

백두옹(*Pulsatilla koreana* Nakai) 뿌리로부터 제초활성물질의 분리

정형진 · 김건우 · 김형동¹⁾

안동대학교 자원식물학과, ¹⁾ 대구교육대학교 안동부속국민학교

Isolation of Herbicidal Compounds from *Pulsatilla koreana* Roots

Hyung Jin Jeong, Kun Woo Kim and Hyung Dong Kim¹⁾

Dept. of Resources plant, Andong National Univ., Andong 760-749, Korea

¹⁾The attached Andong Primary School of Daegu National Univ. of Education

Abstract

To search herbicidal compounds in *Pulsatilla koreana* Nakai, methanol extract of *P. koreana* roots was purified by sequences of XAD-7 column chromatography, silica gel adsorption column chromatography, silica gel flash column chromatography, preparative layer chromatography and preparative high performance liquid chromatography(Prep. HPLC). The final Prep. HPLC gave two herbicidally-active fractions. These fractions treatment at 100ppm inhibited the root length of *Echinochloa crus-galli* seedlings by 48% and 60% as compared with the control, respectively. Components in the two active fractions were analyzed by GC-MS Spectrometry. These compounds, which were isolated from *P. koreana* roots, were identified as several fatty esters, hydrocarbons, squalene, evidonol, and a diazepin analogue.

Key words: *Pulsatilla koreana* Nakai, *Echinochloa crus-galli*, herbicidal compounds.

서 언

유기합성농약은 과거 수십년간 병, 해충 및 잡초의 방제에 위력을 발휘하여 식량생산에 있어서 크게 기여하여 온 바 있으나, 근년의 환경오염 문제가 날로 심각해지고 있는 가운데 농약 또한 환경에의 잔류·축적에 의한 자연생태계의 안정을 위협하는 원인의 하나로서 인식되어지고 있다. 농약의 환경에 대한 안전성은 소량으로도 약효가 뛰어나며 자연환경에서 분해가 용이한 신농약의 개발에 의해 확보 가능하며, 이를 위해서 새로운 화학구조를 가진 모핵의 탐색이 요청되어진다.

천연 유래의 생리활성물질은 환경에 대한 안전성이 높을 뿐만 아니라, 신모핵의 추구에 있어서도 중

래의 합성화학적 수법에만 의존하기보다 이를 선도화합물로 삼아 농약으로 개발하는 편이 효율적인 것으로 여겨지고 있다. 실제로 천연물로부터 농약이 개발된 사례들도 다수 존재하여, 천연살충제 피레트린의 단점을 보완시킨 합성피레스로이드, 식물독소 physostigmine의 화학구조중 phenyl carbamate 부분을 lead로 하여 개발된 합성carbamate계 살충제들, IAA가 발견된 이래 2,4-D를 위시한 호르몬형 제초제의 개발¹⁾ 및 미생물 유래의 제초제 bialaphos²⁾ 등이 그 좋은 예라고 할 수 있다. 이와 같은 배경하에서 유용자원식물로부터 제초활성물질의 탐색이 이루어지고 있으며 이러한 사실은 국내의 연구 보고들^{1,2,7,8)}에서도 확인할 수 있다.

할미꽃(*Pulsatilla koreana* Nakai)은 미나리아

재비과에 속하는 다년생 초본으로서 우리나라의 중부 평야, 산야의 양지, 초원에 자생하고 있다. 이 식물은 관상용이외에도 진통, 해열, 소염, 살균, 살충 등의 효능을 가지고 있어 예로부터 약초로서 이용되어져왔다.^{3,9,10)} 한약재로 사용되는 식물들은 특정 2차대사산물들의 종류 및 함량이 많은 것으로 알려져 있으며, 이 성분들 중에는 제초활성을 나타내는 화합물도 많은 것으로 사료된다. 약초들에 대한 제초활성물질의 존재 여부 및 그 활성성분에 관한 연구가 일부 보고⁶⁾ 되었으나 아직도 이들에 대한 연구는 미흡한 실정에 있다. 따라서 본 연구에서는 할미꽃 뿌리(*P. koreana*)로부터 제초활성물질을 추출·정제하여 그 활성분체를 구명하는 것을 목적으로 삼았다.

재료 및 방법

1. 추출 및 정제

(1) 추출

할미꽃의 뿌리를 풍건하여 마쇄한 후 건물중으로 40g을 취하고 80% methanol 900ml를 가하여 실온에서 24시간 추출하였다. 추출한 용액을 감압하 40℃에서 농축하여 methanol을 제거하였다. 농축된 수용액 200ml에 색소류를 제거하기 위하여 petroleum ether 600ml로 3회 추출하였다.

(2) Amberlite XAD-7 column chromatography

Amberlite XAD-7 Column의 전처리를 위해 각각 5bed volume(4l)씩의 초순수, 정제된 methanol, 초순수를 순서에 따라 사용하여 세정한 후 얻어진 수용액을 530g의 Amberlite XAD-7 column(530×50mm, Rohm & Hass)를 통과·흡착 시킨 다음, 초순수, 40% methanol, 80% methanol, acetone을 1500ml씩 사용한 step-wise법으로 순차적으로 용출·분획하였다.

(3) Silica gel adsorption chromatography

Silica gel 200g (silica gel 60, 70-230 mesh, 450

×40mm, Merck)을 CHCl₃-MeOH (5:1)의 용매계로 slurry로 만들어 colum에 충전하였다. Methanol에 용해된 시료를 celite 20g에 균일하게 흡착시켜 감압하 desiccator에서 용매를 제거한 후 column의 상단에 충전시켰다. 용매계로서 CHCl₃-MeOH (5:1)과 CHCl₃-MeOH-H₂O(7:3:1, lower phase)을 각각 600ml씩 그리고 CHCl₃-MeOH-H₂O (6:4:1) 700ml을 사용하여 흡착된 물질을 용출시켰으며 분획은 50ml씩 하였다.

전술한 용매계를 전개용매로 한 TLC(thin layer chromatography(silica gel 60 F₂₅₄, layer thickness 0.2mm, 200×200mm, Merck)분석을 통해 근접한 R_f치를 보이는 분획들을 모아 생물검정을 하여 활성분획을 찾았다. Spot의 검출에는 254nm와 365nm의 UV short wave와 발색시약으로 70% 황산용액을 사용하였다.

(4) Silica gel flash column chromatography

감압하 40℃에서 농축·건고한 시료는 소량의 methanol에 용해시켜 silica gel flash column chromatography(silica gel 60, 230~400mesh, 160×35mm, Merck)에 적용하였으며, 용출용매계인 CHCl₃-MeOH-H₂O(6.5:4:1, lower phase)을 압축공기로 가압하면서 20ml씩 분획하였다. 활성분획의 확인은 TLC분석과 생물검정에 의하였다.

(5) Preparative layer chromatography(PLC)

상기 정제에서 얻어진 시료 500mg 중에서 120mg을 취하여 2매의 PLC plate(silica gel 60 F₂₅₄, layer thickness 1mm, 200×200mm /concentrating zone, 200×40mm, Merck)에 loading하여 CHCl₃-MeOH-H₂O(6:4:1)로 전개시킨 후, R_f 치가 근접한 band별로 절취하고 동일 용매계로 용출하였다.

(6) Preparative high performance liquid chromatography(Prep. HPLC)

Prep. HPLC의 분리조건을 찾기 위해 유속 2ml/min의 CHCl₃-MeOH-H₂O(4:1:0.2)를 silica계

순상column(10 μ m, μ Porasil, 300 \times 3.9mm, millipore Waters)에 적용시킨 HPLC분석을 행하였으며, peak의 검출에는 programmable wavelength detector(Spectra 200, Spectra-Physics)를 사용하였다.

Prep. HPLC용 시료는 유기용매용 filter(Gelman Acrodisk 13 CR PTFE, 0.45 μ m)로 여과하여 silica계 순상 Prep. column(10 μ m, μ Porasil, 150 \times 19mm, millipore Waters)으로 주입되었으며 CHCl₃-MeOH-H₂O(20:1:0.1)의 용매계를 사용하여 유속 9 ml/min로 용출·분획하였다.

Peak는 UV 254nm에서 검출되었으며 R_f은 전기 조건에서 결정되었다.

진술한 정제 절차의 전체적인 흐름을 그림 1에 나타내었다.

2. 기기분석

GC-MS 분석에 있어서 gas chromatography는 Hewlett-Packard사의 5890-2를, mass spectrometer는 JEOL사의 AX505를 이용하였다.

사용된 GC의 injector온도를 280 $^{\circ}$ C로 설정하고, DB-

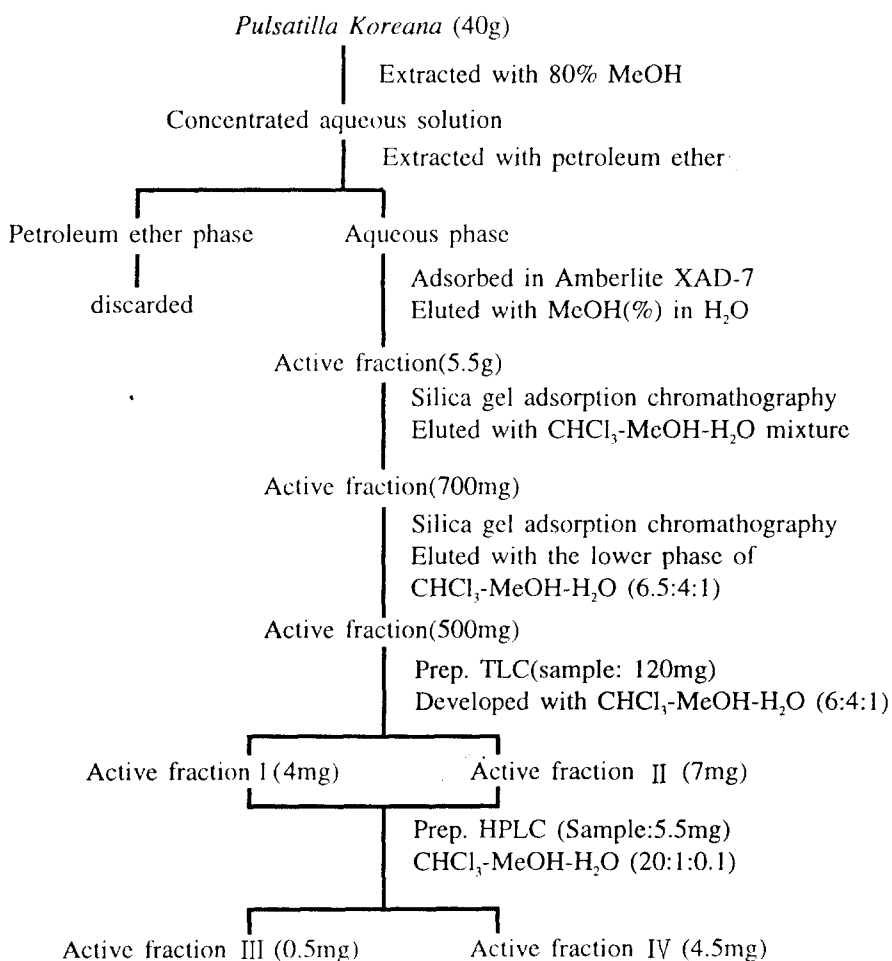


Fig. 1. Purification procedure for herbicidally-active fractions from *Pulsatilla koreana*.

5 fused silica column(30m×0.25mm, film thickness 0.25µm, J & W Scientific)온도는 120℃에서 5분간 두었다가 최종온도 270℃까지 분당 5℃의 비율로 서서히 상승시켜 분석하였으며, FID 검출기를 사용하여 peak를 확인하였다. MS의 분석시, ionizing voltage가 70eV, separator와 ion source는 250℃로 설정하였다.

분리된 화합물은 각 peak의 retention time과 그 peak에 대한 mass spectrum상의 fragment ion peak를 GC-MS data system인 MSMP-DAP-2의 library와 비교하여 동정되었다.

3. 제초활성 검정

시료를 소량의 methanol에 용해시켜 최종적으로 동일 용량의 용매가 처리될 수 있도록 농도에 따라 methanol로 희석한 다음, 조제된 시료액으로 미리 직경 5cm petri dish안에 깔아 둔 여지(Whatman no.2)의 전면을 고르게 적시게 하였다. 그리고 chemical fume hood내에서 여지에 포함된 methanol을 제거하여 pertri dish당 1ml의 증류수를 부은 후, 시험초종인 식용피 (*Echinochloa crus-galli* P.B. var. *fomosenis* Ohwi)의 종자를 6립씩 파종하였다. 치상기간중 petri dish내 수분 함량의 유지를 위해 parafilm으로 밀봉하여 25℃, 14/10시간 광주기의 growth chamber내에 두고 6일간 생육시킨 후, 유묘의 근장을 측정하였다.

결과 및 고찰

할미꽃 뿌리 40g을 80% methanol로 추출하여 petroleum ether로 용매분획하여 얻어진 수용액 분획과 petroleum ether분획을 대상으로 생물검정한 결과, 수용액 분획에서 활성이 인정되어 수용액을 Amberlite XAD-7 column을 통과·흡착시켰다. 용출용매를 초순수, 40% methanol, 80% methanol, acetone으로 하여 흡착된 물질을 용출시켰으며, 각 분획에 대해 활성을 조사하여 40%와 80%의 methanol 분획에서 활성이 나타났다. 얻어진 5.5g의 활성분획은 silica gel adsorption chromatography를 CHCl₃-MeOH-H₂O(5:1)과 CHCl₃-MeOH-H₂O(7:3:1, lower

phase) 그리고 CHCl₃-MeOH-H₂O(6:4:1)로 용출시켜 TLC분석과 생물검정법을 통해 조사한 결과, CHCl₃-MeOH-H₂O(6:4:1)용출분획들에서 활성이 집중되었다. 활성물질들의 TLC상의 거동을 보아 비교적 극성이 높은 물질들의 존재가 시사되었다.

이어서 silica gel adsorption chromatography의 활성분획 700mg을 CHCl₃-MeOH-H₂O(6.5:4:1, lower phase)의 용매계로 하여 silica gel flash column chromatography를 행하고 용출·분획하였다. TLC plate상에서 R_f치가 근접한 분획들을 모은 후, 식용피에 대한 제초활성을 검정하여 500mg의 활성분획을 획득하였다.

전술한 silica gel flash column chromatography에 의해서도 만족할만한 정제 효과를 얻지 못하였으므로 많은 시료의 처리는 어려우나 정제 효율이 비교적 우수한 preparative layer chromatography를 적용하기로 하였다. 상기 활성분획 500mg 중에서 120mg을 취하여 1mm의 PLC plate 2매에 각각 60mg씩 loading하여 CHCl₃-MeOH-H₂O(6:4:1)로 전개시켰다. UV 254nm에서 검출된 band들을 R_f치가 근접한 band별로 절취하여 동일 용매계로 용출하였다.

여기서 얻어진 분획들을 제초활성 검정에 공시하여 CHCl₃-MeOH-H₂O(6:4:1)를 전개용매로 TLC분석을 행한 결과 R_f치 0.64-0.55의 범위에서 활성분획 I(그림 2의 분획 no.3)이 4mg, R_f치 0.55-0.52의 범위에서 활성분획 II(그림 2의 분획 no.4)가 7mg 획득되었다.(그림 1).

PLC를 이용한 정제에서 용출된 각 분획들은 400ppm의 농도로 조제 처리하였으며, 그 결과를 그림 2에 표시하였다.

PLC를 이용한 정제에서 용출된 각 분획들은 400ppm의 농도로 조제·처리하였으며, 그 결과를 그림 2에 표시하였다.

활성분획들의 시험초종인 식용피에 대한 제초활성에 있어서 초장에 대한 억제 효과는 인정되지 않았으나 유근의 경우, 대조구에 비해 활성분획 I(그림 2의 분획 no.3)이 77%, 활성분획 II(그림 2의 분획 no.4)가 92%의 억제율을 나타내었다.

이에 높은 제초활성을 보여준 활성분획 I과 활성분획 II를 합하여 Prep. HPLC로 정제하기로 하고, 적합한 분리조건을 찾기 위해 CHCl₃-MeOH-

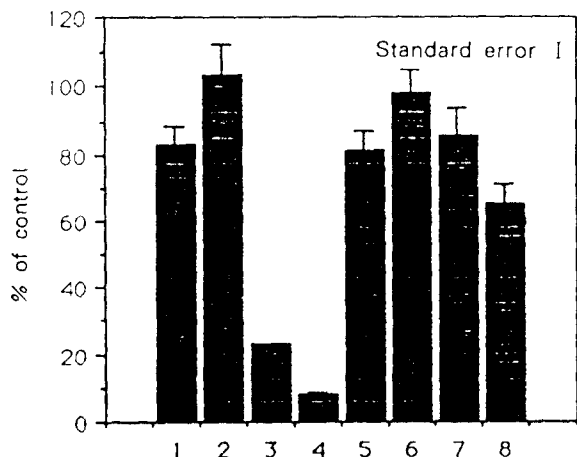


Fig. 2. The effect of preparative TLC fractions from the silica gel-purified *Pulsatilla koreana* extract on root growth of *Echinochloa crus-galli*. The concentration of each fraction was 400 ppm.

H₂O(4:1:0.2)의 용매계를 이용하여 HPLC분석을 행하였다. 역상용 ODS column의 적용도 검토해 보았으나 그림 3의 분리보다 나은 결과를 얻을 수 없었기에 분석시와 동일한 silica계 순상Prep. column(10 μm, μPorasil, 150×19mm, millipore Waters)에 CHCl₃-MeOH-H₂O(20:1:0.1)의 용매계를 사용하여 유속 9 ml/min로 용출·분획하였다.(그림 4).

분리된 활성분획 III의 R_f은 분석시와 같은 4.32min이었다.(그림 4).

활성분획 IV의 peak는 넓게 퍼져 있어 R_f를 정할 수 없었으며, Prep. HPLC의 정제시 8min에서 12min에 걸쳐서 활성분획 IV가 용출되었다. 분리한 활성분획 III의 CHCl₃-MeOH-H₂O(6:4:1)를 전개용매로 한 TLC분석 결과, R_f치 0.73부근에 겹쳐진 발색부분이 있어 단일spot이라고 보기 어려웠으며, 마찬가지로 활성분획 IV에서도 R_f치 0.31주위에서 복수 화합물의 존재가 시사되었다.

식용피에 대해 처리된 100ppm의 활성분획 III과 IV는 유근의 성장을 대조구에 비해 각각 48% 및 60% 억제 시키는 결과를 보여주었다.

활성분획 III의 활성분체를 구명하기 위해 GC-MS를 이용하여 분석하였다. GC에서 분리된 화합물은 각 peak의 R_f과 그 peak의 mass spectrum상의 fragment ion peak를 MSMP-DAP-2 data system의 library와 비교하여 동정하였다. 분리된 활성분획 III

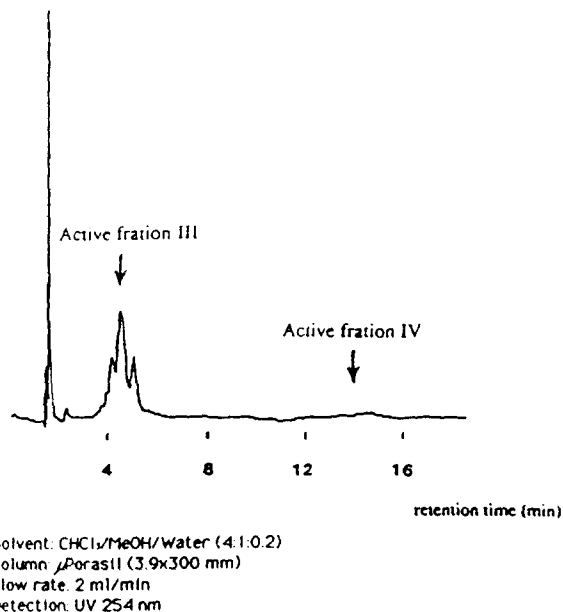


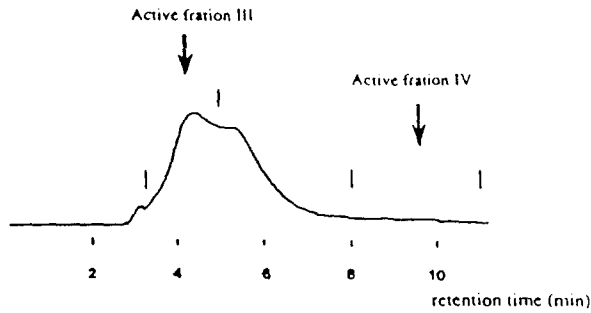
Fig. 3. HPLC profile of the mixture of the active fractions I and II.

에서 동정된 화합물들의 gas chromatogram(그림 5)상의 R_f과 조직명을 표 1에 표시하였다.

표 1에서 보여주는 바와 같이 triterpenoid인 squalene(peak no. 8)과 탄화수소류인 docosane(peak no. 6) 및 peak no. 8의 화합물을 제외한 나머지, 탄소환 dicarboxylic acid 유래의 peak no. 3과 7, 포화지방산 에스테르인 peak no. 2와 5 그리고 불포화지방산 에스테르인 peak no. 1과 4는 모두 고급지방산 에스테르에 속하는 화합물이라는 것을 알 수 있다. 동정된 화합물들의 화학구조는 그림 6에 나타내었다.

한편, 활성분획 IV의 GC-MS분석(그림 7)에 의해 동정된 화합물들을 표시한 표 2로부터 peak no. 2는 포화 dicarboxylic acid 유래의 지방산 에스테르이며, peak no. 1은 페놀성의 evidonol인 것으로 확인되었다.

Peak no. 3(그림 8)의 화합물은 항불안제, 수면장애 치료제 등으로 이용되는 diazepam의 화학구조와 부분적으로 유사한 점이 있다. Diazepam이 식물독성을 나타낸다는 보고⁶⁾가 있으나, 본 화합물의 충분한 정제가 이루어지지 않은 관계로 diazepam과 마찬가지로 활성을 보유하는지의 여부는 평가하기 어려웠다.



Solvent: CHCl₃/MeOH/Water (20:1:0.1)
 Column: μ Porasil (19x150 mm)
 Flow rate: 9 ml/min
 Detection: UV 254 nm

Fig. 4. Prep. HPLC profile of the mixture of the active fractions I and II.

본 연구에서 동정된 화합물들은 수종의 지방산 에스테르, 페놀성 화합물 1종, 탄화수소류 2종, triterpenoid 1종 및 활성분획 IV의 diazepine관련 화합물 1종이었다. 김 등⁶⁾과 전 등^{4),5)}의 연구에서 페놀성 화합물, 지방산 및 terpenoid등이 제초활성과 관련이 있으며 특히, 식물의 유근생장을 억제한다고 보고된 바 있으므로 이 화합물들도 제초활성에 관여할 가능성이 높다고 사료된다. 그러나 GC-MS data system의 library search에서도 동정안된 화합물의 존재와 불충분한 정제로 인한 활성 추구상의 미흡함 등으로 인해 어떤 화합물이 활성의 발현에 주로 관여하고 있는지는 정제조건을 재검토하여 활성본체를 분리한 후에 결론을 내려야 할 것으로 생각하며 급후의 과제로 남아 있다.

적 요

할미꽃의 뿌리에 함유되어 있는 제초활성물질의 확인과 동정을 위하여 이들을 추출·정제하고 활성성분 및 제초활성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 각종 칼럼크로마토그래피법과 Prep. HPLC의 순차적인 적용에 의해 제초활성물질이 포함된 할미꽃 뿌리의 메타놀추출물을 정제하여 2개의 활성분획을 획득하였다.

2. 최종적으로 얻어진 활성분획들을 100ppm의 농도로 조제하여 처리한 결과, 식용피 유근의 생장억제율은 대조구에 비해 각각 48% 및 60%로 나타났다.

3. GC-MS Spectrometry에 의해 분리된 활

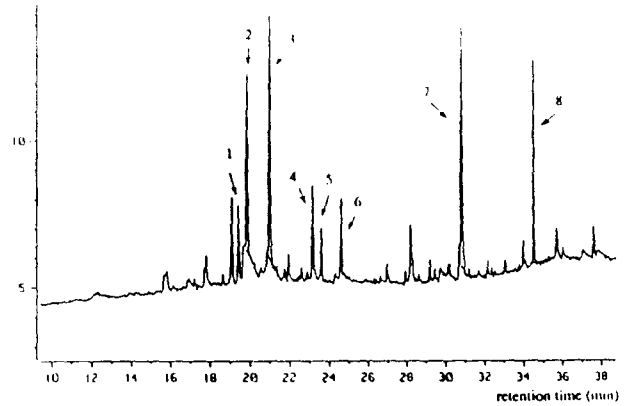


Fig. 5. Gas chromatogram of the active fraction III purified from the extracts of *Pulsatilla koreana*. Detail descriptions for each peak no. are explained in Table 1.

성분획 중의 성분들을 기존자료들과 비교하여 수종의 지방산 에스테르, 2종의 탄화수소류, squalene, evidonol 및 1종의 diazepin관련 화합물이 동정되었다.

인용문헌

1. 안중웅·김진석·조광연. 1989. 천연에서부터 제초활성물질의 탐색 제1보 식물체에 함유된 제초활성물질의 검색. 韓雜草誌 9(1):69-75.
2. 白鏡煥·金吉雄. 1988. 田作雜草로부터 生理活性物質探索. 韓雜草誌 8(3):283-290.
3. 陳存仁. 1982. 圖說 漢方の 醫藥大事典. 講談社. pp.196-199.
4. Chun, J.C. and K.W. Han. 1989. An Identification of Volatile Terpenes in Allelopathic Weeds. Kor. J. Weed Sci. 9(2):149-153.
5. Chun, J. C., K. W. Han, B. C. Jang and H. S. Shin. 1988. Determination of phenolic compounds responsible for allelopathy in upland weeds. Kor. J. Weed Sci. 8(3):258-264.
6. Culter H. G. 1988. Biologically active natural products (Potential use in agriculture). ACS symposium series 380. American Chemical Society. pp. 79-90.
7. Kim, K.U., I.J. Lee., H.J. Jeong and D.S

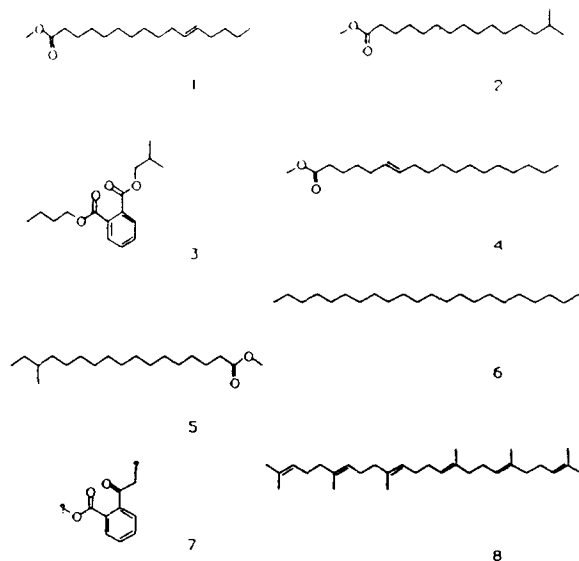


Fig. 6. Structures of the compounds identified from the active fraction III, which was obtained from the mixture of the active fractions I and II by HPLC using μ Porasil column. The number of each compound is correspond to the peak no of gaschromatogram.

Kim, 1987. Potential allelopathic substances identified from annual crop straws. Proceedings of the 11th Asian- Pacific

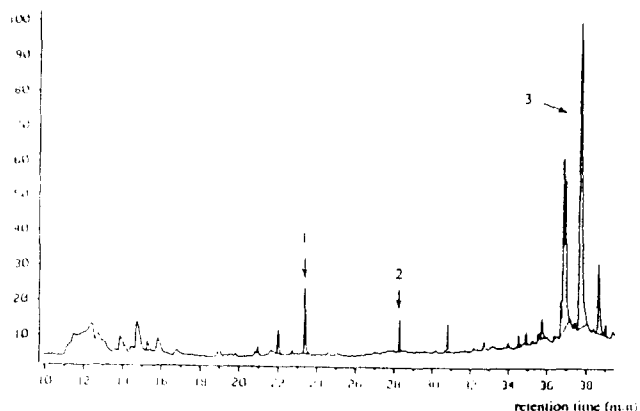


Fig. 7. Gas chromatogram of the active fraction IV purified from the extracts of *Pulsatilla koreana*. Detail descriptions for each peak no. are explained in Table 2.

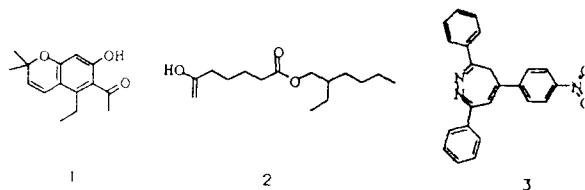


Fig. 8. Structures of the compounds identified from the active fraction IV, which was obtained from the active fractions I and II by HPLC using μ Porasil column. The name of each compound is listed in Table 2. The number of each compound is correspond to the peak on of gas chromatogram.

Table 1. The compounds identified by GC-MS in the herbicidally-active fraction III, which was isolated from *Pulsatilla koreana* extracts

Peak no.	Retention time(min)	Compound
1 ¹⁾	19.40	11-Hexadecenoic acid, methyl ester
2	19.83	14-Methyl-pentadecanoic acid, methyl ester
3	20.98	1,2-Benzenedicarboxylic acid, buty 2-methylpropyl ester
4	23.16	6-Octadecenoic acid, methyl ester
5	23.60	15-Methyl-heptadecanoic acid, methyl ester
6	24.63	Docosane
7	30.83	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester
8	34.50	2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene

1) Peak no. and retention time are correspond to gas chromatogram represented in Fig. 5.

Table 2. The compounds identified by GC-MS in the herbicidally-active fraction IV, which was isolated from *Pulsatilla koreana* extracts

Peak no.	Retention time(min)	Compound
1 ¹⁾	23.37	1-(7-Hydroxy-5-methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-yl)-ethanone
2	28.25	Hexanedioic acid, mono(2-ethylhexyl)ester
3	37.69	5-(<i>p</i> -Nitrophenyl)-3,7-diphenyl-4H-1,2-diazepine

1) Peak no. and retention time are correspond to gas chromatogram represented in Fig.7.

- Weed Science Society Conference. pp. 303-310.
8. 金吉雄 李仁中. 1989. 藥用植物 抽出液의 發芽抑制效果와 關聯化合物探索. 韓雜草誌 9(2):154-167.
9. 金在佶. 1984. 原色天然藥物大辭典(下). 南山堂. pp. 70.
10. 宋柱澤, 鄭炫培, 金炳友, 秦熙成:1989. 韓國植物大寶鑑(上) 資源編. 韓國資源植物研究所. pp. 262-263.
11. Tachibaza K. and K. Kaueko. 1986. Development of a new herbicide, bialaphos. J. Pesticide. Sci. 11(2):297-304.

(접수일 1995년 10월 28일)