

# 독활(*Aralia continentalis*)로부터 生長抑制物質의 分離 및 同定

金吉雄 · 白鏡煥\*

## Separation and Identification of a Growth Inhibiting Compound from *Aralia continentalis*

Kim, K.U. and K.W. Back\*

### ABSTRACT

This experiment was performed to identify and isolate a growth inhibiting compound from *Aralia continentalis*. In order to isolate the growth inhibiting compound from *Aralia continentalis* the bioassay test of lettuce seed germination and rice seedling growth were used. Through these bioassays the growth inhibiting compound which was spotted at R<sub>f</sub> 0.51 on Tlc was isolated. This compound inhibited the lettuce growth by 79% at the concentration of 1000ppm. When sprayed with FeCl<sub>3</sub> reagent, it developed a blue spot. It had UV-absorbance at 217nm and 342nm, and OH<sup>-</sup> of 3600cm<sup>-1</sup>, C=O of 1700cm<sup>-1</sup>, C=C of 1600cm<sup>-1</sup>, and C-O of 1200cm<sup>-1</sup> on IR spectrum. Through HPLC analysis this compound was identified as a ferulic acid (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>) having 25 min. retention time.

Key words : *Aralia continentalis*, A growth inhibiting compound, HPLC, Ferulic acid.

### 緒 言

本 研究는 金<sup>5)</sup> 等이 野生植物로부터 有用物質을 開發하고자 때죽나무(*Styrax japonica*)와 독활(*Aralia continentalis*) 等의 植物體를 對象으로 除草 活性檢定, 抗菌性 및 抗細菌性 效果 檢定을 通하여 生理活性物質이 있음을 報告한 研究結果를 土臺로 독활이 含有하고 있는 主된 生長抑制物質이 무엇인 지를 究明하기 위하여 column chromatography 로 分離한 物質들을 상치 發芽 및 벼 幼苗生長 檢定을 通해 活性을 測定하여 生長抑制物質을 分離한 後 Tlc 로 單離한 物質을 UV-spectrophotometer, IR, HPLC 等으로 同定하였다.

### 材料 및 方法

#### 1. 活性物質의 分離

漢藥商에서 購入한 독활뿌리를 잘 粉碎하여 methanol/acetone (1:1=70%)으로 抽出한 後 減壓 蒸溜를 通하여 남은 水溶層을 hexane으로 5회 抽

出하여 hexane 層과 水溶層으로 分離하였다. 다시 水溶層을 diethyl ether/ethyl acetate (1:1, v/v) 로 抽出한 後 DE/EA層과 水溶層으로 分離하여 DE/EA 粗活性層을 얻었다. 이 DE/EA 粗活性層에 Wako gel 300을 50g 充填한 後 chloroform-methanol gradient로 column chromatography(3.0 × 40 cm)하여 分劃採取機로 10ml씩 받은 後 Tlc 상에서 같은 spot 를 보인 것을 한데 모았다. 이중 活性을 보인 F1 fraction과 F2 fraction을 습하여 2차 column chromatography (Wako gel 300, 3.0 × 40 cm)하여 다시 2개의 fractions 을 얻고 最終으로 活性을 지닌 物質을 Tlc상에서 分離하였다. 使用한 Tlc는 silica gel 60G이며 展開溶媒는 toluene : ethyl acetate : formic acid(6:3:2, v/v/v)이고 UV lamp로 detection 하였다(그림 1).

#### 2. 活性物質의 生物檢定

溶媒 및 column chromatography 에 의해 分離된 各 fraction을 乾燥한 後 粉末로 만들어 ppm을 算定하였고 抑制活性을 調査하기 위하여 發芽가 均一하고 充實한 상치種子를 使用하여 濃度別 2反復씩,

\* 慶北大學校 農科大學 College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

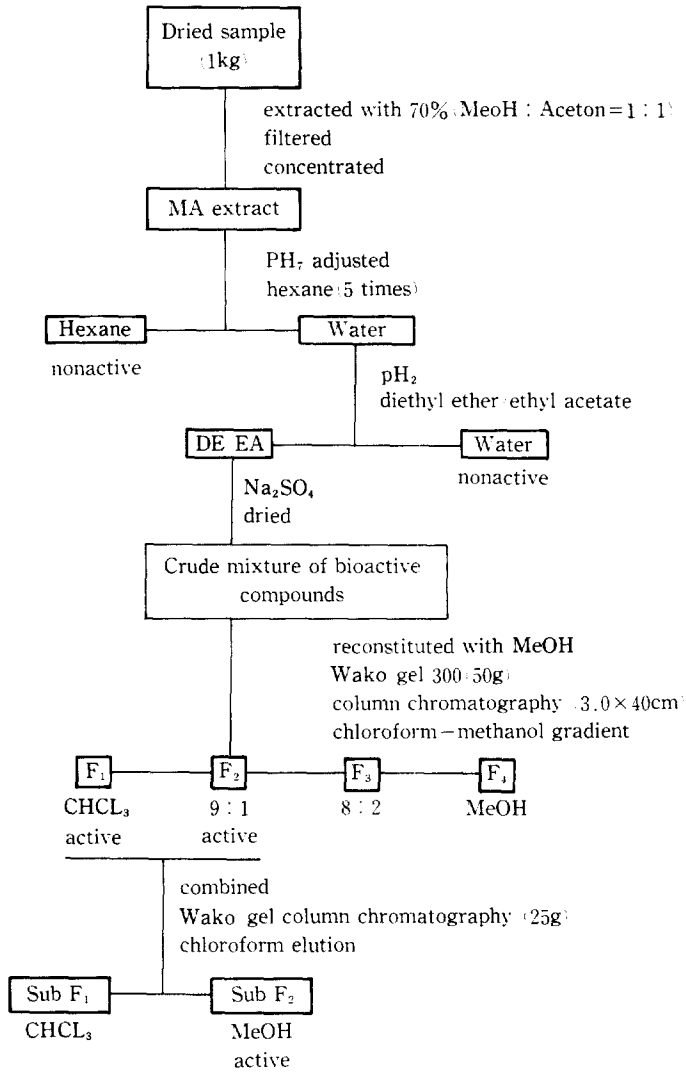


Fig. 1. The isolation procedures for a bioactive compound from *Aralia continentalis*.

反復當 20粒의 상치種子를 사레에 넣어 溫度 20°C 와 光 2,000 lux로 維持되는 恒溫室에 置床한 後 1日과 3日째 發芽率을 5日째는 個體當 生體重을 調査하였다. 비 生物檢定은<sup>6)</sup> 왜성벼인 탄진보주를 使用하였으며 發芽한 벼를 시험관에 5粒씩 2反復으로 浸漬法으로 置床하여 7日째에 제2잎의 길이, 뿌리길이, 뿌리重 및 生體重을 調査하였다.

### 3. 活性物質의 同定

Tlc 상에서  $FeCl_3$  發色反應<sup>3)</sup> : Tlc 상에서  $R_f$  0.51로 하나의 物質로 分離된 化合物을 3%  $FeCl_3$  (0.5N HCl) 溶液을 噴霧하여 生長抑制物質의 p-

henol 성 與否를 調査하였다.

機器分析 : 분석에 使用된 UV-spectrophotometer는 Pye unicam 8600으로 ethanol에 녹여 200-400 nm 範圍에서 測定하였고 IR은 Pye unicam SP 3,300이며 Kbr pellet法으로 測定하였고 H-PLC는  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  column을 使用하였으며 展開溶媒는<sup>7)</sup> water-glacial acetic acid-N-butanol (347 : 1 : 11, v/v/v)이었다(表 1).

**Table 1.** HPLC operating condition for analysis of a growth inhibiting compound from *Aralia continentalis*.

Column	u Bondapak C <sub>18</sub>
Detector	Model 441 absorbance(280nm)
Eluent	Water-glacial acetic acid-n-butanol (347 : 1 : 11, v/v/v)
Flow rate	1.0ml/min
Injection volume	5ul

**結果 및 考察**

독활로부터 生長抑制物質의 生物檢定 및 分離 : 시료를 methanol/aceton(M/A)로 抽出한 다음 hexane 으로 抽出하여 hexane 層과 水溶層으로 나누어 hexane 層을 生物檢定한 結果 1,000 ppm에서도 상치의 發芽 및 生體重의 減少는 없었으며 오히려 生體重量이 增加하는 傾向을 보여(表 2) 독활에 있는 活性物質은 lipid 類는 아님을 確認하고<sup>6)</sup> 水溶層에 活性物質이 남아 있음을 알 수 있었다. 이 水溶層을 diethyl ether/ethyl acetate(DE/EA)로 抽出하여 水溶層과 DE/EA 層으로 分割하여 各 層에 대한 상치 및 벼의 生育抑制程度를 測定한 結果 DE/EA 層

**Table 2.** Inhibitory effect of hexane fraction on lettuce growth.

Time of determination	Hexane fraction (ppm)			Untreated control
	200	500	1000	
	..... % germination <sup>2)</sup> .....			
1 DAT <sup>1)</sup>	48.0	20.0	43.0	35.0
3 DAT	65.0	60.0	60.0	63.0
	..... mg a seedling .....			
5 DAT	9.2	8.5	8.7	7.5

<sup>1)</sup> DAT : days after treatment.

<sup>2)</sup> Average of 20 seeds

이 상치의 發芽 및 生育을 抑制하였으며, 벼의 生育 또한 DE/EA 層이 벼의 제 2엽집의 길이와 뿌리生長을 크게 抑制하여 독활의 活性物質이 DE/EA 層에 存在함을 調査하였다(表 3, 4).

DE/EA 粗活性層을 column chromatography하여 4개의 fractions을 얻어(그림 2) 各 fraction別 상치 및 벼의 生長抑制效果를 調査한 結果 fraction 1과 fraction 2의 1,000 ppm에서 상치 生體重을 90% 이상 抑制하였고 벼의 뿌리生長 또한 各 fraction에서 30% 이상 抑制되어 fraction 1과 fraction 2에 活性物質이 있음을 確認할 수 있었다(表 5).

다시 fraction 1과 fraction 2를 合하여 2차

**Table 3.** Inhibitory effect of water and diethyl ether/ethyl acetate (DE/EA) fraction on lettuce growth.

Time of determination	Water fraction (ppm)			DE/EA fraction (ppm)			Untreated control
	200	500	1000	200	500	1000	
	..... % germination <sup>2)</sup> .....						
1 DAT <sup>1)</sup>	42.5	22.5	30.0	25.0	15.0	27.5	41.3
3 DAT	67.5	37.5	40.0	47.5	35.0	52.5	63.3
	..... mg a seedling .....						
5 DAT	5.5	4.6	5.1	4.8	3.9	3.3	5.3

<sup>1)</sup> DAT : days after treatment.

<sup>2)</sup> Average of 20 seeds

**Table 4.** Inhibitory effect of water and DE/EA fractions on rice (tan-ginbozu) growth.<sup>1)</sup>

Plant characters	Water fraction (ppm)			DE EA fraction (ppm)			Untreated control
	200	500	1000	200	500	1000	
	..... mm <sup>2)</sup> .....						
2nd leaf sheath length	37.8	38.2	37.2	29.4	19.8	9.4	33.6
Root length	29.2	42.8	35.6	62.4	18.4	8.0	33.5
	..... mg .....						
Root Wt.	25.4	21.6	20.0	16.4	6.4	1.2	18.2
Fresh Wt.	53.0	49.0	46.4	46.4	21.8	9.2	45.3

<sup>1)</sup> Determined 7 days after treatment.

<sup>2)</sup> Average of 5 seedlings

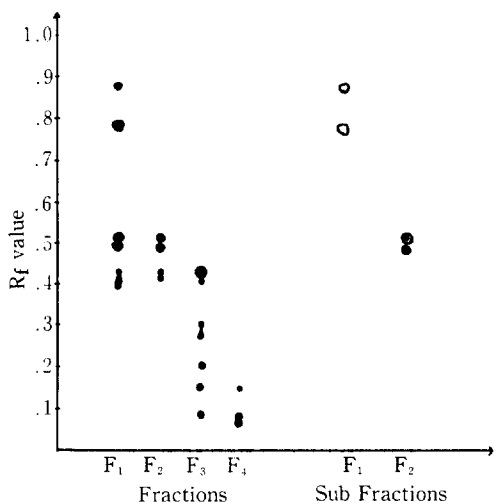


Fig. 2. Spots on the thin layer chromatography in the first and second column chromatography of extracts from *Avalia continentalis*.

column chromatography 하여 두 分割을 나누어 生物檢定한 結果 sub fraction 1에서 보다 sub fraction 2의 化合物에서 上치發芽 및 生育을 크게 抑制하여 sub fraction 2에 抑制物質이 存在함을 알 수 있었다(表 6). 이 sub fraction 2에는 Tlc 상에서  $R_f$  0.51,  $R_f$  0.49 등 2개의 化合物로 나타났으며 上치 生物檢定 結果  $R_f$  0.51 化合物이 1,000 ppm 에서 3日째의 上치發芽를 51%, 5日째의 上치生育을 79% 抑制하여 毒활의 主된 生長抑制物質임을 알 수 있었다(表 7).

毒활로부터 生長抑制物質의 同定: Tlc 상에서 生長抑制物質인  $R_f$  0.51 化合物이  $FeCl_3$  試藥에 검푸른 發色 反應을 보여 이 物質이 phenol 性 物質임을 확인할 수 있었으며(그림 3), UV-spectrum 에서 흡수는 217 nm, 324 nm 이며 324 nm peak 에서 가장 높은 absorbance를 보여 이 化合物은 靑

Table 5. Inhibitory effect of chromatographic fractions on lettuce and rice growth affected by the crude mixture of bioactive compounds extracted from *Avalia continentalis*.

Plant characters	Fractions												Untreated control
	F <sub>1</sub>			F <sub>2</sub>			F <sub>3</sub>			F <sub>4</sub>			
Conc. ppm	200	500	1000	200	500	1000	200	500	1000	200	500	1000	
Lettuce seed	% germination												
1 DAT <sup>1)</sup>	25	0	0	35	12	5	58	45	37	53	45	43	55
3 DAT	60	18	15	88	70	30	93	80	58	95	88	93	97
5 DAT	mg a seedling												
	9.5	1.4	0.9	9.2	9.8	1	16	13	5.7	15	13	13	14
Rice tan-ginbozu <sup>2)</sup>	mm a seedling <sup>3)</sup>												
2nd Leaf													
Sheath	27	27	19	24	27	23	31	27	27	29	29	26	33
Root													
Length	21	13	10	14	14	9	15	13	13	21	16	11	29
	mg a seedling												
Root Wt.	56	40	29	57	38	37	81	41	50	76	73	50	53
Fresh Wt.	81	65	47	83	61	56	117	72	62	104	97	73	81

<sup>1)</sup> DAT : days after treatment

<sup>2)</sup> Determined 7 days after treatment

<sup>3)</sup> Average of 5 seedlings

Table 6. Inhibitory effect of the second column chromatographic fractions on lettuce growth.

Time of determination	Fractions								Untreated control
	Sub fraction 1				Sub fraction 2				
Conc. ppm	100	250	500	1000	100	250	500	1000	
	% germination								
1 DAT <sup>1)</sup>	40.0	40.0	30.0	0.0	30.0	20.0	0.0	0.0	40.0
3 DAT	80.0	79.0	58.0	30.0	48.0	60.0	30.0	20.0	70.0
	mg/a seedling <sup>2)</sup>								
5 DAT	3.1	2.9	2.5	1.0	1.5	1.3	0.9	0.3	4.3

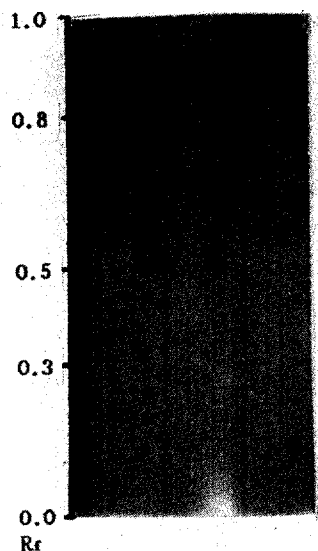
<sup>1)</sup> day after treatment

<sup>2)</sup> Average of 20 seeds

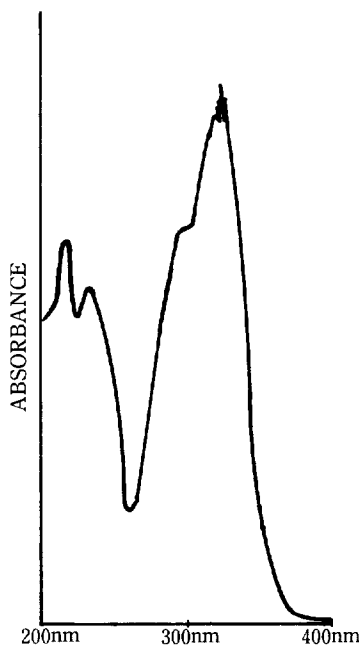
**Table 7.** Inhibitory effect of Sub fraction 2 compounds on lettuce growth

Time of determination Conc. (ppm)	Fractions								Untreated control
	R <sub>f</sub> 0.51				R <sub>f</sub> 0.49				
	100	250	500	1000	100	250	500	1000	
	..... % germination .....								
1 DAT <sup>1)</sup>	55	53	18	0	58	65	55	45	58
3 DAT	83	78	48	43	93	87	88	90	88
	..... mg/a seedling .....								
5 DAT	12	9.8	6.6	2.5	12 3	12	10 9	9.6	12.3

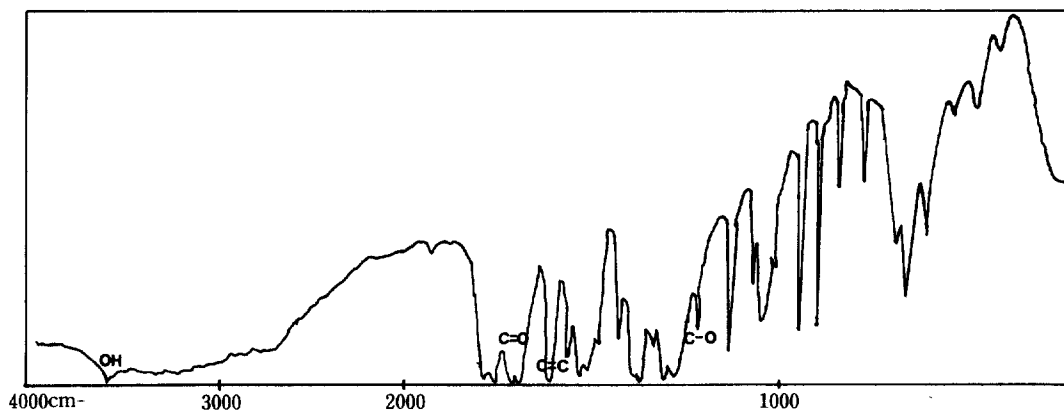
<sup>1)</sup> DAT : days after treatment



**Fig. 3.** The final spot of purified substance on TLC in the second column chromatography from *Aralia continentalis*.



**Fig. 4.** UV-spectrum of a growth inhibiting substance extracted from *Aralia continentalis*.



**Fig. 5.** IR spectrum of a growth inhibiting compound from *Aralia continentalis*.

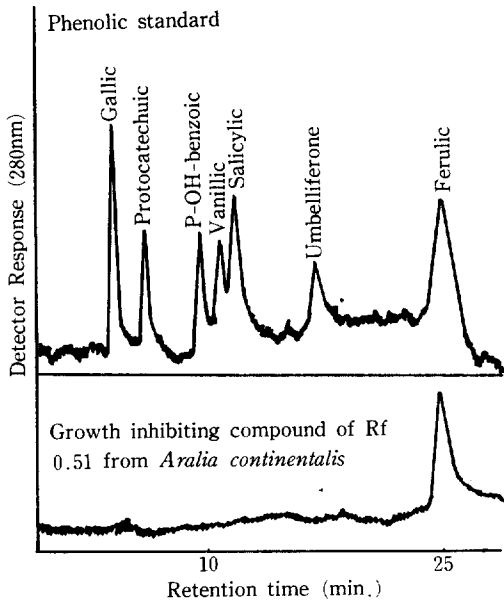


Fig. 6. HPLC chromatogram of a growth inhibiting compound from *Aralia continentalis*

지은 二重結合이 있음을 알 수 있었다(그림 4). IR spectrum은  $3,600\text{ cm}^{-1}$ 에서 OH기,  $1,700\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\text{C}=\text{O}$ ,  $1,600\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\text{C}=\text{C}$ ,  $1,200\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\text{C}-\text{O}$  결합이 確認되었다. 최종적으로 이 물질이 phenol性 物質임을 감안하여 既存의 phenolic standard compounds와 HPLC에서 比較한 結果 retention time 25분대의 ferulic acid( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ )와 一致하여 毒활의 主 活性物質이 ferulic acid임을 同定하였다(그림 5).

以上과 類似한 結果는 여러 研究者들에 依하여 報告된 바 있다. Kimura<sup>4)</sup> 등이 땅콩잎에서 生長抑制物質로 ferulic acid를 分離 報告한 바가 있고, Blum 등<sup>1,2)</sup>은 ferulic acid가 오이 幼苗의 뿌리와 잎의 生育을 抑制한다고 報告하였으며 魏<sup>9)</sup>는 人蔘으로부터 抗酸化物質로서 ferulic acid를 分離 報告한 結果 등에 비추어 보아 毒활이 가진 生長抑制物質이 ferulic acid 이란 점과 一致하는 傾向을 볼 수 있다.

### 摘 要

상치의 生物檢定을 통해 毒활로부터 生長抑制物質을 分離 同定한 結果 TLC 상에서  $R_f$  0.51로 나타났으며 이 물질은 상치 生體重을 70% 抑制하였으며 3%  $\text{FeCl}_3$  (0.5N HCL) 試藥에 검푸른 反應

을 보여 phenol性 物質로 確認되었고 324nm에서 가장 높은 UV 흡수대가 나타났고 IR spectrum에서  $3,600\text{ cm}^{-1}$ 에서 OH기,  $1,700\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\text{C}=\text{O}$ ,  $1,600\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\text{C}=\text{C}$ ,  $1,200\text{ cm}^{-1}$ 에서  $\text{C}-\text{O}$  결합이 確認되었다. HPLC에 의한 同定 結果 retention time 25분대의 ferulic acid( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ )와 一致하여 毒활의 主 抑制物質이 ferulic acid임을 確認하였다.

### 引用 文 獻

1. Blum, U. and B.R. Dalton, 1985. Effect of ferulic acid, an allelopathic compound on leaf expansion of cucumber seedlings growth in nutrient culture. J. Chem. Ecol. 11 : 279-301.
2. Blum, D., B.R. Dalton, and J.O. Rawlings. 1984. Effects of ferulic acid and some of its microbial metabolic products on radicle growth of cucumber. J. Chem. Ecol. 10 : 1169-1191.
3. Egon Stahl, 1969. Thin layer chromatography, A laboratory handbook. pp.854-908.
4. Kimura, Y., K. Takesako, Y. Takahashi & S. Tamura. 1976. Isolation, identification and biological activities of growth inhibitors in peanut. Agr. Biol. Chem. 40(6) : 1183-1187.
5. Kim, K.U., K.W. Back and I.J. Lee. 1990. Development of naturally active compounds from noncultivated plants. Kor. J. Weed Sci. 10(1) : 22-29.
6. Lakbminarayana, G., Pantulu, A.J., Rao, K. S. . 1984. Lipid class and fatty acid composition of young *Amaranthus gangeticus* L. leaves. J. Agric. Food Chem. 32 : 1361-1363.
7. Linskens, H.F. and J.K. Jackson. 1987. High performance liquid chromatography in plant sciences, Modern methods of plant analysis, New series volume 5. pp. 92-10.
8. Sinsaku Natori, Nobuo Ikekawa and Makoto Suzuki. 1981. Advance in natural products chemistry. John Wiley & Sons. pp. 226-228.
9. Wee, Jae Joon. 1989. Isolation and identification of constituents from antioxidant and hematopoetic fractions of *Panax ginseng* C.A. Meyer, Ph. D thesis in Dept. of Food Sci. and Technol., Seoul Nat'l Univ. .