

느티나무에서 단리한 카달렌 화합물에 관한 연구 I*¹ - 7-hydroxy-3-methoxycadalene 단리 및 목부 내 분포 -

최준원*² · 문성희*³ · 최돈하*^{3†}

Study on Cadalene Compounds Purified from *Zelkova serrata* Wood I*¹

- Purification of 7-hydroxy-3-methoxycadalene and Its Distribution in Xylem -

Joon-Weon Choi*² · Sung-Hee Mun*³ · Don-Ha Choi*^{3†}

요 약

본 연구에서는 느티나무의 에탄올 추출액에서 실리카겔 칼럼크로마토그래피법을 이용하여 15개의 탄소로 이루어진 나프탈렌 구조의 세스퀴테르펜인 카달렌 화합물을 단리하였다. 단리한 카달렌 화합물은 HPLC, EI-MS와 ¹H, ¹³C-NMR로 화학 구조를 규명하였다. 느티나무에서 단리한 카달렌 화합물의 분자량은 244 (*m/z*)으로 측정되었으며, 나프탈렌 구조의 1번 위치에 메틸기(CH₃), 4번 위치에 isopropyl기가 부착되어 있으며, 7번 위치에 수산기(OH)와 3번 위치에 메톡실기(OCH₃)가 치환된 7-hydroxy-3-methoxycadalene 구조를 이루고 있었다. 수율은 기건상태 느티나무 중량의 약 0.03% 정도로 나타났다. 카달렌은 느티나무의 잎과 수피에서는 전혀 발견되지 않았고, 목부 부위를 연료별로 나누어 분석한 결과에 의하면 7-hydroxy-3-methoxycadalene은 변재부위에는 전혀 존재하지 않고 심재부에서만 발견되었다.

ABSTRACT

In this study cadalene, which is classified into sesquiterpenes constructed with 15 carbons of naphthalene skeleton, was isolated from ethanol extracts of *Zelkova serrata*

*¹ 접수 2008년 5월 27일, 채택 2008년 7월 4일

*² 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, Dept. Forest Science, CALS, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*³ 국립산림과학원 화학미생물과, Div. Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

† 주저자(corresponding author) : 최돈하(e-mail: cdonha@forest.go.kr)

using successive silica gel column chromatography. The purified cadalene compound was subjected to structural analysis using HPLC, EI-MS and ^1H , ^{13}C -NMR. Its molecular weight was measured to 244 (m/z) and methyl and isopropyl group were attached at C1 and C4 position, as well as hydroxyl group at C7 and methoxyl group at C3 in the naphthalene skeleton, respectively. Yield of 7-hydroxy-3-methoxycadalene amounts to 0.03% based on air dried *Zelkova* wood powder. It was distributed only in xylem tissues(only in heartwood) of *Zelkova* wood, not in leaves and bark.

Keywords: *Zelkova serrata*, ethanol extracts, silica gel column chromatography, 7-hydroxy-3-methoxycadalene, sesquiterpene, heartwood

1. 서 론

느티나무(*Zelkova serrata* MAKINO)는 느릅나무과에 속하는 낙엽활엽교목으로 한반도의 황해도 이남과 중국, 일본, 몽골, 시베리아와 유럽등지에 널리 서식하고 있다. 느티나무의 추출성분에 관한 연구는 1960년대 초반부터 70년대 후반에 이르기까지 매우 활발히 진행되어 왔다(Hayashi *et al.*, 1972; 1976; Hayashi and Takahashi, 1980). 느티나무의 추출성분 중에서도 카달렌 화합물은 우수한 생물학적 활성과 약리학적 효능으로 주목받고 있는 천연화합물이며, 지금까지 대부분 느릅나무과 수종에서만 발견되었다(Chen *et al.*, 1972; Fracheboud *et al.*, 1968; Lindgren and Svahn, 1968; Nishikawa *et al.*, 1972).

카달렌(cadalene)은 farnesyl diphosphate로부터 여러 단계의 생합성 과정, 즉 고리화 반응(cyclization)과 전위반응(rearrangement)을 거쳐서 cadalene이 합성되고, 다시 cadinene구조를 거쳐서 방향족 구조인 카달렌(cadalene) 기본 골격이 완성된다(Dev, 1989; Steele *et al.*, 1998). 세스퀴테펜류에 속하는 천연 화합물인 카달렌은 수목이 생장하는 과정에서 병원균의 침입이나 외부상처에 대한 저항성을 향상시켜 주는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Overreem and Elgersma, 1970; Burden *et al.*, 1984).

본 연구는 느티나무에서 획득한 에탄올 추출액이 항산화 활성과 항암효능 등 다양한 생리적 활성을 나타내며(Lee *et al.*, 1999; 2000) 이러한 생리활성은 느티나무에 존재하는 '카달렌'이라는 천연화합물에 의한 것이라는 기존의 연구결과에 의거하여 느티나

무 에탄올 추출액에서 카달렌 화합물의 단리 및 화학적 구조분석을 시도하였다. 또한 느티나무 부위별로 카달렌 화합물의 분포를 조사하기 위해 느티나무를 연륜별로 분류하여 카달렌 화합물을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

본 실험의 공시재료는 30년생 느티나무(*Zelkova serrata* Makino)로 국립산림과학원 남부산림연구소 시험림에서 채취하였다. 공시재료 채취 후에 수피를 제거하고 길이 50 cm로 절삭하여 통풍이 잘되는 그늘진 곳에서 건조한 후에 분쇄기로 톱밥형태로 분쇄하여 에탄올 추출용 공시재료로 사용하였다.

느티나무의 연륜별 카달렌 분포조사용 공시재료는 2령급(14년생)과 3령급 느티나무를 선택하여 실시하였다. 2령급 느티나무는 수피부, 변재부 6부분, 심재부 3부분과 앞으로 각각 분리하였고, 3령급(30년생) 느티나무는 수피부, 변재 5부분, 전이부분(transition zone) 3부분, 심재 7부분과 앞으로 각각 분리하였고 각 부분은 불밀(Zirconium planetary mono mill)을 이용하여 60 mesh를 통과하는 미세분말로 분쇄하여 실험재료로 사용하였다.

2.2. 에탄올 추출

기건 상태의 느티나무 톱밥(12 kg)을 에탄올(30 l)로 72시간씩 3회 추출하였으며, 추출액을 모두

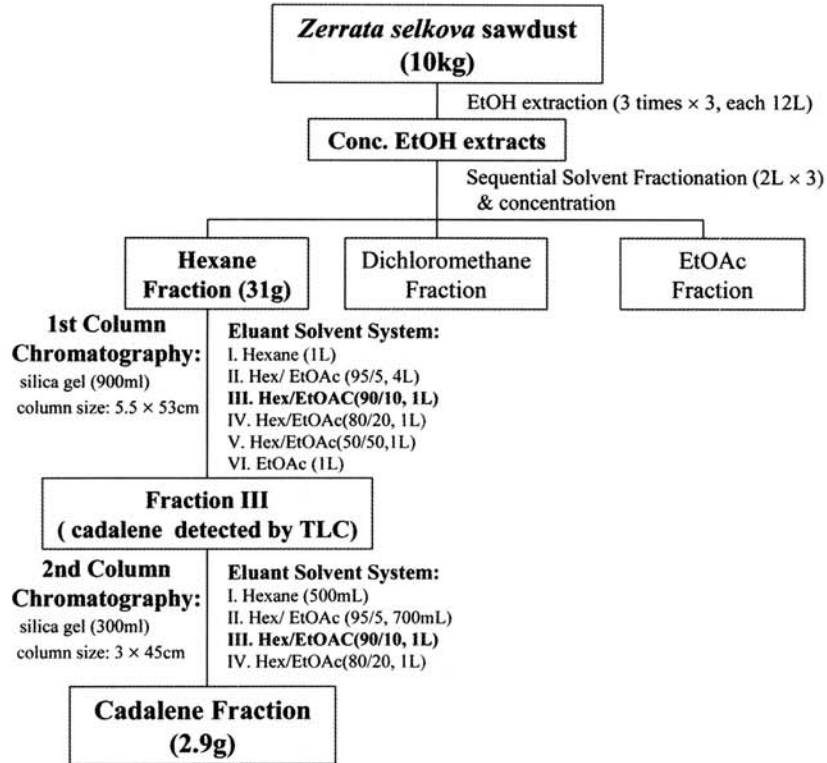


Fig. 1. Purification chart of cadalene by successive silica gel column chromatography.

모아 감압농축기로 40°C 이하에서 농축하여 에탄올 추출액(1 l)을 제조하였다(Lee *et al.*, 1999).

2.3. 카달렌 추출

에탄올 조추출액을 헥산(2 l × 3)으로 추출한 헥산분획물을 감압농축기로 농축한 후에 실리카겔로 충전된 칼럼크로마토그래피(5.5 × 53 cm)로 카달렌을 분리 하였다. 용출용매는 헥산과 에틸아세테이트를 100 : 0, 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20과 50 : 50 (v/v) 비율로 혼합하여 사용하였으며, 칼럼크로마토그래피를 통과한 용매를 각각 50 ml 씩 받아 TLC (전개 용매 : 헥산 : 에틸아세테이트 = 80 : 20, 헥산 : 벤젠 = 4 : 1)로 카달렌의 용출 여부를 추적하였다. 카달렌은 헥산과 에틸아세테이트의 혼합비율이 90 : 10 (v/v) 인 용매조건에서 나타나기 시작하였으며,

카달렌 성분을 포함한 분획들을 모두 합하여 감압, 농축하였다. 카달렌 농축액에 존재하는 미량의 불순물을 제거하기 위하여 이를 다시 실리카겔-칼럼크로마토그래피(3 × 45 cm)를 실시하여 순수한 상태의 카달렌 분획을 획득하였다(Fig. 1). 카달렌 분획을 감압, 농축한 후에 -4°C 이하에서 48시간 이상 방치하여 결정화를 유도한 후에 카달렌 결정(7-hydroxy-3-methoxycadalene)에 포함된 미량의 추출용매를 완전히 제거하기 위하여 24시간 동안 동결건조 하였다.

2.4. 기기분석

단리한 카달렌은 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 정성분석을 실시하였다. HPLC 기종은 Hewlett packard 1,100이며 분석용 칼럼은 Waters symmetry reverse phase column (C18: 4.6

Table 1. Analytical condition of cadalene by HPLC

Instrument	High performance liquid chromatography (HP 1100series) equipped with autosampler
Column	Waters symmetry reverse phase C18 (4.6 × 250 mm)
Detector	UV detector at 280 nm
Mobile phase	Starting with 50% water & 50% AcCN, maintaining for 25 min, linear gradient to 100% AcCN for 10 min, which was held for 5 min
Flow rate	0.6 ml/min
Injection volume	20 µl

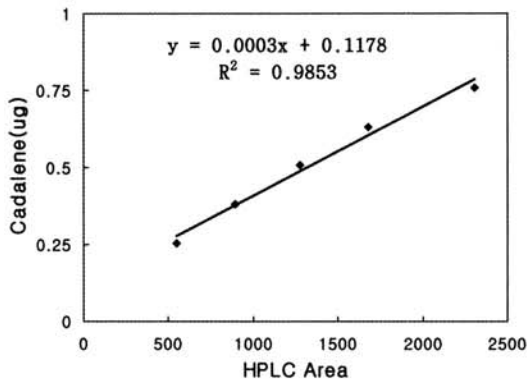


Fig. 2. Calibration curve for quantitative analysis of 7-hydroxy-3-methoxycadalene.

× 250 mm)을 이용하였다. HPLC용매는 처음 25분 동안은 아세토니트릴과 물을 50 : 50 (v/v)으로 혼합하여 흘려주었으며, 이후 아세토니트릴의 비율을 10분 동안 100% 까지 높여서 사용하였다. 자세한 분석 조건은 Table 1에 제시하였다. 분리한 카달렌의 구조 동정을 위하여 CD₃OD에 녹여서 기초과학연구원 서울분소에서 ¹H- 및 ¹³C-NMR (Varian, 500 MHz)을 측정하였으며, 분자량은 EI-MS (JMS-600W, JOEL)로 분석하였다.

2.5. 느티나무 부위별, 연륜별 카달렌 분석

2.5.1. 카달렌 추출

각 부위별로 구분된 시료(5~10 g)는 에탄올(100

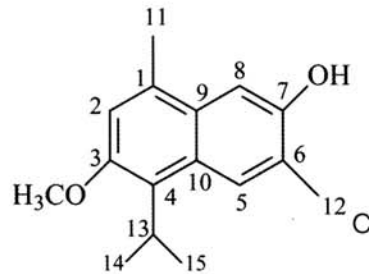


Fig. 3. 7-hydroxy-3-methoxycadalene purified from *Zelkova serrata*.

ml)로 24시간 동안 각각 2회 추출한 후에 혼합하였다. 에탄올 추출액(200 ml)은 감압농축기로 40°C 이하에서 농축하였다. 농축된 에탄올 추출액은 헥산(2 × 100 ml)으로 분획한 후에 헥산 분획물을 다시 농축하였다. 최종 헥산 농축액은 메탄올(2 ml)로 녹인 후에 HPLC 분석 전까지 -4°C 이하에서 보관하였다.

2.5.2. 카달렌 정량분석

각 시료의 헥산 농축액을 메탄올로 녹인 후에 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 각 부위별, 연륜별 카달렌의 함량을 정량적으로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 1과 동일하다. 카달렌의 정량분석을 위하여 카달렌 검량선을 작성하였다. 정량분석용 검량선 작성을 위하여 이미 단리한 카달렌을 재차 실리카겔을 이용한 칼럼크로마토그래피(3 × 45 cm)를 실시하여 카달렌의 순도를 최대한 높여주었다. 여기서 획득한 카달렌(순도 약 95% 이상)을

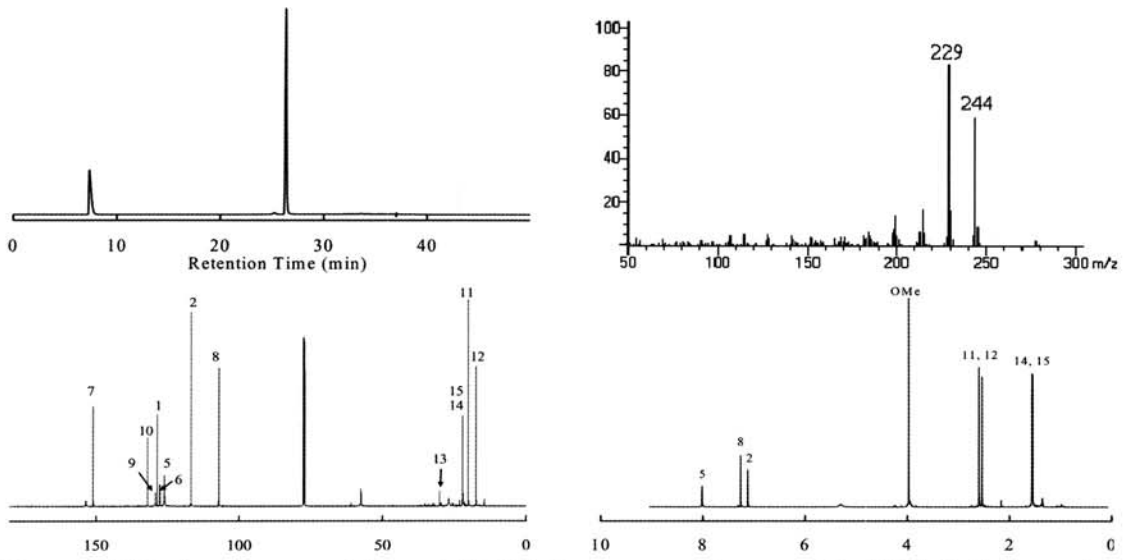


Fig. 4. HPLC chromatogram (above, left), EI-MS spectrum (above, right), ¹H-NMR (below right) and ¹³C-NMR spectrum (below left) of 7-hydroxy-3-methoxycadalene.

표준 카달렌으로 간주하여 5가지 농도의 카달렌 표준용액을 제조하였다. 이렇게 제조한 카달렌 표준용액을 위의 HPLC 조건하에서 분석하여 각 농도별 피크의 면적으로 검량식을 작성하였다(Fig. 2).

3. 결과 및 고찰

3.1. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene 추출

7-Hydroxy-3-methoxycadalene (Fig. 3)은 느티나무의 에탄올 추출액에서 획득한 헥산 분획물을 실리카 겔 칼럼크로마토그래피를 이용하여 분리하였다. 용출용매로는 헥산과 에틸아세테이트를 다양한 비율로 혼합하여 사용하였으며, 카달렌은 두 용매의 9 : 1 (v/v) 비율에서 용출되기 시작하였다. 각 분획은 TLC로 카달렌의 용출을 확인하였으며, 순수한 상태의 카달렌 분획을 얻기 위하여 카달렌이 확인된 분획만 모아서 다시 실리카 겔 칼럼크로마토그래피를 위와 동일한 조건하에서 실시하였다. 이러한 과정으로 추출한 분리한 카달렌은 밝은 갈색(light brown)

의 결정을 이루고 있었으며, 수율은 약 0.03% (2.9 g/ 10 kg 느티나무)으로 나타났다.

3.2. 카달렌 구조

Fig. 4에 느티나무 에탄올 추출액에서 분리한 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 HPLC 크로마토그래프를 제시하였다. 크로마토그래프 앞부분에 나타난 피크는 카달렌 단리에 사용한 용매(에틸아세테이트) 피크이며, retention time 약 26분에 7-hydroxy-3-methoxycadalene 피크가 나타났다. HPLC 분석에 의한 분리한 카달렌의 순도는 95% 이상인 것으로 나타났다. EI-MS 분석에 의하면 분리한 카달렌의 분자량은 244 (m/z, base peak)로 측정되었다.

분리한 카달렌의 ¹H- 과 ¹³C-NMR 스펙트럼은 Fig. 4의 하단부에서 제시하였으며, ¹³C-NMR 스펙트럼의 chemical shifts는 Table 2와 같다. 카달렌 화합물은 다른 세스퀴테펜과는 달리 aromatic hydrocarbon 구조를 이루고 있으므로 C1부터 C10까지의 탄소 피크는 100~155 ppm 영역에서 발견되었다. 반면, C11부터 C15는 카달렌의 측쇄구조를 이

Table 2. Chemical shift of ¹³C-NMR spectrum of 7-hydroxy-3-methoxycadalene

Carbon No.	Chemical shift (ppm)	Carbon No.	Chemical shift (ppm)
C1	131.6	C9	128.8
C2	116.4	C10	131.6
C3	153.1	C11	19.7
C4	125.7	C12	16.9
C5	125.7	C13	21.6
C6	127.5	C14	26.4
C7	150.7	C15	26.4
C8	106.7	OMe	57.0

루는 aliphatic hydrocarbon으로서 주로 30 ppm 이하에서 발견되었으며, 메톡실기(OCH₃)는 전형적으로 57 ppm 부근에서 피크를 나타내었다.

3.3. 느티나무 부위별 카달렌 분포

Fig. 5에는 느티나무 심재와 변재를 분리한 연료별 에탄올 추출물에서 획득한 hexan분획물의 HPLC 크로마토그램들을 중첩시켜 나타내었다. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene에 해당하는 피크는 느티나무 내 심재부에서만 발견되었고, 변재부에서는 전혀 검출되지 않았다. HPLC 크로마토그램 상에(*) 표시한 피크는 190 nm부터 400 nm 범위에서 7-hydroxy-3-methoxycadalene과 매우 유사한 자외선 흡광스펙트럼을 나타내어 화학구조가 유사한 카달렌 이성질체로 추정된다.

각 연료별 느티나무의 에탄올 추출물 함량과 카달렌의 함량은 Fig. 6 (2령급 느티나무)과 Fig. 7 (3령급 느티나무)에 각각 나타냈다. 느티나무의 에탄올 추출물 함량은 2령급 느티나무의 경우 연료 분포와 상관없이 대체로 변재부에서 다소 높게 나타났다. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene은 변재부(ring 1-6)에서 심재부(ring 7-9)로 전이되면서 발견되기 시작하였으며, 심재부에서는 연료에 관계없이 대체로 고르게 분포하고 있었지만 느티나무 수피와 잎에서는 카달렌이 전혀 발견되지 않았다. 3령급 느티나무에

는 심재와 변재사이에 미백색의 전이부분이 존재하고 있음을 육안적으로 확인할 수 있었다. 그러나 목부 내 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 분포는 2령급 느티나무와 마찬가지로 심재부에서만 확인할 수 있었으며, 수(pith)에 가까워질수록 그 함량은 완만하게 감소하는 경향을 보였다.

본 연구에서 확인한 느티나무 목부 내 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 분포특성으로 미루어 느티나무는 성장하는 과정 중 특정 시기에 심재부를 형성하면 '카달렌'이라는 세스퀴테르펜류 화합물이 느티나무 유세포조직(ray parenchyma cell)에서 생합성되어 심재부로 이동, 축적되는 전형적인 심재형성물질로 예측되었다. 느티나무 심재부에는 7-hydroxy-3-methoxycadalene로부터 파생된 여러 종의 카달렌 동족체들이 존재하고 있었다. 이러한 카달렌 동족체들은 7-hydroxy-3-methoxycadalene에 비해 양적으로는 비록 소량이지만 느티나무 심재부를 형성하는 주요 물질들로 예측되었다.

4. 결 론

카달렌(cadalene)은 나프탈렌 구조로 이루어진 천연물질로서 주로 느릅나무과 수종에서 주로 발견되는 세스퀴테르펜류 화합물이다. 느티나무의 에탄올 추출액에서 단리한 카달렌 화합물은 밝은 갈색(light brown)의 결정체로 나프탈렌 구조의 1번 위

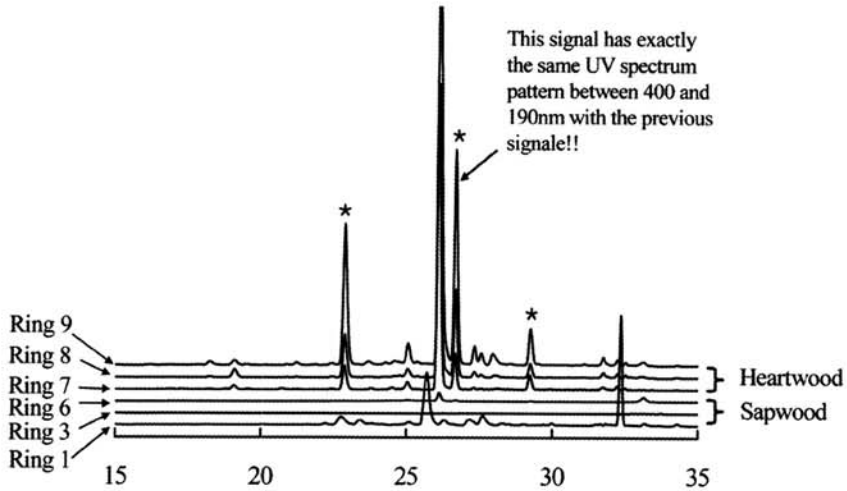


Fig. 5. Cascade of HPLC chromatograms of hexane fractions obtained from Zelkova wood powder of annual ring separation.

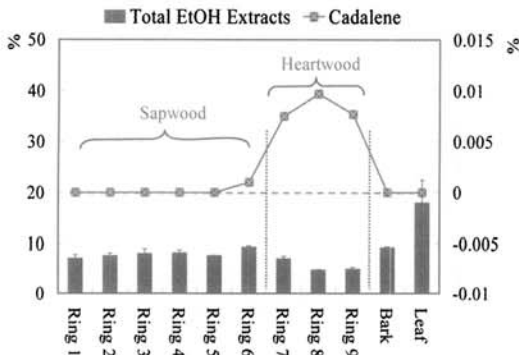


Fig. 6. Quantitative variation of ethanol extract and 7-hydroxy-3-methoxycadalene in 14 year old *Zelkova serrate* wood.

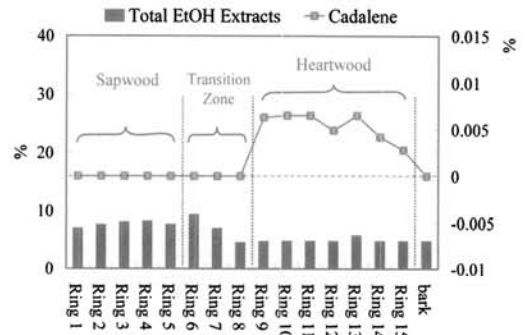


Fig. 7. Quantitative variation of ethanol extract and 7-hydroxy-3-methoxycadalene in 30 year old *Zelkova serrate* wood.

치에 메틸기(CH₃)가, 그리고 4번 위치에 isopropyl기가 부착된 카달렌 기본 골격에 메톡실기(OCH₃)와 수산기(OH)가 각각 3번 위치와 7번 위치에 치환된 7-hydroxy-3-methoxycadalene의 구조를 이루고 있었다. 본 화합물의 수율은 느티나무 목부 기건중량의 약 0.03% 이었다. 7-Hydroxy-3-methoxycadalene은 느티나무의 수피나 잎에서는 전혀 발견되지 않았으며, 목부 중에서도 심재부위에서만 발견되는 점으로

미루어 심재가 형성되는 시기에 생합성되어 심재부로 이동, 축적되는 느티나무 심재형성물질로 추정된다.

사 사

본 연구는 농림부의 농림기술개발사업 지원에 의해 수행되었다.

참 고 문 헌

1. Burden, R. S. and M. S. Kemp. 1984. Sesquiterpene phytoalexins from *Ulmus glabra*. *Phytochemistry* 23: 383~385.
2. Chen, F. A., Y. M. Lin, and A. H. Chen. 1972. Sesquiterpenes from the heartwood of chinese elm. *Phytochemistry*. 11: 1990~1991.
3. Dev, S. 1989. Terpenoids. In: Natural products of woody plant II. Eds: J. W. Rowe (Eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 691~807.
4. Fracheboud, M., J. W. Rowe, R. W. Scott, S. W. Fanega, A. J. Buhl, and J. K. Toda. 1968. New sesquiterpenes from yellow wood of slippery elm. *Forest Products Journal*. 18: 37~40.
5. Hayashi, Y. and T. Takahashi. 1980. Zelkoserraton and Homozelkoserraton, new cadalenic sesquiterpenes from the heartwood of *Zelkova serrata*. *Mokuzai Gakkaishi*. 26: 54~55.
6. Hayashi, Y., K. Sakurai, and T. Takahashi. 1976. Isolation of a Dimer of 7-hydroxy-3-methoxycadalene from the heartwood of *Zelkova serrata* MAKINO. *Mokuzai Gakkaishi*. 22: 202~203.
7. Hayashi, Y., M. Yasue, and T. Takahashi. 1972. Two new naphthalene derivatives from the heartwood of *Zelkova serrata* MAKINO. *Mokuzai Gakkaishi*. 18: 41~42.
8. Lee S. S., H. J. Lee, H. Y. Kang, and D. H. Choi. 1999. Studies on biological activity of wood extractives (I): antimicrobial and antioxidative activity of heartwood extractives. *KFRI Journal of Forest Science*. 61: 82~89.
9. Lee S. S., H. J. Lee, H. Y. Kang, and D. H. Choi. 2000. Studies on biological activity of wood extractives (II): antimicrobial and antioxidative activity of heart wood extractives. *Mokchae Konghak*. 28: 32~41.
10. Lindgren, B. O. and C. M. Svahn. 1968. Extractives of elm wood. *Phytochemistry*. 7: 1407~1408.
11. Nishikawa, K., S. Yasuda, and M. Hanzawa. 1972. The extractives of Ohyonire, *Ulmus laciniata* MAYR. II. The isolation of 7-Hydroxycadalene, Lacinilene A, Scopoletin and Vanillic acid from the Sapwood. *Mokuzai Gakkaishi*. 18: 471~474.
12. Overeem, J. C. and D. M. Elgersma. 1970. Accumulation of mansonones E and F in *Ulmus hollandica* infected with *Ceratosistis Ulmi*. *Phytochemistry*. 9: 1949~1952.
13. Steele, C. L., J. Crook, J. Bohlmann, and R. Croteau. 1998. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). *Journal of Biological Chemistry*. 273: 2078~2089.