

복분자에 함유된 항산화물질의 동정 및 활성

윤 인 · 조정용 · 국주희 · 위지향 · 장미영 · 안태희¹ · 박근형*
전남대학교 식품공학과 및 농업과학기술연구소, ¹오투기식품 중앙연구소

Identification and Activity of Antioxidative Compounds from *Rubus coreanum* Fruit

In Yoon, Jeong-Yong Cho, Ju-Hee Kuk, Ji-Hyang Wee, Mi-Young Jang,
Tae-Hoe Ahn¹ and Keun-Hyung Park*

Department of Food Science and Technology and
Institute of Agricultural Science and Technology, Chonnam National University
¹Research Center, Ottogi Food Co., Ltd.

The ethyl acetate-soluble acidic fractions from juice and cake of *Rubus coreanum* fruit showed DPPH radical-scavenging activity. Each fraction was purified through silica gel adsorption column chromatography. The compounds in the ethyl acetate-soluble acidic fraction of juice were identified as 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, and 3,4-dihydroxycinnamic acid by GC-MS. The compounds in the ethyl acetate-soluble acidic fraction of cake were also identified as succinic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, citric acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, and 3,4-dihydroxycinnamic acid by GC-MS. Antioxidative activity of the identified compounds were evaluated by DPPH radical-scavenging assay and hydroxyl radical-scavenging activity assay.

Key words: *Rubus coreanum* Fruit, antioxidative activity, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid, succinic acid, citric acid.

서 론

물질의 보고라고 할 수 있는 식물자원에서 항암^(1,2), 항알레르기⁽³⁾, 항비만⁽⁴⁾, 항산화⁽⁵⁻¹⁰⁾, 항균⁽¹¹⁾ 등의 기능성 물질 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이들 유용성분을 식품에 첨가하거나 그 자체를 이용하려는 시도가 진행되고 있다. 이 중 항산화물질은 유지의 자동산화 과정의 연쇄반응을 억제하는 radical-scavenger나 금속이온 킬레이트 또는 LDL 산화에 의한 동맥경화, 심장병 예방, 노화억제 등의 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있으며^(12,13), 천연 식품소재에 함유된 항산화 활성물질을 포함한 기능성 물질을 규명함으로써 보다 부가가치가 있는 식품소재 및 식품으로 제공하고자 하는 연구 또한 활발히 진행되고 있다.

복분자(覆盆子)는 '복분자 딸기의 열매'를 약재로 이르는

말로, 복분자 딸기(*Rubus coreanum*)는 장미과의 낙엽관목이며, 우리나라 남부지역이 주 생산지로, 6월에 검붉은 열매가 수확된다. 복분자는 식용으로 이용되고 있을 뿐만 아니라, 예로부터 한방과 민간에서 맹안, 태생, 지사, 음위, 강장, 그리고 양모 등에 약재로 이용하고 있다⁽¹⁴⁾. 복분자에 함유된 기능성 물질에 관한 연구로는, 줄기에 (-)-epicatechin, (+)-catechin, proanthocyanidin⁽¹⁵⁾, 잎에 flavonoid 화합물이 존재하고 있음이 보고^(16,17)된 바 있으며, 복분자의 미숙과에 gallic acid, 2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranose, sanguin이 존재한다고 보고⁽¹⁸⁾된 바 있으나, 가식부인 완숙 복분자에 관한 연구는 미약하여 이에 관한 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는 복분자의 착즙액 및 잔사에 함유된 항산화 물질을 규명함으로써 복분자를 기능성 식품 소재로 활용하는데 도움되고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 복분자(*Rubus coreanum* fruit)는 전라북도 고창군에서 재배된 것으로, 6월에 채취한 후 냉동 보관하여 시료로 사용하였다.

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

활성물질의 추출 및 정제

복분자(2 kg)를 착즙기(Juice master MJ-A1, National, Japan)로 착즙하여 착즙액을 얻었고, 이 착즙액의 잔사는 methanol(MeOH)로 24시간 동안 침지시켜 여과한 후 여액을 38°C에서 감압농축하여 잔사 MeOH 추출물을 얻었다.

착즙액을 1 M HCl로 pH 3.0으로 조정한 다음, ethyl acetate(EtOAc)로 분배하여 수상획분(aqueous layer)과 ethyl acetate 가용 산성·중성획분(EtOAc-soluble acidic·neutral fraction)을 얻었다. Ethyl acetate 가용 산성·중성획분을 완충용액(5% NaHCO₃, pH 8.0)으로 분배하여 EtOAc 가용 중성획분(EtOAc-soluble neutral fraction)과 수상획분으로 분획하였다. 또한 얻어진 수상획분에 1 M HCl을 가하여 pH 3.0으로 조정한 다음, ethyl acetate로 분배하여 EtOAc 가용 산성획분(EtOAc-soluble acidic fraction)을 얻었다.

잔사 MeOH 추출물은 EtOAc와 5% NaHCO₃ 완충용액(pH 8.0)으로 분배하여 수상획분과 EtOAc 가용 중성획분을 얻었다. 수상획분은 1 M HCl로 pH 3.0으로 조정한 다음, EtOAc로 분배하여 EtOAc 가용 산성획분을 얻었다.

복분자 착즙액과 잔사 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분을 각각 silica gel adsorption column chromatography에 의해 정제하였다. Silica gel adsorption column chromatography는 Cho 등⁽¹⁹⁾의 방법으로 silica gel(10 g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck사, Darmstadt, Germany)을 *n*-hexane/EtOAc/MeOH(8:6:1, v/v)의 용매계로 slurry를 만들어 column에 충전시킨 후, *n*-hexane/EtOAc/MeOH 용매계를 이동상으로 8:6:1, 6:8:1, 4:10:1, 2:12:1, 0:14:1, 0:0:15(v/v, 단계별 100 mL씩)로 극성을 증가시키는 step-wise 방법으로 용출·분획하였다.

GC-MS에 의한 물질의 동정

상기 방법에 의해 얻어진 복분자 착즙액과 복분자 잔사 methanol 추출물의 활성획분에 함유된 물질을 trimethylsilyl(TMS) 유도체화 한 후, gas chromatograph-mass spectrometry(GC-MS) 분석에 의해 동정하였다. GC-MS 분석은 MS(Varian SATURN 3, Walnut Creek, CA, USA)에 GC(Varian STAR 3400CX, Walnut Creek, CA, USA)가 연결된 기기로 Rtx-1 capillary column(0.32 mm×30 m, Varian instruments 2700, Walnut Creek, CA, USA)을 장착하였으며 온도는 100°C에서 2분간 유지한 후, 분당 5°C씩 240°C까지 증가시켰으며 240°C에서 5분간 유지시켰다. 또한 ion source 온도 200°C, ionizing voltage 70 eV 조건으로 MS 분석을 하였다.

활성획분의 TMS 유도체화는 Park 등⁽²⁰⁾의 방법에 의해 활성획분의 일부(10 µg)에 시약(무수 pyridine-*N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide-trimethylchlorosilane, 10:5:1, v/v) 20 µL를 가하여 혼합한 다음 60°C에서 30분간 반응시킨 후, GC-MS 분석을 실시하였다.

GC-MS 분석용 표준시약으로 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, citric acid(Sigma, MO, USA), 그리고 succinic acid(Junsei chemical, Japan)를 사용하였다.

동정된 물질의 정량 분석

GC-MS 분석에 의해 동정된 물질의 정량 분석을 위해 앞서 제시한 방법으로 얻어진 복분자 착즙액 및 잔사 methanol 추출물의 EtOAc 가용 산성획분들을 각각 silica gel adsorption column chromatography한 후 활성물질이 용출되는 *n*-hexane/EtOAc/MeOH(8:6:1, v/v) 획분의 일부를 취하여 TMS 유도체화하여 GC-MS 분석하였다. 3회 반복 분석한 후 얻어진 GC의 각 활성 물질의 면적을 구하고, 같은 조건에서 각 표준품의 peak 면적에 의한 검량곡선을 작성하여 정량하였다. 또한, 각 표준품을 시료와 동일한 방법의 정제과정을 거쳐 산출된 각 표준품의 회수율을 구하여 보정하였다.

항산화 활성 측정

DPPH radical-scavenging activity 측정: DPPH radical-scavenging 활성은 Moon 등⁽²¹⁾의 방법에 의해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma, MO, USA)의 ethanol 용액(100 µM) 900 µL와 시료 용액 100 µL를 시험관에 넣고 vortex로 혼합하여, 암소에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 dose-response 곡선으로부터 50%의 DPPH 자유 라디칼 소거능(50% scavenging concentration; SC₅₀)값을 구하였다. 비교구로 α-tocopherol(Sigma, MO, USA)을 사용하였다.

또한, 정제 과정에서 항산화 활성 검정은 Takao 등⁽²²⁾의 방법에 의해 정제된 획분을 TLC에 spot하여 적절한 용매계로 전개한 후 DPPH radical의 ethanol 용액(200 µM)을 TLC-plate에 spray하여 적색이 탈색되면 항산화 활성 양성으로 판정하였다.

Hydroxyl radical에 의한 malonaldehyde 생성억제 효과 측정: Hydroxyl radical에 의한 malonaldehyde 생성억제 효과 측정은 Halliwell 등의 방법⁽²³⁾을 약간 변형한 방법으로, fenton 반응에 의해 deoxyribose가 분해되어 생성되는 malonaldehyde의 양을 thiobarbituric acid-reactive substances(TBARS) 값으로 나타내는 방법에 의해 항산화 효과를 검정하였다. 즉, 10 mL test tube에 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 0.5 mL와 H₂O 100 µL, 28 mM 2-deoxy-D-ribose 100 µL, 시료용액 100 µL (최종 농도; 0.1 mM)의 반응용액에 Fe/Ascorbate (0.1 mM/1.0 mM) 100 µL와 10 mM H₂O₂ 100 µL를 첨가하여 fenton 반응을 유발시켰다. 이 반응용액(1 mL)을 37°C shaking water bath에서 60분간 반응시킨 후, 2.8% trichloroacetic acid와 1% 2-thiobarbituric acid를 각각 1 mL씩 첨가한 다음 100°C의 끓는 물에서 10분간 증탕 가열한 다음, 이를 냉수로 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성되어진 TBARS 값은 적정농도의 tetraethoxypropane(TEP, 표준용액)을 이용하여 작성한 검량선으로부터 얻어진 malonaldehyde의 상당량으로 환산하여 µM 농도로 표시하였다.

결과 및 고찰

복분자 용매 분획물의 항산화 활성

복분자를 착즙하여 얻어진 착즙액을 용매분획하여 EtOAc

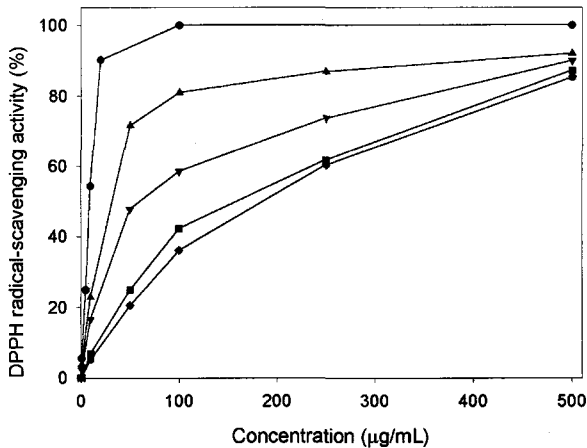


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of solvent fractionated fractions from *Rubus coreanum* fruit.

●-●, α -tocopherol; ▲-▲, EtOAc-soluble acidic fraction of cake; ▼-▼, EtOAc-soluble acidic fraction of juice; ■-■, EtOAc-soluble neutral fraction of juice; ◆-◆, EtOAc-soluble neutral fraction of cake.

가용 산성획분(940 mg)과 EtOAc 가용 중성획분(184 mg)을 얻었다. 또한 잔사 MeOH 추출물을 용매 분획하여 EtOAc 가용 산성획분(685 mg)과 EtOAc 가용 중성획분(517 mg)을 얻었다. 이들 획분을 대상으로 DPPH radical-scavenging 활성을 측정된 결과(Fig. 1), 50%의 DPPH 자유라디칼 소거능(SC_{50}) 값은 잔사 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분이 34 μ g/mL, 착즙액의 EtOAc 가용 산성획분이 60 μ g/mL, 착즙액의 EtOAc 가용 중성획분이 182 μ g/mL, 그리고 잔사 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 중성획분이 190 μ g/mL로 측정되었다. 복분자의 착즙액과 그 잔사 MeOH 추출물의 산성획분과 중성획분 모두 항산화 활성을 보였으나, 이 중 착즙액 및 잔사 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분들이 EtOAc 가용 중성획분들보다 강한 활성을 보였다. 따라서 복분자 착즙액 및 잔사 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분들에 함유된 항산화 활성 물질의 분리 및 동정을 먼저 시도하였다.

복분자 착즙액의 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 항산화 물질의 GC-MS 분석에 의한 동정

복분자 착즙액의 EtOAc 가용 산성획분을 silica gel adsorption column chromatography에 의해 용출·분획하여 항산화 활성을 검정한 결과, *n*-hexane/EtOAc/MeOH(8:6:1, v/v)의 용출획분에서 활성이 나타났다. 이 획분을 일부 취하여 TMS 유도체화한 다음 GC-MS 분석을 행한 결과, GC chromatogram 상에서 10여종의 peak가 나타났다(Fig. 2). 이들 peak의 MS spectrum으로 Wiley6 library 검색을 실시하였다. Retention time(t_R) 11.36분에 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum으로부터 molecular ion으로 m/z 282가 관찰되었으며, fragment ion으로 m/z 267(base peak), 223, 193이 관측되었다. 이 spectrum은 OH기와 COOH기에 TMS기가 도입된 4-hydroxybenzoic acid($C_{13}H_{22}O_3Si_2$)의 MS spectrum과 일치하여 4-hydroxybenzoic acid의 가능성을 나타냈다. t_R 14.18분의 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum으로부터 molecular ion으로 m/z 312가, fragment ion으로 m/z 297(base peak), 282,

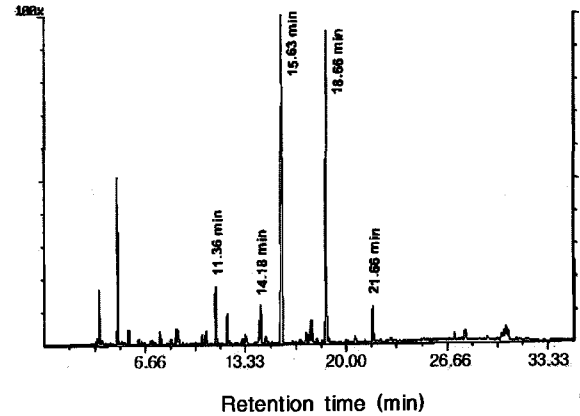


Fig. 2. GC chromatogram of the purified active fraction from juice of *Rubus coreanum* fruit.

267, 253, 223이 관측되었으며, 이 spectrum은 OH기와 COOH기에 TMS기가 도입된 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid($C_{14}H_{24}O_4Si_2$)의 MS spectrum과 일치하여 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid의 가능성을 나타냈다. 또한 t_R 15.63분의 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum으로부터 molecular ion으로 m/z 370이, fragment ion으로 m/z 355, 311, 273, 193(base peak)이 관측되었으며, 이는 2개의 OH기와 COOH기에 TMS기가 도입된 3,4-dihydroxybenzoic acid($C_{16}H_{30}O_4Si_3$)의 MS spectrum과 일치하여 3,4-dihydroxybenzoic acid의 가능성을 나타냈다. t_R 18.66분 peak의 MS spectrum으로부터 molecular ion이고 base peak로 m/z 458이 관측되었으며, fragment ion으로 m/z 443, 370, 282가 관측되었다. 이 spectrum은 3개의 OH기와 COOH기에 TMS기가 도입된 3,4,5-trihydroxybenzoic acid($C_{19}H_{38}O_5Si_3$)의 MS spectrum과 일치하여 3,4,5-trihydroxybenzoic acid의 가능성을 나타냈다. 또한 t_R 21.66분 peak의 MS spectrum으로부터 molecular ion이고 base peak로 m/z 396이 관측되었으며, fragment ion으로 m/z 382, 336, 293, 219가 관측되었다. 이 spectrum은 2개의 OH기와 COOH기에 TMS기가 도입된 3,4-dihydroxycinnamic acid($C_{18}H_{32}O_4Si_3$)의 MS spectrum과 일치하여 3,4-dihydroxycinnamic acid의 가능성을 나타냈다. 이들 물질의 t_R 과 MS data를 Table 1에 나타냈다.

Library 검색에 의해 제시된 5종 물질의 표준품을 동일한 방법에 의해 TMS 유도체화하여 GC-MS 분석한 결과, 각 물질의 GC의 retention time과 MS spectrum이 착즙액에 함유된 물질과 일치하였다. 따라서 복분자 착즙액의 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 5종의 화합물은 4-hydroxybenzoic acid(t_R 11.36분), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid(vanillic acid, t_R 14.18분), 3,4-dihydroxybenzoic acid(protocatechuic acid, t_R 15.63분), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(gallic acid, t_R 18.66분), 그리고 3,4-dihydroxycinnamic acid(caffeic acid, t_R 21.66분)로 동정되었다.

잔사 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 항산화물질의 GC-MS 분석에 의한 동정

복분자 잔사 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분을 silica gel adsorption column chromatography에 의해 정제하여 활성

Table 1. GC-MS data of the trimethylsilylated compounds identified in fruit of *Rubus coreanum*

Source	t_R (min)	Compounds	Prominent ion (relative intensity)
Juice	11.36	4-hydroxybenzoic acid	282 (6.5), 267 (100.0), 223 (50.2), 193 (25.5)
	14.18	4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	312 (37.6), 297 (100.0), 282 (18.2), 267 (64.7), 253 (32.1), 223 (32.1)
	15.63	3,4-dihydroxybenzoic acid	370 (72.8), 355 (46.2), 311 (16.4), 273 (10.7), 193 (100.0)
	18.66	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	458 (100.0), 443 (17.7), 370 (7.3), 282 (74.2)
	21.66	3,4-dihydroxycinnamic acid	396 (100.0), 382 (26.6), 336 (4.8), 293 (5.7), 219 (83.9)
Cake	4.84	succinic acid	262 (2.0), 247 (2.0), 173 (2.9), 147 (100.0), 129 (1.2)
	15.63	3,4-dihydroxybenzoic acid	370 (72.9), 355 (46.2), 311 (16.4), 273 (10.7), 193 (100.0)
	16.08	citric acid	480 (1.6), 465 (31.1), 347 (22.5), 305 (5.3), 273 (100.0), 257 (7.0)
	18.66	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	458 (100.0), 445 (17.7), 370 (7.3), 282 (74.2)
	21.66	3,4-dihydroxycinnamic acid	396 (100.0), 382 (26.6), 336 (48.0), 293 (5.7), 219 (83.9)

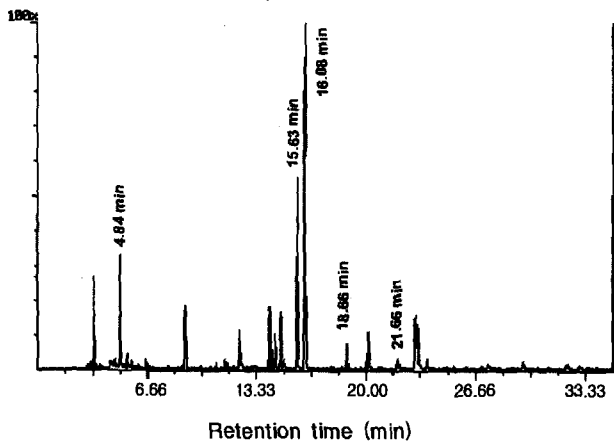


Fig. 3. GC chromatogram of the purified active fraction from cake of *Rubus coreanum* fruit.

을 나타낸 *n*-hexane/EtOAc/MeOH(8:6:1, v/v) 용매계의 용출 회분을 일부 취하여 TMS 유도체화한 후 GC-MS 분석을 실시하였다. GC chromatogram 상에서 10 여종의 peak가 나타났으며(Fig. 3), 이들 peak의 MS spectrum으로 Wiley6 library 검색을 실시하였다. t_R 4.84분의 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum으로부터 molecular ion으로 m/z 262가, fragment ion으로 m/z 247, 173, 147(base peak), 129가 관측되었다. 이 spectrum은 2개의 COOH기에 TMS기가 도입된 succinic acid($C_{10}H_{22}O_4Si_2$)의 MS spectrum과 일치하여 succinic acid의 가능성을 나타냈다. t_R 15.63분 peak를 갖는 물질의 EI-MS spectrum으로부터 molecular ion으로 m/z 370이, fragment ion으로 m/z 355, 311, 273, 193(base peak)이 관측되었으며, 2개의 OH기와 COOH기에 TMS기가 도입된 3,4-dihydroxybenzoic acid($C_{16}H_{30}O_4Si_3$)의 MS spectrum과 일치하여 3,4-dihydroxybenzoic acid의 가능성을 나타냈다. t_R 16.08분 peak의 EI-MS

spectrum으로부터 molecular ion으로 m/z 480이, fragment ion으로 m/z 465, 347, 305, 273(base peak), 257이 관측되었다. 이 spectrum은 OH기와 3개의 COOH기에 TMS기가 도입된 citric acid($C_{18}H_{40}O_7Si_4$)의 MS spectrum과 일치하여 citric acid의 가능성을 나타냈다. 또한 t_R 18.66분 peak의 MS spectrum으로부터 molecular ion이고 base peak로 m/z 458이 관측되었으며 fragment ion으로 m/z 443, 370, 282가 관측되었다. 이 spectrum은 3개의 OH기와 COOH기에 TMS기가 도입된 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ($C_{19}H_{38}O_5Si_4$)의 MS spectrum과 일치하여 3,4,5-trihydroxybenzoic acid의 가능성을 나타냈다. 그리고 t_R 21.66분 peak의 MS spectrum으로부터 molecular ion이고 base peak로 m/z 396이 관측되었으며, fragment ion으로 m/z 382, 336, 293, 219가 관측되었다. 이 spectrum은 2개의 OH기와 COOH기에 TMS기가 도입된 3,4-dihydroxycinnamic acid($C_{18}H_{32}O_4Si_3$)의 MS spectrum과 일치하여 3,4-dihydroxycinnamic acid의 가능성을 나타냈다.

보다 신뢰성 있는 동정을 위해 표준품을 TMS 유도체화하여 GC-MS를 행한 결과, 표준품의 GC retention time과 MS spectrum이 잔사 MeOH 추출물에 함유된 활성물질의 t_R 과 MS data가 일치하였다. 따라서 복분자 잔사 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성회분에 함유된 물질로 succinic acid(t_R 4.84분), 3,4-dihydroxybenzoic acid(t_R 15.63분), citric acid(t_R 16.08분), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(t_R 18.66분), 3,4-dihydroxycinnamic acid(t_R 21.66분)가 동정되었다(Table 1).

복분자 차츰액과 잔사 MeOH 추출물에서 동정된 화합물들은 항산화 활성 혹은 상충작용이 있는 것으로 보고되어 있다. 즉, 4-hydroxybenzoic acid는 땅콩껍질⁽²⁴⁾, 3,4-dihydroxybenzoic acid와 3,4-dihydroxycinnamic acid는 Rooibos tea⁽²⁵⁾에서 항산화 물질로 동정하여 보고된 바 있으며, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid는 땅콩껍질⁽²⁴⁾과 헛개나무⁽²⁶⁾에서, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid는 도토리⁽²⁷⁾에서 항산화 활성물질로 동

Table 2. The content of the identified compounds in juice and cake of *Rubus coreanum* fruit

Compounds	Content ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	
	Juice	Cake
4-Hydroxybenzoic acid	96.6 \pm 3.5	-
4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	64.4 \pm 3.7	-
3,4-Dihydroxybenzoic acid	382.4 \pm 1.6	318.4 \pm 19.0
3,4,5-Trihydroxybenzoic acid	68.5 \pm 3.2	78.7 \pm 2.1
3,4-Dihydroxycinnamic acid	116.6 \pm 1.2	49.3 \pm 0.7
Succinic acid	-	1521.4 \pm 81.8
Citric acid	-	3631.9 \pm 1.8

-: not detected.

정하여 보고된 바 있으며, citric acid는 항산화 물질과 함께 존재할 때 활성의 상승효과(synergistic effect)를 갖는 것으로 보고^(28,29)되어진 바 있다. 동정된 이들 화합물은 복분자의 항산화 활성 발현에 크게 기여하고 있는 것으로 생각된다.

활성물질의 함량

복분자 착즙액과 잔사 MeOH 추출물에서 동정된 화합물들의 함량을 GC 분석에 의해 측정하였다. 복분자 착즙액 및 잔사 MeOH 추출물을 용매분획하여 얻어진 EtOAc 가용 산성획분들을 각각 silica gel adsorption column chromatography에 의해 정제한 다음, 활성 획분의 일부를 TMS 유도체 화하여 GC 분석하여 이들 화합물의 함량을 측정하였다. 또한, 표준품을 동일한 방법으로 처리하여 회수율을 측정하였다. 4-Hydroxybenzoic acid의 회수율은 90.3%, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid는 91.2%, 3,4-dihydroxybenzoic acid는 93.1%, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid는 91.6%, 3,4-dihydroxycinnamic acid는 92.4%로 90% 이상의 비교적 높은 회수율을 나타낸 반면, succinic acid는 44.6%, citric acid는 70.3%로 낮은 회수율을 보였다. 복분자 착즙액과 잔사 MeOH 추출물에 함유된 활성물질의 함량을 회수율로 보정하여 산출한 결과, 복분자 착즙액에서는 3,4-dihydroxybenzoic acid의 함량이 가장 높게 나타났으며, 다음으로 3,4-dihydroxycinnamic acid > 4-hydroxybenzoic acid > 3,4,5-trihydroxybenzoic acid > 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid의 순으로 존재하였다(Table 2).

한편, 복분자 잔사 MeOH 추출물에서는 citric acid의 함량이 가장 높았으며, succinic acid > 3,4-dihydroxybenzoic acid > 3,4,5-trihydroxybenzoic acid > 3,4-dihydroxycinnamic acid 순으로 존재하였다(Table 2).

복분자 착즙액과 잔사 MeOH 추출물에 공통적으로 존재한 물질 중 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid 그리고 3,4-dihydroxycinnamic acid는 함량이 거의 비슷하게 나타나 수용성의 특성을 갖는 착즙액과 잔사에 분배 비율이 비슷함을 알 수 있었으며, citric acid와 succinic acid 등의 유기산은 대부분 잔사에 잔류하였다.

동정된 화합물의 DPPH radical-scavenging activity

복분자에서 동정된 7종의 화합물을 대상으로 DPPH radical-scavenging 활성을 측정하였다. 또한 활성은 항산화제인 α -tocopherol의 활성과 비교하였다. Dose-response curve(Fig. 4)

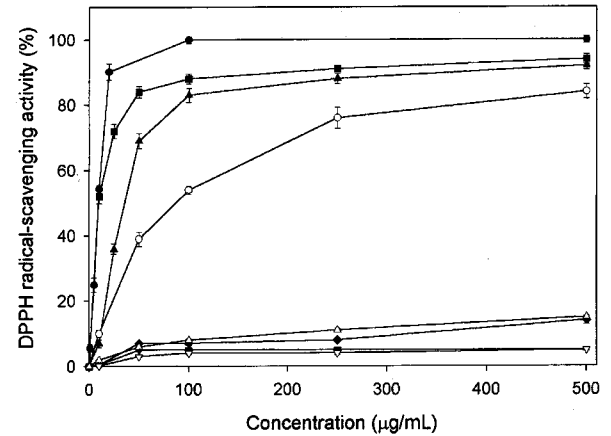


Fig. 4. DPPH radical-scavenging activity of the identified compounds from *Rubus coreanum* fruit.

Data are shown as the mean \pm SD (n=3). ●-●, α -tocopherol; ■-■, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid; ▲-▲, 3,4-dihydroxycinnamic acid; ○-○, 3,4-dihydroxybenzoic acid; △-△, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid; ◆-◆, citric acid; ◇-◇, succinic acid; ▽-▽, 4-hydroxybenzoic acid.

로부터 산출된 50%의 DPPH radical-scavenging 활성을 나타내는 화합물의 농도(SC₅₀)는 α -tocopherol이 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid는 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3,4-dihydroxycinnamic acid는 37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3,4-dihydroxybenzoic acid는 87.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었다. succinic acid, citric acid, 4-hydroxybenzoic acid, 그리고 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid 등의 SC₅₀ 값은 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 측정되었다. 복분자에 함유된 물질 중 3,4,5-trihydroxybenzoic acid가 가장 강한 활성을 보여 α -tocopherol과 유사한 항산화 활성을 나타냈으며, 3,4-dihydroxycinnamic acid 그리고 3,4-dihydroxybenzoic acid 순으로 높은 활성을 보였다.

동정된 화합물의 hydroxyl radical에 의한 malonaldehyde 생성억제 효과

복분자로부터 동정된 화합물 중 상기의 DPPH radical-scavenging activity 검정에서 강한 활성을 나타낸 5종의 화합물을 대상으로 하여, hydroxyl radical에 의한 malonaldehyde 생성억제 효과를 측정하였다. 이는 fenton 반응에 의해 생성되어지는 hydroxyl radical-scavenging 활성 및 철이온과 같은 금속이온 킬레이트에 의한 항산화 활성을 평가할 수 있는 방법⁽²³⁾인 바, Fig. 5에 나타낸 바와 같이 3,4,5-trihydroxybenzoic acid \approx 3,4-dihydroxycinnamic acid \approx 3,4-dihydroxybenzoic acid > 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid > 4-hydroxybenzoic acid의 순으로 항산화 활성을 나타냈다.

DPPH radical-scavenging 활성검정법과 hydroxyl radical에 의한 malonaldehyde 생성억제 효과 검정법 등 성질이 다른 두 종의 항산화 활성 검정법에 의해 평가된, 복분자에서 동정된 화합물의 활성은 유사한 경향을 나타냈다. 두 검정법 모두 phenolic acid에 결합된 OH기의 수에 의해 활성의 차를 나타내고 있는 바, 이들 물질 중 3개의 OH기를 갖는 3,4,5-trihydroxybenzoic acid가 가장 강한 활성을 보이고, OH수가 작을수록 낮은 활성을 보였다. 또 같은 OH 수를 갖는

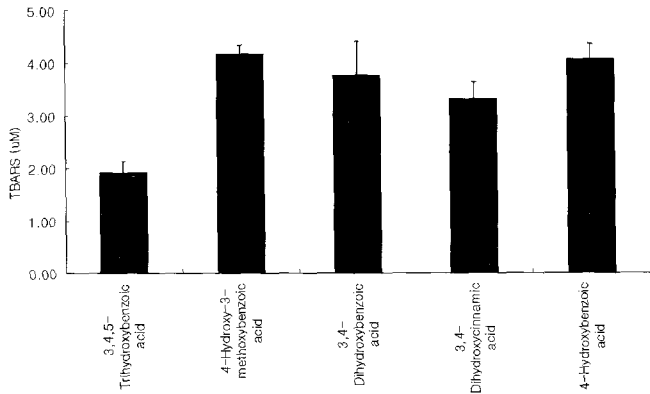


Fig. 5. Hydroxyl radical-scavenging activity of the identified compounds from *Rubus coreanum* fruit.
Data are shown as the mean \pm SD (n=3).

3,4-dihydroxycinnamic acid가 3,4-dihydroxybenzoic acid보다 높은 활성을 보였는데, Natella 등⁽³⁰⁾에 의해 보고된 benzoic acid 유도체보다는 cinnamic acid 유도체 화합물들이 더 강한 항산화 활성을 보인다는 결과와 잘 일치하고 있다.

요 약

복분자를 착즙하여 착즙액과 잔사로 나누고, 각 추출물을 용매분획하여 얻어진 각 획분을 대상으로 DPPH radical-scavenging 활성을 측정하였더니, 각 추출물의 EtOAc 가용 산성획분에서 비교적 강한 활성이 나타났다. 이들 획분에 함유된 활성물질을 규명하고자 silica gel column chromatography로 정제한 다음 활성획분을 GC-MS 분석을 실시한 결과, 복분자 착즙액의 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 물질로 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid 등이 동정되었고, 잔사 MeOH 추출물의 EtOAc 가용 산성획분에 함유된 물질로 succinic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, citric acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid가 동정되었다. DPPH radical-scavenging 활성과 hydroxyl radical에 의한 malonaldehyde 생성억제 효과활성 등의 방법으로 동정된 물질의 항산화 활성이 평가되었다.

감사의 글

이 논문은 오뚜기재단 학술연구 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Kim, K.H., Chang, M.W., Park, K.Y., Rhee, S.H., Rhee, T.H. and Sunwoo, Y.I. Antitumor activity of phytol identified from perilla leaf and its augmentative effect on cellular immune response. *Korean J. Nutr.* 26: 379-389 (1993)
- Kim, Y.I., Lee, S.H. and Cho, T.S. Isolation of anticancer agents from the leaves of *Platycarya strobilacea* S. et Z. *Korean J. Phar-*

- macogn. 27: 238-245 (1996)
- Park, K.H., Koh, D.S. and Lim, Y.H. Anti-allergic compound isolated from *Cinnamomum cassia*. *J. Korean Soc. Agric. Biotechnol.* 44: 40-42 (2001)
- Choo, J.J. Anti-obesity effects of *Kochujang* in rats fed on a high-fat diet. *Korean J. Nutr.* 33: 787-793 (2000)
- Shim, K.H., Young, H.S., Lee, T.W. and Choi, J.S. Studies on the chemical components and antioxidative effects of *Solanum lyratum* Thunb. *Korean J. Pharmacogn.* 26: 130-138 (1995)
- Han, Y.B., Kim, M.R., Han, B.H. and Han, Y.N. Studies on antioxidant component of mustard leaf and seed. *Korean J. Pharmacogn.* 18: 41-49 (1987)
- Kim, J.S., Kang, S.S., Choi, J.S., Lee, M.H. and Lee, T.S. Antioxidant components from *Aralia continentalis*. *Korean J. Pharmacogn.* 29: 13-17 (1998)
- Shin, T.S., Moon, J.D., Kim, Y.G. and Kim, Y.J. Effect of natural antioxidants on lipid oxidation of ground pork. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 794-802 (1998)
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62: 1201-1204 (1998)
- Kuo, J.M., Yeh, D.B. and Pan, B.S. Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plants material. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3206-3209 (1999)
- Cho, J.Y., Moon, J.H., Seong, K.Y. and Park, K.H. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and *trans* 4-hydroxybenzoic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 2273-2276 (1998)
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F. and Remesy, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivative which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* 426: 331-336 (1998)
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956 (1996)
- Kim, T.J. *Korean Resources Plants II.* p. 140 Publishing Department of Seoul University, Seoul (1996)
- Lee, Y.A. and Lee, M.W. Tannins from *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharmacogn.* 26: 27-30 (1995)
- Lee, M.W. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* 39: 200-204 (1995)
- Kim, M.S., Pang, G.C. and Lee, M.W. Flavonoids from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* 41: 1-6 (1997)
- Pang, G.C., Kim, M.S. and Lee, M.W. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharmacogn.* 27: 366-370 (1996)
- Cho, J.Y., Kim, H.K., Ma, S.J., Moon, J.H. and Park, K.H. Isolation and identification of azelaic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid from buckwheat hull as antimicrobial substances. *Food Sci. Biotechnol.* 9: 313-316 (2000)
- Park, K.H., Park, J.D., Hyun, K.H., Nakayama, M. and Yokota, T. Brassinosteroids and monoglycerides with brassinosteroid-like activity in immature seeds of *Oryza sativa* and *Perilla frutescens* and in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 224-2243 (1994)
- Moon, J.H. and Terao, J. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* 46: 5062-5065 (1998)
- Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. and Sakata, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1780-1783 (1994)
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Aruoma, O.I. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165: 215-219 (1987)
- Wee, J.H. and Park, K.H. Identification of 3-methoxy-4-hydroxy-

- cinnamic acid and 4-hydroxybenzoic acid with antioxidative and antimicrobial activity from *Arachis hypogaea* shell. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 15: 464-468 (2000)
25. Gadow, A.V., Joubert, E. and Hansmann, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. J. Agric. Food Chem. 45: 632-638 (1997)
26. Cho, J.Y., Moon, J.H. and Park, K.H. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid with antioxidative and antimicrobial activity from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and conformation of their antioxidative and antimicrobial activity. Korean J. Agric. Food Chem. 32: 1403-1408 (2000)
27. Lee, M.H., Jeong J.H. and Oh, M.J. Antioxidative activity of gallic acid in acorn extract. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 693-700 (1992)
28. Yang, K.S., Yu, J.H., Hwang, J.I. and Yang, R. Synergistic effect of citric acid on antioxidant property of red pepper. Korean J. Food Sci. Technol. 6: 193-198 (1974)
29. Lee, H.B. Synergistic effect of citric acid on antioxidant property of BHT. Korean J. Nutr. 8: 31-36 (1975)
30. Natella, F., Nardini, M., Felice, M.D. and Scaccini, C. Benzoic acid and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation. J. Agric. Food Chem. 47: 1453-1459 (1999)

(2002년 8월 7일 접수; 2002년 10월 11일 채택)