

청겨자채 추출물의 뇌조직 내 Oxidative Stress 억제활성물질의 동정

이근종 · 김미리* · 심재석** · 황재관†

연세대학교 생물산업소재연구센터

*충남대학교 식품영양학과

**연세대학교 생물소재공학과

Isolation and Identification of the Active Compounds from Green Mustard Leaves against Oxidative Stress in Bovine Brain Tissue

Kun-Jong Lee, Mee Ree Kim*, Jae-Seok Shim** and Jae-Kwan Hwang†

Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

**Dept. of Biomaterials Science and Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract

Green mustard leaves were found to effectively prevent lipid peroxidation of bovine-brain tissue by ascorbate/Fe³⁺ system. The 50% methanol extracts of mustard leaves were separated into four solvent fraction using n-hexane, EtOAc, n-BuOH and water. The n-BuOH fraction exclusively exhibited the antioxidative activities at concentration above 100 µg/mL. The n-BuOH fraction was further isolated to a single compound using TLC analysis and silica gel chromatography. The active antioxidative compounds were identified as sinapic acid methyl ester and ferulic acid methyl ester by ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The sinapic acid methyl ester and ferulic acid methyl ester were prepared by methylating of sinapic acid and ferulic acid with diazomethane. The results strongly suggested that sinapic acid and ferulic acid could be employed as a potential antioxidative agents for preventing the bovine brain lipid peroxidation.

Key words: green mustard leaves, bovine brain tissue, lipid peroxidation, sinapic acid methyl ester, ferulic acid methyl ester, diazomethane

서 론

산소라디칼은 지질, 단백질과 같은 생체분자에 산화적 손상을 초래하는 것으로 보고되어 왔다(1,2). 그 결과, 암, 심장혈관계 질환, 뇌 질환 및 노화를 일으킨다. 이러한 hydroxyl radicals (\cdot OH)은 반응성이 크므로 인접한 생체분자의 손상을 입혀서 결국에는 정상적인 세포까지도 사멸시킨다(3). Iron-catalyzed Haber-Weiss 반응과 Fenton 반응으로 superoxide radicals이 형성되고 hydrogen peroxide(H₂O₂)는 Fe²⁺와 작용하여 hydroxyl radical을 생성한다(4,5). 그런데 Zhao 등(6-10)은 일부 천연 화합물들을 이용하여 체내에서 과도하게 생성된 산소라디칼을 효율적으로 소거시킴으로써 질병을 예방할 수 있다고 보고하였다.

최근 기능성 식품이나 음료로 이용되는 채소로 여러 가지가 있으나 십자화과(Cruciferous family)에 속하는 채소들이 항(발)암효과가 크다고 보고(11)됨에 따라 이들 채소의 생리활성 효과에 대해서 관심이 증가하고 있다(12). 따라서 항암

및 항돌연변이 효과를 가지는 녹색채소를 섭취하고자 하는 인구가 늘어나고 있다. 이미 약재나 식품의 생리활성과 항산화 활성에 관한 국내외 연구가 많이 있는데(6-13), 이 중 겨자와 갓에 관한 연구로는 Chung 등(8,9,13)과 Han 등(10)의 보고가 있다. 갓과 겨자(*Brassica juncea*)는 십자화과에 속하는 동종 식물의 사용부위에 따른 이름이며 갓은 열경 채소류 중의 하나로 독특한 맛과 향을 가지고 있어서 배추김치의 양념재료로 사용하거나 갓김치의 재료로 사용하므로 그 소비량이 늘어나고 있다. 근래에 국내 돌산갓의 여러 가지 화학적 성분 분석결과 및 myrosinase의 정제가 보고되었다(14). 갓에 존재하는 독특한 성분으로는 매운맛을 내는 sinigrin이라는 allylthiocyanate의 glucosinolate를 비롯하여 여러 가지 함황화합물이 있으며 이들은 배당체로부터 갓 자체의 myrosinase 작용에 의해서 isothiocyanate를 생성한다(15).

이 외에도 함황화합물 중에는 반응성이 크며 항균성, 항곰팡이성, 항혈액응고성에 효과를 나타내는 생리활성물질이 많은 것으로 보고되었다(16,17). 이와 유사한 고추냉이(*Was-*

†Corresponding author. E-mail: jkhwang@yonsei.ac.kr
Phone: 82-2-2123-3596. Fax: 82-2-312-6821

abia japonica)의 휘발성 함황화합물인 allyl, 3-butenyl, n-hexyl 및 β -phenylethyl isothiocyanate 등이 항균, 항암, 항염 증성 특성을 나타낸다고 보고되었다(17). 한편, 국내산 고추냉이 잎(*Wasabia japonica*)의 diethyl ether 추출물에서 위암의 원인균으로 알려진 *Helicobacter pylori*에 대한 3가지 균주의 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)에서 효과가 있다고 보고된 바 있다(18). 최근에는 갖의 methanol(MeOH) 추출물을 n-hexane, ethylacetate(EtOAc) butanol(n-BuOH), H₂O순으로 순차적으로 용매분획하였을 때 n-BuOH 층에서 flavonol diglucoside인 isorhamnetin-3,7-diglucoside의 존재가 보고되었다(19). 갖의 간조직에 대한 *in vivo* 실험에서 관련 항산화 성분이 sinapine이라고 보고되었다(10). 그러나, 뇌조직의 항산화 활성에 관한 연구는 매우 부진하다.

청겨자채(green mustard leaves)는 중앙 아시아가 원산지이며 흔히 한국인의 식탁에서 쌈으로 생식하는 채소이다. 이것도 갖의 일종이나 항산화 효과가 거의 보고된 바 없으며 다만, 마우스 뇌조직에서 N-methyl D-aspartate(NMDA)에 의해서 산화적 스트레스를 유도한 지질 과산화를 막아준다고 알려져 있다(12). 따라서 본 연구에서는 *in vitro*에서 뇌조직 내 산화적 스트레스에 대한 청겨자채 추출물의 용매 분획물 및 정제물에 의한 항산화 효과를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

청겨자채는 2000년 9월에 가락동 농수산물 시장에서 시료를 구입하여 열풍건조(60°C dry oven) 후 분쇄하여 체로 거른 후 -4°C 냉동실에 보관하면서 시료로 사용하였다. 건조시료 660 g을 50% MeOH 추출(25°C)로 24시간동안 2회 진탕 추출하여 여과 후 감압 농축하였다. 소 뇌는 농협에서 당일 도축한 것을 구입하여 -70°C freezer dryer에서 동결시켜 실험에 사용하였다.

지질과산화에 대한 항산화 효과

소 뇌를 잘 세척한 후에 10 mM phosphate buffer(pH 7.4) 완충용액에 부유시킨 bovine-brain membrane을 단백질 농도(0.3 mg protein/mL)에서(20) 지질과산화를 유발시키기 위해 25 μ M 상기 membrane suspension(1 mL)에 ascorbate와 0.2 mM의 Fe³⁺을 넣고 30분간 37°C incubator에서 진탕하면서 반응시킨 후 여기에 15% trichloroacetic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)를 1 mL 가하고, thiobarbituric acid(TBA) 시약(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 500 μ L 가하여 100°C incubator에서 15분간 중탕한 후 얼음속에서 급냉시켰다. 상기 혼합액을 14,000 rpm의 microcentrifuge에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 533 nm에서 지질과산화 조건에 채소추출물(50% MeOH)의 흡광도(A)를 TBARS법으로 측정하였다(21). 항산화 활성 측정 시 시료 농도별로 용매(MeOH)에 대한 항산화 효과를 동시에

측정하여 대조군으로 보정하였다.

Antioxidative effect (%) =

$$1 - \frac{[A(\text{membrane} + \text{ascorbate} + \text{Fe}^{3+} + \text{sample}^*) - A(\text{membrane} + \text{sample})]}{A(\text{membrane} + \text{ascorbate} + \text{Fe}^{3+}) - A(\text{membrane})} \times 100$$

*Sample: Vegetable extracts (green mustard leaves).

A (membrane): Absorbance from the incubation containing cell membrane only.

A (membrane + sample): Absorbance from the incubation containing cell membrane and sample.

A (membrane + ascorbate + Fe³⁺): Absorbance for the incubation containing cell membrane, ascorbate and Fe³⁺.

A (membrane + ascorbate + Fe³⁺ + sample): Absorbance from the incubation containing cell membrane, ascorbate, Fe³⁺ and sample.

뇌조직 단백질정량

단백질정량은 Bradford법(20)에 준하여 bovine serum albumin을 표준품(1 mg/mL, Sigma Co., USA)으로 하여 측정하였다.

항산화 활성성분의 분리 및 정제

청겨자채 분말(198 g)을 50% MeOH로 2회 추출 후 농축하여 항산화 활성을 TBARS 법으로 측정하였으며 MeOH 추출물을 가지고 용매 분획법에 따라서 n-hexane, EtOAc, n-BuOH, H₂O 순으로 분액깔대기를 이용하여 순차추출하였다(Fig. 1). n-BuOH층은 분리가 잘 안되므로 후드장치에서 하룻밤 동

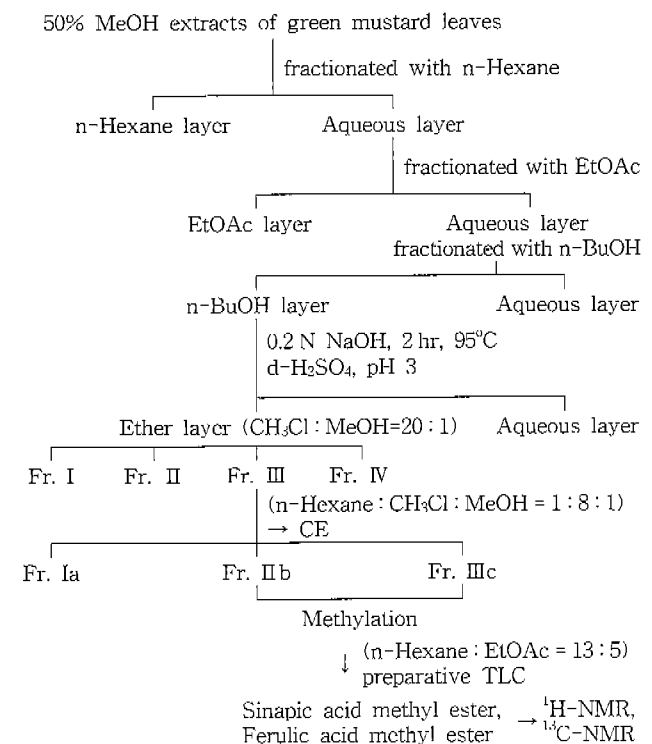


Fig. 1. Isolation of the antioxidative compounds from green mustard leaves.

안 방치하여 분리시켰다. 청겨자채의 n-BuOH 분획(33 g)이 가장 활성이 높은 것으로 나타났으므로 이것을 다시 여러 가지 용매 조건(CH₂Cl₂/MeOH(20:1) → n-hexane/CH₂Cl₂/MeOH(1:8:1) → n-hexane/EtOAc(13:5))으로 silica gel chromatography를 수행하였다. 그 유효성분을 분리하기 위하여 각각의 단계 용매 조건에서 얻은 column chromatography 분획 별로 지질 과산화에 대한 항산화 활성을 측정하였다(Table 1, 3) (21). n-BuOH 분획에는 활성부위가 널리 퍼져 있었으므로 페놀성 성분(phenolic compounds)을 확인하기 위하여 전 처리로 0.2 N NaOH로 2시간동안 가수분해를 실시하였다. 이것을 묽은 황산으로 산성화(pH 3)시키고 에테르 추출하여 가용분획을 농축(4 g)하여 CH₂Cl₂/MeOH(20:1)로 silica gel (Merk, 70~230 mesh) chromatography(7×53 cm)를 실시하였다(Fig. 1). 그 중 활성이 가장 높은 분획 III을 전개용매인 n-hexane/CH₂Cl₂/MeOH(1:8:1)을 사용하여 silica gel chromatography(7×53 cm)를 실시하였다(Fig. 1). Capillary electrophoresis(CE, Beckman P/ACE 5500 CE system, Beckman Instruments, USA)(Table 2)와 thin layer chromatography(TLC, Kiesel-gel 60 F₂₅₄(precoated), Merk)에서 ferulic acid와 sinapic acid를 확인하였다(Fig. 2).

Diazomethane(CH₂N₂)으로 메틸화(22)하여 얻어진 물질을 silica gel column chromatography를 n-hexane/EtOAc(13:5)의 용매조건으로 충전된 column(2×30 cm)에서 용출시켰고 preparative TLC(F₂₅₄ silica gel, Merk)로 단일물질을 분리하였다. CE에서 확인된 활성 분획 III과 표준물질인 sinapic acid와 ferulic acid를 모두 메틸화시켜서 얻어진 ferulic acid methyl ester와 sinapic acid methyl ester의 Rf치가 일치하는지 비교하여 ¹H-NMR을 분석하였고, ¹³C-NMR로 확

Table 1. Antioxidative activity of n-BuOH fraction from green mustard leaves

Solvent fraction (µg/mL)	Antioxidative activity (%) ²⁾
Fraction I ¹⁾	38.0
Fraction II	24.0
Fraction III	58.0
Fraction IV	46.0

¹⁾Each n-BuOH fraction (100 µg/mL) was incubated in the mixture for lipid peroxidation.

²⁾Antioxidative effect (%) =

$$1 - \frac{[A(\text{membrane} + \text{ascorbate} + \text{Fe}^{3+} + \text{sample}^*) - A(\text{membrane} + \text{sample})]}{A(\text{membrane} + \text{ascorbate} + \text{Fe}^{3+}) - A(\text{membrane})} \times 100$$

*Sample: vegetable extracts (green mustard leaves).

Table 2. Instrumental conditions of capillary electrophoresis

Instrument	: Beckman Inc. P/ACE
Capillary	: Silica fused capillary column, 40/47 cm, 75 µm i.d.
Buffer	: 0.1 M borate buffer (pH 8.0)
Injection type	: pressure, 3 sec
Voltage	: 25 kV
Temperature	: 25°C
Detector	: PDA, 200~400 nm

Table 3. Antioxidative activity in bovine brain tissue of identified compounds from green mustard leaves and standard

Compounds	Antioxidative activity (%) ⁵⁾
Sinapic acid methyl ester ¹⁾ (Fraction II b)	40
Sinapic acid ²⁾	22
Ferulic acid methyl ester ³⁾ (Fraction III c)	35
Ferulic acid ⁴⁾	18

^{1,3)}Each compound (50 µg/mL) was incubated in the mixture for lipid peroxidation.

^{2,4)}Each compound (50 µg/mL) was incubated in the mixture for lipid peroxidation.

⁵⁾Antioxidative effect (%) =

$$1 - \frac{[A(\text{membrane} + \text{ascorbate} + \text{Fe}^{3+} + \text{sample}^*) - A(\text{membrane} + \text{sample})]}{A(\text{membrane} + \text{ascorbate} + \text{Fe}^{3+}) - A(\text{membrane})} \times 100$$

*Sample: vegetable extracts (green mustard leaves).

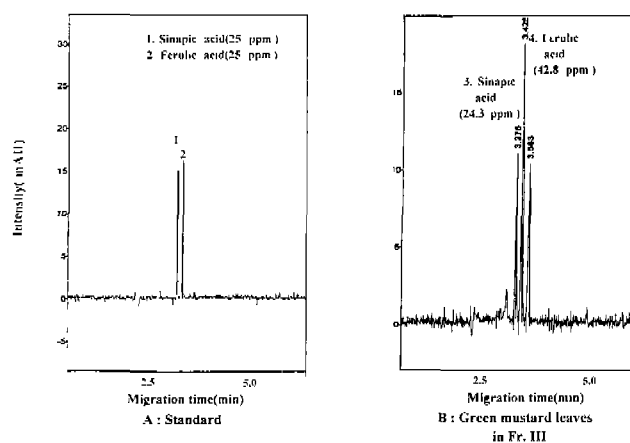


Fig. 2. CE electropherogram of n-BuOH fraction from green mustard leaves.

인하였다.

CE에 의한 분석

Sinapic acid와 ferulic acid를 분리하기 위한 CE의 분석조건은 Table 2와 같다. 총길이 47 cm, UV detection window까지 길이 40 cm, 직경 57 µm을 용융실리카 모세관 컬럼(fused silica capillary column, Beckman Instruments, USA)이 부착된 카트리지(cartridge)와 진동 진공관 검출기(pulsed diode detector, Beckman Instruments, USA)가 장착된 모세관 전기영동장치를 이용하여 수행하였다. 데이터는 P/ACE Station 소프트웨어에 의해 분석하였다. 시료주입은 모세관 양끝에 압력차를 주어 3초간 주입하였다. Borate-borax buffer(pH 8.0)는 0.45 µm membrane filter(Gelman)에 여과한 후 사용하였다. Sinapic acid와 ferulic acid의 정량을 하기 위해 표준물질로 sinapic acid와 ferulic acid(Sigma Co., USA)를 구입하여 0.01 g/10 mL 농도로 MeOH에 녹인 후 희석하여 최종 농도가 10~100 ppm이 되도록 만들어 정량하였다. 시료는 분획 중에서 가장 활성이 높았던 III을 분석하였다. 이 때 시료

는 Sep-pak(cartridge C₁₈, Waters)을 이용하여 MeOH과 물을 1 : 1로 투입하여 activation시킨 후 Sep-pak에 결합된 시료를 다시 MeOH로 elution하여 결합 유기물만을 정제하여 CE로 분석하였다.

NMR에 의한 분석

분리된 시료는 CDCl₃에 녹여서 핵자기 공명 분광기(600 MHz, Bruker, Avance DPX-600)로 ¹H-NMR을 분석하였고, ¹³C-NMR(300MHz, Bruker, Avance DPX-300)분석을 통해서 구조 동정하였다. 시판하는 표준물질과 비교하여 구조를 확인하였다(23).

결과 및 고찰

청겨자채 50% MeOH 추출물은 30% 수율을 나타내었으며, ascorbate/Fe³⁺ system에서 항산화 활성(2 mg/mL)은 53%로 나타났다. 최근 연구에서 청겨자채의 에탄올 추출물이 마우스 뇌조직에서 N-methyl D-aspartate(NMDA)에 의해서 산화적 스트레스를 유도한 지질과산화물을 막아주는 것으로 알려져 있다(12). 이 추출물을 순차추출하였을 때 항산화 활성은 n-hexane, H₂O, EtOAc이 각각 0%, 9% 및 40%였으며 n-BuOH 분획은 49%로 그 활성이 가장 높았고 수율(5%)도 비교적 높았다. 반면에, EtOAc 분획은 항산화 활성은 비교적 높았으나 수율이 매우 낮았다(0.5%). 용매 분획별로 순차추출시 낮은 농도(100 µg/mL)에서도 항산화 활성을 보였으며 분획별 항산화 활성은 널리 분포되었지만 분획 III이 가장 높았다(Table 1).

CE를 이용한 결과 단시간 내 고감도의 물질 확인과 정량

이 가능하였다(Fig. 2). CE로 분석하여 표준물질(Fig. 2A)과 비교해 볼 때 분획III에는 sinapic acid와 ferulic acid가 혼합되어 있었다(Fig. 2B). 흡광도 336 nm에서 sinapic acid의 migration time은 3.275분이었고 ferulic acid는 3.425분으로 표준물질과 동일하게 확인되었다. 각각의 농도별로 표준곡선을 그려서 정량한 sinapic acid의 함량은 건조중량(g)당 24.3 ppm이었고, ferulic acid는 42.8 ppm로 ferulic acid 함량이 sinapic acid보다 다소 많은 양이었다(Fig. 2B). 항산화 활성이 높은 분획인 IIb와 IIIc 피크는 너무도 근접하여 메틸화로 최종 정제된 sinapic acid methyl ester(8 mg)와 ferulic acid methyl ester(14 mg)를 얻었다(Table 3). 또한 이들은 순수한 sinapic acid와 ferulic acid의 Rf 치가 거의 일치하였는데, 그 결과는 전개용매 hexane/ EtOAc(13 : 5)를 사용하여 preparative TLC를 실시하여 TLC 상에서 ferulic acid methyl ester(Rf=0.27)와 sinapic acid methyl ester 유도체(Rf=0.18)를 각각 비교하였고 NMR로 확인하였다. 청겨자채의 ¹H-NMR 분석결과는 Fig. 3(A), (B)와 같으며 spectrum이 이미 보고된 흑겨자(*Brassica nigra*)의 활성성분과 유사한 구조를 가지고 있었다(8). 청겨자채 시료의 NMR 구조 분석 데이터는 Table 4와 같다. 시료의 ¹H-NMR spectrum은 CDCl₃에 녹여서 분석하였으며 6.38 ppm과 7.63 ppm에서 doublet으로 나타났다. Sinapic acid의 *trans*-olepin계 수소인 ¹H가 동일한 적분 값(equivalent integration)을 가지므로 화학적 이동(chemical shifts)을 하는 것으로 여겨진다(23). 6.77 ppm에서는 벤젠 고리의 2,6-H로 2H가 singlet으로 나타났다. 3.85 ppm 피크는 벤젠 고리에 있는 6H로 3,5-OCH₃이다. 3.82 ppm, 3H로 sinapic acid methyl ester의 수소 때문인 것으로 동정되었다.

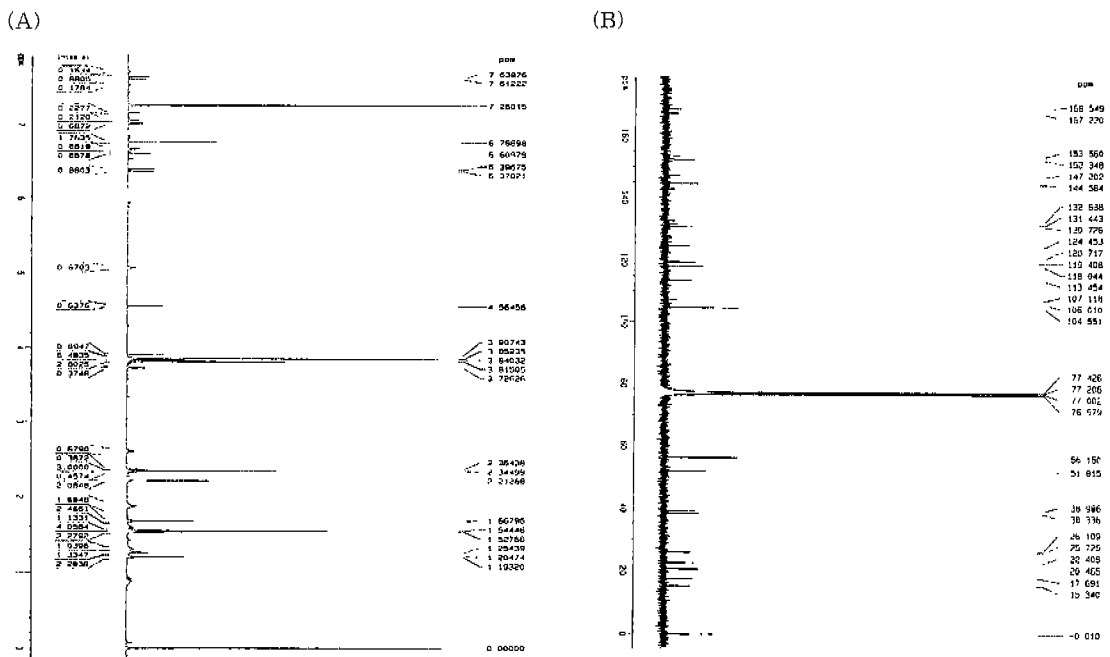


Fig. 3. ¹H-NMR (A) and ¹³C-NMR spectrum (B) of sinapic acid methyl ester.

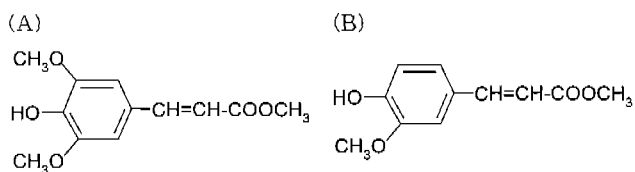
Table 4. Instrumental analysis data for sinapic acid methyl ester from green mustard leaves

Instrument	Data
$^1\text{H-NMR}$ CDCl_3 , ppm	: 3.82 (3H, s, COOCH_3), 3.85 (6H, s, $2 \times \text{OCH}_3$), 6.38 (1H, d, $J = 16 \text{ Hz}$, H-1'), 6.77 (2H, s, H-2,6), 7.63 (1H, d, $J = 16 \text{ Hz}$, H-2')
$^{13}\text{C-NMR}$ CDCl_3 , ppm	: 51.82 (3'- OCH_3), 56.16 (3,5- OCH_3), 104.55 (2,6), 113.45 (2'), 124.45(1), 132.64 (4), 144.58 (1'), 152.35 (3,5), 167.22 (3')

각각의 유도체에 대한 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석 결과는 표준물질과 일치하였다(Table 4). 이 정제물의 화학구조는 Fig. 4(A)와 같다.

Ferulic acid의 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ 결과, 3.80 ppm에서 COOCH_3 가 singlet으로, 3.94 ppm에서는 벤젠 고리의 $-\text{OCH}_3$ 가 singlet으로 나타났다. 6.92 ppm($J = 9 \text{ Hz}$, d, H-5), 7.08 ppm($J = 9 \text{ Hz}$, d, H-6) 및 7.62 ppm($J = 16 \text{ Hz}$, d, H-2')에서 수소가 각각 doublet으로 나타났으며, 7.03 ppm에서는 벤젠 고리의 2,6H, 2H가 singlet으로 나타났다. 이것은 표준품 ferulic acid methyl ester와 TLC, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 동일하였다. 이것의 화학구조는 Fig. 4(B)와 같다.

이들의 항산화 활성을 동일한 농도(50 $\mu\text{g/mL}$)에서 비교할 때 sinapic acid methyl ester가 ferulic acid methyl ester보다 다소 높게 나타났다. 또한, 시판되는 표준물질의 항산화 활성은 sinapic acid(22%)가 ferulic acid(18%)에 비해 약간 높게 나타났으며, 메틸화된 화합물에 비해서 비교적 낮게 나타났다(Table 3). 또한, sinapic acid에 2개의 메틸기(CH_3)도 *meta* 위치에 전자를 주어 라디칼 소거 효과가 증가한다. 따라서 sinapic acid와 methyl ester 유도체의 라디칼 소거 활성이 큰 것은 이 라디칼을 안정화시키는 올레핀계 작용기들이 존재하기 때문이라고 보고된 것과 일치하였다(23). Han 등(10)의 연구결과에서는 ferulic acid methyl ester의 항산화력에 관해 거의 언급된 바 없으나, 이 화합물도 어느 정도 항산화 효과가 있다고 추측된다. 두 화합물은 $\cdot\text{OH}$ 기 소거효과가 벤젠 고리 *para*-hydroxyl기와 관련되어 있다(8). Iron-catalyzed Haber-Weiss 반응과 Fenton 반응에 의하여 생성된 hydrogen peroxide(H_2O_2)는 Fe^{2+} 와 작용하여 hydroxyl 라디칼을 생성한다(4,5). 뇌조직의 산화적 스트레스에 대한 보호효과가 차이가 있는 것도 모두 작용기와 관련이 있는 것으로 사료된다. 생체 조직에서는 SOD, catalase, peroxidase와 같은 항산화 효소 및 저분자 화합물인 tocopherol, polyphenol compounds

**Fig. 4. Sinapic acid methyl ester (A) and ferulic acid methyl ester (B).**

와 ascorbate 등에 의한 $\cdot\text{OH}$ 기 소거 작용이 가능하다(6-10,12). 한편, 각각의 표준물질에 대한 efficient quantity(EQ, ppm) 값이 낮은 sinapic acid(47 ppm)가 ferulic acid(72 ppm)보다 더 높은 항산화력을 갖는 것으로 보고되었다(24).

이상에서 뇌조직의 산화적 스트레스를 유발하는 $\text{Fe}^{3+}/\text{ascorbate}$ system에서 청겨자채 추출물 및 정제물이 항산화 활성이 확인되었다. 청겨자채 추출물도 단독이 아닌 polyphenol compounds, flavonoids 등의 상호작용으로 인하여 항산화력을 나타내는 것으로 사료된다.

겨자와 그 추출물에는 독성과 돌연변이 유발과 같은 제한점이 있는 것으로 알려져 있어 청겨자채의 경우도 독성에 관한 후속 실험을 해볼 필요가 있다(8). 이밖에도 항산화 활성을 가지는 타 십자화과 채소들에 관한 구조규명도 요구된다. 이러한 문제점들이 점진적으로 해결된다면 이들 항산화제 후보물질들의 산업적 이용 가능성이 기대된다.

요 약

마우스 뇌조직에서 지질과산화물을 막아주는 것으로 알려진 청겨자채에 대해서 50% MeOH추출물(2 mg/mL)을 사용하여 소 뇌조직의 산화적스트레스를 유발하는 ascorbate/ Fe^{3+} system에서 항산화 활성을 조사하였다. 청겨자채 추출물의 용매 순차추출 후 TBARS 활성을 각각의 용매 분획(100 $\mu\text{g/mL}$) 별로 확인한 결과 각각의 용매 분획 중 n-BuOH 분획(49%)이 가장 높았고, EtOAc(40%), H_2O (9%) 및 n-hexane(0%) 순이었다. n-BuOH 분획을 silica gel column chromatography를 반복하였으며 CE, TLC를 통해서 sinapic acid와 ferulic acid를 확인하였다. CE를 통하여 그 함량을 정량한 결과, 건조중량(g) 당 sinapic acid는 24.3 ppm이었고 ferulic acid는 42.8 ppm으로 나타났다. 최종 정제활성물질을 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ 와 $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ 로 확인하였으며 sinapic acid methyl ester, ferulic acid methyl ester로 각각 구조 동정되었다. 또한 순수한 sinapic acid와 ferulic acid의 Rf 치가 일치하는지 여부를 TLC 상에서 비교하였다. 동일한 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 sinapic acid methyl ester는 40%, ferulic acid methyl ester는 35%의 항산화 활성을 나타내었으며 이것은 시판되는 표준물질인 sinapic acid(22%)와 ferulic acid(18%)에 비해 약간 높게 나타났다. 이것은 이 화합물에 라디칼을 소거하는 작용기와 관계가 있는 것으로 여겨진다. 청겨자채 추출물 중에도 항산화 활성이 비교적 널리 분포된 것으로 보아 이 성분들은 체내에서 단독으로 또는 상호작용으로 항산화 작용을 나타낼 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 한국학술진흥재단의 박사 후 연구과정 지원사업비와 연세대학교 교내 학술연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

1. Cutler, R.G., Packer, L., Bertram, J. and Mori, A. : *Oxidative stress, antioxidants, aging and disease : Oxidative stress and aging*. Packer, L. (ed.), Basel, Switzerland, p.1-14 (1995)
2. Lai, C.S. and Pette, L.H. : Hydroxyl radical production involved in lipidperoxidation of rat microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 51-59 (1977)
3. Fong, K.L., McCay, P.B., Poyer, J.L., Keele, B.B. and Misra, H. : Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced by flavin enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792-7797 (1973)
4. Halliwell, B. : Biological mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms : The key role of superoxide dismutase. *Cell. Biol. Int. Rep.*, **2**, 113-128 (1978)
5. Gutteridge, J.M. : Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem. J.*, **224**, 761-767 (1984)
6. Zhao, B.L., Li, X.J., He, R.G., Chens, S.J. and Win, W.J. : Scavenging effect of extracts of green tea natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophysics*, **14**, 175-185 (1989)
7. Taira, J., Ikemoto, T., Yoneya, T., Hagi, A., Murakami, A. and Makino, K. : Essential oil phenyl propanoids : Useful as \cdot OH scavengers? *Free Radic. Res. Commun.*, **16**, 197-204 (1992)
8. Chung, S.K., Osawa, T. and Kawakishi, S. : Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 118-123 (1997)
9. Chung, S.K. and Osawa, T. : Hydroxyl radical scavengers from white mustard (*Sinapis alba*). *Food Sci. Biotechnol.*, **7**, 209-213 (1998)
10. Han, Y.B., Kim, M.R., Han, B.H. and Han, Y.N. : Studies on anti-oxidant component of mustard leaf and seed. *Kor. J. Pharmacogn.* **18**, 41-49 (1987)
11. Watenberg, L.W. : Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**, 1-8 (1985)
12. Lee, K.J. : Protective effect against oxidative stress in mouse brain tissue and induction of hepatic glutathione S-transferase vegetable extracts. *Ph.D. Dissertation*, Chunnam National University, Korea (1999)
13. Shim, K.H., Seo, K.I., Kang, K.S., Moon, J.S. and Kim, H.S. : Antimicrobial substances of distilled components from mustard seed. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 948-955 (1995)
14. Park, J.R., Park, S.K., Cho, Y.S. and Chun, S.S. : Purification and characterization of myrosinase in Dolsan leaf mustard (*Brassica juncea*) and changes in myrosinase activity during fermentation of leaf mustard kimchi. *J. Korean Soc. Dietary Culture*, **8**, 147-152 (1993)
15. McGregor, D.J., Mullin, W.J. and Fenwick, G.R. : Analytical methodology for determining glucosinolate composition and content. *J. Assoc. Official Anal. Chemists*, **66**, 825-849 (1983)
16. Saito, Y. : Antioxidant properties of spices. *Oil-chemistry*, **26**, 754-763 (1977)
17. Depree, J.A., Howard, T.M. and Savage, G.P. : Flavour and pharmaceutical properties of the volatile sulphur compounds of wasabi (*Wasabia japonica*). *Food Res. International*, **31**, 329-337 (1999)
18. Shin, I.S., Masuda, H. and Kinai, N. : Inhibitory effect of wasabi on the urease active of *Helicobacter pylori*. Paper presented at Symposium of Korean Society of Food Science and Nutrition, Seoul. 3~4 November, p.407 (2000)
19. Kim, J.E. and Choi, J.S. : Study of flavonoid compound from mustard leaf (*Brassica juncea*). *Nat. Prod. Sci.*, **64**, 199-200 (2000)
20. Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
21. Bidlack, W.T. and Tappel, A.L. : Damage to microsomal membrane by lipidperoxidation. *Lipids*, **8**, 177-182 (1973)
22. Deboer, T.J. and Backer, H.J. : Preparation of diazomethane. *Org. Syn.*, **36**, 16-20 (1956)
23. Pretsch, E., Seibl, J., Simon, W. and Clere, T. : *Tables of spectral data for structure determination of organic compounds*. 2nd ed., Springer-Verlag Press, New York, p.90-200 (1989)
24. Cuvelier, M.E., Richard, H., and Bersot, C. : Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : Structure-activity relationship. *Note, Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 324-325 (1992)

(2001년 5월 9일 접수)