

*Euphorbia ebracteolata*에 대한 생약학적 연구(I)

—*Euphorbia ebracteolata*의 Flavonoid 성분—

이상철 · 안병태 · 박응양 · 이승호 · 노재섭 · 이경순 · 유응결*
충북대학교 약학대학 · 한국화학연구소*

Pharmacognostical Study on the *Euphorbia ebracteolata*(I)

—On the Flavonoidal Constituents—

Sang Cheol Lee, Beung Tae Ahn, Woong Yang Park, Seung Ho Lee,
Jai Seup Ro, Kyong Soon Lee and Eung Kul Ryu*
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763 and
Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-606, Korea

Abstract—Four flavonoids were isolated from the aerial parts of *Euphorbia ebracteolata*. On the basis of chemical and spectroscopic evidence, the structures of these compounds were established as quercetin-3-O- β -D-glucoside (isoquercitrin) (I), quercetin-3-O-rutinoside (rutin) (II), kaempferol-3-O-rutinoside (III) and quercetin-3-O-(2''-O-galloyl)- β -D-glucoside (IV) which was the main flavonoidal component in this plant. The isolation of flavonoids from *E. ebracteolata* is the first example.

Keywords—*Euphorbia ebracteolata* · Euphorbiaceae · flavonoid · isoquercitrin · rutin · kaempferol-3-O-rutinoside · quercetin-3-O-(2''-O-galloyl)- β -D-glucoside

*Euphorbia ebracteolata*는 우리나라의 일부 지역 및 일본 중국 등지에 자생하는 대극과의 다년생 초본이고, 한방에서는 낭독의 대용으로 임파결핵, 골결핵, 만성기관지염 등의 치료약으로 이용하고 있다.^{1,2)} 이 식물의 성분에 관한 연구로는 Zhang 등이 지하부에서 octacosanoic acid, daucosterol, β -sitosterol 및 *Tuberculosis bacillus*에 대하여 살균작용을 갖는 bis(5-formyl-furfuryl)-ether, triterpenic acid, 2,4-dihydroxy-6-methoxyl-3-methyl-acetophenone 등 6종의 성분을 분리하여 보고하였으나³⁾ 지상부의 성분에 관하여는 보고된 바 없다. 이에 저자들은 *Euphorbia ebracteolata*에 대한 생약학적 연구의 일환으로 이 식물의 지상부에 대하여 연구를 수행하여 합수 acetone 추출물로부터 4종의 flavonoid

성분을 분리하였기에 보고한다.

실 험

실험재료—본 실험에 사용한 *E. ebracteolata*는 1991년 4월 전라남도 백양산에서 채집한 신선한 것 20 kg을 감정후 사용하였다.

기기 및 시약—용접은 Swiss Buchii社의 Model 510-K 미량용접측정기를 사용하여 측정하였으며 보정하지 않았다. IR spectrum은 Perkin-Elmer spectrophotometer (Model LE 599, U.K.)로 측정하였고 UV spectrum은 Shimadzu UV-240으로 측정하였으며 선광도는 JASCO DIP-4를 이용하였다. ¹H- 및 ¹³C-NMR spectrum은 Varian-Gemini(200MHz) 핵자기공명장치로 측정하였고

chemical shift는 TMS를 내부 표준으로 하는 δ 치(ppm)로 나타냈으며, 결합정수는 Hz로 표시했다. Column chromatography는 Sephadex LH-20(25~100 μ , Pharmacia Fine Chemical Co., Ltd.), Cosmosil 75 C₁₈-OPN(42~105 μ , Nacalaitesque Co., Ltd.), TSK-gel Toyopearl HW 40F(30~60 μ , Tosoh Co.), Avicel Cellulose (Sigma), MCI-gel CHP 20P(75~150 μ , Mitsubishi Chemical Industries Co. Ltd.)를 사용했다. TLC는 Kieselgel 60F₂₅₄ plate(0.2mm; Merck) [용매: benzene-ethylformate-formic acid(1:7:1 및 1:5:2, v/v), chloroform-methanol-water(13:7:2, v/v lower phase)] 및 Cellulose F₂₅₄ Plate(0.1 mm; Merck)[용매: 2% AcOH, n-butanol-pyridine-water(6:4:3, v/v)]를 이용하였고, 검출은 1% FeCl₃-EtOH 시약(phenolic compounds), 10% H₂SO₄시약(sugar), UV-lamp를 사용했다.

추출 및 분리—신선한 *E. ebracteolata* 20 kg을 세절하여 80% 수성 acetone으로 실온에서 4회 반복 추출하였다. 추출액은 감압하에서 acetone을 제거후 석출하는 침전을 여과하여 제거하고 여액은 재차 농축하여 Sephadex LH-20 column(9 cm×50 cm)에 걸어 water-methanol-acetone을 gradient로 하여 순차적으로 용출시켜 4개의 fraction으로 분획하였다. 이들 분획중 flavonoid test에 양성반응을 나타낸 fraction 2에 대하여 Sephadex LH-20(H₂O-MeOH, EtOH, 60% MeOH, 80% MeOH, MeOH), MCI-gel CHP 20P(H₂O-MeOH), Cosmosil(H₂O-60% MeOH), Toyopearl(H₂O-MeOH), cellulose(2% AcOH) 등의 column chromatography를 반복 실시하여 compound II~IV를 단리하였다.

Compound I(isoquercitrin)—황색분말(H₂O), 1% ethanolic FeCl₃: 오록색, Mg-HCl, Zn-HCl test: 홍색, mp: 231~233°, $[\alpha]_D^{28}$ -10.5°(c=0.3, MeOH); IR, ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3300(OH), 1650(C=O); UV, λ_{\max} (MeOH)nm: 256, 358; λ_{\max} (NaOMe): 272, 327, 402; λ_{\max} (AlCl₃): 272, 422; λ_{\max} (AlCl₃+HCl): 266, 399; λ_{\max} (NaOAc+H₃BO₃): 262, 378; ¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O) δ : 5.25(1H, d, J=8Hz, H-1''), 6.35(1H, d,

J=2Hz, H-6), 6.60(1H, d, J=2Hz, H-8), 7.00(1H, d, J=8Hz, H-5'), 7.70(1H, dd, J=2, 8Hz, H-6'), 8.23(1H, d, J=2Hz, H-2'), 12.42(1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR: Table I.

Compound II(rutin)—황색분말(H₂O), FeCl₃: 오록색, Mg-HCl, Zn-HCl test: 홍색, mp: 186~188°; IR, ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3300(OH), 1650(C=O); UV, λ_{\max} (MeOH)nm: 258, 358; λ_{\max} (NaOMe): 272, 324, 406; λ_{\max} (AlCl₃): 267, 398; λ_{\max} (AlCl₃+HCl): 266, 362; λ_{\max} (NaOAc+H₃BO₃): 262, 378; ¹H-NMR(acetone-d₆) δ : 1.10(3H, d, J=4Hz, rha-CH₃), 4.60(1H, br s, rha-1), 5.20(1H, d, J=8Hz, glc-1), 6.31(1H, d, J=2Hz, H-6), 6.62(1H, d, J=2Hz, H-8), 7.02(1H, d, J=8Hz, H-5'), 7.80(1H, dd, J=2, 8Hz, H-6'), 7.91(1H, d, J=2Hz, H-2'), 12.40(1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR: Table I.

Compound III(kaempferol-3-O-rutinoside)—황색분말(H₂O), FeCl₃: 오록색, Mg-HCl, Zn-HCl test: 홍색, mp: 203~206°, IR, ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3300(OH), 1650(C=O); UV, λ_{\max} (MeOH)nm: 264, 350; λ_{\max} (NaOMe): 274, 322, 396; λ_{\max} (AlCl₃): 270, 345; λ_{\max} (AlCl₃+HCl): 272, 350; λ_{\max} (NaOAc+H₃BO₃): 264, 350; ¹H-NMR(acetone-d₆) δ : 1.10(3H, d, J=4Hz, rha-CH₃), 4.61(1H, br s, rha-1), 5.20(1H, d, J=8Hz, glc-1), 6.31(1H, d, J=2Hz, H-6), 6.63(1H, d, J=2Hz, H-8), 7.03(2H, d, J=8Hz, H-3', 5'), 8.21(2H, d, J=8Hz, H-2', 6'), 12.04(1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR: Table I.

Compound IV[quercetin-3-O-(2''-O-galloyl)- β -D-glucoside]—담황색분말(H₂O), FeCl₃: 오록색, Mg-HCl, Zn-HCl test: 홍색, mp: 205°, UV, λ_{\max} (MeOH)nm: 258, 356; λ_{\max} (NaOMe): 274, 322, 408; λ_{\max} (AlCl₃): 270, 396; λ_{\max} (AlCl₃+HCl): 270, 380; λ_{\max} (NaOAc+H₃BO₃): 262, 372; ¹H-NMR(acetone-d₆+D₂O) δ : 5.32(1H, t, J=8Hz, glc-2), 6.02(1H, d, J=8Hz, glc-1) 6.31(1H, d, J=2Hz, H-6), 6.60(1H, d, J=2Hz, H-8), 7.03(1H, d, J=8Hz, H-5'), 7.32(2H, s, galloyl-H),

Table I. ^{13}C -NMR Spectral data of compounds I~IV (in acetone- d_6 + D_2O)

Carbon	Compound	I	II	III	IV
2		157.5	158.4	157.5	157.4
3		134.7	134.7	134.7	133.8
4		178.3	178.4	178.4	178.1
5		161.4	161.6	161.6	161.9
6		99.2	99.4	99.4	99.5
7		164.7	164.9	165.0	166.6
8		94.3	94.5	94.5	94.2
9		157.1	157.4	158.5	157.3
10		104.5	104.7	104.7	104.9
1'		121.9	122.4	121.7	122.5
2'		115.6	115.7	131.7	115.7
3'		144.6	144.8	115.6	145.1
4'		148.6	148.9	160.4	148.8
5'		117.2	117.0	115.6	116.8
6'		122.0	122.9	131.7	122.2
Sugar		104.7	103.7, 101.4	103.9, 101.4	99.2
		75.8	76.9, 75.9	76.9, 75.9	77.5
		73.8	74.6, 72.7	74.6, 72.7	75.1
		72.1	71.2, 70.8	71.2, 70.8	75.0
		68.5	70.0, 68.8	70.0, 68.8	70.5
		60.5	67.5, 17.4	67.5, 17.4	61.4
Galloyl-1					121.0
	-2				110.0
	-3				145.5
	-4				138.7
	-5				145.5
	-6				110.0
	C=O				164.7

7.71(1H, dd, $J=2, 8\text{Hz}$, H-6'), 7.91(1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-2'), 12.10(1H, s, 5-OH); ^{13}C -NMR: Table I.

Compound I, II, III 및 IV의 산 가수분해—시료 30 mg을 5% H_2SO_4 용액에 녹여 90°C 로 5 시간 가열한 후 반응액을 BaCO_3 로 중화하였다. 석출되는 염을 여과하여 제거하고 얻어진 여액을 ethylacetate로 분획하였다. Ethylacetate층에서 quercetin(compound I, II 및 IV), kaempferol(compound III) 및 gallic acid(compound IV)를 표준과 함께 TLC를 실시하여 확인하였다. 물 분획에서는 D-glucose(compound I, II, III 및 IV)

와 L-rhamnose(compound II 및 III)를 표준과 함께 TLC를 실시하여 확인하였다.

Compound IV의 tannase 가수분해—시료 50 mg을 10% MeOH 용액 5 ml에 용해시켜 tannase를 넣고 40°C 에서 1시간 반응시켰다. 반응액은 냉각후 Sephadex LH-20 column에 걸어 H_2O 로 여분의 tannase를 용출시킨 후 20% MeOH로 elution시켜 gallic acid(7 mg)을 얻었다. 이어서 MeOH로 용출시켜 가수분해산물로 isoquercitrin(I) (17 mg)을 얻어 표준과의 co-TLC 및 각종 spectral data를 비교하여 isoquercitrin으로 동정하였다.

결과 및 고찰

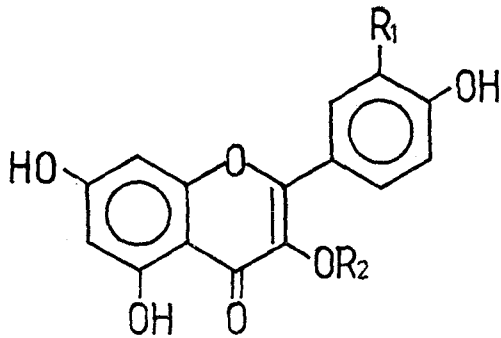
실험에서 단리한 compound I~IV는 모두 Mg-HCl 및 Zn-HCl test에서 홍색을 나타내고 FeCl₃에 의해 오록색을 나타내는 등 flavonoid 확인반응에 양성을 나타내었다.

Compound I은 황색분말로 IR spectrum에서 3300cm⁻¹에서 OH기에 의한 광범위한 흡수대를, 1,650 cm⁻¹에서 γ -pyrone의 conjugated carbonyl group에 의한 흡수를 나타냈으며, UV spectrum에서는 256 nm 및 358 nm에서 흡수를 나타냈다. ¹H-NMR spectrum에서는 aromatic field에서 6.35, 6.60 ppm에 각각 2H로 *m*-coupling하고 있는 flavonoid A환의 6 및 8위의 전형적인 proton signal이 관찰되고, 7.00 ppm에 *o*-coupling하고 있는 doublet, 7.70 ppm에 *o*- 및 *m*-coupling하고 있는 double doublet, 8.23 ppm에 *m*-coupling하고 있는 doublet이 관찰되어 이들 signal이 B환의 2', 5', 6'위의 proton에 귀속됨에 따라 B환의 3' 및 4'위가 치환되어 있음을 알 수 있다. 또 aliphatic field에 있어서는 한개의 hexose에 기인하는 methine 및 methylene proton signal이 관찰되며 5.25 ppm에 anomeric proton signal이 저자장 shift하여 관찰된다. 당은 compound I의 가수분해에 의하여 D-glucose임이 확인됨에 따라 이 화합물은 quercetin에 D-glucose가 glycoside 결합한 화합물로 추정된다. 당의 결합위치는 UV spectrum에서 NaOMe 첨가시 330 nm에서 새로운 흡수대가 나타나는 것으로 7위에 OH기가, NaOAc/H₃BO₃ 첨가시 bathochromic shift와 AlCl₃/HCl 첨가시 보다 AlCl₃ 첨가시 bathochromic shift가 일어난 것으로 보아 B ring에 free의 dihydroxyl group이 존재한다는 것을 알 수 있었다.⁴⁾ 이상의 결과로부터 glucose는 quercetin 핵의 3위에 β -결합 하고 있는 것으로 결론, compound I은 quercetin-3-O- β -D-glucoside(isoquercitrin)⁵⁾로 결정하여 표품과 각종 물리항수 및 spectral data를 비교하여 동정하였다.

Compound II는 산으로 가수분해 하여 D-glucose와 L-rhamnose 및 aglycone으로 quercetin을 얻었다. ¹H-NMR spectrum은 aromatic field

에서 6.31 및 6.62 ppm에 각각 *m*-coupling하고 있는 H-6 및 H-8에 기인하는 doublet을 나타내고 7.02 ppm에 *o*-coupling하고 있는 doublet을, 7.91 ppm에 *m*-coupling하고 있는 doublet을, 또 7.80 ppm에 *o*- 및 *m*-coupling하고 있는 double doublet이 관찰되어 B환의 3' 및 4'위가 치환된 것을 알 수 있으며, aliphatic field에서는 1.10 ppm에 rhamnose의 methyl기에 기인하는 전형적인 3H분의 doublet이 관찰되고 4.60 및 5.20 ppm에 각각 rhamnose 및 glucose의 anomeric proton signal이 관찰된다. 따라서 compound II는 quercetin에 rutinose가 β -결합한 화합물로 추정되며 rutinose의 결합위치는 UV spectrum의 bathochromic shift의 결과에 의하여 quercetin의 3위로 결론지었다.⁴⁾ 이상의 결과로부터 compound II는 quercetin-3-O-rutinoside(rutin)⁶⁾이라 결정하여 표품과 각종 spectral data를 비교하여 동정하였다.

Compound III의 UV spectrum은 flavone의 A 환 및 B환에 기인하는 흡수가 264 nm과 350 nm에서 관찰되어 flavone핵의 3위의 OH가 치환된 flavonoid 유도체임을 알 수 있으며²⁾, 또 NaOAc/H₃BO₃ 및 AlCl₃/HCl 첨가시 shift가 일어나지 않는 것으로 보아 B환이 dihydroxyl group이 아닌 것으로 추정된다.⁴⁾ Compound III의 ¹H-NMR spectrum은 aromatic field에 있어서 7.03 및 8.23 ppm에서 각각 *o*-coupling하고 있는 2H분의 doublet이 관찰되어 B환에 있어서 4'위만이 치환되어 있는 것을 알 수 있으며, 6.31, 6.63 및 12.04 ppm에서 A환의 6, 8위의 proton 및 5-OH기의 proton에 의한 전형적인 signal이 관찰된다. 또 aliphatic field에서는 1.10 ppm에 rhamnose의 methyl기에 기인하는 signal이 doublet으로 관찰되고 4.61, 5.20 ppm에서 rhamnose 및 glucose의 anomeric proton signal이 관찰되어 compound III은 kaempferol의 3위에 rutinose가 결합한 화합물로 추정되었다. 이와 같은 사실은 compound III을 산가수분해하여 kaempferol과 D-glucose 및 L-rhamnose를 얻음으로서도 확인되었다. 이상의 결과를 종합하여 compound III은 kaempferol-3-O-rutinoside⁷⁾로 결정하여 표품과 각종 spectral data를 비교하여 동정하였다.



- I) $R_1=OH$ $R_2=glucose$
 II) $R_1=OH$ $R_2=rutinose$
 III) $R_1=H$ $R_2=rutinose$
 IV) $R_1=OH$ $R_2=2-O-galloyl\ glc.$

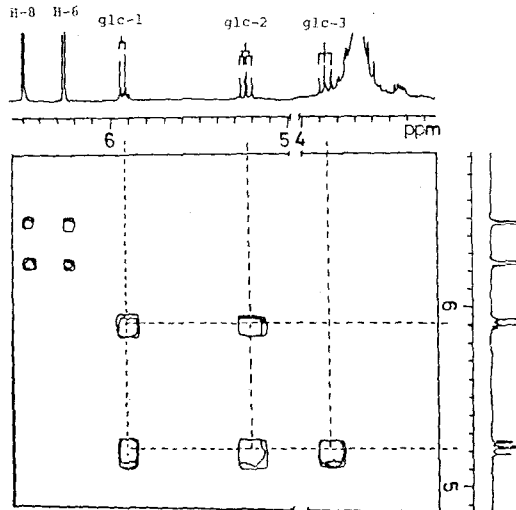


Fig. 1. 1H - 1H COSY Spectrum of compound IV (acetone- d_6 + D_2O)

Compound IV의 1H -NMR spectrum은 aliphatic field에 있어서 6.02 ppm에 저자장 shift한 anomeric proton signal 및 5.23 ppm에 저자장 shift한 산소가 결합된 methine signal 등 한개의 hexose에 기인하는 methine 및 methylene signal이 관찰된다. Aromatic field에 있어서는 6.31, 6.60 ppm에 각각 *m*-coupling한 flavonoid의 6 및 8위의 proton에 기인하는 signal 및 12.10 ppm에 5-OH의 proton에 기인하는 signal이 관찰되고 7.03 ppm에 *o*-coupling하고 있는 doublet, 7.31 ppm에 *o*- 및 *m*-coupling하고 있는 doublet, 7.91 ppm에 *m*-coupling하고 있는 doublet이 관찰되고 있으며 7.32 ppm에 galloyl기의

proton에 기인하는 것으로 생각되는 2H분의 singlet이 관찰되어, compound IV는 quercetin 핵에 galloyl기가 ester결합된 hexose가 glycoside 결합하고 있는 화합물로 추정된다. 이들의 결합 위치를 확인하기 위하여 compound IV를 tannase 가수분해한 결과 gallic acid와 함께 isoquercitrin (I)을 얻었다. 이는 compound IV가 isoquercitrin의 glucose에 galloyl기가 결합된 물질임을 의미하고 있으며 galloyl기의 결합위치는 compound IV의 1H - 1H COSY spectrum의 해석에 의하여 glucose의 2위로 결정하였다(Fig. 1). 이상의 결과로부터 compound IV는 quercetin-3-O-(2''-O-galloyl)- β -D-glucoside⁸⁾로 결정 표준과 각종 물리항수 및 spectral data를 비교하여 동정하였다.

결 론

Euphorbia ebracteolata 지상부의 함수 acetone 추출물을 Sephadex LH-20 column을 이용하여 H_2O -MeOH-acetone을 gradient로 chromatography를 실시하여 얻은 분획중 flavonoid 양성반응을 보인 분획에 대하여 각종 column chromatography를 반복 실시하여 compound I~IV를 단리하였다.

각 화합물에 대하여는 분해반응의 결과 및 각종 spectral data의 검토에 의해 isoquercitrin(I), rutin(II), kaempferol-3-O-rutinoside(III) 및 quercetin-3-O-(2''-O-galloyl)- β -D-glucoside(IV)로 동정하였으며, 이들 화합물중 compound IV (0.03%)의 함량이 가장 많았다.

감사의 말씀—본 연구는 1991년도 교육부 학술연구조성비의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 깊이 감사하는 바이다.

(1992년 9월 10일 접수 : 9월 20일 수리)

文 獻

1. 牧野富太郎 : 牧野新日本植物圖鑑, 北隆館, 369 (1989).
2. 上海科學技術出版社 小學館編 : 中藥大辭典, 小學館, 5652 (1985).
3. Zhang, H., Ding, Y. and Chen, G.: *Acta*

- Botanica Sinica* 29, 429 (1987).
4. Marbry, T.J. Markham, K.R. and Thomas, M.B.: The Systemic Identification of the Flavonoids, Springer, New York (1970).
 5. Harbone, J.B. and Marbry, T.J.: The Flavonoids, Advances in Research, Chapman and Hall Ltd., London, 240 (1982).
 6. Markham, K.R.: Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London, 38 (1982).
 7. Kartnig, Th., Gruber, A. and Stachel, J.: *Planta Medica* 288 (1985).
 8. Isobe, T. Fukushige, T. and Noda, Y.: *Chem. Letters* 27 (1979).