Journal of Environmental Science International
28(11); 993~1004; November 2019

pISSN: 1225-4517 eISSN: 2287-3503
https://doi.org/10.5322/JESI.2019.28.11.993

ORIGINAL ARTICLE

산국 잎과 줄기의 유효성분 분리 및 특성 연구

박숙자 · 박문기 · 이종록*
대구한의대학교 제약공학과

Isolation and Characterization of Constituent Compounds from Leaves and Stems of *Chrysanthemum boreale* Makino

Sook Jahr Park, Moon Ki Park, Jong Rok Lee*
Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

Abstract

Chrysanthemum boreale Makino (*C. boreale*) is widely distributed in Asian countries, and has traditionally been used to treat various inflammatory diseases including bronchitis. In this study, we aimed to isolate biologically active compounds from leaves and stems of *C. boreale*. Chemical components were purified by column chromatograpy and recyclic HPLC, and characterized from their spectral data (IR, MS, NMR). Biological activity experiments were conducted for Farnesyl-protein transferase (FPTase) activity, apoptosis and nitirc oxide (NO) release. As a results, three sesquiterpene lactones were isolated. Compound 1 (4-methoxy-8-*O*-acetyl-10-hydroxy-2,11(13)-guaiadiene-12,6-olide) showed strong cytotoxic activities having an average growth inhibition of 50% (GI_{50}) value of 1.89 ㎍/㎖ against human colon adenocarcinoma cells. Compound 1 also showed a low half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of 10 ㎍/㎖ for NO release. In the caspase 3 activity, compound 1 and compound 2 (8-*O*-(2-carbonyl-2-butyl)-3,10-dihydroxy-4,11(13) -guaiadiene-12,6-olide) exhibited 94% and 90% apoptosis inhibition activity, respectively. Compound 3 (4,8-*O*-diacetyl -10-hydroxy-2(3),11(13)-guaiadiene-12,6-olide) showed a strong inhibitory effect on FPTase activity with 90% inhibitory activity at a concentration of 100 ㎍/㎖. These results clearly show the presence of lactone compounds in the leaves and stems, which may partially contribute to the pharmacological activity of *C. boreale*.

Key words : *Chrysanthemum boreale* Makino, Sesquiterpene lactone, Cytotoxicity, Farnesyl-protein transferase, Apoptosis, Nitric oxide

1. 서 론

산국(山菊, *Chrysanthemum boreale* Makino)은 국화과에 속하는 다년생 초본으로 우리나라의 산야에서 널리 자생하고 있는 흔한 식물이며, 일본, 중국 북부 지역에서도 서식하고 있는 것으로 알려져 있다. 줄기에 달린 잎은 어긋나고 긴 타원형의 모양이며, 9-10월에 걸쳐 전국의 야산에서 노란색 꽃을 피우며, 꽃은 지름이 약 1.5 ㎝ 정도로서 가지와 줄기 끝에 산형(傘形) 비슷하게 달린다 (Lee, 1985; Ko, 1991). 한방에서 산국은 감국과 함께 주로 두통과 제풍열, 청혈해독 등에 사용되어 왔으며, 산국을 주재료로 하는 국화주나 국화차를 제조하여 상업적

Received 18 October, 2019; **Revised** 13 November, 2019; **Accepted** 15 November, 2019
***Corresponding author**: Jong Rok Lee, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea
Phone : +82-53-819-1804
E-mail : jrlee@dhu.ac.kr

ⓒ The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
ⓒ 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.

으로 사용하고 있다. 그 외에도 산국은 중추신경 진경작용, 혈압강하작용, 결핵균 및 각종 바이러스에 대한 억제효과, 두통과 어지럼증에 사용한다고 알려져 있다(Kim, 1996). 민간에서는 기관지 건강을 위해 국화의 꽃과 잎을 차로 만들어 복용해 왔으며, 미세먼지를 포함하여 대기 환경이 악화되는 현시점에서 국화차는 기관지에 좋은 약차로 관심을 받고 있다.

산국 꽃의 성분으로는 에센셜 오일(essential oil), 플라보노이드(flavonoid), 폴리아세틸렌(polyacetylene) 등의 유효 성분을 포함하고 있으며(Kim et al., 2003; Kim et al., 2010: Kim et al., 2015a: Kim et al., 2015b), 메탄올 추출물의 항염 활성(Kim et al., 2010) 및 아토피 개선활성(Yang et al., 2012), 에센셜 오일의 항박테리아 활성(Kim et al., 2015) 등이 보고되었다. Kang et al.(1996)은 일부 항암 효과가 있다고 보고된 handelin을 분리하였으며, Han은 DPPH 라디칼을 소거 활성을 갖는 apigenin과 linarin을 분리하여 보고한 바 있다(Han, 2003).

질환을 치료하는 의학적 측면에서 산국의 효능을 조사한 연구로는 인간 유래 암세포주인 UACC62, HCT15, UO-31, PC3 및 A549 cell에 대하여 산국 꽃에서 분리한 sesquiterpene lactone이 세포독성 활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Jang et al., 1998). Sesquiterpene lactone은 국화과에 속하는 식물들의 특징적인 구성성분으로서 보통 무색으로 친유성(lipophilic)이며 가끔 쓴맛을 가지고 있다(Fraga, 2012). Lee et al.(2017)은 산국 잎과 줄기에서 분리한 guaianolides가 acyl CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) 저해활성을 가짐을 보고하였다. Kim et al. (2016)은 산국의 수증기 증류 추출물의 피부 각질형성세포의 증식 및 이주 유도 활성에 대하여 발표하였다. 또한 산국의 꽃에서 분리된 germacranolides는 *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*에 대하여 항균작용을 나타내는 것으로 보고되었다(Jang et al., 1998a).

현재까지 산국에 대한 연구의 대부분은 꽃을 재료로 이루어졌으며 잎을 비롯한 산국의 다른 부위에 대한 연구는 많이 진행되지 않은 상황이다. 산국의 잎과 줄기에 대하여 새로운 약리작용과 성분 화합물을 연구함으로써 산국의 활용방안을 다양하게 모색해 볼 수 있을 것이고, 식물자원의 이용이란 측면에서 산국의 꽃과 더불어 잎과 줄기를 모두 이용할 수 있다면 자원의 수급이 훨씬 용이해질 것이다. 따라서 본 연구에서는 예로부터 한방과 민간에서 호흡기 보호에 많이 사용하고 있는 산국의 잎과 줄기로부터 생리활성물질을 추적하면서 유효성분을 분리하였고 그 화학구조를 규명하여 보고하는 바이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물체 재료

본 실험에서 사용한 산국(*C. boreale*)은 경상남도 사천시 일대의 자생지에서 채집하여 그늘에서 건조하고 세절하여 실험에 사용하였으며, 클로로포름($CHCl_3$)으로 추출하였다. 즉, 산국의 꽃을 제외한 잎·줄기 5 kg을 상온에서 클로로포름 60 L로 3회 반복하여 추출한 후 rotary evaporator로 감압, 농축하여 용매를 완전히 제거한 후 -20℃에 보관하면서 유효성분의 분리에 이용하였다.

2.2. 시약 및 기기

RPMI 1640, DMEM, Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco (Rockville, MD, USA) 제품을 사용하였고, PBS, Tris-Chloride, EGTA, EDTA, ammonium sulfate, phenylmethylsulfonyl fluoride, leupetin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Rotary evaporator (R-114, BUCHI, Flawil, Switzerland), UV/VIS spectrophotometer (DU-70, Beckman, Fullerton, CA, USA), UV lamp (UVGL-58 Mineralight lamp, UVP, Upland, CA, USA), Polarimeter (JASCO, Japan), IR spectrophotometer (ATI Mattson Genesis, UK), MS (JMS-DX300, JOEL, Japan), NMR (AW 500, Bruker Analytische GmbH, Germany), MPLC (Yemazen, Japan), recyclic HPLC (JAI, Japan)의 것을 사용하였다.

2.3. 화합물 1, 2, 3의 분리

산국 잎·줄기 5 kg을 클로로포름으로 추출하여 얻은 조추출물 157 g을 silica column (70~230 mesh, 10×15 cm)에 loading하여 클로로포름/메탄올의 혼합용매에서 메탄올의 비율을 점진적으로 높여가며 1차 칼럼크로마토

그래피를 실시하여 16개의 소분획물로 나누었다. 분획물의 분류 기준은 precoated TLC plate를 사용하여 상승 1차원법으로 전개시킨 후, UV_{254nm}, UV_{366nm} 조사와 10% 황산에 발색되는 반점의 색깔과 Rf 값의 차이에 따라 분류하였다. 16개의 분획물 중에서 UV_{254nm}에서 약하게 형광을 나타내며 Rf 값이 0.7~0.9 ($CHCl_3$ / MeOH=19/1)이고, 10% 황산에서 푸른색으로 발색되어 sesquiterpene lactone으로 추정되는 분획물 Fr.10을 선택하였다. Fr.10은 silica column (230~400 mesh, 5×16 ㎝)에 loading하여 클로로포름/아세톤의 용매조합에서 아세톤의 비율을 순차적으로 높여가며 2차 칼럼크로마토그래피를 시행하여 다시 10개의 분획물로 나누었다. 이중에서 Rf 값이 클로로포름/아세톤=1/1에서 0.9인 Fr.4을 sesquiterpene lactone으로 추정하고 silica column (230~400 mesh, 2×17 cm)에 loading하여 핵산/에틸아세테이트의 혼합용매에서 에틸아세테이트의 비율을 점진적으로 높여가며(19/1→1/1) 3차 칼럼크로마토그래피를 실시하였다. Sesquiterpene lactone으로 추정되는 물질이 많은 fraction은 preparative TLC를 실시하여 유상의 화합물 1을 36 mg 얻었다.

화합물 2와 3은 상기에서 언급한 1차 칼럼크로마토그래피의 16개 분획물 중에서 0.25~0.4 ($CHCl_3$ / MeOH =19/1)의 Rf 값을 가지는 분획물 Fr.14로 부터 분리하였다. Fr.14에 대하여 화합물 1에서와 동일한 조건의 2차 칼럼크로마토그래피를 실시하여 12개의 분획물을 획득하였으며, 이 중에서 Rf 값이 에테르/메탄올=19/1에서 0.3인 Fr.8을 선택하였다. Fr.8은 메틸렌클로라이드/메탄올(9/1)의 용매조합으로 MPLC를 실시하여 불순물을 제거하였으며, 메틸렌클로라이드/에탄올(25/1)의 용매조합으로 recyclic HPLC를 반복적으로 실시하였고 클로로포름/아세톤(3/2), 에테르/에틸아세테이트(4/1)의 전개용매 조합으로 preparative TLC를 실행하여 유상의 화합물 2를 37 mg, 화합물 3은 46 mg을 얻었다.

2.4. 암세포주에 대한 세포독성 실험

본 실험에 사용한 세포주는 ACHN (kidney carcinoma), LOX-IMVI (melanoma), SW620 (colon adenocarcinoma), PC-3 (prostate adenocarcinoma), A549 (lung carcinoma)이며, 한국생명공학연구원에서 계대배양 중인 것을 분양 받아 사용하였다. 96 well plate의 각 well에 5×10^3~2×10^4개의 실험 세포들을 분주하고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 well의 바닥에 부착시킨 후 단계별로 희석한 시료(30, 10, 3, 1, 0.3 ㎍/㎖)를 처리하여 48시간 더 배양하였다. 시료의 세포독성효과를 계산하기 위하여, 시료를 가하는 시점에서의 세포수(Tz, zero time)와 시료 대신 과량의 medium만을 가하여 48시간 배양하였을 때의 세포수(C, control) 및 각 농도의 시료를 함께 넣고 48시간 배양했을 때의 세포수(T, test)를 각각 측정하여 다음의 수식에 따라 시료가 암세포 성장을 50% 억제하는 농도인 GI_{50}(50% growth inhibitory dose)을 계산하였다.

Tz〉 T인 경우 : [(T-Tz) / (C-Tz)] × 100
Tz 〈T인 경우 : [(T-Tz) / Tz] × 100

2.5. FPTase의 활성 측정

FPTase의 활성은 Scintillation Proximity assay에 의해 측정하였다. 20 ㎕의 ^{3}H-FPP (farnesyl pyrophosphate), 20 ㎕ biotin lamin B peptide, 10 ㎕ 시료용액, 10 ㎕의 assay 완충용액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM $MgCl_2$, 2 mM KCl, 5 mM Na_2HPO_4, 0.01% Triton X-100)을 넣고 3분 동안 pre-incubation한 후 40 ㎕의 FPTase를 넣어주고 37℃에서 1시간 동안 incubation한다. 150 ㎕의 SPA bead/stop reagent solution을 넣어 반응을 정지시키고 vortex한 다음, 30분간 상온에서 방치한 후 liquid scintillation counter 로 측정하였다.

2.6. Apoptosis 저해 실험

U937 세포에 10 μM etoposide를 처리하여 apoptosis를 유도한 후 4시간 후에 현미경으로 cell의 모양을 관찰하여 apoptosis 여부를 1차 판정하였으며, 세포를 harvest 한 후 얻은 cell lysate를 이용하여 apoptosis에 중요한 역할을 담당하는 효소인 caspase 3의 활성을 측정하였다. Etoposide를 투여한 경우 유도된 caspase의 활성과 비 투여시의 활성을 기준으로 각 시료의 저해 활성을 환산하였다. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)는 표준 caspase 3 저해제로 사용하였다.

2.7. NO 방출 저해 실험

NO 방출 저해 활성은 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서 배양액으로 방출되는 NO_2의 량을 Griess

Table 1. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectral data for compound 1

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	5.79	3.2(d, J=2.35 Hz, 1H)
2	132.6	6.01(dd, J_1=5.9 Hz, J_2=2.45 Hz, 1H)
3	137.4	5.90(dd, J_1=5.9 Hz, J_2=2.1 Hz, 1H)
4	89.5 (Quaternary)	
5	50.4	2.77(dd, J_1=11.65 Hz, J_2=1.7 Hz, 1H)
6	77.6	4.31(dd, J_1=11.75 Hz, J_2=9.3 Hz, 1H)
7	47.0	3.78(m, 1H)
8	73.9	5.19(m, J_1=9.4 Hz, J_2=5.7 Hz, J_3=1.4 Hz, 1H)
9	48.4	3.16(m, 1H)
10	12.6 (Quaternary)	
11	135.8 (Quaternary)	
12	169.1 (C=O)	
13	124.5	6.32(d, J=3.3 Hz, 1H) 5.81(d, J=2.9 Hz, 1H)
14	25.5	1.20(s, 3H)
15	21.1	1.42(s, 3H)
1'	169.6 (C=O)	
2'	21.3	2.13(s, 3H)
3'	50.7	3.24(s, 3H)

reagent를 이용한 흡광도법으로 측정하였다. RAW 264.7 cell은 100 ㎍/㎖ penicillin-streptomycin 및 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지로 배양하여 1×10^6/㎖의 농도로 조정한 후 96 well microplate의 각 well에 200 ㎕씩 분주하여 2시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 진공 흡입법으로 상등액을 제거한 후 새로운 배지로 교환한 다음 DMSO에 다양한 농도로 녹인 시료액 5 ㎕와 LPS (1 ㎍/㎖) 5 ㎕를 차례로 처리하여 다시 20시간동안 37℃, 5 % CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양 후 각 well에서 100 ㎕ 씩 상등액을 취하고 여기에 Griess reagent 100 ㎕를 가한 후 microplate reader로 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3. 결 과

3.1. 산국의 잎과 줄기에서 분리한 화합물들의 구조 동정: 화합물 1

화합물 1은 무색유상의 물질로서 적외선 스펙트럼에서 3500 cm^{-1}에서 전형적인 알콜(-OH) 흡수띠와 1759 cm^{-1}부근의 2개의 카르보닐기(-CO), 1645 cm^{-1}부근에서 C=C의 peak가 존재하고 있다는 것을 알았다. 질량 스펙트럼에서는 분자이온 (M^+)의 peak가 m/e = 336에서 관찰되었고, m/e=276 (M^+-60)의 fragment로부터 acetyl기, m/e=304 (M^+-32)의 fragment로부터 methoxy기가 1개 존재하고 있다는 정보를 얻을 수 있었다. ^{13}C-NMR 스펙트럼에서는 탄소 수가 18개라는 것을 알 수 있었으며, 화학적 이동값 δ 169.6 ppm, 169.1 ppm의 peak로부터 2개의 카르보닐기가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. DEPT 90과 135 스펙트럼에서는 4개의 CH_3 (3H×4=12H), 2개의 CH_2 (2H×2=4H), 7개의 CH (1H×7=7H), 그리고 5개의 4차탄소가 존재하고 있음을 알 수 있었고, 또 ^{1}H-NMR 스펙트럼의 적분비로부터 이 화합물에는 24개의 수소가 존재함을 알 수 있었다(Table 1). 이러한 분광학적인 자료를 종합하여 볼 때, 화합물 1의 분자식은 $C_{18}H_{24}O_6$로 추정할 수 있었다.

^{13}C-^{1}H COSY (HMQC) 스펙트럼에서 endo methylene 1개와 exo methylene 1개가 분자 내에 존재

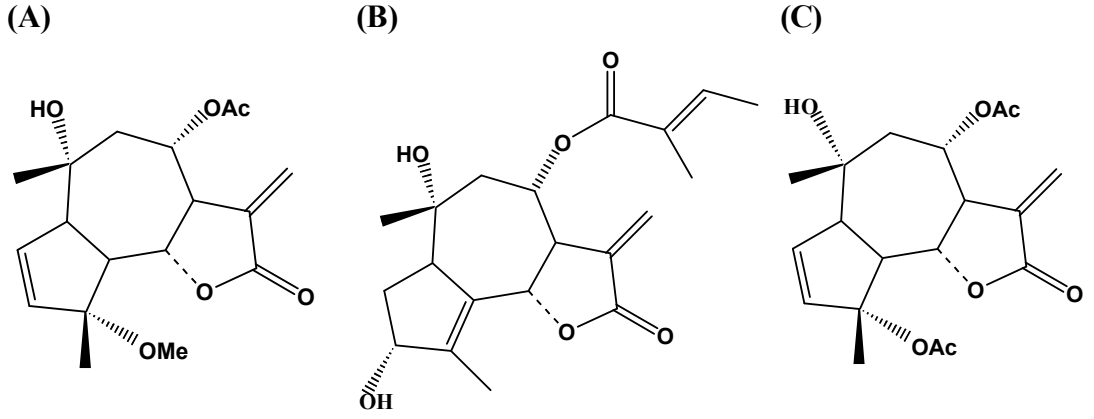

Fig. 1. Chemical structure of compound 1 (A), 2 (B) and 3 (C).
(A) 4-methoxy-8-*O*-acetyl-10-hydroxy-2,11(13)-guaiadiene-12,6-olide;
(B) 8-*O*-(2-carbonyl-2-butyl)-3,10-dihydroxy-4,11(13)-guaiadiene-12,6-olide;
(C) 4,8-*O*-diacetyl-10-hydroxy-2(3),11(13)-guaiadiene-12,6-olide.

함을 알 수 있었다. 이상의 결과들은 DEPT스펙트럼의 결과들과 잘 일치하였다. ^{1}H-^{1}H COSY 스펙트럼에서 H13a/b(6.32, 5.81 ppm)의 vinyl 양성자는 allylic 위치의 H7(3.16 ppm)과 교차 peak가 관찰되었고, H7은 H8(5. 07 ppm) 및 H6(4.31 ppm)과 교차 peak가 각각 관찰되었다. H8은 H9a/b와 연결되어 있고 H9a/b는 더 이상의 교차 peak를 관찰할 수 없었다. 또한 H6은 H5(2.77ppm) 및 H7(3.16ppm)과 교차 peak가 관찰되었으며, H5는 H1(3.2 ppm) 및 H6(4.31 ppm), H1은 H2(6.01 ppm), H2는 H3(5.90 ppm)과 교차 peak를 각각 찾을 수 있으며, H3은 더 이상 교차 peak를 관찰 할 수 없었다.

보다 구체적인 구조동정을 위하여 HMBC로 분석해 본 결과 C10 탄소는 격리된 H14(1.20 ppm)와 H1(2.31 ppm), H9a/b(3.04, 1.82 ppm) 교차 peak가 관찰되었고, C4 탄소는 H3(5.71 ppm), H5(3.77 ppm), H15(1.42 ppm)의 교차 peak가 관찰되었다. C11 탄소는 H13a/b (6.32, 5.81 ppm)와의 교차 peak가 관찰되었고, C1′ 탄소는 H8(5.03 ppm) 및 H2′(2.13 ppm)와 교차 peak를 관찰 할 수 있었다. 이상의 분광학적 결과와 문헌자료를 비교하여 화합물 1은 4-methoxy-8-*O*-acetyl-10-hydroxy-2,11(13)-guaiadiene-12,6-olide로 동정 되었다(Fig. 1A). 이 화합물은 산국에서는 처음 보고되는 물질이었다.

3.2. 산국의 잎과 줄기에서 분리한 화합물들의 구조 동정: 화합물 2

화합물 2는 화합물 1과 마찬가지로 무색유상의 물질로서 적외선 스펙트럼으로부터 전형적인 알콜기(-OH), 2개의 카르보닐기(-CO), C=C의 peak가 존재하고 있음을 확인하였다. 질량 스펙트럼에서는 분자이온(M^+)의 peak가 m/e=362에서 나타났고, m/e=344 (M^+-18)에서 hydroxy기, m/e=262 (M^+-100)에서 angeloyl기의 특징적인 fragment 이온 peak가 각각 관찰되었다.

^{13}C-NMR 스펙트럼에서 20개의 탄소 peak가 관찰되었고, 화학적 이동값 δ 169.2 ppm과 166.5 ppm으로부터 2개의 카르보닐기가 존재한다는 것을 알 수 있었다. DEPT 90과 135 스펙트럼에서는 4개의 CH_3 (3H×4=12H), 3개의 CH_2 (2H×3=6H), 6개의 CH (1H×6=6H)가 존재함을 알 수 있었다. ^{1}H-NMR 스펙트럼의 적분비로부터 이 화합물에는 수소가 26개 존재하고 있다는 것을 알 수 있었다(Table 2). 따라서 이러한 분광학적인 자료를 종합하여 볼 때, 화합물 2의 분자식은 $C_{20}H_{26}O_6$로 추정할 수 있었다.

^{13}C-^{1}H COSY (HMQC) 스펙트럼의 교차 peak로 부터 endo methylene 2개와 vinylic methylene 1개가 분자 내에 존재한다는 것을 알 수 있었고, 이상의 결과들은 DEPT 스펙트럼의 결과와 일치하였다. ^{1}H-^{1}H COSY 스펙트럼에서 H13a/b(6.13, 5.86 ppm)의 vinyl 양성자는

Table 2. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectral data for compound 2

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	55.3	3.25(m, 1H)
2	35.0	2.25(m, 1H) 1.94(m, 1H)
3	80.3	4.95(d, J=6.3 Hz, 1H)
4	132.1 (Quaternary)	
5	135.7 (Quaternary)	
6	77.3	4.76(dd, J_1=10.9 Hz, J_2=1.65 Hz, 1H)
7	47.6	3.34(m, 1H)
8	70.6	5.60(m, J_1=9.3 Hz, J_2=5.7 Hz, J_3=1.6 Hz, 1H)
9	50.9	2.19(dd, J_1=13.1 Hz, J_2=4.0 Hz, 1H) 1.87(dd, J=13.1 Hz, J_2=10.3Hz, 1H)
10	72.7 (Quaternary)	
11	144.5 (Quaternary)	
12	166.5 (C=O)	
13	124.1	6.13(d, J=3.3 Hz, 1H) 5.86(d, J=2.9 Hz, 1H)
14	13.5	1.97(s, 3H)
15	22.5	1.03(s, 3H)
1'	169.6 (C=O)	
2'	127.0 (Quaternary)	
3'	140.1 6.28(m, 1H)	
4'	15.9	2.02(m, 3H)
5'	20.5	1.94(s, 3H)

allylic 위치의 H7(3.34 ppm)과 coupling을 하고, H7은 H6(4.76 ppm) 및 H8(5.60 ppm)과 coupling을 하고 있는 것이 관찰되었다. H8은 H9a/b(2.19, 1.87 ppm)와 coupling하고 있었으나, H9는 H8을 제외하고는 coupling을 관찰할 수 없었다. H6은 H7(3.34 ppm) 및 H5(2.68 ppm)와 coupling하고 있었으며, H1(3.25 ppm)은 H2a/b(2.25, 1.94 ppm), H2a/b는 H3(4.95 ppm)과 coupling이 관찰되었다. 격리된 H3′(6.28 ppm)는 H4′(2.02 ppm)와 교차 peak가 관찰되었고, H5′(1.94 ppm) 양성자는 H3과 allylic coupling을 하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 화합물 2는 20개 탄소를 갖는 sesquiterpene lactone 골격에 4개의 탄소를 갖는 angeloyl기가 붙어있음을 알 수 있었다. 이상의 분광학적 분석 결과로부터 화합물 2는 8-*O*-(2-carbonyl-2-butyl)-3,10-dihydroxy-4,11(13)-guaiadiene-12,6-olide로 동정 되었으며, 지금까지 산국에서는 보고된 적이 없는 물질이었다(Fig. 1B).

3.3. 산국의 잎과 줄기에서 분리한 화합물들의 구조 동정: 화합물 3

화합물 3은 무색유상의 물질로서 적외선 스펙트럼에서 1759 cm^{-1}과 1645 cm^{-1}에서 3개의 카르보닐기(-CO)의 peak가 존재하고 있음을 알 수 있었다. 질량 스펙트럼에서는 분자이온 (M^+) peak가 m/e = 364에서 관찰되었고, m/e=304 (M^+-60) fragment와 m/e=244 (M^+-120) fragment로부터 acetyl기가 2개 존재하고 있다는 정보를 얻을 수 있었다. 또한, m/e=226 (M^+-138)의 fragment로부터 hydroxy기가 존재하고 있다는 사실을 알 수 있었다. ^{13}C-NMR 스펙트럼에서는 탄소 수가 19개라는 것을 알 수 있었으며, 화학적 이동값 δ 170.0

Table 3. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectral data for compound 3

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	58.4	3.25(d, J=10.1 Hz, 1H)
2	131.6	5.94(dd, J_1=5.8 Hz, J_2=2.5 Hz, 1H)
3	139.4	5.83(d, J=2.4 Hz, 1H)
4	84.9 (Quaternary)	
5	53.6	2.75(dd, J_1=11.8 Hz, J_2=10.1 Hz, 1H)
6	78.6	4.34(dd, J_1=11.9 Hz, J_2=9.5 Hz, 1H)
7	48.4	3.14(m, 1H)
8	71.7	5.02(m, J_1=21.6 Hz, J_2=10.8 Hz, J_3=4.2 Hz, 1H)
9	51.2	2.32(dd, J_1=13.1 Hz, J_2=4.2 Hz, 1H) 1.84(dd, J_1=13.1 Hz, J_2=3.8 Hz, 1H)
10	72.8 (Quaternary)	
11	135.8 (Quaternary)	
12	169.6(C=O)	
13	125.5	6.33(d, J=3.2 Hz, 1H) 5.85(d, J=3.2 Hz, 1H)
14	25.4	1.18(s, 3H)
15	25.1	1.47(s, 3H)
1'	170.0 (C=O)	
2'	31.3	2.14(s, 3H)
3'	170.0 (C=O)	
4'	31.3	2.17(s, 3H)

ppm, 169.64 ppm의 peak로부터 3개의 카르보닐기가 존재한다는 사실을 알 수 있었다. DEPT 90과 135 스펙트럼에서는 4개의 CH_3 (3H×4=12H), 2개의 CH_2 (2H×2=4H), 7개의 CH (1H×7=7H), 6개의 4차탄소가 존재하고 있음을 알 수 있었고, ^{1}H-NMR 스펙트럼의 적분비로부터 이 화합물에는 24개의 수소가 존재함을 알 수 있었다(Table 3). 이러한 분광학적인 자료를 종합하여 볼 때, 화합물 3의 분자식은 $C_{19}H_{24}O_7$로 추정할 수 있었다.

^{13}C-^{1}H COSY (HMQC) 스펙트럼에서 endo methylene 1개와 exo methylene 1개가 분자 내에 존재함을 알 수 있었다. 이상의 결과들은 DEPT스펙트럼의 결과들과 잘 일치하였다. ^{1}H-^{1}H COSY 스펙트럼에서 H13a/b(6.33, 5.85 ppm)의 vinyl 양성자는 allylic 위치의 H7(3.14 ppm)과 교차 peak가 관찰되었고, H7은 H8(5.02 ppm) 및 H6(4.37 ppm)과 교차 peak가 각각 관찰되었다. H8은 H9a/b와 연결되어 있고 H9a/b는 더 이상의 교차 peak를 관찰할 수 없었다. 또한 H6은 H5(2.75 ppm) 및 H7(3.14 ppm), H5는 H1(3.25 ppm) 및 H6(4.37 ppm), H1은 H2(5.94 ppm), H2는 H3(5.83 ppm)과 교차 peak를 각각 찾을 수 있으며, H3은 더 이상 교차 peak를 관찰 할 수 없었다.

HMBC로 분석해 본 결과 C10 탄소는 격리된 H14(1.18 ppm), H1(3.25 ppm) 및 H9a/b(2.32, 1.84 ppm), C4 탄소는 H1(3.25 ppm), H5(2.75 ppm) 및 H15(1.47 ppm)와의 교차 peak가 관찰되었다. C2 탄소는 H1(3.25 ppm), C11 탄소는 H13a/b(6.33, 5.85 ppm), C1′ 탄소는 H8(5.02 ppm) 및 H2′(2.14 ppm)와 교차 peak를 관찰 할 수 있었다. 이상의 분광학적 결과로 화합물 3은 4,8-*O*-diacetyl-10-hydroxy-2(3),11(13)-guaiadiene-12,6-olide로 동정 되었으며(Fig. 1C), 산국에서는 처음으로 보고되는 물질로 판명되었다.

Table 4. Cytotoxicity of compound 1, 2 and 3 isolated from *C. boreale* against various human cancer cell lines *in vitro*

Compounds	GI_{50} (㎍/㎖)*				
	ACHN	LOX-IMVI	SW-620	PC-3	A549
1	2.61	2.55	1.89	3.02	3.57
2	3.62	3.56	2.52	6.37	>10
3	6.05	4.98	>10	>10	>10
Adriamycin	0.089	0.0432	0.196	0.76	0.28

*Each compound was examined with five concentrations (30, 10, 3, 1 and 0.3 ㎍/㎖). GI_{50} values of compounds represent the concentration that caused 50% inhibition of cell growth.

Table 5. Farnesyl-protein transferase (FPTase) inhibitory activities of compound 1, 2 and 3 by scintillation proximity assay

Compounds (100 ㎍/㎖)	1	2	3
Inhibition (%)	54	78	90

Table 6. Inhibitory effect on the activity of caspase 3 by compound 1, 2 and 3 isolated from *C. boreale*

Compounds	Inhibition (%)	
	100 ㎍/㎖	20 ㎍/㎖
1	95	93
2	97	42
3	91	75

3.4. 산국에서 분리한 화합물들의 암세포주에 대한 *in vitro* 세포독성실험

암세포주인 ACHN (kidney carcinoma), LOX-IMVI (melanoma), SW620 (colon adenocarcinoma), PC-3 (prostate adenocarcinoma), A549 (lung carcinoma)에 대하여 산국의 잎과 줄기에서 분리한 3종의 sesquiterpene lactone들의 세포독성 활성을 조사한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 모든 세포주에 대해서 독성이 나타났다. 특히 화합물 1은 대조군인 Adriamycin 보다는 높았지만 실험에 사용된 모든 세포주에 대해서 GI_{50} 값이 3.57 ㎍/㎖ 이하로 비교적 강한 세포독성을 보였다.

3.5. 산국에서 분리한 화합물들의 farnesyl-protein transferase (FPTase) 저해활성

3종의 sesquiterpene lactone들을 대상으로 FPTase에 대한 억제 효과를 알아보기 위하여 Scintillation Proximity Assay를 실시하였다. 그 결과 Table 5와 같이 100 ㎍/㎖의 농도에서 화합물 1은 54%, 화합물 2는 78%, 화합물 3은 90%의 강한 저해율을 보였다.

3.6. 산국에서 분리한 화합물들의 Apoptosis 저해활성

Apoptosis 저해제로서의 개발가능성을 조사하기 위하여 3종의 sesquiterpene lactone들에 의한 caspase 3의 활성 저해 정도를 살펴보았다. 그 결과 Table 6에 나타낸 바와 같이 화합물 1은 100 ㎍/㎖의 농도에서 94%를 제해하였고, 화합물 2는 100 ㎍/㎖의 농도에서 91%를 저해하여 강한 활성을 보였다.

3.7. 산국에서 분리한 화합물들의 Nitric Oxide (NO) 방출 저해활성

LPS로 유도된 murin macrophage에서 배지 내로 방출되는 NO의 량이 얼마나 감소되는가를 알아보기 위하여 Griess reagent를 이용한 NO production inhibitory activity assay를 실시하였다. 그 결과 Table 7에 나타낸 바와 같이 화합물 1은 IC_{50} 값이 10 ㎍/㎖ 이며, 화합물 2는 IC_{50} 값이 15 ㎍/㎖, 화합물 3은 IC_{50} 값이 20 ㎍/㎖로

Table 7. Inhibitory activities of compound 1, 2 and 3 against LPS-induced NO production in murine macrophage

Compounds	1	2	3
Inhibition (IC_{50}, μg/ml)	10	15	20

비교적 강한 활성을 보였다.

4. 고 찰

우리나라의 민간요법에서는 산국의 잎을 짠 즙이 종기의 통증을 멎게 하는데 효과가 있다고 하며, 주독을 푸는 데는 꽃을 그늘에 말렸다가 한 숟갈 정도를 뜨거운 물에 넣어 한참 후에 마신다고 전해 내려오고 있다. 현대 의학적 연구로도 산국 꽃의 추출물에는 중추신경의 진정작용이나, 혈압강하작용, 결핵균 및 각종 바이러스에 대한 억제효과가 있다는 것이 증명되었고(Spörel et al., 1991) 폐암과 간암에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으나(Bensky et al., 1986), 산국의 약효성분에 대한 명확한 연구가 이루어지지 않고 있다가, 최근 들어 산국의 꽃에서 cumambrin B 유도체들과 두 종의 germacranolides를 분리하여 이들에 대한 혈당강하, 세포독성, 항암작용 등에 대한 생리활성을 보고한 바 있다(Jang et al., 1998a). 본 연구는 국화과 식물인 산국에서 약효성분으로 예상되는 sesquiterpene lactone을 분리하여 그 구조를 규명하고, 생물학적 활성을 평가함으로써 새로운 천연물 유래 생리활성물질의 탐색에 그 목적이 있다.

Sesquiterpene lactone은 flavonoid와 함께 특히 국화과 식물에 있어서 화학적 분류의 지표물질(chemotaxonomic marker)로 사용된다. 구조-활성연구에 의해 sesquiterpene lactone들은 phosphofructokinase, glycogen synthase, DNA polymerase 및 thymidyrate synthase와 같은 함황효소(thiol-containing enzyme)를 저해할 뿐만 아니라, 어떤 sesquiterpene lactone은 glycolytic pathway와 단백질합성에 동반되는 thiol-containing enzyme의 활성을 억제한다는 사실이 입증되었다(Giordano et al., 1990). 본 실험에 사용된 화합물과 같은 α-methylene-γ-lactone group을 함유하는 sesquiterpene lactone계열 화합물들의 강한 세포독성은 α,β-unsaturated ketone group에 기인한다고 보고되어져 있으며(Ahn et al., 1996), 이 group이 Michael acceptor로 작용하여 생체 내 nucleophile (DNA, enzyme, receptor)과 결합함으로 세포독성을 나타내는 것으로 추정된다.

한편, 과학이 발달함에 따라 암에 대한 새로운 접근방법으로서 암의 발생 기전과 병태생리를 해명하여 암을 예방 또는 치료하고자 하는 노력이 경주되고 있는 가운데 최근에 mechanism-based bioassay가 항암제 개발에 있어서 매우 중요한 방법으로 부상하고 있다(Matthias et al., 1991). 지금까지 개발된 mechanism-based bioassay 방법 중 본 실험에서는 FPTase inhibitor 탐색법을 사용하였다. FPTase는 세포의 증식과 분화를 조절하는 신호전달 과정에 관여하는 효소 중의 하나로서 farnesyl pyrophosphate의 farnesyl group을 암화과정에서 중요한 역할을 담당하는 ras protein에 전달하는 역할을 한다(Janice et al., 1995). 이에 따라 본 연구에서 FPTase의 저해제 탐색을 통해 산국의 항암활성에 대하여 알아본 결과, 3개의 화합물 모두에서 50% 이상의 FPTase 효소활성 저해 효과가 확인되었으며 화합물 3은 90%의 가장 높은 저해효과를 보였다. 화합물 3의 경우, 인체암 세포주에 대한 세포독성은 다른 sesquiterpene lactone 보다 낮게 나타나는 것으로 보아 α-methylene-γ-lactone ring을 함유하는 sesquiterpene lactone 계열 화합물들의 FPTase의 억제는 α-methylene-γ-lactone ring에 기인하는 직접적인 세포독성 보다는 치환체의 종류에 따라 서로 상이하다고 할 수 있겠다. 그러므로 구조-활성관계에서 치환체의 종류와 FPTase 저해활성과 어떤 연관성이 있을 것으로 판단되어 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

세포 자멸사(apoptosis)는 특별한 자극 없이 세포 스스로 죽는 현상으로 세포막의 항상성은 유지되며, 조절 이상 시 여러 질병을 유발시킨다(Fink et al., 2005). 배발생, 면역 반응 및 암의 진행과 같은 넓은 범위의 생물학적 과정 및 병리학적 과정과 관련이 있으며, 최근에는 심장병이나 뇌졸중에서 apoptosis에 기인한 세포사멸을 막고자 caspase의 활성화를 포함한 apoptosis 기작을 이해하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Elmore, 2007).

그러므로 apoptosis를 조절하는 화학물들이 천연물화학에서 분리하려는 중요한 목표화합물로 두각을 나타내고 있다. 본 실험에 사용된 3가지 화합물 중 화합물 1번과 3번은 20 ㎍/㎖의 농도에서 75% 이상의 강한 활성을 보였으며, 특히 화합물 3번은 세포독성은 낮은데 비해 FPTase 저해활성과 apoptosis 저해활성이 강하게 나타났으므로 향후 연구방향을 세포수준에서 진행할 수 있는 가능성을 제시함과 동시에 약리학적 활용가능성을 의미한다고 할 수 있을 것으로 사료된다.

염증은 면역체계에서 일어나는 반응 중의 하나로 인체의 항상성을 유지하는데 필요한 생체 시스템 중의 하나이다(Grivennikov et al., 2010). 하지만 염증 반응이 과도하게 일어나게 되면 암과 같은 만성 질환의 원인이 된다. 만성 위축성 위염에 의한 위암, 간염에서부터 진행되는 간암, 식도염에 의한 식도암 등은 염증과 암 발생과의 밀접한 연관관계를 보여주고 있다(Kim et al., 2009). LPS와 같은 세균의 내독소는 Nitric Oxide (NO)를 과다 생성함으로써 비정상적인 염증반응을 발생시킬 수 있다. NO는 Nitric Oxide Synthase (NOS)의 작용에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 생성되며, 대부분의 조직세포에 영향을 미쳐 순환기계에서는 혈관 이완 물질로 중추신경계에서 신경전달 물질로 면역계에서는 방어물질로 알려져 있다(Barnes, 1995). 하지만 과다 생성 시 prostaglandin 등의 생합성을 촉진하여 염증반응을 심화시키며, 폐혈증 shock를 일으키는 등 해롭게 작용하기도 한다(Lowenstein et al., 1994). 따라서, NO의 과잉방출은 여러 가지 생리학적인 문제를 유발할 수 있으며, NO의 방출을 억제하는 인자들을 발견하는 것은 NO의 독성으로 유발되는 질병 치료제의 개발을 위한 중요한 연구로 판단된다. 이러한 연구를 배경으로 본 연구에서는 산국의 잎줄기에서 분리한 sesquiterpene lactone들을 이용하여 대식세포 배양액내의 NO 생성량을 측정하였으며, 화합물 1, 2, 3의 IC_{50} 값은 각각 10, 20, 30 ㎍/㎖으로 확인되었다. NO 생성에 대한 저해활성은 sesquiterpene lactone들의 α-methylene-γ-lactone ring 보다는 치환체의 종류에 따라 많은 연관성이 있는 것으로 판단되며, sesquiterpene lactone들의 골격형과 치환체의 종류에 따른 활성의 특이성은 NO의 합성에 관여하는 NOS의 active site에 대한 기질구조의 특이성과 세포막의 투과성이나 용해도의 차이 등에 의한 것으로 추측된다.

이상의 결과들로부터 산국의 잎과 줄기에 인체암 세포주에서 세포독성을 나타내고 FPTase과 caspase 활성 및 NO의 생성을 저해하는 3종의 sesquiterpene lactone이 함유되어 있음을 확인하였다. 분리된 화합물 1, 2, 3은 Lee et al.(2017; 2017a)이 산국의 잎과 줄기에서 분리하여 발표했던 sesquiterpene lactone과는 치환기의 종류와 위치가 다른 새로운 sesquiterpene lactone으로 밝혀졌다. 분리 · 동정된 3종의 화합물은 암이나 염증성 질환과 같은 질병치료제로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

5. 결 론

산국의 잎·줄기로 부터 생리활성 성분 연구를 위하여 다양한 크로마토그래피를 반복적으로 실시하여 3개의 guaianolide type의 sesquiterpene lactone들(화합물 1, 2, 3)을 분리하였다. 화합물 1은 4-methoxy-8-*O*-acetyl-10-hydroxy-2,11(13)-guaiadiene-12,6-olide, 화합물 2는 8-*O*-(2-carbonyl-2-butyl)-3,10-dihydroxy-4,11(13)-guaiadiene-12,6-olide, 화합물 3은 4,8-*O*-diacetyl-10-hydroxy-2(3),11(13)-guaiadiene-12,6-olide로 동정되었다. 이들은 국화과 식물의 대표적인 지표성분인 sesquiterpene lactone 계열 화합물이지만, 모두 산국의 잎·줄기에서는 처음으로 보고되는 물질이다. 3종의 sesquiterpene lactone들을 대상으로 인체암 세포주들에 대한 *in vitro* 세포독성을 조사한 결과 세포독성을 보였다. 특히 화합물 1이 강한 세포독성을 보였다. FPTase 활성 저해 효과는 화합물 1이 54%, 화합물 2는 78%, 화합물 3은 90%의 강한 저해율을 보였다. LPS에 의해 과다 생성된 NO도 3종의 sesquiterpene 화합물에 의해 저해됨을 확인하였다. 또한 3종의 화합물은 caspase 3의 활성을 90% 이상 억제하여 apoptosis를 저해하는 효과를 나타내었다. 이상의 연구 결과는 산국의 잎·줄기를 암이나 염증성질환에 효과가 있는 다양한 한약제제와 술, 차 등의 기능성 제품으로 개발하는데 기초 자료가 될 수 있을 것이다. 특히, 미세먼지가 대기환경 오염원으로 문제가 되고 상황에서 기관지염을 비롯한 호흡기 관련 질환을 예방하고 치료할 수 있는 소재로도 활용될 수 있을 것이다. 더불어, 꽃은 잎과 줄기에 비에 상대적으로 양이

적고 수확이 힘들기 때문에 산국의 잎과 줄기를 사용하면 소재의 확보가 훨씬 용이할 것으로 사료된다.

REFERNECES

Ahn, B. Z., Sok, D. E., 1996, Michael acceptor as a tool for anticancer drug design, Curr. Pharm. Design., 2, 247-262.

Barnes, P. J., Liew, F. Y., 1995, Nitric oxide and asthmatic inflammation, Immunol. Today, 16(3), 128-130.

Bensky, D., Gamble, A., Kaptchuk, T., 1986, Chinese herbal medicine: Materia Medica, Eastland press, Seattle, 59.

Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, Toxicol. Pathol., 35(4), 495-516.

Fink, S. L., Cookson, B. T., 2005, Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, Infect. Immun., 73(4), 1907-1916.

Fraga, B. M., 2012, Natural sesquiterpenoids, Nat. Prod. Rep., 29(11), 1334-1366.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M., 2010, Immunity, inflammation, and cancer, Cell, 140(6), 883-899.

Giordano, O. S., Querreiro, E., Pestchanker, M. J., Guzman, J., Pastor, D., Guardia, T., 1990, The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones, J. Nat. Prod., 53(4), 803-809.

Han, W. S., 2003, Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Chrysanthemum boreale* Makino, Kor. J. Med. Crop. Sci., 11(1), 1-4.

Jang, D. S., Park, K. H., Ko, H. L., Lee, H. S., Kwon, B. M., Yang, M. S., 1998, Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from several compositae plants. Part 3. Inhibitory activity on nitric oxide release and ACAT, Kor. J. Pharmacogn., 29(3), 243-247.

Jang, D. S., Park, K. H., Yang, M. S., 1998a, Germacranolides from flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino, Kor. J. Pharmacogn., 29(2), 67-70.

Janice, E. B., James, C. M., 1995, Farnesyl transferase inhibitors: the successes and surprises of a new class of potential cancer chemotherapeutics, Chem. Biol., 2(12), 789-791.

Kang, S. S., Kim, J. S., Son, K. H., Lee, C. O., Kim, Y. H., 1996, Isolation of handelin from *Chrysanthemum boreale*, Arch. Pharm. Res., 19(5), 406-410.

Kim, B. S., Park, S. J., Kim, M. K., Kim, Y. H., Lee, S. B., Lee, K. H., Choi, N. Y., Lee, Y. R., Lee, Y. E., You, Y. O., 2015, Inhibitory effects of *Chrysanthemum boreale* essential oil on biofilm formation and virulence factor expression of *Streptococcus mutans*, Evid. Based Complement. Altern. Med., 2015, 616309.

Kim, D. Y., Hwang, D. I., Yoon, M. S., Choi, I. H., Lee, H. M., 2016, Effect of hydrosol extracted from *Chrysanthemum boreale* Makino flower on proliferation and migration in human skin keratinocyte, J. Soc. Cosmet. Sci. Korea, 42(1), 95-101.

Kim, D. Y., Won, K. J., Yoon, M. S., Hwang, D. I., Yoon, S. W., Park, J. H., Kim, B., Lee, H. M., 2015a, *Chrysanthemum boreale* Makino essential oil induces keratinocyte proliferation and skin regeneration, Nat Prod Res., 29(6), 562-564.

Kim, D. Y., Won, K. J., Yoon, M. S., Yu, H. J., Park, J. H., Kim, B., Lee, H. M., 2015b, *Chrysanthemum boreale* flower floral water inhibits platelet-derived growth factor-stimulated migration and proliferation in vascular smooth muscle cells, Pharm. Biol., 53(5), 725-734.

Kim, K. J., Kim, Y. H., Yu, H. H., Jeong, S. I., Cha, J. D., Kil, B. S., You, Y. O., 2003, Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*, Planta Med., 69(3), 274-277.

Kim, T. J., 1996, Korean resources plants Ⅳ, Seoul National Univ. Press, Seoul, 259.

Kim, T. K., Ock, C. Y., Lee, J. S., Hahm, K. B., 2009, Implication of TGF-β in pathway connecting inflammation and carcinogenesis, Cancer Prev. Res., 14, 177-187.

Kim, Y. H., Sung, J. H., Sung, M. S., Choi, Y. M., Jeong, H. S., Lee, J. S., 2010, Involvement of heme oxygenase1 in the anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum boreale* Makino extracts on the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages, J. Ethnopharmacol., 131(3), 550-554.

Ko, K. S., 1991, Coloured wild plants of Korea. Academy

Press., Seoul, 32.

Lee, C. H., 1985, Illustrated encyclopedia of flora in Korea. Hyangmoonsa, Seoul, 648.

Lee, J. R., Park, M. K., 2017, Isolation of guaianolides with ACAT inhibitory activity from the leaves and stems of *Chrysanthemum boreale* Makino, J. Environ. Sci. Int., 26(11), 1275-1284.

Lee, J. R., Park, M. K., 2017a, Structural analysis and biological activities of sesquiterpene lactones isolated from the leaves and stems of *Chrysanthemum boreale* Makino, J. Environ. Sci. Int., 26(11), 1285-1295.

Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., Synder, S. H., 1994, Nitric oxide: a physiologic messenger, Ann. Intern. Med., 120(3), 227-237.

Matthias, H., Kurt, H., 1991, Bioactivity in plant: The link between phytochemistry and medicine, Phytochemistry, 30(12), 3864-3874.

Spörel, J., Becker, H., Allen, N. S., Gupta, M. P., 1991, Spiroterpenoids from *Plagiochila moritziana*, Phytochemistry, 30(9), 3043-3047.

Yang, G., Lee, K., An, D. G., Lee, M. H., Ham, I. H., Choi, H. Y., 2012, Effect of *Chrysanthemi borealis* flos on atopic dermatitis induced by 1-chloro 2,4-dinitrobenzene in NC/Nga mouse, Immunopharmacol. Immunotoxicol., 34(3), 413-418.

• 박숙자, 대구한의대학교 제약공학과 교수
haany@dhu.ac.kr
• 박문기, 대구한의대학교 제약공학과 교수
moonki@dhu.ac.kr
• 이종록, 대구한의대학교 제약공학과 교수
jrlee@dhu.ac.kr