

복분자(*Rubus coreanus* Miquel) 와인의 ethyl acetate 획분으로부터 저분자 휘발성 화합물들의 분리 및 구조해석

조정용 · 김성자 · 이형재 · 김진영 · 임익재¹ · 강성구² · 박근형 · 문제학*
전남대학교 식품공학과 및 기능성식품연구센터, ¹(주)연수당, ²순천대학교 공동실험실습관

Isolation and Identification of Low Molecular Volatile Compounds from Ethyl Acetate Layer of Korean Black Raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) Wine

Jeong-Yong Cho, Seong Ja Kim, Hyoung Jae Lee, Jin Young Kim, Ik Jae Lym,¹
Seong-Koo Kang,² Keun-Hyung Park, and Jae-Hak Moon*

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

²Research Instrument Center, Sunchon National University

Abstract In the course of our investigation for chemical constituents in the ethyl acetate layer of Korean black raspberry wine, five compounds were isolated and purified by silica gel column chromatography and high-performance liquid chromatography. The isolated compounds were identified as ethyl succinate (1), vanillic acid (2), ethyl 3,4-dihydroxybenzoate (3), furan-2-ol (4), and 4-(4-hydroxyphenyl)butan-2(S)-ol (5) based on the spectroscopic data of electrospray ionization tandem mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The presence of 2 in Korean black raspberry has previously reported. However, 1 and 3-5 in Korean black raspberry and its wine were isolated for the first time.

Keywords: Korean black raspberry wine, *Rubus coreanus*, phenolic compounds, 4-(4-hydroxyphenyl)butan-2(S)-ol, furan-2-ol

서 론

복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 산딸기의 일종으로 5-6월에 흰색의 꽃이 피고, 7-8월에 반구형의 검붉은 열매를 맺는 다년생 식물로 우리나라의 황해도 이남 지방에서 자생 혹은 재배되고 있다(1). 한방에서는 그 열매를 강장제와 강정제로 사용해 왔으며(2,3), 최근 항돌연변이 활성(4), 항균 및 항산화 활성(5-7), Hepatitis B virus 억제(8) 및 *Helicobacter pylori* 생육 억제 효과(9) 등의 다양한 생리활성이 밝혀지고 있다. 복분자 열매에 존재하는 성분으로는 coreanoside F₁, suavissimoside, nigaichifoside F₁·F₂ 등을 비롯한 triterpenoids(10-13), gallotannin, ellagitannin, gallic acid, 2,3-(S)-ellagitannin-D-glucopyranoside, saguin H-4 및 H-6 등의 탄닌류(14-16), quercetin 등의 flavonoids(6), 그리고 phenolic acids(7)가 동정된 바 있다.

이처럼 복분자 열매에는 다양한 유용성분들이 존재하고 있음은 물론, 다양한 생리활성 또한 보고되고 있어 소비자에게 관심이 높아지게 되었다. 그래서 복분자 열매를 이용한 술(17), 유산균발효식품(18), 빵(19), 그리고 건면(20) 등의 다양한 응용식품

이 개발되어 판매되고 있다. 특히 복분자의 생산량 중 상당량이 복분자 와인의 제조에 이용되고 있는 실정이다. 복분자 와인은 발효와 숙성과정을 거치면서 그 원료인 복분자 열매에 함유된 성분들과는 다른 새로운 화합물들이 생성될 가능성이 높다고 판단되나 복분자주에 존재하는 성분 및 생리활성 평가에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다. 그래서 선행연구로 신선 복분자 EtOH 추출물과 복분자주 여과액을 대상으로 그들 각각에 함유되어 있는 화합물들의 존재 경향을 thin layer chromatography(TLC)로 분석을 행한 바 있다. 그 결과(21), TLC chromatogram 상에서 복분자 와인 추출물 중에 함유된 화합물들과 그 원재료인 복분자 열매 추출물에 함유된 화합물들에 있어 현저한 차이가 관찰되었다. 특히 복분자 와인의 용매분획물인 ethyl acetate(EtOAc)층에는 원료 그 자체에 함유된 성분들과는 다른 다양한 화합물들의 존재가 확인되었다. 그래서 이 EtOAc층을 다양한 column chromatography 및 HPLC로 정제하여 이미 선행연구를 통해 5종의 화합물을 분리하였으며, 그 화합물들은 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-(2-hydroxyethyl)-phenol, pyrocatechol, 그리고 ethyl gallate로 구조해석되어 이에 대한 결과를 보고한 바 있다(21). 또한 본 연구에서 복분자 와인의 EtOAc층에 함유되어 있는 화합물들에 대한 추가 분리 및 정제를 행하여 5종의 저분자 휘발성 성분들이 새롭게 분리·구조해석되었다.

이에 본 연구에서는 복분자 와인에 함유된 성분 구명에 대한 연구의 일환으로, 복분자 와인의 EtOAc층으로부터 추가적으로 분리된 5종의 화합물들의 분리 및 구조해석에 대한 결과를 보고하고자 한다.

*Corresponding author: Jae-Hak Moon, Department of Food Science & Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel: 82-62-530-2141
Fax: 82-62-530-2149
E-mail: nutrmoon@jnu.ac.kr
Received May 10, 2011; revised July 7, 2011;
accepted July 21, 2011

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 복분자 와인은 선행 연구(21)에서 제시한 바와 같이 (주)연수당에서 조제된 시료로써, 전남 나주에서 채취한 복분자 열매 15.7 kg으로부터 복분자 와인 원액을 얻어 이를 발효시켜 타 원료를 첨가하지 않은 상태의 것을 시료(알코올 함량 15%)로 사용하였다.

복분자 와인의 추출 및 용매분획

복분자 와인 11 L(복분자 15.7 kg 상당량)를 Büchner 여과장치를 이용하여 감압 여과(No. 2 filter paper, Whatman, Maidstone, England)하였다. 그 여액을 진공농축기를 이용하여 복분자 와인 중에 함유된 ethanol이 제거될 때까지 농축한 후, 얻어진 농축액(2.8 L, 280 g)을 *n*-hexane (3 L×4), EtOAc (3 L×4), 그리고 수포화 *n*-butanol(BuOH, 3 L×4)로 순차 용매분획하였다. 얻어진 각 용매분획층들은 38°C에서 감압 농축하였다.

복분자 와인 EtOAc층의 silica gel column chromatography에 의한 정제

복분자 와인의 EtOAc층은 silica gel column chromatography에 의해 정제되었다. 즉 silica gel(400 g, 70-230 mesh, Kiesel gel 60, column chromatography용, Merck, Darmstadt, Germany)을 CHCl₃으로 slurry를 만들어 column(71.5×4 cm)에 충전한 후, column에 EtOAc층(56.2 g)의 약 1/3의 양(20 g)을 charge한 다음, CHCl₃/EtOAc=100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 그리고 0:100(v/v)으로 순차 용출·분획하였으며, 이어 EtOAc/MeOH=50:50 및 0:100(v/v)으로 용출·분획하는 step-wise법을 이용하였다. 이 때 각 단계별로 2 L씩을 순차 용출시키면서 15 mL씩 분획하였다.

HPLC에 의한 정제

Silica gel column chromatography를 행하여 얻어진 희분을 대상으로 μBondapak™ C₁₈ column(7.8×300 mm, 5 μm Waters, Milford, MA, USA)이 연결된 HPLC를 이용하여 정제하였다. 이 때 사용한 검출 파장은 280 nm(UV detector, SPD 10A, Shimadzu, Kyoto, Japan)에서, 그리고 유속은 2.0 mL/min(Medel 600 pump, Waters)으로 행하였다. 이동상 용매는 15% MeOH(pH 2.65, trifluoroacetic acid, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, A 용매)과 50% MeOH(B 용매)을 사용하였으며, 용출은 초기 5분 동안 100% A 용매를 용출시킨 다음, 45분까지 100% B 용매를 용출시키는 gradient 용출법을 이용하였다. 상기 C₁₈ column을 이용한 HPLC에 의해 정제된 일부 희분들(E2, E9)은 Discovery® RP Amide C₁₆ column(4.6×250 mm, 5 μm Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 연결한 HPLC를 이용하여 재차 정제하였다. 이 때 유속은 1.0 mL/min(LC-20AD pump, Shimadzu)을, 그리고 검출파장은 280 nm(SPD-20A detector, Shimadzu)로 행하였다. 또한 이동상 용매의 경우, 희분 E2는 15% MeOH(pH 2.65, trifluoroacetic acid)을, 그리고 희분 E9는 40% MeOH을 이용한 isocratic 용출법을 적용하여 각각 정제하였다.

NMR 및 MS 분석

¹H-NMR(nuclear magnetic resonance), ¹³C-NMR 및 2D-NMR spectra는 ¹HNOVA 500 spectrometer(500 MHz, Varian, Walnut Creek, CA, USA) 분석을 행하여 얻었다. 이 때 사용한 용매는

CD₃OD였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane(TMS, δ=0)을 이용하였다. Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry(ESI-MS) 분석은 UPLC(Aquility UPLC, Waters, Manchester, UK)에 텐덤 질량분석기(Synapt HDMS, Waters)가 연결된 기기로 Acquity BEH column(2.1φ×100 mm, Waters)을 장착하여 분석하였다.

Compound 1: white powder; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 4.12 (2H, q, *J*=7.5 Hz, H-1'), 2.58 (4H, s, H-2, 3), 1.24 (3H, t, *J*=7.5 Hz, H-2'); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 176.2 (C-1), 174.5 (C-4), 61.8 (C-1'), 30.2 (C-2, 3), 14.6 (C-2'); ESI-MS (negative) *m/z* 145.0 [M-H]⁻.

Compound 2: white needles; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.55 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 7.55 (1H, dd, *J*=9.0, 2.0 Hz, H-6), 6.83 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-5), 3.89 (3H, s, -OCH₃); ESI-MS (negative) *m/z* 167.0 [M-H]⁻.

Compound 3: white powder; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.43 (1H, br. s, H-2), 7.41 (1H, dd, *J*=9.3, 2.0 Hz, H-6), 6.80 (1H, d, *J*=9.3 Hz, H-5), 4.28 (2H, q, *J*=14.0, 7.0 Hz, H-1'), 1.35 (3H, t, *J*=7.0 Hz, H-2'); ESI-MS (positive) *m/z* 182.16 [M+H]⁺, 155.01 [M-CH₃CH₂]⁺.

Compound 4: white powder; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.72 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-5), 7.20 (1H, d, *J*=3.5 Hz, H-3), 6.56 (1H, dd, *J*=3.5, 1.5 Hz, H-4); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 161.9 (C-2), 148.2 (C-5), 119.2 (C-3), 113.1 (C-4); ESI-MS (positive) *m/z* 85 [M+H]⁺, 67 [M-OH]⁺.

Compound 5: viscous oil; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.00 (2H, d, *J*=8.5 Hz, H-2', 6'), 6.68 (2H, d, *J*=8.5 Hz, H-3', 5'), 3.71 (1H, m, H-2), 2.62 (1H, m, H-4a), 2.53 (1H, m, H-4b), 1.69 (1H, m, H-3a), 1.64 (1H, m, H-3b), 1.17 (3H, d, *J*=6.0 Hz, H-1); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 156.4 (C-4'), 134.6 (C-1'), 130.4 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 68.0 (C-2), 42.5 (C-3), 32.4 (C-4), 23.7 (C-1); ESI-MS (positive) *m/z* 85 [M+H]⁺, 67 [M-OH]⁺; ESI-MS (positive) *m/z* 167.0 [M+H]⁺.

결과 및 고찰

복분자 와인의 EtOAc층으로부터 물질의 분리

복분자 와인 11 L로부터 얻어진 농축액을 용매분획하여 *n*-hexane 층(0.2 g), EtOAc층(56.2 g), BuOH층(138.5 g) 및 H₂O층(731.5 g)을 각각 얻었다. 이들을 TLC에 의해 각 층에 함유된 화합물의 존재 경향을 비교한 선행 연구 결과에 의하면(21), EtOAc층에는 다양한 화합물들의 존재가 확인되어 그 일부(20 g/6.2 g)를 CHCl₃/EtOAc/MeOH 용매계를 이용하여 silica gel column chromatography로 정제하고, 얻어진 각 희분을 대상으로 TLC-DPPH법(21)에 의해 항산화 활성을 평가하였다. 그 결과, 희분 A-4-10(CHCl₃/EtOAc=80:20-20:80, v/v)에서 대부분의 항산화 활성물질이 검출되었으며, 그 중 함량이 높은 희분 A-6(CHCl₃/EtOAc=60:40, v/v)으로부터 선행연구를 통하여 5종의 항산화 활성물질을 분리하여 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-(2-hydroxyethyl)-phenol, pyrocatechol, 그리고 ethyl gallate로 구조해석하였고, 이에 대한 결과를 이미 보고한 바 있다(21). 또한 TLC 상에서 상기 희분과 다른 패턴을 나타냈던 CHCl₃/EtOAc=60:40(v/v, 36 mg)의 용출희분은 다른 희분에 비해 비교적 화합물들의 존재 경향이 단순하였다. 그래서 본 연구에서는 이 희분으로부터 화합물들

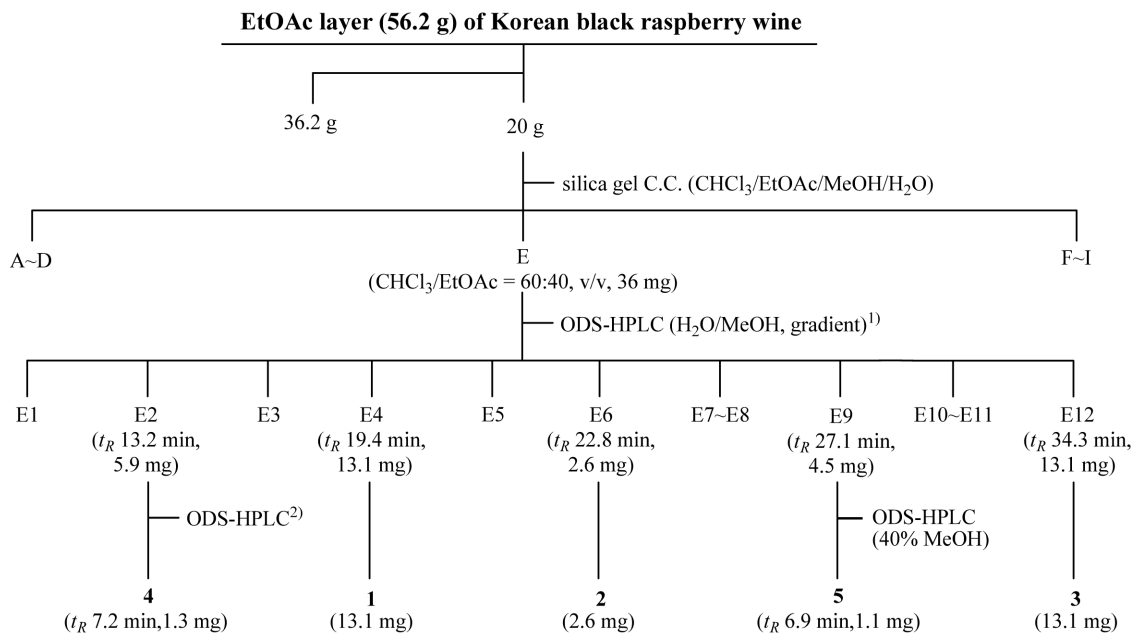


Fig. 1. Isolation procedure of low molecular volatile compounds from EtOAc layer of black raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) wine. C.C.: Column chromatography. ¹⁾The elution was performed by using a linear gradient of 15% MeOH (pH 2.65 by TFA, eluent A) to 60% MeOH (pH 2.65 by TFA, eluent B), starting with 100% A in 5 min and then increased to 100% B over 45 min. ²⁾Mobile phase, 15% MeOH (pH 2.65 by TFA).

의 분리를 시도하였다. 즉 희분 CHCl₃/EtOAc=60:40(v/v, 36 mg)을 대상으로 ODS column이 연결된 HPLC 분석을 실시한 결과, HPLC chromatogram으로부터 12종의 피크가 관찰되었으며, 이를 대상으로 반복적으로 분취를 행하여 5종의 희분 [*t*_R 13.2 min, 5.9 mg (E2); *t*_R 19.4 min, 13.1 mg (E4); *t*_R 22.8 min, 2.6 mg (E6); *t*_R 27.1 min, 4.5 mg (E9); *t*_R 34.3 min, 13.1 mg (E12)]을 각각 얻었다. 각 희분들에 대한 ¹H-NMR 분석을 실시하여 순도를 확인한 결과, 희분 E4(화합물 1), E6(화합물 2), 그리고 E12(화합물 3)에서 용출된 화합물들은 단일 성분으로 판단되었다. 그러나 희분 E2와 E9는 순도가 높지 않다고 판단되어 Discovery[®] RP Amide C₁₆ column이 연결된 HPLC[E2, 15% MeOH (pH 2.65 by TFA); E9, 40% MeOH]에 의해 각각 재차 정제를 행하였다. 그 결과, 희분 E2(5.9 mg)로부터 화합물 4 (*t*_R 7.2 min, 1.3 mg)가, 그리고 희분 E9(4.5 mg)로부터 화합물 5(*t*_R 6.9 min, 1.1 mg)가 각각 단리되었다. 이상의 결과로부터 복분자 와인의 EtOAc층(20 g)을 대상으로 silica gel column chromatography를 행하여 얻어진 희분 CHCl₃/EtOAc=60:40(v/v, 36 mg)으로부터 5종의 화합물들을 단리하였으며(Fig. 1), 이들 화합물을 대상으로 MS 및 NMR 분석을 행하여 구조해석을 행하였다.

단리 화합물들의 구조해석

화합물 1의 ¹³C-NMR spectrum에서는 carboxyl기 유래로 추측되는 2종의 carbon signals[δ 176.2 (C-1), 174.5 (C-4)]과 *sp*³ 탄소 유래로 판단되는 4종의 carbon signals[61.8 (C-1'), 30.2 (C-2, 3), 14.6 (C-2')]을 포함한 총 6종의 탄소 signals이 관찰되었다. 화합물 1의 ¹H-NMR spectrum으로부터 δ 2.58에 4H분의 singlet signal (H-2와 H-3)이 관찰되어 등가 methylene의 존재가 시사되었다. 또 ethanol 유래로 추측되는 2종의 proton signals[δ 4.12 (2H, q, *J*=14.3, 7.5 Hz, H-1'), 1.24 (3H, t, *J*=7.5 Hz, H-2')]이 관찰되었다. 이 결과로부터 화합물 1은 succinic acid의 한 쪽 말단에 ethyl기가 ester 결합한 화합물일 가능성이 강하게 시사되었다.

보다 상세한 구조 해석을 위하여 HSQC 분석에 의해 proton과 carbon들 간의 direct 연결성을 확인하였으며, HMBC 분석을 행하여 얻어진 spectrum으로부터 관찰된 주요 long range proton-carbon의 correlation들을 Fig. 2에 나타냈다. 이들 2D-NMR spectra로부터 이 화합물은 ethyl기가 succinic acid에 ester 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 특히 화합물 1의 ESI-MS(negative) spectrum에서는 이 화합물의 분자량(146)과 일치되는 pseudomolecular ion 유래의 *m/z* 145.0 [M-H]⁻ peak가 관찰되었다. 또한 시판품의 ethyl succinate의 ¹H-NMR spectrum이 화합물 1의 그것과 정확히 일치하였다. 그래서 화합물 1은 틀림없는 ethyl succinate로 동정되었다(Fig. 2).

화합물 2의 ¹H-NMR spectrum에서는 aromatic *sp*²carbon proton으로 추정되는 3종의 proton signals[δ 6.83 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-5), 7.55 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 7.55 (1H, dd, *J*=9.0, 2.0 Hz, H-6)]이 관찰되었으며, 이들의 분열 패턴으로부터 tri-substituted benzene ring의 존재가 강하게 시사되었다. 그리고 3H분의 *sp*³ proton signal (δ 3.89, 3H, s, H-8)이 관찰되어 1종의 methoxy기의 존재가 시사되었다. 또한 화합물 2의 ESI-MS(negative) spectrum에서는 이 화합물의 분자량(168)과 일치되는 pseudomolecular ion peak인 *m/z* 167.0[M-H]⁻의 signal이 관찰되었다. 이 결과로부터 본 화합물은 천연에 널리 존재하는 vanillic acid일 가능성이 높다고 판단되었다. 그래서 시판품의 vanillic acid를 동일조건에서 ¹H-NMR 분석을 행하여 그들의 spectra를 비교하였다. 그 결과, 화합물 2의 ¹H-NMR spectrum은 표준품 vanillic acid의 그것과 정확히 일치하였다. 그래서 화합물 2의 구조는 vanillic acid로 동정되었다(Fig. 2).

화합물 3의 ESI-MS(positive) spectrum에서는 molecular ion *m/z* 182.16 [M+H]⁺ peak와 그 외의 대표적인 fragment ion으로 *m/z* 155.01 [M-CH₂CH₃]⁺ peak가 관찰되어 이 화합물의 분자량은 182로 시사되었다. ¹H-NMR spectrum에서는 화합물 2와 유사한 aromatic *sp*² carbon proton signals[δ 6.80 (1H, d, *J*=9.3 Hz, H-5),

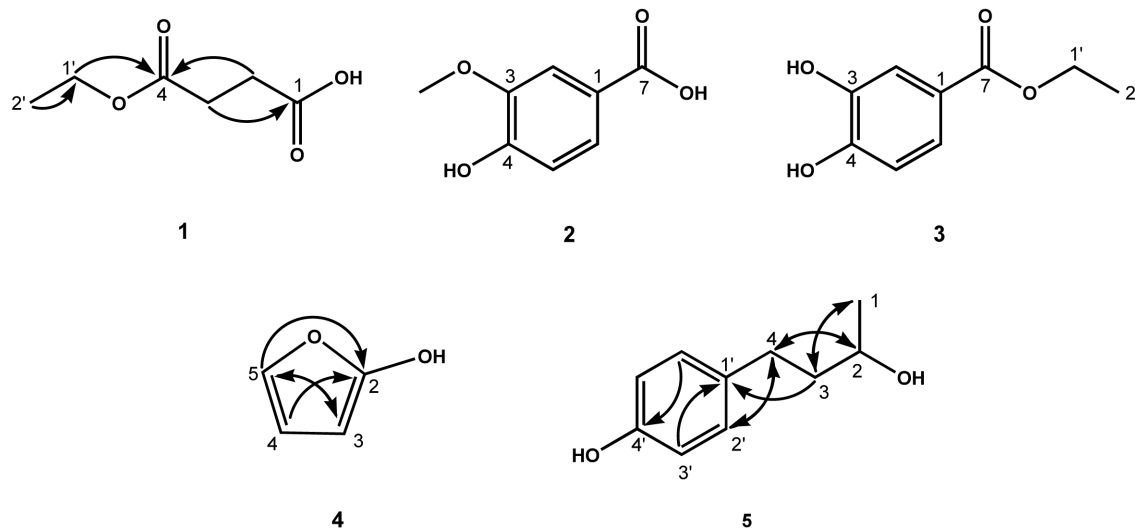


Fig. 2. Structure of the isolated compounds and important correlations (arrows) observed in the HMBC spectrum for 1, 4, and 5.

7.41 (1H, dd, $J=9.3, 2.0$ Hz, H-6), 7.43 (1H, br. s, H-2)]이 관찰되었다. 또한 ethanol 유래로 추정되는 2종의 proton signals [δ 1.35 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-2'')과 δ 4.28 (2H, q, $J=14.0, 7.0$ Hz, H-1)]의 존재가 관찰되었다. 그래서 이 화합물은 benzoic acid에 ethanol이 ester 결합한 ethyl 3,4-dihydroxybenzoate로 강하게 시사되었다. 이에 시판품의 ethyl 3,4-dihydroxybenzoate를 동일조건에서 $^1\text{H-NMR}$ 을 분석한 후, 화합물 3의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum과 비교한 결과, 일치성이 확인되었다. 그래서, 화합물 3의 구조는 최종적으로 ethyl 3,4-dihydroxybenzoate로 동정되었다(Fig. 2).

화합물 4의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 4종의 sp^2 carbon signal들 [δ 161.9 (C-2), 148.2 (C-5), 119.2 (C-3), 113.1 (C-4)]이 관찰되어 furan의 존재가 시사되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum으로부터 각각 1H분의 적분치를 보인 3종의 sp^2 carbon proton signals [δ 7.72 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-5), 7.20 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-3), 6.56 (1H, dd, $J=3.5, 1.5$ Hz, H-4)]의 분열 패턴 및 coupling constant 값으로부터 그들은 일련의 연결성을 갖는 것으로 추측되었다. 그리고 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum으로부터 H-3/H-4 및 H-4/H-5 간의 상관관계가 관찰되어 이들 3종 proton들의 연결성이 확인되었다. 또한 HMBC spectrum(Fig. 2)에서는 H-5(δ 7.72)의 proton과 C-2(δ 161.6)의 4차 carbon 간에 cross peak가 검출되어 화합물 4는 C-2위에 치환기를 갖는 furan 동족체일 가능성이 강하게 시사되었다. 특히 ESI-MS (positive) spectrum에서는 pseudomolecular ion peak인 m/z 85 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 와 그 외의 주요한 fragment ion m/z 67 $[\text{M}-\text{OH}]^+$ peak가 관찰되었다. 이에 화합물 4는 furan-2-ol로 동정되었다(Fig. 2).

화합물 5는 ESI-MS(positive) spectrum으로부터 pseudomolecular ion 유래로 추정되는 m/z 167.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ peak가 관찰되어 이 화합물의 분자량은 166으로 시사되었다. 화합물 5의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 δ 7.00 (2H, H-2', 6')과 6.68 (2H, H-3', 5')에서 동일 coupling constant 값($J=8.5$ Hz)을 갖는 AA'XX'계의 doublet signal들이 관찰되어 para 치환된 aromatic 화합물의 존재 가능성이 시사되었다. 그리고 1종의 methine proton signal(δ 3.71, 1H, m, H-2)과 2종의 geminal methylene proton signals [δ 2.62 (1H, m, H-4a), 2.53 (1H, m, H-4b), 1.69 (1H, m, H-3a), 1.64 (1H, m, H-3b)]이 관찰되었다. 또한 δ 1.17 (3H, $J=6.0$ Hz, H-1)에서 doublet의 methyl group의 존재가 확인되어 이 methyl기는 methine 탄

소에 결합되어 있음을 알 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 benzene ring 유래의 6종의 sp^2 carbon signal들과 4종의 sp^3 carbon signal들이 관찰되어 $^1\text{H-NMR}$ spectrum으로부터 해석된 내용과 일치하였다. 따라서 1D-NMR 및 MS spectra로부터 이 화합물의 구조는 4-hydroxybenzene과 butanol이 결합된 화합물일 가능성이 강하게 시사되었다. 이어 보다 정확한 구조해석을 위하여 HSQC, $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, 그리고 HMBC 등의 2D-NMR 분석을 행하였다. $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum에서는 H-1/H-2, H-2/H-3, 및 H-3/H-4 간의 proton-proton 상관관계들이 검출되어 화합물 5의 부분구조가 butan-2-ol임을 알 수 있었다. 특히 Fig. 2에 제시한 바와 같이 HMBC spectrum에서는 methylene proton signal (δ 1.69, H-3)과 quaternary carbon signal (δ 134.6, C-1') 간의 상관관계를 나타내 4-hydroxybenzene이 2-hydroxybutane의 말단에 결합하고 있음을 알 수 있었다. 또한 이 화합물의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum은 *Taxus baccata*로부터 분리된 4-(4-hydroxyphenyl) butan-2(S)-ol의 그것과 정확히 일치하였다(22). 그래서 최종적으로 화합물 5는 4-(4-hydroxyphenyl)butan-2(S)-ol로 구조해석되었다(Fig. 2).

이상의 결과로부터 복분자 와인의 EtOAc층으로부터 분리한 5종의 화합물들은 ethyl succinate(1), vanillic acid(2), ethyl 3,4-dihydroxybenzoate(3), furan-2-ol(4), 그리고 4-(4-hydroxyphenyl)butan-2(S)-ol(5)로 구조해석되었다(Fig. 2). Ethyl succinate(1)와 vanillic acid(2)는 포도주에서(23-25), ethyl 3,4-dihydroxybenzoate(3)는 페이조아(Feijoa) 열매에서(26), furan-2-ol(4)은 아로니아 발효제품에서(27), 그리고 4-(4-hydroxyphenyl)butan-2(S)-ol(5)은 *T. baccata*(22)에서 각각 휘발성 성분으로 동정된 바 있다. 그리고 vanillic acid(2)는 다양한 식물체에 함유되어 있으며, 복분자 열매로부터 향산화 활성물질로써 동정된 바 있다(7). 그러나 복분자 와인의 EtOAc층으로부터 분리된 5종의 화합물들 중 화합물 2를 제외한 그 외의 화합물들(1, 3-5)은 복분자 와인이나 이를 원료로 하는 식물에서 처음으로 그 존재가 확인되었다.

특히 화합물 5[4-(4-hydroxyphenyl)butan-2(S)-ol]의 전구체로 알려진 raspberry ketone[4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-one]은 복분자의 특징적인 향기성분이고, 향균 및 항비만 등의 생리활성을 갖는다고 밝혀진 바 있다(28-31). 이 화합물은 *p*-coumaryl-CoA와 malonyl CoA의 축합반응에 의해 생성되며, 특히 화합물 5는 *Pytolacca americana*의 식물조직배양에서 raspberry ketone의 산화로부터 생

성분이 밝혀진 바 있고, 더 나아가 이 화합물의 2종의 수산기에 1종 혹은 2종의 당이 결합되어 배당체를 형성하게 된다고 보고된 바 있다(32). 또 발효식품의 경우에 있어서는 일반적으로 다양한 생리활성물질들이 그 출발 원료에 배당체로 존재하던 것이 발효과정동안 미생물에 의해 가수분해되어 aglycone 형태로 유리되어 존재한다는 보고들이 있다(33,34). 보다 자세한 분석학적 연구가 수반되어야 하겠지만 화합물 5는 복분자 와인의 원료인 복분자 열매에 배당체로 존재하던 것이 복분자 와인 제조과정 중 미생물의 작용에 의해 가수분해되어 생성된 물질일 가능성이 시사되어진다. 또한 *Beauveria bassiana* 등의 미생물은 *p*-hydroxybenzylidenacetone과 함께 단시간 배양할 경우, 이를 산화시켜 화합물 5와 raspberry ketone을 생성하나, 장시간 배양할 경우, 이 화합물들이 더욱 산화되어 tyrosol에 이르게 한다고 보고된 바 있다(35). Tyrosol은 Lee 등(20)이 복분자 와인으로부터 분리·동정한 바 있다. 그래서 화합물 5는 복분자주 발효과정동안 생성되는 화합물로서 복분자 열매의 향기성분인 raspberry ketone이 더욱 산화되어 화합물 5를 경유하여 tyrosol을 생성할 가능성이 높은 것으로 판단된다.

복분자 와인의 EtOAc층으로부터 분리한 5종의 화합물들은 앞서 언급한 바와 같이 주로 발효식품에 존재하는 휘발성 성분으로 밝혀져 복분자 와인의 풍미 특히 향에 크게 기여할 것으로 사료된다. 특히, 이 화합물들의 정제 및 농축과정 중의 휘발로 인한 손실을 고려하였을 때, 그들의 실제 함량은 단리되어진 양보다 훨씬 많을 것으로 판단된다. 이 화합물들은 출발 원료인 복분자 열매에도 그 존재 가능성이 검토되어야 하겠으나 대부분 발효과정 중 생성되었을 가능성이 높을 것으로 추측되며, 이에 대한 연구는 추후 세심하게 검토될 필요가 있을 것이다. 이와 같은 복분자 와인의 성분 연구가 복분자 와인의 품질관리 및 생리활성 평가 등을 위한 chemical profile 작성에 추후 중요한 기초 자료로 활용되어지길 기대한다.

요 약

복분자 와인은 복분자 열매를 발효·숙성시켜 제조한 것으로, 소비자에게 널리 음용되고 있으나 그 원재료인 복분자 열매에 대한 연구에 비해 복분자 와인에 존재하는 성분들에 대한 체계적인 연구는 거의 전무한 실정이다. 최근 우리는 복분자주에 함유되어 있는 화합물들의 분자 수준에서의 연구를 통하여 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-(2-hydroxyethyl)-phenol, pyrocatechol, ethyl gallate 등의 5종의 저분자 페놀성 화합물을 단리·구조해석하여 보고한 바 있다. 그 연속된 연구로써 본 논문에서는 복분자주에 존재하는 성분들에 대한 추가적인 분리 및 구조해석을 행하였다. 제조된 복분자 와인(11 L, 복분자 열매 15.7 kg)을 용매분획하여 얻어진 EtOAc층(56.2 g)의 일부(20 g)를 silica gel column chromatography와 ODS-HPLC로 정제하여 5종의 화합물을 단리하였다. 이 화합물들을 대상으로 MS 및 NMR 등의 기기분석을 행한 결과, ethyl succinate(1, 13.1 mg), vanillic acid(2, 2.6 mg), ethyl 3,4-dihydroxybenzoate(3, 13.1 mg), furan-2-ol(4, 1.3 mg), 그리고 4-(4-hydroxyphenyl) butan-2(S)-ol(5, 1.1 mg)로 동정하였다. 이 화합물들 대부분은 발효식품에서 향기 성분으로 동정된 바 있으며, 화합물 2는 복분자 열매에 존재함이 이미 보고되어 있으나, 화합물 1과 3-5는 복분자 열매 및 복분자 와인으로부터 처음으로 동정되었다.

감사의 글

이 논문은 농림기술관리센터의 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다. NMR은 한국기초과학지원연구원(KBSI) 광주센터에서 분석하였다.

문 헌

1. Yuk CS. Coloured Medicinal Plants of Korea. Academy Publishing Co., Seoul, Korea. p. 275 (1990)
2. Bea GH. The Medicinal Plants of Korea, Kyohaksa, Seoul, Korea. p. 231 (2001)
3. Heo J. *Donguibogam* 1-5, Yeogang Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 62, 296, 334, 617, 984, 1085, 2679 (1994)
4. Lee MK, Lee HS, Choi GP, Oh DH, Kim JD, Yu CY, Lee HY. Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanum* Miquel. Korea J. Med. Crop Sci. 1: 5-12 (2003)
5. Cha HS, Park MS, Park KM. Physiological activities of *Rubus coreanum* Miquel. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 409-415 (2001)
6. Yoon I, Cho JY, Kook 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)
7. Yoon I, Wee 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)
8. Chung TH, Kim JC, Lee CY, Moon MK, Chae SC, Lee IS, Kim SH, Hahn KS, Lee IP. Potential antiviral effects of *Terminalia schubula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* against duck hepatitis B virus (DHBV). Phytother. Res. 11: 179-182 (1997)
9. Yang SW, Ho JN, LEE YH Shin DH, Hong BS, Cho HY. Isolation and characterization of *Helicobacter pylori* urease inhibitor from *Rubus coreanus* Miquel. Korean J. Food Sci. Nutr. 33: 769-777 (2004)
10. Ohtani K, Miyajima C, Takahashi T, Kasai R, Tanaka O, Hahn DR, Naruhashi N. A dimeric triterpene glycoside from *Rubus coreanus*. Phytochemistry 29: 3275-3280 (1990)
11. Kim YH, Kang SS. Triterpenoids from *Rubi fructus* (*Bogbunja*). Arch. Pharm. Res. 16: 109-113 (1993)
12. Choi JW, Lee KT, Ha JH, 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)
13. Nam JH, Jung HJ, Choi JW, Lee KT, Park HJ. The anti-gastro-pathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F₁ and 23-hydroxytormentonic acid isolated from the ripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model. Biol. Pharm. Bull. 29: 967-970 (2006)
14. Pang GC, Kim MS, Lee MW. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. Korean J. Pharmacogn. 27: 366-370 (1996)
15. Lee YA, Lee MW. Tannins from *Rubus coreanus*. Korean J. Pharmacogn. 26: 27-30 (1995)
16. Lee MW. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanus*. Yakhak Hoeji 39: 200-204 (1995)
17. Choi HS, Kim MR, Park HS, Kim YS. Alcoholic fermentation of Bokbunja wine. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 543-547 (2006)
18. Park YS, Chang HG. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 46: 367-375 (2003)
19. Kwon KS, Kim YS, Song GS, Hong SP. Quality characteristic of bread with *Rubi fructus* (*Rubus coreanus* Miquel) Juice. Korean J. Food Nutr. 17: 272-277 (2004)
20. Lee YN, Kim YS, Song GS. Quality of dry noodle prepared with wheat flour and immature *Rubus coreanus* (*bokbunja*) powder

- composites. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 43: 271-276 (2000)
21. Kim SJ, Lee HJ, Park KH, Rhee CO, Lim IK, Chung HJ, Moon JH. Isolation and identification of low molecular phenolic antioxidants from ethylacetate layer of Korean black raspberry (*Rubus coreanus*) wine. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 129-134 (2008)
22. Rojatkar SR, Sawaikar DD, Sinha B, Ravindranathan T, Nagasampagi BA. 4-(*p*-hydroxyphenyl)-(2*S*)-butanol from the needles of *Taxus baccata*. Phytochemistry 39: 259-260 (1995)
23. Patel S, Shibamoto T. Flavor compounds in wines produced from chardonnay grapes fermented with fruit juices. Food Sci. Technol. Res. 9: 84-86 (2003)
24. Garcia A, Carcel C, Dulau L, Samson A, Aguera E, Agosin E, Gunata Z. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. J. Food Sci. 67: 1138-1444 (2002)
25. Matejcek D, Mikes O, Klejdus B, Sterbova D, Kuban V. Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines. Food Chem. 90: 791-800 (2005)
26. Hard PJ, Michael BJ. Volatile components of *Feijoa* fruits. Phytochemistry 9: 1355-1357 (1970)
27. Balcerak M, Szopa SJ. Optimization of the technology of aronia-spirit production - Part 2: Influence of the fermentation conditions on the aroma compounds. Deut. Lebensm.-Rundsch. 101: 16-19 (2005)
28. Schinz H, Seidel CF. Ueber das himbeer aroma (on the raspberry aroma). Helv. Chim. Acta 40: 1839-1950 (1957)
29. Fronza G, Fuganti C, Pedrocchi-Fantoni G, Serra S, Zucchi G. Stable isotope characterization of raspberry ketone extracted from *Taxus baccata* and obtained by oxidation of the accompanying alcohol (betuligenol). J. Agr. Food Chem. 47: 1150-1155 (1999)
30. Reddy PS, Jamil K, Madhusudhan P, Anjani G, Das B. Antibacterial activity of isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*. Pharm. Biol. 39: 236-238 (2001)
31. Morimoto C, Satoh Y, Hara M, Inoue S, Tsujita T, Okuda H. Anti-obese action of raspberry ketone. Life Sci. 77: 194-204 (2005)
32. Shimoda K, Harada T, Hamada H, Nakajima N, Hamada H. Biotransformation of raspberry ketone and zingerone by cultured cells of *Phytolacca americana*. Phytochemistry 68: 487-492 (2007)
33. Jang MY, Cho JY, Cho JI, Moon JH, Park KH. Isolation and characterization of antioxidative active compounds from quick-fermented soybean food. Food Sci. Biotechnol. 15: 214-219 (2006)
34. Ko SR, Suzuki Y, Suzuki K, Choi KJ, Cho BG. Marked production of ginsenoside Rd, F₂, Rg₃, and compound K by enzymatic method. Chem. Pharm. Bull. 55: 1522-1527 (2007)
35. Fronza G, Fuganti C, Pedrocchi-Fantoni G, Perozzo V, Servi S, Zucchi G. Stereochemistry of the Baeyer-Villiger-type conversion of 4-(4-hydroxyphenyl) buta-2-one (raspberry ketone) into tyrosol mediated by *Beauveria abassiana*. J. Org. Chem. 61: 9362-9367 (1996)