

한국산 4종 Rubus속 속과, 미숙과 및 잎의 플라보노이드 함량 분석

김민영, 최무영¹, 남정환², 박희준*

상지대학교 제약공학과, ¹상지대학교 식품영양학과, ²농촌진흥청 고령지농업연구소

Quantitative Analysis of Flavonoids in the Unripe and Ripe Fruits and the Leaves of Four Korean Rubus species

Min-Young Kim, Moo-Young Choi¹, Jung-Hwan Nam², and Hee-Juhn Park*

Department of Pharmaceutical Engineering, ¹Department of Food and Nutrition, Sangji University, Woosan-Dong, Wonju 220-702, Korea

²National Alpine Agricultural Institute, Rural Development Administration, Pyongchang 232-950, Korea

Abstract – The five flavonoids, isoqueritrin, juglanin, astragaln and 2-O-trans-p-coumaroyl astragaln were quantitatively analyzed in the leaves, unripe- and ripe fruits of four Korean Rubus species including *Rubus crataegifolius*, *R. pungens* var. *oldhami*, *R. parvifolius*, and *R. coreanus* belonging to the Rosaceae family. The HPLC analysis demonstrated that flavonoids are more abundant in the leaves than in the fruits. In the four Rubus species, ripe fruits generally contained similar or more amount of flavonoids than in unripe fruits. In particular, the quantity levels of total flavonoid (49.81±0.50 mg/g) and isoquercitrin (35.08 ±0.37 mg/g) were highest in the leaf of *R. crataegifolius*. In addition, the content of the flavonoids were quite low in the unripe fruits of *R. coreanus* that is most widely used as Rubi Fructus.

Key words – Rubus, flavonoids, *Rubus crataegifolius*, *Rubus pungens* var. *oldhami*, *Rubus parvifolius*, and *Rubus coreanus*, HPLC

한국에서 장미과(Rosaceae)의 Rubus속 식물 중 한약으로 사용되는 것으로 복분자(Rubi Fructus)가 있다.¹⁾ 복분자는 *Rubus coreanus*의 미숙과를 강장, 강정, 항당뇨, 명안, 양모 등에 동아시아에서 사용되고 있다.²⁾ 복분자나무의 열매는 미숙과실일 때 triterpenoid 성분 함량이 높고 성숙되면 그 함량이 감소됨을 저자들은 보고했기 때문에 이들 성분이 활성물질로 작용하고 있다고 생각된다.³⁾ 또한, 이 식물에 함유된 niga-ichigoside F₁ 및 23-hydroxytormentonic acid, rosamultin, kaji-ichigoside F₁, tormentonic acid, euscaphic acid 등 19 α -hydroxyursane-type triterpenoid 성분이 항염증 등 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{4,5)} 특히 niga-gaichigoside F₁의 항류마티스 작용과 위보호효과에 관해서도 보고된 바 있다.⁶⁾

이러한 triterpenoid가 복분자나무 열매에서는 미숙과실이 성숙과실보다 그 함량이 높고 산딸기의 경우에는 성숙과실이 미숙과실보다 그 함량이 높은 것으로 확인된 바 있다.³⁾

본 연구에서는 한국산 4종의 Rubus속 식물의 산딸기, 명석딸기, 줄딸기, 붉은가시딸기 의 잎, 미숙과실, 성숙과실에 대하여 5종 플라보노이드 성분의 함량을 HPLC로 분석하였다. 분석에 사용된 표준 화합물 플라보노이드 성분은 카메룬의 León A Tapondjou 박사가 *R. rigidus*에서 분리한 2"-O-trans-p-coumaroyl astragaln, astragaln, juglanin, isoquercitrin, callistephin을 사용하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약 – 사용된 HPLC system은 varian Prostar 210 solvent delivery module과 Prostar 325 UV-Vis detector 및 20 μ L sample loop으로 구성된 장치였다. 분석용 컬럼으로 Shiseido Capcell Pak C18 (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm i.d.)을 사용하였다. 이동상으로 사용된 용매는 HPLC 급이었다.

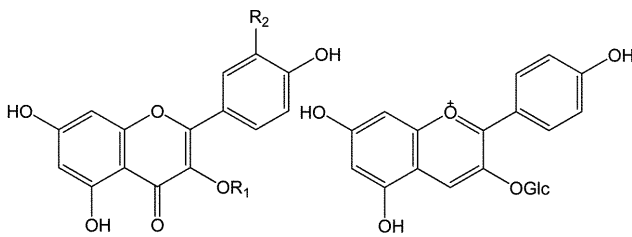
식물재료 – 원주시 근교에 자생하는 산딸기(*R. crataegifolius*), 줄딸기(*R. pungens* var. *oldhami*), 명석딸기

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

Table I. Calibration curve equations of the five standard flavonoids

	Retention time (min)	Equation	
Isoquercitrin	16.6	$y = 36248x + 86049$	$R^2 = 0.995$
Juglanin	20.1	$y = 36802x - 54166$	$R^2 = 0.999$
Astragalin	21.0	$y = 24387x - 31644$	$R^2 = 0.999$
Callistephin	22.4	$y = 35835x - 31051$	$R^2 = 0.997$
2"-O-trans- <i>p</i> -coumaroyl astragalin	28.0	$y = 33905x + 85543$	$R^2 = 0.998$

y (area, μ V), x (concentration, μ g/ml)



- 1 $R_1 = \text{Glucopyranosyl}$ $R_2 = \text{OH}$ (isoquercitrin) 4 Callistephin
 2 $R_1 = \text{Arabinofuranosyl}$ $R_2 = \text{H}$ (Juglanin)
 3 $R_1 = \text{Glucopyranosyl}$ $R_2 = \text{H}$ (astragalin)
 5 $R_1 = 2''\text{-O-trans-}p\text{-coumaroylglucopyranosyl}$
 $R_2 = \text{H}$ ($2''\text{-O-trans-}p\text{-coumaroyl}$ astragalin)

Fig. 1. Structure of the four flavonoids used for HPLC analysis

(*R. parvifolius*), 복분자나무(*R. coreanus*)를 식물재료로 사용하였다. 산딸기 잎과 복분자의 잎은 6월 중 채집한 후 사용하였다. 산딸기 미숙과는 6월 중순 채집하였으며 산딸기 숙과는 붉게 익게 되었을 때인 7월말경 채집하였다. 줄딸기와 산딸기의 경우와 같이 잎, 미숙과 및 숙과를 채집하였다. 복분자 미숙과는 8월 초순경 회백색인 상태의 미숙과를 채집하였으며 숙과는 검게 익게 되었을 때인 8월 중순경 채집하였다. 멥석딸기도 복분자와 유사한 시기에 채집하여 말린 후 사용하였다. 이들 식물재료들을 말려서 건조하여 분쇄한 후 실험에 사용하였다.

표준 화합물과 검량선 작성 - 분석을 위해 사용된 5종의 플라보노이드 화합물 kaempferol 3-O-[2"-O-trans-*p*-coumaroyl]-glucopyranoside, astragalin, juglanin, isoquercitrin, callistephin은 카메룬 University of Dschang의 León Azefack Tapondjou 박사가 *R. rigidus*에서 분리한 것을 제공받아 사용하였다. 검량선 작성을 위하여 상기 5종의 플라보노이드 표준 화합물을 80% MeOH에 녹여서 10, 25, 50, 100 μ g/ml 농도의 표준액을 제조한 후 HPLC chromatogram을 얻고 $r^2 > 0.990$ 값을 보이는 검량선의 직선성을 확인하였다. 각 화합물의 retention time과 그 검량선 식 및 r^2 값을 Table 1에 나타내었다.

HPLC를 이용한 플라보노이드의 함량분석 - 분쇄된 각 식물재료 1g을 MeOH 40 ml에 녹이고 40°C에서 2시간

sonication하였다. 이것을 여과한 후 rotatory evaporator를 이용하여 감압 하에 건조시키고 최종적으로 동결건조하였다. 농축된 추출물을 80% MeOH 2ml에 녹이고 0.50 μ m syringe filter를 통하여 여과한 후 그 여액 20 μ l를 HPLC system에 injection하였다. 이동상 용매로는 0.5% aqueous phosphoric acid(solvent A)와 acetonitrile(solvent B)를 사용하였다. Gradient elution은 다음과 같이 수행하였다. 0 min, 90% A:10% B; 0-5 min, 85% A:15% B; 5-10 min, 80% A:20% B; 10-20 min, 80% A:20% B; 20-21 min, 70% A:30% B; 21-25 min, 70% A:30% B; 25-27 min, 50% A:50% B; 27-30 min, 50% A:50% B; 30-31 min, 90% A:10% B; 31-35 min, 90% A:10% B; 35-40 min, 90% A:10% B. 이동상 용매의 흐름속도는 40분간 1.00 ml/min를 유지하였다. 검출기는 UV 검출기를 사용하였고 고정된 파장 254 nm에서 검출하였다.

결과 및 고찰

미숙과와 숙과의 triterpenoid 성분의 함량변화가 현저함을 밝힌 바 있으며, 특히 복분자는 미숙과일 때, 산딸기는 숙과일 때 그 함량이 높음을 확인한 바 있다.³⁾ 또한 이들 성분들이 과일보다 잎에 높은 함량으로 존재함을 밝혔다. 그러므로 본 연구에서는 4종의 *Rubus*속 식물의 잎, 미숙과 및 숙과에 대한 플라보노이드 함량평가를 HPLC를 이용하여 수행하였다. 실험에 사용된 5종의 플라보노이드 isoquercitrin (1), juglanin (2), astragalin (3), callistephin (4) 및 2"-O-trans-*p*-coumaroylastragalin (5)의 구조는 Fig. 1에 나타내었고 4종 *Rubus*속 식물 잎의 HPLC chromatogram을 Fig. 2에 나타내었다.

우선 플라보노이드 총 함량을 보면 Table 2에 나타내었듯이 산딸기의 잎에서 49.81 \pm 2.39 mg/g으로서 가장 높게 관찰되었다. 가장 낮은 함량을 보인 식물재료는 줄딸기의 미숙과로서 그 함량이 0.15 \pm 0.14 mg/g였으며 그 다음으로 낮은 함량을 보인 식물재료는 복분자나무의 미숙과로서 그 함량이 2.41 \pm 0.57 mg/g이었다. 이러한 결과는 한약에서 사용되는 복분자가 복분자나무의 미숙과인 점으로 미루어 플라보노이드 성분이 주요 생리활성 물질인 것으로 보기 어려움

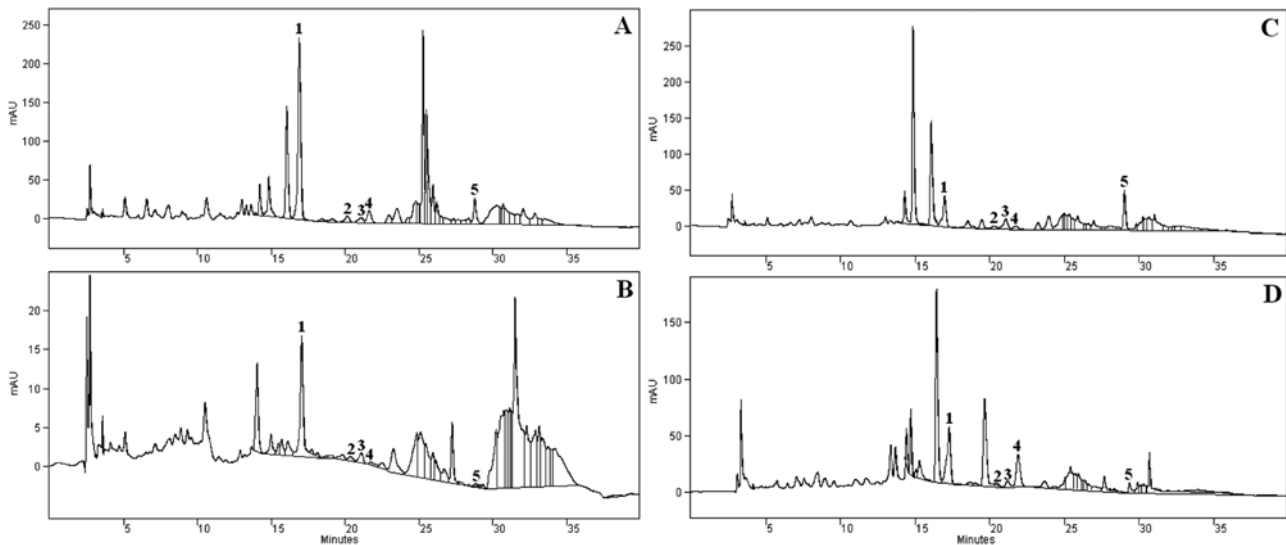


Fig. 2. HPLC chromatograms of the leaf extracts obtained from four *Rubus* species
Chromatograms - **A:** *R. crataegifolius*, **B:** *R. pungens* var. *oldhami*, **C:** *R. parvifolius*, **D:** *R. coreanus* ; Compounds - 1 (Isoquercitrin), 2 (juglanin), 3 (astragalin), 4 (callistephin), 5 (2"-O-trans-*p*-coumarolyastragalin)

Table II. Contents of isoquercitrin (1), juglanin (2), astragalin (3), callistephin (4), and 2"-O-trans-*p*-coumaroyl astragalin (5) determined by HPLC in the ripe- and unripe fruits and the leaves of *Rubus crataegifolius*, *R. pungens* var. *oldhami*, *R. parvifolius*, and *R. coreanus*

Plant name	Plant part	1	2	3	4	5	Sum
<i>R. crataegifolius</i>	Unripe fruit	2.61±0.13	1.62±0.03	6.03±0.34	0.19±0.01	3.43±0.25	13.88±0.47
	Ripe fruit	3.74±0.19	5.00±0.12	10.50±0.58	0.32±0.04	nd	19.56±0.50
	Leaf	35.08±0.37	0.83±1.21	2.97±0.31	3.83±0.21	7.10±2.33	49.81±2.39
<i>R. pungens</i> var. <i>oldhami</i>	Unripe fruit	0.15±0.14	nd	nd	nd	nd	0.15±0.14
	Ripe fruit	2.18±0.39	0.10±0.04	0.41±0.25	0.19±0.12	nd	2.89±0.10
	Leaf	2.94±0.08	0.62±0.05	0.92±0.09	0.36±0.09	0.24±0.27	5.07±0.16
<i>R. parvifolius</i>	Unripe fruit	tr	0.39±0.34	0.50±0.02	0.01±0.01	3.60±0.48	4.49±0.49
	Ripe fruit	0.90±0.09	0.05±0.09	2.29±0.07	0.25±0.03	1.94±0.21	5.44±0.08
	Leaf	6.97±0.08	0.68±0.35	4.95±0.31	1.22±0.55	7.49±0.88	21.30±0.36
<i>R. coreanus</i>	Unripe fruit	1.10±0.12	0.40±0.04	0.30±0.11	0.25±0.43	0.37±0.49	2.41±0.57
	Ripe fruit	0.74±0.03	0.11±0.10	0.43±0.16	tr	1.25±0.20	2.52±0.46
	Leaf	9.85±0.25	0.54±0.17	1.40±0.17	5.99±0.09	1.38±0.12	19.15±0.56

tr (trace), nd (not detected)

을 의미하였다. 4종 식물의 12종 식물재료에 대한 플라보노이드 총 함량을 관찰할 때 모두 잎에서 그 함량이 월등히 높고 과실에서는 그 함량이 비교적 낮았다. 그리고 *Rubus* 4종 식물에서는 숙과가 미숙과에 비교하여 비슷하거나 높은 함량을 보였다. 5종 플라보노이드 중 isoquercitrin이 12종의 식물재료에서 가장 높은 함량을 보였으므로 플라보노이드 분석을 위한 지표로 활용될 수 있음을 알 수 있다.

Juglanin과 astragalin은 각각 산딸기의 숙과에서 가장 높은 함량으로 나타났고 안토시아닌인 callistephin은 복분자

나무의 잎에서, 2"-O-trans-*p*-coumaroly astragalin은 산딸기의 잎에서 가장 높은 함유량을 보이고 있는 사실을 알 수 있었다. *Rubus*속 식물 중 가장 빈도높게 사용되는 생약인 복분자나무의 미숙과를 기원으로 하는 복분자는 isoquercitrin 및 총 플라보노이드 함량이 매우 낮은 사실로부터 플라보노이드가 이 생약의 주요 활성물질로 작용하지 않는 것으로 생각된다. 한편, *Rubus*속 식물을 이용한 플라보노이드의 이용은 산딸기의 잎을 이용하는 것이 가장 바람직하다고 생각된다.

결 론

한국산 4종의 Rubus속 식물 산딸기(*Rubus crataegifolius*), 줄딸기(*R. pungens* var. *oldhami*), 멧석딸기(*R. parvifolius*), 복분자나무(*R. coreanus*)의 미숙과, 숙과 및 잎의 플라보노이드 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 표준물질은 isoquercitrin, juglanin, astragalin and 2"-*O*-*trans*-*p*-coumaroylastragalin이 사용되었다. 그 결과 전반적으로 잎에서 과실보다 총 플라보노이드 함량이 높은 것으로 나타났다. 과실의 숙성함에 따른 플라보노이드 함유량의 변화는 약한 것으로 나타났다. 또, 플라보노이드는 산딸기에서 그 함량이 가장 높고 특히 산딸기의 잎에서는 49.81 ± 2.39 mg/g의 총 함량을 보였다. 5종 플라보노이드 중 isoquercitrin의 함유량이 높았으며, 특히 산딸기의 잎은 35.08 ± 0.37 mg/g의 함량을 보였다. 한약으로 사용되는 복분자(복분자나무의 미숙과)는 매우 낮은 플라보노이드 함량을 보이는 것으로 보아 복분자의 주된 생리활성물질이 아닌 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 2008년도 농업특정연구사업의 지원에 의해 수행된 결과입니다. 그리고, 표준 화합물을 제공하여 주신 카메룬의 León Azefack Tapondjou 박사님(Faculty of Science, University of Dschang)께 감사드립니다.

인용문헌

1. Moon, G. S. (1991) Constituents and Uses of Medicinal Herbs, 310—311, Ilweolseogak, Seoul.
2. Kim T. J. (1996). Botanical Resources in Korea. 142-145, Publishing Center of Seoul National University, Seoul.
3. Nam, J. H., Jung, H. J., Choi, J., Kim, W. B., Park, H. J. (2007) Comparison of Triterpenoid Contents of the Four Rubus Plants in Korea Using TLC-DM, *Kor. J. Pharmacogn.*, **38**: 187-191.
4. Choi, J. W., Lee, K. T., Ha, J. H., 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.
5. Jung, H. J., Nam, J. H., Choi, J. W., 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 (2004).
6. Nam, J. H., Jung, H. J., Choi, J. and 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.

(2008년 5월 14일 접수)