

두릅에서 항미생물활성을 갖는 4-hydroxycinnamic acid의 분리 및 동정

마승진¹ · 국주희¹ · 고병섭² · 박근형^{1*}

¹전남대학교 식품공학과, ²한국한의학연구소

초록 : (1996년 4월 17일 접수, 1996년 7월 4일 수리).

서 론

미생물의 증식을 억제시키는 항균제로 주로 인공합성품이 사용되고 있으나, 경우에 따라 그 안전성이 문제로 제기되고 있어^{1,2)} 안전성에 문제가 없는 천연의 항미생물 활성물질의 개발이 요구되고 있다.³⁾

식물체에는 매우 다양한 유용성분이 함유되어 있으며 이러한 식물자원에서 항미생물 활성물질을 찾으려는 시도가 계속되어 왔으나 우리나라에서 자생하고 있는 식물을 대상으로 한 연구는 빈약한 실정이다.

두릅나무(*Aralia elata* SEEMANN)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 낙엽관목으로 전국 산지에 자생하며 새순을 채취하여 나물로 식용하고, 한방에서는 뿌리, 과실, 수피 등을 당뇨병, 신장병, 급성간염, 류마치스성 관절염, 위암, 위장장애 등에 사용한다.^{4,5)} 두릅나무에 관한 연구는 혈당강화작용, 당뇨병 및 위염, 위궤양의 치료 등의 약리학적 측면에서 주로 수행^{6,7)}되어 왔을 뿐 항미생물 활성물질에 대한 연구는 없는 상태이었다.

이에 우리나라 자생식물에 함유된 항미생물 활성물질을 식품보존제 및 유용항균제로 이용하기 위한 연구의 일환으로 두릅나무껍질의 항미생물 활성물질의 존재를 확인하고, 활성물질의 분리를 시도한 결과, 극성과 함량이 다른 3종의 활성물질이 존재함을 발견하고 이 중에서 3,4-dihydroxybenzoic acid와 3,4-dihydroxycinnamic acid를 활성분체로 보고한 바 있다.^{8,9)}

본 연구에서는 극성이 가장 낮은 또 다른 활성성분을 분리하여 이를 구명하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 두릅나무(*Aralia elata* SEEMANN)의 껍질은 전라남도 장성군 북하면 입암산에서 자라고 있는 2~5년생 두릅나무에서 3월 하순에 채취하여 실온에서 건조한 후 사용하였다.

활성물질의 정제 및 분리

활성물질의 추출과 정제는 전보⁸⁾의 방법에 의하였다. 즉, 두릅나무껍질의 MeOH추출물을 *Staphylococcus aureus*(ATCC 5638)를 대상으로 한 생물검정법¹⁰⁾을 지표로 하여 solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, silica gel partition column chromatography, HPLC 등으로 분리, 정제하였다.

시료의 최종 정제는 1% acetic acid-MeOH(60 : 40, v/v) 용매계로 Delta-PAK C₁₈ column(1.9×30.0 cm)과 μBondapak C₁₈ column(0.3×30.0 cm)의 HPLC를 이용하여 각각 분당 9 ml와 1 ml로 용출(Model 510 solvent delivery system, Waters)하였으며, 검출은 UV detector(290 nm, Model 486 tunable absorbance detector, Waters)를 이용하였다.

활성물질의 구조확인

분리된 활성물질의 구조확인을 위하여 mass spectrometry(MS)와 nuclear magnetic resonance spectroscopy(NMR)을 행하였다. 즉 MS는 Jeol JMS-AX 505 WA mass spectrometer를 사용하여 EI(70 eV), ion source temperature 200°C의 조건에서 direct probe 방식으로 분석하였다.

NMR은 Varian Unity Plus-300 (300 MHz) FT-NMR을 사용하여 분석하였고 용매는 CD₃OD를 사용하였으며 내부표준물질로 tetramethylsilane(TMS)를 사용하였다.

결과 및 고찰

활성물질의 분리

두릅나무껍질 366 g(수분함량 8.2%)의 항균활성이 확인된 MeOH추출물을 *S. aureus*를 대상으로 한 생물검정법을 지표로, 흡착과 분배의 silica gel chromatography 그리고 gel filtration과 HPLC에 의해 정제한 뒤 acetic acid-MeOH 용매계를 이용한 reverse phase column(Delta-PAK C₁₈)의 HPLC를 실시한 결과 retention time(*t_R*)

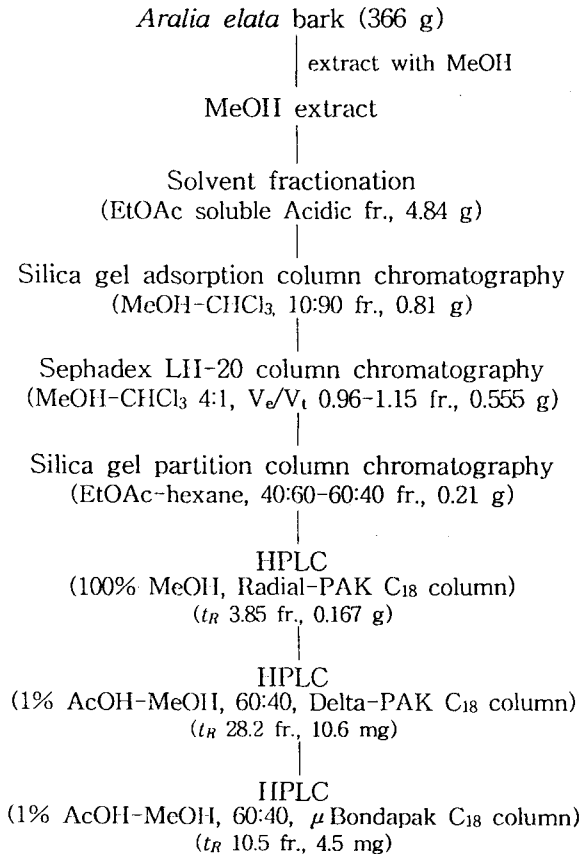
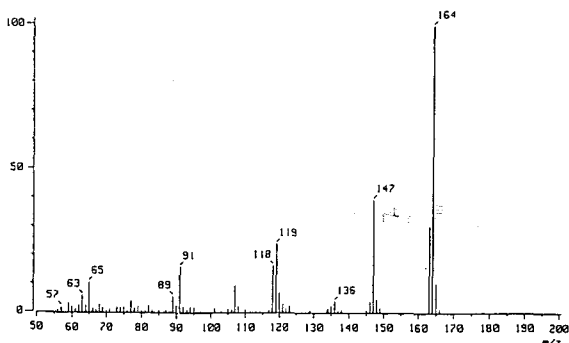
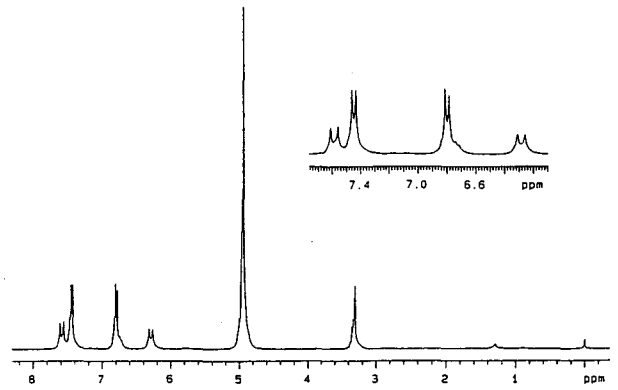
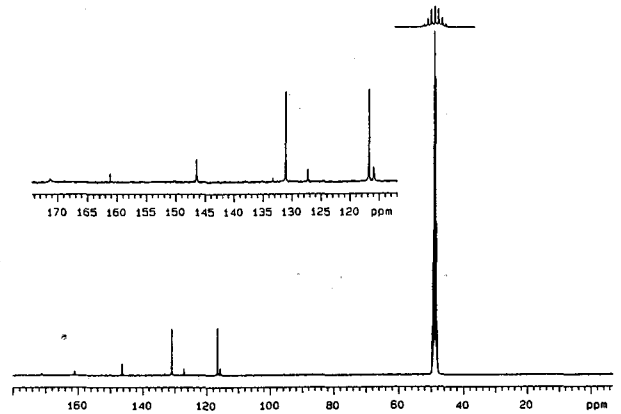
찾는말 : *Aralia elata*, antimicrobial activity, 4-hydroxycinnamic acid

*연락처

Table 1. Antimicrobial activity of the isolated substance from *Aralia elata* against *Staphylococcus aureus*.

microorganism	Clear zone (mm)			
	0.5 mg ¹⁾	1.0 mg ¹⁾	2.0 mg ¹⁾	Benzoic acid ²⁾
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 5638)	10	12	16	13

¹⁾mg/disc of isolated substance from *Aralia elata* ²⁾1.0 mg/disc of Benzoic acid

Fig. 1. Isolation procedure of antimicrobial active substance from *Aralia elata*.Fig. 2. Direct EI-mass spectrum of active substance from *Aralia elata*. The spectrum of recorded on Jeol JMS-AX 505 WA mass spectrometer operating at direct probe method, ionization in EI(70 eV), ion source temperature 200°C.Fig. 3. ¹H-NMR spectrum of active substance from *Aralia elata*. The spectrum of recorded on Varian Unity Plus-300 FT-NMR spectroscopy used in CD₃OD.Fig. 4. ¹³C-NMR spectrum of active substance from *Aralia elata*. The spectrum of recorded on Varian Unity Plus-300 FT-NMR spectroscopy used in CD₃OD.

28.2분에 peak를 나타내 분리가 이루어졌다. 이 물질을 다시 μBondapak C₁₈ column의 HPLC를 실시한 결과 t_R 10.5분에 peak를 보였으며, 이 화분을 농축하였더니 백색의 결정상 물질로 분리되었다. 이 물질의 *S. aureus*에 대한 항미생물활성을 Table 1에 나타냈다. 또한, 이 활성물질의 분리과정과 각 과정에서 얻어진 활성화분의 함량을 Fig. 1에 나타냈다.

분리된 물질의 구조확인

HPLC에 의해 결정상으로 분리된 활성물질을 direct probe방식의 electron impact(EI) mass분석을 한 결과 Fig. 2와 같이 molecular ion(M⁺)이 m/z 164에 base peak로 나타났으며, 특징적인 fragment ion이 m/z 147, 136, 119, 91에 나타났다. 이 spectrum으로 NIST library 검색을 실시한 결과, 4-hydroxycinnamic acid의 가능성(NIST entry No. 11233)이 시사되었으며 이 spectrum은 John Wiley & Sons mass spectral data의 4-hydroxycinnamic acid spectrum(John Wiley & Sons entry No. AD-5033)과 일치하였다.

이어서 ¹H-NMR분석을 실시한 결과 Fig. 3과 같이 δ

6.28(1H, d, J=15.75 Hz, H-2'), 6.77(2H, d, J=8.42 Hz, H-3,5), 7.51(2H, d, J=8.42 Hz, H-2,6), 7.59(1H, d, J=15.75 Hz, H-1')에서 proton이 관찰되어 2개의 benzene ring proton(δ 6.77, 7.51)과 2개의 olefinic proton(δ 6.28, 7.59)이 인정되었다. 또한, δ 6.28 및 7.59에서 관찰되는 olefinic signal은 coupling constant가 15.75 Hz인 사실에서 trans임을 확인하였다.

한편, ^{13}C -NMR분석을 실시한 결과 Fig. 4와 같이 δ 171.34(C-3'), 161.12(C-4), 146.43(C-2'), 131.04(C-3,5), 127.27(C-1), 116.77(C-2,6), 115.91(C-1')에서 signal이 관찰되었으며 이것은 Aldrich library spectra의 4-hydroxycinnamic acid(2, 1051 C)와 일치하였다.

이상의 결과에서 두릅나무 껍질로부터 분리된 항미생물 활성물질은 trans-4-hydroxycinnamic acid로 동정되었다.

감사의 말

본 연구는 농업생물신소재연구센터의 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 연구센터와 과학재단당국에 감사드립니다.

참고 문헌

1. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이웅호 (1994) 수산미이용자원 중에 존재하는 항균성 물질의 검색. 한국식품과학회지 **26**, 261-265.
2. 신동화 (1990) 천연 항균성 물질의 연구현황과 식품가공에의 이용. 식품과학과 산업 **23**, 68-77.
3. 김선재, 박근형 (1995) 식물성 김치재료 추출물의 항미생물 효과. 한국식품과학회지 **27**, 216-220.
4. 육창수 (1981) 한국약품식물자원도감, p.272, 진명출판사, 서울.
5. 이창복 (1985) 대한식물도감, p.575, 향문사, 서울.
6. 이은방, 김옥경 (1993) 두릅나무 근피의 혈당강하 성분에 관한 연구. 생약학회지 **24**, 213-218.
7. 이은방, 정춘식 (1993) 두릅나무 근피 추출물의 약물학적 연구. 약학회지 **37**, 581-590.
8. 마승진, 고병섭, 박근형 (1995) 두릅수피에서 항미생물활성을 갖는 3,4-dihydroxybenzoic acid의 분리. 한국식품과학회지 **27**, 807-812.
9. 마승진, 국주희, 고병섭, 박근형 (1995) Isolation of antimicrobial active substance from bark of *Aralia elata*. 한국식품과학회 제 55차 학술발표회, p.58.
10. Zaika, L. L. (1988) Spices and herbs. Their antimicrobial activity and it's determination. *J. Food Safety* **9**, 97-118.

Isolation and Characterization of 4-hydroxycinnamic Acid with Antimicrobial Activity from *Aralia elata*

Seung-Jin Ma¹, Ju-Hee Kuk¹, Byoung-Seob Ko² and Keun-Hyung Park^{1*} (¹Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, 500-757, Korea; ²Korea Institute of Oriental Medicine, 135-100, Korea)

Abstract: The methanol extracts of *Aralia elata* showed antimicrobial activity against bacteria. The antimicrobial active principle was successively purified with solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, silica gel partition column chromatography and HPLC. The active substance was isolated by HPLC on C₁₈ column with an acetic acid-MeOH system. The active substance was identified as trans-4-hydroxycinnamic acid by MS, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR.

*Corresponding author