

## 옥수수 수염에서 Maysin 및 유사물질의 동정

김선림\*† · Maurice E. Snook\*\* · 김이훈\*\*\* · 박철호\*\*\*

\*작물시험장, \*\*ARS-USDA, \*\*\*강원대학교 농업생명과학대학

## Identification of Maysin and Related Flavonid Analogues in Corn Silks

Sun Lim Kim\*, Maurice E. Snook\*\*, E Hun Kim\*\*\* and Cheol Ho Park\*\*\*

\*National Crop Expt. Sta., R.D.A., Suwon 441-100, Korea

\*\*Phytochemical Research Unit, Russell Research Center, ARS-USDA, Athens, Georgia 30613, U.S.A.

\*\*\*Coll. Agric & Life Sci., Kangwon Nat'l Univ., Chuncheon 200-701, Korea

**ABSTRACT :** This study was carried out to isolate and identify the maysin and related flavonoid analogues in corn silks. Silks were covered with silk bag to prevent pollination and were sampled at 3~5 days after silking. The silks were filled with 100% MeOH and stored at 0°C until analysis. The MeOH extracts of corn silks were filtered and concentrated at 35~40°C. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added on the concentrated aqueous solution to remove the chlorophyll and lipids. The C<sub>18</sub> open column (25 mm × 54 cm) was washed and activated with serial treatment of 500 ml of 100% MeOH(twice) → 75% MeOH → 50% MeOH → 30% MeOH → 100% H<sub>2</sub>O (2 times). The concentrated aqueous solution was applied to the C<sub>18</sub> column and washed with H<sub>2</sub>O several times to remove the sugars and water soluble pigments. Neochlorogenic acid, chlorogenic acid and 4-caffeoquinic acid were eluted with 10% MeOH, and rhamnosyl isoorientin was eluted with 30% MeOH, but maysin was eluted with 50% MeOH from the C<sub>18</sub> open column. Collected fractions were analyzed with HPLC by using revers-phase Ultrasphere C<sub>18</sub> column (4.6 × 250 mm, 5 μm) and H<sub>2</sub>O (10% MeOH containing 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)/MeOH (100% MeOH containing 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) linear gradient from 20% to 90% MeOH for 35 minutes, a flow rate of 1 ml/min and detection at 340 nm. The selected fractions were concentrated and applied to the silicic acid column. Maysin was eluted with 500 ml of 100% ethyl acetate from the silicic acid column for the first purification, and the purity of collected fractions was about 75%, but the purity from the second purification with the C<sub>18</sub> column (1/2 × 43") was greater than 95%. FAB-MS spectral data was obtained with VG70-VSEQ VG analytical fast atom bombardment mass (UK). <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data were obtained with Bruker DPX 400 MHz NMR spec-

trometers (German) in DMSO-d<sub>6</sub> at 400 and 100 MHz, respectively.

**Keywords :** corn silk, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, 4-caffeoquinic acid, rhamnosyl isoorientin, maysin.

**옥수수의** earworm과 fall armyworm은 옥수수의 이삭, 수염부위 등을 가해하는 해충으로 옥수수에 막대한 피해를 입힌다. 따라서 이를 해충에 저항성을 갖는 품종을 육성하고자 이를 해충의 유인원이 무엇이며 저항성에 관여된 물질을 밝히고자하는 관심과 노력이 있었다(Byrne et al., 1989; Byrne et al., 1996). Walter(1975)가 옥수수 수염에 earworm 유충의 생육을 억제하는 물질이 존재한다고 보고한 이래 수염의 해충 저항성물질을 구명하고자 하는 연구가 구체적으로 이루어지기 시작하였으나 저항성 품종의 육성에 결정적인 단서를 제공하지는 못하였다.

Waiss et al.(1979)이 멕시코에서 유래된 Zapalote chico의 수염에 maysin[2"-O-α-L-rhamnosyl-6-C-(6-deoxy-xylo-hexose-4-ulosyl) luteolin]이라는 항생물질이 있다고 보고한 후 이에 대한 연구가 활발히 이루어지기 시작하였다(Byrne et al., 1996; Gueldner et al., 1991; Richard et al., 1992; Snook et al., 1989, 1993, 1994, 1995); Widstrom et al., 1991, 1992; Wiseman et al., 1990, 1993, 1995, 1996). Widstrom et al.(1991)은 spectrophotometer에 의한 maysin 측정법을 개발하여 유전자형에 따른 maysin 함량의 변이를 검토하였는데, anthocyanin 및 flavonoid류의 간섭작용으로 함량이 높게 측정되는 문제점이 있어 생육억제를 명확하게 구명하지는 못하였고, maysin은 단지 earworm의 생육을 억제시키는 물질중의 하나로 인식되어 왔을 뿐이다. 그러나 Snook et al. (1989)이 HPLC를 이용한 maysin의 정량법을 보고하면서 maysin의 항생효과가 보다 구체적으로 입증되기 시작하였다.

\*Corresponding author: (Phone) +82-331-290-6743 (E-mail) kims@nces.go.kr  
<Received March 15, 2000>

Maysin은 phenol성 물질인 flavonoid의 하나로서 산화에 비교적 안정적이며 그 항생작용과는 aglycone인 luteolin이 관여하며, 특히 B환의 O-dihydroxy의 작용이 결정적이나 flavonoid의 aglycone에 결합되어있는 당류들은 특이적 항생작용과는 무관하다고 하였다(Snook *et al.*, 1989). Wiseman *et al.*(1996)은 옥수수의 fall armyworm에 대한 저항성은 주로 수염에 함유되어 있는 maysin, chlorogenic acid 및 luteolin 때문이라 하였고, Snook *et al.*(1994)은 O-dihydroxyflavonol glycoside인 rutin도 corn earworm의 생장을 효과적으로 억제한다고 하였다. Byrne *et al.*(1996)은 maysin이 earworm의 소화관에 있는 아미노산과 결합되어 흡수를 저해하기 때문에 유충의 생육을 억제시킨다고 하였으며, 최근 식물유전학자 Neil Widstrom, 곤충학자 Billy Wiseman, 조지아대학 화학자 Maurice Snook와 함께 P1이란 유전자가 maysin의 합성을 결정적으로 조절한다는 사실을 밝혔다. 따라서 옥수수 수염에서 P1의 발현을 증가시키고, 그밖의 관련 유전자를 밝혀 이를 조절할 수만 있다면 maysin의 양을 증가시킬 수 있을 것으로 평가되고 있다. 본 시험은 옥수수 수염에 함유된 maysin 및 그 유사물질을 동정하고 이들의 분리 및 정제법을 확립하여 내충성 신품종 육성의 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

## 材料 및 方法

### 공시재료

옥수수에서 maysin 및 그 유사물질의 분리를 위하여 사용된 옥수수의 수염은 미국 Georgia주 Tifton에 위치한 Coastal Plain Experiment Station의 Insect Biology and Population Management Research Center의 시험포장에 자식계통인 T97 및 T281(Tifton, GA)을 파종하여 silk bag으로 자연수분을 인위적으로 차단시켰고 출사 후 3~5일이 경과된 수염을 약 30g 씩 채취하여 250 ml의 시료병에 넣고 100%의 MeOH 180 ml를 가하였으며 분석이 이루어지기 전까지 Georgia주 Athens의 Russell Research Center(USDA-ARS)에서 0°C의 저온저장고에 약 1주일간 보관하였다.

### 옥수수 수염의 Methanol 추출

0°C에 보관중인 옥수수 수염의 MeOH 추출물을 No. 1 여과지로 여과 후 35°C에서 갑압농축하였고, 농축이 완료될 무렵 약간의 초순수를 가하여 다시 농축하였는데, 이때 수조의 온도는 40°C로 유지하였고 농축시간의 단축을 위해 별도의 진공펌프를 부착하여 시료가 slurry상태가 될 때까지 농축하였다. 농축된 조추출물은 methylene chloride로 세척하여 엽록소 및 각종 지질계통의 화합물을 제거 후 slurry 상태로 농축하여 methylene chloride를 제거하였다.

**Table 1.** Instrument and analysis conditions for maysin.

Instrument	Hewlett-Packard, HP 1050 LC, U.S.A.
Wave length	340 nm
AUFS	0.02
Column	Ultrasphere C <sub>18</sub> 5 μm (4.6 × 250 mm)
Column temperature	30°C
Mobil phase	A-10% MeOH+0.1% Phosphoric acid B-100% MeOH+0.1% Phosphoric acid
Gradient condition	H <sub>2</sub> O/MeOH linear gradient (from 20% MeOH to 90% MeOH for 35 minutes)
Flow rate	1.0 ml/min.

### 粗抽出物의 분리 및 농축

컬럼은 C<sub>18</sub>(Preparative C<sub>18</sub> 125Å Bulk Packing Material 55~105 μm, WATERS, U.S.A.)을 Fisher FP 컬럼(25 mm × 54 cm)에 충진하고, N<sub>2</sub>의 기류에서 500 mL의 100% MeOH (2회)→75% MeOH(1회)→50% MeOH(1회)→30% MeOH(1회)→100% H<sub>2</sub>O(2회)처리하여 컬럼을 활성화하였다. 활성화된 컬럼에 methylene chloride가 제거된 slurry 상태의 농축시료를 적재하고 초순수로 여러번 세척하여 당 및 각종 수용성 물질을 제거하였고, 10~40% MeOH로 농도를 10% 씩 증가시키면서 컬럼을 세척하여 색소를 제거한 후 50% MeOH로 컬럼에 흡착된 물질을 용출시켜 125 ml씩 fraction을 수거하였다. 각 fraction은 HPLC(Table 1)로 확인하여 maysin을 높게 함유하고 있을 것으로 판단되는 fraction들을 선택, 혼합하여 농축하였다. 그 후 농축물에 잔류하는 수분의 제거를 위해 MeOH와 소량의 CH<sub>3</sub>CN을 가지고 농축하여 조추출물의 silicic acid 컬럼의 적재를 위한 준비를 완료하였다.

### Maysin의 정제

농축된 옥수수 수염의 조추출물에 MeOH를 가해 용해시킨 후 적당량의 silicic acid를 넣고(silicic acid양은 경험적 양임) CH<sub>3</sub>CN을 가하여 농축하였다. 이때 농축관의 넘침현상을 방지하기 위하여 농축관의 회전속도를 낮게 조절하였고, 농축이 완료될 무렵에는 회전속도를 더욱 감소시키고 압력을 증가시켰으며 때때로 농축관을 가볍게 두들겨 줌으로서 silicic acid가 농축관 기벽에 달라붙지 않도록 하였다. 농축이 진행됨에 따라 조추출물은 진갈색~연노란색으로 변화되며 이때 적당량의 CH<sub>3</sub>CN을 첨가한 후 농축하여 조추출물의 silicic acid coating을 마쳤다. 조추출물의 정제를 위한 silicic acid 컬럼의 충진은 N<sub>2</sub>기류에서 methylene chloride 250 ml로 컬럼을 세척하여 충진물을 활성화한 후 silicic acid로 코팅된 maysin의 조추출물을 적재하였다. 그 후 methylene

chloride : ethyl acetate(50:50)의 용액 500 ml로 세척하여 남아있는 색소를 최종적으로 제거하였다. 그 후 100% ethyl acetate 500 ml로 컬럼에 흡착되어 있는 물질을 용출시켰으며 수거된 각 fraction을 HPLC로 확인하여 순도가 높은 fraction들을 혼합, 농축하였다. 그후 silicic acid 컬럼으로 조추출물의 1차 정제시 maysin 이외에도 다양한 불순물이 함유되어 있었기 때문에 C<sub>18</sub> 컬럼 ( $\frac{1}{2} \times 43''$ )으로 maysin을 2차 정제하였다.

#### FAB-MS 및 NMR에 의한 maysin의 구조 확인

분리한 maysin의 구조 해석을 위하여 FAB-MS(VG70-VSEQ VG Analytical, UK)에 의한 분자량의 측정과 핵 자기공명(Bruker DPX 400 MHz NMR, German)에 의한 구조의 확인은 분리된 maysin을 DMSO-d<sub>6</sub>에 용해하여 <sup>1</sup>H-NMR은 400 MHz에서 <sup>13</sup>C-NMR은 100 MHz로 측정하였다.

#### 결과 및考察

##### Preparative C<sub>18</sub> 컬럼에 의한 chlorogenic acid 및 maysin의 용출

Table 1은 0°C에 보관중인 시료를 농축 후 methylene chloride로 분액하여 엽록소 및 각종 지질계통의 화합물이 제거된 옥수수 수액의 조추출물을 preparative C<sub>18</sub> 컬럼에서 당 및 각종 수용성 물질을 제거시킨 후 10%로부터 40%까지 MeOH의 농도를 10%씩 증가시켜 가면서 조추출물을 용출시켰을 때 얻어진 결과를 나타낸 것이다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 10% MeOH로 용출된 물질은 neochlorogenic acid, chlorogenic acid 및 4-caffeoquinic acid로 확인되었다. Chlorogenic acid 계열의 물질은 tannin의 일종으로 caffeic acid 부분에 -OH기 2개를 가지는 polyphenol 물질로서 polyphenol oxidase에 의하여 갈변하기 쉬울 뿐만 아니라 항산화력도 매우 높으며 coffee의 맛의 주성분을 이루고 있

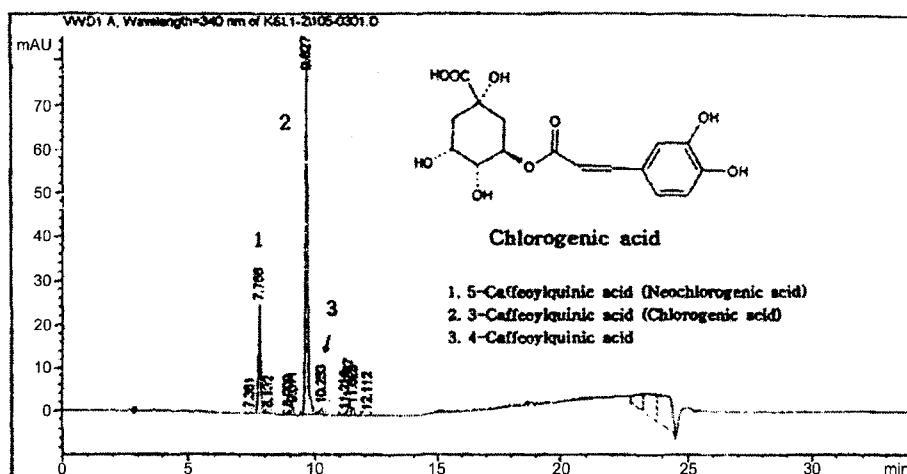


Fig. 1. Chlorogenic acid and related analogues eluted with 10% MeOH from preparative C<sub>18</sub> column.

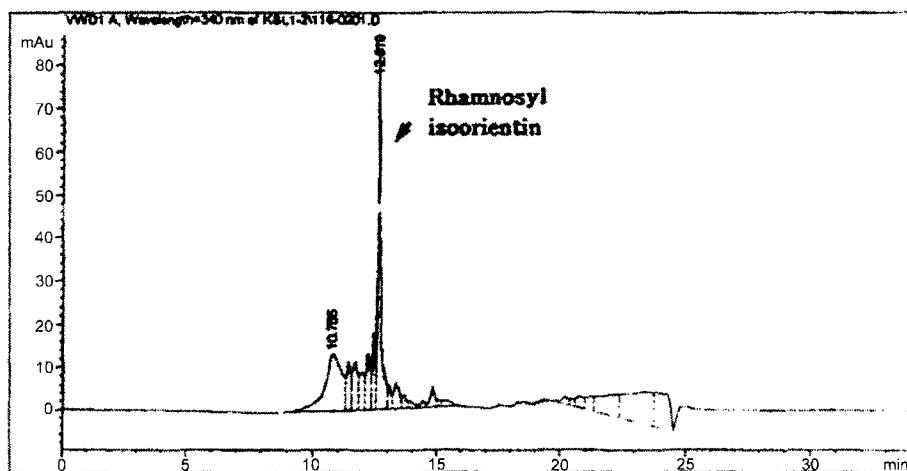


Fig. 2. Rhamnosyl isoorientin eluted with 30% MeOH from preparative C<sub>18</sub> column.

는 물질로 알려져 있다(이 등, 1993). 30% MeOH로 용출된 물질은 rhamnosyl isoorientin으로 확인되었는데(Fig. 2), isoorientin은 luteolin의 8-C-glucoside인 orientin의 일종인 isoflavanone으로 최근 들어 그 기능성이 주목되고 있는 물질이기도 하다. 50%의 MeOH로 컬럼에 흡착된 조추출물을 fraction당 250 ml씩 수거하여 HPLC로 확인하였을 때 maysin을 다량 함유하고 있는 fraction은 16, 17 및 18번 fraction 이었다.

### Maysin의 1차 정제

Preparative C<sub>18</sub> 컬럼에 의해 얻어진 maysin의 조추출물은

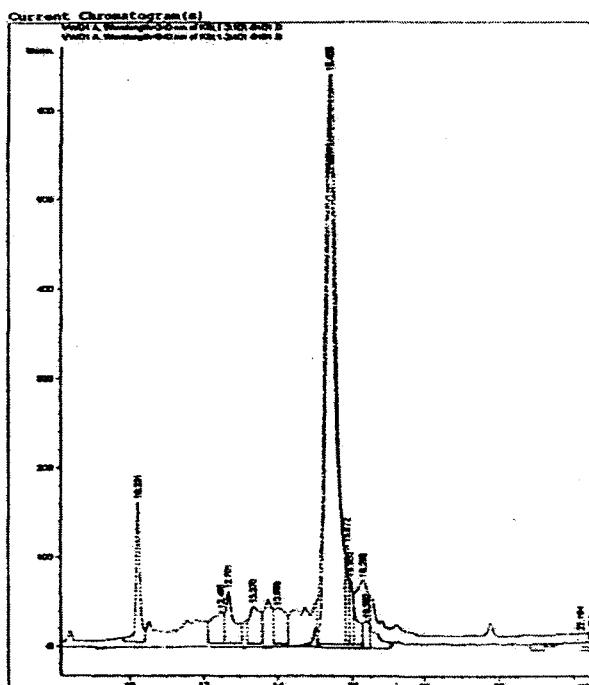


Fig. 3. The first purification of crude maysin with silicic acid column.

순도를 확인한 결과 다량의 불순물이 함유되어 있었기 때문에 maysin의 정제를 위해 조추출물을 silicic acid 컬럼에 적재하여 methylene chloride와 ethyl acetate(50:50, v/v) 용액으로 세척하여 남아있는 색소를 최종적으로 제거한 후 100% ethyl acetate로 column에 흡착되어 있는 maysin을 용출시켰다. Fig. 3은 silicic acid 컬럼에 의하여 1차 정제된 물질을 maysin의 표준물질과 비교한 HPLC chromatogram을 나타낸 것이다. Silicic acid 컬럼에 의하여 정제된 maysin(Fig. 3의 접선)의 순도는 최대 85% 수준에 달하였으나 표준물질(실선)에 비하여 미지의 물질들을 함유하고 있었으므로 수거된 fraction 중 maysin의 순도가 75% 이상 되는 fraction들을 혼합, 농축하여 2차 정제하였다.

### Maysin의 2차 정제

Fig. 4는 silicic acid 컬럼으로 조추출물의 1차 정제시 maysin 이외에도 다량의 불순물이 함유되어 있었기 때문에 C<sub>18</sub> 컬럼( $\frac{1}{2} \times 43''$ )으로 maysin을 2차 정제시켜 얻어진 결과를 나타낸 것으로 maysin의 표준물질과 비교하여 보았을 때 2차로 정제된 maysin의 순도는 95% 이상에 달함을 확인할 수 있었다.

### FAB-MS와 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR에 의한 maysin의 구조 확인

2차 정제로부터 얻어진 maysin의 화학구조 확인을 위하여 FAB-MS에 의한 분자량의 측정과(Fig. 5) <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR를 이용하여 spectrum(Fig. 6)을 얻고 이들의 aglycone 및 결합당의 탄소, 수소의 결합상태를 확인한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

FAB-MS에 의한 maysin의 분자량은 577M+H  $m/z$ 이고, fragmentation으로 보아 431M+H  $m/z$ 은 rhamnose에 해당됨을 알 수 있었다. NMR에 의한 maysin의 화학구조는 Elliger *et al.*(1980) 및 Snook *et al.*(1989)에 의하여 처음으로 구명된 바

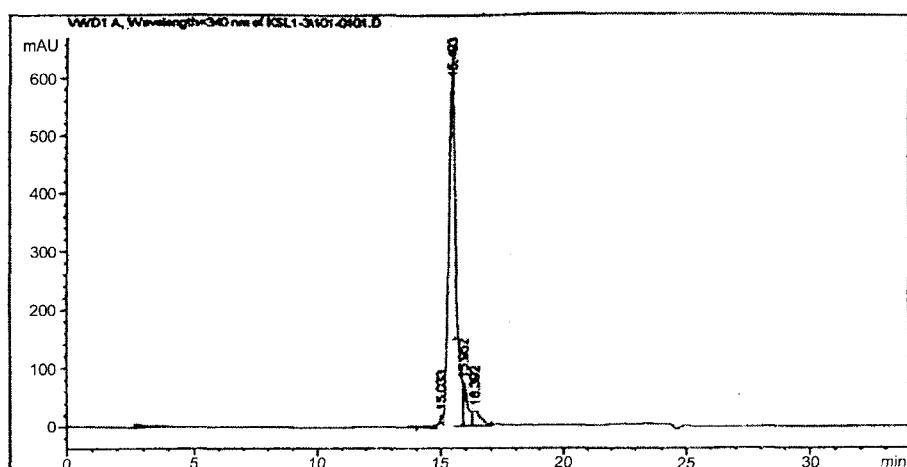


Fig. 4. The second purification of crude maysin with C<sub>18</sub> column ( $\frac{1}{2} \times 43''$ ).

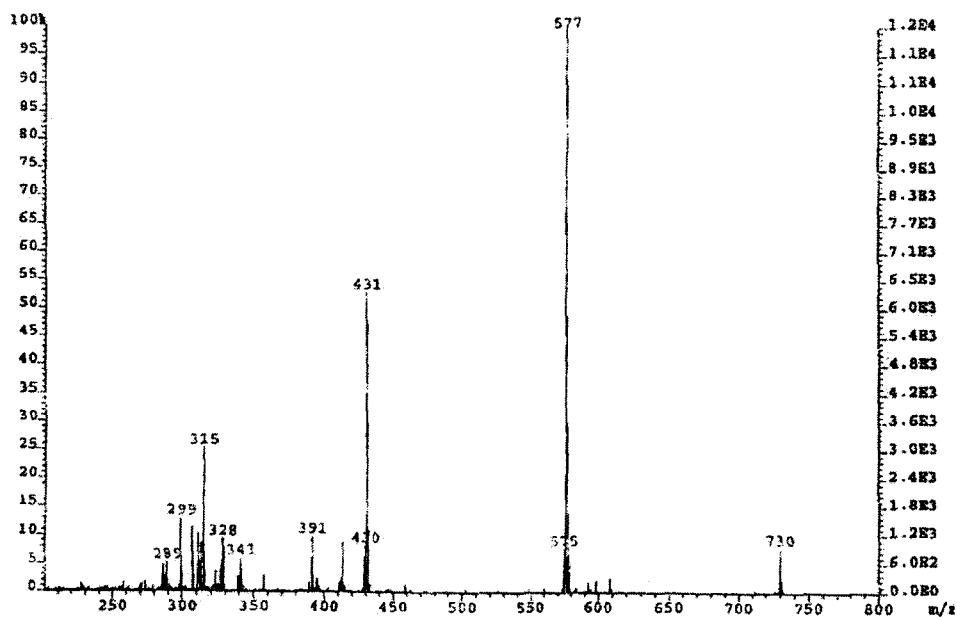
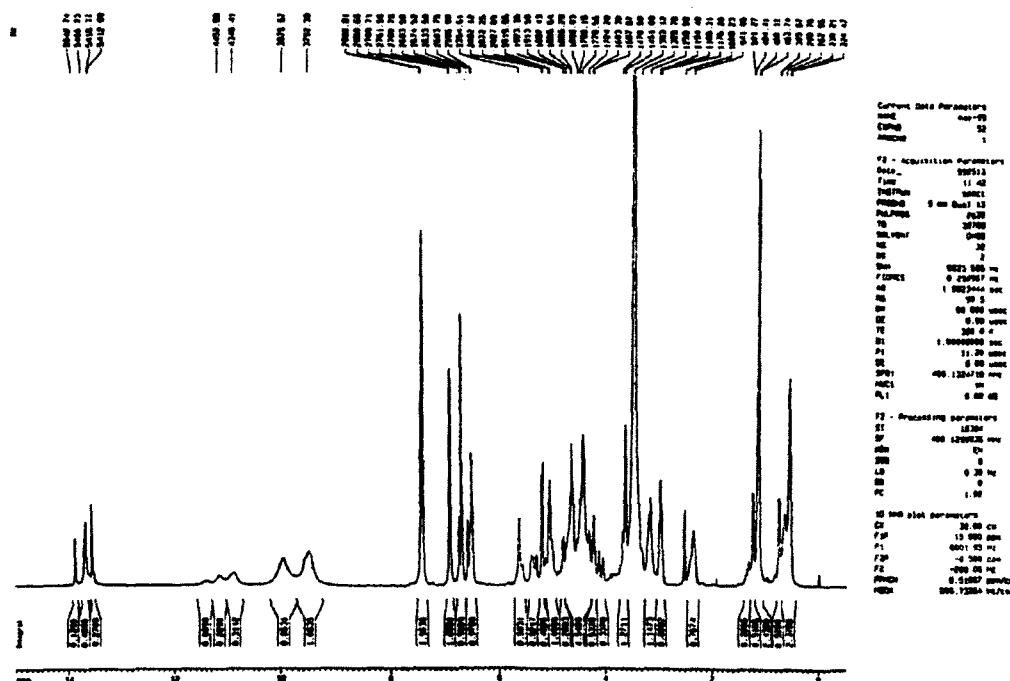
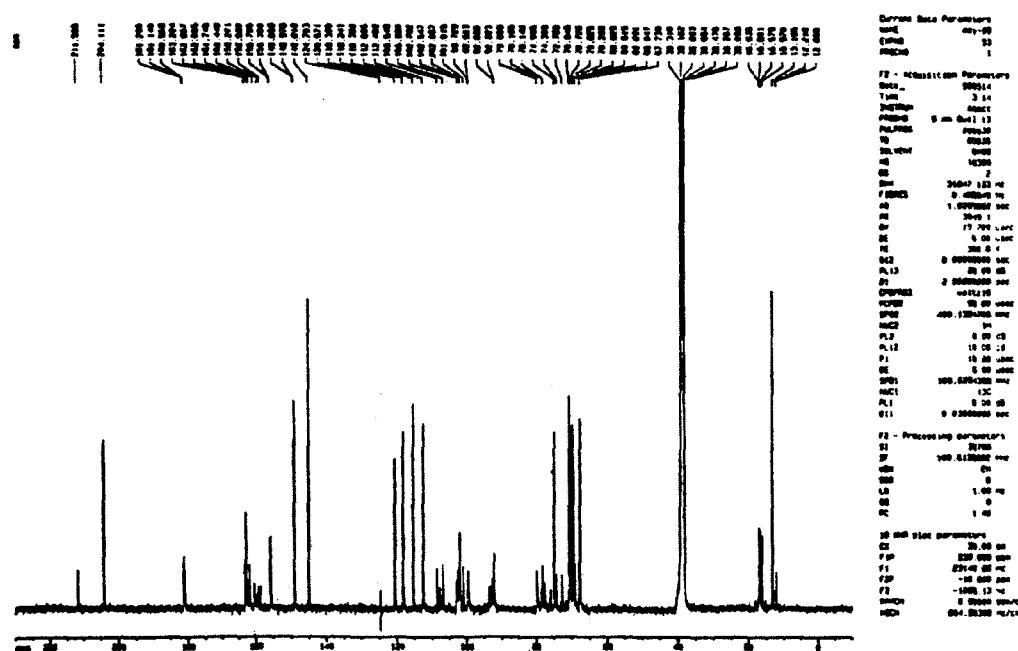


Fig. 5. FAB-MS spectrum of maysin isolated from corn silks.

Fig. 6.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of maysin in  $\text{DMSO}-d_6$ .

있으며, 그 후 Snook *et al.*(1993)에 의하여 maysin 및 그 유사 flavonoid에 해당하는 apimaysin과 3'-methoxymaysin이 새롭게 확인되었다.  $\text{C}_{18}$  컬럼에 의해 2차로 정제된 maysin을  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR에 의한 spectrum을 확인한 결과 Elliger *et al.*(1980) 및 Snook *et al.*(1989)에 의해 보고된 결과와 일치 되었으며, 본 시험에 의하여 옥수수 수염으로부터 maysin의

분리 및 정제는 매우 효율적인 방법임을 확인 할 수 있었다. Maysin의 화학구조는 Fig. 7에서와 같다. Maysin은 flavonoid aglycone 중 B환의 3"번 탄소 R이 OH로 치환된 것이고, maysin의 유사물질인 apimaysin은 R이 H로 치환된 것이며, 3'-methoxymaysin은 R이  $\text{OCH}_3$ 로 치환된 물질로서 maysin 및 그 유사물질들의 특이적 항생효과는 이들의 작용에 의해서



acid였으며 30% MeOH로 용출된 물질은 rhamnosyl isoordinatin이었고 maysin은 50%의 MeOH에서 용출되었다.

2. Silicic acid 컬럼으로 maysin 조추출물의 1차 정제시 100% ethyl acetate 500 ml로 컬럼에 흡착되어 있는 maysin을 용출시켰으며, 이때 수거된 maysin의 순도는 75% 이상에 해당하였고, C<sub>18</sub> 컬럼( $\frac{1}{2} \times 43''$ )으로 maysin의 2차 정제시 maysin의 순도는 95% 이상에 달하였다.

3. FAB-MS에 의한 maysin의 분자량은 577M+H  $m/z^{\circ}$ 이고, fragmentation으로 보아 431M+H  $m/z$ 은 rhamnose에 해당하였고, <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR에 의한 spectrum을 확인한 결과 분리한 물질이 maysin임을 확인할 수 있었다.

## 引用文獻

- Byrne, P. F., L. L. Darrah, K. B. Simpson, A. J. Keaster, B. D. Barry, and M.S. Zuber. 1989. Maize silk pH as an indicator of resistance to the corn ear worm (Lepidoptera : Nectuidae). *Environmental Entomology*. 18(3):356-360.
- Byrne, P. F., L. L. Darrah, K. B. Simpson, M. E. Snook, B. R. Wiseman, N.W. Widstrom, D.J. Moellenbeck, and B.D. Barry. 1996. Maize silk-browning, maysin content, and antibiosis to the corn earworm, Helicoverpa zea (Boddie). *Maydica*. 41:13-18.
- Byrne, P. F., M. D. McMullen, M.E. Snook, T. A. Musket, J. M. Theuri, N. W. Widstrom, B. R. Wiseman, and E. H. Coe. 1996. Quantitative trait loci and metabolic pathways : Genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:8820-8825.
- Elliger, C. A., B. G. Chan, and A. C. Waiss. 1980. C-Glycosylflavone from Zea mays that inhibit insect development. *Phytochemistry*. 19 :293-297.
- Gueldner, R. C., M. E. Snook, B. R. Wiseman, N. W. Widstrom, D. S. Himmelsbach, J.S. Harwood, and C. E. Costello. 1991. Maysin in corn, Teosinte, and Centipede grass. ACS Symposium series 449 (Chapter 16) *Am. Chem. Soc.* pp.251-263.
- 이성우, 김광수, 김순동 공저. 1993. 食品化學(三稿). 修學社.
- Richard, C. G., M. E. Snook, N. W. Widstrom, and B. R. Wiseman. 1992. TLC screen for maysin, chlorogenic acid, and other possible resistance factors to the fall armyworm and the corn earworm in Zea mays. *J. Agric. Food Chem*. 40:1211-1213.
- Snook, M. E., R. C. Gueldner, N. W. Widstrom, B. R. Wiseman, D.S. Himmelsbach, J.S. Harwood, and C.E. Costello. 1993. Levels of maysin and maysin analogues in silk of maize germplasm. *J. Agr. Food Chem*. 41(9):1481-1485.
- Snook, M. E., N. W. Widstrom and R. C. Gueldner. 1989. Reverse-phase high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of maysin in corn silks. *J. Chromatography*. 477: 439-447.
- Snook, M.E., N.W. Widstrom, Wiseman B.R., Byrne P.F., Harwood J.S., and Costello C.E. 1995. New C-4"-hydroxy derivatives of maysin and 3"-methoxymaysin isolated from corn silks (*Zea mays*). *J. Agr. Food Chem*. 43(10):2740-2745.
- Snook, M. E., N. W. Widstrom, Wiseman B. R., R. C. Gueldner, R. L. Wilson, D. S. Himmelsbach, J. S. Harwood, and C.E. Costello. 1994. New flavone C-glycosides from corn (*Zea mays L.*) for the control of the corn earthworm (*Helicoverpa zea*). ACS Symposium series 557 (Chapter 10) *Am. Chem. Soc.* pp.122-135.
- Waiss, A. C., B. G. Chan, C. A. Elliger, B. R. Wiseman, W. W. McMillian, N. W. Widstrom, M. S. Zuber, and A. J. Keaster. 1979. Maysin, a flavone glycosine from corn silk with antibiotic activity toward corn earworm. *J. Econ. Entomol.* 72:256-258.
- Walter, E. V. 1975. Corn earworm lethal factor of sweet corn *J. Econ. Entomol.* 50:105-106.
- Widstrom, N. W., M. E. Snook, W. W. McMillian, A. C. Waiss, and C. A. Elliger. 1991. Maize-silk maysine data; Comparison of interpretation of quantifications by spectrophotometry and HPLC. *J. Agric. Food Chem*. 39:182-184.
- Widstrom, N. W., M. E. Snook, and R. C. Gueldner. 1992. Relationship among silk browning, maysin and related silk constituents. *Ann. Plant Resis. Insect Newsletter* 18. p.31.
- Wiseman B. R., and M. E. Snook. 1995. Effect of corn silk age on flavone content and development of corn earworm (Lepidoptera : Nectuidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* 88(6):1795-1800.
- Wiseman B. R., and M. E. Snook. 1996. Flavone content of silks from commercial corn hybrids and growth responses of corn earworm (*Helicoverpa zea*) larvae fed silk diets. *J. Agric. Entomol.* 13(3): 231-241.
- Wiseman B. R., and M. E. Snook, N. W. Widstrom and D. J. Isenhour. 1993. Maysin content and growth of corn earworm larvae(Lepidoptera : Nectuidae) on silks from first and second ears of corn. *J. Econ. Entomol.* 86(3) : 939-944.
- Wiseman B. R., R. C. Gueldner, R. E. Lynch, and R. F. Severson. 1990. Biochemical activity of centipedegrass against fall armyworm larvae. *J. Chem. Ecol.* 16(9):2677-2690.