

산겨릅나무 줄기에서 이소프렌계 화합물의 분리

허중문 · 전미라¹ · 양은주 · 최선하 · 박종철² · 송경식*

경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부, ¹자연과학대학 생명공학부, ²순천대학교 한약자원학과

Isolation of Isoprenoidal Compounds from the Stems of *Acer tegmentosum* Max

Jong-Moon Hur, Mira Jun¹, Eun-Ju Yang, Sun-Ha Choi, Jong Cheol Park², and Kyung Sik Song*

School of Applied Biosciences, College of Agriculture and Life Sciences,
Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Republic of Korea

¹School of Life Sciences and Biotechnology, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Republic of Korea

²Department of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Republic of Korea

Abstract – The stems of *Acer tegmentosum* Max were extracted with MeOH and then partitioned with CH₂Cl₂, *n*-BuOH, and H₂O, successively. Three compounds were isolated from the CH₂Cl₂ fraction through repeated column chromatographic separation. Their chemical structures were elucidated as β -sitosterol, β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucoside, and epifriedelinol by comparison of spectral data with those in references. These three compounds were firstly isolated from this plant.

Key words – *Acer tegmentosum*, sterol, epifriedelinol

현재, 한반도에 자생하는 것으로 알려진 단풍나무과 식물 은 신나무 (*Acer ginnala*), 고로쇠나무 (*A. mono*), 만주고로쇠 (*A. truncatum*), 산겨릅나무 (*A. tegmentosum*), 시달나무 (*A. tschonoskii* var. *rubripes*), 청시달나무 (*A. barbinerve*), 부계꽃나무 (*A. ukurunduense*), 단풍나무 (*A. palmatum*), 복자기 (*A. triflorum*), 복장나무 (*A. mandshuricum*) 등의 18여종이 알려져 있다.¹⁾ 이들 식물 중, 신나무 (*A. ginnala*) 어린 싹을 차조이라 하여 간열목적, 감창두통을 치료하는데 사용하고, 거풍제습, 활혈거어의 효능이 있는 고로쇠나무 (*A. mono*)의 수피를 지금척이라 하여 풍습골통, 골절, 타박손상 등의 치료에, 복자기 (*A. triflorum*)의 수액을 삼화척, 단풍나무 (*A. palmatum*)의 잎을 계조척이라 하여 담천해소와 복통 및 관절산통 치료에 각각 사용하고 있다.^{2,3)}

산겨릅나무 (*Acer tegmentosum* Max)는 단풍나무과 (Aceraceae)에 속하며 고산지대의 계곡에서 자라는 낙엽소교목으로 소지는 녹색이고 털이 없으며 줄이 있다. 잎은 대생하고 넓은 난형이다. 엽병은 길이 3~8 cm이며, 꽃은 총상화서로 가지 끝에서 밑으로 처지며, 길이가 8 cm로 5월에

핀다. 열매는 길이 3 cm로 수평으로 벌어지고 9월에 익는다. 수피는 섬유조직이 잘 발달해 새끼 대신 사용한다.¹⁾ 중국에서는 줄기를 청해척이라 하여 소종과 외상출혈 치료에 사용하고,²⁾ 한국에서는 최근에 벌나무 또는 산청목이라 하여 주로 간암, 간경화 등의 치료제로 민간에서 널리 유통되고 있으나, methyl gallate 4-*O*- β -D-glucoside와 salidroside⁴⁾를 제외하고는 식물화학적 연구는 거의 이루어져 있지 않다.

한편, 식물 중의 중요 이차 대사산물을 분리, 동정하는 것은 식물 추출물을 이용하여 건강기능식품이나 천연물 신약 등을 개발할 때의 산업화 과정 중에서, 품질 관리를 위한 지표성분이나 약효성분으로서 매우 중요한 위치를 차지하며 천연물 유래의 신약을 개발 시에도 선도물질을 제공한다는 측면에서 필수적인 연구과정이다. 또한 식물 분류학적 견지에서 chemotaxonomy를 이용할 때나 재배지에서 식물의 최적 생육환경을 설정할 때에도 이용할 수 있어 그 의미가 매우 크다고 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 산겨릅나무 줄기의 methylene chloride (CH₂Cl₂, MC) 가용부를 대상으로 각종 chromatography를 이용하여 함유된 화합물을 분리하고, 분광학적 기기분석을 이용하여 화학구조를 동정 하였다.

*교신저자(E-mail): kssong@knu.ac.kr
(FAX): 053-956-5715

재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용한 산겨릅나무 줄기는 2004년 3월에 서울 경동시장 한약도매상에서 절단하여 건조한 것을 구입하여 사용하였으며, 표본은 경북대학교 전통기술첨단화 연구실에 비치하였다 (voucher no. NPC-AT-1).

시약 및 기기 - 분리한 성분의 ^1H 과 ^{13}C NMR분석은 Bruker사 Avance Digital 400 spectrophotometer (Karsruhe, Germany)를 사용하여 400 MHz와 100 MHz에서 측정하였으며 chemical shift는 TMS (tetramethyl silane)를 기준물질로 하여 ppm으로 나타내었다. 그리고 GC-MS 분석은 ionization source (70 eV)로 EI를 사용하는 HP6890 system으로 하였다. 분석에는 HP-5 MS capillary column (30 m \times 0.25 mm, film thickness: 0.25 μm)을 사용하였고, carrier gas는 helium gas (0.7 ml/min)를, detector로 Agilent 5973 mass selective detector를 각각 사용하였다. GC oven 온도는 70°C (1 min)에서 7°C/min 조건으로 300°C (15 min)까지 증가시켰으며, injector 온도는 250°C를 유지하였다. 그리고 GC-MS 분석을 통해 시료의 total ion chromatogram을 얻은 후, Wiley 275 mass spectra library의 자료와 비교하여 화합물의 구조 동정에 참고하였다. TLC는 precoated silica gel (Kieselgel 60F₂₅₄)을, column용 순상 충전제로는 70-230 mesh silica gel (Art. 7734)을 각각 Merck사 (NJ, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 용매 및 기타 시약은 일급 및 특급 시약을 사용하였다.

추출 및 정제 - 산겨릅나무 줄기 (1 kg)를 MeOH에 7일간 실온에서 3회 반복 냉침한 후, 추출액을 감압농축기를 이용, 용매를 제거하여 추출물 43.1 g을 얻었다. 이 추출물을 10% MeOH로 현탁시킨 다음, CH_2Cl_2 , *n*-BuOH, H_2O 순으로 극성에 따라 분획하여 12 g, 13.2 g, 15 g을 각각 얻었다. 이 중 MC 가용성 분획 (8.5 g)을 silica gel column (4 \times 70 cm) chromatography를 하여 hexane-EtOAc 혼합용매 (100 : 0 \rightarrow 1 : 1), 100% MC, MC-MeOH (10 : 1) 순으로 극성을 증가시키면서 용출하여 TLC 패턴에 따라 7개의 fraction으로 나누었다 (ATC1~7). ATC3 fraction에서 백색 분말상 화합물 1 (250 mg)을 얻었으며, ATC6 fraction에서 역시 백색 분말상 화합물 2 (130 mg)가 분리되었다. 그리고 ATC4 fraction에 대하여 용출용매로 hexane-EtOAc 혼합용매 (100 : 0, 500 : 1, 250 : 1)를 사용하는 silica gel (70-230 mesh) column (2.5 \times 60 cm) chromatography를 실시하여 4개의 sub-fraction (ATC4A~D)을 얻었으며, ATC4C fraction에서 백색 분말상 화합물 3 (30 mg)을 단일물질로 얻었다.

화합물 1 - ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.33 (1H, m, H-6), 3.50 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), 0.83 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-26), 0.81 (3H, s, H-27), 0.85 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-29), 0.78

(3H, s, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 140.64 (C-5), 121.62 (C-6), 71.70 (C-3), 56.75 (C-14), 55.93 (C-17), 45.72 (C-24), 42.18 (C-4, 13), 39.66 (C-12), 37.14 (C-1), 36.40 (C-10), 36.04 (C-20), 33.83 (C-22), 31.79 (C-7, 8), 31.55 (C-2), 29.03 (C-25), 28.15 (C-16), 25.93 (C-23), 24.20 (C-15), 22.95 (C-28), 20.99 (C-11), 19.71 (C-26), 19.30 (C-19), 18.92 (C-27), 18.67 (C-21), 12.15 (C-29), 11.87 (C-18).

화합물 2 - ^1H NMR (400 MHz, pyridine) δ : 5.35 (1H, m, H-6), 5.08 (1H, d, $J=7.5$, H-1'), 3.9~4.6 (glucose protons), 1.00 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-26), 0.90 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-27), 0.89 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-29), 0.68 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, pyridine) δ : 141.12 (C-5), 122.14 (C-6), 102.80 (G-1), 78.84 (C-3), 78.72 (G-3), 78.31 (G-5), 75.51 (G-2), 71.91 (G-4), 63.06 (G-6), 57.04 (C-14), 56.46 (C-17), 50.56 (C-9), 46.26 (C-24), 42.70 (C-13), 40.07 (C-12), 39.56 (C-4), 37.69 (C-1), 37.14 (C-10), 36.61 (C-20), 34.43 (C-22), 32.39 (C-8), 32.27 (C-7), 30.48 (C-2), 29.69 (C-25), 28.76 (C-16), 26.60 (C-23), 24.73 (C-15), 23.61 (C-28), 21.51 (C-11), 20.20 (C-27), 19.64 (C-19), 19.43 (C-26), 19.23 (C-21), 12.37 (C-29), 12.19 (C-18).

화합물 3 - ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.72 (1H, m, H-3), 1.15, 0.98, 0.97, 0.94, 0.83 (each 3H, s, $-\text{CH}_3$), 0.92 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 72.65 (C-3), 61.20 (C-10), 53.07 (C-8), 49.03 (C-4), 42.67 (C-18), 41.58 (C-6), 39.55 (C-13), 39.17 (C-22), 38.24 (C-14), 37.70 (C-9), 36.97 (C-5), 35.95 (C-16), 35.42 (C-11), 35.22 (C-19), 35.04 (C-29), 34.94 (C-2), 32.67 (C-21), 31.97 (C-28), 31.68 (C-30), 30.52 (C-12), 29.91 (C-17), 28.07 (C-20), 20.02 (C-26), 18.56 (C-27), 18.14 (C-25), 17.42 (C-1), 16.29 (C-24), 15.67 (C-7), 11.53 (C-3).

결과 및 고찰

ATC3 fraction에서 분리된 화합물 1은 TLC에서 10% 황산을 분무하고 가열하였을 때 자색으로 발색되어 steroid 화합물로 추정할 수 있었다. 그리고 ^1H -NMR spectrum에서 δ 0.68~1.05에서 메틸기에 의한 peak들이 나타났다. δ 3.50에서 C-3에 OH기가 결합한 H-3의 peak가 관측되었다. 그리고 δ 5.33에서 이중결합에 의한 peak가 나타나 Δ^5 -stigmasterone 골격을 갖는 sterol임을 알 수 있었다.⁵⁾ ^{13}C -NMR spectrum에서는 이중결합에 의한 peak가 δ 140.64와 121.62에서 나타났다. 그리고 δ 71.70에서 나타난 peak는 OH기가 결합한 C-3의 oxymethine carbon에 의한 것으로 판단되었다. 이상

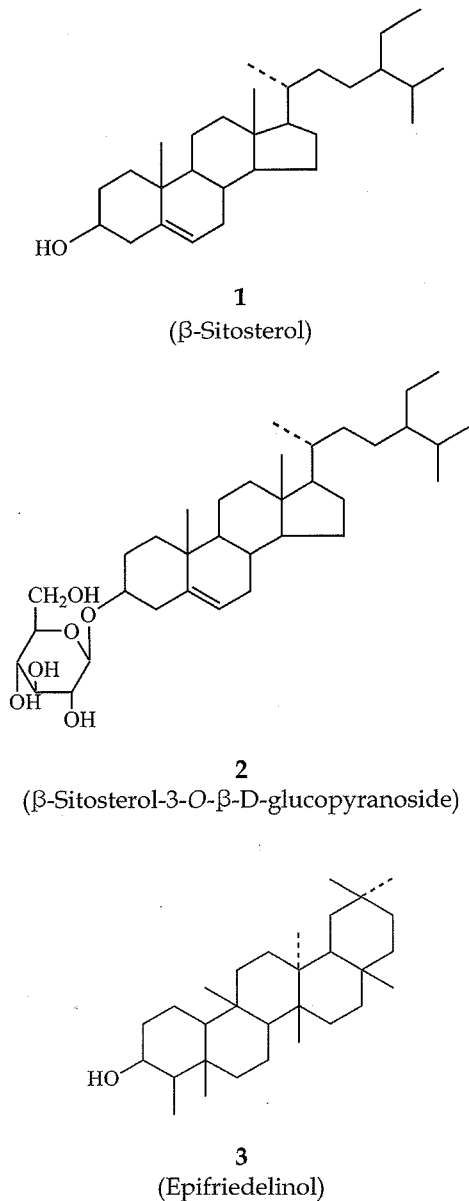


Fig. 1. Structures of isoprenoids isolated from methylene chloride soluble fraction of the stem of *Acer tegmentosum* Max.

의 data 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data는 β -sitosterol의 그것과 잘 일치하였다.⁶⁾ 그러므로 화합물 1을 β -sitosterol로 구조동정하였다.

화합물 2는 화합물 1과 마찬가지로 10% 황산 및 가열을 이용한 정성반응에서 자색으로 양성을 나타내어 steroid 화합물로 추측되었고, $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 5.08에서 doublet ($J=7.5$ Hz)로 coupling하는 당의 anomeric proton이 나타난 것과 당유래의 복잡한 signal들이 δ 3.0과 4.0 사이에 관측된 것을 제외하고는 화합물 1의 signal과 거의 유사하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 당부는 β -결합을 하는

glucose임을 알 수 있었고 문헌치⁷⁾와 잘 일치하여 화합물 2는 β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside로 구조동정하였다.

화합물 3은 화합물 1, 2와 마찬가지로 10% 황산과 가열을 이용한 정성반응에서 양성반응을 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 δ 0.83~1.15 ppm에서 7개의 methyl group이 singlet peak로 관측되었으며, δ 0.86에 나타난 한 개의 doublet methyl signal (3H, $J=6.3$ Hz)로 미루어 friedelane 골격을 가지고 있을 것으로 추측하였다. 또한 δ 3.72에서 나타난 methine signal은 C-3의 proton으로 C-3에 OH기가 결합한 friedelinol 유도체로 추정되었다.⁸⁾ 이 화합물의 GC-MS 측정 결과 molecular ion peak가 m/z 428에서 나타났고, library 검색결과 epifriedelinol과 95% 일치하였다. 따라서 3의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data를 friedelinol 및 이의 이성질체인 epifriedelinol의 문헌치와^{9,10)} 비교하여 최종적으로 epifriedelinol로 구조동정하였다.

β -Sitosterol과 이의 glucoside 배당체 화합물은 식물계에 널리 분포하는 화합물이며, epifriedelinol은 와송 (*Orostachys japonicus*),⁹⁾ 팽나무 (*Celtis sinensis*)¹¹⁾ 등에도 함유되어 있다고 알려져 있으나, 연구된 활성은 거의 전무하다.

산겨릅나무는 과거에 빈용 되지는 않았으나, 최근에 줄기를 산청목 또는 벌나무라 하여 서울 경동시장을 비롯한 전국 주요 한약재 시장 및 온라인 매체를 통해 고가에 시판되고 있다. 주로 간암, 간경화 등의 간질환의 치료제로 사용되고 있으나, 함유된 성분에 관한 연구는 저자 등⁴⁾의 선행 연구 결과 밝혀진 methylgallate 4-O- β -D-glucoside와 salidoside를 제외하고는 본 연구가 유일하며, 활성 연구로서는 최근에 산겨릅나무 추출물의 항암활성이 보고된 바 있으나¹²⁾ 성분을 비롯해 효능 및 안전성과 관련된 연구가 진행된 바 없다.

선행연구결과 밝혀진 methylgallate 4-O- β -D-glucoside는 *Phegopteris connectilis*, *Carpinus cordata* 및 대황에도 함유된 성분이나 활성 연구가 드물고,¹³⁻¹⁵⁾ salidoside는 *Rhodiola creulata*¹⁶⁾와 참들꽃¹⁷⁾ 등의 수종의 식물에 함유되어 있는 성분으로 항산화, amyloid- β 에 의한 산화적 스트레스에 대한 보호작용,¹⁸⁾ 지질과산화 억제,¹⁹⁾ carbohydrate 대사에 미치는 영향²⁰⁾ 등의 연구결과가 보고되어 있다. 본 연구에서 산겨릅나무로부터 추가로 3종의 이소프레노이드 화합물을 분리하고 이들의 화학구조를 밝혔으나, 민간에서 사용되고 있는 본 식물의 오남용 문제 등을 해결하기 위해서는 약효 및 안전성에 관한 보다 체계적이고 과학적인 연구가 필요하다 하겠다.

결 론

산청목 또는 벌나무로 통용되고 있는 산겨릅나무 줄기의 methylene chloride 가용부를 silica gel을 column 충전제로

사용한 chromatography를 활용하여 3종의 화합물을 분리하였다. 분리한 3종의 화합물은 NMR과 GC-MS 분석을 통해 β -sitosterol, β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside 및 epifriedelinol로 동정하였으며 이 식물에서는 처음으로 분리되었다. 향후 이 식물의 잎, 뿌리 등에 대한 추가적인 성분 연구와 분리한 성분들의 효능검색에 관한 연구가 요구된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린 21 연구과제에 의해 지원되었음을 감사드립니다. 또한 본 연구에 참여한 허종문 박사는 산업자원부 인력양성지원사업에 의하여 재정적 지원을 받았음에 감사합니다.

인용문헌

1. 이창복 (1993) 대한식물도감, 522. 향문사, 서울.
2. 소비근 (1994) 중국본초도감 (3권), 193. 여강출판사, 서울.
3. 송주택, 정현배, 김병우, 진희성 (1989) 한국식물대보감 (상권), 586-592. 제일출판사, 서울.
4. Hur, J. M., Yang, E. J., Choi, S. H. and Song, K. S. (2006) Isolation of phenolic glucosides from the stems of *Acer tementosum* Max. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **49**: 149-152.
5. Kim, B. H. and Kim, C. M. (1995) A Study on the constituents of stem of *Lespedeza x maritima* Nakai. *Kor. J. Pharmacogn.*, **26**: 18-22.
6. Chang, I. M., Yun, H. S. and Yamasaki, K. (1981) Revision of ^{13}C NMR assignments of beta-sitosterol and beta-sitosterol-3-O-beta-D-glucopyranoside isolated from *Plantago asiatica* seed. *Kor. J. Pharmacogn.*, **12**: 12-24.
7. Chang, Y. S., Moon, Y. H. and Woo, E. R. (2003) Virus-cell fusion inhibitory compounds from *Ailanthus altissima* Swingle. *Kor. J. Pharmacogn.*, **34**: 28-32.
8. Betancor, C., Freire, R., Gonzalez, A. G., Salazar, J. A., Pascard, C. and Prange, T. (1980) Three triterpenes and other terpenoids from *Catha cassinoides*. *Phytochemistry*, **19**: 1989-1993.
9. Lee, S. H., Pak, S. H., Kim, S. K., Kim, B. K. and Shin, K. H. (2004) Triterpenoids from *Orostachys japonicus*. *Natural Product Sciences*, **10**: 306-309.
10. Park, H. J., Young, H. S., Kim, J. O., Rhee, S. H. and Choi, J. S. (1991) A Study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor. J. Pharmacogn.*, **22**: 78-84.
11. Kim, D. K., Lim, J. P., Kim, J. W., Park, H. W. and Eun, J. S. (2005) Antitumor and antiinflammatory constituents from *Celtis sinensis*. *Arch. Pharm. Res.*, **28**: 39-43.
12. Shin, I. C., Sa, J. H., Shim, T. H. and Lee, J. (2006) The physical and chemical properties and cytotoxic effects of *Acer tegmentosum* Maxim. extracts. *J. Korean Soc. Biol. Chem.*, **49**: 322-327.
13. Adam, K. P. (1999) Phenolic constituents of the fern *Phegopteris connectilis*. *Phytochemistry*, **52**: 929-934.
14. Lee, J. S., Kim, H. J., Park, H. and Lee, Y. S. (2002) New diarylheptanoids from the stems of *Carpinus cordata*. *J. Nat. Prod.*, **65**: 1367-1370.
15. Kashiwada, Y., Nonaka, G. H. and Noshioka, I. (1986) Tannins and related compounds. XL. Rhubarb. (6). Isolation and characterization of new *p*-hydroxyphenylbutanones, stilbenes and gallic acid glucosides. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**: 3237-3243.
16. Han, X., Zhang, T., Wei, Y., Cao, X. and Ito, Y. (2002) Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, **971**: 237-241.
17. Kim, S. J., Kim, K. S., Hwang, S. J., Chon, S. U., Kim, Y. H., Ahn, J. C. and Hwang, B. (2004) Identification of salidroside from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. and its production through cell suspension culture. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **12**: 203-208.
18. Jang, S. I., Pae, H. O., Choi, B. M., Oh, G. S., Jeong, S., Lee, H. J., Kim, H. Y., Kang, K. H., Yum, Y. G., Kim, Y. C. and Chung, H. T. (2003) Salidroside from *Rhodiola sachalinensis* protects neuronal PC12 cells against cytotoxicity induced by amyloid- β . *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **25**: 295-304.
19. Zhang, Y. and Liu, Y. (2005) Study on effects of salidroside on lipid peroxidation on oxidative stress in rat hepatic stellate cells. *Zhong Yao Cai*, **28**: 794-796.
20. Wang, S. H., Wang, W. J., Wang, X. F. and Chen, W. H. (2004) Effects of salidroside on carbohydrate metabolism and differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, **2**: 193-195.

(2007년 1월 18일 접수)