

## 홀아비꽃대(*Chloranthus japonicus*) 뿌리로부터 분리한 shizukanol들의 생물활성

박미란 · 김혜영 · 최경자 · 이선우 · 장경수 · 김진석 · 홍경식 · 박노중 · 조광연 · 김진철\*

한국화학연구원 생물기능연구팀

**요약** : 홀아비꽃대(*Chloranthus japonicus*) 뿌리 조직의 메탄을 추출물은 벼 도열병(*Magnaporthe grisea*), 벼 잎집무늬마름병(*Corticium sasakii*), 토마토 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 토마토 역병(*Phytophthora infestans*) 및 밀 붉은녹병(*Puccinia recondita*) 등의 다양한 식물병을 효과적으로 방제하였다. 이 메탄을 추출물로부터 3개의 항균물질을 분리하였고 이들은 질량분석과 핵자기공명분석을 통하여 shizukanol B, C 및 D로 동정되었다. 이들 세 개의 물질들 중에서 shizukanol C가 실험한 식물병원균들의 군사생육 저해 활성이 가장 큰 것으로 나타났다. 즉, 12.5 µg/ml 이상의 농도에서 벼 도열병균과 고추 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*와 *C. acutatum*)의 군사 생육을 완전히 억제하였고, 3.13 µg/ml 이상의 농도에서는 토마토 역병균의 군사 생육이 완전히 억제되었다. 세 가지 물질은 또한 *in vivo*에서 벼 도열병과 밀 붉은녹병에 대하여 특히 높은 방제효과를 보였다. 다른 한편으로 세 가지 물질들은 밀과 보리 잎에 약해를 유발하였고, 또한 좁개구리밥(*Lemna paucicosta*)의 성장을 억제하였으며, shizukanol B, C, D의 50% 생육억제 농도는 각각 30.0 µg/ml, 49.9 µg/ml 및 154 µg/ml였다. 그리고 shizukanol C는 시험한 5종류의 해충중에서 벼멸구(*Nilaparavata lugens*), 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*), 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 및 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에 대해서 1,000 µg/ml 수준에서 60% 이상의 살충활성을 보였다.(2004년 11월 16일 접수, 2004년 12월 20일 수리)

### 서론

작물을 재배하는 데 있어서 농약의 사용은 필수적이다. 1940년대 합성농약이 출현하기 전까지는 농약의 대다수가 식물체 추출물이었다(Benner, 1993). 이후에는 합성농약의 출현으로 인하여 식물체에 대한 연구가 축소되었다가 최근에 다시 회복되는 추세에 있다. 그 이유는 크게 두 가지로 생각해 볼 수 있다(Benner, 1993; Pillmoor et al., 1993). 하나는 합성농약의 개발에 있어 식물체 유래 천연물은 새로운 선도물질을 제공하는데 기여하기 때문이다. 식물체는 매우 다양한 구조의 물질들을 생산하는 것으로 알려져 있는데, 아직까지 연구가 된 식물 종 보다는 연구가 진행되지 않은 식물 종들이 더 많기 때문이다. 두 번째는 식물체 추출물 및 식물체 유래 물질들이 직접적으로 환경친화형 생물농약으로서 이용될 수 있기 때문이다(Benner, 1993; Pillmoor et al., 1993). 합성농약의 선도물질로 이용된 가장 대표적인 것은 pyrethroid계

살충제들로 현재 주요 살충제 중의 하나로 이용되고 있으며(Benner, 1993), 농약으로 바로 상용화된 예에는 pyrethrins, rotenone, nicotine, azadirachtin(neemazal), pelargonic acid, zeatin, MILSANA 등이 있다(Benner, 1993; Dik and Van Der Staay, 1995; Heger and Klingauf, 1990; Prithiviraj et al., 1998).

본 연구팀에서는 식물체로부터 생리활성 물질을 탐색하는 과정에서 홀아비꽃대(*Chloranthus japonicus*)의 뿌리 추출물이 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병 및 밀 붉은녹병 등의 다양한 식물병에 대하여 *in vivo* 항균활성이 높다는 사실을 발견하였다(Choi et al., 2004). 홀아비꽃대는 후추목(Piperales), 홀아비꽃대과(Chloranthaceae)에 속하는 다년생 식물로서 높이는 20-30 cm로 줄기는 마디가 많으며, 회갈색 뿌리가 돋는다. 주로 산지의 그늘진 곳에서 자라며, 뿌리와 꽃이 이노제, 진통제로 쓰이며, 한국, 일본, 중국 등지에 분포한다.

본 연구에서는 이 홀아비꽃대 뿌리 추출물로부터 세 가지 항균활성 물질을 분리하고 구조를 결정한 후, 분리한 물질들에 대하여 다양한 식물병원균들에

\*연락처

대한 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 항균활성을 조사하였다. 또한 *in vivo*에서의 항균활성을 조사하던 중에 이들 물질들이 제조활성을 가지고 있음을 발견하고, 좁개구리밥(*Lemna paucicostata*)의 성장 저해 활성을 조사하였다. 그리고 5가지 해충에 대한 살충활성도 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 항진균물질의 분리

국내에 자생하고 있는 홀아비꽃대의 뿌리 4.82 kg을 채취한 후 약 0.5 cm의 길이로 절단한 다음 메탄올(methanol: MeOH)을 가하여 1일간 침지하였다. 여과 후 다시 메탄올을 가한 후 6시간 동안 침지한 다음 여과하였다. 두 차례에 걸쳐 추출한 메탄올 추출액을 감압농축한 후 1.6 L의 증류수로 다시 용해하였다. 수용액 층을 동량의 ethyl acetate(EtOAc)로 2회 분획하였다. EtOAc 추출물과 수용액층을 감압농축한 후 2,000 µg/ml 수준에서 *in vivo* 항균활성을 조사한 결과 EtOAc층이 활성이 보여 이 추출물로부터 항진균물질의 분리를 실시하였다.

EtOAc층(61.4 g)을 용해한 후 실리카 겔 컬럼(6.0 cm × 60 cm; 실리카겔 60, 70-230 메쉬, 500 g)에 가한 다음 methylene chloride에 MeOH의 농도를 증가시키면서 용출하였다. 활성 분획들을 모아 농축한 후(5.36 g) 다시 실리카 겔 컬럼(3.6 cm × 60 cm; 실리카겔 60, 70-230 메쉬, 250 g)에 가한 후 chloroform-MeOH(50:1, v/v)로 용출하였다. 여기에서 얻어진 활성 분획들을 모아 농축한 후 얻어진 시료(399 mg)를 실리카 겔 prep TLC에 가하였다. 전개 용매로는 chloroform-MeOH(30:1, v/v)를 이용하였다. 이 과정을 통하여 활성이 있는 세 개의 물질 1(62.4 mg), 2(283 mg), 3(97.4 mg)을 순수하게 분리하였다.

### 기기분석

분리한 세 개의 물질의 질량분석은 double-focusing high-resolution(HR) mass spectrometer(JEOL JMS-DX 303; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. NMR spectrum은 Bruker AMX-500(500 MHz) NMR spectrometer(Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, Germany)로 측정하였고, tetramethylsilane(TMS)를 internal standard로 이용하였다.

### *In vitro* 항균활성

분리한 세 개의 물질에 대하여 9개의 식물병원균에 대한 *in vitro* 항균활성을 조사하였으며, 실험에 사용된 식물병원균은 다음과 같다: 벼 잎집무늬마름병균(*Corticium sasakii*), 오이 모잘록병균(*Pythium ultimum*), 배나무 검은무늬병균(*Alternaria griseon*), 고추탄저병균(*Colletotrichum acutatum*), 토마토 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 벼 도열병균(*Magnaporthe grisea*), 각종 식물 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*), 토마토 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*) 및 토마토 역병균(*Phytophthora infestans*). 세 개의 물질은 dimethyl sulphoxide(DMSO)에 용해한 후 Poison Food Technique(Dhiangra and Sinclair, 1986)의 방법으로 고체배지상에서의 균사 생육억제 활성을 조사하였다. 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)를 고체배지로 이용하였고, 세 가지 물질은 100, 50, 25, 12.5, 6.3 및 3.1 µg/ml 수준으로 처리되었다. 각각의 화합물이 포함된 고체배지를 24-well plate의 각 well당 1 ml씩 분주하였다. 왕성하게 자라고 있는 균체 선단부로부터 지름 5 mm의 agar disc를 떼어 각 well 한가운데에 접종한 후 *B. cinerea*를 제외한 균들에 대해서는 25°C에서 배양하였다. *B. cinerea*의 경우에는 최적 생육온도인 20°C에서 배양하였다. 대조구에는 1%의 DMSO를 포함하고 있는 PDA배지를 처리한 후 각각의 균을 접종하였다. 대조구에서 균체의 선단부가 well 가장자리에 도달할 때(2 ~ 6일)까지 배양한 후 근생육정도를 측정하였다. 각 처리당 4반복으로 실험을 수행하였으며, 항균활성은 최소억제농도(MIC: minimum inhibitory concentration, 균사생육 완전억제에 필요한 최소한의 농도)로 나타났다.

### *In vivo* 항균활성 검증

분리한 세 개의 물질을 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 잿빛곰팡이병, 토마토 역병, 밀 붉은녹병(*Puccinia recondita*) 및 보리 흰가루병(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) 등의 6가지 식물병에 대하여 *in vivo* 항균 활성 검정을 실시하였다. 각각의 물질을 acetone에 용해한 후 Tween 20을 250 µg/ml 수준으로 포함하고 있는 증류수에 희석하였다. Acetone의 최종 농도는 10%였으며, 대조구는 10%의 acetone과 250 µg/ml Tween 20을 포함하고 있는 증류수를 사용하였다. 이렇게 제조한 약제들을 Kim 등(2001, 2004)의 방법에

따라 접종 24시간 전에 식물체 옆면에 분무처리한 후 상온에서 건조한 다음 접종하였다.

발병에 사용한 식물체들, 즉 벼(*Oryza sativa*), 토마토(*Lycopersicon esculentum*), 보리(*Hordeum sativum*) 및 밀(*Triticum aestivum*)을 지름 4.5 cm 플라스틱 포트에 원예용 상토 또는 수도용 상토를 70% 정도 담고 온실(25±5°C)에서 1주에서 3주정도 키웠으며, 이들에 대한 6가지 식물병원균들의 접종 및 발병, 그리고 발병을 조사는 전보(Kim et al., 2001, 2004)와 동일한 방법으로 수행하였다.

### 좁개구리밥을 이용한 제초활성 검정

24-well plate(Coming Co., New York, USA)의 각 well에 시료를 포함한 Hutner배지(400 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KOH, 500 mg EDTA, 200 mg NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 354 mg Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 500 mg MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 24.9 mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 17.9 mg MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 65.9 mg ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 3.95 mg CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 25.2 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 14.2 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.2 mg Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 1.0 liter distilled water)를 2 ml 씩 4반복으로 가한 다음 계대 배양한 좁개구리밥 1개씩을 치상하였다. 세 가지 물질을 acetone에 용해한 후 농도별로 처리하였고, 처리 후 acetone의 농도는 1%였다. 대조구에는 1%의 acetone을 처리하였다. 시료처리 후 30°C 항온실에서 5일간 배양한 다음 결과를 관찰하였다.

### In vivo 살충활성 검정

분리한 3개의 물질들 중에서 가장 양이 많이 확보된 물질 2를 아세톤에 용해한 후 Triton X-100 (t-octylphenoxypolyethoxyethanol; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 100 µg/ml 수용액에 acetone 10%, 각각의 시료농도가 되도록 희석한 다음 처리하였다. 대조구에는 10%의 아세톤과 100 µg/ml Triton X-100이 포함된 증류수를 처리하였다. 벼멸구(*Nilaparvata lugens*) 활성검정은 3~5 cm 정도 자란 벼 유묘 4개체를 탈지면으로 말고 수분을 공급한 지름 4 cm, 길이 15 cm 시험관 내부에 일정한 높이로 넣고, 벼멸구 3령 약충을 각 시험관 당 20마리 씩 접종한 후 소형 분무기로 분무하여 25°C 항온실에서 보관하였다. 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 경우에는 이식 후 4주 경과한 양배추 잎을 지름 3.5 cm 크기의 disc로 잘라 준비된 약액에 약 30초간 침지하고 후드 내에서 건조

하였다. 이것을 지름 5.5 cm 페트리디쉬에 넣고 배추좀나방 3령 유충을 10마리 씩 접종하였다(Kim et al., 1990). 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)의 경우 4주 경과한 양배추 잎을 지름 4.5 cm 크기로 잘라 침지한 후 6 cm 페트리디쉬에 넣고 담배거세미나방 3령 유충 10마리 씩 접종하였다(Park et al., 1992). 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)의 경우 이식 후 3주 경과한 담배 잎을 지름 4.5 cm 크기의 disk로 잘라 약액침지 후 성충을 10마리씩 접종하였다(Ahn et al., 1989). 점박이응애(*Tetranychus urticae*)에 대한 실험은 파종 후 약 3주가 경과한 강낭콩 잎을 지름 3.5 cm 크기로 자른 후에 지름 6 cm 페트리디쉬에 탈지면을 알맞은 크기로 자르고 증류수로 촉촉히 적신 다음 준비된 잎을 놓고, 점박이응애 성충 30 마리를 접종하였다(Kim et al., 1994). 약액처리 후 24시간과 48시간 두 차례에 걸쳐 살충율을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 항균물질의 분리 및 동정

홀아비꽃대의 뿌리 생체 4.82 kg으로부터 메탄을 추출, EtOAc 분획, 2회의 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피와 prep TLC를 통하여 3개의 물질, 즉 물질 1, 2, 3을 각각 62.4 mg, 283 mg 및 97.4 mg을 분리하였다. 이들의 구조를 결정하기 위하여 negative ion-electrospray ionization mode(ESI)의 질량분석을 실시한 결과 물질 1, 2, 3의 [M-H]<sup>-</sup>이 각각 m/z 731, 633 및 577로 나타나, 이들 세 물질의 분자량은 각각 732, 634 및 578 amu로 결정되었다. 이들의 정확한 구조를 결정하기 위하여 <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, DEPT 135°, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C COSY 및 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 등의 핵자기공명분석을 실시한 결과, 물질 1은 shizukanol B로, 물질 2는 shizukanol C로 그리고 물질 3은 shizukanol D로 결정되었다(그림 1). 표 1은 이들 세 가지 물질들의 <sup>13</sup>C-NMR data를 정리한 것이며, 이 data는 Kawabata와 Mizutani(1992)가 보고한 NMR data와 일치하였다.

홀아비꽃대(*C. japonicus*)가 속해있는 홀아비꽃대과(Chloranthaceae)는 5개의 속을 가지고 있는 작은 과(family)로서 아메리카의 열대지방, 동아시아 그리고 태평양지역 등이 분포하고 있다. 우리나라에는 *Chloranthus*속에 속하는 세 개의 식물종, 즉 홀아비꽃대, 꽃대(*C. serratus*) 및 죽절초(*C. glaber*)만 분포하고

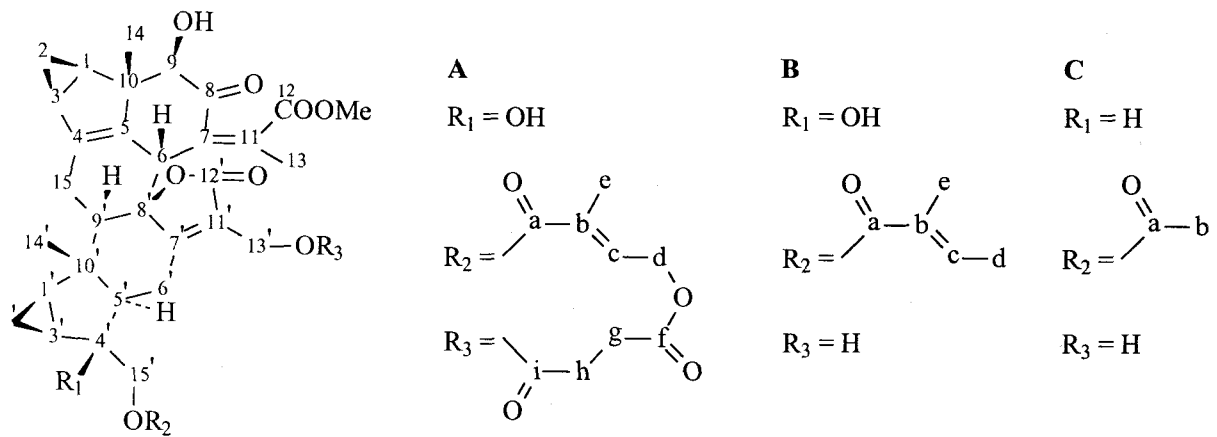


Fig. 1. Chemical structures of shizukanol B(A), C(B), and D(C).

있는 것으로 알려져 있다(이 영노, 1997; 이 창복, 1979). 죽절초는 제주도에서만 나는 다년생 관목으로서 다른 두 가지 식물과 쉽게 구별이 된다. 홀아비꽃대와 꽃대는 다년생 초본으로서 홀아비꽃대는 우리나라 각처의 숲 속에 분포하는 반면에 꽃대는 주로 중부 이북에 분포하는 것으로 보고되고 있다. 두 식물의 큰 차이는 홀아비꽃대의 경우에는 1개의 화서가 나오는 반면에 꽃대는 보통 2개의 화서가 나온다는 것이다.

Shizukanol B, C 및 D는 모두 dimeric sesquiterpene계 물질들로서 홀아비꽃대를 포함한 *Chloranthus*속 식물들은 매우 다양한 sesquiterpene계 물질들을 생산하는 것으로 알려져 있다. Sesquiterpene monomer물질로는 6개의 chloranthalactone A(shizukanolide A), B(dehydroshizukanolide), C, D, E 및 F(Takeda et al., 1993; Uchida et al., 1980)와 5개의 shizukanolide B, C, D, E 및 F, 그리고 glechomanolid, isofuranodiene 및 atracylenolide 등(Kawabata and Miautani, 1989; Kawabata et al., 1981; Uchida et al., 1980) 총 14개의 물질들이 알려져 있다. 이들 중에서 chloranthalactone F와 shizukanolide D, E, F 등을 제외한 나머지 물질들은 모두 홀아비꽃대로부터 분리되었다. *Chloranthus*속으로부터 분리된 이들 물질들에 대한 생물활성은 거의 알려진 바 없다. 다만 Uchida 등(1980)은 5개의 chloranthalactone물질들과 atracylenolide에 대하여 쥐의 lymphomasarcoma L-5178Y 세포들에 대하여 세포독성을 조사한 결과 약간의 세포독성이 있다고 보고하였다. 한편 Kawabata 등(1981)은 dehydroshizukanolide(shizukanolide B)가 *Mucor*와 *Rhizopus*에 대하여 항진균활성이 있다고 보고하였다.

한편 sesquiterpene dimer물질들에는 지금까지 10개의 물질들, 즉 shizukanol A(Kawabata et al., 1990), B, C, D(Kawabata and Mizutani, 1992), E, F, G, H, I(Kawabata et al., 1995), J(Kawabata et al., 1998)가 보고되었다. 이들 물질들은 홀아비꽃대와 꽃대(*C. serratus*)의 뿌리로부터 보고되었다. 또한 Kawabata 등(1998)은 홀아비꽃대 뿌리로부터 sesquiterpene trimer물질인 trishizukanol A를 보고하였다. 하지만 이들의 생물활성에 대해서는 알려진 바가 없다. Kawabata와 Mizutani(1992)는 본 연구에서 분리한 shizukanol B, C 및 D를 꽃대(*C. serratus*)의 뿌리로부터 보고하였다. 홀아비꽃대의 뿌리로부터의 이들 세 가지 물질들의 보고는 본 연구를 통해 처음으로 보고하는 바이다.

**In vitro 항균활성**

홀아비꽃대의 뿌리로부터 분리한 세 개의 물질, 즉 shizukanol B, C 및 D는 실험한 9개의 식물병원균들에 대하여 다양한 정도로 항균활성을 보였다(표 2). 9개의 대상 식물병원균들 중에서 토마토 역병균인 *P. infestans*가 이들 물질에 대하여 MIC값이 3.1 µg/ml이하로 가장 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 그러나 이와는 달리 같은 Oomycetes에 속하는 *P. ultimum*에 대해서는 세 가지 물질 모두 균사생육억제 활성이 없는 것으로 나타났다. 세 가지 물질들 중에는 shizukanol C가 항균활성이 상대적으로 가장 높은 것으로 나타났다. Shizukanol C의 경우 *P. infestans* 외에도 *C. acutatum*, *M. grisea* 및 *C. gloeosporioides*의 균에 대해 MIC값이 12.5 µg/ml으로 나타났다.

Kawabata 등(1981)은 홀아비꽃대 뿌리로부터 분리한 sesquiterpene monomer들 중 shizukanolide, dehydroshizu-

Table 1.  $^{13}\text{C}$  NMR data of shizukanols B, C, and D in  $\text{CDCl}_3$ <sup>a)</sup>

C	Shizukanol B	Shizukanol C	Shizukanol D
1	26.0	25.6	25.6
2	15.9	15.6	15.8
3	24.7	24.5	24.7
4	142.4	142.0	142.4
5	132.2	131.9	131.5
6	41.1	40.7	40.6
7	131.3	131.3	131.5
8	200.6	200.1	200.5
9	79.9	79.6	79.9
10	50.9	50.7	51.0
11	147.4	146.5	147.2
12	170.1	170.8	171.0
13	20.0	19.9	20.5
14	15.2	15.1	15.2
15	25.3	25.0	25.5
1'	25.6	25.1	24.3
2'	11.6	11.5	16.6
3'	27.7	27.9	21.7
4'	77.1	76.9	43.0
5'	61.2	59.9	59.0
6'	23.3	21.9	25.0
7'	174.5	168.5	168.5
8'	93.2	93.0	93.3
9'	55.5	54.8	54.5
10'	44.9	44.5	44.0
11'	123.3	127.1	126.7
12'	171.6	172.1	172.3
13'	54.3	54.2	54.9
14'	25.9	25.9	24.0
15'	72.0	70.8	66.1
a	166.9	167.9	171.1
b	129.2	127.7	20.8
c	135.4	138.3	-
d	61.6	14.2	-
e	12.9	11.7	-
f	171.5	-	-
g	28.6	-	-
h	29.1	-	-
i	171.9	-	-
OMe	52.3	52.3	52.6

<sup>a)</sup>125 MHz.

kanolide, glechomanolid 및 isofuranodiene 등 4가지 물질들에 대하여 *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium solani*, 다양한 *Mucor*속의 속하는 균주들 및 *Rhizopus japonicus*와 *Rhizopus oryzae* 등에 대

하여 *in vitro* 항균활성을 실시한 결과 dehydroshizukanolide를 제외한 다른 물질들은 이들 곰팡이들에 대하여 거의 활성이 없다고 하였다. Dehydroshizukanolide(shozukanolide B)는 특히 *Mucor*속과 *Rhizopus*속의 속하는 균들에 대하여 높은 항균활성을 보인다고 하였다. 이들의 연구와 본 연구의 결과로 미루어 볼 때 홀아비꽃대로부터 분리되는 다양한 구조의 sesquiterpene계 물질들은 다양한 곰팡이에 대하여 항균활성을 가지고 있음을 알 수 있다.

#### *In vivo* 항균활성

홀아비꽃대 뿌리로부터 분리한 세 가지 물질들의 6가지 식물병에 대한 *in vivo* 항균활성을 조사한 결과 표 3과 같이 나타났다. 세 가지 물질들을 각각 300, 100, 33.3 및 11.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준으로 병원균 접종 1일전에 처리한 결과 세 가지 물질 모두 6가지 식물병 중에는 벼 도열병과 밀 붉은녹병에 높은 *in vivo* 항균활성을 보였다. 벼 잎집무늬마름병과 토마토 잿빛곰팡이병의 경우에는 shizukanol B가 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준에서 50%이상의 방제가를 보였고, 토마토 역병의 경우에는 shizukanol D가 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준에서 89%의 방제가를 보였다. *In vitro*에서는 shizukanol C가 다른 두 가지 물질들에 비하여 높은 활성을 보였지만, *in vivo*에서는 뚜렷한 차이를 발견할 수는 없었다. 한 가지 흥미로운 사실은 *in vitro*에서 균사생육 억제활성을 조사하였을 경우에는 *P. infestans* 균의 균사생육이 가장 강하게 억제되었지만, *in vivo*에서는 비교적 활성이 적게 나타났다. 이러한 차이는 흔히 발견되는 현상으로서 *in vitro* 검정법에서는 단순하게 균사 생육 억제 정도만을 측정하는 데 비하여 *in vivo*에서는 다양한 요인들이 복합적으로 작용하여 방제활성으로 나타나기 때문인 것으로 추정된다. 토마토 역병에 대한 *in vivo* 검정법에서는 균사 생육 활성보다는 유주자 발아 억제 활성이 중요하게 작용하고, 또한 약제의 식물체내 침투 정도도 중요하게 작용한다.

#### 좁개구리밥에 대한 생육저해 활성

홀아비꽃대로부터 분리한 shizukanol B, C 및 D의 *in vivo* 항균활성을 조사하던 중에 세 가지 물질 모두 보리와 밀에 대하여 약해를 유발한다는 사실을 발견하였다. 세 가지 물질들의 약해 정도, 즉 식물체에 대한 독성 정도를 정량적으로 측정하기 위하여 좁개구

Table 2. Inhibitory action of shizukanols B, C, and D isolated from *Chloranthus japonicus* roots against mycelial growth of plant pathogenic fungi *in vitro*

Plant Pathogen	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>a</sup>		
	Shizukanol B	Shizukanol C	Shizukanol D
<i>Corticium sasaki</i>	NI <sup>b</sup>	50	NI
<i>Pythium ultimum</i>	NI	NI	NI
<i>Alternaria alternata</i>	>100	100	>100
<i>Colletotrichum acutatum</i>	>100	12.5	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	>100	>100	>100
<i>Magnaporthe grisea</i>	25	12.5	100
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	25	12.5	25
<i>Botrytis cinerea</i>	>100	50	>100
<i>Phytophthora infestans</i>	3.1	3.1	3.1

<sup>a</sup>)Minimum inhibitory concentration.

<sup>b</sup>)NI: not inhibited at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Table 3. *In vivo* antifungal activity of shizukanols B, C, and D isolated from *Chloranthus japonicus* against various fungal pathogens<sup>a</sup>)

Chemical	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Control value (%) <sup>b</sup>					
		RCB <sup>c</sup>	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
Shizukanol B	11.1	13	0	0	0	80	42
	33.3	25	20	0	0	93	33
	100	69	25	36	0	Pt <sup>d</sup>	Pt
	300	90	50	57	25	Pt	Pt
Shizukanol C	11.1	13	10	0	0	80	33
	33.3	79	15	0	0	Pt	Pt
	100	90	0	0	25	Pt	Pt
	300	90	0	21	0	Pt	Pt
Shizukanol D	11.1	50	0	0	0	90	42
	33.3	56	0	7	0	93	33
	100	50	0	7	0	Pt	Pt
	300	80	25	7	89	Pt	Pt

<sup>a</sup>)The plant seedlings were inoculated with spores or mycelial suspensions of the test organisms 1 day after the chemical solutions were sprayed to run-off on the leaves.

<sup>b</sup>)Each value represents the mean of two replicates.

<sup>c</sup>)RCB, rice blast (*Magnaporthe grisea*); RSB, rice sheath blight (*Corticium sasaki*); TGM, tomato gray mold (*Botrytis cinerea*); TLB, tomato late blight (*Phytophthora infestans*); WLR, wheat leaf rust (*Puccinia recondita*); BPM, barley powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*).

<sup>d</sup>)Pt: phytotoxicity.

리밥에 대한 약해를 측정하였다.

이들 세 물질의 좁개구리밥의 생장 저해 활성을 조사한 결과 표 4에서와 같이 세 물질 모두 활성이 있는 것으로 나타났다. Shizukanol B, C 및 D의 50% 생육 저해 농도는 각각 30.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 49.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 154

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나, shizukanol B가 가장 활성이 큰 것으로 나타났다.

*In vivo* 살충활성

분리한 물질들 중에서 가장 양이 많이 확보된

Table 4. Inhibitory activities of shizukanols B, C and D against growth of duckweed<sup>a)</sup>

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Visual injury (%)		
	shizukanol B	shizukanol C	shizukanol D
200	80	70	60
67	70	60	20
22	60	40	0
7.4	10	10	0
2.5	0	0	0

<sup>a)</sup>Each duckweed was floated on Hutner's medium after treating with the three chemicals.

Table 5. Insecticidal activity of shizukanol C against 5 arthropod pests<sup>a)</sup>

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Mortality (%)				
	BPH <sup>b)</sup>	GPA	DBM	TCW	TSSM
1,000	60	80	100	70	0
500	- <sup>c)</sup>	-	40	-	-
250	-	-	0	-	-

<sup>a)</sup>The arthropod pests were treated with shizukanol C by foliar spray or leaf-deeping.

<sup>b)</sup>BPH, brown planthopper; GPA, green peach aphid; DBM, diamondback moth; TCW, tobacco cutworm; TSSM, two-spotted spider mite.

<sup>c)</sup>-: not tested.

shizukanol C를 가지고 5가지 주요 해충에 대한 살충 활성을 조사하였다. 그 결과 표 5에서와 같이 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  수준에서 shizukanol C는 실험한 해충들 중에서 점박이응애(*T. urticae*)를 제외한 나머지 4개의 해충들에 대하여 살충활성을 보였다. 특히 배추좀나방(*P. xylostella*)에 대해서는 가장 높은 살충활성을 보였다. 이 배추좀나방에 대해서는 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 100%와 40%의 살충활성을 보였다.

본 연구결과 홀아비꽃대에서 분리한 shizukanol B, C 및 D는 항균활성, 제초활성 및 살충활성 등 다양한 생리활성을 가지고 있다는 사실을 발견하였다. 대상 생물에 따라 또는 검정 방법에 따라 구조와 활성간에는 차이가 있었지만, 3가지 물질들이 서로 다른 생물학적인 분류에 속하는 생물에 대하여 활성을 보인다는 것은 이들 sesquiterpene dimer들의 작용점이 거의 모든 생물에 존재하는 기초대사 과정중의 하나이거나 아니면 여러 개일 가능성이 있다는 것을 나타낸다. 일반적으로 천연물질은 농약 개발과정에 있어서 직접적으로 농약으로 이용되거나 아니면 선도물질로서 기여한다. 이들 두 가지 주요 역할 외에도 천연물질은 새로운 작용점 발굴을 통한 신농약 개발에도 기여한

다. Shizukanol B, C 및 D의 구조는 합성하기에 어려움이 있고 또한 활성이 직접적으로 사용하기에는 적당하지 않으나 새로운 작용점을 발굴하는데 기여하여 새로운 합성 농약의 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 21세기 프런티어연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 연구비지원(과제번호 PF0021 10-01)에 의해 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Ahn, Y. J., G. H. Kim, and S. Y. Choi (1989) Joint toxic of insecticide mixtures to the cypermethrin and pirimicarb selected strains of green peach aphid (*Myzys persicae sulzer*). Kor. J. Appl. Entomol. 28(1):32~36.
- Benner, J.P. (1993) Pesticidal compounds form higher plants. Pestic Sci. 39:95~102.

- Choi, G.J., K.S. Jang, J.-S. Kim, S.-W. Lee, J.Y. Cho, K.Y. Cho, and J.-C. Kim (2004) *In vivo* antifungal activities of 57 plant extracts against six plant pathogenic fungi. *Plant Pathol. J.* 20(3):184~191.
- Dhiangra, O.D. and J.B. Sinclair (1986) Chemical control, pp. 227-243 *In Basic Plant Pathology Methods*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Dik, A.J. and M. Van Der Staay (1995) The effect of Milsana on cucumber powdery mildew under Dutch conditions. *Med. Fab. Landbouww. Univ. Gent* 59:1027~1034.
- Herger, G. and F. Klingauf (1990) Control of powdery mildew fungi with extracts of the giant knotweed, *Reynoutria sachalinensis*(Polygonaceae). *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 55:1007~1014.
- Kawabata, J. E. Fukushi, and J. Mizutani (1995) Sesquiterpene dimers from *Chloranthus japonicus*. *Phytochemistry* 39(1):121~125.
- Kawabata, J., E. Fukushi, and J. Mizutani (1998) Sesquiterpene dimer and trimer from *Chloranthus japonicus*. *Phytochemistry* 47(2):231~235.
- Kawabata, J. and J. Mizutani (1989) Shizukanolides D, E, and F, novel lindenanolides from *Chloranthus* spp.(Chloranthaceae). *Agric. Biol. Chem.* 53(1):203~207.
- Kawabata, J. and J. Mizutani (1992) Dimeric sesquiterpenoid esters from *Chloranthus serratus*. *Phytochemistry* 31(4):1293~1296.
- Kawabata, J., S. Tahara, and J. Mizutani (1981) Isolation and structural elucidation of four sesquiterpenes from *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae). *Agric. Biol. Chem.* 45(6):1447~1453.
- Kawabata, J., Y. Fukushi, S. Tahara, and J. Mizutani (1990) Shizukanol A, a sesquiterpene dimer from *Chloranthus japonicus*. *Phytochemistry* 29(7):2332~2334.
- Kim, G. H., Y. S. Seo, J. H. Lee, and K. Y. Cho (1990) Development of fenvalerate resistance of the diamondback moth, *Pultella xylostella* linne (Lepidoptera: Yponomeutidae) and its cross resistance. *Kor. J. Appl. Entomol.* 29(3):194~200.
- Kim, G. H., C. Song, N. J. Park, and K. Y. Cho (1994) Inheritance of resistance in dicofol-selected strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch(Acarina: Tetranychidae), and its cross resistance. *Kor. J. Appl. Entomol.* 33(4):230~236.
- 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, J.-C., G.J. Choi, S.-W. Lee, J.-S. Kim, K.Y. Chung, and K.Y. Cho (2004) Screening extracts of *Achyranthes japonica* and *Rumex crispus* for activity against various plant pathogenic fungi and control of powdery mildew. *Pest Manag. Sci.* 60:803~808.
- Park, N. J., K. S. Jang, J. R. Cho, and K. Y. Cho (1992) Effects of RH 5849, an ecdysone agonist, against feeding and growth of tobacco cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius) larvae. *Kor. J. Appl. Entomol.* 31(4):475~479.
- Pillmoor, J.B., K. Wright, and A.S. Terry (1993) Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pestic. Sci.* 39:131~140.
- Prithiviraj, B., U.P. Singh, K.P. Singh, and K. Plank-Schumacher (1998) Field evaluation of ajoene, a constituent of garlic(*Allium sativum*) and neemazal, a product of neem(*Azadirachta indica*) for the control of powdery mildew(*Erysiphe pisi*) of pea(*Pisum sativum*). *J. Plant Dis. Prot.* 105:274~278.
- Takeda Y., H. Yamashita, T. Matsumoto, and H. Terao (1993) Chloranthalactone F, a sesquiterpenoid from the leaves of *Chloranthus glaber*. *Phytochemistry* 33(3):713~715.
- Uchida, M., Y. Koike, G. Kusano, Y. Kondo, S. Nozoe, C. Kabuta, and T. Takemoto (1980) Studies on the constituents of *Chloranthus* spp. III. six sesquiterpenes from *Chloranthus japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* 28(1):92~102.
- 이영노 (1997) 한국식물도감. 교학사. p.1247.
- 이창복 (1979) 대한식물도감. 향문사. p.990.



---

**Biological activity of shizukanols isolated from *Chloranthus japonicus* roots**

Mi Ran Park, Hae Young Kim, Gyung Ja Choi, Seon-Woo Lee, Kyoung Soo Jang, Jin-Seog Kim, Kyung-Sik Hong, No-Joong Park, Kwang Yun Cho and Jin-Cheol Kim\* (*Biological Function Research Team, Korea Research Institute of Chemical Technology, Yusong P.O. Box 107, Taejeon 305-600, Korea*)

**Abstract :** The methanol extract of *Chloranthus japonicus* roots effectively controlled the development of rice blast (*Magnaporthe grisea*), rice sheath blight (*Corticium sasakii*), tomato gray mold (*Botrytis cinerea*), tomato late blight (*Phytophthora infestans*), and wheat leaf rust (*Puccinia recondita*). From the methanol extract of *C. japonicus* roots, three antifungal substances were isolated. Their chemical structures were determined to be shizukanols B, C, and D mainly by mass and NMR spectral data. Among the three substances, shizukanol C showed the strongest inhibitory activity against mycelial growth of the plant pathogenic fungi tested; it completely inhibited mycelial growth of *M. grisea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *C. acutatum* at concentrations of more than 12.5  $\mu\text{g/l}$  and *P. infestans* at concentrations of more than 3.13  $\mu\text{g/ml}$ . They also controlled effectively the development of rice blast and wheat leaf rust. On the other hand, they caused phytotoxic symptoms on barley leaves and inhibited the growth of duckweed (*Lemna paucicostata*) with  $\text{EC}_{50}$  values of 30.0  $\mu\text{g/ml}$  for shizukanol B, 49.9  $\mu\text{g/ml}$  for shizukanol C, and 154  $\mu\text{g/ml}$  for shizukanol D. In addition, shizukanol C showed an insecticidal activity against brown planthopper (*Nilaparavata lugens*), green peach aphid (*Myzus persicae*), diamond-back moth (*Plutella xylostella*), and tobacco cutworm (*Spodoptera litura*) of the 5 arthropod pests tested with mortality values of more than 60% at a concentration of 1,000  $\mu\text{g/ml}$ .

**Key words :** antifungal activity, *Chloranthus japonicus*, herbicidal activity, insecticidal activity, shizukanol.

---

\*Corresponding author (Fax : +82-42-861-4913, E-mail : kjinc@kRICT.re.kr)