

## 두충엽 함유 퀘르세틴배당체의 함량 표준화 및 계절적 변화

함인혜 · 이승재 · 김호현 · 강인호 · 진희억 · 황완균\*

중앙대학교 약학대학

## Standardization and Seasonal Variation of Quercetin Glycoside in *Eucommiae Folium*

Inhye Ham, Seung Jae Lee, Hohyun Kim, In Ho Kang, Hee Ouk Jin and Wan Kyunn Whang\*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Huksuk-Dong, Dongjak-Gu, Seoul 156-756, Republic of Korea

**Abstract** – The radix and folium of *Eucommia ulmoides*(Eucommiaceae) has been used for backache, atrophy of the leg and knee, enuresis, hypertension. In order to evaluate to quality of folium, we have been isolated a main compound as a standard compound, which was elucidated quercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside through it's physicochemical data and IR, FAB-Mass, <sup>13</sup>C-NMR and <sup>1</sup>H-NMR analysis. It was analyzed by HPLC system using 17% CH<sub>3</sub>CN as a solvent system. The amount of quercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside from *Eucommiae folium* was in the range of 0.056±0.022 mg(n=7) and also from the results of analysis through seasonal variation(June ~ October) September and October have been evaluated to be very high in it's content.

**Key words** – *Eucommia ulmoides*, *Eucommiaceae*, Folium, quercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside, HPLC

두충엽(杜冲葉, *Eucommiae Folium*)은 두충나무(*Eucommia ulmoides*, *Eucommiaceae*)의 가지에 달린 잎을 말한다. 두충 나무는 낙엽성 교목으로 높이 10m에 달하며 잎은 타원형 이고 끝이 뾰족하며 고르지 않은 톱니가 있다. 꽃은 4-5월 경에 열은 녹색으로 피며 자웅이주로 수꽃은 적갈색이며 원 산지는 중국이나 우리나라 대부분의 지방에서 재배된다.<sup>1)</sup>

생약 또는 한약으로 두충(杜冲)은 10년이상 된 나무의 껍 질을 건조한 것을 사용하며 그 효능은 강장, 요통, 관절염, 진정 및 이뇨 등으로 주로 강장, 소염, 이뇨제로 사용된다.<sup>2)</sup>

두충의 성분으로는 aucubin, harpagide acetate, ajugoside, eucommiol, eucommiside, geniposide 및 4-deoxyeucommiol 등 주로 iridoid계 유도체와 medioresinol-di-O-β-D-glucopyranoside, olivil di-β-D-glucopyranoside, pinoresinol di-O-β-D-glucopyranoside, liriodendrin, syringaresinol-O-β-D-glucopyranoside 등의 lignan 유도체가 분리보고되었다.<sup>3,5)</sup>

지금까지의 활성연구에서는 분리된 성분 중 pinoresinol di-O-β-D-glucopyranoside의 혈압강하, geniposidic acid 및 aucubin의 collagen 합성 증진작용 그리고 geniposide의 혈

당 강하작용 및 간보호작용에 대하여 보고되어 있다.<sup>6)</sup>

이상과 같이 두충의 분리 성분중 iridoid 배당체는 두충의 주성분이며 역시 두충엽에 있어서도 주성분으로 생각되어 졌다. 최근 두충의 대체 또는 새로운 기능성 식품으로 두충엽이 개발되어 기능성 식품 및 금연초 분야에서 사용되고 있고 따라서 두충엽에 대한 품질평가방법 설정이 절실히 필요되고 있다.

본 연구팀은 먼저 두충의 주성분인 iridoid 배당체 표품을 이용 HPLC로 두충엽의 표준화를 시도하였으나 두충엽의 경우 모든 iridoid 배당체(aucubin, geniposidic acid, geniposide)의 함량이 극미량 들어 있음을 알게 되어 iridoid를 이용한 두충엽의 품질평가는 불가능한 것으로 판단되었다.<sup>7)</sup> 따라서 다음으로 두충엽의 MeOH 추출물의 TLC를 통하여 주성분을 확인하고 그 성분을 각종 크로마토그래피방법을 이용 분리하였고 또한 이 물질을 각종 기기분석(IR, FAB-Mass, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-NMR)을 통하여 quercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside(이하 QXG)로 확인 동정하였다.

본 연구는 두충엽의 주성분인 QXG를 표준물질로 하여 우리나라 각 지역에서 채집 시판되는 두충엽의 함량실험을 실시하여 그 함량 기준과 아울러 두충엽의 품질을 평가하

\*교신저자(E-mail) : whang-wk@cau.ac.kr

였고 나아가 계절적인 함량 변화를 실시하여 두충엽의 품질을 평가, 우수한 두충엽을 제조하는데 그 목적이 있다.

### 실험 방법

**실험재료 및 분석기기** - 표준품 분리에 사용한 두충엽은 경동시장에서 구입하였으며 함량분석에 사용한 재료는 채취지역이 확실한 재료만을 분말화하여 사용하였으며, 계절별 변화에 사용한 재료는 흑석동 소재 중앙대학교 약초원에서 6월말부터 10월말까지 5회에 걸쳐 채집 건조 분말화하여 실험재료로 하였다(Table I).

분석에 사용한 기기로 IR spectrophotometer로는 Galaxy

FT-IR(USA)를 FAB-Mass spectrometer로는 VG70-VSEQ (England)를 그리고 NMR로는 Varian Gemini 2000(USA)등을 사용하였다. 또한 HPLC로는 Waters(USA)를 사용하였다.

**추출 및 분획** - 건조된 두충엽 1kg을 세말로 한 다음 100% MeOH 10 l로 실온에서 3회 추출한 다음 감압 농축하고 물로 현탁시킨 후 ether로 탈지하였다.

다음으로 물분획을 비이온교환수지인 Amberlite XAD-2 resin에 흡착시킨 후 H<sub>2</sub>O부터 30% MeOH, 60% MeOH, 100% MeOH까지 용출시켜 분획하였다.

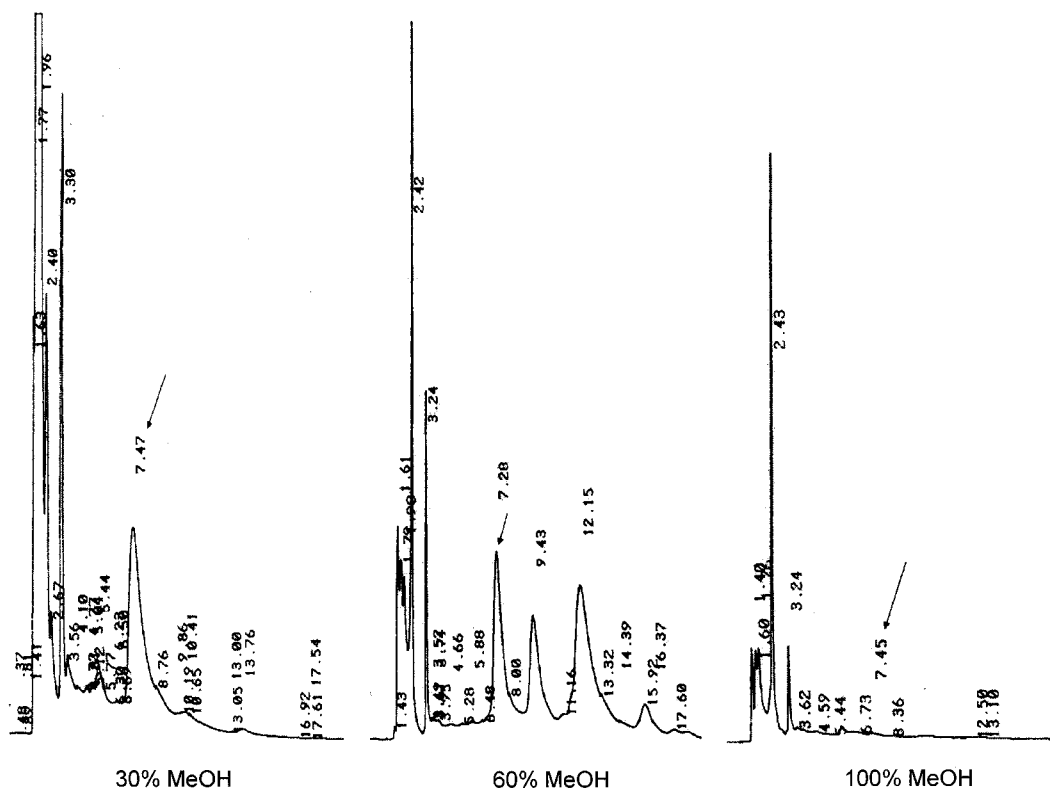
**Compound 1의 분리** - 30% MeOH, 60% MeOH 및 100% MeOH 분획을 HPLC 하였을 때 주성분이 Compound 1임을 알수 있었고 30% MeOH에 다량 함유되어 있음을 알수 있었다(Fig. 1).

다음으로 30% MeOH 분획을 sephadex LH-20으로 용매 30% 및 50% MeOH로 2회 gel filtration을 실시하여 Compound 1 486 mg을 단리하였다.

**Compound 1 - IR** max KBr cm<sup>-1</sup>: 3400 (OH), 2900 (C-H), 1600, 1450 (C=C), 1780 (C=O), 1110, 1120 (glycosidic O); FAB(-)-Mass *m/z*: 595[M-H]<sup>-</sup>, 463[M-(xyl+H)]<sup>-</sup>, 301[M-(glc+xyl+H)]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.67 (1H, dd, *J*=2.4, 8.4 Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 7.56 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-6'),

**Table I.** 실험에 사용된 두충엽의 산지

번호	산지	비고
1	마석	Folium
2	홍천	Folium
3	안동	Folium
4	안성	Folium
5	흑석동	Folium
6	영천	Folium
7	양평	Folium

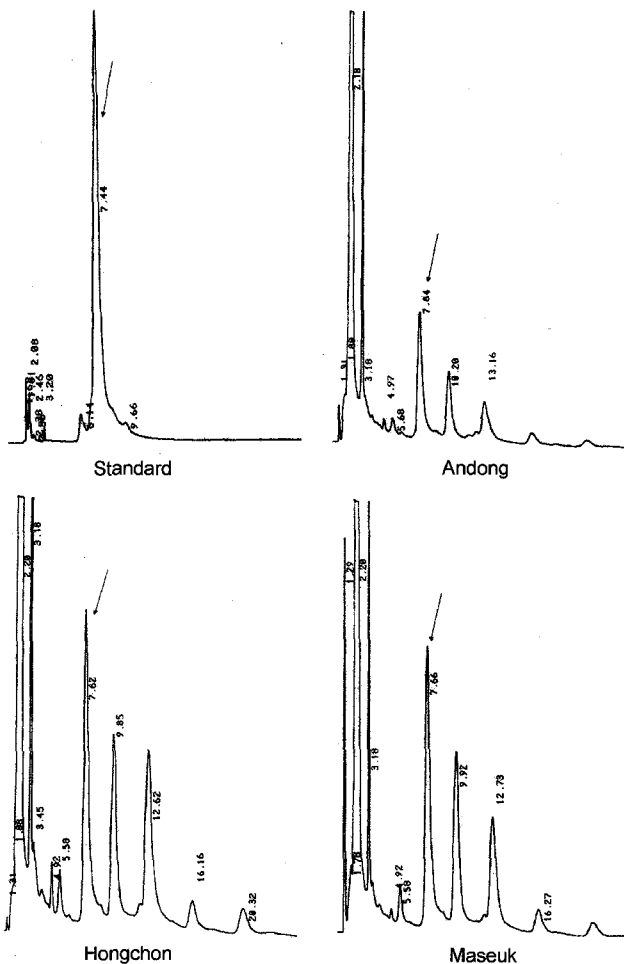


**Fig. 1.** HPLC chromatograms of 30, 60 and 100% MeOH fractions under 17% CH<sub>3</sub>CN solvent.

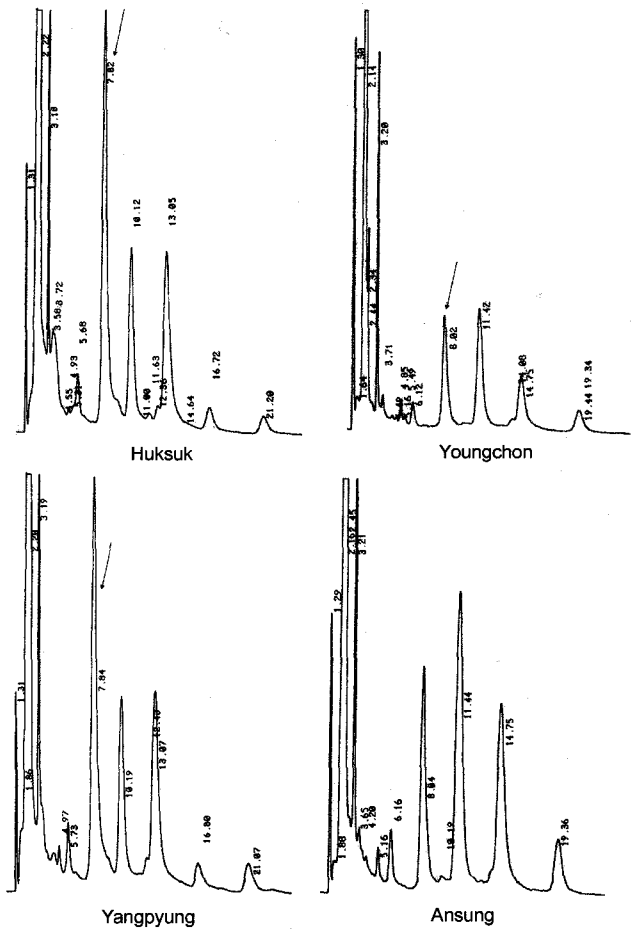
6.40, 6.18 (each 1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6, H-8), 5.73 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, glc anomer H), 4.59 (1H, d,  $J=6.9$  Hz, xyl anomer H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 155.5 (C-2), 133.1 (C-3), 177.6 (C-4), 161.4 (C-5), 98.0 (C-6), 164.5 (C-7), 93.5 (C-8), 153.4 (C-9), 104.6 (C-10), 121.8 (C-1'), 115.3 (C-2'), 145.1 (C-3'), 148.7 (C-4'), 116.1 (C-5'), 121.3 (C-6'), 98.8 (C-1''), 81.9 (C-2''), 76.9 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.6 (C-5''), 60.6 (C-6''), 103.9 (C-1'''), 73.9 (C-2'''), 76.2 (C-3'''), 69.4 (C-4'''), 65.6 (C-5''').

**Compound 1을 이용한 시판 두충엽의 함량시험**

**검액의 조제** - 건조된 각지의 두충엽 10 g을 분말로 한 다음 MeOH 50 ml를 넣고 2시간 수욕상에서 2회 환류추출 하였다. 여과한 후 잔사를 20 ml MeOH로 세척하고 그 여액을 합하여 감압 농축한후 물에 현탁시켜 ether로 3회 추출하였다. 그후 수층을 농축하고 다시 MeOH 50 ml에 녹인



**Fig. 2.** HPLC chromatograms of Compound 1 for Standard, Andong, Maseuk and Hongchon raw materials.



**Fig. 3.** HPLC chromatograms of Compound 1 in Huksuk, Youngchon, Yangpyung and Ansong raw materials.

후 0.45 m filter로 여과한 후 검액으로 하였다(Fig. 2, 3).

**표준액의 조제 및 검량선 작성** - 분리한 Compound 1 10 mg을 정확하게 달고 MeOH 50 ml에 녹여 표준액으로 하였으며 각 표준액 5, 10, 15, 20  $\mu\text{l}$ 씩 HPLC하여 검량선을 작성하였다. 위 조건으로 검량선을 작성한 결과 예상되는 peak가  $y=6 \times 10^6 X - 826129 (r^2=0.9994)$ 의 직선성을 나타내었다.

**HPLC 분석조건** - 칼럼: Akzo Nobel, Kromasil100-10C<sub>18</sub>(4.6x25 cm), 검출기: UV-detector(254 nm), 이동상: 17% MeCN, 유속: 1.0 ml/min, 주입량: 10  $\mu\text{l}$ .

**HPLC에 의한 Compound 1의 계절적 함량변화** - 5월부터 10월까지 매월 말 흑석동 소재 중앙대학교 약초원에서 두충엽을 채취하여 건조한 후 두충엽 함량시험항과 같은 조건으로 검액 및 표준액을 조제하였다(Fig. 4, 5).

**실험 결과 및 고찰**

두충엽(Eucommiae Folium) 1 kg을 세말하여 100%

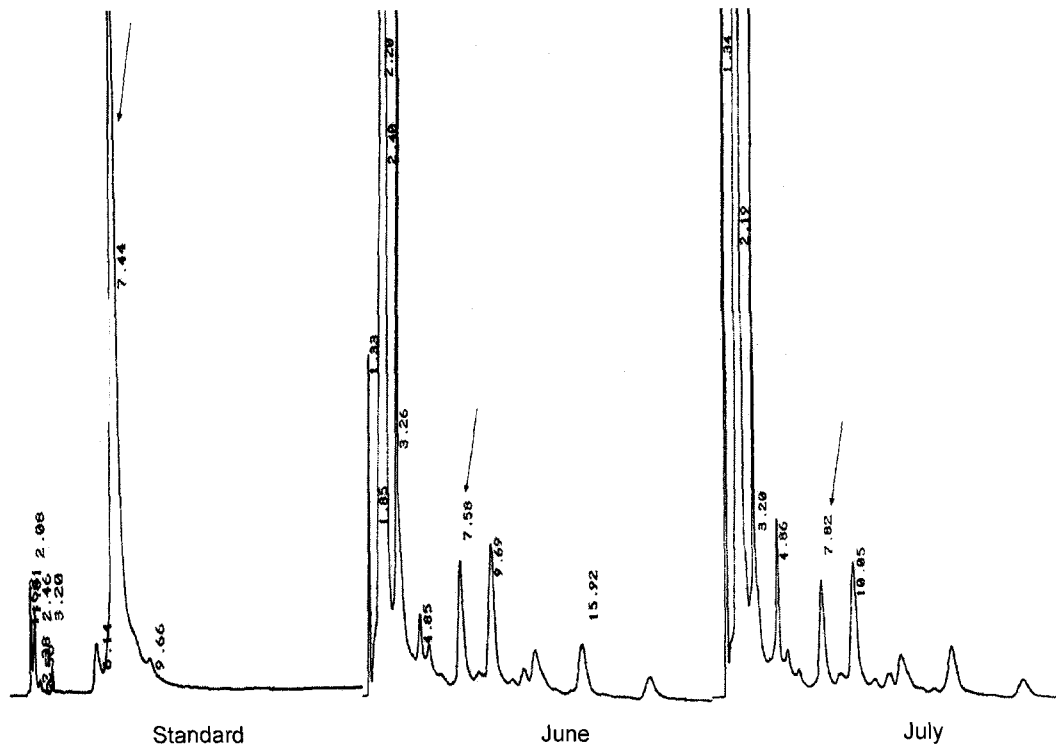


Fig. 4. HPLC chromatograms of seasonal variation of Compound 1.

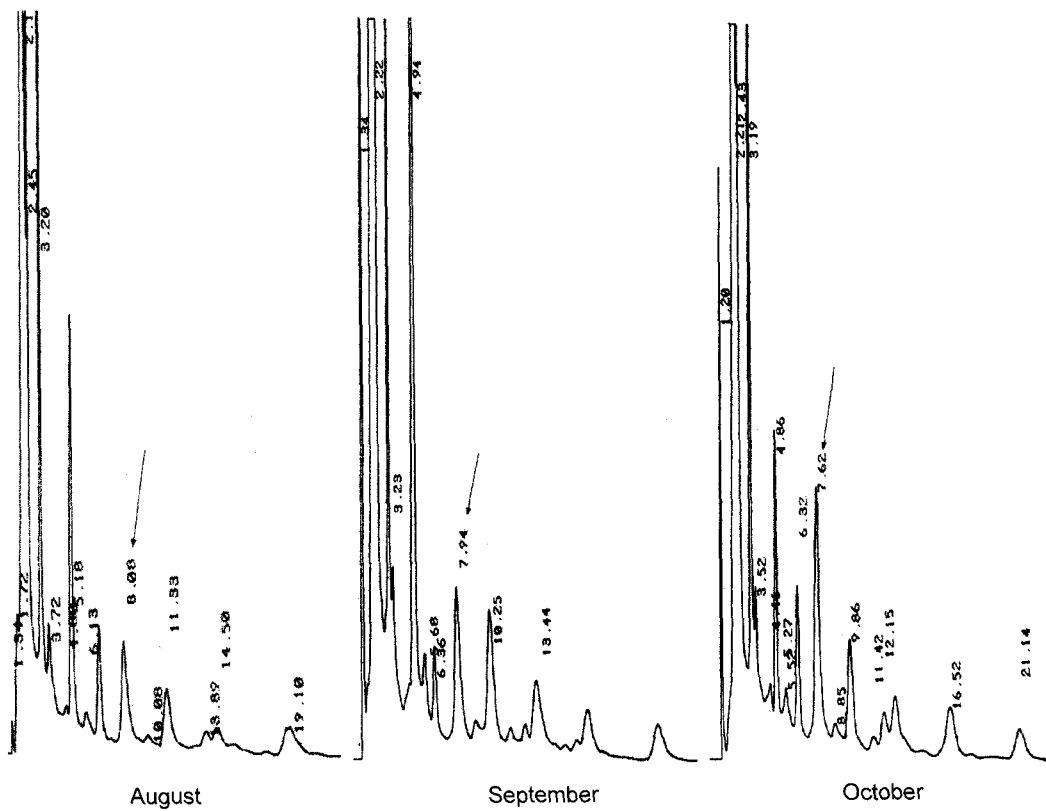


Fig. 5. HPLC chromatograms of seasonal variation of Compound 1.

MeOH 10로 실온에서 3회 추출한 다음 감압농축하고 물로 현탁시킨후 ether로 탈지한 물분획을 비이온교환수지인 Amberlite XAD-2 resin에 흡착시킨후 H<sub>2</sub>O부터 30% MeOH, 60% MeOH, 100% MeOH까지 용출시켜 분획하였다.

다음으로 TLC 및 HPLC를 통하여 주 성분이 flavonoid 화합물임을 추정할 수 있었고 분획에 대한 HPLC를 통하여 30% MeOH분획에 다량 함유되어 있음을 알 수 있었고 sephadex LH-20을 이용 chromatography하여 Compound 1 486 mg을 단리하였다.

**Compound 1** - Compound 1은 노란색의 결정성 화합물로 Mg-HCl 및 FeCl<sub>3</sub> 용액 반응에 양성이고, IR spectrum에서는 3400(OH), 2900(C-H), 1600, 1450(C=C), 1780 (C=O), 1110 및 1120(glycosidic O)cm<sup>-1</sup>에서 강한 흡수대를 나타내어 flavonoid 계열의 배당체임을 추정할 수 있었다.

FAB(-)-Mass spectrum에서는 m/z 595에서 M-H가 탈락된 molecular ion peak를 그리고 m/z 463 및 301에서 각각 pentose 및 pentose와 hexose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있어 Compound 1의 경우 당이 2 mole이 결합된 flavonoid 화합물임을 알 수 있었다.

한편 <sup>1</sup>H-NMR의 aromatic region의 proton signal을 보면 전형적인 flavonoid의 A 및 B ring을 볼 수 있으며  $\sigma$  7.67 ppm의 double doublet signal은 coupling constant가 J=2.4, 8.4 Hz로 B ring의 2번 proton임을 알 수 있었고 또한 6.85 ppm의 경우 J=8.4 Hz로 2번 proton과 ortho coupling함을 알 수 있어 B ring의 5번 proton임을 확인할 수 있었다. 7.56 ppm은 J=2.1 Hz로 B ring의 H-2와 meta coupling하는 H-6임을 확인할 수 있었다. 그리고 A ring의 H-6 및 H-8 가 6.40 및 6.18 ppm에서 J=1.8 Hz로 coupling하는 것으로 보아 서로 meta coupling 함을 증명할 수 있었다.

또한 당부의 anomer proton의 signal에서는  $\sigma$  5.73 ppm에서 나타나는 signal은 J=7.2 Hz로 low field로 shift되어 있는 것으로 보아 aglycone과 결합된 inner sugar anomer proton임을 알 수 있고 그리고 high field로 shift한  $\sigma$  4.59 ppm의 signal의 경우 J=6.9 Hz로 outer sugar anomer proton을 알 수 있었으며 특히 두 당의 anomer proton의 J value로 보아 당은  $\beta$ 체의 6탄당과 5탄당이 결합되어 있음을 추정할 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR에서는 anomer carbon이  $\sigma$  98.8 ppm 및 103.9 ppm에서 관측되어 2 mole의 당이 결합되어 있음을 알 수 있었고 또  $\sigma$  98.8 ppm과 81.9 ppm에서 서로 high 및 low field로 shift하는 것으로 보아  $\sigma$  103.9 ppm의 anomer carbon이  $\sigma$  81.9 ppm에 결합되어 있음을 알 수 있었고 이것으로 인해 당이 glucose 및 xylose가 1-2 결합함을 알 수 있었다.

그리고 다른 aromatic field의 carbon signal의 경우 전형

적인 quercetin의 signal을 관찰할 수 있었다.

이상의 물리화학적인 성상 및 기기분석 그리고 문헌<sup>8)</sup>과의 비교 검토를 통하여 Compound 1을 quercetin-3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside로 확인동정하였다.

**두충엽의 함량 시험** - 실험방법에 의해 조제된 검액과 표준액을 HPLC를 이용하여 동일한 Retention time(R<sub>T</sub>=7.5)를 확인하고 그 peak에 대하여 다음 식으로 3회 함량실험을 실시 함량 설정을 하였다(Fig. 2, 3: Table II).

$$\text{함량(mg)} = \text{표준품량(mg)} \times \text{Ru/Rs} \quad (\text{Ru} = \text{검액의 peak 면적}, \text{Rs} = \text{표준액의 peak 면적})$$

그 결과 Compound 1의 함량은 서울 및 양평의 두충엽에서 0.087 $\pm$ 0.012 mg 및 0.077 $\pm$ 0.006 mg으로 가장 높게 나타났고 비교적 저위도 지방인 영천 및 안동지방에서 0.034 $\pm$ 0.013 및 0.024 $\pm$ 0.002 mg으로 낮게 나타났다. 그리고 각 지역 전체의 함량의 평균은 0.056 mg이고 표준편차는 0.023 mg으로 나타났다(Table II).

**Compound 1의 계절적인 함량 변화** - 흑석동 소재 중앙대학교 약학대학 약초원의 두충엽을 6월말부터 10월 말까지 한달 간격으로 채집하여 음건, 조말로 하고 위의 두충엽 함량시험방법에 의거하여 검액 및 표준액을 조제해 계절적인 함량변화를 조사하였다. 그 결과 Compound 1의 함량은 봄보다는 가을로 갈수록 높게 나타났으며 가장 높은

**Table II.** The contents of compound 1 in Commercial *Eucommiae Folium*

	1회	2회	3회	평균
안동	0.025	0.022	0.026	0.024 $\pm$ 0.002
안성	0.040	0.047	0.049	0.045 $\pm$ 0.005
마석	0.043	0.069	0.063	0.059 $\pm$ 0.014
홍천	0.065	0.079	0.059	0.067 $\pm$ 0.011
흑석동	0.098	0.074	0.089	0.087 $\pm$ 0.012
영천	0.025	0.049	0.026	0.034 $\pm$ 0.013
양평	0.078	0.083	0.071	0.077 $\pm$ 0.006
평균				0.056 $\pm$ 0.023

**Table III.** Seasonal variation of the contents of compound 1 in *Eucommiae Folium*

	1회	2회	3회	평균
6월	0.050	0.048	0.056	0.052 $\pm$ 0.004
7월	0.040	0.040	0.052	0.044 $\pm$ 0.006
8월	0.052	0.050	0.052	0.051 $\pm$ 0.001
9월	0.065	0.071	0.061	0.066 $\pm$ 0.005
10월	0.085	0.071	0.091	0.082 $\pm$ 0.010

달은 9월 및 10월로  $0.066 \pm 0.005$  mg 및  $0.082 \pm 0.010$  mg을 함유하였다(Table III).

**Compound 1을 이용 표준물질로 선택한 당위성** - 지금까지 두충은 iridoid 배당체를 이용 함량실험이 설정되어 있어 두충엽 역시 iridoid 배당체인 geniposide, geniposidic acid 및 aucubin등으로 함량 실험을 하는 것이 타당하다 생각되었다. 따라서 여러 용매 및 UV 파장 등을 응용하여 함량 실험을 실시하였으나 시판 각 지역의 시료에서는 미량이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

또한 약초원에서 채집하여 음건한 것, 즉 비교적 신선한 것의 경우 약간의 iridoid 배당체가 함유되어 있었으나 함유량은 적은 것으로 나타났으며 이것은 iridoid 화합물이 분해한다는 것을 의미한다.

따라서 iridoid 화합물을 이용한 함량분석은 부적당하며 타 성분에 대한 실험 결과 flavonoid 화합물이 주성분으로 함유되어 있는 것을 발견하고 그 중 주성분을 분리하고 그것을 이용 함량 실험을 설정하고자 하였다. 본 연구에 사용된 Compound 1 즉 quercetin-3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside는 flavonol 화합물로 보통 일반적인 flavonoid가 아닌 두충엽에만 함유되어 있는 특이 성분으로 문헌조사 결과 나타났다.

따라서 수용성이며 극성을 가지고 UV 254 nm에서 최대 흡수대를 가지는 quercetin-3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside 즉 Compound 1을 이용 두충엽의 함량 실험을 설정하는 것이 타당하다고 사료된다.

## 결 론

최근 두충엽(*Eucommiae Folium*)을 이용한 기능성 식품과 금연제품의 시판으로 두충엽의 수요가 증가하고 있으나 그 품질에 대한 기준 설정은 패턴분석만으로 되어 있어 품질 평가에 대한 기준이 절실한 실정이다. 또한 두충의 경우 geniposide를 표준물질로 정량하고 있으나 잎의 경우에는 같은 계열인 iridoide 유도체(geniposide, geniposidic acid, aucubin)는 극미량 존재하는 것으로 나타났다.

따라서 iridoid 배당체가 아닌 다른 계열의 주성분을 분리하여 기기분석을 통하여 구조분석을 하고 그 구조를 quercetin 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside로 확인 동정하였으며 이것을 두충엽에 대한 함량 실험을 한 결과

주 물질인 것을 알수 있어 본 물질을 표준물질로 하여 각 지역에서 채취 시판하는 두충엽에 대한 함량실험과 계절별 함량변화를 HPLC로 실험을 실시하였다.

그 결과 서울 흑석동, 안성, 양평 등 중부지방 두충엽에서 표품 함량이 높게 나타났고 남부지방의 것은 함량이 낮았으며 평균 함량은  $0.056 \pm 0.023$  mg으로 Compound 1의 함량이 원료 10 g당 0.033 mg 이상이어야 한다.

또한 Compound 1의 계절별 함량 변화를 실험한 결과 9월과 10월의 두충엽이  $0.66 \pm 0.005$  mg 및  $0.082 \pm 0.010$  mg을 함유하여 봄 및 여름의 함량보다 높게 나타났다.

이상의 결과로 두충엽에 대한 기준은 10 g당 0.033 mg 이상이 함유되어야 할 것으로 사료되며 특히 경기이북지역과 계절별로는 9월이나 10월에 채집하는 것이 가장 바람직하다고 사료된다.

## 참고문헌

1. 김일혁(1997): 약이 되는 풀과 나무, 중앙대학교 출판국, p146.
2. 육창수(1989): 원색 한국 약용식물도감, 아카데미서적, p134.
3. Bianco, A., Bonini, C., Guiso, M., Lavarone, C. and Trogolo, C. (1978): Iridoids, 26. Ulmoside(aucubigenin-1-O- $\beta$ -isomaltoside), a new iridoids from *Eucomia ulmoides*. *Gazz. Chim. Ital.* **108**, 17.
4. Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa, S. and Nishibe, S. (1986): The Constituents of *Eucommia ulmoides*. IV. Isolation of nrs sesquiglycan glycoside and iridoids. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 4933.
5. Gawai, M., Hattori, M. and Namba, T. (1988): Constituents of the stems of *Eucommia ulmoides*. *Shoyakukaku Zasshi*, **42**, 76.
6. Yanmei, L., Takahiro, S., Koichi, M., Katsuya, K., Qingming, C. and Shushichi, T. (1998): The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* Leaves on collagen synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 1306.
7. 식품의약품안전청, 생약·한약재 품질 표준화연구, 충북대학교 약학대학 약품자원개발연구소, 충북 p111 (2000).
8. Beringer, C.W. and Hosfield, G.L. (1999): Flavonol glycosides from Montcalm dark red kidney bean. *J. Agri. Food. Chem.* **47**, 4079.

(2002년 6월 24일 접수)