

삿갓나물 지상부의 식물화학적 성분 연구

이규하 · 김기현 · 이일균 · 최상운¹ · 이강노*

성균관대학교 약학대학 천연물 약품화학 연구실, ¹화학연구소

Phytochemical Constituents from the Aerial Parts of *Paris verticillata*

Kyu Ha Lee, Ki Hyun Kim, Il Kyun Lee, Sang Un Choi¹ and Kang Ro Lee*

Natural Products Laboratory, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746,

¹Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea

Abstract – Column chromatographic separation of the MeOH extract from the aerial parts of *Paris verticillata* led to the isolation of three phenolics, two terpene glucosides and two pyrrolidine alkaloids. Their structures were characterized to be methyl caffeate (**1**), 5-hydroxy pyrrolidin-2-one (**2**), vanillic acid (**3**), benzyl alcohol glucopyranoside (**4**), (6S, 9R)-roseoside (**5**), staphylionoside H (**6**) and 5-methoxy pyrrolidin-2-one (**7**) by spectroscopic means. The isolated compounds (**1-7**) were for the first time reported from this source. The isolated compounds were tested for their cytotoxicity against four human tumor cell lines by SRB method *in vitro*.

Key word – Liliaceae, *Paris verticillata*, Pyrrolidine alkaloid, phenolic comopound

삿갓나물은 (*Paris verticillata* BIEB.)는 한국, 중국, 일본 등 동북아시아 지방의 산지에 널리 분포하는 백합과 (Liliaceae)의 다년초이다.¹⁾ 삿갓나물의 뿌리를 조휴 (蚤休) 라고 하며, 한방에서는 진해, 천식, 만성기관지염에 사용하며, 어린순을 식용으로 사용하지만 유독식물로 분류하고 있다.²⁾ 조휴에서는 saponin, flavonoid 및 phenolic amide 등이 분리 보고 되었다.³⁻⁵⁾ 본 실험실에서는 국내 자생 식물에 대한 체계적인 성분 연구를 수행하고 있으며^{6,7)}, 본 연구에서는 삿갓나물 지상부의 성분을 연구하였다. 즉, 삿갓나물 지상부를 음건 세절하여 MeOH 로 추출후 그 엑스로 부터 컬럼 크로마토그래피 방법으로 7종의 성분을 분리하여, 그 구조를 규명하였다. 분리한 7종의 물질에 대하여 SRB assay를 통한 4종의 암 세포주에 대한 세포독성을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용된 삿갓나물 지상부 (*P. verticillata* BIEB.)는 2002년 8월경 오대산에서 채집한 것으로, 성균관대학교 약학대학 표본실 (SKKU-2002-05) 에 표본을 보관하고 있다.

기기 및 시약 – 비선광도는 JASCO P-1020 를 이용하였으며, ¹H 및 ¹³C – NMR은 성균관대학교 공동기기원에 있는 Varian UNITY INOVA 500 를 이용하였다. 물질의 분자량 측정은 EI-MS 방식을 이용하는 JEOL SX102 mass spectrometer (JEOL Ltd, Japan) 및 FAB-MS 방식을 이용하는 JEOL 700 mass spectrometer (JEOL Ltd, Japan) 기기를 한국기초과학지원연구원 서울센터에 의뢰하였다. 컬럼 크로마토그래피에 사용된 고정상은 silica gel 60 (Merck, 70 ~ 230 mesh and 230 ~ 400 mesh), RP-18 (Merck) 및 Sephadex LH-20 (Pharmacia) 이었으며, 박층 크로마토그래피 측정은 Merck사에서 생산하는 pre-coated Silica gel F₂₅₄ plates 와 RP-18 F_{254s} plates를 사용하였다.

추출 및 분리 – 반건조 중량 약 2.5 kg의 삿갓나물 지상부를 상온에서 메탄올로 추출하여 추출물 250 g을 얻었다. 메탄올 추출물 (250 g)을 물 1.6 L 에 현탁시킨후, 순차적 용매 분획을 통하여 n-hexane 분획물 (80 g), methylene chloride 분획물 (6.0 g), ethyl acetate 분획물 (6.5 g) 및 n-BuOH 분획물 (20 g) 을 각각 얻었다.

이중 ethyl acetate 분획물 (6.5 g)에 대하여 silica gel을 고정상으로 하고 chloroform : MeOH (5:1-2:1) 을 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피 방법을 이용하여 4개의 분획 (E1-E4) 으로 나누었으며, E2 분획 (2.2 g) 을 Sephadex LH-

*교신저자(E-mail): krllee@skku.ac.kr
(FAX): 82-31-290-7750

20 (100% MeOH)을 이용한 컬럼 크로마토그래피 방법으로 4개의 소분획 (E21 - E24)으로 나누었다. 소분획 E23 (550 mg)을 RP C-18 (30% MeOH) 컬럼 크로마토그래피를 수행한 후, HPLC (silica gel/chloroform : MeOH = 30:1 및 RP C-18/50% MeOH) 로 정제하여 미황색 물질 **1** (20 mg) 을 얻었다. 같은 방법으로 소분획 E22 (250 mg)을 실험하여 무색 oil 상 물질 **2** (5 mg) 를 얻었으며, 소분획 E24 (700 mg) 에서부터 무색 oil 상 물질 **3** (20 mg) 을 각각 얻었다. BuOH 분획물 (10 g)을 silica gel을 이용한 컬럼 크로마토그래피법 (chloroform: MeOH : H₂O = 10:5:1-0:1: 1) 을 이용하여 5개의 소분획 (B1-B5)으로 나누었다. 이후 B1 분획 (3.5 g)을 RP C-18 (25% MeOH) 을 이용한 컬럼크로마토그래피법으로 다시 5개의 소분획 (B11-B15) 으로 나누었다. B11 분획 (1.2 g)을 silica gel (chloroform : MeOH = 8:1) 과 Sephadex LH-20 (80% MeOH) 을 이용하여 분리한 후, HPLC (silica gel/chloroform:MeOH = 8:1) 를 이용하여 무색 oil 상 물질 **4** (4 mg), 무색 gum 상 물질 **5** (19 mg) 및 무색 gum 상 물질 **6** (14 mg)을 각각 얻었다. B12 분획 (0.5 g)을 HPLC (silica gel/chloroform : MeOH = 13:1) 로 정제하여 무색 oil 상 물질 **7** (40 mg)을 얻었다.

Compound 1 (methyl caffeate) – 미황색 분말 ; mp : 155-157 °C ; EI-MS : 195 [M+H]⁺ ; ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) : δ 7.55 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-7), 7.04 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-6), 6.79 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 6.26 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-8), 3.76 (3H, s, OMe) ; ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) : δ 168.60 (C-9), 148.40 (C-4), 145.76 (C-3), 145.64 (C-7), 126.56 (C-1), 121.75 (C-6), 115.35 (C-2), 114.00 (C-5), 113.71 (C-8), 50.81 (OMe)

Compound 2 (5-hydroxy pyrrolidin-2-one) – 무색 정유 ; [α]_D : -0.28 (c 0.8, MeOH) ; HREI-MS : 101.0472 [M]⁺ ; ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) : δ 5.27 (1H, dd, *J* = 6.5, 2.0 Hz, H-5), 2.52 (1H, m, H-3eq), 2.42 (1H, m, H-4ax), 2.23 (1H, m, H-3ax), 1.93 (1H, m, H-4eq) ; ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) : δ 179.66 (C-2), 79.76 (C-5), 30.10 (C-4), 28.17 (C-3)

Compound 3 (vanillic acid) – 무색 정유 ; FAB-MS : 191 [M+Na]⁺ ; ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) : δ 7.45 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6), 6.81 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 3.84 (3H, s, OMe) ; ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) : δ 167.72 (C-7), 150.53 (C-4), 145.01 (C-3), 122.48 (C-6), 121.46 (C-1), 116.28 (C-2), 114.70 (C-5), 51.08 (OMe)

Compound 4 (benzyl alcohol glucopyranoside) – 무색 정유 ; FAB-MS : 293 [M+Na]⁺ ; ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) : δ 7.43 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H-2, 6), 7.33 (2H,

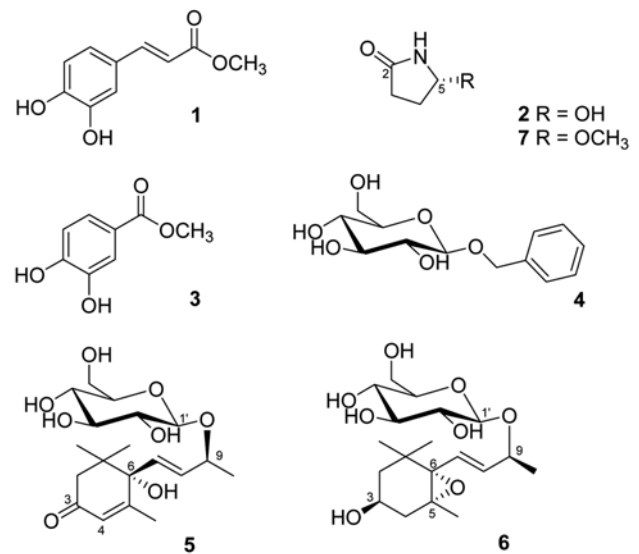


Fig. 1. The Structure of compounds 1~7 isolated from aerial parts of *Paris verticillata*.

t, *J* = 7.0 Hz, H-3, 5), 7.28 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-4), 4.94 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-7a), 4.68 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-7b), 4.35 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 3.90 (1H, dd, *J* = 12.0, 9.0 Hz, H-6'a), 3.70 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.5 Hz, H-6'b), 3.37 - 3.24 (4H, m, H-2', 3', 4', 5') ; ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) : δ 139.24 (C-4), 129.43 (C-1), 129.35 (2C-2, 6), 128.84 (2C-3, 5), 103.44 (C-1'), 78.27 (C-5'), 78.20 (C-3'), 75.30 (C-2'), 71.89 (C-7'), 71.86 (C-4'), 62.98 (C-6')

Compound 5 ((6S, 9R)-roseoside) – 무색 gum ; [α]_D : +97.08 (c 0.95, MeOH) ; FAB-MS : 409 [M+Na]⁺ ; ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) : δ 5.88 (2H, m, H-7, 8), 5.87 (1H, s, H-4), 4.44 (1H, m, H-9), 4.35 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 3.86 (1H, dd, *J* = 12.0, 1.5 Hz, H-6'a), 3.64 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, H-6'b), 3.36-3.24 (3H, m, H-3', 4', 5'), 3.18 (1H, dd, *J* = 9.5, 8.0 Hz, H-2'), 2.54 (1H, d, *J* = 17.0 Hz, H-2a), 2.16 (1H, d, *J* = 17.0 Hz, H-2b), 1.93 (3H, s, H-13), 1.30 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-10), 1.05 (6H, s, H-11, 12) ; ¹³C-NMR (CD₃OD, 125MHz) : δ 201.34 (C-3), 167.40 (C-5), 135.43 (C-8), 131.68 (C-7), 127.32 (C-4), 102.88 (C-1'), 80.14 (C-6), 78.25 (C-3'), 78.17 (C-5'), 77.42 (C-9), 75.39 (C-2'), 71.78 (C-4'), 62.97 (C-6'), 50.84 (C-2), 42.57 (C-1), 24.83 (C-11), 23.57 (C-12), 21.33 (C-10), 19.69 (C-13)

Compound 6 (staphylionoside H) – 무색 gum ; [α]_D : -142.69 (c 0.7, MeOH) ; FAB-MS : 411 [M+Na]⁺ ; ¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) : δ 5.98 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-7), 5.72 (1H, dd, *J* = 15.0, 6.5 Hz, H-8), 4.43 (1H, t

like m, $J=6.5$ Hz, H-9), 4.36 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1'), 3.82 (1H, dd, $J=12.0, 2.5$ Hz, H-6'a), 3.75 (1H, m, H-3), 3.70 (1H, dd, $J=12.0, 5.0$ Hz, H-6'b), 3.35–3.18 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 2.27 (1H, dd, $J=14.0, 5.0$ Hz, H-4a), 1.61 (1H, dd, $J=14.0, 9.5$ Hz, H-4b), 1.55 (1H, dd, $J=12.5, 3.5$ Hz, H-2a), 1.29 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-10), 1.24 (1H, dd, $J=12.5, 2.0$ Hz, H-2b), 1.20 (3H, s, H-13), 1.19 (3H, s, H-11), 0.98 (3H, s, H-12); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125MHz): δ 137.25 (C-8), 127.87 (C-7), 102.76 (C-1'), 78.24 (C-3'), 78.06 (C-5'), 77.05 (C-2'), 75.41 (C-9), 71.51 (C-4'), 71.30 (C-6), 68.17 (C-5), 64.68 (C-3), 62.69 (C-6), 48.10 (C-2), 41.72 (C-4), 36.08 (C-1), 30.25 (C-11), 25.27 (C-12), 21.11 (C-10), 20.35 (C-13)

Compound 7 (5-methoxy pyrrolidin-2-one) – 무색 정유; $[\alpha]_D^{25}$: +0.51 (c 0.1, MeOH); FAB-MS: 116 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500MHz): δ 4.91 (1H, dd, $J=6.0, 1.0$ Hz, H-5), 3.31 (3H, s, OMe), 2.45 (1H, m, H-3eq), 2.32 (1H, m, H-4ax), 2.20 (1H, m, H-3ax), 2.03 (1H, m, H-4eq); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125MHz): δ 180.40 (C-2), 87.64 (C-5), 53.68 (OMe), 28.19 (C-4), 27.65 (C-3)

세포독성실험 – 세포독성 실험은 Sulforhodamine-B Bioassay (SRB) 방법을 응용하여 한국화학연구소에서 수행하였다.⁸⁾ 실험에 사용된 암세포주는 A549 (non small cell lung carcinoma), SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), 및 HCT-15 (colon adenocarcinoma)을 사용하여 세포독성 실험을 진행하였다.

결과 및 고찰

삿갓나물의 지상부 MeOH엑스로 부터 컬럼 크로마토그라피 방법을 이용하여 총 7종의 물질을 분리 하였으며, 이들의 이화학적 데이터 및 분광학적 데이터를 이용하여, 구조 규명을 하였다. 분리된 성분 7종은 본 식물에서 처음으로 분리되었다. 다음은 비교적 특이한 성분인 2종의 pyrrolidine alkaloids (2, 7) 및 2종의 megastimane glycosides (5, 6) 성분의 구조 동정에 대하여 설명하고자 한다.

화합물 2는 무색 정유이며, *p*-anisaldehyde- H_2SO_4 발색시 약에 노란색으로 나타났다. HR FAB-MS (101.0471)로 부터 분자식 ($\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_1\text{O}_2$) 을 확인할 수 있었다. ^1H 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 [$^1\text{H-NMR}$: δ 5.27 (1H, dd, $J=6.5, 2.0$ Hz), $^{13}\text{C-NMR}$: δ 179.66, 79.76] 을 통하여 pyrrolidine ring 구조를 가지는 물질임을 유추할 수 있었다. 상기의 데이터들을 기초로 기존 문헌과 비교하여 화합물 2를 5-hydroxy-pyrrolidin-2-one 으로 결정할 수 있었다.⁹⁾

화합물 7 또한 화합물 2와 성상 및 *p*-anisaldehyde- H_2SO_4 발색 패턴이 같았지만, 분자량은 116 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 으로 차이를 나타내었다. 화합물 2의 OH 그룹이 methoxyl 그룹으로 치환되었음을 ^1H 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 [$^1\text{H-NMR}$: δ 3.31 (3H, s), $^{13}\text{C-NMR}$: δ 53.68]을 통하여 확인할 수 있었기에, 화합물 7을 기존 문헌과 비교하여 5-methoxy-pyrrolidine-2-one 으로 결정하였다.¹⁰⁾

화합물 5는 무색 gum 상으로 FAB-MS를 통하여 분자량을 409 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 로 확인할 수 있었으며, ^1H - 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 결과와 비교하여 분자식을 $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_8$ 으로 결정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼으로 부터 3개의 이중결합 수소 [δ 5.88 (2H, m) 및 5.87 (1H, s)] 과 4개의 methyl 그룹 [δ 1.93 (3H, s), 1.30 (3H, d, $J=6.5$ Hz) 및 1.05 (6H, s)] 을 확인할 수 있었다. 또한 δ 2.54 (1H, d, $J=17.0$ Hz) 과 2.16 (1H, d, $J=17.0$ Hz) 이 CH_2 에서 유발되었음을 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼으로부터 하나의 ketone [δ 201.34] 과 4개의 이중결합 탄소 [δ 167.40, 135.43, 131.68, 127.32] 및 7개의 oxygenated 탄소 [δ 80.14, 78.24, 78.17, 77.42, 75.39, 71.78 및 62.97]를 각각 확인할 수 있었다. ^1H - 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼으로부터 당의 anomeric signal [$^1\text{H-NMR}$: δ , 4.35 (1H, d, $J=8.0$ Hz), $^{13}\text{C-NMR}$: δ 102.88]을 각각 확인하여 1개의 β -glucose 가 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과들 및 기존 문헌의 비선광도를 비교하여 화합물 5를 (6S, 9R)-roseoside로 확인할 수 있었다.¹¹⁾

화합물 6 또한 무색 gum 상 물질로 FAB-MS 를 통하여 분자량을 411 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 로 확인하였으며, ^1H - 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 통하여 분자식을 $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_7$ 으로 확인할 수 있었다. ^1H - 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼이 화합물 5와 유사하지만, α, β unsaturated ketone 그룹 대신에, saturated hydroxyl 그룹이 추가되었으며, 두개의 oxygenated 탄소 [δ 64.68 및 62.69]가 epoxy ring을 형성함을 기존 문헌을 통해 확인할 수 있었다.^{12,13)} 이상의 결과를 바탕으로 기존 문헌의 비선광도 등을 비교한 결과 화합물 6을 staphylionoside H로 확인할 수 있었다.¹³⁾

그외 3종의 phenolic 물질들은 기존 문헌들과 비교하여 각각 methyl caffeate (1)¹⁴⁾, vanillic acid (3)¹⁵⁾ 및 benzyl alcohol glucopyranoside (4)¹⁶⁾로 확인할 수 있었다.

분리한 물질 7종은 모두 본 식물에서 처음으로 보고 하였으며, SRB assay를 통한 세포독성실험에서는 7종 모두 4종의 암세포주에 대하여 (A549, non small cell lung carcinoma; SK-OV-3, adenocarcinoma, ovary malignant ascite; SK-MEL-2, malignant melanoma, metastasis to skin of thigh; HCT-15, colon adenocarcinoma) 미약한 활성을 나타내었다 ($>30\mu\text{M}$).

사 사

본 연구에 사용된 기기중 NMR 은 성균관대학교 공동기기원 박성훈님의 도움을 받았으며, EI-MS 와 FAB-MS는 한국기초과학연구원 서울센터의 서정주 과 김상구 박사님의 도움을 받았기에 감사드립니다.

인용문헌

1. 이영노 (2006) 새로운 한국식물도감 II, 456. 교학사, 서울.
2. 안덕균 (1998) 원색한국본초도감, 107. 교학사, 서울.
3. Wang, Q., Xu, G., Shu, Y., Hattori, M. and Namba, T. (1988) Quantitative analysis of saponins in the chinese drug, Qiyeyizhuhua, by high performance liquid chromatography. *Shoyakugaku Zasshi*, **42**: 58-64.
4. Nakuno, K., Murakami, K., Nohara, T., Tominatsu, T. and Kawasaki, T. (1981) The constituents of *Paris verticillata* M.v. Bieb.. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**: 1445-1451.
5. Lee, K. H., Yang, M. C., Kim, K. H., Kwon, H. C., Choi, S. U. and Lee, K. R. (2008) A new amide from the roots of *Paris verticillata*. *Molecules*, **13**: 41-45.
6. Min, Y. D., Kwon, H. C., Yang, M. C., Lee, K. H., Choi, S. U. and Lee, K. R. (2007) Isolation of limonoids and alkaloids from *Phellodendron amurense* and their multidrug resistance (MDR) reversal activity. *Arch. Pharm. Res.*, **30**: 58-63.
7. Yang, M. C., Lee, K. H., Kim, K. H., Choi, S. U. and Lee, K. R. (2007) Lignan and terpene constituents from the aerial parts of *Saussurea pulchella*. *Arch. Pharm. Res.*, **30**: 1067-1074.
8. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMabon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat'l. Cancer Inst.*, **80**:1107-1112.
9. Kuhnt, M., Probstle, A., Rimpler, H., Bauer, R. and Heinrich, M. (1995) Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Med.*, **61**: 227-232.
10. Ma, G., Liu, H. and Zhang, W. (2007) Photochemistry of N-alkylsuccinimide in methanol and ethanol: an experimental and calculated investigation. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **187**: 377-383.
11. Yamano, Y. and Ito, M. (2005) Synthesis of optically active vomifoliol an roseoside stereoisomers. *Chem. Pharm. Bull.*, **53**: 541-546.
12. Harput, U. S., Saracoglu, I., Nagatsu, A. and Ogihara, Y. (2002) Iridoid glucosides from *Veronica hederifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**: 1106-1108.
13. Yu, Q., Matsunami, K., Otsuka, H. and Takeda, Y. (2005) Staphylionosides A-K: megastigmane glucosides from the leaves of *Staphylea bumalda* DC. *Chem. Pharm. Bull.*, **53**: 800-807.
14. He, Z. D. and Yang, C. R. (1991) Brandioside, a phenylpropanoid glycoside from *Brandisia hancei*. *Phytochemistry*, **30**: 701-702.
15. Miyazawa, M., Oshima, T., Koshio, K., Itsuzaki, Y. and Anzai, J. (2003) Tyrosinase inhibitor from black rice bran. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 6953-6956.
16. Seigler, D. S., Pauli, G. F., Nahrstedt, A. and Leen, R. (2002) Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry*, **60**: 873-882.

(2008년 4월 10일 접수)