

물푸레나무 수피의 Oleuropein과 Ligstroside^{*1}

李尙克^{*2} · 咸演鎬^{*2} · 裴映壽^{*2}

Oleuropein and Ligstroside from the bark of *Fraxinus rhynchophylla*^{*1}

Sang-Keug Lee^{*2}, Yeon-Ho Ham^{*2}, Young-Soo Bae^{*2}

ABSTRACT

The bark of *Fraxinus rhynchophylla*, one of ash trees grown in domestic, was collected, extracted with acetone-H₂O(7:3, v/v) and freeze dried to give 50g of ethylacetate soluble powder. A portion of the freeze dried powder was chromatographed on a Sephadex LH-20 and a TSK 40F column using a series of aqueous methanol and ethanol-hexane mixture as eluents. The extractives contained a large amount of coumarin derivatives in addition to a small amount of ester compounds such as ligstroside and oleuropein which have not been isolated from this tree species yet. Some spectrometric analyses such as NMR and FAB-MS including TLC were performed to identify the structures of the isolated ester compounds.

Keyword : *Fraxinus rhynchophylla*, bark, extractives, ligstroside, oleuropein, ester compounds.

1. 서론

물푸레나무(*Fraxinus rhynchophylla* Hance)는 물푸레나무과에 속하는 낙엽 활엽수로서 우리나라 전국의 산 기슭이나 중턱의 골짜기에서 들메나무, 쇠물푸레나무와 함께 자생하며 목재는 매우 단단하고 쉽게 부러지지 않기 때문에 높은 강도를 요하는 소규모 농기구 등의 부품으로 많이 이용되어 왔다(김, 1995 ; 김, 1996 ; 임, 1994).

일반적으로 수고 8-15m 까지 자라며 수피는 회갈색 또는 흑갈색에 흰색 반점이 있으므로 백침목, 백심목이라고 부르기도 하고, 때로는 어릴 때 푸른색의 수피를 갖기 때문에 청피목 또는 진피수라고도 한다.(김, 1995)

물푸레나무의 껍질은 진피라고도 부르며 성질은 차고 맛은 쓰고 독이 없으며 간의 오랜 열기로 두눈에 피가 지고 부으면서 아픈것과 바람을 맞으면 눈물이 계속 흐르는 것을 낮게하며, 눈에 생기는 푸른 예막,

*1 접수 1998년 8월 20일 Received Aug. 20, 1998

*2 강원대학교 산림과학대학 College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

흰 약막을 없애고 열리(熱痢)와 부인의 대하, 어린이의 열을 겸한 간질을 낮게 한다(허, 1994 ; 중, 1994).

또한 입덧에도 효과가 있으며 특히 소염, 수렴, 해열약으로 설사, 이질, 결막염, 풍안누출과 눈의 백탁 등과 여성의 붓증이나 대하, 냉증과 아이의 경기에도 특효약으로 쓰였고, 특히 중국에서는 눈병의 요약으로 전용되었고 강장제로도 두루 알려지기도 했다고 하며 천연염료의 원료로도 이용되어 왔다.

본 연구는 우리나라의 산림에 널리 분포하고 있으나 특별한 용도를 개발하지 못하여 이용도가 미약한 물푸레나무를 보다 실용적인 고부가가치의 자원으로 활용하기 위한 방법을 모색하기 위하여 수행되었으며 물푸레나무 수피에 함유되어 있는 추출성분을 분리하고 정확한 구조를 규명함으로써 약리작용을 가지는 화합물들에 대한 화학적인 기초자료를 얻고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

1996년 4월 강원대학교 연습림에서 자생하는 생장이 양호하며 수고가 12m, 흉고직경이 15cm인 30년 생 물푸레나무를 벌채하여 즉시 박피하였다. 실험실에서 약 2주간 건조한 후 분쇄기를 사용하여 수피 분말로 제조하고 추출용 시료로 사용하였다.

2.2 추출물의 조제

물푸레나무 수피 분말 1kg을 10ℓ의 유리용기에 넣은 후에 아세톤-물(7:3, v/v)의 혼합용매를 약 7ℓ 가량 부어서 잘 섞이도록 흔들어 준 다음 마개를 막고 실험실에서 약 3일간 추출하였다. 이 과정을 3회 반복 추출하였으며 추출액은 감압 농축기(EYELA N-1 SERIES)로 농축하였다.

농축된 추출물에는 다량의 결정성 화합물이 침전되었고 침전된 화합물은 분리하여 아세톤을 사용한 재결정법으로 정제하였다. 결정성 화합물을 제외한 나머지 추출물은 분획할때기 상에서 먼저 클로로포름용성 화합물을 분리하였고 다음에 에틸아세테이트 용성 및 수용성 부분으로 분리하고 농축하여 분말상으로 조제하였다.

동결건조된 분말은 각각 클로로포름용성 화합물 8g, 에틸아세테이트용성 화합물 50g, 수용성 화합물 150g 이었으며 본 실험에서는 이들중 에틸아세테이트

용성 화합물을 사용하였다.

2.3 칼럼 크로마토그래피

에틸아세테이트 혼합물로부터 순수한 단일 화합물을 분리하기 위하여 칼럼 크로마토그래피 분석을 실시하였으며 사용된 칼럼은 여러 종류의 직경과 길이를 가지는 유리칼럼을 사용하였다. 충전물질로는 Sephadex LH-20과 TSK 40F를 사용하였고 용리용매로는 에탄올-헥산 혼합액과 메탄올 수용액을 사용하였다. 칼럼으로부터 떨어지는 용출액은 fraction collector(Gilson FC 204)를 이용하여 순차적으로 시험관에 받았다. 분리물질의 정제순도 확인은 셀룰로오스 박층 크로마토그래피(TLC)를 이용하여 확인하였다.

칼럼 크로마토그래피 분석을 위하여 에틸아세테이트용성 화합물 20g을 유리칼럼에 주입하고 용리용매로는 에탄올-헥산(5:1, v/v)을 사용하여 1차적인 분리를 실시하여 3개의 fraction으로 분리하였으며 칼럼상에서 분리되지 않는 결정부분은 따로 모아두었다. 각각의 fraction은 BE로 명명하였고, 농축후 동결건조된 양은 BE-1 11.13g, BE-2 0.79g 및 BE-3 0.67g이었으며 결정성 화합물의 양은 1.28g으로 아세톤-물 추출물의 농축시 생긴 결정과 동일하였다.

이후 BE-1을 메탄올-물(2:1, v/v)로 다시 칼럼 크로마토그래피를 수행하였으며 3개의 fraction으로 분리하여 BE-11(1.33g), BE-12(7.5g), BE-13(0.39g)을 얻었다.

BE-12를 메탄올-물(1:2 및 1:4, v/v)을 사용하여 연속적으로 재크로마토그래피를 실시하여 순수한 화합물 I(40mg)을 얻을 수 있었으며 BE-12를 먼저 메탄올-물(1:2 및 1:3, v/v)로 분리를 한 후 다시 에탄올-헥산(4:1, v/v)으로 재크로마토그래피를 실시하여 1g의 순수한 화합물 II를 얻을 수 있었다.

2.4 화합물의 구조 결정

분리된 화합물의 순도를 확인하기 위하여 셀룰로오스 박층 크로마토그래피(TLC)를 사용하였으며 전개용매의 이동거리에 대한 화합물의 이동거리로 화학적 이동값 R_f 를 구하였다.

전개용매로 6% 초산을 solvent A로 하였으며 t-butanol-초산-물(3:1:1, v/v/v)을 solvent B로 하였다. 또한 UV 램프(ENF-240C, 254nm 및 365nm) 하에서 전개용매에 전개시킨 TLC 판을 관찰하여 화합물의 존재를 확인하였으며 발색반응 관찰을

위하여 vanillin-HCl-E+OH 용액을 발색제로 사용하였다.

단리된 화합물들의 구조결정을 위하여 Bruker 400MHz NMR spectrometer를 사용하여 먼저 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 측정하였고 보다 정확한 분석을 위하여 COSY, HETCOR 및 DEPT등의 2D-NMR을 측정하였으며 분석용매로는 methanol-d₄를 사용하였다. 분리된 화합물의 분자량 분석은 기초과학지원 연구소의 VG70-VSEQ Mass Spectrometer를 이용하여 FAB-MS분석을 실시하였다.

2.4.1 화합물 I

R_f : 0.80(solvent A) 및 0.75(solvent B)

FAB-MS : [M+H]⁺ m/z 525

¹H-NMR(δ, MeOH-d₄) : 7.4(1H, s, H-3), 6.96(2H, d, J=8.0Hz, H-2" and H-6"), 6.63(2H, d, J=8.36Hz, H-3" and H-5"), 5.98(1H, q, J=7.03Hz, H-8), 5.8(1H, s, H-1), 4.12(2H, dt, H_a-α), 4.0(2H, dt, H_b-α), 3.87(1H, dd, J=4.25Hz and J=4.27Hz, H-5), 3.62(3H, s, COOMe), 2.73(2H, t, J=6.91Hz, H-β), 2.61(2H, dd, J=4.36Hz and J=4.36Hz, H_a-6), 2.34(2H, dd, J=9.30Hz and J=9.29Hz, H_b-6), 1.55(3H, d, Me-10), 4.72(1H, d, J=7.79Hz, H-1'), 3.32(1H, d, J=8.52Hz, H-2), 3.56~3.60(2H, m, H-3', 4'), 3.24~3.26(1H, m, H-5'), 3.80(1H, br d, J=11.60Hz, H-6').

¹³C-NMR(ppm, MeOH-d₄) : 95.32(C-1), 155.44(C-3), 109.58(C-4), 32.08(C-5), 41.50(C-6), 173.47(C-7), 125.15(C-8), 130.28(C-9), 13.87(C-10), 168.90(C-11), 101.04(C-1'), 75.00(C-2'), 78.69(C-3'), 71.71(C-4'), 78.15(C-5'), 62.99(C-6'), 130.64(C-1"), 131.30(C-2"), 116.54(C-3"), 157.32(C-4"), 116.54(C-5"), 131.30(C-6"), 67.20(C-α), 35.42(C-β), 52.22(C-OMe).

2.4.2 화합물 II

R_f : 0.76(solvent A) 및 0.75(solvent B)

FAB-MS : [M+H]⁺ m/z 541

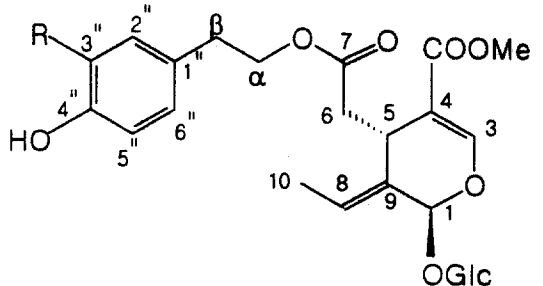
¹H-NMR(δ, MeOH-d₄) : 7.51(1H, s, H-3), 7.05(1H, d, J=8.45Hz, H-5"), 6.75(1H, d, J=1.25Hz, H-2"), 6.66(1H, dd, J=4.69Hz and

J=1.93Hz, H-6"), 6.07(1H, q, J=7.12Hz, H-8), 5.91(1H, s, H-1), 4.20(2H, dt, H_a-α), 4.10(2H, dt, H_b-α), 3.96(1H, dd, J=4.26Hz and J=2.26Hz, H-5), 3.7(3H, s, COOMe), 2.81(2H, t, J=6.97Hz H-β), 2.69(2H, dd, J=4.96Hz and J=4.59Hz, H_a-6), 2.43(2H, dd, J=2.10Hz and J=2.08Hz, H_b-6), 1.64(3H, d, Me-10), 4.80(1H, d, J=7.82Hz, H-1'), 3.40(1H, d, J=8.89Hz H-2'), 3.64~3.69(2H, m, H-3', 4'), 3.29~3.33(1H, m, H-5'), 3.88(1H, dd, J=7.53Hz and J=1.55Hz, H-6').

¹³C-NMR(ppm, MeOH-d₄) : 95.40(C-1), 155.43(C-3), 109.64(C-4), 32.08(C-5), 41.54(C-6), 173.49(C-7), 125.15(C-8), 130.31(C-9), 13.84(C-10), 168.92(C-11), 101.10(C-1'), 75.02(C-2'), 78.68(C-3'), 71.72(C-4'), 78.19(C-5'), 62.99(C-6'), 131.15(C-1"), 116.71(C-2"), 145.19(C-3"), 146.50(C-4"), 117.33(C-5"), 121.59(C-6"), 67.18(C-α), 35.66(C-β), 52.21(C-OMe).

3. 결과 및 고찰

물푸레나무 수피의 에틸아세테이트용성 부분 20g을 Sephadex LH-20과 TSK 40F를 사용하여 연속적인 칼럼 크로마토그래피를 실시하였으며 용리용매로는 메탄올 수용액, 에탄올-헥산 혼합액을 사용하였다. 이 과정에서 두 개의 화합물이 단리되었으며 이들 화합물은 2D-TLC를 이용하여 단일 물질의 여부를 확인한 후 NMR 및 FAB-MS분석을 통하여 정확한 구조를 결정하였다.



I Ligstroside R=H
II Oleuropein R=OH

3.1 화합물 I

이 화합물은 UV상에서 갈색의 단일 spot를 나타내었으며 vanillin HCl-Et+OH 분무용액에 반응하지 않았다. R_f 는 0.80(solvent A)와 0.75(solvent B)로서 매우 높은 화학적 이동값을 보였다. FAB-MS를 이용한 분자량 분석은 $[M+H]^+$ 값이 m/z 525였다. 이 화합물의 분자량은 524로서 양이온 FAB-MS분석을 실시하였으므로 m/z 525의 분자량 값은 제시된 구조와 일치하였다.

1H -NMR에서 H-1과 H-3의 signal은 인접한 수소의 영향이 없으므로 각각 δ 5.8과 δ 7.4에서 단일 peak를 나타내고 있다. H-5는 두 개의 H-6와의 coupling으로 δ 3.87에서 double doublet peak를 보이고 있으며 H-6도 입체화학적 영향에 의하여 H-5와의 coupling으로 δ 2.61과 δ 2.34에서 두 개의 double doublet signal들을 나타내고 있다. 한편 H-8은 H-10의 methyl기 수소와의 coupling으로 δ 5.98에서 quartet signal을 주고 있다. H-10의 methyl기는 δ 1.55에서 doublet signal을 주고 있으며 ester기의 methyl기는 δ 3.62에서 단일 peak를 주고 있다. 한편 H- α 의 두 개의 수소는 입체화학적 차이에 기인하여 H- β 의 수소와의 coupling으로 δ 4.0 및 4.12에서 두개의 double triplet signal을 주고 있으며 H- β 는 δ 2.73에서 하나의 triplet signal을 보이고 있다. 방향족 phenol환은 H-2"과 H-6" 및 H-3"과 H-5"등 두 개의 대칭수소를 포함하고 있으며 이들은 각각 δ 6.96과 δ 6.63에서 ortho couple된 강한 doublet signal을 나타내고 있다(Inoue *et al.*, 1982; Sutarjadi *et al.*, 1978). β -D-(+)-glucose는 δ 3.22~3.81사이에서 특징적인 1H -NMR signal들을 주고 있으며 δ 4.72에서 doublet H-1' signal을 주고 있다(Harborne, 1994).

이상과 같은 1H -NMR spectrum은 Damtoft 등에 의해 보고된 Ligstroside와 일치하고 있다.

^{13}C -NMR도 1H -NMR과 동일한 화합물의 spectrum을 나타내었다. 먼저 methine탄소인 C-1은 95.32ppm에서 signal을 보이고 있으며 2중 결합으로 연결된 C-3 및 C-4는 155.44와 109.58ppm에서 signal을 나타내었다. C-5 및 C-6은 32.08과 41.50ppm에서 두 개의 peak를 주었다. carbonyl탄소인 C-7은 173.47ppm에서 특징적인 signal을 주었으며 또다른 2중 결합을 포함하고 있는 C-8과 C-9는 각각 125.15 및 130.28에서 두 개의 peak를 보이고 있으며 C-8과 결합하고 있는 methyl기의 C-10은

13.87ppm에서 하나의 signal을 보이고 있다. ester기를 형성하고 있는 또다른 carbonyl탄소인 C-11은 168.90ppm에서 signal을 주고 있으며 같이 결합하고 있는 methoxyl탄소는 52.22ppm에서 peak를 보이고 있다. 한편 C- α 및 C- β 인 두 개의 methylene탄소는 각각 67.20 및 35.42ppm에서 signal을 주고 있다.

또한 방향족 페놀환은 C-2"과 C-6" 및 C-3"과 C-5"인 두 개의 대칭탄소를 포함하고 있으며 이들은 각각 131.30 및 116.54ppm에서 특징적인 signal들을 보이고 있으며 수산기를 포함하고 있는 C-4"은 157.32ppm에서 peak를 나타내고 있으며 quaternary탄소인 C-1"은 130.64ppm에서 signal을 주고 있다(Agrawal, 1989; Harborne, 1994; Inoue *et al.*, 1982; Sutarjadi *et al.*, 1978).

β -D-(+)-glucose의 signal들은 101.04ppm에서 C-1'의 signal을 보이고 있으며 나머지 탄소들은 62.99~78.69ppm에서 5개의 특징적인 glucose의 signal을 보이고 있다.

이와 같은 ^{13}C -NMR data는 1H -NMR spectrum과 마찬가지로 Damtoft 등에 의해 구조물푸레나무 (*Fraxinus excelsior*)의 추출물에서 분리된 ligstroside의 NMR data와 일치하고 있다.

3.2 화합물 II

화합물 II도 UV상에서 갈색의 단일 화합물임을 확인할 수 있었으며 vanillin-HCl-Et+OH 발색제에 노란색으로 반응하였다. R_f 는 0.76(solvent A)과 0.75(solvent B)로서 화합물 I과 유사한 화학적 이동 값을 나타내었다. FAB-MS에 의한 분자량 분석은 $[M+H]^+$ 값이 541로서 양이온 FAB-MS에 의한 분자량 값은 이 화합물의 원래 분자량에 수소원자 한 개가 포함된 분자량 값과 일치하였다.

1H -NMR에서는 화합물 I과 동일한 spectrum을 보이고 있으나 단지 방향족 페놀환에 두 개의 수산기가 인접하여 치환된 catechol형태의 방향족 고리를 지니고 있음을 나타내었다. 즉 H-2"은 H-6"과의 meta coupling에 의하여 δ 6.75에서 doublet signal을 주고 있으며 H-5"역시 H-6"과의 ortho coupling으로 δ 7.05에서 doublet를 나타내고 있다. 또한 H-6"은 H-5" 및 H-2"과의 ortho 및 meta coupling으로 δ 6.66에서 double doublet signal을 나타내었다(Inouye *et al.*, 1975; Inoue *et al.*, 1982).

^{13}C -NMR에서도 1H -NMR spectrum과 마찬가지로 화합물 I과 동일한 탄소 signal들을 보이고 있으

나 다만 방향족 페놀환의 탄소 spectrum이 catechol 형태의 그것과 일치함을 나타내었다. 즉 C-1"은 131.15ppm에서 quaternary탄소의 signal을 보이고 있으나 C-2"은 116.71ppm에서 signal을 나타내었으며 수산기를 포함하고 있는 두 개의 탄소인 C-3" 및 C-4"은 각각 145.19 및 140.50ppm에서 특징적인 peak를 주었다. 또한 C-5" 및 C-6"도 117.33 및 121.59ppm에서 두 개의 signal을 추어 화합물 I에 존재하고 있던 두 개의 대칭탄소가 존재하지 않고 있음을 보이고 있다(Agrawal, 1989; Harborne, 1994; Inouye et al., 1975; Inoue et al., 1982). 따라서 이 화합물도 Damtoft등에 의해 보고된 바 있는 oleuropein의 NMR data와 일치하고 있었다.

4. 결 론

물푸레나무 수피 추출 혼합물 중 에틸아세테이트용성 추출성분을 분리하기 위하여 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 이 추출성분의 대부분은 쿠마린 유도체로 구성되어 있었으나 ligstroside 및 oleuropein과 같은 소량의 에스테르형 화합물도 포함되어 있었다. 이들 에스테르형 화합물은 이미 *Fraxinus excelsior*, *Fraxinus japonica* 및 *Fraxinus griffithi* 등의 수종에서 분리되어 보고된 바 있으나 *Fraxinus rhynchophylla*에서는 본 연구를 통하여 처음으로 분리되었다. 또한 쿠마린류 화합물과는 달리 이러한 종류의 화합물에 대한 생리활성 및 약리효과에 대한 연구도 아직 미흡한 실정으로서 국내에 자생하고 있는 활엽수 자원의 효율적인 이용을 위해 앞으로 이들에 관한 연구도 병행되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. 김태정. 1995. 한국의 산야초. 국일문화사. pp. 296~297
2. 김태욱. 1996. 한국의 수목. 교학사. pp. 536~538
3. 임업연구원. 1994. 한국산 주요수종의 성질과 용도. pp. 110~113
4. 중국본초도감. 1994. 여강출판사. vol. 3. p. 215
5. 허준. 1994. 동의보감. 여강출판사. vol. 5. pp.2814~2815
6. Agrawal, P. K. 1989. Carbon ^{13}C -NMR of flavonoids. Elsevier Science Publishing Company INC : 96~123
7. Damtoft, S., H. Franzyk., S. R. Jensen. 1992. Excelsioside, a Secoiridoid Glucoside from *Fraxinus Excelsior*. *Phytochemistry* 31(12) : 4197~4201
8. Harborne, J. B. 1994. The Flavonoids. Chapman and Hall LTD : 441~497
9. Inouye, H., Nishioka, T. and Kaniwa, M. 1975. Glucosides of *Fraxinus japonica*. *Phytochemistry* 14 : 304
10. Inoue, K., Nishioka, T., Tanahashi, T. and Inouye, H. 1982. Three Secoiridoid Glucosides from *Ligustrum japonicum*. *Phytochemistry* 21(9) : 2305~2311
11. Sutarjadi, Malingre, Th. M. and Vav Os, F. L. 1978. Iridoid and Phenolic Glycosides of *Fraxinus griffithi*. *Phytochemistry* 17 : 564