

Momilacton B의 분리 및 동정

이춘우*[†] · 류수노**

*작물과학원, **한국방송통신대학교

I. 서 언

식물체내에서 생성된 물질이 분비되어 다른 식물의 생장에 직·간접적으로 영향을 미치는 것을 alleopathy라 하며, 넓은 의미로 미생물을 포함한 식물계에 존재하는 모든 식물간의 억제 또는 촉진하는 생물화학적 상호작용을 말한다. 이러한 상호작용을 하는 물질을 allelochemicals이라 하며, 이들은 대체로 2차대사물질이다. 이들 물질은 단순한 휘발성물질이나 지방족 물질에서부터 momilactone B 등 여러개의 환이 복잡하게 얽혀진 방향족 화합물등 다양한 화합물로 구성되어 있다.

Momilacton B는 벼의 왕겨에서 휴면억제 물질로 추출되었으며(Kato et al., 1973, 1977), 최근에는 벼짚에 함유한 가장 강력한 alleopathy 물질(Lee et al., 1999a, 1999b, 2002)로 밝혀졌다.

II. 분석방법

1. 장치 및 기구

- 1) 감압증류장치
- 2) Open column 분획장치
- 3) TLC 검정장치

2. 시약 및 재료

- 1) 추출용매 : Methanol, Ethyl acetate, Buthanol, Chloroform, Hexane
- 2) Silicagel 60(Merck 1.07734.9025)
- 3) Celite 545(Kanto chemical 08005-02)
- 4) ODS-TLC(Merck RP-18F₂₅₄S)
- 5) ODS(Senshu scientific co. ODS-ss-1020T)

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6843 (E-mail) leecw@rda.go.kr

3. 분리방법(Lee et al., 1999a, 1999b)

1) 재료 준비

그늘에서 바람으로 말려 잘게 자른 볏짚 20 kg을 80% 메탄올에 1:10의 비율로 담구어 24 시간 침출하여 여과 후 40°C에서 감압 농축한다.

2) 분획

(1) 유기용매 분획

농축된 고형물을 증류수로 녹인 후 동일 부피의 ethyl acetate(EtoAc)로 분획하고, 다시 물층은 butanol로 분획하여 감압 농축한다.

(2) 1차 silicagel column 분획

EtoAc층을 농축하여 고형물을 celite545로 coating한다. 5×80 cm column에 silicagel60 600 g을 hexane으로 습식충진 후에 coating 고형물을 loading한다. Hexane과 EtoAc의 혼합용매에서 EtoAc의 비율을 0%부터 100%까지 10% 단위로 높여가며 분당 5 ml 속도로 2리터를 전개하고, 마지막은 methanol 3리터로 씻어내린다. 각 분획물은 200 ml 나누어 받아 20 ml로 농축하여 CHCl₃ : EtoAc=2:1 비율 전개용매를 사용하여 TLC 확인 후 합친다. 각 분획을 농축하여 생물검정하고 억제율이 높은 hexane 30~70%의 분획을 합쳐서 celite545로 coating 하여 2차 silicagel column 분획한다.

(3) 2차 silicagel column 분획

3×100 cm column에 silicagel60 300 g을 ethyl acetate : ethyl acetate=1:4 용매로 습식충진 하여 1차 silicagel 분획물을 loading한다. loading 후 cholroform과 ethyl acetate의 혼합용매에서 ethyl acetate의 비율을 20%부터 100%까지 10% 단위로 높이면서 분당 5 ml의 속도로 각 농도 당 1000 ml를 전개한다. 각 분획은 100 ml 씩 나누어 받아 20 ml 로 농축하여 TLC 검정하고 Rf 별로 합친 후 농축한다. 생물검정에서 생장억제율이 높은 ethyl acetate 20%분획을 celite545로 coating하여 ODS column column 분획한다.

(4) 1차 ODS- column 분획

3×100 cm column에 ODS 280 g을 50%의 acetonitrile에 녹여 sonic wave로 20분 진탕하여 충전하고, 2차 silicagel 분획에서 얻은 고형물을 loading 한다. Actetonitrile 50%부터 100%까지 10% 단위로 높여가면서 분당 5 ml의 속도로 각 농도당 500 ml를 전개한다. 각 분획은 100 ml 씩 나누어 20 ml로 농축하여 ODS-TLC 확인하여 같은 Rf별로 농축한다. 생물검정에서 생장억제율이 높은 F 2, 3분획을 celite545로 coating하여 2차 ODS column 분획한다.

(5) 2차 ODS- column 분획

ODS 300 g을 50%의 acetonitrile에 녹여 sonic wave로 20분 진탕하여 3×100 cm column 에 충전하고 전 단계에서 얻은 coating한 고형물을 loading한다. Actetonitrile 50%를 분당 5ml의 속도로 500 ml를 8ml씩 나누어 받아 2 ml로 농축 후, 50% acetonirtile 전개용매로 ODS-TLC에서 확인하여 Rf별로 합쳐 농축하여 생물검정한다. 생물검정에서 생장억제율이 높은 흰색 분말의 Rf 5.5를 얻을 수 있다.

(6) 재결정

Rf 5.5의 흰색 분말을 EtOAc를 넣어 hot plate에서 가열하여 녹인 후 hexane를 넣어 실온에서 방치하여 결정을 생겨 이를 여과하면 결정이 생긴다.

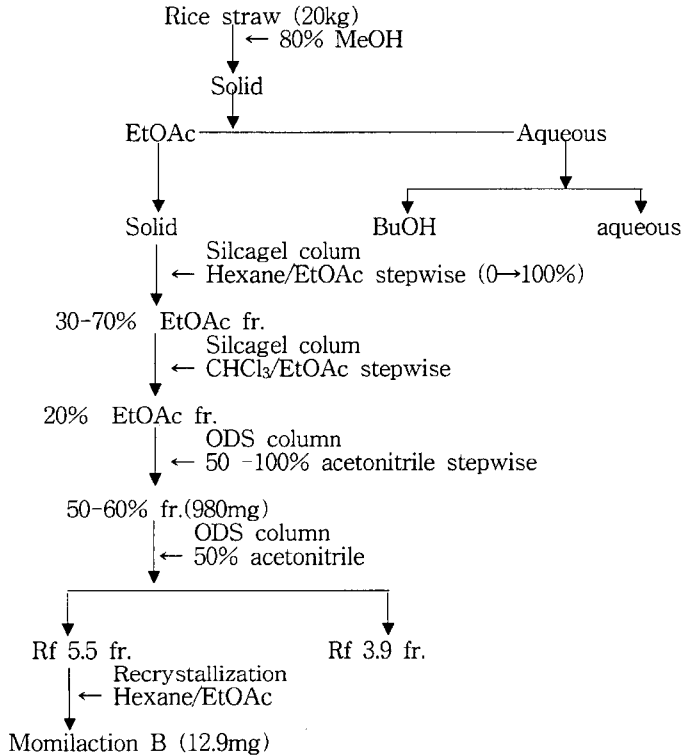


Fig. 1. Isolation scheme of growth inhibitor from rice straw.

4. 물질동정

1) NMR 검정 결과(Kato et al., 1977)

Momilactone-B : mp 242°(decom.), C₂₀H₂₆O₄(M⁺ 330.1834, mol wt 330.1830), (Found C, 72.70 : H, 7.93. C₂₀H₂₆O₄ requires C, 72.55; H, 8.07%). [α] -185°, [φ]_{max} -73510°(217 nm). IR(CHCl₃) 3500, 1750, 1663, and 1638 cm⁻¹. PMR(CDCl₃) 0.87 and 1.40(each 3H, s), 2.20(1H, dd, 7.1 and 2.1 Hz), 3.55(1H, dd, 9.0 AND 2.1 Hz), 4.07(1H, bd, 9.0 Hz), 4.92(1H, dd, 10.5 and 1.2 Hz), 4.94(1H, dd, 7.1 and 4.5 Hz), 4.95(1H, dd, 17.6 and 1.2 Hz) 5.68(1H, d, 4.5 Mz) and 5.83 ppm(1H, dd, 17.6 and 10.5 Hz). CMR(CDCl₃) 28.8(t, C₁), 26.5(t, C₂), 96.6(s, C₃), 50.4(s, C₄), 43.0(d, C₅), 73.8(d, C₆), 114.0(d, C₇), 146.7(s, C₈), 44.7(d, C₉), 30.8(s, C₁₀), 24.8(t, C₁₁), 37.3(t, C₁₂), 40.0(s, C₁₃), 47.4(t, C₁₄), 148.8(d, C₁₅), 110.2(t, C₁₆), 21.9(q, C₁₇), 19.0(q, C₁₈), 180.5(s, C₁₉) and 72.7 ppm(t, C₂₀).

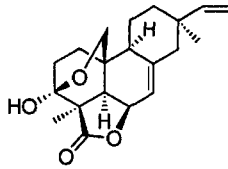


Fig 2. structure of Momilactone B.

2) HPLC/MS 분석 조건 및 결과(Lee et al., 2002)

HPLC(HP 1100 HPLC Series Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany)에 Inertsil ODS-2 column(150 mm×4.6 I.D., 5 mm, GL Sciences, Japan)을 사용하여 80% acetonitrile(containing 0.1% formic acid)를 0.6 ml/min 속도로 전개한다.

HPLC-APCI-MS-MS system을 위하여 APCI inlet system이 설치된 MS(Sciex API-300, Perkin-Elmer SCIEX Instruments, Foster City, CA, USA)를 사용한다. 분석조건은 positive-ion mode에서 collision gas 상태의 Nitrogen를 사용한다. State files은 follows; NEB = 10, CUR = 10, CAD = 4, NC = 3, TEM = 425, OR = 25, RNG = 250, Q0 = -10, IQ1 = -11, ST = -11, RO1 = -12, IQ2 = -34, RO2 = -29, IQ3 = -54, DF = -100, CEM = 1900. Quad 1: 30(0.066), 100(0.11), 1000(0.473), 2000(0.875). Quad 3: 10(0.025), 100(0.055), 1000(0.412), 2000(0.750). multiple reaction monitoring(MRM) mode를 사용하여 parent and product ions을 관찰한다. 조건은 dwell time은 500 ms, duration time 10 min 그리고 pause time은 5.0 ms를 설정한다. 검정결과는 표 3과 같이 m/z 331은 parent ion(M+1, 330+1)과 두개의 product ion인 m/z 313(parent ion-18, H₂O), m/z 269(313 product ion-44, COO)가 관찰된다.

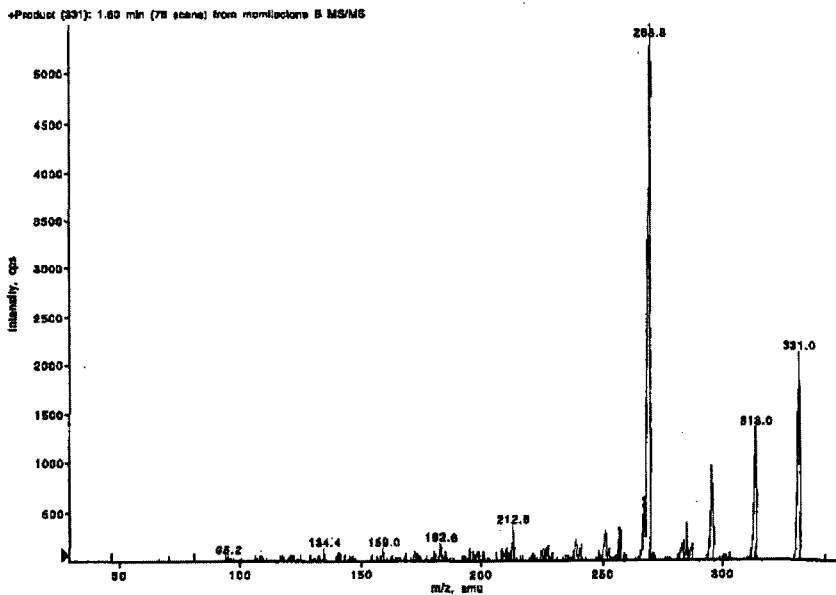


Fig 3. HPLC/MS spectrum of momilactone B(two product ions at m/z 313 (-18, H₂O) and 269 (313-44, COO), parent ion at m/z 331.0(M+1)).

참고문헌

1. Kato, T., C. Kabuto, N. Sasaki, M. Tsunakawa, H. Aizawa, K. Fujita, Y. Kato, Y. Kitahara and N. Takahashi. 1973. Momilactones, growth inhibitors from rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron Lett.* 39 : 3861-3864.
2. Kato, T., M. Tsunakawa, N. Sasaki, H. Aizawa, K. Fujita, Y. Kitahara and N. Takahashi. 1977. Growth and germination inhibitors in rice husks. *Phytochemistry* 16 : 45-48.
3. Lee, C. W., K. Yoneyama, Y. Takeuchi, M. Konnai, S. Tamogami, and O. Kodama. 1999a. Momilactones A and B in Rice Straw Harvested at Different Growth Stages. *Biosci. Biotech. Biochem.* 63(7) : 1318-1320.
4. Lee, C. W., K. Yoneyama, M. Ogasawara, M. Konnai, Y. Takeuchi, M. Konnai. 1999b. Allelochemicals in rice straw. The 17th asian-pacific weed science society.
5. Lee, C. W., K. Yoneyama, Y. Takeuchi, and S.N. Ryu. 2002. Quantification of momilactone A and B in rice straw. *Korean J. crop Sci.* 47(4) : 283~285.

Identification and Isoation of Momilactone B

Choon-woo Lee^{*†} and *Su Noh Ryu*^{**}

**National Institute of Crop Science, R.D.A., Suwon 441-857, Korea*

***Dept. of Agromy, Korea National Open University. Seoul 110-791. Korea02-3668-4631,*

ryusn@knou.ac.kr

+82-31-290-6843, leecw@rda.go.kr