

갯(*Brassica juncea*)의 주 항균물질의 구조 분석

강 성 구

순천대학교 식품공학과

Structural Analysis of Major Antimicrobial Substance Obtained from Leaf Mustard (*Brassica juncea*)

Seong-Koo Kang

Dept. of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

A major component (compound A) in the ethylacetate fraction exhibited a strong antimicrobial activity was identified by UV, IR, FABMS and NMR. The compound A showed strong absorbance at 209, 259 and 359nm, indicating a flavonoid ring structure. IR spectrum possessed absorbance of OH at $3400\sim 3300\text{cm}^{-1}$, ketone at around 1650cm^{-1} , and aromatic C=C at around 1660cm^{-1} . Molecular weight of the compound A calculated as 478 from the information of m/z 479 (M+H)⁺ and m/z 477 (M-H)⁺ in the FABMS spectrum. Molecular formula of this compound was found to be C₂₂H₂₂O₁₂ from m/z 479.1220 (+3.1mmu for C₂₂H₂₃O₁₂) of HRFA-BMS spectrum and from ¹³C-NMR spectrum. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of the compound A revealed aromatic proton and benzene rings. Distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) exhibited that the compound A possessed 10 quaternary carbons and 3 substituted benzene rings including a methoxy group substitution. The compound A was identified as isorhamnetin -3-O-β-glucopyranoside by spectrophotometric methods in conjunction with ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY and HMBC, which revealed a flavone with OH group at 3, 5, 7, and 4' and methoxy group at 3' positions esterified to glucose.

Key words : leaf mustard (*Brassica juncea*), antimicrobial activity, structural analysis isorhamnetin-3-O-β-glucopyranoside

서 론

자연계에는 항균작용을 나타내는 물질이 많이 알려져 있고, 동·식물 또는 미생물에 있어서도 여러 가지 형태로 자기 방어 수단으로서 항균 기능을 갖추고 있다(1). 그러나 항균작용을 나타내는 천연물이 식품보존료로서 이용되기 위해서는 반드시 안전성과 경제성이 확보되어야 하는데, 식품의 경우에는 인간이 계속해서 섭취해 왔던 동·식물의 조직으로부터 항균성분을 추출해서 이용하는 것이 바람직하다고 본다(2). 이러한 측면에서 현재도 일상생활에서 많이 섭취해온 식품재료나 생약재로부터 천연 항균성 물질의 검색과 식품에의 이용에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 주로 향신료와 그 정유성분, 생약제의 항진균성 성분, chitin, chitosan, 미생물이 생성하는 항균물질에 대해 이루어지고 있다(3-9).

이러한 연구 결과 천연 항균성 물질과 그 기작이 서서히 밝혀지고 있는데 천연 항균성 물질은 식물이나 동물의 구성 성분으로 존재하거나 외부의 자극에 의하여 생체내에서 대항물질로 만들어지기도 하며 발효과정 중 생성된 화학물질이 다른 미생물의 성장을 저지하기도 한다(10). 대부분의 천연 항균성 물질은 동·식물 체내에 한 성분으로 함유된 경우가 많으며 단백질, 특정효소, 유기산, 식물의 정유 그리고 식물의 특정성분 등이 항균성을 나타내는 것으로 알려져지고 있다(11). 한편, flavonoid 화합물의 항균성에 관한 연구는 Payne 등(12)이 flavonoid tannic acid가 *Listeria monocytogenes*에 항균 활성이, Juven 등(13)은 green olive의 phenolic 배당화합물인 oleuropein이 *Lactobacillus plantarum*과 *Leuconostoc mesenteroides*에 대해서 항균력이 있다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 저자 등이 이미 전보(14)에서 천연보

종료 개발의 일환으로 옛부터 김치재료, 조미료 및 향신료 등으로 식품에 사용되고 있는 한국산 재래종 갯 (leaf mustard, *Brassica juncea*)으로 부터 에탄올 추출물을 용매분획하여 향균활성이 높았던 에틸아세테이트 분획물 중의 향균성 물질을 순수분리하여 향균작용을 검토한 결과에 이어 주 향균성 물질의 구조식을 밝히고 동정한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 재료는 전보 (14)에서 한국산 갯 (leaf mustard, *Brassica juncea*)의 에탄올 추출물을 용매계통 분획하여 얻은 에틸아세테이트 분획물을 silicagel column chromatography, TLC 및 HPLC를 이용하여 주 향균성 물질을 순수분리하여 얻은 순도 99% 이상의 단일 물질로 단정되는 미황색 결정 화합물 A를 사용하였다.

UV spectrum

단일물질로 순수분리된 향균성 물질 화합물 A를 순수 메탄올에 녹여 Cecil Model 592 spectrometer를 사용하여 UV spectrum을 측정하였다.

IR spectrum

향균성 물질 화합물 A(3mg 정도)의 고체시료와 건조한 KBr(약 100mg)과 함께 막자사발에서 마쇄하여 이 혼합물을 감압하에 유압기로 압축시켜 pellet으로 만들어 Perkin Elmer M-1330 spectrometer로 흡수 spectrum을 측정하였다.

NMR spectrum

향균성 물질 화합물 A를 tetramethylsilane (TMS) 내부표준 물질로 첨가하여 용매 CD₃OD에 녹인 다음 filtering하면서 NMR용 Tube에 넣고 JEOL JNM-EX 270 (270 MHz)를 이용하여 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY, HMBC (Heteronuclear multiple bond correlation) spectrum을 분석하였고 (15), chemical shift는 δ (ppm)로 표시하였다.

Fast atom bombardment (FAB) MS spectrum

향균성 물질 화합물 A의 분자량을 Hewlett Packard 5890 gas chromatograph, JEOL JMX-DX 302 Mass spectrometer, JEOL JMX-DA 5000 Mass data system으로 분석하였다.

결과 및 고찰

UV 흡수 spectrum에 의한 구조분석

미황색 결정으로 분리한 향균성 물질 화합물 A를 순수 메탄올에 녹여 190~400nm에서 UV 비색계에서 scanning한 결과, 메탄올에서 화합물 A의 흡수파장은 209, 259 및 359nm 부근에서 흡수피크를 나타내어 공액 (conjugation) 이중결합을 이룬 방향족 화합물과 C=O기의 존재가 예상되며, flavonoid계 화합물임을 추정할 수 있었다.

IR spectrum에 의한 구조분석

향균성 물질 화합물 A(3mg 정도)의 고체시료와 건조한 KBr(약 100mg)과 함께 충분히 갈아서 이 혼합물을 감압하에 유압기로 압축시켜 pellet으로 만들어 흡수대를 측정한 결과, 3350cm⁻¹ 부근의 흡수피크는 OH기의 존재를 시사하며, 2930cm⁻¹ 근처에서 C-H 흡수피크가, 1650cm⁻¹ 근처에서 ketone group (C=O)으로 예상되는 강한 흡수피크를 나타내었으며, 1600cm⁻¹ 부근에서 aromatic group의 C=C기가 존재함을 예상할 수 있었다.

NMR에 의한 구조분석

¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 DEPT spectrum

NMR에 의한 구조분석은 향균활성 물질 화합물 A를 tetramethylsilane (TMS)을 내부표준물질로 첨가하여 용매 CD₃OD에 녹여 270MHz NMR 기기 (JEOL JNM-EX 270)를 이용하여 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR을 측정한 결과, ¹H-NMR spectrum에서 δ 5.39 (J=7.25Hz)에 axial 방향의 anomeric proton peaks가 발견되는데 1'H와 2'H가 trans form을 취하고 있음을 알 수 있다. 왜냐하면 J(coupling constant)가 7.25Hz이기 때문이다. Cis form인 경우에는 J값이 0~3Hz(대개 3Hz 전후임) 정도로 나타나기 때문이다. 그리고 통상 doublet(d)으로 나타나는데 triplet을 보인 이유는 당부분의 conformation이 고정되어 있지 않고 용액 중에서 aglycon 부분들 등과의 상호작용에 의하여 약간씩 그 conformation에 변화를 받기 때문으로 생각된다. δ 3.2~3.8에서 단당의 존재가 확인되었고, δ 3.94에서 methoxyl기 (-OCH₃)의 존재가 발견되었으며, δ 6.1~6.3의 peaks는 이중결합을 하고 있는 탄소(C)에서 수소(H)가 없는 위치에 결합된 이중결합의 말단 수소에 의해 나타난 signal임을 알 수 있다. 그리고 δ 3.2~3.8의 일련의 signal 및 ¹³C-NMR의 δ 103.7 (aromatic carbon)과 δ 62.6~78.5의 6개의 signal들로부터

C-1를 제외한 $\delta 94.8 \sim 179.4$ 의 SP 탄소(15개)들로 부터 benzene환의 존재가 추정되었다.

그리고 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 spectrum에서 확인된 수소와 탄소의 수와 위치는 Table 1과 2에 나타났다. $\delta 6.90$ 와 $\delta 7.59$ 의 동일 coupling constant ($J=8.25\text{Hz}$) 및 $\delta 7.92$ ($J=1.65\text{Hz}$)의 작은 J 값으로 부터 $\delta 7.59$ 의 proton을 기준으로 각각 ortho위치와 meta위치에 수소가 결합된, 즉 3 치환 benzene 구조의 존재가 강하게 시사되었다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 에서 $\delta 3.9$ 의 3H분의 signal과 $^{13}\text{C-NMR}$ 상의 $\delta 56.8$ 의 signal로 부터 benzene환에 결합한 methoxyl기의 존재가 시사되었다.

또한 NMR측정 puls를 가하는 방법을 조정하여 carbon spectrum에서 peak가 primary(1급탄소), secondary(2급탄소), tertiary(3급탄소), quaternary(4급탄소)중 어느 것인지를 구분할 수 있는 측정방법 (distorsionless enhancement by polarization transfer, DEPT), 즉 수소가

Table 1. $^1\text{H-NMR}$ chemical shift multiplicity of compound A isolated and purified from *Brassica juncea*

	Chemical shift δ (ppm)	Multiplicity (Hz)
H-6	6.19	s.
H-8	6.39	s.
H-2'	7.92	s.
H-5'	6.90	d(8.25)
H-6'	7.59	d(8.25)
H-1''	5.41	d(7.25)
H-2''	3.44	s.
H-3''	3.24	s.
H-4''	0.21	s.
H-5''	3.45	d(3.24)
H-6''	3.52	dd(4.94, 4.94)
H-6''	3.70	dd(2.31, 1.65)
CH ₃ -O-	3.94	s.

Table 2. $^{13}\text{C-NMR}$ chemical shift multiplicity of compound A isolated and purified from *Brassica juncea*

Carbon	Chemical shift δ (ppm)	Carbon	Chemical shift δ (ppm)
C-2	158.54	C-3'	150.90
3	135.38	4'	148.46
4	179.45	5'	116.04
5	163.16	6'	23.87
6	99.99	C-1''	103.73
7	166.25	2''	75.97
8	94.82	3''	78.57
9	158.68	4''	71.53
10	105.78	5''	78.13
C-1'	23.61	6''	62.60
C-2'	114.44	CH ₃ -O-	56.83

3개(CH₃, methyl), 2개(CH₂, methylene), 1개(CH, methylene)씩이 결합된 각종 탄소들을 구분하는 수단을 이용하여 보다 정확한 탄소의 종류를 측정할 결과, $\delta 105.7$, 123.1 , 135.3 , 148.4 , 150.9 , 158.5 , 158.6 , 163.1 , 166.2 및 179.4 의 10개 탄소들이 4차 탄소임을 확인하였다.

$^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY와 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ COSY spectrum

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 및 DEPT에 의해 얻어진 정보를 기초로 화합물 A에 대한 보다 정확한 구조 결정을 위하여 바로 옆탄소에 존재하는 수소와의 연결을 확인하는 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 측정방법과 $^1\text{H-NMR}$ spectrum과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에 의해 수소가 결합된 탄소가 존재하면 그들은 서로 cross peak를 나타내는 것을 이용하는 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ COSY 측정방법을 이용한 2차원 NMR의 측정 결과(Fig. 1, 2), $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY와 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ COSY의 결과로 부터 당 부분의 연속된 수소의 연결을 확인하였으며, $^1\text{H-NMR}$ 의 결과로 부터 예상된 3치환 benzene 중 C-2', 5', 6'의 탄소가 H와 결합되어 있음을 확인하였다. 그리고 $\delta 6.19$ 와 $\delta 6.39$ 의 proton이 또 다른 benzene 환의 2H분의 signal에 상당함과 함께 그들이 각각 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 $\delta 99.9$ 와 $\delta 94.8$ 의 탄소들과 결합함을 알 수 있었다.

HMBC spectrum

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 및 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ COSY 측정방법에 이어 HMBC(Heteronuclear multiple bond correlation)를 이용한 2차원 NMR의 측정 결과

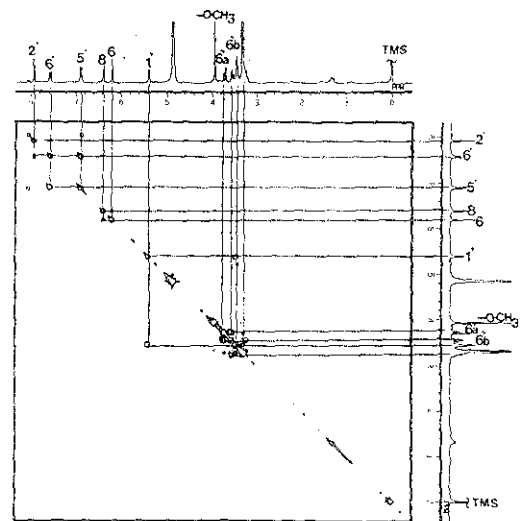


Fig. 1. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum of compound A isolated and purified from *Brassica juncea*.

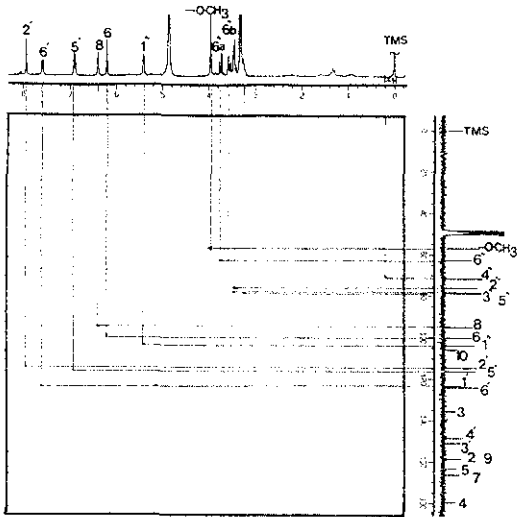


Fig. 2. ¹³C-¹H COSY spectrum of compound A isolated and purified from *Brassica juncea*.

(Fig. 3), methoxyl기의 proton으로부터 δ150.9에만 cross peak가 나타나 δ150.9의 탄소에 methoxyl기가 결합하고 있음을 확인하였으며, 당의 anomeric proton으로부터 δ135.3의 탄소와 ester결합하고 있음을 알았다. 또한 δ7.59의 proton으로부터 δ148.4, 114.4의 탄소, δ6.90의 proton으로부터 δ123.1, 150.9의 탄소, δ7.92의 proton으로부터 δ158.6 또는 158.5의 탄소 및 δ7.92와 δ7.59의 proton으로부터 δ158.6 또는 158.5의 탄소가 각각 cross peak들을 보였으며, δ150.9의 탄소에 대하여 δ7.92, 6.90 proton에 해당하는 cross peak는 존재하였으나 δ7.59의 proton에 해당하는 cross peak는 존재하지 않았다. 그리고 δ6.39의 proton으로부터 δ158.6(또는 δ158.5), 99.9, 166.2, 179.4의 탄소와 cross peak, δ6.196의 proton으로부터 δ166.2, 163.1, 94.8의 탄소와 cross peak의 존재를 나타내었다.

FAB-Mass에 의한 구조분석

항균성 물질 화합물 A의 분자량을 알아보고 보다 자세한 구조분석을 위해 FAB-MS로 fragmentation patterns을 조사한 결과, (Positive) m/z 479[M+H]⁺, (Negative) m/z 477[M-H]⁻의 이온 피크로부터 화합물 A의 분자량은 478로 추정되었으며, (Pos.) m/z 479[M+H]⁺로부터 glucose 한분자가 떨어진 fragment인 m/z 301, methoxy기(-OCH₃)를 갖는 benzene group의 fragment인 m/z 123 그리고 m/z 123에서 CH₃가 제거된 fragment인 m/z 107의 이온 피크를 보였으며, (Neg.) m/z 477[M-H]⁻로부터 물 한분자(H₂O)가 떨어져 나간 fragment인

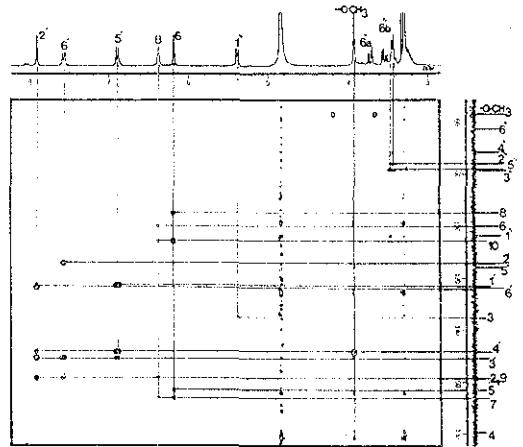
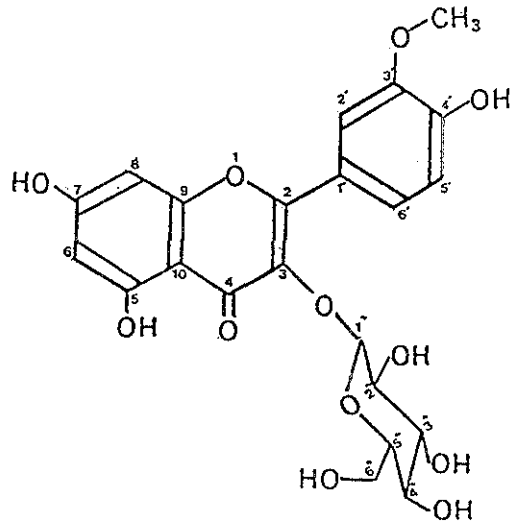


Fig. 3. HMBC spectrum of compound A isolated and purified from *Brassica juncea*.

m/z 459, methoxy기 (-OCH₃)가 제거된 fragment인 m/z 447의 이온 피크를 보여주었다. 또한 결정된 분자량으로 구조식을 결정해주는 high resolution (HR)FABMS에 의한 측정에서 결정된 m/z 479.1220 (+3.1 mmu, C₂₂H₂₃O₁₂), ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum으로부터 분자식을 C₂₂H₂₂O₁₂로 결정하였다.

화합물 A의 구조결정

이상에서 나타낸 UV, IR, HMBC의 결과들과 각종 NMR 및 HRFABMS의 결과들을 종합해 볼 때 화합물 A의 분자량은 478, 분자식은 C₂₂H₂₂O₁₂이며, 구조식은



isorhamnetin 3-O-β-glucopyranoside

Fig. 4. Chemical structure of the compound A isolated and purified from *Brassica juncea*.

Fig. 4에 나타낸 바와 같다. 즉, 3, 5, 7, 4'위에 OH기가 결합되어 있으며, 3'위치에 -OCH₃가 결합된 flavone의 aglycon과 3'위치에서 glucose와 ester 결합한 isorhamnetin 3-O-β-glucopyranoside로 그 구조를 동정하였다.

요 약

갯(*Brassica juncea*)의 에틸아세테이트 분획물 중 주항균성 물질로 순수분리된 화합물 A를 각종 기기분석을 통하여 그 구조식을 밝히고 동정하였다. 항균성 물질인 화합물 A는 메탄올 용매에서 209, 259 및 359nm의 UV 흡광도를 보여서 flavonoid계 화합물의 흡수특성을 나타내었다. IR spectrum에서 3400~3300cm⁻¹ 사이에서 OH, 1650cm⁻¹부근에서 ketone(C=O), 1600cm⁻¹ 부근에서 aromatic(C=C)의 흡수 peak를 볼 수 있었다. FABMS spectrum에서 m/z 479 [M+H]⁺(Pos.), m/z 477 [M-H]⁻(Neg.)로 부터 분자량 478, HRFABMS m/z 479.1220(+3.1mmu ; C₂₂H₂₃O₁₂)과 ¹³C-NMR spectrum(67.8 MHz, CD₃OD)으로 부터 분자식을 C₂₂H₂₂O₁₂로 결정하였다. ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum에서 anomeric proton과 benzene환의 존재가 확인 되었으며, DEPT(distortionless enhancement by polarization transfer) 측정 에 의하여 10개의 탄소가 4차 탄소임을 확인하였다. 또한 3차환 benzene 구조가 존재하며 benzene환에 결합한 methoxyl기의 존재가 시사되었다. 이상에서 나타낸 결과들과 ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY 및 HMBC를 이용한 2차원 NMR의 측정된 결과들을 종합한 결과 화합물 A는 3, 5, 7, 4'위치에 OH기가 결합되었고, 3'위치에 -OCH₃가 결합된 flavone을 aglycon으로 한 3'위치에 당과 ester 결합한 isorhamnetin-3-O-β-glucopyranoside로 그 구조를 동정하였다.

문 헌

1. 野崎一彦 : 天然物による食品の保存の現状と効果. 月刊フodケミカル, 2, 45(1986)
2. 成瀬治己, 庄司 禎 : 現状における抗菌性物質とその應用. 月刊フodケミカル, 4, 53(1984)
3. Sato, A., Terao, M. and Honma, Y. : Antibacterial action of garlic extract on food poisoning bacteria. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 31, 328(1990)
4. Kawamura, J. and Takeo, T. : Antibacterial activity of tea catechin to *Streptococcus mutans*. *J. Japanese Soc. Food Sci. Tech.*, 36, 463(1989)
5. 仁科淳良 : 孟宗竹抽出物の抗菌活性. 月刊フodケミカル, 4, 53(1990)
6. 太田静行 : 抗菌・抗酸化物質の檢索と應用. 月刊フodケミカル, 2, 48(1990)
7. Kurita, N. and Koike, S. : Synergistic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oil components. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 159(1982)
8. 이홍용, 김치경, 성태경, 문택규, 임치주 : 유백피 추출물의 항세균 작용. 산업미생물학회지, 20, 1(1992)
9. 이병완, 신동화 : 식품부패미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성 물질의 검색. 한국식품과학회지, 23, 200(1991)
10. Ames, B. N., Magaw, R. and Gold, L. S. : Ranking possible carcinogenic hazards. *Science*, 236, 271(1987)
11. Beuchat, L. R. and Golden, D. A. : Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.*, 43, 134(1989)
12. Payne, K. D., Rico-Munoz, E. and Davidson, P. M. : The antimicrobial activity of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* and their effectiveness in a model milk system. *J. Food Prot.*, 52, 151(1989)
13. Juven, B., Henis, Y. and Jacoby, B. : Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. *J. Appl. Bacteriol.*, 35, 559(1972)
14. 강성구 : 갯(*Brassica juncea*)의 항균물질의 분리 및 항균성. 한국영양식량학회지, 24, 695(1995)
15. 荒木峻, 益子洋一郎, 山本修 : 有機化合物のスペクトルによる同定法(第5版)-MS, IR, NMR, UVの併用-. 東京化學同人, p.241(1992)

(1995년 6월 15일 접수)