

주목열매 추출물 구조분석*1

박 세 영*2 · 최 인 규*2,3 · 배 영 수*4†

Structure Determination of the Extractives from the *Taxus Cuspidata* Fruits*1

Se-Yeong Park*2 · In-Gyu Choi*2,3 · Young-Soo Bae*4†

요 약

주목열매에서 분리한 과육과 씨를 95% EtOH 용액을 사용하여 각각 1.15 kg과 0.94 kg을 유리 용기에 침지하여 추출하고, 농축된 추출용액을 용매의 극성에 따라 *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate 및 수용성으로 순차 분획한 후, 동결건조하였다. 혼합물로부터 순수한 화합물을 분리하기 위하여 ethyl acetate 및 수용성 분획에 대하여 Sephadex-LH 20 칼럼크로마토그래피를 실시하였다. 단리된 화합물들의 구조는 flavan 화합물의 경우 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 EI-MS 스펙트럼을 측정하였으며, 탄수화물은 보다 정확한 구조를 결정하기 위해 COSY, HSQC와 같은 2-D NMR과 LC/MS 스펙트럼을 이용하여 구조를 결정하였다. 또한 구성당 분석을 위해 acid hydrolysis, permethylation을 실시하여 구성당의 성분과 결합위치를 확인하였다. 위의 실험을 통하여 (+)-catechin (1), (-)-epicatechin (2), (+)-gallocatechin (3), (-)-epigallocatechin(4) 및 β-D-fructofuranose-(2→4)-O-β-D-glucopyranose(1→4)-O-α-D-glucopyranose-(1→2)-O-β-D-fructofuranose (5)의 구조를 결정하였다.

ABSTRACT

The fruits of *Taxus cuspidata* were collected, divided into seeds and fruits, and extracted with 95% EtOH. The extracts were evaporated under the reduced vacuum pressure, concentrated, then

*1 접수 2013년 8월 28일, 채택 2013년 11월 19일

*2 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부. Department of Forest Sciences, College of Agriculture & Life Science, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*3 서울대학교 농업생명과학연구원. Research Institute for Agriculture & Life Sciences, College of Agriculture & Life Science, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*4 강원대학교 산림환경과학대학 산림바이오소재공학과. Department of Forest Biomaterials Engineering, College of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

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

successively fractionated with a series of *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and water on a separatory funnel to get some freeze dried samples. A portion of the EtOAc (arils:1.65 g, seeds:1.04 g) and H₂O (arils:7 g, seeds:10 g) soluble samples were chromatographed on a Sephadex column using MeOH-H₂O (1:1, 1:3, 1:5, v/v), EtOH-hexane (3:1, v/v) mixture and 100% H₂O as eluting solvents to isolate pure compounds from the fractions. The isolates were developed by cellulose TLC using *t*-BuOH-HOAc-H₂O (TBA; 3:1:1, v/v/v) and 6% aqueous HOAc. Visualization was done under ultraviolet light and by spraying the vanillin-HCl-EtOH reagent (4.8:12:480, v/v/v), followed by heating. The structures of the isolates were characterized by ¹H- and ¹³C-NMR, DEPT, 2D-NMR, LC/MS and EI-MS spectra. In addition to the NMR and MS spectra, acid hydrolysis and permethylation were used to determine the correct structure of the isolated sugar compound. Their structures were elucidated as (+)-catechin (1), (-)-epicatechin (2), (+)-gallocatechin (3), (-)-epigallocatechin (4) and β-D-fructofuranose-(2→4)-O-β-D-glucopyranose(1→4)-O-α-D-glucopyranose (1→2)-O-β-D-fructofuranose (5) on the basis of the above experimental evidences.

Keywords: *Taxus cuspidata* fruits, extractives, EtOAc soluble, H₂O soluble, carbohydrate, sugar compound, permethylation

1. 서 론

주목(*Taxus cuspidata* Sieb, et Zucc.)은 주목과 (*Taxaceae*)에 속하는 수종으로 고산지대에 자라며 한국, 일본, 중국 동북부, 시베리아 등지에 분포한다. 근래에는 주목의 잎, 줄기, 껍질, 열매 등에서 얻어진 성분으로 항암, 항염증 등 의약산업은 물론, 화장품산업에도 이용되고 있으며 항산화, 항노화 등에 효과가 있다고 보고되어지고 있다[1].

추출성분의 대부분은 탄수화물이 차지하고 있으며 질소화합물에는 아미노산, 단백질, 알칼로이드, 핵산 등이 있고, 지방족 화합물에는 유기산 및 지방산과 wax성분이 존재한다. 특히, 이들 중 많은 관심이 집중되고 연구되어지고 있는 flavonoid는 그 종류가 매우 많으며 약리작용과 생리활성 및 항균작용 등이 있는 것으로 알려져 있다[2-3]. (+)-Catechin은 대표적인 flavonoid 화합물로서, 폐암과 복수암 세포에서 성장억제 및 세포손상을 유발시켰고 농도와 처리 시간에 의하여 다양한 양상을 보여 줌으로써 녹차의 음용은 암의 예방뿐만 아니라 치료에도 도움이 된다고 보고하고 있다[4]. 자연계에 존재하는 catechin은 14종류가 있으며, 녹차에는 6종류가 있고, 그중 4종류 (-)-epigallocatechin, (-)-epi-

gallocatechingallate, (-)-epicatechin, (-)-epicatechingallate가 주로 많다. 이것은 차의 수렴성과 떫은맛의 주체가 되며 구조상 수산기(-OH)를 많이 가지고 있으므로 항산화 작용을 비롯한 여러 가지 생리활성이 뛰어나다고 알려져 있다[5].

이러한 추출성분의 의약적 이용 이외에도 건강보조식품, 기능성 화장품, 식품첨가물 등으로 그 분야가 확대되면서 많은 관심과 연구가 활발하게 진행되고 있다.

Flavonoid 이외에도 탄수화물이 목재 추출성분에 많이 함유되어있으며, 탄수화물의 화학구조에 대한 연구는 오래 전부터 많이 이루어져 왔다. 그러나 실제로 목재 추출물에서 얻어진 다당류의 경우, 분석에 있어 많은 어려움이 따르기 때문에 연구가 매우 미진한 실정이다.

탄수화물의 구조분석은 1D-NMR인 ¹H-, ¹³C-NMR과 2D-NMR 분석을 이용하여 분자의 골격구조를 직접 관찰할 수 있고, 특정 위치의 탄소를 확인하는 방법 등에 많이 이용되고 있다. 한편, 탄수화물의 화학적 구조 연구법 중 과methyl화(permethylation) 분석법은 glycoside의 결합위치, 주쇄의 분지 유무 등을 알 수 있어 탄수화물 구조 연구에 대단히 중요한 방법이다. 과methyl화(permethylation) 분석법에는

Haworth법, Purdie & Irvine법[6] 등 몇 가지 방안이 제안되어 있지만, 현재에는 Hakomori법[7]과 Ciucanu & Kerek법[8]이 주로 사용되어지고 있다.

탄수화물의 화학구조 및 결합 형태에 관한 연구가 진행되었음에도 불구하고, 국내에서 수목 추출성분 중 다당류 구조분석에 관해서는 연구가 미진한 실정이다.

따라서 본 연구는 주목열매 추출성분을 분리하고, 특히 당 화합물의 화학구조를 연구하여 여러 산업에서의 효율적 이용을 위한 자료를 얻기 위해 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

본 실험에서 사용한 주목의 열매는 2011년 10~11월 강원도 춘천시 강원대학교 구내림에서 채취하여 2주 동안 기건 후, 열매의 과육과 씨를 분리하였고, 열매의 씨는 막자사발로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

2.2. 추출물 조제 및 분리

주목 열매 과육 1.15 kg과 씨 0.94 kg을 95% EtOH 용액에 침지하고 상온에서 반복 추출한 후, 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 추출물은 분획 깔때기 상에서 *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate 및 수용성으로 순차적으로 분획하였다.

2.3. 추출물의 단리

혼합물로부터 순수한 화합물을 분리하기 위하여 ethyl acetate 및 수용성 분획에 대한 칼럼크로마토그래피의 충전물질로는 Sephadex LH-20을, 용리용매로는 MeOH:H₂O (1:1, 1:3, 1:5, v/v), EtOH:hexane (3:1, v/v) 혼합용액과 100% 수용액을 사용하였다.

박층크로마토그래피(TLC)의 전개용매로는 TBA

(*t*-butanol-HOAc-H₂O, 3:1:1, solvent A), 6% HOAc (solvent B)를 사용하였다. Vanillin 및 1% FeCl₃ 발색제를 전개된 TLC판에 분무한 후 반응하는 색을 관찰하였다.

2.4. 화합물의 단리

2.4.1. 주목열매 과육

주목열매 과육의 ethyl acetate용성 분획물 1.65 g을 MeOH-H₂O (1:1, v/v) 혼합용액을 용리용매로 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시하여 4개의 부분으로 분리하였으며 TCAE로 표기하였다. TCAE 2부분을 MeOH-H₂O (1:3, v/v)를 용리용매로 사용하여 다시 칼럼크로마토그래피를 실시하여 3개의 부분으로 분리하였고, 이 중 TCAE 22에서 화합물 1((+)-catechin)을 얻었다. TCAE 21부분을 100% H₂O를 용리용매로 사용하여 3개의 부분으로 분리하였으며, 이때 TCAE 212에서 화합물 3((+)-gallo-catechin)이, 213에서 화합물 2((-)-epicatechin)를 각각 얻을 수 있었다.

또한, 주목열매 과육 수용성 분획물 7 g을 100% H₂O를 용리용매로 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시하여 4개 부분으로 분리하였으며 TCAW로 표기하였다. 이때 TCAW 1에서 화합물 5(tetrasaccharide)를 얻었다.

2.4.2. 주목열매 씨

주목열매 씨의 ethyl acetate용성 분획물 1.04 g을 MeOH-H₂O (1:5, v/v) 혼합용액을 용리용매로 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시하여 4개의 부분으로 분리하였으며 TCSE로 표기하였다. TCSE 2와 TCSE 3에서 화합물 1((+)-catechin)과 화합물 3((+)-gallo-catechin)을 얻었다.

또한, 주목열매 씨 수용성 분획물 10 g을 MeOH-H₂O (1:1, v/v)혼합용액을 용리용매로 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시하여 4개 부분으로 분리하였으며 TCSW로 표기하였다. TCSW 4를 MeOH:H₂O (1:5, v/v)로 다시 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 TCSW 43과 TCSW 44에서 각각 화합물 1((+)

-catechin)과 화합물 3((+)-gallocatechin)을 얻을 수 있었다. 다시 TCSW42 부분을 EtOH:hexane (3:1, v/v)으로 컬럼크로마토그래피를 실시하여 TCSW 422와 TCSW 423에서 화합물 2((-)-epicatechin)와 화합물 4((-)-epigallocatechin)를 얻을 수 있었다.

2.5. 탄수화물 분석

2.5.1. 단당 성분 분석

2.5.1.1. 산 가수분해

산 가수분해는 Seaman[9]의 방법을 사용했다. 2.4.1에서 얻은 화합물 5인 당(saccharide)시료 3~5 mg을 vial에 넣고 98% 황산을 1%와 2%로 각각 희석한 뒤 80°C에서 20분 동안 반응시켰다. 산 가수분해 반응 후 포화된 barium hydroxide (Ba(OH)₂)수용액으로 중화시켜서 반응을 종료하였다. 이때 생성된 염은 syringe filter로 여과하여 제거하였다. 여과한 용액을 동결 건조한 뒤 TLC를 사용하여 단당 성분 정성 분석을 시행하였다.

2.5.1.2. TLC를 이용한 단당 정성 분석

단당 성분 분석을 위한 TLC 분석은 Merck사의 TLC silica gel 60을 사용하였다. TLC 전개용매는 ACN:ethylacetate:1-propanol:water (85:20:20:15, v/v/v/v)을 사용하여 실온에서 TLC plate에 끝까지 전개한 후, 공기 중에서 건조하였다. 건조된 TLC plate는 silver nitrate (AgNO₃)용액에 5분간 담그어 발색하였다. 알칼리성 AgNO₃용액은 magnetic stirrer를 이용하여 AgNO₃가 1 ml의 물에 포화될 때까지 첨가하고, 포화된 AgNO₃ 수용액 1 ml를 200 ml의 acetone에 첨가하여 제조하였다. 그 다음 TLC plate를 공기 중 건조하고 30분 동안 미리 제조한 alkaline MeOH에 40%(w/v) NaOH 2 ml를 첨가하여 제조하였다. Alkaline MeOH 용액에서 TLC plate를 꺼내 공기 중 건조한 후, 증류수 200 ml에 Na₂SO₃ 47.433 g, NaHSO₃ 2.0166 g, Na₂S₂O₃ 5.305 g을 첨가하여 제조한 수용액에 TLC plate의 색이 깨끗해 질 때까지 넣어둔 뒤 흐르는 물에 세척하였다.

2.6. 화합물의 구조결정

단리된 화합물들의 구조를 구명하기 위해 강원대학교 공동실험실습관의 100, 400 및 600 MHz의 핵자기 분광분석기(Bruker Avance DPX)를 사용하여 ¹H과 ¹³C-NMR를 측정하였고, 분석용매로는 Methanol-d₄와 DMSO를 사용하였다. 분자량은 Micromass Autospec M363과 TSQ Quantum Ultra를 이용하여 측정하였다.

2.6.1. Compound 1

¹H-NMR (δ , 400 MHz, CD₃OD) : 2.50 (1H, *dd*, *J*=8.1Hz and *J*=16.1Hz, H-4ax), 2.82 (1H, *dd*, *J*=5.36 and *J*=15.6Hz, H-4eq), 3.96 (1H, *m*, H-3), 4.54 (1H, *d*, *J*=7.13Hz, H-2), 5.85 (1H, *d*, *J*=2.5Hz, H-6), 5.92 (1H, *d*, *J*=2.1Hz, H-8), 6.71 (1H, *dd*, *J*=1.8Hz and *J*=8.1Hz, H-6'), 6.76 (1H, *d*, *J*=8.1Hz, H-5'), 6.83 (1H, *d*, *J*=1.9Hz, H-2')

¹³C-NMR (ppm, 100 MHz, CD₃OD) : 28.55 (C-4), 68.84 (C-3), 82.88 (C-2), 95.53 (C-8), 96.32 (C-6), 100.85 (C-10), 115.28 (C-2'), 116.12 (C-5'), 120.08 (C-6'), 132.24 (C-1'), 146.26 (C-3'), 146.28 (C-4'), 156.95 (C-9), 157.61 (C-5), 157.86 (C-7)

2.6.2. Compound 2

¹H-NMR (δ , 400 MHz, CD₃OD) : 2.72 (1H, *dd*, *J*=2.6Hz and *J*=2.57Hz, H-4ax), 2.85 (1H, *dd*, *J*=4.9Hz and *J*=5.1Hz, H-4eq), 4.16 (1H, *s*, H-3), 4.81 (1H, *s*, H-2), 5.91 (1H, *d*, *J*=1.6Hz, H-6), 5.93 (1H, *d*, 2.1Hz, H-8), 6.75 (1H, *d*, *J*=8.2Hz, H-5'), 6.77 (1H, *dd*, *J*=1.8Hz and *J*=8Hz, H-6'), 6.97 (1H, *d*, 1.8Hz, H-2')

¹³C-NMR (ppm, 100 MHz, CD₃OD) : 28.28 (C-4), 66.49 (C-3), 78.87 (C-2), 94.94 (C-8), 95.44 (C-6), 99.12 (C-10), 114.34 (C-2'), 114.94 (C-5'), 118.45 (C-6'), 131.30 (C-1'), 144.77 (C-3'), 144.94 (C-4'), 156.38 (C-9), 156.65 (C-5), 157.00 (C-7)

Table 1. ^1H and ^{13}C -NMR chemical shifts (δ , ppm) of compound (5)

| Chemical Shift (δ , ppm) | | | | | | | |
|---|--------------|-----------------|------------------|--|--------------|-----------------|------------------|
| compound | ^1H | ^{13}C | assignment | compound | ^1H | ^{13}C | assignment |
| β -D-Fructose(2 \rightarrow | 3.35 | 63.50 | C ₁ H | \rightarrow 4)- β -D-Glucose(1 \rightarrow | 4.47 | 97.25 | C ₁ H |
| | - | 102.36 | C ₂ H | | 3.55 | 72.33 | C ₂ H |
| | 3.82 | 75.72 | C ₃ H | | 3.12 | 77.13 | C ₃ H |
| | 3.73 | 76.29 | C ₄ H | | 3.64 | 69.63 | C ₄ H |
| | 3.17 | 82.69 | C ₅ H | | 3.70 | 81.32 | C ₅ H |
| | 3.43 | 63.37 | C ₆ H | | 3.49 | 61.63 | C ₆ H |
| \rightarrow 4)- α -D-Glucose(1 \rightarrow | 5.10 | 92.63 | C ₁ H | \rightarrow 2)- β -D-Fructose | 3.34 | 64.77 | C ₁ H |
| | 3.57 | 70.34 | C ₂ H | | - | 98.45 | C ₂ H |
| | 3.77 | 70.71 | C ₃ H | | 2.89 | 75.26 | C ₃ H |
| | 3.57 | 68.19 | C ₄ H | | 3.82 | 76.14 | C ₄ H |
| | 3.54 | 82.23 | C ₅ H | | 3.78 | 83.31 | C ₅ H |
| | 3.53 | 61.51 | C ₆ H | | 3.35 | 63.33 | C ₆ H |

Recorded in CD₃OD and DMSO.

2.6.3. Compound 3

^1H -NMR (δ , 400 MHz, CD₃OD) : 2.50 (1H, *dd*, $J=8.1\text{Hz}$ and $J=16.1\text{Hz}$, H-4ax), 2.82 (1H, *dd*, $J=5.36\text{Hz}$ and $J=15.6\text{Hz}$, H-4eq), 3.96 (1H, *m*, H-3), 4.54 (1H, *d*, $J=7.13\text{Hz}$, H-2), 5.85 (1H, *d*, $J=2.5\text{Hz}$, H-6), 5.92 (1H, *d*, $J=2.1\text{Hz}$, H-8), 6.4 (2H, *s*, H-2', 6')

^{13}C -NMR (ppm, 100 MHz, CD₃OD) : 28.13 (C-4), 68.78 (C-3), 82.89 (C-2), 95.52 (C-8), 96.26 (C-6), 100.73 (C-10), 107.19 (C-2', 6'), 131.56 (C-1'), 134.02 (C-4'), 146.88 (C-3', 5'), 156.86 (C-9), 157.63 (C-5), 157.85 (C-7)

2.6.4. Compound 4

^1H -NMR (δ , 400 MHz, CD₃OD) : 2.65 (1H, *d*, $J=2.51\text{Hz}$, H-4ax), 2.73 (1H, *d*, $J=4.9\text{Hz}$, H-4eq), 4.08 (1H, *s*, H-3), 4.72 (1H, *s*, H-2), 5.82 (1H, *d*, $J=2.2\text{Hz}$, H-6), 5.84 (1H, *d*, $J=2.1\text{Hz}$, H-8), 6.41 (2H, *s*, H-2', 6')

^{13}C -NMR (ppm, 100 MHz, CD₃OD) : 29.18 (C-4), 67.54 (C-3), 29.92 (C-2), 95.90 (C-8), 96.40 (C-6), 100.12 (C-10), 107.01 (C-2', 6'), 131.56 (C-1'), 133.63 (C-4'), 146.71 (C-3', 5'), 157.34 (C-9), 157.70 (C-5), 158.01 (C-7)

2.6.5. Compound 5

Compound 5의 ^1H -NMR (400Hz), ^{13}C -NMR (600Hz) 는 Table 1에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

주목열매 과육과 씨를 95% EtOH 용액으로 추출한 후, 용매의 극성에 따라 *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate 및 수용성으로 분획을 실시하여 동결 건조하였다. 그중 ethyl acetate용성과 수용성 분획에 대한 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피를 반복적으로 실시하여 catechin 화합물과 4개의 당으로 이루어진 탄수화물을 분리하였으며, ^1H -

주목열매 추출물 구조분석

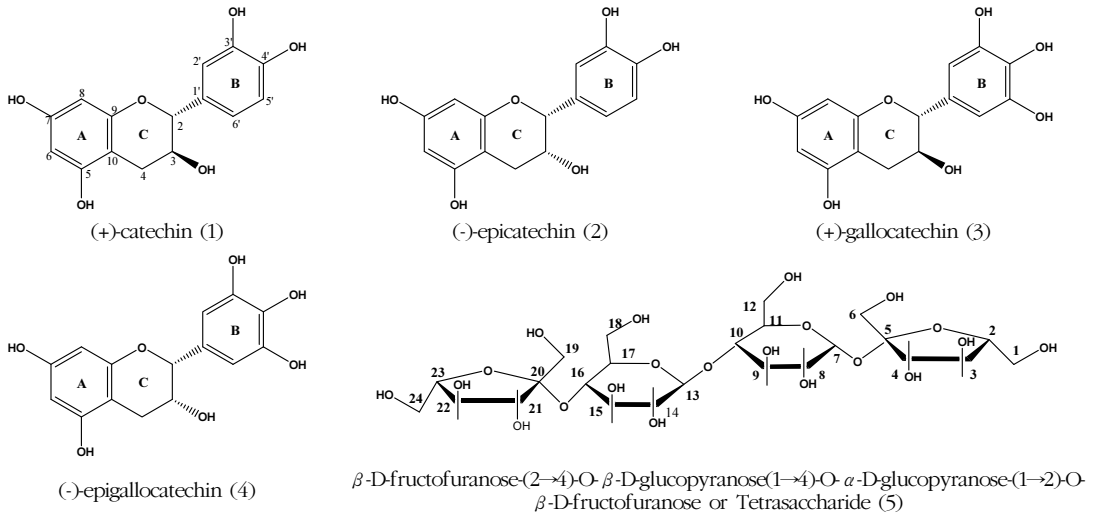


Fig. 1. Chemical structures of the isolated compounds (1-5).

^{13}C -NMR, DEPT, COSY 및 HSQC 스펙트럼과 methylation 이용하여 구조를 구명하였다.

에서 signal이 나타나는 차이를 보였다. 이상의 결과 화합물 2는 (-)-epicatechin으로 동정하였다[11].

3.1. 단리 화합물

3.1.1. (+)-Catechin (1) and (-)-Epicatechin (2)

화합물 1과 2는 flavan-3-ol 화합물의 대표적인 화합물로 녹색식물에 널리 분포하고 있다. 화합물 1은 갈색분말로 R_f 는 0.51(solvent A)과 0.41(solvent B)이었으며, UV램프 하에서는 갈색으로 관찰되고, vanillin 발색제에 진한 적색으로 반응하였다. ^1H -NMR 스펙트럼에서 flavan-3-ol의 heterocyclic C-ring의 특징적인 signal이 δ 2.50, 2.82, 3.96, 4.54에서 나타나며, catechol B-ring의 signal이 δ 6.71, 6.76, 6.83에서 나타난다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 C-2, 3, 4의 signal이 δ 82.88, 68.64, 28.55에서 나타나는 것으로 보아 화합물 1은 (+)-catechin으로 동정하였다[10].

화합물 2는 갈색분말로 R_f 는 0.45(solvent A)와 0.30(solvent B)이었으며 vanillin 발색제에 진한 적색으로 반응하였다. 화합물 1과 구조가 동일하나 C-ring의 입체구조가 cis형태이므로 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 δ 78.87(C-2), δ 66.49(C-3), δ 28.28(C-4)

3.1.2. (+)-Gallocatechin (3) and (-)-Epigallocatechin (4)

화합물 3과 4는 갈색분말로 R_f 값은 각각 0.44(solvent A) 및 0.39(solvent B)와 0.31(solvent A) 및 0.27(solvent B)이었으며, UV램프 하에 갈색으로 나타났으며 vanillin 발색제에 적색으로 반응하였다. 두 화합물의 구조적 차이는 C-3에 결합한 hydroxy group의 입체구조가 차이가 있을 뿐 나머지는 동일한 구조를 가지고 있어 NMR data가 서로 유사한 유형을 나타내었다.

화합물 3은 화합물 1 (+)-catechin과 B환에서 차이를 보이며, catechol형태가 아닌, C-5'에 수산기가 하나 더 치환되어 있는 pyrogallol형태를 하고 있다. 따라서 ^1H -NMR 스펙트럼에서 δ 6.30에서 H-2',6'이 하나의 큰 피크로 나타나고, 적분 값을 보면 두 개의 수소를 나타내고 있는데, 이것은 C-3',4',5'에 수산기가 결합된 pyrogallol환으로 서로 대칭을 이루고 있음을 나타낸다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 B환의 C-2',6'과 C-3',5'이 대칭구조를 이루고 있어 각각 하나의 큰 signal로 나타내었다. 나머지 signal은

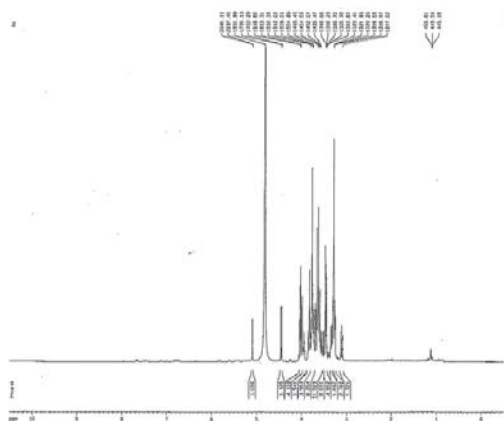


Fig. 2. ¹H-NMR of tetrasaccharide.

(+)-catechin의 전형적인 A환과 C환의 NMR 값과 일치하여, 이상의 결과, 화합물 3은 (+)-gallocatechin으로 동정하였다[12].

화합물 4는 화합물 3과 거의 유사하나, C환의 C-3에 결합한 수산기의 결합위치가 입체적으로 다른 *cis* 구조를 가지며, 이는 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 4.08, 4.72의 signal에서 나타내고 있다(Ham 등 1997; Kim 등, 1997). ¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-3의 수산기의 결합 위치 차이로 C환이 upfield 되어 δ 79.92와 δ 67.54에서 나타났으며 이것은 Foo 등 [13]이 보고한 data와 동일한 값을 나타내었다. 이상의 결과로 화합물 4는 (-)-epigallocatechin으로 구조 동정하였다.

3.1.3. Tetrasacchride (5)

β -D-fructofuranose-(2→4)-O- β -D-glucopyranose(1→4)-O- α -D-glucopyranose-(1→2)-O- β -D-fructofuranose or Tetrasaccharide (5)

화합물 5는 주목열매 과육의 수용성 분획에서 분리되었으며, UV램프 하에서는 갈색으로 관찰되었다. 화학적 이동값 R는 0.78 (solvent A)과 0.68 (solvent B)이었으며 vanillin-HCl-EtOH 발색제에 의한 갈색으로 반응하였다.

Fig. 2의 ¹H-NMR 스펙트럼에서 보는 바와 같이 δ 5.10의 signal J값이 3.71 Hz로 나타나고 있는데

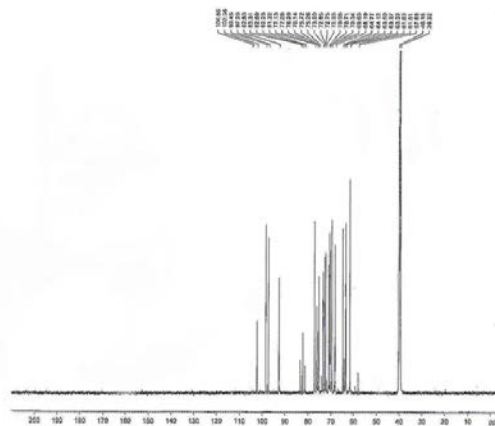


Fig. 3. ¹³C-NMR of tetrasaccharide.

이는 α -D-glucose H-1수소의 피크를 나타내는 것이며, δ 4.47의 7.84 Hz의 J값을 나타내는 것은 β -D-glucose의 H-1에 해당하는 것이다. Fig. 3의 ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 각각 α -D-glucose의 C-1은 δ 92.63에서 나타나며, β -D-glucose의 C-1은 좀 더 downfield되어 δ 97.25에서 나타나고 있다. 이때 β -D-glucose의 C-1과 결합하고 있는 α -D-glucose의 C-4의 경우 δ 68.19에서 피크를 보인다. δ 98.45과 δ 102.36에서 나타나는 signal은 α -D-glucose의 C-1과 β -D-glucose의 C-4와 결합하고 있는 β -D-fructose의 C-2를 각각 나타내고 있으며, 이때 β -D-glucose C-4는 δ 69.63에서 나타난다. 또한 β -D-glucose와 α -D-glucose가 서로 C-O-C결합을 하고 있는데, β -D-glucose의 C-1과 결합하고 있는 α -D-glucose의 H-4는 3.57 ppm 부근에서 나타나고 있다. ¹H-NMR 스펙트럼의 δ 3.34~3.53 사이에서 보이는 signal은 α -D-glucose, β -D-glucose의 H-6과 β -D-fructose의 H-1, 6을 나타내며, ¹³C-NMR 스펙트럼에서 보이는 δ 61.51, δ 61.63은 α -D-glucose, β -D-glucose의 C-6을, δ 64.77, δ 63.33은 각각 α -D-glucose와 결합하고 있는 β -D-fructose의 C-1, 6을 나타내며, δ 63.50, δ 63.30은 β -D-glucose와 결합한 β -D-fructose의 C-1, 6을 나타내고 있다. 이것은 Massimo 등[14]이 Italian honeys에서 분리한 α -D-glucose, β -D-

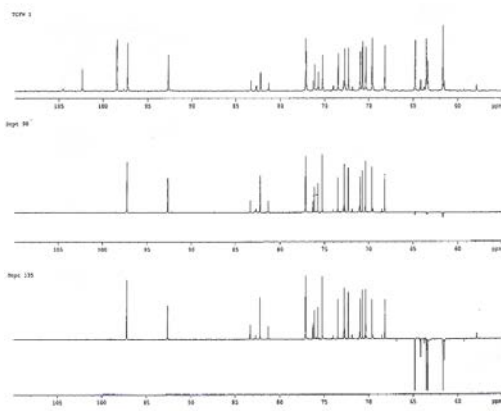


Fig. 4. DEPT of tetrasaccharide.

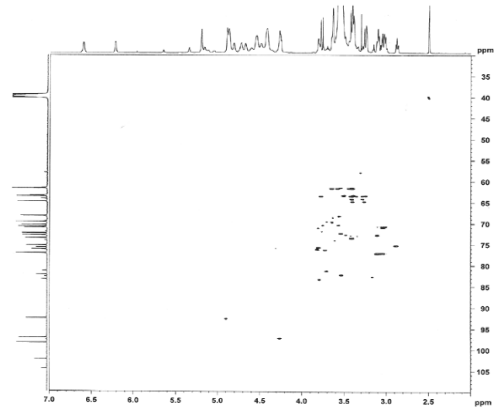


Fig. 6. HSQC of tetrasaccharide.

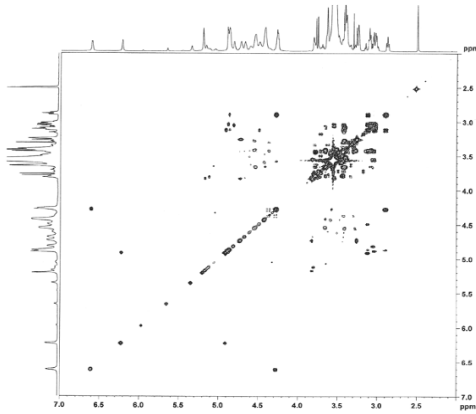


Fig. 5. COSY of tetrasaccharide.

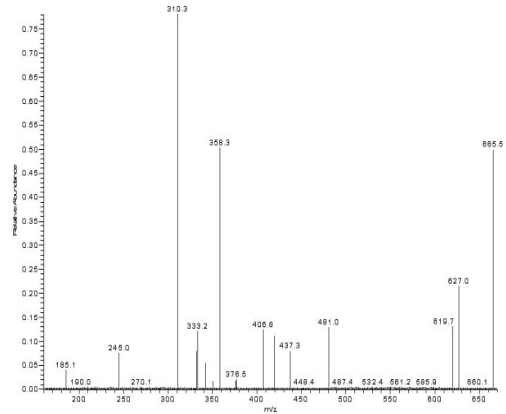


Fig. 7. LC/MS of tetrasaccharide.

glucose의 피크와 비교하여 분석하였다.

Fig. 4의 DEPT 스펙트럼은 좀 더 자세한 구조 분석을 위해 사용되었으며, 탄소와 결합된 수소의 개수에 따른 구별이 가능하다[15]. 그림에서와 같이 100 ppm 전후로 나타나는 signal은 quaternary 탄소이며, 이는 β -D-fructose의 C-2가 다른 분자와 결합을 하고 있음을 나타낸다. 다른 signal과 달리 아래 방향으로 나타나는 signal은 $-\text{CH}_2$ 를 나타내고 있으며, 이 화합물에서 CH_2OH 를 대신하는 피크이다.

수소와 탄소 간의 복잡한 signal의 상관관계를 알아보기 위해서 2D-NMR인 COSY와 HSQC를 통해 구조분석을 하였다.

Fig. 5 COSY 스펙트럼에서 화합물 5의 수소 간의 상관관계를 알 수 있었으며, α -D-glucose, β -D-glucose의 H-2, 3, 5의 수소들이 δ 3.12~3.77 사이에서 나타남을 확인 할 수 있었다. 또한 Fig. 6 HSQC 스펙트럼에서 α -D-glucose의 C-2, 3, 5를 δ 70.34, δ 70.71, δ 82.25에서, β -D-glucose의 C-2, 3, 5를 δ 72.33, δ 77.13, δ 81.32에서 확인할 수 있었다. α -D-glucose와 결합하고 있는 β -D-fructose의 C-3, 4, 5는 각각 δ 75.26, δ 76.14, δ 83.31에서, β -D-glucose와 결합하고 있는 β -D-fructose C-3, 4, 5의 경우 δ 75.72, δ 76.29, δ 82.65에서 각각 나타남을 알 수 있었다.



Fig. 8. Comparison of TLC separation of the sample and control monomeric sugars. (G: glucose, T: tetrasaccharide, F: fructose, S: sucrose)

Fig. 7의 LC/MS 스펙트럼에서는 665의 분자량이 측정되어, 이 화합물의 분자량 665와 일치함을 알 수 있었다. 따라서 이와 같은 결과를 토대로 화합물 5는 당분자 간의 탈수반응에 의해 ether 결합을 하는 α -D-glucose, β -D-glucose, β -D-fructose가 β -D-fructofuranose-(2→4)-O- β -D-glucopyranose(1→4)-O- α -D-glucopyranose-(1→2)-O- β -D-fructofuranose의 결합 구조를 갖는 4당(tetrasaccharide) 화합물로 구조 동정하였다.

3.2. Tetrasaccharide의 단당 분석

Fig. 8에서 보는 바와 같이 화합물 5(sample)를 T로 표기하고, 단당 성분 분석을 위하여 D-glucose, D-fructose 및 D-sucrose를 비교 표준물질로 사용하였으며 각각 G, F, S로 표기하였다. D-glucose 경우 D-fructose의 비해 낮은 이동 값을 보였으며, D-sucrose는 spot의 시작점이 D-glucose와 유사하나 D-fructose의 이동 값보다는 낮은 타원형의 spot으로 나타났다. 또한 화합물 5의 경우에는 D-sucrose와 같은 위치에서 spot을 나타냈으며, 이는 D-glucose와 D-fructose가 함께 존재하고 있는 D-sucrose와 같은 단당을 포함하는 것을 의미한다. 한편, TLC

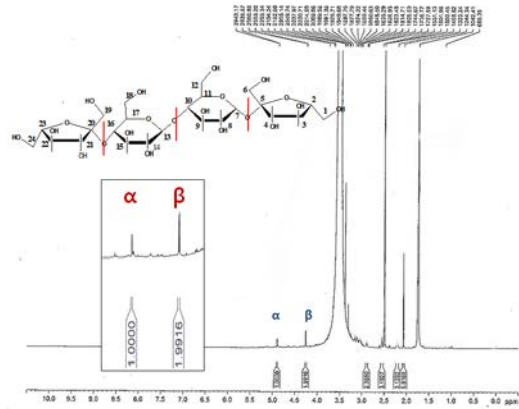


Fig. 9. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of tetrasaccharide prepared by acid hydrolysis.

를 이용한 단당 성분 분석의 경우 아노머(anomer) 탄소의 배열 차이에 의한 α -glucose와 β -glucose 사이의 차이는 나타나지 않았다.

따라서, 단당 분석을 통해 얻은 화합물 5(tetrasaccharide)에는 D-glucose와 D-fructose의 구성 당이 존재함을 확인하였다.

또한, 산 가수분해를 실시한 시료 화합물 5의 경우, glucose와 fructose로 존재하는데 fructose의 경우 aldehyde가 아닌 ketone기를 갖고 있기 때문에, 용액상태에서 glucose의 형태로 변하게 된다. 이때, carbonyl 탄소와 hydroxy기가 함께 존재하고 있는 열린 사슬의 단당류가 pyranose나 furanose의 형태로 고리화(cyclization) 될 때, 분자 내에서 안정된 고리형의 hemiacetal이 형성된다[16]. Glucose의 경우 수용액상태에서 열린 사슬 구조가 가역적으로 고리화가 일어나며, 이때의 glucose는 α -D-glucose와 β -D-glucose로 생성되며, 두 아노머(anomer)는 각각 1:2의 비율로 존재하게 된다고 알려져 있다[17]. Fig. 9의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 보는 바와 같이, δ 5.8과 δ 4.3에서 α -D-glucose와 β -D-glucose가 나타나고 있으며, 화합물 5의 가수분해 후 얻어진 단당이 용액상태에서 열린 사슬 형태에서 고리형의 glucose가 생성되었을 때, α -D-glucose와 β -D-glucose가 각각 1과 1.99의 비율로 존재함을 확인할 수 있었다.

따라서, 이상의 분석 결과를 토대로 화합물 5는 α -

D-glucose, β -D-glucose 및 β -D-fructose의 화합물로 구성됨을 확인할 수 있었다. 최종적으로 화합물 5는 β -D-fructofuranose-(2 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopyranose(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopyranose-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-fructofuranose로 구성된 tetrasaccharide임을 확인할 수 있었으며, 본 실험을 통해 최초로 분리, 구조 동정된 탄수화물이다.

4. 결론

주목열매에서 분리한 과육과 씨를 ethyl acetate 및 수용성에 대한 칼럼크로마토그래피를 실시하여 flavan 화합물 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin을 분리하여 그 구조를 결정하였으며, 당 화합물은 보다 정확한 구조를 결정하기 위해 2차원 NMR과 LC/MS 스펙트럼을 이용하여 분석하였다. 또한 단당성분 분석을 위해 산 가수분해, permetylation을 실시하여 구성당의 성분과 결합위치를 확인하였다. 4당 탄수화물 tetrasaccharide는 β -D-fructofuranose-(2 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopyranose(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopyranose-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-fructofuranose로 결합된 구조로 동정되었으며, 본 실험을 통해 최초로 구조 구명된 화합물이다.

사 사

본 연구는 산림청 '산림과학기술개발사업(과제번호 : S211313L010130)'의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참 고 문 헌

1. 김인영, 조춘구. 2002. 주목(朱木)씨앗 추출물의 제조방법 및 효능효과. 생약학회지 33(4): 364~371.
2. 조병목, 이종윤, 윤병호, 황병호. 1987. 목재화학, 영남대학교출판부.
3. 함연호. 2000. 사시나무속과 버드나무속 주요 수종 수피의 추출성분에 관한 연구. 강원대학교 박사학위논문.
4. 최원경, 박정현, 김성환, 이도영, 이용장. 1999. 암세포

- 의 종류에 따른 녹차 Catechin의 항암효과. 영양학회지 32(7): 838~843.
5. 이학주, 이성숙, 최돈하, 권영한. 2003. 수목추출물의 생리활성에 관한 연구(XI)-주목(*Taxus cuspidata*) 심재 추출성분 및 항산화 활성. 목재공학회지 31(1): 32~40.
6. Purdie, T. and J. C. Irvine. 1903. The alkylation of sugars, Journal of Chemical Society 83: 1021~1037.
7. Hakomori S. 1964. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide, Journal of Biological Chemistry 55: 205~208.
8. Ciucanu I. and F. Kerek. 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, Carbohydrate Research 131: 209~217.
9. Seaman J. F., W. E. Moore, and R. L. Mitchell. 1963. Hydrolysis and quantitative paper chromatography, In: Methods in carbohydrate chemistry, New York Academic press 54~69.
10. Agrawal, P. K. 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier. 437~445.
11. Harbone, J. B. and T. J. Marby. 1982. The flavonoids advance in research. Chapman and Hall Ltd. pp. 421~426.
12. Kwon, D. J. 2010. Chemical Constituents and Biological Activities of Certain *Acer* species Growing in Korea. Thesis for the degree of Doctor.
13. Foo, L. Y., Y. Lu, W. C. McNabb, G. Waghorn, and M. J. Ulyatt. 1997. Proanthocyanidins from *Lotus Pedunculatus* Phytochemistry 45(8): 1689~1696.
14. Massimo, L., B. Davide, and P. Maria. 2008. Classification of Italian Honeys by 2D HR-NMR. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(4): 1298~1304.
15. Li, B. L. and Y. J. Pan. 2002. A new diterpenoid isolated from *Isodon japonica*: structure elucidation by NMR spectroscopy. Bulletin of the Korean Chemical Society 23(4): 617~618.
16. Silva, A. M., E. C. Da Silva, and C. O. Da Silva. 2006. A theoretical study of glucose mutarotation in aqueous solution. 2006. Carbohydrate research 341(8): 1029~1040.
17. Roger W. Binkley. 1988. Modern Carbohydrate Chemistry. Marcel Dekker, INC.