

다공성 합성흡착제를 이용한 복분자 딸기(*Rubus coreanus*) 농축액의 항산화 효과

최세진¹ · 이연실² · 김진규³ · 정차권¹ · 강일준^{1,2} · 임순성^{1,2,3*}

¹한림대학교 식품영양학과, ²한림대학교 식의약품 효능평가 및 기능성 소재개발센터, ³한림대학교 천연의약연구소

Antioxidant Activity of Ripe Fruit Components of *Rubus coreanus*: Extraction Using Porous Polymer Resins

Se Jin Choi¹, Yeon Sil Lee², Jin Kyu Kim³, Cha-Kwon Chung¹, Il-Jun Kang^{1,2}, and Soon Sung Lim^{1,2,3*}

¹Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

²Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University

³Institute of Natural Medicine, Hallym University

Abstract This study was carried out to develop a method of removing unnecessary sugars and high-molecular weight soluble components from water extract by using various highly porous polymer resins: these resins are widely used as adsorbents for polyphenolic compounds. Each anthocyanin-rich fraction (ARF) that was eluted from column packed with 4 different resins (SEPABEADS SP207, 700, 850 and Diaion HP 20) was obtained from an aqueous extract of the ripe fruits of *Rubus coreanus*, which is well-known in Korea as “Bok-bun-ja”. Among the above mentioned resins, Diaion HP20 had the highest efficacy and provided maximum yield of the ARF. The ARF eluted from the column packed with HP 20 exhibited the strongest antioxidant activity *in vitro*. Bioactive phytochemicals extracted from *Rubus coreanus* were investigated using the on-line HPLC-ABTS⁺ system, and the resulting 6 peaks were identified as radical-scavenging components. By using liquid chromatography-mass spectrometry, 5 peaks were obtained, and these were identified as cyanidin-3-sambubioside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-xylosylrutinoside, cyanidin-3-rutinoside and pelargonidin-3-rutinoside. These results indicate that the use of appropriate porous resin (Diaion HP 20) leads to an increase in the yield of bioactive components and enhancement of their biological properties.

Keywords: *Rubus coreanus*, highly porous polymer resin, anthocyanin, antioxidant, on-line bioassay

서 론

복분자 딸기 *Rubus coreanus*는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽 활엽성 관목으로 한국 및 중국이 원산지인 식물이다. 복분자 딸기의 덜 익은 열매, 즉 미성숙 과실을 복분자라 하며 보간신, 명목, 이노제의 효능이 있고 정력감퇴, 유정, 빈뇨를 치료한다고 알려져 있다(1). *Rubus* 속 식물에 대한 연구로는 *R. chinchi* 잎에서 ellagic acid, β-sitosterol, diterpene 배당체들이 분리되었고, *R. microphyllus* 잎에서 quercetin, kaempferol, linalool, α-terpineol, α- 및 β-ionone, *R. idaeus*에서는 anthocyanin이 보고된 바 있다(2). *R. coreanus*의 성분연구에서는 잎으로부터 가수분해성 탄닌과 플라보노이드가, 열매로부터 sanguin H-4와 H-6가 분리 보고되었다(3,4). 복분자 딸기의 생리활성에 대한 연구로는 polyphenol에 의한 superoxide 제거작용과 xanthine oxidase 억제작용, 아질산염 소거능, SOD 유사활성, 항균활성, 항염증 작용 등이 있는 것으로 알려져 있다(5-7).

이러한 생리활성작용은 복분자 딸기의 anthocyanin 및 polyphenol 함량과 관련이 있으며 이 품종이 다른 딸기류에 비해 색이 진하여 anthocyanin 함량이 높다고 보고되어 있다(8).

과실류에는 식이성 섬유, 페놀성 성분과 같은 활성성분 외에도 상당량의 당분을 함유하고 있다. 과당소비의 증가는 내당능 장애, 고인슐린혈증, 고혈압, 인슐린내성과 관련된 대사성 장애에 중요한 기여인자로서 인식되고 있다(9,10). 이에 본 연구에서는 복분자 딸기의 polyphenol성분 특히, anthocyanin을 유효성분으로 보고 다공성 합성 흡착제를 사용하여 복분자 물 추출물 내 상당부분을 차지하고 있는 과당 및 고분자성 다당체를 효과적으로 제거할 수 있는 방법을 제안하고자 한다. 또한, anthocyanin-rich fraction과 기존 물 추출물간의 항산화능을 *in vitro* 상에서 비교함과 동시에 HPLC-ABTS⁺ 실시간 항산화 활성시스템을 접목하여 활성 피크를 선별하고 LC-MS/MS를 통한 활성물질 동정을 시도하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용된 복분자는 2008년 강원도 횡성에서 직접 채취한 후 냉동 보관하여 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 Folin-Ciocalteu reagent, Na₂CO₃, gallate, tannic acid, (+)-catechin,

*Corresponding author: Soon Sung Lim, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon, Gangwon 200-702, Korea

Tel: 82-33-248-2133

Fax: 82-33-251-0663

E-mail: limss@hallym.ac.kr

Received October 25, 2010; revised January 11, 2011;

accepted January 11, 2011

sodium nitrite, sodium hydroxide, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbate, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 추출 및 분석에 사용되는 methanol, ethanol은 HPLC용으로 Fisher Scientific(Fair Lawn, NJ, USA), formic acid는 AppliChem GmbH(Darmstadt, Germany)으로부터 HPLC급으로 구입하여 사용하였다. 당 및 고분자성 다당체 제거를 위한 합성흡착제 HP-20, SP-850, SP-700, SP-207은 Yiryong Chemical®(Bucheon, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

실험 재료 추출

원숙 복분자 열매 1 kg에 증류수 10 L를 가하여 완전히 혼합한 다음 감압여과 후 원심분리(452×g, 30 min)를 통해 얻은 상등액을 동결건조하여 물 추출물 분말시료 250 g(25%)을 얻었다. 복분자 물 추출물 분말시료를 2 g/10 mL이 되도록 용해한 다음 여과하여 준비한 후, 4종류의 합성흡착제(HP 20, SP 850, SP 700, SP 207)를 각각 3×30 cm의 컬럼에 충전하고 methanol로 충분히 세척한 다음 증류수로 안정화시켰다. 시료 용액을 각 컬럼에 흡착시켜 증류수(600 mL)로 당 성분 및 기타 고분자성 물질을 충분히 제거한 다음 흡착되어 있던 물질들을 ethanol(1.2 L)로 용출하였다. 용출물들은 감압농축(Büchi Rotavapor R-144, Donau, Switzerland) 및 동결건조과정을 거쳐 anthocyanin-rich fraction(ARF) 즉, HP20-ARF, SP-207-ARF, SP-700-ARF, SP-850-ARF을 얻었으며 각각의 수율(%)을 계산하였다.

Total polyphenol 함량 측정

총 폴리페놀의 함량은 Folin-Ciocalteu법을 사용해 측정하였다(11,12). 건조 시료 10 mg을 증류수 1 mL에 녹이고 일정농도로 희석하여 측정에 이용하였다. 시료 0.25 mL에 Folin-Ciocalteu reagent를 0.75 mL 가하여 5분간 실온에 방치시킨다. 그 후 7.5% Na₂CO₃을 2.0 mL 첨가하고 증류수 7 mL를 첨가해 최종 volume 10 mL을 맞춘 다음 암실에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 ELISA reader(EL 800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)기를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로 gallate, tannic acid, (+)-catechin을 사용했으며, 각 표준시약의 농도를 달리하여 조제한 후 표준검량곡선을 작성하였다.

Total flavonoid 함량 측정

총 플라보노이드의 함량은 colorimetric법(13)을 사용해 측정하였다. 일정 농도의 시료 1 mL에 증류수 4 mL를 첨가하여 희석하고 5% NaNO₂ 0.3 mL를 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 10% AlCl₃ 0.3 mL를 넣어 6분간 실온에서 반응시킨 뒤 1 M NaOH 2 mL를 넣고 증류수 2.4 mL를 가하여 완전히 혼합하여 반응시킨 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로 (+)-catechin을 사용했으며, 표준시약의 농도를 달리하여 조제한 후 표준검량 곡선을 작성하였다.

전자공여능(Electron donating ability) 측정

전자공여능 측정은 DPPH에 대한 수소공여 효과를 측정하여 전자공여능을 나타내었다. 일정 농도로 희석된 시료에 DPPH 용액(dissolved in 99% ethanol)을 가한 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 50% 흡광도 감소를 나타내는 시료의 농도(IC₅₀)로 표시하였다(14).

Photochemiluminescence(PCL)법에 의한 항산화측정

복분자 물 추출물과 4종의 ARF 시료에 대한 항산화능을 photochemiluminescence(PCL)법으로 비교 측정하였다(15). 이는 photosensitizer의 optical excitation에 의해 생성된 superoxide anion radical의 소거효과를 측정하는 법으로서 Photochem(Aanalytik Jena AG, Jena, Germany)장비를 이용하였다. 실험에 사용되는 luminol은 photosensitizer 및 oxygen radical detection reagent로서 작용하였다. 적당한 농도로 희석한 시료와 sample solvent, reaction buffer, luminol solution을 순서대로 첨가하고 vortex로 잘 혼합한 다음 3분간 반응을 모니터링 한 결과를 나타내었다. 즉, lag time(lag-lag(0))을 표준검량 비교물질로 사용되는 ascorbate의 lag time과 비교하여 시료의 superoxide 라디칼 소거능을 ascorbate에 상응하는 소거농도로 자동 산출되어 표시하였다.

실시간 HPLC-ABTS** 항산화 활성 분석

실시간 활성 측정법은 Koleva의 방법(16)을 참조하여 Thermo Electron Spectra HPLC system과 pinnacle pump(Pickering Lab, LCTech, Dorpen, Germany)를 사용하였다. 분석컬럼은 Agilent ZORBAX SB-C18(3.5 μm, 4.6×150 mm i.d.) flow rate 0.8 mL/min, 컬럼 오븐온도 30°C, 이동상 5% formic acid(A)와 MeOH(B)를 사용하여 40분간 gradient(5% B→100% B)로 분석하였고 UV 520 nm에서 검출하여 분리된 크로마토그램을 얻었다. ABTS** 용액은 총 reactor volume이 1.4 mL인 coil이 장착된 pinnacle pump를 통해 0.3 mL/min 유속으로 공급되어 컬럼으로부터 분리되어 나오는 용출물과 실시간으로 반응하여 ABTS 라디칼에 대한 소거능을 가질 경우 UV 735 nm에서 negative peak을 형성하게 되고 크로마토그램상으로 확인할 수 있었다.

LC-MS 분석

LC-MS분석은 LCQ Advantage Max system(ThermoQuest, San Jose, CA, USA)을 사용하였으며 HPLC 분석 조건은 실시간 HPLC-ABTS** 항산화 활성 분석과 동일하였다. Mass 분석 시 이온화 방식은 electrospray ionization source(ESI)의 positive mode를 사용하였으며, capillary temperature는 250°C, spray voltage는 4.8 kV, capillary voltage는 5.0 V에서 사용하였고, Ion Trap을 통해 MS/MS를 실시하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였고, mean±SEM으로 나타내었다.

결과 및 고찰

합성흡착제별 추출 수율

과일 및 야채에는 비타민, 무기질, 섬유소 및 polyphenol성 항산화물질이 풍부한 반면 상당량의 과당을 포함한 당분, 색소 등이 함유되어 있다(17). 따라서, 경제적이면서 효과적으로 과당을 포함한 기타 고분자성 수용성 물질을 제거하기 위한 시도로 합성흡착제를 이용하였다. 합성흡착제는 교환기 없는 고분자 중합체로서 다공성이 뛰어나고 세공 비표면적이 크므로 vitamin류, 향생물질, steroid계, enzyme 등 각종 생리활성물질의 흡착, 분리, 정제에 주로 사용되고 있다(18). 또한 당액 탈색, 지방산 흡착, phenol 제거, 각종 향료성분, 흡착, 탈색, 정제 등 다양한 용도로 식품 및 의약품에 사용되고 있다. 특히, SEPABEADS SP850는 styrene과 divinyl benzene의 공중합체의 high porous type 합성흡착제(synthetic adsorbent)이며 균일한 세공(細孔)크기 분포와 매우 큰 비표

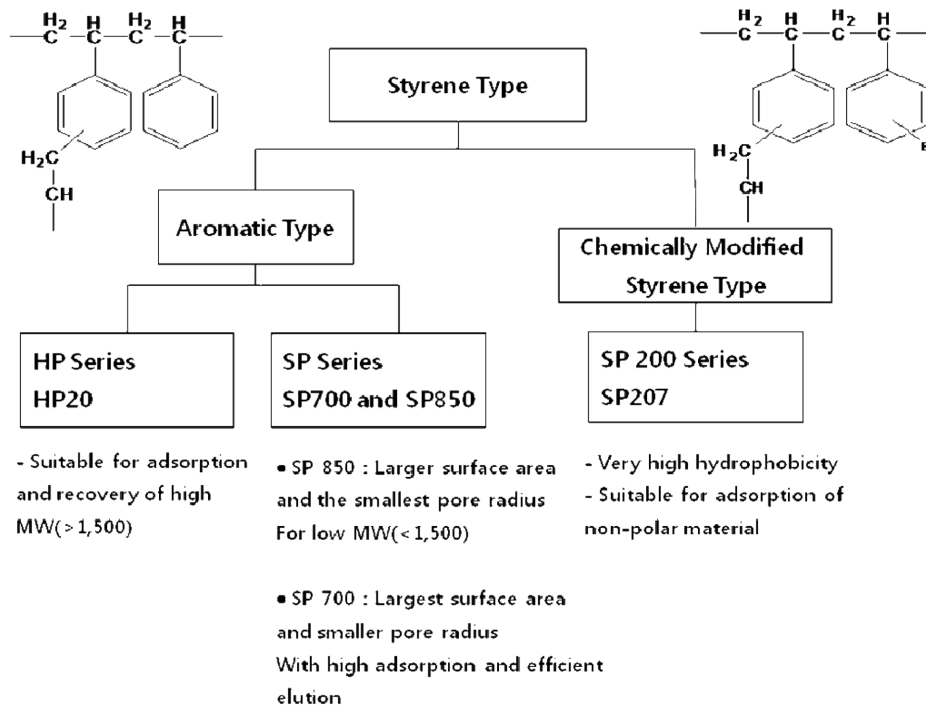


Fig. 1. Properties and application of synthetic adsorbent (<http://www.ixresin.com>).

Table 1. The yields of anthocyanin-rich fraction (ARF) obtained from different synthetic adsorption resins

Samples	Yield (%)
SP 207-ARF ¹⁾	3.97±0.97
SP 700-ARF	5.02±0.73
SP 850-ARF	2.41±1.02
HP 20-ARF	5.54±1.11

¹⁾Anthocyanin-rich fractions of the ripe fruits of *Rubus coreanus* by using highly porous polymer resins

면적(surface area)을 가지고 있으며 세공반경이 매우 작다(Fig. 1). 따라서 작은 분자 즉 분자량 <1,500 Da의 흡착을 선택적으로 할 수 있으며 흡착 능력이 우수하다. 우리는 물 추출물을 대상으로 4개의 합성흡착제를 이용한 컬럼을 실시하였고, 그 수율 결과를 Table 1에 나타내었다.

물 추출물 2g당 SP 850는 48.13 mg(2.41%), SP 207은 79.39 mg(3.97%), SP 700은 100.36 mg(5.02%), HP 20은 110.80 mg(5.54%)로 나타나 복분자의 경우는 HP 20-ARF가 가장 수율이 높은 흡착제임을 알 수 있었다.

합성흡착제에 의한 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량의 농축효과

페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며 플라보노이드와 탄닌이 주성분이다. 이들은 phenolic hydroxyl(OH)기를 갖기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(19).

본 실험에서는 물 추출물과 4종의 ARF에 존재하는 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 측정하여 비교하였다. 총 폴리페놀에 대한 표준물질로는 gallate/tannic acid/catechin 3종을, 총 플라보노이드에 대한 표준물질로는 catechin을 사용하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 3종의 표준물질에 따라 페놀 함량 차이가 뚜렷하게 나타났으며 가장 많이 이용되고 있는 catechin을 기준으로 했을 때 가장 높은 폴리페놀 함량이 산출되었으며 다음으로 tannic acid, gallate 순서의 경향을 보였다. 하지만, 3종의 표준물질 모두에서 4종의 ARF는 물 추출물에 비해 10-20배 가량의 농축효과가 나타났으며, 그 중 SP 850-ARF에서 가장 효과적으로 농축되었음을 확인하였다.

그 다음 총 플라보노이드 함량은 Table 2에서 보는 바와 같이

Table 2. The total polyphenol and total flavonoid contents from ARC and ARFs (mg/g)

	Standards	ARC ¹⁾	ARF ²⁾			
			SP 207	SP 700	SP 850	HP 20
Total polyphenol	Gallate	7.38±0.62 ³⁾	71.69±2.15	85.23±7.08	95.69±3.39	82.15±4.00
	Tannic acid	10.56±0.70	83.64±2.45	99.02±8.04	110.91±3.85	95.52±4.54
	(+)-Catechin	11.71±0.98	113.66±3.42	135.12±11.22	151.71±5.37	130.24±6.34
Total flavonoid	(+)-Catechin	30.00±10.00	270.00±10.00	310.00±10.00	370.00±20.00	320.00±4.00

¹⁾Aqueous extract of the ripe fruits of *Rubus coreanus*

²⁾Anthocyanin-rich fractions of aqueous extract of the ripe fruits of *Rubus coreanus* by using highly porous polymer resins

³⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

ARC의 플라보노이드 함량이 30±10 mg/g으로 가장 낮았으며, SP 850-ARF가 370±20으로 가장 높음을 알 수 있었다. 이는 ARC와 비교하여 SP 850-ARF의 플라보노이드 함량이 12.33배 농축되었음을 알 수 있었다. 이처럼 SP 850-ARF에서 폴리페놀과 플라보노이드가 가장 효과적으로 농축되었음을 알 수 있었다.

합성흡착제에 의한 농축에 따른 전자공여능 증가효과

물 추출물과 4종의 흡착제 ARF에 대한 DPPH 라디칼 소거능을 비교하였으며 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 물 추출물에서는 IC₅₀ 농도가 406 µg/mL인 반면 SP 207, SP 700, SP 850, HP 20에서는 각각 27, 31, 20, 16 µg/mL로 나타나 합성흡착제에 따른 라디칼 소거능력에는 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 물 추출물과 비교한 경우 각각 15.04배(SP 207), 13.10배(SP 700), 20.3배(SP 850), 25.36배(HP 20) 높은 라디칼 소거효과를 나타내었다. 이 중에서 HP 20이 가장 우수한 라디칼 소거능을 갖는 흡착제임을 알 수 있었다.

합성흡착제에 의한 농축에 따른 항산화능 증가효과(화학발광법)

화학발광에 의한 항산화 활성연구는 최근 시도되는 기술로 실험에 사용된 photochem 장비는 시료의 극성에 따라 수용성과 지용성으로 구분되어 있으며 수용성의 경우 ascorbate를 표준물질로 하여 시료 내 라디칼 소거능을 ascorbate에 상응하는 농도로 산출하여 시료간 산화능력을 비교 평가하는 방법이다(20). Table 3에 나타난 바와 같이 ARC 10 µg/mL에서 ascorbate 0.57 µg/mL에 상응한 효과를 보이는 반면 SP 207-ARF, SP 700-ARF, SP 850-ARF, HP 20-ARF에서는 1 µg/mL에서 각각 ascorbate 1.02, 0.70, 0.86, 1.13 µg/mL에 상응하는 라디칼 소거능을 나타내었다. 특히,

Table 3. Antioxidant activity of ARC and ARFs measured using photochemiluminescence (PCL) method and DPPH-radical scavenging method

Samples	Concentration (µg/mL)	Vitamin C equivalent antioxidant capacity (µM)	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)
ARC ¹⁾	1	-	406
	10	3.21 (0.57 µg/mL)	
	50	9.20 (1.62 µg/mL)	
SP 207-ARF ²⁾	1	5.78 (1.02 µg/mL)	27
SP 700-ARF	1	3.93 (0.70 µg/mL)	31
SP 850-ARF	1	4.88 (0.86 µg/mL)	20
HP 20-ARF	1	6.44 (1.13 µg/mL)	16

¹⁾Aqueous extract of the ripe fruits of *Rubus coreanus*
²⁾Anthocyanin-rich fractions of aqueous extract of the ripe fruits of *Rubus coreanus* by using highly porous polymer resins

HP 20-ARF에서 가장 우수한 superoxide 라디칼 소거능을 갖는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 당 및 기타 고분자성 성분 제거에 따라 복분자 내 유효성분의 농축에 기인한 활성 증가를 확인할 수 있었다.

실시간 HPLC-ABTS^{•+}에 의한 ARC, HP 20-ARF와 SP 850-ARF간의 항산화 물질 분석

물 추출물과 4종의 합성흡착제 ARF에 대한 라디칼 소거능을 통해 HP-20과 SP-850이 우수한 것으로 나타나 이들 분획물 내 물질 패턴과 항산화능을 갖는 peak를 빠른 시간에 확인하기 위

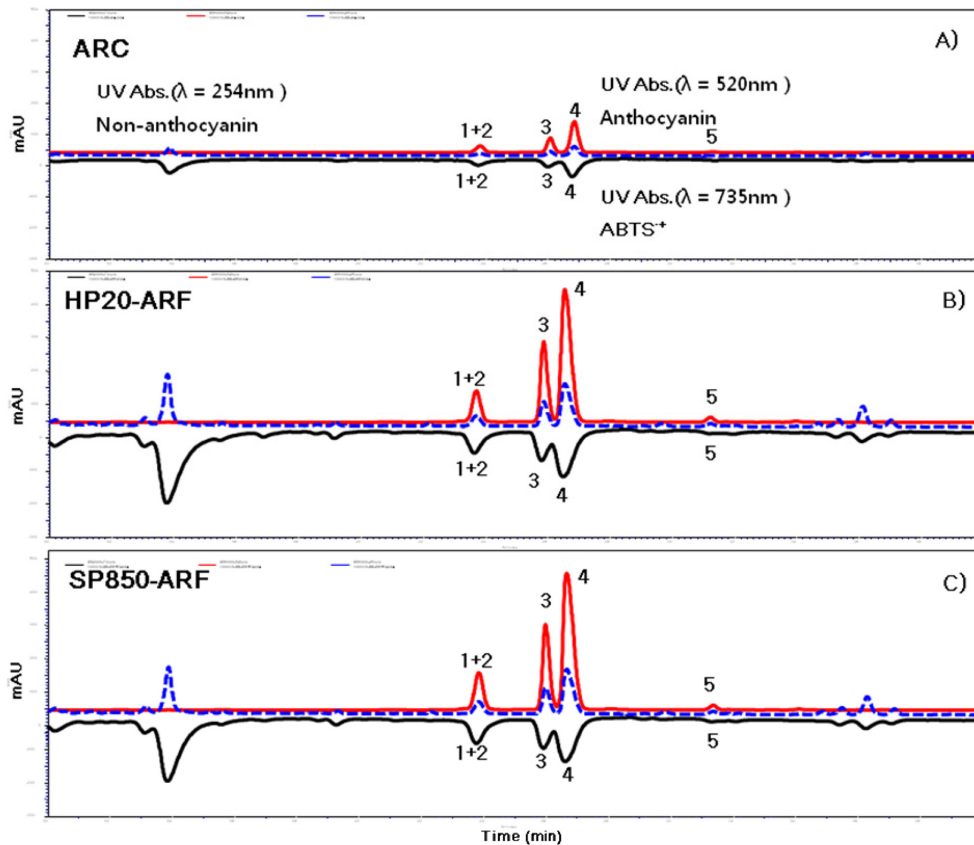


Fig. 2. HPLC-ABTS^{•+} on-line assessment of radical scavenging ARC (A), HP20-ARF (B) and SP850-ARF (C).

Table 4. Positive and negative area of the anthocyanin from ARC and ARFs (HP20 and SP850)

	Peak area ($\times 10^6$)									
	Non-Anthocyanin (RT. 13.85)		1+2		3		4		5	
	Po. ¹⁾	Ne.	Po. ²⁾	Ne. ³⁾	Po.	Ne.	Po.	Ne.	Po.	Ne.
ARC ⁴⁾	9.23	1.44	2.16	0.36	3.80	0.43	9.18	0.34	0.23	0.11
HP20-ARF ⁵⁾	31.84	7.80	10.29	1.50	21.75	2.12	47.65	4.81	1.72	0.40
HP20/ARC ⁶⁾	3.45	5.42	4.76	4.17	5.72	4.93	5.19	14.15	7.48	3.64
SP850-ARF	21.77	6.50	12.44	2.00	23.33	2.11	51.36	4.73	1.9	0.88
SP850/ARC	2.36	4.51	5.76	5.56	6.14	4.91	5.59	13.91	8.26	8.00

¹⁾Positive peak are detected polyphenol at 254 nm.

²⁾Positive peaks are detected anthocyanin at 520 nm.

³⁾Negative peaks are ABTS⁺ signal at 735 nm.

⁴⁾Aqueous extract of the ripe fruits of *Rubus coreanus*

⁵⁾Anthocyanin-rich fractions of aqueous extract of the ripe fruits of *Rubus coreanus* by using highly porous polymer resins

⁶⁾HP 20/ARC: Ratio of the each peaks area of ARC versus those of HP 20 or SP 850

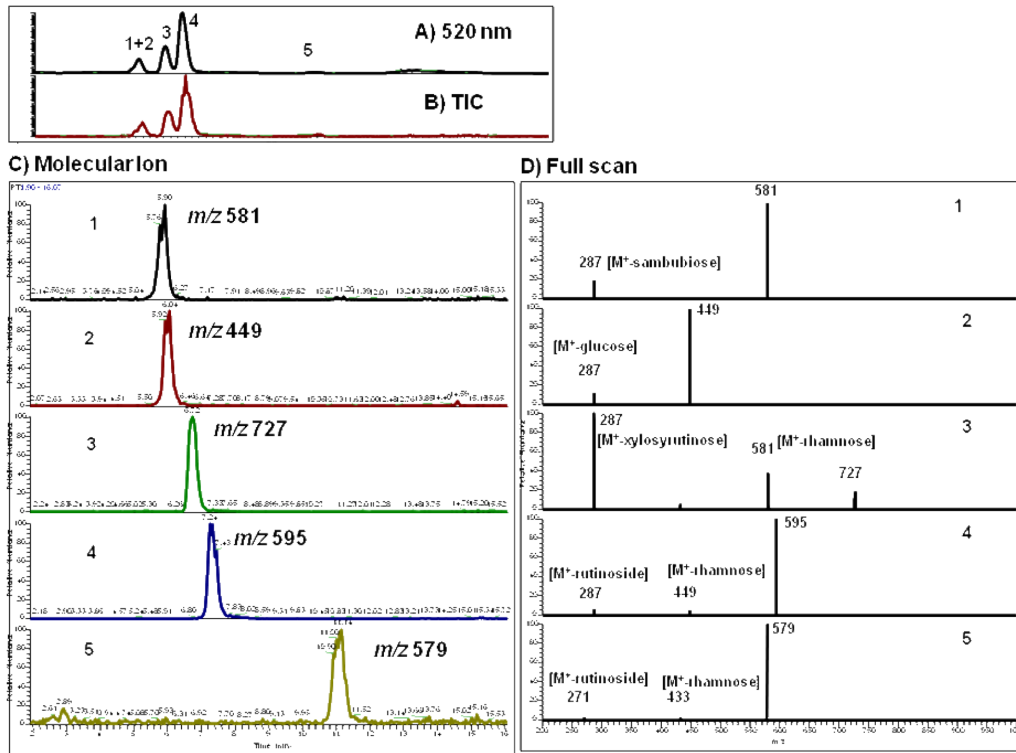


Fig. 3. HPLC-ESI-MS chromatograms of anthocyanins recorded at 520 nm (A), total ion chromatography (B), molecular ion selected ion plots of the five major anthocyanins detected 1-5 (C) and full scan mass spectra (D) in *Rubus coreanus* sample. peaks: 1. cyanidin-3-sambubioside; 2. cyanidin-3-glucoside; 3. cyanidin-3-xylosylrutinoside; 4. cyanidin-3-rutinoside; 5. pelargonidin-3-rutinoside.

해 실시간 HPLC 활성분석 시스템을 적용하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 HPLC 분석 column으로부터 분리된 물질은 1차적으로 UV 520 nm에서 검출되어 positive peak를 갖는 크로마토그램을 보여줌과 동시에 실시간 분리되어 나오는 용출물은 pinnacle pump를 통해 지속적으로 공급되는 안정한 ABTS 라디칼과 반응하여 라디칼 소거능을 갖는 경우 UV 735 nm에서 negative peak로 나타나게 된다. Anthocyanin 계열의 물질은 특정 UV 520 nm에서 흡광하는 성질을 가지고 있어 다른 계열의 물질과 구별할 수 있게 되며, 그 외 물질은 254 nm에서 확인할 수 있었다.

물 추출물과 HP 20-ARF와 SP 850-ARF에 대한 총 라디칼 소거능을 갖는 각각의 negative peak의 면적값을 비교하여 Table 4

에 나타내었다. UV 520 nm에서 5개의 뚜렷한 anthocyanin peak가 관찰되었으며 peak 1+2의 negative peak 면적값이 ARC가 0.36×10^6 인 반면에 HP 20-ARF(1.50×10^6), SP 850-ARF(2.00×10^6)와 비교하여 HP 20 흡착제에 의한 농축물은 약 4.17배, SP 850 흡착제에 의한 농축물은 5.56배 항산화효능이 증가하였으며, peak 3, 4, 5에 대해서는 HP 20-ARF에서는 각각 4.93, 14.15, 3.64배 증가하였으며, SP 850-ARF은 각각 4.91, 13.91, 8.00배 가량 농축됨을 알 수 있었다. 하지만 앞의 항산화활성 실험(Table 3)에서 SP 850-ARF보다 HP 20-ARF가 더 우수한 항산화능력을 갖는 것으로 나타난 이유는 anthocyanin이 아닌 항산화물질. 예를 들어 retention time 13.85 min에 나타나는 254 nm의 positive peak 등과

Table 5. Identification of the major anthocyanins detected in *Rubus coreanus*

Peak	Retention time (min)	Absorption wavelength (nm)	Absorption wavelength (nm)	MS/MS		Identity
				Molecular ion	Fragment ions ^{a)}	
1	6.91	279	516	581	287 (cy)	cyanidin-3-sambubioside
2	6.97	279	515	449	287 (cy)	cyanidin-3-glucoside
3	7.59	280	518	727	581(M ⁺ -rham), 287(cy)	cyanidin-3-xylosylrutinoside
4	7.84	274	511	595	449(M ⁺ -rham), 287(cy)	cyanidin-3-rutinoside
5	9.91	267	498	579	433(M ⁺ -rham), 271(pg)	pelargonidin-3-rutinoside

^{a)}cy, cyanidin; pg, pelargonidin; rham, rhamnose

같은 물질들이 HP 20-ARF에 더 효과적으로 농축된 것으로 판단된다.

LC/MS 분석에 의한 활성 화합물 구조 분석

복분자 물 추출물과 SP 850-ARF의 anthocyanin 성분을 확인하기 위하여 LC-MS 분석을 실시하였으며 그 결과는 Fig. 3에 나타났다. Ion source로 electrospray ionization을 사용하고 positive ion mode로 full scan 분석하여 5개의 주요 peak에 대한 [M+H]⁺ parent ion에 대한 분자량을 확인한 바, 각각 *m/z* 581, 449, 287, 595, 579로 나타났다. Peak 1의 경우 *m/z* 581을 MS/MS한 결과 cyanidin(*m/z* 287, [M-sambubios]) fragment ion이 관찰되었으며 기존 문헌정보, UV-vis spectrum, mass spectrometric fragment 패턴을 통해 cyanidin-3-sambubioside으로 동정하였다. Peak 2-5에서도 각각의 분자량에 대한 UV-vis pattern와 fragment ion을 비교하여 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-xylosylrutinoside, cyanidin-3-rutinoside, pelargonidin-3-rutinoside로 확인되었으며(Table 5) peak 1-4는 cyanidin(*m/z* 287)을 전구체로 하는 anthocyanin임을 알 수 있었다. 본 연구에서 관찰된 anthocyanin들은 복분자 딸기로부터 보고된 기존 문헌과 일치하는 것으로 확인되었다(21).

요 약

4종류의 다공성 합성흡착제(Sepabeads 207, 700, 850, Diaion HP 20)를 사용하여 *Rubus coreanus* 과실의 물 추출물로부터 과당 및 비polyphenol성분을 효과적으로 제거하여 DPPH라디칼 소거능 및 화학발광법을 이용한 superoxide 라디칼 소거능이 증가된 농축물을 효율적으로 얻을 수 있었다. 또한, 실시간 HPLC ABTS⁺ 활성 분석 시스템을 활용하여 6개의 항산화 능력을 갖는 활성피크를 확인할 수 있었으며 이들 대상으로 LC-MS/MS분석을 실시하여 5개의 anthocyanin인 cyanidin-3-sambubioside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-xylosylrutinoside, cyanidin-3-rutinoside, pelargonidin-3-rutinoside를 mass pattern 및 분자량 확인 과정을 통해 잠정적 화학구조 동정을 하였다. 수율과 항산화 효능을 고려해 볼 때, 4종의 합성흡착제 중에서 Diaion HP 20이 가장 우수한 결과를 나타내었다. 이처럼 적절한 합성흡착제의 선택으로 표적물질에 대한 polyphenol성 물질의 농축뿐만 아니라 생리학적 활성증대효과를 가져올 수 있어 적절한 합성흡착제의 선택은 식품 및 의약품의 정제 및 분리에 유용하게 활용될 수 있음이 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2008-314-F00075)에 의하여 연구되었음.

문 헌

- Bae GH. The Medicinal Plants of Korea. Kyohak Publishing Co., Ltd, Seoul, Korea. p. 231 (2000)
- Kim MS, Pang GC, Lee MW. Flavonoids from the leaves of *Rubus coreanus*. Yakhak Hoeji 41: 1-6 (1997)
- Kim MS, Pang KC, Lee MW. Tannins from the leaves of *Rubus coreanus*. Yakhak Hoeji 40: 666-669 (1996)
- Lee MW. Phenolic Compounds from the leaves of *Rubus coreanus*. Yakhak Hoeji 39: 200-204 (1995)
- Kim TG, Kang SY, Jung KK, Kang JH, Lee E, Han HM, Kim SH. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq., and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. Phytother. Res. 15: 718-720 (2001)
- Choi J, Lee KT, Ha J, Yun SY, Ko CD, Jung HJ, Park HJ. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. Biol. Pharm. Bull. 26: 1436-1441 (2003)
- Cha HS, Park MS, Park KM. Physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 409-415 (2001)
- Tulio AZ Jr, Reese RN, Wyzgoski FJ, Rinaldi PL, Fu R, Scheerens JC, Miller A. Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry. J. Agr. Food Chem. 56: 1880-1888 (2008)
- Levi B, Werman MJ. Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. J. Nutr. 128: 1442-1449 (1998)
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. Am. J. Clin. Nutr. 6: 911-922 (2002)
- Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophan determination in proteins. J. Biol. Chem. 27: 627-650 (1927)
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. Am. J. Enol. Viticult. 16: 144-158 (1965)
- Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J. Agr. Food Chem. 50: 3713-3717 (2002)
- Yoshida T, Mori K, Hatano T, Okumura T, Ushara L. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem. Pharm. Bull. 37: 1919-1923 (1989)
- Popov I, Lewin G. Antioxidative homeostasis: Characterization by means of chemiluminescent technique. Method. Enzymol. 300: 437-456 (1999)
- Koleva II, Niederländer HAG, Beek TAV. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. Anal. Chem. 73: 3373-3381 (2001)
- Cha HS, Youn AR, Park PJ, Choi HR, Kim BS. Comparison of physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel during maturation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36: 683-688 (2007)
- Li CF, Liang H, Yuan QP, Hou XD. Optimization of sulforaphane separation from broccoli seeds by macroporous resins. Separ. Sci. Technol. 43: 609-623 (2008)

19. Yoshizawa S, Hjoriuchi T, Fujuki H, Yoshida T, Okuda T. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother. Res.* 1: 44-47 (1987)
20. Apáti P, Szentmihályi K, Kristó SzT, Papp I, Vinkler P, Szoke É, Kéry Á. Herbal remedies of Solidago-correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. *J. Pharmaceut. Biomed.* 32: 1045-1053 (2002)
21. Tian Q, Giusti MM, Stoner GD, Schwartz SJ. Characterization of a new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 94: 465-468 (2006)