

세신(細辛)의 生理活性物質 Phenylpropanoids의 分離

김금숙*·박창기*·백남인**·성재덕*·곽용호*

Bioactive Phenylpropanoids from *Asiasarum sieboldi* Roots

Geum Soog Kim*, Chang Kie Park*, Nam In Baek**, Jae Duck Seong*
and Young Ho Kwack*

ABSTRACT : Treatment of ethylacetate extract of *Asiasarum sieboldi* inhibited the germination and the growth of radish seeds. Two phenylpropanoids were isolated from ethylacetate extract. Their structures were identified as safrole and o-methyleugenol by spectroscopic evidence. From the test to inhibitory effect, o-methyleugenol had inhibited the germination and the growth of radish seeds, while safrole did not. The germination rate and radicle length of radish seeds were decreased to 63.0%, 31.5% of control at 5mg/ml of o-methyleugenol, respectively. At the same concentration, o-methyleugenol inhibited the hypocotyl growth up to 100%.

Key words : *Asiasarum sieboldi*, Safrole, o-methyleugenol, Germination inhibition.

緒 言

세신(細辛, *Asiasarum sieboldi*)은 오래 전부터 主要 韓藥材로서 주로 解熱, 鎮靜, 鎮痛, 鎮咳作用 및 抗알레르기 作用 등의 藥材로 이용되어 왔으며 抗癌效果에 대해서도 연구된 바 있다. 韓藥 세신의 起源에 대한 연구로서 朴 등⁶⁾은 *Asiasarum sieboldi* var. *seoulensis*(족두리풀)의 전초를 起源으로 하며 부분적으로 *Asiasarum sieboldi*(민족두리풀)의 전초가 함유되었다고 하였으며 大韓藥典¹⁾에는 *Asiasarum sieboldi* F. Maekawa 또는 *A. heterotropoides* F. Maekawa var. *mandshuricum* F. Maekawa의 지상부를 가능한 除去된 뿌리 및 줄기

라고 수록하고 있다.

세신의 主要成分^{3,4,5,7,8,9)}으로는 methyleugenol, safrole, β -pinene, eucarvone, elemicin, higenamine, γ -asarone, (-)-asarinin, (-)-sesamin, amides, asarinols A, B, lignan glycosides, flavonoid glycosides, 3',4'-dimethoxycinnamadehyde, N-isobuthyldodecatetraenamide, xanthoxylol, aristolactam 등이 보고되었다. 특히 methyleugenol과 higenamine은 세신의 主要 精油成分들로서 기침 抑制效果가 보고되었고⁵⁾ 또한 methyleugenol은 xanthoxylol과 마찬가지로 抗알레르기에 효과가 있는 것으로 보고되었다.⁴⁾ 한편 asaricin과 safrole은 殺蟲作用이 있으며 더구나 asaricin은 곰팡이에 대

* 嶺南農業試驗場 (National Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA, Milyang 627-130, Korea)

** 慶熙大學校 (College Industry, Kyung-Hee University, Suwon 449-701, Korea)

<'97. 4. 12 접수>

한 抗菌活性도 있는 것으로 밝혀졌다.¹⁰⁾ 李²⁾는 세신의 抗炎效果에 대해서 보고하였다. 본 연구에서는 生藥資源 및 藥用作物로 부터 發芽 沮害 活性物質을 탐색하던 중 세신의 EtOAc분획으로부터 강한 發芽 沮害 活性效果를 발견하고 이로부터 2種의 化合物을 분리하였으며 이 물질의 發芽 沮害 活性效果를 確認 하였기에 보고하고자 한다.

材料 및 方法

1. 活性物質의 抽出 및 分離

본 실험의 植物材料는 密陽市 藥材商에서 流通되는 세신 뿌리를 구입하여 粉碎한 후 사용하였다. 추출은 그림 1에서와 같이 분쇄시료를 사용하여 24시간 3회 상온 추출하고 마지막 1회는 2시간 가열 환류 추출한 후 농축하였다. 이렇게 얻어진 MeOH extract는 EtOAc-H₂O (1:1) 混合 溶媒에 녹여 分配한 후 濃縮하여 H₂O ext. 와 EtOAc ext. 를 얻었다. 발아억제 활성이 보이는 EtOAc ext. 로부터 활성성분을 분리하기 위해 먼저 Avicel를 충전한 column에 EtOAc ext. 를 흡착시켜 CHCl₃-MeOH (20:1→5:1, gradient)를 전개용매로 하여 column chromatography한 후 Fr. 1, Fr. 2를 얻었다.

두 분획을 bioassay하여 발아억제 활성이 보이는 Fr. 1를 다시 silica gel로 충전된 column에 흡착시켜 Hexane-EtOAc (15:1→3:1, gradient)와 CHCl₃-MeOH-H₂O (15:3:1→12:3:1, gradient)를 반복사용하여 chromatography를 실시 fr. 1에서 fr. 9까지 총 9개 소분획을 얻었다. 이중 발아억제 활성을 나타내는 fr. 1분획과 fr. 2분획을 1차적 대상으로 활성물질의 분리 및 정제를 계속하였다. 먼저 fr. 1를 다시 silica gel이 충전된 column에 Hexane 및 Hexane-EtOAc (20:1)를 반복사용하여 chromatography를 실시하여 compound 1 (safrole)을 얻었으며 fr. 2로부터는 Hexane-EtOAc (20:1→15:1, gradient)를 반복사용하여 silicagel column chromatography를 실시 compound 2 (methyleugenol)를 얻었다.

2. Bioassay

세신의 MeOH ext. 로부터 활성물질을 분리하는 과정에서 각 분획들의 발아억제 활성의 검정을 위해서 무우종자에 대한 발아 및 생육억제 정도를 petri dish (ø 5cm)를 사용한 bioassay 방법으로 검정하였으며 이때 시료를 여지에 묻혀 溶媒를 모두 날려보내고 滅菌水를 그 여지에 처리하여 최종 농도가 25mg/ml가 되도록 調節하였다.

한편 抽出物의 발아억제 최저농도를 확인하기 위한 bioassay方法으로는 6 cell multidish (ø 2.5cm/cell)를 사용, 3반복으로 하고 濃度 수준은 25, 15, 5, 0.1, 0.01, 0.001mg/ml로 하여 무우종자를 처리한 후 6일간 27°C에서 暗培養 하였다. 결과는 최종발아율과 배축의 길이 및 유근의 길이를 무처리구에 대한 백분율로 조사하였다.

3. 活性物質의 分離 同定

분리된 compound 1과 compound 2의 構造를 동정하기 위하여 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 Dept NMR spectrum을 측정하였으며 NMR은 Bruker AM300 (¹H-NMR : 400MHz, ¹³C-NMR : 100MHz)를 사용하였다.

그 외 試藥 및 機器로는 抽出, 分割 및 column chromatography용 용매는 특급(G.R)을 사용하였으며, cellulose는 Avicel (E. Merck), silica gel은 silica gel60 (E. Merk. 70-230mesh)을, TLC plate는 Silica gel60F₂₅₄ (E. Merck), NMR용 용매는 CDCl₃ (E. Merck)을 사용하였다

結果 및 考察

세신의 MeOH ext. 를 分割하여 發芽抑制 活性를 보이는 EtOAc 분획을 column chromatography를 반복 실시하여 이미 보고된 2種의 phenylpropanoid 化合物을 분리하였다(그림 1).

化合物 1은 10% H₂SO₄ 처리에 양성반응을 나타내었고 ¹H-NMR Spectrum에서는 2개의 aromatic doublet signal이 δ6.52ppm와 δ6.56ppm에서 관찰되었고 coupling constant는 각각 1.8Hz, 7.9Hz 였으며 1개의 aromatic doublet-doublet signal이 δ6.45ppm (J=7.9Hz, 1.7Hz)에서 관찰되었

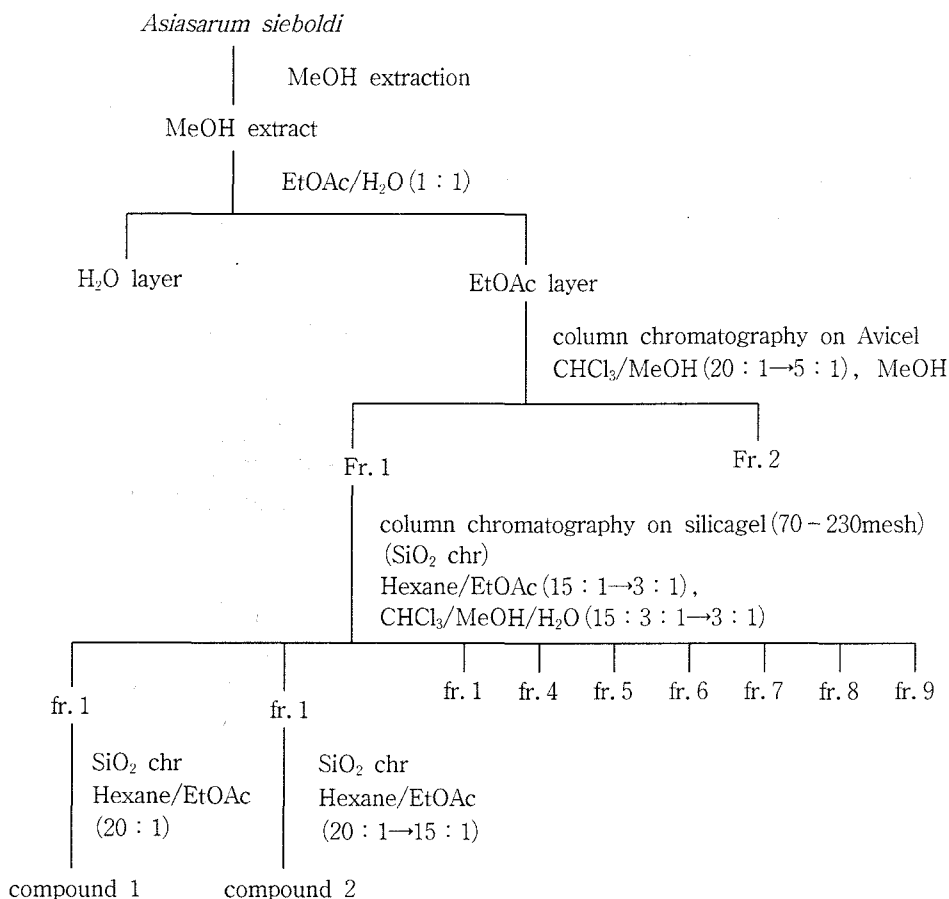
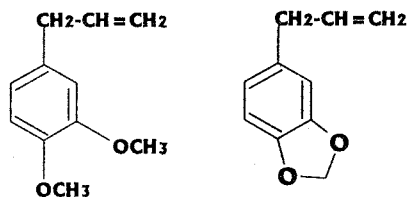


Fig. 1. Isolation procedures for bioactive substances from Radix of *Asiasarum sieboldi*

다. 한편 δ 5.69ppm에서 1개의 dioxymethylene singlet signal을 확인하였다. 또한 δ 5.64ppm (1H, ddt)와 δ 4.90ppm (1H, dd)에서 trans, cis coupling constant가 각각 $J=16.8\text{Hz}$ (or 16.9Hz), $J=10.2\text{Hz}$ (or 10.0Hz)로 확인되고 methylene에 기인한 δ 3.11ppm (2H, d)의 coupling constant는 $J=6.8\text{Hz}$ 로서 이웃한 methyne의 수소와 coupling 된 것으로 추정되어 이러한 proton들이 전형적인 allyl group의 signal인 것으로 확인하였다.

^{13}C -NMR Spectrum에서는 δ 109.57ppm에서 δ 148.20ppm사이에 aromatic group의 탄소에서 기인한 6개의 탄소 signal을 확인하였고 이중 δ 148.20ppm과 δ 146.39ppm의 탄소 signal로부터 2개의



o-methyleugenol

Safrole

Fig. 2. Structures of isolated compounds from *Asiasarum sieboldi*

aromatic 탄소가 산소와 결합하고 있음을 추정할 수 있었다. 한편 δ 101.28ppm에서 dioxyl-methylene의 전형적인 탄소 signal을 확인하였다. 또 allyl group에서 기인한 3개의 탄소 signal을 각각 δ 40.40ppm, δ 138.17ppm 및 δ 108.62ppm에서 확인하였다. 이러한 NMR Spectrum의 결과로부터 化合物 1은 이미 報告된 바 있는 safrole인 것으로 동정되었다(그림 2, 표 1, 2).

Table 1. ^1H -NMR Spectral assignment for Compound 1 and Compound 2 in CDCl_3

Proton	Compound 1	Compound 2
2	6.52d(1.8)	6.59d(1.7)
5	6.56d(7.9)	6.60d(6.8)
6	6.45dd(7.9, 1.7)	6.67dd(6.7, 2.0)
7	3.11d(6.8)	3.21d(6.7)
8	5.64ddt(16.8, 10.2, 6.)	5.84ddt(16.9, 10.)
9a	4.90dd(16.9, 1.7)	4.96dd(16.9, 1.7)
9b	4.89dd(10.0, 1.7)	4.94dd(10.2, 1.7)
3-OCH ₃	-	3.73s
4-OCH ₃	-	3.71s
3,4-OCH ₂ O	5.69s	

The number in parentheses are J values in Hz.

化合物 2는 10% H_2SO_4 처리에 양성반응을 나타내었고 ^1H -NMR spectrum에서는 역시 2개의 aromatic doublet signal이 δ 6.59ppm (1H, d, J=1.7Hz), δ 6.60ppm (1H, d, J=6.8Hz)에서, 1개의 aromatic doublet-doublet signal이 δ 6.67ppm (1H, dd, J=6.7Hz, 2.0Hz)에서 관찰되었다. 또한 化合物 1과 동일한 allyl group에서 기인한 水素 signal이 각각 δ 3.21ppm (2H, d, J=6.9Hz), δ 5.84ppm (1H, ddt, J=16.9Hz, 10.2Hz, 6.9Hz), δ 4.96ppm (1H, dd, J=16.9Hz, 1.7Hz) 및 δ 4.94ppm (1H, dd, J=10.2Hz, 1.7Hz)에서 관찰되었으며 coupling constant와 chemical shift값이 化合物 1과 거의 일치하였다. 한편 δ 3.73ppm과 δ 3.71ppm에서 Methoxyl group의 각각 1개의 singlet signal을 확인할 수 있었다.

^{13}C -NMR에서는 δ 111.61ppm에서 δ 149.25ppm사이에서 6개의 aromatic 탄소 signal을 확인

Table 2. ^1H -NMR Spectral assignment for Compound 1 and Compound 2 in CDCl_3

Carbon	Compound 1		Compound 2	
	δ (ppm)	DEPT	δ (ppm)	DEPT
1	134.28	C	132.95	C
2	116.12 ^a	CH	112.21 ^b	CH
3	148.20	C	149.25	C
4	146.39	C	147.74	C
5	121.78 ^a	CH	120.78 ^b	CH
6	109.57 _a	CH	111.61 ^b	CH
7	40.40	CH ₂	40.16	CH ₂
8	138.17	CH	138.07	CH
9	108.62	CH ₂	115.94	CH ₂
3-OCH ₃	-	-	56.09 ^c	CH ₃
4-OCH ₃	-	-	56.21 ^c	CH ₃
3,4-OCH ₂ O	5.69s	CH ₂	101.28	-

May be interchanged in each column

하였으며 이중 δ 147.74ppm과 δ 149.25ppm의 signal로 酸素에 결합된 炭素임을 확인하였고 δ 56.09ppm과 δ 56.21ppm에서 전형적인 methoxyl group의 탄소 signal을 확인하여 化合物 2는 이미 보고된 o-Methyleugenol인 것으로 同定하였다(그림 2, 표 1, 2).

한편 발아억제 시험에서 o-Methyleugenol을 25mg/ml에서 0.001mg/ml까지 濃度別로 처리한 결과 15mg/ml에서 발아율은 無處理區 對比 66.7%, 胚軸의 길이와 幼根의 길이는 각각 100%, 80.4% 沮害되었다. 5mg/ml에서는 最終發芽率은 37%정도 沮害된 것에 비하여 胚軸의 길이, 幼根의 길이는 각각 100%, 68.5% 沮害된 것으로 보아 5mg/ml 농도에서도 沮害활성이 인정되었으나(표 3) safrole은 발아억제 활성을 나타내지 않았다.

o-Methyleugenol은 세신의 代表的인 精油成分의 하나로서 이제까지 주로 Higenamine과 마찬가지로 기침억제 등의 活性이 보고되어 왔으며 강력한 발아억제활성에 대한 보고는 없었다. 결국 o-Methyleugenol은 세신의 강한 발아억제 활성을 나타내는 생리활성물질의 하나이며 기타 다른 생리

활성 또한 期待되어진다. 세신은 이 物質 以外에도 多樣한 생리활성물질을 含有한 것으로 判斷되는 바 繼續인 研究가 必要하겠다.

Table 3. Inhibitory effects of o-methyleugenol on germination and growth of radish seed.

CONC. (mg/ml)	GR	HL	RL
	% of Control		
25	33.3	0	9.6
15	33.3	0	18.3
5	63.0	0	31.5
0.1	85.2	74.1	75.3
0.01	88.9	124.7	111.1
0.001	107.4	120.6	110.4
LSD (0.05)	18.0	19.1	24.9

GR : germination rate, HL : hypocotyl length, RL : radicle length

摘 要

¹H-NMR, ¹³C-NMR, Dept. NMR의 spectrum으로 compound 1은 safrole로, compound 2은 o-methyleugenol로 推定되었으며 處理濃度別 發芽抑制 效果調査에서 발아억제 물질로 추정된 safrole은 25mg/ml의 처리에서도 발아 및 생육억제 효과를 나타내지 않았다.

o-methyleugenol의 경우는 5mg/ml의 處理로 最終發芽는 무처리구에 비해 58% 저해하였으며, 그리고 25mg/ml에서도 92%, 生育에는 100%의 阻害度를 나타내었다.

以上の 結果를 보면 o-methyleugenol은 세신의 強한 발아저해활성 물질의 하나로 처음 확인되었으며 天然 除草劑로서의 開發 可能性은 추후 再檢證해 보아야 하겠다.

引用 文 獻

1. 대한 약학대학 협의회 약전분과회편. 1995. 대한약전 제 6개정 해설. 문성사. 953p
2. 이 일호. 1975. 細辛의 抗炎作用에 관한 研究. 全北大學校 農大 論文集. 6 : 73-78.
3. Hashimoto, K., T. Katsuhara, K. Niitsu, Y. Ikeya, M. Okada, and H. Mitsuhashi. 1992. Two Glycosides from Roots of *Asiasarum sieboldi*. *Phytochemistry*. 31(7) : 2477-2480
4. Hishimoto, K., T. Yanagisawa, Y. Okui, Y. Ikeya, M. Maruno (Chin), and T. Fujita. 1994. Studies on Anti-Allergic Components in the Roots of *Asiasarum sieboldi*. *Planta Med.* 60 : 124-127
5. Kokuo, T., M. Yokota, H. Nukaya, Y. Gotoh, and M. Nagasawa. 1978. Studies on
6. Park, J. H., J. S. Kim, A. Y. Jeong, and T. Namba. *Pharmacognositical Studies on the "Se Sin"*. 1996. *Korean J. Plant. Res.* 9(2) : 183-188
7. Miyazawa, M., Y. Ishikawa, M. Toshikura, and H. Kameoka. 1991. Insecticidal compounds from *Asiasarum heterotropoides* Maek. var *mandshuricum* Maek. *Chemistry Express*, 6(9) : 703-706
8. Villegas, M., D. Vargas, J. D. Msonthi, A. Marston, and K. Hostettmann. 1988. Isolation of the Antifungal Compounds Falcarindiol and Sarisan from *Heteromorpha trifoliata*. *Planta Medica* 36-37.
9. Yahara, S., K. Kato, and T. Nohara. 1990. Studies on the constituents of the Water Soluble Portion in *Asiasari Radix*. *Shoyakugaku Zasshi*. 44(4) : 331-334