

Research Article



CrossMark

Open Access

UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS를 이용한 국내산 두릅나무 및 음나무 순 내 페놀산 특성 비교

김영진¹, 김현웅¹, 이민기¹, 이선희¹, 게릴라 아사메뉴¹, 이수지¹, 이상훈¹, 차연수², 김정봉^{1*}

¹국립농업과학원 농식품자원부 식생활영양과, ²전북대학교 생활과학대학 식품영양학과

Comparison of Phenolic Acid from Shoots of *Aralia elata* and *Kalopanax pictus* Cultivated in Korea Using UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS

Young Jin Kim¹, Heon-Woong Kim¹, Min-Ki Lee¹, Seon-Hye Lee¹, Gelila Asamenew, Suji Lee¹, Sang Hoon Lee¹, Youn-Soo Cha² and Jung Bong Kim^{1*} (¹Department of Agro-food Resources, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea, ²Department of Food Science and Human Nutrition, College of Human Ecology, Chonbuk National University, Jeonju 561756, Korea)

Received: 8 October 2018/ Revised: 2 November 2018/ Accepted: 12 November 2018

Copyright © 2018 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Young Jin Kim

<http://orcid.org/0000-0003-4126-016X>

Jung Bong Kim

<http://orcid.org/0000-0002-0589-3886>

Abstract

BACKGROUND: In this study, shoots of *Aralia elata* and *Kalopanax pictus* which belong to the Araliaceae family were analyzed using UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS to characterize of individual phenolic acids.

METHODS AND RESULTS: Total thirteen phenolic acids were identified, and nine hydroxycinnamic acid derivatives have been identified for the first time in shoots of *Aralia elata* and *Kalopanax pictus*. For total phenolic acid content (mg/100g dry weight), shoots of *Aralia elata* and *Kalopanax pictus* showed 754.8 and 845.3 mg/100g, respectively. 5-*O*-Caffeoylquinic acid (49%) and 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (44%) were found as major phenolic acids in *Aralia elata*, while 5-*O*-caffeoylquinic acid (91%) was a major component in *Kalopanax pictus*.

CONCLUSION: On comparing the two plants, it was considered that the biosynthesis of 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid can be affected by 5-*O*-caffeoylquinic acid in *Aralia elata*.

Key words: *Aralia elata*, Hydroxycinnamic acid derivatives, *Kalopanax pictus*, UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS

서론

페놀화합물은 식물성 이차대사물질 중 가장 큰 범주에 속하며, 여러 과일 및 채소류에서 8,000개 이상의 서로 다른 화합물이 존재한다고 보고되었다(Crozier *et al.*, 2009). 페놀산은 구조에 따라 hydroxycinnamic acid류(C₆-C₃)와 hydroxybenzoic acid류(C₆-C₁)로 구분되며, 이 중 hydroxycinnamic acid류가 더 큰 비중을 차지한다(Mattila *et al.*, 2007). 이들은 효소적 hydroxylation(-OH), *O*-methylation(-OCH₃), *O*-glycosylation 등의 결합 패턴에 따라 다양한 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다(Rice-Evans *et al.*, 1997). 식물체에서 가장 흔하게 발견되는 페놀산은 caffeic acid와 ferulic acid이며, caffeic acid는 주로 quinic acid와 ester 결합된 형태의 hydroxycinnamic acid 유도체로 존재한다(Crozier *et al.*, 2009; Heleno *et al.*, 2015).

두릅나무(*Aralia elata*)와 음나무(*Kalopanax pictus*)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 식물로, 국내에서는 이들의 어린잎을 나물로 식용하고 있다. 두릅나무 순에서 동정된 5-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid는 산화 방지 및 간세포 보호효과를 나타내는 것으로 보고되었

*Corresponding author: Jung Bong Kim
Phone: +82-63-238-3560; Fax: +82-63-238-3842;
E-mail: jungbkim@korea.kr

다(Kwon *et al.*, 2018). 두릅나무 순으로부터 분리된 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid는 활성 질소종인 peroxydinitrite(ONOO)의 소거 활성을 나타내었다(Nugroho *et al.*, 2011).

두릅나무과 관목의 수피는 한방에서 주로 약용으로 이용하며 지금까지 이들 추출물의 약리학적 활성을 측정하는 연구가 주로 수행되어 왔다(Hwang *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2005). 두릅나무 수피에서 분리된 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxycinnamic acid의 항미생물 효과가 보고되었으며(Ma *et al.*, 1995, 1996), 으나무 수피로부터 분리된 kalopanaxin A, B, F, coniferin, liriodendrin가 간세포에서 항염증 효과를 나타내었다(Quang *et al.*, 2011).

한방에 근거한 두릅나무과 관목 수피의 약리학적 측면에 관한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나 두릅나무 및 으나무 순은 예로부터 식용으로 이용되어 왔음에도 불구하고 페놀산의 분리·동정에 대한 연구는 아직 부족한 실정이며, 특히 이들의 페놀산 특성 비교에 대한 연구는 없는 상태이다.

최근 건강에 대한 관심이 증대되면서 안정성이 높은 원료를 이용한 건강보조 식품 개발에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있으며(Kim, 2015), 잠재적인 생리활성 기능을 가진 두릅나무 순을 첨가한 다양한 식품 개발 연구들이 수행되었다. 설기떡 제조 시 두릅가루를 첨가하면 설기떡의 저장성이 높아진다고 보고된 바 있으며(Kang *et al.*, 2009), 두릅나무 및 으나무 순 가루를 첨가한 국수가 높은 식이 섬유 함량을 나타내었다고 보고하였다(Kim and Lee, 2012).

이에 본 연구는 UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS 분석을 통해 국내산 두릅나무 및 으나무 순에 함유된 페놀산을 분리·동정하여 각 식물간의 페놀산 특성을 비교하고, 이들의 건강보조 식품 원료로서 이용 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 두릅나무 및 으나무 순은 2016년도에 국내 재배된 것을 시중에서 구입하여 시료로 사용하였다. 각 시료를 흐르는 물에 세척 한 후 물기를 닦은 다음 1-3 cm 길이로 세절하여 -20°C 냉동고에 보관한 후 동결 건조 하였다. 동결 건조된 각 시료를 분쇄한 후 밀봉하여 분석 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

페놀산 분석에 사용된 3,4-dihydroxybenzoic acid, caffeic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, 및 2,4,5-trimethoxycinnamic acid는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 5-*O*-Caffeoylquinic acid methyl ester는 Extrasynthese(Genay Cedex, France)에서 구입하여 사용하였으며, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid 및 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid는 Chem Faces(Wuhan, China)에서 구입하여 사용하였다. Water, acetonitrile(ACN) 및 methanol(MeOH)는 UPLC

grade(Fisher Scientific Co., USA)를 사용하였으며, formic acid(FA)는 Daejung Chemicals & Metals (Siheung, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

페놀산 추출

동결 건조된 시료 1 g과 내부표준물질인 2,4,5-trimethoxycinnamic acid 250 ppm이 함유된 추출용매(MeOH: water: FA = 80: 15: 5) 10 mL를 혼합하여 30분간 교반 추출한 후 원심분리(3000 rpm, 15 min, 10°C)하였다. 0.45 µm syringe 필터(Whatman International, Maidstone, Kent, UK)를 사용하여 상층액을 여과한 다음, 여과액 0.5 mL을 물 4.5 mL을 합하여 희석시켰다. Sep-pak C18 cartridge(Waters Co., Milford, MA, USA)에 물 2 mL, 물 2 mL 순으로 흘려주어 활성화 시킨 후 희석된 여과액 5 mL을 로딩시켜 페놀화합물을 내부에 고정시켰다. 물 2 mL을 흘려주어 컬럼 내부를 세척한 뒤 메탄올 3 mL을 흘려주어 화합물을 용출한 다음 질소가스로서 농축시켜 내부표준물질이 없는 추출용매 0.2 mL로 재용해 하였다. 0.2 µm syringe 필터(Whatman)를 사용하여 재용해액을 여과한 다음, LC-vial에 담아 UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS를 이용하여 분석하였다.

UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS를 이용한 페놀산 분리 및 동정

페놀산의 분리 및 동정을 위해 UPLC(Waters, ACQUITY UPLC™ system, Waters Co., Milford, MA, USA)와 diode array detector(DAD)가 연결된 QToF 질량분석기(Xevo G2 QToF, Waters MS Technologies, Manchester, UK)를 사용하였다. 분석 시 검출 파장 범위는 210-400 nm이었으며, hydroxybenzoic acid류, hydroxycinnamic acid류의 대표파장은 각각 280, 320 nm로 설정하였다. 페놀산의 분리를 위해 CORTECS® UPLC® VanGuard™ 보호 컬럼(2.1 × 5 mm; Waters Co.)이 부착된 CORTECS® UPLC® T3 컬럼(2.1 × 150 mm, 1.6 µm; Waters Co.)을 사용하였다. 이동상은 A: 0.1% FA in water, B: 0.1% FA in ACN을 사용하였고, 이동상 B를 2%로 시작하여 4분 동안 유지하고, 8분까지 4%, 20분까지 7%, 32분까지 11%, 55분까지 15%, 75분까지 25%, 85분까지 50%로 증가시켰으며, 87분까지 유지하였다. 이어서 90분까지 90%로 증가시킨 후 92분까지 유지하다 95분까지 2%로 감소시켜 100분까지 유지하였다. 유속은 0.35 mL/min, 컬럼 오븐온도는 30°C, 시료 주입량은 1 µL로 설정하였다. 질량 분석기의 이온 검출 방식은 positive ion 모드를 사용하였으며, capillary 전압은 3.5 kV, sampling con 전압은 40 V, ion source 온도는 120°C로 설정하였다. Desolvation gas의 온도와 유속은 각각 500°C, 1020 L/hrs로 설정하였으며, 질량 스캔 범위는 m/z 50-1000으로 설정하였다. 페놀산 동정 시 선택성 및 정확성을 높이기 위해 특정 이온의 m/z 를 선택하는 selected ion monitoring(SIM) mode를 사용하였고, 선행 연구결과 UV spectrum, 단편 이온 패턴을 참고하였다. 검출된 성

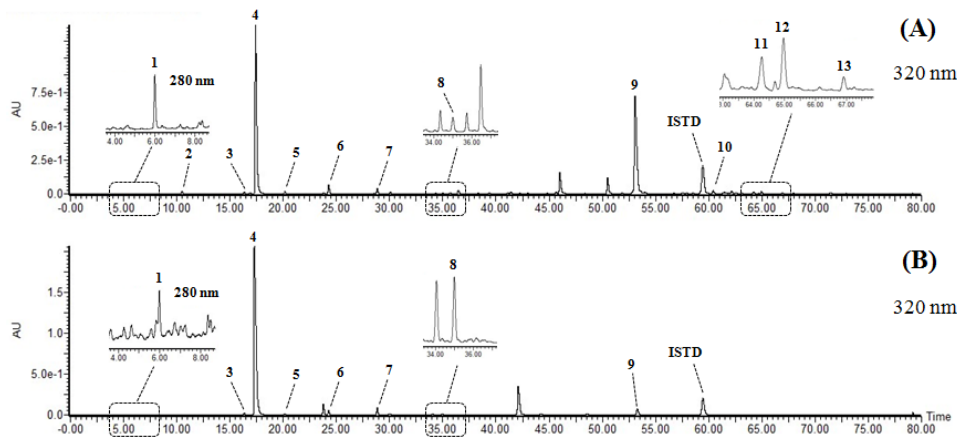


Fig 1. UPLC-DAD chromatograms of phenolic acids in *Aralia elata* (A) and *Kalopanax pictus* (B). 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid, peak 1) and hydroxycinnamic acid derivatives were showed at 280, 320 nm, respectively. 2,4,5-trimethoxycinnamic acid was used as internal standard (ISTD). Data for the numbered peaks are given in Table 1.

Table 1. Characterization of 13 phenolic acids in the shoots of *Aralia elata* and *Kalopanax pictus* using UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS

Peak No.	RT (min)	Positive ions (m/z)			Compound	Content (mg/100g DW)		Used parts on the literature	
		[M+H] ⁺	[M+K] ⁺ / [M+Na] ⁺	Fragment ions		<i>Aralia elata</i>	<i>Kalopanax pictus</i>	<i>Aralia elata</i>	<i>Kalopanax pictus</i>
1	5.99	155	-	137	3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid) ^{a)}	0.9 ± 0.1	0.1 ± 0.0	Barks ⁷	Barks ⁵
2	10.49	355	393/377	181, 163, 135	3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid) ^{a)}	3.5 ± 0.2	ND	-	-
3	16.34	181	-	163, 135	caffeic acid ^{a)}	2.4 ± 0.1	5.3 ± 0.2	-	Barks ^{3,6}
4	17.29	355	393/377	337, 181, 163, 145, 135	5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) ^{a)}	372.7 ± 5.6	772.7 ± 22.6	Shoots ⁴	Shoots ¹ , Barks ⁷
5	20.16	355	393/377	181, 163, 145, 135	4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid) ^{a)}	3.8 ± 0.1	3.1 ± 0.1	-	-
6	24.28	339	377/361	321, 147, 119	5- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroylquinic acid ^{b)}	16.8 ± 0.1	13.0 ± 0.2	-	-
7	28.85	369	407/391	351, 177, 149, 145, 134	5- <i>O</i> -feruloylquinic acid ^{b)}	9.6 ± 0.0	22.0 ± 0.2	-	-
8	35.00	369	407/391	351, 163, 145	5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid methyl ester ^{b)}	1.6 ± 0.5	3.6 ± 0.9	-	-
9	53.29	517	555/539	499, 181, 163	3,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid (isochlorogenic acid A) ^{a)}	331.1 ± 2.8	25.5 ± 0.6	Shoots ⁴	Leaves ²
10	60.42	517	555/539	499, 181, 163	4,5-di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid (isochlorogenic acid C) ^{a)}	5.6 ± 0.1	ND	-	-
11	64.26	531	569/553	513, 177, 163	3- <i>O</i> -feruloyl-5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid ^{b)}	2.6 ± 0.0	ND	-	-
12	64.96	531	569/553	513, 177, 163	3- <i>O</i> -caffeoyl-5- <i>O</i> -feruloylquinic acid ^{b)}	3.3 ± 0.1	ND	-	-
13	66.91	531	569/553	163	dicafeoylquinic acid methyl ester isomer ^{b)}	0.9 ± 0.2	ND	-	-
Total phenolic acid content						754.8 ± 5.7	845.3 ± 22.8		

^{a)} Confirmed with RT, MS and UV spectra of authentic standard, ^{b)} Tentatively identified.

¹⁾Nugroho et al., 2011, ²⁾Hu et al., 2012, ³⁾Kim et al., 1998, ⁴⁾Kwon et al., 2018, ⁵⁾Ma et al., 1995, ⁶⁾Quang et al., 2011, ⁷⁾Sano et al., 1991.

Each value presented as means ± SD ($n=3$) by using internal standard (2,4,5-trimethoxycinnamic acid). RT, retention time; DW, dry weight; ND, not detected.

분은 내부표준물질의 면적과 상대적으로 비교하여 정량되었으며, 각 화합물 간 response factor는 고려하지 않았다.

결과 및 고찰

두릅나무 및 음나무 순 내 페놀산 구조 동정

선행 연구 및 표준품의 검출 시간, UV, MS 데이터를 이

용하여 국내산 두릅나무 및 음나무 순으로부터 총 1종의 hydroxybenzoic acid 유도체와 12종의 hydroxycinnamic acid 유도체가 동정되었다(Fig. 1, Table 1). UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS 분석 결과 3,4-dihydroxybenzoic acid (m/z 155, peak 1), caffeic acid(m/z 181, peak 3)를 제외한 모든 페놀산 성분들에서 모분자에 Na⁺(23 Da) 또는 K⁺(39 Da)가 결합된 단편이온 패턴이 관찰되었다.

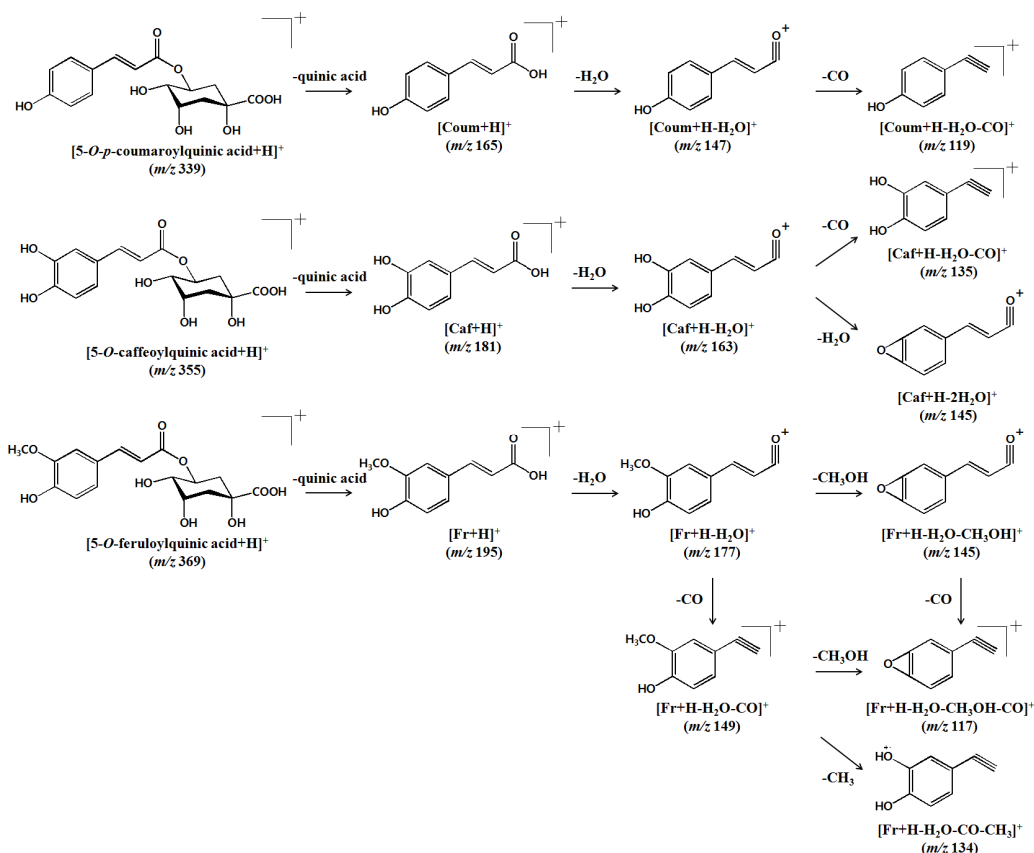


Fig. 2. Proposed fragmentation patterns for 5-*O-p*-coumaroylquinic acid (m/z 339), 5-*O*-caffeoylquinic acid (m/z 355) and 5-*O*-feruloylquinic acid (m/z 368). Coum, *p*-coumaroyl acid; Caf, caffeic acid; Fr, ferulic acid.

Peak 1의 최대 흡광파장은 293 nm로 관찰되었으며, m/z 155[M+H]⁺, 137[M+H-H₂O]⁺의 단편이온 패턴이 관찰되어 dihydroxybenzoic acid isomer로 추정되었다. 표준품을 사용하여 peak 1을 분석한 결과 3,4-dihydroxybenzoic acid임을 확인하였으며, 또한 선행 연구에서 두릅나무 및 으나무 수피에서 3,4-dihydroxybenzoic acid가 보고된 바 있으나 (Ma *et al.*, 1995; Sano *et al.*, 1991), 이들의 순에서는 미량이지만 처음으로 확인되었다.

Peak 3의 모분자는 m/z 181로 확인되었고, caffeic acid (Caf)의 단편이온 패턴인 m/z 163[Caf+H]⁺, 135[Caf+H-H₂O-CO]⁺가 관찰되어 표준품을 이용하여 분석한 결과 caffeic acid임을 확인하였으며, 두릅나무 및 으나무 순에서 모두 처음으로 동정되었다.

Peak 2, 4, 5의 최대 흡광파장은 325 nm 부근이었으며, m/z 355를 모분자로 관찰되었다. 또한 m/z 181[Caf+H]⁺, 163[Caf+H-H₂O]⁺, 145[Caf+H-2H₂O]⁺이 나타나 이들은 모두 caffeoylquinic acid isomer로 추정되었다(Fig. 2). 표준품의 검출시간, UV, MS 데이터와 비교한 결과 peak 2, 4, 5는 각각 3-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid로 확인되었다. 3-*O*-caffeoylquinic acid는 두릅나무 순에서는 처음으로 확인되었고, 5-*O*-caffeoylquinic acid는 두릅나무 및 으나무 순에서 보고된

바 있으며(Nugroho *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012), 4-*O*-caffeoylquinic acid는 두릅나무 및 으나무 순에서 모두 처음으로 동정되었다.

Peak 6은 310 nm에서 최대 흡광파장을 갖는 것으로 확인되었고, m/z 339를 모분자로 가지는 것으로 확인되었다. 또한, *p*-coumaric acid (Coum)의 단편이온 패턴인 m/z 147[Coum+H-H₂O]⁺, 119[Coum+H-H₂O-CO]⁺이 관찰되었으며(Fig. 2), 모분자와 *p*-coumaroyl기 사이의 분자량 차이를 고려하여 *p*-coumaroylquinic acid isomer로 추정되었다. 폐산물 분석 시, 역상 컬럼을 사용하면 caffeoylquinic acid isomer들의 검출 순서와 유사하게 *p*-coumaroylquinic acid isomer 또한 일정한 검출 순서를 가지는 것으로 알려져 있다 (Viacava *et al.*, 2017). 마테 잎에서 3-*O-p*-coumaroylquinic acid, 5-*O-p*-coumaroylquinic acid, 4-*O-p*-coumaroylquinic acid 순으로 검출됨을 보고하였으며, 또한 5-*O-p*-coumaroylquinic acid와 5-*O*-feruloylquinic acid가 근접한 검출 시간을 갖는 것으로 확인되어(Jaiswal *et al.*, 2010) 본 연구에서도 이와 유사한 경향을 확인하였다. 선행 연구 결과의 검출순서를 토대로 peak 6은 최종적으로 5-*O-p*-coumaroylquinic acid로 추정되었으며, 국내산 으나무 순에서 3-*O-p*-coumaroylquinic acid가 보고된 바 있으나(Nugroho *et al.*, 2011) 정확한 구조 동정을 위한 추가 연구가 요구된다.

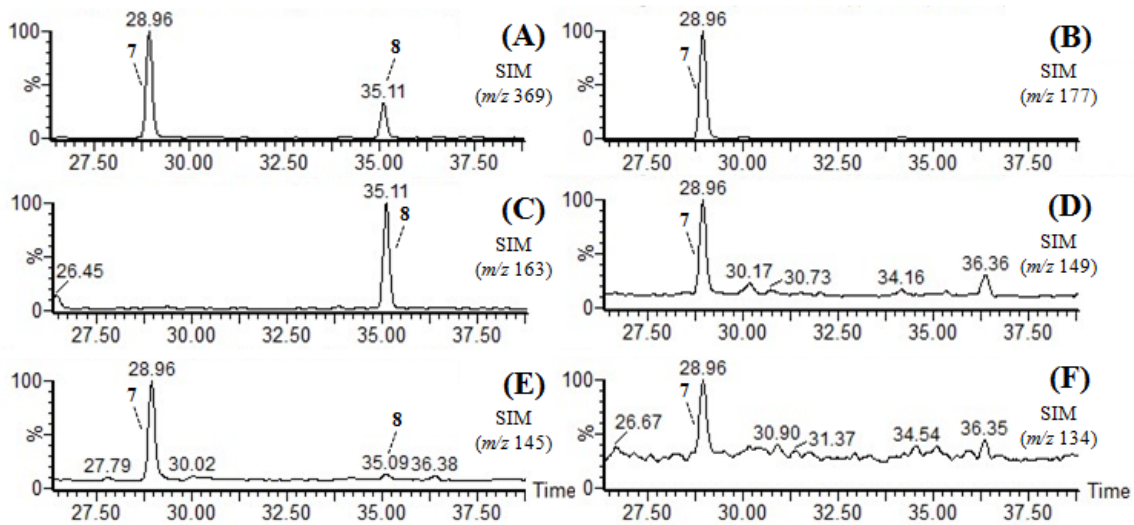


Fig. 3. Comparison of SIM chromatograms in two tentatively identified isomeric compounds ($[M+H]^+$ m/z 369), 5-*O*-feruloylquinic acid (peak 7) and 5-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (peak 8) detected in the shoot of *Aralia elata* and *Kalopanax pictus* (A) m/z 369, (B) m/z 177, (C) m/z 163, (D) m/z 149, (E) m/z 145, (F) m/z 134.

Peak 7, 8은 selected ion monitoring(SIM) mode에서 모두 m/z 369 $[M+H]^+$ 를 가진 isomer로 확인되었다. Peak 7에서는 ferulic acid(Fr)의 단편이온 패턴인 m/z 177 $[Fr+H-H_2O]^+$, 149 $[Fr+H-H_2O-CO]^+$, 145 $[Fr+H-H_2O-CH_3OH]^+$, 134 $[Fr+H-H_2O-CH_3]^+$ 가 확인되었으나, peak 8에서는 caffeic acid의 m/z 163 $[Caf+H-H_2O]^+$, 145 $[Caf+H-H_2O]^+$ 가 관찰되었다(Fig. 2, 3). 커피 및 고구마에서 3종의 feruloylquinic acid isomer가 보고된 바 있어(Clifford *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2008) 실제 커피 및 고구마 시료와 비교한 결과 peak 7은 5-*O*-feruloylquinic acid로 추정되었으며, peak 8은 표준품의 분석 결과를 토대로 5-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester로 확인되었고, 이들은 모두 두릅나무 및 음나무 순에서 처음 동정되었다.

Peak 9, 10은 모두 326 nm 부근에서 최대 흡광과장을 나타냈으며, 모분자로 m/z 517을 가지면서 m/z 181 $[Caf+H]^+$, 163 $[Caf-H_2O]^+$ 의 단편이온 패턴이 확인되어 dicaffeoylquinic acid isomer로 추정되었다. 표준품의 UV, MS 데이터와 비교해 본 결과 peak 9, 10은 각각 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid로 동정되었으며, 그 중 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid는 음나무 순에서는 검출되지 않았고, 두릅나무 순에서는 처음 확인되었다.

Peak 11-13은 오직 두릅나무 순에서만 확인되었으며, SIM 모드를 활용하여 분석한 결과 공통적으로 m/z 531 $[M+H]^+$, 513 $[M+H-H_2O]^+$, 163 $[Caf-H_2O]^+$ 의 단편이온 패턴이 검출되었다. 따라서 이들은 모두 모분자가 m/z 531이면서 caffeoyl기를 가지는 isomer인 것으로 추정되었다. 이 중 peak 11, 12는 단편이온 패턴에서 ferulic acid에서 H_2O 가 소실된 m/z 177이 관찰되어 caffeoylferuloylquinic acid isomer로 추정되었다(Fig. 4). 커피 및 고구마로부터 총 6종의 caffeoylferuloylquinic acid isomer(3-*O*-feruloyl-

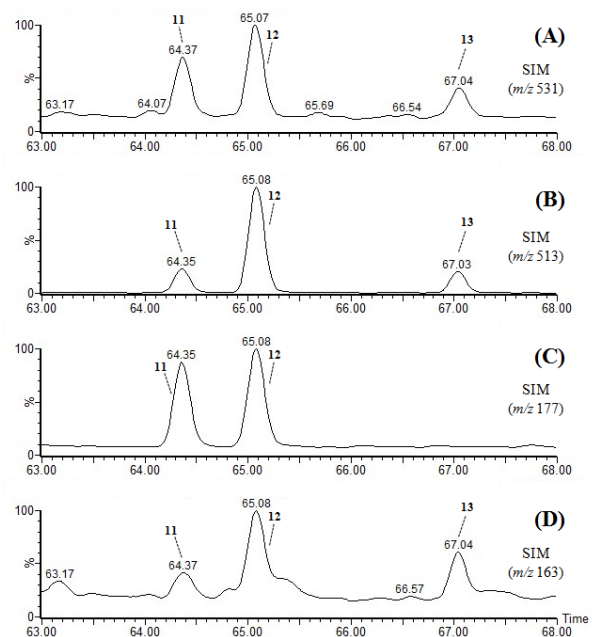


Fig. 4. Comparison of SIM chromatograms in three tentatively identified isomeric compounds ($[M+H]^+$ m/z 531), 3-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid (peak 11), 3-*O*-caffeoyl-5-*O*-feruloylquinic acid (peak 12) and dicaffeoylquinic acid methyl ester isomer (peak 13) detected in the shoot of *Aralia elata*. (A) m/z 531, (B) m/z 513, (C) m/z 177, (D) m/z 163.

4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoyl-4-*O*-feruloylquinic acid, 3-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoyl-5-*O*-feruloylquinic acid, 4-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoyl-5-*O*-feruloylquinic acid)가 보고된 바 있으며(Clifford *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2008), 실제 커피 및

고구마 시료 분석을 통해 확인된 이들 isomer의 UV, MS 데이터에 근거하여 peak 11, 12는 각각 3-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoyl-5-*O*-feruloylquinic acid로 최초 추정되었다. Peak 13은 UV와 단편이온 패턴을 토대로 dicaffeoylquinic acid methyl ester로 추정되었으며, 음나무 잎에서 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester가 보고된 바 있으나(Hu *et al.*, 2012), 정확한 구조 확인을 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

두릅나무 및 음나무 순 내 페놀산 함량 비교

국내산 두릅나무 및 음나무 순 내 개별 페놀산 함량 (mg/100g dry weight)을 내부표준물질을 이용, 정량하여 비교하였다(Table 1). 총 페놀산 함량은 두릅나무 순 754.8 mg/100g, 음나무 순 845.3 mg/100g으로, 음나무 순이 약 11% 높은 함량을 나타내었다.

Caffeic acid는 식물체에서 가장 흔하게 발견되는 페놀산 중 하나이지만 두릅나무 및 음나무 순에서 모두 처음으로 확인되었으며, 음나무 순(5.3 mg/100g)이 두릅나무 순(2.4 mg/100g)에 비해 약 2.2배 높은 함량을 나타내었다.

Hydroxycinnamic acid 유도체는 caffeic acid와 quinic acid가 ester 결합한 형태의 화합물이 다양한 식물 내에서 발견 빈도가 높으며, 하위 그룹으로는 caffeoylquinic acid류, *p*-coumaroylquinic acid류, feruloylquinic acid류 등을 포함한다(Clifford *et al.*, 2017). 동정된 3종의 caffeoylquinic acid isomer 중 5-*O*-caffeoylquinic acid의 함량은 음나무 순에서 772.7 mg/100g, 두릅나무 순은 372.7 mg/100g로 각각 총 페놀산 함량 중 약 91%, 49%를 차지하여 두 식물 모두에서 주성분으로 확인되었으며, 국내산 음나무 순에서 5-*O*-caffeoylquinic acid가 총 페놀산 중 51%를 차지한다고 보고된 바 있으나(Nugroho *et al.*, 2011), 본 연구 결과에 비해 비교적 낮은 함량 비율을 나타내었다. 3-*O*-caffeoylquinic acid는 두릅나무 순에서 3.5 mg/100g로 관찰되었으나 음나무 순에서는 검출되지 않았고, 4-*O*-caffeoylquinic acid는 두릅나무 및 음나무 순에서 각각 3.8, 3.1 mg/100g로 두 식물이 유사한 함량을 나타내었다.

두릅나무과 식물 내 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid는 강한 항산화능과 잠재적으로 세포의 손상을 억제하는 것으로 보고되었으며(Hu *et al.*, 2012), 간세포에서 산화적 스트레스와 지방질 축적 억제 효과가 보고된 바 있다(Kwon *et al.*, 2018). 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid는 두릅나무 순에서 331.1 mg/100g로 총 함량중 약 44%를 차지하여 위와 비슷한 약리학적 효능을 가질 것으로 기대되는 반면 음나무 순에서는 25.5 mg/100g로 총 함량 중 약 3%만을 차지하는 것으로 관찰되었다. 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid는 오직 두릅나무 순에서 5.6 mg/100g을 함유하는 것으로 나타났다. Caffeoylquinic acid류는 효소적 생합성 경로에 의해 dicaffeoylquinic acid류를 합성하는 것으로 알려져 있어(Menin *et al.*, 2010), 이들의 함량 차이를 통해 두릅나무 순에서 dicaffeoylquinic acid류 생합성이 활발하게 이루어졌을 것으로 판단된다.

5-*O*-*p*-Coumaroylquinic acid의 함량은 두릅나무 및 음나무 순에서 각각 16.8, 13.0 mg/100g로 관찰되었다. 5-*O*-Feruloylquinic acid 및 5-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester의 함량은 음나무 순이 두릅나무 순보다 약 2.3배 높은 함량을 나타내었다. 오직 두릅나무 순에서만 확인된 3-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoyl-5-*O*-feruloylquinic acid 및 dicaffeoylquinic acid methyl ester isomer의 함량은 각각 2.6, 3.3 및 0.9 mg/100g로, 총 페놀산 함량 중 0.01-0.04% 범위로 관찰되어 비교적 낮은 함량을 나타내었다.

Hydroxycinnamic acid 유도체는 항산화(Sato *et al.*, 2011), 항염증(Liang *et al.*, 2015), 항고혈압(Zhao *et al.*, 2012), 항종양(Jin *et al.*, 2005)등의 다양한 생리활성 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구 결과를 토대로 식용으로만 사용되어 왔던 두릅나무 및 음나무 순이 건강 보조 식품 개발 원료로써 활용 가치가 높아질 것으로 사료된다.

요약

UPLC-DAD-ESI(+)-QToF/MS를 사용하여 국내산 두릅나무 및 음나무 순의 페놀산을 분석한 결과 두릅나무 순에서 총 13종, 음나무 순에서 총 8종의 페놀산 성분을 동정하였으며, 내부표준물질을 이용하여 이들 개별 성분을 정량하였다. 개별 페놀산 성분 구조 동정 시 모분자에 Na⁺ 또는 K⁺가 결합되는 특징적인 단편이온들이 관찰되어 모분자의 분자량을 쉽게 판단할 수 있었다. 전반적인 구조 동정은 선행연구 및 표준품의 UV, MS 분석 결과를 참고하여 비교하였으며, 특히 이성질체의 효율적인 동정을 위해 SIM mode 방법을 적용하였다. 따라서 두릅나무 및 음나무 순에서 10종(3,4-dihydroxybenzoic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid, caffeic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-*p*-coumaroylquinic acid, 5-*O*-feruloylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-feruloyl-5-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoyl-5-*O*-feruloylquinic acid)의 페놀산이 처음으로 확인되었다. 총 페놀산 함량은 두릅나무 순, 음나무 순이 각각 754.8, 845.3 mg/100g으로 확인하였다. 주요 성분인 5-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid는 두릅나무 순에서 각각 총 페놀산 함량 중 49, 44%로 서로 비슷한 함량을 보인 것이 비해 음나무 순에서는 각각 91, 3%로 확인되었다. 따라서 음나무 순에 비해 두릅나무 순에서 dicaffeoylquinic acid류의 생합성이 활발하게 이루어졌다는 것을 짐작할 수 있었으며, 본 연구 결과는 이들의 생합성에 관여하는 효소, 유전 인자 등을 규명하는데 중요한 기초 자료로 활용될 것으로 사료된다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of Rural

Development Administration (Project No. PJ01265801), Republic of Korea.

References

- Clifford, M. N., Jaganath, I. B., Ludwig, I. A., & Crozier, A. (2017). Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*, 34(12), 1391-1421.
- Clifford, M. N., Knight, S., Surucu, B., & Kuhnert, N. (2006). Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 1957-1969.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501-513.
- Hu, W., Huang, C., & Wang, M. H. (2012). Chemical composition, nutritional value, and antioxidant constituents of *Kalopanax pictus* leaves. *Food Chemistry*, 131(2), 449-455.
- Hwang, I. Y., Hwang, S. A., & Jeong, C. S. (2013). Effects of *Kalopanax pictus* extracts and their related origin on gastric lesions. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 28(4), 367-375.
- Jaiswal, R., Sovdat, T., Vivan, F., & Kuhnert, N. (2010). Profiling and characterization by LC-MSⁿ of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5471-5484.
- Jin, U. H., Lee, J. Y., Kang, S. K., Kim, J. K., Park, W. H., Kim, J. G., Moon, S. K., & Kim, C. H. (2005). A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sciences*, 77(22), 2760-2769.
- Kang, Y. S., Cho, T. O., & Hong, J. S. (2009). Quality characteristics of *sulgidduk* containing added *Aralia elata* leaf powder. *Korea Society of Food & Cookery Science*, 25(5), 593-599.
- Kim, E. J., & Lee, W. J. (2012). Quality characteristics of noodles containing shoots and leaves of *Aralia elata* and *Kalopanax pictus*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 41(4), 571-575.
- Kim, W. J. (2015). Development for customer oriented food products and marketing strategy in small businesses. *Food Industry and Nutrition*, 20(1), 8-10.
- Kim, Y. H., Kim, J. P., Yun, B. S., Moon, S. S., & Yoo, I. D. (1998). Antioxidants isolated from *Kalopanax pictus*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 11, 89-109.
- Kwon, B. S., Park, S. K., Kim, J. M., Kang, J. Y., Park, S. H., Kang, J. E., Lee, C. J., Park, S. B., Yoo, S. K., Lee, U., & Heo, H. J. (2018). Antioxidant capacity and hepatoprotective effect of ethyl acetate fraction from shoot of *Aralia elata* on alcohol-induced cytotoxicity. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 50(2), 216-224.
- Lee, E. B., Hyun, J. E., Kim, I. H., & Whang, W. K. (2001). Anti-inflammatory activity of methanol extract of *Kalopanax pictus* bark and its fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2-3), 197-201.
- Liang, N., & Kitts, D. (2015). Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*, 8(1), 16.
- Ma, S. J., Ko, B. S., & Park, K. H. (1995). Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid with antimicrobial activity from bark of *Aralia elata*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 27(5), 807-812.
- Ma, S. J., Kuk, J. H., Ko, B. S., & Park, K. H. (1996). Isolation and characterization of 4-hydroxycinnamic acid with antimicrobial activity from *Aralia elata*. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 39(4), 265-267.
- Mattila, P., & Hellstrom, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 152-160.
- Menin, B., Comino, C., Moglia, A., Dolzhenko, Y., Partis, E., & Lanteri, S. (2010). Identification and mapping of genes related to caffeoylquinic acid synthesis in *Cynara cardunculus* L. *Plant Science*, 179(4), 338-347.
- Nugroho, A., Kim, M. H., Lee, J. H., Kim, J. D., Lee, K. R., Choi, J. S., Yoo, Y. M. & Park, H. J. (2011). Polyphenol analysis and peroxy-nitrite scavenging effect of the extracts from eight Korean mountainous vegetable. *The Korean Society of Pharmacognosy*, 42(1), 38-45.
- Oh, I. S., Han, J. W., & Kim, H. G. (2005). Water extracts of *Aralia elata* root bark enhances migration and matrix metalloproteinases secretion in porcine coronary artery endothelial cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(4), 372-377.

- Quang, T. H., Ngan, N. T. T., Minh, C. V., Kiem, P. V., Nhiem, N. X., Tai, B. H., Thao, N. P., Luyen, B. T. T., Song, S. B., & Kim, Y. H. (2011). Anti-inflammatory and PPAR subtypes transactivational activities of phenolics and lignans from the stem bark of *Kalopanax pictus*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32(11), 4049-4054.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Sano, K., Sanada, S., Ida, Y., & Shoji, J. (1991). Studies on the constituents of the bark of *Kalopanax pictus* Nakai. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39(4), 865-870.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., & Iseki, K. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), 136-138.
- Viacava, G. E., Roura, S. I., Berrueta, L. A., Iriondo, C., Gallo, B., & Alonso-Salces, R. M. (2017). Characterization of phenolic compounds in green and red oak-leaf lettuce cultivars by UHPLC-DAD-ESI-QToF/MS using MSE scan mode. *Journal of Mass Spectrometry*, 52(12), 873-902.
- Zhao, Y., Wang, J., Balleve, O., Luo, H., & Zhang, W. (2012). Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertension Research*, 35(4), 370-374.
- Zheng, W., & Clifford, M. N. (2008). Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China. *Food Chemistry*, 106(1), 147-152.