

## 百花蛇舌草의 成分에 관한 研究

金榮姬\*

### Studies on the Constituents of *Oldenlandia diffusa*

Young-Hee Kim\*

**ABSTRACT** : From the whole plants of *Oldenlandia diffusa* ursolic acid together with sterols,  $\beta$ -sitosterol and its 3-O- $\beta$ -D-glucoside were isolated and characterized mainly by means of spectroscopic methods. Based on the present findings, it may be considered that this plant may contribute to be a rich source for ursolic acid.

百花蛇舌草는 *Oldenlandia diffusa*(Willd.) Roxb. [= *Hedyotis diffusa* Willd. ; Rubiaceae]를 原植物로 하는 生藥으로서 중국에서는 各種 癌, 요료감염, 맹장염, 급·만성기관지염 등에 單用으로 사용하거나<sup>1)</sup> 또는 복합제제로서 사용되고 있으며 특히 制癌效果가 탁월한 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 이 식물의 成分에 관한 연구로서는 1981년 Nishihama 등<sup>3)</sup>이 iridoid성분인 6-O-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, 6-O-*p*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester, 6-O-*p*-feruloyl scandoside methyl ester를 분리하여 보고하였고, 1982년에는 Takagi 등<sup>4)</sup>이 asperuloside, scandoside methyl ester, asperulosidic acid, geniposidic acid와 scandoside를 분리하여 보고하였다. 1986년 Ho 등<sup>5)</sup>은 백화사설초의 hexane soluble fraction으로부터 anthraquinone 유도체를 분리하여 그의 구조를 2, 3-dimethoxy-6-methyl anthraquinone으로 확정하여 보고하였다. 1991년 Wu 등<sup>6)</sup>은 3종류의 iridoid를 추가로 분리하여 이들의 구조를 Z-6-O-*p*-methoxycinnamoyl

scandoside methyl ester, Z-6-O-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, Z-6-O-*p*-feruloyl scandoside methyl ester로 발표하였다. 한편 이 식물의 生理活性研究로는 1992년 Wong 등<sup>7)</sup>이 백화사설초의 수용성엑스가 benzo[a]pyrene계 화합물에 대하여 antimutagenic activity를 갖고 있음을 보고하였다. 따라서 著者は 국산생약자원의 開發과 이의 活用을 위하여 國內產 재료에 대하여서는 이 식물의 전초로부터 3종의 化合物을 單離하여 그 구조를 究明하였기에 報告한다.

본 研究結果는 尙志大學校에서 支援한 '94년도 校內 研究費에 의해서 遂行되었으며 이에 감사드립니다.

### 材料 및 方法

#### 1. 器 機

融點은 Mitamura-Riken의 미량용점측정기를 사용하여 측정하였으며 補正하지 않았다. IR spectrum은 Perkin-Elmer 283B spectrophotometer를

\* 상지대학교 한약재료학과(Dept. of Materia Medica, Sangji Univ., Wonju 220~702, Korea)

(<'95. 7. 3 接受)

\* 본 연구결과는 尙志大學校에서 지원한 '94년도 校內研究費에 의해서 遂行되었음.

사용하여 KBr법으로 측정하였고, Mass spectrum 및 GC/MS spectrum은 Hewlett-Packard 5985B GC/MS System을 사용하였으며, NMR spectrum은 Bruker AM-300 spectrometer를 사용하여 측정하였다.

## 2. 實驗材料

1993년 3월에 서울의 한약재상에서 구입하여 감정 후 사용하였다.

## 3. 抽出 및 分割

건조한 백화사설초의 전초(3kg)을 세절한 후 MeOH를 가하여 수욕상에서 3회 추출한 후 감압농축하여 얻은 MeOH엑스에  $\text{CHCl}_3$  및 물을 거의 동량가하여 진탕한 후 방치하여  $\text{CHCl}_3$ 분획 30.6g을 얻고, 계속하여 수층을 EtOAc 및 BuOH로 분획하여 EtOAc 및 BuOH분획을 각각 1.7g 및 11.9g을 얻었다.

## 4. 各 分획의 column chromatography

$\text{CHCl}_3$ 분획 10g을 silica gel column에 걸고 hexane-EtOAc 혼합용매를 사용하여 기울기 용리(0, 10, 20, 30%)시켜 얻은 소분획 5를 MeOH로 재결정을 반복하여 백색 분말의 화합물 I (23mg)를 얻었다.

mp 138~140°, IR  $\text{max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$  3420(OH), 1640, 975(disubstituted double bond), 842, 820, 796(trisubstituted double bond); MS,  $m/z$  414[M]<sup>+</sup>, 412[M]<sup>+</sup>, 369, 357, 329, 303, 275, 273, 271, 255, 253, 231, 213; GC/MS; column: OV-1(25m) capillary column, column temp. 240°(2 min) → 280°; rate: 5°/min.

EtOAc분획 1.7g을 silica gel column에 걸고  $\text{CHCl}_3$ -MeOH혼합용매를 사용하여 기울기 용리(0→7%)시켜 얻은 소분획 3을 MeOH로 재결정을 반복하여 백색분말의 화합물 II (464mg)를 얻었다.

mp 287~288°, IR  $\text{max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$  3360(OH), 2900(CH), 1695(COOH), 1450, 1370; MS,  $m/z$ (rel. int., %) 456[M]<sup>+</sup>(2.3), 438(1.1), 248(100), 207

(16.5), 203(33.3), 189(8.6), 175(4.3), 133(12.5); <sup>1</sup>H-NMR(300MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) 0.90(3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.96(3H, d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 30-CH<sub>3</sub>), 1.01(3H, d,  $J=6.5\text{Hz}$ , 29-CH<sub>3</sub>), 1.02(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.06(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.24(6H, s, 2x CH<sub>3</sub>), 2.63(1H, d,  $J=11.3\text{Hz}$ , H-18), 3.45(1H, dd,  $J=6.9, 9.2\text{Hz}$ , H-3), 5.49(1H, t,  $J=3.3\text{Hz}$ , H-12); <sup>13</sup>C-NMR: Table 1 참조.

Table 1. <sup>13</sup>C-NMR data of compounds II and III in pyridine-d<sub>5</sub>.

Carbon No.	Compound II	Compound III
C- 1	39.18	37.59
C- 2	28.17	30.34
C- 3	78.21	78.63
C- 4	39.42	39.45
C- 5	55.91	141.07
C- 6	18.85	121.91
C- 7	33.65	32.25
C- 8	40.06	32.19
C- 9	48.12	50.50
C-10	37.36	37.03
C-11	23.69	21.37
C-12	125.72	40.08
C-13	139.33	42.60
C-14	42.58	57.00
C-15	28.85	24.59
C-16	24.98	28.57
C-17	48.12	56.41
C-18	53.63	12.05
C-19	39.55	19.32
C-20	39.46	36.44
C-21	31.14	19.10
C-22	37.49	34.36
C-23	28.75	26.65
C-24	16.58	46.21
C-25	15.72	29.67
C-26	17.51	19.47
C-27	23.69	20.00
C-28	179.86	23.54
C-29	17.54	12.23
C-30	21.43	-
Glc C- 1		102.68
C- 2		75.36
C- 3		78.38
C- 4		71.88
C- 5		78.32
C- 6		62.99

BuOH 분획 11.7g을 silica gel column에 걸고 EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O(100:16.5:13.5) 혼합용매를 사용하여 용리시켜 얻은 소분획 5를 MeOH로 재결정을 반복하여 백색분말의 화합물 III(17mg)를 얻었다.

mp 296-8°, IR  $\text{max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$  3400(OH), 2959, 2936(CH), 1457, 1380, 1077, 1073, 880; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) 0.68(3H, d, *J*=4.8Hz, CH<sub>3</sub>), 0.88(3H, 3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.88(3H, t, *J*=6.5Hz, CH<sub>3</sub>), 0.95(3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.99(3H, d, *J*=6.2Hz, CH<sub>3</sub>), 3.91(2H, m, H-3, Glc H-5), 5.01(1H, d, *J*=7.6Hz, Glc H-1), 5.34(1H, brd, *J*=4.3Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR: Table 1 참조.

## 結果 및 考察

化合物 I은 Liebermann-Burchard 반응에 陽性이고 그의 IR spectrum은 전형적인 sterol의 spectrum을 보여주었다. 이 물질은 TLC상에서 하나의 spot로 나타났으나 이 물질을 GC/MS를 실시한 결과 2개의 peak가 나타나고 각각의 mass spectrum은 분자이온 peak가 *m/z* 414 및 412에서 나타나며 이외에도 일반적으로 sterol에 공통적으로 나타나는 ion peak가 *m/z* 273, 255, 231, 213 등에서 관찰되었다. *m/z* 329, 303, 275에서도 peak가 존재함은 이들 sterol이 Δ<sup>5</sup>-sterol임을推定할 수 있으며 분자량이 414인 화합물은 β-sitosterol로 解析된다. 또한 *m/z* 369, 351에 peak가 존재하는 것으로 보아 분자량 412인 物質은 Δ<sup>5,22</sup>-sterol인 stigmasterol임을推測할 수 있었다<sup>8,15</sup>. 이와같은 結論은 이들의 mass spectrum의 분열패턴이 β-sitosterol과 stigmasterol의 標準品과 一致하는 것으로 미루어 보아 화합물은 I은 주성분이 β-sitosterol이고 소량의 stigmasterol이 含有되어 있는 sterol임을 確認할 수 있었다.

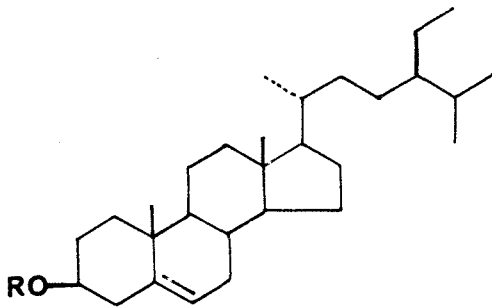
化合物 II는 Liebermann-Burchard test에 양성을 나타내고, IR spectrum에서 3360(OH), 2900(CH), 1695(COOH), 1450, 1370 cm<sup>-1</sup>에서 흡수대를 나타내는 것으로 보아 triterpene계 화합물로 추정되었다. Mass spectrum에서 *m/z* 456에서 분

자이온 peak를 나타내었으며 triterpene계의 특징적인 fragmentation인 retro Diels-Alder 분해에 의해 생성된 ion peak인 *m/z* 248이 base peak로 나타되며, 이 이온에서 COOH가 脫離되어 생성된 이온이 *m/z* 203에서 나타나는 것으로 보아 하나의 이중결합이 C-12, 13위치에 존재하며 D/E ring의 C-17위치에 COOH가 존재함을 알 수 있었고, A/B ring부분에 해당하는 이온 peak가 *m/z* 207에서 나타나는 것으로 보아 A/B ring 위치에 하나의 OH기가 존재함을 알 수 있었다<sup>9</sup>.

그러나 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 5개의 angular methyl기가 각각 singlet로 나타나고 0.96 및 1.01ppm에서 각각 doublet로 2개의 secondary methyl기가 나타나며, H-18 proton이 2.63ppm에서 *J*=11.3Hz의 doublet로 나타나는 것으로 보아 이 화합물은 oleanane계가 아니고 ursane계임을 알 수 있었다<sup>10</sup>. 또한 A/B ring에 결합되어 있는 하나의 OH기는 이 OH기가 결합되어 있는 methine proton이 3.45ppm에서 *J*=6.9 및 9.2Hz의 doublet로 나타나는 것으로 보아 C-3位置에 β 결합하고 있음을 알았다<sup>11</sup>. 따라서 이 화합물은 3β-hydroxyurs-12-ene-28-oic acid 즉 ursolic acid임을 알았으며 이 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR data도 이를 뒷받침하고 있음을 알았다. Ursolic acid는 지금까지 많은 식물로부터 분리 보고 되었으며<sup>12</sup> 다양한 生理活性이 보고된<sup>12-14</sup> 중요한 화합물로서 百花蛇舌草에도 다량 含有되어 있음이 이번 실험결과 確認되었으므로 ursolic acid의 주요한 資源植物임을 확인할 수 있었다. 또한 문헌<sup>11</sup>에 의하면 oleanolic acid도 含有되어 있다고 보고되어 있으나 oleanolic acid는 含有되어 있지 않음을 확인할 수 있었다.

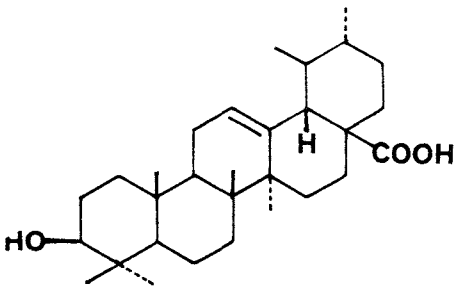
化合物 III도 Liebermann-Burchard 및 Molisch 反應에 각각 陽性を 나타내고 있으므로 sterol glycoside로 推定할 수 있었고, IR spectrum에서 3400cm<sup>-1</sup> 및 1100-1000cm<sup>-1</sup> 領域에서 강한 band가 나타나는 것으로도 推定할 수 있었으며 이외에도 880cm<sup>-1</sup>에서 peak가 나타나는 것으로 β-glycoside 결합으로 되어 있음을 推定할 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 0.67 및 0.94ppm에서

angular methyl singlet signal이 나타나고 5.34ppm에서 H-6 proton이 나타났으며 糖의 anomeric proton이 5.01ppm에서  $J=7.6\text{Hz}$ 의 doublet로 나타나는 것으로 보아  $\beta$ -sitosterol의 C-3 OH에 糖이  $\beta$  결합하고 있음을 알 수 있었다<sup>15)</sup>. 이 化合物의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum을 보면 62~103ppm사이에서 나타나고 있는 당의 carbon chemical shift 값은 glucose와 완전히 일치하므로 이 化合物는  $\beta$ -sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucoside로 確定할 수 있었다.



I R = H

III R = Glucose



II

### 摘 要

國內에서 生産된 百花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa*(Willd.) Roxb. 의 전초로부터 얻은 MeOH extract를  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc 및 BuOH로 分획하여 얻

은 fraction으로 부터 column chromatography를 실시하여 3종의 化合物를 분리하였다. 이들의 理化學的 및 分光學的 data를 종합하여 化合物 I의 化學구조는  $\beta$ -sitosterol에 少量의 stigmasterol이 함유된 sterol이며, 化合物 II는 ursolic acid이고, 化合物 III은  $\beta$ -sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucoside임을 밝혔다. 이 식물은 다양한 生理活性이 報告된 ursolic acid의 중요한 資源植物이 될 수 있음을 本 실험을 통하여 밝혔으며 文獻에 報告된 oleanolic acid는 含有되어 있지 않음을 알았다.

### 引用文獻

1. 上海科學技術出版社. 1979. 中藥大辭典. 小學官. 上海. 2052p.
2. 陳存仁. 1982. 圖說漢方醫藥大辭典. 講談社. 東京. 228p.
3. Nishihama, Y., K. Masuda, M. Yamaki, S. Takagi and K. Sakina. 1981. Three New Iridoid Glucosides from *Hedyotis diffusa*. *Planta Med.* 43 : 28~33.
4. Takagi, S., M. Yamaki, Y. Nishihama and K. Ishiguro. 1982. On the Iridoid Glucosides of the Chinese Drug "bai hua she she cao". *Shoyakugaku Zasshi* 36 : 366~9.
5. Ho, T.-I., G.-P. Chen, Y.-C. Lin, Y.-M. Lin and F.-C. Chen. 1986. An Anthraquinone from *Hedyotis diffusa*. *Phytochemistry* 25 : 1988~9.
6. Wu, H., X. Tao, Q. Chen and X. Lao. 1991. Iridoids from *Hedyotis diffusa*. *J. Nat. Prod.* 54 : 254~6.
7. Wong, B. Y. Y., B. H. S. Lau and R. W. Teel. 1992. Chinese medicinal herbs modulate mutagenesis, DNA binding and metabolism of benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol-9, 10-epoxide. *Cancer Letters* 62 : 123~131.
8. Kim, C. M. and Kang, S. S. 1986. Studies on the Constituents of the Stems of *Echinosophora koreensis*. *Yakhak Hoeji* 30 : 139~142.

9. Budzikiewicz, H., J. M. Wilson and C. D. Jerassi. 1963. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. X X X II. Pentacyclic Triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 85 : 3688~3699.
10. Cheung, H. T. and T. C. Yan. 1972. Constituents of Dipterocarpaceae Resins. IV. Triterpenes of *Shorea acuminata* and *S. resinosa-nigra*. *Aust. J. Chem.* 25 : 2003~12.
11. Kang, S. S. and W. S. Woo. 1986. Synthesis of Epialauritolic acid. *Arch. Pharm. Res.* 9 : 153~6.
12. Harborne, J. B. and H. Baxter. 1993. *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants.* Taylor & Francis. London. 687p.
13. Balanehru, S. and B. Nagarajan. 1994. Triterpene intervene in Adriamycin-induced histamine release in rodents. *Med. Sic. Res.* 22 : 357~9.
14. Kim, K. H., M. V. Chang, E. Y. Kim, K. Y. Park and Y. I. Sunwoo. 1993. Effects of linoleic acid and ursolic acid on T subsets in sarcoma 180-transplanted mice. *Korean J. f Microbiology* 28 : 239~49.
15. Goad, L. J. 1991. *Phytosterols* (in *Methods in Plant Biochemistry*). Academic Press. London. 369p.