J Korean Soc Food Sci Nutr
35(6), 713~720(2006)

광나무 잎의 페놀성 화합물

조정옥[1] · 정인창[2†]

[1]대구보건환경연구원
[2]서라벌대학 관광호텔조리과

Phenolic Compounds of *Ligustrum japonicum* Leaves

Jeong-Ok Jo[1] and In-Chang Jung[2†]

[1]Dept. of Food Analysis, Institute of Health and Environment, Daegu 706-042, Korea
[2]Dept. of Tourism and Hotel Culinary Arts, Sorabol College, Gyeongju 780-711, Korea

Abstract

This study was designed to investigate the possible utilization of *Ligustrum japonicum* leaves as a source of functional ingredients. Contents of total phenolic compounds and condensed tannin were 0.89~1.53% and 0.10~0.13%, respectively. The major flavonoid compounds in the leaves of *L. japonicum* were luteolin, apigenin and their glycosides. Tyrosol, t-cinnamic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, shikimic acid and protocatecuic acid were detected in free phenolic acid, while tyrosol, t-cinnamic acid, ferulic acid, esculetin, caffeic acid, p-coumaric acid and hydroxytyrosol were detected in esterified phenolic acid. The insoluble phenolic acid contained tyrosol, t-cinnamic and p-caoumaric acid.

Key words: *Ligustrum japonicum*, phenolic compounds, tannin, flavonoid, phenolic acid

서 론

식물은 산화적인 손상으로부터 자신을 보호하기 위해 다양한 항산화 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 최근에 식물에 존재하는 페놀성 화합물이 항산화(1), 항암(2), 항세균(3), 항알러지(4), 충치방지(5), 심장질환예방 및 당뇨병 예방(6) 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며 채소와 과일 등 식물에서 밝혀진 chemoprevention에 관련된 대표적인 페놀성분으로는 curcumin(7), epigallocatechin gallate(8), indole-3-carbinol(9), crocetin(10), 3-phenylpropyl isothiocyanate(11), xanthophylls, astaxanthin, canthaxanthin 등의 xanthin 화합물(12) 및 protocatechuic acid(13) 등이 있다.

광나무(*Ligustrum japonicum*)는 물푸레나무과 쥐똥나무속 식물로서 전남과 경남의 해안 및 섬지방, 일본과 대만 등지에서 분포하는 상록활엽교목으로, 잎은 마주나기를 하고 길이 3~10 cm, 너비 2.5~4.5 mm로 넓은 타원형, 달걀꼴 긴 타원형이며, 광택이 있고 두터운 가죽질이다. 열매는 길이 7~10 cm로 10월에 자흑색으로 익고 말린 것을 여정실이라 하며, 민간에서는 잎을 삶아 연하게 만든 것을 종기에 붙이기도 한다(14). 또한, 중국에서 펴낸 중국대사전에서 광나무 잎은 성질이 평하고 독이 없으며, 시력을 좋게 하고 통증완화, 구내염, 치주염, 급성세균성 이질, 악성종양, 화상 등에 효과가 있다고 밝히고 있으며, 북한 동의학사전에서는 열매에 있는 올레아놀산은 간보호작용, 강심작용, 이뇨작용, 백혈구 증가작용을 나타낸다고 하였으며 백모증에도 효과가 있다고 하였다(15). 광나무의 주요성분으로 잎에는 syringin, 과피와 과육에 ursolic acid, oleanolic acid, acetyloeanolic acid 등이 함유되어 있고, 약효로는 강장, 이명, 심계, 불면 및 변비 등을 치료하는 작용이 있다고 알려져 있다(16).

광나무에 대한 연구로는 과실과 종자에서 acetyloleanolic acid, oleanolic acid, ursolic acid, lupeol이 함유되어 있음을 확인한 것이 있으며(17), 쥐똥나무 잎에서 quercetin, eriodictyol, apigenin 등 3종의 플라보노이드와 2종의 플라보노이드 혼합물(18), 물푸레나무 잎에서 coumarin glycoside, esculin, cichoriin, scopolin, fraxin 등을 분리(19), 물푸레나무의 수피에서 ligstoside와 oleuropein(20), ligstroside, oleuropein, esculetin, esculin 등의 성분(21)을 분리하였다고 하였으나 광나무에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 국내에 광범위하게 자생하고 있는 광나무 잎의 페놀성 화합물을 분석하여 기능성 식품으로서의 이용 가능성을 모색해 보고자 하였다.

†Corresponding author. E-mail: jicjjo@sorabol.ac.kr
Phone: 82-54-770-3748, Fax: 82-54-741-5429

Table 1. Profiles of *Ligustrum japonicum* leaves used in the experiment

Sample	Characteristics			
	Length (cm)	Width (cm)	Weight (g/leaf)	Color
A	<2	<1	<1	bright green
B	>5	>2	>2	green
C	>6	>3	>2	dark green

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 광나무 잎은 대구광역시 수성구 신매동 아파트 정원수로 생육되고 있는 광나무에서 자라는 어린새순(A), 중간정도 자란 잎(B) 및 오래된 잎(C)을 6월에 채취하여 냉장 보관하면서 페놀성 화합물 및 축합형 탄닌 등의 분석에 사용하였다(Table 1). 플라보노이드와 유리형, 에스테르형 및 결합형 페놀산 분석시료로는 중간정도 자란 잎(B)을 믹서로 세절하여 사용하였다.

시약 및 분석 장비

Flavonoid, 페놀성 화합물 등의 표준품은 Sigma사 제품을, 무기질 표준품과 HPLC 용매로는 Merck사 제품을, petroleum ether, ethyl ether, hexane 등 기타 실험용 시약은 특급 이상을 사용하였으며, 증류수는 비저항계수 18 mΩ 이상의 순수한 물을 사용하였다. 분석용 장비로는 gas chromatograph (GC, TRACE 2000, CE INSTRUMENT), gas chromatograph/mass spectrometer(GC/MS, HP-5973 MS, Agillent), high pressure liquid chromatography(HPLC, SP 8800, Spectra Physics), 감압농축기(Buchi RE 121 rotary evaporator, Buchi) 등을 사용하였다.

총 페놀성 화합물 및 축합형 탄닌 함량 분석

총 페놀성 화합물은 Purussian blue법(22)에 준하여 시험하였다. 즉, 신선한 광나무 잎 5 g을 정확히 달아 70% ethanol 100 mL를 넣고 homogenizer로 15,000 rpm에서 5분간 추출하여 Whatman No. 5 여과지로 여과하고 그 여액을 50배 희석하였다. 희석액 1 mL에 0.1 N 염산을 사용하여 조제한 0.1 M $FeCl_3$ 용액 3 mL와 0.008 M $K_3Fe(CN)_6$ 용액 3 mL를 가하여 정확히 10분동안 반응시킨 후 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 tannic acid를 사용하여 동일한 방법으로 작성한 표준 검량선으로부터 시료의 총 페놀성 화합물 함량으로 환산하였다.

축합형 탄닌 함량의 측정을 위한 추출방법은 Wang과 Hwang(23)의 방법을 사용하였다. 즉, 신선한 광나무 잎 8 g을 정확히 달아 70% ethanol 100 mL를 넣어 homogenizer로 15,000 rpm에서 5분간 추출하고 Whatman No. 5 여과지로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 시험용액은 Julkunen-Tiitto(24)의 방법으로 함량을 측정하였다. 즉, 알루미늄 호일로 차광한 시험관에 시험용액 0.1 mL와 4% vanillin methanol 시액 3 mL를 넣고 흔들어 섞은 후 다시 HCl 1.5 mL를 넣고 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 catechin을 사용하여 동일한 방법으로 작성한 표준 검량선으로부터 시료의 축합형 탄닌 함량으로 환산하였다.

Table 2. Analytical condition of HPLC for the determination of flavonoid in *Ligustrum japonicum* leaves

Column	Lichrospher 100 RP-18 (4×250 mm ID, 5 μm)
Detector	UV 350 nm
Mobile phase	(A) Acetonitrile : DW (25:75) (pH 3.0) (B) Acetonitrile : DW (75:25) (pH 3.0) Gradient condition: 10 min (A: 95), 30 min (A: 30)
Flow rate	1.0 mL/min
Chart speed	0.25 cm/min
Attenuation	32
Injection vol.	10 μL

Flavonoid aglycones, flavonoid glycosides

믹서로 균질화시킨 시료 20 g을 5배량에 해당하는 증류수를 이용하여 microwave oven에서 2회 반복 추출한 후 여과지로 여과하였다. 여액에 1 N HCl을 가해 pH 2.0으로 조정한 후 ethyl acetate로 3회 반복 추출하여 40°C에서 감압 농축하여 증발 건고시켰다. 잔류물에 methanol을 넣어 용해하고 0.45 μm 여과지로 여과한 것을 시험용액으로 하여 분석하였다(Table 2). 또한, 배당체를 확인하기 위하여 silicagel column chromatography를 실시하였다. 즉, silicagel을 hexane으로 충진한 칼럼에 추출물을 넣고 chloroform 용매계에서 ethyl acetate의 비율을 증가시키면서 용출하여 분획을 얻었다. 각 분획은 감압농축기를 이용하여 40°C에서 증발 건고한 후 잔류물을 methanol에 녹여 HPLC로 분석하였다. 이때 flavonoid 배당체로 추정되는 peak가 분리된 분획은 일정량을 취해 methanol을 증발 건고시킨 후 0.1 N HCl과 1 N HCl을 사용하여 수욕조에서 30분간 가수분해하였다. 가수분해물을 ethyl acetate로 추출하여 감압 농축한 다음 methanol에 녹여 HPLC와 GC/MS로 확인하였다. GC/MS를 이용한 가수분해물의 확인에는 Donor 등(25)의 방법으로 trimethylsilyl(TMS) 유도체화를 실시하였다. 즉, methanol 용액 500 μL를 취하여 증발 건고시킨 잔류물에 0.5 mL pyridine과 0.45 mL 1,1,1,3,3,3-hexamethyl-disilazane(HMDS)을 가하여 균일하게 잘 섞은 다음 50 μL trifluoroacetic acid(TFA)를 가하여 70°C에서 약 30분간 trimethylsilyl 유도체화시켜 GC/MS로 분석하였다. 이때, 생성된 total ion chromatogram의 mass spectra를 Wiley와 NIST library로 확인하였으며, GC/MS 분석조건은 Table 3과 같다.

유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산 시료의 조제 및 분석

시료로 사용한 광나무 잎은 중간정도로 자란 신선한 잎(Table 1의 B)을 채취하여 믹서로 분쇄한 후 70°C에서 건조

Table 3. GC/MS condition for the identification of flavonoids in *Ligustrum japonicum* leaves

Instrument	HP-5973 MS
Column	HP-5 MS (0.25 mm×0.25 μm×60 m)
Oven temp.	200°C for 2 min, then 300°C at 5°C/min and hold 15 min
Source temp.	250°C
Interface temp.	250°C
Injector temp.	230°C
Carrier gas (flow)	He (1.2 mL/min)
Electronic voltage	70 EI
Mass range	40~600 m/z
Split ratio	1:20
Library	NIST, Wiley

마쇄하였다. 우선 hexane으로 수회 탈지하여 Krygier 등(26)의 방법에 준해 처리하여 유리형, 에스테르형 및 결합형 페놀산의 분석에 사용하였다. 즉, 탈지시료 20 g을 증류수 300 mL로 3회 추출하여 여과지로 여과하였다. 여액에 1 N HCl로 pH 2.0으로 조절한 다음 diethyl ether 100 mL로 3회 반복 추출하여 유리형 페놀산 분획으로 하였다. 유리형 페놀산을 추출한 여액에 NaOH 농도가 2 N이 되도록 NaOH를 첨가한 다음 실온에서 4시간 가수분해하였다. 가수분해한 용액을 HCl로 pH 2.0으로 조절한 후 유리형 페놀산과 동일한 방법으로 추출하여 에스테르형 페놀산 분획으로 하였다. 결합형 페놀산은 첫 단계에서 물로 추출한 잔사에 2 N NaOH 250 mL를 첨가한 후 실온에서 가수분해시키고 에스테르형 페놀산과 동일한 방법으로 추출하였다. 각 분획의 diethyl ether 추출용액은 감압농축기를 이용하여 40°C에서 증발 건조시킨 후 일정농도의 methanol에 녹여 유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산의 시험용액으로 하였다. 시험용액을 일정량 취하여 증발 건조시킨 후 플라보노이드 분석에서와 동일한 방법으로 TMS 유도체화를 실시하면서 10분 동안만 반응시켰다. TMS 유도체화한 것을 GC/MS를 이용하여 Table 3의 조건으로 분석하면서 단지 오븐의 시작 온도만 140°C로 하였다. 한편, 페놀산의 정확한 동정을 위하여 benzoic acid, salicylic acid, m-hydroxybenzoic acid, homoveratric acid, gentisic acid, α-resocylic acid, syringic acid, gallic acid, t-cinnamic acid, vanillic acid, tyrosol, o-coumaric acid, umbelliferon, p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, sinapinic acid, o-hydroxyacetophenone, cinnamyl alcohol, homovanillic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxy coumarin, scopoletin, esculetin, fraxetin, 4-methylesculetin, esculin, catecol, p-hydroxyacetophenone, pyrogallol, homovanillic alcohol, acetosyringone, β-resocylic acid, quinic acid, chlorogenic acid 등 36종의 페놀산 표준품을 사용하여 비교하였다. 각 표준품 1.0 mg 정도씩을 취하여 pyridine에 용해하여 시료와 동일한 조건으로 유도체화 한 후 GC/MS에 주입하여 RT(머무름 시간)와 mass spectrum을 확인하였다.

Table 4. Total phenolic compounds and condensed tannin in *Ligustrum japonicum* fresh leaves (%)

Sample	Total phenolics	Condensed tannin
A	1.29±0.08[1)]	0.12±0.13
B	1.53±0.06	0.10±0.07
C	0.89±0.12	0.13±0.04

[1)]Mean±SD (3 replicates).

결과 및 고찰

페놀성 화합물 및 축합형 탄닌

신선한 광나무 잎에 존재하는 총 페놀성 화합물 함량과 축합형 탄닌 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 총 페놀성 화합물의 함량은 0.89~1.53%로 중간정도의 잎(B)에서 가장 많았으며, 축합형 탄닌의 함량은 0.10~0.13%로 세 종류의 잎에서 비슷하게 나타났다. 이는 광나무 잎의 수분함량이 72%정도였으므로 건조하여 용매로 추출할 경우에 그 함량이 훨씬 높게 나타날 것이다.

최근에 다양한 종류의 페놀성 화합물이 천연 항산화제 혹은 항돌연변이, 항발암효과 등의 다양한 생리활성을 나타내고 있어 많은 관심을 모으고 있으며 폴리페놀 화합물을 많이 함유하고 있는 채소와 과일 등 식물성 식품의 섭취량이 증가할수록 심혈관계 질환에 의한 사망률이 낮아진다는 역학조사 결과가 보고되고 있다(27). 또한, 혈중 총 콜레스테롤 농도를 낮추고 HDL-콜레스테롤 농도를 높이는 등의 혈관순환계 질환의 예방 및 개선에 효과가 있음이 보고되고 있다(28). 탄닌은 페놀성 화합물의 한 분류에 속해 있으며, 일반적인 식물에 함유되어 있는 polyphenol로 단백질 및 alkaloid와 결합된 난용성 화합물로 정의되고 있다. 특히, 탄닌은 녹차를 비롯한 차 잎의 주된 폴리페놀 성분으로 알려져 있으며 충치예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항암, 항산화, 미백효과 등이 있다고 알려져 있다.

본 실험에 사용한 광나무 잎의 페놀성 함량은 두충잎의 총 페놀성 화합물 함량을 1.25~2.89%로 보고한 Kim(29)의 연구와 비교할 때 다소 적은 함량이었으며 Chung 등(30)이 감잎차 제조를 위하여 성장시기별 탄닌의 함량변화를 조사하였을 때, 청도 반시 품종의 경우 1.70~2.17%를 나타낸 것과 비교할 때 광나무 잎의 축합형 탄닌은 상대적으로 미량이었다.

Flavonoid aglycones, flavonoid glycosides

광나무 잎의 열수 추출물을 염산으로 액성을 pH 2로 조정하여 ethyl acetate로 추출하고 용매를 제거한 후 잔류물을 일정량의 메탄올에 용해하여 HPLC로 분석하였다. 플라보노이드 표준품으로는 isoquercetrin, quercetrin, luteolin, quercetin, apigenin, keampferol 등을 사용하였고 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1(A)과 같다. 크로마토그램에서와 같이 quercetin glycoside인 isoquercetrin과 quercetrin은 RT(머

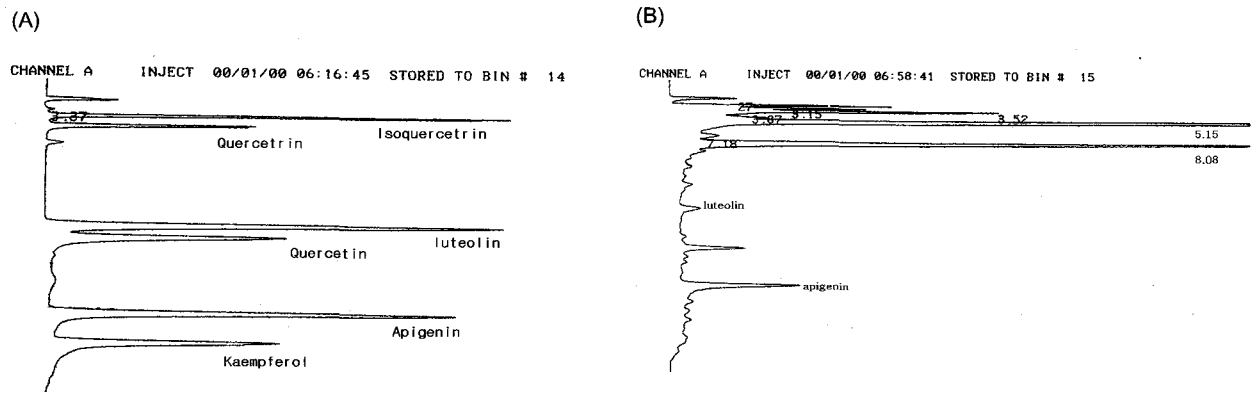

Fig. 1. HPLC chromatograms of flavonoid in *Ligustrum japonicum* fresh leaves. A: standard, B: sample.

무름 시간) 4.03과 RT 5.18분에 각각 분리되었고 aglycone인 luteolin, quercetin, apigenin, keampferol은 RT 16.62, 18.01, 26.88, 30.28분에 각각 분리되어 당이 결합된 glycoside류는 크로마토그램의 앞부분에 aglycone류는 뒷부분에서 분리됨을 알 수 있었다. 광나무 잎에 함유되어 있는 플라보노이드의 크로마토그램 Fig. 1(B)에서는 aglycone인 luteolin과 apigenin이 분리되었고 크로마토그램 앞부분인 RT 5.15분과 RT 8.08분에 flavonoid 배당체로 추정되는 두 개의 peak가 분리되었다.

시료에서 분리된 미확인 배당체를 확인하기 위하여 silica-gel column chromatography를 행하여 용출한 chloroform 분획에서 aglycon인 apigenin과 luteolin이 분리되었고, 50% ethyl acetate로 용출시킨 첫 분획(fraction I)에서 Fig. 2(A)에서 나타난 바와 같이 RT 8.08분에 배당체 형태의 물질이 분리되었다. 이 물질을 확인하기 위하여 분획물을 일정량 취하여 0.1 N HCl로 수욕조에서 30분간 가수분해한 후 ethyl acetate로 추출하여 HPLC에 주입한 결과 RT 8.08분에 분리된 물질은 가수분해되어 aglycone인 apigenin이 검출되는 것으로 보아 Fig. 2(A)의 RT 8.08분에 분리된 peak는 apigenin 배당체인 것으로 확인되었다(Fig. 2(B)).

또한, 50% ethyl acetate로 용출시킨 두 번째 분획(fraction II)에서도 Fig. 3(A)에서와 같이 RT 5.13분에 배당체로 추정되는 물질이 분리되었다. 이 분획은 0.1 N HCl에서 완전하게 가수분해되지 않아 1 N HCl로 가수분해하였다. 가수분해물을 ethyl acetate로 추출하여 HPLC로 분석한 결과 RT 5.13분에 분리된 peak는 가수분해되어 aglycone인 luteolin이 검출되었다(Fig. 3(B)). 이러한 결과로 볼 때 Fig. 3(B)의 RT 5.15분에 분리되었던 peak는 luteolin의 배당체임을 확인할 수 있었으며, luteolin의 8-C-glycoside인 orientin으로 추정되었다.

한편, Romani 등(31)은 광나무 잎의 flavonoid에 관한 연구에서 secoiridoids, kaempferol glycosides, quercetin glycosides 등의 화합물을 HPLC로 분석하였고, Jeong(18)은 동속의 쥐똥나무 잎에서 quercetin, eriodictyol, apigenin 등 3종류 플라보노이드와 2종의 플라보노이드 혼합물을 분리하였다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 Romani 등(31)이나 Jeong(18)이 보고한 결과와는 달리 flavonol류가 아니라 flavone류의 apigenin과 luteolin이 검출되었다. 또한, Jo와 Jung(32)의 녹황색 채소류에 함유된 flavonoid 분석에서도 flavone류가 검출되는 깻잎에서는 flavonol류가 검출되지 않았으며 flavonol이 검출된 부추와 미나리에서는 flavone류가 검출되지 않는 결과를 보여주고 있다. 이것을 확인하기 위하여 가수분해 추출물을 30분간 TMS 유도체화하여 GC/MS로 확인하였다. 또한, apigenin, luteolin, quercetin, kaempferol

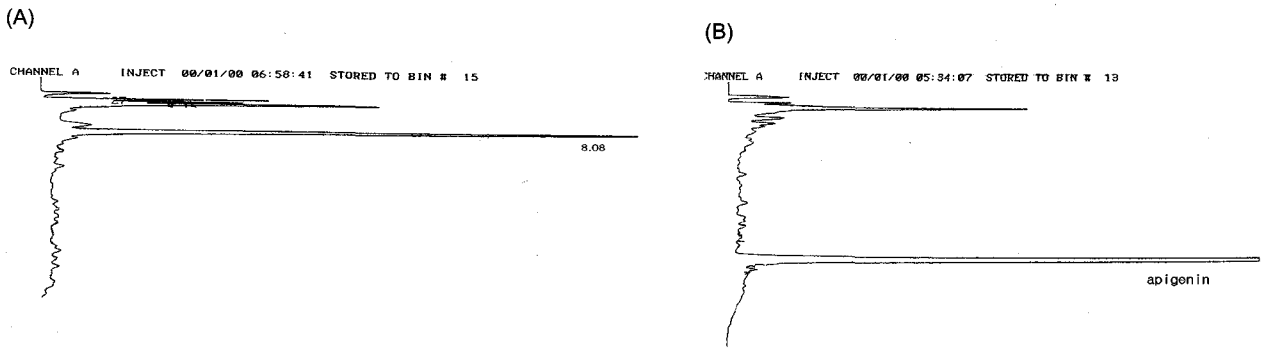

Fig. 2. HPLC chromatograms of flavonoid in *Ligustrum japonicum* fresh leaves.
A: fraction I, B: fraction I after 0.1 N HCl hydrolysis.

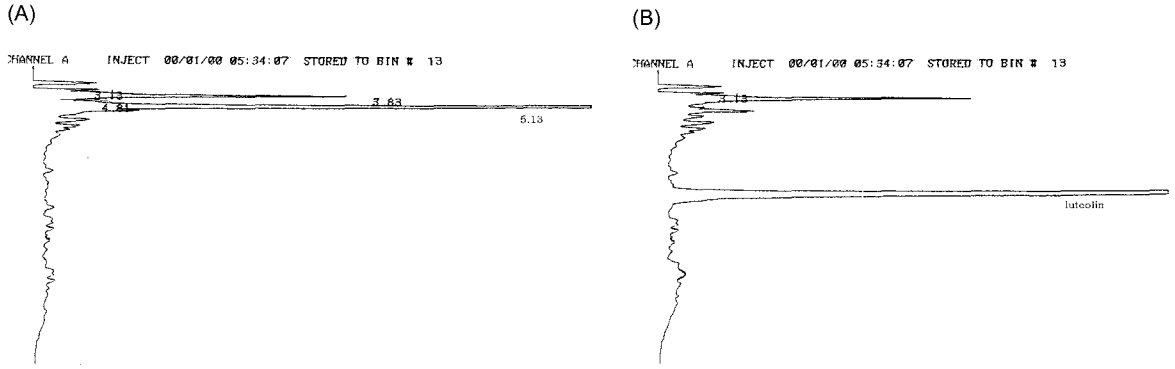

Fig. 3. HPLC chromatograms of flavonoid in *Ligustrum japonicum* fresh leaves.
A: fraction II, B: fraction II after 1.0 N HCl hydrolysis.

등의 표준품을 동일한 조건으로 TMS 유도체화하여 GC/MS에 주입하였다. 표준품에서 얻은 mass spectrum과 비교한 결과, 시료에서 $[M-CH_3]^+$ ion인 m/z 471 ion과 m/z 399, 281, 228 ion 등을 가지는 apigenin을, $[M]^+$ ion인 m/z 559 ion과 m/z 471, 399, 369 ion 등을 가지는 luteolin을 확인하였다. 그러나 m/z 575, 487, 281 ion 등으로 나타나는 quercetin과 m/z 559, 487, 272 ion 등으로 나타나는 kaempferol은 확인되지 않았다. 따라서 광나무 잎에 함유된 flavonoid는 apigenin과 luteolin 그리고 이들의 배당체임을 확인할 수 있었다. Flavonoids는 다양한 생리 및 약리활성을 나타내는 것으로 밝혀져 왔다. 특히, apigenin과 luteolin 같은 flavone류는 chemoprevention으로서도 효과가 있음이 보고되고 있다(33).

유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산의 분석

Tyrosol, p-cinnamic acid 등 페놀산 표준품 36종을 각각의 특성과 칼럼에서 분리되는 RT(머무름 시간) 등을 고려하여 4그룹으로 나누어 TMS 유도체화하여 GC/MS로 분석한 결과 이들 표준품의 RT, fragment ions 그리고 이온강도는 Table 5와 같다. 스펙트럼에서 나타난바와 같이 페놀산 화합물들은 분자이온 $[M]^+$와 $[M]^+$ ion에서 CH_3가 떨어져 나간 $[M-15]^+$ ion, OTMS가 소실된 $[M-89]^+$ ion, 두개의 OTMS가 소실된 $[M-177]^+$ ion 등이 특이적으로 생성되었으며, $[TMSO-C_6H_4-CH_2-]$가 있는 화합물은 m/z 179 ion이 나타난다.

그리고 fragment ion중에서 대체로 높은 abundance를 가지는 m/z 73 ion은 유도체화할 때 -OH기에 결합하는 TMS가 하나일 때 나타나는 ion이고, m/z 147은 -OH기에 결합하는 TMS가 두 개일 때 나타나는 ion이다. 또한, TMS-tyrosol의 mass spectrum에서 나타난 fragment ion은 $[M]^+$ ion인 m/z 282 ion, $[M-CH_3]^+$ ion인 m/z 267 ion, $[M-OTMS]^+$ ion인 m/z 193 ion, $[M-CH_2-OTMS]^+$ ion인 m/z 179 ion, $[-C_6H_4-OTMS]^+$ ion인 m/z 103 ion 등이 생성되었다. Esculetin에 glucose가 결합한 esculin(6, 7-dihydroxy, 6-glycoside coumarin)은 다수의 -OH가 TMS화되어 RT가 41.18로 늦게 분리되었고, m/z 361, 271 ion 외에도 일반적으로 TMS화된 당이 결합된 화합물에서 볼 수 있는 m/z 217 ion이 생성되었다. Coumarin은 대부분 p-coumaric acid에서부터 생합성되고 2H-1-benzopyran-2-one을 기본골격으로 하는 것으로 다른 페놀성 표준품과 마찬가지로 $[M]^+$ ion과 $[M]^+$ ion에서 CH_3가 소실된 $[M-15]^+$ ion 등이 생성되었다. 즉, esculetin(7,8-dihydroxy-6-methoxy-2H-benzopyran-2-one)의 경우 $[M]^+$ ion인 m/z 322 ion과 $[M-15]^+$ ion인 m/z 307 ion 등이 나타나고, fraxetin(7,8-dihydroxy-6-methoxy-2H-benzopyran-2one)도 $[M]^+$ ion인 m/z 352 ion과 $[M-15]^+$ ion인 m/z 337 ion 등이 생성되었다. 이러한 결과로 볼 때 페놀산의 TMS 유도체 화합물은 $[M-15]^+$ ion이 특징적으로 생성되고 이것의 intensity가 상대적으로 강하게 생성됨을 알 수 있었다. 유리형 페놀산은 tyrosol이 대부분을 차지하였고 trans-cinnamic acid, p-hydroxy benzoic acid, vanillic acid, shikimic acid, protocatecuic acid 등의 페놀산이 함유되어 있었다. 그러나 사용한 36종 페놀산 표준품이나 Wiley와 NIST library 확인에서도 동일한 mass spectrum을 가진 화합물이 없어 동정이 불가능하였지만 페놀산 화합물의 특징인 $[M-15]^+$ ion을 가지는 다수의 유리형 페놀산이 함유되어 있는 것을 알 수 있었다. 에스테르형 페놀산은 trans-cinnamic acid, tyrosol, hydroxytyrosol, p-coumaric acid, ferulic acid, esculetin, caffeic acid 등이 함유되어 있었다. Kwon과 Kim(19)은 물푸레나무 잎의 성분연구에서 silicagel, Sephadex LH-20 및 RP-18 등의 칼럼 크로마토그라피를 행하여 esculin, cichoriin, scopolin, fraxin 등을 분리하였고, Bae와 Kim(21)도 물푸레나무의 수피에서 esculin, esculetin, fraxetin 등을 분리 보고하였다. 그러나 본 실험에 사용된 광나무 잎에서는 esculetin은 검출되었으나 나머지 성분은 검출되지 않았다. Kim 등(34)은 밤 삽피의 유리형 분획에서 gallic acid, ellagic acid, salicylic acid, gentisic acid를, 에스테르형 분획에서 gallic acid, ellagic acid, protocatechuic acid 등을, 결합형 분획에서 sinapinic acid를 검출하였다. Hydroxytyrosol을 확인하기 위해서는 oleuropein을 가수분해하면 1 mol씩의 hydroxytyrosol, glucose, elenolic acid가

Table 5. Principal ions observed in the EI mass spectra of TMS derivatives of phenolic acid standards

RT	Group	Systematic name (common name)	M.W.	M.W. (TMS)	Fragment ions m/z (intensity as % of base peak)				
6.91	1	benzencarboxylic acid (benzoic acid)	122	194	194 (9)	179 (100)	135 (52)	105 (78)	77 (53)
8.01	4	1,2-benzenediol (catecol)	110	254	254 (30)	239 (6)	166 (4)	151 (8)	73 (100)
9.02	3	2-hydroxyacetophenone (o-hydroxyacetophenone)	136	208	208 (0)	193 (100)	175 (32)	151 (18)	89 (12)
9.89	3	3-phenyl 2-propen-1-ol (cinnamyl alcohol)	134	206	206 (42)	191 (42)	117 (100)	115 (50)	73 (70)
10.75	4	4-hyroxyacetophenone (p-hydroxyacetophenone)	136	208	208 (28)	193 (100)	151 (13)	91 (8)	73 (18)
11.56	1	2-hydroxy benzoic acid (salicylic acid)	138	282	282 (0)	267 (100)	209 (7)	135 (16)	73 (82)
12.18	2	3-phenylpropanoic acid (t-cinnamic acid)	148	220	220 (30)	205 (100)	161 (55)	131 (90)	103 (64)
12.28	4	2,3,4-benzentriol (pyrogallol)	126	342	342 (50)	239 (100)	211 (8)	133 (15)	73 (92)
12.55	1	3-hydroxy benzoic acid (m-hydroxybenzoic acid)	138	282	282 (40)	267 (100)	223 (45)	193 (48)	73 (50)
12.69	2	4-hydorxyphenyl ethanol (tyrosol)	138	282	282 (18)	267 (13)	193 (14)	179 (100)	103 (13)
15.57	4	4-hyroxy 3-methoxy benzyl alcohol (homovanillic alcohol)	168	312	312 (30)	297 (10)	209 (100)	179 (25)	73 (45)
15.68	1	3,4-methyl phenyl acetic acid (homoveratric acid)	196	268	268 (40)	253 (20)	209 (100)	151 (45)	73 (100)
16.67	2	4-hydorxy,3-methoxy benzoic acid (vanillic acid)	168	312	312 (60)	297 (100)	267 (80)	253 (53)	223 (67)
16.85	3	4-hydroxy 3-methoxy phenyl acetic acid (homovanillic acid)	182	326	326 (42)	267 (28)	209 (58)	179 (38)	73 (100)
16.91	4	4-hydroxy 3,5-methoxy acetophenone (acetosyringone)	196	268	268 (54)	253 (70)	238 (97)	223 (100)	73 (40)
16.97	1	2,5-dihydroxy benzoic acid (gentisic acid)	154	370	370 (4)	355 (100)	267 (6)	223 (6)	73 (60)
17.62	2	2-hydorxy cinnamic acid (o-coumaric acid)	164	308	308 (26)	293 (34)	161 (28)	147 (100)	73 (100)
17.74	1	3,5-dihydroxy benzoic acid (α-resocylic acid)	154	370	370 (100)	355 (94)	311 (35)	170 (24)	73 (86)
17.78	4	2,4-dihydroxy benzoic acid (β-resocylic acid)	154	370	370 (0)	355 (100)	281 (10)	223 (6)	73 (53)
17.86	3	3,4-dihydroxy benzoic acid (protocatechuic acid)	154	370	370 (50)	355 (25)	311 (20)	193 (100)	73 (68)
18.30	2	7-hydorxy coumarin (umbelliferon)	162	234	234 (81)	219 (100)	191 (15)	163 (52)	73 (31)
18.39	3	4-hydroxy coumarin	162	234	234 (40)	219 (100)	206 (40)	175 (44)	73 (32)
18.96	4	1,3,4,5-tetrahydroxyhexanecarboxylic acid (quinic acid)	192	556	345 (100)	255 (44)	204 (16)	147 (50)	73 (92)
19.39	1	4-hydroxy,3,5-dimethoxy benzoic acid (syringic acid)	198	342	342 (70)	327 (100)	312 (70)	297 (64)	73 (70)
19.89	1	2,3,4-trihydroxy benzoic acid	170	458	443 (100)	355 (14)	281 (40)	147 (12)	73 (60)
20.14	2	4-hydorxy cinnamic acid (p-coumaric acid)	164	308	308 (60)	293 (80)	249 (44)	219 (100)	73 (98)
20.65	1	3,4,5-trihydroxy benzoic acid (gallic acid)	170	458	458 (88)	443 (36)	281 (100)	179 (22)	73 (80)
22.23	3	7-hydroxy,6-methoxy coumarin (scopoletin)	192	264	264 (50)	234 (100)	206 (42)	176 (13)	73 (32)
23.01	2	4-hydorxy, 3-methoxy cinnamic acid (ferulic acid)	180	338	338 (100)	323 (57)	308 (54)	293 (37)	249 (57)
23.41	3	6,7-dihydroxy coumarin (esculetin)	178	322	322 (55)	307 (43)	206 (15)	175 (8)	73 (100)
23.84	2	3,4-dihydorxy cinnamic acid (caffeic acid)	194	396	396 (60)	381 (15)	307 (12)	219 (100)	73 (93)
24.25	3	7,8-dihydroxy,6-methoxy coumarin (fraxetin)	208	352	352 (40)	337 (100)	307 (4)	264 (3)	73 (74)
25.67	2	4-hydorxy,3,5-dimethoxy cinnamic acid (sinapinic acid)	224	368	368 (100)	353 (48)	338 (94)	323 (27)	73 (94)
25.67	3	6,7-dihydroxy,4-methyl coumarin (4-methylesculetin)	192	336	336 (78)	321 (65)	248 (6)	220 (18)	73 (100)
40.49	4	3-(3,4-dihydroxycinnamoyl) quinic acid (chlorogenic acid)	354	786	345 (60)	307 (37)	255 (42)	147 (33)	73 (100)
41.18	3	6,7-dihydroxy, 6-glycoside coumarin (esculin)	340	700	361 (55)	271 (12)	217 (33)	147 (32)	73 (100)

생성되므로(35), Bae와 Kim(21)이 분리한 oleuropein을 분양받아 3 N HCl로 100°C에서 10분간 가수분해한 후 생성된 hydroxytyrosol의 RT와 mass spectrum을 비교하였다. 그 결과 동일한 RT와 $[M]^+$ ion인 m/z 370 ion, $[M-OTMS]^+$

ion인 m/z 281 ion, $[M-CH_2-OTMS]^+$ ion에서 나타나는 m/z 267 ion 및 $[M-CH_2-(OTMS)_2]^+$ ion에서 나타나는 m/z 179 ion 등이 검출되어 hydroxytyrosol임을 확인할 수 있었다. 결합형 페놀산 분획에서는 trans-cinnamic, tyrosol, p-cinnamic acid 등의 페놀산이 분리되었고 $C_{16:0}$과 $C_{18:3}$의 지방산이 존재하고 있었다. 이상의 결과에서 볼 때 광나무 잎의 유리형, 에스테르형 및 결합형 페놀산 분석에서 확인된 주요 페놀산은 trans-cinnamic acid, tyrosol, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, hydroxytyrosol, shikimic acid, protocatecuic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, esculetin, caffeic acid 등이었다. 그리고 유리형, 에스테르형 및 결합형 분획 중의 총 페놀성 함량을 측정한 결과 각각 20.66%, 78.01%, 24.56%로 나타나 trans-cinnamic acid, ferulic acid, esculetin, caffeic acid, p-coumaric acid, hydroxytyrosol 등이 검출된 에스테르형 분획의 총 페놀성 함량이 월등하게 높았다.

Owen 등(36)은 extra virgin olive oil에 hydroxytyrosol이나 tyrosol 같은 단순 페놀, aldehydic secoiridoids, flavonoids, lignans 등의 풍부한 페놀성 항산화제를 함유하고 있다고 하였다. 그리고 이들 페놀물질은 유방암이나 직장암과 같은 지방관련 종양의 병인이라는 증거가 늘고 있는 salicylic acid나 2-deoxyguanosin과 같은 반응 산소종을 저해할 가능성이 크다고 하였다. 일반적인 단순 페놀은 xanthin oxidase 저해활성을 나타내지 않는 반면 페놀성 화합물이 풍부한 올리브유 추출물은 salicylic acid에 의한 HO·의 반응을 직접 저해하고, 발암원성에 영향을 주는 xanthin oxidase 활성을 저해한다고 하였다. 또한, xanthin oxidase 활성저해는 총 페놀 양과 밀접하게 관련되어 있어 800 ppm 정도의 함량에서는 완전하게 저해되어 uric acid 생성이 거의 없다고 하였으며 salicylic acid 반응산소종에 대한 tyrosol, hydroxytyrosol, p-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, ferulic acid, cinnamic acid, oleuropein glucoside 등의 IC_{50}은 각각 2.51, 1.34, 1.69, 6.05, 1.56, 2.33 및 7.80 mM로 이들 페놀성 화합물은 IC_{50}이 12.24 mM인 trolox보다 강한 xanthin oxidase 활성 저해효과를 나타냈다고 보고했다. 또한, *in vitro*에서 hydroxytyrosol은 사람의 LDL을 산화시키고, 혈소판 응집을 저해하며(37), 호흡기와 장관의 감염을 야기하는 그람양성과 그람음성세균에 대해서도 억제활성을 나타낸다고 보고하였다(38). 일부 biophenol, oleuropein, hydroxytyrosol, luteolin이 용량의존방식으로 copper sulphate 유발 산화에 대해 LDL을 방어함으로써 LDL-atheroma 발생 가능성을 감소시키며(39), 올리브 오일의 hydroxytyrosol과 hydroxytyrosol의 1~3 glucoside는 오일의 자동산화를 억제한다고 보고하였다(40). 또한 아몬드 껍질에서 분리한 catechin, protocatechuic acid, vanillic acid, p-hydroxybenzoic acid 중 catechin과 protocatechuic acid는 DPPH 소거능이 매우 강해 2 μM에서도 90% 이상 제거한다고 보고하였다. 또한, benzoic acid의 유도체로 단순페놀인 protocatechuic acid는 α-tocopherol보다 10배 높은 항산화 효과를 가지며 rat를 이용한 실험에서 식이 중 100 ppm 정도의 농도에서 결장암과 구강암에 대해 chemoprevention 효과를 가진다고 보고하였다(41). 따라서 국내에서는 물푸레나무에서 tyrosol이 밝혀진 것 이외에는 거의 보고된 적이 없는 tyrosol과 hydroxytyrosol 등의 페놀산이 본 실험에 사용된 광나무 잎에 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

식물자원으로부터 생리활성 물질의 이용측면에서 국내에서 자생하고 있는 광나무 잎을 대상으로 하여 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고된 페놀성 화합물의 분포를 확인하였다. 총 페놀성 함량은 0.89~1.53%, 축합형 탄닌은 0.10~0.13%였으며, flavonoid는 aglycone인 apigenin, luteolin과 칼럼크로마토그라피를 행하여 분획으로 분리한 후 가수분해하여 이들의 배당체를 확인하였다. 페놀산의 분획 중 유리형 페놀산 화합물에는 tyrosol, t-cinnamic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, shikimic acid, protocatecuic acid 등이 존재하였다. 에스테르형 페놀산 화합물에는 tyrosol, t-cinnamic acid, ferulic acid, esculetin, caffeic acid, p-coumaric acid, hydroxytyrosol 등이 함유되었다. 결합형 페놀성 화합물에는 tyrosol, t-cinnamic, p-coumaric acid와 미확인 페놀성 물질들이 존재하였다. 따라서 광나무 잎은 xanthine oxidase 활성저해, LDL 산화, 혈소판 응집저해, 항균활성 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있는 tyrosol, hydroxytyrosol, protocatecuic acid 등 풍부한 페놀성 화합물을 함유하고 있으므로 유용한 식물자원이 될 수 있음을 확인하였다.

문 헌

1. Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzz A. 1996. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr* 50: 28-32.
2. Stoner GD, Mykhtar H. 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Bio Chem* 22: 169-180.
3. Vijaya K, Ananthan S, Nalini R. 1995. Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp. *J Ethnopharmacol* 49: 115-118.
4. Ohmori Y, Ito M, Kishi M, Mizutani H, Katada T, Konishi H. 1995. Antiallergic constituents from oolong tea stem. *Biol Pharm Bull* 18: 683-686.
5. Hattori M, Namba T, Hara Y. 1990. Effect of tea polyphenols on glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull* 18: 717-720.
6. Yokogoshi H, Kato Y, Sagesaka YM, Takihara-Maatsuura T, Kaguda T, Takeuchi N. 1995. Reduction effects of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:

615-618.
7. Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res* 55: 259-266.
8. Yamane T, Takahashi T, Kuwata K, Oya K, Inagake M, Kitao Y, Suganuma M, Fujiki H. 1995. Inhibition of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach. *Cancer Res* 55: 2081-2084.
9. Grubbs CJ, Steele VE, Casebolt T, Juliana MM, Eto I, Whitaker LM. 1995. Chemoprevention of chemically-induced mammary carcinogenesis by indole-3-carbinol. *Anticancer Res* 15: 709-716.
10. Wang CJ, Lee MJ, Chang MC, Lin JK. 1995. Inhibition of tumor promotion in benzo[a]pyrene-initiated CD-1 mouse skin by crocetin. *Carcinogenesis* 16: 187-191.
11. Nishikawa A, Furukawa F, Ikezaki S, Tanakamaru ZY, Chung FL, Takahashi M, Hayashi Y. 1996. Chemopreventive effects of 3-phenylpropyl isothiocyanate on hamster lung tumorigenesis initiated with N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine. *Jpn J Cancer Res* 87: 122-126.
12. Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M, Makita H, Mori H, Satoh K, Hara A. 1995a. Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary administration of naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase. *Carcinogenesis* 16: 2957-2963.
13. Hirose Y, Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M, Makita H, Mori H, Satoh K, Hara A. 1995. Chemopervention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatecuic acid in rats. *Carcinogenesis* 16: 2337-2342.
14. Kim CH, Youk SU. 1993. *Coloured resources woody plants.* AcademyBook, Seoul, Korea. p 438-440.
15. 한국토종야생산야초연구소. http://jdm0777.com.ne.kr (2006. 4. 25 방문)
16. Youk CS. 1989. *Coloured medicinal plants of Korea.* AcademyBook, Seoul, Korea. p 434.
17. Lee JH, Chang SY, Yook CS. 1999. Studies on the morphology and chemical components of *Ligustrum obtusifolium* and other *Ligustrum* spp. *Bull K H Pharma Sci* 27: 21-30
18. Jeong JY. 1992. Studies on the chemistry and biological activities of the flavonoids from the leaves of *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc. *PhD Dissertation.* Kyungsung University, Busan, Korea. p 25-31.
19. Kwon YS, Kim CM. 1996. A study on the chemical constituents from leaves of *Fraxinus riynchophylla. Kor J Pharmacogn* 27: 347-349.
20. Lee SG, Ham YH, Bae YS. 1998. Oleuropein and ligstroside from the bark of *Fraxinus rhynchophylla. Korean J Soc Wood Sci Tech* 26: 56-60.
21. Bae YS, Kim JG. 2000. Extractives of the bark of ash and elm as medicinal hardwood tree species. *Korean J Soc Wood Sci Tech* 28: 62-69.
22. Price ML, Butler LG. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J Agric Food Chem* 25: 1268-1273.
23. Wang CK, Hwang LS. 1993. Analysis of phenolic compounds in betel quid. *J Chin Agric Chem Soc* 31: 623-632.
24. Julkunen-Tiitto R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows. Methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem* 33: 213-217.
25. Donor LW, White JW Jr, Phillips JG. 1979. Gas-liquid chromatographic test for honey adulteration by high fructose corn sirup. *J Assoc Off Anal Chem* 62: 186-189.
26. Krygier K, Sosulski F, Lawrence H. 1982. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purificition procedure. *J Agric Food Chem* 30: 330-334.
27. Hertog MG, Kromhout L, Aravanis D, Blackburn C, Katan MB. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Inter Med* 155: 381-386.
28. Hertog MGL, Fesken EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011.
29. Kim JB. 1998. Changes of major components during growth and physiological functionality of *Eucommia ulmoides* leaves. *PhD Dissertation.* Youngnam University, Gyeongsan, Korea. p 37-38.
30. Chung SH, Moon KD, Kim JK, Seong JH, Sohn TH. 1994. Changes of chemical components in persimmon leaves during growth for processing persimmon leaves tea. *Korean J Food Sci Technol* 26: 141-146.
31. Romani A, Pinelli P, Mulinacci N, Vincieri FF, Gravano E, Tattini M. 2000. HPLC analysis of flavonoids and secoiridoids in leaves of *Ligustrum vulgare* L. (Oleaceae). *J Agric Food Chem* 48: 4091-4096.
32. Jo JO, Jung IC. 2000. Analysis of flavonoids in raw and blanching of several green-yellow vegetables. *J East Asian Soc Dietary Life* 10: 42-47.
33. Steinmetz KA, Potter JD. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 96: 1027-1039.
34. Kim YC, Kim MY, Chung SK. 2002. Phenolic acid composition and antioxidative activity of chestnut endodern. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 45: 162-167.
35. Fernandez-Bolanos J, Rodriguez G, Rodriguez R, Heredia A, Guellen R, Jimenez A. 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *J Agric Food Chem* 50: 6804-6811.
36. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolate from olive oil. *Eur J Cancer* 36: 1235-1247.
37. Visioli F, Romani A, Mulinacci N, Zarini S, Conte D, Vincieri FF, Galli C. 1999. Antioxidant and other biological activities of olive oil mill wastewater. *J Agric Food Chem* 47: 3397-3401.
38. Bisignano A, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol* 51: 971-974.
39. Visioli F, Galli C. 1995. Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease: The potential role of olive oil and its minor constituents. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 5: 306-314.
40. Bianco A, Mazzei RA, Melchioni C, Romeo G, Scarpati ML, Soriero A, Uccella N. 1998. Microcomponents of olive oil-III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl)ethanol. *Food Chemistry* 63: 461-464.
41. Sang S, Lapsley K, Jeong WS, Lachance PA, Ho CT, Rosen RT. 2002. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J Agric Food Chem* 50: 2459-2463.

(2006년 3월 27일 접수; 2006년 5월 2일 채택)