

꾸지뽕나무 잎의 생리활성 및 HPLC에 의한 성분의 정량

김성환 · 김남재* · 최재수** · 박종철***†

경북보건환경연구원

*경희대학교 동서의학연구소

**부산수산대학교 자연과학대학 식품영양학과

***순천대학교 자연과학대학 한약자원학과

Determination of Flavonoid by HPLC and Biological Activities from the Leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau

Sung-Hwan Kim, Nam-Jae Kim*, Jae-Sue Choi** and Jong-Cheol Park***†

Kyungbuk Institute of Health and Environment, Daegu 702-702, Korea

* East-West Medical Research Institute, Kyunghee University, Seoul 130-702, Korea

** Dept. of Nutrition and Food Science, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

*** Dept. of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

The methanol extract of the leaves of *Cudrania tricuspidata* and ethyl acetate fraction from the methanol extract showed inhibition for trypsin activity and the growth inhibition of *Staphylococcus aureus*. The content of kaempferol 7-O- β -D-glucopyranoside isolated from this plant was determined by HPLC and it was about 0.31% for the methanol extract.

Key words : *Cudrania tricuspidata*, trypsin, *Staphylococcus aureus*, kaempferol 7-O- β -D-glucopyranoside, HPLC

서 론

꾸지뽕나무 (*Cudrania tricuspidata* Bureau)는 뽕나무과에 속하는 낙엽성 소교목으로¹⁾ 이 식물의 잎 부분을 한방에서 자수경엽(柝樹莖葉)이라 하여, 습진, 유행성 이하선염, 폐결핵, 만성 요통, 타박상, 급성관절염 등을 치료하는데 사용하고 있다. 木部, 근피 및 과실부분도 요통, 타박상 등의 치료에 이용되고 있다²⁾. 그리고 우리나라 민간에서도³⁾ 꾸지뽕나무를 다려서 마시면 간암 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다.

이 식물에 대한 연구로는 cudraflavone A, B 등의 성분연구⁴⁻⁶⁾가 보고되어져 있다.

저자 등은 천연물에서 유용 생리활성물질 분리 및 구조연구의 일환으로서 한방에서 사용되어지는 꾸지뽕나무 잎을 대상으로 항염증작용 및 항균작용을 검토

하고, 잎에 다량으로 존재하는 flavonoid성분의 함량을 HPLC로서 정량하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

꾸지뽕나무의 잎은 1989년 9월 순천시 매곡동에서 채집하여, 건조 분쇄 후 사용하였다. 이의 표본은 순천대 한약자원학과 표본실에 보관중이다.

기기

HPLC는 Waters Associate의 분석용 liquid chromatograph로서 Model 440 detector 및 M730 data module이 부착된것을 사용하였으며 column은 Waters의 μ -Bondapak C18(3.9mm \times 300mm)을 사용하였다.

화학구조 분석용 기기는 Gallen Kamp melting point

† To whom all correspondence should be addressed

apparatus, Bomen MB 100-C15 FT-IR spectrophotometer, CE 599 Universal automatic scanning spectrophotometer, Bruker AM-200 spectrometer를 이용하였으며 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck Art. 7729), thin layer chromatography용 precoated plates는 Kiesel gel 60 F254(Merck Art. 5735)을 사용하였다.

추출 및 분획

꾸지뽕나무잎 (900g)을 음건후 분쇄하여 수욕상에서 환류냉각하면서 MeOH로 3회 추출하였다. 감압하에서 용매를 유거하여 얻은 MeOH엑스를 10% MeOH에 현탁시킨 후 Scheme 1과 같이 계통 분획을 실시하여 CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH 및 수층으로 분획하였다. 이중 EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 행하여 CHCl₃-MeOH-7%AcOH(5 : 1 : 1, 하층), CHCl₃-MeOH-7%AcOH(25 : 8 : 5, 하층)의 용매로 용출, 화합물 1을 분리 하였다.

각 분획의 trypsin 효소저해활성에 대한 작용

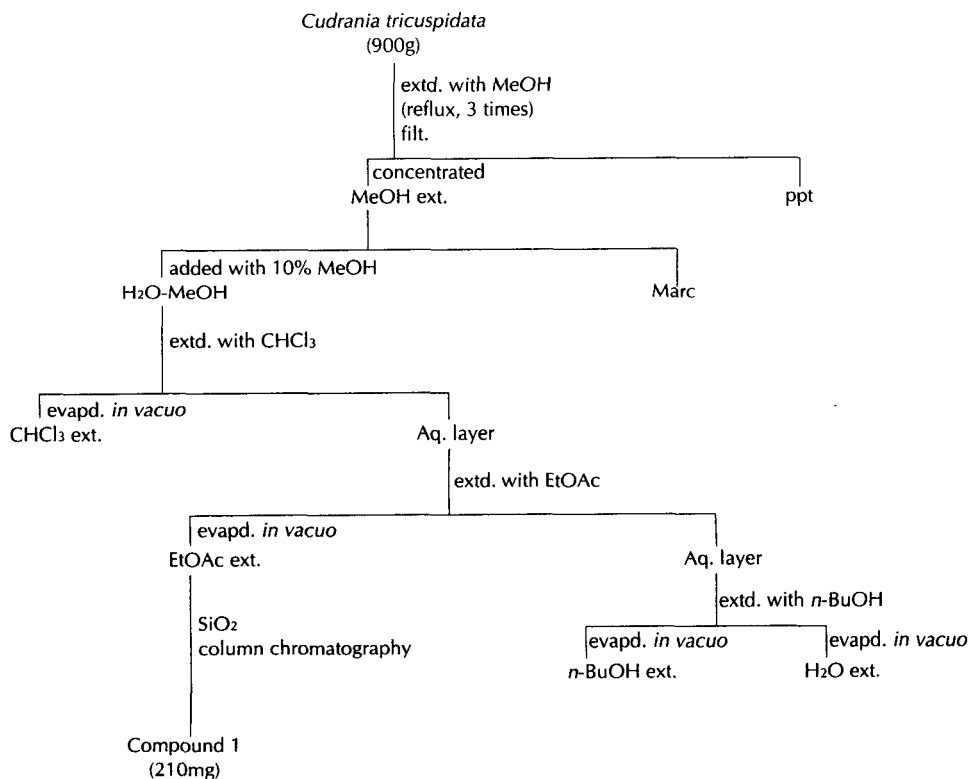
Trypsin 효소저해활성에 대한 작용은 Anson¹²⁾과

Tsutomu 등¹³⁾의 방법에 준하였다. 즉 trypsin(Difco, 20μg/ml) 및 시료를 각각 1/15 M phosphate buffer(pH 7.6)에 용해 시킨 용액(1mg/ml)을 각각 40μl씩 취하여 37°C에서 10분간 가온하였다. 여기에 1.0% casein용액 0.4ml씩 가한 후 37°C에서 20분간 incubation 하고, 0.8M trichloroacetic acid 1ml 씩 가하여 반응을 종료시키고 0.05M HCl 40μl를 가한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 각 상등액 0.5ml씩을 취하고 0.5M NaOH 1μl 씩 가한 후 phenol 시약 0.3ml 씩을 가한 다음 37°C수욕중에서 15분간 incubation 하고 다시 원심분리하여 얻은 상등액을 660nm에서 흡광도를 측정하였으며 아래식으로 부터 억제율을 산출하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{검액의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

항균작용

실험에 사용한 균주는 경희대학교 의과대학 부속병원 임상병리과에서 분주받은 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25927), *Serratia marcescense*, *Pseudomonas ae-*



Scheme 1. Fractionation and isolation of *Cudrania tricuspidata*.

ruginosa, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*이며, 종균배지로는 Nutrient Broth (Difco)를 사용하였고 시험용 배지는 Bacto Muller Hinton Agar Medium (Difco)를 사용하였다. 사용균주를 각각 종균배지에 접종하고, 35 ± 2°C에서 20시간 배양한 후 채균하여 생리 식염수에 부유 시킨 다음, 균의 농도를 650nm에서 투과율 50%가 되게 한 균액을 Muller Hinton Agar로 만든 평판배지에 소독된 면봉을 사용하여 잘 접종 시켰다.

검액을 DMSO에 용해하여 멸균 증류수 ml당 100mg 함유하도록 희석하여 paper disk (Toyo seisakusho) 1매당 10μl씩 흡수시켜 시험용 평판 배지에 놓은 후 35 ± 2°C에서 20시간 배양한 다음 disk 주변에 나타난 세균 발육이 저지된 clear zone의 직경을 측정 하였다.

화합물 1

mp : 244-246°C, IR (KBr, cm⁻¹) ; 3380 (br, OH), 1640 (α, β-unsaturated C=O), 1610, 1540, 1495 (aromatic C=C), 1080 (glycosidic C-O), UVλ_{max}, nm ; (MeOH) : 260, 272 (sh), 295 (sh), 330 (sh), 376 ; (NaOMe) : 254, 274, 440 ; (AlCl₃) : 272, 300, 326, 352, 430 ; (AlCl₃+HCl) : 270, 300, 324, 355, 430 ; (NaOAc) : 255, 372 ; (NaOAc+H₃BO₃) : 260, 271, 298, 374, ¹H-NMR (DMSO-d₆, 200MHz) σ ; 12.5 (1H, s, CsOH) 8.07 (2H, d, J=8.8Hz, H-2' & H-6') 6.93 (2H, d, J=8.8Hz, H-3' & H-5') 6.78 (1H, d, J=2.0Hz, H-8) 6.41 (1H, d, J=2.0Hz, H-6) 5.06 (1H, d, J=7.0Hz, H-1''), ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 50.4MHz) σ ; 176.1 (C-4), 162.7 (C-7) 160.4 (C-5) 159.4 (C-4') 155.8 (C-9) 147.6 (C-2) 136.1 (C-3) 129.6 (C-6' & 2') 121.6 (C-1') 115.5 (C-5' & 3') 104.7 (C-10) 99.9 (C-1'') 98.8 (C-6) 94.4 (C-8) 77.2 (C-3'') 76.5 (C-5'') 73.2 (C-2'') 69.6 (C-4'') 60.7 (C-6'')

표준검량선의 작성

표준검량선의 작성은 내부표준물질로서 4-chloro-N-(2-furylmethyl)-5-sulfamoylanthranilic acid 20mg을 정량하여 MeOH 10ml에 용해시켜 2mg/ml의 내부표준액을 조제하였다. 화합물 1은 50mg을 정량하여 MeOH 50ml에 용해시킨 용액을 stock solution으로 해서 이를 일정량씩 취한 후 각각에 내부표준물질 1ml을 가해 100, 200, 300 및 400μg/ml가 되게 조제하였다. 각 표준액을 20μl씩 취하여 chromatogram을 얻고 각각의 chromatogram으로부터 내부표준물질 및 화합물 1의 면적비를 구하여 검량선을 작성하였다 (Fig. 1). 검량선의

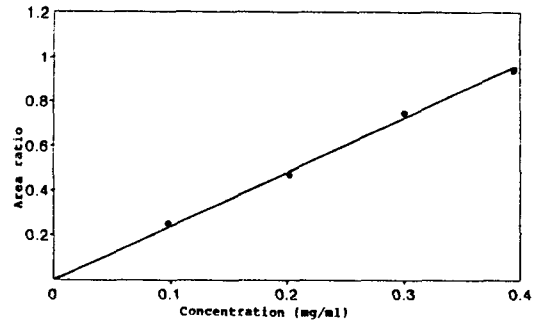


Fig. 1. Calibration curves for kaempferol 7-O-β-D-glucopyranoside.

회귀직선 방정식은 $Y=2.3824X+0.0098$ 으로서 그 직선성을 검정한 결과 그 상관계수가 각각 0.9989로서 1.0에 접근하므로 표준물질과 내부표준 물질의 중량비(X)와 peak 면적비(Y)간에 직선성이 인정되었다.

화합물 1의 정량

건조한 MeOH 엑스 400mg을 정량하여 이를 MeOH 5ml에 용해시키고 이 용액과 내부표준물질을 정확히 1 : 1로 혼합한 것을 검액(40mg/ml)으로 사용하였다. 검액 20μl을 주입하여 HPLC chromatogram을 얻고 이로부터 면적비를 구하였다.

결과 및 고찰

Serine protease는 혈관 확장이나 모세혈관의 투과성 항진 등을 촉진하며 백혈구의 유주를 간접적으로 촉진하여 염증에 관여하는 chemical mediator인 kinin의 유리에 관여하는 효소로 알려져 있다. 그러므로 본 실험에서는 꾸지뽕나무 잎의 항염증 활성을 검색하고자 serine protease의 하나인 trypsin을 이용하여 trypsin 효소 활성억제를 측정하였다^{14,15)}.

검액 EtOAc분획 1.0mg/ml의 농도에서 가장 강한 33.6%의 저해율을, n-BuOH 분획 1.0mg/ml의 농도에서 22.0%의 저해율을 보였으며 검액 MeOH엑스와 H₂O분획에서는 별다른 영향을 미치지 못하였다. 특히 양성 대조약물로 사용한 soybean trypsin inhibitor의 저해율 51.3%에는 미치지 못하나 EtOAc분획물에서는 강한 억제 활성을 나타내었다 (Table 1).

MeOH 엑스로부터 용매분획한 EtOAc 분획과 n-BuOH 분획에서 효소활성 저해가 관찰되어 serine protease가 항염증효과와 밀접한 관련성을 갖고 있는 점 등을 고려할때 꾸지뽕나무 잎의 EtOAc분획과 n-BuOH 분획에서 serine protease inhibitor 성분이 함유되어 있

Table 1. Inhibitory activity of *Cudrania tricuspidata* on the hydrolysis of casein by trypsin *in vitro*

Groups	Concentration (mg/ml)	Activity (Abs. at 660nm)	Inhibition percent (%)
Control	-	0.8068	-
MeOH	1.0	0.7590	5.9
CHCl ₃	1.0	0.8059	0.1
EtOAc	1.0	0.5360	33.6
<i>n</i> -BuOH	1.0	0.6295	22.0
H ₂ O	1.0	0.7745	4.0
Soybean trypsin inhibitor	0.025	0.3929	51.3

는 것으로 사료된다.

그리고 *Staphylococcus aureus*를 비롯한 5개의 균주에 대한 검액의 항균효과를 측정된 결과를 Table 2에 제시하였다. 검액 MeOH엑스와 EtOAc분획은 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 및 *Bacillus subtilis*에 대하여 항균작용을 보였고 다른 균주에 대하여서는 별다른 영향을 주지 못하였다. 또한 검액 CHCl₃, *n*-BuOH, H₂O 분획은 사용한 균주에 대하여 항균작용을 나타내지 않았다. 그러므로 꾸지뽕나무잎의 항균효과 성분은 MeOH엑스 중 EtOAc분획에 함유되어 있는 것으로 추정된다.

EtOAc 분획중의 주성분인 화합물 1은 ¹H-NMR spectrum에서 meta coupling을 하고 있는 두 aromatic proton의 signal [δ6.78 (1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.41 (1H, d, J=2.0Hz, H-6)]과 ortho coupling을 하고 있는 두 aromatic proton유래의 signal [8.07 (2H, d, J=8.8Hz, H-2' & -6'), 6.93 (2H, d, J=8.8Hz, H-3' & -5')] 외에, anomeric proton유래의 signal [δ5.06 (1H, d, J=7.0Hz, H-1)]이 관측되었다. 그리고 ¹³C-NMR spectrum에서 kaempferol 및 D-glucopyranose¹⁶⁾ 유래의 signal [δ99.9 (C-1"), 73.2 (C-2"), 77.2 (C-3"), 69.6 (C-4"), 76.5 (C-5"), 60.7 (C-6")]이 관측되어, 이상의 data로부터 화합물 1은 kaempferol glucoside로 추정되었다. 한편 화합물 1은 UV spectrum에서 MeOH 용매로 측정하였을 경우 band I이 376nm에서 관측되어 C-3위치에 free hydroxyl group 존재가, NaOAc 용매중에서 측정하였을 경우 band II의 파장변화가 관측되지 않아 ¹³C-NMR data의 결과와 함께 당의 결합위치를 고려할때 kaempferol의 C-7위치에 D-glucopyranose의 존재가 확인되었으며, 아울러 anomeric proton의 coupling constant (7.0Hz)로부터 화합물 1의 화학구조는 kaempferol 7-O-β-D-glucopyranoside로 결정하였다(Fig. 2). MeOH 엑스중의 kaempferol 7-O-β-D-glucopyra-

Table 2. Antimicrobial activity of *Cudrania tricuspidata*

Groups	Dose (mg/ml)	St. aureus	Ser. macesence	Ps. aeruginosa	E. coli	B. subtilis
MeOH	100	+	-	-	-	+
CHCl ₃	100	-	-	-	-	+
EtOAc	100	++	-	-	+	+
<i>n</i> -BuOH	100	-	-	-	-	-
H ₂ O	100	-	-	-	-	-

Inhibitory zone diameter : - below 10mm, + 10-15mm, ++ above 20mm

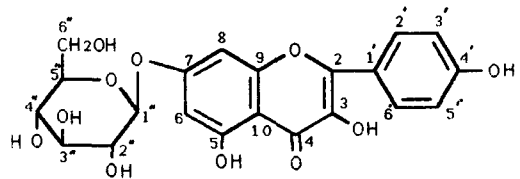


Fig. 2. Structure of kaempferol 7-O-β-D-glucopyranoside.

noside 함량을 분석하기 위하여 HPLC를 실시하였다. 실험부에서와 같이 조제한 검액 일정량을 취하여 HPLC를 실시하고 이로부터 얻은 평균 area ratio(y) 값은 0.3062이므로 회귀방정식에 대입해서 weight ratio값을 구하면 1.2441mg/400mg이다. 따라서 MeOH 엑스중의 kaempferol 7-O-β-D-glucopyranoside의 함량은 0.31%(w/w) 함유되어 있음을 알았다. 그리고 주성분인 kaempferol 7-O-β-D-glucopyranoside의 생리활성은 계속 검토중이다.

요 약

한국산 꾸지뽕나무 잎을 추출하여 생리활성 및 flavonoid 성분의 함량을 HPLC로 정량하였다. MeOH중 EtOAc 및 *n*-BuOH분획은 trypsin 효소활성 저해능을 나타내므로서 항염증활성 성분은 이 분획에 있을 것으로 사료되며, 또한 EtOAc분획은 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과도 있음을 발견하였다. EtOAc 분획에서 kaempferol 7-O-β-D-glucopyranoside 성분을 분리 하여 MeOH 엑스중 함량을 측정된 결과 0.31% (w/w)함유되어 있음을 알 수 있었다.

문 헌

1. 이창복 : 대한식물도감. 향문사, p.285 (1985)
2. 강소신의학원 : 중약대사전(제2권). 소학관, p.2383 (1985)

3. 문화방송 : 한국민간요법대전. 금박출판사, p.31 (1987)
4. Nomura, T., Hano, Y. and Fujimoto, T. : Three new isoprenylated xanthones, cudraxanthone A, B and C, from the root barks of *Cudrania tricuspidata*. *Heterocycles*, **20**, 213 (1983)
5. Fujimoto, T., Hano, Y. and Nomura, T. : Components of root bark of *Cudrania tricuspidata*. Structures of four new isoprenylated xanthones, cudraxanthones A, B, C and D. *Planta Medica*, **50**, 218(1984)
6. Hano, Y., Matsumoto, Y., Sun, J. and Nomura, T. : Structures of four new isoprenylated xanthones. Cudraxanthones H, I, J and K. *Planta Medica*, **56**, 56 (1990)
7. Fujimoto, T. and Nomura, T. : Structures of cudraflavone A and euchrestaflavanone C. *Heterocycles*, **22**, 997 (1984)
8. Fujimoto, T., Hano, Y., Nomura, T. and Uzawa, J. : Components of root barks of *Cudrania tricuspidata* 2. Structures of two new isoprenylated flavones, Cudraflavones A and B. *Planta Medica*, **50**, 161 (1984)
9. Fujimoto, T. and Nomura, T. : Components of root bark of *Cudrania tricuspidata* 3. Isolation and structure studies on the flavonoids. *Planta Medica*, **51**, 190 (1985)
10. Young, H. S., Park, J. H., Park, H. J. and Choi, J. S. : Chemical study on the stem of *Cudrania tricuspidata*. *Arch. Pharm. Res.*, **12**, 39 (1989)
11. Park, J. C., Young, H. S. and Choi, J. S. : Constituents of *Cudrania tricuspidata* in Korea. *Yakhak Hoeji*, **36**, 40 (1992)
12. Anson, M. L. : The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79(1938)
13. Tsutomu, U., Hiroshi, K. and Zen-ichi, O. : Anti-inflammatory effect of extract from *Phellodendri* cortex. *J. Med. Pharma. Society for WAKAN-YAKU*, **6**, 158 (1989)
14. Nakagawa, H., Watanabe, K. and Shuto, K. : Anti-inflammatory effect of proteinase inhibitors suppress on carrageenin-induced inflammation in rats. *Bioc-hem. Pharmacol.*, **32**, 1191(1983)
15. Nakagawa, H., Shuto, K., Isaji, M. and Watanabe, K. : Proteinase inhibitors suppress the formation of granulation tissue in the carrageenin-induced inflammation. *J. Pharmacobio. Dyn.*, **4**, 429(1981)
16. Markham, K. R., Ternai, B., Stanley, B., Geiger, H. and Mabry, T. J. : Carbon-13 NMR studies of flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*, **34**, 1389 (1978)
17. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. : *The systematic identification of flavonoids*. Springer, N. Y., p.44 (1970)

(1992년 10월 5일 접수)