

굴피나무 (*Platycarya strobilacea*) 지상부로부터 항진균성 활성물질 분리

최용화* · 채상기 · 김진호 · 강상재¹ · 백남인² · 한재택²

상주대학교 식물자원학과, ¹상주대학교 원예학과, ²경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터

(2003년 5월 15일 접수, 2003년 6월 19일 수리)

굴피나무 지상부의 메탄올 추출물을 *n*-hexane, ethylacetate, *n*-butanol, H₂O으로 순차적으로 용매분획하였다. Ethylacetate 분획으로부터 silica gel chromatography를 반복하여 활성물질을 분리·정제하였다. 화합물은 NMR과 MS의 기기분석 결과 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone로 구조결정 되었다. 이 화합물은 *in vivo* 실험결과 토마토역병에 대하여 100 µg/ml에서 76%의 방제효과를 나타내었다.

Key words: 굴피나무, 토마토역병, *Phytophthora infestans*, 항진균활성, 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone

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 농약개발에 있어서 곰팡이, 세균, 방선균 및 식물 유래의 천연 생리활성물질은 그 활성성분 자체뿐만 아니라 그 골격을 이용하여 새로운 농약개발을 위한 lead compound로서 이용 가치가 높다.^{8,9)}

저자 등은 항진균성 활성을 갖는 천연농약을 개발 할 목적으로 국내 자생식물체를 식물병에 대하여 *in vivo* 항진균성 활성을 검토한 결과 굴피나무의 용매추출물이 토마토역병을 일으키는 병원균인 *Phytophthora infestans*의 생장을 억제하는 항진균 활성을 갖고 있다고 이미 보고하였다.¹⁰⁾

역병원인 *Phytophthora*는 총 59종(species)과 5변종(variety)이 보고되었으며, 국내에는 지금까지 21 종의 역병원균이 보고되었다. 국내 발생 역병원균 중 전국적 분포와 발생 정도 및 경제적 피해수준 등을 감안할 때, *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. drechsleri*, *P. infestans*, *P. nicotianae*가 5대 주요 역병원균으로 알려져 있다.

토마토역병 병원균인 *P. infestans*가 토마토 잎에 감염되면 줄기의 조기성숙이나 고사로 수확량 감소의 원인이 되어 커다란 경제적 손실을 입히며 이를 방제하기 위해 사용되는 농약비용과 잔류의 문제점을 야기한다.¹¹⁾

굴피나무(*Platycarya strobilacea*)는 가래나무과(Juglandaceae)에 속하는 낙엽활엽의 소교목으로서 우리나라 전역에 분포되어 있다. 근피는 소염제, 지사제로, 수피는 어망염료로 사용된다.¹²⁾

굴피나무 유래의 항진균성 활성물질을 구명하기 위하여 굴피나무 지상부를 MeOH로 추출하여 용매분획과 chromatography로 분리, 정제하여 활성 화합물을 얻었다. 이 화합물에 대하여 NMR과 MS 분석 기법을 이용하여 화학적 구조를 결정하였고 토마토역병에 대한 방제효과를 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 연구에 사용된 굴피나무(*Platycarya strobilacea*)는 2002년 6월 경북 상주시 가장동 소재 감장산에서 채집하였으며 표본은 상주대학교 식물자원학과 천연물화학연구실에 보관 중이다.

시약 및 기기. ¹H- (400 MHz) 및 ¹³C-NMR(100 MHz) 스펙트럼은 Varian의 Unity Inova로, IR 스펙트럼은 Perkin-Elmer Model 599B로, EI/MS는 JEOL의 JMSAX 505-WA로 측정하였다. Column chromatography(c.c.)는 silica gel(70-230 or 230-400 mesh, Merck)을 사용하였다.

추출 및 분획. 음지실온에서 건조시킨 굴피나무의 건엽과 어린가지 2.4 kg을 100% methanol(MeOH) 15 l로 3회 반복 추출하여 MeOH 추출물 279 g을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수(1,000 ml)에 현탁시켜 *n*-hexane(1,000 ml), ethylacetate (EtOAc, 1,000 ml), *n*-butanol(BuOH, 1,000 ml)을 사용하여 각각 3회씩 순차적으로 용매분획하였다.

항진균 활성물질의 분리. 굴피나무 지상부의 MeOH 추출물을 용매분획하여 토마토역병(tomato late blight)에 대한 방제효과를 분석한 결과, EtOAc fraction(fr.)에서 강한 활성을 나타내었다. EtOAc fr.(28 g)을 silica gel(Merck 7734, 500 g) column의 상단에 주입한 후 chloroform(CHCl₃)-MeOH의 용매계(0-80% MeOH in CHCl₃)로 순차용출(step-wise)시켜 활성분획(5% MeOH in CHCl₃)으로 2.5 g을 얻었다. 이 활성분획을 다시 silica gel(Merck 7734, 100 g) c.c.에서 CHCl₃-MeOH의 용매계(0, 0.25, 2, 5, 10% MeOH in CHCl₃)로 용출, 활성분획 0.5 g을 얻었으며, 이 활성분획을 다시 silica gel(Merck

*연락저자

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

E-mail: yhchoi@sangju.ac.kr

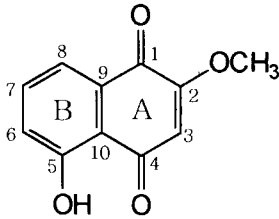


Fig. 1. The structure of antifungal compound 1 isolated from aerial parts of *Platycarya strobilacea*.

9385, 100 g) c.c.에서 hexane-EtOAc의 용매계(8 : 5)로 용출하여 최종적으로 compound 1(0.1 g)을 분리·정제하였다.

Compound 1: yellowish powder (CHCl₃-MeOH), EI/MS *m/z* (rel. int, %): 204 (M+, 100), 189 (25), 174 (44), 147 (18), 118 (43), 105 (62), 63 (32); IRv (KBr, cm⁻¹) 3540, 3195, 2975, 1668, 1625, 1564; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 12.23 (1H, s, H-5-OH), 7.67 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, H-8), 7.58 (1H, dd, *J* = 7.6, 8.4 Hz, H-7), 7.27 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, H-6), 6.11 (1H, s, H-3), 3.93 (3H, s, -OMe); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 190.58 (C-4), 179.32 (C-1), 161.01 (C-5), 160.95 (C-2), 135.38 (C-7), 130.93 (C-9), 125.13 (C-6), 119.49 (C-8), 114.10 (C-10), 109.43 (C-3), 56.67 (-OMe).

in vitro 균사생장 억제 실험. Column chromatography의 분획을 식물병원균인 토마토역병(*Phytophthora infestans*)에 대하여 *in vitro*에서 균사의 생육억제 활성실험을 실시하여 활성물질을 분리·정제하는 데 지표로 삼았다. *P. infestans*균의 균사를 포함하고 있는 agar disc(직경 5 mm)를 V-8 juice agar 배지¹³⁾ 중앙에 집중한 후 분획물질을 좌우에 배치하는 paper disc 방법으로 균사생육의 억제효과를 측정하였다.

in vivo 항진균 활성 검증. Compound 1의 *in vivo*에 의한 항진균 활성 검증은 dimethylsulfoxide(DMSO)를 사용하여 용해한 후에 DMSO의 최종농도가 1%가 되도록 Tween 20 용액(250 µg/ml)으로 희석하여 실험하고자 하는 약제농도로 약제용액을 준비하였다. 무처리구는 약제 없이 DMSO 1%와 Tween 20 250 µg/ml이 되도록 하였다.

온실에서 재배한 2엽기 토마토(*Lycopersicon esculentum*)에 분리된 화합물 용액을 spray하고 온실에서 풍건하였다. 약제처리한 식물은 1일 후에 병원균인 *P. infestans*의 유주자낭 현탁액(10⁵ 유주자낭/ml)에서 나출된 유주자 낭현탁액을 분무, 접종하였다. 접종한 식물은 하루동안 20°C 습실상(상대습도 95% 이상)에 두어 습실상에서 발병을 유도하였다. 습실처리한 식물은 향온향습실(20°C, 상대습도 60~70%)로 이동하여 형광등이 켜진 선반에서 재배하면서 발병시켰다. 접종 4일 후, 병이 충분히 발생한 후에 병반면적율을 달관조사하고 방제가를 계산하였다.¹⁴⁻¹⁶⁾

결과 및 고찰

저자들은 자생식물자원에서부터 천연물 농약을 개발하기 위

하여 국내 자생식물의 MeOH 추출물을 대상으로 항진균 활성 검증을 실시하였다. 그 결과 굴피나무 지상부의 MeOH 추출물(2,000 µg/ml)이 *in vivo* test에서 토마토역병에 대해서 95%의 병원균 증식억제 효과를 나타내었다.¹⁰⁾ 따라서 본 연구에서는 굴피나무 유래의 토마토역병에 대한 항진균 활성물질을 규명하고자, 굴피나무 잎과 어린가지들을 포함한 지상부의 MeOH 추출물을 증류수 1,000 ml에 현탁시켜 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 용매로 용매분획하여 각 분획을 대상으로 *in vitro* test에 의한 토마토역병의 증식억제 효과를 조사하였다. 그 결과 EtOAc 분획에서 강한 활성을 나타냈다. *in vitro* 균사생장 억제 실험의 결과를 지표로 하여 분획으로부터 silica gel c.c.를 반복 사용하여 활성물질로 compound 1을 분리·정제하였다.

Compound 1은 황색분말상(CHCl₃-MeOH)의 물질로, IR (KBr) 스펙트럼으로부터 ketone(1668 cm⁻¹), 수산기(3540 cm⁻¹)와 벤젠환(1564 cm⁻¹)의 존재가 추정되었다. ¹H- (400 MHz, CDCl₃) 및 ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 1,4-naphthoquinone의 전형적인 signal들을 보여주었다. 또한 ¹H-NMR에서 aromatic methine proton signal이 4개만 관측되고 있는 점과, ¹³C-NMR에서 olefine quarternary carbon 중 2개 signal의 chemical shift가 각각 δ_c 161.01과 δ_c 160.95인 점으로부터 naphthalene 환의 2곳에 수산기가 결합하고 있음이 확인되었다. 또한 δ_H 3.93(3H, s)와 δ_c 56.67(q)으로부터 수산기에 methyl기가 한 개 ether 결합하고 있는 것으로 판명되었는데, 이 사실은 EI/MS에서 분자이온 피크가 *m/z* 204에서 관측된 점으로부터도 확인되었다. 또한 δ_H 6.11(1H, s)의 signal로부터 한 개의 수산기는 A ring에 결합되어 있고, δ_H 7.67 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz), δ_H 7.58 (1H, dd, *J* = 7.6, 8.4 Hz), δ_H 7.27 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz) signal 들로부터 다른 한 개의 수산기는 B-ring의 5번 또는 8번에 결합하고 있는 것으로 판명되어, 이 화합물은 2,5-dihydroxy- 또는 2,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone으로 추정되었다. 2,5-dihydroxy 치환체와 2,8-dihydroxy 치환체는 2개의 carbonyl기의 ¹³C-NMR에 있어서의 chemical shift가 뚜렷이 다른데, 전자의 경우, C-1과 C-4는 각각 약 δ_c 180과 δ_c 190에서 관측되는데 비해, 후자의 경우는 각각 δ_c 183 및 δ_c 185에서 관측된다.¹²⁾ Compound 1의 경우는 각각 δ_c 179.32와 δ_c 190.58에서 관측되어 2,5-dihydroxy 치환체로 판명되었다. 한편 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ_H 12.23(1H, s)에서 관측된 signal 은 수산기의 수소 signal로, 5번의 수산기가 4번의 ketone 산소와 수소결합 하여야만 관측될 수 있다는 점으로부터, methoxy 기는 2번에 존재한다는 것을 알 수 있었다. 이 사실은 HMBC 스펙트럼으로부터도 확인되었다. 즉 5번 수산기의 수소 signal 은 C-6(δ_c 125.13, d)과 C-10(δ_c 114.10, s) signal과의 사이에서 correlation을 보여주었고, methoxy기의 수소 signal(δ_H 3.93)은 C-3(δ_c 109.43, d) signal과의 사이에서 correlation을 보여주었다. 따라서 굴피나무에서 분리한 항진균성 활성물질인 Compound 1의 구조는 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone¹²⁾으로 결정하였다.

굴피나무의 성분에 관해서 지금까지 보고된 연구결과에 의하면, 앞으로부터 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone, ursolic acid, gallic acid, 4,8-dihydroxy naphthalene 1-O-β-D-

Table 1. *In vivo* antifungal activity of compound 1 against tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*

Chemical	Concentration (µg/ml)	Disease severity (%)	Control value (% ± S.D.)
Compound 1	100	23.0	76 ± 19
	250	1.7	98 ± 3
Dimethomorph	2	68.0	29 ± 11
	10	2.5	98 ± 4
Control		95.0	

glucoside, eriodictyol, quercetin 3-O-(2"-O-galloyl)-β-D-glucoside, quercetin 3-O-(2"-O-galloyl)-β-D-galactoside, quercetin 3-O-α-L-rhamnoside를 분리하여 항암활성을 보고하였고,¹²⁾ 수피로부터 flavonoid 화합물인 quercetin, 3',4',5',6,7-hexahydroxyflavone, morin, myricetin, myricitrin, quercitrin, afzelin이 보고되었다.¹⁷⁾

토마토역병 병원균인 *Phytophthora infestans*에 대한 증식억제 효과를 *in vivo* 조건하에서 실험한 결과, 100, 250 µg/ml 농도에서 각각 76, 98% 방제효과를 나타내었다. 그에 반해서 현재 살균제로 사용되고 있는 대조약제인 Dimethomorph는 10 µg/ml 농도에서 100% 방제효과를 나타냈다(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., Stavelly, 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.
- 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.
- Cooke, L. R. and Little, G. (2001) The effect of foliar application of phosphonate formulations on the susceptibility of potato tubers to late blight. *Pest Manag. Sci.* **58**, 17-25.
- Kim, Y. I., Lee, S.-H. and Cho, T. S. (1996) Isolation of anticancer agents from the leaves of *Platycarya strobilacea* S. et Z. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 238-245.
- Kim, J.-C., Choi, G. J., Park, H. T. and Cho, K. Y. (2001) Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* **57**, 554-559.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lee, J. H., Kwon, Y. S. and Kim, C. M. (1998) Flavonoids from the stem bark of *Platycarya strobilacea*. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**, 353-356.

Isolation of an Antifungal Compound from Aerial Parts of *Platycarya strobilacea*

Yong-Hwa Choi*, Sang Gi Chae, Jin-Ho Kim, Sangjae Kang¹, Nam-In Baek² and Jae-Taek Han² (Department of Plant Resources, Sangju National University, Sangju, Korea; ¹Department of Horticulture, Sangju National University, Sangju, Korea; ²Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyunghee University, Suwon, Korea)

Abstract: Methanol extract obtained from aerial parts of *Platycarya strobilacea* was successively fractionated with *n*-hexane, ethylacetate, *n*-butanol, and water. From ethylacetate fraction, an active compound was isolated through repeated silica gel column chromatography and was identified as 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone by MS and NMR analyses. The compound showed *in vivo* 76% antifungal activity at 100 µg/ml against tomato late blight disease.

Key words: *Platycarya strobilacea*, tomato late blight, *Phytophthora infestans*, antifungal activity, 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone

*Corresponding author