

솔잎의 후라보노이드 아세틸화 배당체*¹

李尙克*² · 裴映壽*²

Flavonoid Acetylated Glucosides of the Needles of *Pinus densiflora**¹

Sang-Keug Lee*² · Young-Soo Bae*²

요 약

강원대학교 구내림에서 자란 생장이 양호한 소나무 잎을 채취하여 아세톤-물(7 : 3, v/v)로 추출하고 네 개의 분획으로 분리한 후 에틸아세테이트용성 분획물에 대하여 Sephadex LH-20 칼럼으로 크로마토그래피를 실시하였으며 용리용매는 메탄올 및 에탄올 수용액과 에탄올-헥산 혼합액을 사용하였다. 단리된 화합물은 주로 flavan 화합물로 구성되어 있었으며 flavonoid 유도체인 kaempferol-3-O-glucopyranoside와 quercetin-3-O-(6''-O-acetyl)-gluco pyranoside도 소량으로 단리되었는데 이들은 소나무 잎의 추출성분에서는 처음으로 분리되었다. 단리된 화합물은 NMR 및 MS 스펙트럼을 이용하여 정확한 구조를 결정하였다.

ABSTRACT

The needles of *Pinus densiflora*, grown in the campus of Kangwon National University were collected, extracted with acetone-H₂O (7:3, v/v) and freeze dried to give 10.4 g of ethylacetate soluble powder. A portion of the freeze dried powder was chromatographed on a Sephadex LH-20 column using a series of aqueous methanol and ethanol, and ethanol-hexane mixture as eluents. The extractives contained a large amount of flavan compounds in addition to a small amount of flavonoid derivatives such as kaempferol-3-O-glucopyranoside, and quercetin-3-O-(6''-O-acetyl)-glucopyranoside which has not been isolated from this species yet. Some spectrometric analyses such as NMR and FAB-MS were performed to identify the structures of the isolated flavonoid derivatives.

* 1 접수 2001년 5월 17일, 채택 2001년 6월 26일

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

Keywords: *Pinus densiflora*, needles, extractives, flavan, flavonoid derivatives

1. 서 론

소나무(*Pinus densiflora*)는 우리 나라 전역에 자생하는 주요 침엽수종으로 주로 정원수, 조림용, 약용, 식용으로 이용되는데, 특히 수피는 탄닌을 많이 함유하고 있으며 송진은 약용 및 공업원료로 이용되며 술잎을 기능성 식품으로 이용하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

최근 목재 추출성분에 대한 연구들이 많은 분야에서 집중적으로 수행되고 있으며 식품산업과 의약품 등에서 수목성분의 기능성 시험을 통한 제품 개발에 많은 노력을 경주하고 있다. 더욱이 우리 나라 산림의 50% 이상을 점유하는 침엽수의 이용 개발에 관한 주제는 임산분야의 주요 연구 대상으로 대두되고 있는 실정이다.

본 연구는 국내에 자생하는 침엽수 잎의 추출성분을 이용하기 위한 연구의 하나로 먼저 술잎의 추출성분을 분리하고 그 구조를 결정하여 수목 추출성분을 이용한 응용연구의 전 단계로 실시되었다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

1997년 2월 강원대학교 교내에서 자라는 생장이 양호한 30년생 소나무의 잎을 채취하여 실험실에서 약 2주간 건조한 후 분쇄기를 사용하여 분말로 제조하였다.

2.2 추출물의 조제

기건된 소나무 잎 분말 1.15 kg을 10 l의 용리용기에 넣고 아세톤-물(7:3, v/v)의 혼합용액에서 실험실에서 약 3일간 침적시킨 후 추출하였으며 이와 같은 조작을 4회 반복 실시하여 모아진 추출액은 감압

농축기를 이용하여 농축하였다.

농축된 추출물은 분획갈때기에서 먼저 클로로포름을 사용하고 그 다음 헥산, 에틸아세테이트순으로 하여 클로로포름용성, 헥산용성, 에틸아세테이트용성 그리고 수용성부분으로 분리하였다. 이것을 감압 농축기를 이용하여 농축하였으며 농축된 추출물들은 동결건조 하여 분말로 된 클로로포름용성 화합물 31.2 g, 에틸아세테이트용성 화합물 10.4 g, 수용성 화합물 75.5 g을 얻을 수 있었고 헥산용성 화합물은 얻을 수 없었다. 이 중에서 에틸아세테이트용성 화합물을 가지고 본 실험을 실시하였다.

2.3 칼럼 크로마토그래피

에틸아세테이트 혼합물로부터 순수한 단일 화합물을 분리하기 위하여 칼럼 크로마토그래피 분석을 실시하였으며 사용된 칼럼은 1 cm, 1.5 cm, 3 cm의 직경과 60 cm, 90 cm의 길이를 가지는 유리칼럼을 사용하였다. 층진물질로는 Sephadex LH-20을 사용하였고 용리용매로는 에탄올 및 메탄올 수용액, 그리고 에탄올-헥산 혼합액을 사용하였다. 칼럼으로부터 떨어지는 용출액은 fraction collector(Gilson FC 204)를 이용하여 순차적으로 시험관에 받았으며 화합물의 분리여부는 셀룰로오스 박층 크로마토그래피(TLC)를 이용하여 확인하였다.

칼럼 크로마토그래피 분리를 위하여 소나무잎의 에틸아세테이트용성 화합물 10.4 g을 유리칼럼에 주입하고 용리용매로는 95% 에탄올을 사용하여 1차 분리를 실시하여 5개의 분획(FB-1, 2, 3, 4, 5)으로 나누었다. 농축 후 동결 건조된 각 분획의 양은 각각 2.48 g, 6.46g, 0.34 g, 0.58 g, 0.15 g이었으며 FB-2 부분을 메탄올-물(3:1, 1:1, v/v)과 에탄올-헥산(4:1, v/v)을 용리용매로 하여 연속적으로 칼럼 크로마토그래피를 수행한 결과 FB-2332에서 (+)-catechin (760 mg)을 얻었고 FB-2334에서 (+)-gallocatechin (50 mg)을 얻을 수 있었다. 이후 다시 FB-2 부분을 메탄올-물(3:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, v/v)을 용리

용매로 하여 연속적으로 재크로마토그래피를 실시한 결과 FB-2322211에서 kaempferol-3-O-glucopyranoside(I)(37 mg)을 얻었고 FB-23222131에서 quercetin-3-O-(6''-O-acetyl)-glucopyranoside(II)(39.6 mg)를 얻을 수 있었다.

2.4 화합물의 구조 결정

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

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

단리된 화합물들의 구조결정을 위하여 Bruker 400 MHz NMR spectrometer를 사용하여 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 측정하였고 분석용매로는 methanol- d_4 를 사용하였다. 분리된 화합물의 분자량은 Micromass사의 Autospec M363 질량분석기를 사용하여 positive FAB-MS 스펙트럼으로 확인하였다.

2.4.1 화합물 I

R_f : 0.66(solvent A) 및 0.20(solvent B)

FAB-MS : $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 449

$^1\text{H-NMR}(400 \text{ MHz}, \delta, \text{MeOH-}d_4)$: 8.04(2H, *d*, $J=8.84 \text{ Hz}$, H-2', 6'), 6.88(2H, *d*, $J=8.61 \text{ Hz}$, H-3', 5'), 6.37(1H, *s*, H-8), 6.18(1H, *s*, H-6), 5.23(1H, *d*, $J=7.21 \text{ Hz}$, H-1''), 3.2~4.0(5H, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'').

$^{13}\text{C-NMR}(100.6 \text{ MHz}, \delta, \text{MeOH-}d_4)$: 179.8 (C-4), 166.6(C-7), 163.4(C-5), 161.9(C-4'), 159.4 (C-9), 158.8(C-2), 135.8(C-3), 132.6(C-2', 6'), 123.1(C-1'), 116.4(C-3'), 106.0(C-10), 104.5 (C-1''), 100.3(C-6), 95.2(C-8), 78.7(C-3'', 5''), 76.1(C-2''), 71.7(C-4''), 63.0(C-6'').

2.4.2 화합물 II

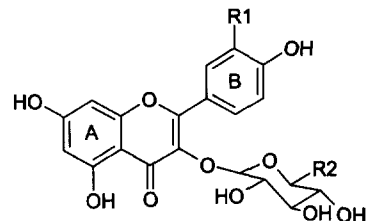
R_f : 0.59(solvent A) 및 0.17(solvent B).

FAB-MS : $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 507

$^1\text{H-NMR}(400 \text{ MHz}, \delta, \text{MeOH-}d_4)$: 7.61(1H, *s*, H-2'), 7.58(1H, *dd*, $J=1.81 \text{ Hz}$ and $J=8.49 \text{ Hz}$, H-6'), 6.83(1H, *d*, $J=8.36 \text{ Hz}$, H-5'), 6.37 (1H, *s*, H-6), 6.18(1H, *s*, H-8), 5.13(1H, *d*, $J=7.41 \text{ Hz}$, H-1''), 3.30~4.20(5H, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''), 1.84(3H, *s*, H-OAc).

$^{13}\text{C-NMR}(100.6 \text{ MHz}, \delta, \text{MeOH-}d_4)$: 179.3 (C-4), 172.7(OAc, C=O), 166.5(C-7), 162.9(C-5), 159.3(C-9), 158.4(C-2), 149.8(C-4'), 145.9(C-3'), 135.4(C-3), 123.4(C-1'), 123.1(C-6'), 117.4 (C-5'), 115.8(C-2'), 105.4(C-10), 104.5(C-1''), 100.0(C-6), 94.9(C-8), 77.9(C-5''), 75.6(C-3''), 75.5(C-2''), 71.3(C-4''), 64.3(C-6''), 20.5(C-OAc).

3. 결과 및 고찰



화합물 I : $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{CH}_2\text{OH}$

Kaempferol-3-O-glucopyranoside

화합물 II : $R_1=\text{OH}$, $R_2=\text{CH}_2\text{OAc}$

Quercetin-3-O-(6''-O-acetyl)-glucopyranoside

소나무 잎의 에틸아세테이트용성 부분 10.4 g을 Sephadex LH-20을 충진물질로 사용하여 연속적인 칼럼 크로마토그래피를 실시하였으며 용리용매로는 에탄올 및 메탄올 수용액 그리고 에탄올-hexan 혼합액을 사용하였다. 이 과정에서 네 개의 화합물이 단리 되었으며 이들 화합물들은 2D-TLC를 이용하여 단일 물질의 단리 여부를 확인한 후 NMR 및 FAB-MS분석을 통하여 정확한 구조를 결정하였다.

특히, 단리된 네 개의 화합물들 중에서 flavan류인 (+)-catechin과 (+)-gallocatechin은 다량으로 단리되어 이들이 주요한 솔잎 추출성분임을 알 수 있었다.

3.1 화합물 I

이 화합물은 UV램프 하에서는 갈색으로 관찰되었고 발색제에는 연한 노란색으로 반응을 하였으며 이때 R_f 값은 0.66(solvent A), 0.20(solvent B)이었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 6.18 ppm과 6.37 ppm의 두 개의 doublet signal은 phloroglucinol A환의 H-6과 H-8의 전형적인 peak를 나타내고 있으며 5.23 ppm의 doublet signal은 C환의 C-3과 결합하고 있는 glucose의 H-1"의 peak가 downfield되어 보이고 있고 3.2~4.0 ppm의 복잡한 signal은 glucose의 H-2", 3", 4", 5", 6"의 전형적인 peak를 나타내고 있다(Agrawal, 1992; Simon et al., 1993). 한편, 8.04 ppm과 6.88 ppm의 두 개의 signal은 B환의 H-2', 6'과 H-3', 5'의 peak를 나타내는 것으로서 이것은 B환의 H-4' 위치에 한 개의 수산기가 결합되어 있어서 서로 대칭되는 구조를 가지는 것을 알 수 있으며 적분값으로도 한 개의 peak가 두 개의 수소를 나타내는 것을 알 수 있다(Allais et al., 1994; Simon et al., 1993).

$^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 132.6 ppm과 116.4 ppm에서 B환의 대칭 되는 C-2', 6'과 C-3', 5'의 signal이 나타나고 있으며 이중결합을 하고 있는 flavone 구조의 C-2와 C-3의 signal은 각각 158.8 ppm과 135.8 ppm에서 크게 downfield 되어 나타나고 있다. C-4 위치의 carbonyl기의 signal은 flavanone보다 10 ppm 정도 upfield된 179.8 ppm에서 나타나고 있고 60~80 ppm사이에 glucose의 탄소들이 나타나고 있으며 104.5 ppm에서 glucose의 C-1"이 downfield되어 나타나고 있다(Harborne, 1994; Agrawal, 1992). 특히, C-2가 기존의 kaempferol의 그것보다 12 ppm 정도 downfield되고 C-4가 4 ppm 정도 downfield된 것으로서 C-3위치에 glucose가 결합을 하고 있다는 것을 알 수 있었다(Agrawal, 1989; Allais et al., 1994; Harborne, 1982; Simon et al., 1993). 또한 A환의 C-6과 C-8의 signal이 각각

100.3 ppm과 95.2 ppm에서 전형적인 peak를 나타내고 있으며 OH기가 결합되어 있는 C-7, 9, 4'의 signal이 각각 166.5 ppm, 163.4 ppm, 161.9 ppm에서 나타나고 있다(Agrawal, 1989; Harborne, 1975; Harborne, 1982). 따라서 상기한 NMR값을 토대로 이 화합물은 kaempferol-3-O-glucopyranoside로 구조를 결정하였으며 FAB-MS를 이용한 분자량 분석치도 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 가 m/z 449로서 이 화합물의 분자량 448에 한 개의 수소원소가 결합된 구조와 일치하였다.

또한 위에서 언급한 $^1\text{H-NMR}$ data 및 $^{13}\text{C-NMR}$ data도 기존의 kaempferol-3-O-glucopyranoside의 data와 일치하고 있다(Agrawal, 1989; Harborne, 1975; Harborne, 1982).

3.2 화합물 II

이 화합물은 TLC상에서 갈색으로 보이고 발색제에는 연한 노란색을 나타내었으며 R_f 값은 0.59(solvent A), 0.17(solvent B)이었다.

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 B환의 H-2'가 7.61 ppm에서 singlet signal로 나타나고 있으며 7.68 ppm에서 H-6'의 signal이 H-2'과 H-5'의 영향으로 doublet doublet으로 나타났으며 coupling constant값은 각각 1.81Hz와 8.49Hz이었다(Chosson et al., 1998; Simon et al., 1993). 또한 H-5'는 H-6'과의 영향으로 6.83 ppm에서 doublet으로 나타나고 있으며 B환이 catechol형태를 하고 있다는 것을 알 수 있었다. A환의 H-6과 H-8은 각각 6.37 ppm과 6.18 ppm에서 phloroglucinol형태의 전형적인 peak를 보이고 있으며 6.83 ppm에서 C-3과 결합한 glucose의 H-1"이 downfield되어 나타나고 있고 3.30~4.20 ppm에서 glucose의 나머지 H-2", 3", 4", 5", 6"의 signal들이 복잡한 peak로 나타나고 있다. 그리고 glucose의 C-6"에 결합되어 있는 acetyl기의 proton이 1.84ppm에서 전형적인 peak를 보이고 있다(Agrawal, 1992; Chosson et al., 1998).

$^{13}\text{C-NMR}$ 에서 B환의 OH기가 결합되어 있는 C-3'과 C-4'의 signal이 145.9 ppm과 149.8 ppm에서 나타나고 있고 C-2', 5', 6'의 signal이 각각 115.8 ppm, 117.4 ppm, 123.1 ppm에서 각각 나타나고 있

는 것으로 보아서 B환이 catechol형태임을 알 수 있었다(Agrawal, 1989; Harborne, 1982; D'Agostino et al., 1992). 이중 결합을 하고 있는 C-2와 C-3의 signal은 158.4 ppm과 135.4 ppm에서 downfield되어 나타나고 있으며 carbonyl탄소인 C-4는 179.3 ppm에서 전형적인 peak를 보이고 있는데, C-2가 기존의 quercetin의 그것보다 11 ppm 정도 downfield되었고 C-4 역시 4 ppm 정도 downfield되어 나타나고 있는 것으로서 glucose가 C-3에 결합되어 있는 것을 알 수 있었다(Chosson et al., 1998; Simon et al., 1993). 한편, glucose의 C-1은 C환의 C-3과 결합을 하고 있기 때문에 104.5 ppm에서 downfield되어 나타나고 있으며 나머지 glucose의 C-2', 3', 4', 5', 6"의 signal은 각각 75.5, 75.6, 71.3, 77.9, 64.3 ppm에서 나타나고 있다(Agrawal, 1992; Harborne, 1982; Harborne, 1994). 또한 acetyl기의 carbonyl탄소와 methyl기의 탄소는 각각 172.7 ppm과 20.5 ppm에서 전형적인 peak를 나타내고 있으며 특히, 기존의 quercetin-3-O-glucoside와 비교해 볼 때, glucose의 C-6"이 3 ppm 정도 downfield되어 나타나는 것으로 acetyl기가 C-6"결합되어 있다는 것을 알 수 있었다(Harborne, 1982; Agrawal, 1989; Simon et al., 1993). OH기가 결합되어 있는 C-5와 C-7이 각각 162.9 ppm과 166.5 ppm에서 나타나고 있고 C-6과 C-8이 100.0 ppm과 94.9 ppm에서 나타나고 있는 것으로서 A환이 phloroglucinol형태를 하고 있는 것을 알 수 있었으며 이들 NMR data를 종합하여 이 화합물은 quercetin-3-O-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside로 구조를 결정하였다(Agrawal, 1989; D'Agostino et al., 1992; Harborne, 1994). FAB-MS에 의한 분자량 분석도 $[M+H]^+$ 값이 m/z 507로서 이 화합물의 분자량 506과 일치하고 있으며 상기한 NMR값은 *rhododendron ferrugineum* 수종에서 Chosson등에 의해 보고된 바 있는 quercetin-3-O-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside의 NMR data와 일치하고 있다.

4. 결 론

솔잎 추출물의 ethylacetate 가용부를 sephadex

LH-20 column으로 분리하여 flavan류인 (+)-catechin과 (+)-gallocatechin을 단리 하였으며 flavonolglycoside인 kaempferol-3-O-glucopyranoside와 quercetin-3-O-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside를 단리하였다. 더욱이 quercetin-3-O-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside는 지금까지 철쭉과의 목본 식물에서 보고된 바 있으나 침엽수와 같은 교목류의 잎의 추출성분에 대한 연구에서는 아직 보고된 바 없는 화합물이다.

참 고 문 헌

1. Agrawal, P. K. 1989. Carbon ^{13}C -NMR of flavonoids. Elsevier Science Publishing Company INC.
2. Agrawal, P. K. 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31(10): 3307~3330.
3. Allais, D. P., A. J. Chulia, M. Kaouadji, Alain Simon and Christiane Delage. 1994. 3-Desoxycallunin and 2"-acetylcallunin, two minor 2,3-dihydroflavonoid glucosides from *calluna vulgaris*. *Phytochemistry* 39(2): 427~430.
4. Chosson, E., A. Chaboud, A. J. Chulia and J. Raynaud. 1998. Dihydroflavonol glycosides from *rhododendron Ferrugineum*. *Phytochemistry* 49(5): 1431~1433.
5. D'Agostino, M., F. D. Simone, Z. L. Zhou and Cosimo Pizza. 1992. Flavonol glycosides from *iagetes elliptica*. *Phytochemistry* 31(12): 4387~4388.
6. Harborne, J. B. 1994. The Flavonoids. Champman and Hall LTD.
7. Harborne, J. B., T. J. Mabry. 1982. The Flavonoids : Advances in Research. Champman and Hall LTD.
8. Harborne, J. B., T. J. Mabry, H. Mabry. 1975. The Flavonoids : Champman and Hall LTD.
9. Simon, A., A. J. Chulia, M. Kaouadji, D. P. Allais and Christiane Delage. 1993. Two flavonol 3[triacetyl-rabinosyl(1→6)glucosides] from *calluna vulgaris*. *Phytochemistry* 33(5): 1237~1240.
10. Simon, A., A. J. Chulia, M. Kaouadji, and Christiane Delage. 1993. Quercetin 3[triacetyl-rabinosyl(1→6)galactoside] and chromones from *calluna vulgaris*. *Phytochemistry* 36(4): 1043~1045.