농약과학회지 제16권 제3호 (2012)
Vol. 16, No. 3, pp. 209-216 (2012)
Open Access http://dx.doi.org/10.7585/kjps.2012.16.3.209
ORIGINAL ARTICLE / RESIDUE

Online ISSN 2287-2051
Print ISSN 1226-6183

계혈등(*Spatholobus suberectus* Dunn)으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조결정

황주태 · 박영식 · 김영신 · 김진철[1] · 임치환*

충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과, [1]한국화학연구원 녹색화학분야

(Received on September 5, 2012. Revised on September 13, 2012. Accepted on September 21, 2012)

Isolation and identification of antifungal compounds from *Spatholobus suberectus* Dunn

Joo-Tae Hwang, Young-Sik Park, Young-Shin Kim, Jin-Cheol Kim[1] and Chi-Hwan Lim*

Department of Bioenvironmental Chemistry, College of Agricultural and Life Science, Chungnam National University, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Republic of Korea
[1]Green Chemistry Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Yuseong-Gu, Daejeon 305-600, Republic of Korea

Abstract In the continued research on natural fungicides for control of plant diseases by using plant-derived products, we found that *Spatholobus suberectus* Dunn had a strong fungicidal activity against several plant pathogens. *S. suberectus* (1 kg) was extracted with 80% aqueous MeOH and then the concentrated extract was partitioned with *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH and H_2O successively. The four layers were tested their disease contron efficacies against 6 plant diseases such as rice blast (RCB), rice sheath blight (RSB), tomato grey mold (TGM), tomato late blight (TLB), wheat leaf rust (WLR), and barley powdery mildew (BPM). The EtOAc fraction was highly active showing over 80% control against RCB, TGM, TLB, and BPM. By using silica gel chromatography, preparative TLC and HPLC, six compounds that were expected to have antifungal activity were separated. Their chemical structures were identified as ethanone, hydroxytyrosol, epicatechin, procyanidin B2, dimethoxy daizein and formononetin by ESI-MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, and 2D-NMR spectroscopic analyses. The chemicals except epicatechin were first reported in *S. suberectus*. Study on *in vitro* and *in vivo* antifungal activities of the isolated compounds is in progress.

Key words *Spatholobus suberectus* Dunn, Epicatechin, Procyanidin B-2, Dimethoxy daizein, Formononetin

서 론

친환경 농업정책에 따른 영향으로 농업생태계 보호를 위한 친환경 농업정책과 유기 농산물에 대한 수요 증가로 합성농약의 대안인 환경친화형 천연물 생물농약의 관심과 개발이 활발히 증가하고 이에 따른 천연물 살균제의 시장이 급증할 것으로 예상되고 있다. 본 연구는 식물에 발생하는 주된 식물병원균들 가운데, 비교적 발병율이 높고 피해가 많이 발생하는 6가지 식물병인 벼 도열병균, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병을 대상으로 *in vivo* 항균활성 screening을 실시하여(Kim 등, 2001; Park 등, 2003; Cho 등, 2006) 각 식물병에 활성을 보이는 한약재인 계혈등을 대상으로 항균활성물질의 분리 및 정제를 실시하고, 분리된 화합물에 대한 항균활성을 검정하였다.

계혈등(*Spatholobus suberectus* Dunn)은 쌍떡잎식물 장미목 콩과 식물인 밀화두(密化豆)의 줄기를 말려서 만든 약제로 생약명은 Mucunae Caulis이며, 중국이 원산지이다. 복건, 광동, 광서, 운남 등지에 분포하며 줄기의 즙액이 닭의 피처럼 붉은 색이어서 계혈등이라는 이름이 붙었으며, 한방에서

*Corresponding author
Tel: +82-42-821-6734, Fax: +82-42-821-7883
E-mail: chlim@cnu.ac.kr

는 심장과 비장에 작용하여 혈액순환을 도와주고, 혈액을 보충하며, 어혈을 없애는 약제로 쓴다. 계혈등은 연중 채취가 가능하며, 보통 가을과 겨울에 줄기를 채취한 후 절단하여 햇볕에 건조하거나 물에 담구고 쪄서 절단하여 햇볕에 건조하여 사용한다. 또한 계혈등에 대한 연구로는 유방암 억제(Messina과 Wu, 2009), 항산화 작용(Röhrdanz 등, 2002), 아테롬성 동맥경화증의 예방(Si과 Liu, 2007), 에스트로겐 활성(Kuiper 등, 1998), 제초활성(Bais 등, 2003), Tyrosinase 억제작용(Kung 등, 2005), 자궁 근종세포 억제작용(Kim 등, 2010)등이 보고가 되어 있다. 본 연구는 선행연구를 통해 여러 식물병원균에 대하여 항균활성을 보이는 계혈등으로부터 활성물질을 분리하고 화학구조를 규명하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시 식물과 식물 병원균

계혈등(*Spatholobus suberectus* Dunn)은 서울 경동시장에서 구입하여 실험에 사용하였다. 항균실험에 사용한 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae*), 벼 잎집무늬마름병(*Rhizoctonia solani*), 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 토마토 역병(*Phytophthora infestans*), 밀 붉은녹병 (*Puccinia recondita*), 보리 흰가루병(*Blumeria graminis* f. sp. hordei)은 한국화학연구원에서 배양하여 사용하였다.

시약 및 기기

활성물질의 추출 및 용매 분획에 사용한 *n*-hexane, ethyl acetate(EtOAc), methanol(MeOH), *n*-butanol(*n*-BuOH)등의 용매는 국내 삼전순약(18 L, 공업용) 제품을 정제하지 않고 사용하였다. NMR용 용매는 CD_3OD(Merck, Germany), HPLC 용매로 사용한 MeOH은 정제하여 사용하였다. Flash column chromatography용 silica gel은 Merck사의 제품(70~230 mesh, Merck, Germany), 분석용 및 분취용 silica gel TLC는 Merck사의 Kiesel gel $60F_{254}$(0.25 mm) 및 Kiesel gel $60F_{254}$(0.5 mm) plate, HPLC 컬럼은 YMC-Pack ODS-A(250 × 20 mm, Kyoto, Japan)를 사용하였다. 발색시약은 10% H_2SO_4 및 vanillin-H_2SO_4를(vanillin 1% in methanol + 5% H_2SO_4 in methanol) 사용하였으며, UV 254와 365 nm로 검출하였다.

HPLC는 JASCO LC 900(Japan), rotary vacuum evaporator는 Rotavapor R200(Bchi, Swiss), 비선광도는 polarimeter P-1020(JASCO, Japan), NMR spectrometer는 JNM-AL400 (400 MHz/100 MHz, JEOL Ltd, Japan)을 사용하였다. 내부 표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였으며, chemical shift는 ppm(δ)으로 나타내었다. ESI-MS는(AD SCIEX, U.S.A) 4000Q Trap으로 측정하였다.

항균활성 검정

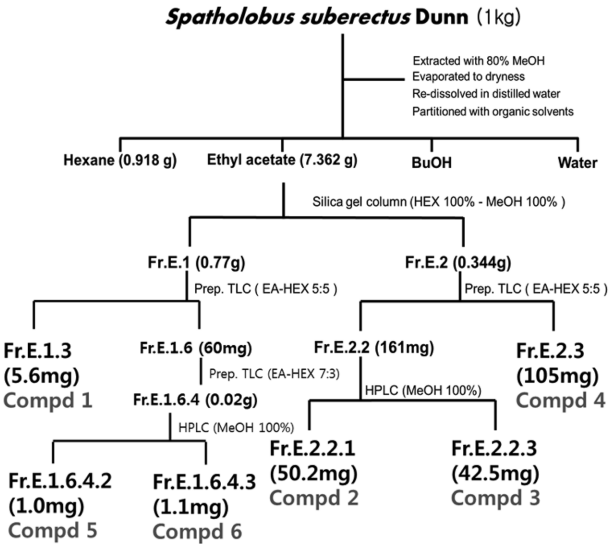
6종의 식물 병원균에 대한 추출 용매별 예방효과를 조사하였다. 계혈등 분획물(*n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH, H_2O) 각 80 mg을 10 mL의 acetone이나 5 mL의 MeOH에 녹이고 Tween 20(250 μL/mL) 용액을 가하여 최종 부피가 40 mL이 되도록 시료를 제조하였다(물질 최종 농도: 2,000 ppm). 실험에 사용한 벼와 토마토, 밀 그리고 보리는 지름 4.5 cm의 플라스틱 포트에 수도용 상토 또는 원예용 상토를 70% 정도 채운 후, 종자를 파종하여 25±5°C의 온실에서 1주 내지 4주간 재배하여 사용하였다. 시료가 식물체에 골고루 분무될 수 있도록 turn table에 놓고 처리구는 2000 ppm의 시료 50 mL를, 대조구는 tween 20 solution 50 mL를 살포하고 풍건한 다음 실온에서 1일 동안 방치한 후 병원균을 접종하고 3일 내지 8일 후에 발병도를 조사하였다(Kim 등, 2001; Cho 등, 2006). 각각의 실험은 3반복으로 실시하였으며 방제가는 다음 식에 따라 계산 하였다.

$$\text{방제가}(\%) = (1 - \text{처리구의 병반면적율}/\text{대조구의 병반면적율}) \times 100$$

각 병원균에 대한 활성은 80%이상의 저해율을 나타내는 시료에 대하여 항균활성이 있다고 판단하고 항균 물질 분리에 이용하였다.

계혈등으로부터 활성 물질의 분리

세절한 뒤 음건한 계혈등 1 kg을 80% aqueous MeOH에 침지한 후 상온에서 3회 추출하고 감압 농축하여 추출물 64 g을 얻었다. 추출물을 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH, H_2O의 순으로 분획한 후 감압 농축하였다(Scheme 1). 우선 EtOAc



Scheme 1. Isolation of active compounds from *S. suberectus* Dunn.

분획을 가지고 silica gel column chromatography(*n*-hexane → EtOAc → MeOH)를 수행하여 10개의 소분획(Fr.E.1-Fr.E.10)으로 나누었다. 이중 Fr.E.1을 preparative TLC(EtOAc-*n*-hexane/5:5, v/v)를 이용하여 7개의 소분획(Fr.E.1.1-Fr.E.1.7)으로 나누어 노란색 gum type의 화합물 **1**(Fr.E.1.3)을 분리하였다. 소분획 Fr.E.1.6을 preparative TLC(EtOAc-*n*-hexane/7:3, v/v)를 이용해 Fr.E.1.6.4를 얻고 이를 preparative HPLC (ODS, MeOH 100%)를 이용하여 무색 결정의 화합물 **5**와 화합물 **6**을 분리하였다. 그리고 소분획 Fr.E.2 또한 preparative TLC(EtOAc-*n*-hexane/5:5, v/v)를 이용하여, 4개의 소분획(Fr.E.2.1-Fr.E.2.4)을 얻었고 이중 노란색 gum type의 화합물 **4**(Fr.E.2.3)를 분리하였다. Fr.E.2.2는 preparative HPLC(ODS, MeOH 100%)를 이용하여 붉은색 gum type의 화합물 **2**와 갈색 gum type의 화합물 **3**을 분리하였다.

결과 및 고찰

계혈등의 분획별 항균활성

계혈등의 분획별 *in vitro* 항균활성을 검정한 결과 *n*-hexane층에서는 벼 도열병에 88%, 토마토 잿빛곰팡이병에 89%, 토마토 역병에 91%, 보리 흰가루병에 86%의 저해 활성을 나타내었다. EtOAc층에서는 토마토 잿빛곰팡이병에 89%, *n*-BuOH층에서는 벼 도열병에 80%, 토마토 잿빛곰팡이병에 85%의 저해 활성을 보였고, H_2O층에서는 밀 붉은녹병에 87%의 항균활성을 보였다(Table 1). EtOAc 층이 가장 강한 항균활성을 보였으므로 이 분획층으로부터 항균물질 분리를 실시하였다.

화합물 1의 구조 결정

화합물 **1**의 화학구조는 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ESI-MS spectrum의 해석에 의하여 결정되었다. ESI-MS 측정결과 *m/z* 167에서 $(M+1)^+$peak, *m/z* 165에서 $(M-1)^+$peak를 나타내어 분자량이 166임을 확인할 수 있었다. ^{1}H-NMR spectrum을 해석한 결과, 2.50 ppm(3H, s, H-8)에서 acethyl group의 proton peak가 singlet으로 관측되었고, 3.87 ppm (3H, s, H-9)에서 aromatic ring에 결합하고 있는 methoxy group의 proton peak가 관측되었다. 그리고 6.82 ppm(1H, d, J = 9.0 *Hz*, H-5), 7.50 ppm(1H, d, J = 3.0 *Hz*, H-2), 7.52 ppm(1H, dd, J = 9.0, 3.0*Hz*, H-6)의 aromatic ring의 methine signal들이 관측되었다. ^{13}C-NMR spectrum을 해석한 결과, 26.35 ppm(C-8)에서 acethyl group의 carbon peak, 56.53 ppm(C-9)에서 methoxy group의 cabon peak, 112.11 ppm(C-3), 116.01 ppm(C-4), 129.02 ppm(C-1), 125.42 ppm (C-2), 149.31 ppm(C-5), 153.71 ppm(C-6)에서 aromatic ring의 methine carbon peak가 관측되었다. 그리고 200 ppm (C-7)에서 ketone의 carbon을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하고 문헌 검색을 통하여 화합물 **1**의 화학구조를 ethanone (M.W 166, $C_9H_{10}O_3$)으로 동정하였다(Khan 등, 2003).

화합물 2의 구조 결정

화합물 **2**의 화학구조는 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ESI-MS spectrum의 해석에 의하여 결정되었다. ESI-MS를 측정한 결과 *m/z* 153에서 $(M-1)^+$peak를 나타내어 분자량이 154임을 추정할 수 있었다. ^{1}H-NMR spectrum을 해석한 결과, 2.62ppm(2H, t, J = 7.1*Hz*, H-7)에서 triplet methylene과 3.63 ppm(2H, q, J = 7.1*Hz*, H-8)에서 quartet methylene proton이 관측되었다. Coupling 형태로부터 두 methylene group이 결합하고 있으며, chemical shift값으로 보아 oxygen과 인접한 $-CH_2-CH_2-OH$의 부분 구조를 가지고 있음을 추정할 수 있었다. 또한 6.48 ppm(1H, dd, J = 8.0, 1.5 *Hz*, H-2), 6.62 ppm에서(1H, d, J = 1.5 *Hz*, H-6), 6.66 ppm에서 (1H, d, J = 8.0 *Hz*, H-5)의 aromatic ring의 methine peak가 확인되었다. ^{13}C-NMR spectrum을 해석한 결과, 39.94 ppm (C-7)에서 aromatic ring과 결합하고 있는 carbon의 peak, 64.94 ppm(C-8)에서 methoxy carbon의 peak가 관측 되었으며, 116.73 ppm(C-2), 117.49 ppm(C-6), 121.66 ppm

Table 1. Antifungal activity of the four fractions obtained by solvent partitioning of 80% aqueous methanol extracts of *Spatholobus suberectus* Dunnagainst six fungal pathogens[a)]

Fraction	Conc. (μL/mL)	Control Value (%)[b)]					
		RCB[c)]	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
n-Hexane	2000	88	21	89	91	27	86
Ethyl acetate	2000	65	11	89	64	0	50
n-Butanol	2000	80	11	85	59	0	5
Aqueous	2000	58	5	55	18	87	0

[a)]Seedlings were inoculated with spores or mycelial suspensions of the test organism 1day after solutions of the plant extracts were sprayed onto the leaves to run-off.
[b)]Control value(%) = (1-disease severity of treated plants/disease severity of untreated plants) × 100.
[c)]RCB = Rice blast; RSB = Rice sheath blight; TGM = Tomato gray mold; TLB = Tomato late blight; WLR = Wheat leaf rust; BPM = Barley powdery mildew.

(C-5), 132.21 ppm(C-1), 145.04 ppm(C-4), 145.56 ppm(C-3)에서 aromatic ring의 methine peak가 관측되었다. 이상의 결과를 종합하고 문헌 검색을 통하여 화합물 **2**는 hydroxyty-rosol(M.W 154, $C_8H_{10}O_3$)로 구조 동정하였다(Romero 등, 2002; Tuck 등, 2002; Boskou, 2008; Biancoa 등, 2006).

화합물 3의 구조 결정

화합물 **3**의 화학구조는 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ESI-MS spectrum의 해석에 의하여 결정되었다. ESI-MS 측정결과 molecular ion peak가 *m/z* 291.20(M+1)$^+$, 289.10(M-1)$^+$에서 관측되어 분자량이 290임을 확인할 수 있었다. ^{1}H-NMR spectrum을 해석한 결과(Table 2), 2.75 ppm(2H, dd, *J* = 16.5, 7.7 *Hz*, H-4)에서 methylene peak, 4.13ppm(1H, m, H-3)과 4.78 ppm(1H, d, H-2)에 oxygen에 인접한 methine proton이 관측되었다. 상호간에 meta coupling 하고 있는 두 개의 aromatic methine proton peak들이 5.88 ppm(1H, d, *J* = 2.2 *Hz*, H-6), 5.90 ppm(1H, d, *J* = 2.2 *Hz*, H-8)에서 관측되었으며, 6.71 ppm(1H, dd, *J* = 8.1, 1.9 *Hz*, H-2')과 6.73 ppm(1H, d, *J* = 8.1 *Hz*, H-3'), 6.94 ppm(1H, d, *J* = 1.9 *Hz*, H-6')의 peak로부터 1,2,4-trisubstituted benzene ring의 3개의 methine proton peak를 확인하였다. ^{13}C-NMR spectrum을 해석한 결과(Table 2), 67.65 ppm(C-3)의 OH기와 인접

Table 2. NMR(^{1}H, 400 MHz; ^{13}C, 100 MHz) data of Compound **3**, **4**(CD_3OD)

position	δ H		δ C	
	Compd. **3**	Compd. **4**	Compd. **3**	Compd. **4**
2	4.78(1H, d, *J* = 1.8 Hz)[a)]	4.56(1H, *J* = 1.8 Hz)	80.05	82.81
3	4.13(1H, m)	3.98(1H, m)	67.65	68.80
4	2.75(2H, dd, *J* = 16.5, 7.7 Hz)	4.12(1H, d, *J* = 2.0 Hz)	29.38	29.25
5	-	-	96.58	158.00
6	5.88(1H, d, *J* = 2.2 Hz)	5.93(1H, d, *J* = 2.3 Hz)	96.08	96.08
7	-	-	158.28	158.08
8	5.90(1H, d, *J* = 2.2 Hz)	5.91(1H, d, *J* = 2.3 Hz)	157.94	95.68
9	-	-	157.65	157.67
10	-	-	100.27	100.99
1'	-	-	132.53	132.40
2'	6.71(1H, dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz)	6.71(1H, dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz)	119.62	116.32
3'	6.73(1H, d, *J* = 8.1 Hz)	6.70(1H, d, 1.9 Hz)	116.12	146.31
4'	-	-	146.03	146.00
5'	-	-	146.20	116.12
6'	6.94(1H, d, *J* = 1.9 Hz)	6.94(1H, d, *J* = 1.9 Hz)	115.53	120.00
2"		4.54(1H, d, *J* = 1.9 Hz)		79.85
3"		3.94(1H, m)		67.48
4"		2.63(2H, dd, *J* = 18.4, 1.6 Hz)		28.41
5"		-		157.50
6"		5.90(1H, s)		96.57
7"		-		158.05
8"		-		107.88
9"		-		157.49
10"		-		100.26
1'"		-		132.28
2'"		6.75(1H, d, *J* = 2.0 Hz)		119.62
3'"		6.70(1H, d, *J* = 2.0 Hz)		145.83
4'"		-		146.00
5'"				115.43
6'"		6.95(1H, d, *J* = 2.0 Hz)		115.38

[a)]Proton signal multiplicity and Coupling constant(*J* = Hz) are parentheses, the characters denote s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; m, multiplet.

한 methine carbon과 29.38 ppm(C-4), 80.05 ppm(C-2), 96.08 ppm(C-6), 96.58 ppm(C-5), 100.27 ppm(C-10), 157.65 ppm(C-9), 157.94 ppm(C-8), 158.28 ppm(C-7)에서 A ring과 C ring의 carbon peak들을 확인하였고, 115.53 ppm(C-6'), 116.12 ppm(C-3'), 119.62 ppm(C-2'), 132.53 ppm (C-1'), 146.03 ppm(C-4'), 146.20 ppm(C-5')에서 B ring의 carbon peak들이 관측되었다. 화합물 **3**의 선광도는 $[\alpha]_D^{25} -61^\circ$ (*c* 0.68 MeOH)로 측정되었다. 이상의 결과를 종합하고 문헌 검색을 통하여 화합물 **3**은 epicatechin(M.W 290, $C_{15}H_{14}O_6$)으로 구조 동정하였다(Masami 등, 1999; Cren-Olive 등, 2002; Mateus 등, 2002; Kumar와 Rajapaksha, 2005).

화합물 4의 구조 결정

화합물 **4**의 화학구조는 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ESI-MS spectrum의 해석에 의하여 결정되었다. ESI-MS 측정결과 molecular ion peak가 *m/z* 579.30에서$(M+1)^+$, 577.50$(M-1)^+$에서 나타나 분자량이 578임을 확인할 수 있었다. 화합물 **4**의 NMR data는 화합물 3의 NMR data와 유사하였다(Table 2). MS data($290 \times 2 - 2 = 578$)와 ^{13}C-NMR의 peak의 수로 보아 화합물 **3**의 2량체임을 추측할 수 있었다. ^{1}H-NMR spectrum을 해석한 결과, 화합물 **3**의 2.75 ppm(H-4) signal이 화합물 **4**에서는 2.63 ppm으로 high shift하고 4.12 ppm에서 methine signal이 관측되어 epicatechin-epicatechin이 C4-C8" 결합한 것으로 추정하였다. 화합물 **4**의 선광도는 $[\alpha]_D^{25} -103^\circ$ (*c* 0.82 MeOH)로 측정되었다. 이상의 결과를 종합하고 문헌 검색을 통하여 화합물 **4**는 procyanidin B2 (M.W 578, $C_{30}H_{26}O_{13}$)로 구조 동정하였다(Takahashi 등, 1999; Mateus 등, 2002b; Shahat, 2006).

화합물 5의 구조 결정

화합물 **5**의 화학구조는 ^{1}H-NMR, HMQC data의 해석에 의하여 결정되었다. ^{1}H-NMR spectrum을 해석한 결과 (Table 3), 8.15 ppm(1H, s, H-2)에서 C ring의 methine proton peak를, 8.04 ppm(1H, d, $J = 9.0$ *Hz*, H-5), 6.92 ppm(1H, dd, $J = 8.7$, 2.1 *Hz*, H-6), 6.83 ppm(1H, d, $J = 1.8$ *Hz*, H-8)에서 A ring의 proton peak를 7.46 ppm(2H, d, $J = 8.4$ *Hz*, H-2', H-6'), 6.98 ppm(2H, d, $J = 8.7$ *Hz*, H-3', H-5')의 B ring의 proton peak가 관측되었다. 그리고 B ring에 결합되어 있는 methoxy group의 proton peak는 3.96ppm (3H, s, C4'-OCH_3)에서 확인하였다. 그리고 proton과 carbon과의 상관관계를 알아보기 위해 HMQC를 측정한 결과, 8.15 ppm(H-2)의 proton peak는 152.87 ppm(C-2), 8.04 ppm(H-5)의 proton peak는 127.09 ppm(C-5), 6.92 ppm(H-6)의 proton peak는 115.56 ppm(C-6), 6.83 ppm(H-8)의 proton peak는 102.00 ppm(C-8), 7.46 ppm(H-2', H-6')의 proton peak는 130.00 ppm(C-2', C-6'), 6.98 ppm(H-3', H-5')의 proton

Table 3. NMR(^{1}H, 400 MHz; ^{13}C, 100 MHz) data of Compound **5**, **6**(CD_3OD)

position	δ H		δ C	
	Compd. **5**	Compd. **6**	Compd. **5**	Compd. **6**
2	8.15(1H, s)[a)]	8.24(1H, s)	152.87[b)]	153.6
3	-	-	124.2	123.3
4	-	-	175.4	174.6
5	8.04(1H, d, $J = 9.0$ Hz)	7.81(1H, d, $J = 9.0$ Hz)	127.09	122.09
6	6.92(1H, dd, $J = 8.7$, 2.1 Hz)	6.99(1H, dd, $J = 8.7$, 2.4 Hz)	115.56	115.56
7	-	-	163.1	161.4
8	6.83(1H, d, $J = 1.8$ Hz)	6.98(1H, d, $J = 2.1$ Hz)	102.00	103.4
9	-	-	157.8	157.0
10	-	-	117.3	118.4
1'	-	-	123.2	123.9
2'	7.46(2H, dd, $J = 8.4$ Hz)	7.47(2H, dd, $J = 6.6$, 1.8 Hz)	130.00	130.00
3'	6.98(2H, dd, $J = 8.7$ Hz)	6.97(1H, dd, $J = 6.6$, 1.8 Hz)	113.54	113.54
4'	-	-	158.1	158.9
5'	6.98(2H, dd, $J = 8.7$ Hz)	6.97(1H, dd, $J = 6.6$, 1.8 Hz)	113.54	113.54
6'	7.46(2H, dd, $J = 8.4$ Hz)	7.47(2H, dd, $J = 6.6$, 1.8 Hz)	130.00	130.00
4'-OCH_3	3.96(3H, s)	3.96 (3H, s)	55.10	55.01
7-OCH_3	-	3.82 (3H, s)	-	61.01

[a)]Proton signal multiplicity and Coupling constant(J = Hz) are parentheses, the characters denote s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; m, multiplet.
[b)]All assignments are based on the results of HMQC.

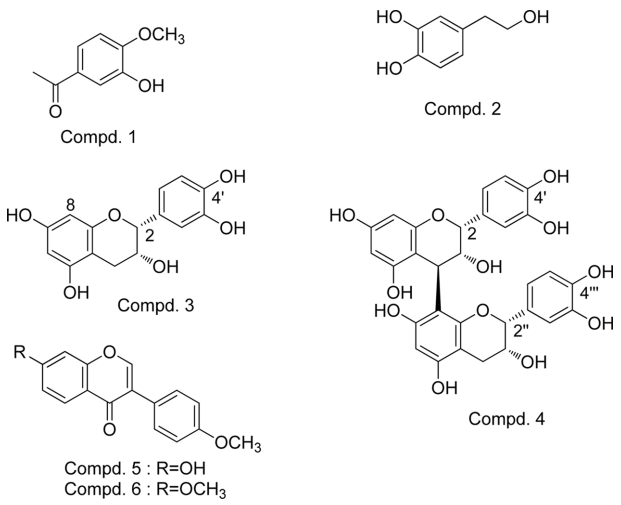


Fig. 1. Chemical structures of compounds **1-6** isolated from *Spatholobus suberectus* Dunn.

peak는 113.54 ppm(C-3', C-5')에서 carbon peak들과 cross peak가 확인 되었으며, A ring에 결합되어 있는 methoxy group의 proton peak 3.96 ppm(C4'-OCH_3)은 55.10 ppm (C4'-OCH_3)에서 cross peak가 확인되었다. 이상의 결과를 종합하여 화합물 **5**의 화학구조를 formononetin(M.W 268, $C_{16}H_{12}O_4$)으로 동정하였다(Ma 등, 2003; Liu 등, 2010).

화합물 6의 구조 결정

화합물 **6**의 화학구조는 ^{1}H-NMR, HMQC data의 해석에 의하여 결정되었다. 화합물 **6**의 NMR data는 화합물 **5**의 NMR data와 매우 유사(Table 3)하여 화합물 **6** 또한 isoflavonoid계 화합물임을 알 수 있었다. ^{1}H-NMR spectrum을 해석한 결과 3.82 ppm(3H, s, H-7'-OCH_3)과 3.96 ppm (3H, s, H-11-OCH_3)에서 methoxy group의 proton peak가 관측되었다. 또한 HMQC를 측정한 결과, 3.82 ppm(C7-OCH_3)의 proton peak는 61.01 ppm(C7-OCH_3), 3.96 ppm (C4'-OCH_3)의 proton peak는 55.01 ppm(C4'-OCH_3)의 carbon peak들과 cross peak가 관측되었다. 이상의 결과를 종합하여 화합물 **6**의 화학구조는 화합물 **5**의 -OH기가 methoxy기로 치환된 dimethoxy daizein(M.W 282, $C_{17}H_{14}O_4$)으로 동정하였다(Kanakubo 등, 2001; Baek 등, 2009; Caligiani 등, 2010).

Epicatechin을 제외한 5가지 물질은 계혈등에서 분리된 것은 처음으로 보고되는 것이다. 분리한 6가지 물질들 중에서 1, 5, 6번 물질들은 매우 소량으로 분리되었기에 항균활성을 조사하기 위해서는 더 많은 양의 물질을 분리하는 추가실험이 필요하다고 판단된다. 이후 항균활성을 조사하기 위한 충분한 양이 확보되면 조추출물이 우수한 활성을 보였던 벼 도열병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병 및 보리 흰가루병에 대한 *in vivo* 항균활성을 조사하고 또한 다양한 병원성 진균에 대한 *in vitro* 항균활성을 조사할 예정이다. 한편, hexane층과 BuOH층도 식물병에 대하여 높은 활성을 보였기 때문에 이들 분획에서도 EtOAc층에서 분리한 물질의 존재 유무와 함께 다른 활성 물질 탐색에 대한 연구를 진행할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 화학비료농약 대체 자원 이용 기술 개발((Project No.: 200901OFT102966197)의 지원에 의하여 이루어진 연구 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

Literature Cited

Baek, M. R., Y. H. Choi, D. S. Yoo, M. R. Kim, S. U. Choi, K. S. Hong, Y. S. Kim, Y. K. Kim, K. R. Lee and S. Y. Ryu (2009) Anti-proliferative components in the roots extract from *Pueraria thunbergiana.* Korean J. Pharmacogn. 40(1):46-50.

Bais, H. P., R. Vepachedu, S. Gilroy, R. M. Callaway and J. M Vivanco. (2003) Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. Science 301:1377-1380.

Biancoa, A., M. A. Chiacchiob, G. Grassic, D. Iannazzod, A. Pipernod and R. Romeod (2006) Phenolic components of *Olea europea*: Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. Food Chemistry 95:562-565.

Boskou, D. (2008) Olive oil minor constituents and health. CRC Press pp.28.

Caligiani, A., G. Palla, A. Maietti, M. Cirlini and V. Brandolini (2010) 1H NMR fingerprinting of soybean extracts, with emphasis on identification and quantification of isoflavones. Nutrients 2:280-289.

Cho, J. Y., G. J. Choi, S. W. Lee, H. Lim, K. S. Jang, C. H. Lim, K. Y. Cho and J. C. Kim (2006) *In vivo* antifungal activity against various plant pathogenic fungi of curcuminoids isolated from *Curcuma longa* L. rhizomes. Plant Pathology J. 22:94-96.

Cren-Olive, C., J. M,Wieruszeski, E. Maes and C. Rolando (2002) Catechin and epicatechin deprotonation followed by ^{13}C NMR. Tetrahedron Lett. 43:4545-4549.

Kanakubo, A., K. Koga, M. Isobe, T. Fushimi, T. Saitoh, Y. Ohshima and Y. Tsukamoto (2001) First finding of Daidzein 7-*O*-phosphate and Genistein 7-O-phosphate that are hydrolyzed by sulfatase. Tetrahedron 57:8801-8805.

Khan, M. R., D. S. D. Rutaihwa and G. L. Mhehe (2003) 1-(3-Hydroxy-4-methoxy-5-methylphenyl)ethanone, a new compound from the stem bark of Lamprothamnus zanguebaricus. Fitoterapia 74:741-742.

Kim, J. C., G. J. Choi, J. H. Park, H. T. Kim and K. Y Cho.

(2001) Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. Pest Manag. Sci. 57:554-559.

Kim, Y. G., S. Ramachandran, D. C. Kim, Y. B. Hong, E. H. Kim, S. H. Kwon, S. J. Shin, S. D. Cha, I. S. Bae and C. H. Cho (2010) Isoliquiritigenin inhibited cell proliferation and triggered apoptosis in human endometrial cancer cell Line. J. Women's Med. 3:89-95.

Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, Saag P. van der, Burg B. van der and J. A. Gustafsson (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology 139:4252-63.

Kumar, N. S., M. Rajapaksha (2005) Separation of catechin constituents from five tea cultivars using high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. 1083: 223-228.

Kung, T. H., Y. H. Jian and Y. C. Kim (2005) Isoliquiritigenin: A Competitive Tyrosinase Inhibitor from the Heartwood of *Dalbergia odorifera*. J. Appl. Pharm. 13:32-34.

Liu, Y., Y. Y. Zhao, H. B. Chen and Q. Y. Zhang (2010) Isolation and structural elucidation of an unstable isoflavonoid glycoside malonate from *Radix hedysari.* J. Chinese Pharm. Sci. 19:100-103.

Ma, X., Tu P., Y. Chen, T. Zhang, Y. Wei and Y. Ito (2003) Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. 992:193-197.

Masami, H., K. Yukiko, N. Hideo, F. Yuko, K. Norihiko, N. Masaaki, M Wataru. and K. Yoshinobu (1999) Identification of The major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (−)-epicatechin. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63:973-977.

Mateus, N., A. M. S. Silva, C. Santos-Buelga, J. C. Rivers-Gonzalo and V. D. Freitas (2002) Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 50:2110-2116.

Messina, M. and A. H. Wu (2009) Perspectives on the soy-breast cancer relation. Am. J. Clin. Nutr. 89:1673-1679.

Park, I. K., S. G. Lee, J. D. Park, S. C. Shin and Y. J. Ahn (2003) Fungicidal activity of domestic plant extracts against six major phytopathogenic fungi. Korean J. Pestic. Sci. 7(2):83-91.

Röhrdanz, E., S. Ohler, Q. H. Tran-Thi and R. Kahl (2002) The phytoestrogen aidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. J. Nutr. 132:370-375.

Romero, C., M. Brenes, P. Garcia and A. Garrido (2002) Hydroxytyrosol 4-β-D-Glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. J. Agric. Food Chem. 50:3835-3839.

Shahat, A. A. (2006) Procyanidins from *Adansonia digitata*. Pharm. Biol. 44:445-450.

Si, H. and D. Liu (2007) Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights. Curr. Med. Chem. 14:2581-2589.

Takahashi, T., T. Kamiya, A. Hasegawa and Y. Yokoo (1999) Procyanidin B-2 study. J. Invest. Dermatol. 112:310-316.

Tuck, K. L., P. J. Hayball and I. Stupans (2002) Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats. J. Agric. Food Chem. 50:2404-2409.

계혈등(*Spatholobus suberectus* Dunn)으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조결정

황주태 · 박영식 · 김영신 · 김진철[1] · 임치환*

충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과, [1]한국화학연구원 녹색화학분야

요 약 계혈등으로부터 6종의 항균활성물질을 분리 정제하여 화학구조를 결정하였다. 계혈등 시료를 음건하여 80% aq. MeOH로 추출하고 감압 농축한 후 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH, 그리고 H_2O 층으로 분획하였다. 각 분획을 이용하여 벼 도열별, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병 등 6가지 식물병에 대하여 식물병 방제효과를 검정한 결과, EtOAc 층이 가장 강한 활성을 보였으며, 벼 도열병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병 및 보리 흰가루병에 대하여 80% 이상의 활성을 보였다. EtOAc층을 대상으로 silica gel chromatography 및 preparative TLC, HPLC 등을 이용하여 6종의 화합물을 분리, 정제하고 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ESI-MS/MS, HMQC, ^{1}H-^{1}H COSY의 기기분석을 통해 ethanone, hydroxytyrosol, epicatechin, procyanidin B-2, dimethoxy daizein과 formononetin 으로 구조를 동정하였다. Epicatechin을 제외한 나머지 화합물들은 계혈등에서 처음으로 분리되었다. 분리한 물질들의 *in vitro* 및 *in vivo* 항균활성에 대한 연구를 진행하고 있다.

색인어 *Spatholobus suberectus* Dunn, Epicatechin, Procyanidin B-2, Dimethoxy daizein, Formononetin