

# 針葉樹 樹皮의 Flavonoid에 관한 成分分析(I)<sup>\*1</sup> —소나무 樹皮의 Flavonoids—

金 薰<sup>\*2</sup>·宋映權<sup>\*3</sup>·鄭大敎<sup>\*2</sup>

## Chemical Analyses of Coniferous Flavonoids in Korea<sup>\*1</sup> —The Flavonoids of Red Pine Bark(*Pinus densiflora*)—

Hoon Kim<sup>\*2</sup>· Hong-Keun Song<sup>\*3</sup>· Dae Kyo Chung<sup>\*2</sup>

### ABSTRACT

The flavonoids from plants is very widely used as natural dye for food and medicine etc. In this study, red pine which is widespread in Korea was studied to find new chemicals which may use as raw material for the special purpose. The flavonoids of red pine bark were separated with Sephadex LH-20 and Toyo pearl HW-40F as packed materials and the structure of separated flavonoids was determined by <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. The (+) catechin which is widespread in nature and dihydroquercetin-3'-O-β-galactoside were found in red pine bark. The dihydroquercetin-3'-O-β-galactoside is newly found in this species.

### 1. 緒 論

식물에서 抽出되는 페놀성 물질 중 anthocyanin, Proanthocyanidin, Tannins 등은 식품의 天然染料,<sup>12),13)</sup> 醫藥品原料,<sup>5),6),11)</sup> 生理活性物質,<sup>7),10)</sup> 화장품<sup>9)</sup> 등의 원료로 광범위하게 응용되고 있다. 또 최근에는 新物質개발 측면에서 식물체에 함유되어 있는 성분의 특성연구가 새로운 분야로 대두되고 있는 현실이다. 이에 본 연구는 국내 주요수종인 소나무(*Pinus densiflora*) 樹皮를 효율적이고 부가가치가 높

은 이용도를 찾기 위한 시도로서 Flavonoids 성분을 有機溶媒로 추출하여 액체크로마토그라피에 의해 이들중 일부를 순수하게 分離시켜 그 構造를 同定하고자 하였다.

### 2. 材料 및 方法

#### 2.1 材料

소나무 수피는 중부 임업시험장(광릉소재) 시험림에서 天然更新된 25년생의 벌채된 원목

\*1. 接受 1991年 10月 2日 Received October 2, 1991.

\*2. 건국대학교 농과대학 College of Agriculture, Kun kuk University, Seoul 133-701, Korea.

\*3. 임업연구원 Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea.

에서 채취하여 시료로 사용하였다.

低壓液體크로마토그래피 system은 ISCO. CO.에서 공급한 WIZ RP Pump, UA5 UV detector and recorder 그리고 Foxy II fraction collector를 기본으로 Sephadex LH-20 (pharmacia CO.)와 Toyo pearl HW-40F (Toyo pearl CO.)를 充塡한 저압컬럼(3.6×60cm, pharmacia CO.)을 사용하였다.

NMR spectra는 Bruker AC-80 FT NMR spectrometer를 사용하였다.

비교 標準物質인 (+)-catechin과 (-)-epicatechin은 Sigma chemical CO.에서 공급된 것을 사용하였으며 TLC는 Silica-gel TLC의 전개용매로는 ethyl acetate : chloroform : formic acid(6 : 3 : 1, v/v)을 사용하였으며 Cellulose TLC의 1차 전개용매는 t-butanol : acetic acid : water(3 : 1 : 1, v/v)를, 2차 전개용매는 6% acetic acid를 사용하였다.

TLC의 檢出은 short wavelength UV light를 조사시켜 실시하였다.

## 2.2 試驗方法

### 2.2.1 溶媒抽出

500 g의 시료를 3ℓ 용량의 비이커에 넣고 acetone : water(7 : 3, v/v) 混合溶液 1.5ℓ를 넣은 다음 密封하여 실온에서 3일동안 放置하였다. 抽出液은 여과한 후 減壓濃縮器를 이용하여 40℃ 이하에서 아세톤을 제거하였다. 수용액은 凍結乾燥시킨 후 純粹蒸溜水(deionized distilled water)에 완전히 용해시킨 후 3倍量의 chloroform을 첨가하여 非極性 化合物을 용액 추출하였다. chloroform으로 추출하고 남은 수용액은 다시 3배의 ethyl acetate로 추출하여 ethyl acetate溶解層과 水溶解層을 분리하였다. ethyl acetate용해층은 35℃ 이하에서 감압농축기로 건조시킨 후 flavonoid분석 시료로 사용하였다.

2.2.2 Liquid chromatography에 의한 Flavonoid의 分析

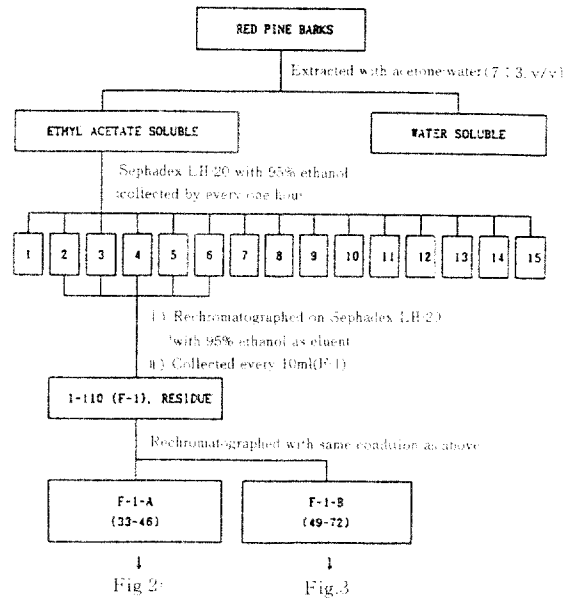


Fig. 1. Intermediate separation of dihydroquercetin-3'-O-galactoside and (+)-catechin.

2.2.1에서 준비된 ethyl acetate 溶解化合物을 최소의 methanol에 용해시켜 Sephadex LH-20 (1.5cm×40cm) 컬럼에 注入시켜 95% ethanol로 溶出시켰다. flow rate는 1ml/min으로 280nm에서 검출하였다. 溶출된 시료는 매 시간 단위로 모았다. 2-6번째 募集液(F-1)은 다시 같은 컬럼에 동일한 조건으로 chromatography시켰다. 溶출액은 매 10ml을 단위로 모았다(Fig. 1). 33-46번째(F-1-A) 모집액과 49-72번째(F-1-B) 모집액을 Toyo pearl HW-40(1.5cm×40cm)로 充塡된 컬럼을 사용하여 분석하였다. F-1-A는 95% ethanol을 eluate로 하여 280nm에서 검출하여 F-1-A-1과 F-1-A-2로 분리하였다. F-1-A-1은 다시 같은 조건에서 분석하여 F-1-A-1-A, F-1-A-1-B와 F-1-A-1-C로 분리하였다. 이중 F-1-A-1-A를 NMR로 동정하였다(Fig. 2).

F-1-B는 Toyo pearl HW-40컬럼을 사용하여 95% ethanol을 eluent로 하여 280nm에서 F-1-B-1, F-1-B-2, F-1-B-3, 그

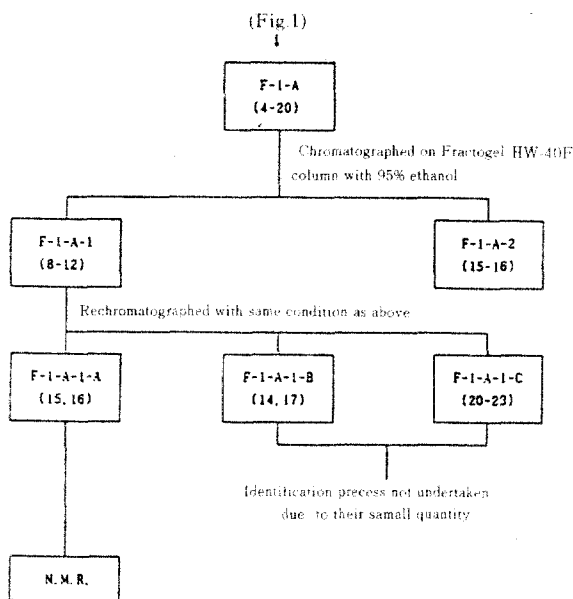


Fig. 2. Isolation of dihydroquercetin-3'-O-galactoside.

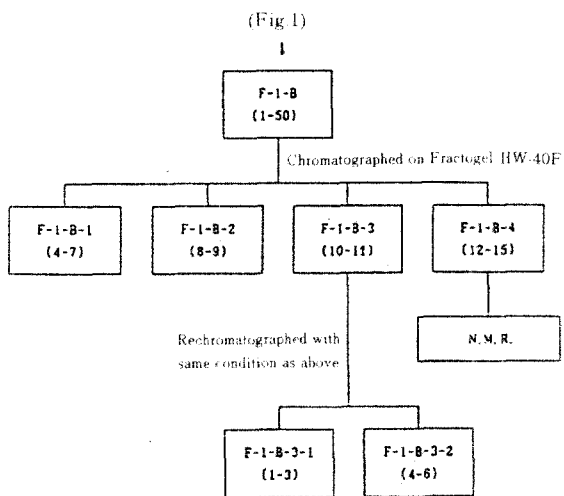


Fig. 3. Isolation of (+)-catechin.

리고 F-1-B-4로 분리하였다. 이 중 F-1-B-4는 NMR로 동정하였다(Fig. 3).

2. 2. 3 Glycoside의加水分解

동결건조된 F-1-A-1-A(2.0mg)을 25ml의 둥근 플라스크에 넣고 10ml의 2N HCl : Ethanol(1 : 1, v/v)을 첨가하여 100°C에서 60분 동안 加熱시켜 가수분해를 시켰다. 가수분해된 시료는 ethyl acetate로 aglycone을 추출

하고 남은 수용액은 NH<sub>4</sub>OH로 中和시킨 후 감압농축기로 농축시켰다. 여기서 생성된 ethyl acetate에 녹은 aglycone과 수용성물질은 TLC로 동정하였다.

3. 結果 및 考察

3.1 Liquid chromatography에 의한 分析

Sephadex LH-20나 Toyo pearl HW-40F는 많은 연구자들이 極性物質을 분리하는데 널리 사용되는 充填劑이다. 본 실험에서도 이 두 충전물을 소나무 수피내에 함유된 flavonoids를 분리하기 위하여 사용하였다. Sephadex LH-20의 경우 Figure 1에서 보듯이 95% ethanol을 移動相으로 사용하였을 때 compound의 특성별로 部分分離가 가능하였으나 순수한 compound는 얻지 못하였다. 그래서 비슷한 性狀을 갖는 충전제인 Toyo pearl HW-40F로 충전한 같은 크기의 컬럼에 같은 조건으로 F-1-A와 F-1-B를 재분리하여 본 결과, F-1-A는 F-1-A-1-A, F-1-A-1-B와 F-1-A-1-C로 분리되었고 F-1-B는 F-1-B-3-1, F-1-B-3-2 그리고 F-1-B-3-4로 순수한 compound가 분리되었다. 이 중 분석이 가능한 量이 수집된 F-1-A-1-A와 F-1-B-4를 NMR로 동정하여 그 구조를 규명하였다.

3.2 NMR spectroscopy에 의한 同定

시료 F-1-B-4와 F-1-A-1-A를 acetone-D<sub>6</sub>에 용해시킨 후 TMS를 표준물질로 첨가하여 분석하였다. 그 결과는 다음과 같다.

F-1-B-4 : Proton N.M.R.; 6.92~6.87ppm(1H, m, H-2'), 6.78~6.76ppm(2H, t, H-5', H-6'), 6.04~5.98ppm(1H, dd, H-8), 5.90~5.87ppm(1H, d, H-6), 4.62~4.52ppm(1H, d, H-2), 3.96ppm(m, H-3), 3.07~2.56ppm(m, H-4), Carbon-13 N.M.R.:

157.2ppm(C-9), 157.19ppm(C-7), 156.90ppm(C-5), 145.70ppm(C-4'), 145.64ppm(C-3'), 132.22ppm(C-1'), 120.06ppm(C-6'), 115.74ppm(C-5'), 115.26ppm(C-2'), 100.66ppm(C-10), 96.22ppm(C-6), 95.51ppm(C-8), 82.69ppm(C-2), 68.38ppm(C-3).

F-1-A-1-A : Proton N.M.R.; 7.45~7.42ppm(1H, d, H-5'), 7.25~7.12ppm(1H, dd, H-6'), 6.96~6.86ppm(1H, d, H-2'), 6.01~5.94ppm(2H, m, H-6, H-8), 6.96~6.86ppm(1H, d, H-2'), 6.01~5.94ppm(2H, m, H-6, H-8), 5.15~5.00ppm(1H, d, H-2), 4.89~4.81ppm(1H, m, H-1''), 4.72~4.57ppm(1H, d, H-3), 3.86ppm(1H, s, H-3''), 3.78ppm(1H, s, H-5''), 3.63~3.52ppm(3H, m, H-2'', H-4'', H-6''). Carbon-13 N.M.R.: 198.05ppm(C-4), 168.02ppm(C-7), 164.97ppm(C-5), 164.06ppm(C-9), 149.36ppm(C-4'), 145.90ppm(C-3'), 129.61ppm(C-1'), 124.94ppm(C-6'), 119.29ppm(C-2'), 116.63ppm(C-5'), 104.29ppm(C-1''), 101.53ppm(C-10), 97.23ppm(C-6), 96.20ppm(C-8), 84.21ppm(C-2), 77.95ppm(C-3''), 77.54ppm(C-5''), 74.66ppm(C-2''), 72.98ppm(C-3), 71.29ppm(C-4''), 62.55ppm(C-6'').

NMR spectra에서 알 수 있듯이 F-1-B-4-B는 flavonoid aglicone이나 F-1-A-1-A는 flavonoid glycoside임이 밝혀졌다.

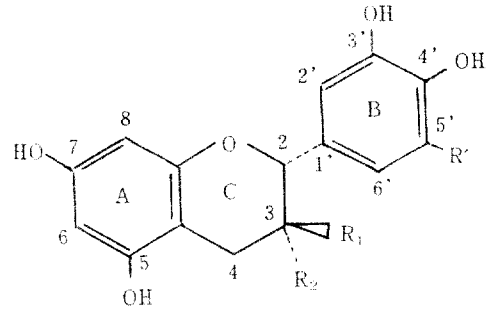
### 3.3 (+)-catechin의 同定

시료 F-1-B-4를 silica-gel TLC에 ethyl acetate : chloroform : formic acid(6 : 3 : 1, v/v)를 전개용매로 하여 (+)-catechin 표준물질과 동시에 전개하였을 때 같은 Rf값을 보였다. 또 cellulose TLC를 이용하여 1차 전개용매로는 t-butanol : acetic acid : water(3 : 1 :

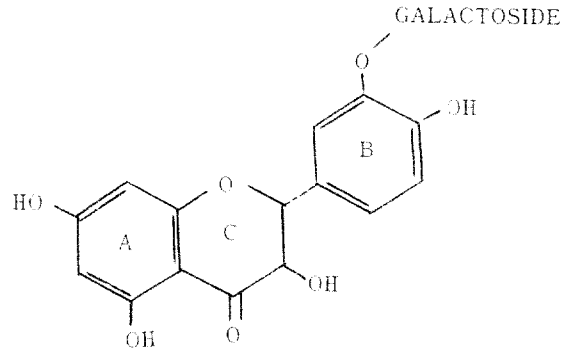
Table 1. Rf value of F-1-B-4

	(+)-catechin	(-)-epicatechin	F-1-B-4
TBA	0.52	0.69	0.49
6% acetic acid	0.56	0.50	0.54

\*TBA : t-butanol : acetic acid : water(3 : 1 : 1, v/v)



R'=R<sub>2</sub>=H, R<sub>1</sub>=OH; (+)-catechin



Dihydroquercetin-3'-O-galactoside

1, v/v)로, 2차 전개용매로는 6% acetic acid를 사용하여 분석한 결과는 Table.1과 같다.

이 compound를 더 확실하게 確認하기 위하여 (+)-catechin과 (-)-epicatechin 표준물질의 <sup>1</sup>H-와 <sup>13</sup>C-NMR spectra를 시료 F-1-B-4의 NMR spectrum과 比較分析하였다. (Fig. 4, 5) 그 결과로 F-1-B-4는 (+)-catechin과 동일한 chemical shifts를 보여주고있고 또 이 결과들은 Yeap-foo등<sup>16)</sup>의 연구결과와 일치하였다. (<sup>13</sup>C-NMRmH C-4의 peak는 acetone-D<sub>6</sub>의 peak와 같이 나왔다.)

### 3.4 Dihydroquercetin-3'-O-galactoside의 同定

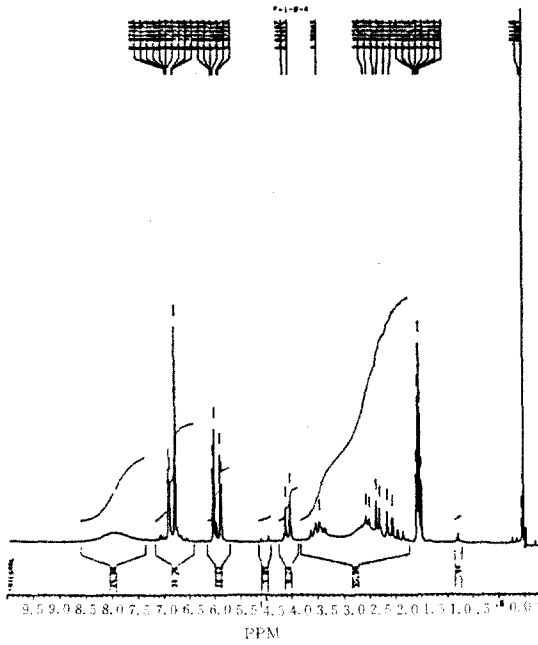


Fig.4. 1H-N.M.R. spectrum of the (+)-catechin in acetone-d<sub>6</sub>.

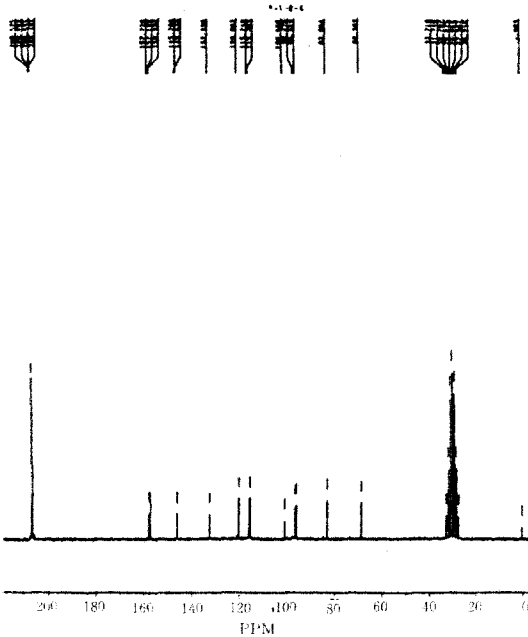


Fig.5. 13C-N.M.R. spectrum of the (+)-catechin in acetone-d<sub>6</sub>.

aglycone의 구조와 glycoside의 구조를 규명하기 위하여 2.2.3에서 記述한 방법대로 F-1-A-1-A를 가수분해하여 aglycone과 glyco-

side를 동정하였다.

중화된 수용성 부분을 cellulose TLC에 ethyl acetate : pyridine : water(8 : 2 : 1, v/v)를 전개용매로 하여 標準糖인 glucose, galactose, mannose, xylose와 arabinose를 동시에 전개시켰다. 전개시킨 TLC를 指示藥(1.66 g의 phthalic acid를 0.93 g의 aniline에 용해한 후 100ml의 water-saturated n-butanol에 용해시킨 액)으로 검출하였다. 그 결과로 glycoside는 galactose 표준물질과 동일한 Rf값을 보였다. 가수분해 후 ethyl acetate로 용출시킨 part는 silica gel TLC로 확인한 결과 dihydroquercetin임이 밝혀졌다. 이를 근거로 동결건조된 F-1-A-1-A를 acetone-d<sub>6</sub>에 용해시켜 NMR(Fig.6,7)로 분석한 결과는 앞에 기술한 바와 같다.

F-1-A-1-A의 1H-NMR spectrum에서 B ring의 signal이 dihydroquercetin의 B ring signal과 다르게 나타났다. 이는 glycoside가 A나 C ring에 결합되지 않고 B ring의 어느 부위

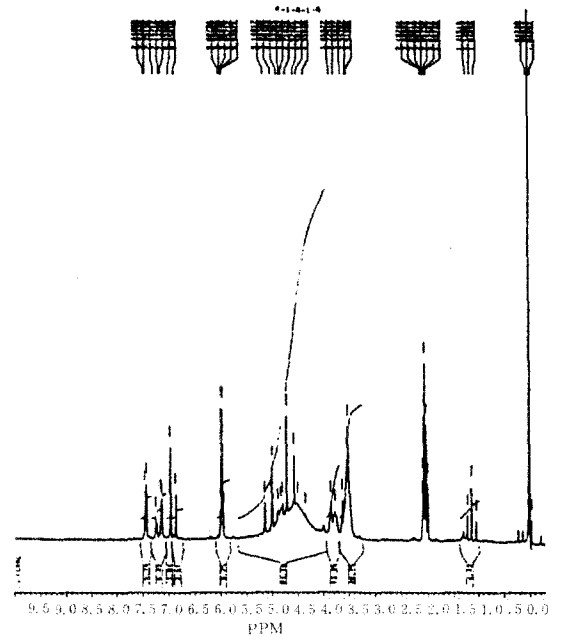


Fig.6. 1H-N.M.R. spectrum of the dihydroquercetin-3-O-galactoside in acetone-d<sub>6</sub>.

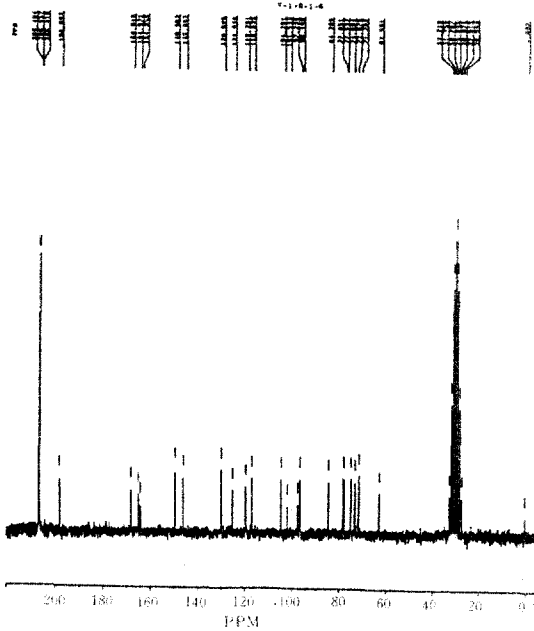


Fig.7.  $^{13}\text{C}$ -N.M.R. spectrum of the dihydroquercetin-3'-O-galactoside in acetone- $d_6$ .

에 결합되어 있다는 것을 의미한다.  $^{13}\text{C}$ -NMR data는 unknown flavonoid의 oxygenation pattern을 결정하는데 유용한 방법이다. 그리고 이것은 flavonoid에 결합되어 있는 糖成分의 구성과 당이 결합된 위치를 밝히는데 가장 좋은 방법이다.<sup>41</sup> Tory등<sup>42</sup>에 의하면 phenolic compound에 glycoside가 결합되면 그 결합된 탄소의 共鳴은 upfield shift가 일어난다고 하였으며 또 flavonoid의 -OH기에 O-glycoside가 치환되면 치환된 부위에 인접한 탄소의 signal이 1.4~2.0ppm 정도 downfield된다고 하였다. 이 중 ortho 위치의 탄소는 para위치의 탄소보다 downfield되는 정도가 약간 적다고 하였다.<sup>43</sup> 이와같은 이론으로 볼 때 dihydroquercetin의 B ring과 이 flavonoid glycoside B ring의 signal을 비교분석하므로써 치환위치를 확인하였다.

C-3'와 ortho위치인 C-2'와 C-4'의 signal은 dihydroquercetin의 signal보다 약 3ppm 정도 downfield 되었고 para 위치인 C-6' sig-

nal은 이보다 좀더 많은 4.1ppm 정도 downfield 되었다.

이상의 결과로 F-1-A-1-A인 flavonoid glycoside는 dihydroquercetin-3'-O-glycoside로 判明되었으나 TLC만으로 확인된 galactose unit를 확정짓기 위하여  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 분석하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR data는 당의 ring size와 anomeric configuration을 결정하는데 응용할 수 있고,<sup>44,45</sup> 또  $\beta$ -anomer의 C-1의 signal은 100~102ppm에 나타나는 반면  $\alpha$ -anomer의 signal은 약 95ppm 정도에서 나타난다고 하였다.<sup>46</sup> F-1-A-1-A의 -O-glycosilation은 C-1'의 signal이 104.29ppm에 나타나  $\beta$ -anomer로 결합되어 있는 것으로 사료된다. 또 glucose와 galactose 표준물질의 NMR data를 얻은 후 flavonoid glycoside의 data와 비교한 결과는 다음 Table.2와 같다.

Table 2. Chemical shifts of the glycoside unit

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Glucose	98.67	74.21	78.53	72.40	76.92	63.57
Galactose	99.23	74.70	77.90	71.60	75.59	63.77
Glycoside	104.29	74.68	77.95	71.29	77.54	62.55

galactose와 glucose는 C-4의 -OH기가 axial과 equatorial로 되어있다는 것만 달라 그 -OH기의 영향으로 C-3, C-4, C-5의 chemical shift가 달라진다. glycoside의 C-1위치에 결합된 -OH의 proton 대신에 aglycone이 치환됨으로서 C-5와 C-6에 영향을 미친다. 그러므로써 C-5는 C-4의 -OH기와 C-1의 -O-aglycone의 영향에 의해서 약 2ppm 정도 downfield되고 C-6는 C-1의 영향에 의해서 약 1ppm 정도 upfield되었다. 이는 Markham 등의<sup>47</sup> 결과와 유사한 chemical shift를 보여준다.

이상의 분석 결과를 종합하여 보면 F-1-A-1-A는 dihydroquercetin-3'- $\beta$ -O-galactoside임이 확인되었다. 이 화합물은 소나무 무수피에서 처음 발견된 화합물로서 앞으로 국내수종들의 성분내에 대한 충분한 연구가 수행되

어아 함을 시사하고 있다.

### 參 考 文 獻

1. Bock, K., and C. Pedersen, 1974 A study of carbon 13-H coupling constants in hexopyranoses. J. C. S. Perkin II, 293~297
2. Bock, K., and C. Pedersen, 1975 A study of carbon 13-H coupling constants in pentapyranoses and some of their derivatives. Acta Chem. Scand. B29, 258~264
3. Bock, K., I. Lundt and C. Pedersen, 1973 Assignment of anomeric structure to carbohydrates through geminal carbon 13-H coupling constants. Tetrahedron Lett. 13, 1037~1040
4. Brewster, K., J. M. Harrison, and T. D. Inch, 1979 Synthesis of aryl  $\beta$ -D-glucopyranosides and aryl  $\beta$ -D-glucopyranosiduronic acids. Tetrahedron Lett. 52, 5051~5054
5. Fukami, M., Z. Hattori, J. Okonoyi, 1978 Detoxifying effects of persimmon fruit tannin on snake venom and bacterial toxins. SanKyo Kenkyusho Nempo 30, 104~111
6. Inokuchi, J., H. Okabe, T. Yamauchi, A. Nagamatsyu, G. Nonaka, I. Nishioka, 1985 Inhibitors of angio tension-coverting enzyme in crude drugs II. Chem. Pharm. Bull. 33, 264~269
7. Lodhi M. A. K., K. T. Killingbeck, 1980 Allelopathic inhibition of nitrification and nitrifying bacteria in a ponderosa pine (*Pinus ponderosa* Dougl.). Community. Am. J. Bot. 67, 1425~1429
8. Markham, K. R. 1983 Techniques of flavonoid identification. Acad. Press. 81
9. Park, S. N., S. W. Choi, Y. C. Boo, C. K. Kim, and T. Y. Lee, 1990 Korean J. Ginseng Sci 14(2) 191
10. Pierpoint, W. S. 1986 In Plant flavonoids in biology and medicin. eds. V. Cody, E. Middleton and J. B. Harbone, Alan Liss, N. Y. 125~140
11. Rewerski, W., T. Piechocki, M. Rylski, and S. Lewak 1971 Pharmacological properties of oligomeric procyanidin *ex Crataegus oxyacantha* (hawthorn). araneim-Forsch 21, 886
12. Ribereau-Gayon, P. 1982 In Anthocyanins as Food Colors. ed. P. Markakis, Academic press, N.Y. 209~244
13. Saito, N., K. Abe, T. Honda, C.F. Timberlake, and P. Bridle 1985 Phytochemistry 24, 1583
14. Tori, K., S. Seo, Y. Yoshimura, H. Arita, and Y. Tomita 1977 Glycosidation shifts in carbon-13 NMR spectroscopy : carbon-13 signal shifts from aglycone and glucose to glucoside. Tetrahedron Lett. 179~182
15. Wenkert, E. and H. E. Gottlieb 1977 Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. Phytochem. 16, 1811~1816
16. Yeap-Foo, L. and J. J. Karchesy, 1989 Procyanidin dimer and trimers from Douglas-fir inner bark. Oregon state univ. 0437R, 1~18