

물쭉의 성분 및 이들 성분이 흰쥐의 간세포 독성에 미치는 영향

장우영 · 이강노[#] · 지옥표 · 유승조 · 김영중* · 김선여*
성균관 대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학

(Received March 16, 1993)

Constituents of *Artemisia selengensis* and their effect on hepatotoxicity

Woo Young Jang, Kang Ro Lee[#], Ok Pyo Jee, Seung Jo Yoo,
Young Choong Kim* and Soon Yoo Kim*

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Su won 440-746

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract— α -Linolenic acid ethylester, C₁₉ spiroketalenolether polyne, herniarin and steroid were isolated from the leaves of *Artemisia selengensis* (Compositae). The structures of the compounds were elucidated on the basis of spectroscopic evidence. Liver protective effects of these constituents were studied using galactosamine and CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes.

Keywords □ *Artemisia selengensis*. Compositae. Acetylene. Liver protective effect. Hepatocytes.

물쭉(유기노, *Artemisia selengensis* Turcz.)은 국화과(compositae)에 속하는 다년생 초본으로서 냇가의 약간 습한곳에서 잘 자라며 옛부터 한방에서 황달, 간염, 간암, 간경변, 간디스토마, 구토, 설사^{1,2)} 등에 널리 사용되어 오고 있다.

물쭉에 관한 연구로는 Birmecker³⁾ 등이 뿌리에서 C₁₄ acetylene 화합물을 분리하여 입체 구조를 연구하여 보고한 것 이외에는 문헌상에 보고된 바 없다.

저자 등은 유기노 잎의 에탄올 엑기스로부터 물쭉에서는 처음 보고되는 α -linolenic acid ethylester, C₁₉ spiroketalenolether polyne, herniarin 및 sterol 등을 분리하였다.

간세포에 미치는 영향은 바이러스성 간염 발생시에 일어나는 병변과 유사한 병변을 일으키는 것으로 알려진 galactosamine과 CCl₄로 간세포를 인위적으로 손상시켜서 이들 성분이 어떻게 작용하는지를 관찰하였다.

실험방법

시약 및 기기

column chromatography는 silica gel 60(230~400 mesh, Merck)을 사용하였고, 박층 chromatography는 precoated TLC plate silicagel 60 F₂₅₄를 이용하였다. LPLC (low pressure liquid chromatography)용 pump는 Duramat-Dosier pump (Chemie und Filter GmbH, Germany), 컬럼은 Lobar^(R)-Lichroprep Si 60 (Merck)을 사용하였다.

화합물의 발색 및 확인은 Anisaldehyde-H₂SO₄를 이용하였고 기타 시약은 일급 시약을 정제 없이 추출 및 컬럼 크로마토그래피에 사용하였다.

융점은 Gallenkamp melting point apparatus(uncorrected), IR은 6160FT-IR(Analect Instrument. U.S. A.), NMR은 Bruker AM-300 spectrophotometer, GC/MS는 Hewlett-packard Model 5890/5987X를 사용하였다.

실험재료

본 실험에 사용된 물쭉(유기노)은 1991년 10월 경

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

기도 남양주군 구암리 부근에서 약 3 kg을 채취하여 신선한 상태에서 일부위만을 세절하여 사용하였다.

추출 및 분리

세절한 잎 약 1.4 kg을 상온에서 에탄올로 2회 추출하여 얻은 엑스 약 200 g을 hexane : ethyl acetate (3 : 1)을 전개 용매로 silica gel column chromatography를 반복 수행하여 3개의 분획(I, II, III)으로 나누는 다음 각 분획을 LPLC column chromatography로 정제하였다.

분획 I의 정제—분획 I 약 22g을 hexane : ethyl acetate(15 : 1)의 전개 용매로 SiO₂ column chromatography를 수행하여 3개의 소분획으로 나누는 다음 3번째 소분획 약 2g을 동일한 전개 용매로 LPLC 즉 Lobar column A를 이용하여 정제하였으며, 미황색의 향이 있는 액체 화합물 1을 약 1.1g 얻었다.

화합물(1) ; IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3011(C=CH), 2928, 2854, 1738(C=O), 1180(C-O), 1035, 723.

¹H-NMR(CDCl₃, TMS) δ : 5.32(6H, m, H-9, 10, 12, 13, 15, 16), 4.10(2H, q, J=7 Hz, H-1'), 2.80(4H, br.t, J=6 Hz, H-11, 14), 2.28(2H, t, J=7 Hz, H-17), 2.05(4H, m, H-2, 8), 1.60(2H, m, H-3), 1.30(8H, m, H-4, 5, 6, 7), 1.20(3H, t, J=7 Hz, H-2'), 0.95(3H, t, J=7 Hz, H-18)

¹³C-NMR(CDCl₃, TMS) δ : 173.8(C-1), 131.9(C-16), 130.0(C-13), 129.9(C-9, 15), 127.5(C-12), 127.0(C-10), 60.0(C-1'), 34.5(C-2), 29.5(C-7), 29.0(C-4,5,6), 27.0(C-8), 25.5(C-11, 14), 25.0(C-3), 20.4(C-17), 14.2(C-18, 2')

MS, m/z(rel. int.):(R_t: 1.05), 306(M⁺, 13), 277(M⁺-C₂H₅, 3), 261(M⁺-OC₂H₅, 6), 250(4), 191(5), 173(8), 163(9), 149(22), 135(27), 93(99), 79(99)

분획II의 정제—분획II 약 27g을 hexane : ethylacetate(3 : 1)을 전개 용매로 silicagel column chromatography를 수행하여 2개의 소분획으로 나누었다. 이 중에서 첫번째 소분획 1.8 g을 동일한 용매를 이용하여 Lobar column A로 정제하였으며, 백색의 고체물질(2) 70 mg을 얻었다.

두번째 소분획 1.4 g을 동일한 전개용매에서 Lobar column A로 정제하며 백색의 결정 28 mg(3)을 얻었다.

화합물(2) ; mp 130~132°; IR ν^{KBr} cm⁻¹: 3445 (OH), 2937, 2906, 1456, 1381, 1055, 958

¹H-NMR(CDCl₃, TMS) δ : 5.35(1H, d, J=5 Hz), 5.10(1H, m), 3.50(1H, m), 2.25(2H, m), 2.00(2H, m), 2.00(2H, m), 1.80(2H, m), 1.05(3H, s) 0.6~0.9(12H, m)
MS, m/z(rel. int.):

Peak a (R_t: 1.11) 400(M⁺, 100), 385(25), 382(35), 367(25), 315(42), 289(26), 273(16), 255(16), 231(14), 229(10), 213(30), 199(12).

Peak b(R_t:1.23) 412(M⁺, 100), 397(9), 394(6), 379(11), 369(12), 351(22), 314(10), 301(12), 300(38), 299(12), 285(10), 273(15), 272(31), 271(55), 255(60), 253(11), 213(30), 199(17).

Peak c(R_t: 1.40) 414(M⁺, 100), 399(30), 397(12), 396(37), 381(22), 329(38), 303(30), 273(21), 255(24), 231(19), 213(38), 199(15).

화합물(3) ; mp 91~93°; IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 2962, 2150(C=C), 1732(C=O), 1651(C=C), 1197, 1095, 1022(C-O), 895, 800.

¹H-NMR(CDCl₃, TMS) δ : 5.17(1H, br.s, H-9), 4.85(1H, m, H-2), 4.30(1H, d, J=2.5 Hz, H-7), 3.95(1H, m, H-1 α), 3.81(1H, d, J=2.5 Hz, H-6), 3.65(1H, t, J=10.5 Hz, H-1 β), 2.15(2H, d, J=7 Hz, H-2'), 2.05(1H, m, H-3'), 2.00(3H, s, H-14) 1.80(4H, m, H-3,4), 0.90(6H, d, J=7 Hz, H-4', 5')

¹³C-NMR(CDCl₃, TMS) δ : 172.1(C-1'), 162.9(C-8), 104.5(C-5), 86.0(C-9), 79.9(C-10,12), 69.9(C-11,13), 66.1(C-7), 64.9(C-1), 58.3(C-2), 52.2(C-6), 43.2(C-2'), 29.3(C-4), 25.6(C-3), 23.8(C-3'), 22.2(C-4', 5'), 4.5(C-14)
MS, m/z(rel. int): (R_t: 1.50) 330(M⁺, 14), 229(10), 228(47), 227(12), 200(10), 124(100), 106(13), 104(11)

분획III의 정제—분획III 37g을 hexane : ethyl acetate(2 : 1)의 혼합 용매에 가온 용해한 후 상온에서 하루정도 방치하여 형성된 침전물 4.0g을 동일용매에서 Lobar column A로 반복하여 정제하여 미백색의 고체물질 2.2g을 얻었다.

화합물(4) ; mp 120~122°; IR ν^{KBr} cm⁻¹: 3082, 3020, 1707(C-O), 1614(C=C), 1124(C-O), 829.

¹H-NMR(CDCl₃, TMS) δ : 7.60(1H, b, J=9.5 Hz, H-4), 7.32(1H, d, J=8.5 Hz, H-5), 6.78(1H, dd, J=8.5, 2.3 Hz, H-6), 6.70(1H, d, J=2.3 Hz, H-8), 6.20(1H, d, J=9.5 Hz, H-3), 3.85(3H, s, CH₃)

¹³C-NMR(CDCl₃, TMS) δ : 162.6(C-7), 161.0(C-2), 155.7(C-9), 143.3(C-4), 128.6(C-5), 112.8(C-6), 112.4(C-3,

C-10), 100.7(C-8), 55.6(C-11)

MS, m/z(rel. int): (R_T: 6.38) 176(M⁺, 92), 148(74), 133(100), 105(12), 89(12), 77(32)

흰쥐의 간세포 배양—간세포는 몸무게 150~200g 되는 웅성 흰쥐로부터 Berry의 방법을 약간 수정한 방법⁴⁾으로 분리하여 5×10⁶ cell/ml을 배양용기(Falcan, 15×24 mm)에 이식하였다. 배양액은 Waymouth's MB 751/1 medium, 10% fetal calf serum, 2.0 mg/ml bovine serum albumin(fraction V), 10⁻⁶ M dexamethasone, 10⁻⁷ M insulin, 5.32×10⁻² M L-serine, 4.09×10⁻² M L-alanine, 2.67×10⁻² M NaHCO₃, 10,000 IU/100 ml penicillin, 10,000 IU/100 ml streptomycin과 500 µg/100 ml amphotericin B로 구성된 배양액을 사용하였다.

Galactosamine(GalN)에 의해 유도된 간 독성의 측정—간세포를 1.5시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 1.5 mM GalN과 물질 1, 3, 4를 각각 함유한 배양액으로 갈아준 다음 간세포를 배양한지 48시간 후에 그 배양액을 채취하여 glutamic pyruvic transaminase(GPT)의 활성을 Reitman Frankel의 방법⁵⁾을 이용하여 측정하였다.

실험결과 및 고찰

화합물 1은 GC/MS에서 분자량이 306이며, ¹H-, ¹³C-NMR spectrum으로부터 분자식이 C₂₀H₃₄O₂이고 불포화도수는 4임을 알 수 있다. IR-spectrum의 1738 cm⁻¹로부터 ester물질임을 알 수 있으며, ¹³C-NMR의 173.8 ppm에서 에스테르 탄소를 볼 수 있다.

¹H-NMR의 olefin proton 영역에는 6.32(m)ppm의 6H뿐이며, ¹³C-NMR의 olefin 영역에는 에스테르탄소를 제외하고 5개의 피이크가 나타났다. 그러나 UV에는 흡수 band가 없으므로 이상의 자료로부터 화합물 1은 고립된 3개의 이중결합들이 연결된 직쇄 에스테르 화합물임을 예측할 수 있다.

¹H-NMR의 4.10(q)ppm의 methylene과 1.20(t)ppm의 methyl group은 ethyl ester물질임을 나타내주며, 2.80(br.t)ppm의 4H, 2.28(t) 및 2.05(m) 등은 화학적 이동에 근거하며 이중결합이 인접하여 있는 methylene group들임을 알 수 있다.

이상의 자료를 종합하여 화합물 1은 불포화지방산 에칠 에스테르인 α-linolenic acid ethylester로 동정할

수 있다. 그러나 화합물 1이 에칠 에스테르로 분리된 것은 추출과정중에 추출 용매인 에탄올과 α-linolenic acid가 에스테르화반응이 일어나서 형성된 artefact일 가능성도 있다. 화합물 1의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 자료를 문헌 값과 비교한 결과 매우 잘 일치하였으며,⁶⁾ 따라서 화합물 1을 α-linolenic acid ethylester로 확정하였다.

화합물 2는 GC/MS로 분석한 결과 3개의 피이크가 나타났으며 이들 각 피이크의 molecular ion peak는 피이크 a(R_T=1.13)가 m/z 400에서, 피이크 b(R_T=1.23)가 m/z 412에서, peak C(R_T=1.40)는 m/z 415에서 base peak로서 나타났다.

각각의 피이크의 분열양상이 campesterol, stigmasterol 및 β-sitosterol의 분열 형태와 일치하며⁷⁾ 따라서 화합물 2는 상기 3종의 물질이 GC/MS로 분석한 자료에 의해서 각각 9.2%, 36.5% 및 54.2%의 비로 존재하는 스테롤의 혼합물로 확인하였다.

화합물 3은 백색의 판상 결정성 물질로서 상온에서 하루정도 방치하면 미황색의 액체로 쉽게 변하는 불안정한 물질이었다. MS spectrum에서 분자량은 330이었으며, NMR자료를 종합하여 분자식은 C₁₉H₂₂O₅임을 알 수 있다.

IR-spectrum의 2150 cm⁻¹(w) band와 ¹³C-NMR spectrum의 4.5 ppm 피이크로부터 이물질이 acetylene화합물임을 알 수 있다.

¹H-NMR-spectrum에서 0.90 ppm(d, J=7 Hz), 2.05 ppm(m) 및 2.15 ppm(d, J=7 Hz)과 MS spectrum에서 m/z 228(M⁺-102)peak와 또한 IR-spectrum의 1732 cm⁻¹(s)로부터 isovalerylester임을 예상할 수 있다.

¹H-NMR-spectrum의 4.30 ppm(d, J=2.5 Hz)의 수소와 3.81 ppm(d, J=2.5 Hz)의 수소는 서로 AB-system을 형성하며, 화학적이동으로부터 산소에 연결되어 있음을 예측할 수 있다. 이상의 자료를 종합하여 보면 화합물 3은 *Artemisia selengensis*²⁾ 및 *Artemisia douglasiana*⁸⁾에서 분리된 spiroketalenol ether epoxide모핵을 갖는 acetylene의 isovalerate임을 알 수 있다. 따라서 화합물 3은 C₁₉-acetylene isovalerate로 확정하였으며, 이 구조는 *A. douglasiana*에서 분리 보고된 물질의 ¹H-NMR자료⁸⁾와 잘 일치하고 있다.

그러나 상기 자료에서는 무색의 gum으로 분리하였으나 본 연구에서는 결정으로 분리되었으며, ¹³C-

Table I—Effects of compounds 1, 3 and 4 on the galactosamineinduced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes

substance	concentration (μg/ml)	Relative GPT value (%)
Control (GalN(-))	0	100 ^{a)} ± 5 ^(c)
Control (GalN(+))	0	0 ^{b)} ± 5 ^(c)
<u>1</u>	50	57 ± 6*
<u>3</u>	50	66 ± 9**
<u>4</u>	50	36 ± 2

Control GPT values: a) 28.3 ± 1.52 IU/L b) 84.0 ± 4.00 IU/L c) mean ± standard deviation.

Significantly different with respect to control: *p < 0.05, **p < 0.01.

Table II—Effects of compounds 1, 3 and 4 on the CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes

substance	concentration (μg/ml)	Relative GPT value (%)
Control (CCl ₄ (-))	0	100 ^{a)} ± 3 ^(c)
Control (CCl ₄ (+))	0	0 ^{b)} ± 3 ^(c)
<u>1</u>	50	68 ± 4**
<u>3</u>	50	81 ± 8**
<u>4</u>	50	28 ± 4

Control GPT values: a) 28.3 ± 1.52 IU/L b) 125.0 ± 12.00 IU/L c) mean ± standard deviation.

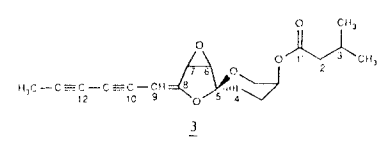
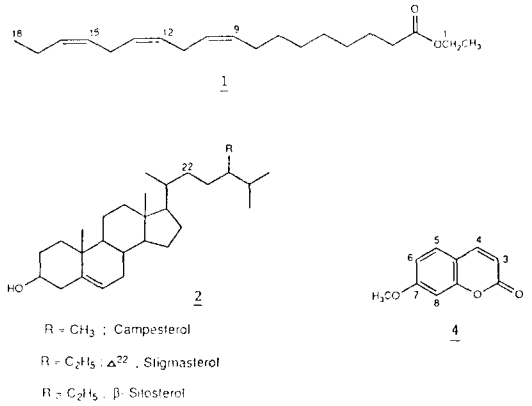
Significantly different with respect to control: *p < 0.05, **p < 0.01.

NMR의 자료는 문헌³⁾과 잘 일치하고 있다. 따라서 본 연구에서는 더욱 순수히 분리되어 결정화된 것으로 사료된다.

화합물 1은 MS에서 분자량이 176이며, IR, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum으로부터 분자식이 C₁₀H₈O₃임을 알 수 있다.

¹H-NMR-spectrum의 3.8(s) ppm에 나타나는 methoxyl기 이외에는 모두 olefin proton들이며, IR스펙트럼의 1707 cm⁻¹는 카르보닐 피이크로 추측된다.

¹H-NMR-spectrum에서 6.20 ppm(d, J=9.5 Hz)의 수소는 7.60 ppm(d, J=9.5 Hz)의 수소와 AB-system을 이루며, 6.78 ppm은 다시 6.70 ppm(d, J=2.3 Hz)의 수소와 W-coupling을 하고 있다. 이상의 자료로부터 화합물 4는 7번에 methoxyl기가 치환된 coumarin 유도체로 예측된다. 즉 화합물 4를 herniarin으로 추정



하였으며, ¹H-, ¹³C-NMR 및 mp 등이 문헌⁹⁾과 잘 일치함을 볼 수 있다.

이들 성분이 간에 어떻게 작용하는가를 일차 배양한 흰쥐의 간세포를 이용하여 알아보았다. 즉 galactosamine이나 CCl₄로 인위적으로 병변을 일으킨 간세포에 이들 성분을 각각 50 μg/ml씩 투여하여 정상 간세포에 대하여 상해를 입은 세포가 회복하는 정도를 측정하였다(Table I, II). 물질 1, 3 및 4 모두 간세포에 대하여 유의성 있는 보호작용을 나타내었다.

감사의 말씀

이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국 학술진흥재단의 자유 공모과제 학술 연구조성비에 의하여 연구되었음.

문헌

- 1) 김재길 : 원색 천연 약물 대사전, 남산당, p. 62 (1984).
- 2) 이선주 : Korean Folk medicine, 서울대학교 출판부, p. 142 (1966).
- 3) Birmecker, W., Wallnöfer, B., Hofer, O. and Greger, H.: Relative and absolute configuration of two naturally occurring acetylenic spiroketal enol ether epoxides. *Tetrahedron* **44**, 267 (1988).

- 4) Berry, M. N. and Friend, D. S.: High-Yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Pathol.* **43**, 506 (1969).
- 5) Reitman, S. and Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Path.* **28**, 56 (1957).
- 6) Batchelor, J. G., Cushley, R. J. and Prestegark, J. H.: Carbon-13 Fourier Transformation Nuclear Magnetic Resonance, VIII. Role of steric and Electric Field Effects in fatty acid spectra. *J. Org. Chem.* **39**, 1698 (1974).
- 7) Garg, V. K. and Nes, W. R.: Codisterol and other Sterols in the seeds of *Cucurbita maxima*. *Phytochem.* **23**, 2925 (1984).
- 8) Bohlann, F., Ates, N., Jakupovic, J., King, R. M. and Robinson, H.: Types of sesquiterpenes from *Artemisia douglasiana*. *Phytochem.* **21**, 2691 (1982).
- 9) Matsueda, S., Magaki, M. and Koveeda, M.: Studies on Sesquiterpene lactones XI: Chemical constitution of *Artemisia feddei*. *Yakugaku Zasshi* **100**, 615 (1980).