

잣나무 수피의 Stilbene glycosides의 분리 및 동정*1

송 홍 근*2

Isolation and Identification of Stilbene glycosides from the Bark of *Pinus koraiensis**1

Hong-Keun Song*2

요 약

약 25년 생 잣나무 수피 추출물중 EtOAc용해분에 함유된 화합물을 분리·동정하였다. 화합물의 분리는 Sephadex-LH20과 TSK-gel HW-40F를 충전제로 한 Column chromatography로 하였다. 분리된 화합물의 구조동정은 ^1H · ^{13}C -NMR, HMQC, HMBC 등과 FAB⁺ MS 등을 이용하여 결정하였다. 새로이 동정된 화합물은 Z-pinostilbenoside, E-desoxyrhaponticin, 그리고 E-resveratrolside 등이었다.

ABSTRACT

EtOAc extract from the bark of *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc was isolated by column chromatography which was packed with Sephadex LH-20 or TSK-gel HW-40F. Several stilbene glycosides were identified by ^1H · ^{13}C -NMR, HMQC, HMBC and FAB⁺ MS. Three stilbene glycosides, Z-pinostilbenoside, E-desoxyrhaponticin, and E-resveratrolside, were identified.

Keywords: E-pionstilbenoside, Z-pinostilbenoside, E-desoxyrhaponticin, E-resveratrolside Stilbene-glycoside, bark, *Pinus koraiensis*

* 1 접수 2001년 11월 8일, 채택 2001년 12월 6일

* 2 건국대학교 농축산생명과학대학 산림환경과학전공, Forest and Environmental Science, College of Agriculture & Life Science, Kon-Kuk University, Seoul 143-701, Korea.

1. 서 론

잣나무는 우리나라 주요 조림수종의 하나로 전국적으로 널리 식재된 수종이다. 이들은 현재 대부분이 간벌 적령기이나 경제적인 여건상 극히 일부분만이 간벌되고 있다. 그래서 경제적으로 도움이 될 수 있는 가능성을 높이기 위하여 부산물로 생산되는 수피에 유용화합물의 함유여부를 검색하기 위한 연구의 일환으로 잣나무 수피의 항균성을 시험한 결과 비교적 높은 항균성을 나타내어(김 등, 2001) 수피에 함유된 주요성분을 밝히고자 본 실험을 실시하였다. 실험 중에 밝혀진 EtOAc 용해분의 주요 성분은 stilbene glycoside였으며, 이 stilbene류의 화합물은 항산화기능(Ryu 등, 1988, Shimizu 등, 1999, Miura 등, 2000), 항균 기능(Fujinori 등, 1992) 천식 억제기능(송 등, 2001), 항알러지 효과(Matsuda 등, 1999), 곤충 생장억제제(Singh 등, 1997) 등 다양한 생리 활성기능이 있는 것으로 밝혀져 있다.

본 실험은 잣나무 수피에 함유된 주요 stilbene glycoside류 화합물을 분리·동정함으로써 유용한 자원으로서 활용할 수 있는 기초 자료를 얻고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

잣나무 수피는 1997년 25년 생 잣나무를 벌채하여 박피하였으며, 건조된 내피를 Wiley mill을 이용하여 분쇄하고, 30 mesh 이하의 것을 추출용 시료로 사용하였다. 수피는 Acetone : H₂O (7 : 3, v/v)를 용매로 추출하였다.

추출된 성분의 분석용 TLC는 silica gel 60F와 cellulose F TLC plate를 사용하였다. Silica gel 60F는 ethyl acetate : chloroform : formic acid (6:3:1, v/v) 혼합용액을 전개용매로 사용하였으며, cellulose F TLC는 t-butanol : acetic acid : water (3:1:1, v/v)와 6% acetic acid 혼합용액을 1차, 2차 전개용매

로 사용하였다. 검색방법은 UV illuminator를 사용하였다.

Column chromatography는 2.5×45 cm 크기의 open column에 Sephadex LH-20을 충전제로 충전하여 중력에 의한 자연 용출방법을 사용하였고, LC column의 충전제는 TSK gel HW-40F를 사용하였다. MS의 matrix는 glycerol을 사용하였고, solvent는 methanol 또는 DMSO를 사용하여 FAB⁺방법으로 분석하였다. 사용한 pump는 Gilson 306, 302였고, detector는 Gilson UV 112로 280 nm에서 검출하였다.

NMR은 Bruker DPX 400(9.4T)를 사용하였는데, 5 mm dual probe를 사용하였다. NMR자료의 post-processing program은 Felix 95.0(Molecular Simulation Inc., San Diego, CA)을 사용하여 Silicon Graphics INDY R4400에서 계산하였다. 용매는 acetone-d₆와 methanol-d₄ 또는 DMSO-d₆였다.

Spectrum window는 ¹H-NMR의 경우는 8,000 Hz였고, ¹³C-NMR과 DEPT의 경우는 24,000 Hz였다. 또한 ¹H-NMR실험을 위한 90° pulse는 9.7 μsec, ¹³C-NMR실험을 위한 90° pulse는 9.6 μsec였다. 2D 실험의 data point는 2K×256이었다. HMQC 및 HMBC는 Bax(Bax and Summers, 1986)가 만든 Pulse program들을 사용하였고, HMBC에서 long ranged coupling을 위한 delay time은 45 msec였다. 모든 NMR 실험은 probe의 온도를 300 K로 유지시켜 행하였다.

2.2 시험방법

동결 건조된 시료는 Fig. 1의 흐름도에 따라 분석하였다.

이와 같이 얻은 에틸아세테이트 용해분을 감압농축 후 동결건조시켜 크로마토그래피 분석 시료로 사용하였다. 1차 크로마토그래피 분석은 Fig. 2의 흐름과 같이 실시하였다.

I ~ V은 void volume을 제외시킨 후 각 분액들을 100 mL씩의 에탄올 용출액을 모은 것이다. 이들 분석된 분액들은 각각 silica gel TLC와 cellulose TLC

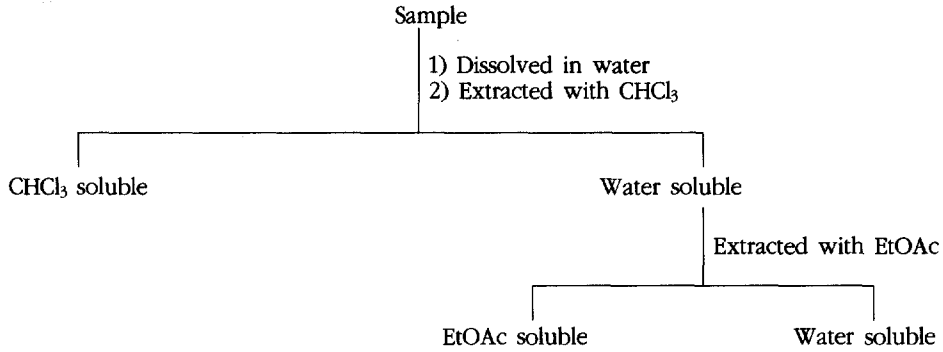


Fig. 1. A flow diagram of extraction and fractionation of the sample.

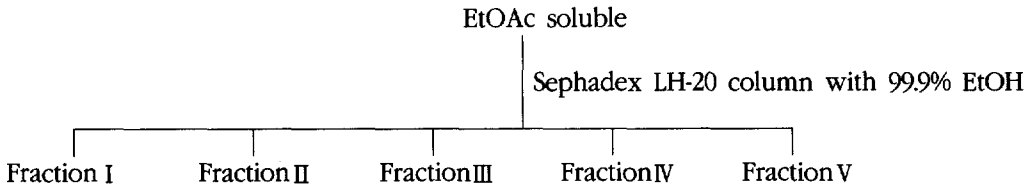


Fig. 2. A flow diagram of extraction and fractionation of the sample.

를 사용하여 검색을 실시하였다.

이렇게 분석한 분획 중 가장 많은 양을 차지하는 분액 III을 TSK gel HW-40F로 충전한 column에 직접 주입하고, Ethanol : H₂O (9:1, v/v)을 1분당 1 mL로 용출하여 재크로마토그래피 하였다.

위와 같이 재크로마토그래피한 결과 용출된 것 중 compound I ~ V의 용출된 봉우리를 silica gel 60F와 cellulose TLC상으로 확인 한 결과 순수한 물질로 판명되어 이를 동결 건조한 후 NMR과 MS 분석용 시료로 사용하였다.

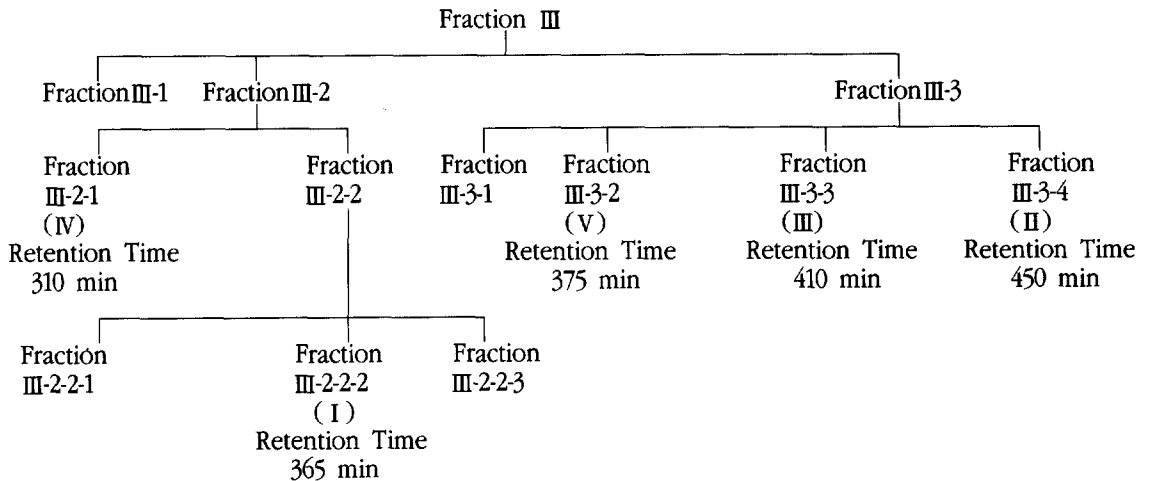


Fig. 3. A flow diagram of extraction and fractionation of the sample.

Table 1. R_f value of Compounds.

	t-butanol : acetic acid : water (3:1:1, v/v)	6% acetic acid
Compound I	0.64	0.21
Compound II	0.54	0.18
Compound III	0.59	0.23
Compound IV	0.80	0.67
Compound V	0.72	0.64

* Song et al, 2001.

각 화합물의 R_f 값은 다음 Table 1과 같다.

3. 결과 및 고찰

국내 침엽수 자원의 활용을 위해서 소나무, 리기다 소나무, 잣나무 부위별 추출물의 병원진균에 대한 항균성을 시험한 결과 잣나무 수피와 근피의 EtOAc분획분에서 우수한 결과를 얻었다. 이와 같은 결과와 위수종의 추출물의 TLC결과 잣나무 수피에는 다른 수종보다 페놀성 화합물의 종류가 다양하게 함유되어 있었다(김 등, 2001).

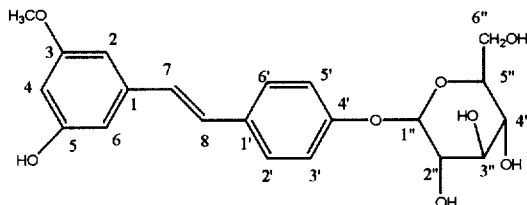
잣나무 수피에 함유된 성분중 우수한 항균활성을 갖는 분획분중 EtOAc분획분의 주성분은 Sephadex LH-20을 이용한 크로마토그래피에서 얻은 분획Ⅲ이었고, 이 분획이 가장 많은 양으로 추출되었다. 이들의 성분을 TSK-gel 40F로 재크로마토그래피하여 얻은 순수한 화합물들은 stilbene glucoside들이었다.

잣나무 수피에 가장 많이 함유된 stilbene glycoside는 E-pinostilbenoside (I)였으며, 이 화합물은 알리지 천식에 관여하는 Leukotriene D₄(LTD₄)에 저항성 기능이 있다는 것을 실험하였다. 이 결과는 한국농화학회지(2001년 12월호)에 게재 될 것이다.

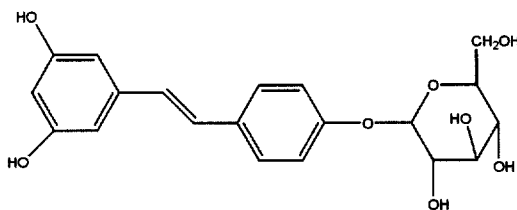
다음으로 많이 함유되어 있는 stilbene glycoside는 E-resveratrolside (II)였다. 이외 소량의 E-desoxyrhaphonticin (III)과 Z-pinostilbenoside (IV)가 단리되었다. 이들 화합물들은 이미 알려진 화합물들이나 잣나무 수피에서는 처음 발견된 것이다.

단리된 stilbene glycoside들의 구조는 ¹H-, ¹³C-NMR 스펙트럼들, HMQC와 HMBC를 이용한 전

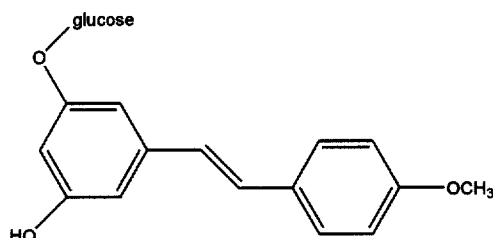
형적인 방법으로 규명하였으며, 분자량은 FAB⁺ MS에 의하여 결정하였다.



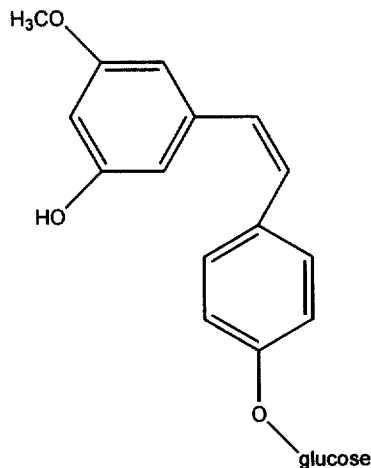
E-pinostilbenoside (I)



E-resveratrolside (II)



E-desoxyrhaphonticin (III)



Z-pinostilbenoside (IV)

Table 2. Assignments of compound I, II, and III.

Assign- ment	I *		II		III	
	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H
1	140.1		141.0		140.0	
2	103.6	6.60	106.0	6.50	103.3	6.50
3	161.5		159.7		161.5	
4	101.5	6.25	102.8	6.20	101.3	6.20
5	159.5		159.7		159.1	
6(2)	106.9	6.60	106.0	6.50	106.0	6.50
7	127.8	6.98	128.6	6.90	127.5	6.80
8	128.8	7.03	128.9	7.00	128.0	7.00
1'	131.6		133.2		132.2	
2'	128.5	7.52	128.6	7.50	127.6	7.40
3'	117.3	7.10	117.9	7.00	116.9	7.00
4'	157.9		158.7		157.7	
5'	117.3	7.10	117.9	7.00	116.9	7.00
6'	128.5	7.52	128.6	7.50	127.6	7.40
OCH ₃	55.8	3.75			54.6	3.70
1"	101.2	4.90	102.2	5.00	100.8	4.80
2"	74.1	3.30	74.9	3.50	73.9	3.40
3"	77.5	3.30	78.0	3.50	77.0	3.40
4"	70.6	3.20	71.4	3.40	70.4	3.30
5"	77.9	3.30	78.2	3.50	77.2	3.40
6"	61.6	3.50,3.70	62.5	3.80, 3.90	61.5	3.60,3.80

* Song et al, 2001.

이들 화합물의 구조 결정에서 명확히 밝히기 어려운 부분은 -OCH₃와 -O-glucose가 어느 탄소에 결합되어 있는가와 C₇과 C₈의 이중결합의 입체화학이 무엇인가이다.

-OCH₃와 -O-glucose의 위치는 Heteronuclear Multiple Quantum Coherence(HMQC) (Bax 등, 1983)와 Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) (Bax & Summers, 1986)에 의하여 결정하였다.

Stilbene 유도체의 trans- 와 cis- 입체 이성질체는 벤젠고리의 치환체의 위치에 관계없이 ¹H의 화학적 이동의 차이에 의해 구별할 수 있다(Koh 등, 2001). 또 ¹H에서 C₇-H와 C₈-H 사이의 결합상수의 차이에 의해서 확인할 수 있었다.

Z-pinostilbenoside (IV)는 HMBC에 의하여 -OCH₃는 C₃에 결합되어 있고, -O-glucose는 C' 4에 결합되

Table 3. Assignments of compound I and IV.

Assign- ment	I *		IV	
	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H
1	140.1		140.7	
2	103.6	6.60	102.1	6.35
3	161.5		162.3	
4	101.5	6.25	100.9	6.30
5	159.5		159.7	
6(2)	106.9	6.60	106.8	6.40
7	127.8	6.98 (<i>d</i> 16.0)	130.4	6.45~6.50 (<i>d</i> 12.0)
8	128.8	7.03 (<i>d</i> 16.0)	131.3	6.50~6.55 (<i>d</i> 12.0)
1'	131.6		132.2	
2'	128.5	7.52	131.3	7.20~7.28
3'	117.3	7.10	117.3	6.90~7.00
4'	157.9		158.3	
5'	117.3	7.10	117.3	6.90~7.00
6'	128.5	7.52	131.3	7.20~7.28
OCH ₃	55.8	3.75	55.8	3.8
1"	101.2		101.7	4.95
2"	74.1		75.1	3.51
3"	77.5		78.1	3.41
4"	70.6		71.7	3.53
5"	77.9		78.4	3.55
6"	61.6		63.0	3.75, 3.88

* Song et al, 2001.

어 있는 것을 확인하였고, C₇과 C₈의 입체화학은 E form의 ¹H 이동 이 Z form의 ¹H 이동보다 저자장으로 이동되어 있으며, 그들간의 결합상수가 E form은 16.0 Hz, Z form은 12.0 Hz로 달라짐을 알 수 있다 (Table 3). 이와 같은 결과는 Koh 등(2001)의 결과와 잘 일치되고 있다.

또한 E-pinostilbenoside (I)와 E-desoxyrhaponticin(III)는 Table 2에서 알 수 있듯이 ¹H와 ¹³C-NMR의 스펙트럼들이 거의 일치되는 결과를 얻었으나, 분리과정에서 보여주듯이 TSK-gel HW 40F로 충전한 column을 이용하여 분리할 때 머무름 시간이 E-pinostilbenoside는 365분 후에 용출되었고, E-desoxyrhaponticin는 410분 후에 용출되었다. 또한 2D Cellulose TLC 상의 R_f값은 이 두 화합물이 다른 화합물임을 보여주고 있다(Table 1). 그래서 NMR상의 값이 거의 같은 것과 chromatographic 상의 차이로 보아서 -OCH₃와 -O-glucose의 위치가 E-pinostilbenoside는 -OCH₃가 C₃에 결합되어 있고, -O-

glucose는 C'4에 결합되어 있는 반면 E-desoxy-rhaponticin는 -OCH₃가 C'4에 결합되어 있고, -O-glucose는 C₃에 결합되어 있음을 알 수 있다.

E-resveratrolside (II)의 ¹H, ¹³C-NMR 봉우리의 위치는 Table 2와 같으며, 분자량은 390이었다(Fig. 4).

이외에 머무름 시간이 375분인 다른 하나의 stilbene glycoside를 분리하였으나 그 양이 충분치 못하여 ¹H 스펙트럼만을 얻었고, 그 결과 Z-form임을 밝혔으나 ¹³C의 스펙트럼을 얻지 못하여 구조규명은 할 수 없었다.

지금까지 발표된 stilbene 계열의 유도체들은 다양한 생리활성을 갖고 있으며 대체적으로 glycoside 유도체들은 aglycone 계열의 stilbene보다 낮은 활성을 보이나(Matsuda 등, 2000), glycoside들은 생체내에서 쉽게 가수분해되어 aglycone으로 전환될 수 있기 때문에 잣나무 수피는 stilbene류를 얻을 수 있는 좋은 자원이므로 판단된다.

4. 결 론

잣나무 수피 추출물중 EtOAc용해분의 주요성분은 stilbene glycoside들이었으며, 이 중 가장 많이 함유된 화합물 E-pionstilbenoside였으며, 그 외 Z-pino-stilbenoside, E-desoxyrhaponticin, 그리고 E-resveratrolside 등이 검출되었다. 이들 화합물들은 이미 알려진 화합물이나 잣나무에서는 처음 밝혀진 화합물이다.

Stilbene glycoside들과 그들의 aglycone보다는 낮은 활성을 보이나 glycoside들은 생체내에서 쉽게 가수분해되어 aglycone으로 전환될 수 있기 때문에 잣나무 수피는 stilbene류를 얻을 수 있는 좋은 자원으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. 김종진, 송홍근, 한창훈. 2001. 소나무屬 수목의 부위별 추출물의 항균활성. 한국농화학회지. 2001. 44(4): 269-272.
2. Bax, A., R. H. Griffey and B. L. Hawkins. 1983. Correlation of proton and nitrogen-15 chemical shifts by multiple quantum nmr. *J. Magn. Reson.* 55: 301-315.
3. Bax, A., and M. F. Summers. 1986. ¹H and ¹³C assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum nmr. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 2093-2094.
4. Fujinori, H., S. Tahara and J. Mizutani. 1992. Antifungal stress compounds from veratrum grandiflorum leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry*. 31(9): 3005-3007.
5. Koh, D., K. H. Park, J. Jung, H. Yang, K. H. Mok, and Y. Lim. 2001. Spectral Assignments and Reference Data. *Magn. Reson. Chem.* 39.
6. Matsuda H., T. Kageura, T. Morikawa, I. Toguchida, S. Harima and M. Yoshikawa. 2000. Effects of Stilbene Constituents from Rhubarb on Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 10: 323-327.
7. Miura T., S. Muraoka, N. Ikeda, M. Watanabe and Y. Fujimoto. 2000. Antioxidative and Prooxidative Action of Stilbene Derivatives. *Pharmacology & Toxicology* 86(5): 203-208.
8. Ryu S. Y., Y. N. Han and B. H. Han. 1988. Monoamine Oxidase-A Inhibitors from Medicinal Plants. *Arch. Pharm. Res* 11(3): 230-239.
9. Shimizu K., R. Kondo, and K. Sakai. 2000. Inhibition of Tyrosinase by Flavonoids, Stilbenes and Related 4-Substituted Resorcinols: Structure-Activity Investigations. *Planta Medica*. 66(1): 11-15.
10. Singh, I. P., H. Etoh, E. Asai, K. Kikuchi, K. Ina, K. Koyasu and Y. Terada. 1997. Flavonoids and Stilbenes as Repellents against the Blue Mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis*. *Nat. Prod. Sci.* 3(1): 49-54.
11. Song, H. K., J. Jung, K. H. Park and Y. Lim. 2001. Leukotriene D₄ Antagonistic activity of a stilbene derivative isolated from the bark of *pinus koraiensis*. 한국농화학회지 2001년 12월호 게재예정.