Isolation and Identification of Phenolic Compounds from the Root Bark of *Morus alba* L.

Jae-Woo Jung · Ji-Hae Park · Kyeong-Hwa Seo · Yoon-Su Baek · Eun-Ji Oh ·
Dae-Young Lee · Dong-Wook Lim · Daeseok Han · Nam-In Baek*

상백피(*Morus alba* root barks)로부터 페놀화합물의 분리 및 동정

정재우 · 박지혜 · 서경화 · 오은지 · 백윤수 · 이대영 · 임동욱 · 한대석 · 백남인*

Received: 4 February 2015 / Accepted: 17 March 2015 / Published Online: 30 June 2015

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2015

Abstract The root barks of *Morus alba* L. were extracted with 80% aqueous MeOH, and the concentrated extract was partitioned with EtOAc, *n*-BuOH, and H₂O fractions. The repeated silica gel, octadecyl silica gel, and Sephadex LH-20 column chromatographies of the EtOAc and *n*-BuOH fractions led to isolation of four phenolic compounds. The chemical structures of the compounds were determined as norartocarpanone (1), 2',4',7-trihydroxy-(2*S*)-flavanone (2), methyl β -resorcyate (3), and (*Z*)-oxyresveratrol-4-*O*- β -D-glucopyranoside (4). Compound 4 was isolated for the first time from the root barks of *M. alba* L.

Keywords *Morus alba* · nuclear magnetic resonance · phenolic compound · root bark · (*Z*)-oxyresveratrol-4-*O*- β -D-glucopyranoside

J.-W. Jung · J.-H. Park · K.-H. Seo · E.-J. Oh · Y.-S. Baek · N.-I. Baek
Graduate School of Biotechnology and Department of Oriental Medicine
Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic of Korea

D.-Y. Lee
Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural
and Herbal Science, RDA, Eumseong 369-873, Republic of Korea

D.-W. Lim · D. Han
Division of Metabolism and Functionality Research, Korea Food Research
Institute, Sungnam 463-746, Republic of Korea

*Corresponding author (N.-I. Baek: nibaek@khu.ac.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

상백피로부터 이차대사산물을 분리하고 각 물질에 대한 성분분석을 통해 상백피의 의약품 및 기능성 화장품 소재로서의 활용 방안을 모색하는 실험을 수행하였다. 저자 등은 상백피로부터 용매추출, 용매분획, 및 column chromatography를 반복 실시하여 5종의 triterpenoid 화합물을 분리 동정하여 보고한 바 있으며(Jung 등, 2014), 이번 실험에서는 4종의 phenolic 화합물을 분리 동정하였다.

이전에 보고된 바와 같이 상백피에서 얻어진 EtOAc 분획(122 g)으로부터 SiO₂ column chromatography (c.c.) (12.5×17 cm, *n*-hexane-EtOAc=4:1→2:1→1:1→chloroform (CHCl₃)-MeOH=10:1, 각 27 L)를 실시하여 41개의 분획물(MRE-1-MRE-41)을 얻었다. MRE-28 [2.2 g, elution volume/total volume (Ve/Vt)=0.595-0.670]을 ODS c.c. (φ 7×4 cm, MeOH-H₂O=2:1→4:1→6:1, 각 2 L)를 실시하여 16개의 분획(MRE-28-1-MRE-28-16)으로 나누었다. MRE-28-2 (44 mg, Ve/Vt=0.021-0.032)를 Sephadex LH-20 c.c. (φ 1×60 cm, MeOH-H₂O=4:1, 0.8 L)를 실시하여 8개의 분획(MRE-28-2-1-MRE-28-2-8)으로 나누었고, 그 중 화합물 1 (MRE-28-2-7, 26 mg, Ve/Vt=0.478-0.578, TLC (ODS F_{254S}) R_f 0.61, MeOH-H₂O=3:1)을 분리하였다. MRE-30 (1.2 g, Ve/Vt=0.672-0.683)을 ODS c.c. (φ 2×10 cm, MeOH-H₂O=3:2→3:1→5:1, 각 1.2 L)를 실시하여 24개의 분획(MRE-30-1-MRE-30-24)으로 나누었고, 그 중 화합물 2 (MRE-30-3, 8 mg, Ve/Vt=0.012-0.022, TLC (ODS F_{254S}) R_f 0.69, MeOH-H₂O=2:1)를 분리하였다. MRB (78 g)를 SiO₂ c.c. (φ 12×20 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=9:3:1→65:35:10→6:4:1, 각 1.5 L)를 실시하여 15개의 분획물(MRB-1-MRB-15)을 얻었다. MRB-1 (790 mg, Ve/Vt=0.000-0.039)을 ODS c.c. (φ 3×7 cm, MeOH-H₂O=1:1, 각 0.7 L)를 실시하여 4개의 분획(MRB-1-1-MRB-1-4)으로 나누었고, 그 중 화합물 3 (MRB-1-2, 19 mg, Ve/Vt=0.513-0.812, TLC (ODS F_{254S}) R_f 0.57, MeOH-H₂O=3:2)을 분리하였다. MRB-10 (2.3 g, Ve/Vt=0.589-0.664)을 ODS c.c. (φ 4×8 cm, MeOH-H₂O=2:3,

Fig. 1 Chemical structures of phenolic compounds (1-4) from the root barks of *Morus alba* L.

각 1.0 L)를 실시하여 8개의 분획(MRB-10-1-MRB-10-8)으로 나누었다. MRB-10-2 (186 mg, Ve/Vt=0.112-0.173)를 SiO₂ c.c. (ϕ 3×10 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=7:3:1, 각 0.75 L)를 실시하여 4개의 분획(MRB-10-2-1-MRB-10-2-4)으로 나누었다. MRB-10-2-2 (120 mg, Ve/Vt=0.481-0.803)를 Sephadex LH-20 c.c. (ϕ 2×60 cm, MeOH-H₂O=4:1, 각 0.1 L)를 실시하여 4개의 분획(MRB-10-2-1-1-MRB-10-2-2-4)으로 나누었고, 그 중 화합물 4 (MRB-10-2-2-4, 5 mg, Ve/Vt=0.720-1.000, TLC (ODS F_{254S}) R_f 0.43, MeOH-H₂O=1:1)를 분리하였다.

화합물 1 (norartocarpanone): Yellow amorphous powder (in MeOH); $[\alpha]_D^{25} +12.4^\circ$ (c 0.12, MeOH); m.p. 248-253; EI/MS m/z 288 [M]⁺; IR (CaF₂ plate, ν) 3454, 1661, 1608, 1598 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 7.22 (1H, d, J =8.8 Hz, H-6'), 6.33 (1H, dd, J =8.8, 2.4 Hz, H-5'), 6.32 (1H, d, J =2.4 Hz, H-3'), 5.88 (1H, d, J =2.4 Hz, H-6), 5.85 (1H, d, J =2.4 Hz, H-8), 5.58 (1H, dd, J =13.2, 2.8 Hz, H-2), 3.03 (1H, dd, J =17.2, 13.2 Hz, H-3a), 2.68 (1H, dd, J =17.2, 2.8 Hz, H-3b); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 198.22 (C-4), 169.18 (C-8a), 166.41 (C-7), 165.47 (C-5), 159.69 (C-4'), 156.76 (C-2'), 128.83 (C-6'), 117.93 (C-1'), 107.76 (C-3'), 103.40 (C-5'), 103.08 (C-4a), 97.18 (C-6), 96.41 (C-8), 75.89 (C-2), 43.09 (C-3).

화합물 2 (2',4',7'-trihydroxy-(2S)-flavanone): Red amorphous powder (in MeOH); $[\alpha]_D^{25} -10.2^\circ$ (c 0.39, MeOH); m.p. 140-145; EI/MS m/z 272 [M]⁺; IR (CaF₂ plate, ν) 3460, 1668, 1602, 1591 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 7.72 (1H, d, J =8.8 Hz, H-5), 7.24 (1H, d, J =8.8 Hz, H-6'), 6.48 (1H, dd, J =8.8, 2.4 Hz, H-6), 6.35 (1H, d, J =2.4 Hz, H-8), 6.33 (1H, dd, J =8.8, 2.4 Hz, H-5'), 6.32 (1H, d, J =2.8 Hz, H-3'), 5.62 (1H, dd, J =13.6, 2.8 Hz, H-2), 2.98 (1H, dd, J =17.2, 12.8 Hz, H-3a), 2.68 (1H, dd, J =17.2, 2.8 Hz, H-3b); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 194.32 (C-4), 166.44 (C-8a), 166.09 (C-7), 159.69 (C-2'), 157.09 (C-4'),

129.89 (C-5), 128.81 (C-6'), 118.17 (C-1'), 114.94 (C-4a), 111.65 (C-6'), 107.76 (C-5'), 103.81 (C-8), 103.41 (C-3'), 76.49 (C-2), 44.08 (C-3).

화합물 3 (methyl β -resorcyate): Brown oil (in CHCl₃); EI/MS m/z 168 [M]⁺; IR (KBr, ν) 3380, 1666, 1621 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ_H) 7.67 (1H, d, J =8.8 Hz, H-6), 6.37 (1H, br.s, H-3), 6.35 (1H, br.d, J =8.8 Hz, H-5), 3.87 (3H, s, H-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ_C) 170.39 (C-7), 163.55 (C-4), 162.67 (C-2), 131.76 (C-6), 108.02 (C-5), 105.42 (C-1), 103.05 (C-3), 51.94 (C-OCH₃).

화합물 4 ((Z)-oxyresveratrol-4-O- β -D-glucopyranoside): Brown amorphous powder (in MeOH); $[\alpha]_D^{25} -20.2^\circ$ (c 0.39, MeOH); m.p. 200-205; EI/MS m/z 406 [M]⁺; IR (KBr, ν) 3391, 1608, 1594 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ_H) 7.02 (1H, d, J =8.8 Hz, H-6), 6.55 (1H, d, J =2.4 Hz, H-3), 6.52 (1H, d, J =12.0 Hz, H- α), 6.40 (1H, dd, J =8.8, 2.4 Hz, H-5), 6.34 (1H, d, J =12.0 Hz, H-), 6.21 (2H, d, J =2.4 Hz, H-2', 6'), 6.07 (1H, t, J =2.4 Hz, H-4'), 4.80 (1H, d, J =7.6 Hz, H-1''), 3.88 (1H, dd, J =12.4, 2.4 Hz, H-6'a), 3.69 (1H, dd, J =12.4, 5.2 Hz, H-6'b), 3.38 (1H, m, H-3''), 3.36 (1H, m, H-5''), 3.36 (1H, m, H-2''), 3.34 (1H, m, H-4''); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δ_C) 159.47 (C-4), 159.23 (C-3'), 159.23 (C-5'), 157.16 (C-2), 140.67 (C-1'), 131.81 (C-6), 129.95 (C- β), 126.25 (C- α), 119.96 (C-1), 110.01 (C-5), 108.52 (C-2'), 108.52 (C-6'), 104.70 (C-3), 102.32 (C-4'), 102.15 (C-1''), 78.11 (C-3''), 78.02 (C-5''), 74.85 (C-2''), 71.37 (C-4''), 62.55 (C-6'').

화합물 4 (Brown amorphous powder)는 EI/MS에서 m/z 406 [M]⁺의 분자이온 peak가 관측되어 분자량을 406으로 결정하였다. IR 스펙트럼으로부터 수산기(3391 cm⁻¹)와 이중결합(1608, 1594 cm⁻¹)의 작용기를 갖는 것으로 확인되었다. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum에서는 저자장영역에서 olefin methine proton signal (δ_H 6.40, 1H, dd, J =8.8, 2.4 Hz, H-5)이 δ_H

7.02 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6) signal과 vicinal coupling (J_3) 합이 확인되었고, δ_H 6.55 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3)과는 long range (J_4) coupling을 확인하였다. 이로 미루어 1,2,4-삼치환 benzene ring 1개를 예측하였다. 또한, olefin methine proton signal (δ_H 6.21, 2H, d, $J=2.4$ Hz, H-2', 6'; 6.07, 1H, t, $J=2.4$ Hz, H-4') 3개가 관측되어 1,3,5-삼치환 benzene ring 1개를 예측하였다. 또한, olefin methine proton signal (δ_H 6.52, 1H, d, $J=12.0$ Hz, H-a; 6.34, 1H, d, $J=12.0$ Hz, H-b) 2개를 관측하였으며, 이 두 signal의 coupling constant (J) 값이 12.0 Hz 인 것으로부터 *cis* 배향의 이중결합을 확인할 수 있었다. 산소가 치환된 영역에서는 한 개의 hemiacetal proton signal (δ_H 4.80, 1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1")이 관측되었으며 J 값이 7.6 Hz로부터 β -결합하고 있음을 확인하였고, 당에서 유래하는 4개의 oxygenated methine 및 1개의 oxygenated methylene signal이 δ_H 3.34-3.38에서 관측되었다. 따라서, proton 데이터를 종합하여, *cis* 배향의 stilbene 골격에 4개의 수산기, 한 개의 당이 결합된 화합물로 예측하였다. ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum에서 당을 포함하여 총 20개의 탄소 signal이 관측되었으며, 저자장영역에서 stilbene 유래의 oxygenated olefin quaternary carbon signal (δ_C 159.47, C-4; 159.23, C-3'; 159.23, C-5'; 157.16, C-2) 4개와, olefin quaternary carbon signal (δ_C 140.67, C-1'; 119.96, C-1) 2개, olefin methine carbon signal (δ_C 131.81, C-6; 129.95, C-b; 126.25, C-a; 110.01, C-5; 108.52, C-2'; 108.52, C-6'; 104.70, C-3; 102.32, C-4') 8개가 관측되었다. 수산기영역에서는 당 유래의 hemiacetal carbon signal (δ_C 102.15, C-1"), 4개의 oxygenated methine carbon signal (δ_C 78.11, C-3"; 78.02, C-5"; 74.85, C-2"; 71.37, C-4"), 1개의 oxygenated methylene carbon signal (δ_C 62.55, C-6")의 chemical shift로부터 당의 구조가 β -glucopyranose임을 확인하였다. 당의 결합위치를 확인 하기 위하여 heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC)를 측정하였으며, 그 결과 anomer proton signal (δ_H 4.80, H-1")이 oxygenated olefin quaternary carbon signal (δ_C 159.47, C-4)과 cross peak를 보여 glucose가 4번에 결합하고 있음을 알 수 있었다. 이를 토대로 문헌 (Hakim 등, 2004)과 비교하여, 화합물 4를 (*Z*)-oxyresveratrol-4-*O*- β -D-glucopyranoside로 구조동정하였다(Fig. 1).

Norartocarpanone (1), 2',4',7-trihydroxy-(2*S*)-flavanone (2) 및

methyl β -resorcyate (3)은 이전에 상백피로부터 분리 보고된 바 있으나, (*Z*)-oxyresveratrol-4-*O*- β -D-glucopyranoside (4)는 상백피에서는 이번에 처음으로 분리, 동정하였다. Norartocarpanone (1)과 2',4',7-trihydroxy-(2*S*)-flavanone (2)는 tyrosinase 억제활성 (Kang 등, 2011; Zheng 등, 2009)이 보고되어 있다.

초 록

뽕나무(*Morus alba* L.) 뿌리껍질을 실온에서 80% MeOH 수용액으로 추출하고 이 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH, 그리고 H_2O 분획으로 나누었다. EtOAc 및 *n*-BuOH 분획에 대하여 silica gel, ODS 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 실시하여 4종의 phenolic 화합물을 분리, 정제하였다. NMR, IR, 및 EI/MS 등을 해석하여, norartocarpanone (1), 2',4',7-trihydroxy-(2*S*)-flavanone (2), methyl- β -resorcyate (3), 그리고 (*Z*)-oxyresveratrol-4-*O*- β -D-glucopyranoside (4)로 각각 구조동정하였다. 화합물 (*Z*)-oxyresveratrol-4-*O*- β -D-glucopyranoside (4)는 상백피로부터는 이번 실험에서 처음으로 분리되었다.

Keywords 뽕나무 · 상백피 · nuclear magnetic resonance, phenolic compound · (*Z*)-oxyresveratrol-4-*O*- β -D-glucopyranoside

감사의 글 본 연구는 한국식품연구원(20140398U0054101S00100)에서 지원한 연구비로 수행 되었음.

References

- Hakim EH, Achmad SA, Aimi N, Indrayanto G, Kitajima M, and Makmur L (2004) Regioselective glucosylation of oxyresveratrol by cell suspension cultures of *Solanum mammosum*. *J Chem Res* **2004**, 706–7.
- Jung JW, Park JH, Jung YJ, Lee CH, Han D, and Baek NI (2014) Isolation and identification of triterpenoids from the Mulberry (*Morus alba*) root bark. *J Appl Biol Chem* **57**, 295–9.
- Kang KB, Kim SD, Kim TB, Jeong EJ, Kim YC, Sung JH et al. (2011) Tyrosinase inhibitory constituents of *Morus bombycis* cortex. *Natl Prod Res* **17**, 198–201.
- Zheng ZP, Chem S, Wang S, Wang XC, Cheng KW, Wu JJ et al. (2009) Chemical components and tyrosinase inhibitors from the twigs of *Artocarpus heterophyllus*. *J Agric Food Chem* **57**, 6649–55.