

## 조희풀(*Clematis heracleifolia*) 줄기의 성분

권용수<sup>1\*</sup> · 전완주<sup>2</sup> · 김명조<sup>3</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 약학대학, <sup>2</sup>강원대학교 의과대학,

<sup>3</sup>강원대학교 농업생명과학대학

### Chemical Constituents of *Clematis heracleifolia* Stem

Yongsoo Kwon<sup>1\*</sup>, Wanjoon Chun<sup>2</sup>, and Myong Jo Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

<sup>2</sup>College of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>3</sup>College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

**Abstract** – Four compounds were isolated from 90% ethanol extract of the stem of *Clematis heracleifolia*. On the basis of spectral data, the structure of isolated compounds were identified as sitosterone (1),  $\beta$ -sitosterol (2), scoparone (3) and octadecanoyl caffeate (4), respectively. Sitosterone (1) and octadecanoyl caffeate (4) are isolated from this plant for the first time.

**Keywords** – *Clematis heracleifolia*, Stem, Ketosteroid, Sitosterone

조희풀(*Clematis heracleifolia*)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 낙엽성 반관목으로 우리나라 전역과 만주지역에 분포한다.<sup>1)</sup> 뿌리와 줄기를 채취하여 약용하며, 풍습을 몰아내고 염증을 제거하는 효능이 있어 수족관절통의 치료, 설사를 멈추는 효능으로 만성설사의 치료에도 사용하고 있다.<sup>2)</sup> 본 연구자 등은 조희풀을 대상으로 성분에 연구에 착수하고 모든 부위의 성분을 분리하고 구조를 동정하여 그 성분상을 밝혀 약용자원으로서의 가능성과 식물분류학적 marker로서의 사용 가능성 등을 알아보려 하였으며 그 결과의 일부로서 지하부로부터 coniferyl alcohol, scoparone, (+)-lariciresinol, daucosterol 등을 분리하고 이들의 acetylcholinesterase억제 활성을 측정하여 보고하였고,<sup>3)</sup> 잎으로부터는 protocatechuic acid, ferulic acid, caffeic acid, aesculin, (6Z)-9-hydroxylinaloyl glucoside 및 9-hydroxylinaloyl glucoside 등을 분리하여 보고하였다.<sup>4)</sup> 이 연구는 계속되는 조희풀의 성분에 관한 연구의 일부로 조희풀의 줄기를 대상으로 성분상을 밝히고자 하였으며, 조희풀 줄기의 90% ethanol 추출물 중 *n*-hexane 분획과 CHCl<sub>3</sub> 분획으로부터 4종의 화합물을 분리하고 그 구조를 밝혔기에 이를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 본 실험에 사용한 조희풀(*C. heracleifolia*)의 줄기는 2013년 9월 사명산의 북서쪽에 위치하는 양구군 공수리 일대에서 채집하여 강원대학교 약학대학 권용수교수가 정확하게 감정한 후 음건하여 사용하였다. 확증표본(KNUPH-2013-09-S-01)은 강원대학교 약학대학 표본실에 보관하였다.

**기기 및 시약** – <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR spectra는 Bruker사의 AVANCE 600을 이용하여 측정하여 얻었다. ESI mass는 AB Sciex사의 API 3200 LC/MS/MS system을 이용하여 negative 또는 positive mode로 측정하였고 EI mass는 Jeol사의 JMS-700 Mass spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. Flash column chromatography는 Teledyne Isco사의 CombiFlash®Retrieve™를 이용하였고 column은 RediSep®을 이용하였다. 각 분획의 추출용매 및 column chromatography용 용매는 특급시약을 증류하여 사용하였다. TLC 전개용매 및 기타 시약은 특급 및 분석용 시약을 사용하였다. TLC plate는 Merck사의 precoated Kieselgel 60 F254s(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm, Merck Art. No. 5715), RP-18 F254s를 사용하였으며, column chromatography의 충전제는 Merck사의 Kieselgel 60(63-200  $\mu$ m 또는 40-63  $\mu$ m) 및 YMC gel ODS-A(150  $\mu$ m)를 사용하였다. TLC spot 발색은 254 nm

\*교신저자(E-mail): yskwon@kangwon.ac.kr

(Tel): +82-33-250-6921

UV 및 20% 황산용액을 사용하였다.

**추출 및 분리** – 채집 후 음건하여 세절한 조희풀(*C. heracleifolia*)의 줄기 2.4 kg을 90% 에탄올 15 L에 넣고 실온에서 3일간씩 3회 추출하였다. 추출액은 여지를 이용하여 여과한 후 여액을 40°C 이하에서 감압농축하고 건조엑스 100 g을 얻었다. 얻어진 추출물 98 g을 증류수로 현탁시킨 후 *n*-hexane, CHCl<sub>3</sub>, *n*-BuOH순으로 분획하고 남은 물층을 제거하였다. 각 분획들을 감압농축하여 *n*-hexane 분획 9.6 g, CHCl<sub>3</sub> 분획 8.1 g, *n*-BuOH 분획 18.7 g을 각각 얻었다. 얻어진 *n*-hexane 분획과 CHCl<sub>3</sub> 분획을 TLC 분석을 통하여 비교한 결과 매우 유사하였으므로 이 두 분획을 함께 분리하고자 하였다. *n*-Hexane 분획과 CHCl<sub>3</sub> 분획을 함께 silica gel column(63-200 μm, 500 g, 10 × 50 cm)에 걸어 CHCl<sub>3</sub>:MeOH (19:1)을 용매로 용출시켜 6개의 분획을 얻었다(CH-1 – CH-6). 분획 CH-2(1.9 g)를 다시 silica gel column(63-200 μm, 100 g, 3.5 × 50 cm)에 걸고 benzene:EtOAc(9:1)을 용매로 용출시키고 다섯 개의 소분획을 얻었다(CH-2-1 – CH-2-5). 소분획 CH-2-2(0.9 g)를 대상으로 silica gel column(40-63 μm, 100 g, 3.5 × 50 cm)에 걸고 *n*-hexane:EtOAc(9:1)을 용매로 용출시켜 네 개의 소분획으로 다시 나누었다(CH-2-2-1 – CH-2-2-4). 이들 소분획 중 소분획 CH-2-2-2(65 mg)는 silica gel column(40-63 μm, 100 g, 3.5 × 50 cm)에 걸고 CHCl<sub>3</sub>를 용매로 정제하여 화합물 **1**(9 mg)을 얻었다. 소분획 CH-1-3(0.5 g)은 MeOH로 재결정을 반복하여 흰색 분말 형태의 화합물 **2**(150 mg)를 얻었다. 소분획 CH-2-2-3(47 mg)을 대상으로 ODS flash column(Redisep® ODS 43 g)에 걸고 MeOH:H<sub>2</sub>O(60:40)을 용매로 정제하고 화합물 **3**(6 mg)을 얻었다. 분획 CH-3(3.5 g)을 ODS column(YMC ODS A, 150 μm, 200 g, 5 × 50 cm)에 걸고 MeOH:H<sub>2</sub>O(80:20)을 용매로 용출시켜 여섯 개의 분획으로 나누었다(CH-3-1 – CH-3-6). 분획 CH-3-6 (1.2 g)을 다시 silica gel column(40-63 μm, 100 g, 3.5 × 50 cm)에 걸고 benzene:EtOAc(5:1)을 용매로 용출시키고 아홉 개의 소분획으로 나누었다(CH-3-6-1 – CH-3-6-9). 이들 소분획 중 소분획 CH-3-6-3(62 mg)을 silica gel column(40-63 μm, 40 g, 1.5 × 50 cm)에 걸고 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(49:1)을 용매로 정제하여 화합물 **4**(12 mg)를 얻었다.

**화합물 1** – White powder; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.72 (1H, s, H-4), 1.18 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, d, *J*=6.6 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.84 (3H, t, *J*=7.4 Hz, 29-CH<sub>3</sub>), 0.83 (3H, d, *J*=6.8 Hz, 27-CH<sub>3</sub>), 0.81 (3H, d, *J*=6.8 Hz, 26-CH<sub>3</sub>), 0.71 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 199.7 (C-3), 171.7 (C-5), 123.7 (C-4), 56.0 (C-17), 55.9 (C-14), 53.8 (C-9), 45.8 (C-24), 42.4 (C-13), 39.6 (C-12), 38.6 (C-10), 36.1 (C-20), 35.7 (C-1), 35.6 (C-8), 34.0 (C-2), 33.9 (C-22), 32.9 (C-6), 32.0 (C-7), 29.1 (C-25), 28.2 (C-16), 26.0 (C-23), 24.2 (C-15), 23.0 (C-28), 21.0 (C-26), 19.8 (C-21), 19.0 (C-

11), 18.7 (C-27), 17.4 (C-19), 12.0 (C-29), 11.9 (C-18); EI-MS (%) *m/z* : 412[M, 93.1]<sup>+</sup>, 397 (11.8), 370 (29.1), 355 (7.5), 327 (8.6), 289 (27.3), 271(26.8), 245 (10.7), 229 (58.6), 147 (27.5), 124 (100), 95 (33.6).

**화합물 2** – White needle; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.35 (1H, d, *J*=5.1 Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.92 (3H, d, *J*=6.5 Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, t, *J*=7.6 Hz, 29-CH<sub>3</sub>), 0.83 (3H, d, *J*=6.8 Hz, 27-CH<sub>3</sub>), 0.81 (3H, d, *J*=6.8 Hz, 26-CH<sub>3</sub>), 0.68 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 140.8 (C-5), 121.71 (C-6), 71.8 (C-3), 56.8 (C-14), 56.0 (C-17), 50.1 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-4, C-13), 39.8 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 36.1 (C-20), 33.9 (C-22), 31.9 (C-7), 31.7 (C-2), 29.1 (C-25), 28.2 (C-16), 26.1 (C-23), 24.3 (C-15), 23.1 (C-28), 21.1 (C-11), 19.8 (C-26), 19.4 (C-19), 19.0 (C-27), 18.8 (C-21), 12.0 (C-18), 11.9 (C-29); ESI-MS (negative mode) *m/z* : 413 [M-H]<sup>-</sup>.

**화합물 3** – White powder; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.62 (1H, d, *J*=9.4 Hz, H-4), 6.86 (1H, s, H-5), 6.85 (1H, s, H-8), 6.29 (1H, d, *J*=9.4 Hz, H-3), 3.95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.94 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); ESI-MS (negative mode) *m/z* : 205 [M-H]<sup>-</sup>.

**화합물 4** – Brown powder; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.52 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-7), 7.03 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 6.93 (1H, dd, *J*=8.2, 2.0 Hz, H-6), 6.77 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-5), 6.28 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-8), 4.12 (2H, t, *J*=6.6 Hz, H-1'), 1.58 (2H, m, H-2'), 1.27 [br s, (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>], 0.89 (3H, t, *J*=6.8 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 169.4 (C-9), 148.7 (C-4), 146.8 (C-7), 143.9 (C-3), 127.7 (C-1), 122.9 (C-6), 116.5 (C-5), 115.2 (C-2), 115.1 (C-8), 65.6 (C-1'), 35.1 (C-16'), 33.1 (C-2'), 30.8~30.3 (C-4'~C-15'), 26.1 (C-3'), 23.7 (C-17'), 14.4 (C-18'); EI-MS (%) *m/z* : 432 [M, 9.0]<sup>+</sup>, 284 (10.5), 256 (27.9), 213 (13.3), 180 (11.6), 111 (41.9), 97 (78.7), 83 (97.6), 69 (91.6), 57 (100).

## 결과 및 고찰

화합물 **1**은 백색 분말 형태로 얻었으며, 이 화합물의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 보면 δ 1.18, 0.71에서 18번과 19번의 methyl기에 의한 singlet, δ 0.91에서 *J*=6.6 Hz의 doublet으로 나타나는 21번 methyl기의 signal, δ 0.83과 0.81에서 *J*=6.8 Hz의 doublet으로 나타나는 26번과 27번의 methyl기에 의한 signals, 0.84에서 *J*=7.4 Hz의 triplet으로 나타나는 29번의 methyl기의 존재를 확인할 수 있었으며, <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 29개의 탄소에 의한 signal들을 확인할 수 있었으므로 이 화합물은 sitgmastane계열의 sterol 화합물로 추정하였다.<sup>5)</sup> 또한 <sup>1</sup>H-NMR spectrum의 δ 5.72에서 수소 1개에 의한

singlet이 나타나고 3번 위치에 OH기가 치환되어 있는 sterol 화합물에서 일반적으로 보여지는  $\delta$  3.5 근처의 3번 수소에 의한 multiplet의 존재를 확인할 수 없었으며,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서도 3번 위치에 OH기가 치환되었을 때 나타나는  $\delta$  70~80 부근의 탄소 signal은 확인할 수 없고  $\delta$  199.7에서 carbonyl signal을 확인할 수 있었으므로 이 화합물의 3번은 OH기가 존재하는 것이 아닌 carbonyl기가 존재함을 알 수 있었다. 또한  $\delta$  171.7에서 5번 탄소의 signal 나타나는데 이는 일반적인  $\Delta^5$ -sterol계 화합물의 5번 탄소가  $\delta$  140~150 부근에서 나타나는 것과 비교하여 볼 때 약 30 ppm 저자장 이동되어 나타남을 알 수 있었다. 이는 이중결합이 4번과 5번 위치에 존재하여 3번의 carbonyl기와 conjugate되어 나타나는 것으로<sup>6)</sup> 전형적인  $\Delta^4$ -3-ketosteroid 형태의 화합물임을 알 수 있었다.<sup>7)</sup> 이는 mass spectrum의 fragmentation을 통해서도 확인할 수 있었는데 분자량이  $m/z$  412인 모핵의 A환과 B환이 깨지면서 생성된 fragmentation이  $m/z$  95 ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}$ )에서 비교적 강하게(33.6%) 나타나 위의 사실을 확인할 수 있었다.<sup>8)</sup> 위에서 확인한 사실과 문헌<sup>9)</sup>을 비교하여 화합물 1은 sitosterone으로 그 구조를 동정하였다. 화합물 2와 3은 표준품과의 TLC 비교 및 문헌<sup>3),10)</sup>과 spectral data를 비

교하여 그 구조를  $\beta$ -sitosterol과 scoparone으로 동정하였다. 화합물 4의  $^1\text{H}$ -NMR spectrum을 보면  $\delta$  7.52와 6.28에서 나타나는  $J=15.9$  Hz의 doublet,  $\delta$  7.03에서 나타나는  $J=2.0$  Hz의 doublet,  $\delta$  6.93에서 나타나는  $J=8.2, 2.0$  Hz의 double doublet 및  $\delta$  6.77에서 나타나는  $J=8.2$  Hz의 doublet으로부터 이 화합물에는 한 개의 caffeic acid가 존재한다는 것을 알 수 있었으며,  $\delta$  4.12에서 나타나는 한 개의 methylene기에 기인하는  $J=6.6$  Hz의 triplet,  $\delta$  0.89에서 나타나는 methyl기에 기인하는  $J=6.8$  Hz의 triplet 그리고  $\delta$  1.27 근처에 나타나는 16개의 methylene기에 기인하는 signal들을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 화합물 4는 caffeic acid에 octadecanoyl기가 ester 결합을 하고 있다는 것을 알 수 있었다. Mass spectrum에서는 분자량이  $m/z$  432에서 나타나고 여기에서 octadecanoyl기가 이탈되면서 형성된 fragmentation ion이  $m/z$  180(caffeic acid)에서 나타나는 것을 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서도 caffeic acid의 C=O가  $\delta$  169.4에서 나타나고 octadecanoyl기의 1번 탄소가  $\delta$  65.6에서 나타나는 것으로부터도 이 화합물은 caffeic acid에 octadecanoyl기가 ester결합을 하고 있음을 알 수 있었다. 이 결과들을 문헌<sup>11)</sup>과 비교하여 화합물 4는 octadecanoyl

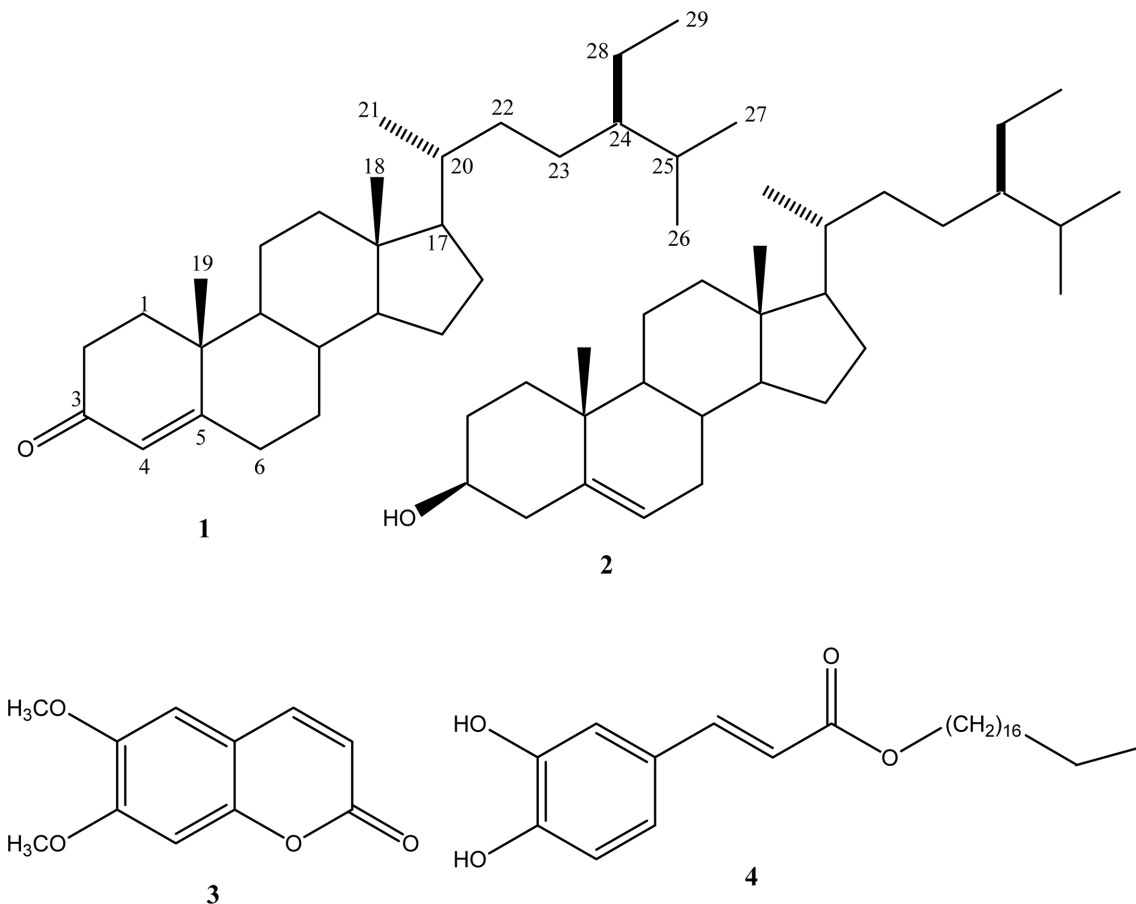


Fig. 1. Structures of 1-4.

caffeate로 동정하였다. 본 연구를 통하여 얻은 화합물들의 활성에 관한 연구를 찾아보면 sitosterone(1)은 DPPH radical 소거작용이 보고되어 있을 뿐 기타 활성을 찾아보지 못하였다.<sup>12)</sup>  $\beta$ -sitosterol(2)은 매우 다양한 활성의 연구가 진행되어 지나친 음주에 따른 간 손상을 감소시키는 효과,<sup>13)</sup> 항염증작용,<sup>14)</sup> 항암활성,<sup>15)</sup> 지질대사 조절작용<sup>16)</sup> 등이 보고되었다. Scoparone(3)은 항염증,<sup>17)</sup> 항암,<sup>18)</sup> 심근보호효과<sup>19)</sup> 등이 보고되었다. 한편, octadecanoyl caffeate(4)의 활성에 관한 연구는 찾아볼 수 없었다.

## 결 론

조희풀(*Clematis heracleifolia*) 줄기의 성분상을 밝히고 활성물질의 자원이나 식물분류학적 기준물질로서의 사용가능성을 알아 보기 위하여 연구에 착수하고 4종의 화합물을 분리하고 그 구조를 동정한 결과 화합물의 구조는 각각 sitosterone(1),  $\beta$ -sitosterol(2), scoparone(3) 및 octadecanoyl caffeate(4)이었다. 이들 화합물 중 sitosterone(1)과 octadecanoyl caffeate(4)는 이 식물에서는 처음으로 분리되었으며, 활성에 관한 연구도 계속되어야 할 것으로 생각된다.

## 인용문헌

- 이우철 (1996) 원색 한국기준식물도감, 110, 아카데미서적, 서울.
- 배기환 (2019) 천연약물도감 I, 319, 교학사, 서울.
- Kim, M. A., Kim, M. J., Chun, W. and Kwon, Y. (2015) Chemical constituents and their acetylcholinesterase inhibitory activity of underground parts of *Clematis heracleifolia*. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**: 6-11.
- Kim, M. A., Yang, H., Kim, M. J. Chun, W. and Kwon, Y. (2016) A new stereoisomeric monoterpene glycoside from *Clematis heracleifolia* leaves. *Nat. Prod. Sci.* **22**: 107-110.
- 강삼식, 손건호 (2000) 천연물성분 구조결정법, 서울대학교 출판부, 서울.
- Hanson, J. R. and Siverns, M. (1975) <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectra of some steroidal unsaturated ketones, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1956-1958.
- Teng, J. I. and Smith, L. L. (1996) Sterol peroxidation by *Pseudomonas fluorescens* cholesterol oxidase. *Steroids* **61**: 627-633.
- Patridge, L. G. and Djerassi, C. (1977) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. 250. Characteristic fragmentations of cholesterol acetate. *J. Org. Chem.* **42**: 2799-2805.
- Georges, P., Sylvestre, M., Ruegger, H. and Bourgeois, P. (2006) Ketosteroids and hydroxykeosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. *Steroids* **72**: 647-652.
- Do, J. C., Son, K. H. and Kang, S. S. (1988) Studies on the constituents of the roots of *Rubus parvifolius* (L). Isolation of (-)-epicatechin. *Kor. J. Pharmacogn.* **19**: 170-173.
- García-Argáz, A. D., Pérez-Amador, M. C., Aguirre-Hernández, E. and Martínez-Vázquez, M. (1999) Two new caffeate esters from roots of *Merremia tuberosa* and *M. dissecta*. *Planta Med.* **65**: 678-679.
- Abdul Mazid, M., Datta, B. K., Nahar, L., Khairul Bashar, S. A. M., Bachar, S. C. and Sarker, S. D. (2011) Phytochemical studies on *Polygonum barbarum* (L.) Hara var. *barbarta* (Polygonaceae). *Rec. Nat. Prod.* **5**: 143-146.
- Chen, Z., Wu, A., Jin, H. and Liu, F. (2020)  $\beta$ -sitosterol attenuates liver injury in a rat model of chronic alcohol intake. *Arch. Pharm. Res.* **43**: 1197-1206.
- Liao, P. C., Lai, M. H., Hsu, K. P., Kuo, Y. H., Chen, J., Tsai, M. C., Li, C. X., Yin, X. J., Jeyashoke, N. and Chao, L. K. (2018) Identification of  $\beta$ -sitosterol as in vitro anti-inflammatory constituent in *Moringa oleifera*. *J. Agric. Food. Chem.* **66**: 10748-10759.
- Pradhan, M., Suri, C., Choudhary, S., Naik, P. K. and Lopus, M. (2018) Elucidation of the anticancer potential and tubulin isotype-specific interactions of  $\beta$ -sitosterol. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **36**: 195-208.
- Cheng, Y., Chen, Y., Li, J., Qu, H., Zhao, Y., Wen, C. and Zhou, Y. (2020) Dietary  $\beta$ -sitosterol regulates serum lipid level and improves immune function, antioxidant status, and intestinal morphology in broilers. *Poult. Sci.* **99**: 1400-1408.
- Lu, C., Li, Y., Hu, S., Cai, Y., Yang, Z. and Peng, K. (2018) Scoparone prevents IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway. *Biomed. Pharmacother.* **106**: 1169-1174.
- Li, N., Yang, F., Liu, D. Y., Guo, J. T., Ge, N. and Sun, S. Y. (2021) Scoparone inhibits pancreatic cancer through PI3K/Akt signaling pathway. *World J. Gastrointest. Oncol.* **13**: 1164-1183.
- Wan, C., Wei, Y., Ma, J. and Geng, X. (2018) Protective effects of scoparone against ischemia-reperfusion-induced myocardial injury. *Mol. Med. Rep.* **18**: 1752-1760.

(2021. 12. 3 접수; 2021. 12. 16 심사;  
2021. 12. 20 게재확정)