

## 황련 추출물로부터 항균활성물질의 분리 및 활성 검정

정일민<sup>†</sup> · 백수봉

전국대학교 식량자원학과  
(1996. 10. 11. 접수)

### Separation and Activity Test of Antifungal Substance from *C. japonica* Extract

Ill-Min Chung<sup>†</sup>, Su-Bong Paik

Dept. of Crops Science, Collage of Agriculture, Kon-Kuk Univ. Seoul 143-701, Korea  
(Received Oct. 11, 1996)

**요약 :** 황련(*C. japonica*)의 추출물을 이용하여 사과경무늬병, 사과탄저병 및 사과푸른곰팡이병에 대한 항균활성을 검정함과 동시에 활성물질을 분리하여 안정성이 있는 천연식물성 농약으로서의 개발 가능성을 검토하고자 시험했던 바, 그 결과를 요약하면 공시균에 대한 황련의 조추출액 EC<sub>50</sub>은 400~500 $\mu$ g/mL이고 TLC, HPLC 분석을 통한 생리활성물질은 berberine으로 동정되었고 그 함유율은 81.14%였다.

**Abstract :** This study was conducted to test antifungal activity and to separate bioactive compound using *C. japonica* extract which was shown the most effective control on the *B. berengeriana*, *G. cingulata* and *P. expansum*. EC<sub>50</sub> on the test pathogene of *C. japonica* extract was 400~500 $\mu$ g/mL. Bioactive compound analyzed by TLC and HPLC method was identified as a kind of alkaloids, berberine, and the content was 81.14%.

**Key words :** *Coptis japonica*, antifungal activity, bioactive compound, HPLC, berberine.

#### 1. 서론

저장중인 과실의 부패 방지를 위한 여러 가지 방법들<sup>1,2</sup>이 제시되어 있는데, 기본적으로는 냉장저장에 의해 병의 발생을 억제 또는 지연시킬 수 있으며, 저장고 안의 산소 농도를 낮추고 이산화탄소의 농도를 높이는 등의 CA 및 MA 저장<sup>3</sup>에 의해서도 부패 방지가 가능하다. 또한 저장 전이나 저장중에 열처리<sup>4,5</sup>를 하거나  $\gamma$ 선이나 자외선 등을 처리<sup>6,7</sup>하여 부패병 발생에 대한 저항성을 증진시킬 수 있다.

그러나 이러한 처리들은 막대한 시설비 및 유지비, 그리고 실제 처리에 있어서의 실용성 문제 등 여러 가지 불리한 점이 많으므로 지금까지는 유기합성농약에 의한 화학적 방제법<sup>8~11</sup>이 주로 사용되어 왔다.

화학적 방제법의 편리성이나 효과의 확실성에도 불구하고 근래에 이르러는 농산물, 특히 생식을 하게 되는 과실 등에서의 맹독성 농약 검출<sup>12,13</sup>이나 약제 내성균의 출현<sup>14~17</sup>등 여러 가지 문제점이 발생하게 되어, 그에 대한 대안으로서 생물학적 방제의 필요성이 대두되었다.

생물학적 방제의 성공 가능성은 Wilson 등<sup>18</sup>에 의해 언급되어졌으며, 그 기술의 발달이나 최근의 연구 경향 등이 여러 연구자에 의해서 종합 고찰되었다.<sup>19,20</sup> 그리고 자연계에는 항균성 성질을 가지는 고등식물이 존재한다는 사실은 옛부터 전해져 많은 식물에서 항균성 또는 살충성을 지니는 활성물질이 발견되었다.<sup>21-23</sup> 전형적인 식물 유래의 항균성 화합물은 lactones, quinones, ketones, phenolic compounds, tannin, tropolones, stilbenes, sulphoxides, thiosulphinates, benzoxazolinones, flavonoids, isoflavones, isothiocyanates, alkaloids, 정유 및 배당체<sup>24</sup> 등으로, 이들을 이용한 천연식물성 안전 농약 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

황련(*C. japonica*)에는 berberine, jateorrhizine, palmatine, coptisine, magnoflorine, epiberberine, berbistine, worenine 및 ferulic acid 등이 함유되어 있는데<sup>25-27</sup>, berberine은 용혈성연쇄구균, 흉막염균, 폐렴쌍구균, 콜레라균, 탄저병균 및 황색포도상구균에 대해 강한 억제 효과를 나타내고 적리균, 디프테리아균, 고초균, 녹색연쇄구균에 대해서는 억제효과, 그리고 폐렴간균, 백일해병균, 페스트균, 브루셀라균, 파상풍균 및 결핵균에 대해서도 유효할 정도의 억제효과가 있다고 알려져 있으며<sup>28</sup>, 홍 등<sup>29</sup>은 황백나무 수피로부터 분리된 berberine이 사과나무 부란병균에 대해 항균력이 있다고 보고했고, 도<sup>30</sup>는 *C. japonica*와 *P. amurense*로부터 분리된 berberine이 항균 활성을 가지고 *C. japonica*는 *P. amurense*에 비해 2배 이상의 항균력이 있다고 했다.

본 연구에서는 우리 나라에서 재배 또는 이용되고 있는 황련(*C. japonica*)의 추출물을 이용하여 사과껍질 무늬병, 사과탄저병 및 사과푸른곰팡이병에 대한 항균 활성을 점정함과 동시에 활성물질을 분리하여 안정성이 있는 천연식물성 농약으로서의 개발 가능성을 검토하고자 실시하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 항균활성물질의 추출

건조된 황련 1kg을 실내 온도에서 풍건시켜 분쇄한 (40 mesh) 가루를 MeOH와 1:5(w/v)의 비율로 1000mL beaker에 넣고 25℃의 water bath에서 24시

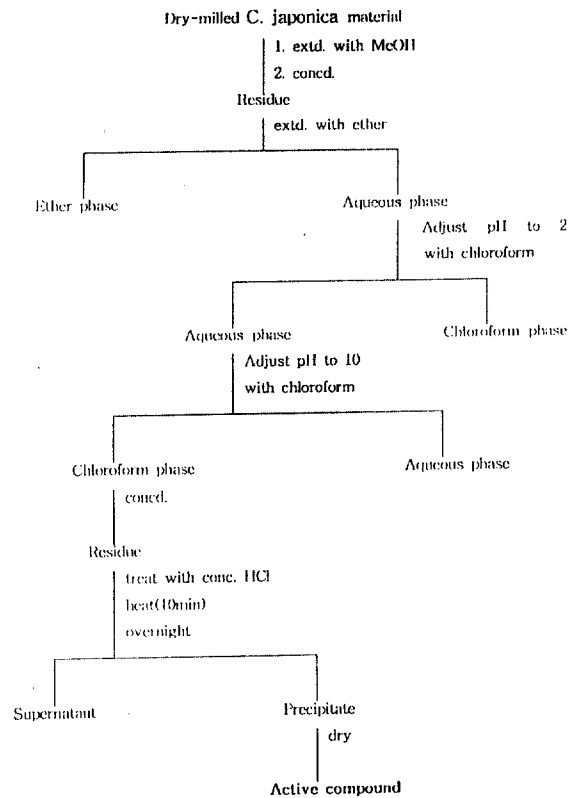


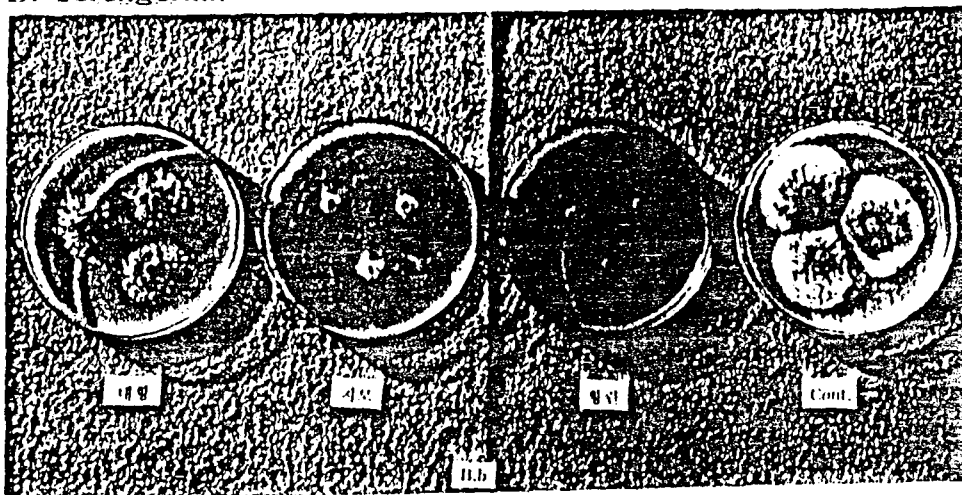
Fig. 1. Extraction procedure of bioactive substance, from *C. japonica*

간 방치한 후 4겹의 gauze로 거르고 여과지(Whatman No. 1)를 사용하여 여과시킨 후 여액을 감압농축시켜 100g의 조추출물을 얻고 이것을 Fig. 1과 같은 방법으로 분획한 결과 4.5g의 황색 분말의 물질을 얻었다.

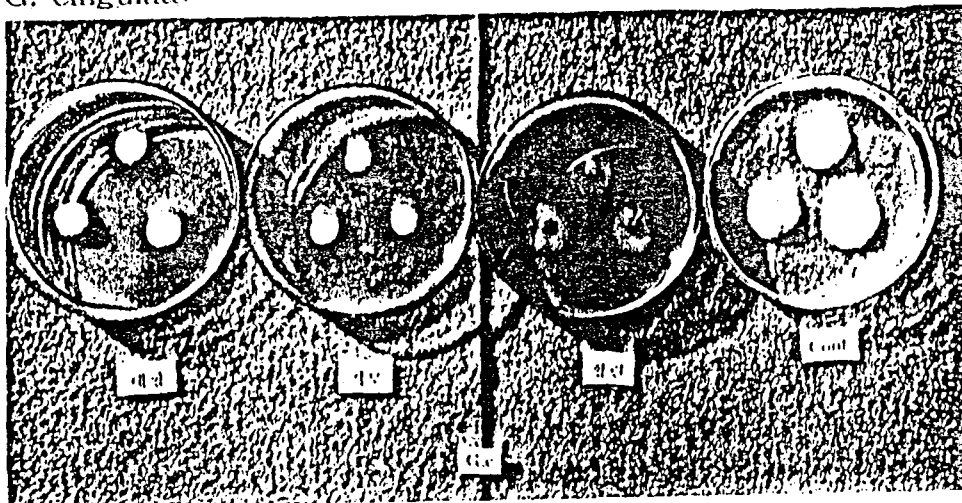
### 2.2. 추출액의 병원균에 대한 활성 조사

Fig. 1에서 얻어진 황색 분말의 물질을 250, 300, 350, 400, 450, 500µg 농도로 희석하여 plastic petri-dish에 분주한 후 50℃로 유지된 potato dextrose agar(PDA)를 10mL씩 붓고 고르게 혼합하였다. 배지가 굳은 후 25℃에서 5일간 배양시킨 공시병원균 *B. berengerian*, *G. cingulata*, *P. expansum* 균총을 5mm 크기로 punching하여 접종하고, 25℃에서 4일간 둔 후 균사의 생장 척도를 측정하여 항균력을 점정하였다. 균사 생장 저지대 형성의 유무를 조사하여 무처리구와 비교하여 상대적인 저해율(%)로 계산하여 EC<sub>50</sub>을 조사하였다. 또한 이 황색 분말을 TLC(Thin Layer Chromato-

A) *B. berengerian*



B) *G. cingulata*



C) *P. expansum*

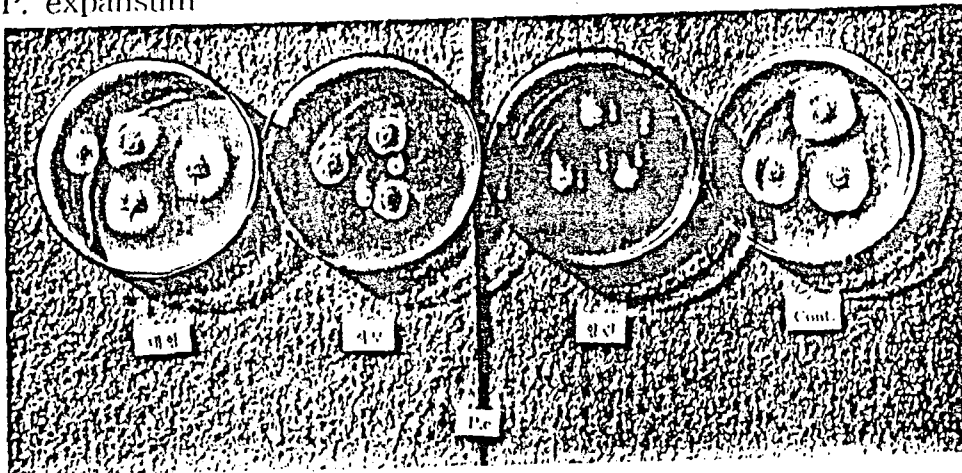


Fig. 2. The effect of crude extract of *C. japonica* on mycelial growth of each pathogens on PDA media.

Table 1. Operating conditions for HPLC analysis.

Parameter	Condition
Column	$\mu$ Bondpak C <sub>18</sub> Column(4.6mm×250mm)
Solvent system	0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 50%, CH <sub>3</sub> CN 50%, SDS 0.6%
Flow rate	1.5mL/min.
Detector	UV visible 254nm.
Injection	volumn 10 $\mu$ L

graphy)상에 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O(5:1:0.1)의 용매로 전개하여 UV하에서 나타난 band를 수집하여 paper disk법을 이용하여 공시 병원균에 대한 항균활성을 검정하였다.

### 2.3. 항균활성물질의 동정

TLC 및 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 단일 물질을 분리하고 표준시약 berberine과 비교하여 동정하였다. 이 때 HPLC의 조건은 Table 1과 같다. HPLC에 사용된 용매는 모두 HPLC용 등급을 사용하였고, 증류수는 탈이온 처리하였으며 사용 전에 0.45 $\mu$ m filter로 여과하여 사용하였다. 그 외 추출 및 조제용은 1급 시약을 사용하였고 사용된 기기는 high performance liquid chromatography에 UV detector(Youngin, Model 720), pump system(Youngin, Model 930), autosampler(Spark Holland B. V.)을 장착하여 사용

하였다. 검량선 작성 berberine 표준품을 0.5mg씩 취해 MeOH 용액 5mL에 용해시킨 후 각각 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 50 $\mu$ L를 injection하여 검량선을 작성하였다(Fig. 5).

### 3. 결과 및 고찰

실험 결과 황련의 조추출물이 사과저장병 방제에 효과가 있는 것으로 나타나고 있다(Fig. 2). 공시균의 균사 생장 억제농도(EC<sub>50</sub>)를 조사한 결과를 Table 2에서 보면 사과점무늬병균은 400 $\mu$ g, 사과탄저병균은 500 $\mu$ g, 그리고 사과푸른곰팡이병균도 500 $\mu$ g으로 나타났다.

황백나무 수피로부터 얻은 조추출액이 사과나무 부란병균(*V. ceratosperma*)의 균사 생육에 대한 EC<sub>50</sub>값이 30~60 $\mu$ g/mL의 범위라는 보고<sup>26</sup>와 황련의 조추출액이 *P. capsici*, *F. oxysporum*, *A. porri* 및 *B. dothidea* 등에 대한 EC<sub>50</sub>값은 500~1000배의 희석 농도의 범위라는 보고<sup>30</sup> 등이 있는데, 본 연구에서는 *B. beren-*

Table 2. Antifungal activities by concentration of crude extract of *C. Japonica* on mycelial growth of each pathogens on PDA media

Concentration ( $\mu$ g)	<i>B. berengeriana</i>	<i>G. cingulata</i>	<i>P. expansum</i>	LSD(0.05)	CV(%)
250	40.7	29.3	29.3	1.15	1.74
300	35.7	26.3	26.3	1.15	1.96
350	30.7	24.3	24.3	1.15	2.18
400	25.3	24.3	24.3	1.15	2.34
450	25.3	23.3	23.3	1.15	2.41
500	22.3	18.3	18.3	1.15	2.94
Control	51.7	38.3	38.3	1.15	1.35
LSD(0.05)	1.01	1.01	1.01	—	—
CV(%)	1.75	2.19	2.19	—	—

\* Colony diameter(mm)

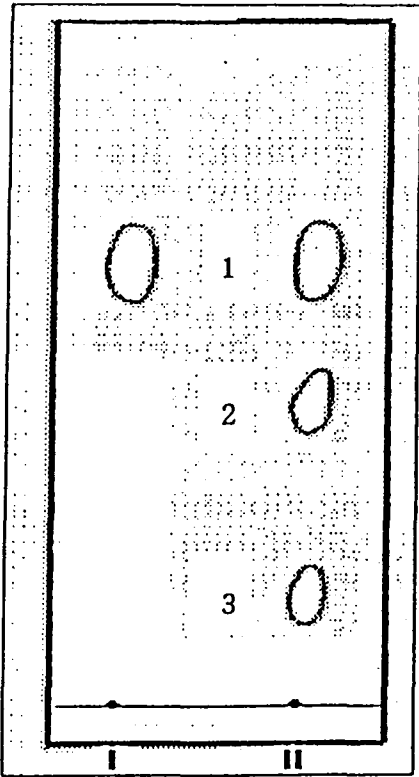


Fig. 3. TLC chromatogram of I, berberine standard, and II, *C. japonica* extract.

*geriana*, *G. cingulata* 및 *P. expansum*에 대해서  $EC_{50}$ 값은 400~500 $\mu$ g/mL 범위로 나타냈다.

그리고 TLC로 황련의 조추출물을 분리한 결과 UV하에서 1, 2 및 3의 3가지 물질로 분리되었으며(Fig. 3), 이것을 가지고 공시균에 대한 균사 성장 억제율을 조사한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 Spot 1에서

저지대 형성이 뚜렷하게 나타났으나, 나머지 2 및 3의 Spot는 효과가 없었다. 따라서 황련의 조추출물 중에서 1의 분리물질이 항균성이 있는 생리활성물질이라고 추정되어 이 분말을 HPLC로 분석한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 표준품 berberine과 동일한 머무름 시간(11 min)에서 peak가 형성되었고 그 함량은 81.14%로 나타났으며 공시균에 항균력을 가지는 물질과도 일치되고 있어 황련의 활성물질은 berberine으로 동정되었다. UV상에서 단일 Spot를 보였던 Spot 1에는 아직 밝혀지지 않은 peak 함량이 19% 정도 존재하므로 이에 대한 앞으로의 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 건국대학교 생명과학연구원 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. J. W. Eckert, and J. M. Ogawa, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **23**, 421-454(1985).
2. J. W. Eckert and N. F. Sommer, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **5**, 391-432(1967).
3. P. D. Lidster, K. B. McRae and K. A. Samford, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **106**, 159-162(1981).
4. R. Barkai-Golan and D. J. Phillips, *Plant Dis.*, **75**, 1085-1089(1991).
5. S. Ben-Yehoshua, E. Barak and B. Shapiro, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **112**, 658-663(1987).
6. S. Droby, E. Chalutz, B. Horev, L. Cohen, V. Gaba, C. L. Wilson, and M. Wisniewski, *Plant Pathology*.

Table 3. Inhibition degree on mycelial growth each pathogen on PDA media of Spot 1, 2 and 3 compound isolated from *C. japonica*

Isolated compound	<i>B. berengeriana</i>	<i>G. cingulata</i>	<i>P. expansum</i>
Spot 1	++ <sup>a)</sup>	+	±
Spot 2	±	-	-
Spot 3	±	-	-

- a) ++ : Formation of inhibition zone, distinctly
- + : Formation of inhibition zone, moderately
- ± : Formation of inhibition zone, slightly
- : Not formation

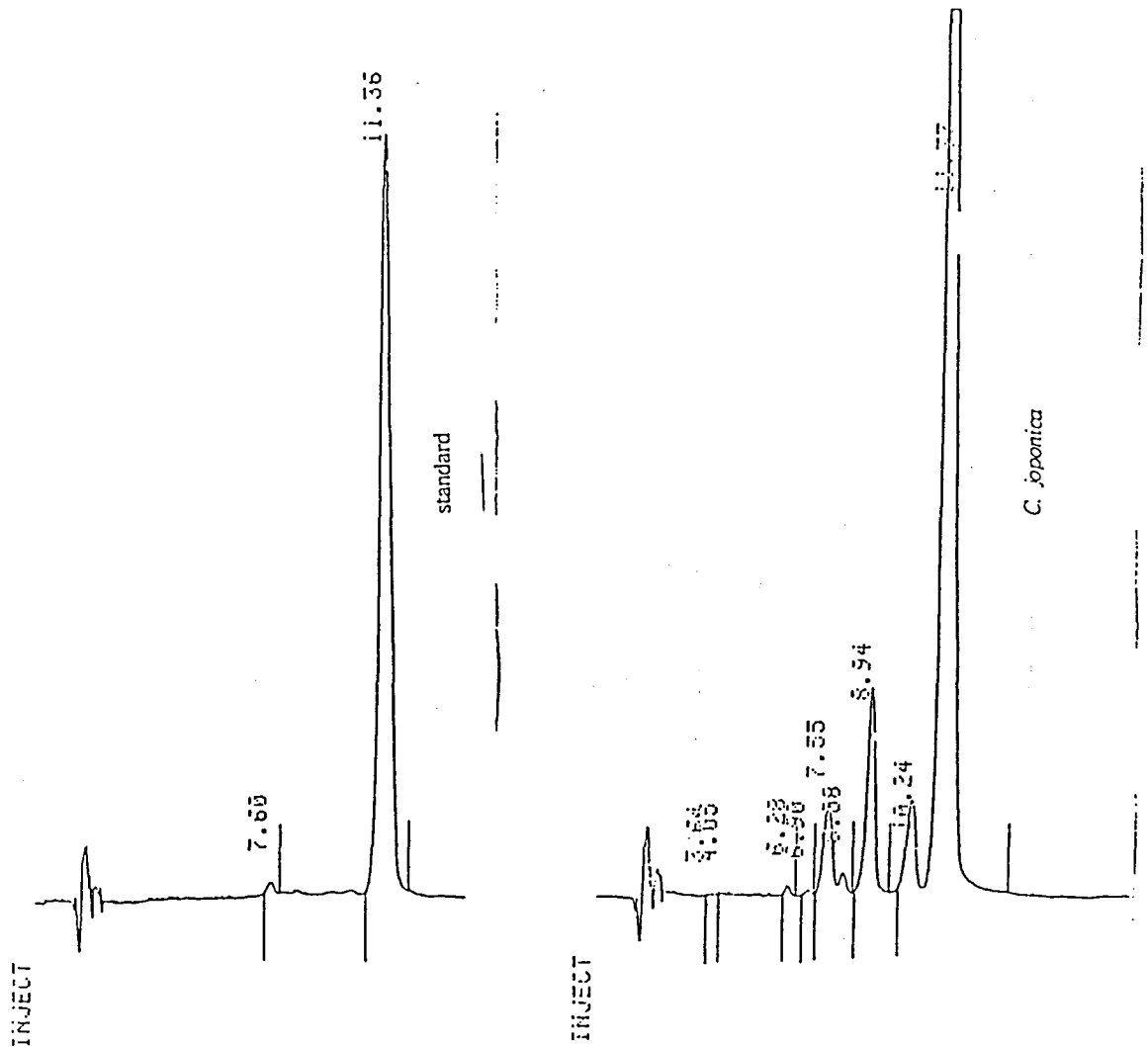


Fig. 4. Chromatogram of berberine standard and spot I of thin layer chromatogram by HPLC.

- 42, 418-424(1993).
7. N. F. Sommer, R. J. Fortlage, P. M. Buckley and E. C. Maxie, *Phytopathology*, **57**, 428-433(1967).
  8. J. A. Bartz and J. W. Eckert, *Phytopathology*, **62**, 239-246(1972).
  9. R. Ben-Arie, *Phytopathology*, **65**, 1187-1189(1975).
  10. G. E. Brown and L. G. Albrigo, *Phytopathology*, **62**, 1434-1438(1972).
  11. G. E. Brown and S. Nagy, *Phytopathology*, **72**, 1008(1982).
  12. 이해근, 이영득, 신용화, *농업논문집*, **30**, 42-51(1988).
  13. D. J. Phillips, *Phytopathology*, **65**, 255-258(1975).
  14. Smilanick, J. L., and J. W. Eckert, *Phytopathology*, **76**, 805-808(1986).
  15. Y. Gutter, A. Shachnai, M. Schiffmann-Nadel, and A. Dinoor, *Phytopathology*, **71**, 482-487(1981).
  16. 김난영, 김기홍, 이창은, *한식병지*, **5**, 344-348(1989).
  17. R. J. McLaughlin, C. L. Wilson, S. Droby, R. Ben-Arie and E. Chalutz, *Plant Dis.*, **76**, 470-473(1992).
  18. J. F. Petrie, and B. A. Dave, *Phytopathology*, **72**, 1008(1982).
  19. C. L. Wilson and P. L. Pusey, *Plant Dis.*, **69**, 375-378(1985).
  20. C. L. Wilson and M. E. Wisniewski, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **27**, 425-441(1989).

21. M. E. Wisniewski and C. L. Wilson, *Hortscience*, **27**, 94-98(1992).
22. 今井統雄, 他田信一, 田中喜一郎, 菅原眞一, *藥學會誌*, **76**(4), 397-400(1973).
23. 機具彰, 村越重雄, 鈴昭憲, 田村三郎, *日本農藝化學會誌*, **47**(7), 449-453(1973).
24. E. P. Lichtenstein, F. M. Strong and D. G. Morgan, *J. Agric. Food Chem.*, **10**(1), 30-33(1962).
25. J. L. Smilanick and J. W. Eckert, *Phytopathology*, **76**, 805-808(1986).
26. 韓大錫外, *生藥學*, 東明社, 131-133, 152-155(1988).
27. 韓國化學研究所, 韓國有用資源研究總覽, 538-542, 781-786(1988).
28. 小學館編, 中藥大辭典(第3卷), 上海科學技術出版社, 158-163, 175-185, 1759-1762(1981).
29. 藥品植物學研究會, 藥品植物學各論, 進明出版社, 96-97, 159-160, 374-375(1980).
30. 홍무기, 정영호, 홍종욱, *농사논문집(작물보호편)*, **30**(3), 24-30(1988).
31. 都銀洙, 藥用식물로부터 항균성 물질의 탐색과 작물병에의 이용에 관한 연구, 건국대학교 박사논문, pp. 1-66(1991).