

육두구 (*Myristica fragrans* Houtt)로부터 Phenylpropanoid의 분리

송명종 · 안은미 · 방면호 · 김세영¹ · 노영덕¹ · 권병목² · 이현선² · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터, ¹경희대학교 한방재료가공학과 및 한방재료가공센터, ²한국생명공학연구원

(2004년 3월 29일 접수, 2004년 9월 10일 수리)

Key words: 육두구, meso-dihydroguaiaretic acid, nectandrin B, syringin methyl ether, chitin synthase III, HMG-CoA reductase, ACAT

서 론

육두구는 말레이시아, 인도네시아에서 자생하는 높이 20 m에 달하는 상록교목으로, 한방에서는 그 종인을 약재로 이용하여 왔다.¹⁾ 육두구는 4~6월 및 11~12월에 각 한 번씩 이른 아침에 채취한 성숙한 과실의 종피를 제거한 종인을 석회수에 하루 정도 담가두었다가 불로 건조시켜 약재로 사용한다. 육두구의 약리 효과로는 소화, 위장의 가스 배출, 거담작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 충치예방의 복합제로 사용되기도 한다.²⁾ 주성분으로는 *d*-camphen 및 α -pinene 등으로 이루어진 2~9%의 정유 성분과 지방산인 myristic acid 및 유독성 화합물인 phenylpropanoid계 물질인 myristicin 등이 보고되어 있다.³⁾

본 실험에서 저자 등은, 육두구로부터 활성을 가진 이차대사 산물을 분리하고자 하여, 3종의 phenylpropanoid를 분리동정하였으며, 이 화합물들의 몇가지 효소에 대한 억제활성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험 약재. 육두구는 경동시장에서 구입한 후, 한국생명공학연구원 이형규 박사에게 의뢰하여 동정하였다(KHU03072).

Phenylpropanoid의 분리. 육두구 종인 6 kg을 실온에서 80% methanol(MeOH, 30 l×2)로 추출, 여과하고, 감압 농축하여, MeOH 추출물을 얻었다. 추출물을 물(3 l)에 현탁시킨 후, chloroform(CHCl₃, 3 l), ethyl acetate(EtOAc, 3 l) 및 *n*-butanol(*n*-BuOH, 3 l)로 추출하였고, 각각 감압 농축하여 4개의 분획(MFC, MFE, MFB, MFW)을 얻었다.

n-BuOH 분획(MFB, 14 g)에 대하여, silica gel(200 g) column(7×25 cm) chromatography(c.c.)(CHCl₃-MeOH = 15 : 1 → 10 : 1 → 5 : 1 → 3 : 1 → CHCl₃-MeOH-H₂O = 9 : 3 : 1 → 6 : 4 : 1 → 6 : 5 : 1)를 실시하였고, TLC로 확인하여 유사한 분획을 농축하여 3개의 분획(MFB-1-MFB-3)을 얻었다.

MFB-1 분획(480 mg)을 다시 silica gel(75 g, 3×28 cm) c.c.

(*n*-hexane-CHCl₃-MeOH = 2 : 15 : 1)하여, 3개의 분획(MFB-1-1 ~MFB-1-3)을 얻었다. MFB-1-2 분획(150 mg)을 silica gel(40 g, 3×15 cm) c.c.(*n*-hexane-EtOAc = 3 : 2)하여, 화합물 1(31 mg)과 화합물 2(79 mg)를 분리하였다.

화합물 1, meso-dihydroguaiaretic acid: colorless crystals(*n*-hexane-CHCl₃); m.p. 87-88°C; [α]_D²³ 0° (*c* = 0.7, CHCl₃); IR (KBr, cm⁻¹) 3559, 3371, 3047, 1648, 1592; EI/MS *m/z*(70 eV): 330[M⁺], 192, 183; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 6.81(2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5,5'), 6.65(2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6,6'), 6.61(2H, s, H-2,2'), 3.84(6H, s, -OMe×2), 2.72(2H, dd, *J* = 13.4, 4.8 Hz, H-7a,7a'), 2.28(2H, dd, *J* = 13.4, 9.2 Hz, H-7b,7b'), 1.74(2H, m, H-8,8'), 0.84(6H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9,9'); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ _C) 146.25(s, C-3,3'), 143.47(s, C-4,4'), 133.73(s, C-1,1'), 121.56(d, C-6,6'), 113.91(d, C-5,5'), 111.37(d, C-2,2'), 55.78(q, -OMe×2), 39.11(d, C-8,8'), 38.81(t, C-7,7'), 16.16(q, C-9,9').

화합물 2, nectandrin B: colorless oil; [α]_D²⁰ 0° (*c* = 0.4, CHCl₃); IR(KBr, cm⁻¹) 3556, 3388, 3056, 1640, 1588; EI/MS *m/z*(70 eV): 344[M⁺], 192, 180, 177, 164, 151; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃, δ) 6.95(2H, d, *J* = 1.6 Hz, H-2,2'), 6.89(2H, dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, H-6,6'), 6.85(2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5,5'), 4.50(2H, d, *J* = 6.4 Hz, H-7,7'), 3.85(6H, s, -OMe×2), 2.32(2H, dq, *J* = 6.4, 6.6 Hz, H-8,8'), 1.03(6H, d, *J* = 6.6 Hz, H-9,9'); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ _C) 146.86(s, C-3,3'), 145.06(s, C-4,4'), 133.26(s, C-1,1'), 118.85(d, C-5,5'), 109.42(d, C-2,2',6,6'), 87.18(d, C-7,7'), 55.38(q, -OMe×2), 43.89(d, C-8,8'), 12.41(q, C-9,9').

MFB-2 분획(580 mg)에 대하여 silica gel(100 g, 4×18 cm) c.c.(CHCl₃-MeOH-H₂O = 12 : 3 : 1)를 수행하여 화합물 3(18 mg)을 분리하였다.

화합물 3, syringin methyl ether: yellowish crystals(*n*-hexane-CHCl₃); m.p. 191-192°C; [α]_D²⁰ -18° (*c* = 0.9, CHCl₃); IR(KBr, cm⁻¹) 3560, 3391, 3030, 1650, 1589; EI/MS *m/z*(70 eV): 386[M⁺], 372, 285, 254, 211, 192, 183; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD, δ) 6.72(2H, s, H-2,6), 6.52(1H, dt, *J* = 15.6, 1.2 Hz, H-7), 6.30(1H, dt, *J* = 15.6, 5.6 Hz, H-8), 4.84(1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-1'), 4.20(2H, dd, *J* = 5.6, 1.2 Hz, H-9), 3.83(6H,

*연락처자

Phone: 82-31-201-2661; Fax: 82-31-201-2157

E-mail: nibaek@khu.ac.kr

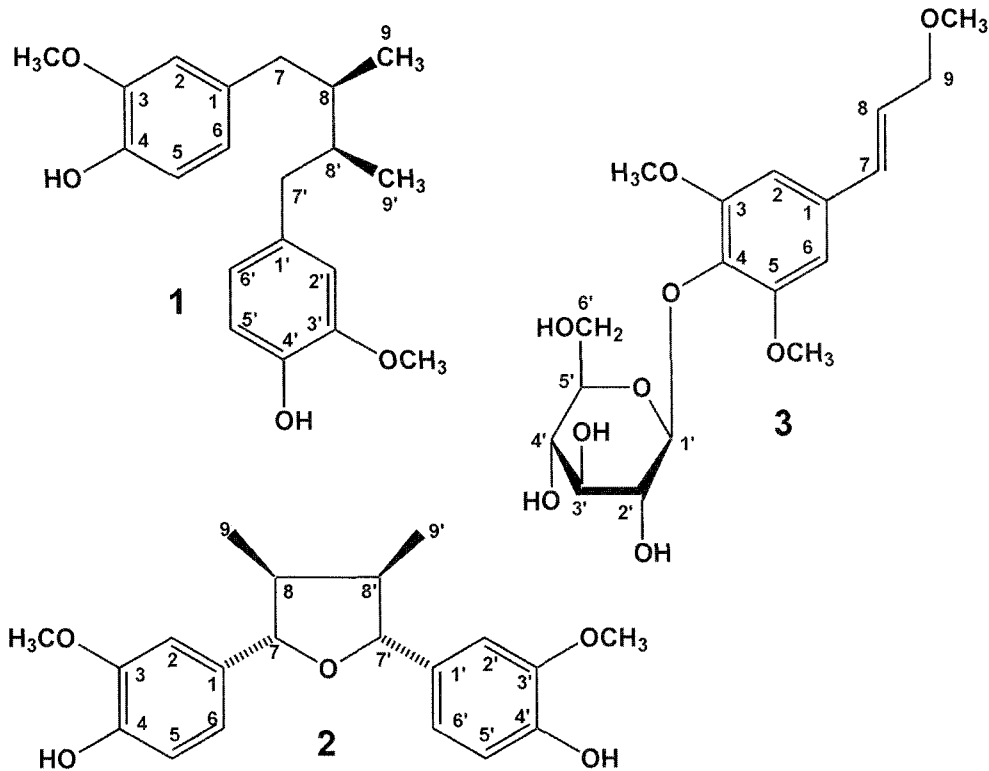


Fig. 1. Chemical structures of phenylpropanoids from *Myristica fragrans* Houtt.

s, C3/5-OMe), 3.32(3H, s, C9-OMe); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃, δ_c) 154.16(s, C-3,5), 135.67(s, C-4), 135.11(s, C-1), 131.13(d, C-8), 129.89(d, C-7), 105.30(d, C-2,6), 105.20(d, C-1'), 78.30(d, C-3'), 77.75(d, C-5'), 75.65(d, C-2'), 71.25(d, C-4'), 63.54(t, C-6'), 62.50(t, C-9), 56.98(q, C3/5-OMe), 49.85(q, C9-OMe).

결과 및 고찰

육두구의 종인을 80% MeOH로 추출하였고, 얻어진 추출물을 용매의 극성에 따라 CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH와 H₂O로 분배 추출하였다. *n*-BuOH 분획을 용매를 달리해가며 column chromatography를 반복하여 3종의 phenylpropanoid, 화합물 1(31 mg), 2(79 mg) 및 3(18 mg)을 분리, 정제하였다.

화합물 1은 ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) spectrum에서 대칭적인 2개의 phenyl기를 이루는 탄소[δ_c 146.25(s), 143.47(s), 133.73(s), 121.56(d), 113.91(d), 111.37(d)] 및 2개의 methoxy(δ_c 55.78)와 고자장 영역에서 2개의 methine(δ_c 39.11), 2개의 methylene(δ_c 38.81), 2개의 methyl(δ_c 16.16) signal이 관측되어 2개의 phenylpropanoid가 결합한 lignan으로 판명되었다. ¹H-NMR spectrum(400 MHz, CDCl₃)에서도, 1,3,4-삼치환 벤젠 유래의 대칭적인 6개의 olefine methine[(δ 6.81, d, *J*=8.0 Hz), (δ 6.65, d, *J*=8.0 Hz), (δ 6.61, s)], 2개의 methoxy(δ 3.84, s), 2개의 methine(δ 1.74), 2개의 methylene(δ 2.72, 2.28), 2개의 methyl(δ 0.84) signal이 관측되었다. 이상의 결과를 문헌값⁴⁾과 비교하여 화합물 1을 *meso*-dihydroguaiaretic acid, 로 동정

하였다. 화합물 1은 이번에 저자 등에 의해서 육두구에서는 처음으로 분리되었다.

화합물 2는 ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) spectrum에서 대칭적인 2개의 phenyl기를 이루는 탄소[δ_c 146.86(s), 145.06(s), 133.26(s), 118.85(d), 109.42(d)(×2)] 및 2개의 methoxy(δ_c 55.38)와 2개의 oxygenated methine(δ_c 87.18), 고자장 영역에서의 2개의 methine(δ_c 43.89), 2개의 methyl(δ_c 12.41) signal이 관측되어 2개의 phenylpropanoid가 결합한 lignan으로 판명되었다. ¹H-NMR spectrum(400 MHz, CDCl₃)에서도, 1,3,4-삼치환 벤젠 유래의 대칭적인 6개의 olefine methine[(δ 6.95, d, *J*=1.6 Hz), (δ 6.89, d, *J*=8.1 Hz), (δ 6.85, dd, *J*=8.1, 1.6 Hz)], 2개의 methoxy(δ 3.85), 2개의 oxygenated methine(δ 4.50), 고자장 영역에서의 2개의 methine(δ 2.32), 2개의 methyl(δ 1.03) signal이 관측되었다. 이상의 결과를 문헌값²⁾과 비교하

Table 1. Inhibitory activities of phenylpropanoids isolated from *Myristica fragrans* Houtt on ACAT, HMG-CoA reductase and chitin synthase III

	ACAT (100 µg/ml)**	HMG-CoA reductase (200 µg/ml)**	Chitin synthase III (140 µg/ml)**
compound 1	60.0±1.2%	12.2±0.2%	42.6±0.9%
compound 2	-	-	-
compound 3	27.2±0.9%	-	45.5±0.8%
Phytol*	93.2±2.1%		

*Diterpenoid, which was used as a positive control, was isolated from the leaves of *Lactuca sativa* L.⁷⁾

**Treatment condition

여 화합물 2를 nectandrin B로 동정하였다.

화합물 3은 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) spectrum에서 1,3,4,5-사치환 벤젠 유래의 탄소 [δ_{C} 154.16(s)($\times 2$), 135.67(s), 135.11(s), 105.30(d)($\times 2$)] 및 1개의 이중결합을 이루는 methine 탄소 [δ_{C} 131.13(d), 129.89(d)]와 D-glucopyranose 유래의 탄소 [δ_{C} 105.20(d), 78.30(d), 77.75(d), 75.65(d), 71.25(d), 63.54(t)] 및 1개의 oxygenated methylene(δ_{C} 62.50), 3개의 methoxy [δ_{C} 56.98($\times 2$), 49.85] signal이 관측되어 phenylpropanoid의 glucose 배당체로 판명되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum(400 MHz, CDCl_3)에서도, 1,3,4,5-사치환 벤젠 유래의 olefine methine(δ 6.72($\times 2$), 6.52, 6.30), 당의 anomeric methine(δ 4.50), 다수의 oxygenated methine 및 oxygenated methylene(δ 3.17~3.86), 3개의 methoxy(δ 3.83, s)($\times 2$), (δ 3.32, s)] signal이 관측되었다. $^1\text{H-NMR}$ 에서 anomeric 수소 signal(δ 4.50)의 coupling constant가 8.8 Hz로 관측되었으므로, 당은 β -결합하고 있는 것으로 판명되었다. 이상의 결과를 문헌값⁵⁾과 비교하여 화합물 3을 syringin methyl ether로 동정하였다.

화합물 2, 3은 육두구에서 잘 알려진 물질이다. 특히, 화합물 2인 nectandrin B는 육두구의 대표적인 물질로 알려져 있으며, methyl 및 phenyl기의 배향에 따라 다양한 이성질체를 이룬다.²⁾ 또한, 화합물 3은 육두구 뿐만 아니라, 다양한 식물에서 분리 보고되고 있는, 주요한 phenylpropanoid 화합물이다. 그러나, 화합물 1은 육두구에서는 이번에 처음으로 분리되었다.

분리된 화합물들에 대하여 콜레스테롤의 생합성 및 흡수에 관계하는 ACAT과 HMG-CoA reductase, 또한 항균활성과 관련된 chitin synthase III 활성 저해 효과를 측정하였다(Table. 1).

ACAT 활성⁶⁾ 실험에서, 각 화합물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때, 화합물 1이 $60.0 \pm 1.2\%$, 화합물 3이 $27.2 \pm 0.9\%$ 각각 저해하는 것으로 나타났다. 장 등⁷⁾이 상추에서 분리 보고한 ACAT 억제활성물질인 phytol의 $93.2 \pm 2.1\%$ 억제 활성과 비교할 때, 비교적 낮은 활성이지만, 화합물 1은 다른 화합물에 비해 상대적으로 높은 억제활성을 보였다. HMG-CoA reductase 활성⁸⁾에 대해서는, 각 화합물을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때, 화합물 1만이 $12.2 \pm 0.2\%$ 를 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 항균활성과 관련하여 chitin synthase III 억제 활성⁹⁾을 측정할 결과, 각 화합물을 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때, 화합물 1이 $42.6 \pm 0.9\%$, 화합물 3이 $45.5 \pm 0.8\%$ 로 억제하는 것으로 나타났다. 이 결과는, 정 등⁹⁾이 잘 알려진 화합물인 ursolic acid와 oleanolic acid가 280 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 20.0% 정도의 억제활성을 갖는다고 보고한 것과 비교하여, 상대적으로 높은 억제 활성을

갖는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업과 경희대 식물대 사연구센터(한국과학재단)에서 지원하는 연구비로 수행되었음.

참고문헌

1. Herath, H. M. T. and Priyadarshani, A. M. A. (1996) Lignans from *Myristica dactyloides*. *Phytochemistry* **44**, 699-703.
2. Hattori, M., Hada, S., Kawata, Y., Tezuka, Y., Kikuchi, T. and Namba, T. (1987) New 2,5-bis-aryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran lignans from the aril of *Myristica fragrans*. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3315-3322.
3. Harborne, J. B., Heywood, V. H. and Williams, C. A. (1969) Distribution of myristicin of the Umbelliferae. *Phytochemistry* **8**, 1729-1732.
4. Filleur, F., Bail, J. C., Duroux, J. L., Simon, A. and Chulia, A. J. (2001) Antiproliferative, anti-aromatase, anti-17 β -HSD and antioxidant activities of lignans isolated from *Myristica arentea*. *Planta Med.* **67**, 700-704.
5. Sugiyama, M., Nagayama, E. and Kikuchi, M. (1993) Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Osmanthus asiaticus*. *Phytochemistry* **33**, 1215-1219.
6. Ericson, S. K., Shrewbery, M. A., Brooks, C. and Meyer, D. J. (1980) Rat liver acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase: its regulation *in vivo* and some of its properties *in vitro*. *J. Lipid Res.* **21**, 930-941.
7. Jang, T. O., Bang, M. H., Song, M. Ch., Hong, Y. H., Kim, J. Y., Chung, D. K., Pai, T. K., Kwon, B. M., Kim, Y. K., Lee, H. S., Kim, I. H. and Baek, N. I. (2003) Development of biologically active compounds from edible plant sources-V. Phytol, ACAT (acyl-coA:cholesterol acyltransferase) inhibitory diterpenoid from the leaves of *Lactuca sativa* L. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 267-270.
8. Kleisek, D. A., Dugan, R. E., Baker, T. A. and Porter J. W. (1981) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. *Methods Enzymol.* **71**, 462-479.
9. Jeung, T. S., Hwang, E. I., Lee, H. B., Lee, E. S., Kim, Y. K., Min, B. S., Bae, K. H., Bok, S. H. and Kim, S. U. (1999) Chitin synthase III inhibitory activity of ursolic acid isolated from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Med.* **65**, 261-263.

Phenylpropanoids from *Myristica fragrans* Houtt

Myoung-Chong Song, Eun-Mi Ahn, Myun-Ho Bang, Se-Young Kim¹, Yeong-Deok Rho¹, Byoung-Mog Kwon², Hyun-Sun Lee² and Nam-In Baek* (*Biotechnology Graduate School & Plant Metabolism Research Center, ¹Department of Oriental Medicinal Materials · Processing & Oriental Medicinal Materials · Processing Center, KyungHee University, Suwon 449-701, Korea, ²Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea*)

Abstract: *Myristica fragrans* Houtt were extracted in 80% aq. MeOH and solvent fractionated using CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH and water, successively. The *n*-BuOH fraction gave three phenylpropanoids through application of silica gel column chromatographies. The chemical structures of the phenylpropanoids were determined by the interpretation of several spectral data, including NMR and MS as *meso*-dihydroguaiaretic acid (**1**), nectandrin B (**2**) and syringin methyl ether (**3**). Compound **1**, which was first isolated from this plant by authors, showed inhibitory activities with 60.0±2.1% (100 µg/ml), 42.6±0.9% (140 µg/ml) and 12.2±0.2% (200 µg/ml) on ACAT(acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase), chitin synthase III and HMG-CoA reductase (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase), respectively. Compound **3** showed inhibitory activities with 27.2±0.9% (100 µg/ml), 45.5±0.8% (200 µg/ml) on ACAT and chitin synthase III.

Key words: *Myristica fragrans* Houtt, *meso*-dihydroguaiaretic acid, nectandrin B, syringin methyl ether, chitin synthase III, HMG-CoA reductase, ACAT

*Corresponding author