

Hydrocotyle japonica의 약효성분에 관한 연구(I)

조 의 환 · 김 일 혁

중앙대학교 약학대학

(Received June 24, 1988)

Studies on the Pharmaco-Constituents of *Hydrocotyle japonica* (I)

Eui Hwan Cho and Il Hyuk Kim

College of Pharmacy, Chung Ang University, Seoul, Korea

Abstract—For the investigation of medicinal resources in *Hydrocotyle* species, the studies were conducted to evaluate the pharmaco-constituents in *Hydrocotyle japonica* MAKINO (Umbelliferae), which is used as folk medicine in Korea. From the methyl alcohol extract of the whole plant, isorhamnetin-3-O- β -D-galactoside (C₂₂H₂₂O₁₂·1/3H₂O, bright yellow needle crystal, mp 247~248°C, $[\alpha]_D^{25} = -52.27^\circ$ in pyridine), one of three flavonol substances in extrat, was isolated and identified by physicochemical properties and spectroscopic evidences (UV, IR, NMR and MS etc.,) in comparison with authentic sample. This flavonoid was appeared from *Hydrocotyle japonica* MAKINO through phytochemical approaches at the outset.

제주피막이 *Hydrocotyle japonica* MAKINO는 제주도의 나무그늘에서 자라는 다년초로서 전체가 녹색이며 원줄기가 지상으로 뻗으면서 마디에서 뿌리가 내리고 가지끝이 굽으며 땅속에서 월동하고 가지가 서지 않는다. 잎은 호생하고 원형이며 지름 5~20mm로서 5~7개로 중앙까지 갈라지며 가장자리에 톱니가 있고 엽병은 길이 7~20mm이며 낙엽은 지름 1.2mm정도로 얇은 막질이다. 꽃은 6~9월에 피고 백색이며 액생하는 화경끝에 달리고 화경은 엽병과 길이가 거의 비슷하며 소화경이 없다.

꽃잎은 5개이고 난형이며 수술도 5개로서 짧고 자방은 하위이며 녹색이다. 열매는 극히 짧은 대가 있고 편구형이며 2~4개씩 달리지만 때로는 10개까지 달리는 것도 있다. 가을철이 되면 가지끝이 땅속으로 들어가서 굽어지고 다른부분은 말라 죽는다.¹⁾

제주도 전역에는 제주피막이 *Hydrocotyle japonica* MAKINO 외에도 피막이풀 *Hydrocotyle sibthorpioides* LAMARCK, 선피막이 *Hydrocotyle maritima* HONDA 및 병풀 *Hydrocotyle asiatica* (L.) URBAIN 등 3종이 야생하고 있다.^{2,3)}

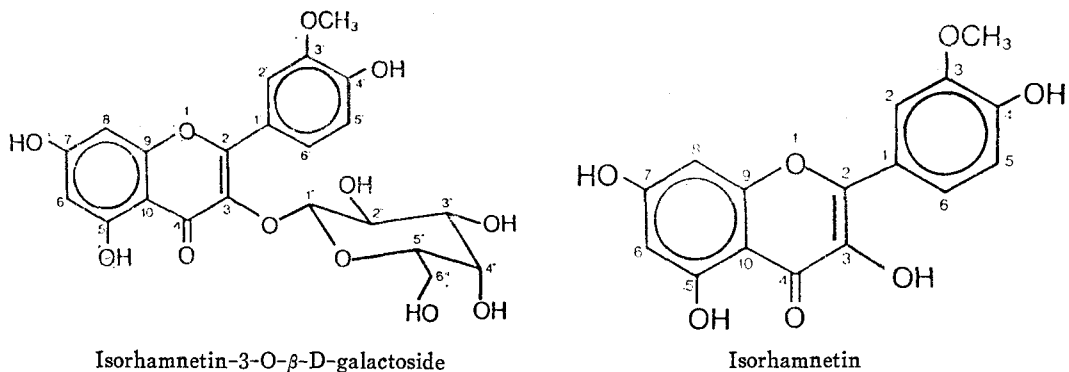


Fig. 1—Constituent isolated from *Hydrocotyle japonica* MAKINO

본 속 식물에 대한 성분연구로는 *Hydrocotyle asiatica*(L.) URBAIN(=*Centella asiatica*(L.) URBAIN)에서 terpenoid인 asiaticoside, asiatic acid, madecassic acid 등이 분리보고 되었으며,⁴⁻⁹⁾ 1960년 Nakaoki 등은 *Hydrocotyle maritima* HONDA의 엽에서 hyperin을 분리하였으며¹⁰⁾, 1986년 伊奈등은 *Hydrocotyle sibthorpioides* LAMARCK의 엽에서 (-)-sesamine을 분리 동정하였다.¹¹⁾ 그러나 제주피막이 *Hydrocotyle japonica* MAKINO는 위 3종의 식물과 동속이며 민간요법이 유사하므로 저자는 의약자원의 개발을 목적으로 천연물 약품화학적 연구를 시도하였다. 성분검색결과 3가지 flavonoid 성분들(물질 FA, 물질 FB, 물질 FC)을 확인하였으며 일차적으로 물질 FA를 단리하여 이화학적 방법과 spectral data를 종합하여 isorhamnetin-3-O-β-D-galactoside로 동정하였기에 그 결과를 보고한다.

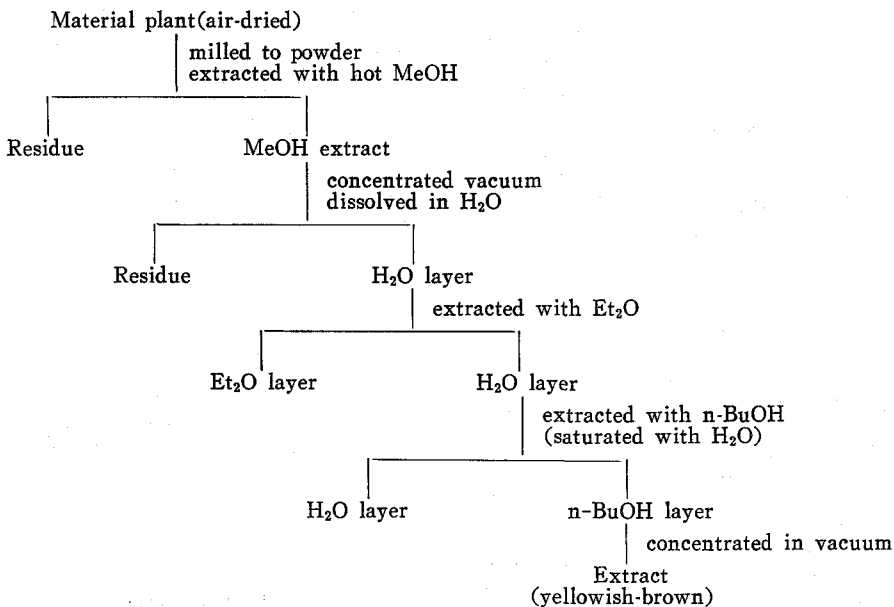
실험 방법

실험 재료 및 기기—제주도 복제주근 구좌읍 일대에서 1986년 7월 중순경 제주피막이 전초를

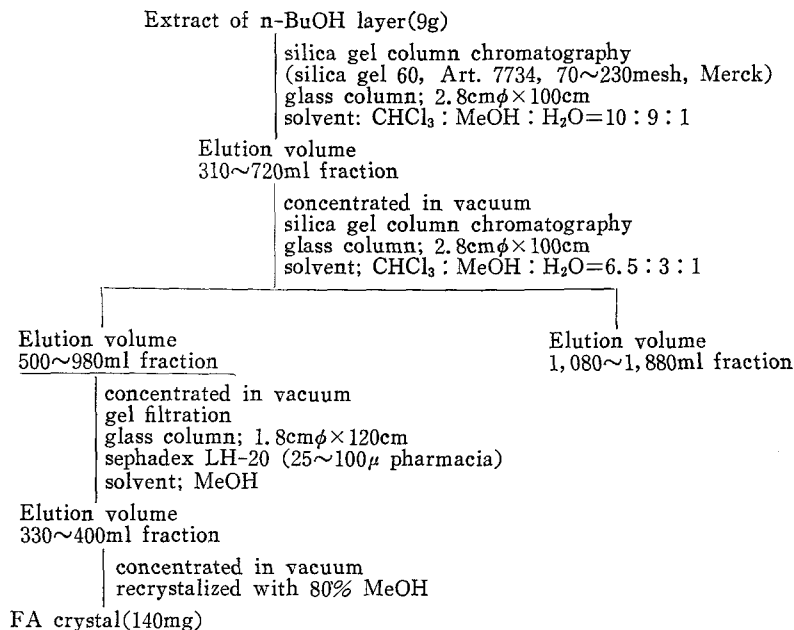
채집하여 감정해서 음건, 세절하여 사용하였고, 사용기기로는 Electrothermal IA 8100 Melting point apparatus, Shimadzu UV-265 Spectrometer, Shimadzu IR435 Spectrometer, VG12~250 MS Spectrometer, Bruker AM-200 ¹H-NMR Spectrometer, Bruker AM-200 ¹³C-NMR Spectrometer, Perkin-Elmer 240 DS Element Analyzer, Jasco Dip-181 Polarimeter 등이 이용되었다.

추출 및 분리—자료식물 4.4kg을 세절하여 MeOH 10liter로 수욕상에서 3회 반복 추출하고 추출액을 합하여 감압농축하여 암갈색의 MeOH 엑스(384.1g)를 만든 다음 여기에 증류수 900ml를 넣고 수욕상에서 진탕시킨후 냉시 여과하여 얻은 수층을 n-BuOH 1liter씩 3회 반복 추출하고 추출액을 합하여 감압농축해서 황갈색의 엑스(22.2g)을 얻었다. (Scheme 1.) (수율 : 0.5%)

물질 FA의 단리—n-BuOH층의 엑스 9g을 먼저 Silicagel column(2.8×100cm, CHCl₃ : MeOH : H₂O=6.5 : 3 : 1의 하층사용)을 실시한 후 여기서 얻은 물질 fraction의 건조 엑스 1.4g을 Sephadex LH-20 column으로 gel filtration하고 MeOH로 재결정하여 mp 247~248°C의 황색침상결정 140mg을 얻었다(Scheme 2.) (수율 1.5%)



Scheme 1. Solvent fractionation of material.



Scheme 2. Isolation of flavonoid compounds.

mp : 247~248°C(80% MeOH)

Anal. Calcd for C₂₂H₂₂O₁₂·1/3H₂O : C, 54.545;

H, 4.669

Found: C, 54.869; H, 4.698

Specific rotation : $[\alpha]_D^{28} = -52.27^\circ$ (C=0.088,
in pyridine)MS(m/z) : 478(M⁺), 316UV(λ_{max} nm) :

MeOH : 254, 266(sh), 304(sh), 354

MeOH+NaOMe : 271, 329, 415

MeOH+AlCl₃ : 268, 301(sh), 364(sh), 405MeOH+AlCl₃+HCl : 267, 300(sh), 356(sh),
403

MeOH+NaOAc : 274, 318, 384

MeOH+NaOAc+H₃BO₃ : 255, 268(sh), 305
(sh), 357IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹) :3400~3200(-OH), 1650(conjugated, C=O),
1600, 1500, 1450(aromatic) 1060(alcohol,
-O-OH)¹H-NMR(DMSO-d₆, δ ppm) :8.02(H^{2'}, d, J=2Hz, 1H), 7.50(H^{6'}, dd,J=8.8 and 2Hz, 1H), 6.90(H^{5'}, d, J=8.8
Hz, 1H), 6.44(H⁸, d, J=2Hz, 1H), 6.20
(H⁶, d, J=2Hz, 1H), 5.51(Gal -H^{1''}, d,
J=7.8Hz, 1H), 3.85(-OCH₃, s, 3H), 3.67
~3.30(Gal; 4 CH-, CH₂, m, 6H)¹³C-NMR(DMSO-d₆, δ ppm, () ; No. of carbon
position) :156.3(2), 133.0(3), 177.2(4), 161.1(5),
98.7(6), 164.3(7), 94.6(8), 156.1(9), 103.9
(10), 120.9(1'), 113.4(2'), 149.3(3'), 146.9
(4'), 115.1(5'), 121.8(6), 55.9(OCH₃),
101.6(1''), 71.2(2''), 73.0(3''), 67.9(4''),
75.8(5''), 60.2(6'')물질 FA의 가수분해—물질 FA 50mg을 10%-
HCl로 상법에 따라 가수분해하여 황색침상의 조
결정을 얻고 이것을 60% acetone으로 재결정하여
mp 293~298°C(decomp.)의 황색침상결정 24mg
을 얻었다. (수율 : 72%)

Aglycone.

UV(λ_{max} nm) :

MeOH : 254, 266(sh), 302(sh), 330(sh), 370

MeOH+NaOMe : 234(sh), 274, 322, 419dec.

MeOH+AlCl₃ : 264, 302, 357(sh), 429

MeOH+AlCl₃+HCl : 262, 302, 359, 428

MeOH+NaOAc : 260(sh), 275, 319, 385

MeOH+NaOAc+H₃BO₃ : 254, 268(sh), 305
(sh), 327(sh), 372

IR($\nu_{\max}^{\text{KB}}\text{cm}^{-1}$) :

3300~3200(-OH), 1650(conjugated C=O),
1600, 1520, 1470(aromatic)

¹H-NMR(DMSO-d₆, δ ppm) :

7.78(H^{2'}, d, J=2Hz, 1H), 7.70(H^{6'}, d, d,
J=8Hz, J=2Hz, 1H), 6.96(H^{5'}, d, J=8Hz,
1H), 6.50(H⁸, d, J=2Hz, 1H) 6.22(H⁶, d,
J=2Hz, 1H), 3.97(-OCH₃, s, 3H)

¹³C-NMR(DMSO-d₆, δ ppm, \circ); No. of carbon
position) :

146.6(2), 135.7(3), 175.8(4), 160.6(5),
98.2(6), 163.9(7), 93.6(8), 156.1(9), 103.0
(10), 122.0(1'), 111.8(2'), 148.8(33'),
147.3(4'), 115.5(5'), 121.7(6'), 55.8(-OCH₃)

Sugar—가수분해 산물을 분리한 수층을 Ag₂
CO₃를 가하여 HCl을 제거한 후 농축하여 검액
으로 한 후 cellulose plate(Art. 5574, Merck)
상에서 전개용매 PhOH : H₂O=3 : 1로 TLC를
실시하여 Rf치 0.42로 D-galactose 표준과 비교
동정하였다.¹⁶⁾

물질 FA acetate—물질 FA를 pyridin과 Ac₂O
로 상법에 따라 acetylation하고 ether로 추출하
여 감압농축하고 40% acetone으로 재결정하여
mp 124~125°C의 백색침상결정 물질 FA acetate
32mg을 얻었다. (수율 : 40%)

¹H-NMR(CDCl₃, δ ppm) :

alcohol 性-OAc×4 : 1.92(s, 3H), 1.99(s,
3H), 2.10(s, 6H)

phenol 性-OAc×3 : 2.34(s, 6H), 2.45(s, 3H)
3.82(m), 3.98(s, 3H, -OCH₃), 5.12(m),
5.46(d, J=8Hz, gal-H^{1''}) 6.64(d, J=2Hz,
H⁶), 7.25~7.30(m, H⁸, H^{5'}), 8.08(m, H^{2'},
H^{6'})

물질 FA aglycone acetate—물질 FA agly-
cone 20mg을 pyridine과 Ac₂O로 상법에 따라

acetylation하고 ether로 추출하여 감압농축하고
60% acetone으로 재결정하여 mp 205°C의 백색
침상 aglycone acetate 24mg을 얻었다. (수율 :
79%)

IR($\nu_{\max}^{\text{KB}}\text{cm}^{-1}$) :

1780(acetyl group, -C=O), 1650(conjugated,
C=O), 1600, 1500, 1450(aromatic) 1180
(ester, C-O)

¹H-NMR(DMSO-d₆, δ ppm) :

phenol 性-OAc×4; 2.32(s, 3H), 2.35(s, 6H),
2.44(s, 3H) 3.89(s, 3H, -OCH₃), 6.87(d,
J=2Hz, 1H, H⁶), 7.30(m, H^{5'}, H⁸), 7.42
(m, H^{2'}, H^{6'})

¹³C-NMR(CDCl₃, δ ppm) :

21.17, 21.06, 20.65, 20.58(4×O=C-CH₃)
56.15(-OCH₃)

결과 및 고찰

물질 FA는 Mg+HCl, FeCl₃ 및 Pb(OAc)₂·Pb
(OH)₂ 반응에 양성이고, IR Spectrum에서 3400
~3200(-OH), 1650(conjugated C=O), 1600,
1500, 1450(aromatic 및 1060cm⁻¹(alcohol C-
OH) 등에서 강한흡수대를 보이고, UV는 254nm
와 354nm에서 흡수대를 나타내므로 flavonol로
추정하였으며, ¹H-NMR(DMSO-d₆)의 3.30~
3.67ppm에서 multiple한 signal과 ¹³C-NMR
(DMSO-d₆)에서 당의 탄소에 해당하는 6개의
peak가 나타나므로 hexose 1 분자가 결합된
flavonol glycoside임을 알 수 있었다. 또한 물질
FA와 물질 FA aglycone의 ¹H-NMR에서 각각
methoxyl group의 3H에 해당하는 singlet signal
이 3.85 및 3.97ppm에서 나타나 methoxyl group
의 존재를 알 수 있었으며 이는 각각 ¹³C-NMR
의 55.9, 56.15ppm의 signal로 더욱 확실케 했
다. 한편 물질 FA aglycone의 ¹H-NMR을 살펴
보면 H^{2'}는 7.78ppm에서 J_{2'6'}=2Hz(meta-cou-
pling)의 doublet, H^{6'}는 7.70ppm에서 J_{6'2'}=2Hz
(meta-coupling), J_{6'5'}=8Hz(ortho-coupling)의
double-doublet, 6.96ppm에서 H^{5'}는 J_{5'6'}=8Hz

(ortho-coupling)의 doublet로 나타나고, H⁸과 H⁶는 J_{6,8}=2Hz J_{3,6}=2Hz로 6.50 및 6.22ppm에서 각각 doublet로 나타나 polyhydroxyl flavonol의 형태임을 알 수 있다. 또한 물질 FA aglycone acetate의 ¹H-NMR 결과 4개의 acetyl group signal이 2.44(3H), 2.35(6H) 및 2.32(3H) ppm에서 나타났고, 3.89ppm에서 methoxyl group의 3H의 singlet signal이 나타나 methoxyl group과 4개의 hydroxyl group이 있음을 분명케 했다. 또한 methoxyl group의 결합위치를 보기위해 shift reagent를 사용한 물질 FA aglycone의 UV spectrum을 살펴보면 MeOH 용액일때보다 2M-NaOH 용액첨가시 band I의 측정치는 49nm의 장파장 이동이 일어나 4'-OH의 존재와 322nm의 새로운 band의 형성으로 7-OH가 있음을 추정케 하는데 이는 NaOAc 첨가시 측정된 band III가 MeOH 용액에 비해 22nm의 장파장 이동이 일어나 더욱 확실케 하였고, 5%의 AlCl₃ 용액 첨가시 band I이 59nm 장파장으로 이동하여 5-OH가 있음을 알 수 있고 여기에 HCl 첨가한 후 band I의 측정치 변화가 없으므로 B-ring의 ortho-dihydroxyl group이 없는 것으로 추정되고 이는 NaOAc/H₃BO₃ 첨가시도 MeOH 용액에 비해 band I의 이동이 거의 없어 이를 확인케 했다.¹⁹⁾

또한 ¹³C-NMR의 결과를 B-ring이 ortho-dihydroxyl group으로 되어있는 quercetin과 비교해 보면 C₃에서 물질 FA aglycone이 3.8ppm downfield 되었고 ortho 위치의 C₂'는 3.2ppm upfield 되어 C에 methoxyl group이 결합되어 있음을 알 수 있고 물질 FA의 MS 결과 fragment ion peak가 316으로 이는 isorhamnetin의 분자량과 일치하며 표품과의 TLC도 일치하여 물질 FA의 aglycone은 isorhamnetin으로 동정하였다.

한편 sugar는 물질 FA acetate의 ¹H-NMR에서 3개의 phenol성 acetyl group signal 즉 2.45(3H), 2.34(6H)ppm 외에 4개의 alcohol성 acetyl group signal 즉 2.10(6H), 1.99(3H), 1.92(3H)ppm이 나타나 물질 FA는 하나의 hexose가 결합되었음을 확실케 하였고 물질 FA의 ¹³C-NMR에서 hexose에 해당하는 6개의 peak 즉

101.6, 71.2, 73.0, 67.9, 75.8 및 60.2ppm에 대한 해석결과 -O-galactose(3-linked)와 동일 하였으며, 가수분해후의 D-galactose와의 비교 TLC에서도 Rf치가 0.42(black-blue)에서 일치하여 D-galactose가 결합되어 있음을 알 수 있었다.

이러한 사실로 부터 물질 FA는 isorhamnetin에 D-galactose가 결합되어 있음을 알 수 있고²⁰⁾ 그 결합위치를 알기 위해 UV-spectrum을 살펴보면 물질 FA가 물질 FA aglycone에 비해 band I이 단파장으로 16nm 이동되는 것으로 보아 C₃가 치환 가능성이 있을 것으로 예상되었고, 각각의 ¹³C-NMR data에서 C₃에 대해 물질 FA의 C₃가 물질 FA aglycone에서 보다 2.7ppm upfield되었고 ortho 위치의 C₂'는 9.7ppm downfield 되었으므로 C₃에 O-galactoside로 결합되어 있음을 알 수 있었다.²⁰⁾

또한 ¹H-NMR에서 galactoside의 H^{1''}가 coupling constant J=7.8Hz로 doublet되어 H^{2''}와 diaxial coupling 즉 β-form으로 결합되어 있음을 알 수 있다.²¹⁾

이상의 결과를 종합하여 물질 FA를 isorhamnetin-3-O-β-D-galactoside로 추정하였고, MS에서 분자량 478이 확인되었고 표품과의 비교 TLC 및 혼용시험 결과 및 기기분석 data 모두 일치하여 물질 FA를 isorhamnetin-3-O-β-D-galactoside로 동정하였다.

결 론

제주 피막이 *Hydrocotyle japonica* MAKINO에서 3가지의 flavonid 성분을 확인하였고 그 중의 물질 FA를 분리하여 이화학적 실험 및 spectral data를 통하여 물질 FA는 mp 247~248°C [α]_D²⁰=-52.27° (C=0.088, in pyridine), C₂₂H₂₂O₁₂·1/3H₂O인 isorhamnetin-3-O-β-Dgalactoside로 동정하였다.

문 헌

- 1) 李昌福; 大韓植物圖鑑 576 (1979), 郷文社.
- 2) 李昌福; 大韓植物圖鑑 577 (1979), 郷文社.

- 3) 濟州道 ; 濟州道 植物圖監 545 (1979), 濟州道.
- 4) L. Si-Qi, and C. Huei-Fang, *Chung Ts'ao Yao*, **11**, 244 (1980).
- 5) Rastogi, R.P., Sarkar, B. and Dhar, M.L.: *J. Sci. Industr. Res.* **19B**, 252 (1960).
- 6) Boiteau, P. and M. Chanez: *C.R. Acad. Sci.*, Paris, Ser. D **264**, 407 (1967).
- 7) P., Bozena, K. Zdzislaw and S. Anna, *Diss. Pharm. Pharmaco.* **20**, 69 (1968).
- 8) Singh, Bhagirath and Rastogi, R.P.: *Phytochemistry* **8**, 917 (1969).
- 9) Polonsky, J., Sach, E. and Lederer, E.: *Bull. Soc. Chim. France.* 880 (1959).
- 10) 中冲太七郎, 森田直賢; 藥用資源の研究(第16報), **80**, 1473 (1960).
- 11) 伊奈郊二, 朝井亞失子, 飯田英夫; 日本 生藥學會 第33會 講演要旨集, **2A10-3**, 11 (1986).
- 12) Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B.: *The Systematic Identification of Flavonoids*, 78 (Springer-Verlag New York Inc. 1970).
- 13) Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B.: *The Systematic Identification of Flavonoids*, 299(Springer-Verlag New York Inc., (1970).
- 14) Markham, K.R.: *Tetrahedron* **34**, 1389 (1978).
- 15) Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B.: *The Systematic Identification of Flavonoids*, 77 (Springer-Verlag New York Inc., 1970).
- 16) Valesi, Amalia G.: *Phytochemistry* **11**, 2821 (1972).
- 17) Harborne, J.B.: and Mabry, T.J.: *The Flavonoids Advances in Research.*, 19(Champan & Hall London, New York, 1982).
- 18) Egon Stahl: *Thin-Layer Chromatography*, 807 (Springer-Verlag New York Inc., 1969).
- 19) Markham, K.R.: *Techniques of Flavonoid Identification*, 42(Academic Press, 1982).
- 20) Matsuura, Shin and Iinuma, Munekazu: *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 1939 (1978).
- 21) Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B.: *The Systematic Identification of Flavonoids*, 268 (Springer-Verlag New York Inc., 1970).
- 22) Leonard Jure: *J. Org. Chem.* **27**, 1294 (1962).
- 23) Soboleva, V.A. and Chagovets, R.K.: *Chemistry of Nature Compounds* **7**, 509 (1971).