

碩士學位論文

개가시나무, 산딸나무 및
벚꽃은잎의 활성성분 규명



濟州大學校 大學院

化學科

文 美 娟

2008年 2月

개가시나무, 산딸나무 및 벚꽃은잎의 활성성분 규명

指導教授 李 南 昊

文 美 娟

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2008年 2月

文美娟의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

濟州大學校 大學院

2008年 2月

Identification of Antioxidation Components
from *Quercus gilva*, *Cornus kousa* and
Callophyllis japonica

Moon, Mi Yeon
(Supervised by professor Nam Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2008. 2.

This thesis has been examined and approved.

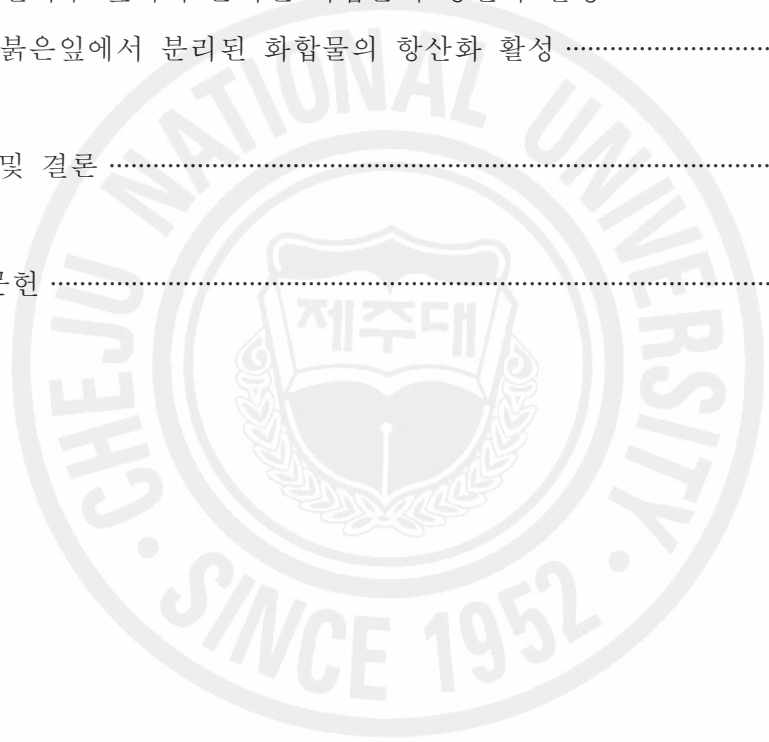
.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Schemes	iii
List of Tables	iii
List of Figures	iv
Abstract	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
2. 재료 및 시약	7
3. 추출, 분획 및 분리	8
3-1. 개가시나무 가지의 추출 및 분획	8
3-1-1. 개가시나무 가지의 활성 성분 분리	9
3-2. 산딸나무 잎의 추출, 분획 및 분획	13
3-2-1. 산딸나무 잎의 활성 성분 분리	14
3-3. 벚붉은잎의 추출 및 분획	18
3-3-1. 벚붉은잎의 활성 성분 분리	19
4. 항산화 활성 실험; DPPH radical 소거 활성	23
III. 결과 및 고찰	26
1. 화합물의 구조 결정	26
1-1. 개가시나무 가지에서 분리된 화합물 구조 결정	26
1-1-1. Compound 1과 compound 2의 구조 해석	26
1-1-2. Compound 3의 구조 해석	30
1-1-3. Compound 4의 구조 해석	32
1-2. 산딸나무 잎에서 분리된 화합물 구조 결정	36
1-2-1. Compound 5의 구조 해석	36

1-2-2. Compound 6의 구조 해석	38
1-2-3. Compound 7의 구조 해석	40
1-3. 벚붉은잎에서 분리된 화합물의 구조 결정	44
1-3-1. Compound 8의 구조 해석	44
1-3-2. Compound 9의 구조 해석	47
1-3-3. Compound 10의 구조 해석	49
2. 향산화 활성	52
2-1. 개가시나무 가지에서 분리된 화합물의 향산화 활성	52
2-2. 산딸나무 잎에서 분리된 화합물의 향산화 활성	53
2-3. 벚붉은잎에서 분리된 화합물의 향산화 활성	54
IV. 요약 및 결론	55
V. 참고문헌	56



List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and fractions from <i>Quercus gilva</i> branch	8
Scheme 2. Isolation of the compounds 1-4 from <i>Quercus gilva</i> branch ..	10
Scheme 3. Procedure of extraction and fractions from <i>Cornus kousa</i> leaves	13
Scheme 4. Isolation of the compound 5 from <i>Cornus kousa</i> leaves	15
Scheme 5. Isolation of the compounds 6, 7 from <i>Cornus kousa</i> leaves ·	15
Scheme 6. Procedure of extraction and fraction from <i>Callophyllis japonica</i>	18
Scheme 7. Isolation of the compound 8 from <i>Callophyllis japonica</i>	20
Scheme 8. Isolation of the compounds 9, 10 from <i>Cornus kousa</i> leaves ·	20

List of Tables

Table 1. NMR spectral assignments for compounds 1 and 2^a	11
Table 2. NMR spectral assignments for compound 4^a	12
Table 3. NMR spectral assignments for compounds 5 and 6^a	16
Table 4. NMR spectral assignments for compound 7^a	17
Table 5. NMR spectral assignments for compound 8^a	21
Table 6. NMR spectral assignments for compounds 9 and 10^a	22

List of Figures

Figure 1. Photograph of <i>Quercus gilva</i>	4
Figure 2. Photograph of <i>Cornus kousa</i>	5
Figure 3. Photograph of <i>Callophyllis japonica</i>	6
Figure 4. Scavenging of the DPPH radical by phenol	24
Figure 5. Measurement of DPPH radical scavenging effect	25
Figure 6. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	27
Figure 7. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	27
Figure 8. HMQC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	28
Figure 9. HMBC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD	28
Figure 10. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	29
Figure 11. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD	29
Figure 12. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	31
Figure 13. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	31
Figure 14. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	33
Figure 15. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	33
Figure 16. HMQC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	34
Figure 17. HMBC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	34
Figure 18. Chemical structure of compound 1-4	35
Figure 19. ¹ H-NMR spectrum of compound 5 in CD ₃ OD	37
Figure 20. ¹³ C-NMR spectrum of compound 5 in CD ₃ OD	37
Figure 21. ¹ H-NMR spectrum of compound 6 in CD ₃ OD	38
Figure 22. ¹³ C-NMR spectrum of compound 6 in CD ₃ OD	39
Figure 23. HMBC spectrum of compound 6 in CD ₃ OD	39
Figure 24. ¹ H-NMR spectrum of compound 7 in CD ₃ OD	41
Figure 25. ¹³ C-NMR spectrum of compound 7 in CD ₃ OD	41
Figure 26. HMBC spectrum of compound 7 in CD ₃ OD	42
Figure 27. Chemical structure of compound 5-7	43

Figure 28. ¹ H-NMR spectrum of compound 8 in CD ₃ OD	45
Figure 29. ¹³ C-NMR spectrum of compound 8 in CD ₃ OD	45
Figure 30 HMQC spectrum of compound 8 in CD ₃ OD	46
Figure 31 HMBC spectrum of compound 8 in CD ₃ OD	46
Figure 32. ¹ H-NMR spectrum of compound 9 in CD ₃ OD	48
Figure 33. ¹³ C-NMR spectrum of compound 9 in CD ₃ OD	48
Figure 34. ¹ H-NMR spectrum of compound 10 in CD ₃ OD	50
Figure 35. ¹³ C-NMR spectrum of compound 10 in CD ₃ OD	50
Figure 36 Chemical structure of compounds 8-10	59
Figure 37. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 1-4 (100 μg/mL) from <i>Quercus gilva</i> branch	53
Figure 38. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 5-7 from <i>Cornus kousa</i> leaves	54
Figure 39. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 8-10 (100 μg/mL) from <i>callophyllis japonica</i>	55

Abstract

For the development of functional cosmetic additives, we have screened plant in Jeju island on DPPH inhibition activities. *Quercus gilva*, *Cornus kousa* and *Callophyllis japonica* distributed in Jeju has shown inhibition activities on free radical scavenging test.

In this study, five antioxidative components were isolated from *Quercus gilva*, *Cornus kousa* and there structures were identified by 1D-NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT) and 2D-NMR (HMQC, HMBC) techniques. Isolated compounds were identified as catechin, *epi*-catechin, tyrosol, tilliroside, kaempferol, astragalín, quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside, bis(3-chloro-2-hydroxypropyl)ether, 2,2-Bis[4-(glycidyoxy)phenyl]propane. their anti-oxidative activities were examined.

RC₅₀ of DPPH radical scavenging for catechin, *epi*-catechin, kaempferol, astragalín, quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside were measured at the concentration of 7.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 9.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 48.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. These radical scavenging activities were more potent than that of L-ascorbic acid.

I. 서론

우리는 음식물의 산화반응을 이용하여 대사하며 열량을 얻고 생명을 유지하고 있다. 이 때 사용되는 산소 중의 1-3%는 활성산소가 되어 체내 세포 중의 지질, 단백질, 핵산 등을 공격하고 있다. 지질의 산화는 주로 자유라디칼에 의한 연쇄반응으로 진행되어 과산화물 및 산화 분해된 카르보닐 화합물 등을 생성하게 된다. 반응성이 큰 과산화물들의 유리기는 생체 내 단백질 또는 아미노산과 반응하여 기능을 파괴시키거나 다른 물질들과 가교 결합을 형성하여 여러 조직에서 세포막의 변화를 일으킬 뿐만 아니라 효소활성의 감소 및 DNA 손상과 퇴행성 장애를 일으킨다.

생체에는 superoxide dismutase, catalase, glutathione, 비타민 등의 항산화제가 존재하여 생성되는 유리기를 제거하여 체내 항상성을 유지한다. 그러나, 나이가 들거나 면역력이 저하되어 있는 경우, 생체 내 산화조절 시스템이 붕괴되어 세포는 산화적 공격을 적절히 방어하기가 어렵게 된다. 따라서, 이러한 경우 외부에서 항산화제를 보충하여 항산화의 항상성을 유지케 하여 주어야 한다.

현재 가장 많이 사용하고 있는 항산화제로는 천연 항산화제인 tocopherol류, flavonoide류와 합성 산화제인 propyl gallate, BHA, BHT, TBHQ등이 있다.¹⁻³⁾ 이들 항산화제는 산소 존재나 고온 조건에서 기질의 유리 라디칼 생성을 지연시키거나 활성을 저해함으로써 지방질의 산화를 억제시키고 있다. 합성 항산화제는 탁월한 효과와 경제성 때문에 폭넓게 사용되고 있으나 이들의 인체에 대한 안정성에 문제가 있으며,⁴⁾ 천연 항산화제로 널리 알려진 tocopherol은 안전하기는 하나 단독으로는 산화연쇄반응 저지 능력이 낮고 가격이 비싼 단점이 있다.

따라서, 새로운 타입의 천연 항산화제의 개발에 관심이 고조되고 있다.⁵⁾ 특히 식물 플라보노이드는 항염, 항궤양, 항동맥경화, 항암 등의 생리활성과 더불어 상당한 항산화효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에는 천연항산화제의 개발을 목표로 개가시나무, 산딸나무의 에탄올 추출물, 해조류인 벚꽃은잎의 메탄올 추출물에서의 분리된 화합물들의 DPPH

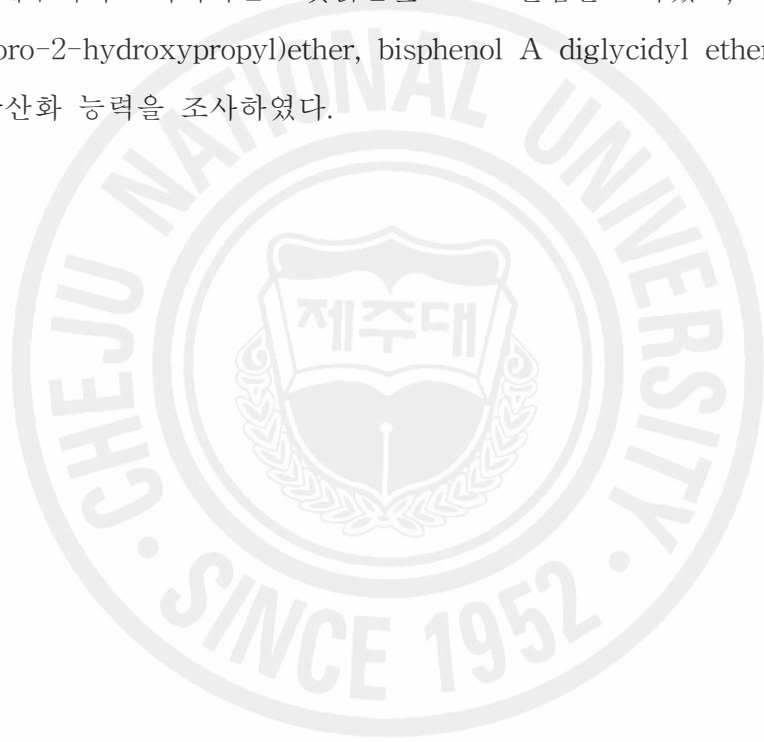
라디칼 저해 활성을 검색하였다.

개가시나무는 참나무목 참나무과의 상록 교목으로써 학명은 *Quercus gilva*이다, 주로 한국(제주), 일본, 타이완, 중국의 난대 지방의 숲속에서 서식을 하며, 높이가 약 20m이다. 나무껍질이 흑갈색이고 잔가지가 황갈색의 털로 뺨뺨이 덮여 있다. 잎은 어긋나고 바소꼴 또는 거꾸로 선 바소꼴이며 길이 5-12 cm이고 끝이 뾰족하다. 잎의 윗부분 가장자리에 날카로운 톱니가 있고 뒷면에 황갈색의 별 모양 성모(星毛)가 뺨뺨이 난다. 잎자루는 털이 없고 길이 1-1.5 cm이다. 주로 관상용으로 심으며 열매는 먹기도 한다. 개가시나무의 화학성분에 관한 연구는 꽃으로부터 분리한 triterpene의 보고되어 있으나⁶⁻⁷⁾ 다른 성분에 관한 연구는 보고되어진 바 없다. 본 연구에서는 제주산 개가시나무의 줄기에서 항산화성분으로 catechin, epicatechin, tyrosol 및 tiliroside의 구조를 동정하고 이들 물질의 항산화능력을 조사하였다.

산딸나무의 학명은 *Cornus kousa*이며, 쌍떡잎식물 산형화목 층층나무과의 낙엽소교목으로써, 가지가 층층나무처럼 넓게 퍼지며, 잎은 마주나고 달걀 모양 타원형으로 산수유나무와 닮았는데, 끝이 뾰족하고 밑은 넓은 췌기 모양으로 가장자리에 톱니가 없으나 약간 물결모양이다. 꽃은 양성화로서 짧은가지 끝에 두상꽃차례로 모여 달리는데 꽃잎 같은 4개의 하얀 포(苞)로 싸인다. 꽃잎과 수술은 4개씩이고 암술은 1개이며, 20-30개가 모여서 달린다. 열매는 취과인데 딸기처럼 모여 달라고 10월에는 붉은 빛으로 익는다. 크기는 높이가 대략 7~12m 정도이며, 6월에 꽃이 핀다. 우리나라, 일본, 중국에 분포하며 산지의 숲에서 자란다. 산딸나무는 주로 정원수, 목재로써 가구재와 조각재로 사용되며, 열매는 식용이 가능하다. 산딸나무의 화학성분에 관한 연구는 가지, 열매에서 분리된 화합물은 보고되어진 바가 많으나, 잎에서 분리된 화합물은 보고되어진 바가 없어 본 연구에서는 제주에 자생하는 산딸나무의 잎 부분으로 실험을 하였고, kaempferol, astragalol 및 quercetin-3-O- β -glucopyranose의 구조를 동정하고 이들 화합물의 항산화능력을 조사하였다.

벚붉은잎은 홍조식물(紅藻植物) 칼리메니아과(科)의 바닷말로써, 학명은 *Callophyllis japonica* 이고, 식물체는 잎 모양을 이루는데, 조그마한 반상근(盤狀根)에서 짧은 줄기가 나고 가지가 불규칙하게 갈라지면서 췌기꼴로 퍼져서 10~20cm 가량 커진다. 줄기와 가지는 편평하게 벌어지며 가장자리에 톱니 모양의 돌기가 생기는 것이 특징이다. 또한, 짙은 붉은색 또는 자색을 띠며 막질(膜質:얇은 종이처럼 반투명한 것)이고, 노성(老成)하면 두꺼워지며 한국에서는 남해안(南海岸) 일대에서 흔히 볼 수 있다.

현재까지 해조류인 벚붉은잎에서 분리되어 알려진 화합물은 없으며, 본 연구에서는 제주에서 서식하는 벚붉은잎으로 실험을 하였고, bisphenol A bis(3-chloro-2-hydroxypropyl)ether, bisphenol A diglycidyl ether의 구조를 동정하고 항산화 능력을 조사하였다.



II. 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 개가시나무(시료번호: 064)는 2006년도 2월에 채집하였으며 동정은 채집하였던 한라수목원에서 이루어졌다. 채집한 개가시나무는 실온에서 완전히 자연 건조시킨 후 잎과, 가지를 분리하였으며, 그 중 가지 부분만 분쇄하여 사용하였다(Figure 1).



Figure 1. Photograph of *Quercus gilva*

산딸나무(시료번호: 138)는 2006년도 7월에 한라수목원에서 채집 및 동정하였으며 채집 후 실온에서 완전히 자연 건조시킨 후에 잎, 가지를 분리하였고, 그 중 잎 부분만 분쇄하여 실험에 사용하였다(Figure 2).



Figure 2. Photograph of *Cornus kousa*

해조류인 벗붙은잎은 제주도 연안에서 채집하였으며, 흐르는 물로 씻은 후, 응달에서 건조 한 후 실험에 들어가기전 잘게 분쇄하였다(Figure 3).



Figure 3. Photograph of *Callophyllis japonica*

2. 시약 및 기기

실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 용매들은 Merck 社 제품을 사용하였다. Column packing material은 RP 18(YMC-GEL ODS-A, 12nm, S-75 μm), SephadexTM LH-20(Amersham Biosciences), normal silica gel 60(230-400mesh ASTM)을 사용하였으며, TLC plate는 silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다.

Visualizing agent로는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃ 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. 시료의 흡광도를 측정하기 위해서는 UV spectrometer는 Biochrom Libra s22(cambridge Inc., England)를 이용하였으며 구조분석에 이용하였던 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400 (FT-NMR system, JEOL)을 이용하였으며, NMR 측정시 사용되었던 용매는 CD₃OD가 사용되었다.

항산화 관련 활성 실험을 하기 위하여 사용하였던 DPPH 시약은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, SIGMA 社)가 사용되었다.

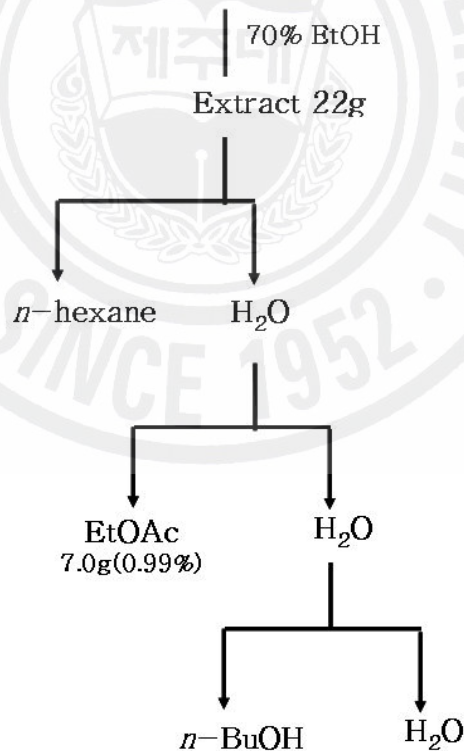
3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 개가시나무 가지의 추출 및 분획

건조된 개가시나무 가지 705 g을 70% ethanol 14.1 L에 침적하여, 실온에서 7일 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator로 농축하여 70% ethanol 추출물 22 g을 얻었다.

이 70% ethanol 추출물을 H₂O 1 L에 현탁을 시키고 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water fraction을 얻었다 (Scheme 1).

Quercus gilva branch 705g



Scheme 1. Procedure of extraction and various fraction from *Quercus gilva* branch

3-1-1. 개가시나무 가지의 활성 성분 분리

개가시나무 가지의 4개의 분획물 중 ethyl acetate fraction의 1/2 (3.3 g, w/w)을 덜어 RP column chromatography를 실행하여 각각 20% (fr. 1, 143.5 mg), 20-40% (fr. 2, 725.2 mg), 40% (fr. 3, 359.2 mg), 40-60% (fr. 4, 244.3 mg), 60% (fr. 5, 250 mg), 60-80% (fr. 6, 149.8 mg), 80% (fr. 7, 123.3 mg), 80-100% (fr. 8, 67.4 mg)과 100% MeOH (fr. 9, 44.8 mg) fraction을 얻었으며, 그 중 20-40% (fr. 2, 725.2 mg) 분획물에서 compound 1을 얻었으며, 40% (fr. 3, 359.2 mg) 분획물에서 compound 2를 얻었다.

개가시나무 가지의 20% MeOH 층 fr. 1 (143.5 mg)을 Sephadex LH-20으로 충전된 glass column에 loading하여 전개용매 100% MeOH을 사용하여 전개시켜 분취액은 CHCl₃/MeOH(4/1)의 조건으로 TLC로 확인하여 fr. 1-1 (8.3 mg), fr. 1-2 (2.0 mg), fr. 1-3 (1.8 mg), fr. 1-4 (18.3 mg), fr. 1-5 (7.7 mg), fr. 1-6 (30.1 mg)의 분획물들을 얻었으며, 그 중 fr. 1-1 (8.3 mg), compound 3을 얻었다.

개가시나무 가지의 60% MeOH 층의 fr. 5 (250 mg)을 Sephadex LH-20으로 충전된 glass column에 loading하여 전개용매 (CHCl₃/MeOH = 4/1)를 사용하여 gradient로 전개시켰다. 분취하여 얻어진 분취용액을 TLC로 확인하여 비슷한 R_f(Retention factor)값을 가진 fraction을 모아 fr. 5-1 (40.3 mg), fr. 5-2 (95.1 mg), fr. 5-3 (26.9 mg), fr. 5-4 (27.5 mg), fr. 5-5 (19.7 mg), fr. 5-6 (21.6 mg), fr. 5-7과 fr. 5-8 fraction을 얻었다. 그 중 fr. 5-5, fr. 5-6을 합하여 normal silica gel으로 충전된 glass column에 loading하여 전개용매(CHCl₃/MeOH = 4/1)를 사용하여 전개시켰으며, 마찬가지로 분취용액을 TLC로 확인하여 fr. 5-5-1 (3.8 mg), fr. 5-5-2 (11.8 mg), fr. 5-5-3 (20.2 mg), fr. 5-5-4 (6.8 mg)까지 총 4개의 분획물을 얻었으며, 그 중 fr. 5-5-2 (11.8 mg), compound 4을 얻었다 (Scheme 2).



Scheme 2. Isolation of the compounds 1-4 from *Quercus gilva* branch

Table 1. NMR spectroscopic data^a for compounds **1** and **2** (400MHz CD₃OD)

No.	Compound 1		Compound 2	
	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)
2	4.56 (1H, d, 7.6)	82.8	4.81 (1H, s)	79.9
3	3.98 (1H, ddd, 7.8, 7.8, 5.4)	68.8	4.18 (1H, ddd, 3.8, 3.7, 1.5)	67.5
4	2.84 (1H, dd, 16.1, 5.4)	28.5	2.85 (1H, dd, 16.6, 4.7)	29.2
	2.50 (1H, dd, 16.1, 8.1)		2.73 (1H, dd, 16.6, 3.0)	
5		157.7		158.0
6	5.92 (1H, d, 2.4)	96.3	5.91 (1H, d, 2.2)	96.4
7		157.5		157.6
8	5.85 (1H, d, 2.4)	95.5	5.93 (1H, d, 2.2)	95.9
9		156.9		157.3
10		100.8		100.0
1'		132.2		132.3
2'	6.76 (1H, dd, 8.0, 2.0)	120.0	6.79 (1H, dd, 8.3, 2.0)	119.4
3'		146.1		145.7
4'		146.2		145.9
5'	6.71 (1H, dd, 8.0)	116.1	6.75 (1H, d, 8.3)	115.9
6'	6.83 (1H, d, 2.0)	115.2	6.96 (1H, d, 2.0)	115.3

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD solution at 400 and 100MHz, respectively. Assignments were based upon HMQC, HMBC experiments.

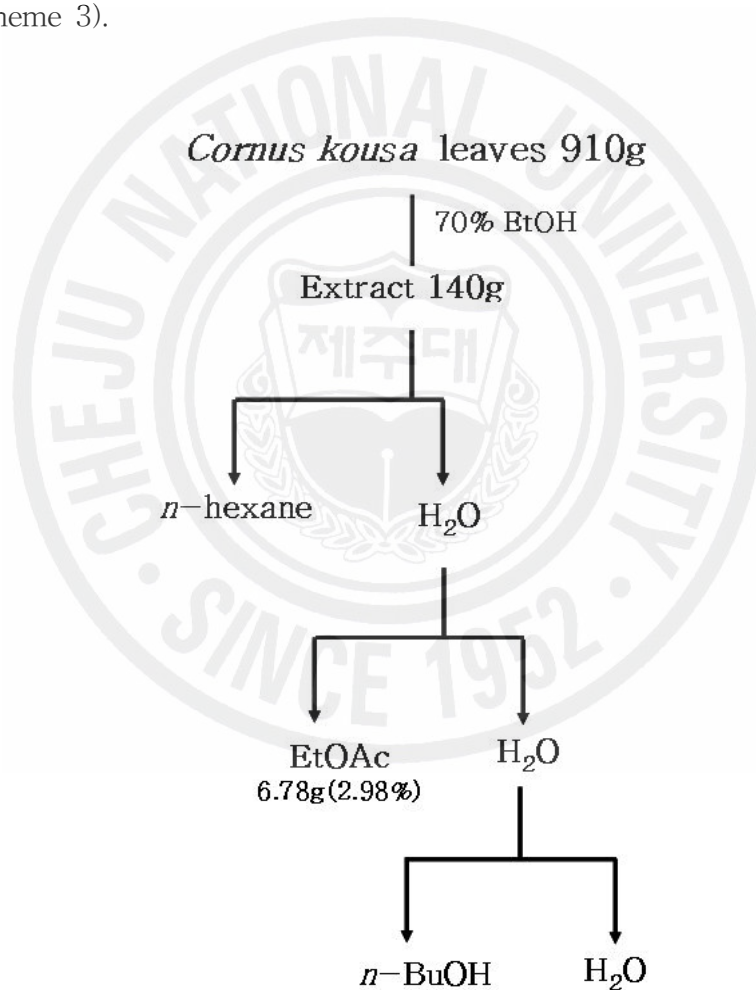
Table 2. NMR spectroscopic data^a for compound **4** (400MHz CD₃OD)

Compound 4					
No.	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)	No.	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)
2		158.5	1''	5.21 (1H, d, 7.6)	104.1
3		135.2	2''		75.7
4		179.3	3''		78.0
5		159.2	4''		71.7
6	6.26 (1H, d, 2.0)	95.0	5''		75.8
7		116.9	6''-a	4.18 (1H, dd, 11.6, 2.2)	64.3
8	6.11 (1H, d, 2.0)	100.3	6''-b	4.29 (1H, dd, 11.6, 6.6)	
9		162.9	1'''		127.0
10		105.3	2'''	6.78 (2H, d, 8.3)	116.8
1'		122.7	3'''	7.30 (2H, d, 8.3)	131.2
2'	6.80 (1H, d, 8.3)	116.0	4'''		161.2
3'	7.97 (1H, d, 9.0)	132.2	5'''		131.2
4'		161.5	6'''		116.8
5'	7.97 (1H, d, 9.0)	132.2	7'''	7.40 (1H, d, 16.1)	146.6
6'	6.80 (1H, d, 8.3)	116.0	8'''	6.07 (1H, d, 16.1)	114.7
			9'''		168.8

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD solution at 400 and 100MHz, respectively. Assignments were based upon HMQC, HMBC experiments.

3-2. 산딸나무 잎의 추출 및 분획

산딸나무 잎의 성분 분리를 위하여 실온에서 완전히 건조한 후, 분쇄한 산딸나무 잎 910 g을 70% ethanol 18.2 L의 용매를 이용하여 7일 동안 stirrer를 이용하여 침출하여, 여과하였다. 여과액은 rotary evaporator를 이용하여 감압 농축하여, 70% 추출물을 105 g 얻었다. 이 추출물은 20 g씩 나누어 H₂O 1 L에 현탁을 시켜, 용매의 극성을 증가시키는 계통 분획법을 이용하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 각각 5.95 g, 6.78 g, 14.13 g, 49.45 g을 얻었다(Scheme 3).

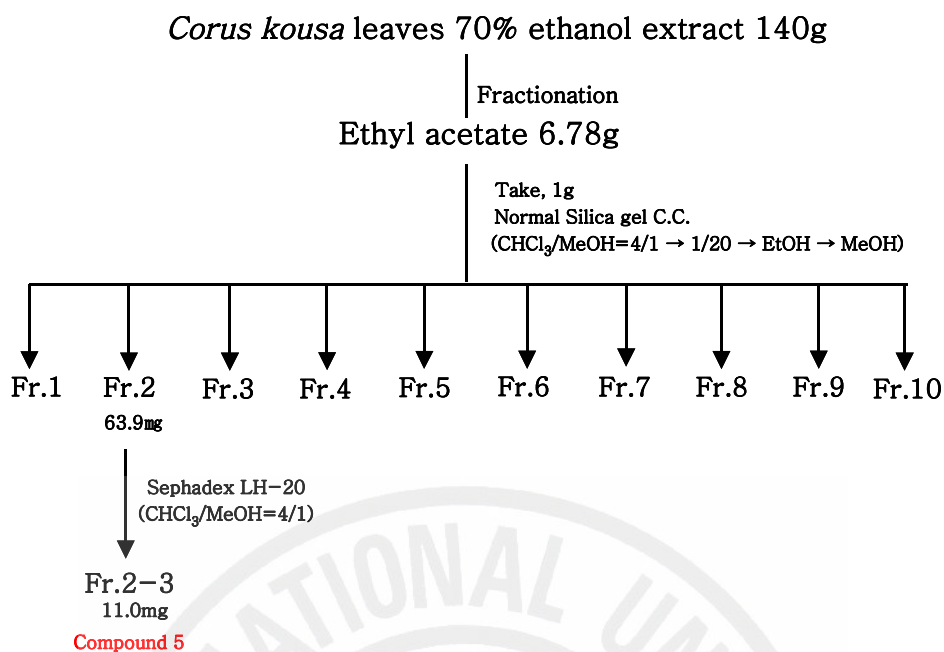


Scheme 3. Procedure of extraction and various fraction from *Cornus kousa* leaves

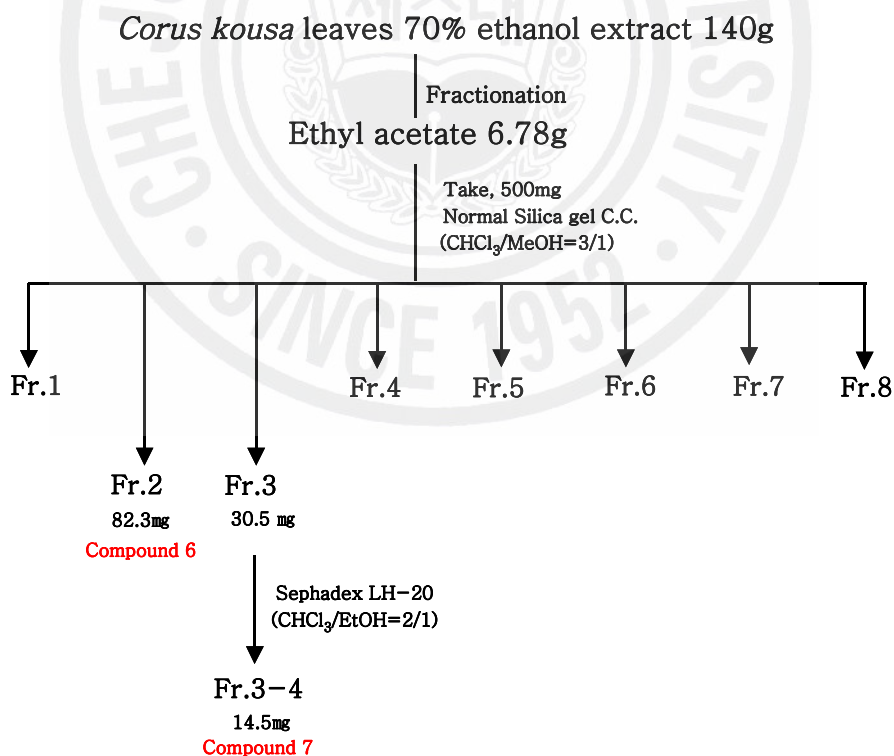
3-2-1. 산딸나무 잎의 활성 성분 분리

산딸나무 잎의 4개의 분획물 중 ethyl acetate 6.78 g 중 1 g을 취하여 normal silica gel column chromatography를 *n*-hexane/EtOAc(1/4 → 1/20)의 전개용매 조건을 가지고 실험을 수행하였다. 용출되어 나온 용출액은 TLC pattern에 따라 총 10개의 fraction을 얻었고, 그 중 TLC 상에서 비교적 깨끗하게 보였던 fr. 2 (63.9 mg)를 CHCl₃/MeOH(4/1)의 전개용매 조건으로 sephadex LH-20으로 column chromatography를 실행하였다. 마찬가지로 TLC pattern으로 7개의 fraction과 단일물질로 보여 지는 fr. 2-3 (11 mg)인 compound 5을 얻을 수 있었다(scheme 3).

분획 층 중 ethyl acetate층 500 mg를 취하여 CHCl₃/MeOH(3/1)의 전개용매로 normal silica gel column chromatography를 실행하여 용출액은 TLC pattern에 따라 총 7개의 fraction과 단일물질로 보여 지는 fraction 2인 compound 6 (82.3 mg)을 얻었다. 7개의 fraction 중 fraction 3 (30.5 mg)은 다시 sephadex LH-20으로 충전된 column에 loading 하여 CHCl₃/EtOH(2/1)의 전개용매 조건으로 chromatography를 실시하여 총 3개의 fraction과 단일물질로 보여 지는 fr. 3-4 (14.5 mg)인 compound 7을 얻었다(scheme 4).



Scheme 4. Isolation of the compounds 5 from *Cornus kousa* leaves



Scheme 5. Isolation of the compounds 6, 7 from *Cornus kousa* leaves

Table 3. NMR spectroscopic data^a for compounds **5** and **6** (400MHz CD₃OD)

Compound 5			Compound 6		
No.	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)	No.	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)
2		148.0	2		159.1
3		137.1	3		135.4
4		177.3	4		179.3
5		162.5	5		162.7
6	6.18 (1H, d, 2.2)	99.4	6	6.38 (1H, d, 2.0)	99.9
7		165.9	7		165.8
8	6.39 (1H, d, 2.3)	94.5	8	6.17 (1H, d, 2.0)	94.8
9		158.3	9		158.3
10		105.8	10		105.6
1'		123.8	1'		122.5
2'	6.09 (1H, d, 8.8)	130.7	2'	8.02 (1H, d, 8.8)	132.2
3'	6.90 (1H, d, 8.8)	116.3	3'	6.86 (1H, d, 8.8)	116.0
4'		160.1	4'		161.4
5'	6.90 (1H, d, 8.8)	116.3	5'	8.02 (1H, d, 8.8)	116.0
6'	6.09 (1H, d, 8.8)	130.7	6'	6.86 (1H, d, 8.8)	132.2
			1''	5.21 (1H, d, 7.3)	104.4
			2''		75.5
			3''		77.8
			4''		71.1
			5''		78.1
			6''		62.5

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD solution at 400 and 100MHz, respectively. Assignments were based upon HMQC, HMBC experiments.

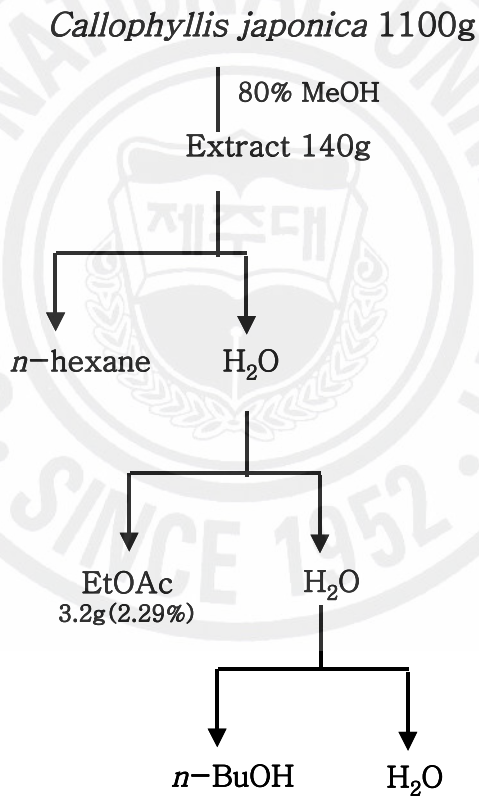
Table 4. NMR spectroscopic data^a for compound **7** (400MHz CD₃OD)

Compound 7		
No.	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)
2		159.0
3		135.6
4		179.4
5		163.0
6	6.37 (1H, d, 2.2)	99.9
7		162.2
8	6.18 (1H, d, 2.3)	94.8
9		158.5
10		105.6
1'		123.1
2'	7.70 (1H, d, 2.2)	117.6
3'		146.0
4'		149.9
5'	6.85 (1H, d, 8.3)	116.0
6'	7.57 (1H, dd, 8.3, 2.2)	123.2
1''	5.23 (1H, d, 7.3)	104.3
2''		75.7
3''		78.1
4''		71.2
5''		78.4
6''		62.5

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD solution at 400 and 100MHz, respectively. Assignments were based upon HMQC, HMBC experiments.

3-3. 벚붉은잎의 추출 및 분획

벚붉은잎 건조 분말 1100 g을 80% MeOH 22 L에 침적하고 실온에서 24시간 동안 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 하여 여액을 취하였고 그 여액을 감압농축 하였으며 분리된 잔사는 추출과정을 동일한 조건에서 2회 반복 실시하였다. 이 과정을 통하여 80% MeOH 추출물 140 g을 얻었다. 80% MeOH 추출물을 20 g씩 나누어 증류수 1 L에 현탁 시키고 용매의 극성을 증가시키는 계통 분획법을 이용하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 각각 3.46 g, 3.2 g, 4.64 g, 78.32 g을 얻었다(scheme 6).



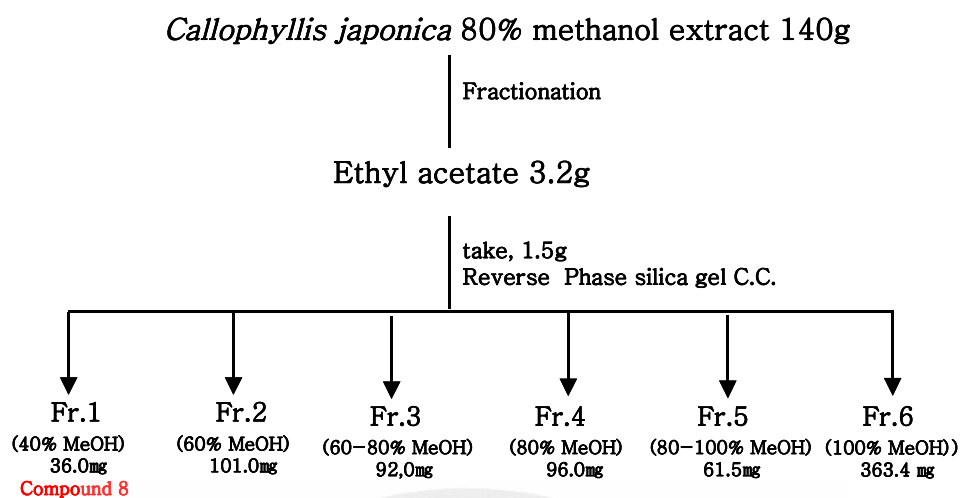
scheme 6. Procedure of extraction and various fraction from *Callophyllis japonica*

3-3-1. 벚꽃은잎의 활성 성분 분리

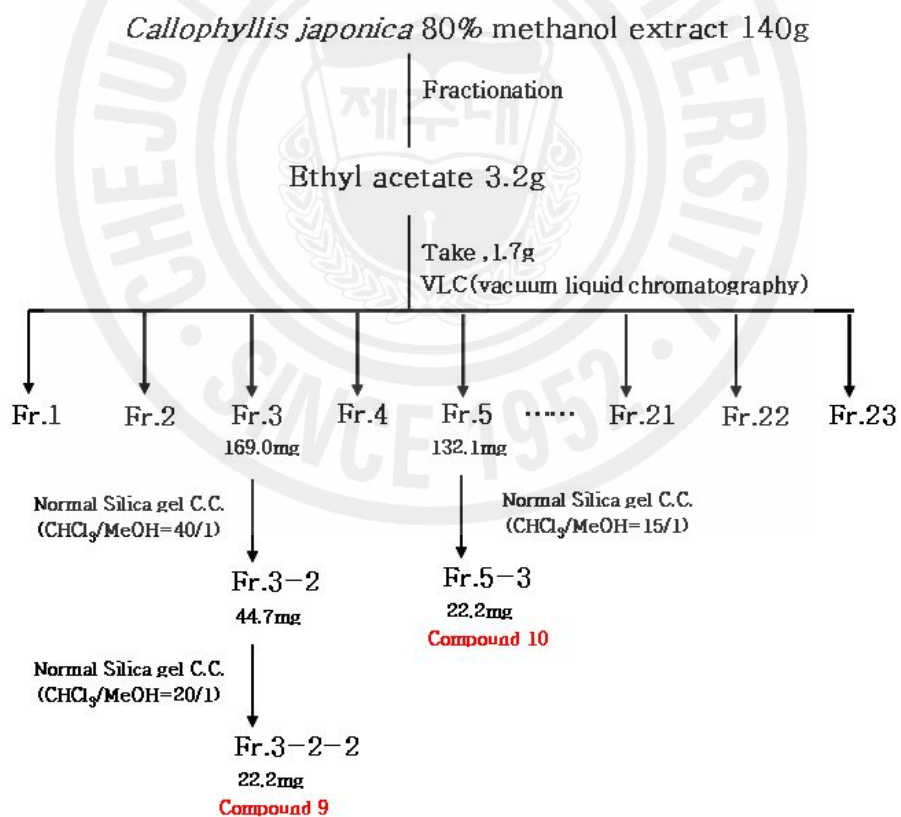
벚꽃은잎 ethyl acetate 3.2 g 중에서 1.5 g을 취하여 RP column chromatography를 실행하여 각각 40% (fr. 1, 36 mg), 60% (fr. 2, 101 mg), 60~80% (fr. 3, 92 mg), 80% (fr. 4, 96 mg), 80~100% (fr. 5, 61.5 mg), 100% MeOH (fr. 6, 363.4 mg) fraction을 얻었으며, 40% (fr. 1, 36 mg) 분획물에서 compound **8**을 얻었다(scheme 7).

벚꽃은잎 ethyl acetate 3.2 g 중에서 1.7 g을 취하여 n-hexane, ethyl acetate, methanol를 가지고 vacuum liquid chromatography를 실시하여 총 23개의 fraction을 얻었으며, 그 중 fraction 3 (85% hexane in ethyl acetate, 169mg)을 normal silica gel chromatography를 실시하여 얻은 4개의 fraction 중 fraction 3-2 (44.7 mg)을 다시 normal silica gel chromatography를 실시하여 1개의 fraction과, 3-2-2 (22.2 mg)인 compound **9**를 얻었다(scheme 8).

Vacuum liquid chromatography를 실시하여 총 23개의 fraction 중에서 fraction 5 (75% hexane in ethyl acetate, 132.1 mg)을 normal silica gel chromatography를 실시하여 총 4개의 fraction과, fraction 5-3 (11.4 mg)인 compound **10**를 얻었다(scheme 8).



Scheme 7. Isolation of the compounds 8 from *Callophyllis japonica*



Scheme 8. Isolation of the compounds 9, 10 from *Callophyllis japonica*

Table 5. NMR spectroscopic data^a for compound **8** (400MHz CD₃OD)

No.	Compound 8	
	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)
1		140.4
2		134.9
3	7.39 (1H, d, 8.3)	130.7
4	7.31 (1H, dd, 8.3, 2.0)	127.8
5		132.3
6	7.45 (1H, d, 2.0)	130.2
7	2.21 (1H, t, 7.8, 7.6)	36.5
8	1.27 (1H, m)	26.6
9	1.28 (1H, m)	30.2
10	1.55 (1H, t, 7.1, 6.8)	30.3
11		179.9
12		170.4

^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD solution at 400 and 100MHz, respectively. Assignments were based upon HMQC, HMBC experiments.

Table 6. NMR spectroscopic data^a for compounds **9** and **10** (400MHz CD₃OD)

No.	Compound 9		Compound 10	
	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (multi, <i>J</i> Hz)	δ_{C} (ppm)
1		157.9		157.4
2	6.83 (1H, d, 8.8)	115.0	6.81 (1H, d, 9.0)	114.8
3	7.12 (1H, d, 8.8)	128.8	7.10 (1H, d, 9.0)	128.5
4		144.8		144.6
5	7.12 (1H, d, 8.8)	128.8	7.12 (1H, d, 8.8)	128.5
6	6.83 (1H, d, 8.8)	115.0	6.81 (1H, d, 9.0)	114.8
7		42.6		41.8
8		31.5		31.4
1'-a	3.33 (1H, m)	71.0	4.24 (1H, dd, 11.4, 2.4)	69.6
1'-b	3.50 (1H, m)		3.81 (1H, dd, 11.4, 6.1)	
2'	3.75 (1H, dd, 11.5, 4.8)	70.1	3.28 (1H, m)	51.1
3'-a	3.66 (1H, dd, 11.5, 5.4)	46.8	2.84 (1H, dd, 4.9, 4.3)	45.0
3'-b	3.75 (1H, m)		2.71 (1H, dd, 4.9, 2.7)	

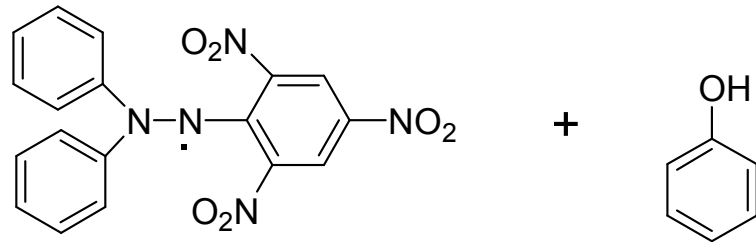
^a ¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD solution at 400 and 100MHz, respectively.

4. 항산화 활성 실험; DPPH radical 소거 활성

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거작용은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색방법으로 특히 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성의 측정에 많이 사용하는 방법이다. 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 525 nm에서 강한 흡수 띠를 보인다. 그러나 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 된다. 이때 흡수 띠도 사라지고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색은 점점 옅어지게 되고, 흡광도도 감소하게 되므로 반응액의 색이 노란색으로 변하는 것을 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다.

실험 방법은 다음과 같이 실행하였다.

먼저 시료를 1 mg/mL의 농도가 70% ethanol을 용매로 하여 녹인다. DPPH 시약은 4 mM농도가 되도록 100% Ethanol을 용매로 하여 녹여, UV spectrometer를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 0.97~0.98이 되도록 맞춘다. 맞춰진 DPPH 용액과 시료는 각각 200 μ g/m, 100 μ g/m, 50 μ g/m, 10 μ g/m의 농도별로 섞은 후, 실온에서 10분 반응을 한 후, UV spectrometer를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하게 된다. 또한, DPPH를 첨가하지 않고 대신에 100% ethanol을 시료와 섞은 후 시료자체흡광도를 측정한다. 이 두 흡광도를 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료의 농도(RC₅₀)를 계산하였다.



DPPH • (violet, 525nm)

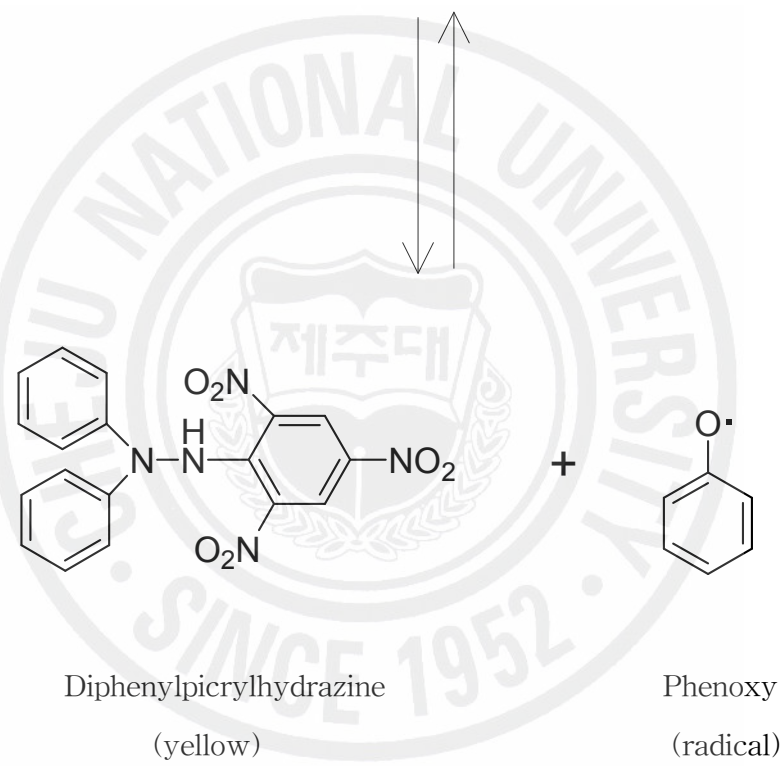


Figure 4. Scavenging of the DPPH radical by phenol

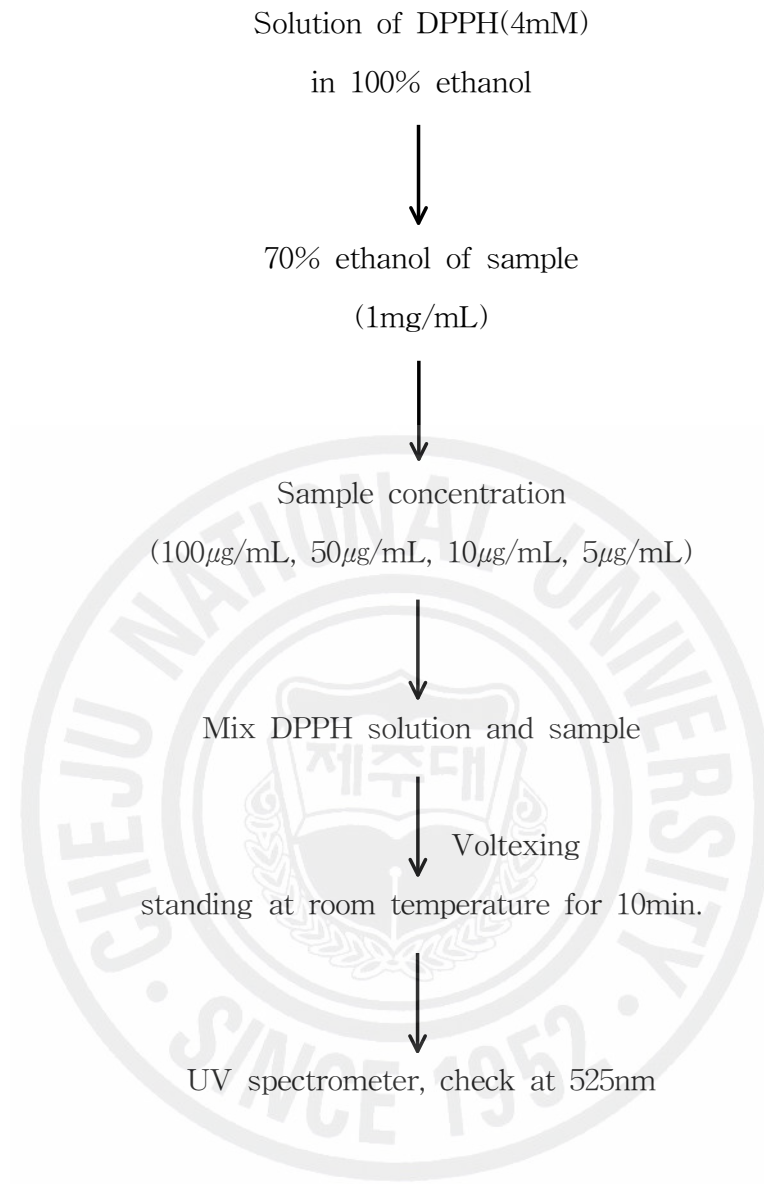


Figure 5. Measurement of DPPH radical scavenging effect

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

1-1. 개가시나무 가지에서 분리된 화합물 구조 결정

1-1-1. Compound 1 과 compound 2의 구조해석

Compound 1, 2의 구조를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C NMR, DEPT, HMQC, HMBC를 측정하였다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 100~160 영역의 carbon signal과 ^1H -NMR spectrum에서 δ 5.92~6.83에서의 signal에 의해 aromatic ring이 있음을 알 수 있었으며(Figure 6, 7, 10, 11), 전형적인 flavonoide 패턴을 보임을 알 수 있었다. 또한, 두 화합물 모두 1개의 methylene 수소(H-4)가 관측되었고, 5개의 olefin 수소가 관측되었는데 커플링 상수 값으로 보아 olefin 수소 5개 중 2개는 ortho 커플링을 하고 있으며, 나머지 3개의 수소는 meta 커플링을 하는 것으로 판단된다. 또한 ^{13}C spectrum으로부터 15개의 탄소를 가지고 있는 것을 알 수 있었다. DEPT의 자료로부터 4차 탄소가 7개, CH가 7개, CH_2 가 1개라는 것을 알 수 있었다. 두 화합물의 가장 큰 차이는 compound 1인 경우 2번 탄소에 붙어있는 수소 피크가 doublet으로 쪼개진 반면에 compound 2인 경우 singlet으로 나타났다. 이러한 현상은 2번과 3번 탄소에 붙어 있는 수소들의 각도에 의한 결과로 보여 진다. Compound 1인 경우 2번 탄소와 3번 탄소에 붙어 있는 수소가 *trans* 형태로 존재하며, compound 2인 경우 *cis* 형태로 존재하는 것으로 판단된다. HMBC의 결과로부터 compound 1과 2의 구조를 예상할 수 있다(Figure 9). Compound 1인 경우 δ 4.56 ppm의 수소(H-2)로부터 δ 156.9인 4차탄소(C-9)와 δ 120.0(C-2')와 상관관계를 나타내는 것으로 보아 두 골격이 C-2 와 C-1'이 연결되어 있음을 알 수 있었고, 2.84 ppm의 수소(H-4)로부터 δ 100.8(C-10)과 상관관계를 나타내는 것으로 보아 C-4, C-10이 서로 연결되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 사실로부터 compound 1은 catechin으로 확인되었다. compound 2인 경우 또한 HMBC로부터 epi-catechin으로 확인되었다.

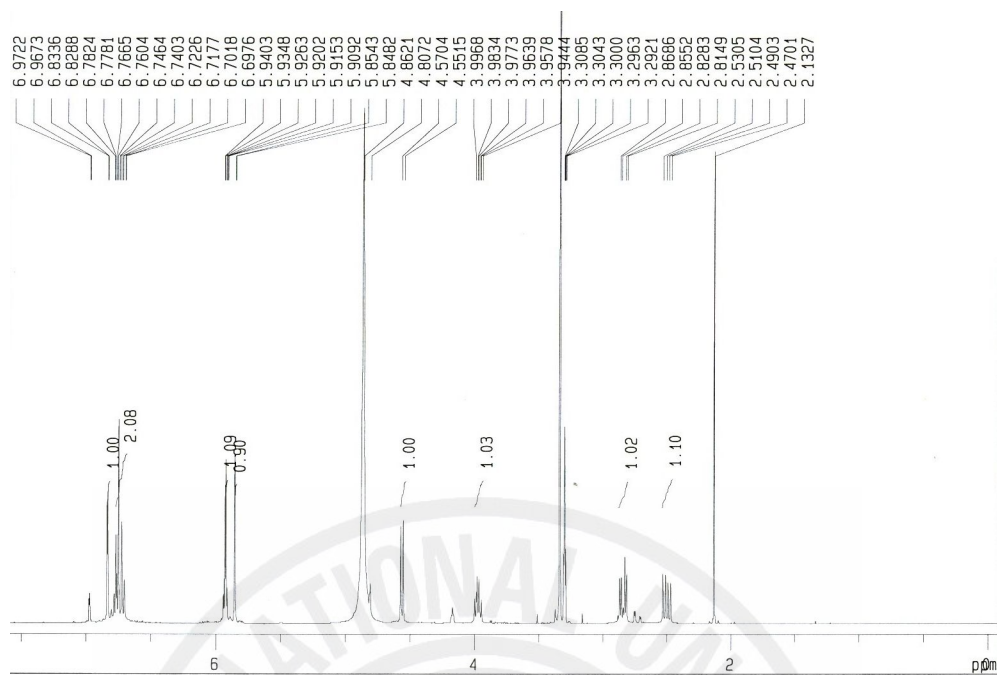


Figure 6. ^1H -NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD

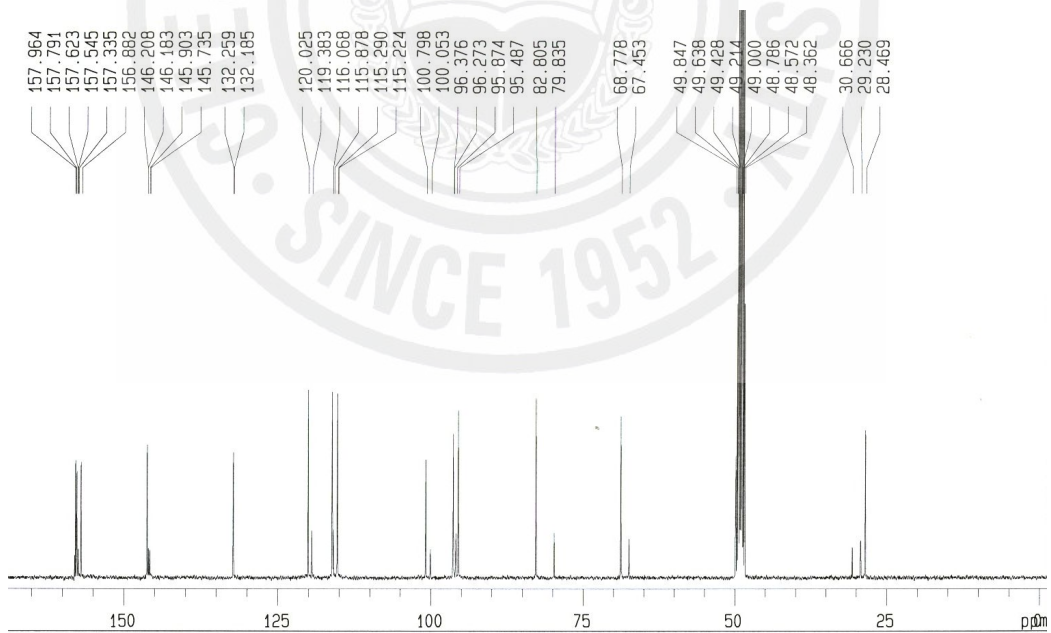


Figure 7. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD

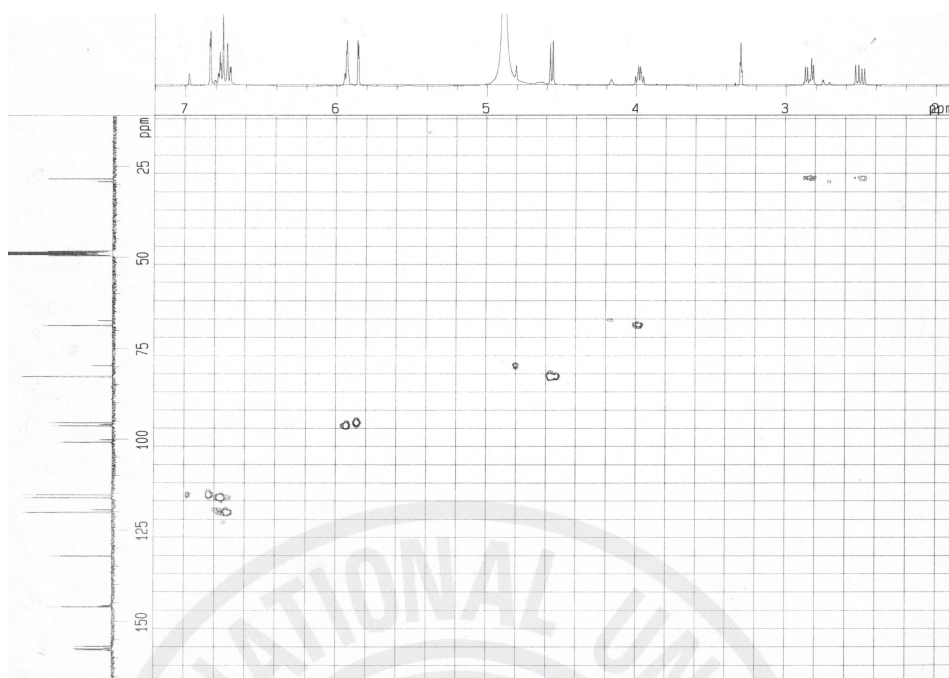


Figure 8. HMBC spectrum of compound **1** in CD₃OD

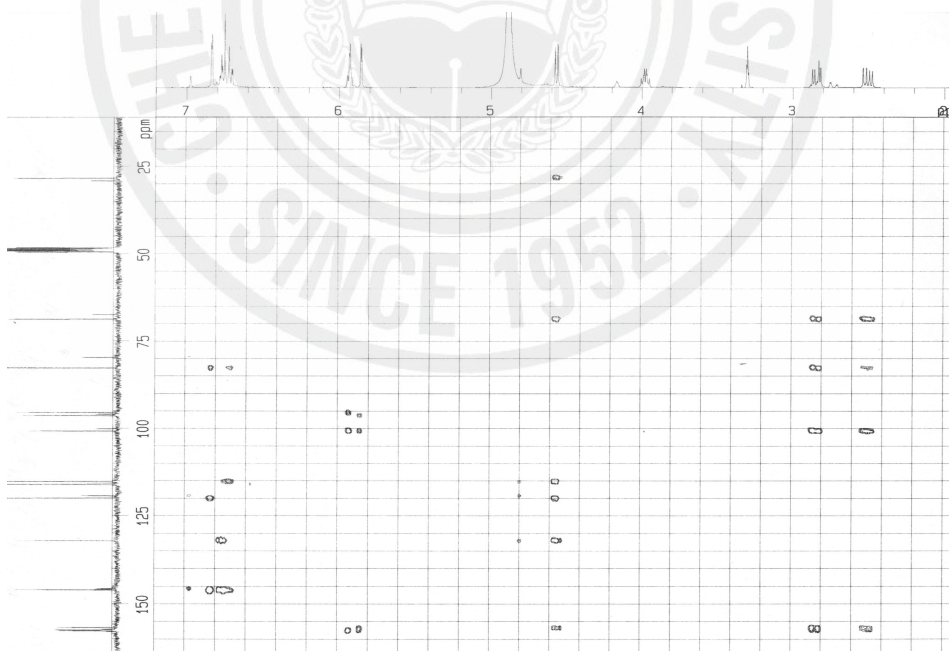


Figure 9. HMBC spectrum of compound **1** in CD₃OD

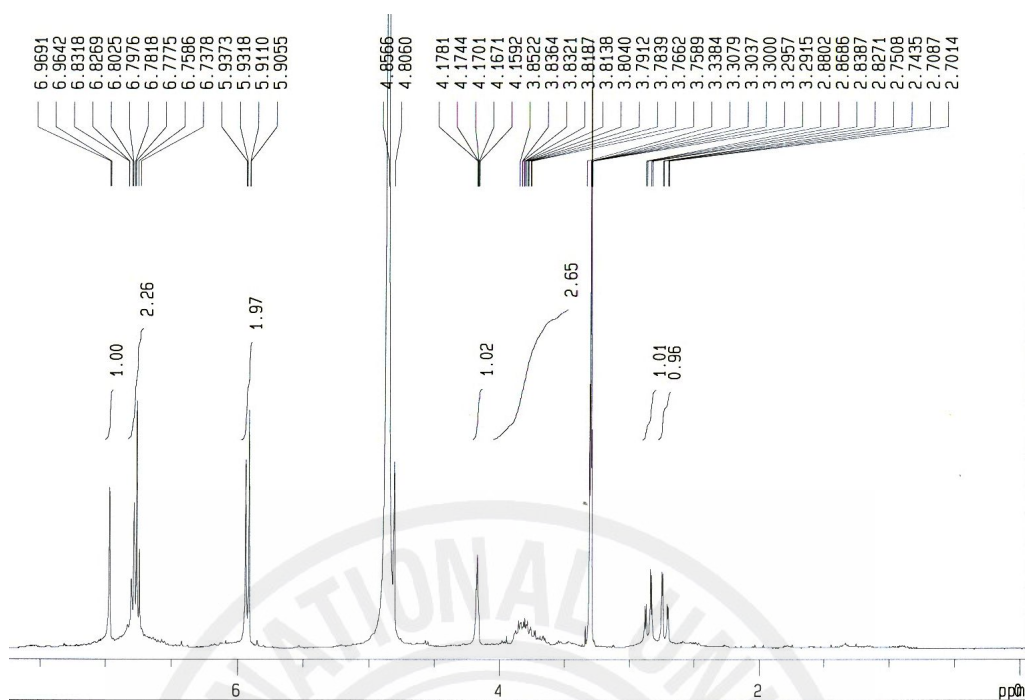


Figure 10. ^1H -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD

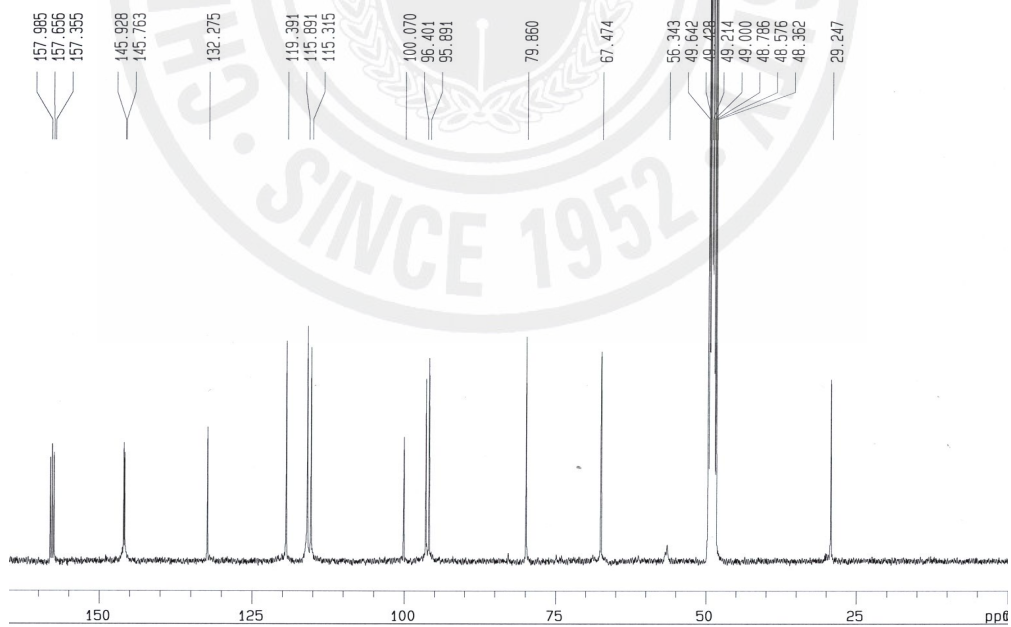
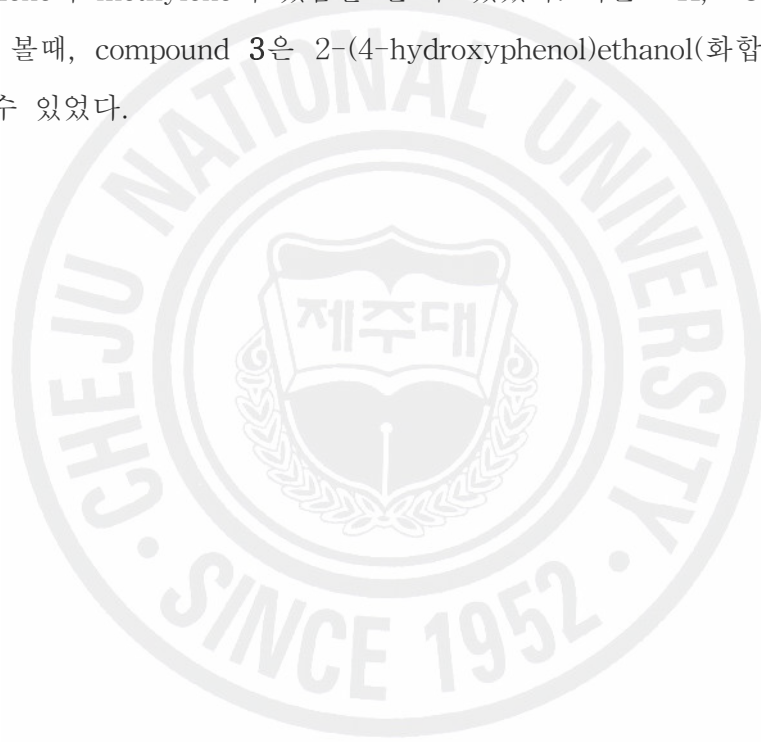


Figure 11. ^{13}C -NMR spectrum of compound **2** in CD_3OD

1-1-2. Compound 3의 구조해석

Compound 3의 구조를 측정하기 위해 ^1H , ^{13}C -NMR를 측정하였다. ^{13}C -NMR spectrum 결과 탄소가 8개가 있음을 확인할 수 있었고, δ 116.4~157.6에서의 signal 값과, ^1H -NMR spectrum에서 δ 6.68, 7.00의 signal 값들로부터 aromatic ring이 있음을 알 수 있었다(Figure 12, 13). 또한 δ 6.68 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.00 (2H, d, $J = 8.0$ Hz)에서, 커플링 상수 값으로 보아 서로 ortho 커플링 하고 있음을 알 수 있었으며, δ 3.67, 2.70에서는 각각 산소가 인접한 methylene와 methylene이 있음을 알 수 있었다. 이들 ^1H , ^{13}C -NMR 결과를 종합하여 볼때, compound 3은 2-(4-hydroxyphenol)ethanol(화합물명: tyrosol)임을 알 수 있었다.



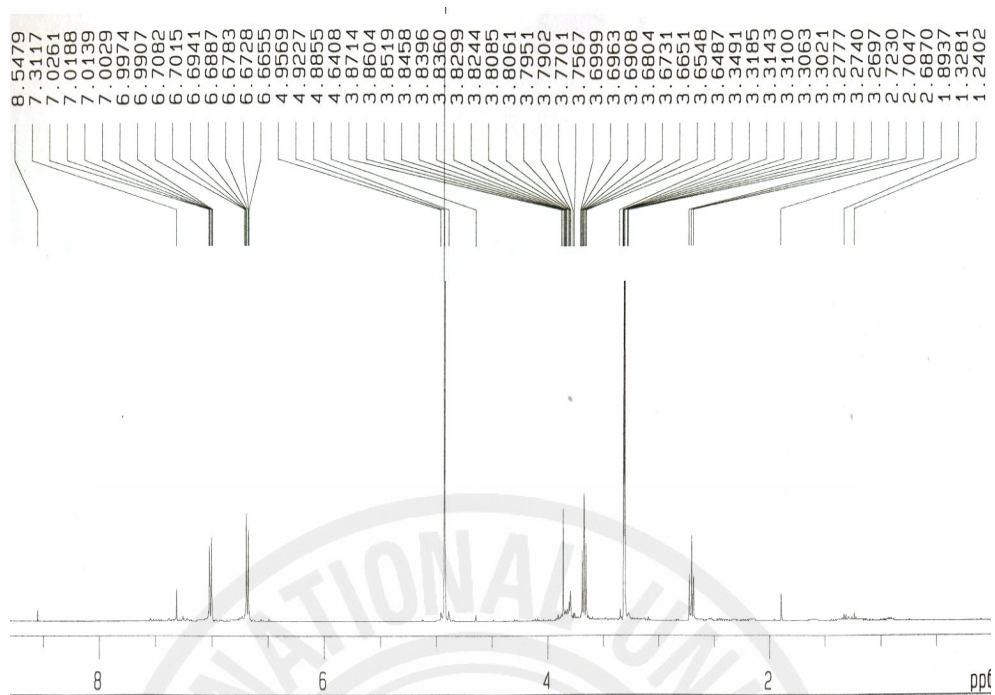


Figure 12. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

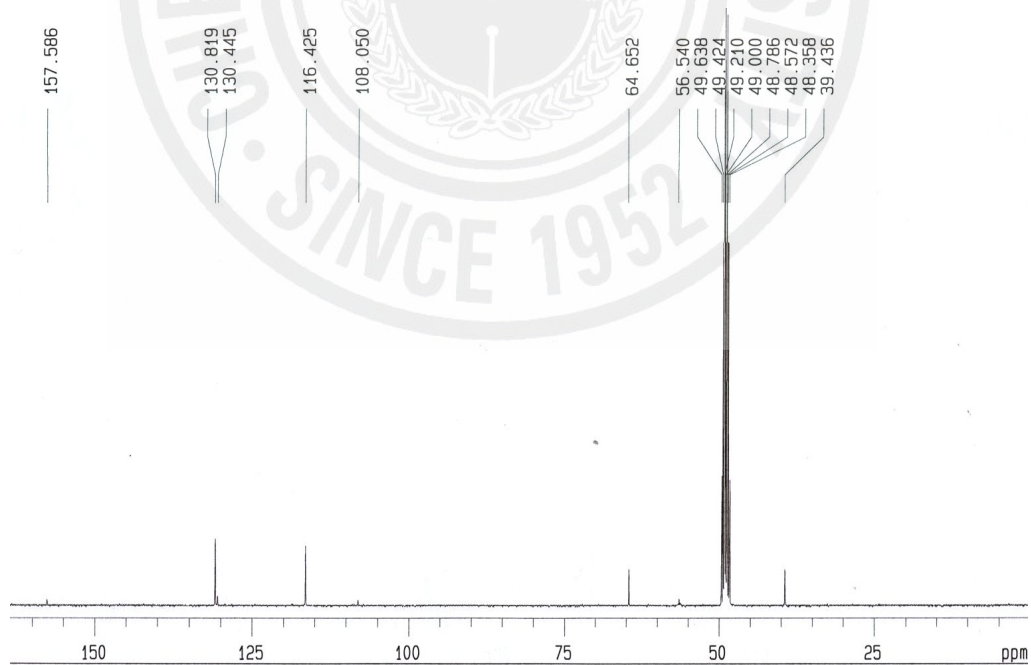


Figure 13. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

1-1-3. Compound 4의 구조해석

Compound 4의 구조를 측정하기 위해 ^1H , ^{13}C -NMR, HMQC, HMBC를 측정하였다. ^{13}C -NMR을 통하여 δ 100-160의 signal에서 aromatic ring이 있음을 알 수 있었고 δ 179.3, 168.8의 signal에서 carbonyl기와 ester기가 있음을 예상할 수 있었다. 또한 ^{13}C -NMR을 통하여 대칭되는 carbon이 있음을 예상할 수 있었으며, 104.1(C-1''), 75.7(C-2''), 78.0(C-3''), 71.7(C-4''), 75.8(C-5''), 64.3(C-6'') signal과 ^1H -NMR에서 δ 3.45~3.49에서 multiplet이며, 수소 적분 값을 통하여 sugar가 있음을 예상하였으며, δ 5.21에서 doublet이며, anomeric 수소의 커플링 상수 값이 7.6 Hz인 것으로 보아, β -D-glucose가 결합된 것을 알 수 있었다(Figure 15). 또한, ^1H -NMR의 δ 6.0~8.0의 signal에 의해 마찬가지로 aromatic ring에 결합된 proton signal 들임을 예상할 수 있었고, 커플링 상수 값을 통하여 각각 ortho 커플링과 meta 커플링을 하고 있음을 알 수 있었다. 또한, δ 6.07, 7.40에서 커플링 상수가 16.1 Hz 인 것으로 보아, methylene 수소가 서로 trans 형태로 결합되어 있음을 예상하였다(Figure 14). 이 모든 분광학적 데이터를 통하여 compound 4에 대한 문헌조사 결과 *Ellipeiopsis cherreensis* 에서 보고된 kaempferol-(6-coumaroyl)-glucopyranoside(화합물명: tiliroside)임을 확인되었으며 NMR spectrum 데이터를 비교한 결과 문헌치⁸⁾와 잘 일치하였다.

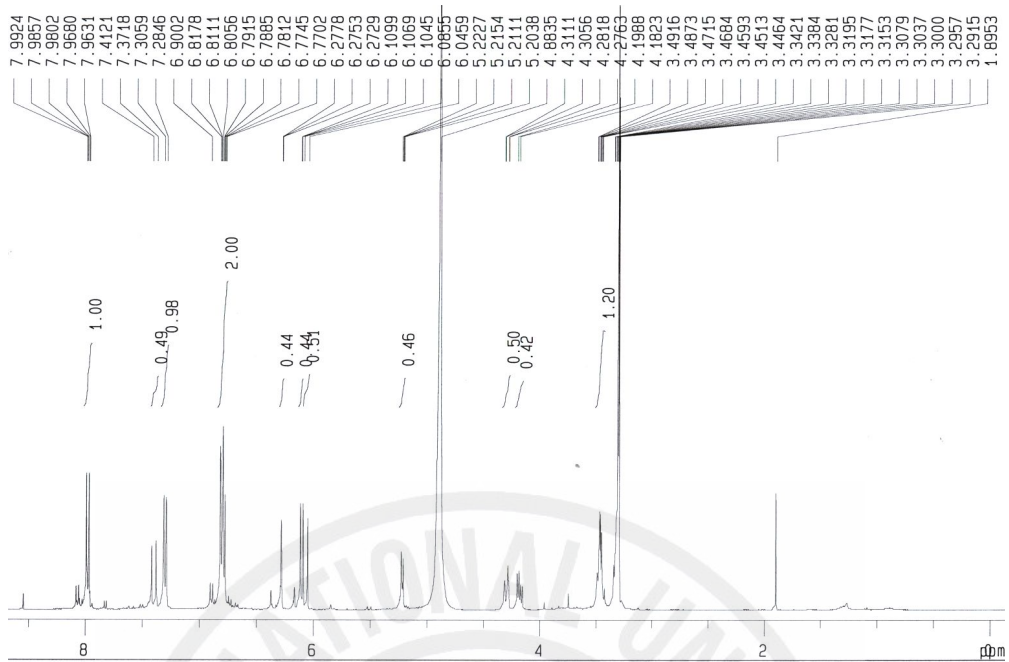


Figure 14. ^1H -NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD

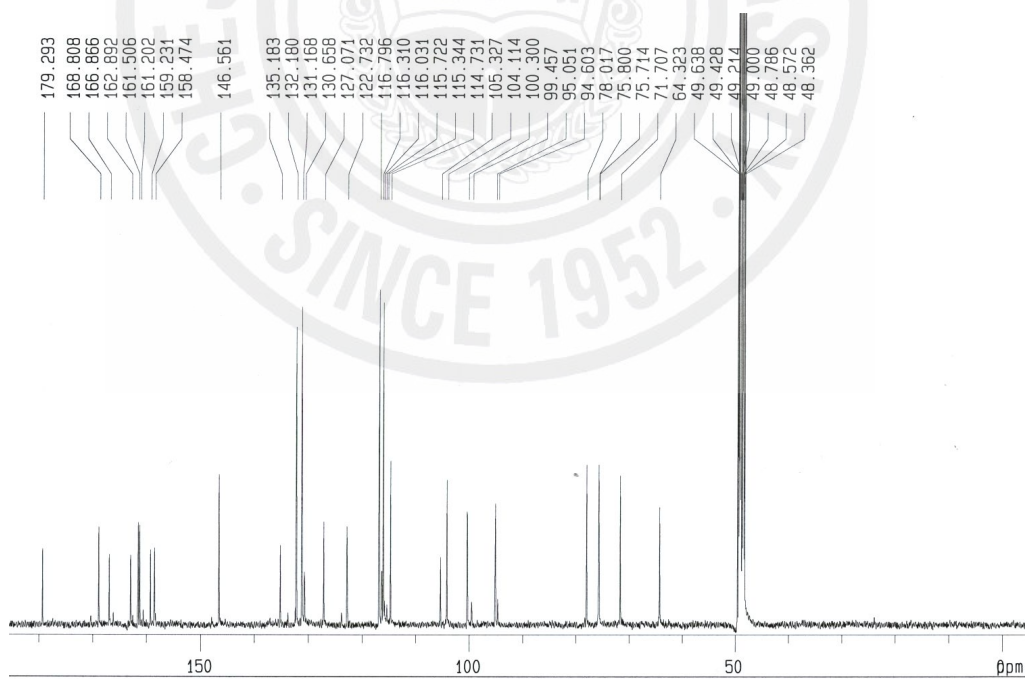


Figure 15. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD

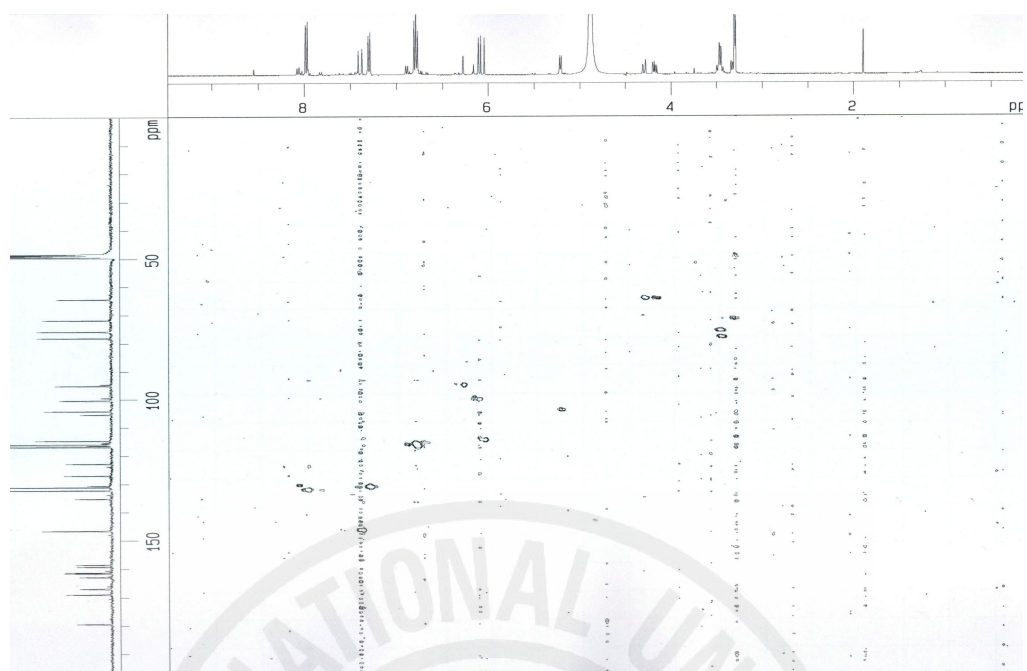


Figure 16. HMQC spectrum of compound 4 in CD₃OD



Figure 17. HMBC spectrum of compound 4 in CD₃OD

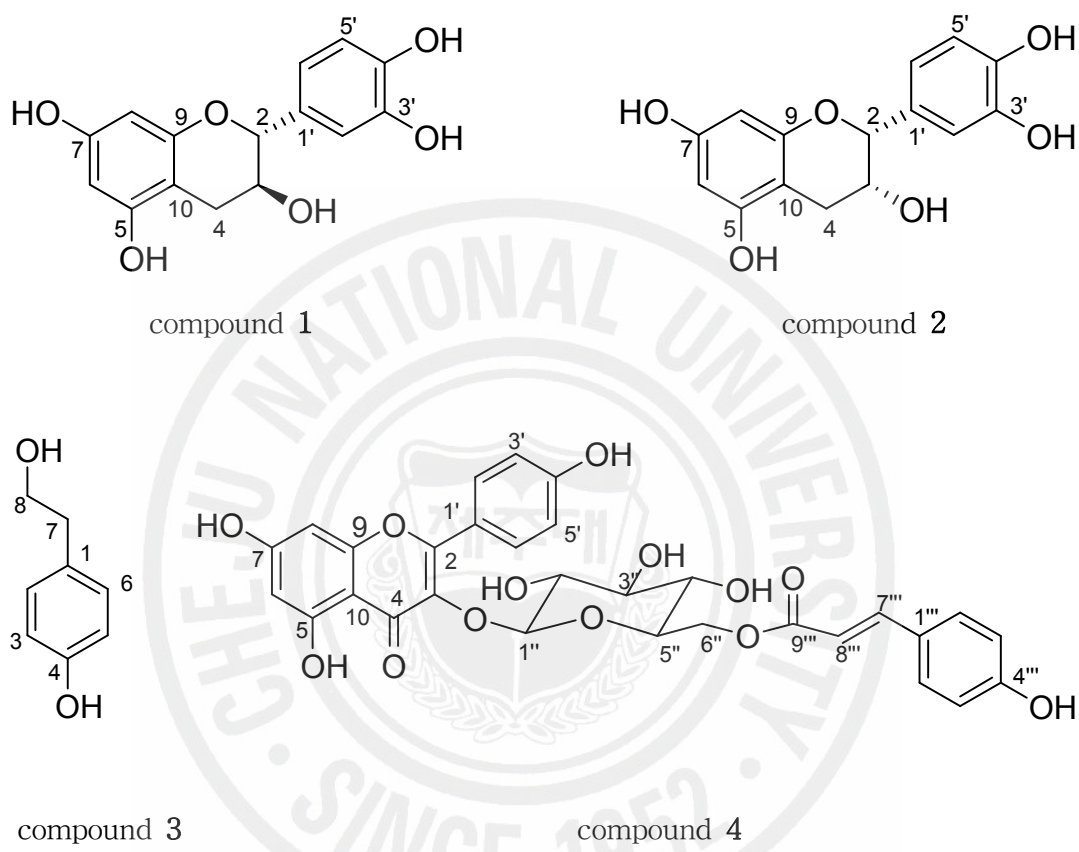


Figure 18. chemical structure of compound 1-4.

1-2. 산딸나무 잎에서 분리된 화합물 구조 결정

1-2-1. Compound 5의 구조해석

Compound 5의 구조를 확인하기 위하여 1D NMR인 ^1H , ^{13}C -NMR를 측정하였다. ^{13}C -NMR spectrum에서 15개의 carbon signal이 관찰되었고, $\delta 177.3$ 에서 1개의 carbonyl기에 기인하는 signal이 관찰되었다. 또한 carbon peak의 적분 값으로 보아 $\delta 116.3$, 130.7 에서 대칭되는 carbon이 있음을 알 수 있었으며, chemical shift 값이 $\delta 100\sim 160$ 영역인 것으로 보아 aromatic ring이 있음을 알 수 있었다(Figure 20). ^1H -NMR spectrum에서도 마찬가지로 $\delta 6.18\sim 8.09$ 에서 aromatic ring이 있음을 알 수 있었으며, coupling constant 값으로부터 A-ring의 methine기의 meta coupling이 $\delta 6.18$ (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), $\delta 6.39$ (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8)에서 나타나고, B-ring의 H-2', 6' 및 H-3', 5'의 signal이 각각 $\delta 8.09$ (2H, d, $J = 8.8$ Hz), $\delta 6.90$ (2H, d, $J = 8.8$ Hz)에서 ortho coupling이 관찰되었다(Figure 19). 이상의 자료를 종합해 볼 때 compound 5은 flavone 골격의 C-3, C-5, C-7, C-4' 위치에 OH기를 가지는 kaempferol으로 구조 동정하였다.

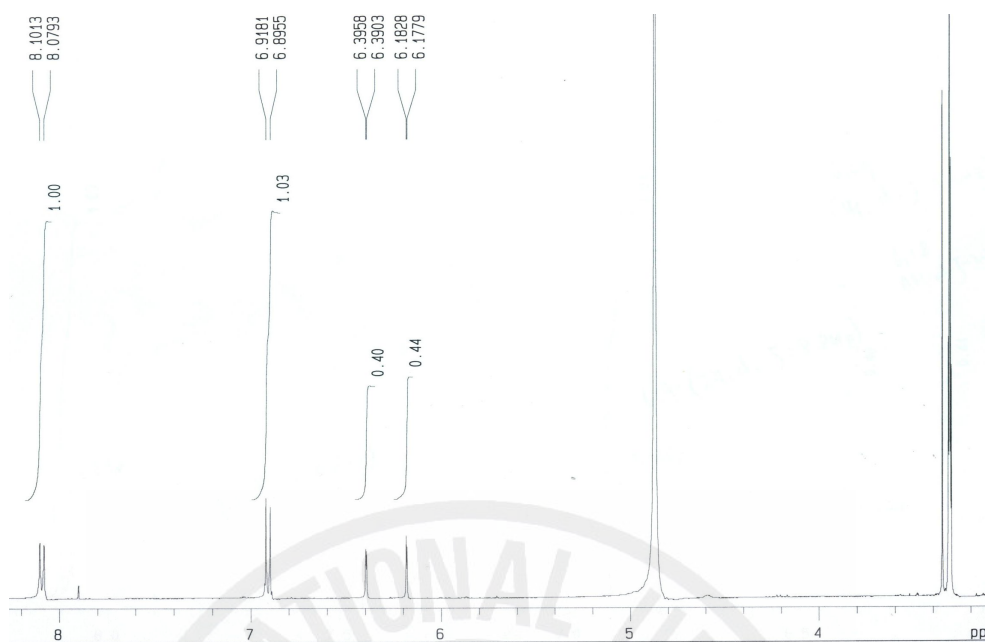


Figure 19. ^1H -NMR spectrum of compound **5** in CD_3OD

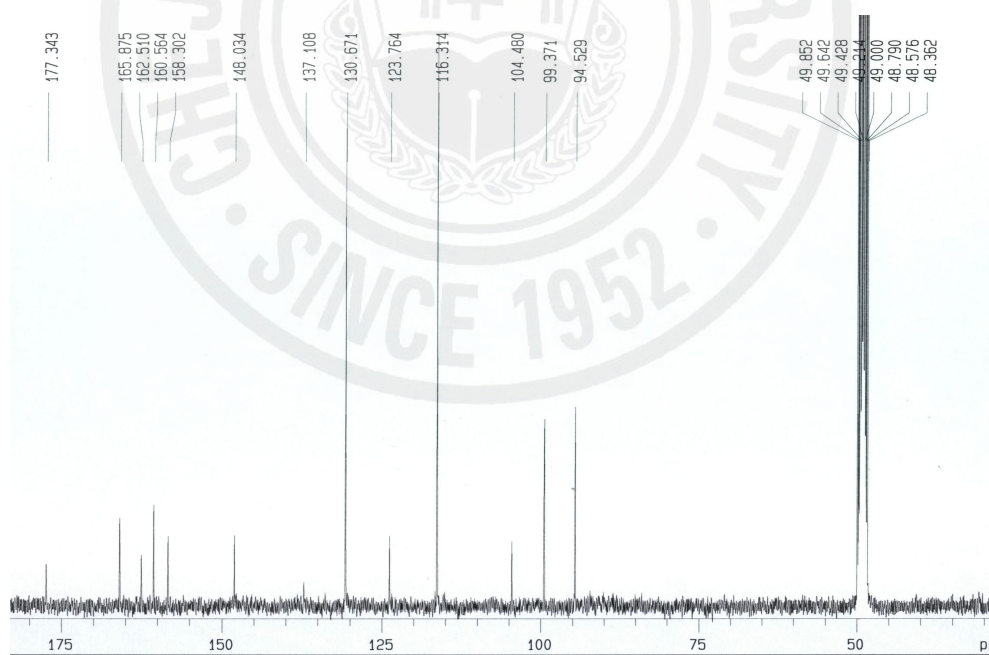


Figure 20. ^{13}C -NMR spectrum of compound **5** in CD_3OD

1-2-2. Compound 6의 구조해석

Compound 6는 Compound 5과 비슷한 양상을 보이는 화합물로서, $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 δ 6.17, 6.38 peak는 A-ring의 proton이 H-8, H-6에서 서로 meta coupling 하고 있으며, δ 8.02 과 6.86 에서는 H-2', 6' 및 H-3', 5'가 ortho coupling 함을 나타낸다. 또한 δ 5.21에서 anomeric proton이 관측된다 (Figure 21). 따라서 이 화합물의 배당체는 compound 5인 kaempferol로 결정하였으며, 당의 구조는 $^{13}\text{C-NMR}$ data (δ 104.4, 78.1, 77.8, 75.5, 71.1, 62.5)에서 D-glycopyranose로(Figure 22)., 결합양식은 coupling constant가 7.3 Hz로써, β 결합함을 알 수 있다 따라서, 참고문헌과 비교하여 볼 때, compound 6의 화학 구조는 kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside(화합물명: astragalín)로 결정하였다.⁹⁾

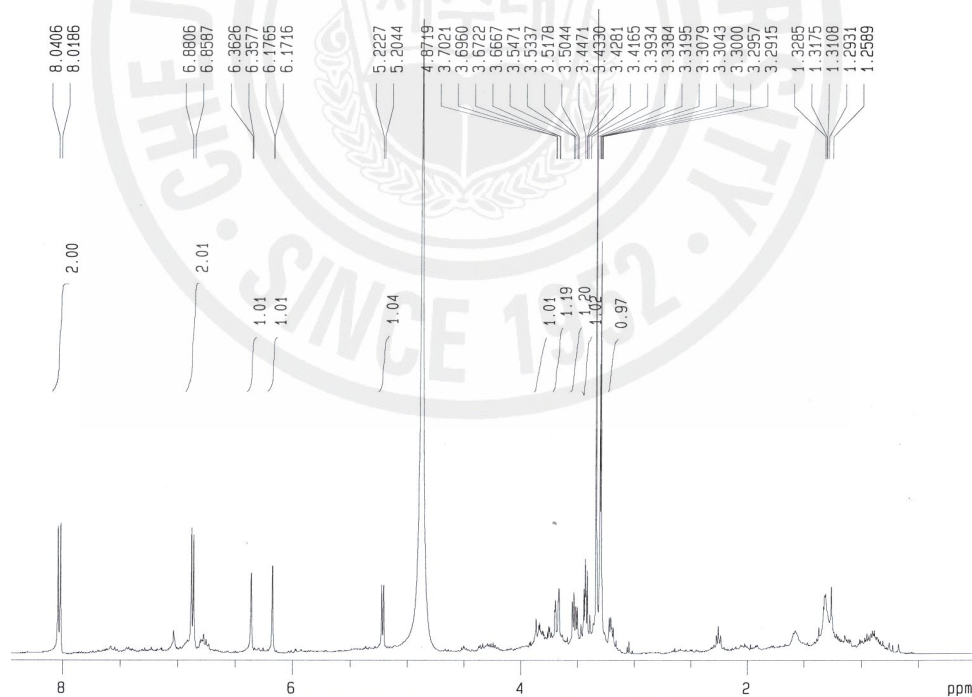


Figure 21. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 6 in CD_3OD

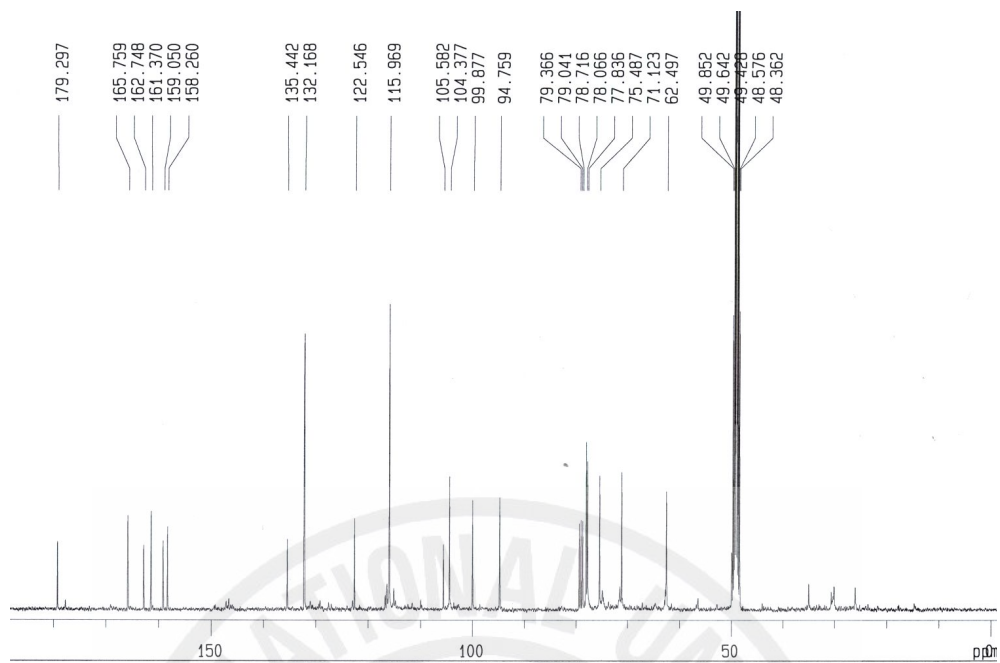


Figure 22. ^{13}C -NMR spectrum of compound **6** in CD_3OD



Figure 23. HMBC spectrum of compound **6** in CD_3OD

1-2-3. Compound 7의 구조해석

Compound 7는 ^{13}C -NMR 분석결과 21개의 carbon으로 구성된 화합물임을 알았다. 이 중 1개의 anomeric carbon (δ 104.3)에 더하여 당으로 생각되는 5개의 carbon signal (δ 78.4, 78.1, 75.7, 71.2, 62.5)이 관찰되어 1개의 6탄당을 함유한 화합물인 D-glucopyranose의 가능성을 시사되었다. 또 1 종의 carbonyl기 유래의 signal (δ 179.4) 및 15개의 sp^2 carbon (δ 99~166.2)이 관찰되어 compound 7은 flavonoide 배당체일 가능성이 대단히 강하게 시사되었다(Figure 25). 또 ^1H -NMR spectrum에서 A-ring의 δ 6.18 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 및 δ 6.37 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6)에서 coupling constant로 두 proton 간에 meta coupling 하고 있음을 알 수 있으며, B-ring에서 δ 6.85 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), δ 7.57 (1H, dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, H-6') 및 δ 7.70 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2')으로 관찰되는 것으로 보아 서로 H-5'와 H-6'이 meta coupling을 하며, H-6'와 H-2'이 ortho coupling 하고 있음을 알 수 있었다. 또한 당의 anomeric proton으로 예상되는 signal (δ 5.23)에서 coupling constant가 7.3 Hz인 것으로 보아 β -D-glucopyranose의 가능성이 강하게 시사되었다(Figure 24). 그래서 보다 정확한 구조해석을 위하여 2D NMR인 HMBC를 분석을 행하였다. Figure 26에 나타낸 바와 같이 각 proton과 탄소 연결이 quercetin 구조를 완벽하게 만족하였으며, 당의 anomeric proton으로부터 quercetin의 C-3 (δ 135.6) 위치의 OH에 결합되어 있음이 관찰되어 aglycone의 C-3 위치에 glucose가 결합됨을 알 수 있었고, 문헌치와 비교하여 볼 때, compound 7은 quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside로 구조해석 되었다(Figure 26).¹⁰⁾

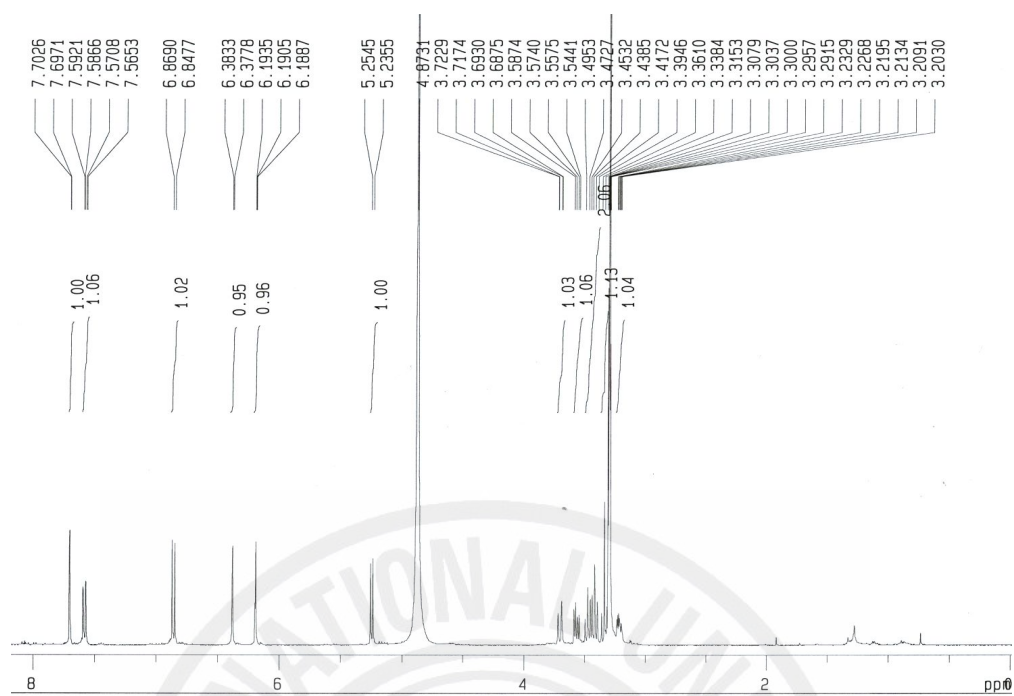


Figure 24. ^1H -NMR spectrum of compound **7** in CD_3OD

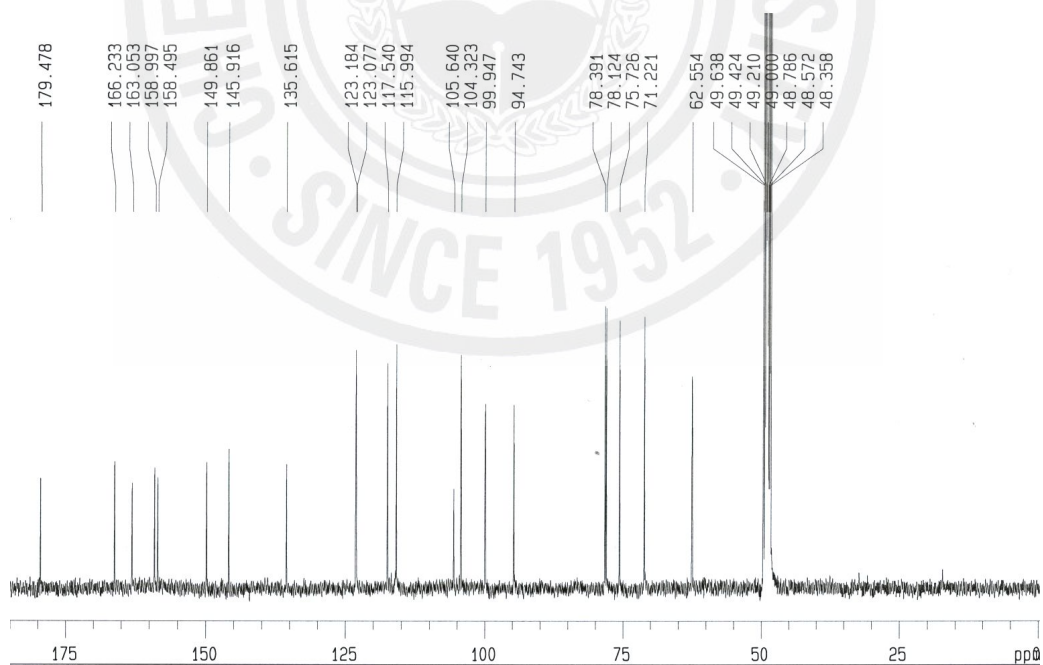


Figure 25. ^{13}C -NMR spectrum of compound **7** in CD_3OD

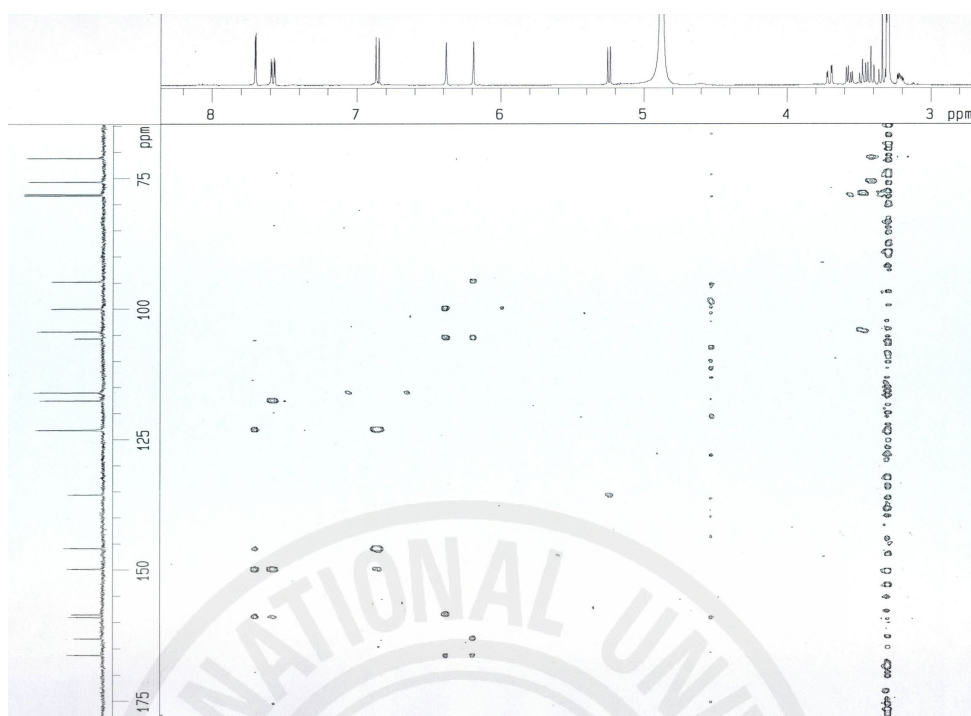
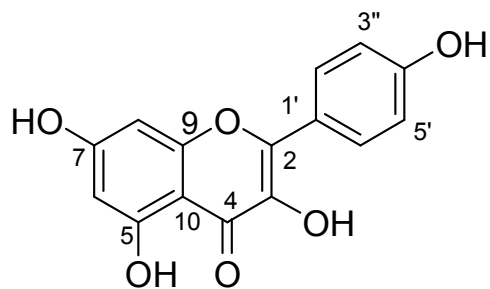


Figure 26. HMBC spectrum of compound 7 in CD₃OD



compound 5



compound 7

Figure 27. chemical structure of compound 5-7.

1-3. 벚붉은잎에서 분리된 화합물의 구조 결정

1-3-1. Compound 8의 구조 해석

Compound 8의 구조를 확인하기 위해 ^1H , ^{13}C -NMR spectrum, DEPT, HMQC, HMBC를 측정하였다. ^{13}C -NMR에서 carbon의 개수가 11임을 알 수 있었고, δ 179.9, 170.4에서 ester가 있음을 알 수 있었다. δ 127.8~140.4 영역의 carbon signal(Figure 29)과 ^1H -NMR에서 δ 7.31~7.45에서의 signal에 의해 aromatic ring이 있음을 알 수 있었다(Figure 28). δ 7.45 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.31 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz), 7.39 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)에서 각 signal들의 커플링 상수 값으로 보아 meta, ortho 커플링 하는 것을 알 수 있었다. DEPT의 자료로부터 11개의 탄소 중에서 4차 탄소가 5개, CH가 3개, CH_2 가 3개라는 것을 알 수 있었다. ^1H , ^{13}C -NMR spectrum, DEPT 데이터를 통하여 예상한 구조를 HMQC와 HMBC로 재차 확인을 하였다. HMBC를 통하여, 두개의 ester기가 각각 H-5와 H-7, 8과 long range correlation하고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 30, 31).

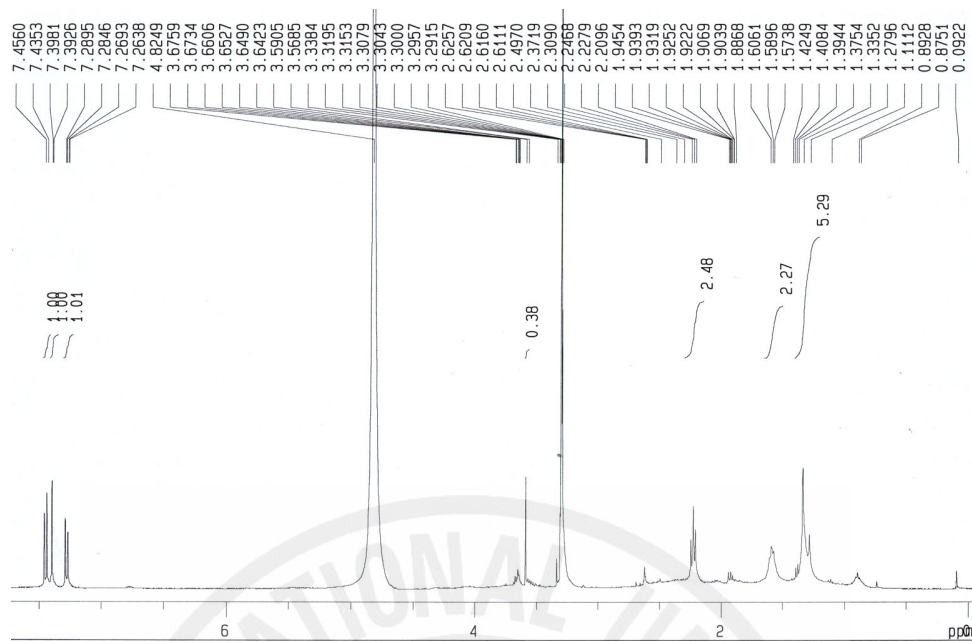


Figure 28. ^1H -NMR spectrum of compound **8** in CD_3OD

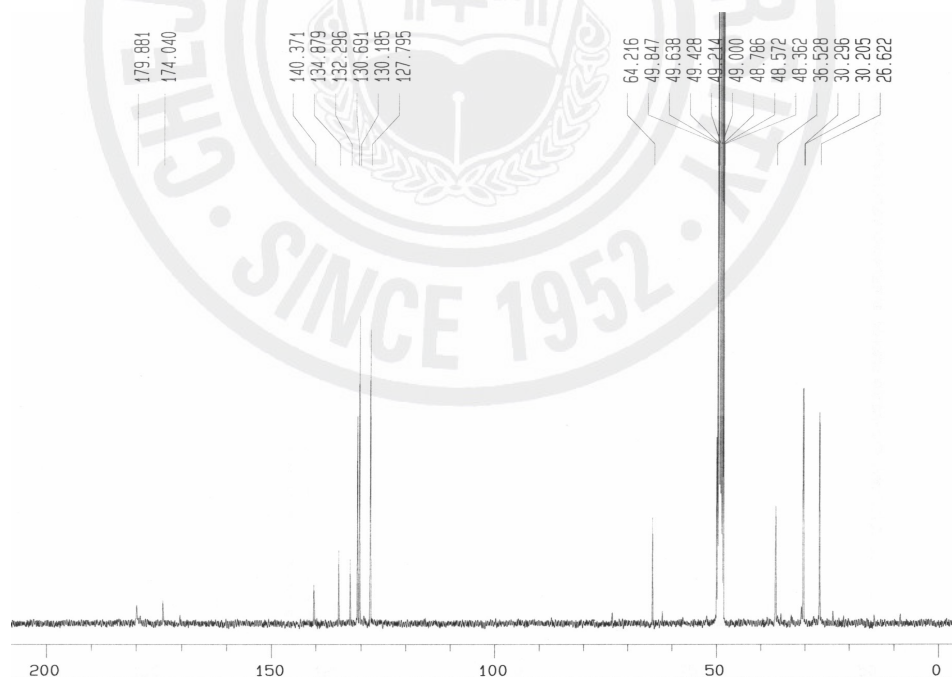


Figure 29. ^{13}C -NMR spectrum of compound **8** in CD_3OD

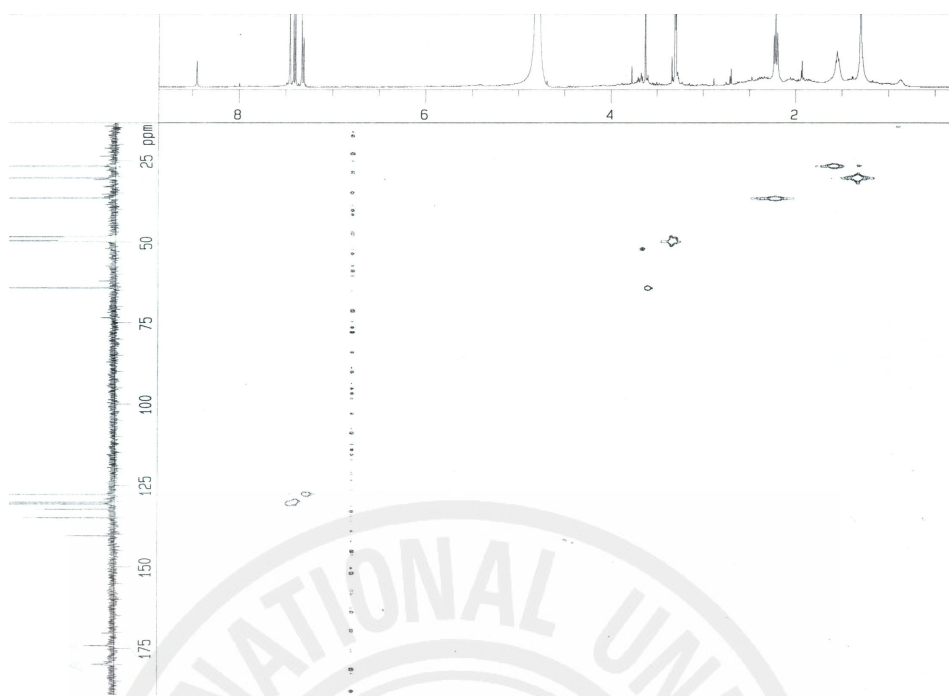


Figure 30. HMBC spectrum of compound **8** in CD₃OD

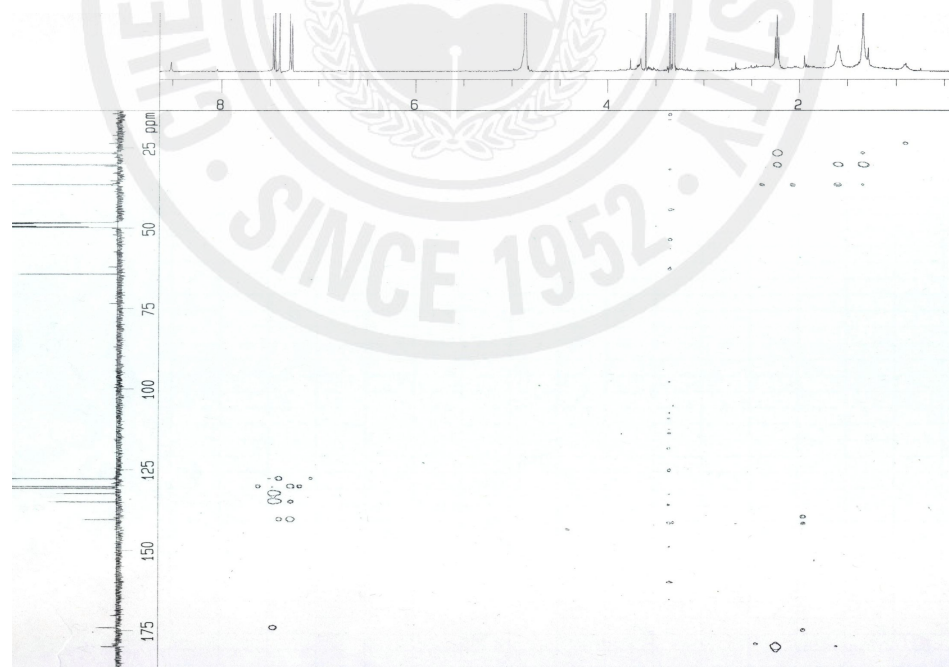


Figure 31. HMBC spectrum of compound **8** in CD₃OD

1-3-2. Compound 9의 구조 해석

Compound 9의 ^1H , ^{13}C -NMR을 분석결과, ^{13}C -NMR에서 δ 115.0~160.0에서 aromatic ring이 있음을 예상할 수 있었으며, carbon spectrum을 통하여 대칭하고 있는 carbon을 포함하여 11개의 carbon이 있음을 알 수 있었다(Figure 33). ^1H -NMR에서는 δ 1.60에서 singlet을 보이며, 적분 값으로써, methyl기가 있음을 알 수 있었고, δ 46.8에서는 할로젠에 인접한 carbon의 signal임을 예상할 수 있었다. ^1H -NMR spectrum에서는 δ 6.83 ($J = 8.3$ Hz), 7.12 ($J = 8.3$ Hz)에서는 커플링 상수 값을 보아 ortho 커플링하고 있으며, δ 3.33~4.10의 signal 들은 methylene에 산소가 인접해 있거나, 할로젠 원소가 인접해 있음을 알 수 있었다(Figure 32). 또한, Dept를 통하여 δ 42.6에서는 4차 carbon의 signal로써, compound 9 화합물이 dimer 형태의 구조를 가지고 있음을 알 수 있었으며, ^1H , ^{13}C -NMR 스펙트럼 결과를 종합해 보면 compound 9는 문헌치와 비교하여 볼 때, bisphenol A bis(3-chloro-2-hydroxypropyl)ether임을 알 수 있었다.¹¹⁾

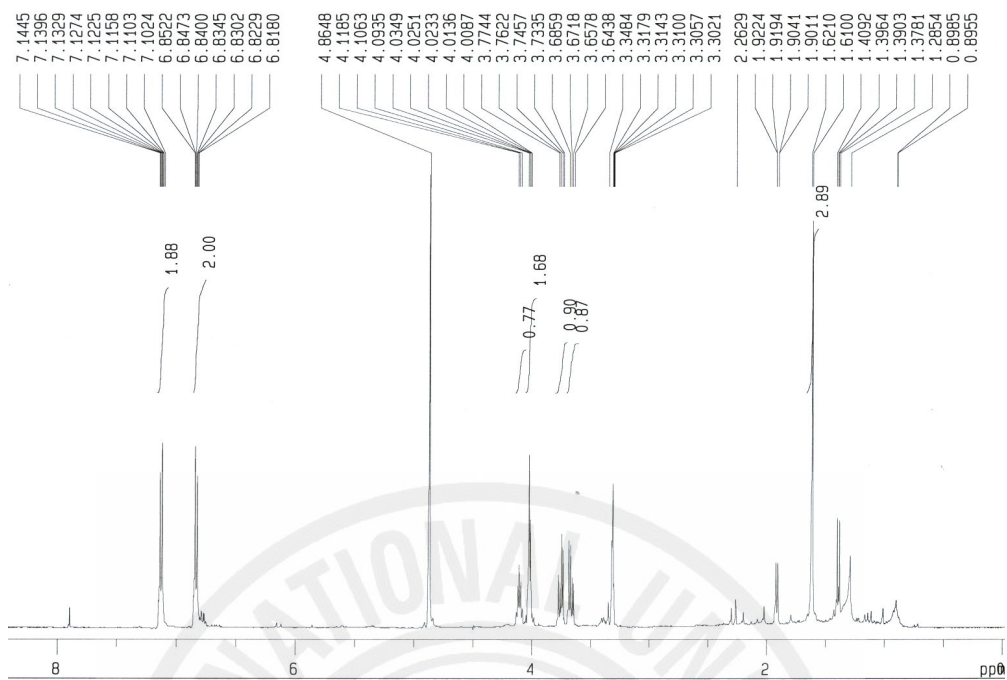


Figure 32. ^1H -NMR spectrum of compound **9** in CD_3OD

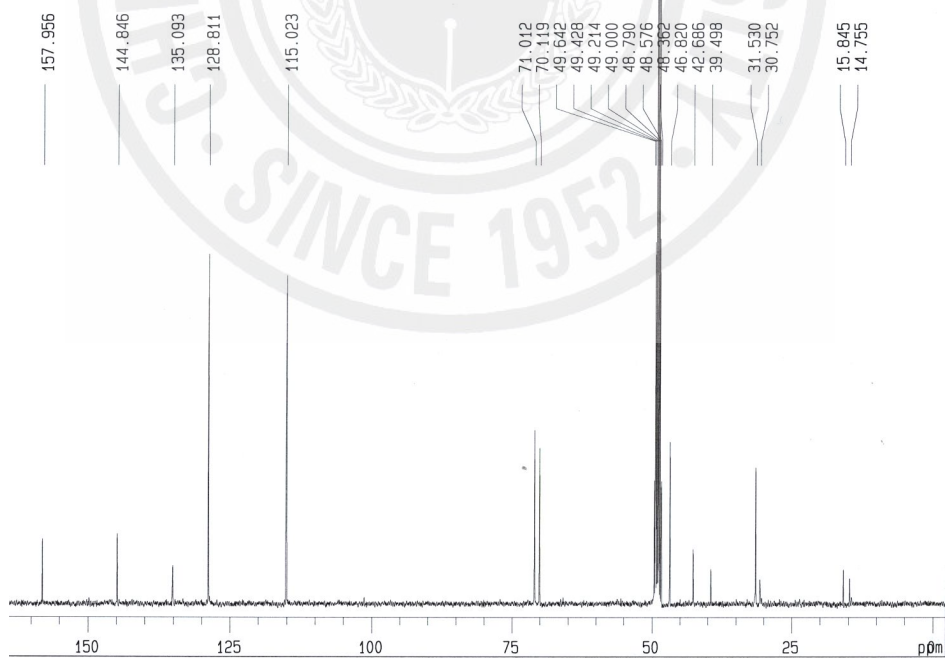


Figure 33. ^{13}C -NMR spectrum of compound **9** in CD_3OD

1-3-3. Compound 10의 구조 해석

Compound 10의 ^1H , ^{13}C -NMR 분석결과 ^{13}C -NMR spectrum 에서 δ 114.8~157.4에서 aromatic ring이 있으며, δ 114.8, 128.5에서는 carbon spectrum 결과로 대칭하고 있는 carbon이 2쌍이 있음을 알 수 있었다(Figure 35). δ 69.6에서는 $-\text{CH}_2-\text{O}$ 의 carbon signal, δ 51.1, 45.0은 epoxy ring에서의 carbon signal 임을 예상할 수 있었다. δ 41.8에서는 4차 carbon의 signal로써, 화합물이 dimer 형태의 구조를 가지고 있음을 알 수 있었다. ^1H -NMR spectrum에서는 δ 6.81 ($J = 9.0$ Hz), 7.10 ($J = 9.0$ Hz)의 커플링 상수 값으로 보아 서로 ortho coupling 하고 있음을 알 수 있고, δ 1.59에서 siglet이며, 적분 비를 보아 methyl 기가 있음을 알 수 있었다(Figure 34). ^1H , ^{13}C -NMR 스펙트럼 결과를 종합해 보면, 두개의 화합물이 dimer 형태를 갖는 bisphenol류임을 알 수 있었고, 문헌치와 비교해 보면, 2,2-bis[4-(glycidyoxy)phenyl]propane임을 확인하였다.¹¹⁾

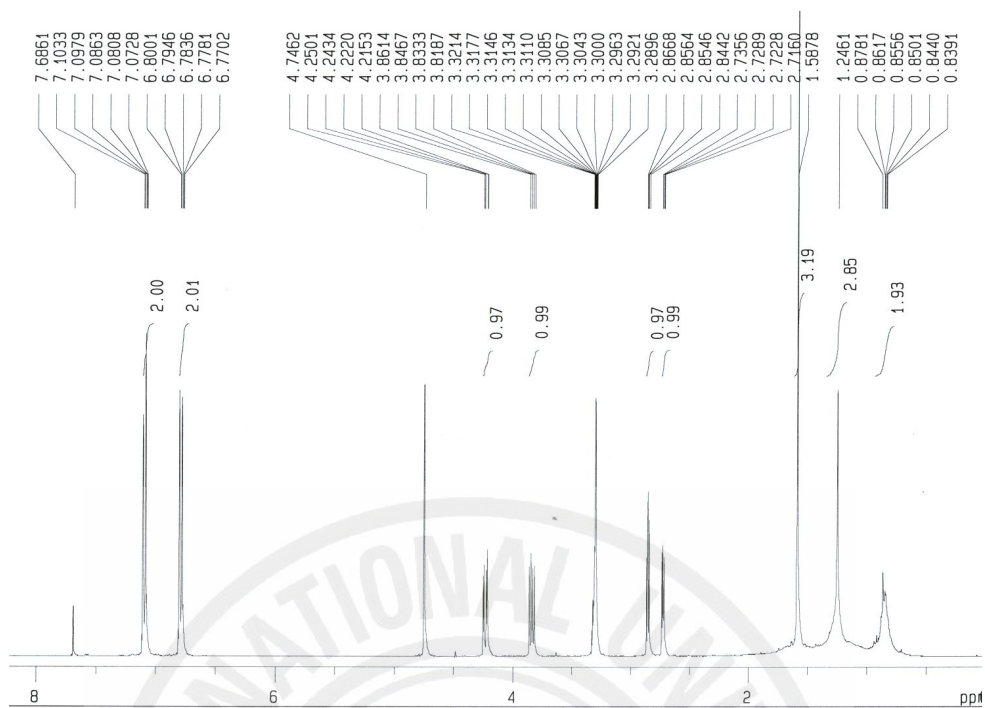


Figure 34. ^1H -NMR spectrum of compound **10** in CD_3OD

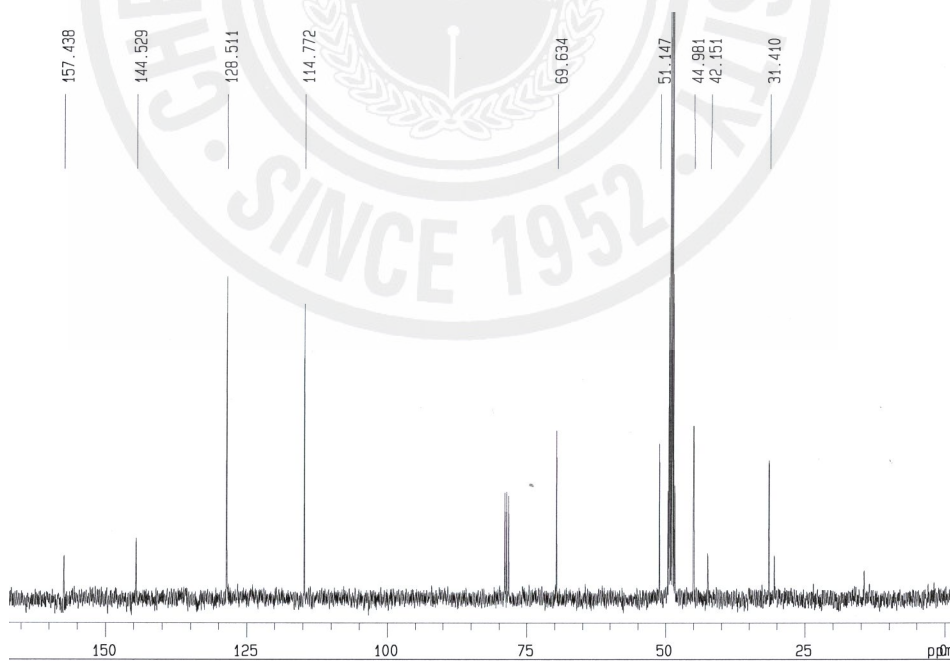
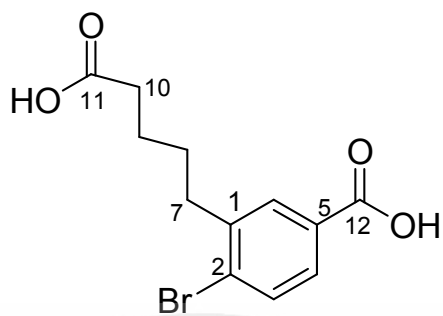
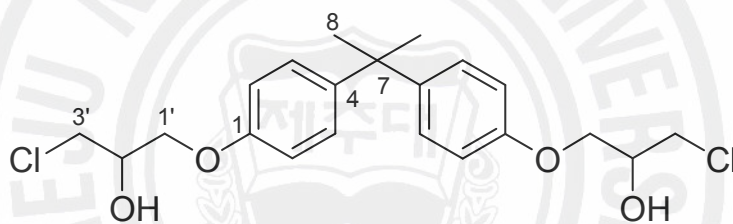


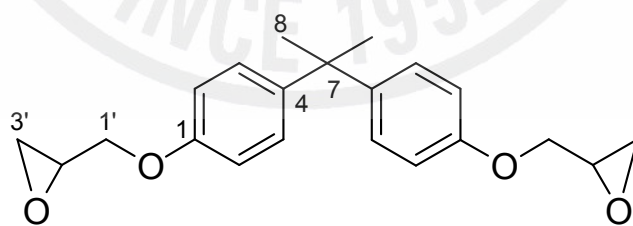
Figure 35. ^{13}C -NMR spectrum of compound **10** in CD_3OD



compound 8



compound 9



compound 10

Figure 36. chemical structure of compound 8-10.

2. 항산화 활성

2-1. 개가시나무 가지에서 분리된 화합물의 항산화 활성

개가시나무 가지의 70% ethanol 추출물에서 분리한 compound 1-4의 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 compound 1은 94.33%, compound 2는 93.5%의 소거 활성을 보였으며, 이는 대조군은 비타민 C의 97.0% 만큼이나 좋은 활성임을 확인할 수 있었다. RC_{50} 값으로 비교를 해보아도 대조군인 비타민C가 4.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며 compound 1은 7.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$, compound 2는 8.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 강력한 소거 활성을 갖고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다. 또한, 다른 화합물인 compound 3, compound 4는 각각 32.5%, 11.1%의 소거 활성을 가지며, 대조군과, compound 1, 2에 비해 좋지 않은 소거능력을 가지고 있음을 알 수 있었다.

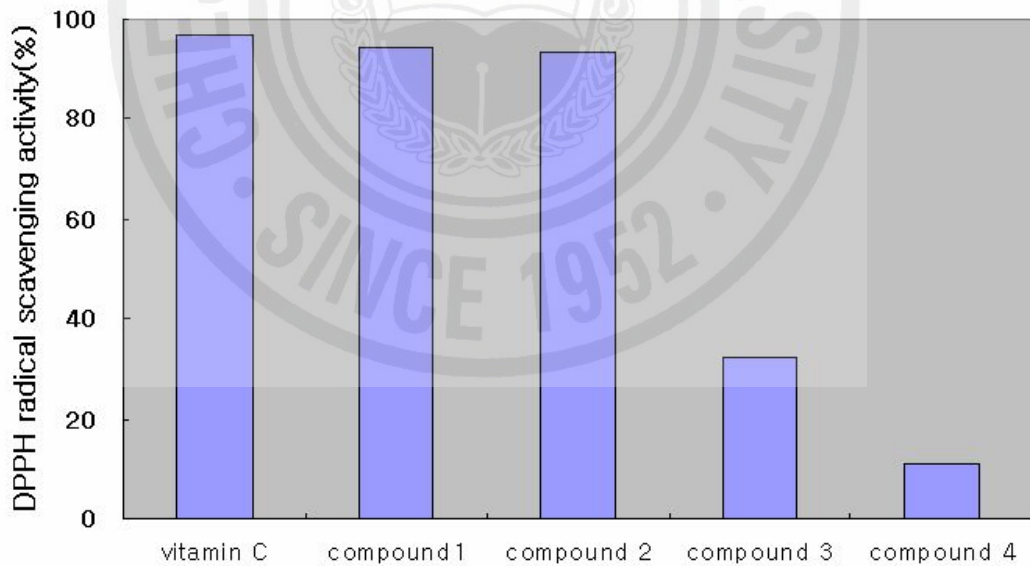


Figure 37. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 1-4 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) from *Quercus gilva* branch

2-2. 산딸나무 잎에서 분리된 화합물의 항산화 활성

산딸나무 잎의 70% ethanol fraction에서 분리한 compound 5-7의 DPPH radical 소거 활성 결과, RC_{50} 값을 보면, compound 5, 7은 각각 $9.27 \mu\text{g/mL}$, $8.01 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군인 비타민 C, $4.17 \mu\text{g/mL}$ 와 비슷하게 아주 강력한 소거 활성 능력을 나타내었다. 그에 비해 compound 6은 $48.33 \mu\text{g/mL}$ 으로 다소 능력이 떨어지지만, $100 \mu\text{g/mL}$ 에서 84.9%, $50 \mu\text{g/mL}$ 에서 51.4%으로 소거 능력은 갖고 있음을 확인 할 수 있었다.

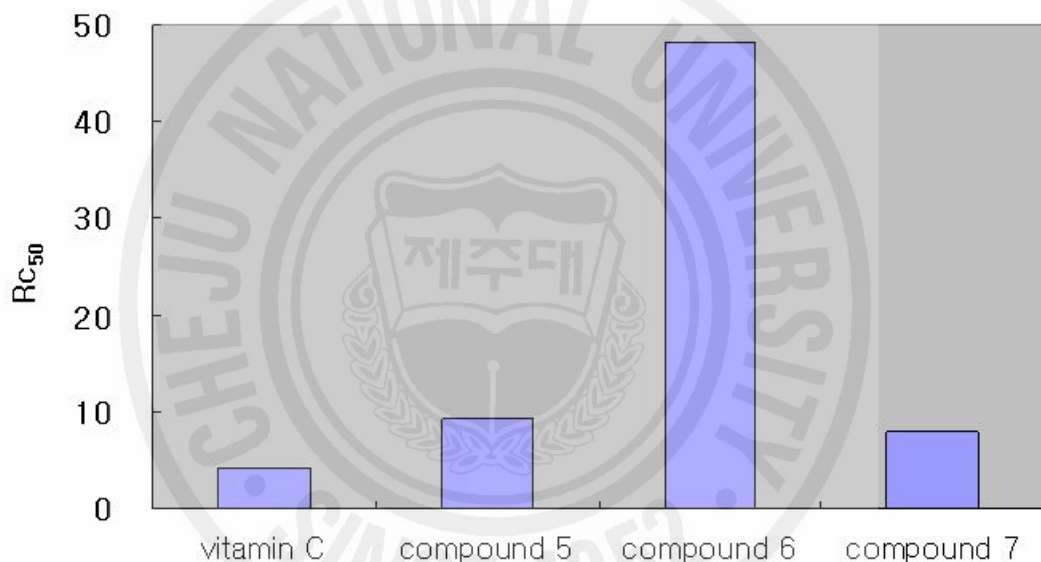


Figure 38. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 5-7 from *Corus kousa* leaves

2-3. 벚꽃은잎에서 분리된 화합물의 항산화 활성

벚꽃은잎 80% methanol fraction에서 분리한 compound 8-10의 DPPH radical 소거 활성 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 7.6% 8.4%, 8.4%로써, 소거 활성 능력이 없음을 확인할 수 있었다.

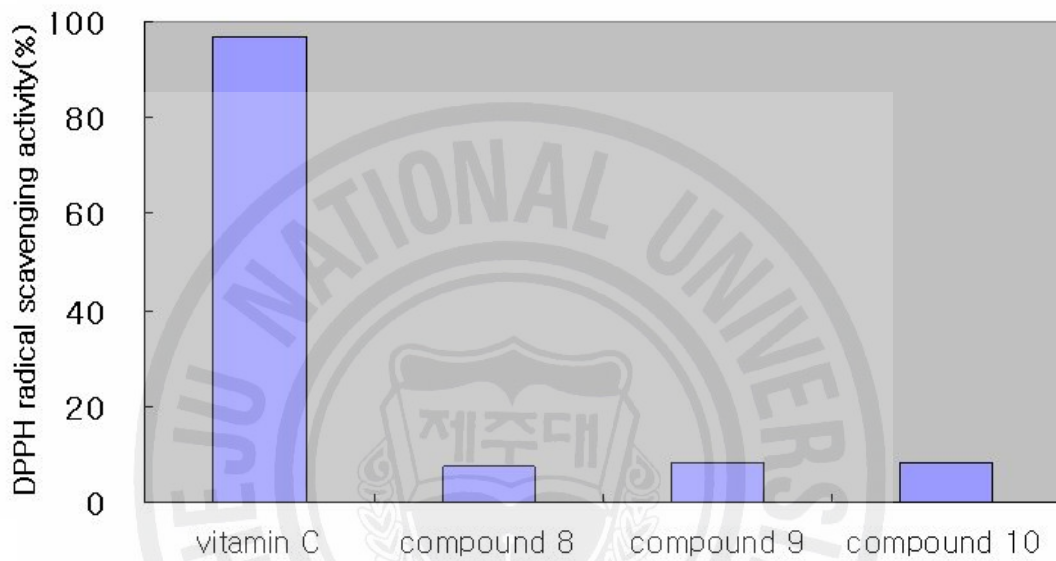


Figure 39. DPPH radical scavenging effect of isolated compounds 8-10 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) from *callophyllis japonica*.

IV. 요약 및 결론

개가시나무 가지와 산딸나무 잎의 70% ethanol 추출물과 벚붉은잎의 80% methanol 추출물을 *n*-hexane, ethyl acetate, butanol, water로 용매분획을 하고 ethyl acetate 분획에 대해, RP column chromatography, sephadex LH-20, normal silica gel chromatography를 실시하여 분리된 분획들을 NMR 기기로 확인하고 문헌들과 비교한 결과 개가시나무 가지에서 catechin, epi-catechin, tyrosol, tiliroside를 분리하였고, 산딸나무 잎에서는 kaempferol, astragalín, quercetin-O- β -D-glucopyranoside 임을 알 수 있었다. 또한 벚붉은잎에서는 bisphenol A bis(3-chloro-2-hydroxypropyl)ether, bisphenol A diglycidyl ether를 분리하였다. Bisphenol A 유도체들은 고업용 플라스틱 소재로 사용되는 물질이므로, 실험과정 중 유입된 오염물질 가능성을 면밀히 검토하였으나, 뚜렷한 원인을 규명할 수는 없었다.

Column chromatography를 통하여 분리된 화합물들의 DPPH radical 소거 활성실험을 하였고, RC₅₀을 확인해 본 결과, 개가시나무 가지에서 분리된 catechin과 epi-catechin은 각각 7.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 산딸나무 잎에서 분리된 kaempferol과 quercetin-O- β -D-glucopyranoside는 9.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군인 비타민 C, 4.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 만큼이나 아주 강력한 소거 능력이 있음을 확인할 수 있었다. 그 외 산딸나무 잎에서 분리된 astragalín은 48.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 다른 화합물보다는 소거 능력이 떨어지지만, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 84.91%의 소거 능력이 있음을 알 수 있었다. 또한 벚붉은잎에서 분리된 화합물들은 DPPH radical 소거 활성 능력을 확인할 수 없었다.

본 연구의 실험결과를 통하여 제주도에서 서식하고 있는 개가시나무 가지와 산딸나무 잎에서 분리된 화합물 중에서 활성이 좋았던 화합물을 이용하여 항산화제 개발 가능성을 엿볼 수 있었다.

V. 참고 문헌

- 1) Giese, J. *Food Technol.* **1996**, 5, 73.
- 2) Pszczola, D. E. *Food Technol.* **2001**, 55, 51.
- 3) Frankel, E. N. *Food Chem.* **1996**, 57, 51.
- 4) Son, J. Y.; Rhim, J. H.; Son, H. S. *Korean J. Food Nutr.* **1995**, 8, 88.
- 5) Kim, K.H.; Choi, M. H. *Korean J. Postharvest.* **1999**, 5, 121.
- 6) Tachi, Yasuhide; Kamano, Yashiaki; Sawada, Jiro; Tanaka, Ichiro; Itokawa, Hideji. *Yakugaku Zasshi.* **1976**, 96, 1213.
- 7) Itokawa, Hideji; Tachi, Yasuhide; Kamano, Yashiaki; Itaka, Yoichi. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* **1978**, 26, 331.
- 8) Lalita Wirasathien; Thitima Pengsuparp; Masataka Moriyasu; Kazuko Kawanishi; Rutt Suttisr. *Arch Pharm Res.* **2006**, 29, 497-502.
- 9) Mohammad Shoeb; Sezgin Celik; Marcel Jaspars; Yashodharan Kumarasamy; Stephen M. MacManus; Lutfun Naha; Paul K. Thoo-Lind; Satyajit D. Sarkere. *Tetrahedron.* **2005**, 61, 9001-9006.
- 10) Lamyaa F. Ibrahim; Salwa A. Kawashty; Ali M. El-Hagrassy; Mahmoud I. Nassarb; Tom J. Mabryc. *Carbohydrate Research.* **2008**, 343, 155-158.
- 11) Kang, C-H.; Kim, D.W. *Analytical science.* **1988**, 1, 189-195.

Special thanks to...

길지도.. 그렇다고 짧지도 않았던 대학원 석사과정을 밟으면서 참 많은걸 배우고 깨달았습니다. 화학이라는 넓은 세계를 흥미와 재미로 제가 힘껏 달릴 수 있게 도움을 주신 한성빈 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 강창희 교수님, 이선주 교수님, 김원형 교수님, 그리고, 저의 지도 교수님이신 이남호 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드리고 싶습니다,

말썰 많던 못난 후배에게 아낌없는 충고와 그 어떤 값비싼 보석으로도 맞바꿀 수 없는 실험 노하우를 전수 해주신 저의 연구실의 백종석 선생님, 오태현 선생님과 곧 엄마 아빠가 되실 김정미, 윤진석 선생님께 감사의 말씀을 드리고 싶습니다.

바쁘척하는 저를 묵묵히 지켜봐주었던 연구실 후배, 성환이, 유태이, 정은이, 하나, 형민이, 주희에게 고맙다는 말을 전하며, 늘 멀리서나마 격려를 아끼지 않으셨던 화학과 모든 선 후배님들께 고개 숙여 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

또한, 연락도 자주 안하면서 힘들다 투정냈던 저를 믿어주고 우정이라는 이름으로 감싸안아준 사랑스런 친구들.. 감사합니다.

마지막으로, 제가 여기까지 올 수 있었던 이유이자 힘든 일이 있어도 참아주고, 견뎌주었던 저의 동생 미소, 미진, 그리고 하늘나라에 있는 지성이 그리고, 기쁠 때나 슬플 때나 늘 제 곁을 지켜주신 저희 하늘이자 저의 연인 맘 따뜻한 상훈오빠에게 사랑의 맘을 담아 감사의 말씀을 전합니다.

이제 시작인 것 같습니다.

이제 불과 걸음마를 뺀 철부지지만, 늘 열심히 뛰는 사람이 되어 어딘가에 꼭 필요한 사람이 되겠습니다. 감사합니다.

2008년 1월

문미연 올림