

## 꾸지뽕나무로부터 항균성 Prenylated Flavonoids의 분리

이병원 · 강남숙 · 박기훈\*

경상대학교 농화학과

(2004년 3월 11일 접수, 2004년 5월 14일 수리)

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata* Bureau)의 클로로포름 추출물로부터 2종의 prenylated flavonoid 항균 물질을 분리하였다. 분리한 화합물에 대하여 항균활성을 실험 한 결과 화합물 1과 2는 10 µg/disk의 농도에서 Gram 양성균인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 그리고 *Bacillus cereus*에 대하여 활성을 보였다. 이들의 구조를 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR 및 2D NMR을 포함한 분광학적인 방법을 통하여 분석한 결과, 화합물 1과 2는 euchrestaflavanone B와 euchrestaflavanone C로 각각 동정 되었다.

**Key words:** 꾸지뽕나무, euchrestaflavanone B, euchrestaflavanone C, 항균활성

### 서 론

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata* Bureau)는 뽕나무과에 속하는 낙엽성 소교목 또는 관목으로서 한국과 중국, 일본 등지에 주로 분포하는 식물이다. 이 식물의 잎은 한방에서 습진 유행성 이하선염, 폐결핵, 만성요통, 타박상, 급성관절염 등의 치료에 사용되고 있으며, 또한 민간에서는 열매와 수피를 약창, 강장, 중풍, 이뇨, 진해 등의 치료약으로 이용되고 있다.<sup>1)</sup> 특히 꾸지뽕나무의 뿌리와 줄기를 다려먹으면 간암치료에 특효 하다고 전해 내려오고 있다.

1980년대 이후로부터 꾸지뽕나무로부터 xanthenes<sup>2-6)</sup>와 flavonoids,<sup>7-10)</sup> benzenoids<sup>11)</sup> 등의 다양한 폴리페놀 화합물들이 분리 보고 되었다. 또한 이 식물체의 잎, 줄기, 뿌리의 추출물에 대한 과산화지질 생성 억제작용,<sup>12-14)</sup> 고혈압,<sup>15)</sup> 세포독성<sup>16)</sup> 등이 보고 되고 있으나 이 식물체의 항균활성에 대한 연구는 미비한 실정이다. 그러나 꾸지뽕나무가 민방에서 습진 등에 이용되기 때문에 이 식물체의 이차대사 물질에 항균활성 물질이 다량 함유되어 있을 것으로 기대된다.

본 연구는 꾸지뽕나무 뿌리 껍질의 클로로포름 추출물로부터 activity-guided fractionation을 통하여 2가지의 항균 물질을 분리하였고, 이들의 구조를 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 및 2D-NMR을 포함한 분광학적인 방법을 이용하여 결정하였으며, 이들의 항균활성 능력에 대하여 검토하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료.** 본 실험에 사용한 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 2001년 2월 경남 합천군 야료면에서 채집하여 음건 세척한 후 사용하였다.

**사용기기.** 용접 측정은 Thomas Hoover Capillary Apparatus

를 사용하여 측정하였으며, 온도는 보정하지 않았다. UV spectrum은 Beckman UV/Vis spectrophotometer DU650(USA)을 사용하였으며, IR spectrum은 Bruker IFS66 FT-IR spectrophotometer(Germany)를 사용하여 KBr disc법으로 측정하였다. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR 및 2D-NMR spectrum은 Bruker AM 500 spectrophotometer(Germany)를 사용하였으며 Mass spectrum은 JEOL JMS-700 spectrometer(Japan)를 사용하였다.

**사용균주 및 재료.** 항균활성에 사용한 균주는 Gram 양성균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 13301, *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Bacillus cereus* ATCC 27348과 Gram 음성균인 *Escherichia coli* ATCC 15489를 한국미생물 보존센터(KCCM)에서 분양 받아 사용하였으며, 생육배지로는 nutrient broth와 nutrient agar(Difco)를 사용하였다.

**유효성분의 분리.** 꾸지뽕나무의 뿌리 껍질(3 kg)을 음건하고 세척한 후 클로로포름으로 1주일 동안 추출한 후, 용매를 감압 농축하였다. 클로로포름 농축액(86 g)을 silica gel(230-400 mesh, Merk)로 충전 시킨 column(7×60 cm)에 loading하여 CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH[30:1 (1000 ml), 20:1 (1000 ml), 10:1 (1000 ml), 5:1 (1000 ml)]의 전개용매에 의해 순차적으로 용출시켜, 용출된 분획 중 CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH = 10:1 부분을 농축하였다. 이 농축액을 CHCl<sub>3</sub>:acetone 조건으로 극성을 점차적으로 높여 column chromatography를 실시하여, CHCl<sub>3</sub>:acetone = 10:1에서 compound 2(140 mg)을 얻었고, CHCl<sub>3</sub>:acetone = 8:1에서 compound 1(180 mg)을 얻었다.

화합물 1: pale yellow needle; mp 189°C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -32.0 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>); UV(CHCl<sub>3</sub>) λ<sub>max</sub> (log ε) 289(4.47), 334(3.75) nm; EI/MS m/z (70 eV): 424 [M<sup>+</sup>], 406, 351, 220, 204, 165; IR(KBr) ν<sub>max</sub> 3422, 2970, 2917, 1636, 1604, 1500 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 1.73 (6H, s, H-4", 5"), 1.74 (3H, s, H-4"), 1.79(3H, s, H-5"), 2.83(1H, dd, J=17.3, 3.0 Hz, H-3a), 3.15(1H, dd, J=17.3, 12.8 Hz, H-3b), 3.25(2H, d, J=7.1, H-1"), 3.32(2H, d, J=7.1 Hz, H-1"), 5.25(2H, m, H-2", 2"), 5.54(1H, dd, J=12.8, 3.0 Hz, H-2), 5.59(1H, s, H-8), 6.41(1H, s, H-3'), 6.96(1H, s, H-6'); <sup>13</sup>C NMR data

\*연락처  
Phone: 82-55-751-5472; Fax: 82-55-757-0178  
E-mail: khpark@gshp.gsnu.ac.kr

(CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ17.86(C-5''), 17.87(C-5'''), 21.2(C-1''), 25.8(C-4''), 25.8(C-4'''), 29.1(C-1'''), 41.9(C-3), 76.9(C-2), 95.7(C-8), 103.0(C-4a), 104.5(C-3'), 107.7(C-6), 116.3(C-1'), 119.4(C-5'), 121.4(C-2''), 121.8(C-2'''), 128.3(C-1'), 135.0(C-3'''), 135.3(C-3''), 153.3(C-2), 155.6(C-4'), 160.6(C-8a), 161.4(C-5), 163.8(C-7), 196.7(C-4).

화합물 2: pale yellow needle; mp 197°C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -102.8 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>); UV(CHCl<sub>3</sub>) λ<sub>max</sub> (log ε) 291(3.98), 338(3.24) nm; EI/MS *m/z* (70 eV): 422 [M<sup>+</sup>], 407, 389, 220, 202, 165; IR(KBr) ν<sub>max</sub> 3430, 2973, 2931, 1635, 1499, 1450 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ1.41(6H, s, H-4'', 5''), 1.76(3H, s, H-4'), 1.81(3H, s, H-5'), 2.87(1H, dd, *J*=17.3, 3.0 Hz, H-3a), 3.13(1H, dd, *J*=17.3, 12.7 Hz, H-3b), 3.35(2H, d, *J*=7.1 Hz, H-1''), 5.25(1H, t, *J*=7.1 Hz, H-2''), 5.49(1H, d, *J*=9.8 Hz, H-2'''), 5.56(1H, dd, *J*=12.6, 2.9 Hz, H-2), 6.01(1H, s, H-8), 6.25(1H, d, *J*=9.8 Hz, H-1'''), 6.33(1H, s, H-3'), 6.88(1H, s, H-6'); <sup>13</sup>C NMR data(CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ17.9(C-5''), 21.2(C-1''), 25.8(C-4''), 28.1(C-4''), 28.1(C-5'''), 41.9(H-3), 76.7(C-2), 77.1(C-3'''), 95.7(C-8), 103.0(4a), 104.9(C-3'), 107.5(C-6), 114.8(C-5'), 116.4(C-1'), 121.3(C-2''), 121.5(C-1'''), 124.7(C-6'), 128.5(C-2'''), 135.8(C-3''), 154.6(C-4'), 154.6(C-2'), 160.5(C-8a), 161.4(C-5), 163.7(C-7), 196.4(C-4).

항균활성검정. 시료의 항균활성 검정은 한천배지확산법(disk-agar plate diffusion method)으로 측정하였다.<sup>17)</sup> 한천배지확산법은 시료용액을 10 μg/disk 농도로 0.45 μm membrane filter (Milipore, USA)로 여과하여 제공하고 멸균된 filter paper disk (Toyo, 8 mm, Japan)에 20 ml/씩을 흡수시킨 후, 용매를 완전히 휘산시킨 후 시험용 평판배지 위에 놓아 밀착시키고 4°C 냉장고에서 1시간 방치한 후, 32°C incubator에서 12-24시간 배양한 다음 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

구조분석. 꾸지뽕나무 뿌리 껍질의 클로로포름 추출액으로부터 화합물 1과 2를 분리하여 이들의 구조를 NMR 등 분광학적인 방법을 이용하여 분석하였다.

화합물 1은 노란색의 침상 결정으로, 분자 ion peak(M<sup>+</sup>)가 *m/z* 424에서 나타났다. IR spectrum에서 3422 cm<sup>-1</sup>(OH)와 1636 cm<sup>-1</sup>(chelated C=O)대에 강한 흡수대를 보였다. UV spectrum (λ<sub>max</sub> 289, 334 nm)을 보면 이 화합물이 flavanone구조임을 예상할 수 있었다.<sup>18)</sup> <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ5.54(1H, dd, *J*=12.8, 3.0 Hz) 및 2.83(1H, dd, *J*=17.3, 3.0 Hz), 3.15(1H, dd, *J*=17.3, 12.8 Hz)는 flavanone의 H-2와 H-3번의 proton임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 25개의 탄소가 관찰되었으며, DEPT 90 및 135 spectrum으로부터 1개의 carbonyl, 4개의 methyls, 3개의 sp<sup>3</sup> methylenes, 5개의 sp methines, 1개의 산소가 원자가 붙은 methine, 그리고 11개의 4차 탄소가 있음을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum에서 H-1'와 H-2' 그리고 H-4', H-5'간의 cross peak가 나타났고,

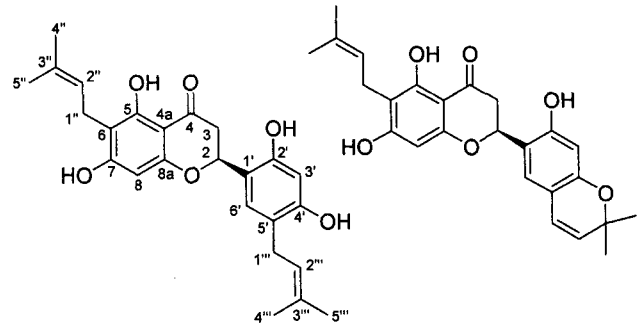


Fig. 1. Structures of compound 1 and 2.

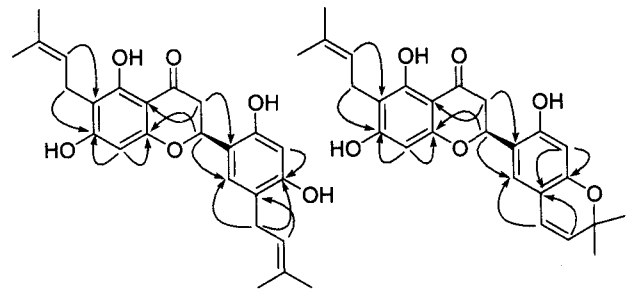


Fig. 2. Important HMBC correlations of compound 1 and 2.

H-2'와 H-4', H-5'간의 cross peak가 나타났다. 또한, H-1'는 H-2'', H-4'', H-5'와 cross peak가 나타났고, H-2''는 H-4'', H-5'와 cross peak가 나타났다. 이것으로 2개의 3,3-dimethylallyl기가 있음을 알 수 있었다. 위의 결과로부터 tetrahydroxyflavanone에 2개의 3,3-dimethylallyl기가 치환되어있는 것으로 예상할 수 있었다. 2개의 3,3-dimethylallyl기의 위치는 HMBC (Fig. 2)를 통하여 결정하였다. HMBC spectrum에서 C-7은 H-1'와 H-8, C-6은 H-2'와 H-8과의 correlation이 나타났으며, C-4'는 H-3'와 H-1'', C-5'는 H-3'와 H-6', H-2''와 HMBC correlation이 나타났다. 이것으로 2개의 3,3-dimethylallyl기의 위치는 각각 A-ring의 C-6, C-ring의 C-5'에 치환되어 있음을 알 수 있었다. C-2'번 위치의 절대배열 결정하기 위해 CD spectra를 조사한 결과, 339 nm에서 positive cotton effect, 295 nm에서 negative cotton effect가 나타났다. 이것으로 C-2'번은 S-배열임을 알 수 있었다. 위의 결과들로부터, 화합물 1은 euechrestflavanone B로 동정하였다.<sup>19)</sup>

화합물 2는 노란색 침상 결정으로, 분자 ion peak(M<sup>+</sup>)가 *m/z* 422에서 나타났다. IR spectrum에서 3430 cm<sup>-1</sup>(OH)와 1635 cm<sup>-1</sup>(chelated C=O)대에 강한 흡수대를 보였다. UV spectrum (λ<sub>max</sub> 291, 338 nm)을 보면 이 화합물이 flavanone구조임을 예상할 수 있다. <sup>1</sup>H-NMR에서 δ5.56(1H, dd, *J*=12.6, 2.9 Hz) 및 2.87(1H, dd, *J*=17.3, 3.0 Hz), 3.13(1H, dd, *J*=17.3, 12.7 Hz)는 flavanone의 H-2와 H-3번의 proton임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 25개의 탄소가 관찰되었으며, DEPT 90 및 135 spectrum으로부터 1개의 carbonyl, 4개의 methyls, 2개의 sp<sup>3</sup> methylenes, 6개의 sp methines, 1개의 산소가 원자가 붙은 methine, 그리고 11개의 4차 탄소가 있음을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum에서 H-1'와 H-2'', H-4'',

**Table 1. Antibacterial activity of Compound 1 and 2 isolated from *Cudrania tricuspidata* with 10 µg/disk**

Compounds	Diameter of inhibitory zone (mm) <sup>a</sup>			
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	11.5	10.0	11.5	na
2	10.0	10.5	11.0	na
ampicillin	29.5	27.5	28.0	27.0

<sup>a</sup>Values are the diameter of inhibitory zone of including the disk (8 mm), na = not active.

H-5"간의 cross peak와 H-2"와 H-4", H-5"간의 cross peak로 1개의 3,3-dimethylallyl기가 있음을 알 수 있었고, H-1"와 H-2"의 cross peak와 HMBC spectrum에서 C-3"는 H-5"와, H-4", H-2", H-1"와의 correlation으로 2,2-dimethylchromene 고리가 한 개 있음을 알 수 있었다. HMBC spectrum에서 C-7은 H-1"와 H-8, C-6은 H-2"와 H-8과의 correlation으로 3,3-dimethylallyl기는 A-ring의 C-6에 치환되어 있음을 알 수 있었다. 또한 C-5'와 H-3', H-1", H-2", C-6'와 H-1", H-2"의 HMBC correlation으로 2,2-dimethylchromene 고리가 C-ring의 H-5'에 있음을 알 수 있었다. CD spectra로부터 C-2번의 절대 배열이 S-배열임을 알 수 있었다. 위의 결과들로부터, 이 화합물은 euchrestaflavanone C로 동정하였다.<sup>19)</sup>

Euchrestaflavanone B는 *Euchresta japonica*에서 분리 보고된 바 있으나, 꾸지뽕나무에서는 처음으로 분리 보고된 것이다.

**항균활성.** 분리된 화합물들을 병원성 미생물에 대하여 한천 배지확산법으로 항균활성 검증을 한 결과, 화합물 1과 2는 10 µg/disk의 농도에서 Gram 양성균인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 그리고 *Bacillus cereus* 대하여 활성을 나타내었다. 이들의 결과를 Table 1에 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 진주산업대학교 동물생명산업 지역협력연구센터의 연구비 지원에 의한 것입니다.

## 참고문헌

- Jang, I. M. (2003) In *Treatise on Asian Herbal Medicines*, Natural Products Science Seoul National University Press, Seoul.
- Nomura, T., Hano, Y. and Fujimoto, T. (1983) Three new isoprenylated xanthenes, cudraxanthone A, B and C, from the root bark of *Cudrania Tricuspidata* (carr.) bur. *Heterocycles* **20**, 213-218.
- Fujimoto, T., Hano, Y. and Nomura, T. (1984) Components of root bark of *Cudrania tricuspidata* 1. Structures of four new isoprenylated xanthenes, cudraxanthenes A, B, C and D. *Planta Med.* **50**, 218-221.
- Hano, Y., Matsumoto, Y., Sun, J. Y. and Nomura, T. (1990) Structures of four new isoprenylated xanthenes, cudraxanthenes H, I, J, and K. *Planta Med.* **56**, 478-481.
- Hano, Y., Matsumoto, Y., Sun, J. Y. and Nomura, T. (1990) Structures of three new isoprenylated xanthenes, Cudraxanthenes E, F, and G. *Planta Med.* **56**, 399-402.
- Hano, Y., Matsumoto, Y., Shinora, K., Sun, J. Y. and Nomura, T. (1991) Structures of four new isoprenylated xanthenes, cudraxanthenes L, M, N, and O from *Cudrania tricuspidata*. *Planta Med.* **57**, 172-175.
- Fujimoto, T., Hano, Y., Nomura, T. and Uzawa, J. (1984) Components of root bark of *Cudrania tricuspidata* 2. Structures of two new isoprenylated flavones, cudraflavones A and B. *Planta Med.* **50**, 161-163.
- Fujimoto, T. and Nomura, T. (1984) Structures of cudraflavanone A and euchrestaflavanone C. *Heterocycles* **22**, 997-1003.
- Young, H. S., Park, H. J. and Choi, J. S. (1989) Chemical study on the stem of *Cudrania tricuspidata*. *Arch. Pharm. Res.* **12**, 39-41.
- Lee, I. K., Kim, C. J., Song, K. S., Kim, H. M., Koshino, H., Uramoto, M. and Yoo, I. D. (1996) Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry* **41**, 213-216.
- Fujimoto, T. and Nomura, T. (1985) Components of root bark of *Cudrania tricuspidata*; 3. Isolation and structure studies on the flavonoids. *Planta Med.* **51**, 190-193.
- Cha, J. Y., Kim, H. J., Chung, C. H. and Cho, Y. S. (1999) Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 1310-1315.
- Cha, J. Y., Kim, H. J. and Cho, Y. S. (2000) Effect of water soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in tissues of rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 531-536.
- Kim, H. J., Cha, J. Y., Choi, M. R. and Cho, Y. S. (2000) Antioxidative activities by water-soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Agric. Chem.* **43**, 148-152.
- Kang, D. G., Hur, T. Y., Lee, G. M., Oh, H. C., Kwon, T. O., Sohn, E. J. and Lee, H. S. (2002) Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *Life Sci.* **70**, 2599-2609.
- Lee, I. K., Kim, C. J., Song, K. S., Kim, H. M., Koshino, H., Uramoto, M. and Yoo, I. D. (1996) Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry* **41**, 213-216.
- Piddok, L. J. V. (1990) Techniques used for the determination of antibacterial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 307-318.
- The Chinese Academy of Sciences (1981) In *Manual Identification of Flavonoids*. Publishing House of Science, Beijing.
- Shirataki, Y., Manaka, A., Yokoe, I. and Komatsu, M. (1982) Two prenylflavanones from *euchresta japonica*. *Phytochemistry* **21**, 2959-2963.

---

**Isolation of Antibacterial Prenylated Flavonoids from *Cudrania tricuspidata***

Byong Won Lee, Nam Suk Kang and Ki Hun Park\* (*Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*)

**Abstract:** Two prenylated flavonoids were isolated from a chloroform extract of the root bark of *Cudrania tricuspidata*. Both compounds (**1**, **2**) showed antibacterial activity against Gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. Their structures were determined as euchrestaflavanone B (**1**) and euchrestaflavanone C (**2**) on the basis of  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and long-range coupling NMR techniques.

---

Key words: *Cudrania tricuspidata*, euchrestaflavanone B, euchrestaflavanone C, antibacterial activity

\*Corresponding author