

일본 잎갈나무재로부터 Diterpene의 단리*¹

황병호² · 趙菊蘭²

Isolation of Diterpene from *Larix leptolepis* Gordon^{*1}

Byung-Ho Hwang^{*2} · Julian Zhao^{*2}

ABSTRACT

To elucidate chemical structure of the wood extractive, wood meal of *Larix leptolepis* Gordon was extracted with 95% ethanol for 72 hours. The extract was fractionated with organic solvents such as *n*-hexane, chloroform, diethyl ether, and ethyl acetate.

From the hexane soluble fraction of the extractives, a new diterpene compound was isolated and identified as 6-acetoxymanol or 13-hydroxy-8(17), 14-labdienyl-6-acetate by IR, ¹H(¹³C)-NMR and Mass spectrometry.

Keywords : *Larix leptolepis* Gordon, wood extractives, diterpene, manool acetate, labdane

1. 서론

최근 목재 추출성분에 관한 연구로서는 생리활성물질의 탐색연구를 비롯하여 수목화학분류학적 견지에서 연구, 생합성, 심재형성 및 심재색소에 관련된 연구 그리고 biomass로서의 개발연구 등이 활발히 진행되고 있는 추세이다. 이들 성분들은 내후성, 내의성 등 주변 생물과의 관계에서 볼 수 있는 생리활성 성분으로서 뿐만 아니라 사람의 건강에 독성 영향을 주고, 합판제조시의 접착장애나 도장장애를 일으키기도 하며, 펄프제조시 수지장애 등으로 산업활동에 지

장을 주기도 한다. 반면에 일부 수종의 추출성분은 향료, 의약품, 유포제, 염료 등으로 널리 이용되기도 한다.

본 연구에서의 시료목으로 선정한 일본 잎갈나무 (*Larix leptolepis* Gordon)는 우리 나라에서의 조림 면적이 상당하며, 아직은 간벌재만이 생산되므로 년 평균 생산량은 상당할 것으로 예상되고 있다. 현재 이 수종의 용도 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

한편, 지금까지의 일본 잎갈나무 추출물에 관한 연구동향으로는 Miki와 Sasaya(1979)가 잎갈나무 내

*1 접수 1998년 6월 24일 Received June, 24, 1998

본 논문은 한국목재공학회, 97추계학술발표회(서울)에 발표한 것임.

*2 강원대학교 산림과학대학 임산공학과 Dept. of Wood Science & Technology, College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

피의 ethanol 추출물로부터 4종의 glycerol 유도체와 4종의 dihydrobenzofuran 유도체 그리고 3종의 phenylpropanol 배당체를 단리 하였다. 또한 Takehara와 Sasaya(1979)는 잎갈나무 변재의 ethanol 추출물로부터 lariciresinol, seco-isolariciresinol, pinoresinol 등 3종의 lignan과 3종의 dihydrobenzofuran 유도체를 단리 동정하였다. 그리고 Miki(1979, 1980)는 잎갈나무 심재의 ethanol추출물에서 3종의 새로운 lignan을 포함하는 많은 lignan을 단리 하였다.

우리 나라에서도 이 수종의 추출성분을 계통적으로 분리 및 단리하여 추출성분의 화학구조를 밝혀 학문적 기초정보의 축적과 항균성 효과를 검색할 목적으로 일본 잎갈나무 목분을 ethanol로 추출하고 각종 유기용매를 사용하는 column chromatography를 행하여 그 성분을 분리, 단리한 후 용점측정, IR, UV, $^1\text{H}(^{13}\text{C})\text{-NMR}$ 그리고 Mass스펙트럼에 의해서 그 화학구조를 결정한다. 즉, 황 등(1986)이 taxifolin과 다량의 $\beta\text{-sitosterol}$ 을 단리 하였고, 최근에는 배 등(1997)이 flavonoid 배당체를 다수 단리하였다. 본 연구는 동 수종의 계속적인 실험결과로서 새로운 diterpene추출물을 단리하여 그 구조를 결정하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

공시재는 강원대학교 연습림의 인공조림지에서 1986년 5월 벌채하였으며 수령 30년, 흉고직경 25cm, 수고 15m인 것을 사용하였고, 박피후 40mesh로 제조하여 사용하였다.

2.2 유기용매추출

상기 목분을 95% ethanol로 3회 반복하여 72시간 상온에서 추출하여 농축하고, 얻어진 에탄올 추출물

은 n-hexane, chloroform, diethyl ether, ethyl acetate로 순차연속 추출하였다.

2.3 기기분석

IR 스펙트라는 KBr pallet 제조법으로 측정하였으며 기기는 BIO-RAD사의 FT-IR Spectrometer (SPC-300)를 사용하였다. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, $^1\text{H-}^{13}\text{C HETCOR}$ 는 Varian사의 NMR Spectrometer(Gemini 200, 400MHz)를 사용하여 측정하였다. VG Analytical사의 High-Mass Spectrometer(VG 70-VSEQ)를 사용하여 질량분석을 행하였다. Yanagimoto사의 용점측정기를 사용하여 용점을 측정하였다.

2.4 항균력 검색

항균성 시험은 임 등(1987)의 방법으로서 멸균된 각각의 기층용 생육배지를 petri dish에 15ml씩 분주하여 응고시키고, 증충용 배지를 각각 5ml씩 시험관에 분주하여 멸균한 후, 45°C 수욕상에 보관하면서 전배양한 각종 시험균액을 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 후, 기층용 배지 위에 분주하여 2종의 평판배지를 만들었다. 본 추출물을 농도 1000 $\mu\text{g/ml}$ 를 멸균된 paper disk에 일정량씩 흡수시킨 후 추출용매를 날려보내고 난후 시험용 평판배지 표면에 올려 놓은 후, 30°C incubator에서 24-48시간동안 배양한 다음 disk 주변의 clear zone (mm)을 측정하여 항균력을 검색하였으며 사용한 균주는 Table 1과 같다.

2.5 추출성분의 단리

상기 에탄올 추출물의 hexane 가용부(fraction A)를 silica gel column(5 \times 74cm)을 사용하여 용매 n-hexane-ethyl acetate(7:1.0/V)혼합액으로 용출시키고 TLC로 측정하여 Rf치 별로 A-1~A-12로 조분별하였다. 이중 A-2 fraction 약 20g을 silica gel column(5 \times 51cm)을 사용하여 용출용매 n-hexane-

Table 1. Experimental fungi

Fungi	Media
<i>Escherichia coli</i> IFO 3301	Nutrient broth and agar
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	Tryptic soy broth and agar(Ddifco)
<i>Pseudomonas fluorescense</i> ATCC 21541	Tryptic soy broth and agar
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Tryptic soy broth and agar
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Tryptic soy broth and agar

일본 잎갈나무재로부터 Diterpene의 단리

ethyl acetate(9:1 v/v)로 분별하여 A-2-1~A-2-4로 분리하였다. 이 중 A-2-3(2.8g)을 silica gel column(3×70cm), *n*-hexane-ethyl acetate(9:1 v/v)로 분리하여 방지할 때 결정이 생기는 A-2-3-1을 여과한 후 *n*-hexane으로 재결정하여 0.1323g를 단리하였고, 융점은 74.5~75.5℃ 이었으며, 정색반응은 violet이었다. 분리도는 Fig. 1과 같다.

이 diterpene의 ¹H-NMR스펙트럼의 해석은 다음과 같다.

¹H-NMR(400MHz. ppm, CDCl₃) δ: 0.74(3H, s, H-20), 0.87(3H, s, H-19), 1.01(3H, s, H-18), 1.04, 1.07, 1.10, 1.13(1H, dd, *J*=4.8, 12.1, H_{ex}-1), 1.15, 1.18, 1.20, 1.22(1H, dd, *J*=4.4, 8.6, H_{ax}-3), 1.25~1.28(2H, m, H-12), 1.28(3H, s, H-16), 1.30~1.35(1H, m, H_{ax}-2), 1.39, 1.44(1H, d, *J*=10.4, H_{ax}-5), 1.47-1.53(1H, m, H_{ex}-2), 1.58-1.63(2H, m, H-11), 1.70~1.80(2H, m, H_{eq}-3, H_{ax}-1), 2.04(3H, s, H-22), 1.96, 2.03, 2.06, 2.08(1H, m, H_{ax}-7), 2.17(1H, s, 13-C-OH), 2.64, 2.67, 2.70, 2.73(1H, dd, *J*=5.0, 12.2, H_{eq}-7), 4.65(1H, s, H_b-17), 4.92(1H, s, H_a-17), 4.97, 4.99, 5.05, 5.10 (1H, m, H_{ax}-6), 5.03, 5.04, 5.08, 5.09(1H, dd, *J*=1.1, 10.8, H_{cis}-15), 5.15, 5.16, 5.24, 5.25(1H, dd, *J*=1.2, 17.4, H_{trans}-15), 5.83, 5.89, 5.92, 5.97(1H, dd, *J*=10.7,

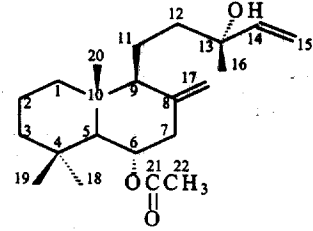


Fig. 2. The chemical structure of 6-acetoxymanol

17.4, H-14)등으로 각 피크가 귀속된다.

이 화합물의 ¹³C-NMR스펙트럼의 해석은 다음과 같다. 즉 ¹³C-NMR(400MHz. ppm, CDCl₃) δ: 15.99(C-20), 18.02(C-2), 19.04(C-11), 21.98(C-22), 22.47(C-19), 27.76(C-16), 33.55(C-4), 36.21(C-18), 39.16(C-1), 39.90(C-10), 41.36(C-3), 43.55(C-12), 44.25(C-7), 56.44(C-9), 57.63(C-5), 73.33(C-6), 73.54(C-13), 109.64(C-17), 111.80(C-15), 144.48(C-8), 145.35(C-14), 170.31(C-21)등으로 각 시그날이 귀속된다.

또한, 이 화합물의 HETCOR(400 MHz, CDCl₃)스펙트럼에서 탄소와 수소가 서로 연관성이 있음을 잘 나타내고 있다. Fig. 3은 이 화합물의 HETCOR스펙트럼이며 Table 2에 요약정리하였다.

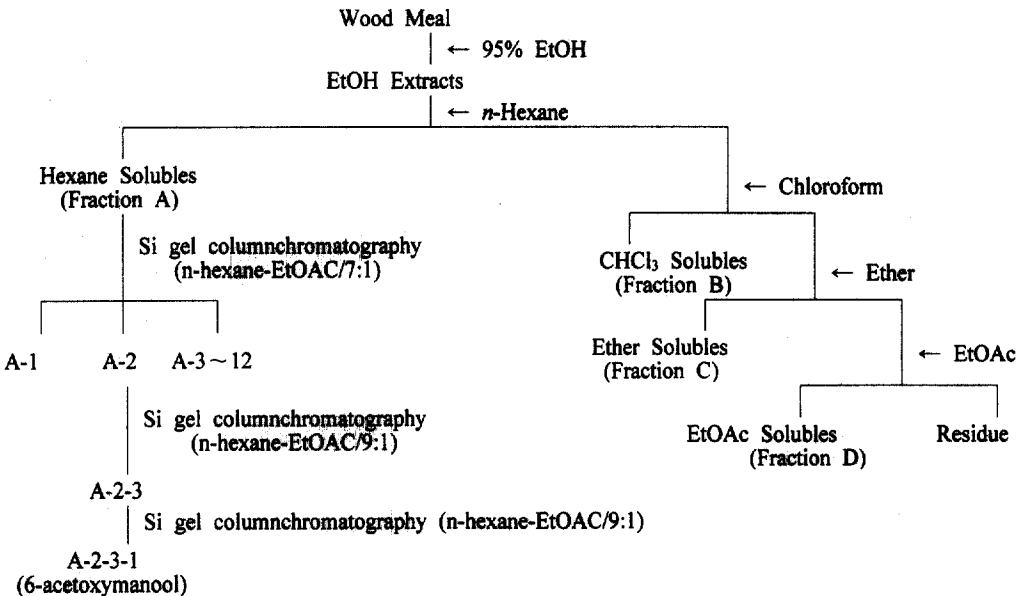


Fig. 1. Fractionation of ethanol extracts from *Larix leptolepis*.

Table 2. HETCOR spectral data of 6-acetoxymanol

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (ppm)	assignment
15.99	0.74, s	20-CH ₃
18.02	1.47 - 1.53 m	2-CH _{eq}
	1.30 - 1.35 m	2-CH _{ax}
19.04	1.57 - 1.63 m	11-CH ₂
21.98	2.04 s	22-CH ₃
22.47	0.87 s	19-CH ₃
27.76	1.28 s	16-CH ₃
33.55	-	4-C
36.21	1.01 s	18-CH ₃
39.16	1.04, 1.07, 1.10, 1.13, dd, $J=4.8, 12.1$	1-CH _{eq}
	1.70 - 1.80 m	1-CH _{ax}
39.90	-	10-C
41.36	1.15, 1.18, 1.20, 1.22 dd $J=4.4, 8.6$	3-CH _{ax}
	1.70 - 1.80 m	3-CH _{eq}
43.55	1.25 - 1.28 m	12-CH ₂
44.25	1.96, 2.03, 2.06, 2.08 m	7-CH _{ax} ;
	2.64, 2.67, 2.70, 2.73, dd, $J=5.0, 12.2$	7-CH _{eq}
56.44	1.57 - 1.63 m	9-CH _{ax}
57.63	1.39, 1.44 t $J=10.4$	5-CH _{ax}
73.33	4.97, 4.99, 5.05, 5.10 m	6-CH _{ax} -OAc
73.54	2.17 s	13-C-OH
109.64	4.65 s	17-CH _b =
	4.92 s	17-CH _a =
111.80	5.03, 5.04, 5.08, 5.09 d,d $J=1.1, 10.8$	15-CH _{cis} =
	5.15, 5.16, 5.24, 5.25, dd, $J=1.2, 17.4$	15-CH _{trans} =
144.48	-	8-C=
145.35	5.83, 5.89, 5.92, 5.97, dd, $J=10.7, 17.4$	14-CH=
170.31	-	21-C=O

3. 결과 및 고찰

이 디테르펜화합물의 IR 스펙트럼에서 $3,400\text{cm}^{-1}$ 에 수산기의 신축진동이, $2,800\text{cm}^{-1}$ 에 methylene기, $1,740\text{cm}^{-1}$ 에 acetoxy기의 흡수피크가 보이며, $1,375\text{cm}^{-1}$ 에서 methyl기의 흡수피크가 잘 나타나고

있다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 Atta-ur-Rahma and Vigar, U.A.(1992)가 발표한 manool의 데이터와 비교하여 시그널 δ 39.16(C-1), 18.02(C-2), 41.36(C-3), 33.55(C-4), 56.44(C-9), 39.90(C-10), 73.54(C-13), 145.35(C-14), 111.80(C-15), 27.76(C-16), 22.47(C-19)

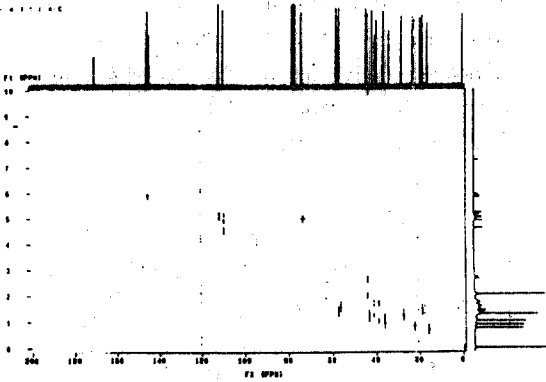


Fig. 3. HETCOR spectrum of 6-acetoxymanol.

등이 비슷하게 귀속된다. C-6위치에 결합한 acetoxy기는 electron withdraw역할을 하므로 그 위치의 시그널 δ 73.33은 manool의 시그널보다 48.9ppm으로 저자장에 이동되고, δ 44.25(C-7)에서 저자장으로 5.6ppm 이동되고, δ 57.63(C-5), 19.04(C-11), 43.55(C-12), 109.64(C-17), 36.21(C-18), 15.99(C-20) 등은 1.3~3.4ppm으로 저자장에 이동된다. δ 144.48(C-8)은 고자장으로 3.9ppm 이동하였다. acetoxy기의 시그널은 δ 170.31(C-21), 21.98(C-22)에서 잘 나타나고 있다.

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서는 δ 0.74, 0.87 및 1.01의 단일 선으로부터 20, 19, 18번 위치에서의 탄소와 결합된 세 개의 메틸기의 존재를 시사하고 있다. 또는 δ 1.28의 단일 선으로부터 13번 위치에서의 수산기를 갖은 탄소와 결합된 메틸기의 존재를 시사하고 있다. 이 화합물의 특징적인 시그널은 δ 2.04(3H, s, H-22)의 단일 선으로부터 acetoxy기의 메틸기의 존재를 시사하고 있는 점이다. ABX형 이중결합에서 $\text{H}_{\text{cis}}-15$ 의 시그널 δ 5.03, 5.04, 5.08, 5.09는 coupling 상수 $J_{\text{AB}}=1.1$, $J_{\text{BX}}=10.8$ 인 double doublet로 잘 나타나고, $\text{H}_{\text{trans}}-15$ 시그널 δ 5.15, 5.16, 5.24, 5.25는 coupling 상수 $J_{\text{AB}}=1.2$, $J_{\text{AX}}=17.4$ 인 double doublet로 잘 나타내고 있으며, 그리고 H-14의 시그널 δ 5.83, 5.89, 5.92, 5.97은 $J_{\text{BX}}=10.7$, $J_{\text{AX}}=17.4$ double doublet로 잘 나타나고 있다. 이중결합한 두 개 수소 H-17의 시그널 δ 4.65, 4.92가 단일선으로 잘 나타나고 있다. Double doublet시그널 δ 2.64, 2.67, 2.70, 2.73은 coupling 상수 $J_{6,7}=5.0$, $J_{7,7}=12.2$ 로 잘 나타나고 있는데 이는 수소 $\text{H}_{\text{eq}}-7$ 에 귀속된다. doublet시그널 δ 1.39, 1.44는 coupling 상수 $J_{5,6}=10.4$ 로 잘 나타

나고 있으므로 $\text{H}_{\text{ax}}-5$ 로 귀속되어 6번 위치에서의 수소는 수직방향인 것으로 해석하였다. 다른 시그널은 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY(Fig. 4)에 의하여 couple된 수소의 위치로 결정할 수 있고, 이 수소의 conformation은 coupling상수로 설명할 수 있다. 그리고 이 수소를 붙어 있는 탄소의 시그널은 HETCOR스펙트럼(Fig. 3)에 의하여 확인하였다. 즉, 시그널 δ 1.15, 1.18, 1.20, 1.22(1H, dd, $J=4.4, 8.6$)는 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY에서 H-19와의 crosspeak가 나타나고 있는데 H-3으로 해석할 수 있고, coupling상수 $J_{a,e}=4.4$, $J_{a,a}=8.6$ 이 있는데 $\text{H}_{\text{ax}}-3$ 으로 결정하였다. HETCOR스펙트럼을 보면 $\text{H}_{\text{ax}}-3$ 과 대응하고있는 3번탄소의 $^{13}\text{C-NMR}$ 시그널이 δ 41.36이었다. 그리고 3번탄소와 coupling된 수소가 δ 1.70 - 1.80에 하나 더 있다. 이 시그널은 $\text{H}_{\text{ex}}-3$ 으로 해석할 수 있다.

이 화합물의 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY(400 MHz, CDCl_3) 스펙트럼(Fig. 4)에서 모든 수소들이 서로 깊은 연관성이 있음을 나타내고 있다. $\text{H}_{\text{ax}}-6$ (4.97, 4.99, 5.05, 5.10ppm)과 $\text{H}_{\text{eq}}-7$ (2.64, 2.67, 2.70, 2.73ppm), $\text{H}_{\text{ax}}-7$ (1.96, 2.03, 2.06, 2.08ppm)과의 coupling, 그리고 $\text{H}_{\text{ax}}-6$ 과 $\text{H}_{\text{ax}}-5$ 의 coupling, $\text{H}_{\text{ax}}-3$ 과 $\text{H}_{\text{ex}}-3$, $\text{H}_{\text{ax}}-3$ 과 $\text{H}_{\text{ax}}-2$, $\text{H}_{\text{ax}}-3$ 과 $\text{H}_{\text{ax}}-2$, $\text{H}_{\text{ex}}-3$ 과 $\text{H}_{\text{ax}}-2$, $\text{H}_{\text{ex}}-3$ 과 $\text{H}_{\text{ex}}-2$, $\text{H}_{\text{ax}}-2$ 와 $\text{H}_{\text{ax}}-1$, $\text{H}_{\text{ax}}-1$ 과 $\text{H}_{\text{ex}}-1$ 등이 명확하게 잘 나타나고 있다. $\text{H}_{\text{ax}}-3$ 과 H-19, $\text{H}_{\text{eq}}-1$ 과 H-20의 W conformation에 기인하는 두개 long-rang coupling들이 뚜렷하게 나타나고 있다.

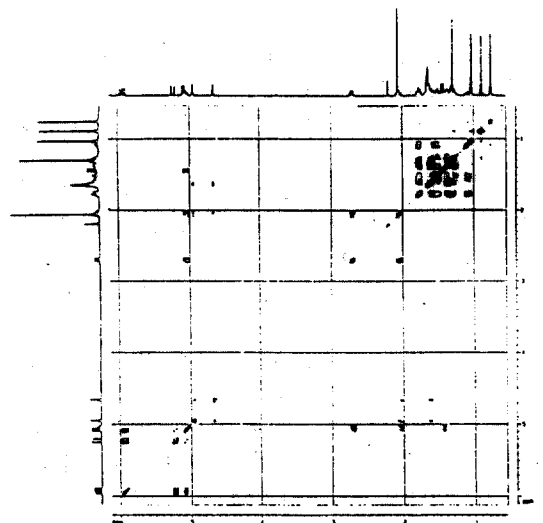


Fig. 4. COSY spectrum of 6-acetoxymanol.

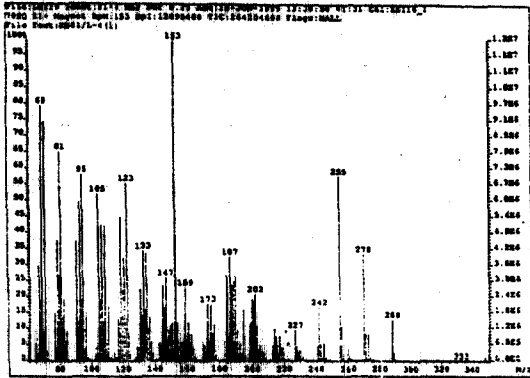


Fig. 5. Mass spectrum of 6-acetoxymanool.

또한 13번에 수산기가 존재하는 것은 앞에서 설명한 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 로 14, 15번에 ABX형 이중결합이 존재하고, coupling 상수에 의하여 13번위치에서는 수소가 존재하지 않는 것을 알 수 있었다. 그리고 HETCOR스펙트럼에서는 14번탄소의 $^{13}\text{C-NMR}$ 시그날이 $\delta 145.35$ 로 나타나고 있는데 이것은 13번의 수산기의 electron withdraw 영향 때문이다. 이와 같은 방법으로 다른 위치에 수산기가 없는 것을 구명할 수 있다. 즉, 앞에서 설명한 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 로 H_{ax-6} 과 H_{eq-7} , H_{ax-7} 과의 coupling에 의하여 7번위치에는 수소 두 개 있고, 서로 couple된 수소가 C-1, 2, 3에 여섯 개가 있는데 이들 위치에서는 수산기가 존재할 수 없다.

Fig. 5는 이 화합물의 mass 스펙트럼인데 분자이온은 M^+ 348이고, base ion은 m/z 153, 그 외의 중요한 fragment ion은 m/z 288, 270, 255, 153, 123, 120, 105 등이 있다.

Fig. 6는 이 화합물의 Mass fragmentation으로서 분자이온은 M^+ 348에서 탈메틸화되어 m/z 288로, 또 탈수되어 m/z 270으로, 계속 탈메틸화되어 m/z 255로 된다. m/z 270에서 점선으로 개환되어 base ion m/z 153으로 된다.

이들 데이터의 분석결과로부터 이 화합물은 Fig. 2와 같이 6-acetoxymanool 또는 13-hydroxy-8(17), 14-labddienyl-6-acetate로 명명하였으며, SCIFINDER에 의하여 새로운 화합물로 판정되었고 추출물의 기초적 데이터로서의 가치가 크다고 사려된다.

그리고 이 화합물의 항균활성(antimicrobial activity)

검색은 농도1000 $\mu\text{g/ml}$ 하에서 5종의 균주 *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*(0157:H7) 등의 세균으로 검색한 결과 항균활성은 없었다.

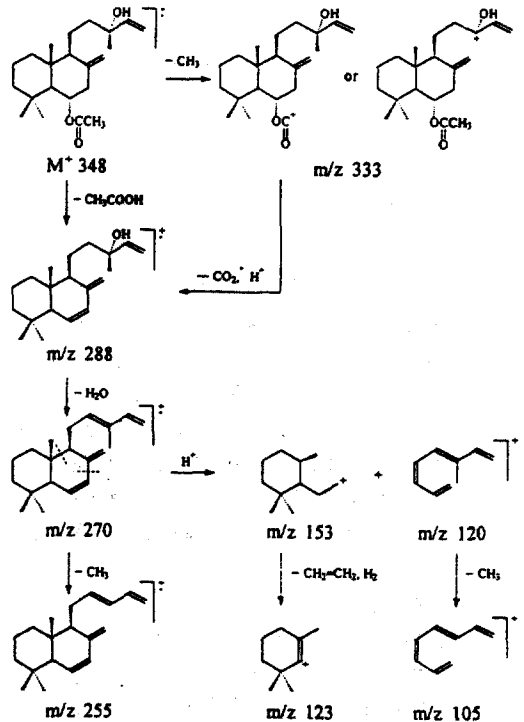


Fig. 6. A probable mass fragmentation of 6-acetoxymanool.

4. 결론

일본 잎갈나무의 추출성분을 밝히기 위하여 목본을 제조하여 ethanol로 추출하고 유기용매로 분리하여 새로운 디테르펜화합물 유도체를 단리 정제하여 IR, NMR, Mass스펙트럼에 의하여 그 화학구조를 결정하였다. 이 디테르펜은 Labdan계인 신화합물로 추정되는 6-acetoxymanool (13-hydroxy-8(17), 14-labddienyl-6-acetate)로 명명하였으며 이 화합물은 목재화학분야의 기초적 자료로서 중요성을 갖는다.

참 고 문 헌

1. Atta-ur-Rahma and Viqar, U. A. 1992. ^{13}C -NMR of Natural Products. Plenum Press. New York vol. 2 : 38
2. Miki, K. and T. Sasaya. 1979. Glycerol Derivatives in the Inner Bark of *Larix leptolepis* Gord. *Mokuzai Gakkaishi*. 25(5) : 361
3. Miki, K. and T. Sasaya. 1979. Dihydrobenzofuran Derivatives from Inner Bark of *Larix leptolepis* Gord. *Mokuzai Gakkaishi*. 25(6) : 437
4. Miki, K., K. Ito and T. Sasaya. 1979. Lignans from Heartwood of Inner Bark of *Larix leptolepis* Gord. *Mokuzai Gakkaishi*. 25(10) : 665
5. Miki, K. and T. Sasaya. 1980. Lignans from Heartwood of *Larix leptolepis* Gord. *Mokuzai Gakkaishi*. 26(9) : 633
6. Takehara, T. and T. Sasaya. 1979. Lignans from Sapwood of *Larix leptolepis* Gord. *Mokuzai Gakkaishi*. 25(7) : 516
7. Takehara, T. and T. Sasaya. 1979. Dihydrobenzofuran Derivatives from Sapwood of *Larix leptolepis* Gord. *Mokuzai Gakkaishi*. 25(10) : 660
8. Zinkel, D. F., Zank, L. C. and M. F. Wesolowski. 1971. Diterpen Resin Acids. *American Oil Chemicals*. 48(9) : 55-461
9. 김진규, 박완근, 배영수. 1997. 일본잎갈나무 잎의 후라보노이드 배당체. 목재공학 25(2) : 81~87
10. 임춘미, 경구항, 유양자. 1987. BHA 및 BHT의 미생물 성장억제 효과. 한국식품과학회지. 19: 54
11. 최형주, 황병호. 1986. 목재추출성분에 관한 연구 (III). 목재공학 14(3) : 30~35