

# NMR을 이용한 혼합물의 분광학적 분석: 구조분석에서 대사체분석

## NMR-spectroscopic Analysis of Mixtures: from Structure to Function

유미영 | 식품분석센터

Miyoung Yoo | Food Analysis Center

### 서론

Nuclear magnetic resonance(NMR) 분광학은 생물학적 공정의 이해를 돕기 위해 필요한 metabolomes (1000 dalton 이하의 내인성, 외인성 대사체)의 구조적 특징 및 기능적 특징들을 확립시킬 수 있는 특별한 기회를 제공하는 학문이다. 전통적인 NMR 분광학은 순수화합물 분석으로 중요도가 밀려난 반면, 지난 몇 년간 복잡한 대사체(metabolite) 분석을 위한 NMR 분광학 기술의 사용이 급증되어 왔다. NMR을 이용한 새로운 방법의 개발은 대사체 분석뿐만 아니라 화학적 분해로 인해 분리되지 않는 작은 분자를 구조 동정함으로써 더욱더 그 영역을 확장하였다. 또한 비교 대사체학(comparative metabolomics) 및 통계분석(statistical analyses) NMR은 genotype 혹은 phenotype의 변화에 관련 있으면서 이미 알려진 대사체 및 알려지지 않은 대사체의 구조 동정에 매우 효과적이라고 입증되고 있다. Metabolomics 연구에 있어서 주 분석 장비는 NMR

이라고 할 수 있으며,  $^1\text{H}$ 와  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy를 주로 이용하며, high-energy phosphate 대사체와 phosphorylated 지질 중간체 등을 분석하기 위해서는  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy를 사용한다. 또한 최근에는 NMR의 단점인 많은 signal을 LC로 분리할 수 있는 LC-MS-NMR 장비를 이용하여 중풍환자의 소변과 샘플을 분석하여 중풍환자 특유의 대사체 프로파일링 결과를 보고하였다.

대사체는 살아있는 세포 내에서 작동하는 수많은 신호 경로를 연결하는 역할을 한다. 그래서 대사체는 환경적, 유전적 변화에 의한 세포 조직 또는 조직의 변화된 정보를 포함하고 있다. 대사체학(metabolomics)은 이러한 대사체들을 총체적으로 관찰하여 환경적, 유전적 변화와 화학물질 간의 관계를 설명하는 학문으로 가능한 많은 화학물질을 동시에 관찰하여 이들의 상관관계를 유의성 있게 설명하는 것이 중요하다. 또한 기능적 genomics를 위한 개체의 저분자 대사물질인 대사체의 포괄적인 profiling에 초점을 둔 -omics technology들 중의

한 분야이며 생체조직에 존재하는 내부적으로 합성되어진 저분자 화합물을 연구하는 것으로 저분자 화합물은 glucose, cholesterol, ATP, lipid와 같이 잘 알려진 화합물을 포함하고 있다. 이들 분자들은 cellular 대사과정의 최종 생성물이다.

Metabolome의 기능 규명과 구조 동정은 화학생물학에서 가장 도전적인 업무 중의 하나이다. NMR이나 MS와 같이 분석과학 기술의 진보에도 불구하고 중요한 대사산물의 구조 결정 및 생물학적 역할은 많은 연구를 요구하며, 화합물의 구조가 구별될 수 있지만 대사체의 생물학적 기능을 규명하기란 여전히 불완전하다. 또한 genomics와 proteomics의 최근 진보와 비교하면, NMR 분석은 내인성의 organism's metabolome을 구조적으로나 기능적으로 규명할 수 있는 능력이 아직은 제한적이다. 핵산과 단백질의 구조 및 기능 규명에 대한 이해를 먼저 선행하고, 스테로이드 호르몬과 작은 유기체 분자의 구조를 밝혀 나감으로써 NMR의 제한적인 면

을 채워 나갈 수 있을 것으로 판단된다. 지금까지는 주로 수천 개 화합물의 예기치 않은 구조, 기능적 역할, 생합성 경로의 규명과 연관된 결과로 인해서 yeast, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, mice의 metabolome만이 제한적으로 연구되어 왔다. Proteomics와 genomics가 대사체학보다 먼저 도약하는 이유 중 하나는 metabolome의 구조적 다양성 혹은 불규칙성에 있으며, 유도 변형된 단백질과 핵산은 metabolome의 구조 동정 및 기능을 규명할 수 있도록 한다. NMR 분석이 분자 혼합물의 비교 metabolite profiling에서 응용까지 현재 적용되는 범위를 Fig. 1에 나타내었다. NMR을 이용한 대사체 응용범위는 가장 고전적인 방법인 천연물의 구조동정, phenotype 혹은 genotype의 targeted 분석, profiling 분석 등으로 분류할 수 있다. 본 연구에서는 NMR을 이용한 대사체 분석의 기본원리, 대사체 분석방법 및 식품분야에서의 활용방안에 대해 기술해보고자 한다.

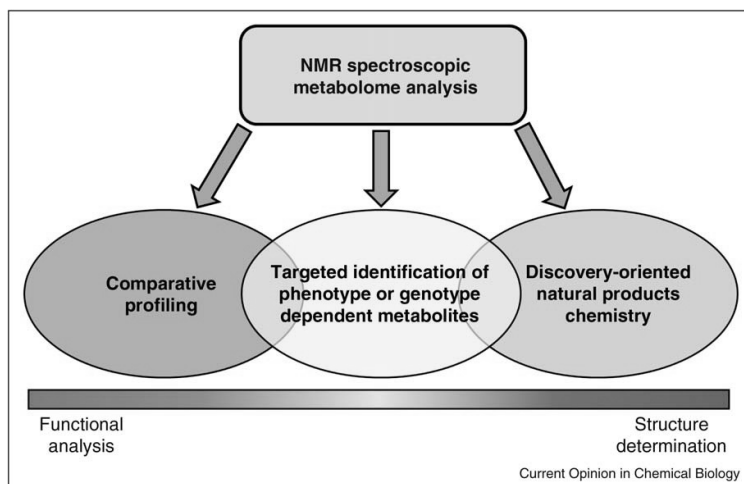


Fig. 1. The range of applications for NMR-spectroscopic analyses of metabolite mixtures can be categorized roughly into three areas. (Forseth RR, Schroeder FC, Curr Opin Chem Biol, 15, 38-47, 2011)

## NMR을 이용한 대사체학 기법 원리

대사체학은 metabolic profiling으로부터 개발되어 1970년대 초 GC-MS를 이용하여 스테로이드, 산, 뇨에 함유된 약물 대사체 등을 분석하는데 사용하였는데, 이 결과들이 인체의 건강을 진단하는데 활용되면서 metabolic profiling은 더욱 발전하는 계기가 되었다. 최근까지 NMR을 이용한 새로운 생체분자들(metabolite mixture)의 규명은 대개 연구자의 크로마토그래피를 이용하여 화합물을 분리할 수 있는 능력에 의존하여 왔다. 오픈 컬럼을 이용하여 특별한 기능성을 가진 화합물을 분류한 다음 바로 NMR을 이용하여 구조 결정을 실시하는 것은 주로 천연물화학과 화학생물학에서의 전통적인 점

근방식이다. 보통 화합물의 순도는 NMR 분석의 성공을 위해 필수로 간주되었다. 복잡한 혼합물로부터 새로운 화합물을 구별하기 위한 NMR 사용의 첫 번째 예는 절지동물의 천연물 연구에서부터 유래하였다. *Myrmecaria* 개미는 엄청난 양의 독성이 분비선에서 생산되는데 분비물의 질량분석 결과 무독성 monoterpene인 것으로 나타났다. 이것은 분비물이 공기에 노출될 때 화학적 분해로 인하여 독성이 급격히 없어지는 것으로 관찰되었다. 따라서 신선한 *Myrmecaria* 개미 분비물의 NMR 분석결과 heptacyclic alkaloids 계열인 myrmecarin 430A로 구조 동정 되었다(Fig. 2). 또한 다량의 monoterpene, alkaloids 화합물을 포함하는 *Myrmecaria* 개미 분비물로부터 myrmecarin 430A의 구조동정을 위해

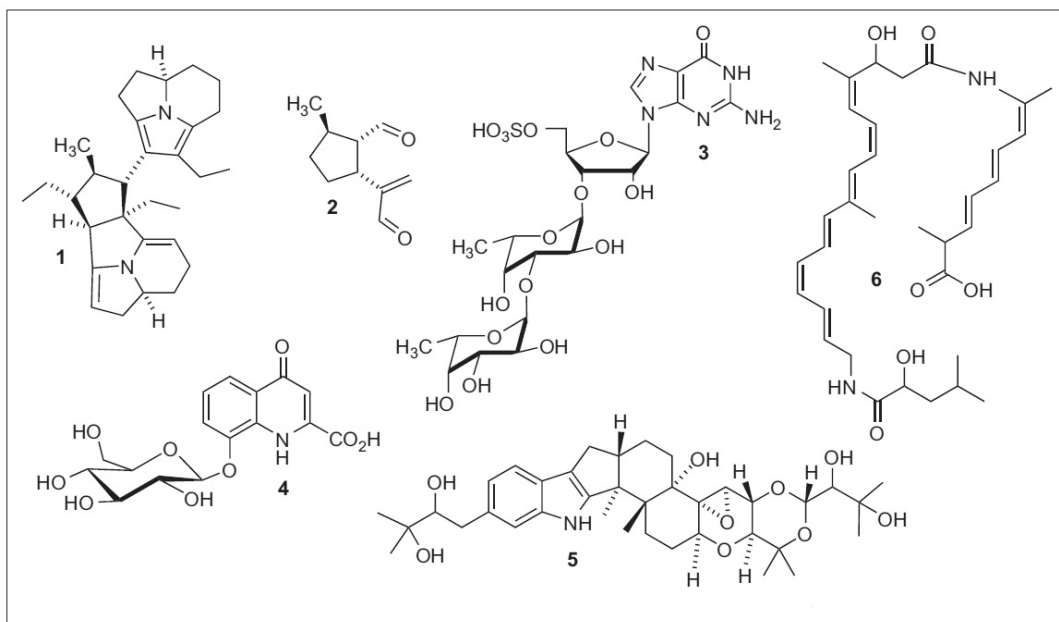


Fig. 2. Structures of new natural products identified via NMR-spectroscopic analyses of complex mixtures. Myrmecarin 430A (1) and bacillaene (6) represent members of a small but growing class of metabolites that have never been isolated in pure form, (Forseth RR, Schroeder FC, Curr Opin Chem Biol, **15**, 38-47, 2011)

사용된 NMR은 고해상도 DQF-COSY이다. DQF-COSY crosspeaks는 높은 정밀성을 가지고 있기 때문에 자세한 커플링 정보를 제공할 뿐만 아니라, 시그널이 겹치거나 아주 낮은 강도의 신호를 가지고 있다 하더라도 구조적인 assignments가 가능하다.

Dossey 등은 mass의 감도를 증가시키기 위해 감소된 볼륨의 probe를 시연함으로써 2차원적 NMR 분석의 범위를 확장하였다. 전통적인 방법보다는 25배로 더 증대된 감도를 가진 1 mm 극저온 probe를 사용하여 *Anisomorpha buprestoides*에서 나오는 방어용 분비물은 COSY, TOCSY, ROESY, 그리고  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ 은 HMQC와 HMBC로 분석하였다. 이 스펙트럼에 바탕을 두어, 대벌레(walking stick) 방어 물질로 잘 알려진 dolichodial의 입체 이성체인 monoterpene dialdehydes가 포도당과 혼합물로 이루어져 있는 것이 알려졌다. 또한 HTS 극저온 probe를 사용하여 대벌레 분비물 1ml만을 사용하여 곤충 표본 분석을 가능하게 하였다. 이 연구는 동일한 조건하에서 성장하더라도 다양한 종류의 독을 가진 각각의 벌레들이 개별적인 수준에서 화학적인 다양성의 잠재적인 관련성을 설명하는 것을 정립하였다. Dossey 등은 잘 알려진 화합물 이외에 unfractionated 추출물의 2D NMR을 사용하여 새로운 대사산물을 발견했다. 또한 동일한 저음량 HTS 극저온 probe를 사용하여 *Parectatosoma mocquerysi*의 살포액으로서 monoterpene parrectadiol을 포함한 여러 가지 화합물을 발견하였다.

MS를 기반으로 하는 감도가 증가된 방법들은 잘 알려진 화합물의 검출 및 정량을 위한 metabolite의 빠른 profiling을 가능하게 하며, 일반적인 HPLC-MS 분석은 현재 수천 종류의 화합물의 존재 규명을 위해 다양한 분류 분석을 가능하게 한다. 또한 NMR

분광학이 대사체 profiling을 할 수 있는 가장 큰 장점으로는 미지의 화합물에 대한 구조 동정을 할 수 있는 실용성을 가지고 있다. 다차원 NMR 스펙트럼의 분석은 화합물의 구조적 정보를 제공하며, 이것은 분석하는 사람들이 직접적으로 원자와 원자 사이의 연결 형태 및 공간적 구조 배열을 추론할 수 있는 정보를 제공하고 있다.

NMR은 이온화 조건의 선택에 매우 의존적인 MS와는 확연히 구별되고 있다. 그리고 지금까지 일반적으로 사용된 이온화 기술, electrospray ionization(EI)은 비극성 부류의 대사체들(지질, 스테로이드 화합물)의 분석보다는 극성을 가지는 화합물의 검출에 더 적합한 기술로 알려져 있다.

대조적으로 NMR을 이용한 분석은 모든 화합물들이 NMR 용매에 녹거나 분석조건에 안정적이면서 NMR 스펙트라 안에서 시그널의 상대적인 높이는 화합물의 양과 비례하고 있다. 그러나 NMR의 이상적인 분석 품질과 많은 정보 제공에도 불구하고, NMR은 주로 순수한 화합물의 구조 동정 기기로 사용되어져 왔다. 초기 생물학적 샘플은 혼합물의 metabolic profiling을 위해 NMR이 사용되어 왔으며, NMR이 혼합물로부터 새롭거나 전혀 의도하지 않은 대사체를 확실히 구조 동정하기 위한 적당한 기기로 사용되지 않았다. 최근 NMR을 이용한 분석 방법은 이전에 잘 알려지지 않았던 화합물에 대한 물질 규명이나 복잡한 유기체 혼합물의 예상되지 못하는 화합물의 구조 동정에 있어서 큰 역할을 하기 시작하였다. 혼합물의 특징을 규명할 수 있는 NMR 분광학의 발전 요인은 NMR spectrometers의 감도 증가와 data processing과 같은 통계학의 발전에 그 이유를 찾을 수 있으며, 화학적 분해로 인해 분리되지 않는 화합물과 같은 작은 유기체들(대

사체군) 역시 NMR을 이용하여 구조 동정을 할 수 있게 되었다. 그리고 NMR을 기반으로 한 분석은 genotype 혹은 phenotype의 변화와 연관이 있는 새롭거나 알려진 대사체를 분석하는데 매우 효율적이라고 보고되고 있다.

## 대사체 추출방법

원하는 대사체들의 선택적인 추출은 다양한 생화학적 화합물을 분석하고 최적화된 데이터 취득을 가능하게 해주므로 이를 위한 추출방법의 최적화가 중요하며, 시료의 추출과정 중 생물의 대사과정을 중단시키기 위해서는 액체 질소를 이용한 급속 냉동 동결 건조 방법이 사용된다. 대사체의 추출은 극성이 다른 유기용매, 즉 극성 대사체는 메탄올, 에탄올, 물 등을 사용하고, 지용성 대사체는 클로로포름 등을 주로 이용하며, 용매의 혼합량 및 사용량에 따라 1차 및 2차 대사체들의 추출 효율이 달라지므로 이에 따라 효율을 높일 수 있는 다양한 추출방법이 개발되고 있다.

## Metabolic Profiling과 데이터 처리(Data Processing)

Metabolic profiling은 targeted와 nontargeted profiling으로 대별할 수 있다. Targeted profiling은 식품 내의 전체 대사산물 중에서 특정한 대사산물의 양적, 질적 변화에 대한 분석을 주로 하는 것이다. 이에 반하여 nontargeted profiling은 특정한 대사산물보다 식품의 모든 성분에 대한 전반적인 패턴

변화를 조사하는 방법으로 식품 metabolic fingerprinting으로 불리며 비교적 간편한 추출과정을 통해  $^1\text{H-NMR}$ 을 통해 분석이 이루어진다. 즉 각 시료에 대한 NMR data를 얻은 후, Chenomx의 프로그램을 이용하여 일정 감도 이상의 data만을 모으고 내부표준물질을 일정 농도로 첨가하여 기준으로 정한 다음, 일정 간격으로 data를 합침(binning)으로써 다변량통계분석을 이용하여 통계학적으로 data를 분석한다(Fig. 3).

대사체학에서 주로 사용되는 생물정보학 기법으로는 다변량분석법(multivariate analysis)을 들 수 있다. 다변량분석에는 principal component analysis (PCA, 주성분분석), partial least squares(PLS, 부분 최소 자승법), discriminant analysis(DA, 판별분석), partial least squares discriminant analysis(PLS-DA, 부분 최소 제곱 판별 분석), orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA, 직각 부분 최소 제곱 판별 분석) 등이 주로 사용되고 있으며 데이터의 구조나 목적에 따라 적당한 알고리즘을 선택하여 사용한다. 식품 metabolomics에서는 주로 PCA가 사용되고 있다. PCA의 주목적은 다변량 데이터로부터 가능한 적은 변수로 많은 정보를 파악해 집약시킴으로써 궁극적으로 변수를 감소시켜 데이터를 이해하고자 하는 것이다. 예를 들면 원산지별 쇠고기 추출물을  $^1\text{H}$ 로 분석하여 얻은 profile은 다변량 분석법 중 가장 대표적인 PCA를 통하여 2차원 또는 3차원 공간에 한 개의 점으로 표시할 수 있다. 이때 x와 y축은 데이터 상호간에 correlation이 존재하지 않는 두 개의 영역일 뿐이면 구체적인 의미는 없다. PCA 분석결과는 스코어(score)와 로딩(loading)의 산포도를 통해 데이터의 특징을 해석함으로써 유용한 정보를 추출할 수 있다. 스코어

는 주성분 공간에서 각 시료의 좌표인데, 이들을 플로트한 산포도는 시료 간의 관계를 나타낸다. 즉 산포도상에서 인접하여 위치할수록 시료 간에 비슷한 성질을 나타내고 있는 것으로 추정할 수 있다. 또한 산포도상의 공간적 위치에 따라 시료간에는 몇 개의 그룹으로 구분이 가능하다. 로딩은 주성분 축(고유벡터)의 계수로서 각 주요 성분에 대해 각 변수들이 기여한 정도를 파악함으로써 어느 변수가 중요하며 불필요한지를 알 수 있게 된다. 즉 PCA를 통한 패턴 인식을 해 보면 여러 개의 서로 다른 샘플을 2차원 또는 3차원 공간에 표시하면 샘플들 간의 특정 공통점에 의해 클러스터링이 이루어진다 (Fig. 4). PLS는 계량화학 알고리즘 중에서 정량목적으로 가장 많이 사용하는 방법이다. PLS는 스펙트럼 데이터뿐만 아니라 시료의 농도까지 동시에 이용하여 농도 변화를 가장 잘 설명할 수 있는 factor들을 설정하는 방법이다. 스펙트럼의 변화는 항상 주어진 성분의 농도 변화에 따라 가장 크게 나타나지 않을 수도 있다. 실질적으로 기기변화에 따른

바탕선 변화, 잡음(noise), 시료상태에 따른 산란 등이 존재할 때 스펙트럼은 농도의 변화보다는 이런 현상들에 의해 더욱 크게 변화할 수 있다. 그러나 PLS를 사용하면 factor 설정시 농도 정보가 이용되기 때문에, 측정성분과 관계없는 다른 스펙트럼 변화가 존재할 때 농도 변화를 더 설명을 잘 할 수 있는 factor가 설정될 수 있고, 이에 따라 분석 성능도 향상될 수 있다. PLS는 판별분석과 결합한 PLS-DA로 활용할 수 있으며, PLS 분석의 확장된 개념인 OPLS 역시 OPLS-DA로 활용이 가능하다.

### 식품분야 활용방안

대사체를 적용한 기술 분야는 질환·의약품분야, 식품·식물분야, 독성·환경분야, 미생물 분야 등으로 나눌 수 있다. 이 중에서 식품분야에서의 대사체를 활용한 분야는 크게 농산물의 품질·원산지 평가, 식품에서의 안전성, 안정성, 영양적 가치 평가,

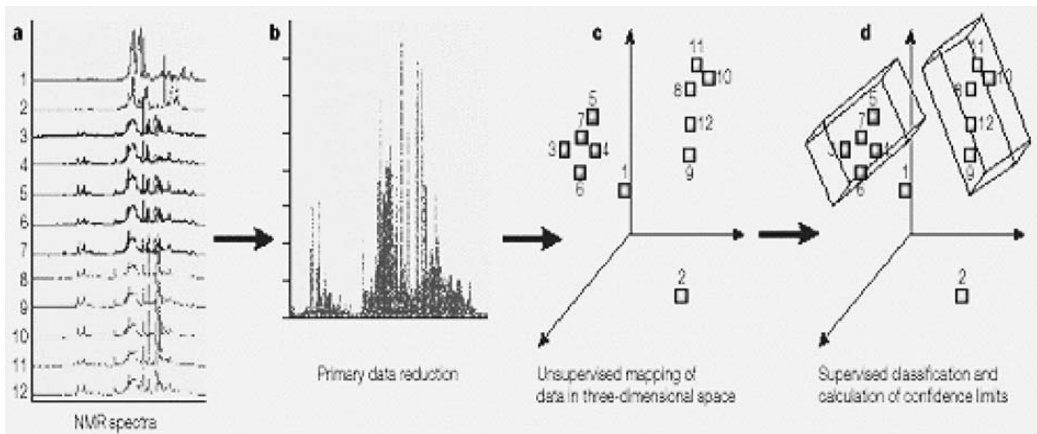


Fig. 3. Metabolomics process using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. (Jeong BC, Molecular and cellular biology news, 18, 17-28, 2006)

식품 섭취 후 생리변화 분석으로 나눌 수 있다.

특히 농산물의 품질·원산지 평가부분으로 예를 들어 인삼의 대사체 분석을 핵자기공명분석기(NMR) 및 주성분분석(PCA)을 수행하여 대사체들의 차이 점을 구별하였으며, 2D J-resolved NMR experiment를 수행하여 이 데이터를 주성분분석(PCA)을 수행하여 알라닌(alanine), 아르기닌(arginine), 콜린(choline), 푸마린산(fumaric acid), 이노지톨(inositol), 수크로스(sucrose), 진세노사이드(ginsenoside) 등이 판별에 중요한 대사체임을 확인하였다. 또한 식품 안전성 관련 대사체 분석에서는 유전자 재조합 식품의 안전성과 관련하여 형질이 전환된 식물에 대한 안전성 검증이 요구되고 있는 실정이다. 이에 유전자 재조합 셀러리에서 발견되는 푸라노쿠마린(furanocoumarins)이나 재조합 감자에서의 당알칼로이드(glycoalkaloids) 등과 같은 물질을 targeted analysis와 nontargeted analysis 분석 접근을 통한 연구도 보고되고 있다. NMR을 이

용한 대사체 분석은 식품의 오염 및 위해 요소에 관한 지표를 만드는데 이용될 수 있는 연구 방법으로, 식품의 부패를 일으키는 미생물이 생산하는 독성물질 및 off-flavor 물질을 targeted analysis 방법으로 오염 정도를 판단할 수 있고, 식품 보존을 위해 사용하는 nitrite, sulphite, propionic acid, sorbic acid, benzoic acid 등과 같은 화학적 식품 첨가물의 첨가 여부 및 안전성 평가를 위해 사용될 수 있다.

## 기대효과

NMR을 이용한 식품의 대사체 분석에서는 먼저 식품의 종류와 질, 등급 구별을 할 수 있으며, 그 예로는 쇠고기 원산지 판별, 녹차의 성분변화 해석에 따른 발효 타입 및 숙성 연도 측정, 송이버섯 연도별 바이오마커 발굴 및 품질 판별, 효모 균주의 발효 특성을 평가하여 와인 발효 모니터링 적용 가능

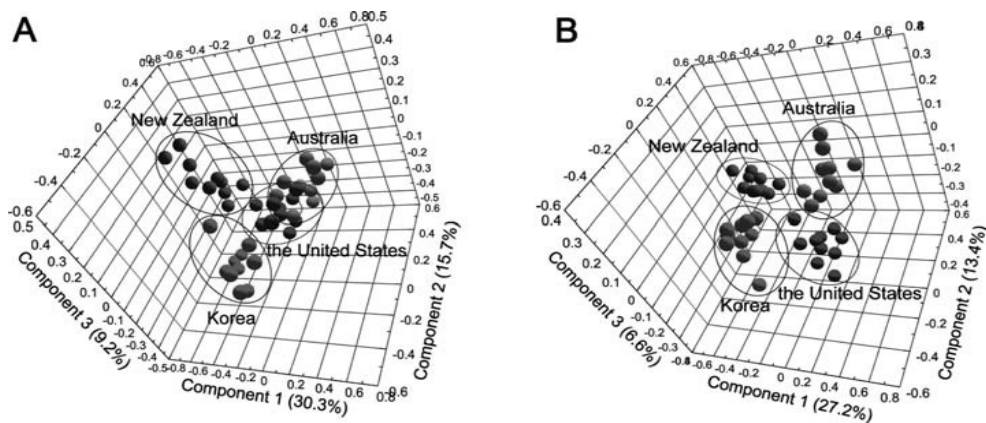


Fig. 4. PCA (A) and OPLS-DA (B) 3D score plots derived from the  $^1\text{H}$  NMR spectra of beef sirloin (or chuck) extracts obtained from Australia, Korea, New Zealand, and the United States. (Jung Y *et al.*, J Agric Food Chem, **58**, 10458–10466, 2010)

성을 제시하여 소비자의 불만족을 해소할 뿐만 아니라 이러한 식품의 대사체 분석을 통하여 식품 구성성분의 전반적인 이해 및 프로세스를 모니터링할 수 있는 기반이 된다. 또한 이를 통한 특정 화합물의 발견은 기능성 식품소재 개발 등에도 이용될 수 있으며, 소비자들의 욕구에 맞는 식품을 개발하는데 기여할 수 있다. 유전자 재조합 식품의 안전성 평가 및 식품의 오염, 위해요소에 관한 지표를 만들어 인간의 질병을 예방하고 건강한 삶을 유지하는데 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

#### ● 참고문헌 ●

1. Cho IH, Kim YS, Choi HK, Metabolomic discrimination of different grades of pine-mushroom(*Tricholoma matsutake* Sing.) using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and multivariate data analysis, *J Pharm Biomed Anal*, **43**, 900-904, 2007
2. Choi YH, Sertic S, Kim HY, Verpoorte R, Classification of lily species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis, *J Agric Food Chem*, **53**, 1237-1245, 2005
3. Dixon RA, Gang DR, Charlton AJ, Fiehn O, Applications of metabolomics in agriculture, *J Agric Food Chem*, **54**, 8984-8994, 2006
4. Forstner RR, Schroeder FC, NMR-spectroscopic analysis of mixtures: from structure to function, *Curr Opin Chem Biol*, **15**, 38-47, 2010
5. Jeong BC, Metabolomics of disease research, *Molecular and cellular biology news*, **18**, 17-28, 2006
6. Jeong JY, Hwang GS, Park JC, Kim DH, Ha M,  $^1\text{H}$ -NMR- based urinary metabolic profiling of gender and diurnal variation in healthy Korean subjects, *Environmental health and toxicology*, **25**(4), 295-306, 2010
7. Jung Y, Lee J, Kwon J, Lee KS, Ryu DH, Hwang GS, Discrimination of the geographical origin of beef by  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics, *J Agric Food Chem*, **58**, 10458-10466, 2010
8. Kim S, Ching H, Liu JR, Advances in plant metabolomics, *J Plant Biotechnol*, **33**(3), 161-169, 2006
9. Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG, Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR, *J Exp Bot*, **56**(410), 255-265, 2004
10. Kuiper HA, Kok EJ, Engel KH, Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment, *Curr Opin Chem Biol*, **14**, 238-243, 2003
11. Lachenmeier DW, Humpfer E, Fang F, Schutz B, Dvorsak P, Spraul M, NMR-spectroscopy for nontargeted screening and simultaneous quantification of health-relevant compounds in foods: The example of melamine, *J Agric Food Chem*, **57**, 7194-7199, 2009
12. Son HS, Hwang GS, Kim KM, Ahn HJ, Park WM, Lee CH, Metabolomics studies on geographical grapes and their wines using  $^1\text{H}$  NMR analysis coupled with multivariate statistics, *J Agric Food Chem*, **57**, 1481-1490, 2009



13. Tarachiwin L, Ute K, Kobayashi A, Fukusaki E, <sup>1</sup>H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality, J Agric Food Chem, **55**, 9330-9336, 2007

**유 미 영** 공학박사

소 속 : 한국식품연구원 식품분석센터

전문분야 : 식품공학(천연물화학, 천연물에서 유용한 성분 분리 정제 및 구조분석 연구)

E-mail : myyoo@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9342