

## Hydrocotyle japonica의 약효성분에 관한 연구(II)

조의환 · 김일혁

중앙대학교 약학대학

(Received September 26, 1991)

### Studies on the Pharmaco-Constituents of *Hydrocotyle japonica*(II)

Eui Hwn Cho and Il Hyuk Kim

College of Pharmacy, Chung Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract**—A flavonoidal glycoside was isolated from the whole plant of *Hydrocotyle japonica*(Umbelliferae) and identified as quercetin-3-O- $\beta$ -D-galactoside quercetin-3-O- $\beta$ -D-(hyperoside) (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>·1/3 H<sub>2</sub>O, yellow needle crystal, m.p. 249~250°, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -65.94° in pyridine) by physicochemical properties and spectroscopic evidences(UV, IR, NMR and Mass etc., in comparison with authentic sample.

**Keywords** □ *Hydrocotyle japonica*, Umbelliferae, whole plant, quercetin-3-O-B-D-galactoside, hyperoside.

前報<sup>1)</sup>에서 저자는 제주피막이 *Hydrocotyle japonica*의 전초로부터 flavonoidal glycoside인 물질 FA를 분리하여 그 화학구조를 isorhamnetin-3-O- $\beta$ -D-galactoside로 동정한 바 있다.

계속해서 저자 등은 동일분획으로부터 또다른 flavonoid 물질 FB를 분리하여 이화학적 방법과 spectral data를 종합하여 quercetin-3-O- $\beta$ -D-galactoside(hyperoside)로 동정하였기에 그 결과를 보고한다.

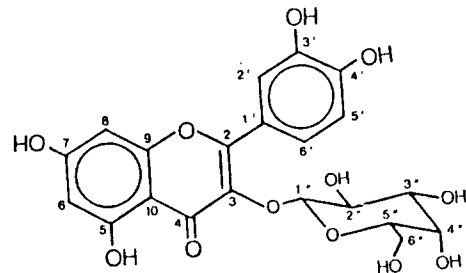


Fig. 1—Quercetin-3-O- $\beta$ -D-galactoside.

#### 실험방법

**물질 FB의 단리**—前報의 실험방법<sup>1)</sup>에 의해 얻은 BuOH 층의 엑스 9g을 silica gel column(2.8×100 cm, CHCl 6.5 : 3 : 1)을 실시한 후 여기서 얻은 물질 FB fraction의 건조엑스 0.9g을 Sephadex LH20 column으로 gel filtration하고 60% acetone으로 재결정하여 mp.249~250°C의 황색침상결정 130 mg을 얻었다(수율 : 1.5%).

mp : 249~250°(60% acetone)

Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>·1/3H<sub>2</sub>O ; C, 53.617 ; H,

4.369

Found : C, 53.646 ; H, 4.732

Specific rotation : [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -65.94°(C=0.138, in pyridine)

MS(m/z) : 464(M<sup>+</sup>), 302(base peak, 100%)

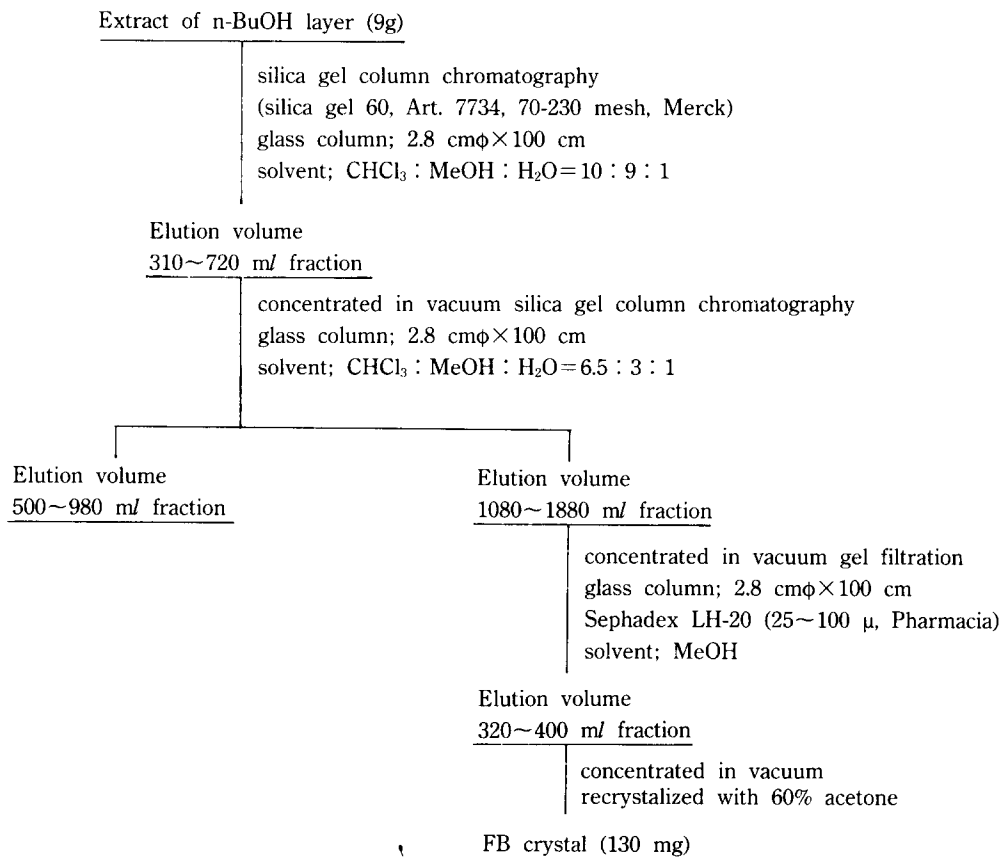
UV( $\lambda_{max}$  nm) :

MeOH : 256, 267(sh), 300(sh), 359

MeOH+NaOMe : 273, 329, 408

MeOH+AlCl<sub>3</sub> : 274, 304(sh), 355(sh), 439

MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl : 268, 300(sh), 364(sh), 404



Scheme 1—Isolation of flavonoid compound FB

MeOH+NaOAc : 274, 325, 381

MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 260, 297(sh), 380

IR( $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm) : 3400~3200(-OH), 1650(conjugated, C=O), 1600, 1550, 1480(aromatic) 1080(alcohol, -C-OH)

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) : 7.66(H<sup>6'</sup>, dd, J=8.8 and 2 Hz, 1H), 7.53(H<sup>2'</sup>, d, J=2 Hz, 1H), 6.81(H<sup>5'</sup>, d, J=8.8 Hz, 1H), 6.40(H<sup>8</sup>, d, J=2 Hz, 1H), 6.19(H<sup>6</sup>, d, J=2 Hz, 1H), 5.37(gal-H<sup>1''</sup>, d, J=7.8 Hz, 1H), 3.65~3.28(gal ; 4=CH-, -CH-, m, CH)

<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm, ( ) ; No. of carbon position) : 156.2(2), 133.4(3), 177.3(4), 161.1(5), 98.6(6), 164.2(7), 93.5(8), 156.1(9), 103.7(10), 121.0(1'), 115.0(2'), 144.7(3'), 148.4(4'), 115.8(5'), 121.9(6'), 101.7(1''), 71.2(2''), 73.2(3''), 67.9(4''), 75.5(5''), 60.2(6'')

**물질 FB의 가수분해**—물질 FB 50 mg을 10%-HCl로 상법에 따라 가수분해하여 황색침상의 조결정을 얻고 이것을 50% acetone으로 재결정하여 mp. 292~293°(decomp.)의 황색 침상결정 20 mg을 얻었다(수율 : 61%) (lit.285~290°).<sup>2-4)</sup>

Aglycone.

UV( $\lambda_{\max}$  nm) :

MeOH : 255, 268(sh), 302(sh), 372

MeOH+NaOMe : 244, 326, 424

MeOH+AlCl<sub>3</sub> : 271, 301(sh), 336, 453

MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl : 265, 301(sh), 361, 428

MeOH+NaOAc : 260(sh), 274, 322, 383

MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 259, 301(sh), 387

IR( $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm) : 3400~3200(-OH), 1650(conjugated C=O), 1600, 1500, 1450(aromatic)

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) : 7.70(H<sup>2'</sup>, d J=2 Hz,

**Table I**—<sup>1</sup>H-NMR Data of FB and Hyperoside.<sup>6)</sup> (DMSO-d<sub>6</sub>, ppm)

FB	Hyperoside
7.66(H <sup>6'</sup> , d,d, J=2 Hz, J=8.8 Hz, 1H)	7.60(H <sup>6'</sup> , d,d, J=2 Hz, J=8.3 Hz, 1H)
7.53(H <sup>2'</sup> , d, J=2 Hz, 1H)	7.59(H <sup>2'</sup> , d, J=2 Hz, 1H)
6.81(H <sup>5'</sup> , d, J=8.8 Hz, 1H)	6.89(H <sup>5'</sup> , d, J=8.3 Hz, 1H)
6.40(H <sup>8'</sup> , d, J=2 Hz, 1H)	6.42(H <sup>8'</sup> , d, J=1.9 Hz, 1H)
6.19(H <sup>6'</sup> , d, J=2 Hz, 1H)	6.21(H <sup>6'</sup> , d, J=1.9 Hz, 1H)
5.37(gal-H <sup>1''</sup> , d, J=7.8 Hz, 1H)	5.52(gal-H <sup>1''</sup> , d, J=7.3 Hz, 1H)

1H), 7.56(H<sup>6'</sup>, d,d, J=8 Hz, J=2 Hz, 1H), 6.96(H<sup>5'</sup>, d, J=8 Hz, 1H), 6.96(H, d, J=8 Hz, 1H), 6.44(H<sup>8'</sup>, d, J=2 Hz, 1H), 6.22(H<sup>6'</sup>, d, J=2 Hz, 1H)

<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm, ( ) ; No. of carbon position) : 146.8(2), 135.6(3), 175.8(4), 160.6(5), 98.1(6), 163.8(7), 93.3(8), 156.1(9), 103.0(10), 121.9(1'), 115.0(2'), 145.0(3'), 147.6(4'), 115.5(5'), 119.9(6')

Sugar

가수분해 산물을 분리한 수층을 Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 가하여 HCl을 제거한 후 농축하여 검액으로한 후 cellulose plate(Art. 5574, M-erck) 상에서 전개용매 PhOH : H<sub>2</sub>O=3 : 1로 TLC를 실시하여 Rf치 0.42로 D-galactose 표준과 비교 동정하였다.

**물질 FB acetate**—물질 FB 50 mg을 pyridine과 Ac<sub>2</sub>O로 상법에 따라 acetylation한 후 재결정하여 mp. 120~121°의 백색침상결정 물질 FB acetate 47 mg을 얻었다(수율 : 55%).

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) :

alcohol성-OAc×4 : 1.92(s, 3H), 2.00(s, 3H), 2.12(s, 3H), 2.14(s, 3H)

phenol성-OAc×4 : 2.32(s, 3H), 2.35(s, 6H), 2.44(s, 3H), 3.84(m), 5.30(m), 5.48(d, J=8 Hz, gal-H<sup>1''</sup>), 6.64(d, J=2 Hz, H<sup>6'</sup>) 7.30(m, H<sup>8</sup>H<sup>5'</sup>), 7.96(m, H<sup>2'</sup>, H<sup>6'</sup>)

**물질 FB aglycone acetate**—물질 FB aglycone 20 mg을 pyridine과 Ac<sub>2</sub>O로 상법에 따라 acetylation하고 ether로 추출하여 감압농축하고 60% acetone으로 재결정하여 mp.196~197°(lit.195~197°)<sup>5)</sup>의 백색침상 결정 FB aglycone acetate 22 mg을 얻었다(수율 : 65%).

IR(ν<sub>max</sub><sup>KBr</sup> cm) : 1780(acetyl group, -C=O), 1650(conjugated, C=O), 1600, 1500, 1400(aromatic)

**Table II**—<sup>13</sup>C-NMR Data of FB and Hyperoside.<sup>7)</sup> (DMSO-d<sub>6</sub>, ppm)

Carbon No	FB	H
2	156.2	156.3
3	133.4	133.8
4	177.3	177.5
5	161.1	161.2
6	98.6	98.6
7	164.2	164.0
8	93.5	93.4
9	156.1	156.3
10	103.7	104.0
1'	121.0	121.3
2'	115.0	115.2

Carbon No	FB	H
3'	144.7	144.7
4'	148.4	148.3
5'	115.8	116.2
6'	121.9	121.8
1''	101.7	102.3
2''	71.2	71.4
3''	73.2	73.4
4''	67.9	68.0
5''	75.7	75.8
6''	60.2	60.2

C: No. of carbon positon.

H: Hyperoside.

1180(ester, C-O)

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) :

phenol성-OAc×5 ; 2.33(s, 6H), 2.34(s, 6H), 2.43(s, 3H), 6.88(d, J=2 Hz, 1H, H<sup>6'</sup>), 7.34(m, H<sup>5'</sup>, H<sup>8'</sup>), 7.71(m, H<sup>2'</sup>, H<sup>6'</sup>)

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 21.17, 21.03, 20.51, 20.55 (5×O=C-CH<sub>3</sub>)

## 결과 및 고찰

물질 FB는 Mg+HCl, FeCl<sub>3</sub> 및 Pb(OAc), Pb(OH) 반응에 양성이고, IR Spectrum에서 3400~3200 (-OH), 1650(conjugated C=O), 1600, 1500, 1440 (aromatic) 및 1080 cm<sup>-1</sup>(alcohol C-OH) 등에서 강한 흡수대를 보이고, UV는 256 nm와 300, 359 nm에서 흡수대를 나타내므로 flavonol로 추정하였으며, <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)의 3.28~3.65 ppm에서 multiple 한 signal과 <sup>13</sup>C-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)에서 당의 탄수에 해당하는 6개의 peak가 나타나므로 hexose 1분자가 결합된 flavonol glycoside임을 알 수 있었다.

한편 물질 FB aglycone의 H-NMR을 살펴보면 H<sup>2'</sup>는 7.70 ppm에서 J<sub>2'6'</sub>=2 Hz(meta-coupling)의 doublet, H<sup>6'</sup>는 7.56 ppm에서 J<sub>6'2'</sub>=2z(meta-coupling), J<sub>6'5'</sub>=8 Hz(ortho-coupling)의 double-doublet, 6.96 ppm에서 H<sup>5'</sup>는 J<sub>5'6'</sub>=8 Hz(ortho-coupling)의 doublet로 나타나고, H<sup>8</sup>과 H<sup>6</sup>는 J<sub>88</sub>=2 Hz, J<sub>86</sub>=2 Hz로 6.44 및 6.22 ppm에서 각각 doublet로 나타나 polyhydroxyl flavonol의 형태임을 알 수 있다.

FB aglycone acetate의 <sup>1</sup>H-NMR 결과 5개의 acetyl group signal이 2.33(6H), 2.34(6H) 및 2.43(3H) ppm에 나타나 5개의 hydroxyl group이 있음을 분명케 했다. 또한 shift reagent를 사용한 물질 FB aglycone의 UV spectrum을 살펴보면 MeOH 용액일 때보다 2 M-NaOH 용액첨가시 band I의 측정치는 52 nm의 장파장 이동이 일어나 4'-OH의 존재와 326 nm의 새로운 band의 형성으로 7-OH가 있음을 추정케 하는데 이는 NaOAc 첨가시 측정된 band III가 MeOH 용액에 비해 19 nm의 장파장 이동이 일어나 더욱 확실케 하였고, 5%의 AlCl<sub>3</sub> 용액 첨가시 band I이 81 nm 장파장으로 이동하여 5-OH가 있음을 알 수 있고 여기에 HCl 첨가한 후 band I이 25 nm 단파장 이동하여 B-ring의 ortho-dihydroxyl group이 있는 것으로 추정되고 있는 이는 NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 첨가시 MeOH 용액에 비해 band I이 15 nm 장파장 이동하여 이를 확인케 했다.

이상을 종합하여 FB aglycone은 quercetin으로 추정할 수 있었으며 물질 FB의 MS 결과 fragment ion peak가 302로 quercetin의 분자량과 일치하며 표품과의 TLC 및 혼용시험도 일치하여 물질 FB의 aglycone은 quercetin으로 동정하였다.

한편 sugar는 물질 FB acetate의 <sup>1</sup>H-NMR에서 4개의 phenolic acetyl group signal 즉 2.44(3H), 2.35(6H) ppm 2.32(3H) 외에 4개의 alcohol성 acetyl-group signal 즉 1.92(3H), 2.00(3H), 2.12(3H), 2.14(3H) ppm이 나타나 물질 FB는 하나의 hexose가 결합되었음을 알 수 있었고, 물질 FB의 <sup>13</sup>C-NMR에서 hexose에 해당하는 6개의 peak 즉 101.7, 71.2, 73.2, 67.9, 75.7 및 60.2 ppm에 대한 해석결과 -O-galactose (3-linked)와 동일하였다.

또한 가수분해 후 표품 D-galactose와 비교 TLC에서도 Rf치가 0.42(black-blue)에서 일치하여 당은 D-galactose임을 알 수 있었다.

이러한 사실로부터 물질 FB는 quercetin에 D-galactose가 결합되어 있음을 알 수 있고 그 결합위치를 알기위해 UV-spectrum을 살펴보면 물질 FB가 물질 FB aglycone에 비해 band I이 단파장으로 13 nm 이동되는 것으로 보아 C<sub>3</sub>가 치환 가능성이 있을 것으로 예상되었고 각각의 <sup>13</sup>C-NMR data에서 C<sub>3</sub>에 대해 물질 FB의 C<sub>3</sub>가 물질 FB aglycone에서 보다 2.2 ppm upfield 되었고 ortho 위치의 C<sub>2</sub>는 9.4 ppm down field 되었으므로 C<sub>3</sub>에 O-galactoside로 결합되어 있음을 알 수 있었다.

또한 <sup>1</sup>H-NMR에서 galactoside의 H<sup>1''</sup>가 coupling constant J=7.8 Hz로 doublet되어 H<sup>2''</sup>와 diaxial coupling 즉 β-form으로 결합되어 있음을 알 수 있다.<sup>4)</sup>

이상의 결과를 종합하여 물질 FB를 quercetin-3-O-β-D-galactoside로 추정하였고, MS에서 분자량 464가 확인되었으며 표품과의 비교 TLC 및 혼용시험 결과 및 기기분석 data 모두 일치하여 물질 FB를 quercetin-3-O-β-D-galactoside로 동정하였다.

## 결 론

제주 피막이 *Hydrocotyle japonica*에서 물질 FB를 분리하여 이화학적 실험 및 spectral data(UV, IR, NMR, Mass, etc.)를 통하여 물질 FB는 mp.249~250° [D]<sub>D</sub><sup>20</sup> -65.94°(C=0.138, in pyridine), C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>·1/3H<sub>2</sub>O인 quercetin-3-O-β-D-galactoside(hyperoside)로 동정하였다.

## 문 헌

- 1) Cho, E.H. and Kim, I.H.: Studies on the pharmaco-

- constituents of *Hydrocotyle japonica*(I). *Yakhakhojei* **32**, 281(1988).
- 2) Leonard J.: The selective alkylation of polyphenols. II. Methylation of 7-, 4'-, and 3'-hydroxyl group in flavonols. *J. Org. Chem.* **27**, 1294(1962).
- 3) Fujita, M. and Sankawa, U.: Detection & isolation of coloring matters containing in the leaves of chinese & corean rhubarb plants. *Soyakugaku Zasshi* **12**, 80(1958).
- 4) Takizawa, N.: Studies on the constituents of lindera species(I) On the flavonoid compounds of Lindera families. *Soyakugaku Zasshi* **38**, 196(1984).
- 5) Yasue, M., Sakakibara, J. and Kaiya, T.: Studies on the constituents of *Lyonia ovalifolia* Drude var. elliptica Hand. -Mazz. X. On the constituents of the flower(I). *Yakugaku Zasshi* **90**, 1174(1970).
- 6) Yasukawa, K. and Takido, M.: A flavonol glycoside from *Lysimachia mauritiana*. *Phytochemistry* **26**, 1224 (1987).
- 7) Harborne, J.B. and Mabry, T.J.: *The flavonoids advances in research*, 19 Chapman & Hall London New York (1982).