

## 산오리나무의 세포독성 성분연구

배춘일 · 공재명 · 오정완 · 김현중 · 오갑진 · 박시경\* · 정순간 · 조의환

삼진제약(주) 중앙연구소

(Received August 18, 1997)

### Studies on the Cytotoxic Constituent of *Alnus hirsuta*(S<sub>PACH</sub>) R<sub>UPR</sub>.

Choon-Il Bae, Jae-Myung Gong, Jung-Wan Oh, Hyun-Jong Kim,  
Gab-Jin Oh, Si-Kyung Park\*, Sun-Gan Chung and Eui-Hwan Cho  
Central Research Institute, Samjin pharmaceutical Co., LTD., Kyunggi 445-920, Korea

**Abstract**—To find out antitumor active principles from natural resources, we have evaluated various extracts from the leaves of *Alnus hirsuta* (Betulaceae). The ethylacetate extract of this plant was found to show a significant cytotoxicity against several kinds of cultured human solid tumor cell lines (AGS, A5 49, HCT15, SKOV3, HEP3B) *in vitro*. Using cytotoxicity-guided chromatographic purification of the ethylacetate extract, cytotoxic constituent: 1,7-bis-(4-hydroxyphenyl)-5-(β-D-glucopyranosyloxy)-3-heptanone, was isolated and structurally identified by physico-chemical properties and spectroscopic evidences.

**Keywords** □ *Alnus hirsuta*, Betulaceae, cytotoxic effect, 1,7-bis-(4-hydroxyphenyl)-5-(β-D-glucopyranosyloxy)-3-heptanone(platyphylloside), diarylheptanoid.

산오리나무 *Alnus hirsuta*(S<sub>PACH</sub>) R<sub>UPR</sub>는 자작나무과(Betulaceae)에 속하는 낙엽 교목으로서 우리나라 중부 이북의 해발 200~900 m 지역에 분포하며 물오리, 참오리나무, 색적목 또는 산적양이라고도 한다.<sup>1,2)</sup> 한방에서는 같은 속 식물중의 하나인 오리나무 *Alnus japonica*의 수피를 적양(赤楊)이라고 하는데 이것은 해열, 지혈, 수렴 등의 효능이 있고 장염, 설사, 외상출혈, 혈변 등에 쓰이는 것으로 알려져 왔다.<sup>3,4)</sup>

본 연구자들은 천연 자원으로부터 항암제 개발을 목적으로 200여종의 식물자원을 중심으로 인체 유래 암세포에 대한 *in vitro*상에서의 세포독성 효과를 측정하였으며 그 중에서 산오리나무의 추출물로부터 유의성 있는 활성을 관찰하였다. 따라서 이 추출물을 일련의 순차적인 용매 분획을 실시하여 각각의 분획물들에 대

한 세포 독성을 검색한 결과 EtOAc 엑스에서 강한 활성을 관찰하였다. 따라서 이 엑스의 세포독성을 지표로 한 분획과 분리를 각종 컬럼 크로마토그래피를 시행하여 활성 물질인 compound 1을 분리하였다.

#### 실험 방법

**실험 재료** - 본 실험에 사용된 산오리나무 *Alnus hirsuta* (S<sub>PACH</sub>) R<sub>UPR</sub>는 1995년 8월경에 경기도 화성군에서 채집하여 감정 후 음건 세절하여 사용하였다.

**시약 및 기기** - 박층 크로마토그래피용 precoated TLC plate는 silica gel 60 F<sub>254</sub>(Merck Art. 5554)를 이용하였고 컬럼 크로마토그래피는 silica gel 60(70~230, mesh, Merck), Sephadex LH 20(20~100 μ, Pharmacia)과 MCI gel CHP 20P(75~150 μ, Mitsubishi Chem. Ind.)등을 사용하였다. 사용 기기로는 융점은 Electrothermal IA8100(uncorrected), IR

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0339-353-1712 (팩스) 0339-353-8701

spectrum은 Shimadzu IR-435, UV spectrum은 Hewlett Packard 8452A,  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum은 Bruker AMX-500 그리고 MS spectrum은 Hewlett-Packard 5988을 사용하여 측정하였다.

**실험 동물** - 삼진제약(주) 중앙연구소 동물사육실에서 자체 생산한 ICR계 수컷생쥐( $23 \pm 2$  g)를 실험에 사용하였으며 물과 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사료는 시판 고형사료(삼양유지 공업주식회사)를 사용하였으며 사육실의 내부온도는  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도는  $55 \pm 1\%$ 로 유지하였다.

**급성 독성 실험** - ICR계 수컷생쥐(체중 $23 \pm 2$  g) 6마리를 한 군으로 compound **1**을 경구와 비경구 투여한 후 7일까지의 행동의 이상 유무와 사망여부를 관찰하였다(Table IV).

**항암 활성 검색(SRB assay)<sup>5,6</sup>** - 각 실험 대상 세포주를 96 well microplate에 분주하고  $\text{CO}_2$  incubator에서 24시간 배양했다. 대조군과 더불어 적정 농도의 시험물질을 가하고 48시간 배양 한 후 각 well의 배지를 제거하고 10% trichloroacetic acid(TCA)를 가해 cell들을 고정 시켰다. 0.4% SRB(sulforhodamin B)를 가해서 염색을 시켰으며 착색된 well에 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane를 넣어 용해시키고 ELISA reader로 파장 540 nm에서 optical density(O. D.)를 측정하였다. 각 세포주에서  $\text{IC}_{50}$ 값(성장을 50% 억제하는데 요구되는 농도, 단위:  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )은 control O. D.의 50%감소를 초래하는 시험물질의 농도로 정하였다. 모두 3회 이상의 반복실험을 하였으며 그 평균치를 다음의 공식에 의해 계산하였다. (1-mean O. D. in test well/ mean O. D. in con-

trol well)  $\times 100(\%)$  이로부터 각 시험 물질의  $\text{IC}_{50}$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  값을 구하였다.

**추출 및 분리** - 건조된 산오리나무 잎 분말(10 kg)을 MeOH 15 l로 4시간씩 3회 환류냉각 추출하고 추출액을 비점 이하에서 감압 농축하여 농축된 엑스(590 g)를 얻는다. 이 엑스를 상온에서 순차적인 용매 분획을 실시하여 hexane(20 g),  $\text{CHCl}_3$ (24 g), EtOAc(50 g), BuOH(75 g),  $\text{H}_2\text{O}$ (350 g)의 엑스를 각각 얻어 이것들에 대한 1차 약효 검색을 실시하였다(Table I). 이 중에서 유의성있는 활성이 관찰된 EtOAc 엑스를 MCI gel 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 EA-I, EA-II, EA-III의 3분획으로 나누어 약효 검색한 결과 EA-II에서 활성이 관찰되었다(Table II). 따라서 EA-II 분획물을 Sephadex LH 20( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MeOH}$ )과 실리카겔 컬럼 크로마토그래피( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$ )를 실시하여 compound **1**(230 mg)을 분리하였다(Scheme I).

**Compound 1** - mp:  $165^\circ\text{C}$  (decomp.); IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3400(OH), 1700(C=O), 1610, 1590, 1510(Ph), 1070(C-O); UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm(log  $\epsilon$ ): 282(3.73);  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.74~1.83(2H, m, 6-H), 2.59~2.81(8H, m, 1, 2, 4, 7-H), 4.16(1H, q, 5-H), sugar moiety: 3.15(1H, m, 2'-H), 3.24(1H, m, 4'-H), 3.35(1H, m, 5'-H), 3.70(1H, dd, J=11.8 Hz and 5.3 Hz, 6'b-H), 3.86(1H, dd, J=10.5 Hz and 2 Hz, 6'a-H), 4.29(1H, d, J=7.5 Hz, anomer-H), 6.67(4H, d, J=8 Hz, Ar-H), 6.99(2H, d, J=8.5 Hz, Ar-H), 7.01(2H, d, J=8.5 Hz, Ar-H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ : 209.4(C-3), 157.1(C-4'), 156.9(C-4'), 133.2(C-1''), 132.1(C-1'), 130.1(C-2', C-6''), 129.9(C-2', C-6'), 116.3(C-3', C-5''), 116.2(C-3', C-5'), 75.5(C-5), 48.2(C-4), 45.9(C-2), 38.2(C-6), 31.0(C-7), 29.2(C-1), sugar moiety: 103.6(C-1'), 75.3(C-2'), 78.5(C-3'), 71.7(C-4'), 78.3(C-5'), 62.8(C-6'); MS(EI) m/z(relative in-

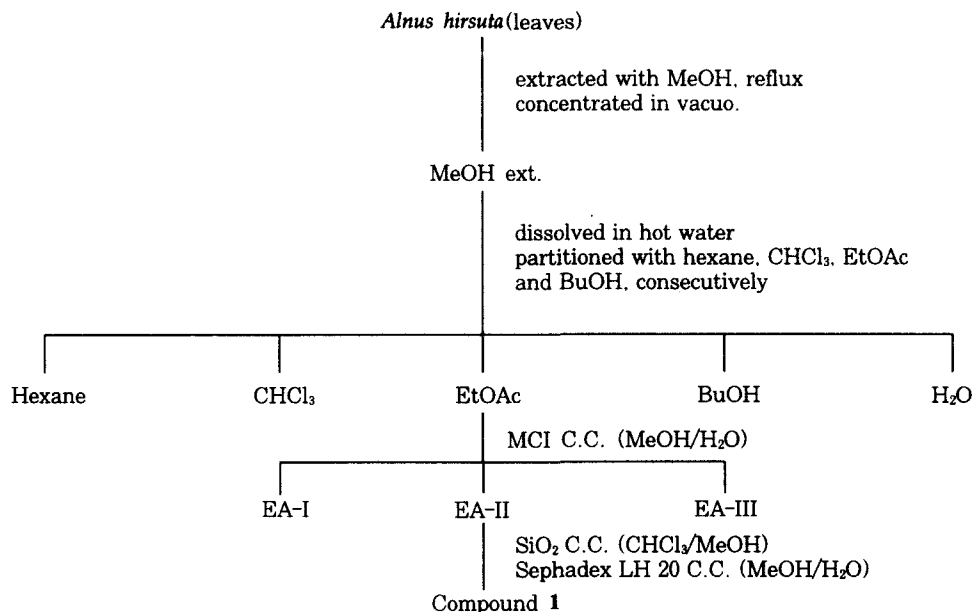
**Table I**—Cytotoxic effect of partitioned extracts from *Alnus hirsuta*

Group	$\text{IC}_{50}$ $\mu\text{g}/\text{ml}$				
	A549	AGS	HCT15	SKOV3	HEP3B
Hexane	59.2	31.3	40.3	50.4	67.4
$\text{CHCl}_3$	47.8	35.2	57.3	58.0	46.3
EtOAc	38.8	17.8	24.9	48.4	20.3
BuOH	>125	81.4	93.8	63.7	82.5
$\text{H}_2\text{O}$	>125	86.0	84.1	>125	77.1

Human tumor cell lines: A549(lung carcinoma), AGS(gastric adenocarcinoma), HCT15(colon adenocarcinoma), SKOV3(ovary adenocarcinoma), HEP3B(hepatocellular carcinoma)  
 $\text{IC}_{50}$  value presents the concentration of a group required for 50% inhibition of cell growth

**Table II**—Cytotoxic effect of fractions from EtOAc extract of *Alnus hirsuta*

Group	$\text{IC}_{50}$ $\mu\text{g}/\text{ml}$				
	A549	AGS	HCT15	SKOV3	HEP3B
EA I	19.0	20.7	34.0	21.9	37.9
EA II	11.6	15.3	10.8	11.4	12.6
EA III	39.9	38.5	25.1	40.0	81.9



**Scheme 1**— Extraction and Isolation of compound 1 from *Alnus hirsuta*

tensity) : 476(M<sup>+</sup>, 15), 296 (M<sup>+</sup> -180, 51), 107(100)

**Compound 1의 hydrolysis** - Compound 1 100 mg에 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 ml를 넣고 2시간 동안 환류냉각 반응을 한 다음 반응액을 CHCl<sub>3</sub>로 추출하고 추출액을 감압 농축하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CHCl<sub>3</sub>/MeOH=15:1)와 Sephadex LH 20(MeOH)의 gel filtration을 실시하여 compound 1의 aglycone을 얻었고 수층을 Ba CO<sub>3</sub>로 중화시킨 후 당의 표품과 비교 TLC한 결과 D-glucose임을 확인할 수 있었다.

**Compound 1 aglycone** - mp : 122°C(decomp.) : UVλ  $\frac{EtOH}{max}$  nm (log ε) : 225(4.20), 280(3.75), 288 (3.69), UVλ  $\frac{EtOH+NaOH}{max}$  nm (log ε) : 246(4.22), 288 (3.69), 298(3.87); IRλ  $\frac{KBr}{max}$  cm<sup>-1</sup> : 3400(OH), 1690 (C=O), 1600, 1500, 1210, 800; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 1.65(2H, m, 6-H), 2.49~2.75 (8H, m, 1, 2, 4, 7-H), 4.0(1H, q, 5-H), 6.68(2H, d, J=7.6Hz, 3', 5'-H), 6.69(2H, d, J=7.4Hz, 3'', 5''-H), 6.98(4H, d, J=8Hz, 2', 6', 2'', 6''-H); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 212.0(C-3), 156.7(C-4'), 156.5(C-4''), 134.2(C-1''), 133.4(C-1'), 130.4(C-2', C-6'), 130.4(C-2'', C-6''), 116.3(C-3'', C-5''), 116.2(C-3', C-5'), 68.4(C-5), 51.4(C-4), 46.5(C-2), 40.6(C-6), 32.0 (C-7), 29.9(C-1); MS(EI) m/z(relative in-

tensity) : 314(M<sup>+</sup>, 11), 296(M<sup>+</sup> -H<sub>2</sub>O, 12), 107(100)

**Compound 1의 acetylation** - Compound 1 20 mg을 pyridine 1 ml에 녹이고 Ac<sub>2</sub>O 1 ml를 가한 후 상온에서 24시간 방치하였다. 반응 혼합물에 얼음물 50 ml를 넣고 CHCl<sub>3</sub> 50 ml로 3회 추출하고 추출액은 합하여 비점 이하에서 감압농축한 다음 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(hexane/EtOAc=1:1)를 실시하여 compound 1 acetate 30 mg을 얻었다.

**Compound 1 hexaacetate** - mp : 70°C(decomp.) : <sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 2.28(6H, s, aromatic-OAc×2), 1.98(3H, s, alcoholic-OAc), 2.0 (3H, s, alcoholic-OAc), 2.01(3H, s, alcoholic-OAc), 2.03(3H, s, alcoholic-OAc), 1.75~1.86(2H, m, 6-H), 2.64~2.87(8H, m, 1, 2, 4, 7-H), 4.58 (1H, d, J=8Hz, 1'-H), 6.96~7.19(8H, m, aromatic-H); MS(EI) m/z(relative intensity) : 728(M<sup>+</sup>, 11), 686 (M<sup>+</sup>-42, 26), 331(97), 107(100)

## 결과 및 고찰

**구조 확인** - Compound 1은 ferric chloride에 정색하고 IR spectrum의 3400, 1700 cm<sup>-1</sup>부근에서 hydroxy와 carbonyl group에 해당하는 band가 관찰되

며  $^1\text{H-NMR}$ 에서  $\delta 7.01(2\text{H, d, } J=8.5\text{Hz, Ar-H})$ 와  $\delta 6.99(2\text{H, d, } J=8.5\text{Hz, Ar-H})$  그리고  $\delta 6.67(4\text{H, d, } J=8.0\text{Hz, Ar-H})$  등의 signal로부터 2개의 phenyl group과  $\delta 4.29\sim 3.15$ 의 signal로부터 sugar moiety가 존재할 것으로 예상하였으며, compound **1** acetate의  $^1\text{H-NMR}$ 에서 4개의 alcohol성 OH( $\delta 1.98, 2.0, 2.01, 2.03$ )와 2개의 phenol성 OH( $\delta 2.28 \times 2$ )로부터 2개의 4-hydroxyphenyl group을 가진 moiety와 hexose 1분자가 결합된 구조로 추정하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 로부터 2개의 4-hydroxyphenyl group의 signal( $\delta 132.1, 133.2, 129.9, 116.2, 116.3, 156.9, 157.1, 130.1$ )을 확인하였고 hexose가 D-glucose( $\delta 103.6, 75.3, 78.5, 71.7, 78.3, 62.8$ )임을 추정하였으며 그 밖에 carbonyl carbon( $\delta 209.4$ )과 methylene carbon signal( $\delta 29.2, 45.9, 48.2, 38.2, 31.0$ ) 등의 pattern으로 볼 때 compound **1**은 diarylheptanoid glucoside로 추정하였다.<sup>7,8)</sup> Compound **1**을 가수분해하여 D-glucose(co-TLC)와 aglycone을 얻었고, aglycone에 대한 UV spectrum에서 alkali 첨가에 의한 bathochromic shift가 일어나는 것으로 부터 ketol구조의 존재 가능성을 예상하였고  $^{13}\text{C-NMR}$ 로부터 aglycone은 bis-(4-hydroxyphenyl)-heptanone의 methylene carbon에 hydroxy group이 치환된 구조로 추정 하였다.<sup>9,10)</sup>  $^1\text{H-NMR}$ 에서 2개의 4-hydroxyphenyl에 의한 8개 proton을  $\delta 6.98(4\text{H, d, } J=8.0\text{Hz, Ar-H})$ 과  $\delta 6.69(2\text{H, d, } J=7.4\text{Hz, Ar-H})$  그리고  $\delta 6.68(2\text{H, d, } J=7.6\text{Hz, Ar-H})$  등에서 관찰할 수 있었고  $\delta 2.75\sim 2.49(8\text{H, m, } 1, 7, 2, 4\text{-H})$ 에서 2개의 benzyl methylene proton 4개 (C-1, C-7)와 carbonyl group에 인접한 C-2와 C-4의 methylene proton 4개 그리고  $\delta 1.65(2\text{H, m, HO-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ar})$ ,  $\delta 4.0(1\text{H, quintet, } -\text{CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{-})$  등의 signal로부터 com-

ound **1**의 aglycone이 1,7 bis-(4-hydroxyphenyl)-5-ol-3-heptanone임을 확인할 수 있었다.<sup>11,12)</sup> 또한 compound **1**의  $^1\text{H-NMR}$ 에서  $\delta 4.29(1\text{H, d, } J=7.5\text{Hz, anomer H})$ 의 signal과  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 aglycone의 데이터와 비교 검토한 결과 C-4, C-6가 각각  $-3.2, -2.4\text{ ppm}$  shift되고, C-5가  $+7.1\text{ ppm}$  shift되는 것으로 부터 D-glucose는 compound **1**의 5번탄소 위치에  $\beta$ -glucosidation되어 있는 것을 알 수 있다.<sup>13)</sup> 따라서 이상을 종합하여 compound **1**을 1,7-bis-(4-hydroxyphenyl)-5-( $\beta$ -D-glucosyloxy)-3-heptanone으로 확정 하였으며 이 물질에 대한 기존 문헌의 기기분석 데이터와 비교 검토한 결과 잘 일치하는 것을 확인할 수 있었다.<sup>14,15)</sup>

**항암 활성** - *In vitro* 상에서의 세포독성을 5종의 인체 유래 암세포(A549, AGS, HCT15, SKOV3, HEP3B)에 대하여 SRB법으로 측정하였다. 산오리나무로부터 추출 분획된 5개의 분획물에 대하여 1차 효능 검색을 실시한 결과 Table I에 나타난 바와 같이 EtOAc엑스가 유의성 있는 효과를 나타내었다( $\text{IC}_{50}$ :  $17.8\sim 48.4\ \mu\text{g/ml}$ ). 따라서 EtOAc엑스를 MCI gel로 컬럼 크로마토그래피하여 3개의 분획 EA-I, EA-II, EA-III으로 나누고 이것을 약효 검색한 결과 EA-II 분획물에서  $\text{IC}_{50}$ 값이  $10.8\sim 15.3\ \mu\text{g/ml}$ 의 세포독성 효과를 관찰할 수 있었다(Table II). 따라서 EA-II분획물을 실리카겔, Sephadex LH 20 컬럼 크로마토그래피를 통하여 세포독성 물질인 compound **1**을 분리 하였다. Compound **1**은 Table III에 나타난 바와 같이 A549, AGS, HEP3B, HCT15, SKOV3에 대한  $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/ml})$ 값이 9.1, 5.1, 4.6, 3.0, 9.2로서 모든 cell line에 대하여 강한 세포독성을 나타내었고 대조 약물로 사용한 Fluorouracil에 비하여 동등 이상의 활성을 나타내었다. 한편 급성 독성의 실험 결과 생쥐에 대한 compound **1**의 경구투여에서는 최소 사망 용량이  $2000\ \text{mg/kg}$  이상 이었고 복강 투여는  $1000\ \text{mg/kg}$  그리고 정맥주사에서는  $500\ \text{mg/kg}$  이상으로 대조약물인 Fluorouracil( $\text{LD}_{50}$

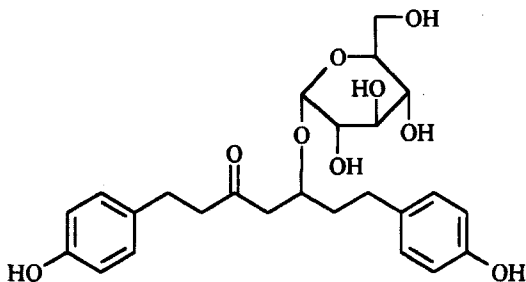


Fig. 1 — Structure of Compound 1.

Table III — Cytotoxic effect of compound **1** from *Alnus hirsuta*

Compounds	$\text{IC}_{50}\ \mu\text{g/ml}$				
	A549	AGS	HCT15	SKOV3	HEP3B
Compound <b>1</b>	9.1	5.1	3.0	9.2	4.6
Fluorouracil	9.3	7.0	9.4	7.6	5.8

**Table IV**—Acute toxicity of compound **1** in mice

Administration route	Dose (mg/kg)	Number of treated mouse	Number of died mouse
po	2000	6	0
ip	1000	6	0
iv	500	6	0

mg/kg : po=781, ip=242, iv=262)<sup>16)</sup>에 비하여 독성이 매우 낮은 것으로 나타내었다(Table IV).

## 결 론

천연 자원으로 부터 항암제 개발을 목적으로 산오리나무 *Alnus hirsuta* (S<sub>PACH</sub>) R<sub>UPR</sub>의 추출물을 세포독성을 지표로 한 분획과 분리를 위하여 각종 칼럼 크로마토그래프를 시행한 결과 활성물질인 compound **1**을 단리하였다. 이 화합물은 물리 화학적 성질과 기기분석 데이터를 종합하여 1,7-bis-(4-hydroxyphenyl)-5-(β-D-glucopyranosyloxy)-3-heptanone으로 확인 동정하였다. 이 화합물은 인체 유래 암 세포(A549, AGS, HCT15, SKOV3, HEP3B)에 대한 세포독성 실험결과 유의성 있는 활성을 나타내었으며(IC<sub>50</sub> : 3.0~9.2 μg/ml), 생쥐에 대한 급성 독성 실험결과 최소 사망 용량이 경구투여는 2000 mg/kg 이상, 복강 및 정맥투여에서는 각각 1000 mg/kg, 500 mg/kg 이상으로 매우 안전한 화합물로 평가 되었다.

## 감사의 말씀

본 실험에 사용한 재료 식물을 감정해 주신 충북대학교 약학대학 이 경순 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

## 문 헌

- 1) 이창복 : 대한 식물 도감, 향문사, 서울, p.268 (1989).
- 2) 김태정 : 한국의 자원식물(I), 서울대학교 출판부, p. 92 (1969).
- 3) 김재길 : 원색 천연 약물대사전(하권), 남산당, 서울 p.161 (1984).
- 4) 新文豊 出判公司 : 新編 中藥大辭典(中), 臺北, p.952 (1971).
- 5) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. : New colo-

rimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).

- 6) Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, L., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. R. : Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using adverse panel of cultured human tumor cell line. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 757 (1991).
- 7) Smite, E., Lundgren, L. N. and Anderson, R. : Arylbutanoid and diarylheptanoid glycosides from inner bark of *Betula pendula*. *Phytochemistry* **32**, 365 (1993).
- 8) Nomura, M., Tokoroyama, T. and Kubota, T. : Biarylheptanoids and other constituents from wood of *Alnus japonica*. *Phytochemistry* **20**, 1097 (1981).
- 9) Suga, T., Ohta, S., Aoki, T. and Hirata, T. : An X-ray crystallographic study on the absolute configuration of dihydroxyashabushiketol and the solvent-dependence of its optical rotation. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56**, 3353 (1983).
- 10) Ohta, S., Aoki, T., Hirata, T. and Suga, T. : The structures of four diarylheptanoid glycosides from the female flowers of *Alnus serrulatoidea*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1635 (1984).
- 11) Terazawa, M., Koga, T., Okuyama, H. and Miyake, M. : Isolation of platyphyllonol, a new diarylheptanoid from the green bark of Shirakanba, *Betula platyphylla* Skatch. var. *japonica* Hara. *Mokuzai Gakkaishi* **19**, 47 (1973).
- 12) Sasaya, T. and Izumiyama, K. : Phenolic compounds from the wood of Keyama-hannoki *Alnus hirsuta* Turcz. (Betulaceae). *Bull. College Exp. For Coegee Agric. Hokkaido Univ. JPN.* **31**, 23 (1973).
- 13) Seo, S., Tomita, Y., Tori, K. and Yoshimura, Y. : Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shifts in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3331 (1978).
- 14) Ohata, S., Koyama, M., Aoki, T. and Suga, T. : Absolute configuration of platyphyllonol and (-)-centrolol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **58**, 2423

- (1985).
- 15) Terazawa, M., Koga, T., Okuyama, H. and Miyake, M. : Phenolic compounds in living tissue of woods III. *Mokuzai Gakkaishi* **30**, 391 (1984).
- 16) Japan pharmaceutical information center : Drugs in Japan (ethical drugs) Yakugyo Jiho Co., Tokyo, p.1135 (1995).