Journal of the Pharmaceutical Society of Korea
21, 81-86 (1977)

五加皮의 Lignan Glycoside에 관한 硏究

盧 煥 成·李 叙 潤

圓光大學校 藥學大學

韓 秉 勳

서울大學校 生藥硏究所

(Received March 2, 1977)

Hwan Seong Ro, Su Yoon Lee(*College of Pharmacy, Won Kwang University, Yi-ri 510-11*) and Byung Hoon Han (*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110*): Studies on the Lignan Glycoside of Acantopanax Cortex

Abstract—A lignan glycoside, mp 263-5°, $C_{34}H_{46}O_{18}$, was isolated from the cortex of *Acanthopanax sessiliflorum forma chungbunensis* C.S. Yook and it was identified as lirioresinol β-diglucoside, liriodendrin. The compound stimulated the incorporation of ^{14}C-leucine into mouse liver protein.

韓國에 自生하는 *Acanthopanax* 屬 植物로서는 9種, 3品種. 計 12種類가 알려지고 있다[1]. 이들중 市販되는 五加皮의 主要部分을 이루고 있는 것으로서 *Acanthopanax sessiliflorum forma chungbunensis* C.S. Yook이 最近의 硏究에 의하여 新種植物로써 同定되었으며 京畿道 光陵, 大成里등 中部地方에 廣範圍하게 自生하고 있다. 五加皮는 樹皮 및 根皮가 古來로 부터 漢方이나 民間에서 强壯, 强精, 鎭痛藥으로 쓰이고 있으며 最近 Brekhman[2,3]등이 쏘련産 가시오갈피나무, *Eleutherococcus senticosus* Maxim.로 부터 分離한 lignan glycoside와 人蔘 saponin이 나타내는 抗疲勞效果를 비교하여 報告함으로써 注目을 끈 바 있다. 著者等은 民間에서 널리 使用되고 있으며 新種植物로서 同定된 바 있는 중부오갈피나무, *Acanthopanax sessiliflorum forma chungbunensis* C.S. Yook, 樹皮의 水溶性分劃을 column chromatography 法으로 精製한 結果, mp 263~5°의 結晶性物質을 分離하였다. 이 物質은 理化學的 諸性質과 各種 spectra의 特性에 依해서 그 化學的 本態를 追求한 結果, Edgar E. Dickey[4]가 *Liriodendron tulipifera* L.에서 分離한 lignan glycoside인 liriodendrin과 諸性質이 一致하였다. 이 物質은 *Eleutherococcus senticosus* Maxim[5,6]의 根皮, *Acanthopanax sessiliflorum* Seem.[7,8]의 樹皮, *Kalopanax pictum* Nakai[9]의 樹皮에서 分離된 바 있다. Brekhman[2,3]등은 이 物質에 對하여 抗疲勞效果試驗 以外에 壽命延長試驗, 抗 stress 試驗등을 施行한 바 있다.

著者等은 이 物質의 生理活性을 檢索할 目的으로 ^{14}C-leucine incorporation rate를 測定한 바 그 incorporation rate를 促進하는 結果를 얻었다.

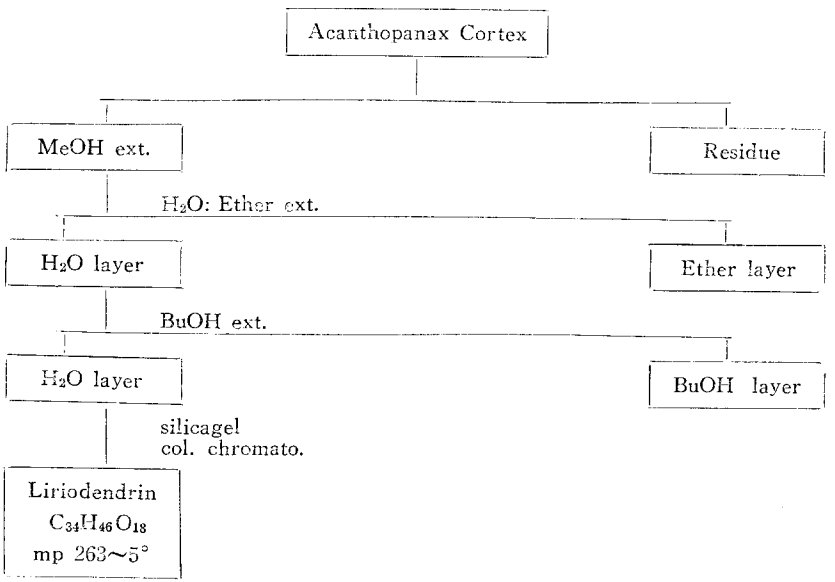
實 驗

器具—融點의 測定은 Mitamura heat block model--MRK를 使用하였고 이에서 얻어진 測定値는 補正하지 않았다. 선광도 測定은 Shimadzu QV-50 spectrophotometer에 polarimeter accessory를 附着하여 使用했으며 UV는 Shimadzu MPS 50 L로 測定하였고 IR는 Jasco Model IR-S型을 使用하여 KBr disk 法으로 測定하였다. 元素分析은 炭水素分析器로 測定하였으며 NMR은 Jeol-3H-60型을 使用하여 TMS를 internal reference로 하여 測定하였고 mass-spectrum은 Finnigan 1015를 使用하여 測定하였다.

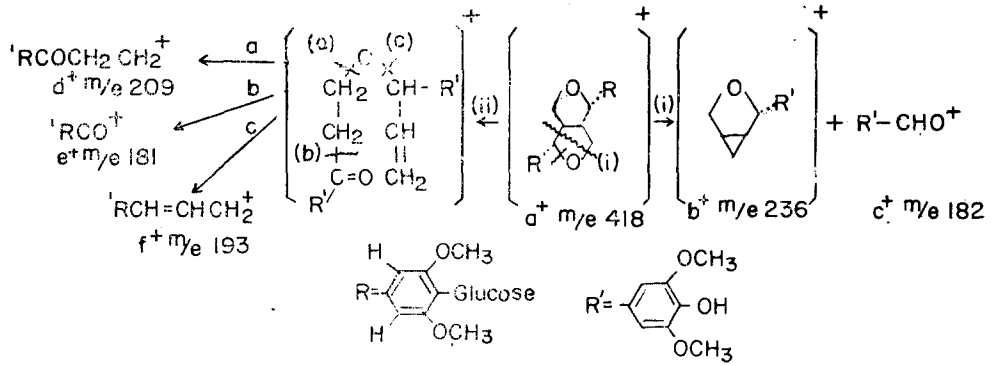
實驗材料—市販되는 五加皮中에서 충부오갈피나무와 同一한 TLC像을 나타내는 것 만을 選別하여 使用하였다. 즉 市販되고 있는 五加皮와 京畿道 光陵에서 採取한 충부오갈피나무의 各 MeOH extract를 $CHCl_3$-MeOH-H_2O (70 : 30 : 4)을 溶媒로 하여 TLC 展開시켰다. TLC 條件 및 chromatogram은 Fig. 1.에 표시하였다.

Liriodendrin의 分離—材料 300 g을 MeOH 1,200 ml로 reflux 시켜 抽出하고 濃縮하여 MeOH extract를 얻고 이것을 물 50 ml에 현탁시켰다(Scheme 1).

이것을 Et_2O 50 ml씩 2回 抽出하여 Et_2O 層을 除去하고 水層을 다시 BuOH 50 ml씩 3回 抽出하여 BuOH 層을 除去하고 水層만을 取하여 濃縮시켜 3 g의 extract를 얻었다. 이 extract를 $CHCl_3$-MeOH-H_2O (70 : 30 : 4)을 展開溶媒로 하여 Silicagel column (3×70 cm)을 通하여 liriodendrin을 純粹分離하였다. 이 物質을 含水메탄올에서 再結晶하여 mp 263~5°의 針晶을 얻었다. 이 物質의 TLC는 Fig. 1의 같은 흑색으로 표시한 것과 一致하였으며 Fig. 1의 TLC 조건에서 Rf=0.37이었다. 이 物質은 熱水와 HAc에 잘 녹고 冷水에 難溶이며 $CHCl_3$ 및 冷 MeOH에 不溶이며 Anthrone 反應陽性, Mäule test 陽性, Dragendorff 反應 및 질소반응은 陰性이었다.



Scheme 1—Isolation procedure of liriodendrin



Scheme 2—Mass fragment ion of liriodendrin

Anal. Calcd. for $C_{34}H_{46}O_{18}$; C, 54.9 ; H, 6.2 Found : C, 54.30 ; H, 5.91 $[\alpha]_D^{18}=-34.6$ (C=0.1 in H_2O)

UVλ_{max}^{EtOH}nm ; 271.5, IRν_{max}^{CCl4}Cm^{-1} ; 3340 (OH), 2960 (CH_2), 1593. 1490 (aromatic), 1050 (C-O), 790 (aromatic), MS (m/e) ; 418 (a^+), 236(b^+), 182(c^+), 209(d^+), 181(e^+), 193(f^+), NMR in DMSO, δ 7.0 (4 H, s), δ 3.75 (12H, s, methoxyl).

Acetylation of liriodendrin—pyridin 3.4 ml에 liriodendrin 40 mg을 녹인 後 Ac_2O 3 ml와 混合하여 5時間동안 室溫에 放置한 後 常法에 의하여 얻어진 白色의 針狀結晶을 MeOH에서 再結晶했다.

Anal. Calcd. for $C_{50}H_{62}O_{26}$: C, 55.66 ; H, 5.76, Found : C, 54.9 ; H, 5.85, NMR in $CDCl_3$; δ 6.57 (4 H, s, aromatic), δ 3.80 (12H, s, methoxyl), δ 2.00 (24 H, singlet like, acetyl).

Hydrolysis of liriodendrin—Liriodendrin 34 mg에 0.1 N HCl 1 ml를 加하고 20分間 water bath 上에서 加熱 加水分解시킨 後 $CHCl_3$를 加하여 抽出하고 $CHCl_3$層을 $NaHCO_3$液으로 세척한 後 濃縮하였다. 이것을 ethylacetate에 녹여 數日 放置하면 白色結晶이 생긴다. mp는 210~2°였다.

NMR in $CDCl_3$: δ 5.57 (4 H. s), δ 5.53 (2 H), δ 3.88 (12. s).

Glucose의 確認 및 含量分析—前記한 酸分解産物中 genin을 除去한 나머지 糖液과 糖標準品을 phenol-H_2O (5 : 1)을 展開溶媒로 TLC하여 比較하였다. 다시 Ames Co. 제품인 glucose確認用 test paper에 의하여 確認하였다. Liriodendrin中의 glucose 含量은 檢體 一定量과 glucose標準液을 0.2% anthrone 試液을 使用하여 發色시켜 620 nm에서 吸光度를 測定比較하여 糖含量을 算出하였다.

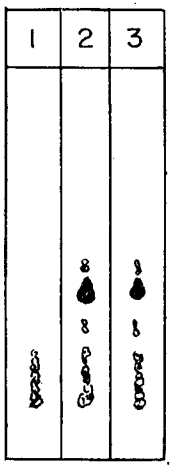
그 結果 liriodendrin中에는 glucose가 44.5% 含有되어 있고 이는 aglycon 1 mol에 glucose 2 mol이 結合된 것에 해당된다.

Liriodendrin의 ^{14}C-lencine incorporation rate 測定—供試動物은 19.5±1.5 g의 mouse를 使用했으며 放射性同位元素試藥은 ^{14}C-leucine을 Dongamin (3% amino acid by Dong-A Pharm. Co.)으로 희석시켜 20 μ curie/10 ml로 하여 使用했다. Scintillation solution은 2, 5, -diphenyl oxazol (POP) 1 g과 1, 4 bis (2, 5-diphenyl oxazolyl)-benzene (POPOP) 25 mg을 加하여 toluene cocktail을 만들어 使用했다. 檢液의 調劑는 liriodendrin을 saline에 녹여 0.1% 및 0.2

% solution을 만들었으며 control은 saline을 使用했다. 방부제로 phenol을 0.25% 가 되도록 各各의 檢液과 control에 加하였다. ^{14}C-leucine incorporation 實驗은 20마리의 mouse를 一群으로 하여 檢液 各 0.2 ml씩을 7日間 1日 1回씩 계속하여 腹腔內 주사하였다. 7回 마지막 檢液을 투여하고 4時間이 지난 後 ^{14}C-leucine soln. 0.4 ml를 腹腔내 주사하고 다시 正確히 1時間 後에 decapitation하여 liver를 적출하여 各 群別로 pool up한 다음 냉동 보관하였다. 이것을 saline으로 세척한 後 liver와 同容의 saline을 加하고 80秒間 homogenation시킨 後 5倍 容量의 0.5 N-$HClO_4$를 加하여 24時間 放置하였다. 이에서 얻어진 상등액은 버리고 침전을 2 g취하여 다시 5倍容量의 0.5 N $HClO_4$를 加하여 70°에서 20分間 加溫, 冷却後 5000 rpm에서 4分間 원심분리하여 침전을 얻었다. 침전에 同容의 saline을 加하고 homogenation시킨 後 0.5 N $HClO_4$ 30 ml를 加하여 침전을 세척하고 원심분리하여 침전을 얻는다. 위와 같이하여 0.5 N $HClO_4$ 30 ml씩 4回, EtOH 20 ml씩 3回, aceton 15 ml씩 3回, Et_2O 15 ml씩 2回 各各 washing하여 얻어진 침전을 室溫에서 건조시켜 蛋白質 및 放射能測定用 檢體로 하였다. 放射能의 測定은 蛋白質檢體 50 mg을 HCOOH 3 ml에 溶解시킨 것을 蛋白質檢液으로 하고 이 檢液 0.4 ml를 toluene cocktail 10 ml에 混合하여 scintillation counting solution으로 하고 放射能을 測定했다. 蛋白質의 定量은 위에서 調劑한 蛋白質檢液 1 ml에 HCOOH를 加하여 10 ml로 하고 다시 이 溶液 1 ml에 HCOOH 3 ml를 加하여 測定液으로 한 後 280 nm에서 吸光度를 測定하였다. 따로 50 mg의 bovine albumin을 5 ml의 HCOOH에 溶解시킨 후 이 溶液 1 ml에 HCOOH를 加하여 10 ml가 되게 하여 蛋白質標準液으로 하였다. 蛋白質標準液이 나타내는 E_{280}을 基準으로 하여 蛋白質檢體中의 蛋白質濃度를 計算하였다.

結果 및 考察

原植物의 確認—市販五加皮의 MeOH extract의 TLC像은 Fig. 1과 같이 2種의 相異한 TLC pattern을 볼 수 있다. 著者等이 使用한 五加皮는 그 TLC像이 京畿道 光陵에서 採取되는 중부오갈피나무 標品에서 抽出된 extract의 TLC像과 一致함을 알았다. 이 植物의 原植物名을 鑑定한 結果 *Acanthopanax sessiliflorum forma chugbunensis* C.S. Yook으로 밝혀졌다.



Solvent ; $CHCl_3$–MeOH–H_2O (70 : 30 : 4)
Color reaction : spraying with 10% H_2SO_4 and heating in an oven at 100°.

1. Acanthopanax cortex (sample A)
2. Acanthopanax cortex (sample B)
3. *Acanthopanax sessiliflorum forma chungbunensis* C.S. Yook from Kwang-neong.

Fig. 1—Thin-layer chromatogram of acantopanax cortex

Liriodendrin의 同定—이 物質은 질소반응이 없고 Mäule 反應 陽性, Anthron 反應 陽性 등으로 미루어 보아 lignan glycoside임을 알 수 있으며 IR에서도 lignan glycoside 구조에 부합되는 spectrum이 얻어지고 있다. Mass Spectrum은 Pelter[10,11] 및 Ludwig[12]등이 oxabicyclooctane系 lignan의 一種인 di-O-methylpinoresinol 및 pinoresinol 등에 對하여 이미 報告한 바 있는 主要 mass fragment ion인 a^+ m/e (386), b^+ m/e (220), c^+ m/e (166), d^+ m/e (193), e^+ m/e (165), f^+

m/e (177)에 對應되는 fragment ion인 a^+ (418), b^+ (236), c^+ (182), d^+ (209), e^+ (181), f^+ (193)가 나타나고 있으므로 이 物質은 pinoresinol과 마찬가지로 3,7-oxabicyclooctane系 lignan임을 나타내고 있으며 pinoresinol보다 2個의 水酸基가 더 많은 3,7-oxabicyclooctane系 lignan化合物임을 알 수 있다. 이 物質의 UV spectrum은 271.5 mμ에서 吸收極大를 나타내며 또 微細構造를 갖고 있어서 aromatic absorption으로 同定되었으며 이 spectra는 NaOH를 加했을 때 전혀 吸收曲線의 移動이 없음으로 phenol性 遊離의 水酸基는 없는 것으로 同定하였다 따라서 2個의 glucose는 2個의 phenol性 水酸基에 各各 1 mol씩 結合된 것이다. 이 物質의 NMR spectrum (DMSO)을 보면 7.0 ppm에서 aromatic proton (4 H)와 3.75 ppm에서 4個의 methoxyl基(12 H)가 모두 singlet으로 나타나고 있으므로 이는 이들 aromatic proton 4個와 methoxyl基 4個가 모두 等價임을 보여주고 있다. 이 物質의 acetate에 對한 NMR에서도 6.57 ppm (4H, s)와 3.80 ppm (12H, s)에 나타난 peak들이 이 事實을 뒷바침하고 있으며 2.00 ppm에 나타난 acetyl peak (24 H, singlet like)는 이 物質이 diglucoside임을 뒷바침해 주고 있다. 이 物質의 aglycon의 NMR spectrum을 보면 Brigg[13]등에 의해서 이미 報告가 된 바 있는 Table 1의 數値와 比較하여 이 物質의 酸分解에 의하여 얻어진 aglycon은 lirioresinol A에 一致한다.

또 liriodendrin octaacetate의 NMR spectrum을 Table I과 비교하여 보면 genuine aglycon은 lirioresinol B에 一致함을 알 수 있다. 이러한 모든 實驗結果를 綜合하여 보면 이 物質은 lirioresinol-B-diglucoside인 liriodendrin으로 同定되며 이는 標品과의 混融試驗에서 一致됨을 確認하였다.

Liriodendrin의 ^{14}C-leucine incorporation rate—Table II에서 볼 수 있는 바와같이 liriodendrin 0.2 mg/mouse投與群에서는 control群에 비하여 ^{14}C-leucine incorporation이 19.8%증가되었으며 이 物質 0.4 mg/mouse投與群에서는 27.6%의 증가를 보였다.

이 實驗結果는 liriodendrin이 ^{14}C-leucine incorporation rate를 현저하게 증가시키는 것을 보여주고 있다.

Table I—δ Value of lignan

	δ value in ppm		
Proton	Lirioresinol B	Lirioresinol A	Liriodendrin octaacetate
1 H	3.11	2.9	3.11
5 H	3.11	3.3	3.11
2 H	4.73 d	4.81 d	4.73 d
6 H	4.73	4.41	4.73
4 H	4.15~4.45 m (2 H)	4.09 m (1 H) 3.88 m	4.15~4.45m (2 H)
8 H	3.90~4.04 (2 H)	3.2~3.5 m (2 H)	3.90~4.04 (2 H)
OCH_3	3.88s (12 H)	3.88s (12 H)	3.8s (12 H)
Aromatic	6.57s	6.57s	6.54s
Phenol	5.60 (2 H)	5.53 (2 H)	
Acetyl			2.02 (24 H)

Table II—Effect of liriodendrin on the incorporation of ^{14}C-leucine in the liver protein.

Sample	No. of mouse	Radioactivity (cpm/mg protein)	Percent
Control	12	34,361	100.0
Liriodendrin 0.2 mg	12	41,159	119.8
Liriodendrin 0.4 mg	12	43.835	127.6

結　　論

1. 新種 五加皮로 同定된 바 있는 중부오갈피나무, *Acanthopanax sessiliflorum forma chungbunensis* C.S. YOOK의 樹皮에서 mp 263～5°, $C_{34}H_{46}O_{18}$를 分離하여 그 化學的 本態를 究明하였다. 그 結果 이 物質은 liriodendrin 임을 同定하였다.

2. Liriodendrin은 mouse의 肝에서 ^{14}C-leucine incorporation rate를 증가시켰다.

原植物을 鑑定하여주신 陸昌洙 敎授(慶熙大 藥大)와 實驗에 便宜를 提供하여 주신 禹源植所長(서울大 生硏)任 및 liriodendrin 標準品을 分讓하여주신 忠北大學의 金學性敎授께 깊은 감사를 드립니다.

文　　獻

1. 陸昌洙, 李東豪, 徐允枝, 生藥學會誌, **7**, 179 (1976).
2. I.I. Brekhman, I.V. Dardmov, *Lloydia*, **32**, 46 (1969).
3. I.I. Brekhman, *Ann. Rev. Pharmacol.*, **9**, 419 (1969).
4. E.D. Edgan, *J. Org. Chem.*, **23**, 179 (1958).
5. Ovodev, Yu. S., *et al.*, *IZV. Akad. Nauk SSSR., Ser. Khim.*, **11**, 2065 (1965).
6. Ovodov, Yu. S., *et al*, *Khim. Prirodnih Soedin*, **1**, 63 (1967).
7. L.A Elyakova, G.B Elyakov, *IZU. AN. SSSR., Ser. Khim.*, **3**, 537 (1965).
8. L.A Elyakova, A.K Dizenko, G.B. Elyakov, Dokl. *Akad. Nauk USSR.*, **165**, 562 (1965).
9. 金學成, 藥劑學會誌, **4**, 5 (1974).
10. A. Pelter, P. Saiton, and M. Barber, *Heterocyclic Chem.*, **3**, 191 (1966).
11. C.H., Ludwig, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1186 (1964).
12. L.H Brigg, R.C Cambie, R.A.F. and Couch, *J. Chem. Soc.*, **C**, 3042 (1968).