

황벽나무 열매 추출물로부터 신규 화합물의 분리 및 구조분석*1

김영희*2† · 최정은*2 · 홍진영*2 · 조창욱*2 · 이정민*2 · 김수지*2

A New Compound Isolation and Structure Analysis from *Pbellodendron Amurense* Fruit Extract*1

Young-Hee Kim*2† · Jung Eun Choi*2 · Jin-Young Hong*2 · Chang Wook Jo*2 ·
Jeung-Min Lee*2 · Soo Ji Kim*2

요 약

본 연구는 유기질 문화재 보존을 위해 한국 전통 약용식물을 대상으로 항균 및 살충활성을 검증한 결과 황벽나무 열매 추출물이 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다. 황벽나무 열매 추출물을 비극성 용매로 분획하여 그 중 가장 활성이 우수한 ethylacetate 분획물을 대상으로 실리카겔 및 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 실시하고 Prep-TLC를 이용하여 화합물을 순수 분리하였다. 화합물은 UV spectrum 분석 결과 260 nm 파장에서 최대흡수피크가 관찰되었고, ¹H, ¹³C, HMQC, HMBC NMR과 ESI mass spectrum을 이용하여 화학구조를 분석한 결과 (4'-ethyl-2'-methylfuranyl)-6-methoxy-7-methylnona-2E,4E,6Z,8E-tetraenoic acid의 새로운 화합물임을 알 수 있었다.

ABSTRACT

Antifungal and insecticidal activity of Korean traditional medicinal plants was carried out to develop natural material for the development of organic cultural heritage conservation. As a result, *Pbellodendron amurense* fruit was finally selected as a candidate of antifungal and insecticidal natural material. An novel active compound was purified from the ethylacetate fraction of *Pbellodendron amurense* fruits using silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography and PTLC. The compound was obtained as yellow oil form; UV λ_{\max} (MeOH): 260 nm. The chemical

*1 접수 2012년 11월 1일, 채택 2013년 7월 17일

*2 국립문화재연구소 보존과학연구실. Conservation Science Division, National Research Institute of Cultural Heritage, Daejeon, 305-380, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 김영희(e-mail: kimyh93@hanmail.net)

structure of novel compound was determined as (4'-ethyl-2'-methylfuranyl)-6-methoxy-7-methylnona-2E,4E,6Z,8E-tetraenoic acid on the basis of various NMR experiments including ^1H - and ^{13}C -NMR, HMQC, HMBC and ESI-mass spectrum.

Keywords: *Phellodendron amurense*, novel compound, isolation, chemical structure analysis

1. 서 론

황벽나무(*Phellodendron amurense*)는 겉껍질을 벗기면 노란 속껍질이 나타난다. 겉껍질은 콜크, 속껍질은 약재로 사용하였으며, 열매는 살충제로 오랜 옛날부터 사용해 온 나무로 조상들이 아낀 나무이다 [1]. 동의보감에 보면 수피를 황벽, 황백(黃栢)이라 하며 설사와 이질을 멈추게 하고 눈이 충혈로 찢발이 서고 아플 때, 입안이 현 것 등을 치료한다고 한다. 참고로 화장품 천연소재 연구에서 지방분해활성, 피부 멜라닌 생합성 저해활성, 항산화활성이 보고되었으며[2-4], 향미생물 활성연구에서는 식품부패미생물이나 피부진균, 식중독균, 구강균에 대한 저해효과가 확인되었다[5-6]. 또한 노란 수피는 염료의 재료가 되기도 해서 옷감이나 종이를 염색하는데 사용하였으며, 현존 최고의 목관인쇄물인 무구정광대다라니경(국보 126호)이 천년을 넘긴 긴 세월 동안 잘 보존되어 온 것도 황벽나무 열매의 성분 때문이다[7]. 황벽나무 열매의 황색색소는 주성분이 berberine과 그 유도체들로서, 이 성분에 대한 연구는 이미 많이 이루어져 있다[8-10]. 황벽나무 성분으로 염색한 항균지 개발에 대한 연구도 진행되고 있으며, 이러한 항균지는 벌레나 세균의 침입에 대해 효과적이고 종이의 품질 향상과 더불어 강도 또한 향상시켜 보존성을 높이고 있다[11]. 이렇듯 예로부터 황벽나무는 약재를 비롯해 문화재 보존, 섬유 및 종이의 염색과 보존에도 사용되어 왔다. 본 연구실에서 황벽나무 부위별 추출물을 포함한 열매 추출물 및 분획물을 이용하여 다양한 유기질 문화재 가해균에 대한 항진균 활성 조사 및 항산화 효과에 대하여 보고한 바 있으며, 황벽나무의 우수한 항진균 효과와 열매의 항산화 효과를 조사한 연구 결과로부터 황벽나무의 성분이 미생물의 성장을 억제하고 산화

방지에 높은 효과가 있음을 확인하였다[12].

그러므로 본 연구에서는 이러한 약리효과를 가지고 있는 황벽나무의 추출성분들을 보다 정확히 규명하고 새로운 물질을 탐색함으로써 황벽나무의 유기질 문화재 보존제로서 활용 가능성 및 유효성분의 화학적인 기초자료를 제공하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

2.1.1. 황벽나무 열매(*Phellodendron Amurense* Fruits)

본 연구에 사용된 황벽나무는 50년생으로 대전광역시 유성구 금고동의 수목원관리사업소 양묘장에서 2009년 9월에 채취하였다. 채취한 열매는 깨끗이 씻어 건조시킨 후 99.95%의 메탄올로 실온에서 1주일 동안 추출하여 여과하였다. 여액은 회전식 진공농축기(EYELA, Japan)로 감압농축한 후 본 실험의 시료로 사용하였다.

2.1.2. 분석기기

본 연구에 사용된 분석기기는 분리된 화합물의 자외선 흡수 영역을 파악하기 위하여 UV-VIS spectrometer인 UV-2550 (Shimadzu, Japan)을 사용하였고, 적외선 흡수 스펙트럼은 ALPHA-P (Bruker, Germany)로 측정하였으며, 질량분석을 위한 Mass spectrometer는 Agilent Technology사의 Triple Quad 6410 System을 사용하였다. 화합물의 구조를 동정하기 위하여 900 MHz NMR Spectrometer (Bruker, Germany)를 이용하여 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, HMQC와 HMBC spectrum을 측정하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 황벽나무 열매의 추출 및 분획

황벽나무 열매는 실험 시 세척하여 99.95% 메탄올로 실온에서 1주일 동안 추출한 후 여과지(Whatman No.2)로 여과하여 본 실험의 시료로 사용하였다. 메탄올 추출물을 진공감압농축기로 농축시킨 후 증류수로 현탁시켜 용매별 극성차이를 이용하여 용매분획을 실시하였다. 먼저 n-Hexane을 1:1 (v:v)의 비율로 혼합한 후 상하층으로 분리된 층 가운데 상층을 분리해낸 다음 하층을 다시 분획하는 동일한 과정을 총 3회 반복 수행하였다. 남은 여액에 동일한 과정으로 dichloromethane을 이용하여 분획하였다. 용매별 순차 분획 과정 중 마지막으로 동일한 방법으로 ethylacetate를 첨가하여 분획한 후, 이를 감압농축하여 최종 분획물로 본 실험에 이용하였다.

2.2.2. 생리활성 성분의 분리

황벽나무 열매 추출물로부터 유효성분을 분리하기 위하여 각종 컬럼 크로마토그래피 및 TLC를 실시하였다. 즉 silica gel open column chromatography (n-hexane : ethylacetate = 30:1~1:5)를 실시하여 다량의 비극성 성분을 제거하였다. TLC 확인을 통하여 유효성분 분획물을 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography (dichloromethane:methanol = 1:1)를 실시하여 분리하였다. 용매조건을 변경하여 Sephadex LH-20 column chromatography (methanol:water = 70:30)로 재분리하여 순수한 분획물을 얻었으며, 이를 TLC와 HPLC 분석을 통하여 단일 화합물임을 확인하였다.

2.2.3. 생리활성 성분의 화학구조 규명

UV-Vis spectroscopy (Shimadzu, Japan)를 이용하여 200~600 nm 영역에서 순수 분리한 화합물의 최대 흡수 피크를 관찰하였으며, IR spectroscopy (Bruker, Germany)를 이용하여 화합물의 주요 작용기를 관찰하고, 작용기 피크의 overtone 여부를 확인하였다. HPLC-MS (Agilent, USA)를 이용하여 화합물의 정확한 분자량을 확인하였다. UV, IR

그리고 MS 분석을 통하여 화합물의 기본구조를 예측한 후 정확한 화학 구조를 동정하기 위하여 NMR spectroscopy (Bruker, Germany)를 이용하였다. 수소간 상관관계를 규명하기 위하여 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (900 MHz)을 측정하였고, 탄소의 위치 및 치환체와의 상관관계를 위해 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (225 MHz)을 측정하였으며, 수소-수소 연결을 보기 위해 COSY spectrum, 수소-탄소 연결을 보기 위해 HMQC spectrum을 측정하였다. 그 외 HMBC spectrum을 이용하여 수소로부터 먼 거리의 탄소의 연결을 확인함으로써 화합물의 구조를 동정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 황벽나무 열매 유효 성분의 분리

Ethylacetate 분획물을 TLC로 확인한 결과, n-hexane과 ethylacetate 1:1 전개용매를 사용한 경우에는 여러 분획으로 나누어지며, methanol과 dichloromethane 1:5 전개용매의 경우에는 분리가 이루어지지 않았다. 따라서 n-hexane과 ethylacetate를 이동상으로 이용한 silica gel column chromatography를 진행하였고, 그 결과로 얻은 fraction 가운데 주성분 구간인 fraction 63~65를 모아 농축시켰다. 이들을 다시 size exclusion gel인 Sephadex LH-20를 이용하여 분리하였으며, 분리된 주성분 구간 fraction 9~12를 이동상을 달리하여 Sephadex LH-20 column chromatography (methanol:water = 70:30)으로 분리하였다. 이들 분획을 TLC로 확인한 단일 피크 구간을 HPLC 분석을 통하여 다시 확인하였다(Fig. 1).

3.2. 황벽나무 열매 유효 성분의 구조 분석

3.2.1. UV/Visible 흡광도

TLC 전개 후 얻은 순수 화합물을 UV 흡광도를 측정한 결과 260 nm에서 최대 흡수 피크를 나타내었다. 이는 conjugated diene으로 인한 흡수 피크로 예상되었다.

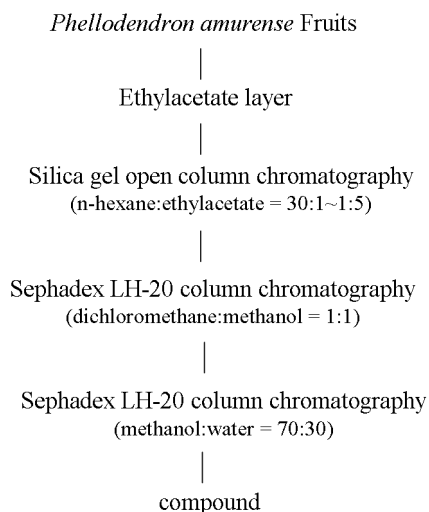


Fig. 1. Purification scheme of novel compound from *Phellodendron amurense*.

3.2.2. IR 분석을 통한 작용기 확인

화합물의 IR spectrum을 분석한 결과 3,312 cm^{-1} 에서 전형적인 hydroxy group으로 인한 넓은 흡수 피크가 관찰되었고, 2,943, 2,800 cm^{-1} 의 C-H stretching으로 인한 흡수 피크가 관찰되었다. 또한 1,457 cm^{-1} 의 conjugated double bond carbon에 의한 흡수 피크로 사료되며 1,023 cm^{-1} 에서 primary alcohol의 C-O stretching에 의한 피크가 관찰되었다. 900~500 cm^{-1} 구간에서 conjugated carbon 또는 C-H bending에 의한 흡수 피크가 관찰되었다.

3.2.3. HPLC-Mass Spectrum 해석

순수 분리한 화합물을 acetonitrile:water = 20:80 (v/v) 조건의 이동상으로 HPLC-MS spectrum scanning한 결과, 양이온(positive) 모드의 일반적 특성에 따라 분석하고자 하는 중성분자에 protonation된 $[M^+]$ 형태로 mass peak가 나타났다. 본 결과의 mass peak m/z 값은 306이었으며, 18단위로 adduct된 것으로 나타났다. 이는 conjugated diene에 대한 hydrolysis 반응 또는 구조상 hydroxy group과 proton의 addition으로 인한 것으로 추측된다. 화합물의 물리화학적 특성을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Physico-chemical property of compound purified from *Phellodendron Amurense*

	Compound
Molecular formula	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_4$
Molecular weight	306
HRESI-MS m/z	306.1831 $[M]^+$
Calcd.	306.1833
UV(MeOH) λ_{max} nm	260
IR ν_{max} cm^{-1}	3312, 2943, 2800, 1457, 1023

3.2.4. ^1H , ^{13}C -NMR, COSY, HMQC와 HMBC에 의한 구조 해석

순수 분리한 화합물의 ^1H -NMR spectrum을 측정 한 결과 15개의 proton peak가 관찰되었고, 각 proton peak는 주변 proton과의 coupling constant 값에 의하여 예측할 수 있다. 그 중 methine peak는 6.0, 7.18, 6.21, 6.19, 6.13, 5.89 ppm으로 6개와 4.08, 1.83, 4.28 ppm에 3개로 모두 9개이며, 이 중 conjugated diene 결합으로 연결된 proton이 6개로 6.0과 7.18 ppm이 $J = 15.3$ Hz, 6.21과 6.19 ppm이 $J = 14.4$ Hz, 6.13과 5.89 ppm이 $J = 15.3$ Hz로 trans 결합을 하고 있으며, 또한 이중 7.18과 6.21 ppm은 $J = 10.8$ Hz로 cis 결합으로 연결되어 있음을 알 수 있었다. Methylene은 모두 2개로 2.24, 1.62 ppm에서와 1.32 ppm에서 나타났으며, 2.24와 1.62 ppm은 하나의 carbon에 있는 proton들이다. 또한 1개의 methoxy기가 3.25 ppm에서 관찰되었고, 3개의 methyl기가 1.21, 0.98, 1.02 ppm에서 관찰되었다.

^{13}C -NMR spectrum에서는 18개의 carbon peak가 관찰되었다. 171.2 ppm에 carboxylic carbon에 해당하는 peak가 관찰되었고, 149.9 ppm과 110.2 ppm에서 2개의 4급 탄소가 관찰되었다. 또한 123.2, 142.6, 129.0, 130.1, 122.3과 131.6 ppm에서 conjugated double bond에 의한 6개의 carbon peak가 관찰되었다. 52.6 ppm에서 1개의 methoxy carbon peak가 관찰되었고, 14.2, 20.8과 27.2 ppm에서 3개

Table 2. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum data of compound

Position	¹ H-chemical shift	¹³ C-chemical shift
1		171.2
2	6.0 (d, <i>J</i> = 153 Hz)	123.2
3	7.18 (dt, <i>J</i> = 153, 10.8, 3.6 Hz)	142.6
4	6.21 (dd, <i>J</i> = 14.4, 10.8 Hz)	129.0
5	6.19 (d, <i>J</i> = 14.4 Hz)	130.1
6		149.9
7		110.2
8	6.13 (q, <i>J</i> = 153, 7.2, 6.3 Hz)	122.3
9	5.89 (dq, <i>J</i> = 153, 128, 6.3 Hz)	131.6
10	3.25 (s)	52.6
11	1.21 (bs)	27.2
1'	4.08 (dd, <i>J</i> = 12.8, 6.3 Hz)	72.6
2	1.83 (m)	29.6
3'	2.24, 1.62 (m)	37.2
4'	4.28 (ddd, <i>J</i> = 6.3, 6.3, 5.4 Hz)	69.2
5'	1.32 (m)	31.2
6'	0.98 (t, <i>J</i> = 6.3, 6.3 Hz)	14.2
2-CH ₃	1.02 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz)	20.8

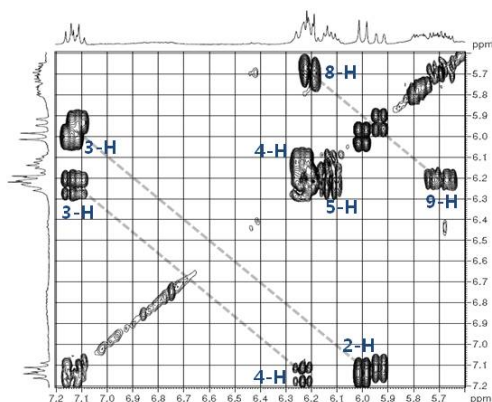


Fig. 2. H-H COSY correlation of a novel compound.

의 methyl carbon peak이 관찰되었다. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum data는 Table 2에 나타내었다.

위의 spectrum에서 알 수 없는 것들은 2D-NMR spectrum을 통하여 예측하였다. 우선, Fig. 2에 나타낸 것과 같이 COSY spectrum을 통하여 바로 이웃하는 proton-proton correlation을 예측하였는데, 결과는 다음과 같다. 6.0과 7.18 ppm, 7.18과 6.21 ppm, 6.21과 6.19 ppm 그리고 마지막으로 6.13과 5.89 ppm의 proton들이 이웃하고 있는 것을 알 수 있었고, 4.08과 1.83 ppm, 4.28과 1.32 ppm, 1.32와 0.98 ppm이 서로 이웃하고 있음을 알 수 있었다. 다음으로 HMBC spectrum을 통하여 proton에서 멀리

있는 carbon peak를 관찰할 수 있었다. 6.0 ppm의 proton에서 C-1 (171.2 ppm)과 C-4 (129.0 ppm), 7.18 ppm의 proton에서 결합된 carbon C-1 (171.2 ppm), C-2 (123.2 ppm), C-5 (130.1 ppm)의 연결을 확인하였으며, 6.19 ppm의 proton에서 C-6 (149.9 ppm), 5.89 ppm의 proton에서 C-7 (110.2 ppm), C-8 (122.3 ppm), C-1' (72.6 ppm)의 연결을 확인하였다. 또한 1.21 ppm의 methyl proton에서 C-6 (149.9 ppm), C-7 (110.2 ppm), C-8 (122.3 ppm)의 연결과 1.02 ppm의 methyl proton으로부터 C-1' (72.6 ppm)과 C-3' (37.2 ppm), 그리고 1.32 ppm의 proton으로부터 C-3' (37.2 ppm), C-4' (69.2 ppm), C-6' (14.2 ppm)의 연결을 확인하였다.

이상의 결과로부터 순수 분리한 새로운 화합물이 동정되었다. 신규 화합물의 화학구조는 Fig. 3에 나타내었다.

황벽나무 (*Phellodendron amurense*) 수피에 대한 연구는 많이 진행되어 밝혀진 성분으로 berberine이 대표적이며, 그 외 성분으로 palmatine, jateror-rhizine, magnoflorine, norcoralydine, menispermine, guanidine, condicine, obacunone, limonin 등이 있다. Isoquinoline alkaloid의 photoberberine class의 하나인 berberine 성분은 황백 내 0.6~2.5% 함유되어 있으며, 항암활성, 항진이활성, 항균활성, 단백질 생합성 저해활성, 항염증활성, 살균작용, 식욕항

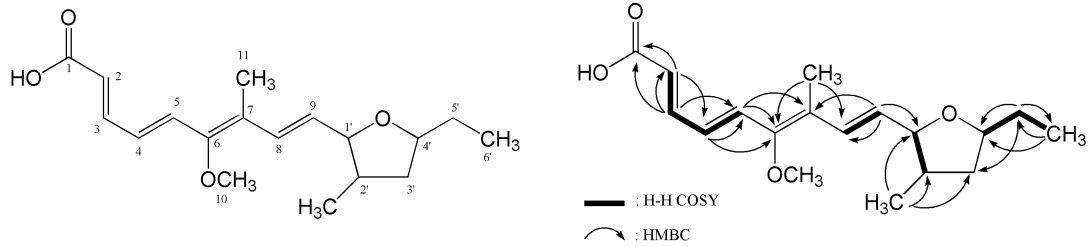


Fig. 3. Chemical structure of compound purified from *Phellodendron amurense* fruits.

진작용 및 설사에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구에서 새롭게 분리한 화합물은 황벽나무 수피에서 얻어진 화합물과 전혀 다른 화합물로 그 의미가 크다.

4. 결 론

본 연구에서 분리한 화합물은 처음으로 황벽나무 열매로부터 분리한 화합물로 황벽나무 수피에서 주로 분리되는 berberine 계열의 화합물이 아닌 새로운 화합물, (4'-ethyl-2'-methylfuranyl)-6-methoxy-7-methylnona-2E,4E,6Z,8E-tetraenoic acid로 동정되었다. 황벽나무 열매 추출물에서 항진균 및 살충활성을 나타내었기 때문에 본 화합물 또한 활성이 있을 것으로 사료되나 이는 활성검증을 통하여 다시 보고 하고자 한다.

사 사

본 연구는 국립문화재연구소에서 지원한 문화유산융복합연구 중 「유기질 문화재 천연 보존재료 개발 연구」의 일환으로 진행되었습니다.

참 고 문 헌

1. 강관권. 2010. 역사와 문화로 읽는 나무사전 “황벽나무”, p. 606-608.
2. Kim, K. H., S. C. Ahn, M. S. Lee, O. S. Kweon, W. K. Oh, M. S. Kim, C. B. Sohn, and J. S. Ahn. 2003. Adipocyte differentiation inhibitor isolated from

- the barks of *Phellodendron amurense*. Korean J. Food Sci. Technol 35(3): 503~509.
3. Lee, J. G., J. Y. Choi, J. S. Oh, H. W. Jung, E. H. Choi, H. S. Lee, J. A. Kim, T. S. Chang, J. K. Son, and S. H. Lee. 2007. Isolation of melanin biosynthesis inhibitory compounds from the *Phellodendri cortex*. Natural Products Sciences 38(4): 387~393.
4. Lee, S. E., N. S. Seong, J. K. Bang, C. G. Park, J. S. Sung, and J. Song. 2003. Antioxidative activities of Korean medicinal plants. Korean J. Medicinal Crop Sci. 11(2): 127~134.
5. Doh, E. S. 1997. Antifungal activity of *Anemarrhena asphodeloides*, *Coptis japonica* and *Phellodendron amurense* extracts against Phytophthora blight. Korean J. Plant. Res. 10: 351~359.
6. Kwak, D. J. 2004. Antibacterial activities of *Phellodendri cortex* on the *Streptococcus mutans*. J. Korean Soc. Hygienic Sciences 10(2): 99~107.
7. 임경진. 2001. 솟아라 나무야, 다른세상, 서울, 대한민국.
8. Nakamoto, K., S. Sadamori, and T. Hamada. 1990. Effects of crude drugs and berberine hydrochloride on the activities of fungi. J. Prosthet. Dent. 64(6): 691~694.
9. Liu, Y. M., S. J. Sheu, S. H. Chiou, H. C. Chang, and Y. P. Chen. 1993. A comparative study on commercial samples of *Phellodendri cortex*. Planta Med. 59(6): 557~561.
10. Mitani, N., K. Murakami, T. Yamaura, T. Ikeda, and I. Saiki. 2001. Inhibitory effect of berberine on the mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic implantation of Lewis lung carcinoma. Cancer Lett. 165, 35~42.
11. Choi, T. H. 2010. Development of high performance materials for cultural properties, conservation and storage using natural dyed Korean tra-

- ditional paper (Hanji). National Research Institute of Cultural Heritage (NRICH), Research report.
12. Hong, J. Y., Y. H. Kim, M. H. Jung, C. W. Jo, and J. E. Choi. 2010. Antifungal activities on organic heritage fungi and antioxidative effect of *Phellodendron amurense* extractives. Journal of Korea TAPPI. 42(5): 54~61.