

한국산 초피의 어독성분에 관한 연구

김용두[†] · 강성구* · 오명록

순천대학교 식품공학과

*경상대학교 식품공학과

A Study on the Ichthyotoxic Constituents of Chopi (*Zanthoxylum piperitum* DC)

Yong-Doo Kim[†], Seong-Koo Kang* and Myoung-Rok Oh

Dept. of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

To study an ichthyotoxicity of *Zanthoxylum piperitum* DC (Chopi) against fish (*Misgurnus anguillicaudatus*), the bark of Chopi was extracted with water, methanol and chloroform. The ichthyotoxicities of each extract were found in order of MeOH extract, H₂O extract, dried-powder of Chopi and CHCl₃ extract. The active compound was isolated from the MeOH extract by silica gel column chromatography, HPLC and recrystallization, successively, and it was identified to be L-asarinin by the comparison of UV, GC-Mass and LC-Mass data.

Key words : ichthyotoxicity, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Zanthoxylum piperitum* DC, L-asarinin

서 론

초피나무는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 동북 아시아에 널리 자생하는 운향과 산초나무속에 속하는 낙엽관목으로 과피, 수피 및 뿌리 등에 독특한 신미와 정유성분이 함유되어 있어 동북아시아에서 가장 오래된 전통적인 향신료와 약용으로 널리 사용되어 왔다¹⁻³⁾.

우리나라의 초피의 사용 역사는 17세기 말엽의 요록(要錄)이란 문헌에 의하면 고추 대신 초피가 향신료로 사용되었다고 전하는 것으로 보아 고추 도입 이전부터 향신료로 사용되었던 것으로 추정된다⁴⁾. 초피의 새잎은 국에 넣어 먹고, 종실은 팥아 추어탕 등에 넣어 생선의 비린 냄새를 완화시키고, 김치에 넣어서 생김치의 풋 냄새를 없애는데 주로 이용하고 있을 뿐만 아니라, 의약품으로서 한방, 서양의학 그리고 민간약 등의 분야에서도 방향성건위, 소염, 이뇨, 구충제 등으로 사용하고 있다⁴⁻⁶⁾. 그 외에도 해독살충약으로도 사용하고 있으며 일부 지방에서 수피를 건조시킨 분말로 물

고기를 잡는데 사용하고 있다^{7,8)}.

그러나 이와 같은 초피나무에 대한 연구는 권 등⁹⁾의 산초류 생약의 성분검색, 김 등¹⁰⁾의 방향성분, 정¹¹⁾의 신미성분, Yasuda 등¹²⁾의 정유성분, Aihara¹³⁾의 sanshool에 관한 보고 등이 있으나 어독성에 대해서는 경험적으로만 익히 알고 있을 뿐, 물고기를 죽이는 원인과 이에 관련된 인자에 대한 체계적인 연구는 되어 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 초피나무에 존재하는 어독성의 물질을 확인하기 위해 용매별로 추출하여 물고기에 대해 어독성을 실험하였으며, 초피나무로부터 어독성분을 조사 구명하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 초피나무는 전남 승주군 조계산에서 5~10년생 초피나무의 수피를 건조시켜 분말로 하여 시료로 사용하였고 어독성 확인에 사용된 물고기는 체중이 약 2g정도인 미꾸라지를 사용하였다. 사용한

[†]To whom all correspondence should be addressed

물은 수도물을 24시간 방치 후 사용하였다.

어독성 물질의 추출과 확인

Fig. 1과 같이 음건된 초피분말 500g을 상온에서 증류수 2L로 6시간씩 3회 교반추출하여 여과한 추출여액을 50°C에서 감압농축하여 물추출물로 하였고, 물로 추출하고 남은 잔사는 다시 계속해서 2L의 methanol로 6시간씩 3회 교반추출하여 얻어진 methanol여액을 50°C에서 감압농축하여 methanol추출물로 하였으며 그 잔사를 2L의 chloroform으로 3회 6시간씩 교반 추출한 추출여액을 50°C에서 감압농축하여 chloroform 추출물로 하였다.

Methanol로 추출된 시료는 methanol의 농도가 10%가 되도록 물을 가하여 24시간 동안 4°C에서 방치한 후 원심분리하여 침전물을 다시 methanol에 용해시켰다. 이와 같은 조작을 3회 반복 실시 한 후 시료로 사용하였다.

각 추출물의 어독성 검색은 1L의 beaker에 수도물을 500ml씩 넣고 미꾸라지 3마리를 넣은 후 추출액 0.1ml, 건조분말 0.5g 그리고 추출잔사 0.5g을 첨가하고 미꾸라지가 죽는 시간을 측정하였으며, 이때 추출용매 자체의 어독성을 확인하기 위해서 각각의 추출용매를 시험구와 같은 양 첨가하여 비교 측정하였다.

어독성 물질의 분리는 직경 3cm × 30cm의 유리 column에 활성화된 silica gel을 충전하고 추출액 1ml

를 주입하고 75% methanol로 용출시켜 분취기를 사용하여 2ml씩 분취하고 각각의 분취에 대하여 어독성을 확인 하였다. 어독성이 강한 분취를 자외선분광기를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

어독성이 확인된 분취를 membrane filter (0.45 μ m)로 여과하고 HPLC를 사용하여 다시 분리하여 각각의 peak에 대해 어독성을 조사하였다. HPLC 분석조건은 column μ -bondapak C₁₈, solvent 75% methanol 및 detector 280nm에서 측정하였다.

어독성 물질의 확인은 column chromatography에서 어독성이 확인된 분취를 HPLC에서 나타난 chromatogram과 LC-Mass (5989A LC-Mass, HP Co.)에서 나타난 chromatogram을 비교하여 동일 peak를 추적하여 확인 하였다. 이때 LC-Mass 분석에 사용된 column은 ODS hyperosil (2.1mm × 100mm)이며 solvent는 methanol 70%, flow rate는 0.4ml/min로 하였으며, LC-Mass의 interface는 particle beam으로 EI mode에서 50 m/z~500m/z까지 scanning 하였고 mass spectrum을 Willy library와 비교 확인 하였다.

HPLC에서 어독성이 확인된 peak를 분취하여 GC-Mass에서 분리 확인 하였다. 분석에 사용된 기기는 5970B GC-Mass (HP Co.)로 column은 ultra-2 (25m × 0.2mm)이고 oven temp.는 60°C~180°C로 분당 5°C씩 상승 시켰으며 50m/z~500m/z까지 scanning 하였고 TIC mode로 검출하였고 mass spectrum을 Willy

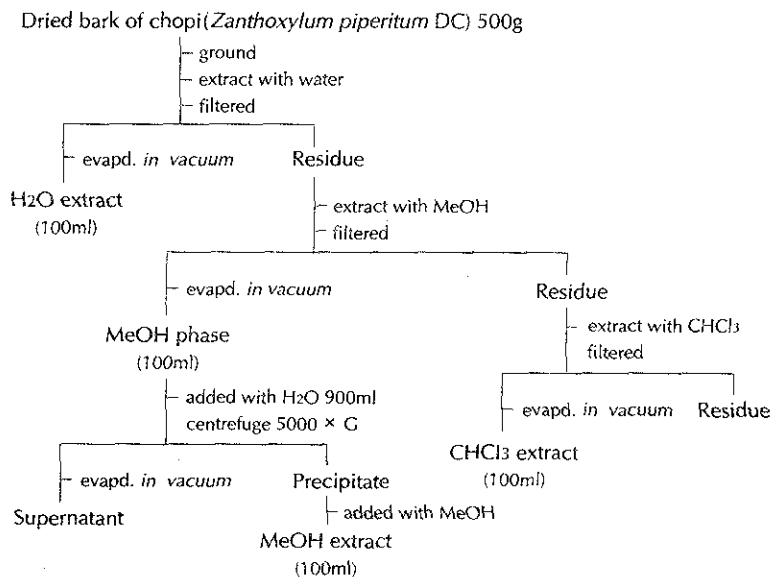


Fig. 1. Extraction of Chopi (*Zanthoxylum piperitum* DC).

library와 비교 확인 하였다.

결과 및 고찰

추출물의 어독성

초피를 물, methanol 및 chloroform으로 추출하여 얻은 추출물과 추출잔사 그리고 초피의 건조분말로 미꾸라지에 대한 어독성을 검색한 결과는 Table 1과 같다. 즉, methanol추출물이 1분 10초로 가장 강한 어독성을 보였으며, 물추출물은 4분 30초, 건조분말은 6분 30초, chloroform추출물은 7분 5초로 각각 나타났으나 추출잔사에서는 반응이 없었다. 이때 추출용매 자체의 어독성을 확인한 결과, 본 실험에 사용된 농도에서는 별 영향이 없는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 어독성물질이 물에 소량 용해되고 methanol에는 잘 녹는 물질이며 chloroform 추출물은 물에 잘 용해되지 않는 것으로 판명되었다.

또한 methanol추출액에 물을 가하여 methanol농도가 10%로 되게 조절하여 4°C에서 24시간 방치한 후, 생성된 고형분을 원심분리하여 상등액과 침전물을 같은 방법으로 독성실험을 한 결과, 침전물은 1분 10초를 나타낸 반면 상등액은 2분 30초로 침전부분이 더 강한 독성을 갖고 있었다. 그리고 침전과정을 반복 되풀이 함으로서 유탁현상의 색이 점점 유백색으로 변화 되었으며 어독성이 강한 분획일수록 백탁현상이 강하게 나타났다.

Column chromatography법으로 분획을 하여 물고기 에 어독성을 측정 한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다.

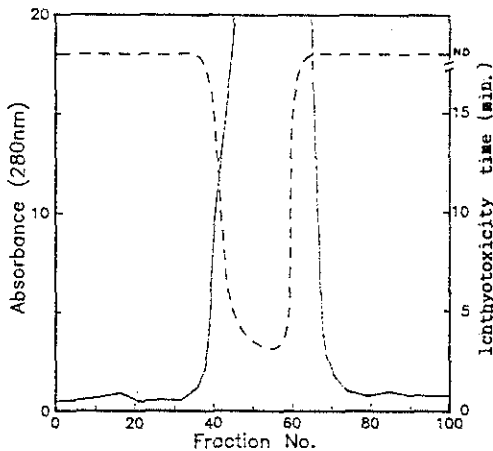


Fig. 2. Ichthyotoxicity and absorbance for each fractions of methanol extract separated by the silica gel column chromatography. ND : not detected — ; absorbance, --- ; ichthyotoxicity

즉 column을 통과 시킨 200개의 분획 중에서 40번부터 68번까지의 분획에서 어독성이 확인되었으며 51~57번 분획에서 3분 14초로 나타나 가장 강한 어독성을 보였다. 또한 각 분획의 흡광도를 측정 한 결과는 30번 분획에서 부터 흡광도가 증가하여 100까지 흡광도가 나타나 어독성이 확인된 40번 부터 68번까지가 이 범위에 들어 있어 어독성과 흡광물질이 상관 관계가 있는 것으로 나타났다.

어독성이 강한 fraction부분을 자외선광도계로 흡수 극대값을 측정 한 결과는 250nm~285nm까지 흡수를 보였고, 275nm에서 가장 강한 흡광도를 보였다.

Column chromatography에서 분취하여 어독성이 강한 fraction을 HPLC를 사용하여 다시 분리한 결과 8개의 peak가 검출되었고, 분리 형태는 Fig. 3과 같다. 또한 이들 peak를 각각 분취하여 어독성을 확인한 결과는 Table 2에 나타낸 바와 같다. 즉 4번 peak에서 7초, 5번 peak에서 10초로 각각 어독성이 확인 되었으나 다른 peak에서는 미꾸라지가 전혀 죽지를 않아 독성이 없는 것으로 나타났다. 어독성이 확인된 이들 두 peak를 각각 감압농축한 결과 무색 침상의 결정을 얻을 수 있었다.

Table 1. Ichthyotoxicity for solvent extracts of bark of *Z. piperitum* against *M. anguillicaudatus*

	Water extract	Methanol extract	Chloroform extract	Residue	Dried-powder of chopi
Death time (sec.)	270	70	445	-*	390

*Not detected

Table 2. Ichthyotoxicity of each peaks of the methanol extract separated by the HPLC

Peak No.	Control	1	2	3	4	5	6	7	8
Death time (sec.)	-*	-	-	-	7	10	-	-	-

*Not detected

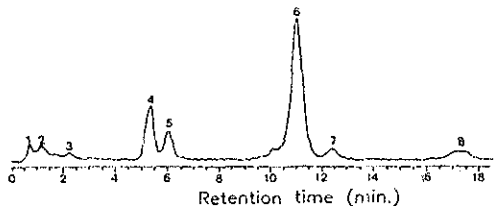


Fig. 3. HPLC chromatogram of active fractions No. 40~68 of the methanol extract separated by the silica gel column chromatography.

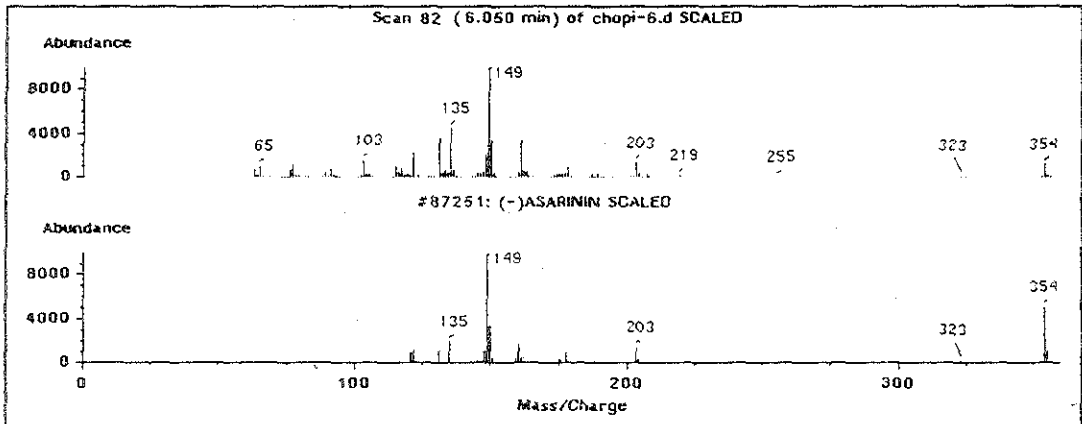


Fig. 4. LC-Mass spectra of peak 5 and (-)-asarinin standard.

HPLC를 사용하여 다시 분리한 8개의 peak 중 어독성이 확인된 5번 peak를 LC-Mass에서 그 물질을 확인한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같으며, 어독성이 강한 4번과 5번 peak의 mass spectrum은 각각 65, 77, 135, 149, 203, 228 및 354m/z와 65, 77, 135, 149, 203 및 354m/z 등이 검출되어 이들 두 peak는 이성질체로 생각되었고, mass에 내장된 Willy library와 비교 확인한 결과 asarinin으로 확인되었다.

또한 HPLC에서 분취한 4, 5번 peak를 GC-Mass에 물질 확인한 결과 mass spectrum은 65, 77, 135, 149, 203 및 354m/z 등이 검출되어 이 두 peak는 GC-Mass 분석에서도 LC-Mass에서와 같이 (-)-asarinin일 확율이 89~95%로 나타났다.

초피의 asarinin은 Abe 등¹⁴이 보고한 바 있다. 정제된 초피추출물의 여러가지 이화학적 특성과 spectra data가 기지물질인 asarinin과 일치하나 본 실험을 통해 밝혀진 초피의 어독성분은 살충성분에 관한 연구와 함께 후속적인 확인 연구가 진행중에 있다.

요 약

한국산 초피나무의 물고기에 대한 독성력을 확인하기 위하여 물질을 용매추출, silica gel column chromatography와 재결정을 통하여 분리 정제하였다. 추출물의 물고기에 대한 독성실험 결과, methanol 추출물에서 가장 강한 독성이 나타났으며, 그 다음으로는 물추출물, 초피의 건조분말 그리고 chloroform추출물 순서로 독성을 보였다. 이 추출물의 구조를 기기분석을 통해 해석한 결과 L-asarinin임을 확인하였다.

문 헌

1. 이성우 : 한국 전통식생활의 탐색. 한국식품과학회지, 12(4), 52(1979)
2. 한국동식물도감 : 식물편. 문교부, Vol.15, p.28(1974)
3. 윤환교, 김지문 : 입산초나무 종실의 유지 및 단백질 조성에 관한 연구. 충남대학교 농업 기술연구보고, 3(2), 170(1976)
4. 한희자 : 한국산 초피와 산초의 과피 및 종자의 성분에 관한 연구. 한양대학교 대학원 박사학위논문(1988)
5. 김홍선, 유경수 : 왕초피나무 *Xanthoxylum coreanum* Nakai과피의 생약학적 연구(1). 생약학회지, 1, 4(1970)
6. 이원호 : 약초재배법과 야생약초의 이용법. 장학을판사, p.241(1976)
7. 相原 博, 鈴木 猛 : 山椒の成分に就いて(第5報) 殺蟲及び成分. 藥學雜誌, 71, 1323(1951)
8. 정명현 : 식물약품화학. 삼성출판사, p.37(1980)
9. 권창호, 홍남두, 김장민 : 산초류 생약의 성분 검색. 생약학회지, 4(4), 209(1973)
10. 김정환, 이경석, 오원택, 김경례 : 초피 (*Zanthoxylum piperitum* DC)의 과피와 잎의 방향 성분. 한국식품과학회지, 21(4), 562(1989)
11. 정현숙 : 한국산 초피 (*Zanthoxylum piperitum* DC)의 신미 및 정유성분에 관한 연구. 전남대학교 대학원 석사학위논문(1984)
12. Yasuda, I., Takeya, K. and Itokawa, H. : Evaluation of Chinese *Zanthoxylifructus* commercial available in Japan by pungent principles and essential oil constituents. *Shoyakugaku Zasshi*, 36(4), 301(1982)
13. Aihara, T. : On the principles of *Xanthoxylum piperitum* DC. IV. On the structure of sanshoamide. *Yakugaku Zasshi*, 71, 1112(1951)
14. Abe, F., Yahara, S., Kubo, K., Nohara, G., Hikaru, O. and Nishioka, I. : Studies on *Xanthoxylum* spp. Constituentis of the bark of *Xanthoxylum piperitum* DC. *Chem. Pharm. Bull.*, 22(11), 2650(1974)

(1993년 7월 2일 접수)