

비목나무 (*Lindera erythrocarpa*) 잎으로부터 항진균성 활성물질의 분리

최용화* · 권순열 · 김진호 · 백남인¹ · 최경자² · 조광연² · 이병무³

상주대학교 식물자원학과, ¹경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터,

²한국화학연구원 생물화학연구부, ³농업과학기술원 농약안전성과

(2003년 3월 6일 접수; 2003년 4월 24일 수리)

비목나무 잎의 메탄올 추출물을 *n*-hexane, ethylacetate, *n*-butanol, H₂O로 순차적으로 용매분획하였다. Ethylacetate 분획으로부터 silica gel chromatography를 반복하고 재결정하여 활성물질을 분리·정제하였다. 화합물은 NMR과 MS의 기기분석 결과 methyllicidone의 입체이성질체 혼합물로 구조결정 되었다. 이 혼합물은 밀 붉은녹병에 대하여 50 µg/ml에서 85%의 방제효과를 나타내었다.

Key words: 비목나무, 밀 붉은녹병, *Puccinia recondita*, 항진균활성, methyllicidone

서 론

병해충 및 잡초의 방제를 위하여 널리 사용되어온 유기합성 농약은 지속적이고 광범위한 사용으로 인하여 환경오염, 저항성 출현, 인축독성 등의 문제를 야기해 왔다.¹⁻³⁾ 이러한 유기합성농약의 문제점을 극복하기 위한 방법으로 저항성 품종 개발, 경종적 방제, 생물적 방제, 천연물 농약 개발 등이 이용되고 있다.⁴⁻⁷⁾ 특히 천연물 유래 활성물질은 그 활성성분 자체뿐만 아니라 그 골격을 이용하여 새로운 농약개발을 위한 lead compound로서 이용 가치가 높다.^{8,9)}

최근 식물유래의 생리활성물질에 대한 관심이 높아지고 있으며, 식물유래의 물질들이 항생, 항암, 첨가물 등 다양한 분야에서 이용되고 있다. 오늘날 사용되고 있는 의약품의 절반 이상이 천연자원 유래의 천연물질이며 그 중에서도 고등식물에서 유래한 것이 약 25%를 차지하고 있다.¹⁰⁾ 식물체는 다양한 방어기능물질을 건조중량의 10%까지 함유하고 있으며,¹¹⁾ 그 중 가장 보편적으로 이용되고 있는 저분자 항균물질은 alkaloids, flavonoids, terpenoids, phenolic compounds, quinones 및 volatile oil 등의 2차 대사산물이거나 또는 그 유연체들로 알려져 있다.^{12,13)}

필자는 국내 자생식물체를 대상으로 식물병에 대하여 *in vivo* 살균활성을 검토한 결과 비목나무(*Lindera erythrocarpa*)의 용매 추출물이 강한 항진균 활성을 갖고 있다고 이미 보고하였다.¹⁴⁾ 또한 최 등¹⁵⁾도 목본식물 218종을 대상으로 항균활성을 조사한 결과 비목나무가 강한 항진균활성을 갖고 있다고 보고하였다.

비목나무는 녹나무과(*Lauraceae*) 식물로 세계적으로 45속 1,500여종이 분포하고 우리나라에는 6속 12종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 비목나무는 자웅이주로 4월에서 5월에

연한 황색의 꽃이 피고 9월에 8 mm 정도의 적색열매를 맺는다. 한국의 남부지방을 비롯하여 일본, 중국의 따뜻한 지역에 자생하는 높이 5m의 낙엽수이다. 건조된 열매는 특이한 방향과 쓴맛을 가지고 있어 일본에서는 위장약과 신경통의 진통제로 사용되고 있다.¹⁷⁾

녹병은 담자균류의 녹병균목(*Uredinales*)에 속하는 활물기생균인 *Puccinia* spp., *Uromyces* spp., *Aecidium* spp., *Gymnosporangium* spp. 속에 의해 발생하는 병으로 가장 무서운 식물병의 하나이다. 잎 또는 줄기에 황색 및 갈색의 가루를 내는 병반이 생기는 녹병은 밀과 귀리, 보리 등 식량 작물, 채소, 관상식물 및 수목 등에 발생하여 경제적으로 큰 피해를 주고 있다. 특히 *Puccinia* spp.는 밀 등의 줄기녹병(*P. graminis*), 밀, 보리, 호밀 누런녹병 혹은 줄녹병(*P. striiformis*), 밀과 호밀의 잎녹병 혹은 붉은녹병(*P. recondita*), 보리의 잎녹병 또는 좁은 녹병(*P. hordei*), 귀리의 관녹병(*P. coronata*), 옥수수 녹병(*P. sorghi*), 조 녹병(*P. purpurea*), 사탕수수 녹병(*P. saccharo*) 등 매우 파괴적인 병을 일으킨다. 뿐만 아니라 *Puccinia* 속은 목화(*P. staknani*), 아스파라거스(*P. asparagi*), 국화(*P. chrysanthemi*), 금어초(*P. antirrhini*) 등에도 심한 녹병을 일으키고 있다.

비목나무 유래의 항진균물질을 구명하기 위하여 비목나무 잎을 MeOH로 추출하여 용매분획과 chromatograph로 분리·정제하여 활성 화합물을 얻었다. 이 화합물에 대하여 NMR과 MS 분석 기법을 이용하여 화학적 구조를 결정하였고 밀 붉은녹병에 대한 방제효과를 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 연구에 사용된 비목나무(*Lindera erythrocarpa*) 잎은 2001년 8월 전북 완주군 구이면 소재 모악산에서 채취하였다.

시약 및 기기. ¹H-(400 MHz) 및 ¹³C-NMR(100 MHz) 스

*연락저자

Phone: 82-54-530-5201, Fax: 82-53-530-5201

E-mail: yhchoi@sangju.ac.kr

펙트럼은 Varian 의 Unity Inova로, IR 스펙트럼은 Perkin-Elmer Model 599B로, EI/MS는 JEOL의 JMSAX 505-WA로 측정하였다. 용점은 Fisher Melting Point Apparatus로 측정하였고 미보정하였다. Column chromatography(c.c.)는 silica gel(70-230 or 230-400 mesh, Merck), ODS gel(70-230 mesh, YMC)를 사용하였다.

추출 및 분획. 음지실온에서 건조시킨 비목나무의 건엽 1.4 kg을 95% methanol(MeOH) 15 l로 3회 반복 추출하여 MeOH 추출물 150 g을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수에 현탁시켜 *n*-hexane, ethylacetate(EtOAc), *n*-butanol(BuOH)을 사용하여 순차적으로 용매분획하였다.

항진균 활성물질의 분리. 비목나무 잎의 MeOH 추출물을 용매분획하여 밀 붉은녹병(wheat leaf rust)에 대한 방제효과를 분석한 결과, EtOAc fraction(fr.)에서 강한 활성을 나타내었다. EtOAc fr.(10.5 g)을 silica gel(Merck 7734, 500 g)에 충전시킨 후 chloroform(CHCl₃)-MeOH의 용매계 (0~60% MeOH in CHCl₃)로 순차용출(step-wise)시켜 활성분획(5% MeOH in CHCl₃)으로 1.73 g을 얻었다. 이 활성분획을 다시 silica gel(Merck 9385, 100 g) c.c.에 충전시켜 hexane-CHCl₃, CHCl₃-MeOH의 용매계로 용출, 활성분획 102 mg을 얻었다. 이 활성분획을 MeOH에 녹여 상온방치로 재결정 compound 1(84 mg)을 얻었다.

Compound 1. Yellow needles (MeOH); m.p. 121-122°C; IRv (CHCl₃, cm⁻¹) 1685 (C=O), 1590 (C=C); EI-MS (m/z); 270 (M⁺), 241, 211, 183, 131, 103;

¹H-NMR for major component (400 MHz, CDCl₃) 8.20 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-β), 7.63-7.59 (2H and 1H, m, H-2,6 and H-α), 7.42-7.37 (2H and 1H, m, H-3,5 and H-4), 5.95 (1H, s, H-5'), 4.20, 3.94 (both 3H, each s, 4'-OMe and α'-OMe).

¹H-NMR for minor component (400 MHz, CDCl₃) 7.92 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-β), 7.63-7.59 (2H and 1H, m, H-2,6 and H-α), 7.42-7.37 (2H and 1H, m, H-3,5 and H-4), 5.94 (1H, s, H-5'), 4.21, 3.93 (both 3H, each s, 4'-OMe and α'-OMe).

¹³C-NMR for major component (100 MHz, CDCl₃) 191.52, 185.25 (C-3' and C-6'), 169.83 (C-4'), 168.66 (C-α'), 142.60 (C-α), 135.25 (C-1), 130.24 (C-4), 128.80 (C-3,5), 128.44 (C-2,6), 121.31 (C-β), 111.61 (C-5'), 109.12 (C-1'), 64.62, 58.56 (4'-OMe and α'-OMe)

¹³C-NMR for minor component (100 MHz, CDCl₃) 189.43, 188.07 (C-3' and C-6'), 169.53 (C-4'), 168.83 (C-α'), 142.81 (C-α), 135.17 (C-1), 130.28 (C-4), 128.83 (C-3,5), 128.44 (C-2,6), 120.87 (C-β), 112.08 (C-5'), 109.38 (C-1'), 64.95, 58.48 (4'-OMe and α'-OMe)

밀 붉은녹병 대한 *in vivo* 항진균 활성 검증. 항진균 활성을 조사할 비목나무 추출물 및 compound 1은 dimethylsulfoxide (DMSO)를 사용하여 용해한 후에 DMSO의 최종농도가 1%가 되도록 Tween 20 용액 (250 µg/ml)으로 희석하여 실험하고자 하는 약제농도로 약제용액을 준비하였다. 무

처리구는 약제 없이 DMSO 1%와 Tween 20 250 µg/ml이 되도록 하였다.

온실에서 재배한 1엽기 밀(*Triticum aestivum* L., cv Chokwang)에 식물체 추출물 혹은 분리된 화합물 용액을 spray 하고 온실에서 풍건하였다. 약제처리한 식물은 1일 후에 병원균인 *Puccinia recondita*의 포자를 접종하였다. *P. recondita*는 활물기생균이므로 밀 유묘에서 형성된 포자를 수확하여 Tween 20 용액(250 µg/ml)에 0.67 g 포자/l 수준으로 현탁한 후 포자현탁액을 분무처리하여 접종하였다. 접종한 식물은 하루동안 20°C 습실상(상대습도 95% 이상)에 두어 습실처리 하였다. 습실처리한 식물은 항온항습실(20°C, 상대습도 60~70%)로 이동하여 형광등이 켜진 선반에서 재배하면서 발병시켰다. 접종 7일 후, 병이 충분히 발생한 후에 병반면적율을 달관조사하고 방제가를 계산하였다.^{19,21)}

결과 및 고찰

자생식물자원으로부터 천연물 농약을 개발하기 위하여 국내 자생식물을 대상으로 항진균 활성검정을 실시하였다. 그 결과 비목나무 잎의 MeOH 추출물(2,000 µg/ml)이 *in vivo* test에서 86%의 병원균 증식억제 효과를 나타내었다.¹⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 비목나무 유래의 항진균 활성물질을 규명하고자, 비목나무 잎의 MeOH 추출물을 증류수 1,000 ml에 현탁시켜 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 용매로 용매분획하여 각 분획을 대상으로 *in vivo* test에 의한 밀 붉은녹병의 증식억제 효과를 조사하였다. 그 결과 EtOAc 분획에서 강한 활성을 나타냈다. 이 분획을 silica gel c.c.와 MeOH 재결정으로 compound 1을 분리하였다.

Compound 1은 IR 스펙트럼으로부터 conjugated-ketone (1,685 cm⁻¹) 및 이중결합 (1,590 cm⁻¹)의 존재가 추정되었고, EI/MS로부터 분자량은 270 (m/z 270, M⁺)으로 결정되었다. NMR 스펙트럼으로부터 이 분획은 2종의 매우 유사한 물질이 함유되어 있음이 판명되었다. 우선 주성분 물질의 ¹H-NMR data를 보면 trans 구조를 갖는 2개의 olefine 수소 {(δ8.20, 1H, d, *J*=15.6 Hz), (δ7.63-7.59, 1H, m)와 1개의 일치환 벤젠 {(δ7.63-7.59, 2H, m), (δ7.42-7.37, 2H and 1H)}의 존재가 추정되었다. 또한 1개의 olefine (δ5.95, 1H, s)과 2개의 methoxy (δ4.20, δ3.94, both 3H, each s) signal도 관측되었다. ¹³C-NMR 및 DEPT 스펙트럼으로부터 2개의 ketone (δ191.52, 185.25), 산소가 결합한 2개의 olefine 4급탄소 (δ169.83, 168.66), 탄소가 결합한 2개의 olefine 4급탄소 (δ135.25, 109.12), 8개의 olefine methine 탄소 {δ142.60, 130.24, 128.80 (x2), 128.44 (x2), 121.31, 111.61} 및 2개의 methoxy (δ64.62, 58.56) signal이 확인되었다. 이상의 결과로부터 이 화합물은 비목나무에서 분리 보고된 바 있는 methyllicudone으로 동정되었다. Methyllicudone은 *Lindera lucida*의 과실로부터 처음 분리되어 구조가 밝혀졌으며,²²⁾ 그 후 비목나무로부터도 분리되었다.^{23,24)} 하지만 NMR, 특히 ¹³C-NMR 에 대한 data는 상세히 동정되지 않았다. COSY를 이용하여 ¹H-NMR에서의 각 signal을 확인하였고, g-HSQC NMR 기법을 이용하여 ¹³C-

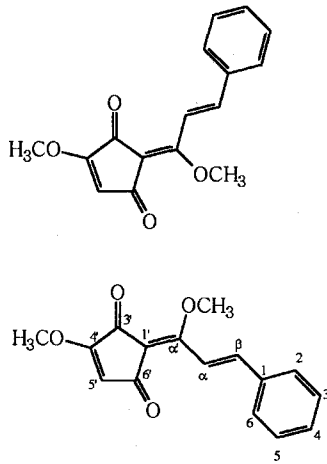


Fig. 1. The structures of antifungal active compounds isolated from leaves of *Lindera erythrocarpa*.

Table 1. *In vivo* antifungal activity of active compound 1 against wheat leaf rust caused by *Puccinia recondita*

Compound	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	C.V. (%)
Active compound 1	50	85
	100	85
	200	98
Mancozeb	10	90
	50	100
Flusilazole	2	73
	10	100

NMR 스펙트럼에서 4급 탄소를 제외한 모든 signal들을 정확히 동정하였다. 4급 탄소의 경우는 HMBC를 이용하여 확인하였다. 즉 H- α (δ 7.63-7.59) 및 H- β (δ 8.20) signal과의 사이에서 cross peak를 보여주는 δ 168.66 signal을 C- α' 로, H-2,6 (δ 7.63-7.59), H-3,5 (δ 7.42-7.37) 및 H- β (δ 8.20) signal과의 사이에서 cross peak를 보여주는 δ 135.25 signal을 C-1'으로, H-5' (δ 5.95) signal과의 사이에서 cross peak를 보여주는 δ 109.12 signal을 C-1'으로 확실하게 동정할 수 있었다.

한편 함량이 적은 성분의 경우 여러 가지 data가 methyllicudone과 매우 유사하였기 때문에, C- α 및 C- β 의 기하학적 구조만이 다른 즉, cis 구조를 갖는 성분으로 추정하였다. 하지만 $^1\text{H-NMR}$ 에서 H- α 와 H- β 사이의 coupling constant 가 15.6 Hz로 여전히 trans 구조를 갖고 있는 것으로 판명되었다. 한편 licudone 골격을 갖는 화합물들은 용액상태에서 서로 다른 형태를 갖는 2개의 화합물이 평형상태로 존재하는 것으로 보고되고 있어서,²⁵ 비록나무에서 분리한 이 화합물도 Fig. 1과 같은 2가지 형태의 methyllicudone 이 공존하는 것으로 판명하였다.

이상과 같이 비록나무 잎으로부터 항진균 활성물질로서 methyllicudone의 두 입체이성질체를 분리, 동정하였다.

비록나무의 성분 관해서 지금까지 보고된 연구결과에 의하면, terpene계 화합물로서 methyllicudone을 비롯하여 linderone, methyllicudone, sitosterol-D-glucoside이 보고되었으

며,^{17,18)} essential oil 성분으로 caryophyllene, geranyl acetate, α -pinene, camphene, β -pinene, limonene, bornyl acetate 등이 밝혀졌다.²³⁾

밀 붉은녹병 병원균인 *Puccinia recondita*에 대한 증식억제 효과를 실험한 결과, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 85%의 높은 방제효과를 나타내었다. 그러나 현재 살균제로 사용되고 있는 대조약제인 mancozeb(50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 100% 방제)나 flusilazole (2 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 100% 방제)에 비하여 compound 1은 방제 효과가 약하게 나타났다(Table 1).

참고문헌

- Ames, B. N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* **204**, 587-593.
- Delp, C. J. (1988) In *Fungicide resistance in North America*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minn., p. 133.
- Staub, T. and Sozzi, D. (1984) Fungicide resistance: A continuing challenge. *Plant Dis.* **68**, 1026-1031.
- Becker, J. O. (1993) Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: Status and outlook. *Pestic. Sci.* **37**, 355-363.
- Lange, L., Breinhilt, J., Rasmussen, F. W. and Nielsen, R. I. (1993) Microbial fungicides-The natural choice. *Pestic. Sci.* **39**, 155-160.
- Porter, N. and Fox, F. M. (1993) Diversity of microbial products-discovery and application. *Pestic. Sci.* **39**, 161-168.
- Powell, K. A. and Jutsum, A. R. (1993) Fungicide resistance: A continuing challenge. *Plant Dis.* **68**, 1026-1031.
- Baker, C. J., Stavely, J. R., Thomas, C. A., Sasser, M. and MacFall, J. S. (1983) Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathol.* **73**, 1148-1152.
- Katz, E. and Demain, A. (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* **41**, 449-474.
- Kinghorn, A. D. (1993) In *Discovery of natural products with therapeutic potential*. Gullo, V. P., (ed.), Butterworths. Boston, MA.
- Tomas-Lorents, F., Iniesta-Sanmaritin, E., Tomas-Barberan, F. A., Trowitzsch-Kienast, W. and Wray, V. (1989) Antifungal phloroglucinol derivatives and lipophilic flavonoids from *Helichrysum decumbens*. *Phytochem.* **28**, 1613-1615.
- Mitscher, L. A., Park, Y. H. and Clark, D. (1980) Antimicrobial agents from higher plants, antimicrobial isoflavanoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var *Typica*. *J. Nat. Prod.* **43**, 259-269.
- Clark, A. M., El-Feraly, F. S. and Li, W. S. (1981) Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. *J. Pharm. Sci.* **70**, 951-952.
- Rim, Y. S., Park, Y. M., Park, M. S., Kim, K. Y., Kim, M. J. and Choi, Y. H. (2000) Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants. *Korean J. Med. Crop Sci.* **8**, 342-350.
- Choi, M. S., Shin, K., Kwon, O. W., Yoon, S. R., Jung, M. Y., Song, K. H., Ahn, J. K., Lee, W. Y. and Son, S. H. (1999) The

- Screening of antimicrobial species from woody plants. *FRI. J. For. Sci.* **62**, 141-154.
16. Sun, B. Y. and Chung, Y. H. (1988) Monographic study of the Lauraceae in Korea. *Kor. J. Plant Tax.* **18**, 133-151.
17. Liu, S.-Y., Hisada, S. and Inagaki, I. (1973) Terpenes of *Lindera erythrocarpa*. *Phytochem.* **12**, 233.
18. Liu, S.-Y. and Ogihara, Y. (1975) Studies on the constituents of *Lindera erythrocarpa* Makino. I. Flavonoids from the fruits. *Yakugaku Zasshi* **95**, 1114-1118.
19. Kim, H.-J., Kim, J. C., Kim, B. S., Kim, H. K. and Cho, K. Y. (1999) Antibiotic and phytotoxic activities of ophiobolins from *Helminthosporium* sp. *Plant Pathol. J.* **15**, 14-20.
20. Park, J.-H., Kim, J.-C., Choi, G. J., Kim, H. T., Hong, K.-S., Song, C., Kim J.-G. and Cho, K. Y. (2000) Biological activities of *Fusarium* isolates from soil and plants. *Kor. J. Pestic. Sci.* **4**, 19-26.
21. Ryu, S. Y., Kim, J. C., Kim, Y. S., Kim, H. T., Kim, S. K., Choi, K. J., Kim, J. S., Lee, S.-W., Heor, J. H. and Cho, K. Y. (2001) Antifungal activities of coumarins isolated from *Angelica gigas* and *Angelica dahurica* against plant pathogenic fungi. *Kor. J. Pestic. Sci.* **5**, 26-35.
22. Lee, H. H. (1968) The structure of lucidone and methyl-lucidone. *Tetrahed. Lett.* **40**, 4243-4246.
23. Komae, H. and Hayashi, N. (1972) Terpenes from *Lindera erythrocarpa*. *Phytochem.* **11**, 853.
24. Liu, S.-Y. and Ogihara, Y. (1975) Studies on the constituents of *Lindera erythrocarpa* Makino. I. Flavonoids from the fruits. *Yakugaku Zasshi* **95**, 1114-1118.
25. Takai, M., Lie, S.-Y., Ogihara, Y. and Iitaka, Y. (1977) Studies on the constituents of *Lindera erythrocarpa* M. III. The isolation and crystal structure of sodium lucidonate. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 1404-1408.

Isolation of Antifungal Active Compounds from the Leaves of *Lindera erythrocarpa*

Yong-Hwa Choi,* Sun Youl Kwon, Jin-Ho Kim, Nam-In Baek¹, Gyung Ja Choi², Kwang Yun Cho² and Byung-Moo Lee³ (Department of Plant Resources, Sangju National University, Sangju, Korea; ¹Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyunghee University, Suwon, Korea; ²Bio-Organic Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon, Korea; ³National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, Korea)

Abstract: Methanol extract obtained from *Lindera erythrocarpa* leaves was successively fractionated with *n*-hexane, ethylacetate, *n*-butanol, and H₂O. From ethylacetate fraction, an active fraction was isolated through repeated silica gel column chromatography and recrystallization, and was identified as a stereoisomer complex of methyl-lucidone by MS and NMR analyses. The complex showed 85% antifungal activity at 50 µg/ml against the disease wheat leaf rust.

Key words: *Lindera erythrocarpa*, wheat leaf rust, *Puccinia recondita*, antifungal activity, methyl-lucidone

*Corresponding author