

## *Rubus crataegifolius* 의 成分에 관한 研究\*

文昌奎·柳忠珪

서울대학교 藥學大學

(Received December 29, 1975)

Chang Kiu Moon and Choong Kiu Ryu (*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151*): Sterols and a Triterpenoid from *Rubus crataegifolius*

**Abstract**— $\beta$ -Sitosterol, stigmasterol, campesterol, cholestanol and a triterpenoid, ursolic acid were identified from the root of the *Rubus crataegifolius* BUNGE (Rosaceae).

산딸기나무 *Rubus crataegifolius* BUNGE (Rosaceae)<sup>1)</sup>는 國內에 自生하는 灌木으로 果實은 強壯, 健胃, 清涼, 止瀉, 補肝, 補腎, 補眼 및 盈胎機轉에 關聯되는 것으로 考證되어 있는 覆盆子(*Rubus coreanum* MIQUEL)代用으로 使用되어 왔으며 산딸기나무의 根部는 民間에서 避妊에 關聯이 있는 것으로 傳來되고 있다.

著者等은 別途의 基礎實驗을 通해 산딸기나무 根部의 總 alcohol extract 를 albino rat 에 經口投與하여 產子數의 減少現象을 觀察하고 避妊機轉에 關聯될 것으로 推定하여 아직 文獻上에 發表된바 없는 本植物의 有效成分 追跡의 一環으로 系統的인 成分研究에 着手하였다. 本報에서는 于先 sterol 分割 및 triterpenoid 分割에서 얻은 知見을 報告한다.

**Sterol**—試料의 Et<sub>2</sub>O 可溶分割의 不鹼化合物로부터 preparative TLC<sup>13)</sup>에 依해 Liebermann-Buchard 反應陽性(赤→靑→綠)인 sterol 混合物, mp 135°를 分離하였다. IR spectrum 에서 3390 cm<sup>-1</sup>(-OH), 810~840cm<sup>-1</sup>(trisubstituted double bond)의 吸收帶를 나타내는 이 物質은 GLC 에 依해 標品과 比較하여  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol 및 cholestanol 의 混合物임을 推定하고 MS spectrum 으로부터  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol 및 cholestanol 의 Mol.-peak 에 해당하는 m/e; 414, 412, 400 및 388이 우선 確認되고 m/e 273 (M-side chain), m/e 213 (M-side chain-H<sub>2</sub>O), m/e 213 (M-side chain-42-H<sub>2</sub>O) 등의 stigmastane skeleton<sup>2)</sup>의 特徵的인 fragment 와 m/e 388(M<sup>+</sup>), m/e 370(M-H<sub>2</sub>O), m/e 275(M-side chain)等 飽和 sterol 母核의 典型的인 fragment 가 同時에 觀察됨으로써 stigmastane 母核과 飽和母核을 갖인 sterol 의 混合物로 推定할 수 있고  $\Delta^5$ -sterol<sup>3,4)</sup>인  $\beta$ -sitosterol 과 campesterol 은 m/e 414, 396, 303 과 m/e 400, 382, 289 等에 依해 그 存在가 確定되고 m/e 412, 394, 369, 301等에 依해

\* 本 研究費의 一部는 產學協同財團의 研究費로 充當하였음.

$\Delta^{5,22}$  sterol 인 stigmasterol 이 m/e 388, 370, 275 등에 의해 cholestanol 의 존재가 確認되었다.

以上 GLC 및 MS 에 의한 所見이 一致함으로 이 sterol 分割은  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol 및 cholestanol 의 混合物로 確認되었다.

**Triterpenoid**—Ether extract 로부터 triterpenoid  $M^+456$ ,  $C_{30}H_{48}O_3$ , mp 256~258°,  $[\alpha]_D^{25} = +69^\circ$  (C=0.6 EtOH) 를 分離하였다. 이 化合物은 Liebermann-Buchard 反應陽性(紅→紫→靑)으로 triterpenoid 系化合物임을 示唆한다. Zimmermann test 는<sup>5)</sup> 陰性임으로 3番炭素位の ketone 基는 存在하지 않으며 IR spectrum 에서 3410  $cm^{-1}$  (OH), 1690  $cm^{-1}$  (C=O), 2600  $cm^{-1}$  (COOH), 810~830  $cm^{-1}$  (OH) 및 1020~1040  $cm^{-1}$  의 吸收 peak<sup>6)</sup> 가 觀察된다. UV spectrum 에서는 203 nm 에서 吸收極大를 나타냄으로써 二重結合의 存在가 認知된다.

$Ac_2O$ -pyridine 으로 acetylation 하여 얻은 acetate 의 mp 는 276°이고  $CH_2N_2$  으로 合成한 methylester 은 10% KOH 溶液으로 加水分解되지 않고 元物質은  $Br_2$ -HAc 에 의해 Br- $\gamma$ -lactone 을 生成함으로 COOH 基는 17番 炭素上에 存在하고 있음을 示唆한다<sup>7)</sup>.

이 物質의 acetate 와 methylester 을 各各 methylation, acetylation 했을때 同一한 methylester acetate mp 232~235°를 얻었다. Methylester acetate 의 IR spectrum 에서는 OH 基가 觀察되지 않으며 methylester 을  $CrO_3$ -pyridine 으로 酸化하여 얻은 ketonic-methylester mp 180° 은 Zimmermann 反應 陽性으로 3番炭素上에  $\beta$ -OH 가 存在함을 立證해주고 있다.

MS spectrum 에서는 molecular-peak 가 m/e 456( $C_{30}H_{48}O_3$ )에서 觀察되고 ursan-12-ene 또는 olean-12-ene<sup>8,9)</sup> 系 化合物群의 典型的인 Retro Diels-Alder fragmentation 에 의해 生成된 m/e 248, 207 fragment 가 觀察되고 m/e 248에서 carboxyl 基가 脫離된 m/e 203과 m/e 207에서  $H_2O$  가 脫離된 m/e 189 등이 確認되었다. Methylester acetate 에 있어서도 m/e 207, m/e 262, m/e 203, m/e 189 등의 peak 가 觀測되어 이 物質이 ursolic acid 임을 뒷받침하고 있다. Methylester 의 NMR spectrum 에서는 5個의 methyl signal, 即 26- $CH_3$ , 24- $CH_3$ , 25- $CH_3$ , 23- $CH_3$  및 27- $CH_3$ 의 singlet 가  $\delta$  0.75, 0.78, 0.95, 0.99, 1.07 ppm 에서 認知되고 29- $CH_3$ , 30- $CH_3$  는 multiplet 로 perturbation 되어 他 peak 속에 묻혀있고<sup>10,11)</sup>  $\delta$  3.61에서 methoxyl 基와  $\delta$  5.25에 (1H,  $H^>C=C<$ ) 가 觀察된다.  $\delta$  2.24(1H)는 3番炭素位の 水素에 의한 signal 로  $\omega \frac{1}{2}$ , 約 19 Hz 임으로 3番炭素位の 水素는 axial 即 3  $\beta$ -OH 임<sup>12)</sup>을 알 수 있다.

Dehydration 後  $\delta$  2.07의 signal 이 消失됨으로써 hydroxyl 基의 存在를 確認할 수 있다. Methylester acetate 의 NMR spectrum 에서  $\delta$  2.04에 acetyl 基  $\delta$  3.6에서 methoxyl 基가 觀察되고 acetylation 에 의해 paramagnetic shift 한 3番炭素위의 水素 signal 이  $\delta$  4.5(triplet like)에서 觀察된다. 以上과 같은 理化學的 性質에 의해 이 物質은 ursolic acid 임을 確認하였다.

## 實 驗

GLC chromatogram 은 Shimadzu Model GC (FID)를 使用하고  $CHCl_3$  溶液으로 測定하였다. IR spectrum 은 KBr-disk method로 Beckman Spectrophotometer IR-4를 使用하여 測定하였고. NMR spectrum 은  $CDCl_3$  중에서 TMS 를 標準物質로 하여 Varian HA-100MHz 로 測定하였다.

**試料의 抽出**—陰乾한 試料의 地下部 約 4 kg 을 粗末로 한후 petroleum ether 20 l 씩으로 2回 抽出하고 濃縮하여 petroleum ether extract 를 얻고 脫脂된 試料를 20 l methanol 로 熱湯으로 抽出하여 濃縮해서 methanol extract 500 g 을 얻었다. Methanol extract 에 約 6倍容량의 蒸溜水를 加해 水可溶分을 除去한 殘渣를 ether 로 抽出하여 ether extract 를 얻었다.

Petroleum ether extract 와 ether extract 를 各各 silicagel G 를 擔體로 TLC (benzene : acetone=5 : 1)를 施行한 결과 Rf 0.80에서 sterols, Rf 0.38에서 triterpenoid 性 物質을 檢出하였다.

**Preparative TLC에 의한 sterols의分離 및 精製**—Petroleum ether extract 혹은 ether extract 5 g을 5% alcohol 性 KOH 50 ml로 水浴上에서 2時間 鹼化하여 얻은 不鹼化物로부터 transparent identification technique에 의한 preparative TLC<sup>13)</sup> (hexane: ether=1 : 1, silica gel G)로 sterols을 分離하고 MeOH로 반복 再結晶하여 無色の 結晶을 얻었다. mp 135°, IR 3390 cm<sup>-1</sup>(OH), 825 cm<sup>-1</sup>. MS (m/e) 414( $\beta$ -sitosterol), 412(stigmasterol), 400(campesterol), 300(cholestanol).

**Sterols의 GLC**—OV-1, chromosorb W (60~80 mesh); 2 m×3 mm glass column; column temp., 240°; carrier gas, N<sub>2</sub>(40 ml/min); detector, FID. 250° t<sub>R</sub>;  $\beta$ -sitosterol, 28.2 min.; stigmasterol, 25.0 min; campesterol, 23.3 min; cholestanol, 14.6 min.

**Triterpenoid의 分離 및 精製**—Ether extract 10 g을 silicagel column (silicagel 60, 300 g, 3.5×100 cm)를 使用하여 CHCl<sub>3</sub>: EtOAc(10 : 1→5 : 1)溶媒 system의 gradient elution method로 分離하였다. M<sup>+</sup>456(C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>), mp 256~258°, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>=+69°(c=0.6 EtOH)이며 Lieberman-Buchard 反應 陽性, Zimmerman 反應 陰性이다.

IR 3410 cm<sup>-1</sup>(OH), 1690 cm<sup>-1</sup>(COOH), 2600 cm<sup>-1</sup>(COOH), 1020~1040 cm<sup>-1</sup>(ursane), 810~840 cm<sup>-1</sup>(trisubstituted double bond). UV  $\lambda_{max}^{EtOH}$  nm 203(log  $\epsilon$  3.6). MS (m/e) 456(t), 248(100%), 207(39%), 189(36%), 133(73%).

**Triterpenoid의 methylester 合成**—Triterpenoid ether 溶液에 ethereal diazomethane 으로 methylation 한후 hexane: benzene(1 : 1)로 再結晶하여 mp 110~112°인 結晶을 얻었다. 이 物質은 10% methanolic KOH로 8時間 saponification 해도 加水 分解받지 않았다.

IR 3360 cm<sup>-1</sup>(OH), 1710 cm<sup>-1</sup>(C=O), 1270 cm<sup>-1</sup>(ester). NMR  $\delta$  5.25(-CH=C< triplet like),  $\delta$  3.61(s, 3H methoxyl),  $\delta$  0.75(3H),  $\delta$  0.78(3H),  $\delta$  0.95(3H),  $\delta$  0.99(3H)  $\delta$  1.07(3H).

Found: C, 81.5; H, 11.2, Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>: C, 79.08; H, 10.71.

**Ketonic methylester 合成**—Methylester 을 Sarrett reagent<sup>14)</sup>로 酸化하여 常法에 依해 처리한후 GLC로 分離 MeOH로 精製하여 mp 176~178°인 ketonic methylester을 얻었다. 이 물질은 Zimmerman 反應 陽性이었다.

**Triterpenoid의 acetate 合成**—Triterpenoid를 pyridine에 용해한후 無水酢酸 : pyridine 용액으로 acetylation하여 多量의 alcohol을 加하고 減壓濃縮하였다. 殘渣를 MeOH로 再結晶하여 mp 271~272°인 物質을 얻었다. IR 3300 cm<sup>-1</sup>(OH), 1710 cm<sup>-1</sup>(C=O), 1270 cm<sup>-1</sup>(ester), NMR  $\delta$  2.0 ppm(s, 3H acetyl),  $\delta$  4.3 ppm(s, 1H triplet like).

**Triterpenoid의 methylester acetate 合成**—上記 methylester과 acetate를 各各 methylation, acetylation하여 얻은 methylester acetate는 同一 하였고 mp 231~234°이었다. IR 1730cm<sup>-1</sup>(C=O), 1240 cm<sup>-1</sup>(ester). NMR  $\delta$  2.0 ppm(s, 3H acetyl),  $\delta$  3.6 ppm(s, 3H), MS (m/e) 511(t), 262(90%), 249(33%) 203(100%) 189(46%), 133(73%).

**Bromo- $\gamma$ -lactone 合成**—Triterpenoid 30 mg과 NaOAc 300 mg을 混合한 後 HOAc 10 ml를 加하여 溶解시키고 3% brom 초산액 2 ml을 滴加한다. 1時間 放置한 後 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1 g을 蒸溜水 50 ml로 溶解시킨 溶液에 徐徐히 加하여 反應을 停止시킨다. 生成된 白色沈澱을 濾過 精

製하였다. IR  $1780\text{ cm}^{-1}$ ( $\gamma$ -lactone).

## 文 獻

1. 鄭台鉉, 韓國植物圖鑑 上, 1972, 教育社, p-183.
2. J.W. Clark and L. I. Dainis, *Aust. J. Chem.*, **20**, 1961 (1967).
3. B.A. Knights, *J. Gas Chromat.*, **5**, 273 (1967).
4. F.F. Knapp, H.J. Nicholas, *Phytochemistry*, **8**, 207 (1969).
5. R.Z. Zimmermann, *Physiol.*, **300**, 141 (1951).
6. K. Nakanishi, *Infrared Absorption Spectroscopy*, Nankodo Company Ltd., Tokyo, 1962.
7. C. Djerassi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2901 (1957).
8. C. Djerassi, M. Budzikiewicz, and J.M. Wilson, *Tetrahedron Letters*, 1962, 263.
9. *Ibid.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3688 (1963).
10. J. Karliner and C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, **31**, 1945 (1966).
11. H.T. Cheung and D.G. Williams, *Tetrahedron*, **25**, 119 (1969).
12. M. Shamma *et al.*, *J. Org. Chem.*, **27**, 4512 (1962).
13. A. Seher *et al.*, *Fette, Seifen Anstrichmittel*, **73**, 557 (1971).
14. G.I. Poos, G.E. Arth, and L.H. Sarett, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 422 (1953).