

## 두충나무잎의 생리활성 Flavonoid 분석

박종철<sup>†</sup> · 김성환\*

순천대학교 한약자원학과

\*경북보건환경연구원

### Flavonoid Analysis from the Leaves of *Eucommia ulmoides*

Jong-Cheol Park<sup>†</sup> and Sung-Hwan Kim\*

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

\*Kyongbuk Insitute of Health and Environment, Daegu 702-702, Korea

#### Abstract

Three flavonoid compounds, astragalín (1), isoquercitrín (2) and quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside (3) isolated from the leaves of *Eucommia ulmoides* were identified and quantified by HPLC. All flavonoids were well separated on a  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column with a mobile phase composed of THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (145 : 125 : 50 : 20 : 2 : 658). The contents of compound 1 in the methanol extract and n-butanol fraction were 0.09% (w/w) and 0.46% (w/w), of compound 2 were 0.08% (w/w) and 0.48% (w/w), and of compound 3 were 0.40% (w/w) and 1.22% (w/w), respectively.

**Key words :** *Eucommia ulmoides*, astragalín, isoquercitrín, quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside, HPLC, flavonoid

#### 서 론

두충나무는 낙엽교목으로 잎은 호생하며 맥위에는 잔털이 있고, 열매는 편평한 긴 타원형이고 자르면 고무 같은 점질의 실이 나오며, 가지, 잎에도 점질이 함유되어 있다(1). 이 식물의 잎과 수피는 기호음료로 사용되고 있으며 한방에서 이의 수피를 두충이라고 하여 신농본초경의 상품에 수재되어 있고 강장, 이뇨, 안태의 효능으로 고혈압, 소변불리, 습관성 유산, 하복통 등에, 두충엽도 하혈, 이뇨 효능으로 고혈압 등의 치료에 사용하고 있다(2-4). 그러나 수피를 사용하는 경우에는 자원의 재생산이 어렵게 되므로 현재에는 자원개발 측면에서 잎이나 가지 등을 사용하여 여러 종류의 건강식품이 개발되어 이용되고 있다. 따라서 매우 고가인 두충수피는 그 자원이 한정되어 있고 그리고 우리나라 일부 지역에서 재배하고 있으나, 자원의 재생산이 가능한 두충잎의 새로운 기호음료 및 의약품 개발이 중요하다고

사료된다.

이 식물은 혈압강하, 이뇨, 혈관확장, 축동, 혈당상승 억제효과 등의 활성(5-9)이 보고되었으며, 성분(10-17)으로는 iridoid, cyclopentanoid, dilignan-glycoside, gutta-percha, flavonoid 등이 분리되었다. Flavonoid 화합물은 많은 식물 중에 함유되어 있는 2차 대사산물로서 그의 다양한 약리작용이 알려져 있으며(18-21), 이를 주성분으로 하는 의약품들도 개발되어 있기도 하다. 따라서 이 화합물을 질병의 치료제로 사용할 flavonoid 자원생약의 품질평가는 중요한 과제이며, 재현성이 높은 분석법의 표준화가 요구되고 있고 최근에는 high performance liquid chromatography(HPLC)에 의한 정량, 정성 분석이 이루어지고 있다.

저자 등은 flavonoid 화합물들을 지표로 하는 식용 및 약용 식물들의 품질평가를 위한 분석연구로서 flavonoid을 표적 성분으로 하여 HPLC법에 의해 두충잎을 분석하는 방법을 확립하였다. 즉 reversed-phase column인  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>을 사용하고 혼합용매로 isocratic elution하여 분리가 우수한 chromatogram을 얻었으며,

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

이에 의한 flavonoid 화합물을 정량하여 기호음료로 사용되는 두충잎의 품질을 확보할 수 있는 생약의 분석방법을 설정하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

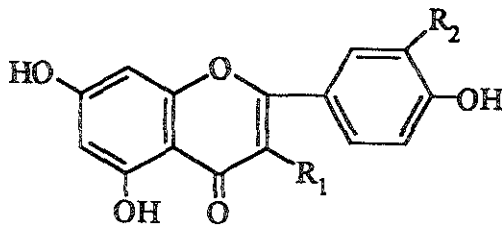
식물재료인 두충나무잎은 1993년 6월 20일 전남 순천시 서면에서 채집하여, 음건, 세절하여 사용하였으며 순천대 한약자원학과 표본실에 보관중이다.

분석기기 및 시약

HPLC 분석기기는 Spectra-Physics의 분석용 liquid chromatograph로서 Spectra 100 detector, column은  $\mu$ -Bondapak C18(10 $\mu$ m, 3.9 $\times$ 100mm)을 사용하였다. 분석용 시약은 분석 전에 Millipore 여과기로 여과시켰다. Flavonoid 화합물들은 두충나무잎에서 순수분리하여 구조를 결정된 화합물을 사용하였으며, 내부 표준물질은 leuteolin (22)을 정제하여 사용하였다.

추출 및 분리

두충나무잎 (1.5kg)을 음건 후 세절하여 수욕상에서 환류냉각하면서 MeOH로 3회 추출하였다. 용매를 감압하여 제거, MeOH 추출물을 얻은 후 10% MeOH에 현탁시켜 용매의 극성 증가 순에 따라 계통 분획을 실시하고 CHCl<sub>3</sub>, n-butyl alcohol (n-BuOH) 및 수층으로 분획하였다. 이 중 n-BuOH 분획을 silica gel column chromatography [CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O=7 : 3 : 1(하층), CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O=65 : 35 : 10(하층)]를 실시하여 astragalín (1), isoquercitrín (2) 및 quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside (3) (Fig. 1)의 flavonoid 성분을 분리하여 HPLC의 표준물질로 사용하였다.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1	Glucose	H
2	Glucose	OH
3	Glucose2 Xylose	OH

Fig. 1. Flavonoid structure.

Astragalín(1)의 분광학적 특성

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$  ; 11.55 (1H, brs, C<sub>5</sub>-OH), 8.05 (2H, d, J=9Hz, H-2' & H-6'), 6.86 (2H, d, J=9.1 Hz, H-3' & H-5'), 6.43 (1H, d, J= 1.9Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J=1.9Hz, H-6), 5.44 (1H, d, J=7.4Hz, anomeric H), <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.3MHz)  $\delta$  ; 177.6 (C-4), 164.4 (C-7), 161.5 (C-5), 156.3 (C-2), 156.1 (C-9), 133.4 (C-3), 130.9 (C-2'), 120.8 (C-1'), 104.2 (C-10), 101.1 (C-1''), 98.7 (C-6), 93.8 (C-8), 77.2 (C-5''), 76.5 (C-3''), 74.1 (C-2''), 69.8 (C-4''), 60.8 (C-6'')

Isoquercitrín(2)의 분광학적 특성

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$  ; 11.82 (1H, brs, C<sub>5</sub>-OH), 7.57 (1H, d, J=2.0Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, J=9.0 & 2.0Hz, H-2 & H-6'), 6.91 (1H, d, J=9.0Hz, H-5'), 6.47 (1H, d, J=1.9Hz, H-8), 6.28 (1H, d, J=1.9Hz, H-6), 5.36 (1H, d, J=7Hz, anomeric H), <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.3MHz)  $\delta$  ; 156.2 (C-2), 133.1 (C-3), 177.3 (C-4), 161.3 (C-5), 98.8 (C-6), 164.1 (C-7), 93.7 (C-8), 156.1 (C-9), 103.9 (C-10), 121.3 (C-1'), 115.4 (C-2'), 144.9 (C-3'), 148.5 (C-4'), 116.4 (C-5'), 121.4 (C-6'), 100.8 (C-1''), 74.0 (C-2''), 76.6 (C-3''), 70.1 (C-4''), 77.6 (C-5''), 61.1 (C-6'')

Quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside (3)의 분광학적 특성

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$  ; 12.65 (1H, brs, C<sub>5</sub>-OH), 7.76 (1H, dd, J=2.1 & 8.5Hz, H-6'), 7.61 (1H, d, J=2.1Hz, H-2'), 6.92 (1H, d, J=8.5Hz, H-5'), 6.46 (1H, d, J=1.8Hz, H-8), 6.36 (1H, d, J=1.8Hz, H-6), 5.72 (1H, d, J=7.2Hz, anomeric H), 4.95 (1H, d, J=6.8Hz, anomeric H), <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.3MHz)  $\delta$  ; 156.2 (C-2), 132.6 (C-3), 177.3 (C-4), 161.1 (C-5), 97.8 (C-6), 165.1 (C-7), 93.4 (C-8), 155.0 (C-9), 104.4 (C-10), 121.6 (C-1'), 115.1 (C-2'), 145.1 (C-3'), 148.7 (C-4'), 115.7 (C-5'), 121.5 (C-6'), 98.7 (C-1''), 81.7 (C-2''), 76.0 (C-3''), 69.3 (C-4''), 77.4 (C-5''), 60.5 (C-6''), 103.2 (C-1'''), 73.8 (C-2'''), 76.7 (C-3'''), 69.3 (C-4'''), 65.5 (C-5''')

HPLC 조건 및 표준검량선

분석 조건은 Table 1과 같으며 표준검량선 작성을 위해 표준물질은 astragalín, isoquercitrín 및 quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside의 flavonoid 각 10mg으로 정평하여 MeOH 10ml에 용해시

Table 1. HPLC operating condition

Column : $\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>
Detector : UV 365nm
Sensitivity : 0.2 Auf
Mobile phase : THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O (145 : 125 : 50 : 20 : 2 : 658)
Flow rate : 1.0ml/min
Chart speed : 0.5cm/min

킨 용액을 stock solution으로 하였으며 내부 표준물질은 luteolin 10mg을 정평하여 MeOH 10 $\mu$ l에 용해시켜 1,000 $\mu$ g/ml를 조제하였다. 두 표준액을 일정량씩 취하고 MeOH를 가하여 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25mg/ml가 되게 조제하였다. 이 혼합액 10 $\mu$ l를 취하여 HPLC의 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 area ratio를 구하였다. 화합물 1, 2 및 3의 회귀직선 방정식은 각각 Y=2.4883X-0.0027, Y=6.2855X-0.0036, Y=2.6363X-0.0071이며 상관계수는 0.9997, 0.9997, 0.9995로서 1.0에 접근하므로 표준물질과 내부 표준물질의 중량비와 peak area ratio 간에 직선성이 인정되었다.

MeOH 엑스 및 n-BuOH 분획중 flavonoid 성분의 정량

건조한 MeOH 엑스 1,000mg 및 n-BuOH 분획물 500mg을 정평하고 이를 MeOH 10ml에 용해시켜 검액으로 사용하였다. 검액, luteolin 및 MeOH을 1 : 1 : 2로 혼합한 후 이액 10 $\mu$ l를 취해 HPLC로서 정량하였다.

결과 및 고찰

두충은 민간에서 당뇨에 차로서 사용하며 한방에서도 간신(肝腎)을 보하고 근골(筋骨)을 강하게 하는 것으로 알려져 있다(3,4). 일반적으로 수피를 약용으로 사용하고 있으나 잎도 기호음료와 혈압강하 작용 등이 알려져 있는 약용 천연자원식물으로서 이의 품질평가를 위한 분석법을 확립하였다.

건조한 잎을 MeOH로 추출해서 얻은 MeOH 엑스를 용매 극성증가 순에 따라 분획하여 n-BuOH 가용부를 제조하였으며, 이 분획물을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (7 : 3 : 1, 하층 및 65 : 35 : 10, 하층)의 전개용매를 사용하여 silica gel column chromatography로서 3종의 flavonoid 화합물을 분리하였다. 이는 문헌의 NMR data(17) 비교에 의해 화합물 1, 2 및 3은 astragalín, isoquercitrín 및 quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside (Fig. 1)으로 화학구조를 동정하였다.

이들 flavonoid 화합물은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 컬럼, THF-

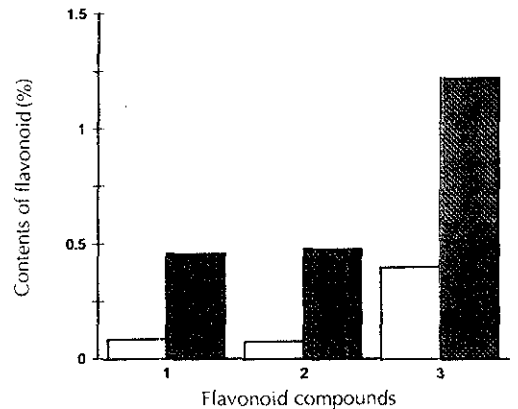


Fig. 2. Contents of flavonoids in MeOH extract and n-BuOH fraction of *Eucommia ulmoides*.

- : The content in MeOH extract
- : The content in n-BuOH fraction
- 1 : Kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (astragalín)
- 2 : Quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoquercitrín)
- 3 : Quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1-2)- $\beta$ -D-glucoside

dioxane-MeOH-HOAc-5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 혼합용매의 이동상을 사용한 HPLC법으로 양호하게 분리, 정량할 수 있었다. 즉  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>을 이용하여 수종의 용매로서 HPLC를 실시하여 분리능을 검토한 결과 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O의 혼합용매(145 : 125 : 50 : 20 : 2 : 658)로서 isocratic elution 할 때 좋은 결과를 얻었다. 상기 flavonoid 화합물들은 용매분획중 n-BuOH 분획물에서 대부분 용출되므로 total extract인 MeOH 엑스와 n-BuOH 분획물 중의 분석과 정량을 위해 실시한 HPLC chromatogram은 3종의 flavonoid의 표준물질과의 spike test를 통해 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. 내부 표준물질은 동일 조건에서 수종의 화합물들을 HPLC 실시한 결과 luteolin이 적합하였으며, 지표물질의 함량분석을 위한 표준 검량선의 상관계수는 각각 0.9997, 0.9997, 0.9995로서 모두 1.0에 접근하므로 표준물질과 내부 표준물질의 중량비와 peak area ratio 간에 직선성이 인정되었다.

화합물 1, 2 및 3의 평균 area ratio값은, MeOH 엑스 중에서 각각 0.0511, 0.1166, 0.2572이며 n-BuOH 분획물에서는 각각 0.1399, 0.3730, 0.3954로서 이를 회귀직선 방정식에 대입하면 MeOH 엑스와 n-BuOH 분획중의 astragalín의 함량은 각각 0.8648mg/10ml, 2.2923mg/10ml, isoquercitrín은 0.7649mg/10ml, 2.3966mg/10ml, quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside의 함량은 4.0102mg/10ml, 6.1070mg/10ml이다. 따라서 MeOH 엑스와 n-BuOH 분획 중의 함량은, astragalín은 각각 0.09% (w/w), 0.46% (w/w), isoquer-

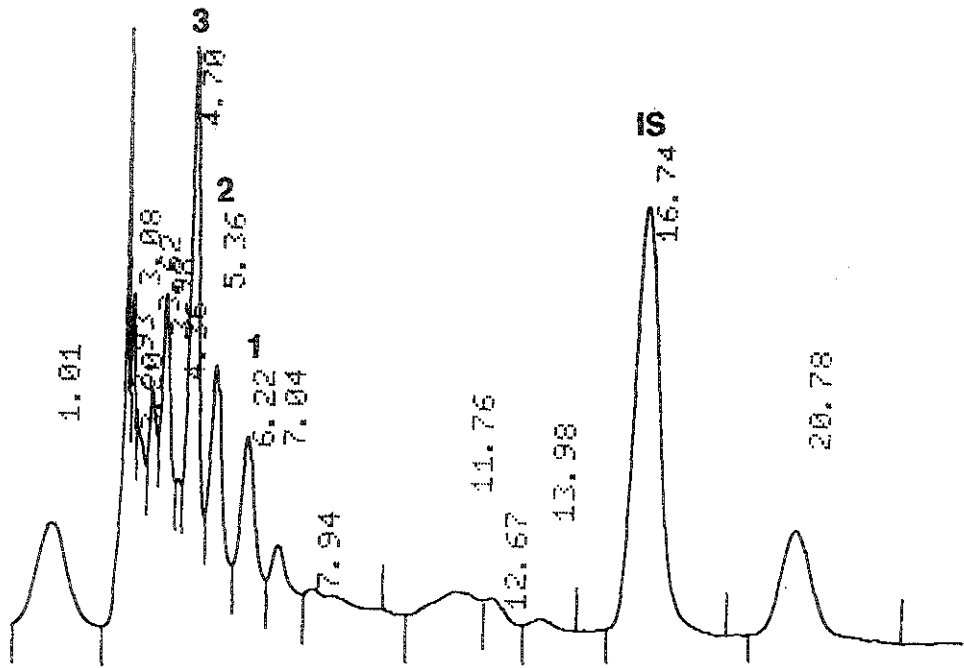


Fig. 3. HPLC chromatogram of the methanol extract of *Eucommia ulmoides*.

1 : Astragalin 2 : Isoquercitrin 3 : Quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside IS : Luteolin

citrin은 0.08% (w/w), 0.48% (w/w), quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside은 0.40% (w/w), 1.22% (w/w)였다. Isoquercitrin은 이뇨작용이 알려져 있고, quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside에 대한 활성은 아직 알려진 바 없으나 이 화합물은 malagasian 민간약으로서 류마티스, 관절염에 사용되는 *Kalanchoe prolifera*에서 발견된 화합물(23)로서 두충나무잎 중에 약 1.22%의 비교적 많은 양으로 함유되어 있어 이 flavonoid 자원식물로서의 개발 가능성을 암시하고 있다.

두충나무잎 중의 flavonoid를 지표물질로 하는 분석법을 확립하였으며 이에 의하여 6월에 채집한 두충나무잎의 성분들을 HPLC로 이용하여 분리, 확인하고, 화합물의 함량을 정량하였다. 따라서 HPLC에 의한 이들 성분들의 분리, 확인 및 기호음료로 사용되는 두충나무잎의 품질평가에도 기여하리라 기대된다.

## 요 약

기호음료 및 약용으로 사용되는 두충나무잎의 품질 평가를 위한 HPLC로서 함유된 flavonoid 화합물을 정성, 정량 분석하였다. 즉 두충나무잎의 n-BuOH 분획으로부터 astragalin, isoquercitrin, quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylo-

pyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside의 3종 flavonoid 성분들을 분리하였으며, 이들 화합물은 HPLC의 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (145 : 125 : 50 : 20 : 2 : 658) 혼합용매에서 양호한 분리능을 나타내었다. MeOH 엑스와 n-BuOH 분획 중에 astragalin의 함량은 각각 0.09% (w/w), 0.46% (w/w), isoquercitrin은 0.08% (w/w), 0.48% (w/w), quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-glucopyranoside은 0.40% (w/w), 1.22% (w/w) 함유되어 있다.

## 감사의 글

이 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(지역개발연구과제) 지원에 의한 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. 이창복 : 대한식물도감. 향문사, 서울, p.507(1985)
2. 小學館 : 중약대사전. 소학관, 동경, p.4030(1985)
3. 難波恒雄 : 원색화한약도감(하). 보육사, 오사카, p.144(1980)
4. 김재길 : 원색천연약물대사전(상). 남산당, p.439(1984)

5. 정명현, 박정완 : 혈압강하제 국산자원생약의 개발 연구. 생약학회지, **6**, 29 (1975)
6. 홍남두, 노영수, 원도희, 김남재, 조보선 : 두충나무의 항당뇨활성에 관한 연구. 생약학회지, **18**, 112 (1987)
7. 홍남두, 노영수, 김종우, 원도희, 김남재, 조보선 : 두충나무의 일반 약리활성 연구. 생약학회지, **19**, 102 (1988)
8. Namba, T., Hattori, M., Yie, J., Ma, Y., Nomura, Y., Katamura, K. and Lu, W. : Studies on Tu-Chung leaves ( I ). *J. Med. Pharm. Soc. for Wakan-Yaku*, **3**, 89 (1986)
9. Ma, Y., Yie, J., Hattori, M., Kaneko, S., Nomura, Y., Wakaki, K. and Namba, T. : Studies on Tu-Chung leaves ( II ). *J. Med. Pharm. Soc. for Wakan-Yaku*, **4**, 26 (1987)
10. Bianco, A., Bonini, C., Guiso, M., Iavarone, C. and Trogolo, C. : Iridoids. XXXVI. Ulmoside, a new iridoid from *Eucommia ulmoides*. *Gazzetta Chimica Italiana*, **108**, 17 (1978)
11. Bianco, A., Iavarone, C. and Trogolo, C. : Structure of eucommiol, a new cyclopentenoid-tetrol from *Eucommia ulmoides*. *Tetrahedron*, **30**, 4117 (1974)
12. Deyama, T. : The constituents of *Eucommia ulmoides* I. Isolation of (+)-medioresinol di-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2993 (1983)
13. Charles, J. S., Ravikumar, P. R. and Huang, F. C. : Isolation and synthesis of pinoresinol diglucoside, a major anti-hypertensive principle of Tu-Chung (*Eucommia ulmoides*). *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5412 (1976)
14. Deyama, T., Ikawa, T. and Nishibe, S. : The constituents of *Eucommia ulmoides* II. Isolation and structures of three new lignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3651 (1985)
15. Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa, S. and Nishibe, S. : The constituents of *Eucommia ulmoides* III. Isolation and structure of a new lignan glycoside. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 523 (1986)
16. Horii, Z., Ozaki, Y., Nagao, K. and Kim, S. : Ulmoprenol, a new type C<sub>30</sub> polyprenoid from *Eucommia ulmoides*. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 5015 (1978)
17. Young, H. S., Park, J. C., Park, H. J., Lee, J. H. and Choi, J. S. : Phenolic compounds of the leaves of *Eucommia ulmoides*. *Arch. Pharm. Res.*, **14**, 114 (1991)
18. Veckenstedt, A. and Horn, M. : Testing of antiviral compounds against Mengo virus infection of Mice. A 2-step procedure of *in vivo* screening. *Z. Allg. Microbiol.*, **16**, 57 (1976)
19. Swallow, D. L. : Antiviral agent. In "Progress in drug research" Jucker, E.(ed.), Birkhauer Verlag Basel und Stuttgart, **22**, 312 (1978)
20. Kim, C. J., Su, S. K., Joo, J. H. and Cho, S. K. : Pharmacological activities of flavonoids ( II )-Relationships of anti-inflammatory and antigranulomatous actions. *Yakhak Hoeji*, **34**, 407 (1990)
21. 柴田承二 : 생물활성 천연물질. 의치약출판사, 동경, p.425 (1970)
22. Young, H. S., Im, K. S. and Choi, J. S. : The pharmacological study on the plant of *Ixeris spp.* 2. Flavonoid and free amino acid composition of *Ixeris sonchifolia*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 296 (1992)
23. Demetzos, C., Skaltsounis, A. L., Razanamahefa, B. and Tilleguin, F. : Synthesis of quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-xylopyranoside via orthoester methodology. *J. Natural Products*, **57**, 1234 (1994)

(1995년 9월 18일 접수)