

GC-MS에 의한 대파의 항산화 물질 동정

서지우 · 조정용 · 국주희 · 위지향 · 문제학¹ · 김성호² · 박근형*
전남대학교 식품공학과 및 농업과학기술연구소
¹전국대학교 응용생물화학과 · 농업자원개발연구소, ²진도군 농업기술센터

Identification of Antioxidative Substances in *Allium fistulosum* L. by GC-MS

Gee-Woo Seo, Jeong-Yong Cho, Ju-Hee Kuk, Ji-Hyang Wee,
Jae-Hak Moon¹, Sung-Ho Kim² and Keun-Hyung Park*

Department of Food Science and Technology and Institute of Agricultural Science and Technology,
Chonnam National University

¹Department of Applied Biology and Chemistry, The Research Institute of Agricultural Resource Development,
Konkuk University

²Jindo Agricultural Technology Center

The ethyl acetate-soluble acidic fraction of juice, hot water, and MeOH extract of *Allium fistulosum* L. showed DPPH radical-scavenging activity. Each fraction was purified through silica gel adsorption column chromatography, and the active substances in the juice and hot water extract were identified as succinic acid, fumaric acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, and 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid. For the MeOH extract, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, and 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid were identified as the active substances by GC-MS. The contents of these compounds were determined by GC analysis, and their anti-oxidative activities were measured using the DPPH radical-scavenging assay. The results obtained showed that 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid was the dominant antioxidant in *Allium fistulosum* L.

Key words: *Allium fistulosum* L., antioxidative substances, DPPH radical scavenging, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, GC-MS

서 론

자유라디칼 혹은 활성산소에 의한 생체 내 산화는 암, 각종 성인병 및 노화의 원인이 된다고 알려져 있으며, 항산화 물질은 산화에 의한 질병예방 및 노화억제에 효과가 있는 것으로 알려져 있어 최근 기능성 소재로서의 항산화제에 대한 관심이 고조되고 있다⁽¹⁻⁴⁾. 합성항산화제인 BHA와 BHT 등은 탁월한 항산화력과 경제성 때문에 널리 이용되어 왔으나 생체효소의 활성을 억제하고 암을 유발시키는 등 안전성 여부가 논란이 되면서 소비자의 기피 현상이 보이자^(5,6), 천연의 생물자원에서부터 항산화 물질을 개발하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다⁽⁷⁻¹²⁾.

한편, 대파(*Allium fistulosum* L.)는 국내 생산량의 약 20%가 진도지역에서 재배되고 있으며, 특히 다른 재배지역에서 수확 및 재배가 불가능한 겨울철에도 진도에서는 생육과 수확작업이 가능하여 겨울 대파로 그 명성이 전국적으로 유명하다. 대파는 발한, 해독, 소종 등의 효과가 있다고 구전되어 왔으나, 대파의 기능성에 관한 연구는 대파 수용성추출물이 혈소판 응집 억제작용⁽¹³⁾, 대파에 함유된 α -tocopherol의 함량에 관한 보고⁽¹⁴⁾가 있을 뿐 기능성 물질에 관한 연구는 거의 수행되어진 바가 없다.

본 연구에서는, 대파에 존재하는 항산화 기능을 갖는 물질을 탐색하고 발굴하여 대파의 식품적 가치를 재인식하고, 대파의 항산화 기능성물질을 구명함으로써 대파를 식품소재로 이용하는데 도움되고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 대파(*Allium fistulosum* L.)는 전라남도 진

*Corresponding author: Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, 300, Yongbong-dong, Buk-gu, Gwangju 500-757, Korea
Tel: 82-62-530-2143
Fax: 82-62-530-2149
E-mail: khpark@chonnam.ac.kr

도근 지산면에서 재배된 것을 12월에 수확하여 시료로 사용하였다.

활성물질의 추출 및 정제

대파추출물은 대파(1 kg)를 착즙 및 과량의 열수와 methanol (MeOH)로 추출하여 각각의 추출물을 얻었다. 대파 착즙액은 대파를 착즙기(Juice master MJ-A1, National, Japan)로 착즙하여 얻었으며, 열수추출은 90°C로 유지된 항온수조에서 대파를 90°C의 열수로 30분간 추출하여 원심분리(6,000 rpm, 30 min)하여 열수추출물을 얻었다. 또한, 대파를 MeOH로 24시간 동안 상온에서 침지시켜 여과한 후 40°C 이하에서 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다.

대파의 착즙액과 열수추출물을 1.0 N HCl로 pH 3.0으로 조정된 다음, ethyl acetate(EtOAc)로 분배하여 수용액 획분(aqueous layer)과 EtOAc 가용 산성·중성획분(EtOAc-soluble acidic·neutral fraction)을 얻었다. EtOAc 가용 산성·중성획분을 완충용액(5% NaHCO₃, pH 8.0)으로 분배하여 EtOAc 가용 중성획분(EtOAc-soluble neutral fraction)과 수용액획분으로 분획하였으며, 얻어진 수용액획분에 1.0 N HCl을 가하여 pH 3.0으로 조정된 후, EtOAc로 분배하여 EtOAc 가용 산성획분(EtOAc-soluble acidic fraction)을 얻었다. 한편 대파 MeOH 추출물은 EtOAc와 5% NaHCO₃ 완충용액(pH 8.0)으로 분배하여 수용액획분과 EtOAc 가용 중성획분을 얻었고, 여기서 얻어진 수용액획분을 1.0 N HCl로 pH 3.0으로 조정된 후, EtOAc로 분배하여 EtOAc 가용 산성획분을 얻었다⁽¹⁵⁾.

대파 착즙액, 열수추출물 및 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분을 Kuk 등⁽¹⁶⁾의 방법에 의해 각각 silica gel column chromatography에 의해 정제하였다. Silica gel adsorption column chromatography는 silica gel(10 g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck사, Darmstadt, Germany)을 *n*-hexane/EtOAc/MeOH(8:6:1, v/v)의 용매계로 slurry를 만들어 column에 충전시킨 후, 각각의 EtOAc 산성획분을 소량의 *n*-hexane/EtOAc/MeOH(8:6:1, v/v)에 녹여 column에 주입한 후 *n*-hexane/EtOAc/MeOH 용매계 8:6:1, 6:8:1, 4:10:1, 2:12:1, 0:14:1, 0:0:15(v/v)의 순으로 극성을 증가시키는 단계용출 방법으로 용출분획하여, 얻어진 각각의 획분을 대상으로 활성을 검정하였다.

GC-MS 분석에 의한 항산화 물질의 동정

Silica gel adsorption column chromatography에 의해 얻어진 대파 착즙액, 열수추출물 및 MeOH 추출물 등 각각의 활성획분에 함유된 항산화 물질의 동정은 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)분석에 의하였다. GC-MS 분석은 gas chromatograph(Varian STAR 3400CX, Walnut Creek, CA, USA; Rtx-1 capillary column, 0.32 mm×30 m, Varian, Walnut Creek, CA, USA)를 mass spectrometer(Varian SATURN 4D, Walnut Creek, CA, USA)에 장착한 기기를 사용하여 ion source 온도 200°C, ionizing voltage 70 eV 조건으로 분석하였다. GC의 injector 온도 220°C, oven 온도는 처음 2분 동안 100°C로 유지하였고, 승온 속도를 5°C/min으로 하여 최종온도가 240°C가 되도록 한 후 5분간 240°C를 유지하도록 하였다.

Trimethylsilyl(TMS) 유도체화는 활성획분 10 µg에 NaOH로 건조시킨 pyridine과 *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide(Fluka, Switzerland), 그리고 trimethylchlorosilane(Fluka, Switzerland)을 10:5:1(v/v)로 혼합한 시약 20 µL를 가하여 vortex mixer로 혼합한 후, 65°C의 heating block에서 30분간 반응시켜 GC-MS 분석용 시료로 하였다⁽¹⁵⁾.

GC-MS 분석용 표준시약으로는 succinic acid(Sigma, St. Louis, MO), fumaric acid(Sigma, St. Louis, MO), 4-hydroxybenzoic acid(Junsei, Japan), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid(Sigma, St. Louis, MO), 4-hydroxycinnamic acid(Sigma, St. Louis, MO), 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid(Kasei, Japan)를 사용하였다.

동정된 물질의 함량 측정

대파 착즙액, 열수추출물, MeOH 추출물에서 항산화 활성 물질로 동정된 화합물들의 함량은 윤 등⁽¹⁵⁾의 방법에 의해 GC 분석에 의해 측정하였다. 즉, 대파 착즙액, 열수추출물, MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 각각의 EtOAc 가용 산성획분들을 silica gel adsorption column chromatography한 후 *n*-hexane/EtOAc/MeOH(8:6:1, v/v) 획분의 일부를 취하여 TMS 유도체화 하여 GC-MS 분석하였다. 3회 반복 분석한 후 얻어진 GC의 각 활성 물질의 면적을 구하고, 같은 조건에서 각 표준품의 peak 면적에 의한 검량곡선을 작성하여 정량 하였다. 또한, 각 표준품을 동일한 방법으로 처리하여 산출된 각 표준품의 회수율을 측정하였다.

항산화 활성 측정

DPPH radical-scavenging 활성은 Abe 등⁽¹⁸⁾의 방법에 의해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH; Sigma, St. Louis, MO) ethanol 용액(100 µM) 900 µL와 시료용액 100 µL를 시험관에 넣고 vortex mixer로 30초간 혼합한 다음 암소에서 10분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 비교구로는 α -tocopherol(Sigma, St. Louis, MO)을 사용하였다. 이때 α -tocopherol 농도의 증가에 따라 흡광도가 더 이상 변하지 않는 농도를 측정하여 그 농도를 100% DPPH radical-scavenging 농도로 하였다. 그 비교구에 대하여 DPPH radical이 50% scavenging 되어진 농도를 SC₅₀으로 나타냈다.

분리 및 정제 과정 중 항산화 활성 검정은 Takao 등⁽¹⁹⁾의 방법에 의해 시료를 TLC plate에 spotting하여 적절한 용매계로 전개한 후, DPPH 용액(200 µM in ethanol)을 plate에 분무하여 보라색이 탈색되어진 부분을 항산화 활성 양성으로 판정하였다.

결과 및 고찰

대파 각 추출물의 용매 분획물의 항산화 활성

얻어진 대파 착즙액, 열수추출물, MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분(수율: 착즙액, 96.1 mg; 열수추출물, 64.3 mg; MeOH 추출물, 39.5 mg)과 EtOAc 가용 중성획분(수율: 착즙액, 258.0 mg; 열수추출물, 71.2 mg; MeOH 추출물, 313.2 mg)을 대상으로 시료의 농도별 DPPH radical-scavenging 활성을 측정하였다. 얻어진 활성곡선(Fig. 1)으로부터 산출된

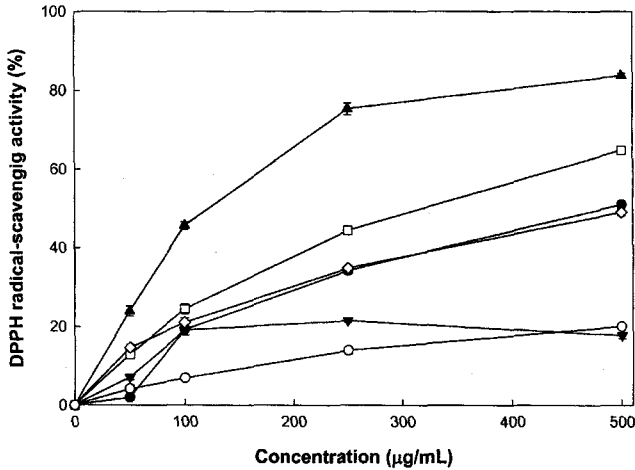


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of solvent fractionated in *Allium fistulosum* L.

Data are shown as the mean \pm S.D. (n=3). -◇-: EtOAc-soluble acidic fraction of juice, -○-: EtOAc-soluble neutral fraction of juice, -●-: EtOAc-soluble acidic fraction of hot water extract, -□-: EtOAc-soluble neutral fraction of hot water extract, -▲-: EtOAc-soluble acidic fraction of MeOH extract, -▼-: EtOAc-soluble neutral fraction of MeOH extract.

50% DPPH radical 소거능(SC₅₀) 값은 열수추출물의 산성획분이 487 µg/mL, 열수추출물의 중성획분이 321 µg/mL, 착즙액의 산성획분이 500 µg/mL, MeOH 추출물의 산성획분이 124 µg/mL로 측정되었다. 즉, 대파의 착즙액, 열수추출물, MeOH 추출물에서 얻어진 산성 및 중성획분 모두 항산화 활성을 나타내어 대파의 착즙액, 열수추출물, MeOH 추출물은 모두 항산화 활성물질을 함유하고 있다고 판단되었다. 이에 활성을 갖는 각각의 획분들에 함유된 활성본체를 구명하고자 대파 착즙액, 열수추출물, MeOH 추출물 중 보다 활성이 높았던 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 항산화 활성물질의 동정을 먼저 시도하였다.

대파 착즙액의 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 항산화 물질의 동정

먼저 대파 착즙액의 EtOAc 가용 산성획분을 대상으로 n-hexane/EtOAc/MeOH 용매계의 silica gel adsorption column chromatography를 실시하여 항산화 활성을 조사하였다. 그 결과 n-hexane/EtOAc/MeOH 8:6:1(v/v) 용출획분에서 활성이 나타났다. 이 활성획분에 함유된 활성본체는 EtOAc 가용 산성물질이며 silica gel 흡착 chromatography의 용출 양상⁽¹⁵⁾으로 보아 phenolic 물질로 추정되어 이들 물질의 구명을 위해 그 일부를 TMS 유도체화 한 다음 GC-MS에 의해 분석하였다. 그 결과(Fig. 2), retention time(*t_R*)이 다른 다수의 peak가 나타났으며 이 peak로부터 MS spectrum을 얻었다. 얻어진 각 MS spectrum을 대상으로 Wiley 5 library 검색을 실시하여 구조가 확인된 peak는 다음과 같다.

t_R 4.84분에 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum은 molecular ion peak가 *m/z* 262에 그리고 그 이외의 fragment ion이 *m/z* 247, 173, 147(base peak)에 나타나, succinic acid의 2개

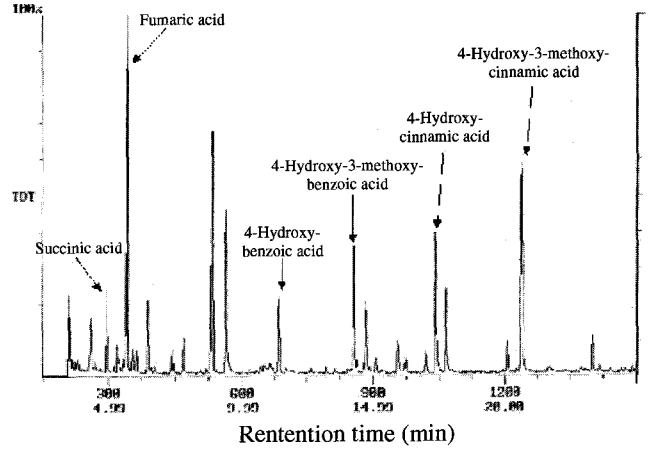


Fig. 2. GC chromatogram of the active fraction from juice of *Allium fistulosum* L.

의 COOH기에 TMS가 도입된 구조의 MS spectrum과 일치하여 succinic acid(C₁₀H₂₂O₄Si₂)의 가능성을 나타냈다.

t_R 5.59분에 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum은 molecular ion이 *m/z* 260에 그리고 그 이외의 fragment ion으로 *m/z* 245(base peak), 217, 189, 147 등의 ion이 관측되어 2개의 COOH기에 TMS가 도입된 fumaric acid(C₁₀H₂₀O₄Si₂)의 가능성을 나타냈다.

t_R 11.83분에 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum은 molecular ion이 *m/z* 282에 그리고 fragment ion으로 *m/z* 267(base peak), 193의 ion이 관측되어 OH기와 COOH기에 TMS가 도입된 4-hydroxybenzoic acid(C₁₃H₂₂O₃Si₂)의 가능성을 나타냈다.

t_R 14.33분의 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum은 molecular ion이 base peak로 *m/z* 312에 그리고 fragment ion으로 *m/z* 282, 267, 253, 223의 signal이 관측되어 OH기와 COOH기에 TMS가 도입된 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid(C₁₄H₂₄O₄Si₂)의 가능성을 나타냈다.

t_R 17.78분의 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum으로부터 molecular ion이 *m/z* 308에 그리고 fragment ion으로 *m/z* 293, 219의 ion이 관측되어 4-hydroxycinnamic acid의 OH기와 COOH기에 TMS가 도입된 구조의 가능성을 나타냈다.

t_R 20.68분의 peak를 갖는 MS spectrum으로부터 molecular ion이 base peak로 *m/z* 338에, 그리고 fragment ion으로 *m/z* 323, 308의 ion이 관측되어 OH기와 COOH기에 TMS가 도입된 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid(C₁₆H₂₇O₄Si₂)의 가능성을 나타냈다. 이들 화합물의 각각의 *t_R* 및 MS data를 Table 1에 나타냈다.

Library 검색에 의해 제시된 6종 물질의 표준품을 동일한 조건과 방법에 의해 TMS화 하여 GC-MS 분석한 결과, GC의 *t_R* 및 MS spectrum이 각 화합물과 모두 일치하여 대파 착즙액의 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 6종의 화합물은 succinic acid, fumaric acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, 그리고 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid로 각각 동정되었다.

Table 1. GC-MS data of the trimethylsilylated compounds identified in *Allium fistulosum* L.

t_R (min)	Compounds	Prominent ion m/z (relative intensity, %)	Source
4.84	Succinic acid	262(0.3), 247(10.6), 173(9.8), 147(100)	Juice Hot water extract
5.59	Fumaric acid	260 (1.6), 245(100), 217(10.6), 189(4.9), 147(74.0)	Juice Hot water extract
11.83	4-Hydroxybenzoic acid	282(11.4), 267(100), 193(25.2)	Juice Hot water extract MeOH extract
14.33	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	312(100), 282(73.2), 267(72.4), 253(32.5), 223(43.9)	Juice Hot water extract MeOH extract
17.78	4-Hydroxycinnamic acid	308(73.2), 293(100), 219(56.1)	Juice Hot water extract MeOH extract
20.68	4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid	338(100), 323(21.1), 308(6.5)	Juicet Hot water extract MeOH extract

대파 열수추출물의 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 항산화 물질의 동정

대파 열수추출물의 EtOAc 가용 산성획분을 silica gel adsorption column chromatography로 용출분획하여 활성을 검정한 결과, 대파 착즙액의 분석결과와 같이 *n*-hexane/EtOAc/MeOH 8:6:1(v/v)의 획분에 항산화 활성이 나타나, 이 획분의 일부를 취하여 TMS 유도체화 한 다음 GC-MS 분석을 실시하였다. 그 결과, t_R 4.84분, 5.59분, 11.83분, 14.33분, 17.78분, 20.68분에 peak가 GC chromatogram 상에 관측되었다. 이들 peak의 각각의 t_R 과 MS spectrum은 대파 착즙액에서 동정된 6종의 화합물과 정확히 일치하여, 이들 화합물은 succinic acid, fumaric acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid 그리고 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid로 동정되었다(Table 1).

대파 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 항산화 물질의 동정

대파 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분을 silica gel adsorption column chromatography로 용출분획하여 활성을 검정한 결과, 대파 착즙액 및 열수추출물과 마찬가지로 *n*-hexane/EtOAc/MeOH 8:6:1(v/v)의 획분에서 항산화 활성이 나타났다. 이에, 이 획분의 일부를 취하여 TMS 유도체화 한 다음 GC-MS 분석을 실시하였다. 그 결과, t_R 11.83분, 14.33분, 17.78분, 20.68분에 peak가 GC chromatogram 상에서 관측되었으며, 이들 화합물은 각각의 t_R 과 MS spectrum이 표준품과 일치하여 각각 4-hydroxybenzoic acid(11.83분), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid(14.33분), 4-hydroxycinnamic acid(17.78분), 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid(20.68분)로 동정되었다(Table 1).

이상의 결과 대파 착즙액, 열수추출물로부터 2종의 유기산(succinic acid, fumaric acid) 및 4종의 phenolic 물질(4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid)이 동정되었으며, MeOH 추출물로부터 4종의 phenolic 물질이 동정되었다. 이들 화합물중 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydrox-

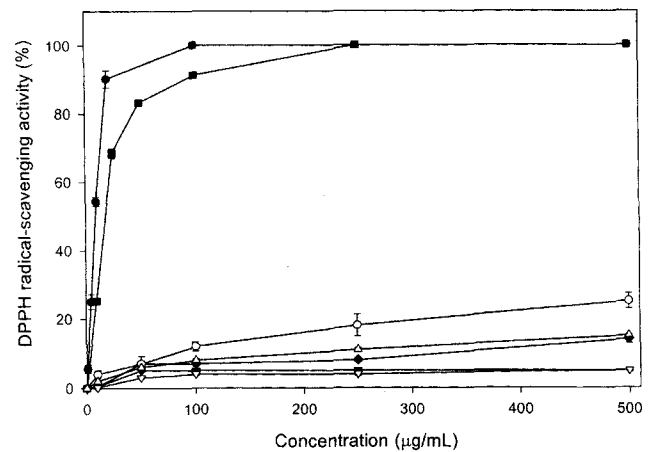


Fig. 3. DPPH radical-scavenging activity of the identified compounds in *Allium fistulosum* L.

Data are shown as the mean \pm S.D. (n=3). -●-: α -tocopherol, -▼-: succinic acid, -◆-: fumaric acid, -△-: 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, -▽-: 4-hydroxybenzoic acid, -○-: 4-hydroxycinnamic acid, -■-: 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid.

ycinnamic acid는 왕겨⁽²⁰⁾, 땅콩껍질⁽²¹⁾, 복분자⁽¹⁵⁾ 등에서, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid는 땅콩껍질⁽²¹⁾, 헛개나무⁽²²⁾, 귀리⁽²³⁾, 보리⁽²⁴⁾ 등에서 항산화 및 항미생물 활성물질로 동정된 바 있으나, 대파로부터 이들 phenolic acids가 항산화 활성물질로 동정된 것은 처음으로 생각된다.

동정된 물질의 항산화 활성

대파에서 동정된 6종의 화합물을 대상으로 시료의 농도별 DPPH radical-scavenging 활성을 측정하여 Fig. 3에 제시하였다. 얻어진 활성 곡선으로부터 50% DPPH 라디칼의 소거 농도(SC₅₀) 값은 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid가 14 µg/mL로 측정되어 천연 항산화제인 α -tocopherol(8 µg/mL)과 유사한 항산화 활성을 나타냈으며, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid,

Table 2. The content of the identified compounds of *Allium fistulosum* L.

Compounds	Contents ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$) ¹⁾		
	Juice extracts	Hot water extracts	MeOH extracts
Succinic acid	444.5 \pm 63.2	273.8 \pm 17.3	-
Fumaric acid	1921.5 \pm 19.1	135.1 \pm 9.9	-
4-Hydroxybenzoic acid	88.9 \pm 6.1	76.9 \pm 7.5	34.5 \pm 1.5
4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	133.8 \pm 12.1	80.7 \pm 7.6	58.0 \pm 4.2
4-Hydroxycinnamic acid	107.1 \pm 8.0	77.9 \pm 9.2	63.4 \pm 4.4
4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid	395.2 \pm 12.8	203.0 \pm 11.9	159.2 \pm 0.1

¹⁾Data are shown as the mean \pm S.D. (n=3).

succinic acid 그리고 fumaric acid의 SC_{50} 값은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 측정되어, 대파에 함유된 물질 중 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid가 가장 강한 활성을 나타내었다. Phenol성 화합물은 그 phenol성 수산기의 수소 공여능에 의해 라디칼을 소거하고 aryloxy 라디칼을 경유하여 분자내의 전자 이동에 의해 안정화되어진다고 알려져 있으며⁽²⁵⁾, monohydroxyl을 가진 phenol성 화합물에 비해 ortho 위치에 전자 공여능을 가지고 있는 methoxy(-OCH₃)기가 결합된 화합물은 aryloxy radical의 안정성을 더욱 향상시키기 때문에 보다 강한 항산화 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다⁽²⁶⁾. 또한 Natella 등⁽²⁷⁾은 벤젠환에 결합된 관능기로 -COOH를 가지고 있는 benzoic acid 보다는 propenoic side chain (-CH=CHCOOH)을 가지고 있는 cinnamic acid가 더 강한 항산화 활성을 보이는데, 이는 -C=C- 이중결합의 공명이 radical의 안정화에 기여하기 때문이라고 보고한 바 있는데, 본 연구에서도 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid > 4-hydroxycinnamic acid > 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid \geq 4-hydroxybenzoic acid 순으로 활성이 큰 경향을 나타내었다.

GC에 의한 활성물질의 정량분석

대파에 함유된 이들 화합물의 정확한 함량을 분석하기 위해 GC에 의한 정량분석을 실시하였다. 대파 착즙액, 열수추출물, MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 각각의 EtOAc 가용 산성획분을 silica gel adsorption column chromatography에 의해 정제하였다. 여기서 얻어진 활성획분의 일부를 TMS 유도체화 한 후 GC 분석을 실시하여 화합물 각각의 함량을 측정하였으며, 표준품 역시 동일한 방법으로 처리하여 회수율을 측정하였다. 표준품 각각의 회수율을 측정한 결과, succinic acid는 44.6%, fumaric acid는 76.9%, 4-hydroxybenzoic acid는 90.3%, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid는 89.2%, 4-hydroxycinnamic acid는 91.3%, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid는 94.8%였다.

대파착즙액, 열수추출물, MeOH 추출물로부터 동정된 각 활성물질의 함량을 회수율로 보정하여 산출한 결과(Table 2), 대파 착즙액에서는 fumaric acid의 함량이 가장 높게 나타났으며, 다음으로 succinic acid > 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid > 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid > 4-hydroxycinnamic acid > 4-hydroxybenzoic acid의 순으로 나타났다.

열수추출물에서는 succinic acid의 함량이 가장 높게 나타났으며, 다음으로 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid >

fumaric acid > 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid > 4-hydroxycinnamic acid \approx 4-hydroxybenzoic acid의 순으로 나타났다.

MeOH 추출물에서는 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid의 함량이 가장 높게 나타났으며, 다음으로 4-hydroxycinnamic acid > 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid > 4-hydroxybenzoic acid의 순으로 나타났다.

대파에서 동정된 화합물 중, 유기산인 succinic acid와 fumaric acid는 대파 착즙액과 열수추출물로부터는 검출되었으나 대파의 MeOH 추출물에서는 검출되지 않았으며, 유기산의 함량은 추출방법에 의해서도 달라짐을 알 수 있었다. 즉, 대파 착즙액에는 fumaric acid의 함량이 아주 높은 반면에 열수추출물의 경우에는 fumaric acid 보다는 succinic acid의 함량이 더 많은 것으로 나타났다. 한편 4종의 phenolic acids는 대파 3종의 추출물 모두에서 검출되었다. 이중 radical-scavenging 활성이 가장 강했던 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid의 함량이 가장 높았으며, 착즙액과 열수추출물은 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, 4-hydroxybenzoic acid의 순으로 함량을 나타내었으나, MeOH 추출물의 경우에는 4-hydroxycinnamic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid의 순으로 cinnamic acid 유도체 화합물이 benzoic acid 유도체 화합물보다 더 높은 함량을 나타내었다. 추출방법 및 추출용매에 따른 화합물의 함량의 차이는 용매에 대한 용해도 및 친화력의 차이에 의한 것으로 생각된다.

요 약

대파에 함유된 항산화 물질을 구명하고자 대파를 3가지 다른 방법으로 추출하여 대파 착즙액, 열수추출물, MeOH 추출물을 얻었다. 이들 추출물을 각각 용매분획하여 얻어진 EtOAc 가용 산성획분을 silica gel adsorption column chromatography로 정제하여 얻어진 활성획분을 GC-MS 분석하였다. 그 결과, 대파 착즙액과 열수추출물에서는 succinic acid, fumaric acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid 그리고 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid의 6종 화합물이 동정되었으며, MeOH 추출물로부터는 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid, 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid의 4종 화합물이 동정되었다. 동정된 이들 화합물을 대상으로 DPPH radical-scavenging 활성을 검정한 결과,

4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid가 가장 강한 항산화 활성을 나타냈다. 또한 각각의 대파추출물에 함유된 항산화 물질의 함량을 GC에 의해 정량분석한 결과, 대파 착즙액과 열수 추출물 및 MeOH 추출물 모두 강한 항산화 활성을 나타내는 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid가 가장 많이 함유되어 있었다.

감사의 글

이 연구는 목포대학교 식품산업기술연구센터 지원에 의하여 수행된 결과로서 이에 감사드립니다.

문헌

- Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. Antioxidants in Nutrition, Health and Disease, pp. 1-39. Oxford University Press, UK (1994)
- Ames, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens, oxygen radicals and degenerative disease. *Science* 221: 1256-1264 (1983)
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14 (1984)
- Gordon, M.H. Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat. Prod. Rep.* 13: 265-273 (1996)
- Branen, A.L. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 59-63 (1975)
- Omaye, S.T., Reddy, K.A. and Cross, C.E. Effect of butylated hydroxytoluene and other antioxidants on mouse lung metabolism. *J. Toxicol. Environ. Health* 3: 829-836 (1997)
- Yen, G.C., Chen, H.Y. and Peng, H.H. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *J. Agric. Food Chem.* 45: 30-34 (1997)
- 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)
- Lindley, M.G. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 9: 336-340 (1998)
- Kuo, J.M., Yeh, D.B. and Pan, B.S. Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plants material. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3206-3209 (1999)
- Yokozawa, T., Dong, E., Liu, Z.W. and Shimizu, M. Antioxidative activity of flavones and flavonols *in vitro*. *Phytother. Res.* 11:446-449 (1997)
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H. and Kim, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163: 1161-1168 (2002)
- Seo, D.C., Chung, S.M., Lee, J.Y., Kim, Y.S. and Chung, J.H. Effect of oriental onion (*Allium fistulosum*) on platelet aggregation. *J. Food Hyg. Saf.* 11: 273-276 (1996)
- Ching, L.S. and Mohamed, S. Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3101-3105 (2001)
- Yoon, I., Cho, J.Y., Kuk, J.H., Wee, J.H., Jang, M.Y., Ahn, T.H. and Park, K.H. Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanum* fruit. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 898-904 (2002)
- Kuk, J.H., Ma, S.J., Moon, J.H., Kim, K.Y., Choi, S.H. and Park, K.H. Antibacterial and antifungal activities of a naphthoquinone derivative isolated from the fruits of *Catalpa ovata* G. DON. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12:858-863 (2002)
- Cho, J.Y., Kim, H.K., Ma, S.J., Moon, J.H. and Park, K.H. Isolation and identification of azelaic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid from buckwheat hull as antimicrobial substances. *Food Sci. Biotechnol.* 9: 313-316 (2000)
- Abe, N., Nemoto, A., Tsuchiya, Y., Hojo, H. and Hirota, A. Studies of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a 2-pyrone compound. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64: 306-333 (2000)
- Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. and Sakata, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1780-1783 (1994)
- Cho, J.Y., Moon, J.H., Seong, K.Y. and Park, K.H. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:2273-2276 (1998)
- Wee, J.H. and Park, K.H. Isolation of 4-hydroxycinnamic acid, 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid, and 3,4-dihydroxybenzoic acid with antioxidative and antimicrobial activity from peanut (*Arachis hypogaea*) shell. *Food Sci. Biotechnol.* 10: 551-556 (2001)
- Cho, J.Y., Moon, J.H. and Park, K.H. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1403-1408 (2000)
- Xing, Y.M. and White, P.J. Identification and function of antioxidants from oat groats and hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 303-307 (1997)
- Maillard, N.M. and Berset, C. Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1789-1793 (1995)
- Castelluccio, C., Bolwell, G.P., Gerrish, C. and Rice-evans, C. Differential distribution of ferulic acid to major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem. J.* 316: 691-694 (1996)
- Pokorny, J. Autooxidation of Unsaturated Lipids, pp. 141-206. Academic Press, New York, USA (1987)
- Natella, F., Nardini, M., Felice, M.D. and Scaccini, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1453-1459 (1999)

(2003년 7월 29일 접수; 2003년 9월 5일 채택)