

독일가문비(*Picea abies* Karsten) 잎 추출성분의 항산화 활성

이상극¹ · 배영수^{2*}

¹국립산림과학원 화학미생물과, ²강원대학교 산림과학대학 임산공학과

Antioxidant Activity of the Extractives from the Needles of *Picea abies* Karsten

Sang-Keug Lee¹ and Young-Soo Bae^{2*}

¹Department of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

²Department of Wood Science & Engineering, College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

요약: 독일가문비(*Picea abies* Karsten) 잎을 채취하여 건조시킨 후 분쇄하여 1.5 kg을 acetone-H₂O(7:3, v/v)로 추출하고 hexan, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 물 가용부로 분획하여 동결건조 시켰다. 에틸아세테이트 및 물 가용부를 Sephadex LH-20으로 충전한 칼럼에서 MeOH와 EtOH-*n*-hexane 혼합액을 용출용매로 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시하였다. 단리된 화합물들은 셀룰로오스 박층크로마토그래피(TLC)로 확인한 후 ¹H-, ¹³C-NMR 등의 스펙트럼을 사용하여 정확한 구조를 규명하였고 FAB 및 EI-MS로써 분자량을 측정하였다. 독일가문비 잎의 에틸아세테이트 가용부에는 (+)-catechin(화합물 I), (-)-epicatechin(화합물 II), kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside(화합물 III), 4-hydroxyacetophenone(화합물 IV)가 분리되었으며 물 가용부에서는 (+)-catechin(화합물 I)과 protocatechuic acid(화합물 V)가 분리되었다. 각 분획물 및 단리된 화합물들은 DPPH 라디칼 소거법을 이용하여 항산화 시험을 실시하였으며, 분획물중에는 에틸아세테이트 가용부, 그리고 화합물중에는 (+)-catechin과 (-)-epicatechin에서 기준물질과 유사한 우수한 항산화 효능이 있는 것으로 나타났다.

Abstract: The dried needles (1.5 kg) of *Picea abies* Karsten were ground, extracted with acetone-H₂O (7:3, v/v), concentrated, and fractionated with a series of *n*-hexane, methylene chloride, ethyl acetate and water on a separatory funnel. Each fraction was freeze dried, then a portion of ethyl acetate soluble powder was chromatographed on a Sephadex LH-20 column using a series of aqueous methanol and ethanol-*n*-hexane mixture as eluents. The isolated compounds were identified by cellulose TLC, ¹H-, ¹³C-NMR, FAB and EI-MS. (+)-catechin (compound I), (-)-epicatechin (compound II), kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside (compound III), 4-hydroxyacetophenone (compound IV) were isolated from the ethyl acetate soluble fraction and (+)-catechin (compound I), protocatechuic acid (compound V) were isolated from the H₂O soluble fraction of *P. abies* needle. The antioxidative activities of each fraction and the isolated compounds were tested by DPPH radical scavenging method, and EtOAc soluble fraction, (+)-catechin and (-)-epicatechin showed similar values to α-tocopherol and BHT as controls.

Key words : *Picea abies*, 4-hydroxyacetophenone, protocatechuic acid, HPLC, DPPH radical

서론

독일가문비(*Picea abies* Karsten)는 유럽에서 들어온 상록침엽교목으로 원산지에서는 높이가 50 m에 달하며 잎의 길이는 1~2 cm이다. 음수(陰樹)이나 생장이 비교적 빠른 편이고 부식질(腐植質)이 많은 비옥(肥沃)한 적윤지(滴潤地)에서 잘 자라며 천근성(淺根性)이므로 풍도(風倒)의

해(害)가 있다고 알려졌다(임업연구원, 1987). 잎은 바늘 모양으로 생겼고 길이 1~2 cm로 능형(稜形)으로 두드러진 것이 특징이다. 꽃은 6월에 피고 길이가 10~15 cm가 되는 구과(毬果)는 10월에 가지와 같이 아래로 처져 달리며 연한 갈색이지만 익기 전에는 자줏빛이 도는 녹색이다(김태욱, 1996; 이창복, 1985). 목재의 재질이 양호하여 유럽에서는 주요 조림수종으로 대량 식재하고 있으며 수자(樹姿)가 좋아서 독립수(獨立樹), 기념비(紀念碑) 등 풍치수(風致樹) 외에 주로 관상용, 가구재 등으로 이용되어 왔다. 국

*Corresponding author
E-mail: bae@kangwon.ac.kr

내외적으로 독일가문비에 대한 생태학적인 연구는 많이 수행되어 있지만 잎의 성분분석 및 활성 시험에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

우리나라의 경우 침엽수와 활엽수의 비율이 서로 비슷한 구성을 나타내고 있으나 수목의 약리적, 기능적 이용에는 대부분 활엽수가 이용되어 왔으며 침엽수의 이용은 매우 제한적이었고 잎의 추출성분에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 국내에 식재되어 있는 침엽수 잎 추출성분들의 효율적 이용에 관한 연구 중의 하나로, 추출성분을 분리정제하여 화학구조를 결정하고, HPLC를 이용한 정량분석을 실시하여 각 화합물들의 정확한 함유량을 구하고자 하였다. 또한, 기초적인 생리활성 실험으로서 DPPH 라디칼 소거능법을 이용한 항산화 시험을 수행하여 수목으로부터 얻어지는 천연물을 약리적 및 기능적으로 응용하기 위한 기초 자료를 얻기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

2000년 7월 강원도 춘천시 사농동 산림개발연구원에서 독일가문비 잎을 채취하여 실험실에서 약 2주간 상온으로 음건한 후 분쇄기를 사용하여 분쇄하였다.

2. 추출물의 조제 및 분리

분쇄하여 거진 된 독일가문비 잎 1.5 kg을 10 l의 유리용기에 넣고 acetone-H₂O(7:3, v/v) 혼합용액에 침적하여 상온에서 약 3일간 추출하였으며, 충분한 양을 얻기 위하여 이와 같은 조작을 4회 반복 실시하여 농축하였다. 농축된 추출물은 분획할때기에서 헥산 가용부, 메틸렌클로라이드 가용부, 에틸아세테이트 가용부 및 물 가용부로 분리하고 농축하였으며 동결 건조하여 얻어진 가용부는 각각 50.04 g, 6.58 g, 41.25 g, 256.34 g 이었다.

3. 추출물의 단리 및 구조규명

독일가문비 잎의 에틸아세테이트 가용부에서 단일 화합물을 단리, 정제하기 위하여 칼럼크로마토그래피를 실시하였으며 충전물질로는 Sephadex LH-20을 사용하였고 용출용매는 EtOH-*n*-hexane 혼합액과 MeOH 수용액을 사용하였다. 칼럼으로부터의 용출액은 fraction collector (Gilson FC 204)를 이용하여 순차적으로 시험관에 받았으며 분리된 물질의 확인은 셀룰로오스 박층크로마토그래피(TLC)를 이용하여 확인하였다. 전개용매로 6% AcOH (solvent A)과 *t*-BuOH-AcOH-H₂O(3:1:1, v/v/v, solvent B)를 사용하였으며 TLC상에 전개된 화합물은 UV램프 (ENF-240C)로 254 nm에서 관찰하였고, vanillin-HCl-

EtOH 용액을 분무하여 발색되는 색깔을 관찰하였다. 또한 단리화합물의 순도를 확인하기 위하여 solvent A와 solvent B를 순차적으로 교차하여 전개하는 2차원 박층크로마토그래피를 실시하였다. 한편, 결정 또는 침전물이 생기는 경우에는 재결정법을 실시하여 정제하였다.

독일가문비 잎 에틸아세테이트 가용부 26.15 g을 유리 칼럼에 주입하고 용출용매로는 MeOH-H₂O(4:1, v/v)를 사용하여 4개의 fraction으로 분리하였으며 PLE로 표기하였다. PLE-2 fraction을 MeOH-H₂O(2:1, 1:2, v/v), EtOH-*n*-hexane(4:1, 3:1, v/v), 그리고 EtOH-H₂O(3:1, v/v) 등을 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 4-hydroxyacetophenone(화합물 IV)과 kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside(화합물 III)를 단리 하였다. PLE-3 fraction을 MeOH-H₂O(1:1, 1:4, v/v)와 EtOH-hexane(4:1, v/v)을 용출용매로 칼럼크로마토그래피를 실시하여 (-)-epicatechin(화합물 II)과 (+)-catechin(화합물 I)을 단리 하였다. 한편, 독일가문비 잎 물 가용부 27.0 g을 용출용매 MeOH-H₂O(1:1, v/v)을 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시하였으며 PLH로 표기하였다. PLH-4 fraction을 MeOH-H₂O(1:3 v/v)을 용출용매로 칼럼크로마토그래피를 실시하여 protocatechuic acid(화합물 V)를 단리 하였으며 PLH-5 fraction을 MeOH-H₂O(1:3 v/v)을 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 (+)-catechin(화합물 I)을 단리 하였다.

4. 단리화합물의 구조분석

단리된 화합물들의 구조 분석은 NMR spectrometer (Bruker ADVANCE DPX,)를 사용하여 ¹H-, ¹³C-NMR 스펙트럼을 분석하였으며 분자량은 Mass spectrometer (VG70-VSEQ)를 이용하여 FAB 및 EI-MS를 측정하였다.

1) 화합물(I): (+)-Catechin

R_f: 0.53 (solvent A), 0.37 (solvent B)

¹H-NMR (400 MHz, δ, MeOH-*d*₄): 2.50 (1H, *dd*, *J* = 8.15 Hz and *J* = 16.12 Hz, H-4ax), 2.84 (1H, *dd*, *J* = 5.43 Hz and *J* = 16.14 Hz, H-4eq), 3.95 (1H, *m*, H-3), 4.56 (1H, *d*, *J* = 7.50 Hz, H-2), 5.86 (1H, *d*, *J* = 2.16 Hz, H-6), 5.96 (1H, *d*, *J* = 2.27 Hz, H-8), 6.71 (1H, *dd*, *J* = 1.70 Hz and *J* = 8.16 Hz, H-6'), 6.76 (1H, *d*, *J* = 8.11 Hz, H-5'), 6.83 (1H, *d*, *J* = 1.61 Hz, H-2').

¹³C-NMR (100 MHz, δ, MeOH-*d*₄): 28.94 (C-4), 69.23 (C-3), 83.27 (C-2), 95.91 (C-8), 96.69 (C-6), 101.22 (C-10), 115.66 (C-2'), 116.49 (C-5'), 120.46 (C-6'), 132.63 (C-1'), 146.64 (C-4'), 146.66 (C-3'), 157.33 (C-7), 158.00 (C-5), 158.25 (C-9).

2) 화합물(II): (-)-Epicatechin

R_f : 0.45 (solvent A), 0.35 (solvent B)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ , MeOH- d_4): 2.73 (1H, *dd*, $J = 16.72$ Hz and $J = 2.45$ Hz, 4ax), 2.86 (1H, *dd*, $J = 4.58$ Hz and $J = 16.80$ Hz, H-4eq), 4.17 (1H, *br s*, H-3), 4.81 (1H, *br s*, H-2), 5.92 (1H, *s*, H-6), 5.94 (1H, *s*, H-8), 6.77 (2H, *m*, H-5', 6'), 6.97 (1H, *br s*, H-2').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ , MeOH- d_4): 29.25 (C-4), 67.47 (C-3), 79.86 (C-2), 95.87 (C-8), 96.37 (C-6), 100.05 (C-10), 115.30 (C-2'), 115.88 (C-5'), 119.38 (C-6'), 132.27 (C-1'), 145.76 (C-4'), 145.95 (C-3'), 157.36 (C-7), 157.65 (C-5), 157.99 (C-9).

3) 화합물(III): Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside

R_f : 0.58 (solvent A)과 0.22 (solvent B)

FAB-MS m/z : 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 338, 329 (Base ion), 286, 245.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ , MeOH- d_4): 3.21~3.94 (5H, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''), 5.24 (1H, *d*, $J = 7.06$ Hz, H-1''), 6.19 (1H, *d*, $J = 1.08$ Hz, H-6), 6.38 (1H, *br s*, H-8), 6.88 (2H, *d*, $J = 8.57$ Hz, H-3', 5'), 8.05 (2H, *d*, $J = 8.71$ Hz, H-2',6').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ , MeOH- d_4): 62.64 (C-6''), 71.37 (C-4''), 75.76 (C-2''), 78.06 (C-5''), 78.43 (C-3''), 94.85 (C-8), 100.00 (C-6), 104.16 (C-1''), 105.69 (C-10), 116.10 (C-3', 5'), 122.80 (C-1'), 132.32 (C-2', 6'), 135.49 (C-3), 158.53 (C-2), 159.09 (C-9), 161.61 (C-4'), 163.06 (C-5),

166.24 (C-7), 179.51 (C-4).

4) 화합물(IV): 4-Hydroxyacetophenone

R_f : 0.86 (solvent A), 0.54 (solvent B)

EI-MS m/z : 136 $[\text{M}]^+$, 122, 121 (Base ion), 93, 65.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ , MeOH- d_4): 2.51 (3H, *s*, H-8), 6.84 (2H, *d*, $J = 8.76$ Hz, H-2,6), 7.88 (2H, *d*, $J = 8.76$ Hz, H-3, 5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ , MeOH- d_4): 26.67 (C-8), 116.61 (C-2, 6), 130.59 (C-1), 132.52 (C-3, 5), 164.32 (C-4), 199.90 (C-7).

5) 화합물(V): Protocatechuic acid

R_f : 0.66 (solvent A), 0.38 (solvent B)

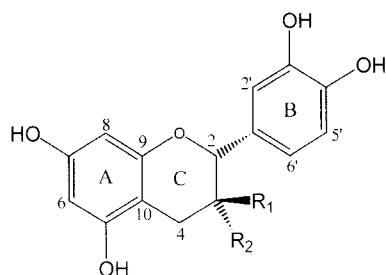
EI-MS m/z : 154 $[\text{M}]^+$, Base ion, 137, 110, 81, 63, 53.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, δ , MeOH- d_4): 6.65 (1H, *d*, $J = 8.16$ Hz, H-5), 7.28 (1H, *dd*, $J = 1.94$ Hz and $J = 8.23$ Hz, H-6), 7.33 (1H, *d*, $J = 1.93$ Hz, H-2).

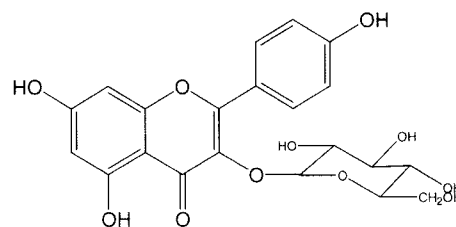
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, δ , MeOH- d_4): 114.75 (C-2), 116.72 (C-5), 122.37 (C-1), 122.86 (C-6), 144.03 (C-3), 150.44 (C-4), 169.45 (C-7).

5. DPPH radical 소거법을 이용한 항산화 실험

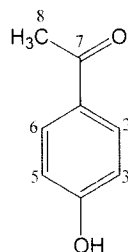
각 가용부와 단리화합물들을 적당한 농도로 희석한 메탄올 용액 4.0 ml와 0.15 mM의 DPPH 1.0 ml를 섞은 후 상온에서 30분간 반응시킨 뒤 514 nm에서 흡광도 감소를



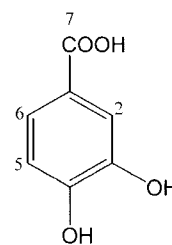
$R_1=\text{OH}$, $R_2=\text{H}$ (+)-Catechin
 $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$ (-)-Epicatechin



Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside



4-Hydroxyacetophenone



Protocatechuic acid

Figure 1. Compounds isolated from the needles of *P. abies*.

측정하였다. 항산화 효과는 시료 무침가 대조군에 대한 50% 흡광도의 감소를 나타내는 검체의 농도(IC₅₀)로 나타내었다. 항산화력은 합성항산화제인 BHT와 천연항산화제인 α -tocopherol과 비교하면서 각 화합물 및 분획물의 IC₅₀을 구하여 항산화 활성이 우수한 물질을 탐색하고자 하였다.

결과 및 고찰

독일가문비 잎의 에틸아세테이트 가용부로부터 (+)-catechin(I), (-)-epicatechin(II), kaempferol-7-O- β -D-glucopyranoside(III), 4-hydroxyacetophenone(IV), protocatechuic acid(V)를 분리 하였으며 (+)-catechin은 노간주나무 잎의 추출성분(이 등, 2004)에서 보고한 바 있다.

1. 화합물(II)

화합물(II)는 (+)-catechin과 함께 가장 많이 알려진 flavan-3-ol 화합물로서 축합형탄닌을 구성하는 기본 화합물중의 하나로 그 차이점은 C-2에 치환된 방향환과 C-3에 결합된 수산기가 C환에 대해 나란히 뒤로 결합된 *cis*의 구조를 이루고 있다.

¹H-NMR 스펙트럼은 (+)-catechin과 거의 유사하지만 C-3의 수산기 위치의 차이에 의해 약간 다른 signal을 보이고 있다. 4.81 ppm과 4.17 ppm에서 singlet signal은 heterocyclic C환의 H-2와 H-3에 해당하는 것이고, H-4의 axial 과 equatorial 수소는 2.73 ppm과 2.86 ppm에서 *J* 값이 axial 수소가 2.45 Hz, 16.72 Hz이며 equatorial 수소가 4.58 Hz, 16.80 Hz인 double doublet signal을 보이고 있다. 이것은 (+)-catechin에 비해 H-2와 H-3은 0.22 ppm과 0.25 ppm 정도 downfield되었으며 H-4ax은 0.23 ppm 정도 downfield되어 나타나고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 C-2, -3, -4가 각각 79.86 ppm, 67.40 ppm, 29.25 ppm에서 signal을 나타내는데, (+)-catechin에 비해 C-4는 1 ppm 정도 downfield되었고, C-2, -3은 4 ppm과 2 ppm씩 upfield 되어 있는 차이를 보이고 있다. 이것은 C-3위치의 수산기가 밑으로 내려가 있는 형태, 즉 H-2와 H-3이 *cis*형태임을 나타내는 증거이며 (+)-catechin과 가장 잘 구분되는 signal이다. 또한, ¹H-NMR 스펙트럼의 phloroglucinol A환의 H-6과 H-8은 각각 5.92 ppm과 5.94 ppm에서 나타나고 있는데, H-6이 약 0.1 ppm downfield된 차이를 보이고 있으며 ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 차이가 없었고, catechol B환의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 스펙트럼은 (+)-catechin과 동일한 피크를 나타내었다.

이상의 결과는 Ohara와 Hemingway(1989), Foo 등(2000)이 분리한 (-)-epicatechin과 동일한 NMR값을 나타내고 있으며 Lee 등(1997)이 생강나무의 수피로부터 보고

한 (-)-epicatechin과도 일치하고 있다.

2. 화합물(III)

화합물(III)은 aglycone이 kaempferol로서 C-3위에 glucose가 결합을 하고 있는 구조이다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 6.19 ppm과 6.38 ppm의 signal은 phloroglucinol A환의 H-6과 H-8에 해당하며 8.05 ppm과 6.88 ppm의 두 개의 signal은 B환의 H-2', -6'과 H-3', -5'에 해당하는 것으로서 서로 *ortho* coupling되어 *J*값이 각각 8.76 Hz, 8.57 Hz를 나타내고 있는데, 이것은 B환이 서로 대칭되는 구조를 가지는 phenol 환임을 알 수 있다. 이에 대한 ¹³C-NMR 스펙트럼은 A환의 C-6과 C-8은 100.00 ppm과 94.85 ppm에서 signal을 나타내고 있으며 OH기가 결합을 하고 있는 C-5와 C-7은 이보다 크게 downfield된 163.06 ppm과 166.24 ppm에서 나타나고 있다. 또한, B환의 C-2', -6'과 C-3', -5'은 132.32 ppm과 116.10 ppm에서 하나의 signal로 나타나기 때문에 서로 대칭구조임을 알 수 있으며 OH기가 결합한 C-4'는 크게 downfield된 161.61 ppm에서 signal을 주고 있다. 이상은 Ho 등(2002)이 콩잎의 butanol 추출물에서 분리한 화합물들과 일치하고 있다. 한편, ¹H-NMR 스펙트럼에서 5.24 ppm의 doublet signal은 C-3에 결합된 glucose의 H-1"에 해당하는 것으로 *J* 값이 7.06 Hz인 것으로 보아 β -D-glucose임을 알 수 있었고 나머지 glucose의 수소들은 3.21~3.94 ppm에서 전형적인 signal을 나타내고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-1"은 104.16 ppm에서 downfield되어 나타나며 76.76 ppm, 78.48 ppm, 71.37 ppm, 78.06 ppm, 62.64 ppm의 signal은 나머지 glucose의 전형적인 형태를 보여주고 있다. C환의 C-2와 C-3은 flavanone 화합물보다 크게 downfield되어 158.53 ppm과 135.49 ppm에서 signal을 주는 것으로 이중결합임을 알 수 있으며 특히 kaempferol의 C-2와 C-3보다 각각 8 ppm과 3 ppm 정도 더 downfield된 것으로 glucose가 C-3에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 또한 carbonyl 탄소인 C-4는 C-2와 C-3이 이중결합이고 C-3에 glucose가 결합되어 있기 때문에 flavanone 보다 약 15 ppm 정도 upfield되어 나타나는 차이를 보이고 있다.

이상의 결과는 Harborne과 Mabry (1982) 그리고 Agrawal (1989)이 보고한 화합물과 일치하며 Johnson 등(2001)이 보고한 kaempferol 배당체와 일치하고 있다. 또한, Moreno 등(2001)과 Kim 등(1997)이 보고한 kaempferol 배당체와도 동일한 값을 나타내었으며 FAB-MS 스펙트럼에서 분자량 분석은 *m/z* 449 [M+H]⁺로서 이 화합물의 분자량 448과 일치하였다.

3. 화합물(IV)

화합물(IV)는 phenol 환에 acetoxy기가 결합하고 있는

acetophenone을 기본골격으로 하며 C-4위치에 OH기가 결합하고 있는 형태의 화합물이다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 2.51 ppm의 singlet signal은 acetoxy기의 -CH₃를 나타내며 ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 26.67 ppm에서 signal을 나타내고 있다. 또한, 199.90 ppm의 signal은 acetoxy기의 C=O에 해당하는 것으로 이러한 유형은 함(2000)이 보고한 picein과 Ternai와 Markham(1976)이 보고한 acetophenone 계열 화합물들의 acetoxy기와 동일하게 나타났다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 6.84 ppm과 7.88 ppm에서 doublet signal은 H-2, -6과 H-3, -5에 해당하며 *J* 값은 8.76 Hz로서 *ortho* coupling되어 있고 서로 대칭 형태임을 알 수 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-2, -6은 116.61 ppm에서, C-3, -5는 132.52 ppm에서 강한 signal을 보이고 C-1은 130.59 ppm에서 signal이 나타나며 OH기가 결합하고 있는 C-4는 164.32 ppm에서 나타나고 있다. 이것은 Rasmussen 등(1995)이 보고한 4-hydroxyacetophenone과 일치하며 Shao 등(1995)이 *Aster batangensis*의 뿌리에서 단리한 acetophenone 배당체와도 일치하였다. EI-MS 분석에서는 *m/z* 136[M]⁺ 으로서 이 화합물의 분자량 136과 일치하였다.

4. 화합물(V)

화합물(V)는 benzoic acid 계열인 pyrocatechol의 유도체로서 benzoic acid의 C-3과 C-4의 위치에 OH기가 결합된 형태의 화합물이다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 H-5의 signal은 6.65 ppm에서 doublet으로 나타나는데, *J* 값이 8.16 Hz인 것으로 보아 H-6과 *ortho* coupling 되었음을 알 수 있고, H-6은 7.28 ppm에서 double doublet으로 나타나는데, *J* 값이 각각 1.94 Hz와 7.33 Hz인 것으로서 H-5와는 *ortho* coupling, H-2와는 *meta* coupling 되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 H-2는 7.33 ppm에서 H-6과 *meta* coupling이 되어 *J* 값이 1.93 Hz인 doublet signal을 보이고 있다. 따라서 이상의 chemical shift로써 catechol형태의 구조임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 169.45 ppm의 signal은 전형적인 carboxyl기를 나타내고 있으며 OH기가 결합하고 있는 C-3과 C-4는 144.03 ppm과 150.44 ppm에서 signal을 주고 있다. 한편, methine 탄소인 나머지 C-2, -5, -6은 각각 114.75 ppm, 116.72 ppm, 122.86 ppm에서 signal을 나타내고 있으며 carboxyl기가 결합하고 있는 C-1은 122.37 ppm에서 signal을 주고 있다. 이상은 flavonoid catechol환의 chemical shift와 매우 유사한 형태를 보여주고 있으며 Cha 등(2000)이 보고한 protocatechuic acid와 일치하고 있으며 Kim과 Bae(2001)가 비자나무 잎에서 단리한 화합물과도 정확하게 일치하고 있다. EI-MS 스펙트럼에서 분자량 분석은 *m/z* 154[M]⁺ 로서 이 화합물의 분자량 154와 일치하였다.

Table 1. Antioxidation activities of the fractionated extracts and isolated compounds from the needles of *P. abies*.

	Sample	IC ₅₀ (μg)
Control	BHT	12
	α-tocopherol	14
Crude and fractionated extractives from the needles of <i>P. abies</i>	Crude extractive	22
	Hexane soluble fraction	37
	CH ₂ Cl ₂ soluble fraction	24
	EtOAc soluble fraction	20
	H ₂ O soluble fraction	36
Isolated compounds from the needles of <i>P. abies</i>	(+)-Catechin	11
	(-)-Epicatechin	12
	Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside	-
	4-Hydroxyacetophenone	-
	Protocatechuic acid	-

5. 분획물 및 단리 화합물의 항산화능

독일가문비 잎의 조추출물 및 분획물, 그리고 단리 화합물을 가지고 DPPH radical 소거법을 이용하여 기초적인 항산화 시험을 실시하였다. 기준물질로는 합성 항산화제인 BHT와 천연 항산화제인 α-tocopherol을 사용하여 항산화능을 비교하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 조추출물 및 에틸아세테이트 가용부에서 우수한 항산화 효능을 나타내었으며 단리 화합물 중에는 (+)-catechin과 (-)-epicatechin이 기준물질과 비슷한 높은 항산화 효능을 나타내었으며 이것은 조추출물 및 에틸아세테이트 가용부가 우수한 활성을 나타내는 것과 관련이 있는 것으로 생각된다.

결론

독일가문비 잎의 에틸아세테이트 및 물 가용부를 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피를 수행한 결과 (+)-catechin, (-)-epicatechin, kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside, 4-hydroxyacetophenone이 에틸아세테이트 가용부에서 단리 되었으며 물 가용부에서는 (+)-catechin 및 protocatechuic acid가 단리 되었다. (+)-catechin, 4-hydroxyacetophenone, protocatechuic acid는 주로 결정으로 얻을 수 있었으며 4-hydroxyacetophenone은 독일가문비 잎에서는 처음으로 단리 되었다. 각 분획물 및 단리 화합물에 대한 DPPH radical 소거법을 이용한 항산화 실험에서 조추출물 및 에틸아세테이트 가용부가 항산화 효능을 나타내었고 (+)-catechin과 (-)-epicatechin이 기준물질과 비슷한 우수한 항산화 효능을 나타내었다.

인용문헌

1. 김태욱. 1996. 한국의 수목. 교학사. pp. 15-49.

2. 이창복. 1985. 대한식물도감. 향문사. pp. 59-68.
3. 임업연구원. 1987. 한국수목도감. pp. 496.
4. 함연호. 2000. 사시나무屬과 버드나무屬 主要 樹種 樹皮의 抽出成分에 關한 研究. 강원대학교 박사학위논문.
5. Agrawal, P.K. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier.
6. Cha, B.C., S.B. Lee, T.J. Rhim, and K.H. Lee. 2000. Constituents of Antioxidative Activity and Free Radical Scavenging Effect from *Galla Rhois* (*Rhus javanica* Linne). *Kor. J. Pharmacognosy*. 31(2): 185-189.
7. Foo, L.Y., Y. Lu, A.L. Molan, D.R. Woodfield, and W.C. McNabb. 2000. The phenols and prodelphinidins of white clover flowers. *Phytochemistry*. 54: 539-548.
8. Harborne, J.B. and T.J. Mabry. 1982. The Flavonoids: advances in research. Chapman and Hall Ltd.
9. Ho, H.M., R.Y. Chen, L.K. Leung, F.L. Chan, Y. Huang, and Z.Y. Chen. 2002. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soyleaf. *Biomed Pharmacother*. 56: 289-295.
10. Kim, J.K., W.G. Park, and Y.S. Bae. 1997. Flavonoid glycosides from needles of *Larix leptolepis* (Pinaceae). *Mokchaekonghak*. 25(2): 81-87.
11. Kim, J.K., Y.S. Bae. 2001. Extractives from the needles of *Torreya*. *Mokchaekonghak*. 29(4): 53-59.
12. Lee, S.K., W.G. Park, and Y.S. Bae. 1997. Procyanidins from *Lindera obtusiloba* Bark. *Mokchaekonghak*. 25(2): 110-116.
13. Moreno, A., M. Cordero, I. Guerra, and M.V. Toro. 2002. Flavonoids from *Dorycnium rectum*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 30: 73-74.
14. Ohara, S.R. and W. Hemingway. 1989. The phenolic extractives in southern red oak (*Quercus falcata* Michx. var. *falcata*) bark. *Holzforschung*. 43: 149-154.
15. Rasmussen, S., C. Wolff, and H. Rudolph. 1995. Compartmentalization of Phenolic Constituents in *Sphagnum*. *Phytochemistry*. 38(1): 35-39.
16. Shao, Y., Y.L. Li, and B.N. Zhou. 1996. Phenolic and Triterpenoid Glycosides from *Aster Batangensis*. *Phytochemistry*. 41(6): 1593-1598.
17. Ternai, B. and K.R. Markham. 1976. Carbon-¹³NMR studies of flavonoids-I: flavones and flavonols. *Tetrahedron*. 32: 565-569.

(2006년 5월 4일 접수; 2006년 6월 16일 채택)