

무궁화나무의 성분 및 생물활성에 관한 연구(II)

유익동,* 이인경, 유인자, 정동호, 한규훈, 윤봉식

한국과학기술연구원 생명공학연구소

Studies on the Constituents of *Hibiscus syriacus* (I)

Ick-Dong Yoo,* In-Kyoung Lee, In-Ja Ryoo, Dong-Ho Choung,
Kyou-Hoon Han and Bong-Sik Yun

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST,
P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

Abstract - *Hibiscus syriacus* L. (Malvaceae) is widely distributed over Korea, China, India and Siberia. The dried flower of *H. syriacus* is used as a folk medicine for curing of hematochezia, dysentery, obstruction due to wind-phlegm, regurgitation, and vomiting of food, and the dried root bark is used as antipyretic, anthelmintic, and antifungal agents. From a chloroform extract of root bark of this plant, compounds I, II, and III were isolated and the structures were elucidated by various spectroscopic analyses. These compounds were identified as syringaresinol, *E*-*N*-feruloyltyramine, and *Z*-*N*-feruloyltyramine, respectively and were isolated from this plant for the first time. Compounds II and III exhibited lipid peroxidation inhibitory activities with IC_{50} of 15.5 and 28.6 μ g/ml, respectively.

Key words - *Hibiscus syriacus*; Malvaceae; root bark; syringaresinol; *E*-*N*-feruloyltyramine; *Z*-*N*-feruloyltyramine

무궁화나무(*Hibiscus syriacus* L.)는 아욱과(Malvaceae)에 속하는 낙엽활엽 관목으로 한국, 중국, 인도 및 시베리아등지에 널리 분포한다. 잎은 난형으로 밑은 쐐기모양이고 간혹 3갈래로 갈라지며 가장자리에 거친 톱니가 있다. 꽃은 옅은 자색으로 7-8월에 피며 단립성으로 액생(腋生)하며 화관(花冠)은 종모양이고 짧은 화경(花梗)이 있다.¹⁾ 예로부터 중국에서는 무궁화 나무의 수피 추출물을 무좀약으로 사용한 것을 비롯, 무궁화나무 추출액은 점할지사(粘滑止瀉), 위장염(胃腸炎), 위장카타르, 장출혈, 피부병, 이질, 대하, 탈황 등에 유효한 것으로 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 이에 따라 성분연구도 활발히 이루어져 삼원환 지방산인 malvalic acid 및 sterculic acid, flavone인 saponarin, polyphenol 화합물인 api-

genin-7-O- β -D-glucoside와 taxifolin-3-O- β -D-glucopyranoside, hypoletine-7-O- β -D-glucopyranoside 등⁵⁾을 포함하여 betulin, β -sitosterol, 1,22-docosanediol 및 carotenoid 성분, anthocyanin 성분 등이 분리 보고되었다.⁶⁻⁹⁾ 또한, Yokota 등¹⁰⁾은 수피로부터 canthin-6-one과 항진균활성을 갖는 지방산 lauric acid, myristic acid, palmitic acid등을 분리한 바 있으며 그 외에도 무궁화의 잎 및 꽃눈으로부터의 다당체에 관한 연구가 수행된 바 있다.^{11,12)} 무궁화의 근피 성분에는 몇몇 항균활성물질이 존재하는 것으로 밝혀졌으나 이들의 정확한 성분분석에 관한 연구는 미비하다.³⁾ 따라서 항균활성, 지질과산화 저해활성등의 생물활성을 지표로 무궁화 근피로부터 새로운 생리활성물질을 탐색함과 동시에 근피의 주요성분을 분석하던 중 syringaresinol(I), *E*-*N*-feruloyltyramine(II), *Z*-*N*-feru-

*교신저자 : Fax 042-860-4595

tyramine(III) 등의 화합물을 분리하였기에 보고한다.

재료 및 방법

실험재료 - 1995년 10월, 대전시 근교에서 무궁화 뿌리를 채취하여 음건 세절한 후 분말로하여 사용하였다. 증거표본은 한국과학기술연구원 생명공학연구소 세포기능제어 R.U. 실험실에 보관되어 있다.

기기 및 시약 - UV/Vis spectrometer는 Kontron Uvicon 930을 사용하였고, FAB-MS는 Kratos Concept-1S FAB mass spectrometer를 사용하였다. NMR spectrum은 Varian Unity 300 및 Varian Unity 500 spectrometer를 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane을, 용매로는 $CDCl_3$ 및 CD_3OD 를 사용하였다. Column chromatography용으로, silica gel은 Kieselgel 60 (230-400 mesh)를, Sephadex LH-20은 Pharmacia Co., ODS resin은 YMC Co. (lot No. 51252) 제품을 사용하였으며, silica gel TLC에는 Merck사의 No. 5715 및 5744를, 역상 TLC (RP)에는 Merck사의 No. 15389를 사용하였으며, 기타 시약은 일급시약을 사용하였다.

추출 및 분리 - 음건, 세절한 무궁화 뿌리 1.6 Kg을 MeOH에 1일 침지하여 2회 추출한 후 감압하에서 용매를 제거하고, $CHCl_3$ 을 가하여 3회 추출하였다. $CHCl_3$ 층은 감압 농축한 후 hexane-EtOAc (10:1-1:1), $CHCl_3$ -MeOH(100:1-1:1)을 전개용매로하여 silica gel column chromatography를 실시하였고 용출물은 TLC 분석에 의하여 분획 A, B로 나누었다. 분획A는 재차 silica gel column chromatography($CHCl_3$ -MeOH=100:1-5:1)를 행하여 분획 A-1 및 A-2로 나누고 A-1은 MeOH 및 80% MeOH을 전개용매로 Sephadex LH-20 column chromatography를 2회 행한 후 RP TLC (70% MeOH)에 전개하여 Rf 0.65의 화합물 I (18.5 mg)를 얻었다. 분획 A-2는 Sephadex LH-20 column에 가하여 MeOH로 용출하고, ODS column chromatography(70-90% MeOH)를 행한 후 preparative TLC($CHCl_3$ -MeOH=10:1, Rf=0.4)를 통하여 화합물 II (15 mg)를 분리하였다. 분획B는 재차 silica gel column chromatography

(hexane- Me_2CO =5:1-1:1)를 행한 후 Sephadex LH-20 column에 가하여 MeOH로 용출하고 preparative TLC($CHCl_3$ - Me_2CO =4:1)에 전개하여 Rf치 0.2부근의 band를 회수한 후 최종적으로 HPLC(ODS, 10×250 mm, 50% MeOH, 2 ml/min, UV 254 nm)에 의하여 retention time 14 분대의 화합물 III (2.0 mg)을 분리하였다.

지질과산화 저해활성 측정 - Rat liver microsome은 yagi 등의 방법으로 분리하여 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 현탁하여 사용하였다. 먼저 마이크로솜(1 mg protein/ml) 10 μ l에 MeOH에 녹인 각 농도의 시료, 500 μ M 황화철 용액 25 μ l, 100 mM Tris-HCl buffer 0.5 ml, 증류수 0.45 ml을 혼합한 후 37 $^\circ$ C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 3M TCA:2.5N HCl을 1:1로 섞은 혼합용액 0.3 ml을 가하여 반응을 중지시키고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액 1 ml을 취하여 0.67% TBA용액 0.3 ml과 섞은 후 100 $^\circ$ C에서 5분간 가열하고 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 측정된 후 하기식에 의해서 지질과산화 저해율(%)을 계산하였다.

$$\text{저해율} = \frac{A - C}{A - B} \times 100$$

- A: 저해제를 넣지 않은 것의 흡광도
- B: 저해제와 마이크로솜을 넣지 않은 것의 흡광도
- C: 저해제를 넣은 것의 흡광도

항균활성 - *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* 등 5종의 세균, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium oxysporium* 등의 곰팡이 및 효모 *Candida albicans*에 대하여 항균활성을 측정하였다. 측정방법은 각 시료의 농도를 1 mg/ml로 한 후, paper disk(직경 8 mm)에 40 μ l씩 적용하여 검정용 배지위에 놓고 세균은 2일, 곰팡이는 5일 배양하여 투명한 크기를 측정하였다.

결과 및 고찰

화합물 I - 화합물 I(Fig. 1)은 흰색분말로 206, 240(sh), 270 nm에서 UV 최대 흡수 peak를 나타내었다. FAB-MS 측정 결과 m/z 418 및 419에 피

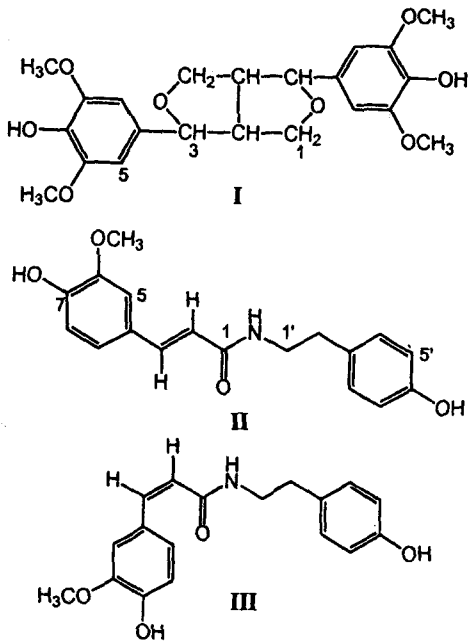


Fig. 1. Structures of compounds I, II and III.

크를 나타내어 본 화합물의 분자량이 417 혹은 418 인 것으로 추정되었다. ^1H NMR 측정 결과(CDCl_3 , 300 MHz) 6.58 ppm에서 singlet methine proton 및 3.90 ppm에서 methoxy proton, 4.73과

3.10 ppm에서 methine proton 및 3.90, 4.28 ppm에서 비등가 methylene proton으로 사료되는 signal들이 관찰되었다. ^{13}C NMR 및 DEPT 실험에 의하여 3개의 sp^2 사급탄소, 한개의 sp^2 methine 탄소, 2개의 sp^3 탄소에 유래하는 signal들이 관찰되었다(Table I). 그러나 이들 ^1H 및 ^{13}C signal의 수가 FAB-MS측정으로부터 추정된 분자량에 비하여 현저히 적어 본 화합물의 구조가 symmetrical dimer일 것으로 추정되었다. ^1H NMR signal의 irradiation 실험에 의하여 본 화합물의 구조 중 $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ 의 부분구조가 존재함을 알 수 있었으며, 평면구조는 HMBC 실험에 의하여 결정되었다. 즉 6.58 ppm의 방향족 methine proton 으로부터 132.0, 102.7, 134.2, 147.2 ppm의 sp^2 탄소에 long-range coupling이 관찰되었고 5.49 ppm의 hydroxy proton 으로부터 134.2 및 147.2 ppm의 탄소에 각각 long-range coupling이 관찰되어 3,5-dimethoxy-4-hydroxylbenzene 환의 존재가 밝혀졌다. 또한, 4.73 ppm의 methine proton 으로부터 132.0, 102.7 ppm의 탄소에 long-range coupling이 관찰되어 4.73 ppm의 methine 탄소에 benzene 환이 결합하고 있음을 알 수 있었다. Fig. 2에 나타낸 바와같이 그 외의

Table I. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for 1 in CDCl_3 and 2 and 3 in CD_3OD (^1H -NMR: 300 MHz, ^{13}C -NMR: 75 MHz)

No.	δ_c	1 δ_H	δ_c	2 δ_H	3 δ_H
1	72.0	3.90, 4.28 (<i>m</i>) ^a	169.3		
2	54.3	3.10 (<i>m</i>)	118.8	6.49 (<i>d</i> , 15.3)	5.80 (<i>d</i> , 12.6)
3	86.3	4.73 (<i>d</i> , 4.2)	142.0	7.43 (<i>d</i> , 15.3)	6.60 (<i>d</i> , 12.6)
4	132.0		128.2		
5	102.7	6.58 (<i>s</i>)	111.6	7.11 (<i>d</i> , 1.8)	7.35 (<i>d</i> , 1.8)
6	147.2		149.4		
6-OCH ₃	56.5	3.90 (<i>s</i>)	56.3	3.88 (<i>s</i>)	3.82 (<i>s</i>)
7	134.2		149.8		
7-OH		5.49 (<i>brs</i>)			
8	147.2		116.9	6.79 (<i>d</i> , 8.4)	6.72 (<i>d</i> , 8.1)
9			123.4	7.02 (<i>dd</i> , 8.4, 1.8)	6.92 (<i>dd</i> , 8.1, 1.8)
1'			42.5	3.46 (<i>t</i> , 6.9)	3.39 (<i>t</i> , 7.2)
2'			35.8	2.75 (<i>t</i> , 6.9)	2.68 (<i>t</i> , 7.2)
3'			131.1		
4', 8'			130.8	7.05 (<i>d</i> , 8.7)	6.99 (<i>d</i> , 8.7)
5', 7'			116.7	6.71 (<i>d</i> , 8.7)	6.68 (<i>d</i> , 8.7)
6'			157.0		

^aProton resonance multiplicity and coupling constant (Hz) in parenthesis.

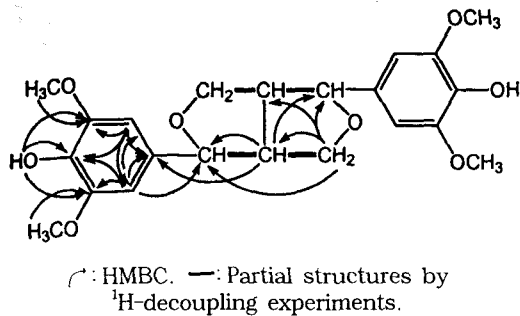


Fig. 2. Planar structure of compound I elucidated by the HMBC data.

HMBC data를 근거로 본 화합물의 화학구조가 Fig. 1에서 보여진 것처럼 결정되었다. 화합물 I의 분자식 및 화학구조를 근거로 database검색을 실시한 결과 본 화합물은 syringaresinol로 판명되었다. Syringaresinol은 (+)- 및 (-)-form이 존재하나 본 화합물은 선광도를 나타내지 않아 (+)-, (-)-form의 혼합물로 추정되었다. Syringaresinol은 *Liriodendron tulipifera*로부터 처음 분리 보고 되었으며 그 후 Deyama 등¹³⁾에 의하여 *Eucommia ulmoides*에서도 분리 보고된 바 있다. 본 연구에 의하여 *Hibiscus syriacus*에도 이같은 성분이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

화합물 II-화합물 II(Fig. 1)는 백색 분말로 획득 되었으며 UV측정 결과 200, 220, 295, 317 nm에서 UV최대 흡수 peak를 나타내었다. FAB-MS 측정결과 m/z 314에서 (M+H)⁺를, m/z 336에서 (M+Na)⁺를 나타내어 본 화합물의 분자량이 313임을 알 수 있었고 또한 분자량으로부터 본 화합물이 적어도 홀수개의 질소를 포함하고 있음을 추정할 수 있었다. ¹H NMR측정 결과 각 proton 간의 결합상수로부터 1,4-disubstituted benzene 환 및 1,3,4-trisubstituted benzene 환의 존재를 알 수 있었고 이 외에 상호간에 *trans* 결합(15.3 Hz)한 2개의 olefinic methine proton, 서로 이웃하고 있는 2개의 methylene proton 및 한 개의 methoxy proton이 관찰되었다. ¹H 및 ¹³C NMR data를 Table I에 나타내었다. ¹H NMR spectrum의 해석에 의하여 밝혀진 각 부분구조는 HMBC 실험에 의하여 연결되었으며 각 HMBC signal의 해석결과를 Fig. 3에 나타내었다. 즉 6.49 및 7.43 ppm의 methine proton들로부터 169.3 ppm의 carbonyl

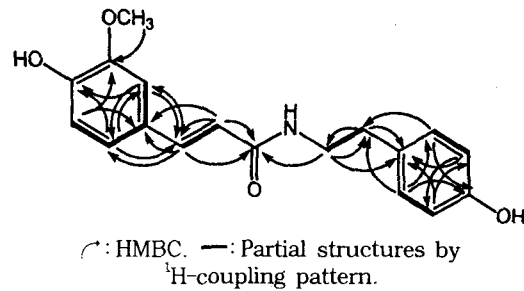


Fig. 3. Planar structure of compound II elucidated by the HMBC data.

탄소에 long-range coupling이 관찰되었고 또한 7.43 ppm의 proton으로부터 128.2, 111.6, 123.4 ppm의 탄소에, 3.88 ppm의 methoxy proton으로부터 149.4 ppm의 탄소에 long-range coupling이 관찰되어 ferulic acid moiety의 부분구조가 밝혀 졌다. 또한, 2.75 ppm의 methylene proton으로부터 131.1 및 130.8 ppm의 탄소에 long-range coupling이 관찰되었고 1'의 ¹H(3.46 ppm) 및 ¹³C(42.5 ppm)의 chemical shift로부터 1'의 탄소가 질소와 결합하고 있음을 알 수 있었으며 그 결과 화합물 II의 구조 중 tyramine moiety의 존재가 밝혀졌다. 그 외에 3.46 ppm의 proton으로부터 169.3 ppm의 carbonyl 탄소에 long-range coupling이 관찰되어 화합물 II의 화학구조가 Fig. 1과 같이 결정되었다. 화학구조를 근거로 database 검색을 실시한 결과 화합물 II는 E-N-feruloyltyramine으로 밝혀졌다. Feruloyltyramine은 1983년 Fukuda 등¹⁴⁾이 *Tinospora tuberculata*로부터 분리한 alkaloid 화합물이다. 본 연구에 의하여 무궁화나무도 feruloyltyramine을 생성하는 것으로 밝혀졌다.

화합물 III-백색분말의 화합물 III(Fig. 1)은 200, 220, 295, 315 nm에서 UV최대 흡수 peak를 나타내었다. FAB-MS 측정결과 m/z 314에서 (M+H)⁺를 나타내어 본 화합물의 분자량이 313임을 알 수 있었다. ¹H NMR측정 결과 각 proton 간의 결합상수로부터 1,4-disubstituted benzene 환 및 1,3,4-trisubstituted benzene 환의 존재를 알 수 있었고 상호간에 *cis* 결합(12.6 Hz)한 2개의 olefinic methine proton, 서로 이웃하고 있는 2개의 methylene proton 및 한 개의 methoxy pro-

ton이 관찰되었다(Table I). 이상의 물리화학적 특성 및 ^1H NMR spectrum으로부터 본 화합물은 화합물 II와 매우 유사함을 알 수 있었고 따라서 화합물 II와 ^1H NMR spectrum을 비교, 분석하였다. 그 결과 화합물 II는 3, 4번의 olefinic methine proton이 *trans* 결합을 하고 있으나 본 화합물은 *cis* 결합을 하고 있는 *Z-N-feruloyltyramine*¹⁴⁾으로 밝혀졌다.

생물활성 - 화합물 I, II, III의 지질과산화 저해활성을 vitamin E와 비교하여 조사하였으며 그 결과는 다음과 같다. 화합물 II, III은 각각 15.5, 28.6 $\mu\text{g/ml}$ 에서 IC_{50} 을 나타내었으며 이는 vitamin E (1.6 $\mu\text{g/ml}$) 보다 각각 10배, 18배 낮은 활성이었다. 그러나 화합물 I은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 전혀 활성을 나타내지 않았다. 항균활성 측정 결과 화합물 III이 무좀균 *Trichophyton mentagrophytes*에 대하여 약한 항균활성을 나타낸 반면 그 외의 화합물은 활성을 나타내지 않았다.

결 론

무궁화나무(*Hibiscus syriacus* Linne)의 근피를 CHCl_3 로 추출하고 추출물로부터 3종의 화합물(I, II, III)을 분리, 정제한 후 물리화학적 및 분광학적 실험을 행하여 그 구조를 규명하였다. 그 결과 화합물 I은 syringaresinol로, 화합물 II는 *E-N-feruloyltyramine*으로, 화합물 III은 *Z-N-feruloyltyramine*으로 동정하였다. 무궁화나무에서는 처음으로 분리된 이들 화합물들에 대하여 지질과산화 저해활성을 측정한 결과 화합물 II, III이 각각 15.5, 28.6 $\mu\text{g/ml}$ 에서 IC_{50} 값을 나타내었다.

인용문헌

1. 육창수 (1989) 원색한국약용식물도감, 351. 아카데미서적, 서울.
2. 赤松金芳 (1970) 新訂和漢藥, 243. 醫齒藥出版社, 東京.
3. Hsu, H. Y., Chen, Y. P., Shen, S. J., Hsu, C. S., Chen, C. C. and Chang, H. C. (1986) Oriental materia medica (a concise guide), 503-504. Oriental healing arts institute, Taiwan.
4. Huang, K. C. (1993) The pharmacology of chinese herbs, 193-194. CRC Press, Tokyo.
5. Bandyukova, B. A. (1990) Polyphenol composition of *Hibiscus syriacus*. *Khim. Prir. Soedin.* 4: 552-553.
6. 張恩綰, 康欽樹, 張昭 (1993) Chemical constituents from the bark of *Hibiscus syriacus* L. *Zhongguo Zhongyao Zashi* 18: 37-38.
7. Hanny, B. W., Henson, R. D., Thompson, A. C., Guedner, R. C. and Hedin, P. A. (1972) Identification of carotenoid constituents in *Hibiscus syriacus* L. *J. Agr. Food Chem.* 20: 914-916.
8. Kim, J. H., Miyajima, I., Fujieda, K. and Uemoto, S. (1989) Anthocyanidin 3-glucosides and *in vitro* unstable anthocyanins from *Hibiscus syriacus*. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 33: 243-251.
9. Kim, J. H., Okubo, H., Fujieda, K. and Uemoto, S. (1989) Anthocyanin pigmentation patterns in petals of *Hibiscus syriacus*. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 33: 253-258.
10. Yokota, M., Zenda, H., Kosuge, T. and Yamamoto, T. (1978) Antifungal constituents in the bark of *Hibiscus syriacus* L. *Yakugaku zasshi* 98: 1508-1511.
11. Shimizu, N., Tomoda, M. and Adachi, M. (1986) Plant mucilages. XXXIX. A representative mucilage, "Hibiscus-mucilage SL," from the leaves of *Hibiscus syriacus*. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 4133-4138.
12. Tomoda, M. and Ichikawa, M. (1987) Plant mucilages. XL. A representative mucilage, "Hibiscus-mucilage SF," from the flower buds of *Hibiscus syriacus*. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 2360-2365.
13. Deyama, T. (1983) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. I: Isolation of (-)-medioresinol Di-O-beta-D-glucopyranoside. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 2993-2997.
14. Fukuda, N., Yonemitsu, M. and Kimura, T. (1983) Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. I. N-trans- and N-cis-feruloyltyramine and a new phenolic glucoside tinotuberide. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 156-161.

(1997년 5월 30일 접수)