

복분자 딸기 열매의 가수분해성 탄닌

방근철, 김민선, 이민원*

중앙대학교 약학대학

Hydrolyzable Tannins from the Fruits of *Rubus coreanum*

Keun Cheol Pang, Min Son Kim and Min Won Lee*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract - Fruits of *Rubus coreanum* (Korean name: Bog-bun-ja) have been used in oriental traditional medicine as the remedies for impotence, pollution, premature ejaculation and frequency of urination etc. It is known to have phenolic compounds as an astringent. By means of chromatographic methods, four hydrolyzable tannins were isolated from the fruits of *R. coreanum*. The structures of these compounds were established as gallic acid, 2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranose, sanguin H-4 and sanguin H-6 on the basis of physicochemical and spectroscopic evidences.

Key words - *Rubus coreanum*; Rosaceae; Hydrolyzable tannin; gallic acid; 2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranose; sanguin H-4; sanguin H-6.

복분자 딸기 *Rubus coreanum* Miquel는 장미과에 속하는 낙엽관목(落葉灌木)으로서 높이가 3 m에 이르고, 줄기에 흰가루가 덮여 있는 것이 특징이다. 열매는 둥글고 7-8월에 적색으로 익지만 나중에는 흑색으로 변한다. 산기슭 양지쪽에 나며 수직적으로는 표고 50-1,000 m, 수평적으로는 제주, 전남, 전북, 충남, 충북, 경남, 황해도에 야생하며, 지리적으로는 일본, 중국에 분포한다.¹⁻³⁾ 복분자(Rubi Fructus)는 여름에 과실이 미숙할 때 채취하여 끓는 물에 약간 익힌 다음 양건한 것을 쓰고, 漢方에서 遺尿, 遺精, 早泄, 陽痿 등 노인성 질환에 수렴성 강장제의 목적으로 사용하여 왔다.^{4,5)}

성분으로는 coreanoside F₁, suavissimoside, nigaichigoside F₁, F₂ 등을 비롯한 triterpenoids에 관해서 보고가 있었고,^{6,7)} 이 생약의 수렴성 생리활성물질로 예상되는 phenol성 물질, 특히 탄

닌에 대해서는 복분자 딸기(*Rubus coreanum*)의 줄기로부터 축합형 탄닌으로서 flavan 3-ol 인 (-)-epicatechin, (+)-catechin과 procyanidin인 procyanidin B-4 및 ellagitannin으로서 sanguin H-4가 분리되었다.⁸⁾ 앞에서는 flavonoid로서 kaempferol, quercetin, quercetin 3-O-β-D-glucuronide의 Na salt, quercetin 3-O-β-D-glucuronide의 Na carboxylate 및 ellagitannin인 ellagic acid, sanguin H-5등이 분리, 보고된 바 있다.⁹⁾

본 연구에서는 복분자 딸기의 덜 익은 열매를 80% 함수아세톤으로 추출하여 얻은 엑스로부터 가수분해성 탄닌으로서 1종의 gallotannin과 3종의 ellagitannin을 분리하였으며, 이화학적 성상과 spectral data를 토대로 gallic acid(1), 2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranose(2), sanguin H-4(3), sanguin H-6(4)로 확인, 동정하였기에 보고하고자 한다.

*교신저자 : Fax 02-816-7388

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서 사용한 복분자 딸기 (*Rubus coreanum*) 열매는 1996년 7월 전라북도 고창에서 야생하는 것을 채집하여 식물학적 검정을 거친 후 음건하여 사용하였다.

기기 및 시약 - IR spectrometer는 Shimadzu IR-435(Japan), ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrometer는 JNM-EX90A, 90MHz(Japan), Varian GEMINI 2000, 300MHz(USA) 및 Bruker AMX-500, 500MHz(Germany)를 사용하였고, Polarimeter는 Jasco DIP-370(Japan)을 사용하였다. Column chromatography는 Amberlite XAD-2(20-50 mesh, Fluka), Sephadex LH 20(75-230 μm mesh, Pharmacia), MCI-gel CHP-20P(75-150 μm, Mitsubishi), Toyopearl HW 40F(30-60 μm, Tosoh)를 사용하였고, TLC는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck)와 Cellulose(Sigma)를 이용하였고, 검출은 UV-lamp와 FeCl₃-EtOH 시약, NaNO₂-AcOH 및 10% H₂SO₄용액을 사용하였다.

추출 및 분리 - 음건한 재료 2 kg을 분쇄하여 80% aq. Me₂CO로 4회 실온에서 추출하여 여과하였다. 그 추출액을 감압 농축한 후 H₂O에 현탁하여 물침출액을 Amberlite XAD-2 C.C.(용매: H₂O-MeOH-Acetone)를 실시하여 5개의 fraction을 얻었으며, 이중 탄닌분획으로 보이는 fr.2와 fr.3에 대해 분리를 시도하였다. fr.2를 Sephadex LH-20 C.C.(용매: H₂O-MeOH, 80%EtOH), MCI-gel CHP-20P C.C.(용매: H₂O-MeOH)을 실시하여 compound **1**, gallic acid(100 mg)과 compound **2**, 2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranose(50 mg)를 얻었다. 가장 뚜렷한 탄닌화합물의 분획으로 보이는 fr.3에 대해서는 Sephadex LH-20 C.C.(용매: H₂O-MeOH-Acetone), MCI-gel CHP-20P C.C.(용매: H₂O-MeOH), Avicel cellulose C.C.(용매: 2%AcOH) 및 TSKgel Toyopearl HW 40F C.C.(용매: H₂O-MeOH-Acetone)등을 반복 실시하여 compound **3**, sanguin H-4(600 mg)과 compound **4**, sanguin H-6(80 mg)을 얻었다.

Compound 1 - 무색침상결정, IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3496(Phenolic OH), 1668(COO), 1612, 1541,

1426(Aromatic C=C), ¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 90 MHz): δ 6.92(2H, s, galloyl H), ¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 22.5MHz): δ 108.7(C-2,C-6), 120.5(C-1), 137.9(C-4), 145.3(C-3,C-5), 167.4(COO).

Compound 2 - 갈색무정형분말, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 69.0$ (*c*=0.1, Me₂CO), IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3418(Phenolic OH), 1737(C=O), 1619, 1530, 1444(Aromatic C=C), 1042(Glycosidic C-O-C). ¹H-NMR(300 MHz, Me₂CO-*d*₆+D₂O): δ 4.72(1/2H, dd, J=9.6, 8.1Hz, β -H-2), 4.92(1/2H, dd, J=9.6, 3.9 Hz, α -H-2), 4.98(1/2H, d, J=8.1Hz, β -H-1), 5.03(1/2H, t, J=9.6Hz, β -H-3), 5.38(1/2H, t, J=9.6Hz, α -H-3), 5.39(1/2H, d, J=3.9Hz, α -H-1), 6.62, 6.63, 6.71, 6.72(2H in total, each s, HHDP-H), ¹³C-NMR(75MHz, Me₂CO-*d*₆+D₂O): δ 62.2(Glc-C₆), 68.4(Glc- α -C₄), 68.7(Glc- β -C₄), 73.1(Glc-C₂), 78.0(Glc-C₃), 78.4(Glc-C₅), 91.6(Glc- α -C₁), 95.0(Glc- β -C₁), 107.6, 107.9(HHDP-C₃, C_{3'}), 114.8, 114.9(HHDP-C₁, C_{1'}), 127.2, 127.4(HHDP-C₂, C_{2'}), 136.4, 136.5(HHDP-C₅, C_{5'}), 144.5, 144.6(HHDP-C₄, C_{4'}), 145.4, 145.5(HHDP-C₆, C_{6'}), 169.6, 170.2(HHDP-COO).

Compound 3 - 갈색무정형분말, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 96.0^\circ$ (*c*=0.1, Me₂CO), IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3399(Phenolic OH), 1736(C=O), 1617, 1516, 1449(Aromatic C=C), 1039(Glycosidic C-O-C). ¹H-NMR(300 MHz, Me₂CO-*d*₆+D₂O): δ 5.21(1H, dd, J=9.6, 3.3Hz, H-2), 5.50(1H, t, J=9.6Hz, H-3), 6.49(1H, s, HHDP-H), 6.56(1H, d, J=3.3Hz, H-1), 6.74(1H, s, HHDP-H), 7.23(2H, s, galloyl-H), ¹³C-NMR(75MHz, Me₂CO-*d*₆+D₂O): δ 61.7(Glc-C₆), 67.7(Glc-C₄), 73.9(Glc-C₂), 76.4(Glc-C₃), 78.3(Glc-C₅), 91.0(Glc-C₁), 107.5, 107.9(HHDP-C₃, C_{3'}), 110.4(galloyl-C₂, C₆), 114.7, 114.8(HHDP-C₁, C_{1'}), 120.7(galloyl-C₁), 126.7, 127.2(HHDP-C₂, C_{2'}), 136.4, 136.5(HHDP-C₅, C_{5'}), 140.0(galloyl-C₄), 144.6, 144.7(HHDP-C₄, C_{4'}), 145.4, 145.5(HHDP-C₆, C_{6'}), 146.5(galloyl-C₃, C₅), 165.6(galloyl-COO), 169.1, 170.1(HHDP-COO).

Compound 4 - 담갈색무정형분말, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 62.0^\circ$ (*c*=0.1, Me₂CO), IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3414(Phenolic

OH), 1743(C=O), 1619, 1515, 1447(Aromatic C=C), 1043(Glycosidic C-O-C), ¹H-NMR (500MHz, Me₂CO-d₆+D₂O): δ 3.83(1H, d, J=13.0Hz, H-6), 3.93(1H, d, J=13.0Hz, H-6'), 4.28(1H, m, H-5), 4.36(1H, dd, J=10.0, 6.7 Hz, H-5'), 5.04(1H, t, J=10.0Hz, H-4), 5.12(2H, t, J=10.0Hz, H-3 and H-4'), 5.20(1H, m, H-2'), 5.24(1H, dd, J=13.0, 6.7Hz, H-6'), 5.29(1H, dd, J=10.0, 4.0Hz, H-2), 5.37(1H, dd, J=10.0, 9.0Hz, H-3'), 5.58(1H, dd, J=13.0, 6.7 Hz, H-6), 6.17(1H, d, J=8.5Hz, H-1'), 6.29, 6.33, 6.39, 6.48, 6.53(each 1H, s, HHDP-H), 6.53(1H, d, J=4.0Hz, H-1), 6.77(1H, s, HHDP-H), 6.80(1H, s, sanguisorboyl H), 7.12(2H, s, galloyl H), 7.13, 7.28(each 1H, d, J=1.9 Hz, sanguisorboyl H)

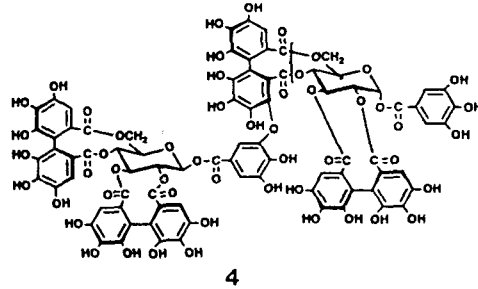
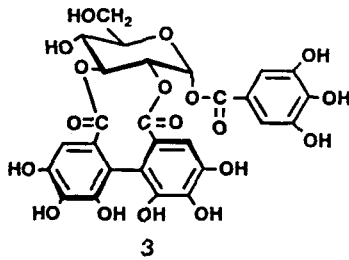
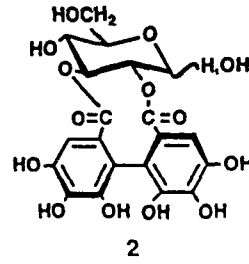
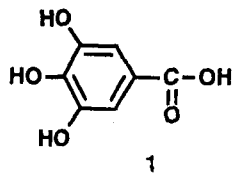
결과 및 고찰

Compound 1은 무색침상결정으로 FeCl₃ test에서 청색을 나타내고, IR spectrum에서 3496 cm⁻¹에서 OH기, 1668 cm⁻¹에서 COO에 의한 흡수대를 보여서 phenolic acid임을 추정하였고, ¹H-NMR spectrum에서는 δ 6.92 ppm에서 수소적분치 2H에 해당하는 galloyl기에 의한 singlet signal을 나타내며, ¹³C-NMR spectrum에서는 δ 108.7에서 C-2, C-6, δ 120.5에서 C-1, δ 137.9에서 C-4, δ 145.3에서 C-3, C-5, δ 167.4에서 COOH에 의한 carbonyl signal이 관찰되었다. 이상의 기기분석 결과와 문헌과의 비교로 1은 gallic acid로 확인 동정하였다.^{10,11)}

Compound 2는 갈색무정형 분말로 FeCl₃ test에서 청색을 나타내고, NaNO₂-AcOH용액에 의해 적갈색으로 나타나 ellagitannin임을 시사하였고, IR spectrum에서도 3418 cm⁻¹에서 OH, 1737 cm⁻¹에서 COO, 1619, 1530, 1444 cm⁻¹에서 Aromatic C=C, 1042에서 Glycosidic C-O-C에 의한 흡수대를 보였다. ¹H-NMR spectrum에서는 δ 6.62, (6.63), 6.71, (6.72)에서 HHDP기에 의한 각각 1H분에 해당하는 중첩된 signal을 나타냈다. 당의 anomeric signal은 δ 4.98에서 β-H-1이 1/2H의 doublet signal(J=8.1Hz)로, δ 5.39에서

α-H-1이 1/2H의 doublet signal(J=3.9Hz)로 나타나서 이 물질은 당의 anomeric center가 비어있는 화합물임을 알 수 있었다. 또한, 당의 β-H-2가 δ 4.72(1/2H, dd, J=9.6, 8.1Hz)에서, α-H-2가 δ 4.92(1/2H, dd, J=9.6, 3.9Hz)에서, β-H-3과 α-H-3이 각각 5.03(1/2H, t, J=9.6Hz), 5.38(1/2H, t, J=9.6Hz)에서 저자장 shift하여 나타나므로 HHDP기가 당의 2와 3번 위치에 결합하고 있음을 알 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서도 1개의 HHDP기의 carbon에 의한 signal이 107.6, 107.9, 114.8, 114.9, 127.2, 127.4, 136.4, 136.5, 144.5, 144.6, 145.4, 145.5에서 나타나고, 169.6, 170.2에서 ester에 의한 2개의 carbonyl signal이 나타났으며, 1개의 glucose에 의한 signal이 62.2(Glc-6), 68.4, 68.7(Glc-α,β-C₄), 73.1(Glc-2), 78.0(Glc-3), 78.4(Glc-5), 91.6(Glc-α-C₁), 95.0(Glc-β-C₁)에서 나타나 2는 glucose의 2,3번에 HHDP기가 결합한 화합물임을 알 수 있었다. 이상의 기기분석 결과와 이화학적 성상을 문헌과의 비교에 의해 2는 2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranose로 확인, 동정하였다.^{12,13)}

Compound 3는 갈색무정형 분말로 FeCl₃ test와 NaNO₂-AcOH용액에 의해 양성을 나타내 ellagitannin임을 알 수 있었고, IR spectrum에서도 3399(Phenolic OH), 1736(C=O), 1617, 1516, 1449(Aromatic C=C), 1039(Glycosidic C-O-C) 등의 phenolic 그룹에 의한 흡수대를 보였다. ¹H-NMR spectrum에서는 δ 7.23에서 galloyl기에 의한 2H의 singlet signal과 δ 6.49, 6.74에서 HHDP기에 의해 각각 1H의 singlet signal이 나타나 galloyl기와 HHDP기가 1개씩 존재하는 것을 알 수 있었다. 당의 anomeric signal은 δ 6.56에서 coupling constant가 3.3Hz인 1H의 doublet signal로 나타나고, 당의 H-2, H-3가 각각 δ 5.21(1H, dd, J=9.6, 3.3Hz), 5.50(1H, t, J=9.6Hz)에서 저자장 shift하여 나타나므로, 당의 1번 OH에 galloyl기가 α결합하고 2, 3번 OH에 HHDP기가 연결되어 있음을 확인할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서도 1개의 galloyl기에 의한 signal이 δ 110.4, 120.7, 140.0, 146.5, 165.6에서 나타나고, 1개의 HHDP기에 의한 signal이 δ 107.5, 107.9, 114.7, 114.8, 126.7, 127.2, 136.4, 136.5, 144.6,



144.7, 145.4, 145.5, 169.1, 170.1에서 나타났다. 또한 1개의 glucose에 의한 signal도 δ 61.7, 67.7, 73.9, 76.4, 78.3, 91.0에서 나타났다. 이상의 기기 분석 결과로 보아 3은 1-O-galloyl-2,3-HHDP- α -D-glucose로서 이화학적 성상을 문헌과 비교하여 sanguiin H-4로 확인, 동정하였다.^{8,14)}

Compound 4는 담갈색무정형분말로 FeCl₃와 NaNO₂-AcOH test에 의해 양성으로 나타나 ellagitannin임을 알수 있었고, IR spectrum에서도 3414(Phenolic OH), 1743(C=O), 1619, 1515, 1447 (Aromatic C=C), 1043(Glycosidic C-O-C) 등의 phenolic 그룹에 의한 흡수대를 보였다.

¹H-NMR spectrum에서 δ 6.29, 6.33, 6.39, 6.48, 6.53, 6.77에서의 각각 수소적분치 1H에 해당하는 singlet signal은 3개의 HHDP기에 의한 것이고, δ 7.12에서 2H분의 galloyl기에 의한 singlet signal이 나타났고, δ 6.80에서 1H분의 singlet signal과 δ 7.13, 7.28에서 각각 1H분의 double signal(J=1.9Hz)은 1개의 sanguisorbol기에 의해 나타난 것으로 4는 도합 1개의 galloyl기, 3개의 HHDP기, 1개의 sanguisorbol기가 분자 구조내에 존재함을 알수 있었다. 또한 δ 6.17에서 1H의 doublet signal(J=8.5Hz)과 δ 6.53에서 1H의 doublet signal(J=4.0Hz)은 각각 glucose의 anomeric proton으로서 각각 β 결합과 α 결합에 의해서 나타난 것으로 2개의 glucose가

존재하는 dimeric ellagitannin임을 알 수 있었다. 먼저 δ 6.53에 H-1의 J=4.0Hz doublet과 coupling하는 H-2는 δ 5.29(1H, dd, J=10.0, 4.0 Hz)에 나타나 있고, H-3는 δ 5.12에서 triplet(J=10.0Hz)으로 나타나 있으며, δ 5.04(1H, t, J=10.0 Hz)에서 H-4가, δ 5.58(1H, dd, J=13.0, 6.7Hz)에서 H-6의 한개 수소에 의한 signal등이 모두 저자장으로 shift하여 나타남으로 1개의 glucose는 1, 2, 3, 4, 6 모든 acyl group이 결합에 참여함을 알 수 있었다. 한편, δ 6.17의 anomeric 수소가 J=8.5Hz의 doublet으로 나타나 있는 다른 한개의 glucose에서도 역시 H-2',3'가 각각 5.20 및 5.37로 저자장 shift하여 나타나고, H-4',6'도 δ 5.12(t, J=10.0Hz)와 δ 5.24(dd, J=13.0, 6.7Hz)에서 저자장 shift하여 나타나므로 이 위치도 모두 결합에 참여함을 알 수 있었다. 이상의 결과를 통해 볼 때 4에는 sanguiin H-2 signal 패턴(1-O-galloyl-2,3-(S)-HHDP-4,6-sanguisorbonyl- α -D-glucopyranose)이 나타나 있고¹⁵⁾, 동시에 1- β -O-galloyl pedunculagin의 signal 패턴(1-O-galloyl-2,3,4,6-(S)-HHDP- β -D-glucopyranose)도 나타남¹⁶⁾으로 sanguiin H-2와 pedunculagin이 galloyl기를 중심으로 결합한 dimeric ellagitannin인 sanguiin H-6임을 알 수 있었다. 따라서 이상의 기기분석 결과와 이화학적 성상을 문헌과의 비교를 통해 본 결과 4는 sanguiin H-6로

확인, 동정할 수 있었다.^{17,18)}

결 론

우리나라에서 수렴성 강장제로 약용하고 있는 복분자 딸기(*Rubus coreanum*)의 미숙과실로부터 tannin분리를 시도하여 4종의 가수분해성 탄닌인 compound 1, 2, 3, 4를 얻었다. 물리화학적 성상과 각종 기기분석 조건 및 문헌과의 비교를 통해 compound 1은 gallic acid, compound 2는 2, 3-(S)-HHDP-D-glucopyranose, compound 3은 sanguin H-4, compound 4는 sanguin H-6로 각각 확인, 동정하였다.

인용문헌

- 鄭台鉉(1974) 韓國動植物圖鑑 木本部, 182. 理文社, 서울.
- 李昌福(1989) 大韓植物圖鑑, 441. 鄉文社, 서울.
- 陸昌洙(1981) 韓國藥品植物資源圖鑑, 188. 進明出版社, 서울.
- 韓國生藥學教授協會(1995) 本草學, 863. 大韓藥師會, 서울.
- Dan Bensky and Andrew Gamble (1993) Chinese herbal medicine: Materia medica, 388. Eastland Press, Washington.
- Ohtani, K., Miyajima, C., Takahasi, T., Kasai, R., Tanaka, O., Hahn, D.R. and Naruhashi, N. (1990) A dimeric triterpene glycoside from *Rubus coreanus*. *Phytochemistry* 29: 3275-3280.
- Kim, Y. H., Kang, S. S.(1993) Triterpenoids from Rubi Fructus (Bogbunja). *Arch. Pharm. Res.* 16: 109-113.
- Lee, Y. A. and Lee, M. W.(1995) Tannins from *Rubus coreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.* 26: 27-30.
- Lee, M. W.(1995) Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* 39: 200-204.
- Park, W. Y., Lee, S. C., Ahn, B. T., Lee, S. H., Ro, J. S. and Lee, K. S.(1993) Phenolic compounds from *Acalypha australis* L. *Kor. J. Pharmacogn.* 24: 20-25.
- Park, J. C., Young, H. S., Lee, S. H.(1993) A tannin compound isolated from the underground part of *Rosa rugosa* Thunb. *Kor. J. Pharmacogn.* 24: 319-321.
- Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I.(1986) Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 650-655.
- Lee, M.-W., Tanaka, T., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I.(1992) Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica*. *Phytochemistry* 31: 2835-2839.
- Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I.(1985) Tannins and related compounds, Part 28. Revision of the structures of sanguins H-6, H-2, and H-3, and isolation and characterization of sanguin H-11, a novel tetrameric hydrolysable tannin, and seven related tannins from *Sanguisorba officinalis*. *J. Chem. Research (M)* 2001-2029.
- Nonaka, G., Tanaka, T. and Nishioka, I.(1982) Tannins and related compounds. Part 3. A new phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone, and three new ellagitannins, Sanguins H-1, H-2, and H-3, from *Sanguisorba officinalis*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 1067-1073.
- Tanaka, T., Tachibana, H., Nonaka, G., Nishioka, I., Hus, F.-L., Kohda, H. and Tanaka O. (1993) Tannins and related compounds. CXXII. New dimeric, trimeric and tetrameric ellagitannins, lambertianins A-D, from *Rubus lambertianus* Seringe. *Chem. Pharm. Bull.* 41: 1214-1220.
- Nonaka, G., Tanaka, T., Nita, M. and Nishioka, I.(1982) A dimeric hydrolyzable tannin, sanguin H-6 from *Sanguisorba officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 30: 2255-2257.
- Yoshida, T., Feng, W. S. and Okuda T.(1992) Tannins and related polyphenols of rosaceous medicinal plants, XII. Roshenins A-E, dimeric hydrolyzable tannins from *Rosa henryi* Boul. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 1997-2001.

(1996년 12월 8일 접수)