

함초발효액으로부터 항산화 활성 물질의 분리 및 동정

조정용¹ · 박선영¹ · 신미정¹ · 고천성¹ · 문제학² · 함경식^{1*}

¹목포대학교 식품공학과 및 천일염생명과학연구소

²전남대학교 식품공학과 및 기능성식품연구센터

Isolation and Identification of Antioxidative Compounds in Fermented Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) Juice

Jeong-Yong Cho¹, Sun-Young Park¹, Mi-Jeong Shin¹, Tian-Cheng Gao¹,
Jae-Hak Moon², and Kyung-Sik Ham^{1*}

¹Dept. of Food Engineering and Solar Salt Biotechnology Research Center,
Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

²Dept. of Food Science & Technology, and Functional Food Research Center,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract

The chloroform layer of fermented glasswort (*Salicornia herbacea*) juice was found to have higher radical-scavenging activity than the other layers by the assays using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS⁺) radicals. Two antioxidative compounds were isolated and purified from the chloroform layer by Sephadex LH-20 column chromatography using the guided assay of DPPH radical scavenging. Based on mass spectrometer and nuclear magnetic resonance, the isolated compounds were identified as cirsiomaldehyde (**1**) and chrysoeriol (**2**). This is the first study to report the presence of those compounds in fermented glasswort juice. Compound **2** showed higher radical-scavenging activity than **1**.

Key words: fermented glasswort, *Salicornia herbacea*, antioxidant, cirsiomaldehyde, chrysoeriol

서 론

함초(*Salicornia herbacea* L.)는 명아주과의 한해살이 초본 식물로 우리나라에서는 통통마디로도 불리어지며, 칠면초와 해홍나물 등과 함께 우리나라 서해안과 남해안 바닷가에 자생하는 염생식물들 중의 하나이다(1). 이 식물은 일반 육상식물들과 달리 NaCl 함량이 높고 칼슘, 마그네슘, 그리고 칼륨 등의 미네랄도 다량 함유하고 있다고 알려져 있다(2). 예로부터 함초는 몸 안에 쌓인 독소와 숙변을 없애고, 압, 고혈압, 당뇨병, 피부병, 관절염 등의 치료 목적으로 사용되어 왔으며, 민간요법에서는 시력저하, 소화불량, 위장병, 간염, 그리고 신장병 등의 예방에도 사용되어 왔다(3,4). 최근 많은 연구자들로부터 함초가 갖는 생리활성에 대한 연구가 활발히 수행되어 항당뇨(2,5), 항산화(6,7), 항암(8), 면역조절 기능 향상(9,10), 그리고 미백(11) 등에 효과가 있다고 보고되어지고 있다.

또한 함초에 존재하는 생리활성 물질로는 sterols(12), polysaccharides(13), flavonoid glycosides(13,14), 그리고

chlorogenic acid 유도체들(15) 등이 동정되었으며, flavonoid 배당체 화합물로서 isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside, quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside와 tungtungmadic acid(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoyl quinic acid)가 항산화 활성 물질로 규명되어진 바 있다(16,17). 또한 함초로부터 분리한 isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside는 streptozotocin에 의해 유도된 당뇨 쥐에서 알도스 산화효소의 저해와 함께 소르비톨 축적을 억제한다고 보고된 바 있다(18).

이처럼 최근 함초의 다양한 기능성이 밝혀지면서 그에 대한 관심 또한 고조되어 이를 찾는 소비자가 늘고 있다. 이 식물은 보통 생식하거나 나물 등의 형태로 먹어 왔으나 최근 환, 소금, 발효액, 된장과 같은 발효식품류 등의 다양한 응용 제품들이 개발되어 판매되고 있다. 이중 발효액은 함초를 당과 혼합하여 1년 이상의 발효를 거쳐 숙성시켜 만든 것으로 함초 자체가 갖는 짠맛을 줄여 음용이 용이하다는 장점이 있다. 최근 함초에 *Bacillus subtilis* 및 *Lactobacillus acidophilus* 균주를 접종하여 숙성 발효시켜 만든 함초발효

*Corresponding author. E-mail: ksham@mokpo.ac.kr
Phone: 82-61-450-2425, Fax: 82-61-454-1521

액에 관한 연구가 이루어진 바 있다(19,20). 즉 *B. subtilis* 균주로 발효시킨 함초발효액은 angiotensin converting enzyme의 저해 활성을 증가시키고, *L. acidophilus*로 발효시킨 함초발효액은 발효과정 중 항산화 활성과 fibrinolytic activity를 증가시킨다고 하였다. 이는 아마도 함초 자체의 유용 성분과 더불어 발효과정 중 미생물의 작용에 의해 생성된 성분들이 생리활성 향상에 기여한 것으로 시사된다. 이와 같이 함초발효액은 식품학적 측면에 있어 응용 가치가 충분하다고 생각되나 함초발효액 제조에 적합한 발효균주 및 유용성분에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 논문에서는 함초발효액에 함유된 유용 성분의 구명 연구의 일환으로, 상온에서 1년간 자연 발효시킨 다음, 여과하여 얻어진 여액을 숙성시켜 제조한 발효액으로부터 2종의 항산화 활성물질을 분리하고 구조해석 하였으며, 분리된 이 화합물들의 항산화 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 함초발효액은 우리원식품(Bosung, Korea)으로부터 구입하였다. 이 제품은 2002년 10월에 보성군 벌교읍 갯벌지역에 자생하는 신선한 함초를 채취하여 물로 세척 후, 함초, 올리고당, 설탕을 7:1.5:1.5(w/w)로 혼합한 후, 상온에서 1년 동안 발효시킨 다음, 여과(No. 2, Whatman, Maidstone, England)하여 얻어진 여액을 5년간 상온에서 자연 숙성시켜 만든 것을 이용하였다.

용매분획물의 조제

시료 1,500 mL(신선 함초 5 kg 상당량)에 물 0.5 L를 혼합한 다음, *n*-hexane(2 L, 3회), chloroform(CHCl_3 , 2 L, 3회), ethyl acetate(EtOAc, 2 L, 3회), 그리고 water-saturated butanol(BuOH, 1 L, 3회)로 순차용매 분획하여 *n*-hexane층, CHCl_3 층, EtOAc층, 그리고 BuOH층을 각각 얻었다. 얻어진 각 분획층은 cooling aspirator(CCA-1110, Eyela, Tokyo, Japan)가 장착된 vacuum evaporator를 사용하여 37°C에서 감압 농축하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography의 분자 크기에 의한 정제

Sephadex LH-20(70~230 mesh, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)을 100% MeOH로 상온에서 24시간 동안 팽윤화한 다음, 동 용매계로 column(2.0×35 cm)에 충전시킨 후 100% MeOH 용매계를 이동상으로 하여 300 mL를 용출시켰으며, 용출용액은 5 mL씩 분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography의 흡착에 의한 정제

Sephadex LH-20(Pharmacia Fine Chemicals)을 MeOH/H₂O(1:9 v/v)로 slurry를 만든 다음, 동일한 용매로 column

(2.0×20 cm)에 충전한 후, MeOH/H₂O 용매계를 이동상으로 MeOH 농도를 10~100%까지 10%씩(각 단계별 200 mL) 증가시키는 step-wise 용출 방법으로 용출하였으며, 용출용액은 10 mL씩 분획하였다.

분리된 활성물질의 기기분석

단리된 활성물질의 ¹H-nuclear magnetic resonance(¹H-NMR, 400 MHz), ¹³C-NMR(100 MHz), two-dimensional NMR(2D-NMR) spectra는 Digital Avance 400 spectrometer(Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe, Germany) 분석에 의해 얻어졌으며, 용매는 CD₃OD와 DMSO-*d*₆을, 그리고 내부 표준물질은 tetramethylsilane(TMS)을 기준점으로 하였다. 또한 electron spray ionization mass spectrometer(ESI-MS) 분석은 ESI ion trap mass spectrometer(Bruker Daltonics, EsquireHCT, Bremen, Germany)를 사용하였다.

항산화 활성 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging 활성 측정: 용매분획물 및 단리된 화합물들의 항산화 활성은 Abe 등(21)이 제시한 DPPH radical-scavenging 활성 측정법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉, DPPH (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) ethanol 용액(100 μM) 900 μL에 시료용액 100 μL를 가하여 vortex mixer로 가볍게 혼합한 다음, 암소에서 20분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 비교구로 천연 항산화제인 ascorbic acid를 이용하였으며, DPPH radical이 50% scavenging 된 농도를 SC₅₀(50% scavenging concentration)으로 나타냈다.

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS⁺) radical-scavenging 활성 측정: 용매분획물 및 단리된 화합물들의 항산화 활성은 ABTS⁺ radical-scavenging에 의해 측정되었다. 즉 ABTS⁺ 라디칼 용액은 1.0 mM의 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride를 phosphate buffer saline(PBS)에 녹인 2.5 mM의 ABTS와 혼합하여 70°C의 항온조에서 30분간 반응시켜 제조된 것을 실험에 사용하였다. PBS는 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로서 150 mM NaCl을 포함하는 용매를 사용하였다. 이때 blue-green ABTS⁺ radical의 농도는 spectrophotometer를 사용하여 734 nm에서 0.7±0.02(mean±SD)가 되도록 조정하였다. 각 시료를 20 μL씩 취해서 980 μL ABTS radical 용액에 첨가한 다음, 37°C에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 ABTS⁺ radical-scavenging 활성을 조사하였다.

정제 및 단리과정에서 항산화 활성 검정: 정제된 획분 혹은 단리 화합물을 TLC(thin-layer chromatography, 25 TLC aluminium sheets, Silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm thickness, Merck, Darmstadt, Germany) plate에 spotting한 후, DPPH의 ethanol 용액(200 μM)을 plate에 분무하여 보라색

이 탈색되어진 획분이나 물질을 항산화 활성의 양성으로 판정하였다(22).

결과 및 고찰

함초발효액 용매분획물의 DPPH와 ABTS⁺ radical-scavenging 활성

함초발효액을 용매분획 하여 *n*-hexane층(0.5 g), CHCl₃층(1.52 g), EtOAc층(4.2 g), 그리고 BuOH층(6.5 g)을 각각 얻었다. 이들 분획물을 대상으로 DPPH radical-scavenging 활성을 검정한 결과(Fig. 1), *n*-hexane층 > CHCl₃층 > EtOAc층 > BuOH층 순으로 나타났다. 즉 *n*-hexane층과 CHCl₃층이 상대적으로 높은 활성을 보였다. 또한 동일 분획물을 대상으로 ABTS⁺ radical-scavenging 활성을 조사한 결과(Fig. 2), 이들 radical-scavenging 활성은 CHCl₃층 > *n*-

hexane층 > EtOAc층 > BuOH층 순으로 나타났다. DPPH radical-scavenging 활성에서는 *n*-hexane층에서 강한 활성을 보인 반면, ABTS⁺ radical-scavenging 활성은 CHCl₃층에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 이로부터 함초발효액에 함유된 DPPH 및 ABTS⁺ radical-scavenging 활성물질들은 비교적 극성이 낮은 CHCl₃층과 *n*-hexane층에 분포되어 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 함초발효액을 용매분획 하여 얻어진 분획물들 중 *n*-hexane층 및 CHCl₃층이 비교적 높은 DPPH 및 ABTS⁺ radical-scavenging 활성을 나타내 그중 보다 양이 많은 CHCl₃층을 대상으로 그에 함유된 항산화 활성 물질을 먼저 분자 수준에서 밝히고자 그들 성분의 분리를 시도하였다.

활성물질의 단리 및 정제

함초발효액으로부터 얻어진 CHCl₃층(1.02 g)을 대상으로 MeOH을 이동상으로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하여 분자체 크기에 의한 분리 방법을 이용하여 용출·분획하였다. 각각의 용출 획분의 일부를 TLC에 spotting하여 적절한 용매로 전개한 다음, DPPH 용액을 분무하여 항산화 활성을 검정한 결과, 모든 획분에서 항산화 활성이 인정되었으며, TLC 상에서 단일 spot으로 검출된 활성획분 C(4.6 mg, 화합물 2, 황색분말, elution volume/total volume 1.58~1.87)를 포함하여 총 4그룹의 활성획분으로 나누었다. 활성획분 C를 제외하고 가장 높은 항산화 활성을 나타낸 획분 B(246.4 mg, elution volume/total volume 0.46~0.80)를 H₂O/MeOH 용매계로 Sephadex LH-20을 이용한 흡착 칼럼 chromatography에 의해 분획하여 항산화 활성을 검정한 결과, TLC 상에서 거의 단일 spot을 보인 획분(H₂O/MeOH 9:1, v/v, 154.9 mg, B2)을 얻었다. 보다 정제된 화합물을 얻기 위하여 그 활성획분 B2(154.9 mg)를 H₂O/MeOH = 9:1(v/v) 용매계로 isocratic 용출방법에 의해 Sephadex LH-20 칼럼 chromatography를 실시하여 활성물질 1(140.2 mg, 황색오일)을 얻었다.

이상의 결과로부터 함초발효액의 CHCl₃ 분획물로부터 2종의 항산화 활성 물질을 분리하였으며, 단리된 화합물들은 NMR 및 MS 분석 등의 기기분석에 의해 구조해석을 행하였다.

활성물질의 구조해석

화합물 1의 ESI-MS(negative ion) spectrum으로부터 *m/z* 235[M+H]⁻와 257[M+Na]⁻이 검출되어 이 화합물의 분자량(MW)은 234로 시사되었다. 화합물 1의 ¹H-NMR spectrum으로부터 2종의 이중결합 유래 proton signals[δ 7.37(2H, d, *J*=3.5 Hz, H-3)과 6.58(2H, d, *J*=3.5 Hz, H-4)], 1종의 methylene proton signal[δ 4.61(4H, s)], 그리고 1종의 aldehyde proton signal[δ 9.53 (2H, s)]이 검출되었다(Table 1). 특히 2종의 이중결합 유래 proton signals[δ 7.37(H-3)과 6.58(H-4)]의 coupling constant 값(*J*)이 등가(3.5 Hz)로 측

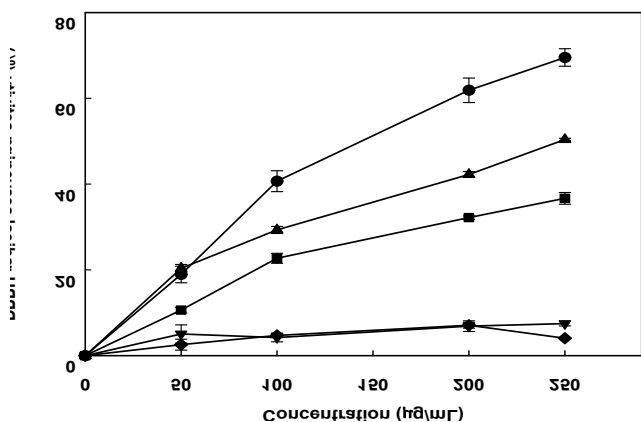


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of each fraction after solvent fractionation of fermented glasswort juice. Values are expressed as mean ± SD in triplicate experiments. (●) *n*-Hexane layer; (▲) CHCl₃ layer; (■) EtOAc layer; (▼) BuOH layer; (◆) H₂O layer.

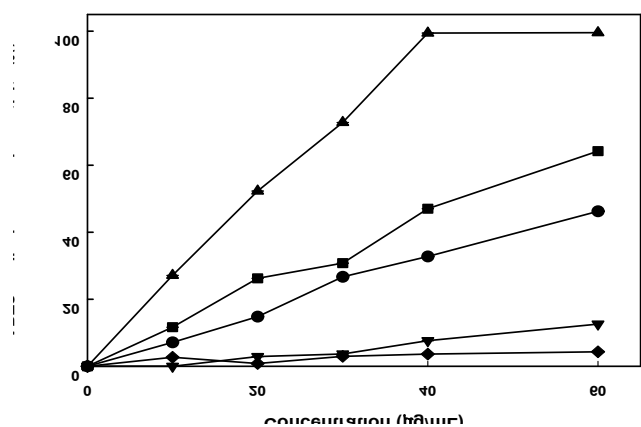


Fig. 2. ABTS⁺ radical-scavenging activity of each fraction after solvent fractionation of fermented glasswort juice. Values are expressed as mean ± SD in triplicate experiments. (●) *n*-Hexane layer; (▲) CHCl₃ layer; (■) EtOAc layer; (▼) BuOH layer; (◆) H₂O layer.

Table 1. ^1H - (400 MHz) and ^{13}C - (100 MHz) NMR data of **1** (CD_3OD)

Position	δ_{H} (int., mult., J in Hz)	δ_{C}
2, 2'	—	154.3
3, 3'	7.37 (2H, d, 3.5)	125.3
4, 4'	6.58 (2H, d, 3.5)	111.3
5, 5'	—	163.6
$\text{CH}_2 \times 2$	4.61 (4H, s)	57.8
$\text{CHO} \times 2$	9.53 (2H, s)	179.9

정되어 이 화합물은 furan 형의 구조임이 시사되었다. 화합물 **1**의 ^{13}C -NMR spectrum으로부터는 1종의 carbonyl carbon signal(δ 179.9)을 포함한 2종의 sp^2 methine carbon signals[δ 125.3(C-3)과 111.3(C-4)], 2종의 sp^2 oxygenated quaternary carbon signals[δ 154.3(C-2)과 163.3(C-5)], 그리고 oxygenated methylene carbon signal(δ 57.8)로 총 7종의 carbon signal들이 검출되어 ^1H -NMR data와 일치성을 보임을 알 수 있었다(Table 1). 이상의 MS 및 1D-NMR spectra로부터 화합물 **1**은 1종의 aldehyde와 1종의 methyl alcohol이 각각 결합된 furan 형의 구조일 가능성이 높다고 판단되었다.

보다 정확한 구조해석을 위해서 이 화합물에 대한 HSQC, ^1H - ^1H COSY, 그리고 HMBC 등의 2D-NMR 분석을 행하여 proton 및 carbon 간의 상관관계를 확인하였다. 특히 HMBC spectrum(Fig. 3)에서 methylene proton signal[δ 4.61(1H, s)]로부터 C-4위의 sp^2 methine carbon signal(δ 111.3)에 cross peak가 관찰되어 methyl alcohol은 furan의 5위에 결합된 것으로 확인되었다. 그리고 나머지 다른 쪽 3위의 이중 결합 유래 proton signal(δ 6.58)로부터 carbonyl carbon signal(δ 179.9)에 상관관계가 관찰되어 carbonyl group은 furan 환의 2위에 결합되어 있음을 확인하였다. 그러나 매우 특이하게도 HMBC spectrum 상에서 methylene proton signal[δ 4.61(1H, s)]로부터 그 자신의 methylene carbon signal(δ 57.8)에 상관관계가 관찰되었다. 이것은 hydroxymethylfurfural 2종이 존재하며, 그 2종의 methyl alcohol group들이 서로 ether 결합하여 대칭형의 2량체를 형성하고 있을 가능성이 시사된 결과라 판단되었다. 또 결정적으로 MS 분석에 의해 확인된 분자량이 그 2량체에 귀속되어지는 234였던 것으로부터 화합물 **1**의 구조는 bis-5,5'-formyl-furfuryl ether(cirsiumaldehyde)로 해석되었다(Fig. 3).

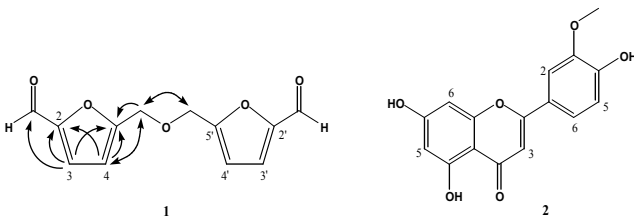


Fig. 3. Structures of **1** and **2**. Arrows: important HMBC correlations.

Table 2. ^1H - (400 MHz) and ^{13}C - (100 MHz) NMR data of **2** ($\text{DMSO}-d_6$)

Position	δ_{H} (int., mult., J in Hz)	δ_{C}
2	—	163.7
3	6.90 (1H, s)	103.2
4	—	181.8
5	—	161.5
6	6.51 (1H, d, 2.0)	98.9
7	—	164.2
8	6.20 (1H, d, 2.0)	94.1
9	—	157.4
10	—	103.7
1'	—	121.5
2'	7.56 (1H, d, 2.0)	110.5
3'	—	148.2
4'	—	150.8
5'	6.94 (1H, d, 8.0)	115.8
6'	7.58 (1H, d, 8.0)	120.4
3'-OCH ₃	3.89 (3H, s)	56.0

화합물 **2**의 ^1H -NMR(400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectrum (Table 2)으로부터 전형적인 flavonoid의 signal 패턴이 관찰되었다. 즉 3종의 sp^2 carbon proton signals[δ 7.56(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.94(1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 7.58(1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6')]는 flavonoid의 B ring에, 그리고 2종의 sp^2 carbon proton signals[δ 6.51(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.20(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8)]은 flavonoid의 A ring에, 그리고 1H분의 sp^2 carbon proton signal[δ 6.90(1H, s, H-3)]은 flavonoid의 C ring에 각각 결합된 것으로 추정되는 proton signal들이 관찰되었다. 또 그에 더하여 1종의 methoxyl proton signal[δ 3.89(3H, s)]의 존재가 관찰되어 이 화합물은 1종의 methoxyl group이 결합된 flavone류 화합물임이 시사되었다. 화합물 **2**의 ^{13}C -NMR(100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectrum (Table 2)에서는 1종의 carbonyl carbon signal(δ 181.8), 14종의 sp^2 carbon signals(δ 164.2-94.1), 그리고 1종의 methoxyl carbon signal(δ 56.0)을 포함하여 총 16종 carbon의 존재가 확인되었다. 이 ^{13}C -NMR spectrum은 ^1H -NMR data와 일치하는 상관성을 보여 화합물 **2**는 methoxyl group이 결합된 flavone 구조일 가능성이 재차 강하게 시사되었다. 특히 이 화합물의 ^{13}C -NMR spectrum을 methylation된 다양한 flavone 화합물들의 spectra와 비교한 결과(23), chrysoeriol의 ^{13}C -NMR spectrum과 정확히 일치하였다. 더욱이 이 화합물의 ESI-MS(negative ion) spectrum으로부터 m/z 299.0[M-H]⁻이 검출되어 이 화합물의 분자량(MW 300)과 일치함을 확인하였다. 그래서 화합물 **2**의 구조는 chrysoeriol(5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone)로 동정되었다(Fig. 3).

단리 화합물들의 DPPH 및 ABTS⁺ radical-scavenging 활성

함초발효액의 CHCl_3 층으로부터 단리된 2종의 항산화 활성물질들을 대상으로 DPPH 및 ABTS⁺ radical-scavenging

Table 3. Free radical-scavenging activities of the compounds isolated from fermented glasswort juice

Compounds	SC ₅₀ (μg)	
	DPPH radical	ABTS ⁺ radical
1	< 250	202.5
2	< 250	16.6
Ascorbic acid ¹⁾	3.5	1.8

SC₅₀ value is the concentration of compound required for 50% radical scavenging. Each value represents the mean of two replications. The final concentration of the DPPH was 100 μM and final absorbance of ABTS⁺ radical solution was 0.7±0.02 at 734 nm.

¹⁾Ascorbic acid was used as a positive control.

활성을 검정하였다. 그 결과(Table 3), 이 화합물들의 DPPH radical-scavenging 활성은 농도 의존적으로 증가하였으나 대조구로 사용한 ascorbic acid에 비해 매우 약한 활성을 나타냈다. 이중 chrysoeriol(**2**)은 DPPH radical-scavenging 활성에 있어 cirsiomaldehyde(**1**)와 거의 유사한 정도의 활성을 나타냈다. 반면, ABTS⁺ radical-scavenging 활성의 경우, 이들 화합물은 DPPH를 이용한 radical-scavenging 활성보다 더 높은 활성을 보였다(Table 3). 즉 chrysoeriol(**2**)의 SC₅₀ 값이 16.6 μg/mL로 cirsiomaldehyde(**1**, SC₅₀ 202.5 μg/mL)보다 현저히 높은 활성을 보였다. 함초발효액으로부터 얻어진 CHCl₃층은 다른 용매분획층들보다 강한 항산화 활성을 보였던 반면, 그 CHCl₃층으로부터 단리된 주요 활성 화합물들은 비교적 약한 활성을 나타냈다. 용매분획 후 각 획분들의 항산화 활성 비교에 있어 CHCl₃층의 활성이 가장 강하게 평가되었고, 그 함량 또한 다른 분획물들보다 많았으며, CHCl₃층 정제과정의 각 획분들의 TLC 상에서의 항산화 활성 화합물의 존재경향에 있어서도 단리된 2종 화합물들의 활성정도 와 존재량이 가장 현저하였다. 이는 CHCl₃층에 단리된 2종 화합물이 주요 항산화제로 존재하나 그 외에도 다른 강한 활성물질들이 미량으로 다양하게 존재하기 때문에 2종 화합물의 활성이 약했음에도 불구하고 CHCl₃층의 활성이 다른 획분에 비해서 더 강하게 나타났을 것이며, 그 CHCl₃층으로부터 2종 이외의 다른 화합물들이 단리되지 못한 것으로 판단되었다.

함초발효액의 CHCl₃층에 함유된 2종의 항산화 물질이 분리되고, 이 활성물질들은 기기분석을 통하여 cirsiomaldehyde(bis-5,5'-formylfurfuryl ether)와 chrysoeriol(5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone)로 각각 구조해석 되었다(Fig. 3). 이 화합물들은 본 실험에 사용한 발효액의 원료인 함초에서의 존재는 아직 보고된 바 없어 함초발효액으로부터는 처음으로 동정된 것으로 생각된다. 함초발효액의 CHCl₃층으로부터 다량으로 단리된 화합물 **1**(cirsiomaldehyde)은 최근 영경퀴 및 천마 등의 식물에서도 동정된 바 있다(24,25). 이 화합물은 식품의 열처리 혹은 저장 중 Maillard 반응이나 carmel 반응에 의해 당으로부터 생성되는 대표적인 성분인 5-hydroxymethyl furfural로부터 생성

되어진다고 보고된 바 있다(26). 또한 이 화합물은 *Calcarisporium arbuscula*의 배양액으로부터 동정된 바 있어(27), 미생물에 의해서도 생성되어지는 것으로 사료된다. 그래서 함초발효액에 존재하는 화합물 **1**은 발효액의 원료인 함초 유래일 가능성도 있으며, 발효과정 중 5-hydroxymethyl-furfural이 자동 중합되거나 미생물에 의해 생성되어질 가능성도 있어 추후 보다 상세한 연구가 요구된다. 화합물 **2** (chrysoeriol)는 항암 및 항산화 활성을 발현하며, 다양한 식물에 존재한다고 알려져 있다(28,29). 특히 다양한 식물체내에서 당과 결합된 배당체 화합물로 동정되고 있어 함초에 있어서도 이 화합물은 배당체 형태로 존재하고 있을 가능성이 높을 것으로 추측되며, 발효과정 중에 aglycone이 유리되어 화합물 **1**이 형성되었을 가능성이 시사된다. 그러나 아직 그에 대한 검토가 수행된 바 없기 때문에 함초에 화합물 **1**의 배당체로서의 존재 유무를 확인하고, 배당체로 존재할 경우 당의 종류 및 그 결합 위치 등의 분자수준에서의 추가 연구가 요구된다. 더 나아가 flavonoid 배당체 화합물들은 발효과정 중 미생물의 작용에 의해 당 가수분해 되어 aglycone이 유리된다고 보고되고 있다(30,31). 따라서 함초발효액으로부터 단리된 cirsiomaldehyde(**1**)와 chrysoeriol(**2**)은 함초발효액의 제조에 있어 품질관리를 위한 지표물질로서의 활용 가능성의 검토가 필요하다고 생각되며, 이를 위해서는 함초 발효액으로부터 유용성분이 추가적으로 구명되어야 할 것이다. 또한 이들 물질이 함초 원재료에 함유되어 있는 성분인지, 아니면 발효과정 중 생성되어지는 성분인지에 대한 연구가 추후 수행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

함초발효액의 기능성 해명과 유용 기능성 성분 탐색연구의 일환으로 함초발효액으로부터 항산화 활성물질을 분리하여 구조해석 하였다. 함초발효액을 용매분획 하여 얻어진 용매분획물들 중 CHCl₃층이 높은 항산화 활성을 나타냈다. 그래서 CHCl₃층을 Sephadex LH-20 column chromatography의 분자체 효과 및 흡착능의 특성을 각각 이용하여 정제함으로써 2종의 항산화 활성물질을 분리하였다. 단리한 이들 화합물을 대상으로 MS 및 NMR 분석을 통하여 cirsiomaldehyde(**1**)와 chrysoeriol(**2**)로 각각 동정하였다. 이 화합물들은 ABTS⁺ 및 DPPH radical-scavenging 활성을 나타냈으며, 화합물 **2**는 화합물 **1**에 비해 더 높은 활성을 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 신안군에서 지원된 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문헌

1. Kim CS, Song TG. 1983. Ecological studies on the halophyte communities at western and southern coasts in Korea. *Korean J Ecol* 6: 167-176.
2. Min JG, Lee DS, Kim TJ, Park JH, Cho TY, Park DI. 2002. Chemical composition of *Salicornia herbacea* L. *J Food Sci Nutr* 7: 105-107.
3. Bang MH, Kim HA, Cho YJ. 2002. Hypoglycemic and anti-oxidant effect of dietary hamcho in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 840-846.
4. Jo YC, Ahn JH, Chon SM, Lee KS, Bae TJ, Kang DS. 2002. Studies on pharmacological effects of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Korean J Med Corp Sci* 10: 93-99.
5. Park SH, Ko SK, Choi JG, Chung SH. 2006. *Salicornia herbacea* prevents high fat diet-induced hyperglycemia and hyperlipidemia in ICR mice. *Arch Pharm Res* 29: 256-264.
6. Ha JA, Lee SH, Kim HJ, Lee JY. 2006. The role of *Salicornia herbacea* in ovariectomy-induced oxidative stress. *Biol Pharm Bull* 29: 1305-1309.
7. Jang HS, Kim KR, Choi SW, Woo MH, Choi JH. 2007. Antioxidant and antithrombus activities of enzyme-treated *Salicornia herbacea* extracts. *Ann Nutr Metab* 51: 119-125.
8. Kong CS, Kim YA, Kim MM, Park JS, Kim JA, Kim SK, Lee BJ, Nam YW. 2008. Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells. *Toxicol in Vitro* 22: 1742-1748.
9. Im SA, Lee YR, Lee YH, Oh ST, Gerelchuluun T, Kim BH, Kim YS, Yun YP, Song SG, Lee CK. 2007. Synergistic activation of monocytes by polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea* and interferon- γ . *J Ethnopharmacol* 111: 365-370.
10. Im SA, Kim KJ, Lee CK. 2006. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea*. *Int Immunopharmacol* 6: 1451-1458.
11. Lee JT, Jeong YS, An BJ. 2002. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Korean J Herbol* 17: 61-69.
12. Lee YS, Lee HS, Shin KH, Kim BK, Lee SH. 2004. Constituents of the halophyte *Salicornia herbacea*. *Arch Pharm Res* 27: 1034-1036.
13. Lee KY, Lee MH, Chang IY, Yoon SP, Lim DY, Jeon YJ. 2006. Macrophage activation by polysaccharide fraction isolated from *Salicornia herbacea*. *J Ethnopharm* 103: 372-378.
14. Park SH, Kim KS. 2004. Isolation and identification of anti-oxidant flavonoids from *Salicornia herbacea* L. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 120-123.
15. Chung YC, Chun HK, Yang JY, Kim JY, Han EH, Kho YH, Jeong HG. 2005. Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from *Salicornia herbacea*. *Arch Pharm Res* 28: 1122-1126.
16. Kong CS, Kim JA, Qian ZJ, Kim YA, Lee JI, Kim SK, Nam TJ, Seo YW. 2009. Protective effect of isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea* against oxidation-induced cell damage. *Food Chem Toxicol* 47: 1914-1920.
17. Hwang YP, Yun HJ, Chun HK, Chung YC, Kim HK, Jeong MH, Yoon TR, Jeong HG. 2009. Protective mechanisms of 4-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoyl quinic acid from *Salicornia herbacea* against tert-butylhydroperoxide-induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions* 181: 366-376.
18. Lee YS, Lee SH, Kim BK, Oguchi K, Shin KH. 2005. Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol Pharm Bull* 28: 916-918.
19. Song TC, Lee CH, Kim YE, Kim IH, Han DS, Yang DH. 2007. The Functionality of the saltwort (*Salicornia herbacea* L.) extract fermented juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 395-399.
20. Park IB, Park JW, Lee YJ, Shin GW, Kim HS, Jo YC. 2009. Quality characteristic of glasswort (*Salicornia herbacea* L.) fermented by *Bacillus subtilis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 902-908.
21. Abe N, Nemoto A, Tsuchiya Y, Hojo H, Hirota A. 2000. Studies of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a 2-pyrone compound. *Biosci Biotech Bioch* 64: 306-333.
22. Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. 1994. 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.
23. Park YH, Moon BH, Yang HJ, Lee YS, Lee EJ, Lim JY. 2007. Complete assignments of NMR data of 13 hydroxy-methoxyflavones. *Magn Reson Chem* 45: 1072-1075.
24. Shen YM, Mu QZ. 1990. New furans from *Cirsium chlorolepis*. *Planta Med* 56: 472-474.
25. Yun-Choi HS, Pyo MK, Park KM. 1997. Cirsiumaldehyde from *Gastrodia elata*. *Nat Prod Sci* 3: 104-105.
26. Chambel P, Oliveira MB, Andrade PB, Fernandes JO, Seabra RM, Ferreira MA. 1998. Identification of 5,5'-oxydimethylene-bis(2-furaldehyde) by thermal decomposition of 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde. *Food Chem* 63: 473-477.
27. Yu NJ, Guo SX. 2002. Studies on the chemical constituents from culture filtrate of a fungus isolated from *Ganoderma lucidum*. *Nat Prod Res Develop* 14: 24-26.
28. Takemura H, Uchiyama H, Ohura T, Sakakibara H, Kuruto R, Amagi T, Shimoi K. 2010. A methoxyflavonoid, chrysoeriol, selectively inhibits the formation of a carcinogenic estrogen metabolite in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Biol* 118: 70-76.
29. Mishra B, Priyadarsini I, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Mohan H. 2003. Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorg Med Chem* 11: 2677-2685.
30. Zhang CZ, Zhong Y, Sun ZJ, Ma YY. 2009. Purification and characterization of SDG- β -D-glucosidase hydrolyzing secoisolariciresinol diglucoside to secoisolariciresinol from *Aspergillus oryzae*. *Pro Biochem* 44: 607-611.
31. Ito J, Sahara H, Kaya M, Hata Y, Shibasaki S, Kawata K, Ishida S, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. 2008. Characterization of yeast cell surface displayed *Aspergillus oryzae* β -glucosidase 1 high hydrolytic activity for soybean isoflavone. *J Mol Catal B: Enzymatic* 55: 69-75.

(2010년 4월 29일 접수; 2010년 6월 9일 채택)