

복분자 딸기 잎의 페놀성 물질

이 민 원

중앙대학교 약학대학

(Received March 23, 1995)

Phenolic Compounds from the Leaves of *Rubus coreanum*

Min-Won Lee

College of Pharmacy, Chung-Ang Univ., Seoul 156-756, Korea

Abstract—Chemical examination of the leaves of *Rubus coreanum* has led to the isolation and characterization of six phenolic compounds. The structures of these compounds were elucidated as kaempferol(1), quercetin(2), sodium salt of quercetin 3-O-β-D-glucuronide(3), sodium carboxylate of quercetin 3-O-β-D-glucuronide(4), ellagic acid(5) and sanguin H-5(6) on the basis of physico-chemical and spectroscopic evidences.

Keywords □ *Rubus coreanum*, Rosaceae, Flavonoid, ellagitannin

생리활성이 있는 식물의 페놀성 물질에 대한 연구로 저자는 장미과(Rosaceae)에 속하는 복분자딸기(*Rubus coreanum*)의 줄기로부터 2종의 flavan-3-ol과 1종의 proanthocyanidin 및 1종의 ellagitannin을 분리하여 보고한 바 있다.¹⁾ 본 연구는 그 잎으로부터 4종의 flavonoids 즉, kaempferol, quercetin, sodium salt of quercetin-3-O-β-D-glucuronide, sodium carboxylate of quercetin 3-O-β-D-glucuronide 그리고 ellagic acid 및 1종의 ellagitannin인 sanguin H-5를 분리하여 그 구조를 밝혔다.

실험방법

실험재료

실험에 사용한 복분자(*Rubus coreanum*, 5.5 kg) 잎은 1994년 8월 중앙대학교 약초원에서 채집하여 줄기와 잎을 분리한 후 음건하여 사용하였다.

시약 및 기기

TLC는 precoated Silicagel 60 F₂₅₄(Merck)와 precoated Cellulose F₂₅₄(Merck)를 사용하였고 반점의 확인은 UV-lamp와 FeCl₃, NaNO₂-HOAc 및 10%

H₂SO₄(분무후 가열)용액을 사용하였다. 컬럼크로마토그래피는 Amberlite XAD-2(20~50 mesh, Fluka), Sephadex LH 20(75~230 μm, Pharmacia), MCI-gel CHP-20P(75~150 μm, Mitsubishi), Toyopearl HW 40F(30~60 μm, Tosoh)를 사용하였고, IR spectrophotometer는 Shimadzu IR-435(Japan), UV spectrophotometer는 Cary-3, Varian(U.S.A), ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrometer는 JNM-EX90A, 90 MHz(Japan), Bruker AM-200, 200 MHz(Germany) 및 Bruker AMX-500, 500 MHz(Germany)를 사용하였고, EI-Mass spectrometer는 GC-MS/MS-DS, TSQ 70 0(U.S.A) 그리고 Negative FAB-Mass spectrometer는 VG70-VSEQ(England)를 사용하였고 원소분석은 Buck Sci A-200(U.S.A)를 사용하였고, Polarimeter는 Jasco DIP-370(Japan)을 사용하였다.

추출 및 분리

음건한 재료를 80% 아세톤으로 실온에서 3회 추출하여 감압하 저온(45°C)에서 농축한 후 수층을 에테르로 탈지한 후 여과하여 Amberlite XAD-2 수지를 이용하여 물부터 시작하여 100% MeOH까지 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 분획한 후 (7개분획) 그

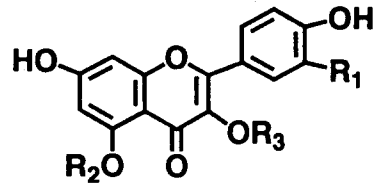
중 분획 7을 선택하여 Sephadex LH-20(78×300 mm)으로 80% EtOH로 부터 ellagic acid(5, 300 mg)와 kaempferol(1, 300 mg), quercetin(2, 250 mg), quercetin 3-O-β-D-glucuronide Na-salt(3, 200 mg)을 분리하였고 MCI-gel(H₂O-MeOH)과 Sephadex LH-20(80% EtOH)을 반복 사용하여 quercetin 3-O-β-D-glucuronide sodium carboxylate(4, 250 mg)을 분리하고 Toyopearl HW-40F(30% EtOH)로 중압 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 sanguin H-5(6, 150 mg)를 얻었다.

Compound 1, 노란색 분말—UV λ_{max}nm(MeOH): 368.0(4.20), 322.0(2.13), 264.0(3.57)nm, (MeOH + NaOMe): 424.0(4.55), 325.0(2.20), 285.0(3.89)nm, (MeOH + AlCl₃): 416.0(3.41), 350.0(2.03), 303.0(1.56), 273.0(3.32)nm, (MeOH + AlCl₃ + HCl): 415.0(3.35), 348.0(2.20), 303.0(1.52), 270.0(3.27)nm, (MeOH + NaOAc): 373.0(2.01), 307.0(1.22), 270.0(2.13), (MeOH + NaOAc + H₃BO₃): 368.0(2.16), 309.0(1.20), 265.0(2.13)nm

¹H-NMR(90 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.20(1H,d,J=2.0 Hz, H-6), 6.44(1H,d,J=2.0 Hz,H-8), 6.93(2H,d,J=8.8 Hz,H-3,H-5), 8.05(2H,d,J=8.8 Hz,H-2,H-6), 12.44(1H,s,5-OH).

Compound 2, 노란색 분말—UV λ_{max}nm(MeOH): 369.0(0.67), 255.0(1.96) nm,(MeOH + NaOMe): 411.0(0.48), 330.0(1.30), 279.0(1.41)nm, (MeOH + AlCl₃): 454.0(0.86), 270.0(1.29)nm, (MeOH + AlCl₃ + HCl): 427.0(0.69), 363.0(0.37), 259.0(1.11)nm, (MeOH + NaOAc): 375.0(0.33), 275.0(0.44), 258.0(0.44)nm, (MeOH + NaOAc + H₃BO₃): 382.0(0.42), 261.0(0.63)nm; ¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.28(1H,d,J=1.6Hz, H-6), 6.58(1H,d,J=1.6 Hz,H-8), 7.00(1H,d,J=8.0 Hz,H-5), 7.67(1H,ddJ=2.0,8.0 Hz,H-6), 7.75(1H,d,J=2.0 Hz,H-2), 12.30(1H,s,5-OH); ¹³C-NMR(125 MHz, DMSO-*d*₆): (Table I.); EI-MS(*m/z*): 302 [M]⁺.

Compound 3, 노란색 분말—IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 1654 (C=O), 1603,1560(C-C),1084(glycosidic C-O), UV λ_{max}nm(MeOH): 349.0(1.67), 265.0(2.15)nm, (MeOH + NaOMe): 397.0(2.32), 321.0(1.45), 275.0(2.50)nm, (MeOH + AlCl₃): 351.0(0.42), 270.0(0.60)nm, (MeOH + AlCl₃ + HCl): 347.0(0.41), 268.0(0.56)nm, (MeOH



	R ₁	R ₂	R ₃
1:	H	H	H
2:	OH	H	H
3:	OH	Na	glucuronic acid
4:	OH	H	glucuronic acid-Na

+ NaOAc): 359.0(0.33), 267.0(0.53)nm, (MeOH + NaOAc + H₃BO₃): 360.0(0.55), 267.0(0.40)nm; ¹H-NMR(200 MHz, Me₂CO-*d*₆ + D₂O): δ 5.09(1H,d,J=6.5 Hz,anomeric H), 6.18(1H,d,J=1.7 Hz,H-6), 6.38(1H,d,J=1.7 Hz,H-8), 6.82(1H,d,J=8.4 Hz,H-5), 7.38(1H,ddJ=2.0,8.4 Hz,H-6), 8.30(1H,d,J=2.0 Hz, H-2); ¹³C-NMR(50 MHz, DMSO-*d*₆): (Table I.); Negative FAB-MS(*m/z*): 501[M-H]⁻, 325[M-glucuronic acid]⁻.

물질 3의 산 가수분해: 3(50 mg)을 60% dioxane 10 ml와 c-HCl 2.5 ml를 가해 수욕상에서 2시간 반응시켜서 ammonia수로 중화한후 EtOAc로 추출하여 물로 세척하고, 그 추출액을 Sephadex LH-20 column chromatography로 정제하여 3a를 얻었다. 남은 모액은 감압농축 후 TLC로 glucuronic acid의 존재를 확인하였다. 3a, 갈색분말, ¹H-NMR(90 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.15(1H,d,J=2.0 Hz,H-6), 6.37(1H,d,J=2.0 Hz,H-8), 6.83(1H,d,J=8.0 Hz,H-5), 7.50(1H,ddJ=1.8,8.0 Hz,H-6), 7.63(1H,d,J=1.8 Hz,H-2), 12.43(1H, s,5-OH)

Compound 4-노란색 분말—IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 1772, 1655, 1597(C=C), 1072(glycosidic C-O), UV λ_{max} nm (MeOH): 358.0(0.17), 256.0(0.24)nm, (MeOH + NaOMe): 407.0(0.23), 272.0(0.30)nm, (MeOH + AlCl₃): 417.0(0.72), 271.0(0.97)nm, (MeOH + AlCl₃ + HCl): 363.0(0.46), 268.0(0.76)nm, (MeOH + NaOAc): 368.0(0.33), 266.0(0.51) nm, (MeOH + NaOAc + H₃BO₃): 375.0(0.41), 261.0(0.41)nm; ¹H-NMR(200 MHz, DMSO-*d*₆): 5.51(1H,d,J=6.9 Hz, anomeric-H), 6.20(1H,d,J=1.7 Hz,H-6), 6.45(1H,d,J=1.7 Hz,H-8), 6.80(1H,d,J=8.4 Hz,H-5), 7.52(1H,d,J=2.0 Hz,H-2), 7.62(1H,ddJ=2.0,8.4 Hz,H-6), 12.52

Table 1— ^{13}C -NMR Chemical shifts of Compound 2-4 in DMSO-d_6

Carbon Number	2	3	4
2	147.2	157.7	156.3
3	136.6	134.2	133.2
4	176.5	177.7	177.3
5	161.5	161.1	161.3
6	99.1	98.1	98.9
7	165.1	165.5	164.4
8	94.8	93.9	93.7
9	157.9	156.6	156.4
10	103.9	103.7	104.0
1'	123.5	120.7	121.9
2'	115.6	115.5	115.4
3'	145.9	144.9	145.1
4'	148.4	148.5	148.8
5'	116.1	118.2	116.2
6'	121.4	120.6	121.0
GlcUA 1'		103.2	101.2
2'		74.3	73.9
3'		76.8	76.1
4'		71.5	71.5
5'		74.3	76.1
6'		172.3	169.9

(1H,s,5-OH); ^{13}C -NMR(50 MHz, DMSO-d_6): (Table I); EI-MS(m/z): 502[M] $^+$, 302[M-glucuronic acid-Na] $^+$, 153, 137

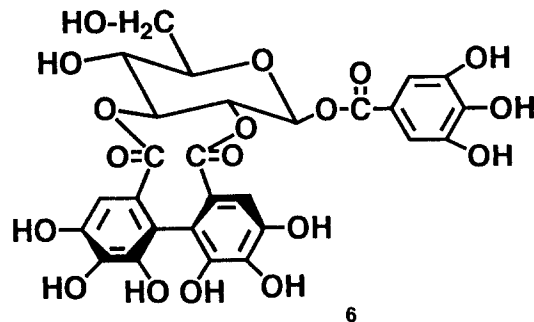
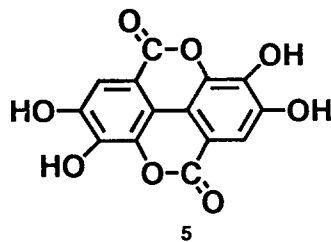
물질 4의 산 가수분해: 3과 같은 조건으로 가수분해를 실시하여 4a를 얻었고 4a는 3a와 동일하였다(1H-NMR, TLC). 모액으로부터 glucuronic acid를 확인하였다.

Compound 5, 갈색 분말—IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1700(C=O), 1620(C=C); ^1H -NMR(90 MHz, DMSO-d_6): 7.47(2H,s); EI-MS(m/z): 302[M] $^+$.

Compound 6, 갈색 분말— ^1H -NMR(90 MHz, $\text{Me}_2\text{CO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$): 4.92(1H,d,J=9.0 Hz,H-2), 5.14(1H,t,J=9.0 Hz,H-3), 6.05(1H,d,J=9.0 Hz,H-1), 6.38, 6.68 (each 1H,s,HHDP-H), 7.10(2H,s,galloy-H), Negative FAB-MS(m/z): 633[M-H] $^-$.

결과 및 고찰

Compound 1은 FeCl_3 용액과 Mg-HCl 반응에 양성을 나타내었고 UV 스펙트럼의 368, 322, 264 nm에서



특징적인 flavonol 패턴을 나타내었다. ^1H -NMR 스펙트럼에서 δ 6.20과 6.44에서 H-6과 H-8이 서로 meta 커플링하고있는($J=2.0$ Hz) 5,7-dihydroxy A-ring 패턴을 나타내었고, δ 6.93과 8.05에서 각각 2H의 doublet 시그널($J=8.8$ Hz)은 B-ring이 A_2B_2 타입임을 보여주었다. 그의 aromatic 영역에서 더 이상의 수소가 존재하지 않아 1은 kaempferol로 동정하였다.²⁾

Compound 2는 FeCl_3 시약과 Mg-HCl 반응에 양성이고 UV spectrum에서 362과 258 nm(MeOH)의 전형적인 flavonoid 패턴을 나타내었다. ^1H -NMR 스펙트럼에서 ABX 패턴의 B-ring을 7.75(1H,d, $J=2.0$ Hz,H-2), 7.67(1H,dd, $J=2.0,8.0$ Hz,H-6), 7.00(1H,d, $J=8.0$ Hz,H-5)에서 나타내었고 그 외 δ 6.58과 6.28에서 각각 ^1H 의 doublet signal($J=1.6$ Hz)은 H-8과 H-6으로 3,3',4',5,7-pentahydroxy flavone의 구조임을 알 수 있었다. 또한, EI-MS에서도 m/z 302에서 분자 이온피크를 나타내었고 기타의 data를 표품과 비교를 통해 quercetin으로 동정하였다.^{3,4,5)}

Compound 3은 FeCl_3 시약에 의해 암녹색을 나타내었고 UV 스펙트럼에서도 flavonoid의 전형적인 (349.0, 265.0 nm) 흡수를 나타내었다. ^1H -NMR 스펙트럼에서 2와 대단히 유사한 B-ring의 ABX 패턴과 A-ring의 5,7-dihydroxylation 패턴을 나타내었으나 δ 5.09에서 $J=6.5$ Hz의 anomeric 수소가 나타나 3은 quercetin에 당이 연결된 glycoside임을 추정케 하였다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 δ 103.2, 74.3, 76.8, 71.5,

74.3, 172.3의 시그날은 1몰의 glucuronic acid의 존재를 나타내었고 당은 β-결합을 하고 있음을 알수 있었다. 또한 genin인 quercetin 과 비교해서 C-3 (-2.4 ppm), C-2(+10.5 ppm), C-4(+1.2 ppm)의 shift로부터 당과의 결합은 quercetin의 3번 위치임을 보여주었다. 한편, Negative FAB-MS로 부터 m/z 502의 [M-H] peak가 나타났으며 1 mol의 glucuronic acid가 떨어져 나간 m/z 325가 base peak로 나타나 genin인 quercetin에 24에 해당하는 원소가 붙어 있음을 시사하였고 원소분석결과 Na의 존재를 확인하였다. 또한 ¹H-NMR 스펙트럼에서 DMSO-d₆ 용매하의 12ppm 근처에서 free의 OH에 의한 피크가 없으므로 3은 quercetin의 5번 OH에 Na가 결합하고 있음을 알 수 있었다. 한편, 산 가수분해를 통해 quercetin과 glucuronic acid를 각각 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 3은 quercetin-3-O-β-D-glucuronic acid Na salt로 동정하였다.¹⁰⁾

Compound 4는 FeCl₃ 시약에 의해 암녹색을 나타내고 UV 스펙트럼에 의해 역시 flavonoid임을 추정케 하였다. 특히 ¹H 및 ¹³C-NMR 스펙트럼이 3과 유사하였으나 시그날의 위치가 조금 다르게 나타났으며 EI-MS스펙트럼에서 m/z 302에서 genin(quercetin)에 의한 피크가 나타났으나 [M]⁺ peak는 m/z 502에서 나타나 당(glucuronic acid)에 분자량 24에 해당하는 Na가 치환되어 있음을 시사하였다. 따라서 원소분석을 실시한바 Na의 존재가 나타났으며 4의 IR 스펙트럼에서는 glucuronic acid의 free carboxylic acid에 의한 피크가 나타나지 않아 4는 quercetin 3-O-β-D-glucuronide의 glucuronic acid의 6번의 COOH에 Na가 결합한 quercetin 3-O-β-D-glucuronide의 Na carboxylate로 결정하였다.¹¹⁾

Compound 5는 갈색분말로써 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 7.47의 2H의 signal과 IR spectrum에서 1700에서의 강한 흡수 및 EI-MS 스펙트럼에서 m/z 302의 분자이온피크를 나타내 표품과의 직접 비교를 통하여 ellagic acid로 동정하였다.¹²⁾

Compound 6는 FeCl₃와 NaNO₂ acetic acid에서 양성으로 나타나 ellagitannin임을 추정케 하였고¹³⁾ ¹H-NMR 스펙트럼에서 galloyl기에 의한 δ 7.10에서 2H의 singlet 시그날과 δ 6.38, 6.68에서 각각 1H의 HHDP에 의한 signlet 시그날이 나타나 각각 1개씩의 galloyl기와 HHDP기가 존재하는 것으로 나타났다.

이는 지난번 동일 식물의 줄기에서 분리하여 보고한 sanguin H-4와 같은 경우이나 sanguin H-4의 anomeric 수소는 δ 6.60에서 J=4.0 Hz의 doublet로 나타나 α-configuration으로 동정한 바 있다.¹⁴⁾ 한편 6의 glucose anomeric 시그날은 δ 6.05에서 1H의 doublet 시그날(J=9.0 Hz)로 나타났으며 H-2에 의한 δ 4.92의 doublet 시그날(J=9.0 Hz)과 coupling하고 있으며 이어 H-3의 triplet signal(J=9.0 Hz)이 δ 5.14로 저자장으로 shift된 것으로 나타나 glucose의 1번 OH에 galloyl기가 β 결합하고 2,3번 OH에 HHDP기가 연결된 1-O-galloyl-2,3-HHDP-β-D-glucose로써 Negative FAB-Mass에서도 m/z 633에서 분자이온피크를 나타내었다. 이와 같은 사실들은 표품의 data와 완전 일치하여서 sanguin H-5로 동정하였다.¹⁵⁾

감사의 말씀

본 연구의 일부는 1994년 중앙대학교 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Lee, Y. -A. and Lee, M. -W.: Tannins from *Rubus coreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**, 27 (1995).
- 2) 육창수, 이우철, 문창규: 금강제비꽃의 Flavonoid 배당체(II). *약학회지* **33**, 124 (1989).
- 3) Markham, K. R.: *Techniques of Flavonoid Identification*. p 75, Academic Press. (1982).
- 4) Lee, M. -W.: Flavonoids from the leaves of *Betula platyphylla var. latifolia*. *Kor. J. Pharmacogn.* **25**, 199 (1994).
- 5) Harborne, J. B. and Mabry, T. J.: *The Flavonoids, Advances in Research*, Chapman and Hall, London, New York, p 38 (1982).
- 6) Möhle, B., Heller, W. and Wellman, E.: UV-induced Biosynthesis of Quercetin 3-O-β-D-glucuronide in Dill Cell Cultures. *Phytochemistry* **24**, 465 (1985).
- 7) Hwang, T. -H., Kashiwada, Y., Nonaka, G. and Nishioka, I.: 4-Carboxylmethyl Flavan-3-ols and Procyanidins from *Davallia divaricata*. *Phytochemistry* **29**, 279 (1990).
- 8) 안병태, 이상철, 박용양, 이승호, 노재섭, 이경순, 유응걸: *Euphorbia ebracteolata*에 대한 생약학적 연구

- (II)-Tannin 및 관련 화합물에 관한 화학적 연구-생약학회지 **23**, 211 (1992).
- 9) Lee, M. -W., Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Dimeric Ellagitannins from *Alnus japonica*. *Phytochemistry* **31**, 2835 (1992).
- 10) Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Tannins and Related Compounds. part 28. Revision of the structures of Sanguiin H-6, H-2 and H-3 and Isolation and Characterization of Sanguiin H-11, a Novel Tetrameric Hydrolyzable Tannin and Seven Related Tannins from *Sanguisorba officinalis*. *J. Chem. Research (M)*, 2001 (1985).