

## 참느릅나무 잎에서 Flavonoid 성분의 분리 및 HPLC에 의한 정량

김 성 환 · 황 금 택\* · 박 종 철\*\*

경북보건환경연구원 · \*원광대학교 한의과대학 본초학교실 ·

\*\*순천대학교 자연과학대학 한약자원학과

### Isolation of Flavonoids and Determination of Rutin from the Leaves of *Ulmus parviflora*

Sung Hwan Kim, Keum Taek Hwang\* and Jong Cheol Park\*\*

Kyongbuk Institute of Health and Environment, Daegu 702-702,

\*College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iri 570-749 and

\*\*Department of Oriental Medicine Resources, College of Natural  
Science, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea

**Abstract**—From the leaves of *Ulmus parviflora* isoquercitrin and rutin were isolated and identified by chemical and spectral analysis. The content of rutin was determined by HPLC, and it was about 2.81% in methanol extract.

**Keywords**—*Ulmus parviflora* · Ulmaceae · flavonoid · isoquercitrin · rutin · HPLC

참느릅나무는 느릅나무과에 속하는 낙엽활엽 교목으로서 수피는 회갈색이며, 가지는 갈색이고 털이 밀생하며, 잎은 호생으로 배열하는 단엽이고, 양성화이며 9월에 개화한다.<sup>1)</sup> 분포는 경기도 이남에 흔히 자라며 특히 전남지역에서는 오동도, 진도, 백운산,芥島 등지에서 야생되고 있다.

Nakai는 광범위한 형태학적 연구를 통해 느릅나무과를 정리하면서 참느릅나무를 *Ulmus parviflora* Jacq. 대신에 *Ulmus coreana* Nakai로 신종 처리하기도 하였다. 느릅나무속 식물의 꽃은 대부분 전년도 가지에서 눈이 벌어지면서 봄에 피나 참느릅나무의 꽃만은 금년도 새로이 자란 가지에서 가을에 뿜으로써 구별이 가능하다.<sup>2)</sup>

한방에서는 참느릅나무(*U. parviflora*), 당느릅나무(*U. davidiana*), 느릅나무(*U. davidiana* var. *japonica*)의 잎을 낭유엽(榔榆葉)이라 하며, 소염작용으로 瘡腫, 腰背痛, 齒痛 등의 치

료에 사용된다.<sup>3)</sup> 또한 근피 또는 수피는 낭유피(榔榆皮)라 하며, 利水, 消腫의 작용으로 淋疾, 水腫, 癰腫, 乳腺炎의 치료에 사용되어 진다.<sup>4)</sup> 우리나라 민간에서는 뿌리껍질에서 나오는 액을 간암의 치료에, 뿌리를 찢어 환부에 발라서는 염증의 치료에, 그리고 가지와 잎은 위궤양 치료에 사용하기도 한다.<sup>5)</sup>

손 등<sup>6)</sup>은 당느릅나무 근피에서 (+)-catechin, (+)-catechin 5-O-β-D-apiofuranoside를 분리하였으며, Chen 등<sup>7)</sup>은 참느릅나무의 목재부분에서 manosonone C, G, 7-hydroxycadalenal, 3-methoxy-7-hydroxy-cadalenal을 보고하였으나, 참느릅나무잎 성분연구에 대해서는 아직 보고된 물질이 없으므로 이에 대한 연구를 시작하여 2가지 성분을 단리, 동정하였다. 또한 화합물 2는 column chromatography 뿐아니라 용매분획만으로도 많은 양이 순수히 분리되어 졌으므로 이 물질의 자원식물로서의 가치를 검토하고자 HPLC

에 의해 그 함량을 정량하였기에 보고하고자 한다.

## 실험 방법

### 1. 실험재료

참느릅나무 잎은 1989년 9월 20일 전남 순천시 매곡동에서 채집하여, 순천대 생물학과 식물계통 분류학 실험실 정영철 교수에 의해 감정한 후, 음건, 가루로 제조해서 사용하였다. 표본은 한약자원학과 표본실에 보관중이다.

### 2. 시약 및 기기

실험에 사용한 column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(Merck Art. 7729), thin layer chromatography용 precoated plate는 Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck Art. 5735), 용매는 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

사용기기로는 Gallen Kamp melting point apparatus, Bomen MB 100-C15 FT-IR spectrophotometer, CE 599 universal automatic scanning spectrometer, Bruker AM-200 spectrometer를 이용하였다. HPLC 분석기기는 Wa-

ters Associate의 분석용 liquid chromatograph로서 Model 440 detector 및 M 730 data module이 부착된 것을 부용하였다. Column은 Waters의  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(3.9 mm×300 mm)을 사용하였다.

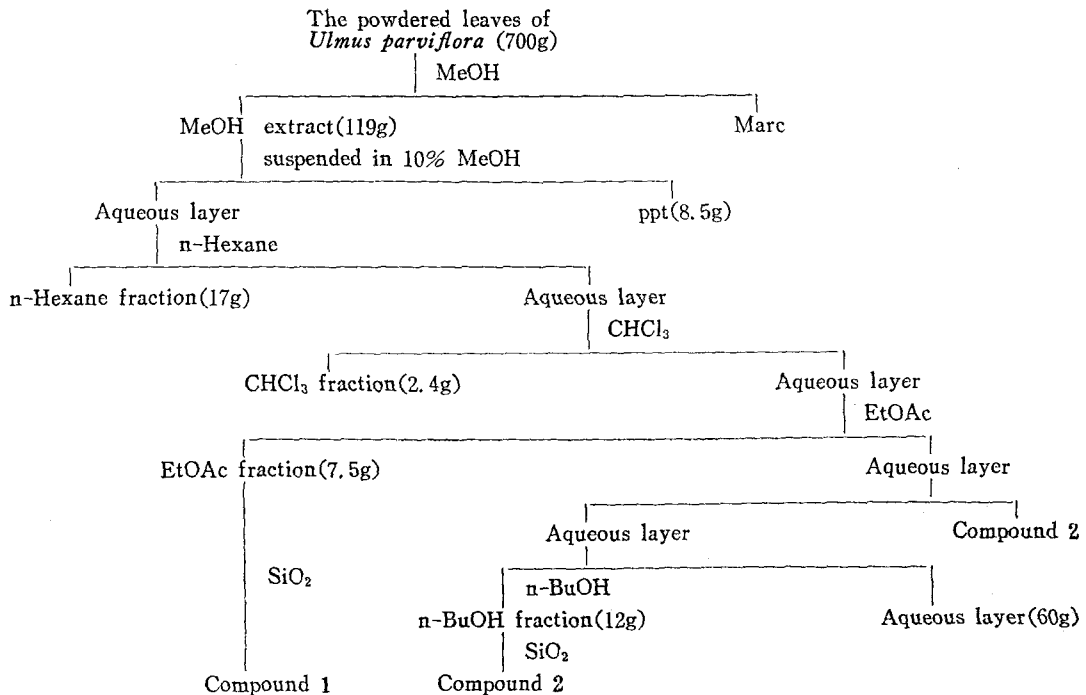
분석용 시약은 HPLC 용 시약을 사용하였으며 내부 표준물질로 사용한 kaempferol 3-O-(6''-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside는 영신초에서 분리한 것을 사용하였다.

### 3. 추출 및 분획

참느릅나무잎(700g)을 음건 후 가루로 제조하여 수욕상에서 환류냉각하면서 MeOH로 3회 추출하였다. 용매로 감압하여 제거, MeOH 추출물을 얻은 후 10% MeOH에 현탁시킨 후 Scheme I과 같이 계통 분획을 실시하여 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH 및 수층으로 분획하였다.

### 4. 화합물 1

mp 234~5°, IR,  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3450(OH), 1670(C=O), 1615, 1600, 1474(C=C), 1190, 1105(C-O)cm<sup>-1</sup>; UV,  $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm 258, 358; NaOMe: 272, 408; AlCl<sub>3</sub>: 275, 440; AlCl<sub>3</sub>+HCl: 270, 404; NaOAc: 272, 375; NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 262,



Scheme I. Fractionation and isolation of compounds 1 and 2

381;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 200MHz)  $\delta$ : 12.62 (1H, s, C<sub>5</sub>-OH), 7.67(1H, d,  $J=2.0\text{Hz}$ , H-2'), 7.56(1H, dd,  $J=9.0$  &  $2.0\text{Hz}$ , H-6'), 6.63(1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ , H-5'), 6.38(1H, d,  $J=1.2\text{Hz}$ , H-8), 6.18(1H, d,  $J=1.2\text{Hz}$ , H-6), 5.45(1H, d,  $J=6.9\text{Hz}$ , anomeric H of glucose);  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 50.3MHz)  $\delta$ : 177.4(C-4), 164.2(C-7), 161.2(C-5), 156.3(C-2), 156.1(C-9), 148.4(C-4'), 144.8(C-3'), 133.3(C-3), 121.5(C-1'), 121.1(C-6'), 116.1(C-5'), 115.2(C-2'), 103.9(C-10), 100.9(C-1''), 98.7(C-6), 93.5(C-8), 77.5(C-5'''), 76.5(C-3''), 74.1(C-2''), 69.9(C-4''), 60.9(C-6'').

### 5. 화합물 2

mp 194~7°, IR,  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3260, 1654, 1599, 1505, 1458, 1362, 1294, 1205, 1069, 1006  $\text{cm}^{-1}$ ; UV,  $\lambda_{\text{max}}$ (MeOH)nm: 258, 359; NaOMe: 272, 332, 409;  $\text{AlCl}_3$ : 274, 440;  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$ : 271, 403; NaOAc: 270, 385; NaOAc+ $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 262, 380;  $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 200MHz)  $\delta$ : 12.58(1H, s, C<sub>5</sub>-OH), 7.56(1H, dd,  $J=9.0$  &  $1.9\text{Hz}$ , H-6'), 7.51(1H, d,  $J=1.9\text{Hz}$ , H-2'), 6.83(1H, d,  $J=9.0\text{Hz}$ , H-5'), 6.38(1H, d,  $J=1.8\text{Hz}$ , H-8), 6.17(1H, d,  $J=1.8\text{Hz}$ , H-6), 5.32(1H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ , anomeric H of glucose), 4.37(1H, s, anomeric H of rhamnose), 0.98(3H, d,  $J=6.0\text{Hz}$ , CH<sub>3</sub> of rhamnose);  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 50.3MHz)  $\delta$ : 177.3(C-4), 164.1(C-7), 161.2(C-5), 156.6(C-2), 156.4(C-9), 148.4(C-4'), 144.7(C-3'), 133.3(C-3), 121.6(C-1'), 116.3(C-5'), 115.2(C-2'), 104.0(C-10), 101.2(C-1''), 100.7(C-1'''), 98.7(C-6), 93.6(C-8), 76.4(C-3''), 75.9(C-5'''), 74.1(C-2''), 71.9(C-4'''), 70.6(C-4'')\*, 70.4(C-2''')\*, 70.0(C-3''')\*, 68.2(C-5'''), 67.0(C-6''), 17.7(C-6'''), \*Assignment may be reversed.

### 6. 산 가수분해

화합물 1 및 2를 각각 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 로 수용상에서 환류 냉각하여 5시간 가열, 가수분해하고 냉각 후 EtOAc에 이행시켜 용매를 유기한 잔사를 MeOH로 재결정하였다. 이 aglycone들은 표준품과의 대조(TLC, mmp 및 UV)에 의해

quercetin으로 동정하였다.

### 7. 화합물 2의 HPLC 정량

#### 1) 분석조건

이동상으로는 THF-dioxane-MeOH-HOAc-5%  $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ (145:125:50:20:2:658)을 사용해서 isocratic elution시켰다. 분석은 실온에서 실시하였으며 용매의 유속은 1.0 ml/min, UV detector는 365 nm를 사용하였고 감도는 0.2 AUFS, chart speed는 0.5 cm/min으로 하였다.

#### 2) 표준검량선의 작성

표준검량선의 작성은 내부표준물질로서 kaempferol 3-O-(6''-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside 20 mg을 정량하여 MeOH 20ml에 용해시켜 1mg/ml의 내부표준액을 조제하였다. 화합물 2는 10 mg을 정량하여 MeOH에 10ml에 용해시킨 용액을 stock solution으로 해서 이를 일정량씩 취한 후 각각에 내부표준물질 1ml을 가해 100, 200, 300, 400 및 500  $\mu\text{g/ml}$ 가 되게 조제하였다. 각 표준액을 10 $\mu\text{l}$ 씩 취하여 chromatogram을 얻고 각각의 chromatogram으로부터 내부표준물질 및 화합물 2의 area ratio를 구하여 검량선을 작성하였다.

지표물질의 함량을 결정하기 위해서 표준검량선을 작성하여 Fig. 1에 표시하였다. 검량선의 회귀직선 방정식은  $Y=0.2081X+0.0058$ 으로서 그 직선성을 검정한 결과 그 상관계수가 0.9999로서 1.0에 접근하므로 표준물질과 내부 표준물질의 중량비(X)와 peak area ratio(Y)간에 직선성이 인정되었다.

#### 3) 화합물 2의 정량

전조한 MeOH 엑스 200mg을 정량하여 이를 MeOH 10ml에 용해시키고 이 용액과 내부표준

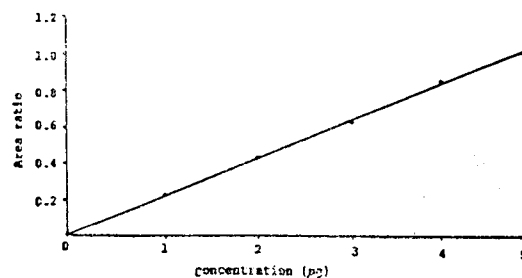


Fig. 1. Calibration curve for rutin

물질을 정확히 1:1로 혼합하여 10mg/ml 되게 하여 검액으로 하였다.

검액 10 $\mu$ l을 취하여 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻고 이로부터 area ratio 값을 구하였다.

### 실험결과 및 고찰

화합물 1과 2는 모두 flavonol glycoside임을 정색반응, UV 및 IR spectral data를 종합하여 추정할 수 있었다. 특히 UV spectra에서는 두 화합물 모두 MeOH 용매에서 3-OH가 치환된 화합물로, 또한 여러 shift reagent에 의한 spectra 검토에서 C-5, C-7, C-3' 및 C-4'에 유리 hydroxyl 기가 존재하는 flavonoid임을 암시하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum 해석에서도 두 화합물이  $\delta$ 6.38 및 6.19에서 A-ring proton들이 서로 *meta* coupling함으로써 H-8 H-6으로, 그리고 화합

물 1은  $\delta$ 7.67, 7.56, 6.63에서, 화합물 2는  $\delta$ 7.51, 7.56, 6.83에서의 proton coupling으로 각각 B-ring의 H-2', H-6' 및 H-5'로 assignment 할 수 있다. 그러므로 두 화합물의 aglycone은 UV spectra와 종합하여 볼때 quercetin임을 알 수 있었다.<sup>9)</sup>

Sugar 부분은 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 화합물 1은 D-glucopyranose, 화합물 2는 rutinose의 문헌치와 일치하고 있으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 glucose anomeric proton의 coupling constant가 화합물 1은 6.9Hz, 화합물 2는 7.2Hz로서 모두  $\beta$ -configuration하고 있음을 알 수 있다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 C-3의 위치가 quercetin과의 비교에서 고자장 shift함으로써 C-3 위치에 이들 당이 결합하고 있음을 암시하며, 나머지 spectrum 부분도 문헌과 일치함으로써 화합물 1은 isoquercitrin, 화합물 2는 rutin으로 확정하였다. 이들은 참느릅나무잎에서 처음으로 분리한 화합물들이다.

이중 rutin은 참느릅나무잎에서 column chromatography를 이용하지 않고서 계통분획을 실시하던 중 MeOH 엑스를 n-hexane, CHCl<sub>3</sub> 그리고 EtOAc층을 제거한 수층을 방치하였을 때에도 많은 양의 황색결정이 석출되어짐을 발견하였다. 이처럼 비교적 많은 양의 rutin이 얻어짐으로써 참느릅나무잎은 rutin의 자원식물로서 개발가능성을 암시하고 있다.

Rutin의 함량을 결정하기 위하여 HPLC를 실시하였다. 즉 실험부의 함량분석 방법에 따라 측정된 결과 참느릅나무 잎으로부터 얻은 MeOH 엑스층의 rutin함량은 2.81%(w/w)임을 알 수 있었다.

### 결 론

참느릅나무(*Ulmus parviflora*)잎의 EtOAc 분획과 n-BuOH 분획에서 각각 isoquercitrin과 rutin을 분리하였다. 이중 rutin은 column chromatography를 이용하지 않고 용매분획만으로도 비교적 많은 양이 분리되어졌다. 이의 함량은 HPLC로서 산출한 결과 MeOH엑스 중에서 2.81%(w/w)이었다.

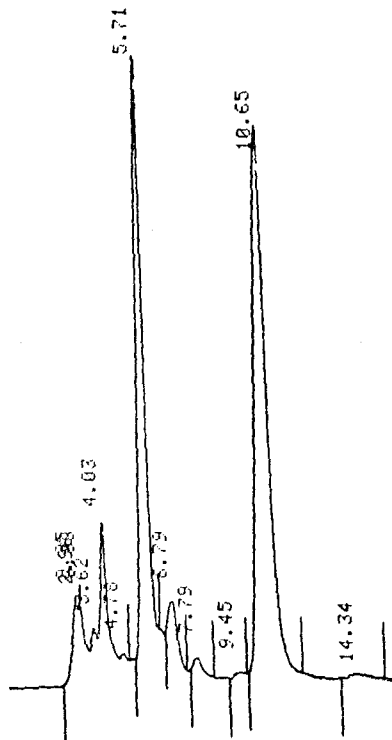


Fig. 2. HPLC chromatogram of methanol extract from the leaves of *Ulmus parviflora*  $t_R$  5.71: rutin;  $t_R$  10.65: kaempferol 3-O-(6''-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside

**감사의 말씀**—귀중한 표준품 kaempferol 3-O-(6''-O-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside을 제공하여 주신 안동대 식품영양학과 손건호 교수님과 실험에 협조하여 준 경상대 식품영양학과 대학원생 유명범에게 깊은 감사의 뜻을 포함합니다.  
 <1992년 9월 5일 접수 : 10월 2일 수리>

**참 고 문 헌**

1. 이창복 : 대한식물도감, 향문사, p. 280 (1985).
2. 김부열, 이상태 : 식물분류학회지 **19**, 31 (1989).
3. 강소신의학원 : 중약대사전(4권), 소학관, 동경, p. 5668 (1985).
4. 김재걸 : 원색천연약물대사전(하), 남산당, p. 151 (1984).
5. 문화방송 : 민간요법대전, 금박출판사, p. 305 (1987)
6. Son, B.W., Park, J.H. and Zee, O.P.: *Arch. Pharm. Res.* **12**, 219 (1989).
7. Chen, F.C., Lin, Y.M. and Chen, A.H.: *Phytochemistry* **11**, 1190 (1972).
8. Do, J.C., Yu, Y.J., Jung, K.Y. and Son, K.H.: *Kor. J. Pharmacogn.* **23**, 9 (1992).
9. Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B.: *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, N.Y. (1970).