

해국(*Aster spathulifolius* Maxim.) 에탄올 추출물의 생리활성물질 및 항균 활성 조사

임다정¹, 송정섭¹, 박미리엄^{1,2}, 이승기³, 이사라³, 손연경^{3*}, 김양선^{1*}

Investigation of Bioactive Compounds and Antimicrobial Activity of the Ethanol Extracts of *Aster spathulifolius* Maxim.

Da Jung Lim ¹, Jeong-Sup Song ¹, Mirieom Park ^{1,2}, Seungki Lee ³, Sarah Lee ³,
Youn Kyoung Son ^{3*} and Yangseon Kim ^{1*}

¹(재)농축산용미생물산업육성지원센터, ²전북대학교, ³국립생물자원관

¹Department of Research and Development, Center for Industrialization of Agricultural and Livestock Microorganisms, Jeongeup 56212, Korea, ² Department of Animal Biotechnology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea, ³Biological Resources Assessment Division, National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, Korea

* Correspondence: sophy004@korea.kr, yangseon@cials.or.kr

<https://doi.org/10.5338/KJEA.2025.44.31>

Agric. Environ. Sci. 2025, 44, 299-308

Received: April 11, 2025

Revised: May 30, 2025

Accepted: September 3, 2025

Published: September 10, 2025

Online ISSN: 2233-4173

Print ISSN: 1225-3537



Check for updates

© The Korean Society of Environmental Agriculture 2025



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://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.

Abstract: *Aster spathulifolius* Maxim., a traditional medicinal plant from the *Asteraceae* family, is native to Korea and Japan and has been reported to be effective for treating obesity and cardiovascular diseases. This study aimed to investigate its antimicrobial potential against various pathogens, including *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, and *Aspergillus fumigatus*, as well as to analyze the secondary metabolites present in the plant to identify compounds responsible for its antimicrobial activity. The stems and leaves of the plant were dried and subjected to reflux extraction with 70% aqueous ethanol at 25°C for 24 hours, and this was repeated three times. The extract demonstrated significant antimicrobial activity against the gram-negative bacteria *E. coli* and *S. Enteritidis* as well as the fungus *A. fumigatus*. Secondary metabolite analysis using LC-QTOF/MS identified polyphenol compounds, including chlorogenic acid, iso-chlorogenic acid C, and rhodiosin, that are known for their antioxidant, antitumor, and antibacterial properties. In particular, quantitative evaluation of the indicators chlorogenic acid and 3,5-dicaffeoylquinic acid revealed that they contained 39.11 mg/g and 51.33 mg/g per dry extract product, respectively. In conclusion, *A. spathulifolius* Maxim. was determined to be particularly effective as an antimicrobial agent against gram-negative bacteria and fungi.

Keywords: Antimicrobial activity, *Aster spathulifolius* Maxim., Bioactive compounds, Chlorogenic acid, 3,5-Dicaffeoylquinic acid

서 론

지속가능한 개발의 키워드로 생물의 다양성과 생물유전자원의 중요성이 점점 더 부각되고 있다. 동물, 식물, 미생물 등 생명연구자원은 다양한 경제적 가치를 지니며 이를 이용하여 의약품, 식품, 화장품 등 여러 산업에서 중요한 역할을 하고 있다[1]. 이러한 배경 속에서 생물유전자원의 접근과 이용에 대한 관리 필요성이 인식되었고, 2010년 채택된 나고야 의정서는 생물유전자원에 대한 국가의 주권적 권리를 인정하고 이 자원의 이용으로부터 발생하는 이익의 공정하고 공평한 공유를 규정하게 되었다[2]. 대한민국도 이에 서명하여 관련 정책을 강화하고 있다[3]. 특히, 자원이 많지 않은 생물유전자원 이용국으로서 대한민국은 생물유전자원의 확보와 이용 경쟁에 대비한 많은 노력이 필요하다. 따라서 국내 생물자원에 대한 연구의 필요성이 더욱 강조되고 있으며 생리활성 물질, 생태적 가치, 경제적 잠재력 등을 평가하고 새로운 활용 방안을 모색함으로써 생물자원의 효율적 관리와 보호를 도모해야 한다[4,5].

식물추출물은 의약품, 식품 보존제, 향신료, 살충제 및 화학 제품 등 다양한 분야에서 안전하고 효과적인 천연 소재로 폭넓게 활용되고 있다[6]. 특히 폴리페놀(polyphenols), 터펜(terpenes), 알칼로이드(alkaloids) 등 식물추출물의 주요 구성 성분들은 강력한 항산화, 항균 및 항염증 효과가 보고되어 그 활용 가치가 높게 평가된다[7-10]. 현대사회에서는 식품 매개 질병의 증가와 항생제 내성균의 출현으로 인해 새로운 항균 물질의 개발이 요구되고 있다. 2023년 식품의약품안전처의 식중독 통계 현황에 따르면 식중독 발생 건수가 2021년 245건, 2022년 311건, 2023년 359건으로 증가하는 추세를 보이며, 특히 2022년 대비 2023년에는 발생 건수가 15% 증가, 환자 수는 60% 증가하였다[11]. 대표적인 식중독 유발 미생물로는 그람 음성인 *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis가 있으며 그람 양성인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*가 주요 병원균으로 알려져 있다. *Salmonella*의 경우 소고기, 가금류, 계란 등의 오염된 식품의 섭취를 통해 장염을 유발하며 유아와 송아지 등에게는 장티푸스와 같은 증상, 패혈증 등을 일으킬 수 있다[12]. 또한 *E. coli*는 verotoxin을 생산하여 감염 시 무혈성 설사 또는 출혈성 설사를 동반하며 독소로 인한 신장의 손상 및 용혈성요독증후군을 유발할 수 있다[13]. 또한 현대인들의 식생활 변화로 기호품 및 당류의 소비가 증가하면서 구강 질환 중 하나인 충치의 발병률을 높이고 있으며 *Streptococcus mutans*, *S. sobrius*, *S. rattus* 등과 같은 충치 유발균을 포함하는 구강 세균의 억제에 penicillin 및 erythromycin과 같은 항생제가 효과적이지만 내성 문제로 실제 사용이 제한적이다[14,15]. 이러한 병원성 미생물에 대한 대응을 위해 녹차, 마늘, 생강 등의 식물추출물에서 효과적인 식중독균 성장 억제 및 항산화, 항균 활성이 보고되고 있으며, 안전하면서도 효과적인 천연 항균제 개발은 공중 보건 향상에 매우 중요한 과제이다[16,17].

국내 자생식물인 해국(*Aster spathulifolius* Maxim.)은 대한민국 중부 이남지방, 독도의 햇볕이 잘 드는 암벽이나 경사진 곳에서 자생하는 쌍떡잎식물로, 초롱꽃목 국화과에 속하는 여러해살이풀이다[18]. 해국은 전통적으로 한약재로 사용되어 왔으며 항염증, 해열, 진통, 소화 개선 및 항산화 효과로 다양한 효능으로 여러 질병 치료에 활용되고 있다[19-22]. 해국은 α -spinasterol, labdaienol 등의 테르펜계 화합물을 80% 이상 함유한 것으로 보고되고 있고, 이는 항비만 작용과 혈중 지질 개선의 효과를 통해 비만 및 고지혈증의 예방 또는 치료에 도움을 주는 것으로 확인되었다[22]. 또한 폴리페놀성 화합물 등 다양한 생리활성 물질을 다량 함유하고 있어 그 약리학적 잠재력이 매우 높다[23]. 본 연구에서는 국내 자생하는 식물인 해국을 대상으로, 에탄올 추출물의 생리활성 물질 프로파일을 분석하고, 산업화를 위한 주요 지표 성분을 선정하여 정량평가를 수행하였다. 또한 본 연구 결과는 식물 유래 천연 항균제 개발의 중요성에 기여하며, 국내 자생식물 해국의 기능성 소재로서의 가치와 활용 가능성을 제시하는 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

결과 및 고찰

해국 에탄올 추출물의 프로파일링 분석

해국(*A. spathulifolius* Maxim.)이 속한 국화과(*Asteraceae*) 식물은 오랫동안 전통 의약품 및 식품으로 사용되어 왔으며 현대에 항산화, 항염증, 면역 증강 등 다양한 효과가 밝혀졌다. 이러한 효능을 보이는 생리활성 물질을 추출하기 위해 여러 가지 방법이 활용되고 있다. 특히, 추출법에 따라 화합물의 조성이 달라질 수 있으며, 본 연구에서 사용한 에탄올 추출법은 다양한 극성 및 비극성 화합물을 높은 효율로 추출할 수 있는 방법 중 하나이다. 이 방법은 특히 항산화 활성이 높은 성분을 추출하는데 널리

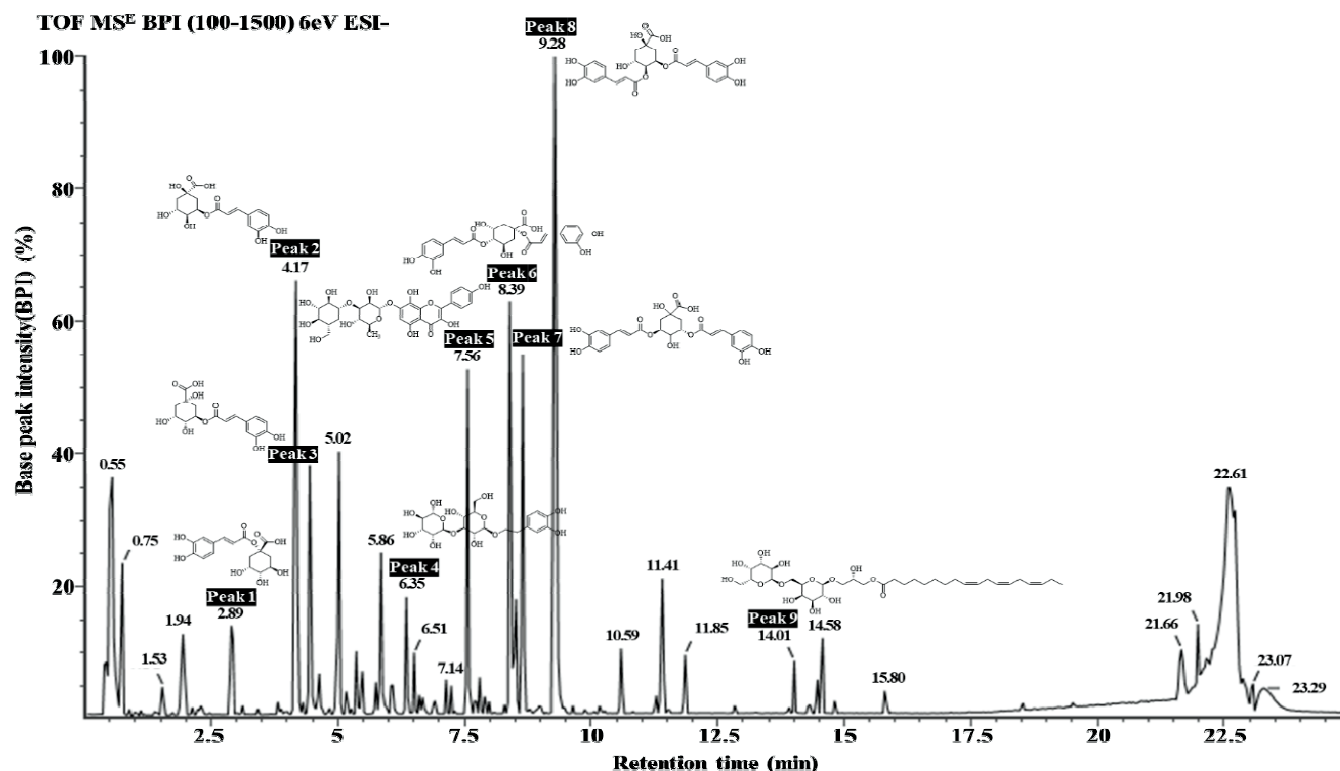


Fig. 1. Base peak ion (BPI) chromatogram of the *Aster spathulifolius* Maxim. extract obtained through UPLC-QTOF-MS analysis.

The chemical structures of the components identified from the ethanolic extract of *A. spathulifolius* Maxim. are presented based on the UPLC-QTOF/MS analysis.

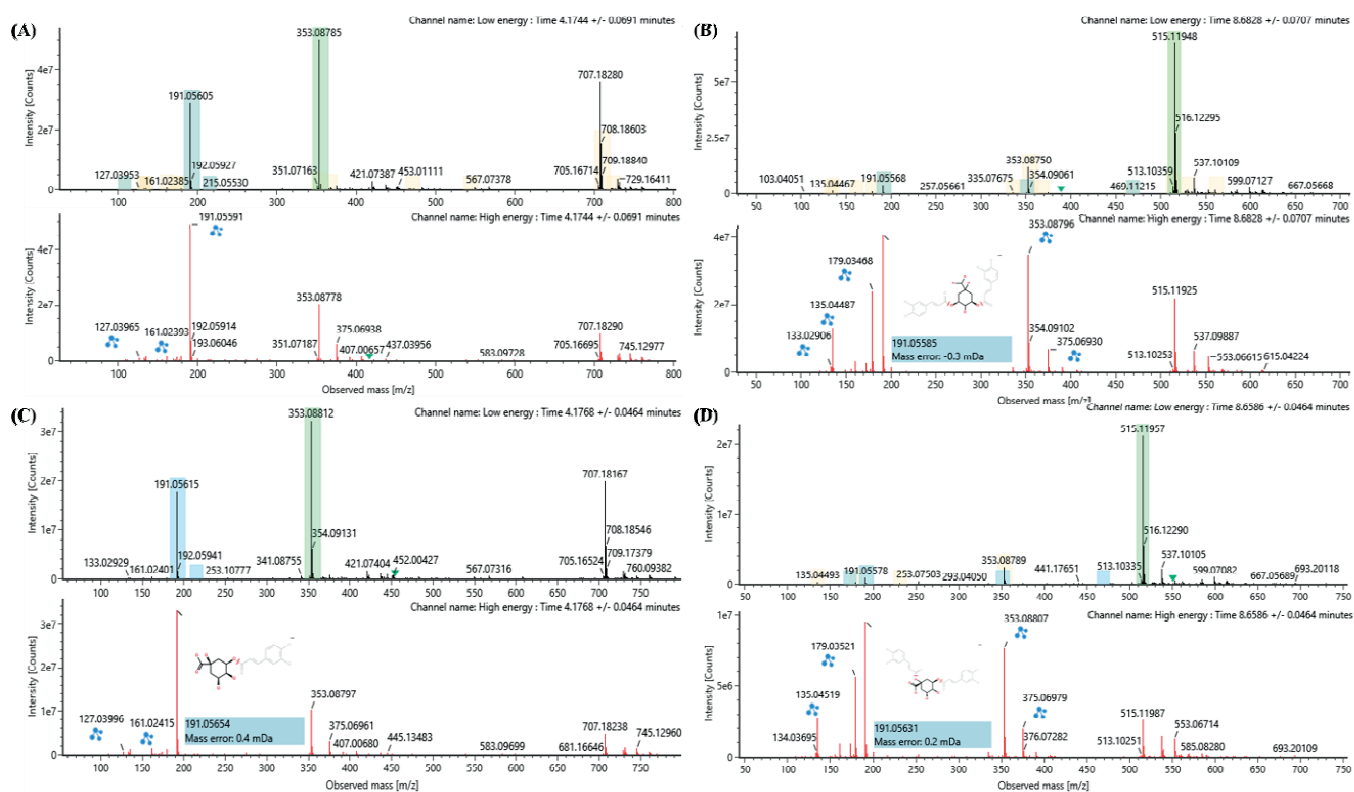
사용되는 방법이다[24]. 본 연구에서는 해국의 줄기와 잎에서 추출한 에탄올 조추출물은 UPLC-QTOF-MS를 통해 분석 및 동정하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이, ESI negative 모드에서 다양한 생리 활성 물질이 분리되었다. 이를 Waters의 UNIFI 소프트웨어 1.9 버전과 Chemspider 라이브러리를 이용하여 검색하였으며, 총 9개의 성분이 잠정적으로 동정되었다. 동정된 물질의 머무름 시간(retention time, RT), 모화합물 및 단편 이온들을 나열하였으며 모든 성분은 5 ppm 미만의 질량 정확도를 보였다(Table 1). 식별된 9개의 성분은 폴리페놀성 화합물로 1-caffeoylquinic acid (peak 1), neochlorogenic acid (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), 3,5-dicaffeoylquinic acid (peak 6), 1,4-dicaffeoylquinic acid (peak 7), isochlorogenic acid C (peak 8)와 같은 여러 caffeic acid 계열이 분석되었으며 기타 폴리페놀 화합물인 decaffeoylacteoside (peak 4), rhodiosin (peak 5), gingerglycolipid A (peak 9)도 분석되었다. 그 중 peak 3과 peak 5로 식별된 화합물의 질량 스펙트럼을 표준물질과 비교한 결과, 각각 chlorogenic acid와 3,5-dicaffeoylquinic acid로 동정되었다(Fig. 2). 특히 다수 함유하고 있는 caffeic acid 계열은 채소, 과일, 허브 등 다양한 식물에서 발견되는 생리활성물질로 염증, 암, 신경퇴행성 질환, 당뇨병 예방 등 항산화 특성과 관련된 여러 효능이 보고되고 있다[25]. 이는 해국 추출물의 다양한 생리활성 효능이 주로 이들 폴리페놀성 화합물, 특히 카페인산 유도체에서 비롯될 수 있음을 시사한다.

해국 에탄올 추출물의 지표물질의 정량분석

해국의 주요 지표물질로 조사된 chlorogenic acid와 3,5-dicaffeoylquinic acid는 다른 국화과 식물의 생리활성 물질 분석 문헌에서도 유사하게 보고되었다[22,26-28]. 에탄올 추출물 시료에서 chlorogenic acid와 3,5-dicaffeoylquinic acid의 함량을 조사하기 위해 LC-MS/MS로 정량분석을 수행하였다. 분석법의 검증은 정량과 정성 이온의 ion ratio, 검량선의 직선성, 회귀방정식으로 역환산(back-calculated)한 농도 등을 고려하였다. 표준물질의 검량곡선은 0.625~1 ppm 범위에서 결정 계수(R^2)가 chlorogenic acid는 0.9996, 3,5-dicaffeoylquinic acid는 0.999로 우수한 선형성을 보였다. 표준물질 대비 시료 내 검출되는 정량과 정성 이온의 비가 $\pm 30\%$ 범위가 되도록 하였으며 역환산한 편차가 $\pm 20\%$ 이내에 존재하도록 분석 조건을 확립하였다(Fig. 3). 최적화된 분석 조건을 바탕으로 chlorogenic acid와 3,5-dicaffeoylquinic acid의 시료 내 화합물의 함량을 측정한 결과 각각 39.11 mg/g 및 51.33

Table 1. The tentative identification of chemical components of the ethanolic extract of *Aster spathulifolius* Maxim. based on the UPLC-QTOF/MS analysis

Peak	Component name	Formula	Observed RT (min)	Neutral Mass (Da)	Observed [M-H] ⁻ (m/z)	Mass Error (ppm)	Fragment ion (m/z)	Ref.
1	1-Caffeoylquinic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	2.9105	354.0951	353.0882	1.1	197.0456 191.0562 135.0452	[35]
2	Neochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	4.1768	354.0951	353.0881	0.9	191.0565 161.0242 135.0450	[36-38]
3	Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	4.4606	354.0951	353.0880	0.5	191.0561 173.0455 135.0451	[36,39,40]
4	Decaffeoyllacteoside	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	6.3624	462.1737	461.1662	-0.5	267.0719 191.0558	[41]
5	Rhodosin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	7.5698	610.1534	609.1454	-1.1	343.0459 300.0278 151.0033	[38]
6	3,5-Dicaffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid A)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	8.4139	516.1268	515.1198	0.1	353.0879 191.0562 135.0451	[42]
7	1,4-Dicaffeoylquinic acid	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	8.6586	516.1268	515.1196	0.6	353.0881 191.0563 135.0452	[40,42]
8	Isochlorogenic acid C	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	9.2941	516.1268	515.1195	0.1	353.0883 191.0563 135.0453	[39,43]
9	Gingerglycolipid A	C ₃₃ H ₅₆ O ₁₄	14.0222	676.3670	675.3589	-1.2	629.3539 467.3009	[44]

**Fig. 2. The mass spectra acquired from UPLC-QTOF-MS were utilized to compare the reference standards of chlorogenic acid (A) and 3,5-dicaffeoylquinic acid (B) with the identified compounds in peaks 3 (C) and 6 (D).**

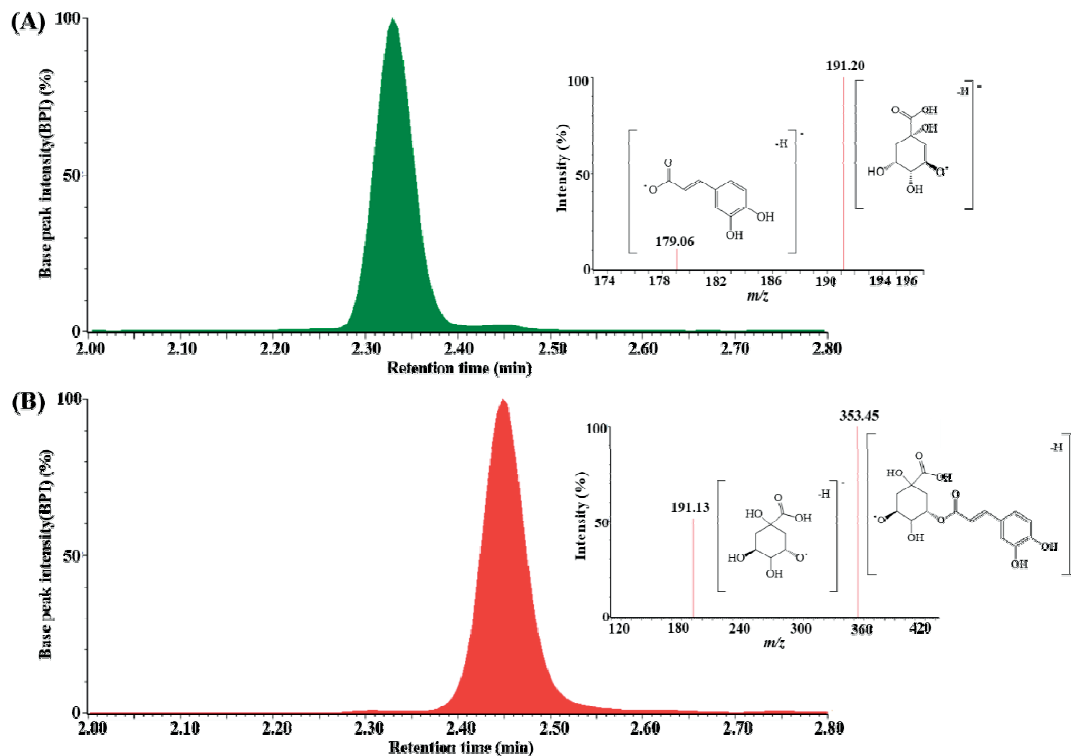


Fig. 3. The reference materials of chlorogenic acid (A) and 3,5-dicaffeoylquinic acid (B) were compared using LC-MS/MS.

mg/g으로 나타났다. 이 결과는 해국 에탄올 추출물이 생리활성 지표 물질인 chlorogenic acid와 3,5-dicaffeoylquinic acid를 상당히 높은 농도로 함유하고 있음을 의미한다. 특히, 3,5-dicaffeoylquinic acid는 chlorogenic acid보다 더 높은 함량을 보여, 이 화합물이 해국 추출물의 주요 활성 성분 중 하나로 작용할 가능성을 시사한다. 이들 지표 성분의 높은 함량은 해국 에탄올 추출물이 향후 기능성 식품 소재 또는 의약품 개발에 활용될 수 있는 잠재력을 뒷받침하는 중요한 정량적 근거가 된다.

해국 에탄올 추출물의 항균 활성 평가

해국 에탄올 추출물의 주요 병원성 세균 및 진균 6종에 대한 항균 활성을 Table 2에 요약하였다. 이 추출물은 그람 양성균인 *E. coli*와 *S. Enteritidis*, 그람 음성균인 *S. mutans*와 *S. aureus*에 대해 뚜렷한 클리어 존을 형성하였다. 특히, 클리어 존의 평균 직경은 *E. coli*에서 10.33 ± 1.53 mm, *S. Enteritidis*에서 10.00 ± 1.00 mm, *S. mutans*에서 9.33 ± 0.58 mm, *S. aureus*에서 9.67 ± 0.58 mm 나타났다. 반면 진균인 *Aspergillus fumigatus*에 대해서는 클리어 존의 직경이 9 mm 미만으로 약한 항균 활성을 보였다. 반면, *Candida albicans*에 대해서는 항균 활성이 관찰되지 않았다(Fig. S1). 해국 추출물이 특정 병원성 세균에 대한 효과적인 항균 활성

Table 2. Antimicrobial activity of ethanolic crude extract from *A. spathulifolius* Maxim. against pathogenic strains

Strain	Antimicrobial activity ^{a)}
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2617	++ ^{b)}
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis NCCP 14546	++
<i>Streptococcus mutans</i> KCTC 3065	++
<i>Staphylococcus aureus</i> NCCP 14560	++
<i>Candida albicans</i> NCCP 31077	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> NCCP 32662	+

^{a)} Antibiotics were used as positive controls at the following concentrations: ampicillin (2.5 mg/ml); gentamycin (2.5 and 50 mg/ml); kanamycin (50 mg/ml); and hygromycin (10 and 50 mg/ml).

^{b)} The inhibition zone (mm) around the paper disc containing the *A. spathulifolius* Maxim. was classified as 11 mm $\geq$ ++ > 9 mm, + $\leq$ 9 mm; -, no inhibition zone. All microbial pathogens showed no inhibition against the negative control (DMSO).

을 지닌다는 것을 보여주며 특히 병원성세균에 대한 강한 항균 활성은 해국의 산업적 활용 가능성을 시사한다. 한편, 해국 에탄올 추출물의 지표성분으로 조사된 chlorogenic acid는 다양한 식물에 존재하는 페놀산의 일종으로 항균 활성을 포함한 여러 생리활성이 보고되고 있다. 예를 들어 Chen 등(2022)은 *Yersinia enterocolitica*와 같은 식품 매개 병원균에 대하여 chlorogenic acid가 강한 항균 활성과 생물막 형성에 영향을 미친다고 보고하였다[29]. 또한, Su 등(2019)은 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균 활성을 조사하였으며 그 메커니즘을 chlorogenic acid가 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)의 함량을 감소시켜 세포 내 막 투과성을 증가시키고 외막의 박리를 유도하여 세포 내 대사를 방해하는 방식으로 설명하였다[30]. Sung 등(2010)은 chlorogenic acid가 병원성 진균인 *C. albicans*의 세포막 구조를 파괴하여 항진균 활성을 나타낸다고 보고하였다[31]. 이와 같이 chlorogenic acid의 항균 및 항진균 활성이 선행 연구에서 잘 알려져 있음에도 불구하고, 본 연구의 해국 에탄올 추출물에서는 *C. albicans*에 대한 유의미한 항균 활성이 관찰되지 않은 점은 흥미로운 결과이다. 이는 해국 추출물 내 chlorogenic acid의 농도가 *C. albicans* 저해에 불충분했거나, 다른 성분들이 chlorogenic acid의 항진균 활성을 상쇄하거나 방해했을 가능성을 시사한다. 또한, 서론에서 언급되었던 해국에 다수 함유된 테펜계 화합물(α -spinasterol, labdaenol 등) 또한 항균 활성을 가지는 것으로 알려져 있어, 해국 추출물의 전체적인 항균 활성은 폴리페놀뿐만 아니라 이러한 테펜 성분들 간의 복합적인 상호작용의 결과일 수 있다. 본 연구에서는 특정 생리활성 물질에 대한 항균 활성을 조사하지 않았으나 해국 에탄올 추출물이 다양한 병원균에 대해 유의미한 항균 활성을 보였다는 점에서 해국에 대한 본 연구는 생리활성 물질 프로파일링 및 주요 활성 물질의 정량화를 통해 관찰된 항균 활성이 다양한 폴리페놀성 화합물로부터 기인함을 강력하게 시사하며, 이는 해국의 산업적 활용을 위한 기초 자료로서 중요한 의미를 가진다. 이러한 결과는 해국 추출물이 다양한 의약품 및 건강 기능성 식품 재료로서 활용될 수 있는 가능성을 제시한다. 따라서 해국의 생리활성 물질에 대한 추가 연구가 필요하며, 비록 추출물 내 모든 활성 성분을 분석하거나 개별 활성 성분의 항균 활성을 직접 확인하지 못했다는 한계가 있으나, 앞으로 해국 추출물의 주요 활성 성분을 분리 및 동정하고, 이들 성분 또는 성분 조합의 정확한 작용 기전을 세포 및 분자 수준에서 규명하며, 나아가 다른 병원성 미생물에 대한 추가적인 항균 활성을 조사하는 연구가 수행된다면 국내 자원인 해국의 건강 기능성 식품 개발 및 의약품 소재로서의 가치 향상에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

재료 및 추출물 조제

본 연구에서 사용한 해국(*A. spathulifolius* Maxim.)은 2015년도 9월 전라남도 진도군 군내면에서 채취하였으며 줄기와 잎 부위를 세절 후 그늘에서 건조하여 추출 시료로 사용하였다. 추출은 건조된 해국 100 g에 70% (v/v) 에탄올 수용액(Sigma-Aldrich, USA) 1 L를 가하고 상온에서 24시간씩 3회 환류 진탕하였다. 추출액을 여과한 후 여액을 감압 농축 및 동결 건조하여 고상의 분말 상태의 추출물 시료를 얻었다. 이는 밀봉하여 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

해국 에탄올 추출물의 2차 대사산물 분석 및 지표성분 정량

해국 에탄올 추출물의 2차 대사산물을 분석하기 위해 UPLC-ESI-QTOF/MS (Waters, Xevo G2-XS QTOF, UK)를 이용하여 천연성분을 스크리닝하였다. 대사물질의 분리는 UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m; Waters, USA) 컬럼을 사용하였으며 0.1% formic acid가 함유된 water (이동상 A)와 0.1% formic acid가 함유된 acetonitrile (이동상 B)의 농도구배 조건으로 분석하였다. 초기 %B(v/v)는 1분간 5%로 설정하였고, 이후 20분간 100%로 상승시켜 2.3분 동안 유지하였다. 마지막으로 0.1분 동안 이동상을 100%에서 5%로 변경하고 컬럼 안정화를 위해 2.6분 동안 유지하였다. 총 분석 시간은 25분이었으며 유속은 0.4 mL/min, 컬럼 온도는 35°C, 주입량은 5 μ L로 설정하였다. 질량분석기의 이온화 방식은 음극의 전자분무이온화(negative electrospray ionization, negative ESI)법을 사용하였으며 capillary 전압은 2.5 kV, ion source와 desolvation 온도는 각각 150°C, 250°C로 설정하였다. 질량 대 전하비율(m/z)을 50에서 1,500 범위의 물질을 검출하기 위해 전체 스캔 질량 스펙트럼을 획득하였다. 프로파일링은 UNIFI software (ver. 1.9, Waters)의 traditional medicine library와 오픈 라이브러리 소스인 Chemspider를 이용하여 분석하였다. 이때 동정된 화합물은 감도(response) 값이 높고, error 값(mDa, ppm)이 낮은 것을 기준으로 각 성분의 이온화 패턴 분석 결과를 비교하여 error 값(ppm)이 절대값 5 이내로 측정된 물질만을 동정하였다.

해국 에탄올 추출물의 지표 성분의 함량을 분석하기 위해 Waters ACQUITY UPLC I-Class Plus와 연결된 MS/MS (Waters,

Xevo TQ-S micro, UK)를 이용하여 정량평가 하였다. 물질의 분리를 위해 사용된 컬럼과 이동상은 UPLC-QTOF/MS 조건과 동일하며 농도구배 조건은 초기 %B(v/v)는 1분간 5%로 설정하였고, 이후 3분간 60%로 상승시켜 1.5분 동안 유지하였다. 0.5분 동안 이동상을 60%에서 5%로 변경하고 컬럼 안정화를 위해 1분 동안 유지하였다. 총 분석 시간은 6분이었으며 유속은 0.3 mL/min, 컬럼 온도는 40°C, 주입량은 1 µL로 설정하였다. 질량분석기의 이온화 방식은 negative ESI법을 사용하였으며 capillary 전압은 3.0 kV, ion source와 desolvation 온도는 각각 150°C, 500°C로 설정하여 분석하였다. 지표 성분 chlorogenic acid (CGA)와 3,5-dicaffeoylquinic acid (CGA dimer)의 표준물질은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구매하여 사용하였으며 다중반응모니터링(multiple reaction monitoring, MRM) 조건은 Table 3과 같다[18,32].

Table 3. Conditions for UPLC-MS/MS analysis utilizing multiple reaction mode (MRM)

Chemical	Ion mode	Precursor ion <i>m/z</i> , (Cone, V)	Product ions <i>m/z</i> , (CE, V)	
			Quantitative	Quantitative
Chlorogenic acid (CGA)	Negative	353.25	191.20 (7)	179.06 (13)
3,5-dicaffeoylquinic acid (CGA dimer)	Negative	515.32	353.45 (13)	191.13 (48)

사용 병원균 및 배지

본 연구에서 사용된 병원균은 그람 음성균 2종(*E. coli* KCTC 2617, *S. Enteritidis* NCCP 14546), 그람 양성균 2종(*S. mutans* KCTC 3065, *S. aureus* NCCP 14560), 진균 2종(*C. albicans* NCCP 31077, *A. fumigatus* NCCP 32662) 등 총 6종의 공시 균주로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)와 질병관리청 국가병원체자원은행(NCCP)에서 각각 분양받았다. 각 병원성 세균 및 진균에 적합한 배양 조건 및 배지는 Table 4와 같다. 병원균은 25% glycerol stock으로 약 -80°C 초저온냉동고에 보관하였고 활성화시킨 후 사용하였다.

Table 4. Summary of pathogenic microorganisms applied in antimicrobial studies

Pathogenic microorganisms	Medium	Incubation condition	Antibiotic ^{a)}
Gram negative bacteria			
<i>E. coli</i> KCTC 2617	Nutrient agar	37°C, 24h	Amipicillin (2.5 mg/mL)
<i>S. Enteritidis</i> NCCP 14546	Tryptic soy agar	37°C, 24h	Gentamycin (2.5 mg/mL)
Gram positive bacteria			
<i>S. mutans</i> KCTC 3065	Brain heart Infusion agar	37°C, 24h	Kanamycin (50 mg/mL)
<i>S. aureus</i> NCCP 14560	Nutrient agar	37°C, 24h	Gentamycin (50 mg/mL)
Fungal			
<i>C. albicans</i> NCCP 31077	Sabouraud dextrose agar	30°C, 48~72h	Hygromycin (10 mg/mL)
<i>A. fumigatus</i> NCCP 32662	Potato dextrose agar	25°C, 120h	Hygromycin (50 mg/mL)

^{a)} FDA indication for Integrated Summary of Effectiveness (ISE).

항균 활성 조사

항세균 활성은 Kriby-Bauer법으로 조사하였으며 병원성 세균 4종에 대해 병원성 세균은 각각 적합한 배지에 $1\sim 2 \times 10^8$ CFU/mL의 농도로 도말하였다. 멸균된 paper disk (Φ8 mm, Whatman)를 병원균이 도말된 plate 위에 올려놓고 disk에 추출물 시료를 20 µL씩 떨어뜨려 흡수시킨 후 37°C에서 1일간 배양하였다[33]. 항진균 활성은 NCCLS M38-P법으로 조사하였으며 병원성 진균 2종에 대해 각각 적합한 배지를 사용하였다[34]. *C. albicans* NCCP31077는 효모와 유사하게 생육하여 항세균 활성 조사 방법과 동일하게 진행하였다. *C. albicans*의 경우 $1\sim 2 \times 10^8$ CFU/mL 농도로 도말하고 *A. fumigatus*는 직경 6 mm 크기의 조각을 plate 중앙에 접종하였다. 병원성 진균이 도말 혹은 접종된 배지에 멸균된 paper disk를 놓고 disk에 시료를 20 µL씩 떨어뜨려 흡수시킨 후 37°C에서 1일간 배양하였다. 이때 사용한 해국 추출물의 농도는 200,000 ppm으로 DMSO에 용해하여 사용하였으며

음성 대조군으로 DMSO를 사용하였고 양성 대조군으로는 FDA의 ISE 지침을 따라 사용하였다. 항세균 및 항진균 활성 평가 방법은 배양 후 plate의 disk 주변의 생육 저지대 부분을 확인하고 직경(mm)을 측정하였다. 본 실험은 3회 반복 수행하였다.

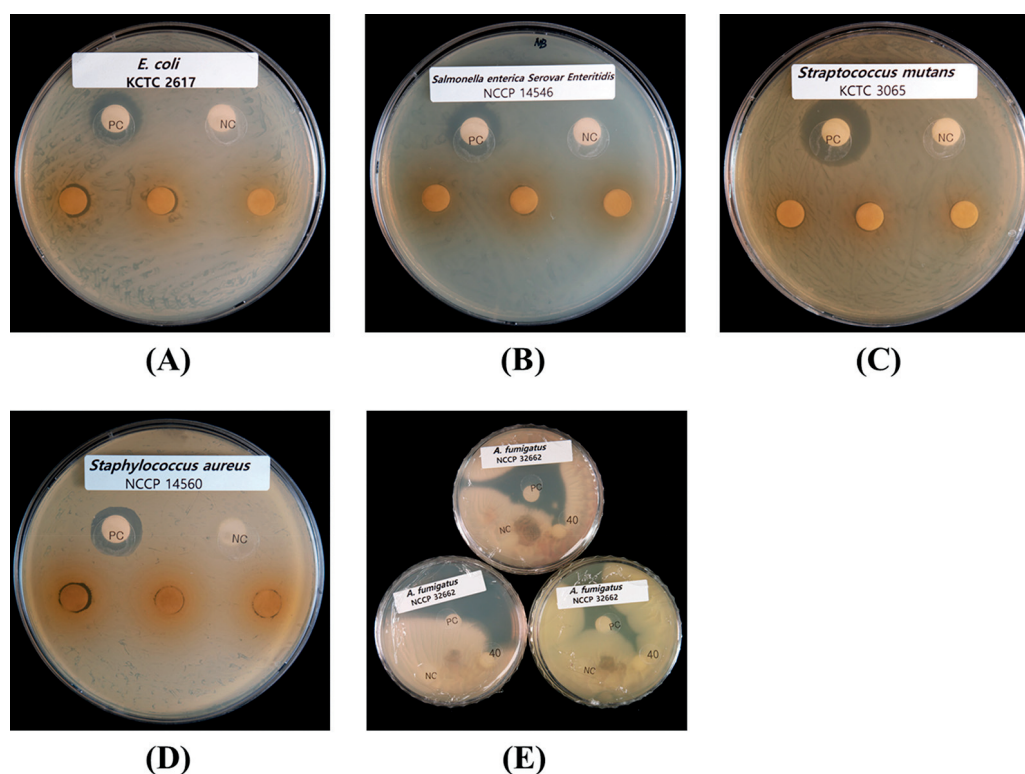


Fig. S1. Pictures of antimicrobial activities of ethanolic crude extract from *A. spathulifolius* Maxim. against *Escherichia coli* KCTC 2617 (A), *Salmonella enterica* serovar Enteritidis NCCP 14546 (B), *Streptococcus mutans* KCTC 3065 (C), *Staphylococcus aureus* NCCP 14560 (D), *Aspergillus fumigatus* NCCP 32662 (E).

Data Availability: All data are available in the main text or in the Supplementary Information.

Author Contributions: Y.K. and Y.K.S conceived and designed the research; D.J.L and Y.K.S collected the data; Y.K. and Y.K.S contributed data or analysis tools; J.-S.S. and M.P performed the analysis; D.J.L, S.K.L and S.L wrote the first manuscript; D.J.L, M.P revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Notes: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments: This research was funded by grants from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR202518101, NIBR202518201) and supported by Rural Development Administration (RDA), Republic of Korea (Project No. RS-2025-02213608).

Additional Information:

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.5338/KJEA.2025.44.31>

Correspondence and requests for materials should be addressed to Youn Kyoung Son, Yangseon Kim.

Peer review information Korean Journal of Environmental Agriculture thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at <http://www.korseaj.org>

References

- Kim CM, Park K, Cho KH, Jo G, Jin T-E (2020) The current status and policy measure of biological research resources in Korea. *Journal of Environmental Policy and Administration*, 28(4), 91-112. <https://doi.org/10.15301/jepa.2020.28.4.91>.
- Park WS (2013) Domestic implementation strategies for Nagoya protocol. *Korea Law Review*, 68, 457-493.
- Hong H-D, Lim H-T, Cho ES (2013) Evaluation and challenges of policy responses to ABS (Nagoya protocol) of Korea. *Korea Technology Innovation Society*, 16(2), 506-529.
- Kim E-J (2025) Sustainable use of biological resources and innovative technologies: Strategies for a future coexisting with nature. *Monthly Environment*, 292, 40-43.
- Kim Y-J, Han H-S (2012) Study of bioindustry in the agri-food sector: Current status and development strategies. R666, 1-149.
- Fialova S, Rendekova K, Mucaji P, Slobodnikova L (2017) Plant natural agents: Polyphenols, alkaloids and essential oils as perspective solution of microbial resistance. *Current Organic Chemistry*, 21(18), 1875-1884. <https://doi.org/10.2174/1385272821666170127161321>.
- Ahn M-S, Kim H-J, Seo M-S (2007) A study on the antioxidative and antimicrobial activities of the citrus *Unshju* peel extracts. *Journal of the Korean Society of Food Culture*, 22(4), 454-461.
- Moon J-S, Kim S-J, Park Y-M, Hwang I-S, Kim E-H, Park J-W, Park I-B, Kim S-W, Kang S-G, et al. (2004) Antimicrobial effect of methanol extracts from some medicinal herbs and the content of phenolic compounds. *Food Science and Preservation*, 11(2), 207-213.
- Han S-R, Kim M-j, Oh T-J (2015) Antioxidant activities and antimicrobial effects of solvent extracts from *Lentinus edodes*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44(8), 1144-1149. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2015.44.8.1144>.
- Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM (2019) Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. *Frontiers in Microbiology*, 10, 911. <http://10.3389/fmicb.2019.00911>.
- Oh Y-K (2023) 2023 Statistical Yearbook of Food and Drug Safety (No. 25), pp. 314-321, Ministry of Food and Drug Safety, Korea.
- Mukherjee N, Nolan VG, Dunn JR, Banerjee P (2019) Sources of human infection by *Salmonella enterica* serotype Javiana: A systematic review. *PLoS One*, 14(9), e0222108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222108>.
- Rota C, Carraminana J, Burillo J, Herrera A (2004) In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1252-1256. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.6.1252>.
- Fujita S, Saito N, Yamada T, Takii Y, Kondo K, Ohue M, Ikeda E, Moriya Y (2007) Randomized, multicenter trial of antibiotic prophylaxis in elective colorectal surgery: Single dose vs 3 doses of a second-generation cephalosporin without metronidazole and oral antibiotics. *Archives of Surgery*, 142(7), 657-661.
- Desjardins M, Delgaty K, Ramotar K, Seetaram C, Toye B (2004) Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in group a and group b streptococcus: Implications for reporting susceptibility results. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5620-5623. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.12.5620-5623.2004>
- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>.
- Danish P, Ali Q, Hafeez M, Malik A (2020) Antifungal and antibacterial activity of aloe vera plant extract. *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2020(1), 1-8.
- Choi W-G, Kim J-H, Kim DK, Lee Y, Yoo JS, Shin DH, Lee HS (2018) Simultaneous determination of chlorogenic acid isomers and metabolites in rat plasma using LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study following oral administration of *Stauntonia hexaphylla* leaf extract (YRA-1909) to rats. *Pharmaceutics*, 10(3), 143. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030143>.
- Cho I-J, Choung SY, Hwang Y-C, Ahn KJ, Chung HY, Jeong I-K (2016) *Aster spathulifolius* Maxim. extract reduces body weight and fat mass in obese humans. *Nutrition Research*, 36(7), 671-678. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.03.001>.
- Kim C, Bu HJ, Lee SJ, Hyun C-G, Lee NH (2014) Chemical compositions and anti-inflammatory activities of essential oils from *Aster spathulifolius* and *Vitex rotundifolia* Maxim.. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(10), 012-015. <https://doi.org/10.7324/japs.2014.401003>.
- Won J-N, Lee S-Y, Song D-S, Poo H (2013) Antiviral activity of the plant extracts from *Thuja orientalis*, *Aster spathulifolius*, and *Pinus thunbergii* against influenza virus A/PR/8/34. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 125-130. <https://doi.org/10.4014/jmb.1210.10074>
- Kim S-J, Bang C-Y, Guo Y-R, Choung S-Y (2016) Anti-obesity effects of *Aster spathulifolius* extract in high-fat diet-induced obese rats. *Journal of Medicinal Food*, 19(4), 353-364. <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.3566>.
- Pietta P, Minoggio M, Bramati L (2003) Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 28, 257-312. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80143-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80143-6).
- Lee J-E, Jayakody JTM, Kim J-I, Jeong J-W, Choi K-M, Kim T-S, Seo C, Azimi I, Hyun J, et al. (2024) The influence of solvent choice on the extraction of bioactive compounds from *Asteraceae*: A comparative review. *Foods*, 13(19), 3151. <https://doi.org/10.3390/foods13193151>.
- Birková A, Hubková B, Bolerázská B, Mareková M, Čižmarová B (2020) Caffeic acid: A brief overview of its presence, metabolism,

- and bioactivity. *Bioactive Compounds in Health and Disease-Online*, 3(4), 74-81. <https://doi.org/10.31989/bchd.v3i4.692>.
26. Lin L-Z, Harnly JM (2008) Identification of hydroxycinnamoylquinic acids of arnica flowers and burdock roots using a standardized LC-DAD-ESI/MS profiling method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10105-10114. <https://doi.org/10.1021/jf802412m>.
27. Tamura Y, Hattori M, Konno K, Kono Y, Honda H, Ono H, Yoshida M (2004) Triterpenoid and caffeic acid derivatives in the leaves of ragweed, *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asterales: Asteraceae), as feeding stimulants of *Ophraella communa* LeSage (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chemoecology*, 14, 113-118. <https://doi.org/10.1007/s00049-004-0269-1>.
28. Fraisse D, Felgines C, Texier O, Lamaison J-L (2011) Caffeoyl derivatives: Major antioxidant compounds of some wild herbs of the Asteraceae family. *Food and Nutrition Sciences*, 2(3), 181-192. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.23002>.
29. Chen K, Peng C, Chi F, Yu C, Yang Q, Li Z (2022) Antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against *Yersinia enterocolitica*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 885092. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.885092>.
30. Su M, Liu F, Luo Z, Wu H, Zhang X, Wang D, Zhu Y, Sun Z, Xu W, et al. (2019) The antibacterial activity and mechanism of chlorogenic acid against foodborne pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(12), 823-830. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2678>.
31. Sung WS, Lee DG (2010) Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1), 219-226. <https://doi.org/10.1351/pac-con-09-01-08>.
32. Kim JY, Park YH, Park SE, Hwang BS, Hwang IG, Kim G-C (2020) Antioxidant activity and phenolic acid analysis of *Rudbeckia laciniata* var. *hortensis* extract. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 49(1), 46-53. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2020.49.1.46>.
33. Hudzicki J (2009) Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology*, 15(1), 1-23.
34. CLSI (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts (3rd edition), CLSI document M27-43. Vol. 28. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA.
35. Carlotto J, Da Silva LM, Dartora N, Maria-Ferreira D, Sabry DdA, Arquimedes Filho P, De Paula Werner MF, Sasaki GL, Gorin PA, et al. (2015) Identification of a dicaffeoylquinic acid isomer from *Arctium lappa* with a potent anti-ulcer activity. *Talanta*, 135, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.068>.
36. Willems JL, Khamis MM, Saeid WM, Purves RW, Katselis G, Low NH, El-Aneed A (2016) Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 933, 164-174. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.041>.
37. Kim YJ, Kim H-W, Lee M-K, Lee S-H, Asamenew G, Lee S, Lee SH, Cha Y-S, Kim JB (2018) Comparison of phenolic acid from shoots of *Aralia elata* and *Kalopanax pictus* cultivated in Korea using UPLC-DAD-ESI(+)-QTOF/MS. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 37(4), 260-267. <https://doi.org/10.5338/KJEA.2018.37.4.37>.
38. Jia W, Wang C, Wang Y, Pan G, Jiang M, Li Z, Zhu Y (2015) Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medical preparation Lianhua-Qingwen capsule by UPLC-DAD-QTOF-MS. *The Scientific World Journal*, 2015(1), 731765. <https://doi.org/10.1155/2015/731765>.
39. Sun S, Liu M, He J, Li K, Zhang X, Yin G (2019) Identification and determination of seven phenolic acids in Brazilian green propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. *Molecules*, 24(9), 1791. <http://10.3390/molecules24091791>.
40. Han YK, Vinh LB, Nam M-h, Lee KY (2023) Identification of compounds using HPLC-QTOF-MS online antioxidant activity mapping from aerial parts of *Ligularia stenocephala*. *Applied Biological Chemistry*, 66(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13765-023-00814-1>.
41. Zhang B, Li MY, Luo XM, Wang XB, Wu T (2020) Analysis of the chemical components of Qixianqingming granules and their metabolites in rats by UPLC-ESI-Q-TOF-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 55(1), e4484. <https://doi.org/10.1002/jms.4484>.
42. Clifford MN, Knight S, Kuhnert N (2005) Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3821-3832.
43. Wu Q, Zhao D, Leng Y, Chen C, Xiao K, Wu Z, Chen F (2024) Identification of the hypoglycemic active components of *Lonicera japonica* Thunb. and *Lonicera hypoglaucha* Miq. by UPLC-Q-TOF-MS. *Molecules*, 29(20), 4848. <https://doi.org/10.3390/molecules29204848>.
44. Cai H, Wen Z, Meng K, Yang P (2021) Metabolomic signatures for liver tissue and cecum contents in high-fat diet-induced obese mice based on UHPLC-Q-TOF/MS. *Nutrition & Metabolism*, 18(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12986-021-00595-8>.