

호박잎에서 Paraquat 활성 억제 물질의 분리, 동정 및 특성 구명

현규환¹, 윤영범¹, 장세지¹, 신동영¹, 권오도², 최현석³, 정하일⁴, 국용인^{1*}

Isolation, Identification and Characterization of Paraquat Activity-Inhibiting Substances in Squash (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) Leaves

Kyu Hwan Hyun¹, Young Beom Yun¹, Se Ji Jang¹, Dong Young Shin¹
Oh Do Kwon², Hyun-Sug Choi³, Ha-Il Jung⁴ and Yong In Kuk^{1*}

ABSTRACT The fourth leaves (younger leaves) amongst extended 4-upper leaves in 18 squash cultivar were the highest tolerance to the paraquat application, followed by third, the second, and the first leaves (older leaves). The fourth leaves in Joongangaehobak showed more than three times higher tolerance to the paraquat application than did the first leaves. When the combining of water extract from the fourth leaves with paraquat were applied to the leaves and stems of maize, the paraquat phytotoxicity in maize was reduced compared to the paraquat application alone. Therefore, this study continued to investigate if the phytotoxicity inhibitor exist in the fourth leaves. The water extract in the fourth leaves were isolated by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, TLC, and HPLC, and the substance in the extract was speculated as a malic acid by identifying through NMR. The mixture malic acid and paraquat were applied to the maize to verify the application effect of malic acid on paraquat toxicity. The 100 μ M of paraquat application alone showed 62% of paraquat toxicity to the corn leaves, while the combined application of 100 μ M paraquat with malic acid at 0.1, 0.3, 0.5, and 1.0% did not show the symptom.

Key words: malic acid; NMR; paraquat; squash.

¹ 순천대학교 생명산업과학대학 한약자원개발학과, 540-742 전남 순천시 중앙로 413(Dept. of Development in Resource Plants, College of Life Science and Natural Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea).

² 전남농업기술원 쌀연구소, 520-715 전남 나주시 산포면 산제리 206-7(Jeonnam Agricultural Research and Extension Service, Naju 520-715, Korea).

³ 국립농업과학원 유기농업과, 441-707 수원시 서둔동(Department of Agro-Food Safety, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea).

⁴ 미국 코넬대학교 작물토양학과(Department of Crop and Soil Sciences, Cornell University, NY, Ithaca 14853, USA).

* 연락저자(Corresponding author) : Phone) +82-61-750-3286, Fax) +82-61-750-3280, E-mail) yikuk@sunchon.ac.kr

(Received September 3, 2012; Examined September 7, 2012; Accepted September 19, 2012)

서 언

Bipyridinium계 제초제 paraquat는 1958년 영국 ICI에서 제초제로 개발된 이래 세계 100여개 국가의 농경지 및 비농경지에 사용되고 있는 효과가 탁월한 비선택성 제초제이다(Dodge 1971; Herbicide Handbook 1994). Paraquat는 photosystem I로부터 전자를 받아들여 안정한 자유 radical을 형성한다. 이 radical은 분자 산소에 의해 다시 산화되어 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)중의 하나인 superoxide anion(O_2^-)이 생성되고, 이어서 hydrogen peroxide(H_2O_2)와 hydroxyl radical(OH^\cdot)이 생성된다(Farrington 등 1973). 이들 활성산소종은 지질과산화작용을 일으켜 불포화지방산을 ethane이나 malondialdehyde로 분해시켜 식물을 고사케 한다(Rabinowitch와 Fridovich 1983).

이러한 작용기작을 갖고 있는 paraquat는 지금까지 개발된 제초제 중에서 약효발현속도가 가장 빠른 제초제이다. 또한 이러한 장점과 더불어 폭넓은 잡초스펙트럼을 갖고 있어 농경지 및 비농경지에 발생하는 잡초의 효율적인 방제를 위하여 중요한 농업자재 중의 하나이다. 그러나 동일 작용기작을 가진 제초제를 매년 같은 포장에 계속하여 사용함으로써 특정 잡초종으로의 천이와 함께 특정계통의 제초제에 대한 저항성 잡초종의 출현을 야기시키고 있다. 제초제 저항성 잡초에 대한 국제적인 조사결과에 의하면 세계적으로 393여종의 제초제 저항성 잡초가 출현하였다고 보고되었다(Heap 2012). 그 중 28종이 paraquat에 저항성인 것으로 보고되었는데, 이러한 paraquat에 저항성 초종들의 저항성기작은 1) 큐티클을 통한 제한된 침투, 2) paraquat 분자의 대사 불활성화, 3) 작용점 변형, 4) paraquat에 의해 생성되는 활성산소 방어능력, 5) paraquat의 세포 내 격리기구 등으로 생각되지만, 어떤 저항성 초종은 이들 중 한 가지 가설로만으로도 설명이 가능한 저항성 초종이 있는 반면 일부 초종은 한 가지 이상의 저항성 기작이 상호 관련되어 있는 경우도 있다(Fuerst와 Vaughn 1990).

위에서 언급한 paraquat에 저항성인 28 초종은 paraquat 연용에 의해서 발생되었으며, 지황(*Rehmannia glutinosa*)과 같은 일부 초종은 과거에 전혀 노출 경력이 없는데도 내성을 보인 경우도 있다(Kim과 Chun 1992). 이처럼 paraquat에 대한 내성은 종간에 차이가

있을 수 있고 동일종 내에서도 품종 간에 차이가 있을 수 있다. 실제로 미국에서 사용된 콩 품종과 한국에서 사용된 품종 간에 paraquat에 대한 내성 차이가 존재한다고 보고되었다(Kim과 Hatzios 1993). 또한 동일 작물의 품종 내에서도 엽령에 따라 paraquat 내성차이가 존재하는데, Casano 등(1994)은 보리에서 그리고 Ohe 등(2005)은 담배에서 성숙엽이 어린엽에 비해 paraquat에 내성이 크다고 보고하였고 그러한 차이는 항산화제와 항산화효소에 의한 활성산소의 소거능력에 기인된다고 하였다. 위의 연구와 유사하게 Amsellem 등(1993)은 paraquat 저항성 망초(*Conyza bonariensis*)도 생육단계와 항산화효소와 관련이 있다고 하였다. 이처럼 성숙엽이 신엽보다 환경스트레스 및 paraquat에 내성이 큰 것은 일반적인 식물에 나타날 수 있는 현상이다. 그러나 Donahue 등(1997)은 paraquat를 처리한 완두 잎에서 제3엽(신엽)은 제1엽과 2엽보다 내성임을 보고하였다. 이러한 엽령간 내성차이는 광합성 효율과 glutathione reductase와 Cu/Zn superoxide dismutase 등 항산화효소 활성 증가와 관련이 있다고 하였다.

또한 Kuk 등(2006)은 paraquat에 대한 내성은 오이의 동일 개체 내에서 어린잎일수록 컸다고 보고하였다. 즉, 4엽이 전개된 오이 잎에 paraquat를 처리했을 때 엽위별 내성정도는 4엽(신엽)>3엽>2엽>1엽 순이었고, 특히 최상위 엽은 고농도 paraquat 처리에 의해서도 전혀 외형적인 증상을 보이지 않았다. 이러한 엽령간 내성차이는 ascorbate peroxidase 등 항산화효소 활성 증가와 관련이 있다고 하였다. 한편 호박잎에서도 오이잎처럼 paraquat를 처리했을 때 어린엽(4엽)이 성숙엽에 비해 내성을 보였는데 이러한 내성은 항산화효소(catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase와 glutathione reductase) 및 항산화제(ascorbate)에 의해 기인되었다(Yoon 등 2011). 그러나 Chun 등(1997)은 지황에서의 paraquat 저항성 기작을 Fuerst와 Vaughn(1990)이 제안한 위의 paraquat 저항성 기작 가설을 적용하여 검토하였는데, 가설 중 어느 것에도 적용되지 않았고 paraquat에 대한 내성이 지황의 수용성 추출물 내에 존재하는 내성물질과도 관련이 있을 것이라고 하였다. 또한 본 연구팀의 선행연구(Lee 등 2012)에 의하면 호박잎 추출물에 의해 paraquat 활성이 경감되는 결과를 도출하였다. 따라서 본 연구는 paraquat 내성물질이 호박 어린엽에 존재하는지 알아보기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구팀의 선행 연구(Yoon 등 2011)에서 다양한 18개 호박 품종 중에서 엽령별로 paraquat에 내성차이가 뚜렷한 중앙애호박 품종을 선발하였다. 이 호박종자를 24시간 동안 증류수에 침지 후 육묘용 상자(50 × 30 × 7cm)에 파종하여 온실에 두었다. 발아 후 떡잎이 전개되었을 때 500ml의 상토가 충전된 pot에 이식한 후, 4엽이 전개될 때 실험 재료로 이용하였다. 온실 조건은 주/야 온도가 30±2/20±3°C, 광주기는 주/야 14/10시간, 상대습도는 70%, 광량은 500μmol/m²/sec이었다. Paraquat 활성 경감정도를 알아보기 위하여 옥수수(장원찰 1호) 종자를 24시간 증류수에 침종하고 위의 호박실험과 동일한 육묘용 상자에 파종하여 1엽기까지 생육한 후 지름 7cm의 소형포트에 이식하여 3엽이 전개되었을 때 paraquat를 처리하였다.

Paraquat 활성물질 추출

4엽이 전개된 호박잎 중에, 제 4엽만을 1kg 수확하여 7 × 7mm크기로 자른 후, 8L의 MeOH을 넣고 환류냉각하면서 비등 후 20분간 추출 하고, 여과하여 잔사를 재추출하는 과정을 총 3회 실시하였으며, MeOH로 추출한 잔사에 다시 물 8L를 넣고 비등 후 20분간 추출 후 여과하고 잔사를 재추출하는 과정을 총 3회 실시하였다. MeOH과 물 추출물을 감압농축한 후, 증류수를 가하여 각각 500ml로 정용하였다.

용매분획별 paraquat 활성

각각의 MeOH, 물 추출물에 대해 용매분획을 실시하였다. n-Hexane, ethylacetate 그리고 chloroform을 각각 500ml씩 가하여 용매분획을 실시하고, 얻어진 n-hexane, ethylacetate, chloroform 그리고 수용성 획분에 대해 paraquat 활성을 조사하였다. Paraquat 활성은 호박잎 생체중량 5, 10g 상당량이 되도록 추출물을 조제하여 이들 추출물에 0.1% tween 20이 첨가된 100μM paraquat 농도가 되도록 조제하여 3엽기 옥수수 잎에 소형분무기를 사용하여 5ml를 처리하고 처리 후 24시간에 달관평가(0~100%, 0 : 완전고사, 100 : 피해없음)에 의해 잎 피해율을 조사하였다. 이때 추출물에 의한 paraquat 활성경감 정도를 비교하기 위하여 추출물

이 포함되지 않은 0.1% tween 20이 첨가된 100μM paraquat를 단독으로 처리하였다. 또한 0.1% tween 20을 증류수에 첨가하여 각 옥수수 식물체당 5ml를 처리하여 tween 20에 대한 효과 유무를 조사하였다.

Silica Gel Column Chromatography

MeOH, 물 추출물의 용매분획에서 얻어진 4개의 획분 중, paraquat 활성경감 효과가 높은 수용성 획분에 대해 silica gel column chromatography를 실시하였다. Silica gel(70~230 mesh, Merck사) 250g으로 column(3.4 × 75cm)을 제작하고, 시료를 silica gel 20g에 넣고 감압농축한 후 흡착시켜 column 상단에 charge하고, 용매로 용출하면서 250ml씩 분취한 후, paraquat 활성경감 정도를 조사하였다. 사용한 용매계는 chlo개 form내 MeOH 농도를 0, 5, 10, 15, 20, 30, 100%로 증가시키면서 각각 1L씩 용출하고, 그 후, MeOH내의 물의 농도를 20, 50, 100%로 증가시키면서 각각 1L씩 용출하였다. 물 추출물의 경우는 용매계를 변경하여 silica gel column chromatography를 실시하였다. 변경한 용매계는 MeOH내에 물 농도를 0, 10, 20, 30, 50%까지 각각 1L씩, 그 후 물 3L로 용출하면서 500ml씩 용출분획하고 얻어진 획분에 대해 paraquat 활성경감 정도를 조사하였다. Paraquat 활성경감 검정은 위의 용매분획별 paraquat 활성 실험과 동일하게 수행하였다.

Sephadex LH-20 Column Chromatography

Silica gel column chromatography에서 paraquat 활성경감이 인정된 획분을 모아 농축한 후, Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. Gel 100g을 물로 12시간 동안 팽윤시킨 후, column(3.0 × 70cm)을 제작하고 물로 용출하면서 40ml씩 분취하고 얻어진 획분에 대해 paraquat 활성경감 정도를 조사하였다. Paraquat 활성경감 검정은 위의 용매분획별 paraquat 활성 실험과 동일하게 수행하였다.

TLC

Sephadex LH-20 column chromatography에서 paraquat 활성 경감이 인정된 획분을 모아 농축하고, 그 일부를 사용하여 TLC(Merck사, G-60)를 실시하였다. Plate는 10 × 10cm로 잘라서 사용하였고, 용매계는 다음 3가지를 사용하였다.

용매계 A ethylacetate-acetic acid-methanol-water
(60 : 15 : 5 : 10, v/v)

용매계 B acetone-water-chloroform-methanol
(8 : 0.5 : 1 : 1, v/v)

용매계 C chloroform-methanol-water(6 : 4 : 1, v/v)

HPLC

MeOH 및 물 추출물에 대해 HPLC를 실시하면서 검출에 적합한 UV 파장을 선정하였고, 분리효율을 높이기 위하여 0.1% 인산완충용액, 물, 0.1% 초산용액을 사용하여 HPLC를 실시하고 각 획분에 대해 paraquat 활성경감 정도를 조사하였다. 이중 분리효율이 좋은 0.1% 초산용액을 선발하였고, HPLC 조건은 표 1과 같다. Paraquat 활성경감 검정은 위의 용매분획별 paraquat 활성 실험과 동일하게 수행하였다.

핵자기 공명장치(NMR) 분석

NMR 스펙트럼은 AVNCE-400 FT-NMR(400 MHz, Bruker, Germany)으로 측정하였다. 핵자기 공명 분석을 위한 용매로는 D₂O를 이용하였으며, 분리 정제된 시료의 대략적인 탄소의 수와 탄소의 종류를 관찰하기 위하여 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 DEPT NMR spectrum을 분석하였다. Chemical shift(화학적 이동)는 δ(ppm) 단위로 기록하여 구조분석을 하였다.

Table 1. HPLC conditions by using acetic acid.

Instrument	Waters Associate	
Column	Zorbax RX-C8(9.5mm × 25cm)	
Solvent System	A : water, Min : 5.0 40.0 40.1 45.0 45.1 50.0	B : acetonitrile %B : 0 40 100 100 0 0
Detector	UV 254nm	
Flow rate	3.5 ml/min	
Temp.	30°C	
Injection Volume	40μl	

정제 물질에 의한 paraquat 활성 경감

본 연구에서 최종 분리, 동정된 물질은 malic acid로 추측되어 이 malic acid와 paraquat을 위의 paraquat 활성경감 검정법과 동일한 방법으로 옥수수에 처리하고 paraquat 활성경감 효과를 조사하였다. 이때 malic acid 농도는 0.1, 0.3, 0.5 및 1%이었고 paraquat 농도는 100μM이었다.

통계분석

본 연구결과로부터 얻은 자료는 LSD 통계분석을 SAS(2005) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

용매분획별 Paraquat 활성 경감

본 연구팀의 기존연구에 의하면 18종의 호박 품종에 대한 엽위별 paraquat에 대한 내성 반응을 알아본 결과 대부분의 품종에서 1엽<2엽<3엽<4엽 순이었다(Yoon 등 2011). 이들 품종 중에서 엽령간 뚜렷한 내성 차이가 있는 중앙호박의 경우 4엽은 1엽에 비해 paraquat에 대해 3배 이상의 높은 내성을 보였다. 따라서 이들 엽령간 내성 차이가 4엽에 존재하는 내성 물질에 의해서 기인되는지를 알아보기 위하여 내성물질을 분리 동정하고자 하였다.

용매분획하여 얻어진 n-hexane, ethylacetate, chloroform 그리고 수용성 획분에 대해 호박잎 생체중량 5, 10g 상당량으로 제조활성을 조사한 결과는 그림 1과 같다. MeOH 추출물의 경우 각 분획 추출물에 100μM paraquat이 되도록 조제한 후 그 조제된 추출물을 3엽이 전개된 옥수수에 처리하고 처리 후 24시간에 n-hexane, chloroform 획분은 대조구(100μM paraquat 단독처리, 63%)에 비해 잎에 피해율(피사정도, 82~91%)이 심하였으며, ethylacetate 획분은 대조구와 유사한 피사 상태를 나타내었고, 수용성 획분에서 미미한 피사상태(15%정도)를 보여 수용성 획분에서 paraquat 활성 경감이 가장 높았다. 또한 물 추출물의 경우 n-hexane, ethylacetate 및 chloroform은 대조구와 피해정도(52~68%)가 유사하였고 수용성 획분(14%)에서는 대조구(62%)에 비해 피해정도가 적게 나타나, MeOH 추출물보다 물 추출물에서 paraquat 활성경감이 더 높

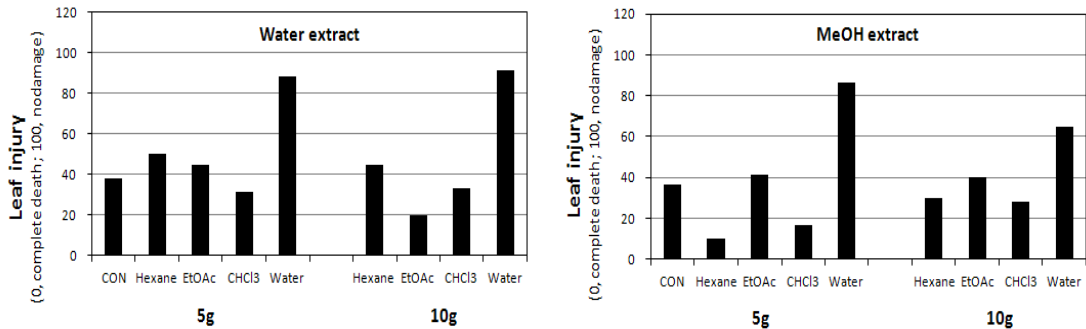


Fig. 1. Leaf injury of maize as affected by paraquat treatment (100 μ M) by different solvent fractions. Leaf injury was investigated at 24 hrs after treatment.

게 나타났다. 그러나 잎 생체량(5, 10g)간에 paraquat 활성경감에는 차이가 없었다. 한편 paraquat 처리 후 48시간에서도 24시간 처리와 유사한 경향을 보였다 (자료 미제시). 본 연구와 유사하게 호박엽의 물 추출물과 paraquat를 혼용하여 옥수수 경엽에 처리한 경우 paraquat 활성을 경감한다고 하였으나 n-hexane, ethylacetate 및 chloroform 희분에서는 효과가 떨어진다고 하였다(Lee 등 2012). 특히 호박 4엽의 물 추출물과 paraquat 혼용처리는 paraquat 단독처리에 비해 약 10배 paraquat 활성 경감을 보였고, 이러한 내성은 paraquat 처리된 잎에 ascorbic acid 함량 증가뿐만 아니라 엽록소 감소, 지질과산화 및 세포내 전해질 누출의 감소와 밀접하게 관련된다고 하였다.

Silica gel column chromatography

용매분획에서 활성이 인정된 methanol 추출물과 물 추출물의 수용액 희분에 대해 silica gel column chro-

matography를 실시하고 paraquat 활성 경감을 검정한 결과는 그림 2와 같다. MeOH추출물의 경우에 체초활성 경감이 인정된 희분은 20, 50, 100% MeOH 용출희분에서 paraquat 활성 경감이 인정되었으며, 물 추출물의 경우는 30, 50% MeOH 용출희분과 물 용출희분 초반에서 paraquat 활성 경감이 인정되었다.

Sephadex LH-20 Column Chromatography

Silica gel column chromatography에서 활성이 인정된 희분(그림 2의 26~36 분획분)을 모아 농축한 후, Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하고 paraquat활성 경감을 검정한 결과는 그림 3과 같다. MeOH 추출물의 경우는 bed volume에 대한 elution volume의 비(이하 V_e/V_t) 0.4~1.0의 범위에서 활성이 인정되었고, 물 추출물의 경우는 V_e/V_t 0.3~1.1의 범위에서 활성이 인정되어, MeOH과 물 추출물 활성분체의 분자량이 유사함을 확인하였다.

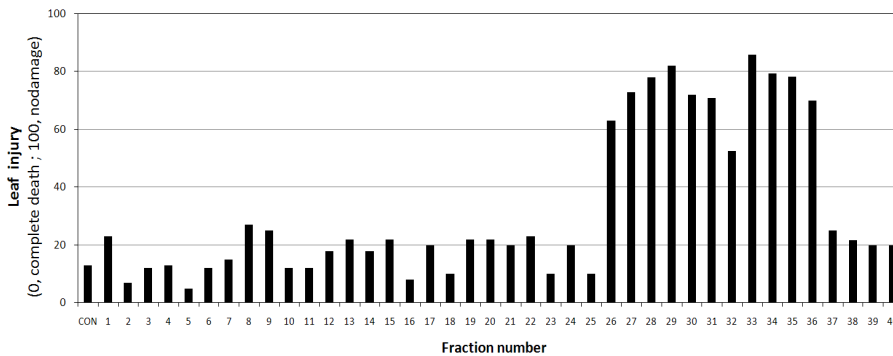


Fig. 2. Leaf injury of maize as affected by paraquat treatment (100 μ M) by silica gel column chromatography fractions. Leaf injury was investigated at 24 hrs after treatment.

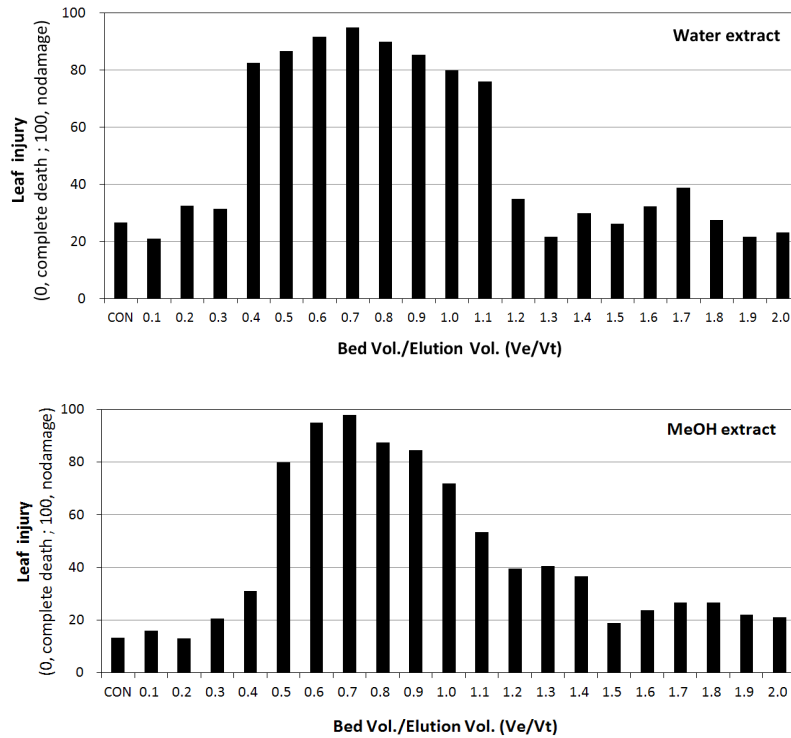


Fig. 3. Leaf injury of maize as affected by paraquat treatment (100µM) by Sephadex LH-20 column chromatography fractions. Leaf injury was investigated at 24 hrs after treatment.

TLC

Sephadex LH-20 Column Chromatography에서 paraquat 활성 경감이 인정된 획분을 모아서 농축한 다음, 단일물질 여부 및 활성본체의 유사성을 확인하기 위하여 용매계를 달리하여 TLC를 실시하고 요오드 증기를 사용하여 발색한 결과는 그림 4와 같다. 용매계 A로 전개한 결과, MeOH과 물 추출물의 전개양상이 거의

동일하여 두 추출물의 활성본체가 거의 유사함을 확인하였다. 용매계 B와 C를 사용하여 전개한 경우는 spot의 정확한 판독이 어려웠다.

HPLC

HPLC 분리 및 UV 검출파장 선정

MeOH 및 물 추출물에 대해 검출에 적합한 UV 파

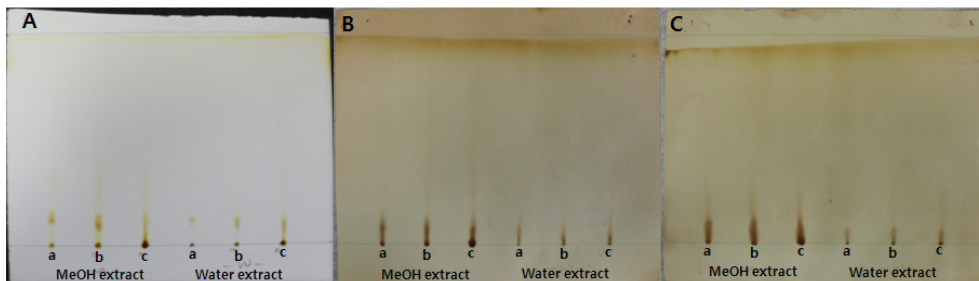


Fig. 4. TLC plate patterns of Sephadex LH-20 Column Chromatography fractions (solvent A, ethylacetate-acetic acid-methanol-water (60 : 15 : 5 : 10, v/v); solvent B, acetone-water-chloroform-methanol (8 : 0.5 : 1 : 1, v/v); solvent C, chloroform-methanol-water(6 : 4 : 1, v/v).

장을 선정하기 위해 HPLC를 실시하였다(자료 미제시). MeOH추출물의 경우에는 220nm에 비해 254nm에서 많은 수의 peak가 검출되어 254nm에서 더 높은 검출효과를 나타내었으며, 물 추출물의 경우에는 220nm, 254nm 모두 비슷한 경향을 나타내었다. 또, MeOH추출물에 비해 물 추출물에 더 많은 종류의 화합물이 존재함을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 254nm를 최종 검출과장으로 선정하였다.

한편, Sephadex LH-20 column chromatography와 HPLC의 결과에서 나타난 바와 같이 MeOH과 물 추출물의 분자량이 유사하고, HPLC chromatogram에서 나타난 바와 같이 MeOH추출물의 peak가 물 추출물의 peak와 완전히 겹쳐서 나타나며 물 추출물에 더 많은 수의 화합물이 존재하는 것으로 강하게 시사되어, 추후 실험은 물 추출물을 대상으로 실시하였다.

인산 완충용액을 이용한 HPLC 분리

분리효율을 높이기 위하여 0.1% 인산완충용액을 사용하여 HPLC를 실시하여 얻어진 각 획분에 대해 제조활성 경감에 대한 검정을 실시하여 얻은 chromatogram과 paraquat 활성 경감을 조사하였다(자료 미제시).

인산완충용액을 사용하여 분리한 결과, 분리능은 향상되었으나, paraquat 활성 경감 결과에 나타난 바와 같이 25~30, 30~35, 35~40, 40~45분 획분을 제외한 전 획분에서 paraquat 활성 경감이 인정되었다. 이들 25~30, 30~35, 35~40분 획분은 HPLC 용매계 중에서 상대적으로 acetonitrile의 함량이 많고, 인산완충용액의 함량이 적은 부분이다. 따라서 paraquat 활성 경감에 인산화합물이 영향을 끼치는지를 확인하기 위해 용매계로 사용한 인산완충용액을 대상으로 제조활성 경감을 검정한 결과, 0.1% 인산완충용액이 paraquat의 약해를 경감시키는 것을 확인하고 HPLC 용매계를 인산완충용액 대신 물로 변경하여 HPLC를 실시하였다.

물을 이용한 HPLC 분리

물을 사용하여 HPLC를 실시하고 각 획분에 대해 paraquat활성 경감을 조사하였다(자료 미제시). 단, 획분은 처음은 2분, 그 후 1분씩 10분까지 분획하고, 5분씩 25분까지 분획, 10분간 분획, 15분간 분획하여 총

14개 획분을 얻었으며, 이를 대상으로 paraquat활성 경감을 검정하였다. 생물활성은 2~5 그리고 9, 10번 획분에서 paraquat활성 경감이 인정되었으나, chromatogram에 나타난 바와 같이, retention time(이하 RT) 12분부터 20분까지 tailing현상이 심하여 물질의 분리가 효과적이라고 판단하기는 어려웠다.

초산을 이용한 HPLC 분리

분리효율을 높이기 위하여 0.1% 초산용액을 사용하여 HPLC를 실시하여 얻어진 획분에 대해 paraquat활성 경감에 대한 검정을 실시하여 얻은 결과는 그림 5와 같다. Chromatogram에 나타난 바와 같이, 물을 사용한 HPLC의 결과보다는 분리능이 향상되었음을 확인할 수 있었으며, paraquat활성 결과, RT 3~4분, 17~18분, 19~20분 그리고 25~26분에서 인정되었으며, paraquat활성 경감물질에 대한 정보를 더욱 얻고자 NMR 분석을 실시하였다.

NMR 분석결과

HPLC의 제조활성경감 획분인 RT 3~4분, 17~18분, 19~20분 그리고 25~26분에 대해 NMR을 실시한 결과, RT 3~4분, 17~18분에서는 peak가 나타났으나, RT 19~20분, 25~26분에서는 peak가 나타나지 않았다. 정확한 이유는 추정할 수가 없으나, 시료양이 너무 적어 검출이 되지 않은 것으로 사료된다. RT 3~4분(이하 Fr. HPLC 3-4)의 NMR 분석결과중 대표적으로 그림 6과 7에 제시하였고 그 밖의 결과와 RT 17~18분(이하 Fr. HPLC 17-18)의 NMR 분석결과는 너무 많아 제시하지 않았다. DEPT(Distortionless Enhanced by Polarization Transfer) 45, 90 그리고 135, 이 세 가지 실험의 스펙트럼과 양성자를 디커플링한 carbon-13 스펙트럼을 이용하면 각 탄소에 결합되어 있는 양성자의 수를 쉽게 구분 할 수 있다. 즉, CH, CH₂, CH₃ 그리고 quaternary carbon을 쉽게 구분 할 수 있다. DEPT 45는 CH, CH₂, CH₃ peak가 양으로 나타나며 proton을 가지고 있지 않은 탄소는 나타나지 않으며, DEPT 90은 CH peak가 양으로 나타나고, DEPT 135는 CH, CH₃ peak는 양으로 나타나는 반면에, CH₂ peak는 음으로 나타난다.

Fr. HPLC 3-4의 ¹H-NMR [400 MHz, D₂O/DCI = 16 : 1(v/v)] spectrum으로부터 1종의 sp³ methylene

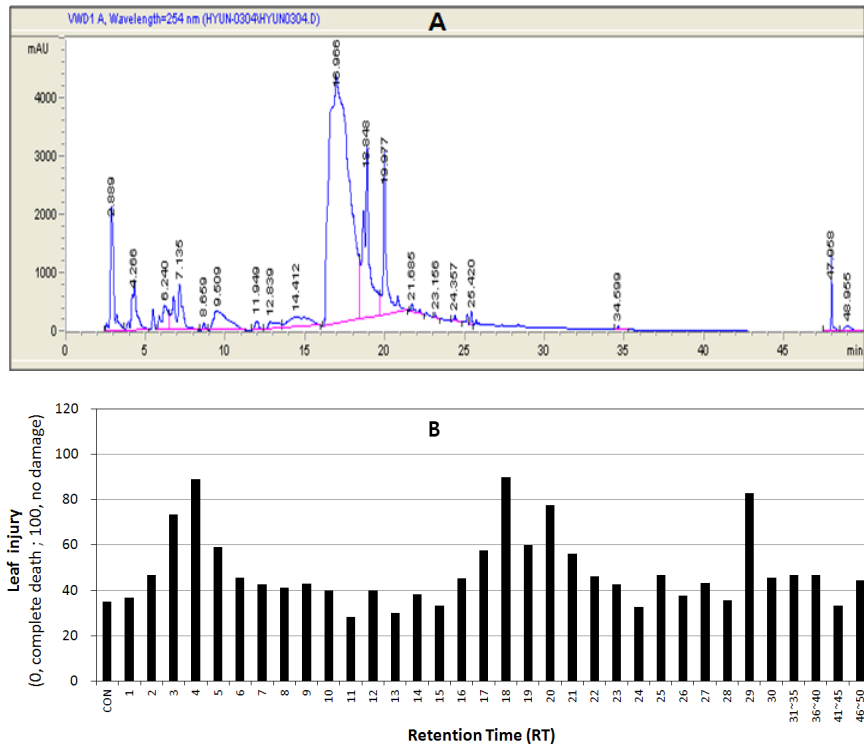


Fig. 5. HPLC chromatogram for acetic acid (A) and leaf injury (B) of maize as affected by paraquat treatment ($100\mu\text{M}$). Leaf injury was investigated at 24 hrs after treatment.

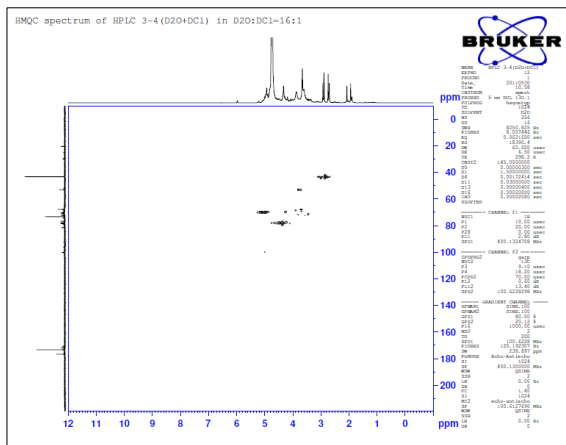


Fig. 6. HMQC spectrum of HPLC 3-4.

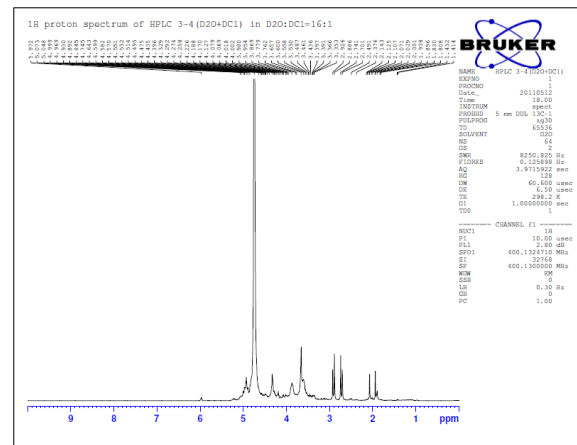


Fig. 7. ^1H proton spectrum of HPLC 3-4.

proton signal들 [δ 2.72(1H, d, J = 16.0 Hz, H-3a), 2.90(1H, d, 16.0 Hz, H-3b)]과 1종의 sp^3 oxygenated methine proton signal [δ 4.33(1H, m, H-2)]이 관찰되었다. 또한 ^{13}C -NMR [100 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ = 16 : 1(v/v)] spectrum으로부터 1종의 sp^3 carbon signal들 [δ

43.2(C-3), 72.9(C-2)]이 관찰되어 ^1H -NMR spectrum과 일치하였다. 여기에 더하여 2종의 carbonyl carbon signal들 [δ 173.3(C-1), 176.6(C-4)]이 관찰되었다. 이상의 1D-NMR spectra로부터 이 화합물은 malic acid일 가능성이 강하게 시사되었다. 이어 HMQC 분석에

Table 2. ¹H-(400 MHz) of Fr. HPLC 3-4 main compounds and ¹³C-(100 MHz) NMR data in D₂O/DCI = 16:1 (v/v).

Position	δ_H (int., mult., J in Hz)	δ_C
1	-	5.38 (1H, dd, 9.2, 3.6)
2	4.33 (1H, m)	2.94 (1H, dd, 16.0, 3.6)
3a	2.72 (1H, d, 16.0)	2.80 (1H, dd, 16.0, 9.2)
3b	2.90 (1H, d, 16.0)	7.04 (1H, d, 2.0)
4	-	6.77 (1H, d, 8.4)

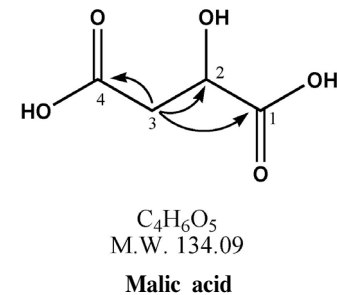


Fig. 8. Structure of Fr. HPLC 3-4 compounds and correlation of HMBC.

의해 proton-carbon 간의 상관관계를 확인하였으며, HMBC 분석에 의해 proton-carbon 간의 long range correlation들을 검토한 결과, 이 화합물의 구조는 malic

acid인 것으로 시사되었다. 특히 화합물 HPLC 3-4의 ¹H-NMR spectrum은 다양한 과실주스로부터 동정된 malic acid의 그것과 일치하였다(표 2). 그래서 화합물 HPLC 3-4는 malic acid(그림 8)로 동정하였다.

또한 Fr. HPLC 3-4의 ¹H- 및 ¹³C- NMR spectra에서 malic acid에 해당하는 signal들 이외에도 이당량의 당 화합물로 추정되는 signal들이 관찰되었으나 이 화합물의 구조해석을 위해서는 추가적인 정제가 요구되는 것으로 판단되었다.

Fr. HPLC 17-18의 ¹H-NMR(400 MHz, D₂O) spectrum으로부터 당 유래로 추정되는 signal들(δ 5.08 ~ 3.47)과 methyl carbon proton signal(δ 3.72)이 관찰되었다. ¹³C-NMR(100 MHz, D₂O) spectrum에서는 ¹H-NMR spectrum으로부터 추정된 당 혹은 methyl group 유래로 추정되는 signal들이 관찰되었다. 즉 anomeric carbon에 해당하는 1종의 signal(δ 104.4), non-anomeric carbon에 해당하는 5종의 signal들(δ 77.7-60.7), 그리고 methyl carbon signal(δ 52.9)을 포함한 총 7종의 carbon이 관찰되었다. 이상의 1D-NMR spectra로부터 이 화합물은 methyl group이 결합된 당화합물로 시사되었다. 이 화합물의 보다 정확한 구조해석을 위해서 추가적인 분석이 필요한 것으로 사료된다.

정제물질의 특성 구명

본 연구에 의해 분리, 정제된 물질은 NMR분석에 의해 malic acid로 추정되었다. 따라서 malic acid와

Table 3. Effect of malic acid on reduction of paraquat phytotoxicity in maize leaves.

Treatment	Leaf injury (0; complete death, 100; no damage)			Shoot fresh wt. (g/plant)
	1 DAT ¹⁾	2 DAT	3 DAT	3 DAT
Untreated control	100 ^{a2)}	100 ^a	100 ^a	1.47 ^a
100 μ M Paraquat (PA)	38 ^b	58 ^b	17 ^c	1.00 ^a
0.1% Malic acid (MA) + PA	100 ^a	53 ^b	13 ^c	0.92 ^a
0.3% MA + PA	100 ^a	87 ^a	48 ^b	1.05 ^a
0.5% MA + PA	100 ^a	90 ^a	47 ^b	1.06 ^a
1% MA + PA	100 ^a	94 ^a	62 ^b	1.36 ^a

¹⁾DAT, days after treatment.

²⁾Means within a column followed by the same letters are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

paraquat를 옥수수에 동시 처리 후 paraquat 활성경감 효과를 조사하였다(표 3). 처리 후 1일째 100 μ M paraquat를 단독으로 처리한 경우 62% 옥수수 잎피해가 발생하였으나 100 μ M paraquat에 malic acid를 각각 0.1, 0.3, 0.5 및 1% 혼용 처리한 경우 잎 피해가 전혀 발생하지 않았다. 처리 후 2, 3일째 경우에도 100 μ M paraquat 단독처리에 비해 malic acid와 paraquat를 혼용처리한 경우에 비해 잎피해 정도가 적었다. 하지만 처리 후 3일째 조사한 생체중에서는 paraquat 단독처리와 malic acid와 혼용 처리간에 유의적인 차이는 없었다. 이와 같은 연구결과로 볼 때 호박잎에 존재하는 malic acid가 활성산소를 소거시켜 paraquat 활성을 억제시켰을 것으로 생각되며 특히 어린엽 일수록 malic acid의 양이 상대적으로 많기 때문에 paraquat에 대한 내성이 증가하는 것으로 사료된다(자료 미제시). 한편 Chun 등(2002)은 paraquat에 내성인 지황(*Rehmannia glutinosa*)에서 paraquat 활성을 경감시킬 수 있는 물질을 분리하였고 그 물질을 acteoside라고 하였다. 실제로 분리된 acteoside과 paraquat를 혼용처리하여 오이 잎에 처리한 결과 paraquat 약해가 크게 감소하였다. 한편 paraquat 활성을 경감할 수 있는 일부 천연 및 무기물질이 있다. 그러나 그들의 효과는 물질과 paraquat 간에 간접적인 상호작용에 기인되는 것으로 생각된다. Polyamines인 spermidine과 spermine은 벼 잎에서 paraquat 독성을 감소하였다(Chang과 Kao 1997). 또한 1, 10-phenanthroline 처리는 내생 spermidine 수준을 증가시켜 paraquat 활성을 감소하였다(Chang과 Kao 1997). 추가적으로 Ca²⁺, Mg²⁺와 K⁺와 같은 무기양이온은 paraquat 저항성 및 감수성 망초(*Conyza bonariensis*) 생태형의 엽절편에서 paraquat 활성을 경감시켰다(Norman과 Fuerst 1997). 결론적으로 본 연구를 통하여 호박 어린엽이 paraquat에 내성이었던 것은 어린엽에 상대적으로 많은 malic acid를 함유하고 있고, 이들 malic acid와 paraquat의 상호작용에 의해 paraquat 활성을 경감시키는 것으로 사료된다.

요 약

선행연구를 통해 18종의 호박 품종에 대한 엽위별 paraquat에 대한 내성 반응을 조사한 결과, 1엽<2엽<3

엽<4엽 순이었다. 이들 품종 중에서 엽령간 뚜렷한 내성차이가 있는 중앙애호박의 경우 4엽은 1엽에 비해 paraquat에 대해 3배 이상의 높은 내성을 보였다. 또한 이들 4엽의 물 추출물과 paraquat를 혼용하여 옥수수 경엽에 처리시 paraquat 약해를 경감시켰다. 따라서 본 연구는 paraquat 약해를 경감시키는 물질이 어린 호박 잎에 존재하는지를 알아보기 위하여 수행하였다. MeOH 추출물보다 물 추출물에서 paraquat 활성경감이 더 높아서 물 추출물을 실리카겔과 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피와 TLC, HPLC를 이용하여 paraquat 활성 경감 효과를 보이는 순수물질을 얻어 NMR을 통해 분석한 결과 malic acid로 추정되었다. 따라서 malic acid가 paraquat 활성경감 물질여부를 확인하기 위하여 malic acid와 paraquat를 옥수수에 동시 처리하였다. 처리 후 1일째 100 μ M paraquat를 단독으로 처리한 경우 옥수수 잎 피해가 62% 발생하였으나 100 μ M paraquat에 malic acid를 각각 0.1, 0.3, 0.5 및 1% 혼용 처리한 경우 잎 피해가 전혀 발생하지 않았다.

감사의 글

본 연구는 연구재단 연구비 지원(KRF-2008-F00003)에 의해 이루어진 것임.

인용 문헌

- Amsellem, Z. M., J. A. Dreisenaar, and J. Gressel. 1993. Developmental variability of photooxidative stress tolerance in paraquat-resistant *Conyza*. *Plant Physiol.* 103:1097-1106.
- Casano, L. M., M. Martín, and B. Sabater. 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiol.* 106:1033-1039.
- Chang, C. J., and C. H. Kao. 1997. Paraquat toxicity is reduced by polyamines in rice leaves. *Plant Growth Regul.* 22:163-170.
- Chun, J. C., J. Kim, I. T. Hwang, and S. E. Kim. 2002.

- Acteoside from *Rehmannia glutinosa* nullifies paraquat activity in *Cucumis sativus*. Pesticide Biochem. Physiol. 72:153-159.
- Chun, J. C., S. Y. Ma, S. E. Kim, and H. J. Lee. 1997. Physiological response of *Rehmannia glutinosa* to paraquat and its tolerance mechanisms. Pestic. Biochem. Physiol. 59:51-63.
- Dodge, A. D. 1971. The mode of action of the bipyridylium herbicides, paraquat and diquat. Endeavour 30:130-135.
- Donahue, J. L., C. M. Okpodu, C. L. Cramer, E. A. Grabau, and R. G. Alscher. 1997. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves : Relationships to resistance. Plant Physiol. 113:249-257.
- Farrington, J.A., M. Ebert, E. J. Land, and K. Fletcher. 1973. Bipyridylium quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridylium herbicides. Biochem. Biophys. Acta, 314:372-381.
- Fuerst, E. P., and K. C. Vaughn. 1990. Mechanisms of paraquat resistance. Weed Technol. 4:150-156.
- Herbicide Handbook. 1994. Weed Science Society of America. Seventh Edition. 352 p.
- Heap, I. M. 2012. International survey of herbicide-resistant weeds, available at www.weedscience.com.
- Kim, J. S., and J. C. Chun. 1992. Resistance of the medicinal plant Jiwhang (*Rehmania glutinosa*) on paraquat. Korean J. Weed Sci. 12(4):374-379.
- Kim, S., and K. K. Hatzios. 1993. Differential response of two soybean cultivars to paraquat. Z. Naturforsch. 48c:379-384.
- Kuk, Y. I., J. S. Shin, H. I. Jung, J. O. Guh, S. Jung, and N. R. Burgos. 2006. Mechanism of tolerance to paraquat in cucumber leaves of various ages. Weed Sci. 54:6-15.
- Lee, S. B., J. Y. Yoon, H. J. Jung, D. J. Lee, D. Y. Shin, K. H. Hyun, and Y. I. Kuk. 2012. Ameliorative effects of squash (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) leaf extracts on oxidative stress. Plant Growth Regul. 67:9-17.
- Norman, M. A., and E. P. Fuerst. 1997. Interaction of cations with paraquat in leaf sections of resistant and sensitive biotypes of *Conyza bonariensis*. Pestic. Biochem. Physiol. 57:181-190.
- Ohe, M., Rapolu M., Mieda T., Miyagawa Y., Yabuta Y., Yoshimura K., and Shigeoka S. 2005. Decline in leaf photooxidative-stress tolerance with age in tobacco. Plant Sci. 168:1487-1493.
- Rabinowitch, H. D., and I. Fridovich. 1983. Superoxide radicals, superoxide dismutases, and oxygen toxicity in plants. Photochem. Photobiol. 37:679-690.
- SAS Statistical Analysis System. 2005. SA/STAT User's Guide, Version 7, Statistical Analysis System Institute, Electronic Version Cary, NC.
- Yoon, J. Y., J. S. Shin, D. Y. Shin, K. H. Hyun, N. R. Burgos, S. B. Lee, and Y. I. Kuk. 2011. Tolerance to paraquat-mediated oxidative and environmental stress in squash (*Cucurbita* spp.) leaves of various ages. Pestic. Biochem. Physiol. 99:65-76.