

# 結晶性 Dihydroquercetin의 새로운 分取方法\*<sup>1</sup>

宋 昉 權\*<sup>2</sup>

## New Separation Technique of Crystallized Dihydroquercetin\*<sup>1</sup>

Hong - Keun Song\*<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The new preparative separation technique of dihydroquercetin (2, 3-*trans*-dihydroxy-3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxydihydroflavonol) was investigated by liquid chromatography. Also some typical coniferous wood bark were examined for the sources of dihydroquercetin. The good sources of dihydroquercetin were Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii*] bark and pitch pine [*Pinus rigida*] bark. There is no dependence the produced place and species dihydroquercetin which is separated by silica-gel column chromatography was taken with white needle-like crystals. This crystals were very stable in the humidity and on the light. It also can stored very long without derivatives.

### 1. 緒 論

지난 20년간 나무에 풍부하게 존재하는 縮合 타닌의 構造結定 및 그 이용에 대한 연구는 끊임없이 계속되어 왔다. 1972년 Haslam 외 2인<sup>1)</sup> 으로부터 시작하여 Hemingway<sup>2)</sup>, Porter<sup>3)</sup> 등의 노력으로 縮合타닌의 構造結定이 거의 확실시 되었으나 이 분야의 이용, 특히 針葉樹 縮合타닌의 이용은 그 標準化合物의 取得이 어려워 그렇게 많은 진전이 없는 실정이다. 지금까지 天然物에서 純粹分離가 가능한 단위는 tetramer(Hsu 외 2인)<sup>3)</sup>까지이었다.

2, 3-*trans*-dihydroxy-3, 3', 4', 7, 8-pentahydroxydihydroflavonol(dihydroquerc-

etin or taxiforin) 은 proanthocyanidin polymers 또는 anthocyanidin의 前驅物質 (precursor)로 이들의 화학적인 性狀을 연구하는데 없어서된 안될 중요한 化合物이다. 이 化合物은 1948년 Pew<sup>4)</sup>에 의하여 Douglas-fir 心材에 존재하는 것이 밝혀진 이후로 많은 木本植物에서 존재가 확인되었다. Dihydroquercetin을 식물체에서 분리하는 것은 어려운 방법이 아니다. 다만 문제가 되는 것은 분리된 dihydroquercetin을 장기간 변하지 않고 순수하게 보관할 수 없다는 것이다. 이 化合物의 分取 방법은 1950년 초 Douglas-fir수피로부터 kurth가 주동이 되어 몇몇의 방법이 개발<sup>5)</sup>되었으나 그 과정이 복잡하고 최종 분리된 化合物

\*1. 接受 1991年 7月 25日 Received July 25, 1991

\*2. 임업연구원 Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea.

이 빛에 불안정한 多孔性(amorphorous)物質로서 장기간 보관이 어려운 단점이 있다.<sup>1)</sup>

국내 유용 針葉樹 중 소나무, 리기다소나무, 잣나무, 낙엽송 樹皮를 試料로하여 추출물을 분석하여 이중 dihydroquercetin含量이 가장 많은 수종인 리기다소나무를 선택하였다.<sup>4)</sup> 미국 북서부지역의 대표수종인 Douglas-fir 樹皮는 Kurth에 의하여 개발된 分取방법<sup>3)</sup>을 도입하여 精製한 후 새로운 分取方法을 적용하였고 위의 국내 수종 중 dihydroquercetin의 함량이 가장 많은 리기다소나무 樹皮는 Kurth가 개발한 精製過程을 생략한 후 직접 分取하고자 하였다. 그 이유는 Kurth에 의한 방법이 가장 최근까지 일반화된 방법으로서 dihydroquercetin을 가장 純粹하게 分取한다고 알려져 있기 때문에 그 精製過程 없이 직접 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 分取하는 방법과 비교하므로써 장단점을 알고져 하였다.

## 2. 材料 및 方法

Douglas-fir 樹皮에서 dihydroquercetin을 추출하기 위한 試料로는 Weyerhaeuser Company에서 供給한 dihydroquercetin이 많은 試料를 사용하였다. 리기다소나무 樹皮는 중부임업시험장(광릉)에서 1988년 벌채한 35년생 원목에서 박피하여 사용하였다.

그림 1은 Douglas-fir 樹皮의 分析過程을, 그림 2는 리기다소나무 樹皮의 分析過程을 模式圖로 나타낸 것이다. 이 過程들을 자세히 설명하면 다음과 같다.

### 2.1 溶媒抽出

Weyerhaeuser Co.에서 공급된 試料에 殘存하는 非極性物質을 용해시키기 위하여 chloroform에 녹여 여과한 후 용해되지 않은 나머지를 ethyl acetate에 다시 녹인 후 여과하였다. 이 ethyl acetate 용해액을 후드안에서 건조시켜 짙은 赤褐色의 끈적끈적한 물질을 얻었다. 이

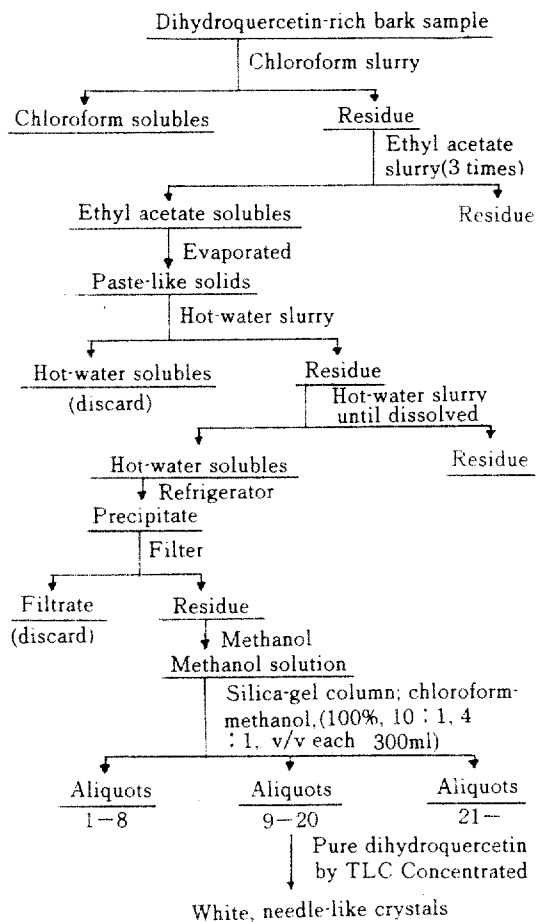


Fig.1. Crystallization of dihydroquercetin from Douglas-fir bark.

질액성물질은 試料 1로 사용하였다. 리기다소나무 樹皮는 음지에서 기건시킨 후 pulverizer로 微粉碎하여 acetone : water(7 : 3, v/v)에 浸漬시켜 3일동안 실온에서 방치하여 추출하였다. 추출액은 여과한 후 減壓濃縮機로 濃縮시켰다. 농축된 수용액에 적당량의 chloroform을 添加하여 非極性物質이 충분히 추출될때까지 分液갈대기로 水溶液과 분리하였다. 水溶液은 다시 ethyl acetate로 충분히 抽出하여 ethyl acetate 溶解層을 얻은 후 후드에서 건조시켰다. 이것을 試料 2로 사용하였다.

### 2.2 Dihydroquercetin의 精製

試料 1을 蒸氣水槽(steam bath)에서 熱水로

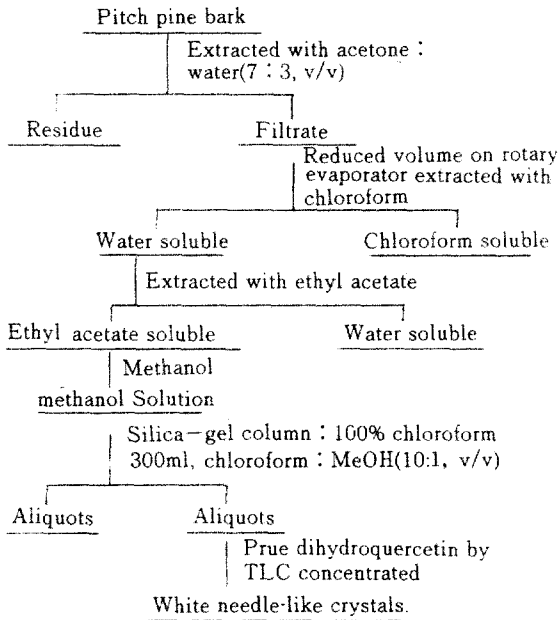


Fig.2. Crystallization of dihydroquercetin from Pitch pine bark.

용해시킨 결과 색깔이 있는 물질이 일차적으로 용해되어 하얀색의 불용性物質이 남는다. 색깔이 많은 水溶性 溶液을 제거한 하얀색의 불용性物質에 충분히 많은 뜨거운 물을 넣어 용해시킨 후 여과한다. 여과한 나머지는 계속 같은 과정을 반복하여 완전히 용해시킨 후 용해액을 식힌 후 냉장고에 저장시켜 노란색의 沈澱物을 생성시킨다(試料 1-A). 試料 2는 試料1과는 달리 緒論에서 언급한 바와 같이 精製과정을 거치지 않고 바로 다음 과정으로 진행하였다.

### 2.3 Dihydroquercetin의 結晶化

試料 1-A는 최소량의 methanol에 녹여 Silica-gel G-7(J. T. Backer Co.)을 slurry-packed 컬럼(4×30cm)에 충전시켰다. 이 컬럼에 展開溶媒로 chloroform : methanol(100%, 10 : 1, 4 : 1, v/v, 각 300ml씩)을 順次的으로 溶出시키고 溶出液은 自動分注機(auto-collector)를 이용하여 1시간 별로 모았다. 試料2는 정제과정이 없이 바로 최소량의 methanol에 녹인 후 Silica-gel 60G(Merck Co.)를

slurry-packed 컬럼에 충전하였다. 이 컬럼에 展開溶媒로 300ml의 100% chloroform으로 비극성 化合物이 溶出되지 않을때까지 계속 전개하였다. 展開溶媒는 自動分注機에 의하여 30분 간격으로 모았고 이 모인 부분은 매 3번째의 募集液을 TLC로 확인하여 같은 Rf값을 갖는 것끼리 합하였다. 합쳐진 용액은 암실에서 자연 휘발시켜 흰색결정이 얻어질때까지 방치하였다.

### 2.4 Dihydroquercetin의 動定

2.3에서 얻어진 흰색결정은 UV 265FW (shimadzu Co. Kyoto, Japan)을 사용하여 UV spectra를 얻었고 NMR spectra는 Bruker FT 400MHz NMR spectrometer로 얻었다. NMR spectra의 용매는 acetone-D<sub>6</sub>를 사용하였고 용매의 shift를 표준으로 하였다.

## 3. 結果 및 考察

2.2에서 생성된 노란색 沈澱物은 여과하여 회수한 후 TLC에 의하여 확인한 결과 대부분이 digydroquercetin이었다. 이 精製方法이 Kurth에 의하여 개발된 分取方法이다.

2.3에서 試料1-A의 募集液중 9-20번째의 募集液은 TLC로 확인하여 본결과 純粹한 dihydroquercetin이 존재하였다. 이 부분을 암실에 보관하여 용액을 감소시켜 흰색 結晶이 형성되도록 하였다. 結晶이 형성된 후 용매가 완전히 건조되기 전에 나머지의 용매를 딸아낸 후 흰색 結晶을 얻었다. 이 Douglas-fir 樹皮에서 얻어진 흰색 바늘상 結晶은 Markham<sup>4)</sup>에 의한 방법으로 UV spectra, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR에 의하여 분석하였다. 또 이 물질의 融點은 238-240°C였고 이는 標準物質(ICN. K&K Laboratories, INC. 이 공급한 dihydroquercetin)과 같았으며 문헌상 발표된 dihydroquercetin의 融點은 240-242°C였다.<sup>5)</sup> 또 이물질은 標準物質과 같이 TLC에 동시 전개하여 본 결과

동일한 Rf값을 가졌다.

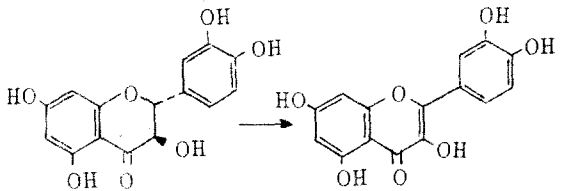
이 물질의 UV spectra 및 NMR spectra의 결과는 다음과 같다. 분석치: UV spectra;  $\lambda_{max}$  (MeOH) 324.0 and 289.0 nm; (MeOH+NaOH) 326.0, 244.4(sh) nm; (MeOH+AlCl<sub>3</sub>) 381.4, 313.6 nm, (MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl) 378.4, 310.6 nm; (MeOH+NaOAc) 326.6, 291.4 (sh) nm; (MeOH+NaOHc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 326.6 (sh), 291.4 nm. proton NMR; 5.93ppm(1H, d, J=2Hz, for 6-H), 5.97ppm(1H, d, J=2Hz, for 8-H) 7.05ppm(1H, d, J=2Hz=2Hz, for 5'-H) 6.88 and 6.90ppm (1H, dd, J=2, 8Hz, for 6'-H), 6.83 and 6.85ppm (1H, d, J=8Hz, for 2'-H), 4.99 and 5.02ppm(1H, d, J=11.3Hz, for 2-H), 4.58 and 4.61ppm(1H, d, J=11.3Hz, for 3-H). Carbon 13 NMR; 198.11ppm(C-4), 167.85ppm(C-7), 165.0ppm(C-5), 164.06ppm(C-9), 146.51ppm(C-4'), 145.69ppm(C-3'), 129.67ppm(C-1'), 120.75ppm(C-6'), 115.77 and 115.66ppm(C-2', 5'), 102.0ppm(C-10), 96.98ppm(C-6), 95.96ppm(C-8), 84.42ppm(C-2), 73.06ppm(C-3).

또 2-3에서 試料 2의 募集液 중 21번째 부터는 純粹한 dihydroquercetin이 溶出되기 시작하였다. 이 부분은 암실에 보관하여 용액을 감소시켜 흰색 結晶이 형성되도록 하였다. 이 흰색 바늘상 結晶은 標準物質 및 Douglas-fir 樹皮에서 얻어진 흰색 바늘상 結晶의 融點 및 TLC의 Rf값이 동일하였다. 이 흰색 바늘상 結晶은 Bruker AC-80 FT NMR을 이용하여 <sup>1</sup>H-, 및 <sup>13</sup>C-NMR분석을 실시하였다. 리기다 소나무 수피에서 얻어진 결과는 Douglas-fir 樹皮에서 얻어진 결과와 동일하였다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 Kurth에 의한 精製過程을 거치지 않고 ethyl acetate용해액을 직접 컬럼크로마토그래피에 의하여 손쉽게 結晶性 dihydroquercetin을 얻을 수 있었다.

Kurth나 Malterud<sup>7)</sup> 등이 사용한 방법에 의하

여 분리된 dihydroquercetin은 그 純粹도가 99% 이상이나 이는 大氣 및 빛에 노출되므로서 쉽게 다른 물질 특히 quercetin으로 상당량이 變質된다.<sup>6), 11)</sup>



이는 dihydroquercetin이 吸濕性 물질이기 때문에 大氣 중의 수분을 吸着하므로서 水溶性化 되어 그 化合物이 光에너지에 의하여 손쉽게 脫水素化 반응이 일어나므로서 더 안정적인 quercetin이 형성되기 때문이다.<sup>11)</sup>

그리고 분리된 dihydroquercetin이 바늘상 흰 結晶粒자를 형성할 수 있는 이유는 같은 Silica-gel 충전물질이라도 粒子가 일반 컬럼 크로마토그래피에 사용되는 70-230  $\mu$ m보다 작은 60  $\mu$ m이하의 것을 사용하여 Silica-gel의 고유특성인 吸着性を 최대한으로 이용하는 것이다. 이는 dihydroquercetin 자체를 다른 물질과 분리 할 뿐만 아니라 여기에 吸着되어 있는 H<sub>2</sub>O 분자를 제거시키므로써 자체 結晶이 일어날 수 있는 여건을 조성한다고 思料된다.

結晶性 dihydroquercetin은 大氣中 및 光에너지에 방치하여도 quercetin의 형성이 없이 안정하였다. 그리고 이 結晶의 HPLC에 의한 분석 결과 純度は 99.9% 이상임이 밝혀졌다.

#### 4. 結 論

본 실험은 anthocyanidin 및 proanthocyanidin의 化學的 특성을 연구하는데 필수불가결한 前驅物質(precursor)인 dihydroquercetin의 새로운 分取方法 및 原料源을 밝히기 위하여 수행하였다. 시험 결과는 다음과 같다.

1. Dihydroquercetin의 原料源으로는 외국수종은 Douglas-fir 樹皮가, 국내수종은 리기다소

나무 樹皮가 좋았다.

2. 產地와 수종에 관계없이 Silica-gel 칼럼을 이용한 dihydroquercetin 分取는 모두 백색 바늘상 結晶을 얻을 수 있었다.

3. 백색 바늘상 結晶은 UV, NMR spectroscopy에 의하여 dihydroquercetin임이 밝혀졌다.

4. 백색 바늘상 結晶形 dihydroquercetin은 수종, 產地에 관계없이 장기간 純粹하게 보관할 수 있었다.

### 參 考 文 獻

1. Haslam, E., R. S. Thompson, D. Jacques, and (in part) R. J. N. Tanner. 1972. Plant Proanthocyanidins. Part I Introduction; the Isolation, Structure, and Distribution in nature of Plant Procyanidins. J. C. S. Perkin I, 1387-1399.
2. Hemingway, R. W., and L. Yeap-Foo. 1984. Condensed Tannins: Synthesis of the First 'Branched' Procyanidin Trimer. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 85-86.
3. Hus, F., C. Nonaka, and I. Nishioka. 1985. Tannins and Related Compunds. XXXIII Isolation and Characterization of procyanidins in *Dioscorea cirrhosa* LOUR.. Chem. Pharm. Bull. 33(8), 3293-3298.
4. Ku, J. U., J. H. Kang, and H. K. Song. 1988. Unpublished data
5. Kurth, E. F. 1956. Producing pure dihydroquercetin. U.S. Patent 2744919
6. Kurth, E. F., and F. L. Chan 1953 Extraction of Tannin and Dihydroquercetin from Douglas-fir Bark. J. Am. Leather Chem. Assoc., 48, 20-32.
7. Malterud, K. E., T. E. Bremnes, A. Faegri, T. Moe, and E. K. S. Dugstad. 1985. Flavonoids from the Wood *Salix caprea* as Inhibitors of Wood-Destroying Fungi. J. Nat. Prod. 48(4) 559-563.
8. Markham, K. R. 1983. Techniques of flavonoid identification. Acad. Press.
9. Pew, J. C. 1948. A Flavonone from Douglas-fir Heartwood. J. Am. Chem. Soc. 70, 3031-3034.
10. Porter, L. T., Z. Czochanska, L. Yeap-Foo, and R. H. Newman. 1980. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, Structural Units and Molecular Weight. J. C. S. Perkin I 2278-2286.
11. Song, H. K. 1988. Chemistry of phenolic stains on Douglas-fir sapwood. O.S.U. Ph. D. Thesis.