

## 개오동나무 잎으로부터 항산화활성을 갖는 lignan 화합물의 분리 및 동정

국 주 회 · <sup>1</sup>마 승 진 · 문 제 학 · † 박 근 형  
전남대학교 식품공학과 및 농업과학기술연구소

<sup>1</sup>Department of Entomology, University of California, Davis, USA  
(접수 : 2003. 9. 18. 게재승인 : 2003. 12. 24.)

## Isolation and Identification of Lignans as Antioxidant from Leaves of *Catalpa ovata* G. DON

Ju-Hee Kuk, Seung-Jin Ma<sup>1</sup>, Jae-Hak Moon, and Keun-Hyung Park†

Department of Food Science and Technology and Institute of Agricultural Science and Technology,  
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>1</sup>Department of Entomology, University of California, Davis, USA  
(Received : 2003. 9. 18. Accepted : 2003. 12. 24.)

The methanol extract from leaves of *Catalpa ovata* G. DON showed DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical-scavenging activity, and its antioxidative compounds were studied. The ethyl acetate-soluble neutral fraction from the methanol extract was successively purified with silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC. Three antioxidative compounds were isolated and identified as piperitol, pinoresinol and lariciresinol by HR-MS and NMR spectroscopic analyses. The DPPH radical-scavenging activity of the identified compounds decreased in the order of lariciresinol > pinoresinol > piperitol.

**Key Words** : *Catalpa ovata*, antioxidative compound, lariciresinol, pinoresinol, piperitol

### 서 론

식품의 산패 및 체내에서의 산화는 식품 품질과 영양가를 저하시키는 원인이 될 뿐만 아니라 노화 및 각종 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있으며, 이들 유해한 작용을 억제하기 위한 항산화제가 개발되어오고 있다(1, 2). 하지만 현재까지 개발되어 사용되고 있는 대부분의 항산화제는 화학적 합성품으로 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), tert-butylhydroquinone (TBHQ) 등이 그 효과와 경제성으로 인해 이용되고 있지만 지속적으로 체내에 축적될 경우에 안전성이 문제되고 있어 소비자들의 기피현상이 높아지고 있다(3). 따라서 보다 안전하면서도 강한 항산화활성을 갖는 물질을 천연물로부터 분리하여 이용하려

는 시도가 활발히 진행되고 있다. 식물체는 광합성 과정에서 발생하는 활성산소종에 대한 산화적 손상으로부터 보호할 수 있는 다양한 형태의 항산화물질을 생성하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이들 식물류의 항산화효과에 관한 많은 연구가 보고되어 있다. 하지만 아직까지 과학적인 구멍이 이루어지지 않은 부분이 많으므로 여러 가지 생리활성을 갖는 식물성 소재의 발굴이 요구되고 있다.

한편, 개오동나무(*Catalpa ovata* G. DON)는 능소화과(Bignoniaceae)에 속하는 낙엽교목으로 한국 전역에 자생하고 있다. 개오동나무의 열매는 한방에서 이노제로서 신장염 등에, 잎과 수피는 발열, 해독, 살충, 황달 등에 이용되어 왔다. 개오동나무에 관련된 연구로 개오동나무 수피의 성분으로 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, syringic acid 등의 방향족 화합물(4), 항종양 활성을 갖는 naphthoquinone (5)이 보고되어 있으며, 잎에 함유된 성분으로 monoterpene glycosides(6), 열매에서 flavone 6-sophoroside, flavone 6-glucoside 등의 flavonoid계 화합물(7)과 iridoid 화합물(8)이 보고되어 있다.

하지만, 개오동나무의 생리활성에 관한 연구로는 항종양

† Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel: +82-62-530-2143, Fax: +82-62-530-2149

E-mail: khpark@chonnam.ac.kr

효과에 관한 보고가 되어있을 뿐 다양한 생리활성에 관한 연구는 매우 빈약한 상태이다. 이에 전보에서는 개오동나무에 함유된 기능성물질에 관한 연구로써 개오동나무 열매로부터 항균활성물질인 4,9-dihydroxy-2,2-dimethyl-3,4-dihydronaphtho [2,3-*b*]pyran-5,10-dione을 동정하여 보고한 바 있다(9).

본 연구에서는 우리나라 자생식물에 함유된 유용물질 탐색 연구의 일환으로 개오동나무의 잎에 함유된 항산화물질을 규명하여 개오동나무 잎의 천연 항산화제로의 이용가능성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

개오동나무(*Catalpa ovata* G. Don)의 잎은 9월에 채취하여 수분함량  $9.4 \pm 0.02\%$ 까지 실온에서 건조한 후 분쇄하여 시료로 사용하였다.

### 활성물질의 추출 및 용매분획

분쇄한 개오동나무 잎(1 kg)을 homogenizer (BM-2 Nissei bio-mixer, Nihonseiki Kaiseiki LTD, Japan)로 마쇄하면서 methanol (MeOH, 35 L)로 추출하였다. 개오동나무 잎의 MeOH 추출물을 cooling aspirator가 장착된 vacuum evaporator (TYPE N-2N, Eyla, Japan)로 감압농축하고, buffer 용액(0.2 M monobasic sodium phosphate-0.2 M dibasic sodium phosphate, pH 7.5)과 ethyl acetate (EtOAc)를 이용하여 수용성 획분과 EtOAc 가용 중성획분으로 분획하였다. 수용성 획분은 0.1 M HCl을 이용하여 pH 3.0으로 조절한 뒤, 다시 EtOAc로 분배하여 수용성 획분과 EtOAc 가용 산성획분으로 분획하였다(9).

### Silica gel adsorption column chromatography에 의한 정제

Silica gel adsorption column chromatography는 시료의 10 배량에 상당하는 silica gel (Kieselgel 60, 70~230 mesh, Merck, Germany)을  $\text{CHCl}_3$ 으로 slurry를 만들어 column에 충전시킨 후,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50%까지 단계적으로 증가시키는 step-wise 방법으로 용출분획하였다. *n*-Hexane-EtOAc-MeOH 용매계의 column chromatography는 *n*-hexane-EtOAc-MeOH 8:6:1, 6:8:1, 4:10:1 (v/v, 단계별 5 L)을 용매계로 하여 용출분획하였으며, 용매의 극성을 낮추어 *n*-hexane-EtOAc-MeOH 10:4:1, 8:6:1, 6:8:1, 0:0:15 (v/v, 단계별 5.8 L)를 용매계로 하여 용출분획하였다. 또한, silica gel을 *n*-hexane-EtOAc의 혼합용매계로 slurry를 만들어 column에 충전시킨 후, *n*-hexane-EtOAc 10:4, 9:5, 8:6, 7:7, 6:8, 5:9, 4:10 (v/v)의 용매계로 극성을 증가시키면서 용출분획하였다.

### Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 정제

Silica gel adsorption column chromatography로 용출분획하여 얻어진 개오동나무 잎의 활성획분을 Sephadex LH-20 column chromatography로 정제하였다. Sephadex LH-20 (70~230 mesh, Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 MeOH- $\text{CHCl}_3$  (4:1,

v/v) 용매계로 24시간 팽윤시킨 후, column (total volume 250 mL)에 충전하고, 동일한 용매계로 용출분획하였다(9).

### HPLC에 의한 정제

활성물질은 HPLC를 사용하여 최종 정제하였다. 활성물질 1은 Senshupak ODS column (8.0×250 mm, Senshu, 10  $\mu\text{m}$ , Japan)을 이용하여 80% MeOH을 이동상으로 1.5 mL/min (Model 510 solvent delivery system, Waters, USA)로 용출분획하여 활성획분을 얻은 다음, Symmetry  $\text{C}_{18}$  column (4.6×150 mm, Waters, USA)으로 50% MeOH (1.0 mL/min)을 용출용매로 하여 분리하였다. 활성물질 2는 Senshupak ODS column을 이용하여 60% MeOH을 이동상으로 하여 1.5 mL/min로 용출분획하여 분리하였으며, 활성물질 3은  $\mu$  Bondapak  $\text{C}_{18}$  column (7.8×300 mm, Waters, USA)을 이용하여 40% MeOH (4.0 mL/min)로 용출분획하여 분리하였다. 활성물질은 UV detector (486 tunable absorbance detector, Waters, USA)를 사용하여 254 nm (활성물질 1, 2) 또는 280 nm (활성물질 3)에서 검출하였다.

### 분리된 활성물질의 구조분석

분리된 활성물질의 구조분석을 위하여 MS 및 NMR 분석을 실시하였으며, HR-MS (high resolution-mass spectrometer)는 JMS 700 spectrometer (JEOL, Japan)를 사용하여 분석하였다.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  및 2D-NMR (two-dimensional nuclear magnetic resonance)은 INOVA 500 spectrometer (500 MHz, Varian, USA)를 사용하여 분석하였다.

### 활성물질 1

HR-MS  $[\text{M}]^+$   $m/z$  356.0362 (+0.3  $m\text{mu}$  for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$ );  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 3.11 (1H×2, m, H-8, 8'), 3.86 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.85 (1H×2, dd,  $J=3.5, 7.0$  Hz, H-9<sub>a</sub>, H-9'<sub>a</sub>), 4.22 (1H×2, dd,  $J=3.50, 7.0$  Hz, H-9<sub>b</sub>, H-9'<sub>b</sub>), 4.71 (1H×2, d,  $J=5.0$  Hz, H-7, 7'), 5.94 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 6.77 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5), 6.78 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 6.81 (1H, dd,  $J=1.5, 8.0$  Hz, H-6), 6.84 (1H, dd,  $J=1.5, 8.0$  Hz, H-6'), 6.88 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2'), 6.95 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 54.2 (C-8), 54.4 (C-8'), 55.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 71.4 (C-9'), 71.5 (C-9), 86.2 (C-7'), 86.3 (C-7), 101.2 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 106.4 (C-2'), 107.8 (C-5'), 109.8 (C-2), 114.9 (C-5), 118.9 (C-6), 119.4 (C-6'), 132.6 (C-1), 135.4 (C-1'), 146.2 (C-4), 147.4 (C-4'), 148.0 (C-3'), 148.2 (C-3).

### 활성물질 2

HR-MS  $[\text{M}]^+$   $m/z$  358.0349 (+0.3  $m\text{mu}$  for  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$ );  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.11 (2H, m, H-8, 8'), 3.88 (1H×2, dd,  $J=3.5, 9.0$  Hz, H-9<sub>a</sub>, H-9'<sub>a</sub>), 3.91 (3H×2, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4.25 (1H×2, dd,  $J=7.0, 9.0$  Hz, H-9<sub>b</sub>, H-9'<sub>b</sub>), 4.74 (1H×2, d,  $J=5.0$  Hz, H-7, 7'), 5.62 (1H×2, s, OH), 6.83 (1H×2, dd,  $J=1.8, 8.2$  Hz, H-6, 6'), 6.89 (1H×2, d,  $J=8.2$  Hz, H-5, 5'), 6.90 (1H×2, d,  $J=1.8$  Hz, H-2, 2');  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 54.1 (C-8, 8'), 55.9 ( $\text{OCH}_3$ ×2), 71.6

(C-9, 9'), 85.9 (C-7, 7'), 108.6 (C-2, 2'), 114.3 (C-5, 5'), 118.9 (C-6, 6'), 132.9 (C-1, 1'), 145.2 (C-4, 4'), 146.7 (C-3, 3').

### 활성물질 3

HR-MS [M]<sup>+</sup> *m/z* 360.1567 (-0.6 *mmu* for C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 2.38 (1H, m, H-8'), 2.50 (1H, dd, *J*=11.0, 13.5 Hz, H-7<sub>a</sub>), 2.74 (1H, m, H-8), 2.93 (1H, dd, *J*=4.8, 13.5 Hz, H-7<sub>b</sub>), 3.63 (1H, dd, *J*=6.5, 11.0 Hz, H-9'<sub>a</sub>), 3.72 (1H, dd, *J*=5.8, 8.5 Hz, H-9<sub>a</sub>), 3.82 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.85 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.86 (1H, dd, *J*=7.0, 11.0 Hz, H-9'<sub>b</sub>), 3.99 (1H, dd, *J*=6.5, 8.5 Hz, H-9<sub>b</sub>), 4.75 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-7'), 6.65 (1H, dd, *J*=2.0, 8.0 Hz, H-6), 6.72 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5), 6.76 (1H, s, H-5'), 6.77 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 6.91 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 33.7 (C-7), 43.9 (C-8), 54.1 (C-8'), 56.5 (OCH<sub>3</sub>×2), 60.5 (C-9'), 73.6 (C-9), 84.1 (C-7'), 110.7 (C-2'), 113.5 (C-2), 116.1 (C-5'), 116.3 (C-5), 119.9 (C-6'), 122.3 (C-6), 133.6 (C-1), 135.8 (C-1'), 145.9 (C-4), 147.1 (C-4'), 149.1 (C-3, 3').

### 항산화 활성 측정

항산화 활성 검정은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA) 라디칼에 대한 소거능으로 나타냈다. 즉, DPPH ethanol 용액 (100 μM) 900 μL와 다양한 농도의 시료용액 100 μL를 갈색 시험관에 넣고 혼합한 다음 암소에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 dose-response 곡선으로부터 50%의 DPPH 라디칼 소거능 값 (SC<sub>50</sub>)을 구하였다(10). 비교구로 α-tocopherol (Sigma, USA) 을 사용하였다. 또한, 정제과정에서 항산화 활성 검정은 시료를 TLC (Thin layer chromatography, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0.2 mm, Merck, Germany)에 점적하여 적절한 용매로 전개한 다음 ethanol에 용해된 DPPH 용액(200 μM)을 분무하여 자색이 탈색되면 항산화활성 양성으로 판정하였다(11).

## 결과 및 고찰

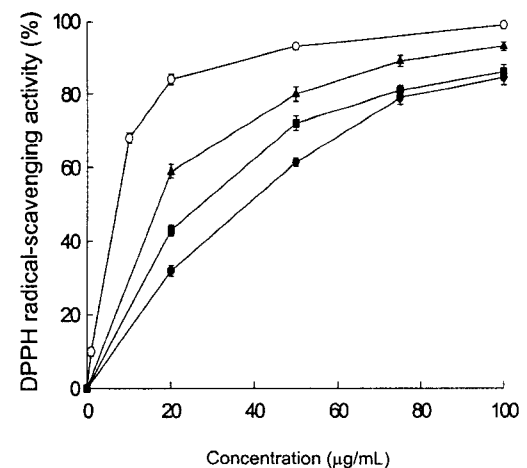
### 개오동나무 잎 추출물의 항산화 활성

개오동나무 잎의 MeOH 추출물 및 이를 용매분획하여 얻어진 EtOAc 가용 산성획분과 EtOAc 가용 중성획분의 항산화 활성 검정을 위해 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. 시료의 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능 곡선(Fig. 1)으로부터 50% DPPH 라디칼 소거능의 농도(SC<sub>50</sub>)를 구한 결과, MeOH 추출물이 38.0 μg/mL, EtOAc 가용 산성획분이 21.9 μg/mL, EtOAc 가용 중성획분이 29.7 μg/mL로 나타나 EtOAc 가용 산성획분과 중성획분 모두 항산화활성을 갖는 것으로 판단되었다. 이 중 우선 EtOAc 가용 중성획분에 함유된 항산화 활성물질의 분리 및 동정을 시도하였다.

### 활성물질의 분리

개오동나무 잎의 MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 EtOAc 가용 중성획분(46.5 g)을 CHCl<sub>3</sub>-MeOH 용매계의 silica

gel adsorption column chromatography로 분획한 후 항산화활성을 검정하였다. 그 결과, CHCl<sub>3</sub>-MeOH 90 : 10 (v/v)의 용출획분(23.6 g)에서 활성이 나타나 이 획분으로 *n*-hexane-EtOAc-MeOH 혼합 용매계의 silica gel adsorption column chromatography를 실시하였다. *n*-Hexane-EtOAc-MeOH 8:6:1 (v/v)에서 0:14:1까지 용출분획한 결과, *n*-hexane-EtOAc-MeOH 8:6:1 (v/v)의 용출획분(20.8 g)에서 활성을 보였다. 이 활성획분을 다시 *n*-hexane-EtOAc-MeOH 14 : 1 : 1 (v/v)~0:14:1로 용출분획하여 활성획분으로 14 : 1 : 1 획분 (19.6 g)과 12 : 3 : 1 획분 (1.7 g)을 얻었으며 이들 각 획분으로부터 항산화물질의 분리를 시도하였다. *n*-Hexane-EtOAc-MeOH 14 : 1 : 1 (v/v) 획분을 앞서 실시한 것보다 용매의 극성을 더욱 낮춘 *n*-hexane-EtOAc 용매계로 silica gel adsorption column chromatography를 실시하여 활성을 검정한 결과, *n*-hexane-EtOAc 9 : 5 (v/v) 획분에서 활성을 보였다. 이 활성획분 (1.2 g)을 MeOH-CHCl<sub>3</sub> (4 : 1, v/v) 용매계의 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분획하고 활성을 검정한 결과, total volume에 대한 elution volume의 비 (V<sub>e</sub>/V<sub>0</sub>)가 0.92~1.02인 용출획분(14.3 mg)에서 활성을 보였다. 이 획분은 Senshupak ODS column (이동상 80% MeOH)을 이용한 HPLC에 의해 retention time (*t<sub>R</sub>*) 8.3분에서 peak를 나타냈으며, Symmetry column (이동상 50% MeOH)에 의해 재 정제되어 활성물질 1 (*t<sub>R</sub>* 17.0분, 8.5 mg)이 단리되었다.



**Figure 1.** DPPH radical-scavenging activities of MeOH extract and solvent fractionated fractions from leaves of *Catalpa ovata*. (○, α-Tocopherol; ●, MeOH extract; ▲, EtOAc-soluble acidic fraction; ■, EtOAc-soluble neutral fraction) α-Tocopherol was used as a reference compound. Data are shown as the mean±S.D. (*n*=3).

한편, *n*-hexane-EtOAc-MeOH 혼합 용매계의 silica gel adsorption column chromatography에서 활성을 나타낸 *n*-hexane-EtOAc-MeOH 12 : 3 : 1 (v/v) 획분(1.7 g)으로 *n*-hexane-EtOAc 용매계의 silica gel adsorption column chromatography를 실시하였으며, 그 결과 *n*-hexane-EtOAc 8 : 6 (v/v) 획분과 6 : 8 (v/v) 획분에서 각각 활성이 나타나 이들 획분을 각각 Sephadex LH-20 column chromatography로 용출분

확하였다. *n*-Hexane- EtOAc 8 : 6 (v/v) 희분(198.8 mg)은 Ve/Vt 0.80~1.00 희분에서 항산화활성을 보였으며, 이를 Senshupak ODS column을 이용하여 60% MeOH을 이동상으로 한 HPLC에 의하여 활성물질 2 ( $t_R$  10.0분, 13.8 mg)가 분리되었다.

또한, 항산화활성을 나타낸 *n*-hexane-EtOAc 6 : 8 (v/v) 희분(172.3 mg)은 Sephadex LH-20 column chromatography에서 Ve/Vt 0.74~1.00 용출희분에서 활성을 나타냈으며  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> column (40% MeOH)을 이용한 HPLC에 의하여 활성물질 3 ( $t_R$  14.5 분, 6.4 mg)이 분리되었다.

### 분리된 활성물질의 구조확인

화합물 1의 <sup>1</sup>H-NMR 분석 결과, 6종의 aromatic proton [ $\delta$  6.95(1H, d,  $J$ =1.5 Hz, H-2), 6.88 (1H, d,  $J$ =1.5 Hz, H-2'), 6.84 (1H, dd,  $J$ =8.0, 1.5 Hz, H-6'), 6.81 (1H, dd,  $J$ =8.0, 1.5 Hz, H-6), 6.78 (1H, d,  $J$ =8.0 Hz, H-5'), 6.77 (1H, d,  $J$ =8.0 Hz, H-5)]이 관찰되었으며, 그들 signal의 분열 패턴으로부터 3치환 benzene 2종의 존재가 확인되었다. 그리고 이웃하는 산소에 의해 저자장으로 shift된 singlet methylene proton ( $\delta$  5.94, OCH<sub>2</sub>O) 1종을 포함하여 총 3종의 methylene proton [ $\delta$  4.22(1H $\times$ 2, dd,  $J$ =7.0, 3.5 Hz, H-9<sub>a</sub>, H-9'<sub>b</sub>), 3.85 (1H $\times$ 2, dd,  $J$ =7.0, 3.5 Hz, H-9<sub>a</sub>, H-9'<sub>b</sub>)]이 관찰되었다. 또  $\delta$  3.86에 1종의 methoxyl기 유래의 proton signal이 관찰되어 그 chemical shift 치로부터 methoxyl화 되어진 benzene 환의 존재가 시사되었다. 그 외에도 4H 분에 해당하는 proton signal이 관찰되어 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY와 HSQC 분석결과와 함께 그들의 연결을 확인한 결과, 각각 2종씩의 proton signal들 [ $\delta$  3.11(1H $\times$ 2, m, H-8, 8'),  $\delta$  4.71 (1 H $\times$ 2, d,  $J$ =5.0 Hz, H-7, 7')]이 증첩된 총 4종의  $sp^3$  methine proton이 존재함을 확인할 수 있었으며, 그들 proton은 4종의 연결된 탄소 상에 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR 분석 결과, 12종의 aromatic  $sp^2$  carbon signal ( $\delta$  148.0-106.4), 7종의  $sp^3$  carbon signal [ $\delta$  101.2 (OCH<sub>2</sub>O), 86.3 (C-7), 86.2 (C-7'), 71.5 (C-9), 71.4 (C-9'), 54.4 (C-8'), 54.2 (C-8)] 및 1종의 methoxy carbon signal ( $\delta$  55.3)을 포함한 총 20종의 carbon signal들이 관찰되어 활성물질 1은 lignan 구조의 화합물일 가능성이 강하게 시사되었다. 부분구조간의 결합과 각 치환기의 위치, 그리고 각 탄소들 간의 연결을 확인하기 위하여 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 및 HMBC 분석 결과를 확인하였다. HMBC spectrum으로부터

H-7의 proton signal( $\delta$  4.71)로부터 C-6 ( $\delta$  118.9) 및 C-2 ( $\delta$  109.8)의 carbon signal들 간에 각각 cross peak가 관찰되었다. 또 H-7'과 9위의 proton signal들로부터 그들 상호간의 carbon signal들에, 그리고 H-7과 9'위의 proton signal들로부터 그들 상호간의 carbon signal들에도 역시 cross peak가 각각 관찰되었다. 그 외에도 H-7'의 proton signal ( $\delta$  4.71)로부터 C-2' ( $\delta$  106.4) 및 C-6' ( $\delta$  119.4)의 carbon signal들 간에도 cross peak가 관찰되었으며, -OCH<sub>2</sub>O-의 methylene proton signal ( $\delta$  5.94)로부터 benzene 환의 C-3' ( $\delta$  148.0) 및 C-4' ( $\delta$  147.4)의 carbon signal들 간에 cross peak가 검출되었다. 또 methoxyl carbon proton signal ( $\delta$  3.86)로부터 C-3의 carbon signal ( $\delta$  148.2)에 cross peak가 관찰되었다. 그리고 HR-MS 분석결과, C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> ( $m/z$  356.0362, +0.3 mmu)의 분자식을 갖는 물질임이 확인되었다. 이상의 결과들로부터 활성 화합물 1의 구조는 piperitolo로 동정되었다(Fig. 2).

화합물 2의 <sup>1</sup>H-NMR 분석 결과, 3치환체 benzene 유래의 3H 분의 proton signal [ $\delta$  6.83 (1H $\times$ 2, dd,  $J$ =1.8, 8.2 Hz, H-6, 6'), 6.89 (1H $\times$ 2, d,  $J$ =8.2 Hz, H-5, 5'), 6.90 (1H $\times$ 2, d,  $J$ =1.8 Hz, H-2, 2')]과 1종의 methylene proton signal [ $\delta$  4.25 (1H, dd,  $J$ =7.0, 9.0 Hz, H-9<sub>b</sub>),  $\delta$  3.88 (1H, dd,  $J$ =3.5, 9.0 Hz, H-9<sub>a</sub>)] 및 2종의  $sp^3$  methine proton signal [ $\delta$  3.11 (2H, m, H-8), 4.74 (1H $\times$ 2, d,  $J$ =5.0 Hz, H-7, 7')], 그리고 benzene 환에 결합된 1종의 methoxyl기 유래의 proton signal ( $\delta$  3.91, 3H, s)이 각각 검출되었다. 또 <sup>13</sup>C-NMR spectrum으로부터 6종의  $sp^2$  carbon signal ( $\delta$  146.7-108.6) 및 methoxyl기 유래로 추정되어지는 1종의 carbon signal을 포함하여 총 4종의  $sp^3$  carbon signal [ $\delta$  85.9 (C-7),  $\delta$  54.1 (C-8, 8'),  $\delta$  71.6 (C-9')]이 관찰되었다. 그러나 HR-MS 분석 결과 ( $m/z$  358.0349, +0.3 mmu for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>), 대단히 흥미롭게도 화합물 1보다 분자량 2가 더 많은 M<sup>+</sup> ion이 검출되었다. 그래서 화합물 2는 화합물 1과 유사한 형태의 완전 대칭형 구조를 취하고 있을 가능성이 강하게 시사되었다. 그래서 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 재검토한 결과, 화합물 1과 2의 spectrum이 대단히 유사한 경향을 보이고 있음을 확인할 수 있었으며, 화합물 1의 -OCH<sub>2</sub>O-의 methylene proton signal이 소실되어졌음을 알 수 있었다. 또 화합물 2가 대칭구조일 가능성을 고려하였을 때, 그 3'위가 methoxyl화 되었을 가능성이 시사되었다. 화합물 1의 구조를 참고로 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY 및 HMBC 분석을 행한 결과, 2종의 methoxyl 기의 결합위치 및

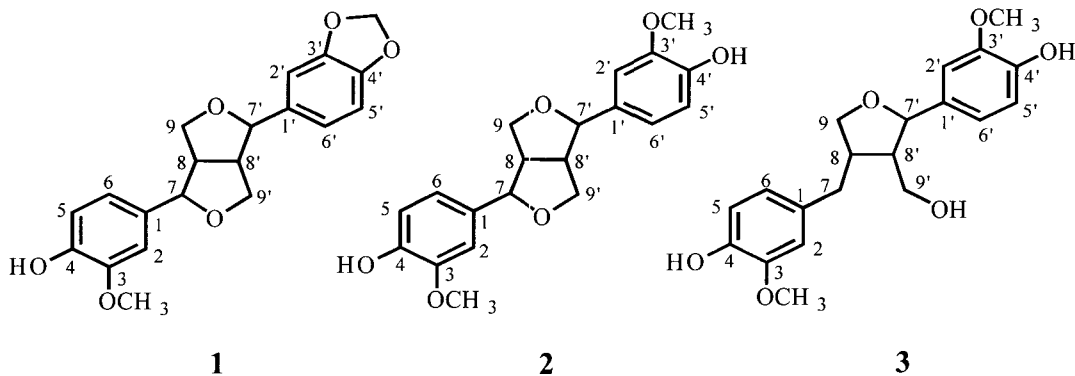


Figure 2. Chemical structures of antioxidative compounds isolated from leaves of *Catalpa ovata*.

두 benzene 환을 연결하는 대칭성의 hydrofuran 구조가 확인되어 화합물 2는 pinoresinol로 동정되었다.

화합물 3의  $^1\text{H-NMR}$  분석 결과, 이 화합물 역시 두 그룹의 3 치환체 benzene [ $\delta$  6.65 (1H, dd,  $J=2.0, 8.0$  Hz, H-6), 6.72 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5), 6.76 (1H, s, H-5'), 6.77 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-6'), 6.80 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2), 6.91 (1H, d,  $J=1.5$  Hz, H-2')]과 2종의 benzene 환에 결합된 methoxyl기 [ $\delta$  3.85 (3H, s, C-3'),  $\delta$  3.82 (3H, s, C-3)] 및 그 외에 각각 3종씩의 methylene proton과  $sp^3$  methine proton으로 구성된 화합물로서 화합물 1, 2와 유사한 구조의 lignan 화합물일 가능성이 강하게 시사되었다. 또 그  $^1\text{H-NMR}$  spectrum을 화합물 2의 spectrum과 비교한 결과, 상호 유사한 경향을 보였으나 화합물 2의 7위의 methine proton signal ( $\delta$  4.74)이 소실되어진 대신 고자장 [ $\delta$  2.93 (H-7<sub>b</sub>), 2.50 (H-7<sub>a</sub>)]에 AB type의 signal이 새롭게 검출되어짐을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 화합물 2의 7위와 9'위가 ether 결합한 hydrofuran 환이 개환된 형태의 화합물인 lariciresinol일 가능성이 강하게 시사되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  상에서도 화합물 3의 7 ( $\delta$  33.7)과 9'위 (-CH<sub>2</sub>OH)의 carbon signal들 ( $\delta$  60.5)이 화합물 2의 그것들에 비해 각각 52.5 ppm 및 11.1 ppm씩 저자장 shift되었음을 확인할 수 있었다. 또 화합물 3의 HMBC spectrum 상에서 그 7'위와 9'위의 proton signal들과 그들의 각 carbon signal들 간에는 cross peak가 검출되었으나 7위와 9'위 (-CH<sub>2</sub>OH)의 carbon proton들과 그들의 각 탄소들 간에는 cross peak가 검출되지 않았다. 그리고 화합물 3의 HR-MS 분석 결과,  $M^+$  ion의 signal이 화합물 2의 그것보다 2 증가한  $m/z$  360.1567 (-0.6 mmu for C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>)로 검출되었다. 이들 각종 기기분석 결과들로부터 화합물 3은 lariciresinol로 동정되었다.

활성물질 1, 2, 3은 lignan 유도체로서, lignan은 다양한 식물체내에 그 자체로 혹은 배당체 형태로 존재하여 항산화활성, 항균활성, 항바이러스활성 등 다양한 생리활성을 갖는 것으로 보고되어 있다(12). 식물에서 lignan의 생합성 경로를 보면 pinoresinol (활성물질 2)은 piperitol (활성물질 1)의 전구체로서 coniferyl alcohol로부터 생합성되며, lariciresinol (활성물질 3)은 pinoresinol (활성물질 2)로부터 생합성되는 것으로 알려져 있다(13). 활성물질 1은 *Aptosimum spinescens* (14), *Paulownia tomentosa* (15), *Sesamum indicum* 종자(16) 등에서 분리된 바 있으며, 항산화 및 항균활성이 알려져 있다. 활성물질 2는 *Rhathiolepis ovata*에서 제조활성물질로, *Pandanus odoratissimus*에서 항산화물질로, 구상나무에서 항균물질로 각각 분리되어 보고되어진 바 있으며, 배당체로 존재하여 항산화활성을 나타낸다는 보고도 있다(17-20). 활성물질 3은 식물체에 존재하여 항산화활성(21) 외에도 항암효과(22), 타감작용(23), 위 점막 보호(24) 등의 다양한 활성을 나타낸다고 보고되어 있다.

#### 분리된 물질의 항산화 활성

개오동나무 잎의 MeOH 추출물로부터 분리하고 동정한 항산화물질 3종을 대상으로 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다. 50%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내는 물질의 농도 (SC<sub>50</sub>)를 측정된 결과, *α*-tocopherol (대조구, SC<sub>50</sub> 8  $\mu\text{g/mL}$ ) >

lariciresinol (활성물질 1, SC<sub>50</sub> 19  $\mu\text{g/mL}$ ) > pinoresinol (활성물질 2, SC<sub>50</sub> 31  $\mu\text{g/mL}$ ) > piperitol (활성물질 3, SC<sub>50</sub> 59  $\mu\text{g/mL}$ )의 순으로 항산화활성이 나타났다(Fig. 3).

Piperitol과 pinoresinol은 함께의 항산화성분으로 알려져 있으며(16), Jong 등은 *Pandanus odoratissimus*로부터 분리한 pinoresinol이 thiocyanate method에 의한 항산화활성 측정 결과 강한 활성을 나타냈다고 보고한 바 있다(18). 또한, Nagashima 등은 black sesame seed에서 분리한 pinoresinol과 lariciresinol의 DPPH 라디칼 소거활성을 조사한 결과, 항산화활성이 *α*-tocopherol > lariciresinol > pinoresinol의 순으로 나타남을 보고(21)하였는데, 본 실험에서도 같은 경향을 나타냈다.

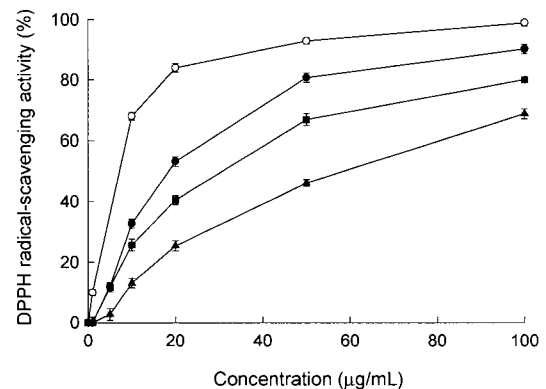


Figure 3. DPPH radical-scavenging activities of isolated compounds from leaves of *Catalpa ovata* (-○-, *α*-Tocopherol; -▲-, piperitol (active compound 1); -■-, pinoresinol (active compound 2); -●-, lariciresinol (active compound 3)). Data are shown as the mean  $\pm$  S.D. (n=3).

#### 요약

개오동나무 (*Catalpa ovata* G. Don) 잎의 MeOH 추출물은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냈으며, 이에 개오동나무 잎에 함유된 항산화물질을 구명하고자 하였다. MeOH 추출물을 용매분획하여 EtOAc 가용 중성획분을 얻고, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography로 정제한 다음 HPLC에 의해 3종의 활성물질을 분리하였다. 분리된 물질들은 HR-MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 2D-NMR 등의 기기분석에 의해 piperitol, pinoresinol, lariciresinol로 동정하였다. 이들 물질들을 대상으로 DPPH 라디칼 소거활성을 조사한 결과, lariciresinol (SC<sub>50</sub>, 19  $\mu\text{g/mL}$ ) > pinoresinol (SC<sub>50</sub>, 31  $\mu\text{g/mL}$ ) > piperitol (SC<sub>50</sub>, 59  $\mu\text{g/mL}$ )의 순으로 항산화활성이 나타났다.

#### 감사

이 논문은 2002년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Ramarathnam, N., T. Osawa, H. Ochi, and S. Kawakishi (1995), The contribution of plant food antioxidants to human health, *Trends in Food Sci. Technol.* **6**, 75-82.
- Gordon, M. H. (1996), Dietary antioxidants in disease prevention, *Nat. Prod. Rep.* 265-273.
- Branen, A. L. (1975), Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-63.
- Imamura, H. and M. Suda (1962), The chemistry of wood extractives. III. Constituents of *Catalpa ovata* G. DON, *J. Wood Research Soc. Jpn.* **8**, 127-130.
- Fujiwara, A., T. Mori, A. Iida, S. Ueda, Y. Hano, T. Nomura, H. Tokuda, and H. Nishino (1998), Antitumor-promoting naphthoquinones from *Catalpa ovata*. *J. Nat. Prod.* **61**, 629-632.
- Machida, K., M. Ando, Y. Yaoita, R. Kakuda, and M. Kikuchi (2001), Studies on the constituents of *Catalpa* species. VI. Monoterpene glycosides from the fallen leaves of *Catalpa ovata* G. DON, *Chem. Pharm. Bull.* **49**, 732-736.
- Okuda, T., T. Yoshida, and I. Ono (1975), Two new flavone glycosides from *Catalpa ovata*, *Phytochemistry* **14**, 1654-1656.
- Machida, K., M. Ogawa, and M. Kikuchi (1998), Studies on the constituents of *Catalpa* species. II. Iridoids from *Catalpa fructus*, *Chem. Pharm. Bull.* **46**, 1056-1057.
- Kuk, J. H., S. J. Ma, J. H. Moon, K. Y. Kim, S. H. Choi, and K. H. Park (2002), Antibacterial and antifungal activities of a naphthoquinone derivative isolated from the fruits of *Catalpa ovata* G. DON, *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 858-863.
- Blois, M. S. (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* **181**, 1199-1200.
- Takao, T., F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi, and K. Sakata (1994), A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish, *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1780-1783.
- Ward, R. S. (1995), Lignans, neolignans, and related compounds, *Nat. Prod. Rep.* 183-205.
- Pare, P. W., H. B. Wang, L. B. Davin, and N. G. Lewis (1994), (+)-Pinoresinol synthase: a stereoselective oxidase catalysing 8,8'-lignan formation in *Forsythia intermedia*, *Tetrahedron Lett.* **35**, 4731-4734.
- Brieskorn, C. H. and H. Huber (1976), Four new lignans from *Aptosimum spinescens* (Thunbg.), *Tetrahedron Lett.* **26**, 2221-2224.
- Ina, H., M. Ono, Y. Sashida, and H. Iida (1987), (+)-Piperitol from *Paulownia tomentosa*, *Planta Med.* **53**, 504-505.
- Kato, M. J., A. Chu, L. B. Davin, and N. G. Lewis (1998), Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds, *Phytochemistry* **47**, 583-591.
- Ahn, J. W., J. S. Choi, and K. Y. Cho (1989), The search for naturally occurring herbicidal compounds. II. Isolation of pinoresinol from *Rhathiolepis ovata* Briat and its biological activity, *KJWS* **9**, 76-79.
- Jong, T. T. and S. W. Chau (1998), Antioxidative activities of constituents isolated from *Pandanus odoratissimus*, *Phytochemistry* **49**, 2145-2148.
- Kim, Y. G., J. S. Jo, and C. K. Moon (1999), Antimicrobial activities of the lignans from *Abies koreana* Wilson, *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 260-262.
- Katsuzaki, H., M. Kawasumi, S. Kawakishi, and T. Osawa (1992), Structure of novel antioxidative lignan glucosides isolated from sesame seed, *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 2087-2088.
- Nagashima, M., Y. Fukuda, and R. Ito (1999), Antioxidative lignans from industrial wastewater in cleaning of black sesame seed, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **46**, 382-388.
- Suh, N., L. Iyengi, H. H. S. Fong, A. D. Kinghorn, and J. M. Pezzuto (1995), Discovery of natural product chemopreventive agents utilizing HL-60 cell differentiation as a model, *Anticancer Res.* **15**, 233-240.
- Hiroshi, N., F. Yoshiharu, Y. Kosumi, K. Seiji, Y. Shosuke, H. Koji, and S. Takahisa (2002), Isolation and identification of plant growth inhibitors as candidate for allelopathic substance from aqueous leachate from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) leaves, *Plant Growth Regulation* **37**, 113-117.
- Hiroyuki, H., T. Takashi, Y. Yukako, Y. Toshio, and S. Tetsuro (2000), Analysis of gastric mucous membrane-protective compounds in *Coptidis rhizoma*, *Natural Med.* **54**, 209-212.