

현사시나무 수피에서 분리한 Grandidentatin Isomer의 입체구조결정*1

권 동 주*2 · 김 현 석*3 · 이 필 호*3 · 배 영 수*2†

Determination of Stereochemical Structure of a Grandidentatin Isomer from *Populus alba* × *glandulosa* Bark*1

Dong-Joo Kwon*2 · Hyun-Seok Kim*3 · Phil-Ho Lee*3 · Young-Soo Bae*2†

요 약

현사시나무 수피를 채취하여 기건 시킨 후 70% 아세톤 용액으로 추출하고 농축한 후 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 수용성으로 순차 추출하여 동결건조하였다. 에틸아세테이트 분획에 대하여 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피와 분취 TLC를 반복적으로 수행하여 화합물을 분리하였다. 화합물의 구조는 산 가수분해와 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR 및 MALDI TOF-MS 스펙트럼을 분석하여, grandidentatin A (*cis*-2-hydroxycyclohexyl 6-*O-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside)로 동정하였다. Grandidentatin A는 현사시나무 수피에서 처음 분리되었으며, 문헌에 보고되지 않은 신규화합물이다.

ABSTRACT

The bark of *Populus alba* × *glandulosa* was collected, air-dried and extracted with 70% aqueous acetone. Then it was successively partitioned with *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc and H₂O. Repeated Sephadex LH-20 column chromatography and preparative TLC on the EtOAc soluble fraction gave a grandidentatin isomer. The structure was elucidated as grandidentatin A (*cis*-2-hydroxycyclohexyl 6-*O-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside) on the basis of spectroscopic

* 1 접수 2008년 10월 13일, 채택 2008년 11월 10일

* 2 강원대학교 산림과학대학 임산공학과. Dept. of Wood Science & Engineering, College of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

* 3 강원대학교 자연과학대학 화학과. Dept. of Chemistry, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

† 주저자(corresponding author) : 배영수(e-mail: bae@kangwon.ac.kr)

evidences such as $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR and MALDI TOF-MS spectrum followed by acid hydrolysis. Grandidentatin A was identified here for the first time in *Populus alba* \times *glandulosa* bark, and to the best of our knowledge it has not been reported in any other literature.

Keywords: *Populus alba* \times *glandulosa*, grandidentatin isomer, acid hydrolysis, stereochemistry, NMR

1. 서 론

버드나무과(Salicaceae)는 전세계적으로 2속 340종이 북반구 온대와 한대 지방에 주로 분포하며 사시나무속(*Populus*)은 북반구 온대가 주요 분포지이고 약 40종으로 구성되어 있는데 우리나라에는 7종이 존재한다(김태욱, 1996). 현사시나무(*Populus alba* \times *glandulosa* Uyeki)는 임목육종학자인 故 현신규 박사가 은백양(*P. alba*)과 수원사시나무(*P. glandulosa*)를 인공교배(人工交配)하여 만든 나무로 은수원사시나무라고도 부르며 영명으로는 Suwon poplar라 한다. 또한 1950년에 수원에서 발견된 은백양과 수원사시나무에서 생긴 자연잡종(自然雜種)을 은사시나무(*P. tomentiglandulosa*)라고 한다(이창복, 1985). 현사시나무 수피는 은회색으로 옆으로 갈라지나 모양이 렌즈 및 다이아몬드 형태이며, 1970년대 주요 조림수종으로 우리나라 곳곳에 식재되었으나, 재질이 좋지 못하고 성장도 늦어 현재는 거의 식재하지 않는다. 목재는 흰빛으로 가볍고 연하며 잘 갈라지고 뒤틀려, 펄프재, 성냥개비, 상자재로 쓰인다.

버드나무과 수종의 수피에는 salicin 및 salicin glycoside, salicyl alcohol 등의 salicin 유도체 화합물들이 특징적으로 분포(Pearl and Darling, 1967; 1968a; 1968b; 1971a; 1971b; Thieme and Benecke, 1971; Steele and Ronald, 1973)하며 해열작용과 진통억제작용(Rabate, 1935; 1936)이 있다. Ham (2001)은 사시나무속(*Populus*)과 버드나무속(*Salix*) 수종에서 flavans, flavanones, flavonols, chalcones 및 salicin 유도체 등의 phenolic 화합물들을 분리하였으며, Pearl and Darling (1962)과 Erickson 등(1970)은 *P. grandidentata* 수피에서 grandidentatin, pop-

uloside 및 grandidentoside를 분리하였다. 현사시나무는 분포가 제한적이기 때문에 성분분석에 대한 연구가 미진하여 Kim 등(2006)이 수피에서 *p*-coumaric acid, salireposide 및 suwonpopuloside를 분리하여 보고한 것이 유일하다.

따라서 본 연구에서는 추출성분에 대한 연구가 미진한 현사시나무를 대상으로 수피의 EtOAc 분획에서 분리한 신규화합물인 grandidentatin isomer을 NMR 등의 분광학적 기기분석을 이용하여 입체구조를 동정하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에 사용한 현사시나무 수피는 2006년 3월 강원대학교 구내림에서 벌채한 현사시나무의 수피를 박피하여 실험실에서 2주 이상 기간 시킨 후 분쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

2.2. 사용기기

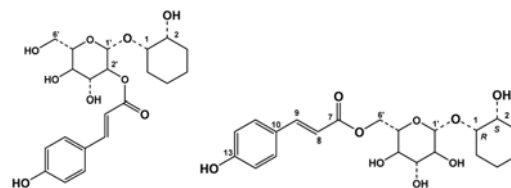
화합물의 구조를 규명하기 위해 강원대학교 공동 실험실습관의 Bruker Avance DPX 600 MHz spectrometer (Germany)를 사용하여 $^1\text{H-}$ (600 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz)을 측정하였으며, 분석용매로는 TMS를 첨가한 DMSO- d_6 를 사용하였다. 화합물의 분자량은 Voyager-DE STR 질량분석기를 이용하여 accelerating voltage 20000 V, mirror voltage ratio 1.12, acquisition mass range 200~1500 Da, laser intensity 2075, 2,5-dihydroxybenzoic acid를 matrix로 사용하여 positive ion mode에서 MALDI

Table 1. ¹H- and ¹³C-NMR chemical shifts (δ, ppm) for grandidentatin isomer

Position	δ _H (multi. and J _{HH} (Hz))	δ _C
1	3.59 (1H, <i>m</i>)	77.74
2	3.68 (1H, <i>m</i>)	68.11
3	1.13-1.64 (<i>m</i>)	30.34
4	1.13-1.64 (<i>m</i>)	20.57
5	1.13-1.64 (<i>m</i>)	22.00
6	1.13-1.64 (<i>m</i>)	28.89
7		166.42
8	6.38 (1H, <i>d</i> , 16.0)	113.78
9	7.58 (1H, <i>d</i> , 16.0)	144.78
10		125.18
11	7.54 (1H, <i>d</i> , 8.0)	130.15
12	6.80 (1H, <i>d</i> , 8.0)	115.75
13		160.02
14	6.80 (1H, <i>d</i> , 8.0)	115.75
15	7.54 (1H, <i>d</i> , 8.0)	130.15
1'	4.30 (1H, <i>d</i> , 8.0)	100.73
2'	3.04 (1H, <i>m</i>)	73.06
3'	3.20 (1H, <i>m</i>)	76.19
4'	3.14 (1H, <i>m</i>)	70.17
5'	3.30 (1H, <i>m</i>)	73.61
6'	4.15 (1H, <i>dd</i> , 7.0, 11.0) 4.38 (1H, <i>br d</i> , 11.0)	63.45

TOF-MS 스펙트럼을 측정하였다. 용점은 Electro Thermal 9100 기기로 측정하였으며, 선광도는 JASCO DIP-1000 digital polarimeter로 측정하였다.

Column chromatography용 충전물질은 lipophilic Sephadex LH-20 (Sigma, Sweden), TLC plate는 DC-Plastikfolien Cellulose F (Merck, Germany)와 preparative TLC는 Silica gel 60 F₂₅₄ 1 mm (20 × 20 cm) (Merck, Germany)을 사용하였다. TLC 전개용매는 TBA (*t*-butanol : AcOH : H₂O (3 : 1 : 1, v/v/v)), 6% aqueous AcOH 및 CHCl₃-MeOH (5 : 1, v/v)를 사용하였고 vanillin 발색제(vanillin : HCl : EtOH (4.8 : 12 : 480, w/v/v)), 1% FeCl₃ (in EtOH) 및 20% H₂SO₄를 분무하여 TLC에 반응하는 색을 관찰하였다. 용매 및 기타 시약은 일급 및 특급



Grandidentatin Grandidentatin isomer (1)

Fig. 1. Chemical structures of grandidentatin and grandidentatin isomer.

시약을 사용하였다.

2.3. 추출 및 분획

현사시나무 수피 5.0 kg을 70% 아세톤 용액에 약 5일간 실온에서 3회 반복 추출한 후 여과지(Advantec No. 2)로 여과하였다. 여액을 40°C에서 감압농축하고, 농축된 추출물을 물에 현탁시켜 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(dichloromethane), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 순으로 극성에 따라 분획하였다. 각 분획물은 감압농축하여 유기용매를 제거한 후 동결 건조하여 조추출물 29.3 g, 헥산 분획 13.0 g, 디클로로메탄 분획 32.5 g, 에틸아세테이트 분획 64.3 g 및 수용성 분획 255.3 g을 얻었다.

2.4. 화합물의 분리

에틸아세테이트 분획 10.0 g을 Sephadex LH-20으로 충전한 column에서 전개용매 MeOH-H₂O (1 : 3, v/v)를 사용하여 2개의 fraction (H1과 H2)으로 나누었다. H1 fraction을 100% H₂O와 EtOH-hexane (3 : 2, v/v) 혼합용액으로 Sephadex LH-20 column에서 다시 분리하였으며, 그 중 H122 fraction을 preparative TLC용 Silica gel 60 F₂₅₄ 1 mm (20 × 20 cm) plate에 점적하여 CHCl₃-MeOH (5 : 1, v/v) 용액에 전개하고 동일한 화학적 이동값(R_f)을 보이는 band 부분들을 회수하여 화합물 **1**을 분리하였으며, NMR data는 Table 1과 같다.

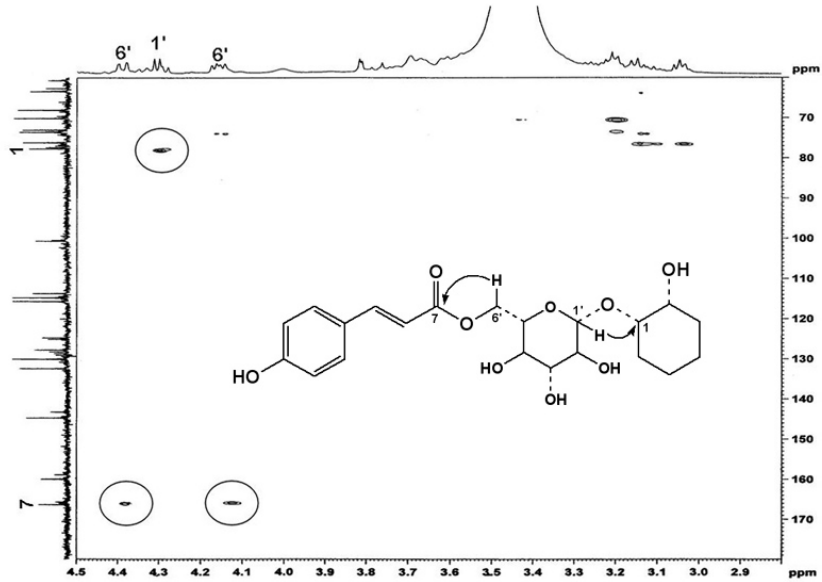


Fig. 2. Selected HMBC correlations of grandidentatin isomer.

2.5. 산 가수분해

화합물의 입체구조를 분석하기 위하여 산 가수분해를 실시하였다. 1 ml의 vial에 시료 10 mg (0.024 mmol)를 넣고 500 μ l의 H₂O와 HCl (37%) 1방울을 첨가하여 80°C에서 6시간 교반하였다. Vacuum으로 H₂O를 모두 제거한 후 DMSO-*d*₆ (600 μ l)로 시료를 용해한 후 NMR 측정용 시료로 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

현사시나무 수피를 70% 아세톤 용액으로 추출한 후 용매의 극성에 따라 분획을 실시하여 동결 건조하였다. 그 중 에틸아세테이트 분획에 대한 Sephadex LH-20 column chromatography와 preparative TLC를 반복적으로 실시하여 화합물 1을 분리하고 NMR을 이용하여 화학구조를 규명하였다(Fig. 1).

화합물 1은 연한 노란색 무정형 분말로 780 mg을 분리하였으며, 1% FeCl₃ 발색제에 양성으로 반응하였고, 융점은 264~265°C, 선광도는 $[\alpha]_D^{28} + 33.3^\circ$ (MeOH, c 0.1)이었다. Positive MALDI TOF-MS 스

펙트럼에서 분자 ion peak는 m/z 447 [M+Na]⁺, 463 [M+K]⁺에서 나타났다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 6.80과 δ 7.54의 두 개의 doublet ($J = 8.0$ Hz)은 *ortho* coupling을 하고 있는 *p*-coumaric acid의 대칭 수소들의 signal이 나타나며, olefinic 수소인 H-8과 H-9는 δ 6.38과 δ 7.58에서 각각 doublet signal로 나타나고 J 값이 16.0 Hz인 것으로 보아 *trans* 구조임을 알 수 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 *p*-coumaric acid의 대칭 탄소들이 δ 115.75 (C-12, 14)와 δ 130.15 (C-11, 15)에서 signal이 나타나며, 이중결합 탄소들이 δ 113.78 (C-8)과 δ 144.78 (C-9), carbonyl 탄소가 δ 166.4 (C-7)에서 signal이 관찰되는 것으로 보아 *p*-coumaric acid가 결합하고 있음을 알 수 있었다 (Kim *et al.*, 2006). Cyclohexanediol의 수소들은 δ 1.13과 δ 1.64 사이에서 broad multiplet signal로 나타났다으며, H-1과 H-2는 각각 δ 3.59와 δ 3.68에서 signal이 관찰되었다. C-1과 C-2는 δ 77.74와 δ 68.11에서 signal이 나타났으며, 나머지 탄소들은 δ 30.34 (C-3), δ 20.57 (C-4), δ 22.00 (C-5), δ 28.89 (C-6)에서 signal이 관찰되었다 (Dommissie *et al.*, 1986). Glucose의 anomeric 수소는 δ 4.30 (H-1')에

Table 2. ^{13}C -NMR chemical shifts (δ , ppm) for grandidentatin isomer and authentic *cis*-, *trans*-cyclohexanediol measured in $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_c		
	grandidentatin isomer	<i>cis</i> -cyclohexanediol	<i>trans</i> -cyclohexanediol
1,2-cyclohexanediol			
1	77.74	70.15	74.37
2	68.11	70.15	74.37
3	30.34	30.41	33.11
4	20.57	21.92	24.16
5	22.00	21.92	24.16
6	28.89	30.41	33.11

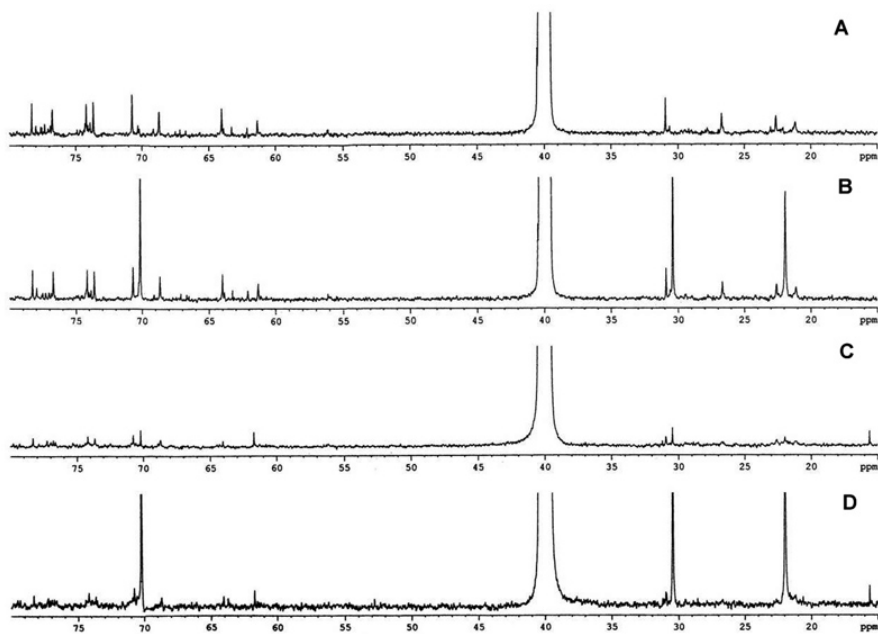


Fig. 3. ^{13}C -NMR spectrum of grandidentatin isomer (A), grandidentatin isomer containing added *cis*-cyclohexanediol (B), hydrolysis of grandidentatin isomer (C) and hydrolysis of grandidentatin isomer containing added *cis*-cyclohexanediol (D) measured in $\text{DMSO-}d_6$.

서 8.0 Hz의 J 값을 갖는 doublet signal로 나타나 β -D-glucose임을 알 수 있으며, H-6'의 두 개의 수소가 δ 4.38, δ 4.15에서 각각 doublet과 double doublet signal로 나타났다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 anomeric 탄소(C-1')는 δ 100.7에서 signal이 나타나

며, C-2'와 C-3'은 Dommissse 등(1986)이 분리한 grandidentatin보다 upfield되어 δ 73.0과 δ 73.6, C-6'은 downfield되어 δ 63.5에서 signal이 관찰되어 C-6'과 *p*-coumaric acid가 결합을 하고 있음을 추정할 수 있었다(Thieme, 1967; Gouda *et al.*, 2006). 또

한, ^1H - ^{13}C HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) 스펙트럼으로 수소와 결합하고 있는 탄소의 위치를 확인하였으며, ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) 스펙트럼 (Fig. 2)에서 glucose 6번 수소(H-6')와 *p*-coumaric acid의 carbonyl 탄소(C-7)의 상관 signal이 관찰되었으며, glucose 1번 수소(H-1')와 cyclohexanediol 1번 탄소(C-1)의 상관 signal이 나타나 glucose와 *p*-coumaric acid 및 cyclohexanediol의 결합위치를 결정할 수 있었다.

Cyclohexanediol group의 입체구조를 결정하기 위하여 *cis*-와 *trans*-cyclohexanediol (Sigma)의 표준 물질을 구입하여 NMR 스펙트럼을 비교하였다. Table 2에서와 같이 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 *cis*와 *trans* form의 chemical shift 값이 현저하게 차이가 났으며, grandidentatin isomer의 ^{13}C -NMR spectra data는 *cis* form과 유사하였다. 또한, grandidentatin isomer와 가수분해하여 glucose를 제거한 grandidentatin isomer에 *cis*-cyclohexanediol을 첨가하여 ^{13}C -NMR을 측정한 결과 *cis* form의 signal intensity가 현저하게 증가(Fig. 3)하는 것으로 보아 *cis*-(1*R*, 2*S*)-1,2-cyclohexanediol의 구조임을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 화합물 1은 분자식 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_9$ 인 *cis*-(1*R*, 2*S*)-2-hydroxycyclohexyl 6-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside로 현재까지 문헌에 보고되지 않은 신규화합물로 grandidentatin과 *p*-coumaroyl의 결합위치가 다른 isomer 화합물이므로 grandidentatin A로 명명하였다.

4. 결 론

현사시나무 수피를 70% 아세톤 용액으로 추출하고, 추출물을 hexan, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 수용성으로 용매 분획하였다. 이 중 에틸아세테이트 분획을 대상으로 Sephadex LH-20 column chromatography와 preparative TLC를 실시하여 화합물을 분리하였다. 화합물의 구조는 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 2D-NMR (HMQC, HMBC) 및 MALDI TOF-MS 스펙트럼을 분석하여, grandidentatin A (*cis*-2-hydroxycyclohexyl 6-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-

glucopyranoside)로 동정하였으며, 현재까지 문헌에 보고되지 않은 신규화합물이다.

사 사

본 연구는 산림청 산림과학 기초연구 지원사업으로 수행된 결과의 일부이며, 깨끗한 NMR 스펙트럼을 얻을 수 있도록 도움을 주신 강원대학교 공동실험실습관 핵자기공명실의 유지숙 박사님께 감사드립니다.

1. 김태욱. 1996. 한국의 수목. 교학사. pp. 219-222.
2. 이창복. 1985. 대한식물도감. 향문사. pp. 255.
3. Dommissse, R. A., L. V. Hoof, and A. J. Vlietinck. 1986. Structural analysis of phenolic glucosides from Salicaceae by NMR spectroscopy. Phytochemistry. 25: 1201~1204.
4. Erickson, R. L., I. A. Pearl, and S. F. Darling. 1970. Barks of the family Salicaceae. XXV. Populoside and grandidentoside from the bark of *Populus grandidentata*. Phytochemistry. 9: 857~863.
5. Gouda, Y. G., A. M. Abdel-baky, K. M. Mohamed, F. M. Darwish, R. Kasai, and K. Yamasaki. 2006. Phenylpropanoid and phenylethanoid derivatives from *Kigelia pinnata* DC. fruits. Natural Product Research. 20: 935~939.
6. Ham, Y. H. 2001. A study on the bark extractives of several *Populus* and *Salix* trees. PhD thesis. Department of Wood Science and Engineering, College of Forest Sciences, Kangwon National University.
7. Kim, J. K., Y. H. Ham, and Y. S. Bae. 2006. Phenolic compounds from bark of Suwon poplar (*Populus alba* L. and *Populus glandulosa* Uyeki). Holzforschung. 60: 674-677.
8. Pearl, I. A. and S. F. Darling. 1962. Bark of the family Salicaceae. V. Grandidentatin, a new glucoside from the bark of *Populus grandidentata*. Journal of Organic Chemistry. 27: 1806.
9. Pearl, I. A. and S. F. Darling. 1967. Mass spectrometry of natural D-glucosides and the structure of salireposide. Tetrahedron Letters. 20: 1869~1872.

10. Pearl, I. A. and S. F. Darling. 1968a. Studies on the barks of the family Salicaceae XVI. The structure of salireposide. *Phytochemistry*. 7: 821~824.
11. Pearl, I. A. and S. F. Darling. 1968b. Leaves of the family Salicaceae. XI. The hot water extractives of the leaves of *Populus balsamifera*. *Phytochemistry*. 7: 1845~1849.
12. Pearl, I. A. and S. F. Darling. 1971a. Barks of the family Salicaceae. XXVI Hot water phenolic extractives of the bark and leaves of diploid *Populus tremuloides*. *Phytochemistry*. 10: 483~484.
13. Pearl, I. A. and S. F. Darling. 1971b. Leaves of the family Salicaceae. Phenolic extractives of the leaves of *Populus balsamifera* and of *P. trichocarpa*. *Phytochemistry*. 10: 2844~2847.
14. Rabate, J. 1935. Biochemical study of the Salicaceae. XI. The hydrolysis of salicoside by *Salix purpurea* leaf enzyme powder and some secondary phenomena. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique*. 17: 572~601.
15. Rabate, J. 1936. Biochemical study of the glucides of Salicaceae. Analytical method. *Journal de Pharmacie et de Chimie*. 24: 311~325.
16. Steele, J. W. and W. Ronald. 1973. Phytochemistry of the Salicaceae. VI. The use of a gas liquid chromatographic screening test for the chemotaxonomy of *Populus* species. *Journal of chromatography*. 84: 315~318.
17. Thieme, H. 1967. Phenolic glycosides of the genus *Populus*. *Planta Medica*. 15: 35~40.
18. Thieme, H. and R. Benecke. 1971. Phenolglycosides of Salicaceae. 8. Studies on the glycoside accumulation in some middle European populus species. *Die Pharmazie*. 26: 227~231.