

## 일본잎갈나무 낙엽의 추출성분 및 항산화활성\*

사전령<sup>1)</sup> · 권동주<sup>1)</sup> · 김진규<sup>1)</sup> · 황병호<sup>2)</sup> · 배영수<sup>2)</sup>

## Antioxidative activities on the extractives of *Larix kaempferi* Carr. Fallen Needles\*

Chuan-Ling Si<sup>1)</sup>, Dong-Joo Kwon<sup>1)</sup>, Jin-Kyu Kim<sup>1)</sup>,  
Byung-Ho Hwang<sup>2)</sup> and Young-Soo Bae<sup>2)</sup>

### 요 약

일본잎갈나무 낙엽 (8.5kg)을 채취하여 95% EtOH 용액으로 추출하고 농축된 추출용액은 분획할때 기로 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 수용성으로 순차 추출하여 동결건조하였다. 에틸아세테이트용성과 수용성 분획에 대하여 칼럼크로마토그래피를 실시하였고, 충전물질로는 Sephadex LH-20을, 용리용매로는 메탄올 수용액 및 에탄올-헥산 혼합용액을 사용하였다. 단리된 화합물들은 TLC로 확인한 후 NMR 스펙트럼을 사용하여 정확한 구조규명을 하였고 FAB-MS와 EI-MS 스펙트럼으로 분자량을 측정하였다.

일본잎갈나무 낙엽으로부터 5개의 화합물을 단리하였으며, 각 분획물과 단리된 화합물들은 DPPH 라디칼 소거법을 이용하여 항산화 시험을 실시하였다.

### ABSTRACT

Fallen needles (8.5kg) of *Larix kaempferi* were separately collected, extracted with 95% EtOH. EtOH extract was evaporated under reduced pressure, concentrated then successively fractionated with a series of hexane, methylene chloride, ethylacetate and water on a separatory funnel.

Then, each fraction was freeze dried. A portion of ethylacetate and water soluble powder were packed on a column chromatography (Sephadex LH-20) eluting with aqueous MeOH and EtOH-hexane mixture. Spectrometric analyses such as NMR and FAB-MS including TLC were performed to characterize the structures of isolated compounds.

5 compounds were isolated from the fallen needles of *Larix kaempferi*. The antioxidative activities of each fraction and isolated compounds were done by DPPH radical scavenging test.

**Key words :** *Larix kaempferi* Carr., flavan-3-ol, flavone glycoside, flavonol glycoside, antioxidative activities

\* 이 논문의 일부는 2002년도 농림기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었음.

- 1) 강원대학교 대학원 임산공학과 : Dept. of Wood Science & Engineering, Graduate School, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.
- 2) 강원대학교 산림과학대학 임산공학과 : Dept. of Wood Science & Engineering, College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

## 서 론

일본잎갈나무(*Larix kaempferi* Carr.)는 소나무과(Pinaceae) 잎갈나무속(*Larix*)에 속하는 낙엽 침엽교목이다. 소나무과는 북반구 전역에 10속 250종이 분포하며 우리나라에는 6속 25종이 있고, 잎갈나무속은 10종이 북반구 한대에 분포하며 우리나라에는 잎갈나무(*Larix gemlini* var. *principis-ruprechtii* Pilg er.)와 일본잎갈나무 (*Larix kaempferi* Carr.) 2종이 있다. 일본잎갈나무는 일본 원산으로 1904년에 도입되었으며 중부 이남에 대량으로 식재되어 있는 우리나라 주요 조림수종의 하나이다. 목재는 건축재, 펄프재 등에 쓰이고 수피에서는 테르핀유를 채취하고 잎과 함께 민간에서는 발모(發毛), 치통(齒痛), 통경(痛經) 등에 약용으로 사용된다(김태욱, 1996 : 조재명 등, 2003).

국내 침엽수림은 총 산림면적의 42%인 2,667,000ha(산림청, 2001)로 많은 부분을 차지하고 있고, 본 연구의 공시재료인 일본잎갈나무는 1995년부터 1997년까지 총 조림면적의 12~14%인 2,811ha 정도(산림청, 1998)를 차지하며 잣나무에 이어 두 번째로 많이 조림되어 있는 수종이다. 잎은 채취가 용이하고 낙엽수이므로 매년 새로운 잎이 생성되기 때문에 대량 확보가 가능하여 다른 약용수목에 비해 원료수급이 용이하고 추출물의 여러 가지 생리활성 효능이 인정되면 산업화가 용이한 장점이 있다.

따라서 본 연구는 일본잎갈나무 잎의 효율적 이용한 관한 연구로서 낙엽의 추출성분을 분리하고 화학구조를 결정하고자 하였으며, 각 추출물 분획과 단리된 화합물에 대한 기초적인 생리활성 시험인 DPPH radical 소거법을 이용한 항산화 활성 검정을 통해 추출성분의 화학적 기초 자료를 제공하고 이를 토대로 기능성 향장품 산업에 응용하기 위한 자료를 얻기 위해 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료

일본잎갈나무 낙엽은 2001년 12월과 2002년 11월에 강원도 홍천군 봉명리소재의 강원대학교 학술림에서 채취하여 실험실에서 2주 이상 건조시킨 후 분쇄기를 이용, 분말로 제조하여 추출용 시료로 사용하였다.

### 2. 추출물의 분획

기건 된 낙엽 8.5kg을 20ℓ 유리용기에 넣고 95% EtOH 용액으로 3일간 침지하여 추출하였으며, 충분한 양을 얻기 위하여 이와 같은 조작을 3회 반복 실시하였으며 모아진 추출액은 감압농축기를 이용하여 농축하였다.

농축된 추출용액은 분획할때기로 hexan, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 수용성으로 순차 추출한 후 감압농축기를 이용하여 농축하였으며, 각각의 추출용액은 냉동 후 동결건조하여 분말상으로 제조하였다. 동결건조된 각 분획물의 양은 crude 20.3g, hexane용성 12.3g, methylene chloride용성 3.0g, ethylacetate용성 44.4g, 수용성 340.1g, 고형분 425.9g을 얻었으며 본 실험에서는 ethylacetate용성 27.22g과 수용성 28.99g을 사용하였다.

### 3. 추출물의 분리

혼합물로부터 순수한 화합물을 분리하기 위하여 에틸아세테이트용성과 수용성 분획에 대한 칼럼크로마토그래피를 실시하였고 충전물질로는 Sephadex LH-20을, 용리용매로는 메탄올 수용액 및 에탄올-hexan 혼합용액을 사용하였다.

단리 된 화합물의 확인은 셀룰로오스 박층크로마토그래피를 실시하였고 전개용매로는 *t*-butanol-AcOH-H<sub>2</sub>O (3:1:1, v/v/v, solvent A)와 6% AcOH (solvent B)를 사용하였다. 바닐린 발색제를 전개된 TLC 판에 분무한 후, 가열 건조하여 반응하는 색을 관찰하였다.

### 4. 화합물의 구조결정

단리된 화합물들의 구조를 규명하기 위해 강원

대학교 공동실험실습관의 400MHz의 핵자기분광분석기 (Bruker Avance DPX)를 사용하여  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  및 COSY, HETCOR, HMBC 등의 2차원 NMR 스펙트럼을 측정하였고 분석용매로는  $\text{CD}_3\text{OD}$ 와  $\text{DMSO}-d_6$ 를 사용하였다. 분리된 화합물의 분자량은 질량분석기 (Micromass Autospec M363)를 이용하여 FAB-MS와 EI-MS 분석을 실시하였다.

## 5. 화합물의 단리

낙엽 에틸아세테이트용성 화합물 27.2g을  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (1:1, v/v) 혼합용액을 용리용매로 사용해 칼럼크로마토그래피를 실시하여 4개의 부분으로 분리하여 KDLE로 표기하였다. 농축 후 동결건조 된 양은 KDLE 1 7.6g, KDLE 2 10.8g, KDLE 3 3.1g, KDLE 4 2.3g이었으며 KDLE 2와 KDLE 3 부분을  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, v/v)와  $\text{EtOH-Hexane}$  (2:1, 3:1, 4:1, 4:3, v/v)을 용리용매로 사용하여 연속적인 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 KDLE 334에서 화합물 2 ((-)-epicatechin 44mg), KDLE 335에서 화합물 1 ((+)-catechin 86mg), KDLE 32262에서 화합물 4 (kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside 19mg), KDLE 322523에서 화합물 5 (kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside 66mg)를 얻었다.

낙엽 수용성 화합물 29.0g을  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (1:1, v/v) 혼합용액을 용리용매로 사용해 칼럼크로마토그래피를 실시하여 5개의 부분으로 분리하였으며 KDLH로 표기하였다. 농축 후 동결건조 된 양은 KDLH 1 19.6g, KDLH 2 355mg, KDLH 3 1.2g, KDLH 4 930mg, KDLH 5 4.2g이었으며 KDLH 3과 KDLH 4 부분을  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (1:3, 1:5, 1:8, 1:9, v/v)와  $\text{EtOH-Hexane}$  (2:1, v/v)을 용리용매로 사용하여 연속적인 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 KDLH 433에서 화합물 2 ((-)-epicatechin 13mg), KDLH 443에서 화합물 1 ((+)-catechin 41mg), KDLH 32222와 32223에서 화합물 3 (2''-O-rhamnosyl vitexin 71mg)을 얻었다.

## 6. 단리 화합물

본 실험에서 분리된 화합물들의 화학적 이동값 ( $R_f$ ), NMR Data 및 분자량은 다음과 같다.

### 6.1 화합물 1 ((+)-catechin)

$R_f$  : 0.67(solvent A), 0.41(solvent B).

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\delta$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 2.50 (1H, *dd*,  $J=8.2\text{Hz}$  and  $J=16.1\text{Hz}$ , H-4ax), 2.84 (1H, *dd*,  $J=5.5\text{Hz}$  and  $J=16.1\text{Hz}$ , H-4eq), 3.98 (1H, *m*, H-3), 4.56 (1H, *d*,  $J=7.5\text{Hz}$ , H-2), 5.85 (1H, *d*,  $J=2.2\text{Hz}$ , H-6), 5.92 (1H, *d*,  $J=2.3\text{Hz}$ , H-8), 6.71 (1H, *dd*,  $J=1.9\text{Hz}$  and  $J=8.1\text{Hz}$ , H-6'), 6.76 (1H, *d*,  $J=8.1\text{Hz}$ , H-5'), 6.83 (1H, *d*,  $J=1.8\text{Hz}$ , H-2').

$^{13}\text{C-NMR}$  (100MHz,  $\delta$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 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).

### 6.2 화합물 2 ((-)-epicatechin)

$R_f$  : 0.47(solvent A), 0.32(solvent B).

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\delta$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 2.73 (1H, *dd*,  $J=2.8\text{Hz}$  and  $J=16.8\text{Hz}$ , H-4ax), 2.86 (1H, *dd*,  $J=4.6\text{Hz}$  and  $J=16.8\text{Hz}$ , H-4eq), 4.17 (1H, *br s*, H-3), 4.81 (1H, *s*, H-2), 5.92 (1H, *d*,  $J=2.2\text{Hz}$ , H-6), 5.94 (1H, *d*,  $J=2.2\text{Hz}$ , H-8), 6.78 (2H, *m*, H-5',6'), 6.97 (1H, *d*,  $J=1.7\text{Hz}$ , H-2').

$^{13}\text{C-NMR}$  (100MHz,  $\delta$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 29.31 (C-4), 67.54 (C-3), 79.93 (C-2), 95.93 (C-8), 96.43 (C-6), 100.11 (C-10), 115.37 (C-2'), 115.93 (C-5'), 119.43 (C-6'), 132.33 (C-1'), 145.83 (C-3'), 145.99 (C-4'), 157.41 (C-9), 157.72 (C-5), 158.05 (C-7).

6.3 화합물 3 (2''-O-rhamnosylvitexin)

R<sub>f</sub> : 0.81(solvent A), 0.53(solvent B).  
FAB-MS : calculated for C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub> 578,  
found m/z 579 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, δ, CD<sub>3</sub>OD) : 0.64 (3H, *d*, *J*=6.2Hz, H-6'''(CH<sub>3</sub>)), 3.0~4.26 (10H, *m*, sugar proton), 5.02 (1H, *d*, *J*=9.9Hz, H-1''(glc)), 5.09 (1H, *d*, *J*=1.2 Hz, H-1'''(rham)), 6.28 (1H, *s*, H-6), 6.61 (1H, *s*, H-3), 6.94 (2H, *d*, *J*=8.7Hz, H-3',5'), 7.99 (2H, *d*, *J*=8.6Hz, H-2',6').

<sup>13</sup>C-NMR (100MHz, δ, CD<sub>3</sub>OD) : 18.01 (C-6'''), 63.06 (C-6''), 69.99 (C-5'''), 72.18 (C-4'',2'',4''), 73.56 (C-3''), 73.74 (C-1''), 78.16 (C-2''), 81.65 (C-3''), 82.91 (C-5''), 99.87 (C-6), 102.57 (C-1'''), 103.67 (C-3), 105.00 (C-10), 105.74 (C-8), 117.03 (C-3',5'), 123.61 (C-1'), 130.18 (C-2',6'), 157.98 (C-9), 162.82 (C-4',5), 164.30 (C-7), 166.77 (C-2) 184.21 (C-4).

6.4 화합물 4 (kaempferol-3-O-α-L-arabinofuranoside)

R<sub>f</sub> : 0.85(solvent A), 0.19(solvent B).  
FAB-MS : calculated for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub> 418,  
found m/z 441 [M+Na]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, δ, CD<sub>3</sub>OD) : 3.49 (2H, *d*, *J*=4.36Hz, H-5''), 3.81 (1H, *m*, H-3''), 3.91 (1H, *m*, H-2''), 4.33 (1H, *d*, *J*=2.7 Hz, H-4''), 5.48 (1H, *s*, H-1''), 6.20 (1H, *d*, *J*=2.0Hz, H-6), 6.40 (1H, *d*, *J*=2.0Hz, H-8), 6.92 (2H, *d*, *J*=8.8Hz, H-3',5'), 7.95 (2H, *d*, *J*=8.8Hz, H-2',6').

<sup>13</sup>C-NMR (100MHz, δ, CD<sub>3</sub>OD) : 62.55 (C-5''), 78.66 (C-3''), 83.38 (C-2''), 88.04 (C-4''), 94.08 (C-8), 99.92 (C-6), 103.52 (C-10), 109.67 (C-1''), 116.55 (C-3',5'), 122.81 (C-1'), 132.06 (C-2',6'), 134.95 (C-3), 158.59 (C-2), 159.41 (C-9),

161.59 (C-4'), 163.10 (C-5), 166.04 (C-7), 179.95 (C-4).

6.5 화합물 5 (kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside)

R<sub>f</sub> : 0.83(solvent A), 0.48(solvent B).  
FAB-MS : calculated for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>, 432,  
found m/z 433 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, δ, CD<sub>3</sub>OD) : 0.93 (3H, *d*, *J*=4.4Hz, H-CH<sub>3</sub>(rha)), 3.43~4.23 (4H, *m*, H-2'',3'',4'',5''), 5.38 (1H, *s*, H-1''), 6.19 (1H, *s*, H-6), 6.37 (1H, *s*, H-8), 6.93 (2H, *d*, *J*=8.5Hz, H-3',5'), 7.75 (2H, *d*, *J*=8.6Hz, H-2',6').

<sup>13</sup>C-NMR (100MHz, δ, CD<sub>3</sub>OD) : 17.69(C-Me), 71.95 (C-5''), 72.06 (C-3''), 72.14 (C-2''), 73.22 (C-4''), 94.79 (C-8), 99.85 (C-6), 103.52 (C-1''), 105.95 (C-10), 116.54 (C-3',5'), 122.65 (C-1'), 131.94 (C-2',6'), 136.24 (C-3), 158.54 (C-2), 159.29 (C-9), 161.58 (C-4'), 163.21 (C-5), 165.86 (C-7), 179.62 (C-4).

6. DPPH radical 소거법을 이용한 항산화 시험

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용한 free radical 소거능 활성을 검정하기 위하여 강원대학교 바이오산업공학부의 UV-visible spectrophotometer (UVISON 922 Kontron Co.)를 사용하여 항산화 시험을 실시하였다. 낙엽 추출물 분획들과 분리된 화합물들을 methanol에 1000ppm의 농도로 희석하고 methanol 4ml가 들어있는 다섯 개의 시험관에 각각 0, 10, 20, 40, 80μl씩 순차적으로 넣은 다음 0.15mM DPPH 1ml를 첨가 후 상온에서 약 30분간 반응시킨 뒤 517nm에서 흡광도 감소를 측정하였다.

항산화 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도 (μg)를 검체의 농도 (IC<sub>50</sub>)로 나타내었다. 항산

화력은 기존의 합성항산화제인 BHT와 천연항산화제인  $\alpha$ -tocopherol과 비교하면서 각각의 추출물 분획 및 화합물의 IC<sub>50</sub>을 구하여 항산화력이 우수한 물질을 탐색하고자 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 화합물 1 ((+)-catechin)

화합물 1은 갈색의 분말 또는 흰색의 결정으로 ethylacetate용성 및 수용성에서 단리되었다. 셀룰로오스 2차원 박층크로마토그래피 상에서의 화학적 이동값 R<sub>f</sub>는 0.67(solvent A)과 0.41(solvent B)이었으며 UV램프 하에서는 갈색으로 관찰되고, vanillin-HCl-EtOH 발색제에서는 진한 적색으로 반응하였다.

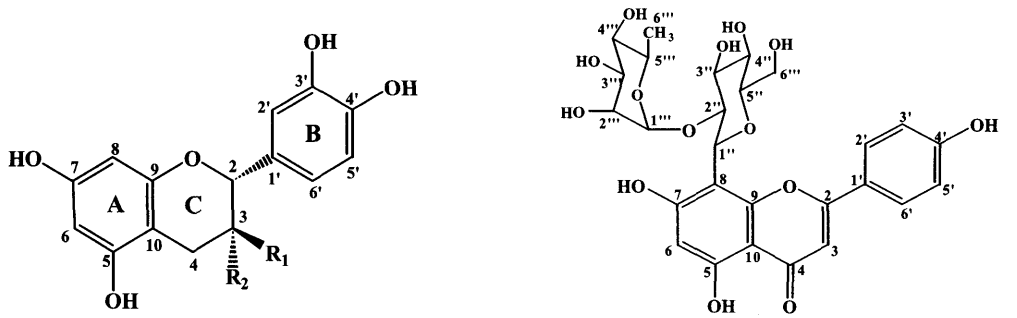
<sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 5.85ppm과 5.92ppm에서 두 개의 doublet은 H-6과 H-8의 피크로서 *J*값이 2.2Hz와 2.3Hz인 것으로 보아 *meta coupling*이 되어있음을 알 수 있고, <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 C-6과 C-8은 각각 96.32ppm과 95.53ppm에서 나타나며 수산기가 결합되어 있는 C-5, 7, 9는 157.61ppm, 157.86ppm 그리고 156.95ppm에서 나타나는데 이것은 phloroglucinol A환의 전형적인 피크다. Quaternary 탄소인 C-10은 다른 탄소의 피크보다 작게 100.85ppm에서 나타나고 있다. 또한 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 2.50ppm에서 나타나는 double doublet은 H-4의 axial 수소로서 vicinal 수소인 H-3과의 coupling으로 8.2Hz의 *J*값과 geminal 수소인 H-4의 equatorial 수소에 의해 16.1Hz의 *J*값을 나타내며 2.84ppm의 double doublet은 H-4의 equatorial 수소로서 geminal 수소인 H-4의 axial 수소에 의해 16.1Hz의 *J*값과 vicinal 수소인 H-3의 의해서 5.5Hz의 *J*값을 나타내고 있

다. 3.98ppm은 H-3의 수소로서 인접한 H-2, H-4ax 그리고 H-4eq에 의해서 multiplet으로 나타나고 있으며 H-2는 H-3의 수소에 의해서 4.56ppm에서 *J*값이 7.5Hz인 doublet 피크를 보이고 있다. <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 28.55ppm의 피크는 C-4에 carbonyl기가 치환되어 있지 않은 flavan-3-ol의 전형적인 피크이며 C-3과 C-2는 68.84ppm과 82.88ppm에 나타나는데 이는 flavan류 화합물의 heterocyclic C환의 특징적인 피크 형태이다.

한편, B환의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 H-2'은 H-6'과 *meta coupling*으로 6.83ppm에서 *J*값이 1.8Hz인 doublet 피크로 나타나고 있으며 H-5'은 6.76ppm H-6'과 *ortho coupling*으로 *J*값이 8.1Hz인 doublet 피크를 보여주고 있고, 6.71ppm에서 나타나는 double doublet은 H-6'의 피크로 인접한 H-2'과 *meta coupling*, H-5'과 *ortho coupling*으로 *J*값은 1.9Hz와 8.1Hz이다. B환의 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 수산기가 결합 되어 있지 않은 C-2', 5', 6' 피크들은 115.28ppm, 116.12ppm, 120.08ppm에서 나타나며 C-3'과, 4' 피크들은 수산기가 결합되어 있어 146.26ppm과 146.28ppm에서 나타나고 있는데, 이것은 이 화합물의 B환이 catechol 형태를 가지고 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과 Ham 등(1997)은 *Taxus cuspidata*의 잎으로부터 단리한 화합물의 NMR 값과 일치하고 있으며, Sa 등(2002)은 *Rosa davurica*의 뿌리로부터 (+)-catechin을 단리하여 NMR값과 DPPH radical 소거법을 이용한 항산화활성 및 *Rosa davurica*의 부위별 (+)-catechin 함량을 보고한바 있다.

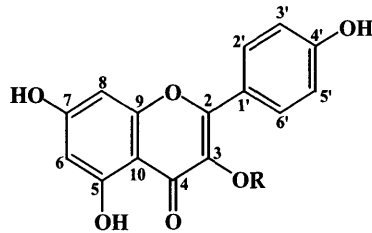
(+)-catechin은 지혈(hemostatic), 지사(antidiarrheal), 항궤양(antiulcer)등의 약리 효과가 있으며 간장 질환(hepatic disorders) 치료제 등으로 사용되고 있다(장일식, 2003).



Compound 1 : R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H, (+)-Catechin

Compound 2 : R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, (-)-Epicatechin

Compound 3 : 2''-O-rhamnosylvitexin



Compound 4 : R=α-L-arabinose, Kaempferol-3-O-α-L-arabinofuranoside

Compound 5 : R=α-L-rhamnose, Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside

Fig. 1. Chemical structures of the isolated compounds.

## 2. 화합물 2 ((-)-epicatechin)

화합물 2는 갈색의 분말로 ethylacetate용성 및 수용성에서 단리되었다. 화학적 이동값 R<sub>f</sub>는 0.47(solvent A)과 0.32(solvent B)이었으며 UV램프 하에서는 갈색으로 관찰되고, vanillin-HCl-EtOH 발색제에서는 적색으로 반응하였다.

(-)-epicatechin은 (+)-catechin과 거의 유사한 형태의 피크를 보이고 있으나 C환의 입체배위 차이에 의해 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼의 4.81ppm과 4.17ppm은 heterocyclic C환의 H-2, 3의 피크로 각각 singlet으로 나타나고, H-4의 axial 수소는 2.73ppm에서 2.8Hz와 16.8Hz의 J값을 보이며 equatorial 수소는 2.86ppm에서 4.6Hz와 16.7Hz의 J값을 갖는 double doublet 피크를 보이고 있다.

<sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서는 (+)-catechin에 비해 C-2와 C-3은 2.95ppm, 1.30ppm upfield되어 79.93ppm, 67.54ppm에서 피크가 나타나며 C-4는 0.76ppm downfield되어 29.31ppm에서 피크가 나타나는 차이를 보이고 있다. 이것은 C-3위의 수산기가 밑으로 내려가 있어 H-2와 H-3이 cis형태를 이루고 있기 때문이다. 이는 H-2와 H-3이 trans형태를 이루고 있는 (+)-catechin과 가장 잘 구분이 되는 피크이다(이상극, 2003).

이상의 결과 Kim과 Bae(2001)가 *Torreya nucifera*의 잎으로부터 단리한 화합물의 NMR 값과 일치하고 있어 (-)-epicatechin으로 구조를 결정하였으며 약리효과로는 항염증(anti inflammatory), 간친화 활성(hepatotronic activity) 및 독성(toxic)이 있다(장일식, 2003).

### 3. 화합물 3 (2''-O-rhamnosylvitexin)

화합물 3은 노란색의 분말로 수용성에서만 단리되었다. 화학적 이동값  $R_f$ 는 0.81(solvent A)과 0.53(solvent B)이었으며 UV램프 하에서는 갈색으로 관찰되고, vanillin-HCl- EtOH 발색제에서는 밝은 노란색으로 반응하였다. 이 화합물은 vitexin(apigenin-8-C-glucoside)의 C-2'' 위치에 rhamnose가 결합을 하고 있는 형태의 구조이다.

$^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 H-2', 6'과 H-3', 5'는 서로 *ortho coupling*되어  $J$ 값이 각각 8.6Hz와 8.7Hz로 7.99ppm과 6.94ppm에서 doublet 피크로 나타나고 있고,  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서 130.18ppm과 117.03ppm은 C-2', 6'과 C-3', 5'에 해당하는 것으로 다른 탄소의 피크보다 크게 나타나고 있으며 수산기가 결합되어 있는 C-4'는 162.82ppm에서 나타나는 것으로 보아 B환이 서로 대칭되는 구조를 가지는 페놀환임을 알 수 있다. 또한,  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼의 6.61ppm에서 나타나는 singlet 피크는 H-3이며,  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서 C-2와 C-3이 166.77ppm과 103.67ppm에서 나타나는 것으로 보아 이중결합이고 C-3이 치환되어 있지 않음을 알 수 있으며 carbonyl 탄소인 C-4는 184.21ppm에서 피크를 보이고 있다. 이것은 flavone C환의 특징적인 피크이며 Roh 등(2000)이 *Melampyrum roseum*에서 단리한 apigenin C환의 NMR값과 일치하고 있다.

$^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 A환의 H-6은 인접한 수소가 없기 때문에 6.28ppm에서 singlet 피크로 나타나고,  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서 C-6은 99.87ppm에서 피크를 보이는 반면 C-8은 Owen 등(2003)이 보고한 apigenin의 그것보다 약 11ppm downfield되어 105.74ppm에서 나타난 것으로 보아 glucose C-1''과 aglycone C-8이 결합을 하고 있음을 알 수 있었으며 C-5와 C-7은 162.82ppm과 164.30ppm에서 피크를 나타내고 있다.

Markham(1992)은 flavonoid C-glycoside의 경우 sugar와 C-C 결합을 하고 있는 탄소의

화학적 이동값은 10ppm downfield되지만 주위에 다른 탄소들의 화학적 이동값에는 영향을 미치지 않는다고 보고한바 있다.

$^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 5.02ppm의 피크는 C-8에 결합되어 있는 glucose의 H-1''에 해당되는 것으로 doublet으로 나타나고  $J$ 값이 9.9Hz인 것으로 보아  $\beta$ -D-glucose임을 알 수 있고, rhamnose의 H-1'''은 5.09ppm에서 doublet으로 나타나는데  $J$ 값이 1.2Hz인 것으로 보아  $\alpha$ -L-rhamnose임을 알 수 있다. 나머지 glucose와 rhamnose의 수소들은 3.00~4.26ppm 사이에서 복잡한 형태의 피크를 보이고 있으며 0.64ppm에서 rhamnose의 methyl기 수소가 전형적인 피크를 보여주고 있다.  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼의 73.67ppm에서 C-glycoside의 특징적인 anomeric 탄소인 C-1''의 피크가 나타나며 C-2''은 Lew 등(1998)이 *Kylinga brevifolia*에서 단리한 vitexin의 C-2''보다 약 8ppm downfield되어 78.16ppm에서 나타나고, rhamnose의 C-1'''은 102.57ppm에서 나타나는 것을 보아  $\alpha$ -L-rhamnoside (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-glucoside의 구조임을 알 수 있으며, 18.01ppm에서 rhamnose methyl기의 전형적인 피크를 보이고 있다.

이상의 결과 Kim 등(1997)이 *Larix leptolepis*의 잎에서 단리한 화합물의 NMR값과 일치하고 있으며 Kassem 등(2000)이 단리한 luteolin-4'-O-neohesperidoside의 glucose와 rhamnose의 NMR값과도 비교 분석하여 2''-O-rhamnosylvitexin으로 구조를 결정하였으며 FAB-MS 스펙트럼은  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z 579로 이 화합물의 분자량 578과 일치하였다.

### 4. 화합물 4 (kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside)

화합물 4는 갈색의 분말로 ethylacetate용성에서 단리되었다. 화학적 이동값  $R_f$ 는 0.85(solvent A)와 0.19(solvent B)이었으며 UV램프 하에서는 갈색으로 관찰 되고, vanillin-HCl-EtOH 발색제에서는 노란색으로 반응하였다.

<sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 6.20ppm과 6.40ppm에서 각각 2.0Hz의 *J*값을 갖는 doublet은 A환의 H-6과 H-8의 피크이며 이에 대한 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼은 C-6과 C-8이 99.92ppm과 94.08ppm에서 나타나는데 이것은 phloroglucinol A환의 전형적인 NMR값을 보여주고 있는 것이다. 또한, <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 7.95ppm과 6.92ppm에서 나타나는 doublet은 H-2', 6'과 H-3', 5'의 피크로서 서로 *ortho coupling*되어 *J*값이 8.8Hz로 동일하게 나타나고 있고 적분값으로도 한 개의 피크가 두 개의 수소를 나타내고 있다는 것을 알 수 있다. <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 C-2, 6과 C-3, 5는 132.06ppm과 116.55ppm에서 다른 탄소의 피크보다 큰 피크로 나타나고 있고 C-4'는 161.59ppm에서 나타나고 있는 것으로 보아 페놀환임을 알 수 있다.

<sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 C환의 H-3의 피크가 나타나지 않는 것으로 보아 flavonol 화합물임을 알 수 있으며, <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 C-2와 C-3은 158.59ppm과 134.95ppm에서 나타나는데 이는 Agrawal(1989)이 보고한 kaempferol의 C-2 보다 약 10ppm downfield된 것이며 C-3 보다 약 4ppm upfield된 것으로서 glucose가 C-3에 결합되어 있다는 것을 알 수 있으며 carbonyl 탄소인 C-4는 179.29ppm에서 나타나고 있다.

한편, <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 5.48ppm에서 singlet 피크는 anomeric 수소인 arabinofuranose의 H-1"의 피크이며 3.91ppm과 3.81ppm의 multiplet과 4.33ppm과 3.49ppm의 doublet은 H-2", 3", 4", 5"의 피크이다. <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 anomeric 탄소인 C-1"은 결합을 하고 있는 영향에 의해 downfield되어 109.67ppm에서 나타나며 나머지 arabinofuranose의 C-2, 3, 4, 5의 피크는 83.38ppm, 78.66ppm, 88.04ppm, 62.55ppm에서 나타나고 있으며 Agrawal(1989)과 Markham (1992)이 보고한 α-L- arabinofuranoside와 일치했다.

이상의 결과는 Kim 등(1997)이 *Larix leptolepis*의 잎에서 단리한 화합물의 NMR값과 일치하고 있으며 Harbone과 Mabry(1982)가

보고한 화합물의 NMR 값과도 일치하였다.

FAB-MS 스펙트럼은 [M+Na]<sup>+</sup> m/z 441로 이 화합물의 분자량 418과 일치하여 kaempferol-3-O-α-L- arabinofuranoside로 구조를 결정하였다.

## 5. 화합물 5 (Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside)

화합물 5는 노란색 분말로 ethylacetate용성에서 단리되었다. 화학적 이동값 R<sub>f</sub>는 0.83 (solvent A)과 0.48(solvent B)이었으며 UV 램프 하에서는 갈색으로 관찰되고, vanillin-HCl-EtOH 발색제에서는 노란색으로 반응하였다. 화합물 5는 앞서 설명한 화합물 4와 구조가 동일하나 rhamnose가 결합을 하고 있기 때문에 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 C-3에 결합하고 있는 rhamnose의 anomeric 수소인 H-1"으로 singlet인 것으로 보아 α-L-rhamnose인 것을 알 수 있으며 나머지 rhamnose의 H-2", 3", 4", 5"은 3.43~4.23ppm에서 특징적인 피크를 보이고 있으며 rhamnose의 methyl기 3개의 수소는 0.93ppm에서 전형적인 피크를 나타내고 있다. <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 rhamnose C-1"은 aglycone의 C-3과 결합을 하고 있어 rhamnose의 나머지 탄소들보다 downfield되어 103.52ppm에서 나타나고 C-2", 3", 4", 5"은 72.14ppm, 72.06ppm, 73.22ppm, 71.95ppm에 나타나고 있고 methyl기 탄소는 17.69ppm에서 전형적인 피크를 보이고 있다.

이상은 Kazuma 등(2002)이 단리한 kaempferol 배당체 화합물과 동일한 NMR값을 보이고 있어 화합물 5는 kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside로 구조를 결정하였다. FAB-MS 스펙트럼은 [M+H]<sup>+</sup> m/z 433으로 이 화합물의 분자량 432와 일치하고 있다.

## 6. DPPH radical 소거법을 이용한 항산화 활성

### 6.1 각 분획물의 항산화 시험



Table 1. IC<sub>50</sub> values of antioxidative activities of each extract fraction

Fractions		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g)
Control	BHT	14 $\mu$ g
	$\alpha$ -tocopherol	12 $\mu$ g
Fallen needles	Hexane soluble fraction	60 $\mu$ g
	Methylene chloride soluble fraction	>100 $\mu$ g
	Ethyl acetate soluble fraction	51 $\mu$ g
	Water soluble fraction	77 $\mu$ g
	Crude extractive	68 $\mu$ g

Table 2. IC<sub>50</sub> values of antioxidative activities of isolated compounds

Compounds		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g)
Control	BHT	14 $\mu$ g
	$\alpha$ -tocopherol	12 $\mu$ g
Isolated compounds	(+)-Catechin	6 $\mu$ g
	(-)-Epicatechin	10 $\mu$ g
	2''-O-rhamnosylvitexin	>100 $\mu$ g
	Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside	64 $\mu$ g
	Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside	>100 $\mu$ g

Table 1에서 보는 바와 같이 각 추출물 분획들은 기준물질보다 낮은 항산화 활성이 나타났다. 추출물 분획 중 에틸아세테이트용성 분획의 IC<sub>50</sub> 값이 51 $\mu$ g로 가장 높은 항산화 활성을 나타냈으며, 메틸렌클로라이드용성 분획의 경우 활성이 없는 것으로 나타났다.

### 6.2 단리 화합물의 항산화 시험

Table 2에서 보는 바와 같이 일본잎갈나무 낙엽에서 단리된 화합물들에 대한 항산화 시험을 실시한 결과 flavan-3-ol 화합물인 (+)-catechin, (-)-epicatechin의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 6 $\mu$ g, 10 $\mu$ g으로 기준물질보다 우수한 항산화 효과를 나타냈으며, flavonol glycoside 화합물인 kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside는 64 $\mu$ g의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다.

## 결론

일본잎갈나무 낙엽의 에틸아세테이트용성 분획과 수용성 분획에 대하여 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피를 실시하여 flavan-3-ol 화합물인 (+)-catechin (127mg), (-)-epicatechin (57mg)을 단리하였고 flavone glycoside 화합물인 2''-O-rhamnosylvitexin (71mg)을 단리하였다.

또한 kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (19mg)와 kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (66mg)의 flavonol glycoside 화합물을 단리하였다.

에틸아세테이트용성 분획과 수용성 분획에서 모두 단리된 화합물은 (+)-catechin, (-)-epicatechin으로 일본잎갈나무 낙엽의 주요 구성성분임을 알 수 있었으며, 2''-O-rhamnosylvitexin은 수용성 분획에서만 단리된 것으로 보아 수용성분획의 주

요 구성성분임을 알 수 있었다.

추출물 분획에 대한 항산화 활성 시험 결과 에틸 아세테이트용성의 항산화 활성이 높게 나타났으며, 단리 화합물의 항산화 시험 결과 flavan-3-ol 화합물인 (+)-catechin, (-)-epicatechin은 기준 물질보다 높은 항산화 활성이 나타났다.

### 인용문헌

1. 김태욱. 1996. 한국의 수목. 교학사. 21~22.
2. 이상극. 2003. 國內産 主要 針葉樹 잎의 抽出成分. 강원대학교 박사학위논문.
3. 산림청. 1998. 임업통계요람. 48pp.
4. 산림청. 2001. 임업통계연보. 36pp.
5. 장일식. 2003. 동양의학과학대전. 학술편수관.
6. 조재명 외 12명. 2003. 원색 약용·식용 수목도설. 유성사. 10~11.
7. Agrawal, P. K. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier.
8. Ham, Y. H., W. G. Park, S. S. Han and Y. S. Bae. 1997. Flavonoid Glycosides from Needles of *Taxus cuspidata*(Taxaceae). *Mokchaekonghak*. 25(2) : 45~51.
9. Harbone J. B. and T. J. Mabry, 1982. The flavonoids: advance in research, Chapman and Hall Ltd.
10. Kassem, M., S. A. Mosharrafa, N. A. M. Saleh and S. M. Abdel-Wahab, 2000. Two new flavonoids from *Retama raetam*. *Fitoterapia*, Vol. 71, pp. 649~654.
11. Kazuma, K., N. Noda and M. Suzuki. 2002. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*. 62(2) : 229~237.
12. Kim, J. K. and Y. S. Bae. 2001. Extractives from the Needles of *Torreya*. *Mokchae konghak*. 29(4) : 53~59.
13. Kim, J. K., W. G. Park and Y. S. Bae. 1997. Flavonoid Glycosides from Needles of *Larix leptolepis*(Pinaceae). *Mokchaekonghak*. 25(2) : 81~87.
14. Lew, J. H., J. H. Kwak, K. R. Lee and O. P. Zee, 1998. Flavonoids from *Kylinga brevifolia* var. *leirolepsis*, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 29, No. 2, pp. 71~74.
15. Markham, K. R., 1992. Techniques of Flavonoid Identification, Academic press.
16. Owen, R. W., R. Haubner, W. Mier, A. Giacosa, W. E. Hull, B. Spiegelhalder and H. Bartsch, 2003. Isolation, Structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 41, pp. 703~717.
17. Roh., J. H., H. I. Moon and O. P. Zee, 2000. Phytochemical Constituents from *Melampyrum roseum* var. *hirsutum* Beauv, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 31, No. 2, pp. 157~162.
18. Sa, J. H., I. C. Shin, K. J. Jeong, T. H. Shim, H. S. Oh, S. K. Park, E. H. Cheung, S. N. Kim, G. G. Kim, D. S. Choi, Y. S. Kwon and C. M. Kim, 2002. Catechin Content and Antioxidative Effect from *Rosa davurica* Pall, *Kor. J. Pharmacogn*, Vol. 33, No. 3, pp. 177~181.