않았다(Table I and II). 양성 대조군으로 사용한 butein의 IC<sub>50</sub> 값은 RAW264.7 대식세포에서 2.45±0.44 mM, BV2 미세아교세포에서 3.2±0.94 mM이었다.

## 결 론

성분연구가 미흡한 쓴쭉(*A. absinthium*)의 지상부로부터 6종의 성분들을 분리하여 각각 eupatilin(1), dammaradienyl acetate(2), glutinol acetate(3), 3 $\beta$ -acetoxyoleanan-12-one(4), taraxasterol(5), quercetin-3,4'-dimethyl ether(6)으로 동정하였다. 이 가운데 eupatilin(1)만이 RAW264.7 대식세포와 BV2 미세아교세포에서 LPS로 유발한 NO생성억제 효과를 나타냈다. 화합물 2-5는 쓴쭉에서 처음으로 분리된 화합물들이다.

## 사 사

이 논문은 2016년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었습니다.

## 인용문헌

- Colin, W. (2002) *Artemisia*, *Artemisia Medicinal and Aromatic Plants*, p. 344. Industrial Profiles and Chemical Rubber Company (CRC), London & New York.
- Aberham, A., Cicek, S. S., Schneider, P. and Stuppner, H. (2010) Analysis of sesquiterpene lactones, lignans, and flavonoids in wormwood (*Artemisia absinthium* L.) using high-performance liquid chromatography (HPLC)-mass spectrometry, reversed phase HPLC, and HPLC-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 10817-10823.
- Ahamad, J., Naquvi, K. J., Ali, M. and Mir, S. R. (2014) Isoflavone glycosides from aerial parts of *Artemisia absinthium*. *Chem. Nat. Compd.* **49**: 996-1000.
- Tulake, A., Jiang, Y. and Tu, P. F. (2012) Nine lignans from *Artemisia absinthium* L. *J. Chin. Pharm. Sci.* **21**: 360-364.
- Ahamad, J., Naquvi, K. J., Ali, M. and Mir, S. R. (2013) New glycoside esters from the aerial parts of *Artemisia absinthium* Linn. *Nat. Prod. J.* **3**: 260-267.
- Berlet, B. S. and Stadtman, E. R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**: 20313-20316.
- Remick, D. G., Strieter, R. M., Eskandari, M. K., Nguyen, D. T., Genord, M. A., Raiford, C. L. and Kunkel, S. L. (1990) Role of tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am. J. Pathol.* **136**: 49-60.
- Gonzalez-Scarano, F. and Baltuch, G. (1999) Microglia as mediators in inflammatory and degenerative disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**: 219-240.
- Kim, A. R., Ko, H. J., Chowdhury, M. A., Chang, Y. S. and Woo, E.-R. (2015) Chemical constituents on the aerial parts of *Artemisia selengensis* and their IL-6 inhibitory activity. *Arch. Pharm. Res.* **38**: 1059-1065.
- Liu, R., Wang, X.-B. and Kong, L.-Y. (2006) Dammaradienyl acetate. *Acta Cryst.* **E62**: o3544-o3546.
- Seedi, E. and Hesham, R. (2005) Antimicrobial triterpenes from *Poulsenia armata* Miq. *Standl. Nat. Prod. Res.* **19**: 197-202.
- Fingolo, C. E., Santos, T. de S., Vianna, F. M. D. M. and Kaplan, M. A. C. (2013) Triterpene esters: natural products from *Dorstenia arifolia*. *Molecules* **18**: 4247-4256.
- Gaydou, E. M., Faure, R. and Wollenweber, E. (1996)  $\beta$ -amyrin acetate epoxide from *Canarina canariensis*. *Phytochemistry* **42**: 1115-1118.
- Yekta, M. M. and Alavi, S. H. R. (2008) New triterpenoids from *Peucedanum ruthenicum*. *Iran J Pharm. Sci.* **4**: 289-294.
- Carvalho, M. G., Velandia, J. R. and Beserra, L. O. F. B. (1998) Triterpenoid isolated from *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). *Quim. Nova.* **21**: 740-743.
- Kwon, Y. S. and Kim, C. M. (2003) Antioxidant constituents from the stem of *Sorghum bicolor*. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 535-539.
- Knowles, R. G. and Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**: 249-258.
- Choi, E. J., Lee, S., Chae, J. R., Lee, H. S., Jun, C. D. and Kim, S. H. (2011) Eupatilin inhibits lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory mediators in macrophages. *Life Sci.* **88**: 1121-1126.
- Sapkota, A., Gaire, B. P., Cho, K. S., Jeon, S. J., Kwon, O. W., Jang, D. S., Kim, S. Y., Ryu, J. H. and Choi, J. W. (2017) Eupatilin exerts neuroprotective effects in mice with transient focal cerebral ischemia by reducing microglial activation. *PLoS One.* **12**: e0171479.

(2017. 11. 24 접수; 2017. 12. 12 심사; 2018. 1. 18 게재확정)