

TLC-DM을 이용한 Rubus속 4종 식물의 Triterpenoid 함량 비교

남정환 · 정현주¹ · 최종원² · 김원배³ · 박희준*

상지대학교 자원식물학과, ¹원광대학교 약학대학, ²경성대학교 약학대학, ³농촌진흥청 고령지농업연구소

Comparison of Triterpenoid Contents of the Four Rubus Plants in Korea Using TLC-DM

Jung-Hwan Nam, Hyun-Ju Jung¹, Jongwon Choi², Won-Bae Kim³ and Hee-Juhn Park*

Department of Botanical Resources, Sangji University, Woosan-Dong, Wonju 220-702, Korea

¹College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

³National Alpine Agricultural Institute, Rural Development Administration, Pyongchang 232-950, Korea

Abstract – The extraction yield of the methanolic extracts and 19 α -hydroxyursane-type triterpenoid (19 α -HUT) fraction were investigated in the unripe and ripe fruits and the leaves of the four Rubus plants (*Rubus coreanus*, *R. crataegifolius*, *R. phoenicolasius*, *R. pungens* var. *oldhami*) to develop the biomaterial 19 α -HUT mixture as functional foods. Thin layer chromatography-Densitometer (TLC-DM) was used to analyze the individual quantity of 19 α -HUTs using standard compounds (euscaphic acid, tormentic acid, 23-hydroxytormentic acid, kaji-ichigoside F₁, rosamultin, niga-ichigoside F₁). The content of methanolic extract of the fruits were higher in the ripe stage than in the unripe stage whereas the content of 19 α -HUT mixture varied with each Rubus species. The Rubus plants containing the highest amount of 19 α -HUTs in the leaves were *R. coreanus*, *R. phoenicolasius* and *R. pungens* var. *oldhami* while only *R. crataegifolius* showed the highest content in the ripe fruits. The mean of total genin content of 19 α -HUTs was 0.94 mg/g; that of the glycosides was 0.60 mg/g. The genin quantity was found in the order of 23-hydroxytormentic acid > euscaphic acid > tormentic acid; the glycoside was observed in the order of niga-ichigoside F₁ > kaji-ichigoside F₁ > rosamultin, by which the biosynthetic pathway of 23-hydroxytormentic acid and its glucoside niga-ichigoside F₁ via the intermediates tormentic acid and/or rosamultin was presumed. It is also suggested that the ripe fruits of *R. crataegifolius* will be desirable to use as functional foods rather than unripe fruits.

Key words – Rubus, *Rubus crataegifolius*, 19 α -hydroxyursane-type triterpenoid, TLC-DM

한국에서는 장미과(Rosaceae) Rubus속 식물이 10여종 자생한다.¹⁾ 이 중 한국의 강원도 일대에서 자주 발견되는 Rubus 속 식물로는 복분자딸기(*R. coreanus*), 산딸기(*R. crataegifolius*), 줄딸기(*R. pungens* var. *oldhami*), 붉은가시딸기(*R. phoenicolasius*) 및 명석딸기(*R. parvifolius*) 등이 있다. 이 중 복분자딸기는 서양의 블랙베리(blackberry)에 해당하며 한국의 농가에서 이미 재배되고 있는 상태에 있고 산딸기는 한국의 산에 대량 야생하고 있는 식물로 레드 라스베리(red raspberry)에 해당한다고 할 수 있다. 한방에서는 복분자딸기의 미숙과를 복분자(Rubi Fructus)라 하여 강장, 강정, 항당뇨, 지사, 명안, 양모 등을 위해 약용되고 있으나²⁾

현재 한국에서 시판되는 한약 복분자는 중국산이다.

저자들은³⁾ 이미 복분자의 항염활성성분으로 niga-ichigoside F₁ 및 그 비당체인 23-hydroxytormentic acid 성분을 밝혔다. 이들 성분은 19 α -hydroxyursane-type triterpenoid(19 α -HUT)에 속한다. Niero 등은⁴⁾ 브라질산 *Rubus imperialis*에서 분리한 niga-ichigoside F₁(niga-F₁)성분의 초산 유도 abdominal constriction에 대한 억제효과로서 그 ID₅₀가 3.1 mg/kg (ip) 수준에서 관찰되었다고 한다. Niga F₁의 비당체인 23-hydroxytormentic acid(23-HTA)가 EtOH + sodium salicylate로 유도한 위손상을 현저히 억제함을 저자들은 보고한 바 있다.⁵⁾

일반적으로 복분자는 미숙과를 약용하므로 실험 중 미숙과에 triterpenoid가 많이 함유될 것으로 예측되어 속과, 미

*교신저자(E-mail): hjpark@sangji.ac.kr
(FAX): 033-730-0564

숙과 및 잎의 성분 함량을 조사하고자 하였다. 또한 복분자 이외에도 산딸기, 붉은가시딸기, 줄딸기 등에 대한 성분 함량도 비교하여 복분자를 대신할 수 있는 기능성식품을 개발하고자 실험에 착수하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약 - TLC Documentation System은 UVI tel Limited 제품을 사용하였으며 소프트웨어는 동일회사의 UVI band program으로 그 colony수를 측정하여 19 α -HUT 화합물의 함량을 측정하였다. TLC plate는 silica gel aluminium sheets(Si-gel 60F₂₅₄, Merck 1.05554.0001)를 사용하였으며 전개용매는 CHCl₃-MeOH-H₂O (75:25:10, 하층)으로 10 cm 전개한 다음 말리고 50%-H₂SO₄로 분무하고 120°C의 오븐에서 30초 발색시킨 다음 이를 Thin layer chromatography-Densitometer(TLC-DM)로 colony 수를 카운트하였다.

식물재료 - 산딸기와 복분자나무는 원주시 근교에 자생하는 식물을 이용하여 실험에 사용하였다. 산딸기 잎과 복분자의 잎은 6월 중 채집한 후 사용하였다. 산딸기 미숙과는 6월 중순 채집하였으며 산딸기 숙과는 붉게 익게 되었을 때인 7월말경 채집하였다. 복분자 미숙과는 8월 초순경

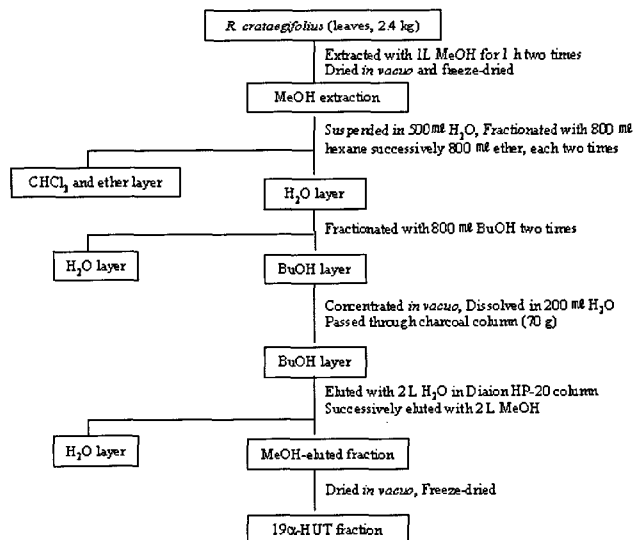
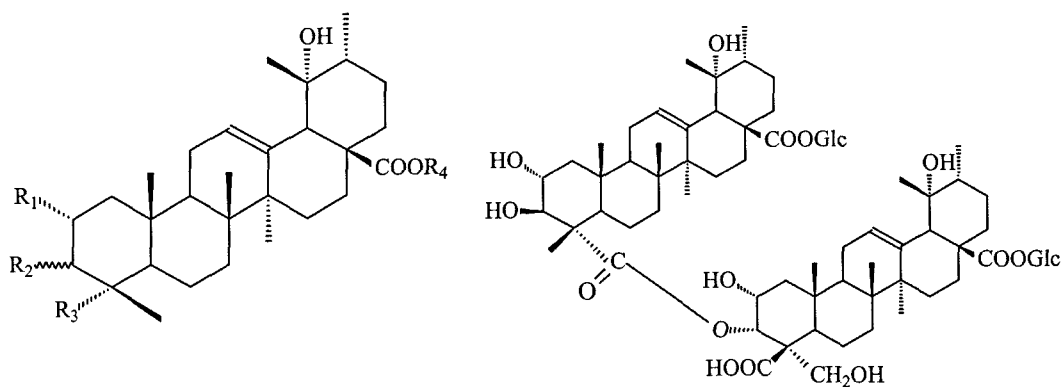


Fig. 1. A schematic procedure for extraction and fractionation of the unripe and ripe and the leaves of the Rubus species.

회백색인 상태의 미숙과를 채집하였으며 숙과는 검게 익게 되었을 때인 8월 중순경 채집하였다.

HUT의 제조 및 추출을 조사 - 분쇄한 각 재료를 정확히



Coreanoside F₁

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
EA(Euscaphic acid)	OH	α-OH	Me	H
TA(Tormentic acid)	OH	β-OH	Me	H
23-HTA(23-hydroxytormentic acid)	OH	β-OH	CH ₂ OH	H
Kaji F ₁ (Kaji-ichigoside F ₁)	OH	α-OH	Me	Glc
Rosa(Rosamultin)	OH	β-OH	Me	Glc
Niga F ₁ (Niga-ichigoside F ₁)	OH	β-OH	CH ₂ OH	Glc
Niga F ₂ (Niga-ichigoside F ₂)	OH	α-OH	CH ₂ OH	Glc
Suav R ₁ (Suavissimoside R ₁)	OH	α-OH	COOH	Glc

Fig. 2. Structure of 19 α -HUT constituents isolated from *R. crataegifolius*.

평량하여 100 g을 취한 후 1.00 L의 메탄올로 5시간씩 3회 끓여서 추출한 다음 여과하였다. 이를 진공농축기를 이용하여 감압하에 농축하고 동결건조한 다음 정확히 메탄올 추출물을 평량하였다. 이 메탄올 추출물을 500 ml의 증류수에 현탁시키고 분획깔때기에서 hexane 800 ml로 2회 분배추출한 다음 남은 수층에 에테르 800 ml로 2회 분배추출하였다. 남은 수층에 수포화 BuOH로 3회 분배추출하였고 BuOH 층을 농축하였다. 이 BuOH 분획을 증류수 500 ml에 현탁시킨 다음 charcoal 70 g을 넣고 흔들어 준 다음 여과지에서 거른다. 계속하여 Diaion HP-20(320 g, 5×7 cm)칼럼에 시료를 넣고 증류수 2000 ml로서 전개하여 당 분획을 제거한 다음, 계속하여 MeOH 2.0 L로 전개하여 유출된 액을 모아 농축하였으며, 이를 19 α -HUT 분획으로 하였다. 19 α -HUT 분획은 TLC에서 사포닌 이외의 반점을 거의 확인할 수 없었다. 19 α -HUT 분획을 얻는 과정을 Fig. 1에 나타내었으며, 동일한 실험을 3회 반복하여 평균한 값인 알코올 추출물의 무게와 19 α -HUT의 무게를 Fig. 2에 나타내었다.

19 α -HUT 함량 비교 - 표준액을 제조하기 위해 전보의 방법⁶⁾에 따라 분리된 euscaphic acid(EA), tormentic acid(TA), 23-hydroxytormentic acid(23-HTA), kaji-ichigoside F₁(Kaji F₁), rosamultin(Rosa), niga-ichigoside F₁(Niga F₁)의 6종을 각각 메탄올에 녹이고 희석하여 5.00 mg/ml의 용액을 제조하였다. 따로 검액을 제조하기 위해 산딸기 및 복분자 19 α -HUT mixture 20 mg씩 취하고 1000 μ l에 녹였다. 표준액과 검액을 TLC plate에서 0.300 ml씩 정확히 채취하여 spotting하였다. 이를 CHCl₃-MeOH-H₂O(75:25:10, 하층)으로 10 cm 전개한 다음 말리고 50%-H₂SO₄로 분무하고 120°C의 오븐에서 30초 발색시킨 다음 이를 TLC-DM(UVI tel Limited)로 colony 수를 카운트 (software:UVI tel Limited UVI band program)하였다. 표준

액 대비한 검액의 6종 HUT 성분의 함량을 산출하여 식물 재료 중량당 19 α -HUT 화합물 중량(mg/g)의 값을 계산하여 Table II에 나타내었다.

결 과

알코올 추출물 및 HUT 수율 - 메탄올 추출물의 수율은 미숙과와 숙과를 비교하였을 때 숙과가 현저히 높았으며, 잎은 식물종에 따른 편차가 크지만 일반적으로 그 수율이 높았다(Table I). 가장 높은 수율을 보였던 것은 줄딸기 잎으로서 67.5%에 달하였고 다음으로 산딸기 숙과(60.0%), 복분자 잎(43.9%) 순이었다. HUT 수율은 복분자 잎이 가장 높았으며(5.08%), 줄딸기 잎(2.41%), 산딸기 숙과 순이었다.

TLC에 의한 성분의 확인 - 실험에 사용된 4종의 Rubus 속 식물재료는 모두 EA, TA, 23-HTA, Kaji F₁, Niga F₁을 모두 함유하고 있었다. Niga-ichigoside F₂의 존재가 확인된 식물 재료는 복분자 미숙과, 줄딸기 미숙과 산딸기 숙과 및 잎이었다. Suavissimoside R₁을(Suav R₁) 함유하는 식물재료는 붉은가시딸기 미숙과 복분자딸기 잎 산딸기 전부위에서 관찰되었다. 그리고, coreanoside F₁이 확인된 식물재료는 붉은가시딸기 미숙과 복분자 미숙과와 잎, 산딸기의 미숙과와 잎에서 관찰되었다.

Triterpenoid의 함량 - TLC densitometry로 6종 tripterpenoid의 함량을 측정하여 Table II에 나타내었다. 대체로 잎에서는 triterpenoid의 함량이 높음을 알 수 있었다. 과실의 경우 복분자를 제외하고 일반적으로 숙과의 triterpenoid 함량이 높았다. 즉 복분자딸기의 경우 미숙과에는 triterpenoid 함량이 높으나 숙과에서는 그 함량이 낮아 다른 식물재료와는 다른 양상을 나타내었다. 비당체(genin)의 평균함량은 0.94 mg/g이었으며 배당체(glycoside)는

Table I. Yield of the MeOH extracts 19 α -HUT fraction obtained from the ripe and unripe fruits and leaves of *R. coreanus*, *R. crataegifolius*, *R. pungens* var. *oldhami*, *R. phoenicolasius*

Plant	Part	MeOH extract (%)	HUT fraction (%)
<i>R. coreanus</i>	Unripe fruit	7.3	0.42
	Ripe fruit	32.2	0.10
	Leaf	43.9	5.08
<i>R. crataegifolius</i>	Unripe fruit	9.7	0.11
	Ripe fruit	60.0	1.98
	Leaf	28.6	1.02
<i>R. phoenicolasius</i>	Unripe fruit	11.0	0.60
	Ripe fruit	13.4	1.05
	Leaf	11.8	1.81
<i>R. pungens</i> var. <i>oldhami</i>	Unripe fruit	10.2	0.23
	Ripe fruit	19.2	0.40
	Leaf	67.5	2.41

Table II. Comparison of 19 α -HUTs' contents in ripe and unripe fruits and leaves of *R. coreanus*, *R. crataegifolius*, *R. pungens* var. *oldhami*, *R. phoenicolasius*

Plant name	Plant part	Genin (mg/g)				Glycoside (mg/g)				Sum
		EA	TA	23-HTA	Sum	Kaji-F ₁	Rosa	Niga-F ₁	Sum	
<i>R. coreanus</i>	Unripe fruit	0.09	0.05	0.13	0.27	0.05	0.05	0.04	0.14	0.41
	Ripe fruit	0.05	0.01	0.01	0.07	0.02	0.03	0.01	0.06	0.13
	Leaf	0.61	0.28	1.35	2.24	0.38	0.45	0.50	1.33	3.57
<i>R. crataegifolius</i>	Unripe fruit	0.04	0.03	0.06	0.13	0.04	0.02	0.08	0.14	0.27
	Ripe fruit	0.69	0.40	0.82	1.91	0.49	0.28	1.26	2.03	3.94
	Leaf	0.33	0.32	0.80	1.45	0.28	0.16	0.16	0.60	2.05
<i>R. phoenicolasius</i>	Unripe fruit	0.17	0.02	0.18	0.37	0.07	0.03	0.04	0.14	0.51
	Ripe fruit	0.43	0.03	0.14	0.60	0.08	0.05	0.13	0.26	0.86
	Leaf	0.51	0.13	0.43	1.07	0.16	0.01	0.26	0.43	1.50
<i>R. pungens</i> var. <i>oldhami</i>	Unripe fruit	0.14	0.03	0.12	0.29	0.05	0.04	0.08	0.17	0.46
	Ripe fruit	0.13	0.02	0.06	0.21	0.11	0.04	0.28	0.43	0.64
	Leaf	1.33	0.40	0.97	2.70	0.36	0.36	0.75	1.47	4.17
Mean		0.38	0.14	0.42	0.94	0.17	0.13	0.29	0.60	1.54

Abbreviation: EA(Euscaphic acid), TA(Tormentic acid), 23-HTA(23-hydroxytormentic acid), Kaji F₁(Kaji-ichigoside F₁), Rosa(Rosamultin), Niga F₁(Niga-ichigoside F₁).

1.54 mg/g을 보여 triterpenoid는 배당체로서 더 많이 존재함이 나타났다. 비당체 함량은 23-HTA > euscaphic acid > tormentic acid 순으로 관찰되었으며, 배당체 함량은 Niga F₁ > Kaji F₁ > Rosa 순으로 관찰되었다. Niga F₁의 함량은 산딸기 속과에서 가장 높았다.

고 찰

Rubus속 식물에서 존재하는 19 α -HUT는 pomolic acid를 제외하면 2 α ,3 α - 혹은 2 α ,3 α -di-OH의 구조를 가지는 화합물로 존재하며 EA와 TA가 대표적이며 이 계열 화합물에서 그 구조가 가장 단순하다. EA와 TA는 상호 epimer의 관계에 있으므로 pomolic acid를 전구물질로 하여 생합성된 것으로 예상되며 H₂O 분자의 첨가에 의해 생성된 것으로 예상된다.⁸⁾

이러한 EA와 TA가 4종의 식물재료 모든 부위에서 동시에 관찰된 점으로 미루어 상기와 같은 생합성과정을 예상할 수 있다. 한편 EA 및 TA의 평균함량은 각각 0.38 mg/g, 0.14 mg/g이었던 바 EA 함량이 더 높게 관찰되었다. 그리고 23-HTA가 비당체 중 가장 높은 함량을 보였으므로 TA가 23-HTA의 전구물질로 사용됨에 따른 양적 변화인 것으로 예상되었다. 이러한 현상은 배당체에서도 유사하게 관찰되었는데 TA의 배당체인 Rosa는 평균함량(0.13 mg/g)이 Kaji F₁보다 낮은 함량(0.17 mg/g)을 보였고, 23-HTA 및 Rosa에서 생합성될 수 있는 Niga F₁은 가장 높은 함량을 보였다(0.29 mg/g). 이상의 19 α -HUT들은 Niga F₁을 생합성하기 위

한 중간체(intermediate)이거나 부산물(byproduct)일 것으로 생각된다. 저자들은 Oleanane계 배당체 화합물(사포닌)이 주로 bisdesmoside로 존재하는 현상을 음나무에서 확인한 바 있으나, Ursane 배당체가 주성분인 Rubus속 식물들은 주성분을 비당체가 좀 더 많이 함유되어 있음이 관찰되었다.⁹⁾

한약 복분자는 복분자 딸기의 미숙과를 지칭한다고 하였으며, 본 연구결과에서도 복분자는 미숙과에 19 α -HUT가 더 많은 것으로 나타나고 있었던 반면(0.41 mg/g), 열매가 검게 익는 속과에서는 극소량만이 관찰되었다(0.13 mg/g). 그리고, 복분자 앞에서 속과보다 더 많은 19 α -HUT가 존재함이 나타났다(3.57 mg/g). 이와 반대로, 열매가 붉게 익는 산딸기와 붉은가시딸기 및 줄딸기에서는 속과에서 훨씬 높은 함량을 보였다. 그리고, 장미과 식물인 해당화 뿌리에서 얻어진 EA 및 TA의 항염효과¹⁰⁾ 및 항비만효과,¹¹⁾ TA의 TPA 유도 흰쥐 귀 부종에 대한 억제효과¹²⁾ 및 anti-tumor promoting effect¹³⁾ 등이 보고되었다. 또한 Ivorra 등은¹⁴⁾ TA가 인슐린 유리 유도에 의한 혈당강하효과를 보고하였다. Wang 등은¹⁵⁾ 줄딸기 총배당체 분획의 cerebral ischemia에 대한 억제효과를 흰쥐를 이용한 실험에서 밝혔다.

이러한 사실로 미루어 산딸기는 약용이나 건강기능성식품으로 복분자를 대용하여 사용하고자 할 때는 미숙과보다 속과를 이용하는 것이 더 바람직하다고 생각된다. 복분자를 비롯한 Rubus속 식물은 민간에서 지사제로 사용되는 예가 많으며, 지사효과를 나타내리라고 예상되는 복분자 탄닌 성분이 보고된 바 있다. 그러므로 탄닌 성분 대신에 19 α -HUT가 강화된 산딸기 음료 등 기능성식품의 개발이 가능하다

고 생각된다. 그리고, 복분자나무 열매의 경우는 열매 추출물에 복분자의 잎 추출물로 19 α -HUT를 강화하는 방법의 제품개발이 기대되며, 산딸기의 경우는 속과를 그대로 이용하는 것이 기능성을 위해 매우 바람직하다고 제시되었다.

결 론

한국산 4종의 Rubus속 식물의 19 α -HUT 혼합물을 이용하기 위하여 그 추출물 및 개별 함량을 6종 표품 19 α -HUT 화합물을 이용하여 비교하였다. 그 결과 복분자딸기 잎을 이용하여 높은 수율의 19 α -HUT 혼합물 제조가 가능하였으며 산딸기는 속과에서 가장 높은 19 α -HUT 혼합물 제조가 가능하였다. 그리고 단일 성분으로는 Niga F₁이 가장 높은 평균함량을 보였다. 그러므로, 이러한 사실을 이용하여 19 α -HUT 혼합물이 강화된 건강식품의 개발이 기대된다.

사 사

본 연구는 2006년도 농업특정연구사업의 지원에 의해 수행된 결과입니다.

인용문헌

1. Ko, K. and Jeon, E. (2003) Ferns, fern-allies, and seed-bearing plants of Korea, Iljinsa, Seoul, pp. 294-295.
2. Moon, G. S. (1991) Constituents and Uses of Medicinal Herbs, Ilweolseogak, Seoul, pp. 310-311.
3. Choi, J., Lee, K. T., Ha, J., Yun, S. Y., Ko, C. D., Jung, H. J. and Park H. J. (2003) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of niga-ichigoside F₁ and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*, *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 1436-1441.
4. Niero, R., Cechnel Filho, V., Souza, M. M., Montanari, J. L., Yunes, R. A. and Delle Monache, F. (1999) Antinociceptive activity of niga-ichigoside F₁ from *Rubus imperialis*, *J. Nat. Prod.* **61**: 1145-1146.
5. Nam, J. H., Jung, H. J., Choi, J., Lee, K. T. and Park, H. J. (2006) The antigastropathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F₁ and 23-hydroxytormentonic acid isolated from the unripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model, *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 967-970.
6. Nam, J. H., Jung, H. J., Taponjdjou, L. A., Lee, K. T., Choi, J., Kim, W. B. and Park, H. J. (2007) The Anti-hyperlipidemic Effect and Constituents of the 19 α -Hydroxyursane-type Triterpenoid fraction Obtained from the Leaves of *Rubus crataegifolius*, *Biol. Pharm. Bull.* **30**: (submitted).
7. 박희준, 정현주, 남정환, 임상철, 김원배 (2006) Rubus속 식물자원에 존재하는 19 α -hydroxyursane-type triterpenoid의 특성과 이용, *한국자원식물학회지* **19**: 563-572.
8. 남정환, 정현주, 최종원, 박광균, 김원배, 이명선, 박희준 (2006) 개두릅에서 칼로파낙스사포닌 월별 함량변화의 추이, *생약학회지* **37**: 184-189.
9. Jung, H. J., Nam, J. H., Choi, J., Lee, K. T. and Park, H. J. (2004) 19-Hydroxyursane-type Triterpenoids: Antinociceptive Anti-inflammatory Principles of the Roots of *Rosa rugosa*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 101-104.
10. 박희준, 남정환, 정현주, 이명선, 이경태, 정민화, 최종원 (2005) 고지방 식이로 유도된 비만 흰쥐에서 해당근에서 분리된 Euscaphic Acid 및 Tormentonic Acid의 효과, *생약학회지* **36**: 324-331.
11. Banno, N., Akihisa, T., Tokunda, H., Yasukawa, K., Higashihara, H., Ukiya, M., Watanabe, K., Kimura, Y., Hasegawa, J. and Nishino, H. (2004) Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 85-90.
12. Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Taguchi, Y., Akazawa, H., Ukiya, M., Kimura, T. and Nishino, H. (2005) Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 1995-1999.
13. Ivorra, M. D., Paya, M., Villar, A. (1988) Hypoglycemic and insulin release effects of tormentonic acid: a new hypoglycemic natural product, *Planta Med.* **54**: 282-285.
14. Wang, J. S., Qiu, Z. Y., Xia, Y. P., Li, H. J., Ren L. Y. and Zhang, L. (2006) The protective effects of total glycosides *Rubus parvifolius* on cerebral ischemic in rat. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **31**: 138-141.

(2007년 4월 30일 접수)