

진노랑상사화 인경으로부터 살초활성 물질의 분리

장호진¹, 김건우*

Isolation of Herbicidal Compound from Bulbs of *Lycoris chinensis* var. *sinuolata* K.H.Tae & S.T.Ko

Ho-Jin Jang¹ and Kun-Woo Kim*

ABSTRACT This study was conducted to determine the herbicidal activity of allelochemicals and identify herbicidal compounds in bulbs of *Lycoris chinensis* var. *sinuolata*. Methanol extract was purified by a series of silica gel flash column chromatography and HPLC. The final HPLC gave two active fractions and an herbicidal compound was obtained. By GC/MS analysis, the herbicidal compound was identified as montanine (O²-methyl pancracine), an isoquinoline alkaloid. Montanine showed 100% of growth inhibition on the shoot and root of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) seedlings at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as compared with the control.

Key words: allelochemicals; alkaloid; herbicidal activity; *Lycoris chinensis* var. *sinuolata*; montanine.

서 언

수많은 식물 종들이 다양한 화학구조를 가진 allelochemical들을 생산하여 다른 동·식물 및 미생물을 제어하여 자신의 생존영역을 방어하는 메커니즘을 가지고 있으며, 생물 종들 간에 화학적 생태계를 형성하고 있다(Rice 1984). 이러한 물질들은 의약 및 농약분야의 신 기능성 모핵화합물의 제공뿐만 아니라 천연 유래의 친환경 농자재로써 활용 가능성이 충분한 최적의 소재라고 할 수 있다.

근래 들어 살초활성을 보유한 국내 자생식물 종들을 탐색하기 위한 시도가 활발하게 이루어지고 있다

(권 등 1997; 김과 이 2007; 김과 장 2009; 김과 홍 2005; 김 2006). 또한 식물 유래의 살초활성 물질을 분리하기 위한 연구 역시 지속적으로 이루어져, 소리쟁이(*Rumex crispus*)의 angelicin(조 등 2010), 섬쭉부쟁이(*Aster glehni*)의 coumarin(김 등 2008), 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium*) 열매의 psoralen과 bergapten(김 등 2005), 족도리(*Asarum sieboldii*)의 elemicin(김 등 2005), 할미꽃(*Pulsatilla koreana*)의 anemonin(최 등 2003), 애기수영(*Rumex acetosella*)의 chrysophanic acid(김 등 2003a) 등이 국내 자생식물들로부터 분리·보고된 바 있다. 한편 식물유래 살초활성 물질과 제초제와의 합제를 통해 천연 물질의

¹ 안동대학교 생명자원과학부 생약자원학 전공, 760-749 경북 안동시 송천동 388(Medicinal Plant Resources Major, School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea).

* 연락저자(Corresponding author) : Phone) +82-54-820-5661, Fax) +82-54-823-1627, E-mail) kkw@andong.ac.kr

(Received December 7, 2010; Examined December 13, 2010; Accepted December 17, 2010)

활용성을 높이려는 시도도 이루어지고 있다(장 등 2010). 지금까지 국내에서 식물의 천연화합물을 선도 물질로 하여 제초제를 개발한 사례는 없으나(김 등 2001; 김 등 2003b), 전술한 바와 같이 국내 식물 종들의 살초활성 탐색과 살초활성 물질의 분리 연구에 관련되어 축적된 자료들은 자생식물 유래의 화합물을 선도물질로 한 환경친화적인 신기능성 제초제 및 식물 추출물을 이용한 친환경농업용 작물보호제 개발에의 전망을 밝게 하고 있다.

수선화과(Amaryllidaceae) 상사화속(*Lycoris*)에 속하는 진노랑상사화(*Lycoris chinensis* var. *sinuolata* K.H.Tae & S.T.Ko)는 한국 특산식물로서 전라북도 내장산 및 전라남도 불갑산에 분포하는 다년생 구근 식물이며, 화훼용으로 이용되고 있다. 수선화과 식물에는 다양한 신경약리학적 활성을 보유한 알카로이드류가 함유되어 수선화과 알카로이드류에 관한 연구는 대부분 의약활성에 국한되어 있다(Silva 등 2006; Silva 등 2008). 한편 수선화과 상사화속의 석산(*Lycoris radiata*)의 경우, 돌피와 상추(박 등 2002) 및 배추, 상추, 알팔파 등(Iqbal 등 2006)에 대한 생육 억제 효과가 보고된 바 있다.

본 연구는 고활성의 살초력을 가지고 있는 진노랑상사화의 인경 추출물(김과 장 2009)로부터 살초활성 물질을 분리하여 동정하고, 진노랑상사화 인경에 함유된 allelochemical들의 살초활성에 관한 정밀한 조사를 통해 친환경농업용 농자재 및 식물자원 유래 신기능성 제초제를 개발하기 위한 참고 자료의 제공을 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료 및 추출

본 실험에 사용된 진노랑상사화는 2008년 9월 전라남도 영광군 불갑산 일원에서 채집하였으며, 김(2004)과 국가표준식물목록(국립수목원과 한국식물분류학회 2007)을 참조하여 식물 종을 동정·분류하였다. 추출용 시료는 식물체로부터 인경을 제거하여 실온에서 음건한 후 분쇄하여 조제하였다. 건조시료

75g을 80% methanol 1L에 침지하여 7일 동안 24시간 간격으로 교반하면서 3회 추출하였다. Whatman No. 2 여지에 의한 여과 후, 식물체 잔사가 제거된 추출여액을 40℃에서 감압농축하여 완전히 건조된 조추출물을 획득하였다.

분리 및 정제

80% methanol 조추출물은 hexane, ethyl acetate 및 *n*-butanol을 사용하여 극성 순으로 용매분획하였다. 이들 중 ethyl acetate 분획물 643mg에 대해 silica gel flash column(ϕ 2.5×18cm, Silica gel 60, 230~400 mesh, Merck) chromatography를 사용하여 CHCl₃-MeOH 5 : 1(v/v), CHCl₃-MeOH 5 : 2 및 MeOH순으로 각 분획 당 10mL씩 용출하였다. 생물검정에 의해 활성이 확인된 분획들(477mg)은 다시 silica gel flash column(ϕ 2.0×17cm, Silica gel 60, 230~400 mesh, Merck) chromatography를 실시하였다. 전개용매계 CH₂Cl₂-EtOH 5 : 1부터 3 : 1, 1 : 1까지 순차적으로 극성을 높여 가며 10mL씩 분획하였고, ethanol로 최종 용출하였다. 활성분획 J2-5(52mg)에 대해 Xterra Prep. RP₈ column(10 μ m, ϕ 7.8×300mm, Waters Co.)이 장착된 HPLC(Waters 1525, Waters Co.)로 분리·정제하였으며, 그 결과 최종 활성분획 J3-1(4.6mg) 및 J3-2(2.8mg)가 획득되었다(그림 1). HPLC 분취 조건으로써 이동상으로 MeOH-H₂O 8 : 2, 유속을 2mL min⁻¹하였고, 분리된 화합물 peak들은 photo diode array detector(Waters 996, Waters Co.)를 통해 UV 흡수특성을 분석·확인한 다음, 254nm에서 검출하였다.

살초활성 검정

Methanol 300 μ l로 시료를 용해하여 직경 5.5cm petri dish 내 Whatman No. 2 여지에 균일하게 흡착시킨 후 fume hood에서 1시간 이상 방치하여 methanol을 완전히 증발시켰다. Petri dish에 1mL의 증류수를 첨가하고 0.5% sodium hypochlorite 용액으로 30분간 살균하여 멸균수로 세정한 돌피(*Echinochloa crus-galli* (L.) P.Beauv.) 종자를 petri dish 당 15립씩 3반복으로 파종하였다. 돌피 종자가 파종된 petri dish는 28

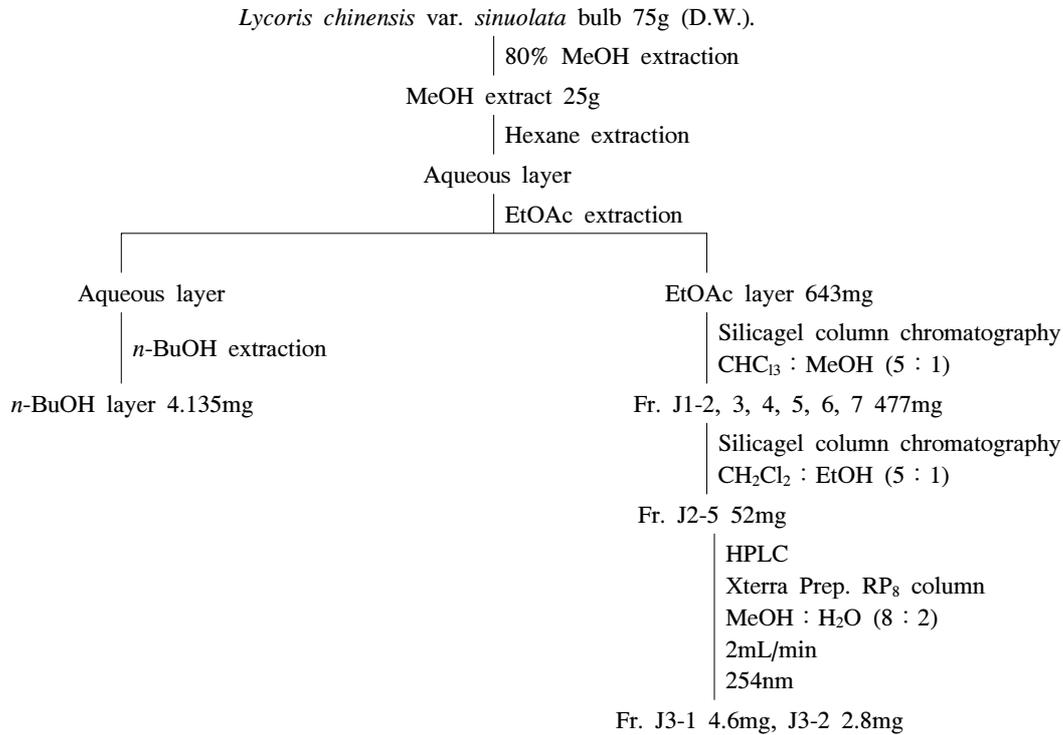


Fig. 1. Schematic isolation procedure of herbicidal compounds from bulbs of *L. chinensis* var. *sinuolata*.

℃, $230\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 growth chamber에 치상하였으며, 7일 후 시험구 당 균일하게 자란 10개의 유묘를 택하여 초장 및 근장을 측정하고, 대조구에 대한 각 처리구의 생장억제율을 산출하였다.

살초활성물질의 동정

최종 활성분획 J3-1 및 J3-2에 함유된 살초활성 물질은 GC/MS 분석을 실시하였으며, GC에 의해 분리된 화합물의 mass spectrum을 GC/MS data system

인 MS Chemstation(Hewlett Packard)에 설치된 NIST 및 Wiley library와의 검색·비교를 통해 동정하였다. GC/MS 분석 조건은 다음과 같다.

결과 및 고찰

진노랑상사화 인경의 80% MeOH 추출물에 대해 돌피 유묘의 생장에 미치는 영향을 조사한 결과, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 농도에서 뿌리의 생장이 대조구에 비해 90%

GC model	: HP 6890 GC system (Hewlett Packard)
Mass model	: HP 5973 Mass selective detector (Hewlett Packard)
Column	: Ultra 2 capillary (ϕ 0.2mm×25m, 0.33 μm film thickness, Hewlett Packard)
Injector temp.	: 250℃
Column temp.	: 120℃(5 min.) → 5℃/min. → 270℃(20 min.)
Carrier gas	: Helium
Split ratio	: 1 : 10
Separator temp.	: 250℃
Ion source temp.	: 200℃

Table 1. Growth of *Echinochloa crus-galli* seedlings as affected by the bulb extract of *Lycoris chinensis* var. *sinuolata*.

	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% inhibition	
		Shoot	Root
MeOH extract	1,000	22.1 \pm 0.5 ^a	93.7 \pm 1.8
	500	0	90.5 \pm 0.5

^a Mean \pm standard error of three replicates.

이상 억제되는 것으로 나타나(표 1), 진노랑상사화 인경의 추출물에는 살초활성에 관련된 물질이 함유되어 있음이 시사되었다.

조추출물 25g을 증류수에 용해 후 hexane, ethyl acetate 및 *n*-butanol로 용매분획하여 각 분획에 대한 생물검정을 실시하였다. 그 결과 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 농도에서 ethyl acetate 및 *n*-butanol 분획이 돌피 유묘의 생장을 90~100% 억제시키는 것으로 확인되었으며, 이들 중 발아도 되지 않은 ethyl acetate 분획의 살초활성 물질을 대상으로 분리·정제 실험을 수행하였다(그림 2).

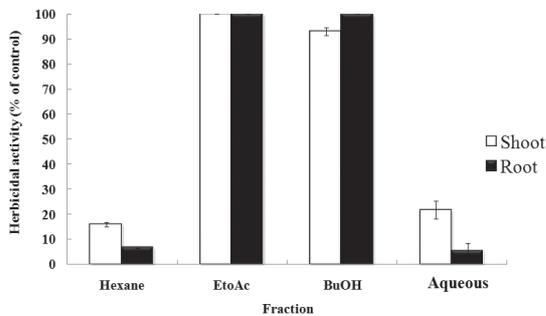


Fig. 2. Growth of *Echinochloa crus-galli* seedlings as affected by the fractions acquired from solvent fractionation of *L. chinensis* var. *sinuolata* bulb extract. Each fraction was applied at 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to the test seeds. The vertical bar represents the mean \pm S.E. of three replicates.

Ethyl acetate 분획물 643mg을 CHCl_3 -MeOH 및 CH_2Cl_2 -EtOH 전개용매계를 적용하여 2회에 걸쳐 silica gel flash column chromatography를 실시하였다. Silica gel flash column chromatography 후, 분획물을 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 농도로 조제하여 돌피 유묘에 대한

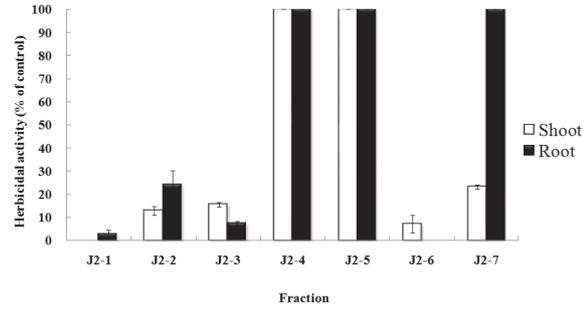


Fig. 3. Growth inhibition of *E. crus-galli* as affected by the fractions purified from *L. chinensis* var. *sinuolata* bulb extract. Seven fractions were acquired by eluting with CH_2Cl_2 -EtOH (5 : 1) on silica gel column. Each fraction was applied at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to the test seeds. The vertical bar represents the mean \pm S.E. of three replicates.

생장억제율을 조사한 결과, J2-4 및 J2-5 분획물의 경우 100%인 것으로 확인되었다(그림 3).

이들 중 J2-4 분획에 비해 수득량이 많은 J2-5 분획을 대상으로 C_8 역상 column이 장착된 HPLC를 통해 살초활성 물질들을 분취하였으며, 최종적으로 2개의 활성분획 J3-1(4.6mg)과 J3-2(2.8mg)를 획득할 수 있었다(그림 4).

J3-1 및 J3-2 분획물의 살초활성을 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 에서 평가하였을 때 신초 및 유근의 생장을 완전히 억제하

Table 2. Growth of *Echinochloa crus-galli* seedlings as affected by J3 fractions purified from *Lycoris chinensis* var. *sinuolata* bulb extract.

Fraction name	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% inhibition	
		Shoot	Root
J3-1	100	100	100
	50	100	100
	20	63.5 \pm 3.2 ^a	100
	10	44.0 \pm 0.3	92.0 \pm 0.3
	5	16.5 \pm 0.5	75.5 \pm 2.8
J3-2	100	100	100
	50	100	100
	20	60.6 \pm 1.2	100
	10	35.7 \pm 1.3	98.8 \pm 0.2
	5	13.9 \pm 0.5	92.7 \pm 1.2

^a Mean \pm standard error of three replicates.

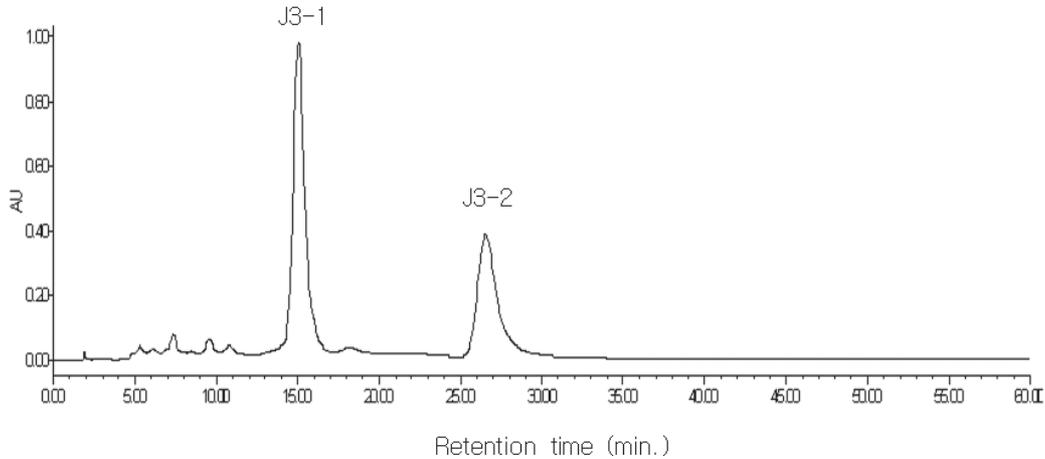


Fig. 4. HPLC chromatogram of the active fraction J2-5 purified from the bulb extract of *L. chinensis* var. *sinuolata*.



Fig. 5. Growth inhibition of *E. crus-galli* as affected by montanine.

였으며, $10\mu\text{g mL}^{-1}$ 수준에서도 유근에 대한 생장억제율이 90% 이상인 것으로 확인되었다. J3-2 분획물은 $5\mu\text{g mL}^{-1}$ 에서도 유근의 생장을 92.7% 억제하였다(표 2). 그림 5에 처리 14일 후의 돌피에 대한 J3-2 분획물의 생장억제 현상을 나타내었다.

최종 활성분획 J3-1 및 J3-2에 대한 GC/MS 분석 결과, J3-2 분획만이 gas chromatogram 상에서 1개의 peak로 나타나, 단일 조성의 화합물로 분리되었음을 확인할 수 있었다(그림 6). 본 화합물의 mass spectrum(그림 7)을 GC/MS data system인 MS Chemstation에 설치된 NIST 및 Wiley library를 통해 검색·비교한 결과, O²-methyl pancracine으로 동정되었다. 이 물질은 분자식 C₁₇H₁₉NO₄, 분자량 301.337인 montanine(그림 8)으로 알려져 있으며,

isoquinoline alkaloid에 속한다(Inubushi 등 1960; Niemann과 Kessel 1966; Ulubelen 1990).

수선화과 알칼로이드는 항바이러스, 항종양, 신경약리학적 활성 등 광범위한 약리학적 활성을 나타낸다고 알려져 있다(Silva 등 2006). Montanine 또한 수선화과 수종의 식물들에서 분리되었으며(Inubushi 등 1960; Silva 등 2008), montanine 관련 연구는 대부분 의약활성에 국한되어 불안완화제, 우울증치료제 및 경련진정제와 같은 신경약리학적 활성을 가진다고 보고되어 있다(Silva 등 2006). 본 화합물의 경우, 현재까지 진노랑상사화로부터 분리된 바 없으며 살초활성에 관해서도 밝혀진 바 없다.

오래전부터 berberine, cocaine, physostigmine 등의 알칼로이드류가 종자 발아억제제로써 유망한 것으로 알려져 있었으며(Rice 1984), Macias(1995)는 식물에서 생합성 되는 물질들 중 알칼로이드류는 $10^{-2} \sim 10^{-5}\text{M}$ 에서 억제활성을 나타낸다고 하였다. 본 연구를 통해 진노랑상사화 인경으로부터 분리된 montanine은 $1.7 \times 10^{-5}\text{M}$ 에서 돌피 유근의 생장을 92.7% 억제시키는 매우 높은 살초력을 나타내어 알칼로이드류 가운데도 고효성을 보유한 화합물인 것으로 확인되었다. 따라서 montanine은 향후 신규 제초제 개발을 위한 선도물질로서의 활용가능성이 매우 높다고 판단되었다. 본 연구를 통해 얻어진 진노랑상사화 유래 추출물은 친환경 작물보호제로 이용하기 위하여 관련 특허가 출원되었다(태와 김 2008).

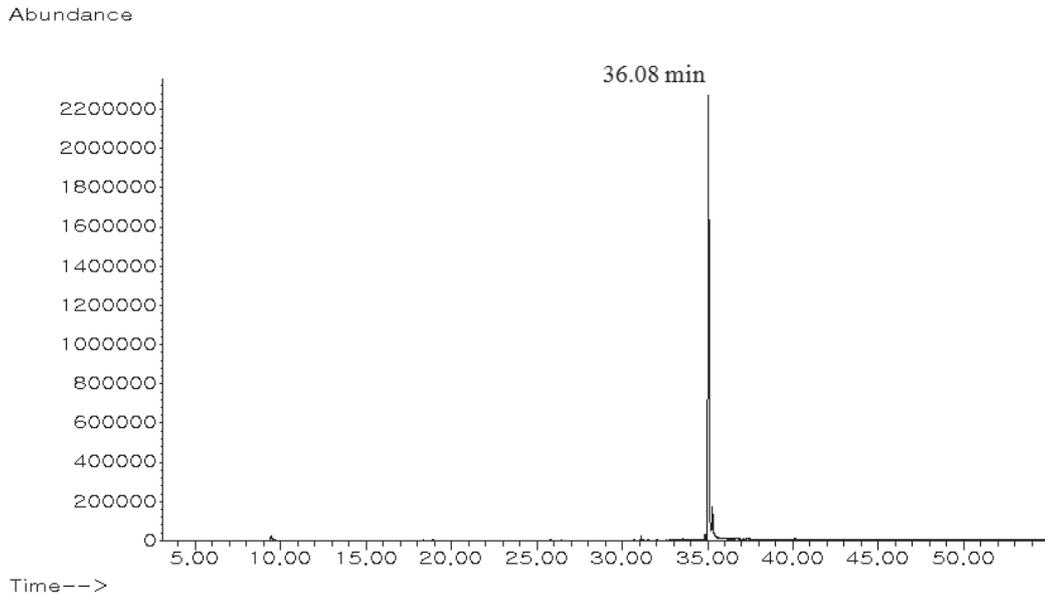


Fig. 6. Gas chromatogram of the active fraction J3-2 purified from the bulb extract of *L. chinensis* var. *sinuolata*.

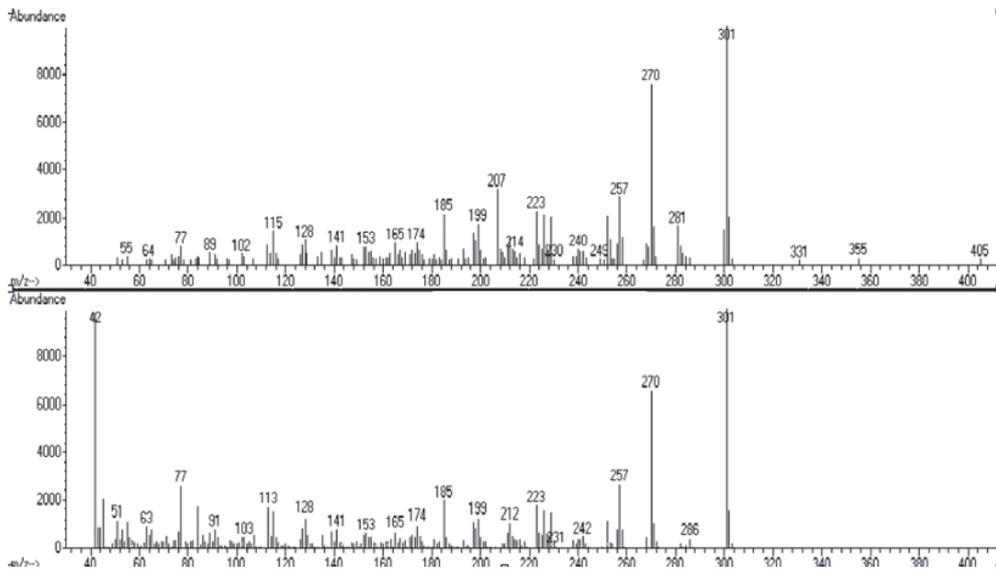


Fig. 7. EI-MS spectrum of montanine (O^2 -methyl pancracine) in the active fraction J3-2 purified from *L. chinensis* var. *sinuolata* blub extract.

요 약

본 연구는 진노랑상사화 인경에 함유된 allelochemical의 살초활성을 조사하고, 활성 발현에 관련된 살초활성 물질을 분리하여 화학구조를 밝히고자 수행되었다.

Silica gel flash column chromatography, HPLC 등 일련의 크로마토그래피법들을 통해 진노랑상사화 인경의 MeOH 추출물을 분리·정제하였다. HPLC에 의해 최종 획득된 활성분획에 대한 GC/MS 분석 결과, isoquinoline alkaloid인 montanine(O^2 -methyl pancracine)이 동정되었다. Montanine은 $50\mu\text{g mL}^{-1}$

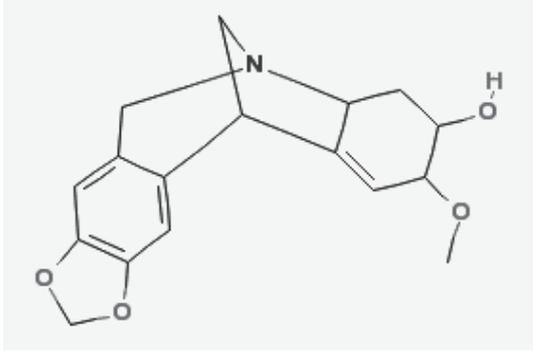


Fig. 8. Chemical structure of montanine (O^2 -methyl pancracine).

농도에서 돌피 유묘의 생장을 100% 억제시키는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 안동대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

인용문헌

국립수목원, 한국식물분류학회. 2007. 국가표준식물 목록. 국립수목원. 포천.

권오경, 임수길, 성기석, 최병렬. 1997. 국내 자생 식물자원 중 농약활성 물질 탐색. 한국환경농학회지 16(4):347-355.

김무열. 2004. 한국산 상사화속(*Lycoris*, 수선화과)의 분류학적 재검토. 한국분류학회지 34(1):9-26.

김건우, 백정규, 김진석. 2005. 산초나무 열매로부터 살초활성물질의 분리. 한국잡초학회지 25(3):194-201.

김건우, 신준구, 이동구. 2008. 섬쭈부쟁이(*Aster glehni* Fr. Schm.)로부터 살초활성물질의 분리. 한국잡초학회지 28(4):434-441.

김건우, 이동구. 2007. 살초 및 살균활성물질 함유 국내 자생식물의 탐색. 한국잡초학회지 27(3):285-295.

김건우, 장호진. 2009. 국내 자생식물의 살초활성. 한국잡초학회지 29(3):194-203.

김건우, 홍경식. 2005. 국내 자생식물 추출물의 피 및 좁개구리밥에 대한 생육 저해 활성. 한국잡초학회지 25(3):209-220.

김미성, 이유선, 김희연, 최해진, 허수정, 권순배, 임상현, 김경희, 김성문. 2005. 족도리(*Asarum sieboldii* Miq.)로부터 신규 살초활성 물질 elemicin의 분리. 한국잡초학회지 25(3):202-208.

김성문. 2006. 국내 자생 살초활성 식물종의 탐색. 한국잡초학회지 26(3):225-245.

김성문, 허수정, 용석호, 김진석, 허장현. 2001. 천연물 기원 살초활성물질. 한국잡초학회지 21(3):199-212.

김희연, 최해진, 김도순, 허수정, 김성문. 2003a. 애기수영(*Rumex acetosella* L.)으로부터 새로운 살초활성물질 chrysophanic acid의 분리. 한국잡초학회지 23(4):301-309.

김희연, 최해진, 유용만, 허수정, 임상현, 김진석, 김성문. 2003b. 식물기원 제초활성물질. 한국잡초학회지 23(3):190-212.

박재현, 이인중, 신동현, 김길용. 2002. 한국산 꽃무릇의 Allelopathy 효과 구명. 경북대농학지 20:25-31.

장현우, 서보람, 황현진, 김재덕, 김진석, 김성문, 전재철, 최정섭. 2010. 천연 물질 Chrysophanic acid의 제초활성. 한국잡초학회지 30(2):143-152.

조남규, 이사은, 최정섭, 황기환, 구석진,王海英, 김성문. 2010. 소리쟁이(*Rumex crispus* L.)로부터 신규 살초활성물질 angelicin의 분리. 한국잡초학회지 30(3):183-190.

최해진, 김희연, 허장현, 허수정, 김도순, 김성문. 2003. 할미꽃(*Pulsatilla koreana* Nakai)으로부터 새로운 살초활성물질 anemonin의 분리. 한국잡초학회지 23(4):310-317.

태현숙, 김건우. 2008. 진노랑상사화 추출물을 유효 성분으로 포함하는 제초용 조성물. 특허출원 제 10-2008-0123243호.

Inubushi Y., H. M. Warnhoff and W. C. Wildman.

1960. Structures of montanine, coccinine, and manthine. *J. Org. Chem.* 25(12):2153-2164.
- Iqbal Z., H. Nasir, S. Hiradate and Y. Fujii. 2006. Plant growth inhibitory activity of *Lycoris radiata* Herb. and the possible involvement of lycorine as an allelochemical. *Weed Biol. and Manag.* 6:221-227.
- Macias F. A. 1995. Allelopathy in the search for natural herbicide models. pp. 310-330 in K. Inderjit, M. M. Dakshini, and F. A. Einhelig, ed. *Allelopathy : organisms, processes, and applications*. American Chemical Society Symposium Series 582.
- Niemann C., and J. W. Kessel. 1966. The isolation of rupicoline and montanine, two psedoindoxyl alkaloids of *Tabernaemontana rupicola* Benth. *J. Org. Chem.* 31(7):2265-2269.
- Silva A. F. S., J. P. de Andrade, L. R. M. Bevilaqua, M. M. de Souza, I. Izquierdo, A. T. Henriques and J. Â. S. Zuanazzi. 2006. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacol., Biochem. and Behav.* 85:148-154.
- Silva A. F. S., J. P. de Andrade, K. R. B. Machado, M. A. B. Rocha, M. A. Apel, M. E. G. Sobral, A. T. Henriques and J. A. S. Zuanazzi. 2008. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine* 15:882-885.
- Rice E. L. 1984. *Allelopathy*. 2nd ed. Academic Press, Orlando, Florida. pp. 266-291.
- Ulubelen A. 1990. A new alkaloid, montanine, from *Ruta montana*. *J. Nat. Prod.* 53(1):207-208.