

## 복분자(*Rubus coreanus* Miquel) 와인의 에틸아세테이트층으로부터 저분자 페놀성 항산화 화합물의 단리 · 동정

김성자 · 이형재 · 박근형 · 이종욱 · 임익재<sup>1</sup> · 정희종 · 문제학\*

전남대학교 식품공학과 및 기능성식품연구센터, <sup>1</sup>(주)연수당

### Isolation and Identification of Low Molecular Phenolic Antioxidants from Ethylacetate Layer of Korean Black Raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) Wine

Seong-Ja Kim, Hyoung Jae Lee, Keun-Hyung Park, Chong-Ouk Rhee, Ik Jae Lim<sup>1</sup>, Hee-Jong Chung, and Jae-Hak Moon\*

Department of Food Science & Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University  
<sup>1</sup>Yeonsudang Co., Ltd.

**Abstract** Five antioxidative active substances were isolated from the EtOAc layer (20 g/56.2 g) of Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) wine (11 L, black raspberry 15.7 kg fresh wt. eq.) by various column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy and gas chromatography Electro Ionization-Mass Spectrometry (GC-EI-MS) identified these as 4-hydroxybenzoic acid (1, 0.1 mg), 3,4-dihydroxybenzoic acid (2, 0.3 mg), 4-(2-hydroxyethyl)-phenol (3, 0.6 mg; tyrosol), pyrocatechol (4, 0.3 mg), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester (5, 0.6 mg; ethyl gallate). The presence of 1 and 2 in Korean black raspberry has previously been reported. However, the presence of 3-5 in Korean black raspberry, and the identification of 1-5 from the Korean black raspberry wine have never before been reported.

**Key words:** black raspberry wine, *Rubus coreanus* Miquel, antioxidants, phenolic compounds, phenolic acids

## 서 론

복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽관목으로 중국이 원산지(1)로 알려져 있으며, 우리나라에서는 제주도 및 남부지역이 주요산지로 초여름에 검붉은 열매를 수확하여 식용하고 있다(1). 예로부터 한방에서는 강장제, 강정제 및 보간의 요약으로서 귀한 약재로 알려져 왔으며, 신체허약, 양위, 유정, 유평 등에 실용되는 소재이다(2-4).

딸기류에 관한 항산화 화합물의 분석을 위해 29종의 딸기 추출물의 산기수분해물을 대상으로 행한 Mattila 등(5)의 연구로부터 caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, *p*-coumaric acid, *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, cinnamic acid 및 gallic acid 등의 존재가 보고된 바 있다. 또 딸기의 대표적인 수용성 anthocyanin으로서 pelargonidine 3-glucoside의 존재가 보고되어져 있다(6).

한편 복분자에 함유된 성분 연구로는 줄기로부터 flavan 3-ol인

(-)-epicatechin, (+)-catechin, 그리고 procyanidin인 procyanidin B-4 가 분리 · 동정되어진 바 있으며(7-9), 앞으로부터 kaempferol, quercetin, quercetin 3-O-β-D-glucuronide, ellagic acid 및 sanguin H-5 등이 분리 · 보고되어진 바 있다. 복분자 열매로부터 quercetin (10) 및 다양한 phenolic acids의 존재 또한 보고되어 있다(11). 또 미성숙 복분자 열매로부터 gallotannin, ellagitannin, gallic acid, 2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranoside, sanguin H-4 및 H-6의 존재가 확인되어져 있다(12).

복분자 열매의 약리학적 연구로는 페놀성 화합물의 항산화 작용(10,11) 및 위염과 위궤양의 일차적 발병인자로 알려진 *Helicobacter pylori*의 생육 억제작용(13)에 더하여 시상하부-뇌하수체-성선축의 기능을 증강함으로써 난소제거 암컷 흰쥐의 생식 내분비기능 부조화로 야기되는 증상에 대해 개선효과가 있다는 연구결과가 보고되어 있다(14). 그리고 복분자의 여성 생식기능에 미치는 효과를 검토하기 위해 과육을 제거한 씨앗 추출물의 섭취실험을 행하여 흰쥐의 난포숫자와 크기를 비교한 결과, 미성숙 열매의 추출물보다 성숙 열매의 추출물이 불임증에 더 효과적이었다는 연구보고 등이 있다(15).

이처럼 복분자에 다종의 유용 성분의 존재 및 다양한 생리활성이 보고되면서 최근 식용 및 다양한 음료의 원료로도 널리 이용되고 있어 일반인들에게도 친숙한 식품소재로 인식되고 있다. 복분자는 이러한 기능적 측면뿐만 아니라 관능적 측면에서도 우수하기 때문에 음료 및 과자류 등의 다양한 식품소재로서 개발이 기대되고 있다.

\*Corresponding author: Jae-Hak Moon, Department of Food Science and Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Buk-gu, Gwangju 500-757, Korea

Tel: 82-62-530-2141

Fax: 82-62-530-2149

E-mail: nutrmoon@chonnam.ac.kr

Received November 22, 2007; accepted January 25, 2008

한편 복분자 열매는 술의 형태로 상당량이 이용되고 있음에도 불구하고 복분자의 각종 약리 및 생리활성, 그리고 그와 관련된 성분연구의 거의 대부분은 원재료인 복분자 열매 자체만을 대상으로 수행되어져 왔다. 그러나 복분자 열매를 이용하여 제조한 복분자 와인에는 발효와 숙성과정을 거쳐 제조되어지기 때문에 원재료 중에 함유되어 있는 화합물들이 제조과정 중에 효소작용 등에 의해 중합 또는 분해되어 원재료와는 전혀 다른 새로운 종의 화합물들이 생성되어질 가능성이 높다고 판단된다. 만약 원재료 복분자 열매와 복분자 와인 중에 함유된 성분들 간에 차이가 있다면, 그들 각각에 의해 발휘되어지는 생리활성에도 적지 않은 차이가 있을 것으로 추측되어진다. 그러나 복분자 와인의 제조과정에 따른 화합물의 변화나 복분자 와인에 함유되어 있는 생리활성 화합물에 관한 체계적인 연구는 거의 전무한 상태이다.

이에 본 연구에서는 먼저 복분자 와인에 함유된 성분들의 chemical profile을 구명할 필요가 있다고 판단되어 항산화 활성에 초점을 맞추어 발효 및 숙성이 진행된 복분자 와인을 대상으로 생리활성물질의 분리 및 구조해석을 행하여 일련의 결과들이 얻어졌기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 이용된 복분자 열매(*Rubus coreanus* Miquel)는 전남 나주에서 2004년 6월에 채취한 것을 이용하였으며, 복분자 와인은 동일 복분자 열매를 이용하여 (주)연수당에서 조제된 시료를 이용하였다. 이 복분자 와인은 15.7 kg의 신선 복분자 열매로부터 11 L의 복분자 와인 원액이 얻어진 것으로 발효 및 숙성 후 타 원료를 첨가하지 않은 상태의 것(알코올 15%)을 이용하였다. 시료의 추출 및 용매분획에 이용한 유기용매는 시약용(extra pure, Duksan, Ansan, Korea)을, 그리고 HPLC에는 HPLC grade (Fisher Scientific Inc., Hampton, USA)의 용매를 이용하였다.

### 원재료 복분자 열매의 추출물 조제

신선 복분자 열매 220 g에 EtOH 300 mL를 가하고 homogenizer(BM-2 Nissei boi-mixer, Nihonseiki LTD., Suwa, Japan)로 균질화한 후, 흡입여과(No. 2, Whatman, Maidstone, England)하여 여과액과 잔사를 분리하였다. 이어 회수한 잔사에 EtOH 300 mL를 가하여 균질화와 여과를 재차 행해 얻어진 여과액을 합한 후 진공농축하였다.

### 복분자 와인의 추출 및 용매분획

복분자 와인 11 L(신선 복분자 열매 15.7 kg 상당량)를 Büchner 여과장치를 이용하여 흡입여과(No. 2, Whatman)하였다. 그 여액을 진공 농축기를 이용하여 복분자 와인 중에 함유된 EtOH이 제거될 때까지 농축한 후, 얻어진 농축액(2.8 L, 280 g)을 *n*-hexane(3 L×4), ethyl acetate(EtOAc, 3 L×4), 수포화 *n*-butanol(*n*-BuOH, 3 L×4)로 순차 용매분획하였다. 얻어진 각 획분은 38°C에서 감압 농축한 후 무게를 측정하였다.

### 복분자 열매와 복분자 와인 추출물들의 TLC 분석 및 항산화 활성평가

원재료 복분자 열매 추출물 및 복분자 와인 여과액의 농축물을 용매분획한 후, 얻어진 각 획분을 대상으로 TLC-DPPH법(16)에 의한 항산화 화합물의 존재 경향을 비교·검토하였다. 즉 각 시료의 동일량(1 mg)을 TLC plate(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.25 mm

thickness, Merck, Darmstadt, Germany)상에 spotting한 후, CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 5:2(v/v) 용매계를 이용하여 전개시킨 다음, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma, St. Louis, MO, USA) ethanol 용액(200 μM)을 TLC plate에 분무하여 보라색이 탈색 되어진 획분을 항산화활성 양성으로 판정하였다.

이하 항산화 화합물의 분리·정제 과정에서 활성물질의 존재 여부를 평가하기 위한 검정법으로도 본 TLC-DPPH법이 이용되었다.

### Silica gel column chromatography에 의한 정제

EtOAc층(56.2 g)의 약 1/3의 양(20 g)을 대상으로 silica gel column chromatography에 의한 정제를 행하였다(17). 즉 시료의 20배량에 상당하는 silica gel(400 g, 70-230 mesh, Kiesel gel 60, column chromatography용, Merck, Darmstadt, Germany)을 CHCl<sub>3</sub>으로 slurry를 만들어 column(4×71.5 cm)에 충전한 후, EtOAc 중에 CHCl<sub>3</sub>의 함량을 100%에서부터 0%까지, 그리고 MeOH 중에 EtOAc의 함량이 100, 50 및 0%의 용액을 각각 2 L씩 순차 용출시키면서 15 mL씩 분획하였다.

1차 silica gel column chromatography로부터 얻어진 획분 A-6(0.23 g)을 대상으로 용매계를 달리하여 silica gel column chromatography를 재차 행하였다. 즉 silica gel(5 g)을 CHCl<sub>3</sub>으로 slurry를 만들어 column(1.5×25 cm)에 충전시키고, CHCl<sub>3</sub> 중에 MeOH 함량이 0, 10, 20, 30, 40, 50%인 용액을 step-wise 용출법에 의해 순차 용출·분획하였다. 각 단계별 용매는 75 mL씩 용출시켰으며, 용출 용액은 5 mL씩 분획하였다.

### Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 정제

Sephadex LH-20(70-230 mesh, Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 Lu 등(18)의 방법에 의해 MeOH로 24시간 팽윤시킨 후 column(1.6×25 cm)에 충전하고, 활성 획분 B-3(1.8 g)을 소량의 MeOH에 녹여 column에 charge한 다음, 동일 용매로 용출·분획하였다. 총 100 mL의 이동상을 용출시켰으며, 용출 용액은 2 mL씩 분획하였다.

### ODS column chromatography 의한 정제

시료의 200배량에 상당하는 octadecylsilane(ODS, 70-230 mesh, 200 g, YMC, Kyoto, Japan)을 Yim 등(19)의 방법에 의해 MeOH로 slurry를 만들어 column(3.8×52.1 cm)에 충전시킨 후, 20% MeOH로 평행화하였다. 활성획분 C-3(1.0 g)을 20% MeOH에 용해하여 ODS column에 charge한 후, MeOH 농도를 20%에서 100%까지 20%씩 증가시키는 step-wise 용출법에 의해 용출시켰다. 각 단계별 용매는 700 mL씩 용출시켰으며, 용출 용액은 10 mL씩 분획하였다.

### HPLC에 의한 정제

획분 C-4(3.0 mg)는 μBondapak C<sub>18</sub> column(7.8×300 mm, Waters, Mass., USA)을 이용하여 20% MeOH을 이동상으로 isocratic 용출(flow rate, 2.5 mL/min, 3회 반복)을 행하였다. 그로부터 얻어진 활성 획분 D-3(*t<sub>R</sub>* 8.1 min, 2.0 mg)은 ODS 80Ts column(4.6×150 mm, Tosoh, Tokyo, Japan)을 이용하여 20% MeOH을 이동상으로 isocratic 용출(flow rate, 1.0 mL/min, 5회 반복)을 행하여 정제하였다.

획분 E-12(1.8 mg)는 μBondapak C<sub>18</sub> column(7.8×300 mm, Waters, Mass., USA)에 20% MeOH(2.5 mL/min, isocratic, 3회 반복)을 이동상으로 정제를 행하고, 얻어진 획분 F-2, 4 및 6은 ODS 80Ts column(4.6×150 mm, Tosoh, Tokyo, Japan; 20%

MeOH, pH 2.65 by trifluoroacetic acid; 1.0 mL/min, 각각 7회, 10회, 15회 반복)을 이용한 동일조건에서 각각 재정제를 행하였다.

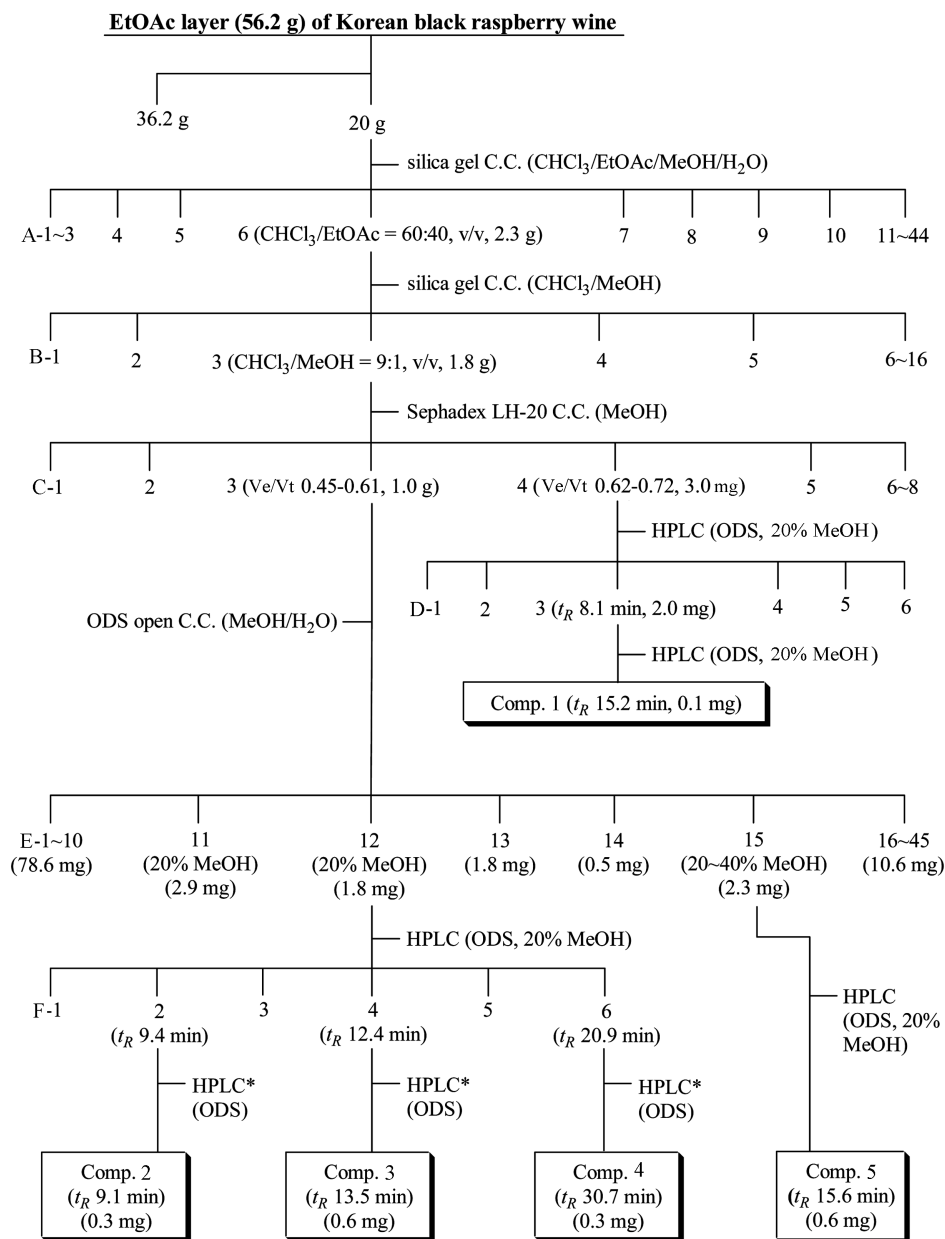
그리고 획분 E-15(2.3 mg) 또한 ODS 80Ts column(4.6×150 mm, Tosoh, Tokyo, Japan; 20% MeOH; 1.0 mL/min, 3회 반복)을 이용하여 정제하였다.

이들 정제는 모두 동일 HPLC system을 이용하였다. 즉 SPD-20A UV/VIS Detector(214 nm, Shimadzu, Kyoto, Japan)와 LC-20AD Pump(Shimadzu)가 이용되었으며, column은 40°C (CTO-20A Column Oven, Shimadzu)에서 유지되었다. 이상 5종 화합물의 분리과정을 Fig. 1에 정리하였다.

(GC-EI-MS)분석은 GC(GC2010, Shimadzu, Kyoto, Japan)에 EI-MS(QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan)가 연결된 기기로, Rtx-1 capillary column(0.32 mm×30 m, Varian instruments 2700, Walnut Creek, CA, USA)을 장착하였으며, ion source 온도 200 °C, ionizing voltage 70 eV, 컬럼의 오븐 온도는 100°C에서 2분간 유지한 후, 분당 5°C씩 240°C까지 증가시켰으며, 240°C에서 5분간 유지하도록 하는 조건에서 행하였다. 활성획분의 trimethylsilylation(TMS화)은 Park 등(20)의 방법을 이용하였다. 즉 분석 대상 시료의 일부(10 µg)에 NaOH로 건조시킨 pyridine과 *N,O*-bis(trimethylsilyl) acetamide(Fluka, Steinheim, Switzerland), trimethylchlorosilane(Fluka, Steinheim, Switzerland)을 10:5:1(v/v)로 혼합한 시약 20 µL를 가한 다음, 60°C에서 30분간 반응시켜 GC-MS 분석용 시료로 사용하였다. GC-MS 분석용 표준시약으로 이

**GC-EI-MS 분석에 의한 항산화물질의 동정**

Gas chromatograph electron ionization mass spectrometry



**Fig. 1. Isolation procedure of antioxidants from EtOAc layer of Korean black raspberry wine filtrate.** \*Mobile phase, 20% MeOH (pH 2.65 by trifluoroacetic acid). C.C.: Column chromatography.

용한 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxymethoxybenzoic acid 및 pyrocatechol은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며, 각각 10 µg을 단리 시료와 동일 방법에 의해 TMS화하여 화합물들의 동정에 이용하였다.

### NMR 분석

<sup>1</sup>H-NMR(nuclear magnetic resonance) 기기분석은 INOVA 500 spectrometer(500 MHZ, Varian, Walnut Creek, CA, USA)를 사용하였다. 분석용매는 내부표준 물질로 tetramethylsilane (TMS, δ=0)을 함유한 deuterium methanol(CD<sub>3</sub>OD, Acros, NJ, USA)을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 복분자 열매 추출물과 복분자 와인의 항산화 활성

신선 복분자 열매 EtOH 추출물과 복분자 와인 여과액을 대상으로 그들 각각에 함유되어 있는 항산화 화합물들의 존재 경향을 TLC-DPPH법을 이용하여 비교·분석한 결과(결과 미제시), 흥미롭게도 원재료의 복분자 열매에 함유된 화합물과 복분자 와인 중에 함유된 화합물들의 TLC 거동에 현저한 차이가 관찰되었다. 즉 원재료 복분자 열매 추출물은  $R_f$  0.25 이하에서 대부분의 화합물이 검출되었으며,  $R_f$  0.25 이상에서는 거의 화합물의 존재가 확인되지 않았다. 반면 복분자 와인의 경우에는 원재료에서 관찰되었던 화합물들 대부분이 소실되었으며,  $R_f$  0.5 이상의 부분에서 강한 항산화 활성을 보이는 다양한 화합물들이 검출되었다. 뿐만 아니라  $R_f$  0.5 이하의 부분에서도 원재료 복분자 열매의 성분들과는 존재경향이 전혀 다른 다양한 항산화 화합물들의 존재가 시사되었다. 이것은 원재료에 함유되어 있는 화합물들이 와인 제조 과정 중 발효 및 숙성을 거치는 동안 변화되었기 때문일 것으로 추측 되었으며, 그 변화는 발효에 관여하는 효모의 작용 또는 발효 및 숙성 과정동안 산화·환원 등에 의한 화학적 반응이 작용하였기 때문일 것으로 사료되었다.

이 결과로부터 복분자 와인에 함유되어 있는 화합물들은 원재료에 함유되어 있는 그것들과는 큰 차이가 있음이 확인되었지만, 복분자 와인에 의해 발현 되어지는 생리활성은 원재료 복분자에 의한 생리활성과는 큰 차이를 보일 가능성이 높을 것으로 판단되었다. 이에 복분자 와인에 함유되어있는 생리활성 화합물들을 분자 수준에서 구명할 필요가 있다고 판단되어 항산화 활성 화합물에 초점을 맞추어 정제를 행하였다.

### 복분자 와인 용매분획물들의 항산화 활성

복분자 와인 11 L(복분자 열매 생체중량 15.7 kg 상당량)를 여과하여 얻어진 농축액(928.3 g)을 용매분획하여 *n*-hexane층 0.2 g, EtOAc층 56.2 g, *n*-BuOH층 138.5 g 및 H<sub>2</sub>O층 731.5 g을 각각 얻었다. 이들을 TLC-DPPH법에 의해 각 층에 함유된 항산화활성 화합물들의 존재 경향을 비교한 결과(결과 미제시), *n*-hexane층의 경우  $R_f$  0.85와 0.95에 2종의 화합물이 검출되었으며, H<sub>2</sub>O층의 경우  $R_f$  0.2 이하의 부분에 tailing을 보인 물질 군이 검출되었다. 그 두 층으로부터 검출된 화합물들은 EtOAc층과 BuOH층에 존재하는 화합물들에 비해 항산화 활성이 상대적으로 낮음을 알 수 있었다. 즉 EtOAc층으로부터는 강한 항산화활성을 나타내는 다양한 화합물들의 존재( $R_f$  0-0.9)가 확인되었으며, 그들의 함량 또한 다른 획분에 비해 월등히 높은 것으로 판단되었다. 그리고 BuOH층의 항산화활성은 EtOAc층에는 미치지 못하나 EtOAc층에 존재하는 화합물들과는 다른 종류의 화합물로 판단되어지는 spot들( $R_f$

0-0.75)이 검출되었다. 본 결과로부터 복분자 와인 중에 함유되어 있는 항산화 화합물은 BuOH층에도 적지 않은 양의 항산화 화합물이 존재하나 EtOAc층에 함유된 화합물들이 복분자 와인의 항산화활성에 기여도가 가장 높은 것으로 판단되었다. 그래서 본 연구에서는 EtOAc층을 대상으로 그에 함유된 항산화 화합물들을 단리·정제하고 그 구조를 구명하기로 하였다.

### 활성물질의 단리 및 정제

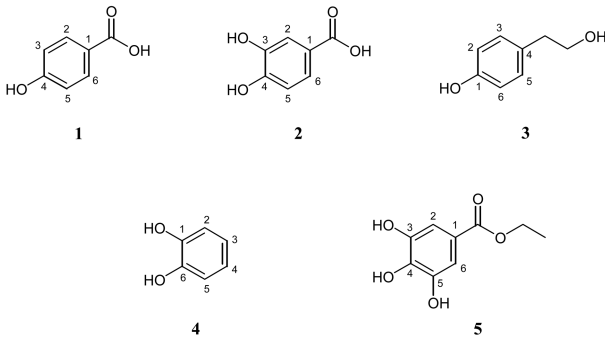
EtOAc층(56.2 g)의 약 1/3 상당량(20 g)을 대상으로 silica gel column chromatography (4×71.5 cm)를 행한 후, 얻어진 각 획분을 TLC-DPPH법에 의해 항산화 화합물의 존재 경향을 검토한 결과, 획분 A-4-10(CHCl<sub>3</sub>/EtOAc = 80:20-20:80, v/v)에서 대부분의 항산화 활성화합물이 용출됨을 확인하였다. 그 중 상대적으로 함량이 높은 획분 A-6(CHCl<sub>3</sub>/EtOAc = 60:40, v/v, 2.3 g)을 대상으로 용매계를 달리하여 silica gel column chromatography(1.5×25 cm)를 재차 행하였다. 그 결과 획분 B-3(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9:1, v/v)에서 가장 현저한 항산화 활성이 관찰되었다. 그래서 그 활성 획분 B-3(1.8 g)을 더욱 정제하기 위해 Sephadex LH-20 column chromatography(MeOH)를 행한 후, 얻어진 각 획분을 TLC-DPPH법에 의해 분석을 행한 결과,  $V_e/V_t$  0.45-0.61(C-3, 1.0 g) 및  $V_e/V_t$  0.62-0.72(C-4, 3.0 mg)의 용출획분에서 각각 활성 화합물의 존재가 확인되었다. 그 중 보다 함량이 많은 획분 C-3은 ODS(octadecylsilane) open column chromatography를, 그리고 C-4는 HPLC에 의하여 각각 정제를 행하였다.

먼저 획분 C-4(3.0 mg)를 µBondapak C<sub>18</sub> column(20% MeOH)으로 정제하여 얻어진 활성 획분(D-3,  $t_R$  8.1 min, 2.0 mg)을 ODS 80Ts column (20% MeOH)을 이용하여 재정제를 행한 결과, 화합물 1( $t_R$  15.2 min, 0.1 mg)을 단리하였다.

이어 활성획분 C-3(1.0 g)을 대상으로 ODS open column chromatography를 행한 결과, E-12(20% MeOH용출 획분, 1.8 mg)와 15(20-40% MeOH용출 획분, 2.3 mg)의 각 획분에서 항산화 화합물들의 존재가 확인되었다. 획분 E-12(1.8 mg)를 µBondapak C<sub>18</sub> column에 의한 HPLC(20% MeOH)를 행하여 3종의 주요 peak( $t_R$  9.4 min(F-2),  $t_R$  12.4 min(F-4),  $t_R$  20.9 min(F-6))를 각각 분취하였다. 이들 세 활성 획분을 ODS 80Ts column (20% MeOH, pH 2.65)을 이용한 동일조건에서 각각 재정제를 행하여 획분 F-2로부터 화합물 2( $t_R$  9.1 min, 0.3 mg)를, 획분 F-4로부터 화합물 3( $t_R$  13.5 min, 0.6 mg)을, 그리고 획분 F-6으로부터 화합물 4( $t_R$  30.7 min, 0.3 mg)를 각각 단리하였다. 마지막으로 활성 획분 E-15(2.3 mg)를 ODS 80Ts column(20% MeOH)을 이용한 HPLC를 행하여 화합물 5( $t_R$  15.6 min, 0.6 mg)를 단리하였다.

### 활성물질의 구조해석

화합물 1의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Table 1)으로부터 δ 7.88 및 6.82에서 각각 2H분의 AA'BB'계의 doublet signal들이 관찰되었다. 이들 signal은 para 치환체의 aromatic 탄소에 결합된 proton 유래의 signal로 추측되어 화합물 1은 천연에 널리 존재하는 4-hydroxybenzoic acid 또는 그 유사 화합물일 가능성이 시사되었다. 그래서 시판품의 4-hydroxybenzoic acid를 동일 조건에서 <sup>1</sup>H-NMR 분석(결과 미제시)을 행하여 화합물 1의 spectrum과 비교한 결과, 상호간의 일치성이 확인되었다. 또 화합물 1을 TMS 유도체화한 후 GC-MS 분석을 행한 결과,  $m/z$  (int., %) 73(TMS<sup>+</sup>, 100), 91((M-(COO-TMS) - TMS)<sup>+</sup>, 9.3), 105((M-(OTMS)<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 2.5), 165((M-(COOTMS))<sup>+</sup>, 0.8), 193((M-(CH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, 49.5), 207((M - TMS)<sup>+</sup>,



**Fig. 2. Structure of compounds isolated from EtOAc layer of Korean black raspberry wine.**

5.1], 223((M - (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 79.9), 267((M - CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 97.2), 282(M<sup>+</sup>, 21.2) 등의 TMS화된 4-hydroxybenzoic acid에 귀속되어지는 특징적인 fragment ion들이 검출되어 화합물 1을 4-hydroxybenzoic acid(Fig. 2)로 동정하였다.

화합물 2의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Table 1) 상에서 δ 6.79의 d form (1H, d, J = 8.5 Hz), δ 7.42의 dd form의 1H(J = 8.5, 2.5 Hz) 및 δ 7.43의 br. s form의 1H signal들이 각각 관찰되었던 것으로부터 방향족환의 1, 3 및 4위에 치환체가 결합된 3,4-dihydroxybenzoic acid일 가능성이 시사되었다. 그리고 화합물 2를 TMS 유도체화 후 GC-MS 분석을 행한 결과, m/z(int., %) 73 (TMS<sup>+</sup>, 100), 165((M - (-OTMS)<sub>2</sub> - (-C=O))<sup>+</sup>, 4.8), 193((M - (-OTMS)<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 42.6), 223((M - (TMS)<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 4.9), 281((M - (CH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, 1.8), 311((M - (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 7.5), 355((M - CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 9.7), 370(M<sup>+</sup>, 20.1)의 fragment ion들이 검출되어 화합물 2를 3,4-dihydroxy-benzoic acid (Fig. 2)로 동정하였다.

화합물 3의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Table 1) 상에서 δ 7.03과 6.70에 AA'BB'계의 전형적인 방향족 sp<sup>2</sup> carbon proton 유래의 doublet signals(2H, br. d, J = 8.3 Hz)가 관찰되었다. 그 signal들의 경향이 화합물 1의 경우와 유사하였으나 그들 signal들의 chemical shift가 다르게 검출되었던 것으로부터 화합물 1과는 다른 관능기가 para 치환된 방향족 화합물일 가능성이 시사되었다. 그리고 δ 3.68과 δ 2.71에서 검출된 각각 2H의 2중 triplet signals(J = 7.0 Hz)의 존재로부터 말단에 alcohol기가 결합된 ethyl 구조가 존재함이 시사되어 본 화합물은 4-(2-hydroxyethyl)-phenol 일 가능성이 강하게 시사되었다. 이 화합물을 TMS화하여 GC-MS 분석을 행한 결과, m/z(int., %) 73 (TMS<sup>+</sup>, 100), 103((M - (-OTMS)<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 19.3), 117((M - (-Ph-OTMS))<sup>+</sup>, 1.1), 149((M - (-OTMS) - (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 4.3), 179((M - (-CH<sub>2</sub>-OTMS))<sup>+</sup>, 86.5), 193((M - (-OTMS))<sup>+</sup>, 6.8), 209 ((M - TMS)<sup>+</sup>, 0.3), 235((M - (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 0.2), 252((M - (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 0.1), 267((M - CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 11.2), 282 (M<sup>+</sup>, 16.1)의 4-(2-hydroxyethyl)-phenol에 귀속되어지는 fragment ion들이 검출되

어 화합물 3을 4-(2-hydroxyethyl)-phenol(tyrosol, Fig. 2)로 동정하였다.

화합물 4의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Table 1)으로부터 δ 6.75와 6.65에 동일한 유형의 multiplet signal 한 쌍만이 검출되었다. 이 signal들은 방향족환에 동일한 관능기가 ortho 치환된 화합물의 전형적인 pattern이라 판단되어 catechol일 가능성이 시사되었다. 그래서 시판품의 catechol을 동일조건에서 <sup>1</sup>H-NMR을 분석(결과 미제시)하고, 그 spectrum을 화합물 4의 그것과 비교한 결과, 그들 spectra가 일치함이 확인되어 화합물 4를 pyrocatechol(Fig. 2)로 동정하였다.

화합물 5의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Table 1) 상에서 δ 7.04에 2H의 broad singlet signal에 더하여 carboxyl group에 ester 결합된 methylene carbon proton 유래로 추측되어지는 2H의 quartet signal (δ, 4.27, J = 7.0 Hz) 및 δ 1.34에 말단의 methyl기 유래로 판단되는 3H의 triplet signal(J = 7.0 Hz)이 관찰되었던 것으로부터 ethyl group이 ester화 되어진 4치환체의 방향족 화합물일 가능성이 강하게 시사되었다. 즉 본 화합물은 방향족환의 meta 위에 등가의 proton이 존재하는 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester로 추정되었다. 또 화합물 5를 TMS화하여 GC-MS 분석한 결과, m/z(int., %) 73 (TMS<sup>+</sup>, 100), 237((M - (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) - (TMS)<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 6.3), 267 ((M - (TMS)<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, 1.2), 281((M - (-OTMS) - (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) - (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 62.5), 311((M - (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) - TMS)<sup>+</sup>, 7.0), 369((M - (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 5.4), 399((M - CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 3.2), 414(M<sup>+</sup>, 37.6) 등에서 TMS화된 추정 구조에 귀속되어지는 특징적인 fragment ion들이 검출되어 화합물 5를 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester(ethyl gallate, Fig. 2)로 동정하였다.

이상 5종의 phenolic 화합물들(Fig. 2)이 복분자 와인의 EtOAc 층으로부터 분리·동정되었다. 이들 중 화합물 1과 2는 복분자 열매로부터도 그 존재가 이미 보고(11)되어진 바 있어 그들은 원재료인 복분자 열매유래로 판단되어진다. 그러나 화합물 3-5는 복분자 열매로부터 그 존재가 보고되어진 바 없다. 그리고 분리 화합물 5종 모두 복분자 와인으로부터 그 존재가 확인된 것은 처음이다. 화합물 3은 포도 와인에 존재하는 성분 중의 하나이나 그 원료인 포도로부터는 검출되지 않는다는 보고가 있다(21). 즉 화합물 3은 포도의 발효과정에서 생성되었음을 의미하는 흥미로운 결과라 판단되어진다. 이 점을 고려하였을 때, 복분자 와인 중의 화합물 3 또한 발효과정동안에 생성되었을 가능성이 높다고 시사되어진다. 다양한 종의 딸기류를 대상으로 페놀성 화합물을 분석한 Mattila 등(5)과 Maeaettae-Riihinen 등(22)의 보고에 있어 pyrocatechol (화합물 4)은 검출되지 않았다. 그래서 화합물 4 또한 발효 생성물일 가능성이 높다고 시사되어진다. 그리고 Yoon (11) 등은 화합물 5의 부분구조를 갖는 gallic acid의 존재를 복분자 (*Rubus coreanus* Mig.)로부터 보고한 바 있다. 그리고 그 ethyl ester 형인 화합물 5가 포도 와인으로부터도 검출되어진 바 있다 (23). 그래서 본 화합물 5는 발효과정 중에 gallic acid에 ethanol

**Table 1. <sup>1</sup>H-NMR data (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS) of compounds isolated from EtOAc layer of Korean black raspberry wine**

Compound	δ <sub>H</sub> (mult., J)
1	7.88 (2H, 8.5 Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, 8.5 Hz, H-3, 5)
2	7.43 (1H, br. s, H-2), 7.42 (1H, dd, 8.5, 2.5 Hz, H-6), 6.79 (1H, d, 8.5 Hz, H-5)
3	7.03 (2H, br. d, 8.3 Hz, H-3, 5), 6.70 (2H, br. d, 8.3 Hz, H-2, 6), 3.68 (2H, t, 7.0 Hz, -CH <sub>2</sub> -OH), 2.71 (2H, t, 7.0 Hz, Ph-CH <sub>2</sub> -)
4	6.75 (2H, m, H-4, 5), 6.65 (2H, m, H-3, 6)
5	7.04 (2H, s, H-2, 6), 4.27 (2H, q, 7.0 Hz, -CH <sub>2</sub> -), 1.34 (3H, t, 7.0 Hz, -CH <sub>3</sub> )

1, 4-Hydroxybenzoic acid; 2, 3,4-dihydroxybenzoic acid; 3, 4-(2-hydroxyethyl)-phenol; 4, catechol; 5, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester.

이 ester화하여 형성되었을 가능성이 시사되어진다. 그러나 화합물 3-5가 복분자 와인으로부터 동정되어졌을지라도 현 단계에서 그들의 유래를 단정지을 수는 없다고 판단된다. 즉 원재료 복분자 열매에 처음부터 함유되어져 있었던 성분인지 발효과정 중에 새롭게 생성된 성분인지에 대해서는 추후의 상세한 검토가 필요한 사항이다. 그리고 화합물 1과 2의 경우에도 원재료에 함유되어져 있는 성분인지는 하나 발효과정 중에 타 화합물로부터 추가적으로 유도되어 그 함량에 변화가 초래되었을 가능성 또한 흥미의 대상이라 판단된다.

이와 같은 복분자 와인의 성분연구가 복분자 와인의 생리활성 평가 및 품질관리 등을 위한 chemical profile 작성에 추후 중요한 기초적 자료로 활용되어지길 기대한다.

## 요 약

복분자 와인은 복분자 열매를 발효·숙성시켜 제조하기 때문에 그들 양자 간의 성분에는 차이가 있을 것으로 추측되었다. 그러나 복분자 와인의 음용률이 높음에도 불구하고 복분자 와인 중에 함유된 성분들에 관한 체계적인 연구는 거의 전무한 실정이다. 그래서 먼저 복분자 와인 중에 함유되어 있는 성분들의 chemical profile의 검토를 위해 항산화 활성에 초점을 맞추어 화합물의 단리·구조해석에 착수하였다. 복분자 와인 11 L(신선 복분자 열매 15.7 kg 상당량)의 농축액(928.3 g)을 용매분획한 후 얻어진 EtOAc층(20 g/56.2 g)을 대상으로 각종 column chromatography 및 HPLC를 행하여 5종의 항산화 활성 화합물을 단리하였다. 그들을 대상으로 <sup>1</sup>H-NMR 분석 및 TMS 유도체화 후 GC-MS 분석을 행한 결과, 4-hydroxybenzoic acid(1, 0.1 mg), 3,4-dihydroxybenzoic acid(2, 0.3 mg), 4-(2-hydroxyethyl)-phenol(3, 0.6 mg), pyrocatechol(4, 0.3 mg), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester(5, 0.6 mg)로 동정하였다. 화합물 1과 2는 복분자 열매 중에 존재함이 보고되어 있으나 화합물 3-5는 복분자 열매로부터 그 존재가 보고되어진 바 없으며, 이들 5종의 화합물 모두가 복분자 와인으로부터 동정되어진 것 또한 처음이다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Park YS, Chang HG. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. J. Korean Soc. Agr. Chem. Biotechnol. 46: 367-375 (2003)
- Oriental Medicine Dictionary Compilation Committee. The Oriental Medicine Dictionary. Jounghdam Publishing Co., Seoul, Korea. p. 546 (2001)
- National Oriental Medicine College Herbology Professor's Co-Compilation Committee. The Herbology. Yeongrimsa, Seoul, Korea. pp. 630-631 (1991)
- Heo J. Dongyueobgam. Publications on oriental medicine written by J. Hoe in Chosun Dynasty (1613). Minjungseowon, Seoul, Korea. p. 1383 (1993)
- Mattila P, Hellstrom J, Torronen R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. J. Agr. Food Chem. 54: 7193-7199 (2006)
- Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, van Buren L, Wagner E, Wiseman S, van De Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. Free Rad. Res. 36: 217-233 (2002)
- Lee YA, Lee MW. Tannins from *Rubus coreanus*. Korean J. Pharmacogn. 26: 27-30 (1995)
- Lee MW. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanus*. Yakhak Hoeji 39: 200-204 (1995)
- Kim MS, Pang GC, Lee MW. Flavonoids from the leaves of *Rubus coreanus*. Yakhak Hoeji 41: 1-6 (1997)
- Yoon I, Wee JH, Moon JH, Ahn TH, Park KH. Isolation and Identification of quercetin with antioxidative activity from the fruits of *Rubus coreanus* Miquel. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 499-502 (2003)
- Yoon I, Cho JY, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH, Park KH. Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanus* fruit. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 898-904 (2002)
- Pang GC, Kim MS, Lee MW. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanus*. Korean J. Pharmacogn. 27: 366-370 (1996)
- Yang SW, Ho JN, Lee YH, Shin DH, Hong BS, Cho HY. Isolation and characterization of *Helicobacter pylori* urease inhibitor from *Rubus coreanus* Miquel. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 769-777 (2004)
- Kim JH, Lee SY. A comparative study on effect of black raspberries. Kor. J. Herb. 6: 3-12 (1991)
- Kim BS, Park YK, Kang BS. The effect of *Rubi fructus* on the ovulation and ovary in rats. Kor. J. Herb. 16: 139-152 (2001)
- Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 1780-1783 (1994)
- Cho JY, Moon JH, Seong KY, Park KH. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and *trans* 4-hydroxybenzoic acid isolated and identified from rice hull. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 2273-2276 (1998)
- Lu Y, Foo LY. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. Food Chem. 59: 187-194 (1997)
- Yim CK, Moon JH, Park KH. Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid, which exhibits antimicrobial activity, from fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1386-1391 (1999)
- Park KH, Park JD, Hyun KH, Nakayama M, 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. Biotechnol. Biochem. 58: 2241-2243 (1994)
- Ribereau-Gayon P. Phenolic compounds of grapes and wine. I. Phenolic acids. Ann. Physiol. Veg. 6: 119-139 (1964)
- Maeaeetae-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Toerrienen, AR. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae). J. Agr. Food Chem. 52: 6178-6187 (2004)
- Hernandez T, Estrella I, Perez-Gordo M, Alegria EG, Tenorio C, Ruiz-Larrea F, Moreno-Arribas MV. Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. J. Agr. Food Chem. 55: 5260-5266 (2007)