J Appl Biol Chem (2018) 61(2), 131–134
https://doi.org/10.3839/jabc.2018.019

Online ISSN 2234-7941
Print ISSN 1976-0442

Note: Bioactive Materials

Glycosyl glycerides from the stems of 'Baekma' cultivar of *Chrysanthemum morifolium*

Hyun-Ji Oh[1] · Hyoung-Geun Kim[1] · Ha-Seung Pak[2] · Yun-Su Baek[3] · Oh-Keun Kwon[3] · Hak-Ki Shin[3] · Nam-In Baek[1]

국화 '백마'(*Chrysanthemum morifolium*) 줄기로부터 glycosyl glyceride 의 분리 및 동정

오현지[1] · 김형근[1] · 박하승[2] · 백윤수[3] · 권오근[3] · 신학기[3] · 백남인[1]

Received: 28 February 2018 / Accepted: 9 April 2018 / Published Online: 30 June 2018
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

Abstract The stem of *Chrysanthemum morifolium*, 'Baekma', were repeatedly extracted with 80% aqueous MeOH and the concentrates was partitioned into ethyl acetate (EtOAc), *n*-butyl alcohol and H_2O fraction. The repeated silica gel and octadecyl silica gel column chromatographies for the EtOAc fractions led to isolation of two glycosyl glycerides. The chemical structures of the compounds were determined as (2*S*)-1-*O*-*β*-D-galactopyranosyl-2,3-dilinoleoylglycerol (**1**) and (2*S*)-1-*O*-*β*-D-galactopyranosyl-2,3-dipalmitoylglycerol (**2**) based on spectroscopic data anlyses including nuclear magnetic resonance, mass sperctrometry, and infrared spectrometry and gas chromatography mass spectrometry.

Keywords Baekma · *Chrysanthemum morifolium* · Gas Chromatography Mass Spectrometry · Glycosyl glyceride · Nuclear magnetic resonance

Nam-In Baek (✉)
E-mail: nibaek@khu.ac.kr

[1]Graduate School of Biotechnology and Department of Oriental Medicine Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

[2]Flower Research Institute, Chungcheongnam-do ARES, Yesan 32425, Republic of Korea

[3]Floriculture Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

국화는 국화과(Asteraceae)에 속하는 여러해살이풀로 주로 아시아 등지에서 서식한다. 국화는 약 1 m 크기로 자라며, 품종에 따라 여름부터 늦가을까지 개화한다. 국화는 관상용으로 가장 많이 쓰이며, 방향제나 차, 한약재등으로 사용된다. 국내 관상화훼 농업에서 국화의 시장가치는 두번째로 높은 수준을 차지하며, 다양한 품종이 육종 개발되고있다. 현재 국화는 700종 이상의 품종이 개량되었고, 크게 대국인 스탠다드형과 소국인 스프레이형으로 나뉜다. 이중 국내 생산비는 스탠다드형이 80% 이상으로 압도적인 점유율을 갖는다[1]. 이에 힘입어 2004년 한국 농촌진흥청 원예연구소에서는 국내 최초로 '백마(白馬)'라는 스탠다드형 국화를 육종하였다. 백마는 현재 국내뿐만 아니라 세계 각국으로 수출되고 있으며, 주로 관상용으로 활용된다. 관상용 국화는 주로 절화로 유통되며, 유통 과정 중 다량의 부산물이 발생한다. 부산물 중 가장 높은 비율을 차지하는 부위는 국화의 줄기로 폐기 과정 중 농가에 추가비용을 발생시킨다. 국화 줄기는 항산화[2], 혈전 생성 억제, 관상동맥의 혈행 개선, 관상동맥성 심질환 치료[3]의 활성을 가지고 있으나 다른 부위에 비해 많은 연구가 이루어져 있지 않다. 따라서 농가의 비용 감소와 소득증대를 위해 부산물에 대한 활용방안이 촉구되며, 부산물의 활용가능성 평가를 위해 국화 줄기에 대한 연구를 시작하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 국화 '백마'(*C. morifolium*)의 줄기는 스탠

다드형 국화의 줄기로 2017년 4월에 양재꽃시장(서울, 대한민국)에서 구입하였으며, 충청남도 농업기술원 화훼연구소(충청남도 예산군 오가면 역탑리) 박하승 박사가 동정하였다. 백마는 국내에서 최초로 육종한 흰색의 볼륨감 있는 스탠다드형 절화용 하추국으로 꽃의 중심부가 노란 빛을 띄는 다른 국화 품종과는 달리 중심부가 녹색을 띄고있어 동정이 가능하다. 표본시료(KHU-NPCL-20170430)는 경희대학교 천연물화학실 (용인, 경기도)에 보관되어 있다.

시약 및 기기

시약 및 기기는 이전 실험과 동일하게 사용하였다[4].

추출 및 분리

국화 '백마'의 건조한 줄기 3.3 kg을 80% MeOH 수용액(30 L)으로 실온에서 24시간씩 3회 반복 추출하였다. 얻어진 여액을 40°C에서 감압농축하여 MeOH 추출물(177 g)을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물은 H_2O (3.0 L)와 ethyl acetate (EtOAc, 3.0 L ×3)로 분배추출하였고, 다시 H_2O 층을 *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH, 2.4 L×3)로 분배추출하였다. 각층을 40°C에서 감압농축하여 EtOAc 분획(CBAE, 19.3 g), *n*-BuOH 분획(CBAB, 18.9 g) 및 H_2O 분획(CBAW, 138.8 g)을 얻었다. EtOAc 분획(CBAE, 19.3 g)에 대하여 silica gel (SiO_2) column chromatography (c.c.) (ϕ10.0×15.0 cm, $CHCl_3$-EtOH=10:1→$CHCl_3$-MeOH=10:1→$CHCl_3$-MeOH=5:1, 각 3.0 L)를 실시하여, 총 13개의 분획(CBAE-1~CBAE-13)을 얻었다. 그 중에서 CBAE-10 분획[490.9 mg, elution volume/total volume (Ve/Vt) 0.098-0.119]에 대하여 octadecyl silica gel (ODS) c.c. (ϕ3.5×6 cm, acetone-MeOH-H_2O=3:1:1, 각 2.5 L)를 실시하여 화합물 **1** (CBAE-10-16, 64.5 mg, Ve/Vt=0.355-0.419, ODS TLC R_f 0.17 acetone-MeOH-H_2O=5:1:1)과 화합물 **2** (CBAE-10-21, 17.4 mg, Ve/Vt=0.548-0.608, ODS TLC R_f 0.31 acetone-MeOH-H_2O=5:1:1)을 분리하였다.

화합물 **1** ((2*S*)-1-*O*-*β*-D-galactopyranosyl-2,3-dilinoleoyl glycerol): 연황색 오일(CH_3OH); $[\alpha]_D^{25}$ +26.0° (*c* =0.10, MeOH); negative FAB-mass spectrometry (MS) *m/z* 777[M-H]$^-$; infrared spectroscopy (IR) (KBr, μ) 3383, 1723, 1612 cm^{-1}; ^{1}H-nuclear magnetic resonance (NMR) (400 MHz, CD_3OD, δ_H) 5.40-5.30 (8H, overlapped, H-9",9"',10",10"',12",12"',13",13"'), 5.30 (1H, m, H-2), 4.46 (1H, dd, *J* =10.8, 2.8, H-3a), 4.24 (1H, d, *J* =8.0, H-1'), 4.18 (1H, dd, *J* =10.8, 6.8, H-3b), 3.86 (1H, dd, *J* =10.4, 5.4, H-1a), 3.79 (1H, m, H-4'), 3.75 (1H, m, H-5'), 3.71 (2H, overlapped, H-6'), 3.64 (1H, dd, *J* =10.4, 6.0, H-1b), 3.49 (1H, overlapped, H-2',3'), 2.80 (4H, overlapped, H-11,11), 2.32 (2H, overlapped, H-2), 2.31 (2H, overlapped, H-2), 2.06 (8H, overlapped, H-8",8"',14",14"'), 1.59 (4H, overlapped, H-3,3), 1.32-1.26 (28H, overlapped, H-4-7, 4-7, 15-17, 15-17"'), 0.97 (6H, t, *J* =8.0, H-18",18"'); ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C) 175.5 (C-1"), 175.3 (C-1"'), 131.1 (C-9"), 131.0 (C-9"'), 129.2 (C-12",12"',13",13"'), 128.8 (C-10",10"'), 105.2 (C-1'), 74.7 (C-3'), 74.4 (C-5'), 72.3 (C-2'), 71.7 (C-2), 70.2 (C-4'), 67.7 (C-1), 66.2 (C-3), 62.2 (C-6'), 35.1 (C-2"), 34.9 (C-2"'), 33.1 (C-14",14"'), 30.7-30.2 (C-4"-7",4"'-7"',15"-17",15"'-17"'), 28.1 (C-8,8), 26.4 (C-11,11), 26.0 (C-3,3), 14.7 (C-18,18); GC-MS t_R =12.96 min (linoleic acid methyl ester).

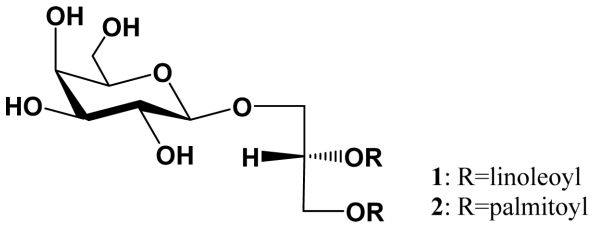

Fig. 1 Chemical structures of glycosyl glycerides **1** and **2** from the stems of *Chrysanthemum morifolium* 'Baekma'

화합물 **2** ((2*S*)-1-*O*-*β*-D-galactopyranosyl-2,3-dipalmitoyl glycerol): 연녹색 오일(CH_3OH); $[\alpha]_D^{25}$ +26.4° (*c* =0.10, MeOH); positive FAB-MS *m/z* 731 [M+H]$^+$; IR (KBr, *μ*) 3383, 1723 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD, δ_H); 5.30 (1H, m, H-2), 4.46 (1H, dd, *J* =10.4, 2.8 Hz, H-3a), 4.23 (1H, d, *J* =8.0 Hz, H-1'), 4.18 (1H, dd, *J* =10.4, 6.8 Hz, H-3b), 3.86 (1H, dd, *J* =10.2, 4.2 Hz, H-1a), 3.79 (1H, m, H-4'), 3.75 (1H, m, H-5'), 3.71 (2H, overlapped, H-6'), 3.64 (1H, dd, *J* =10.2, 6.0 Hz, H-1b), 3.50 (2H, overlapped, H-2',3'), 2.32 (2H, overlapped, H-2"), 2.31 (2H, overlapped, H-2"'), 1.59 (4H, overlapped, H-3",3"'), 1.34-1.25 (48H, overlapped, H-4"-15", H-4"'-15"'), 0.89 (6H, t, *J* =8.0, H-16",16"'); ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C) 175.7 (C-1"), 175.3 (C-1"'), 105.2 (C-1'), 74.7 (C-3'), 74.4 (C-5'), 72.3 (C-2'), 71.7 (C-2), 70.2 (C-4'), 67.7 (C-1), 66.2 (C-3), 62.2 (C-6'), 34.9 (C-2"), 34.8 (C-2"'), 33.1 (C-14",14"'), 30.8-30.1 (C-4"-13",4"'-13"'), 26.0 (C-3",3"'), 23.7 (C-15",15"'), 14.4 (C-16",16"'); GC-MS t_R =11.06 min (palmitic acid).

Glycosyl glyceride 1과 2의 알칼리 가수분해

각 화합물(1.0 mg)을 20% KOH/MeOH (2 mL)에 녹여 80°C의 항온 수조에 60분 동안 방치하였다. 이를 실온에서 식힌 후, TLC 에서 초기 물질의 소멸 양상을 관측하고($CHCl_3$-EtOH =7:1), 산성 양이온 교환수지(Dowex 50W, H^+ form)를 이용해 중화하고 여과하였다. 각 여과액을 감압농축한 후, EtOAc (3 mL)와 H_2O (3 mL)로 분획하였다. EtOAc분획물 2000 ppm을 syringe filter (0.2, 13 mm)로 여과한 후, 여과액은 GC-MS 분석 전까지 4°C에서 보관하였다.

GC/MS 분석

GC-MS분석에는 DB-5 column (0.25 μm film diameter ×0.25 mm diameter ×30 m length)를 사용하였다. 운반 기체인 Helium을 24.2 mL/min의 유속으로 흘려주고, 오븐의 온도는 160°C에서320°C까지 4°C/min로 15분 동안 변화를 주었다. 인젝터와 검출기의 온도는 280°C로 동일하게 설정하였다. 시료 용액(1 μL)을 10:1의 split ratio로 GC column에 주사하였다. 검출기로는 전자 이온화(electron ionization; EI) (70 eV)와 사중극자(quadrupole)질량분석기를 사용하였다. 지방산은 순수 지방산의 보유시간과 질량 분광학적으로 비교하여 동정하였다(Wiley 9

Library, version 2008; John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA).

결과 및 고찰

화합물 **1**은 negative FAB-MS 에서 *m/z* 777 $[M-H]^-$의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 778로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3383 cm^{-1}), 카보닐기(1723 cm^{-1}), 이중결합(1612 cm^{-1})이 있는 것으로 확인되었다. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD, δ_H) 스펙트럼에서 δ_H 5.40-5.30 부근에서 여덟 개의 olefin methine proton 이 발견되었고, δ_H 5.30에서 oxygenated methine proton, δ_H 4.46/4.18, 3.86/3.64에서 oxygenated methylene proton 두 개가 발견되었다. 두 개의 말단 methyl proton signal 이 δ_H 0.97 (6H)에서, 여섯 개의 allyl methylene proton signal이 δ_H 2.80 (4H), δ_H 2.06 (8H)에서, 14개의 methylene proton signal 이 δ_H 1.32-1.26 (28H)에서 관측되어 두 개의 *n*-aliphatic 지방산이 있음을 예상하였다. 하나의 oxygenated methine 이 δ_H 5.30 (H-2)에서 관측되고, 두 개의 oxygenated methylene 이 각각 δ_H 3.86 (H-1a), δ_H 3.64 (H-1b), δ_H 4.46 (H-3a), δ_H 4.18 (H-3b)에서 관측되어, glycerol이 존재함을 예상하였다. Oxygenated methylene (δ_H 4.46, H-3a; 4.18, H-3b)과 oxygenated methine (δ_H 5.30, H-2) signal을 비교하여 화합물 **1** 이 두 개의 ester bond를 C-2와 C-3에 가진 구조임을 예상하였다. 당에서 유래한 1개의 hemiacetal proton signal (δ_H 4.24, 1H, d, J=8.0 Hz), 4개의 oxygenated methine signal (δ_H 3.79; 3.75; 3.49), 1개의 oxygenated methylene signal (δ_H 3.71, 2H, overlapped, H-6')의 chemical shift 및 anomer proton signal의 결합정수(J=8.0 Hz)로부터 당의 구조가 β-galactopyranose임을 예상하였다. 이를 통해 이 화합물이 glycosyl diglyceride임을 예상하였다. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C) 스펙트럼에서 탄소수가 45개임을 확인하였으며, 이를 통해 탄소 수 18개의 지방산 2분자를 갖는glycosyl diglyceride 화합물임을 확인하였다. 당의 chemical shift δ_C 105.2 (C-1'), 74.7 (C-3'), 74.4 (C-5'), 72.3 (C-2'), 70.2 (C-4'), 62.2 (C-6')를 통해 이 당이 β-galactopyranose임을 확인하였다. 두 개의 ester (δ_C 175.5, 175.3), 여덟 개의 olefin methine (δ_C 131.1, 131.0, 129.2×4, 128.8×2), 여섯 개의 allyl methylene (δ_C 28.1-26.4), 18개의 methylene (δ_C 35.1-26.0), 그리고 두 개의 terminal methyl (δ_C 14.7×2) carbon signal 들을 관측하였고 두 개의 지방산이 있음을 확인하였다. ^{13}C-NMR의 chemical shift값을 통해 linoleic acid에 이중결합이 *Z*형태를 갖는 것을 알 수 있었다. Glycosyl glyceride와 같은 화합물의 경우 NMR의 1D data에서glycerol에 결합한 지방산의 이중결합의 개수를 알 수 있고, ^{13}C data의 signal 개수와 chemical shift를 통해 구조를 대략적으로 예상할 수 있으나, 지방산으로부터 유래된 다수의 signal이 겹쳐져 관측되어 정확한 구조동정이 불가능하다. 따라서 GC/MS data를 통해 각 물질에 결합한 지방산을 확실히 동정한 후, glycerol에 결합한 위치를 NMR의 2D data를 통해 확인하면, glycosyl glyceride의 정확한 구조동정이 가능하다. 알칼리 가수분해와 용매 분획을 통해 얻어진 지방산은 GC-MS 스펙트럼으로부터 12.96 min에서 peak를 관측하였고, mass 스펙트럼을 문헌(Wiley 9 Library)과 비교하여 linoleic acid로 동정하였다. 또한 화합물 **1**의 광학회전 값($[\alpha]_D^{25}$ +26.0°, c=0.10, MeOH)이 문헌값[5]과 유사함을 확인하였고, 식물의 glycosylglyceride의 생물발생학적 관점으로 보았을 때, C-2의 절대 배열이 *S*임을 알 수 있다. 위의 data를 문헌값[6]과 비교하여 화합물 **1**을 (2*S*)-1-*O*-β-D-galactopyranosyl-2,3-dilinoleoylglycerol로 구조동정 하였다.

화합물 **2**는 positive FAB-MS 에서 *m/z* 731 $[M+H]^+$의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 730으로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3383 cm^{-1}), 카보닐기(1723 cm^{-1})가 있는 것으로 확인되었다. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD, δ_H)과 ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C) 스펙트럼을 통하여 화합물 **1**과 같은 구조에 지방산 두 개가 다른 구조임을 확인하였다. 알칼리 가수분해와 용매 분획을 통해 얻어진 지방산은 GC-MS 스펙트럼으로부터 11.06 min에서 peak를 관측하였고, mass 스펙트럼을 문헌(Wiley 9 Library)과 비교하여 palmitic acid로 동정하였다. 또한 화합물 **2**의 광학회전 값($[\alpha]_D^{25}$ +26.4°, c=0.10, MeOH)이 문헌값[7]과 유사함을 확인하였고, 식물의 glycosylglyceride의 생물발생학적 관점으로 보았을 때, C-2의 절대 배열이 *S*임을 알 수 있다. 위의 data를 문헌값[6]과 비교하여 화합물 **2**를 (2*S*)-1-*O*-β-D-galactopyranosyl-2,3-dipalmitoylglycerol로 구조동정 하였다.

초 록

국화(*C. morifolium*)품종인 '백마' 줄기를 80% MeOH 수용액으로 3회 반복 추출한 뒤, 감압농축한 추출물을 EtOAc, *n*-butyl alcohol과 H_2O층으로 계통분획을 실시하였다. EtOAc분획에 대하여 SiO_2 및 ODS column chromatography를 반복실시하여 2종의 지방산 화합물을 분리 및 정제하였다. Nuclear magnetic resonance, infrared spectrometry, FAB-MS, GC-MS data를 해석하여, 화합물 **1**과 **2**를 각각 (2*S*)-1-*O*-β-D-galactopyranosyl-2,3-dilinoleoylglycerol과 (2*S*)-1-*O*-β-D-galactopyranosyl-2,3-dipalmitoylglycerol로 구조동정 하였다.

Keywords 국화 · 백마 · Gas Chromatography Mass Spectrometry · Glycosyl glyceride · Nuclear magnetic resonance

감사의 글 본 논문은 농림식품기술기획 평가원(세부과제번호: 317071-03-1-SB020)의 지원에 의해 이루어진 것입니다. 지원에 감사드립니다.

References

1. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (2017) 2016 Flower Cultication Status. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs: Saejong
2. Chen LX, Hu DJ, Lam SC, Ge L, Wu D, Zhao J, Long ZR, Yang WJ, Fan B, Li SP (2016) Comparison of antioxidant activities of different parts from snow *Chrysanthemum* (*Coreopsis tinctoria* Nutt.) and identification of their natural antioxidants using high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid) diammonium salt-based assay. J Chromatogr A 1428: 134–142
3. Zhang L, Fu H, Tian J, Wang W, Zhai X, Li R, Li W (2011) Method for

manufacturing total flavonoids from stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium.* CN Patent 2011-10184646. 2 Nov, 2011
4. Kim HG, Ko JH, Lee YG, Pak HS, Kim DC, Son KS, Baek YS, Keun OG (2016) Flavonoids from the flower of *Chrysanthemum morifolium*. J Appl Biol Chem 59(4): 357–360
5. Baruah P, Baruah NC, Sharma RP, Baruah JN, Kulanthaivel P, Herz W (1983) A monoacyl galactosylglycerol from *Sonchus arvensis*. Phytochem 22(8): 1741–1744
6. Jung JH, Lee H, Kang SS (1996) Diacylglycerylgalactosides from *Arisaema amurense*. Phytochem 42(2): 447–452
7. Reshef V, Mizrachi E, Maretzki T, Silberstein C, Loya S, Hizi A, Carmeli S (1997) New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. J Nat Prod 60(12): 1251–1260