

엄나무 유래 신규 항산화 활성물질

김영희, 김종평, 윤봉식, 문석식¹⁾, 유익동
생명공학연구소, ¹⁾공주대학교 자연과학대학 화학과

Antioxidants Isolated from *Kalopanax pictus*

Young-Hee Kim, Jong-Pyoung Kim, Bong-sik Yun, Surk-sik Moon and Ick-Dong Yoo
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong,
Taejon 305-600.

¹⁾Depart. of Chemistry, College of Natural Science Kong-ju Univ. Kongju, Chungnam 314-701, Korea.

Abstract

Screening of new antioxidants from oriental medicines resulted in the isolation of a new antioxidative compound and eight known compounds from the stem bark of *Kalopanax pictus*. On the basis of various spectroscopic studies, the structure of the new compound was determined to be 4-rhamnose-3,5- dimethoxybenzoic acid methyl ester. Other known compounds were identified as ferulic acid, 4,5,6,- trihydroxyflavanone, 2',4',4"-trihydroxychalcone, caffeic acid, coniferyl alcohol, syringin, 1,3-di-O-caffeoylquinic acid. These compounds showed lipid peroxidation inhibitory activity in rat liver microsomes and free radical scavenging activity.

서 론

모든 호기성 생물들은 산소를 최종 전자수용체로 하는 호흡을 통해 에너지를 획득한다. 그러나 이와 같이 생명유지에 절대적으로 필요한 산소이지만 안정한 분자 상태인 기저삼중항산소가 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 수퍼옥사이드 라디칼 (O_2^-), 하이드록실 라디칼 ($\cdot OH$), 과산화수소 (H_2O_2), 일중항산소 (1O_2)와 같은 반응성이 매우 큰 활성산소 (reactive oxygen species)로 전환되면 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다. 즉, 이들 활성산소는 세

포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 함으로써 암을 비롯하여 노화, 뇌질환, 심장질환, 허혈, 염증, 류마티스 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(1-5).

한편, 정상적인 세포에서도 대사과정 중 어느 정도의 free radical과 기타 활성산소 및 과산화물이 생성되고 있으나, 생체내에는 이들에 대한 방어기구로서 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화 효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 저분자 항산화물질이 존재하여 산화적 손상으로부터 스스로를 보호하고 있다. 그러나 이와 같은 생체 방어기구에 이상이 초래되거나 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 활성산소의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산소독성에 의한 세포파괴가 야기된다. 따라서 이와 같은 free radical을 소거할 수 있는 화합물 (free radical scavengers) 또는 과산화물 생성 억제물질과 같은 항산화물질들은 이들 산화물들에 의하여 야기되는 각종 질환 치료제 및 노화억제제로서 기대된다.

본 연구실에서는 약용식물을 비롯하여 국내의 토양미생물, 담자균류로부터 지질과산화 저해 및 free radical 소거활성을 갖는 새로운 항산화활성물질을 탐색하여 다수의 신규 화합물을 보고한 바 있다(6-19). 천연물로부터 신규 항산화 활성물질 탐색의 일환으로 조사한 약용식물의 항산화 활성조사 결과 옹나무의 메탄올 추출물에서 지질과산화 억제활성 및 free radical 소거활성이 검정되어 활성물질의 규명을 시도하였다.

옹나무 (*Kalopanax pictus*)는 전국에 자생하는 낙엽활엽교목으로 높이 25 m, 직경 1m에 달하는 거목이며, 대개 군집성이 없고 중국이나 일본에도 분포한다(20). 한방에서는 수피를 해동피 (*Kalopanax cortex*)라하여 강장약 및 신경통약 등으로 사용되어 왔다(21). 지금까지 옹나무로부터 수종의 사포닌과 리그난 성분이 분리, 보고된 바 있다(22, 23). 특히 옹나무에는 구조적으로 강한 항산화 활성을 지닐 것으로 추정되는 몇몇 페놀성 화합물들이 존재하는 것으로 보고되었음에도 불구하고 이들 활성에 관하여는 조사된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 옹나무로부터 항

산화 활성물질을 탐색하여 지질과산화 저해 및 free radical 소거활성을 갖는 신규 화합물을 분리하여 Kalopanxin E로 명명하였으며, 항산화 활성을 갖는 수종의 phenolic 화합물을 분리하여 그 화학 구조를 규명하였다.

재료 및 방법

시료의 채취 - 엄나무는 대전지역에서 1997년 4월에 채집한 후 음건, 세절하여 사용하였다.

기기 및 시약 - UV spectrum은 UV-260 spectrophotometer를, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine 5989A mass spectrometer를 사용하여 측정하였다. ¹H, ¹³C NMR을 비롯한 2차원 NMR 측정에는 Varian Unity 300 spectrometer 및 Varian Unity 500 spectrometer를 사용하였으며, NMR 용매는 CDCl₃과 CD₃OD을 사용하였으며, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)을 사용하였다. Column chromatography용으로 silica gel은 Kieselgel 60 (70~230mesh, Merck Art. 7734)을, ODS resin은 YMC-gel (ODS-A, 60~230mesh)을, Sephadex LH-20은 Pharmacia사 제품을 사용하였다. Silica gel TLC 및 역상 TLC에는 각각 Merck사의 pre-coating된 Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck Art. 5715, 5744)과 ODS(Merck Art. 15389) plate를 사용하였다. 기타 시약은 일급시약을 사용하였다.

활성물질의 추출 및 분리 - 엄나무 줄기로부터 항산화 활성물질의 분리 및 정제과정은 Fig. 1과 같다. 음건하여 세절한 엄나무 줄기 6kg을 80% MeOH을 가하여 상온에서 3일간 2회 반복 추출하였다. MeOH 추출물을 감압 농축한 다음 유기 용매를 사용하여 극성에 따른 분획을 실시하였다. 물에 현탁된 MeOH 추출시료를 n-hexane으로 먼저 추출하고 난 후 물층을 다시 CHCl₃, EtOAc, n-BuOH로 순차적으로 추출하였다. 각 용매추출 분획중 가장 강한 지질과산화 억제 활성을 나타내는

Stem of *Kalopanax pictus* (6 kg)

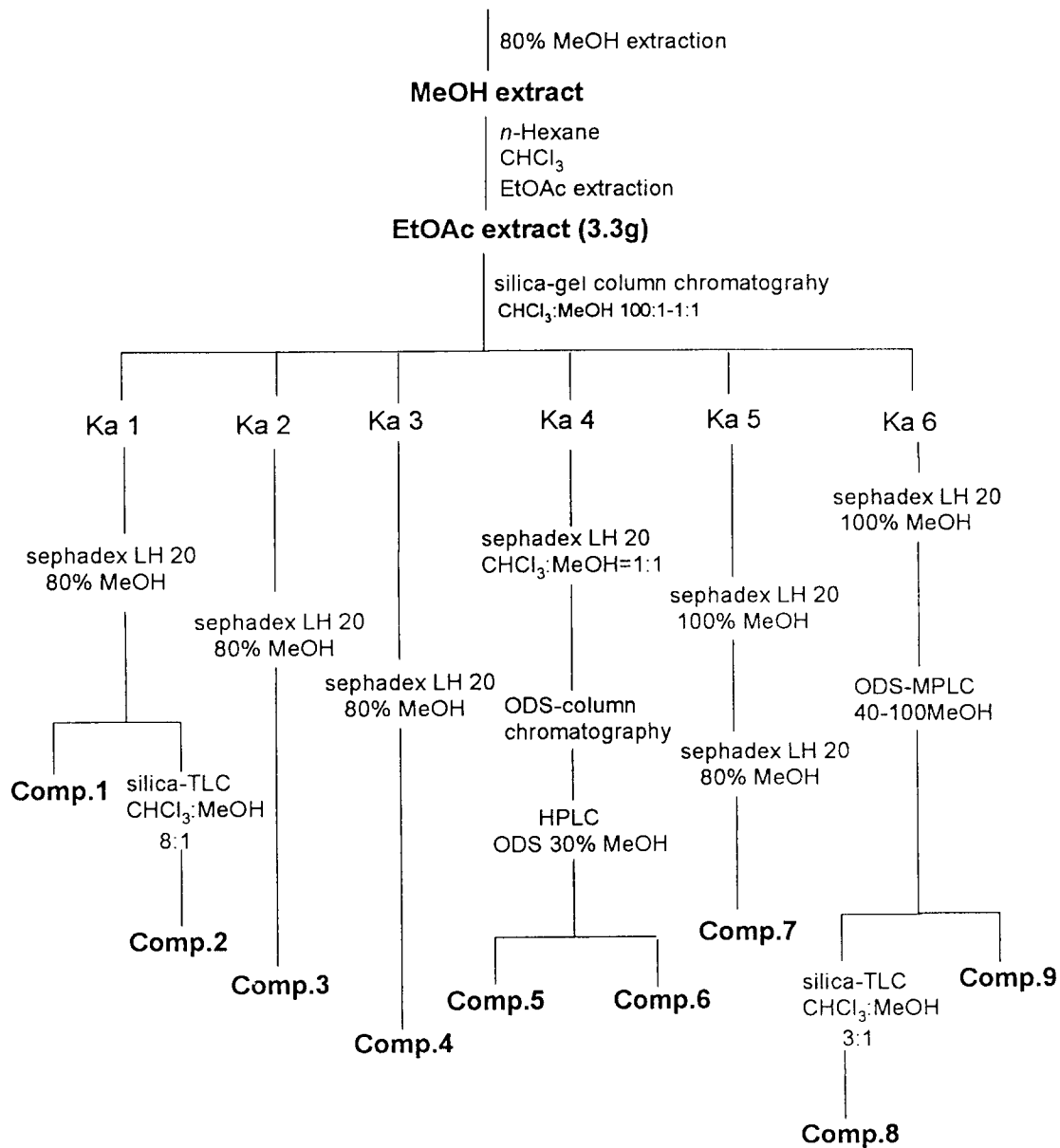


Fig. 1. Isolation procedure of the antioxidants from the stem of *Kalopanax pictus*.

EtOAc 추출물 (3.3g)을 silica gel column상에서 CHCl₃:MeOH 50:1에서 시작하여 1:1 혼합용매까지 극성을 올리면서 용출시켜 6개(Ka 1~6)의 분획으로 나누었다. Ka 1에 대하여 Sephadex LH-20 column chromatography(80% MeOH)를 행하여 2개의 화

성분획을 얻었으며, 이로부터 화합물 1과 화합물 2를 정제하였다. Ka 2와 Ka 3 분획을 Sephadex LH-20 column chromatography (80% MeOH)를 하여 각각으로부터 화합물 3과 화합물 4를 얻었다. Ka 4 분획은 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH=1:1), ODS column chromatography 및 HPLC(column; Phenomenex C₁₈, 2.5 × 25cm, solvent; 30% MeOH)를 거쳐 화합물 5와 6을 정제하였다. 활성분획 Ka 5로부터는 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 화합물 7을 분리하였다. Ka 6 분획은 Sephadex LH-20 column chromatography(100% MeOH)을 실시한 후, 다시 Lobar RP-18 chromatography 및 preparative-TLC (CHCl₃:MeOH=3:1)를 실시하여 화합물 8을 분리하였으며, 화합물 9는 MeOH과 물을 이용한 결정화에 의하여 정제하였다.

지질 과산화 억제 활성의 측정

Microsome은 rat의 간으로부터 Hogeboom의 방법(24)에 따라 차등 원심분리법으로 분리하였으며, 분리된 microsome을 지질원으로 하여 Ohkawa등의 방법(25)에 따라 비효소적 방법인 Fe²⁺/ascorbate 반응계를 이용하여 지질 과산화 억제활성을 측정하였다. 즉, Fe²⁺/ascorbate 반응계에 의해 유발된 라디칼 연쇄반응에 의한 microsome의 지질과산화 결과 생성된 malonedialdehyde(MDA)를 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시킨 다음 분광학적 방법으로 정량하였다. 이때 시료 첨가에 의한 MDA생성의 감소 정도를 지질 과산화 억제 활성 지표로 하여 -tocopherol과 그 활성을 비교하였으며, 그 과정은 다음과 같다. Tris-HCl 완충용액 (100mM, pH 7.5) 0.5ml, ascorbic acid(2mM) 0.1ml, FeSO₄·7H₂O(4mM) 0.1ml 및 microsome 용액 (10mg protein/ml) 50 μ l가 포함된 혼합 용액에 DMSO에 녹인 화합물 시료 50 μ l를 혼합한 다음 37℃ 진탕 배양기에서 30분간 반응시킨 후 3M TCA-2N HCl(1:1) 혼합 용액 0.25ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 이것을 3,500g에서 10분간 원심 분리하여 상징액 1ml을 취한 다음 0.67% TBA용액 0.25ml를 가하고 100℃에서 20분간 끓인 후 상온으로 냉각하여 530nm에서의 흡광도를 측정하였다. 시료의 지질 과산화 억제활성은 시료

를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도(AC)와 시료를 첨가한 반응구에서의 흡광도(AS)차를 시료 및 FeSO₄ 용액을 첨가하지 않은 blank의 흡광도(AB)와 대조구의 흡광도(AC) 차에 대한 백분율 $[(AC-AS) / (AC-AB) \times 100]$ 로 산출하였다.

결과 및 고찰

가. 화학구조 해석

분리한 화합물들의 화학구조는 ¹H NMR 및 ¹³C NMR spectrum 등의 1차원 NMR 분석 및 HMBC 등의 2차원 NMR 분석을 통하여 이루어졌다.

1. 화합물 1

¹H NMR(300MHz, CD₃OD) δ : 6.93(1H, d, J=7.5, H-2), 6.77(1H, d, J=7.5, H-3), 7.03(1H, s, H-6), 6.25(1H, d, J=15.9, H-1'), 7.54(1H, d, J=15.9, H-2'), 3.75(3H, s, OMe)

화합물 1은 분자량이 194이며 216, 328nm에서 UV 최대 흡수피크를 나타내었다. ¹H NMR spectrum에서는 3.75ppm에서 한 개의 aromatic methoxy proton이 관찰되었으며, 6.93, 6.77, 7.03ppm에 ABX-type의 aromatic methine proton이, 그 외에 6.25, 7.54ppm

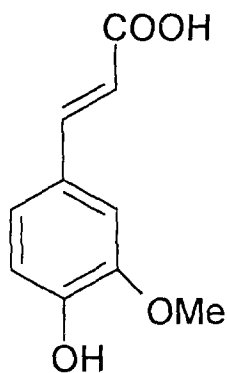


Fig. 2. Structure of compound 1.

에서 proton coupling constant로부터 알 수 있는 ethylene signal이 관찰되었다. ^{13}C NMR spectrum에서는 methoxy carbon이 51.9ppm에서, carbonyl carbon signal이 169.8ppm에서 관찰되었으며, 그 외에 aromatic carbon과 ethylene carbon signal이 114.8, 115.1, 115.7, 122.7, 127.7, 146.9, 149.6, 144.9ppm에서 관찰되었다. 이상의 NMR data로부터 화합물 1은 ferulic acid로 확인되었다(Fig. 2) (26).

2. 화합물 2

^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ : 5.27(1H, dd, $J=12.9, 3$, H-2), 3.07(1H, dd, $J=17.1, 12.9$, H-3a), 2.71(1H, dd, $J=17.1, 3$, H-3b), 7.73(1H, d, $J=8.7$, H-5), 6.49(1H, dd, $J=8.7, 2.1$, H-6), 6.35(1H, d, $J=2.1$, H-8), 7.32(2H, d, $J=8.4$, H-2', 6'), 6.81(2H, d, $J=8.4$, H-3', 5')

화합물 2는 EI-MS의 m/z 256 (M^+) peak로부터 분자량이 256임을 알 수 있었다. ^1H NMR spectrum에서 산소와 결합한 methine proton이 5.27ppm에서 관찰되었으며, 이는 3.08 및 2.71ppm의 ethylene proton과 결합하고 있음을 coupling constant로부터 알 수 있었다. 그 외에 flavonoid 화합물의 5번, 6번, 8번 proton에 기인하는 3개의 proton(7.73, 6.49, 6.35ppm) 및 7.32, 6.81 ppm에서 1,4-disubstituted benzene에 기인하는 aromatic proton들이 관찰되어 4,5,7-trihydroxyflavanone으로 판명되었다(Fig. 3) (27).

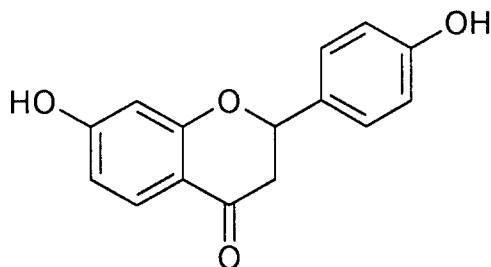


Fig. 3. Structure of compound 2

3. 화합물 3

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_3OD) δ : 7.51(1H, d, $J=15.3$, H-2), 7.69(1H, d, $J=15.3$, H-3), 6.18(1H, d, $J=2.1$, H-3'), 6.31(1H, dd, $J=9, 2.1$, H-5'), 7.87(1H, d, $J=9$, H-6'), 7.52(2H, d, $J=9.3$, H-2'',6''), 6.75(2H, d, $J=9.3$, H-3'',5'')

화합물 3의 EI-MS의 m/z 256(M)⁺ peak로부터 본 화합물의 분자량이 256임을 알 수 있었다. 분자량 및 ^1H , ^{13}C NMR spectral data를 근거로 본 화합물은 분자식 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 인 2',4',4''-trihydroxychalcone으로 판명되었다(Fig. 4)(28). $^1\text{H NMR}$ 에서 benzene ring과 결합하고 있는 ethylene proton(7.51, 7.69 ppm), 1,2,4-trisubstitued benzene에 기인하는 aromatic proton들(6.18, 6.31, 7.87ppm) 및 1,4-disubstitued benzene에 기인하는 proton들(7.52, 6.75ppm)이 관찰되었다. $^{13}\text{C NMR}$ spectrum에서는 α,β -unsaturated carbonyl carbon(192.5ppm)과 산소와 결합한 방향족 4급탄소(165.3, 160.5ppm) 등이 관찰되었다.

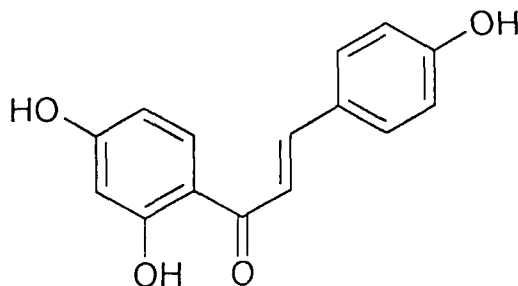


Fig. 4. Structure of compound 3.

4. 화합물 4

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_3OD) δ : 7.51(1H, d, $J=15.3$, H-2), 7.69(1H, d, $J=15.3$, H-3), 6.18(1H, d, $J=2.1$, H-3'), 6.31(1H, dd, $J=9, 2.1$, H-5'), 7.87(1H, d, $J=9$, H-6'), 7.52(2H, d, $J=9.3$, H-2'',6''), 6.75(2H, d, $J=9.3$, H-3'',5'')

화합물 4는 218, 283nm 부근에서 UV극대 흡수 피크를 가지며, ^1H NMR spectrum에서 3개의 aromatic methine proton(6.94, 6.79, 7.04ppm)과 ethylene proton(6.23, 7.54ppm)이 확인되었다. 그리고 ^{13}C NMR spectrum에서는 165.8ppm에서의 carbonyl carbon signal을 비롯 9개의 aromatic signal들이 관찰되었으며, NMR 해석 결과 caffeic acid로 판명되었다(Fig. 5) (29).

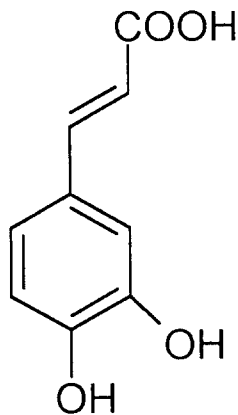


Fig. 5. Structure of compound 4.

5. 화합물 5

^1H NMR(300MHz, CD_3OD) δ : 6.95(1H, dd, $J=8.4, 2.1$, H-2), 7.10(1H, d, $J=8.4$, H-3), 7.07(1H, d, $J=2.1$, H-6), 6.54(1H, d, $J=15.9$, H-1'), 6.27(1H, dt, $J=15.9, 5.4$, H-2'), 4.21(2H, d, $J=5.4$, H-3'), 3.20~4.0 (glucose), 3.87(3H, s, OMe)

화합물 5는 213, 258nm에서 UV 최대 흡수를 보이는 분자량 342인 화합물로서, ^1H NMR spectrum에서 3.87ppm의 aromatic ring에 결합한 한 개의 methoxyl signal과 6.95, 7.10, 7.07ppm의 AMX-type의 aromatic proton, 6.54 및 6.27ppm의 aromatic proton, 3.20~4.0ppm의 glucose proton signal들이 관찰되었다. ^{13}C NMR spectrum에서는 methoxyl carbon signal(55.8ppm)과 aromatic carbon signal(131.1, 119.1, 115.4, 146.0, 149.1, 110.1ppm) 및 ethylene carbon signal(128.5, 129ppm)과 함께 당의 anomeric

carbon signal(100.1ppm)을 포함하여 60.8~77.0ppm 사이에 당에서 유래하는 signal 들이 관찰되었으며, 이로부터 본 화합물은 coniferyl alcohol로 동정되었다(Fig. 6) (30).

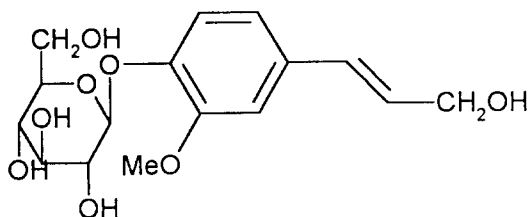


Fig. 6. Structure of compound 5.

6. 화합물 6

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_3OD) δ : 6.74(2H, s, H-2,6), 6.54(1H, dd, $J=15.0, 6.0$, H-1'), 6.32(1H, dt, $J=15.0, 6.0$, H-2'), 4.21(2H, dd, $J=6.0, 1.5$, H-3'), 3.2~3.8(glucose), 3.85(6H, s, $\text{OMe} \times 2$)

화합물 6의 $^1\text{H NMR}$ spectrum은 aromatic ring에 결합된 대칭의 methoxy signal(3.85ppm), 두 개의 aromatic proton(6.74ppm) 및 glucose의 proton signal(3.2~3.8ppm)을 나타내었다. Coupling constant 및 chemical shift로부터 aromatic ring에 연결된 trans ethylene이 존재함을 알 수 있었다. $^{13}\text{C NMR}$ spectrum에서는 56.6ppm에서 methoxy carbon, 128.7, 130.3ppm에서 ethylene carbon, 102.8ppm에서 당의 anomeric carbon과

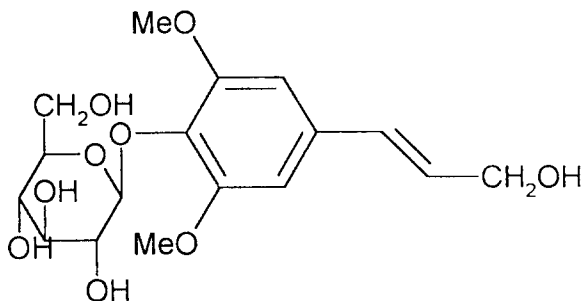


Fig. 7. Structure of compound 6.

61.6~77.3ppm 사이에서 당의 methine carbon이 관찰되었으며, 그 외에 132.9, 104.6, 152.8, 134.0ppm에서 aromatic ring의 carbon들이 관찰되었다. 이들 NMR data를 근거로 화합물 6는 syringin으로 밝혀졌다(Fig. 7) (31).

7. 화합물 7

^1H NMR(300MHz, CD_3OD) δ : 2.66(1H, dd, $J=12.9, 3.9$, H-2_{eq}), 2.02 (1H, dd, $J=12.9, 10.5$, H-2_{ax}), 5.39(1H, td, $J=10.5, 10.2, 3.9$, H-3), 3.82(1H, dd, $J=10.2, 3.3$, H-4), 4.33(1H, m, H-5), 2.66(1H, dd, $J=15.3, 3.3$, H-6_{eq}), 2.23(1H, dd, $J=15.3, 3.3$, H-6_{ax}), 7.15(1H, d, $J=1.8$, H-2'), 6.89(1H, d, $J=8.4$, H-5'), 7.06(1H, dd, $J=8.4, 1.8$, H-6'), 7.61(1H, d, $J=15.9$, H-7'), 6.38(1H, d, $J=15.9$, H-8'), 7.17(1H, d, $J=1.8$, H-2"), 6.89(1H, d, $J=8.4$, H-5"), 7.08(1H, dd, $J=8.4, 1.8$, H-6"), 7.62(1H, d, $J=15.9$, H-7"), 6.44(1H, d, $J=15.9$, H-8')

화합물 7의 EI-MS는 m/z 486에서 $(\text{M})^+$ peak를 나타내어 분자량이 486임을 알 수 있었다. ^1H NMR spectrum에서 두 개의 caffeic acid moiety를 관찰할 수 있었다. 즉, trans olefinic protons에 해당하는 15.9Hz의 coupling constant를 갖는 네 개의 doublet methine signal이 관찰되었고, 또한 2개의 ABX spin system의 benzene ring의 존재가 관찰되었다. Quinic acid moiety의 H-3, H-4, H-5에 대한 signal이 이들 상호간의 spin-spin coupling constants에 의하여 확인되었고, quinic acid moiety에 caffeoyl substitution의 위치는 free quinic acid proton들의 ^1H NMR chemical shifts와 비교 분석함으로써 알 수 있었다. ^1H NMR spectrum으로부터 두 개의 caffeoyl 잔기가 quinic acid의 C-1과 C-3 위치에 결합되어 있음을 알 수 있었는데, 이는 free quinic acid와 비교했을 때 C-3 위치의 proton signal이 약 1.42ppm 정도 downfield로 shift한 것으로 보아 하나의 caffeic acid 잔기가 C-3의 hydroxyl 기에 결합되어 있고, 다른 하나가 C-1에 결합되어 있음을 나타낸다. ^{13}C NMR spectrum에서 quinic acid의 quaternary C-1의 chemical shift가 5-O-caffeoylquinic acid의 C-1과 비교해 볼 때 downfield shift 된 것으로 보아 위의 ^1H NMR 해석을 뒷받침해준다. 이상의 NMR data로부터 화합물 7은 1,3-di-O-caffeoylquinic acid로 결정되었다(Fig. 8) (32).

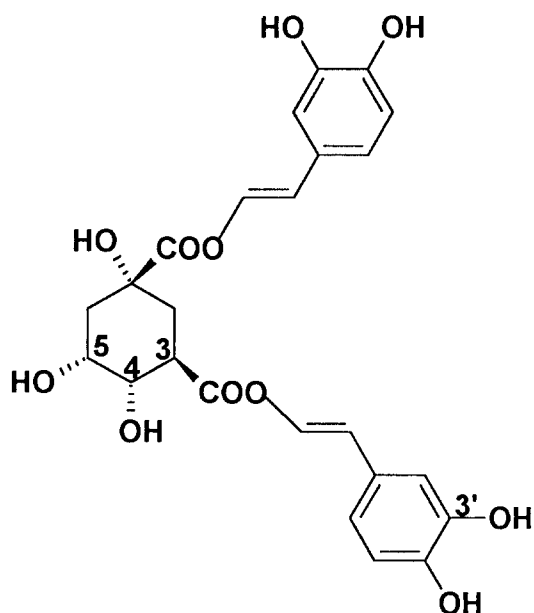


Fig. 8. Structure of compound 7.

8. 화합물 8

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_3OD) δ : 7.34(2H, s, H-2,6), 5.34(1H, d, $J=1.5$, H-1'), 4.13(1H, dd, $J=1.5, 3.3$, H-2'), 3.88(1H, dd, $J=3.3, 9.6$, H-3'), 3.43(1H, dd, $J=9.6, 9.6$, H-4'), 4.24(1H, m, $J=9.6, 6.3$, H-5'), 1.20(3H, d, $J=6.3$, H-6'), 3.90(6H, s, $2 \times \text{OMe}$), 3.88(3H, s, OMe)

화합물 8은 FAB-MS 결과 m/z 359에서 $(\text{M}+\text{H})^+$ peak를 나타내어 본 화합물의 분자량이 358임을 알 수 있었다. $^1\text{H NMR}$ spectrum을 해석한 결과 7.34 ppm에 2H 분의 symmetric aromatic methine proton이 관찰되었고, 3개의 methoxy signal이 3.88(3H, s), 3.90(6H, s)ppm에서 관찰되었다. 이것은 benzene ring에 두 개의 methoxy기가 치환되어 있음을 시사하였다. 또한 rhamnose로부터 기인된 1.20ppm의 methyl proton이 관찰되었고, 이외에 3.43~5.34ppm 사이에 anomeric proton을 포함하여 당을 구성하는 signal들이 관찰되었다. $^{13}\text{C NMR}$ spectrum에서는 methoxyl carbon에 해

당하는 signal이 52.7 및 56.6ppm에서, rhamnose의 methyl carbon이 17.8ppm에서, anomeric carbon이 103.4ppm에서, 그리고 carbonyl carbon에 해당하는 signal이 168ppm에서 관찰되었다. HMBC spectrum에서 3.88ppm의 methoxyl proton이 168ppm의 carbonyl carbon과 그리고 rhamnose의 anomeric proton(5.34ppm)으로부터 126.9ppm의 aromatic carbon에 long-range coupling을 나타냄으로써, 본 화합물은 4-rhamnose-3,5-dimethoxybenzoic acid methyl ester로 동정되었다(33).

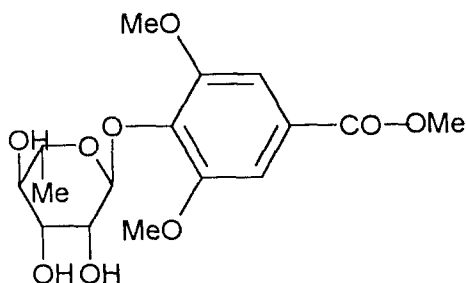


Fig. 9. Structure of compound 8.

9. 화합물 9

화합물 9는 224, 261nm의 UV 최대 흡수피크를 갖는 화합물로서 HREI-MS 측정 결과 (측정치 668.0984, 계산치 668.0994) 및 ^{13}C -NMR 결과로부터 분자식이 $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_{16}$ 으로 결정되었다. IR 스펙트럼분석 결과, hydroxyl기 (3360cm^{-1}), ester기 ($1710, 1690\text{cm}^{-1}$), 및 aromatic carbon($1550, 1450\text{cm}^{-1}$)의 존재가 시사되었다. 본 화합물의 화학 구조는 CD_3OD 를 용매로 측정 한 ^1H NMR(Fig. 10), ^{13}C NMR spectrum(Fig. 12) 및 HMBC spectrum(Fig. 13)의 해석으로부터 결정하였다. 각 proton과 carbon NMR data를 Table 1에 나타내었다.

^1H NMR spectrum에서 benzene ring에 결합되어있는 세 개의 methoxy signal이 관찰되었고, 그 중 두 개는 서로 대칭이었다. 또한 aromatic proton signal들 중 7.27ppm의 proton은 서로 대칭인 두 개의 proton이었고, 6.57, 6.99, 7.03ppm의 aromatic proton은 AMX-type의 proton들이었다. 그리고 aromatic ring에 결합된 trans ethylene

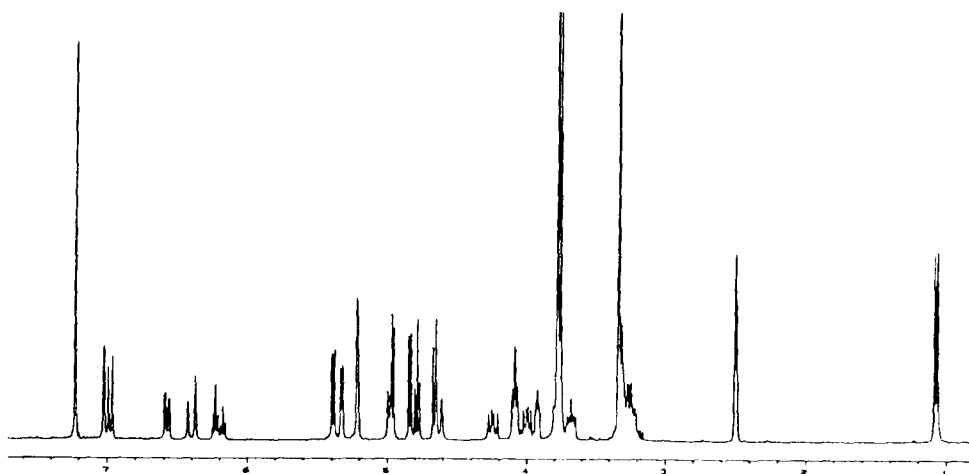


Fig. 11. ^1H NMR spectrum of compound 9

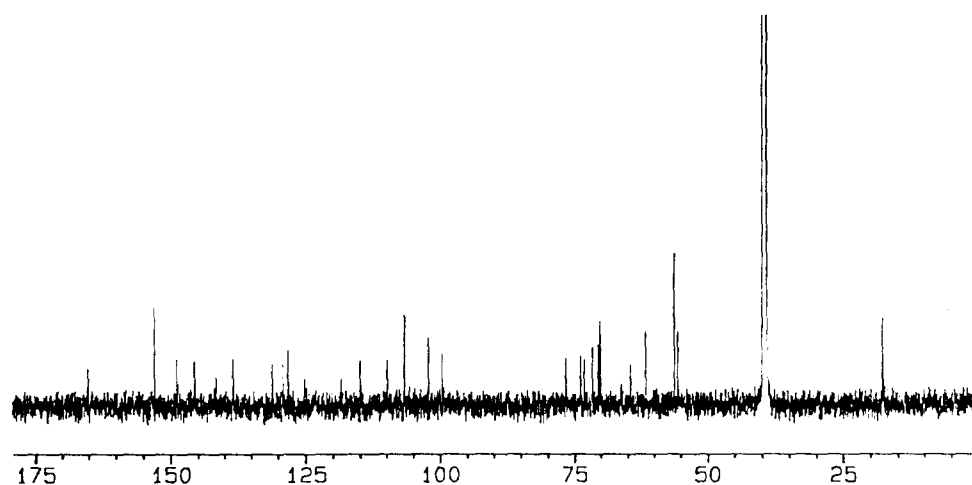


Fig. 12. ^{13}C NMR spectrum of compound 9

의 존재를 proton coupling constant와 chemical shift로부터 알았다. 당의 anomeric proton signal (4.98, 5.22ppm)을 포함해서 3.2~4.22ppm 사이에서 oxygenated methine proton 등 당에서 유래한 signal들이 관찰되었고, rhamnose의 methyl signal도 1.07ppm에서 관찰되었다. 이상의 ^1H NMR data로부터 두 개의 당(glucose와 rhamnose)과 두 개의 benzene ring이 존재함을 알 수 있었다. 그리고 HMBC spectrum(Fig.3)의 해석으로부터 symmetric aromatic methine인 7.03(2H, H-2', 6')ppm의 proton으로부터 carbon C-1' (125.3), C-3', 5' (153.0), C-4' (138.5), C-7' (165.2)에 long-range coupling이 관

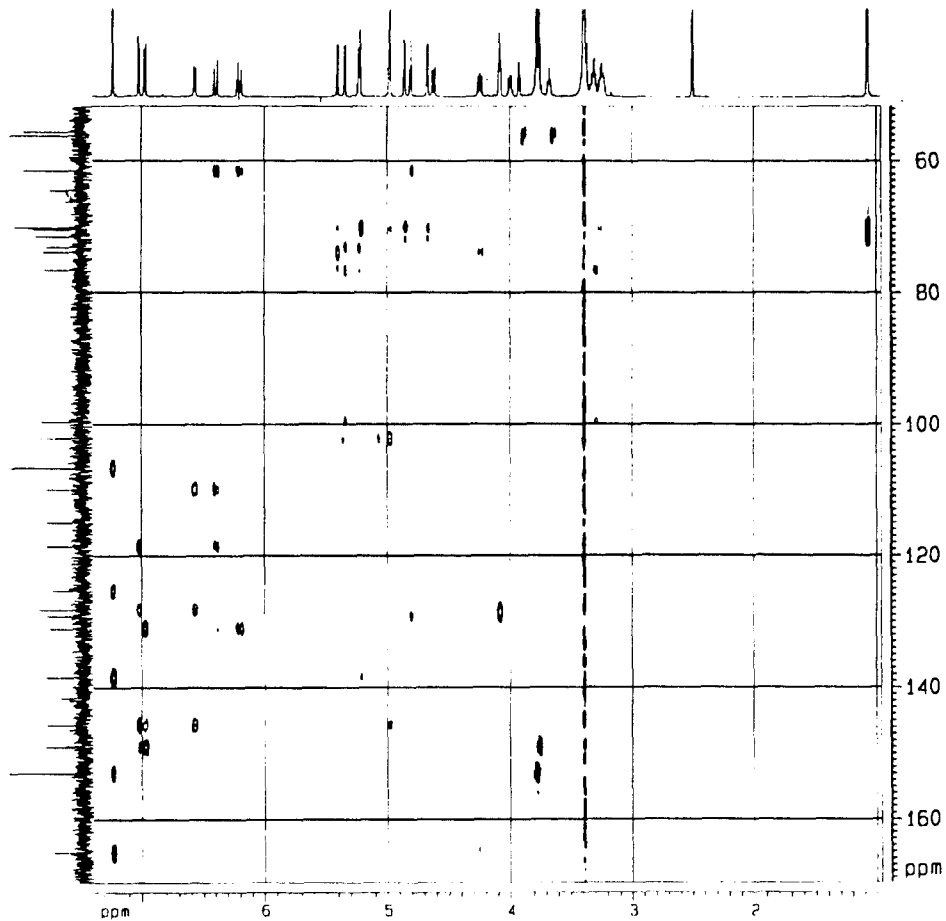


Fig. 13. HMBC Spectrum of Compound 9

찰되었다. 또한 trans-configuration ($J=15.8$)을 가지는 ethylene proton 6.43(H-7)ppm은 carbon C-9(61.6), C-8(128.2), C-2(109.9), C-6(118.5)와 서로 correlation을 나타내었다. 4.98 ppm의 anomeric proton이 C-4(145.7)와, 5.22 ppm의 anomeric proton은 C-4' (138.5)와 서로 cross correlation을 이루는 것으로 보아 4.98(glucose)는 C-4와 결합하고 있고, 5.22(rhamnose)는 C-4' 와 결합하고 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 화합물 9는 4-O-[6''-O-(4''-O- α -L-rhamnopyranosyl)-syringyl]- β -D-glucopyranosyl-coniferyl alcohol로 판명되었으며, 신규 화합물로서 Kalopanaxin E로 명명되었다.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of Compound 9 (CD_3OD , 600 MHz)

Position	^1H NMR	^{13}C NMR
1		131.1
2	7.03(1H, d, J=1.8)	109.9
3		149.0
4		145.7
5	6.99(1H, d, J=8.5)	114.9
6	6.57(1H, dd, J=1.8, 8.5)	118.5
7	6.43(1H, d, J=15.8)	129.1
8	6.17(1H, dt, J=15.8, 5.1)	128.2
9	4.09(2H, t, J=5.1)	61.6
OMe	3.76(3H, s)	55.6
1''	4.98(1H, d, J=7.38)	102.1
2''		73.1
3''		76.4
4''		70.2
5''		73.8
6''		64.5
1'		125.3
2'	7.24 (1H, s)	106.6
3'		153.0
4'		138.5
5'		153.0
6'	7.24(1H, s)	106.6
7'		165.2
2 × OMe	3.78(6H, s)	56.2
1'''	5.22(1H, d, J=1.2)	99.6
2'''	4.14(1H, dd, J=1.2, 3.2)	70.2
3'''	3.89(1H, dd, J=3.2, 9.5)	70.2
4'''	3.26(1H, dd, J=9.5, 9.5)	71.6
5'''	4.24(1H, m, J=9.5, 6.2)	70.5
6'''	1.07(3H, d, J=6.2)	17.8

나. 생물활성

엄나무로부터 분리한 9개 화합물들에 대하여 rat liver microsome을 이용한 지질 과산화 저해활성 측정법 및 DPPH radical 소거활성 측정방법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. 대조구로는 천연 항산화제인 Vitamin E와 합성 항산화제인 tert-butylhydroxyanisol(BHA)을 사용하였다. 화합물들의 항산화 활성은 지질과산화를 50% 억제하는 화합물 농도를 IC₅₀ 값으로 나타내었으며, 이들 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Lipid peroxidation inhibitory activity and free radical scavenging activity (IC₅₀, $\mu\text{g/ml}$) of the compounds isolated from *Kalopanax pictus*

Compounds	Rat liver microsome	DPPH
1	0.6	0.5
2	0.5	0.5
3	0.9	4.0
4	0.4	2.1
5	2.3	2.9
6	6.1	9.0
7	0.5	1.6
8	5.0	2.0
9	9.8	6.7
BHA	2.8	0.6
Vitamin E	0.6	0.6

각 화합물들의 항산화 활성은 benzyl propenoic acid 계 화합물들인 화합물 1과 화합물 4는 각각 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 Vitamin E 와 BHA 보다 높게 나타났으며, 또한 flavonoid 계 화합물인 화합물 2와 chalcone 계 화합물인 화합물 3도 IC₅₀ 값이 1 $\mu\text{g/ml}$ 이하로 강하게 나타났다. 나머지 당을 포함하는 화합물들인 화합물 5, 화합물 6 및 화합물 8들은 대조구들 보다는 낮으나 강한 항산화 활성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 엄나무의 주요 항산화활성 성분은 benzyl propenoic acid 및 flavonoid계의 화합물들임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Fridovich, I., Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247, 1-11(1986)
2. Singh, A., Chemical and biochemical aspects of activated oxygen: singlet oxygen, superoxide anion, and related species, Pp. 17-24. In Miquel, J., A. T. Quintanilha, H. Weber(ed.), *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine, Vol. I*, CRC Press, Boca Raton, Florida.(1989)
3. Fridovich, I., Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 239-257(1983)
4. McBride, T. J., Preston, B. D. and Loeb, L. A., Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry* 30, 207-213(1991)
5. Cross, E. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul R. L. and McCord, J. M., Oxygen radicals and human disease(clinical conference). *Ann. Intern. Med.* 107, 526-545(1987)
6. Lee, I. K., Kim, C. J., Song, K. S., Kim, H. M. and Yoo, I. D., Two more benzylated dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *J. Natural Products* 58, 1614-1617(1995)
7. Lee, I. K., Kim, C. J., Song, K. S. and Yoo, I. D., Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry* 41, 213-216(1996)
8. Kim, W. G., Kim, J. P., Kim, C. J., Lee, K. H. and Yoo, I. D., Benzastatin A, B, C and D: New free radical scavengers from *Streptomyces nitrosforeus* 30643. (I) Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological properties. *J. Antibiotics* 49, 20-25(1996)
9. Kim, W. G., Kim, J. P. and Yoo, I. D., Benzastatin A, B, C and D: New free radical

- scavengers from *Streptomyces nitroforeus* 30643. (II) Structure determination. *J. Antibiotics* 49, 26-30(1996)
10. Lee, I. K., Yun, B. S., Cho, S. M., Kim, W. G., Kim, J. P., I. J. Ryoo and Yoo, I. D., Betulinans A and B, two benzoquinone compounds from *Lenzites betulina*. *J. Natural Products* 59(11), 1090-1092(1996)
11. Kim, J. P., Kim, W. G., Koshino, H., Jung, J., and Yoo, I. D., Sesquiterpene o-naphthoquinones from the root bark of *Ulmus davidiana*. *Phytochemistry* 43(2), 425-430(1996)
12. Lee, I. K., Jeong, C. Y., Yun, B. S., Kim, Y. S., Yu, S. H., Koshino H. and Yoo, I. D., Illudins C₂ and C₃, new illudin C derivatives from *Coprinus atramentarium* ASI 20013. *J. of Antibiotics* 49(8), 821-822(1996)
13. Koshino, H., Lee, I. K., Kim, J. P., Kim, W. G., Uzawa, J. and Yoo I. D., Agrocybenine, novel class alkaloid from the Korean mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Tetrahedron Letters* 37(26), 4549-4550(1996)
14. Lee, I. K., Yun, B. S., Cho, S. M., Kim, W. G., Kim, J. P., Ryoo, I. J. and Yoo, I. D., Betulinans A and B, two benzoquinone compounds from *Lenzites betulina*. *J. Natural Products* 59(11), 1090-1092(1996)
15. Yun, B. S., Ryoo, I. J., Kim, W. G., Kim, J. P., Koshino, H., Seto, H. and Yoo, I. D., Structures of phenazostatins A and B, Neuronal cell protecting substances of microbial origin. *Tetrahedron Letters* 37(47), 8529-8530(1996)
16. Kim, W. K., Ryoo, I. J., Yun, B. S., Shin-ya, K., Seto, H. and Yoo, I. D., New diphenazostatins with neuronal cell protecting activity, Phenazostatins A and B, produced by *Streptomyces* sp. *J. of Antibiotics* 50(9), 715-721(1997)
17. Kim, W. G., Kim, J. P., Koshino, H., Shin-Ya, K., Seto, H. and Yoo, I. D., Benzastatin E, F, and G : new indoline alkaloids with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces nitrosporeus*. *Tetrahedron* 53(12), 4309-4316(1997)
18. Yoo, I. D., Lee, I. K., Ryoo, I. J., Choung, D. H., Han, K. H., Yun, B. S., Three

- new naphthalenes from the root bark of *Hibiscus syriacus*. *Phytochemistry* 47(5), 799-802(1998)
19. Yun, B. S., Ryoo, I. J., Lee, I. K., and Yoo, I. D., Hibispeptin A, an unique cyclic peptide from *Hibiscus syriacus*. *Tetrahedron Letters* 39(9), 993-996(1998)
20. Vanky, K., The genus mundkurella(Ustilaginales). *Mycological Res.* 94(2), 269-273(1990)
21. Lee, E., Choi, M-Y., Park, H-J., Cha, B-C., and Cho, S-H., Chemical constituents and biological activity of *Kalopanax cortex*. *Kor. J. Pharmacogn.* 26(2), 122-129(1995)
22. Shao, C-J., Kasai, R., Ohtani, K., and Kohda, H., Saponins from leaves of *Kalopanax pictus* NAKAI, Harigiri. structures of Kalopanax-saponins JLa and JLb. *Chem.Pharm.Bull.* 38(4), 1087-1089(1990)
23. Shao, C-J., Kasai, R., Xu, J-D., and Tanaka, O., Saponins from roots of *Kalopanax septemlobus* KOIZI., Cique. structures of Kalopanax-saponins C, D, E and F. *Chem. Pharm. Bull.* 37(2), 311-314(1989)
24. Hogeboom, G. H., General methods for the isolation of liver cell compounds : Fraction of cell components of animal tissue. *Methods of Enzymol.* 1, 16-19(1965)
25. Ohakawa, H., Ohishi N. and Yagi K., Assay for lipid peroxydes in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358(1979)
26. Takeshi, D., The constituents of *Eucommia ulmoides*, OLIV., I. isolation of (+)-Medioresinol Di-O- β -D-glucopyranoside. *Chem. Pharm. Bull.* 31(9), 2993-2997(1983)
27. Marakham, K. R., Ternai, B., Sranley, R., and Mabry, T. J., Carbon-13 NMR studies of flavonoids- III , Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 34, 1389-1397(1978)
28. Majamder, P. L., Lahiri, S., and Mukhoti, N., Chalcone and dihydrochalcone derivatives from the orchid *Lusia volucris*. *Phytochemistry* 40(1), 271-274(1995)
29. Masatake, K., Yasuhiko, I., Woo, Y-C., and Yoshimasa, H., Two new phenylpropanoid

- glycosides from *Wikstroemia sikokiana*. *Chem. Pharm. Bull.* 36(3), 1158-1161(1988)
30. Masateru, O., Yasuyuki, I., Thoru, I., Junichi, K., Yasuko, Y., Yujiro, N., and Toshihiro, N., Five new monoterpene glycosides and other compounds from *Foeniculi fructus*(Fruit of *Foeniculum vulgare* Miller). *Chem. Pharm. Bull.* 44(2), 337-342(1996)
31. Mastaka, S., Eiko, K., and Masao, K., Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Osmanthus asiaticus*. *Phytochemistry* 33(5), 1215-1219(1993)
32. Irmgrad, M., Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* 31(6), 2111-2113(1992)
33. Kazuko, S., Shuichi, S., Yoshiteru, I., and Junzo, S., Studies on the constituents of the bark of *Kalopanax pictus* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.* 39(4), 865-870(1991)