

느릅나무 근피의 화학조성분 및 항균성 물질(II): 항균성 물질의 단리 및 화학구조*1

김창순*2 · 이증명*2 · 최장옥*3 · 박성배*2 · 엄태진*2†

Chemical Analysis and Isolation of Antibacterial Compound from *Ulmus* Species (II) : Isolation and Chemical Structure of Antibacterial Compound*1

Chang-Soon Kim*2 · Jung-Myoung Lee*2 · Chang-Ok Choi*3 ·
Soung-Bae Park*2 · Tae-Jin Eom*2

요 약

느릅나무 근피의 메탄올 추출물을 분획하여 항균성을 측정된 결과 항균력이 가장 우수한 수용성 분획을 silicagel column chromatography 및 TLC에 의해 분리·정제한 다음 정제 화합물을 UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR를 사용하여 구조를 동정하고 그 화합물의 항균력을 검정하였다. 수용성 분획물로부터 두 종류의 정제 화합물을 단리하였다. 기기분석 결과, 화합물 B는 Catechin rhamnoside로 확인되었다. 단리된 정제화합물은 *Staphylococcus aureus* 및 *Salmonella typhimurium*에 대하여 항균활성을 나타내었다.

ABSTRACT

The methanol extractives from root bark of *Ulmus davidiana* var *japonica* nakai were fractionated with *n*-hexane, ethyl ether, ethyl acetate and water, the water soluble fraction was also fractionated with silicagel column chromatography. The chemical structure of purified compounds were identified with UV, IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra and the antibacterial activities also were investigated. Two different

*1 접수 2002년 3월 13일, 채택 2002년 5월 30일

*1 경북대학교 임산공학과, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

*3 경북산림환경연구소 Kyungpook Forest Environmental Institute, Kyungju Korea

† 주저자(corresponding author) : 엄태진(e-mail: tjeom@knu.ac.kr)

antibacterial compounds (compound A and B) were fractionated with silicagel chromatography and TLC. Compounds B was identified as a catechin rahnmoside. The both of compounds had antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*.

Keywords: methanol extractives, *ulmus* species, antibacterial activity, identification, silicagel chromatography, TLC

1. 서 론

느릅나무과 수목의 줄기나 뿌리의 껍질을 말린 것을 유백피 혹은 유근백피라고 하며 한방에서는 이뇨, 부종, 거담 등에 약효가 우수한 것으로 알려져 있으며 최근 이 등(1992)은 유백피 추출성분의 항세균 작용에 대하여 보고하였다.

백피 혹은 유근백피 중의 생리활성 물질로서 분리 동정된 성분은 몇 가지가 있는데 먼저, 근피로부터 flavonoid인 (+)-catechin과 배당체로서 (+)-catechin-5-O- β -D-apiofuranoside (Son et al, 1989), 수피로부터 friedelin, epifriedelin, taraxerol 등 3종의 triterpenoid (Hong et al, 1990)가 분리되어 보고되었고 참느릅나무로부터 7-hydroxycadalalenal (Chen et al, 1990), mansonone C, mansonone G (Fracheboud et al, 1968), sitosterol, lignan 등을 비롯하여 cadalemic sesquiterpene 및 calamenic sesquiterpene Tanaka et al, 1966) 등 다양한 화합물들이 분리 보고되었다. 또 당느릅나무로부터 모두 세 개의 isoprenoid 골격을 갖는 sesquiterpenoid로서 특히 heterocyclic ring을 갖는 천연에서 매우 드문 *ortho*-naphthoquinone가 보고되었다(김, 1995).

본 연구에서는 느릅나무 근피의 MeOH 추출물 분획 중 항균력이 우수한 수용성 분획물을 Silica gel column chromatography, TLC를 사용하여 분리 정제한 다음 기기분석을 통하여 화학구조를 동정하고, 그 화합물의 항균력을 측정하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료 및 균주

2.1.1. 공시재료

경북 산림환경 연구소 내에 식재되어 있는 6년생 느릅나무 뿌리를 채취하여 수피부를 기건 건조시킨 후 분쇄하였다. 2 kg의 근피를 2.5 L의 1급 메탄올에 3일간 2회 침적시킨 후 여과액을 농축하였다. 농축 건고물에 300 mL의 증류수를 가해 초음파를 쏘이면서 용해하고 *n*-hexane, ethyl ether, ethylacetate 각 600 mL를 이용하여 순차 분획하였고 각 분획 중 항균성이 제일 우수한 수용성 분획 약 100 g을 시료로 하였다.

2.1.2. 공시균주

항균성 실험에 사용된 균주는 *Staphylococcus aureus*과 *Salmonella typhimurium*을 한국유전자은행에서 분양받아 사용하였다.

2.2. 추출물의 단리·정제 및 기기분석

추출물의 정제를 위하여 수용성 분획 10 g을 메탄올에 용해시킨 후 Table 1과 같은 조건으로 column chromatography를 행하였다. 얻어진 150개의 분획(각 20 mL)의 순도 확인을 위하여 Table 2의 조건으로 TLC를 행하였다.

정제화합물의 화학구조를 동정을 위하여 UV spectrum은 UV-160A UV-Visible Recording Spectrophotometer (Shimadzu) 기종을 사용하여 측정하였으며, Wavelength는 200~400으로 하였다. IR

Table 1. Condition of column chromatography

Glass column	φ 5 cm × 80 cm
Stationary phase	Silica gel
Mobile phase	CHCl ₃ : MeOH (9:1→1:1, v/v)

Table 2. Condition of thin layer chromatography

Stationary phase	Silica gel
Mobile phase	CHCl ₃ : MeOH (6:4, v/v)
UV detect	254 nm
Coloration	3% H ₂ SO ₄

spectrum은 KBr법에 의하여 시료 2 mg을 KBr 20 mg에 섞어 정제 형성기를 사용하여 tablet으로 만든 다음 FT-IR spectrometer (Mattson Instrument, Inc., Galaxy 7020A)를 사용하여 측정하였다.

¹H-NMR spectrum은 Varian unity INOVA (500 MHz)기종을 사용하여 500 MHz에서 측정하였고, 측정온도는 25°C였다. 내부표준물질은 TMS (tetramethylsilane, δ 0.00 ppm)를 사용하여 시료의 각 signal과 TMS 사이의 간격을 ppm 단위로 표기하였으며, 각 signal의 결합정수는 Hz단위로 표기하였다. 측정용 용매인 DMSO-d₆는 Aldrich사로부터 구입하여 사용하였다. ¹³C-NMR spectrum은 Varian unity INOVA (500 MHz)기종을 사용해서 125 MHz에서 측정하였으며, 측정용 용매는 DMSO-d₆ 측정온도는 25°C였다.

정제화합물의 A와 B의 각종 spectrum의 특성은 다음과 같다.

Compound A - UV, λ_{max} (log ε) 220, 280 nm; IR, ν_{max}^{KBr} 3418(OH), 1737(C=O), 1614, 1516, 1462 (aromatic C=C), 1111, 1047(C-O) cm⁻¹; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.46, 3.85, 4.58, 6.1, 6.59~6.73, 3.3~3.8, 1.19 ppm

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ: 65.66, 70.36, 79.19, 114.80, 130.23, 144.75, 69.43, 71.83 ppm

Compound B - UV, λ_{max} (log ε) 220(5.45), 281(4.78) nm; IR, ν_{max}^{KBr} 3418(OH), 1626, 1518, 1444 (aromatic C=C), 1107, 1046(C-O) cm⁻¹; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 4.55(1H, d,

J=7.1Hz, H-2), 3.85(1H, m, H-3), 2.41(1H, dd, J=7.7, 16.2Hz, H-4), 2.67(1H, dd, J=5.1, 16.2Hz, H-5), 5.89(1H, d, J=2.1Hz, H-6), 6.09(1H, d, J=2.2Hz, H-8), 6.58~6.72(3H, m, H-2', H-5', H-6'), 5.33(1H, d, J=3.7, H-1''), 3.38~4.03(4H, m, Rha-H), 1.12(3H, d, J=6.1, H-6'')

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ: 80.90(C-2), 65.91(C-3), 27.41(C-4), 155.14(C-5), 95.61(C-6), 156.19(C-7), 94.70(C-8), 156.16(C-9), 101.60(C-10), 130.29(C-1'), 114.31(C-2'), 144.75(C-3'), 144.75(C-4'), 115.03(C-5'), 118.11(C-6'), 101.95(C-1''), 70.47(C-2''), 70.17(C-3''), 71.84(C-4''), 69.96(C-5''), 29.48(C-6'')

2.3. 항균성 시험

멸균된 Luria bertani agar배지를 petri dish에 분주하여 하층배지를 만들고 1 mL의 균체 현탁액을 도말한 후 paper disc(지름 8 mm, 두께 0.7 mm)를 놓고 DMSO 혹은 Methanol에 용해된 정제 화합물 50 μL를 주입하였다. 접종된 배지를 37°C의 배양기에서 36시간 배양한 후 생육 저지환의 직경을 측정하였다.

2.4. 정제물의 가수분해 및 TLC

정제 화합물을 5% HCl-60% dioxane 용액으로 비등수욕상에서 가수분해시킨 후 감압농축하고 얼음물에 가하여 석출되는 침전물을 여과 제거하였다. 여과액을 Ag₂CO₃로 중화시킨 후 표품(sigma Co.)의 rhamnose, glucose, xylose, mannose 등과 함께 TLC를 전개하였다(전개용매: CHCl₃: MeOH: H₂O = 82:28:8).

3. 결과 및 고찰

3.1. 항균 물질의 분리·정제

항균력이 우수한 수층의 용매추출 잔사물을 silica gel column으로 분획하며 전개용매를 CHCl₃: MeOH

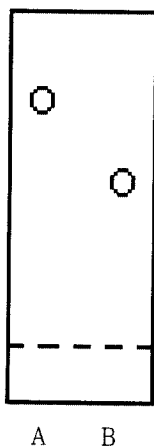


Fig. 1. TLC of the Compound A and B Mobile Phase - $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (6 : 4) Detection : H_2SO_4 reagent (3%).

(9 : 1→1 : 1, v/v)로 gradient elution시켜 150개의 소분획을 받았다. 분리된 소분획들을 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH}$ (6 : 4, v/v)의 전개용매로 전개시켜 UV Detector (254 nm)로 검정한 후 3% 황산 용액으로 발색시켜 spot을 확인하였다. 소분획들을 TLC로 전개하여 Rf 치가 비슷한 것들을 확인하여 각각 15번부터 20번까지를 Compound A라 하고, 24번부터 27번까지를 Compound B라 하였다. 이상의 Compound A, Compound B분획은 매우 소량이기 때문에 silica gel column정제를 수회 반복하여 많은 양을 받아낸 후 재차 silicagel에 의하여 용출시켜 정제 순도를 높였다.

Fig. 1에 Compound A, Compound B를 TLC 전개시킨 결과를 나타내었다. UV 조사에 의해서는 흡광 band가 잘 나타나지 않았지만, 3% 황산 용액으로 발색시켰을 경우 Compound A는 푸른색을 띠고 Compound B는 갈색을 띠는 단일 화합물임을 확인하였다.

3.2. 항균 물질의 화학구조동정

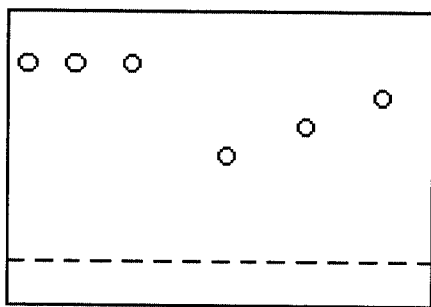
Compound A, B의 UV spectrum을 보면 220 nm 와 280 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 것으로 보아 benzene고리를 갖는 화합물로 사려되며, Compound A의 IR spectrum은 $3,418\text{ cm}^{-1}$ 에서 OH기, $1,737$

cm^{-1} 에서의 carbonyl기 유래의 peak를 보이고, $1,614, 1,516, 1,462\text{ cm}^{-1}$ 에서 benzene고리에서 유래된 CH band가 보였다. Compound B의 IR spectrum은 $3,418\text{ cm}^{-1}$ 에서 OH, $1,626, 1,518, 1,444\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic C=C band, $1,107, 1,046\text{ cm}^{-1}$ 에서 C-O 유래의 band를 확인할 수 있었다.

Compound A의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 benzene에서 유래되는 proton shift 값은 2.46, 3.85, 4.58, 6.1, 6.59~6.73 ppm에서, 당에서 유래되는 proton shift 값은 3.3~3.8 사이에서 1.19 ppm에서 나타났고, Compound A의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum은 benzene에서 유래되는 carbon shift 값은 65.66, 70.36, 79.19, 114.80, 130.23, 144.75 ppm에서 나타났고, 당에서 유래되는 carbon shift 값은 69.43, 71.83 ppm에서 나타났다. 기기분석 결과 Compound A는 catechin rhamnoside의 산화물인 것으로 추정되고, Compound B의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 δ 2.41 및 2.61 ppm에서 나타내는 2개의 doublets of doublet는 각각 1H에 해당하며 이들 proton은 3.85 ppm 에서 나타나는 multiplet과 강하게 correlation함을 알 수 있고 이 multiplet는 다시 δ 4.55 ppm에서 나타나는 doublet ($J=7.1\text{ Hz}$)와 correlation하고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 proton signal의 연계 및 coupling pattern 은 catechin류의 전형적인 pattern임을 확인할 수 있으며 각각 H-4, H-3 및 H-2로 assignment 할 수 있었다. 또한 H-2의 coupling constant가 7.1 Hz로 나타나는 것으로 보아 C-2 및 C-3에 결합된 수소는 서로 trans로 결합되어 있음을 알 수 있으므로 epicatechin류 보다는 catechin류로 결정할 수 있었으며 이와 같은 결과는 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 80.90 ppm에서 C-2의 carbon signal이 나타나는 것으로 이를 확정할 수 있었다.

또, Fig. 2는 Compound A, B의 가수분해물을 표준품들과 함께 박층크로마토그래피를 한 결과로서 CHCl_3 과 Me-OH과 물을 전개용매로 하여 Rf치를 측정한 결과, Compound A와 B는 rhamnose와 비슷한 Rf치를 나타냈고 glucose와 galactose, 그리고 xylose와는 다른 Rf치를 나타내는 것으로 보아 rhamnose의 배당체인 것으로 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 화합물 B는 Fig. 3과 같은 구조



A B Rha. Gal. Glu. Xyl.

Fig. 2. TLC of sugars from hydrolyzed Compound A, B Mobile Phase - CHCl₃/MeOH/H₂O (52 : 28 : 8) Detection : H₂SO₄ reagent (3%).

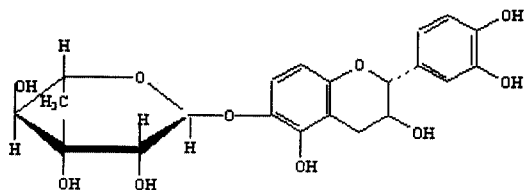


Fig. 3. The structure model obtained from Compound B.

의 catechin rhamnoside인 것을 확인할 수 있다. Fig. 3은 catechin rhamnoside의 화학구조를 나타내고 있다.

3.3. Compound A, B의 항균성 검정

Compound A, B의 항균성을 측정된 결과를 Table 3, 4에 나타내었다.

메탄올 추출물의 수층으로부터 단리한 Compound A, B는 매우 낮은 농도에서도 생리 식염수 중에는 침전을 보이는 경향이 있었기 때문에 DMSO, MeOH에 녹여 100 PPM 농도로 만든 후 항균력을 측정된 결과 Compound A는 DMSO로 녹인 경우 균주에 대한 활성이 나타났으며, 시간이 흐름에 따라 생육저지환이 커졌고, Compound B는 *S. aureus*, *S. typhimurium* 균 모두에서 MeOH에 녹인 경우 균주에 대한 활성이

Table 3. Inhibitory effect of Compound A, B on *S. typhimurium*

Sample	Solvent	Diameter (mm) of inhibition zone during the culture period (hr.)			
		0	12	24	36
A	DMSO	-	2	3	5
	Me-OH	-	-	-	-
B	DMSO	-	-	-	-
	Me-OH	-	3	5	6

A : Compound A, B : Compound B, DMSO : Dimethyl Sulfoxide Me-OH : Methanol

Table 4. Inhibitory effect of Compound A, B on *S. aureus*

Sample	Solvent	Diameter (mm) of inhibition zone during the culture period (hr.)			
		0	12	24	36
A	DMSO	-	3	6	8
	Me-OH	-	-	-	-
B	DMSO	-	-	-	-
	Me-OH	-	4	6	9

A : Compound A, B : Compound B, DMSO : Dimethyl Sulfoxide Me-OH : Methanol

나타났으며 DMSO에서는 항균력이 나타나지 않았다. 저지대의 폭은 각각 5~9 mm 정도로 나타났고, *S. aureus*에서 좀더 강한 활성을 나타냈다.

이상과 같은 결과로부터 compound A와 B에 있어서 용제에 따라 항균력의 차이를 보이는 것은 compound A와 B의 DMSO와 메탄올에 대한 용해도가 같지 않은 것에 기인하는 것으로 용해도가 낮은 용제에 용해시킨 경우 compound A와 B가 시험용 paper disk로부터 배지 중으로 확산되기 어렵기 때문에 compound A와 B가 균과의 접촉이 제한되므로 항균성을 발휘할 수 없게 되었기 때문으로 생각된다.

4. 결 론

느릅나무 근피의 메탄을 추출물을 각 용제에 의해 분획하여 항균성을 측정한 결과 항균력이 가장 우수한 수층을 silicagel column chromatography, TLC를 사용하여 분리, 정제한 다음 정제된 화합물을 UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 를 사용하여 구조를 동정한 후 그 화합물의 항균력을 검정하였다.

1) 항균력이 우수한 수층 분획물을 silicagel column으로 분획하여 TLC로 2개의 각기 다른 화합물을 얻었다.

2) 잔사물에서 단리한 Compound B를 분석기기를 사용하여 구조로 동정한 결과 Catechin rhamnoside로 확인되었다.

3) Compound A, B를 MeOH, DMSO에 녹여 항균력을 검정한 결과 Compound A에서는 DMSO에서 녹은 물질이 균주에 대하여 활성을 나타냈고, Compound B에서는 MeOH에서 녹은 물질이 균주에 대하여 활성을 나타냈다.

참 고 문 헌

1. Chen, C. M., Chen, Z. T., and Y. L. Hong. 1990. A mansonone from *Helicters angustifolia*. *Phytochemistry*. 29: 980~982.
2. Fracheboud, M., ROW, J. W., Scott, R. W., Fanega, S. M., Buhl, A. J., and J. K. Toda. 1968. New sesquiterpenes from yellow wood of slippery elm. *Forest. Products. J.* 18: 37~40.
3. Hong, N. D., Rho, Y. S., Kim, N. J., and J. S. Kim. 1990. A study on constituents of *Ulmi cortex*. *Kor. J. Pharmacogn.* 21: 201~204.
4. Tanaka, N., Yasue, M., and H. Imamura, 1966, The chemistry of wood extractives. XIV. - Constituents of *Mananmia altissima*(I), *J. Japan Wood Res. Soc.* 12: 289~292.
5. Son, B. H., Park, J. H., and O. P. Zee. 1989. Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*. *Arch. Pharm. Res.* 12: 219~222.
6. 김종평. 1995, 당느릅나무로부터 분리한 신규 sesquiterpene quinone 화합물의 화학구조 및 항암활성, 서울대학교 박사학위논문, pp. 3~4.
7. 이홍용, 김치경, 성태경, 문택규, 임치주. 1992, Antibacterial activity of *Ulmus pumila* L extract, *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 20(1): 1~5.