

Ethyl Acetate와 Methanol을 이용한 블루베리 추출물 대사체 분석

조영희¹ · 김수경¹ · 권다애¹ · 이흥진¹ · 최형균² · 어중혁^{1*}

¹중앙대학교 식품공학과

²중앙대학교 약학대학

Metabolomic Analysis of Ethyl Acetate and Methanol Extracts of Blueberry

Young-Hee Jo¹, Sugyeong Kim¹, Da-Ae Kwon¹, Hong Jin Lee¹,
Hyung-Kyoon Choi², and Joong-Hyuck Auh^{1*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Gyeonggi 456-756, Korea

²College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

ABSTRACT Metabolite profiling of blueberry (cultivar "Spartan") was performed by extraction using different solvents, methanol and ethyl acetate, through metabolomic analysis using LC-MS/MS. Unsupervised classification method (PCA) and supervised prediction model (OPLS-DA) provided good categorization of metabolites according to the extraction solvents. Metabolites of the anthocyanin family, including delphinidin hexoside, delphinidin, 5-O-feruloylquinic acid, malvidin hexoside, malvidin-3-arabinoside, petunidin-3-arabinoside, and petunidin hexoside, were mainly detected in methanol fractions, whereas those of the flavonoid family, including chlorogenic acid, chlorogenic acid dimer, 6,8-di-C-arabinopyranosyl-luteolin, and luteolin were successfully prepared in the ethyl acetate fraction. Thus, metabolomic analysis of blueberry extracts allows for the simple profiling of whole and distinctive metabolites for future applications.

Key words: metabolites profiling, blueberry, LC-MS/MS

서 론

딸기, 블루베리, 복분자, 오디 등을 포함하는 베리류는 항산화, 항염증 등의 생리활성 효과가 있어 최근 많은 관심을 받고 있으며 이들 추출물들에 대한 다양한 생리활성 작용 기작을 규명하는 연구가 다양하게 시도되고 있다(1-4). 2009년 미국 국립보건원의 보고에 따르면 과일 채소류를 항산화력에 따라 분류할 때 가장 높은 여섯 가지 식품 소재에 블루베리와 cranberry가 포함된다고 하였고 그 외에 딸기와 blackberry도 고향산화 식품군에 포함된다고 알려지고 있어 이들을 이용한 기능성 식품의 개발이 다양하게 시도되고 있다(5). 또한 2010년 Perez-Jimenez 등(6)의 의하면 건강에 유익한 폴리페놀 함유 식품의 분류에서 상위 10개 중 8개가 베리류로 분류될 만큼 강한 생리활성을 보유하고 있다고 하여 매우 유용한 기능성 식품 소재의 하나로 인식되고 있다. 그러나 이들 베리류에 함유된 기능성 성분에 대한 연구는 단순히 특정 성분에 대한 분석에 그치고 있고 전체적인 대사체들의 분석을 위한 시도는 매우 제한적으로 이루어지고 있는 실정이다.

보라색을 나타내는 블루베리는 항산화 물질인 안토시아닌 성분을 가지고 있는 대표적인 건강식품의 하나로 진달래과(Ericaceae) 산앵두나무속(Vaccinium)에 속하는 관목성 식물로서 세계적으로 400여종이 있다(7). 블루베리는 북미 지역에서 상업적으로 다량 재배되고 있고 하이부시 블루베리(*Vaccinium corymbosum*), 로우부시 블루베리(*Vaccinium myrtillus*) 그리고 래빗아이 블루베리(*Vaccinium ashei*)가 주요 재배종으로 알려져 있다. 블루베리에 함유된 안토시아닌, 플라보노이드, 라이코펜은 항산화능, 시력강화, 면역증진 및 뇌졸중 방지에 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있으며 뉴욕타임지가 선정한 세계 10대 슈퍼푸드에 선정되어 많은 관심을 받고 있다(8). 최근 국내에서도 건강에 대한 관심과 함께 블루베리에 대한 관심이 높아져 블루베리 과실을 이용한 잼, 와인, 소스, 막걸리, 과자 등에 다양하게 이용하고 있다(8-10).

블루베리의 주요 생리활성 성분은 폴리페놀류로서 이들 성분들에 대한 연구는 지속적으로 관심을 받아 왔으나 이들 화합물들의 다양한 구조적 변이와 표준물질의 미비로 대사체의 전반적인 비교와 규명보다는 단편적인 화합물의 분석만이 보고되어 왔다(11,12). 주로 많은 연구가 색소 성분인 안토시아닌에 집중되어 있으며 이와 관련한 최초의 연구는 1970년 Ballinger 등에 의해 블루베리로부터 14종류의 안

Received 1 November 2013; Accepted 6 November 2013

*Corresponding author.

E-mail: jhauh@cau.ac.kr, Phone: +82-31-670-3079

토시아닌이 동정된 것이다(13). 이후 추가로 15종의 안토시아닌이 5종류의 aglycone(cyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, petunidin)과 이들의 배당체의 형태로 동정되었고, Saper 등(14)에 의해 추가로 16종류의 안토시아닌이 발견되는 등 지속적인 연구가 이루어지고 있다. 또한 폴리페놀류와 관련해서는 Azar 등(15)에 의해서 12종류의 폴리페놀류와 이들의 배당체들이 보고되었고, 다양한 종의 블루베리에 함유된 폴리페놀류들에 대한 연구가 진행된 바 있다(16). 이상과 같은 블루베리에 함유된 유용 화합물들에 대한 분석은 다양한 크로마토그래피 분석 기술의 발전과 함께 지속적으로 발전해 오고 있으나, 물질의 동정에 사용할 표준화합물이 없는 문제로 전체적인 대사체의 규명에는 한계를 보이고 있다. 최근에는 기존에 사용되어 오던 UV-vis 혹은 photodiode array(PDA) 검출기의 한계를 보완할 수 있는 질량분석기(mass spectrometer, MS)를 도입하여 좀 더 정확한 물질의 분석이 가능하게 되었으나, 다양한 화합물들의 정확한 구조 분석에는 여전히 한계점을 보이고 있다. 이러한 단편적인 물질 동정을 보완 및 극복할 수 있는 방법으로 최근 대사체학(metabolomics) 기법이 이용되고 있다. 대사체학은 생체 소재에 존재하는 대사물 전체를 분석하고 이들 간의 변이를 규명할 수 있는 연구법으로, 식품소재의 종류, 부위, 원산지 등에 따른 대사체의 변이를 짧은 시간 내에 효율적으로 밝힐 수 있는 장점이 있다. 최근 대사체학을 이용하여 국내산 복분자에 함유된 대사체들을 규명하는 등 식품학 분야에 적극적으로 이용되고 있으나(2,17), 블루베리에 함유된 유용 대사체들에 대한 분석 시도는 아직까지 보고된 바 없다. 이에 본 연구에서는 대사체 추출에 널리 이용되는 ethyl acetate와 methanol 추출물에 함유된 대사체를 LC-MS/MS를 이용하여 분석하고 이들 대사체의 profiling을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 블루베리는 국내에서 재배되는 spartan 품종으로 농장에서 친환경 농법으로 재배, 수확한 블루베리를 사용하였다. 수확 후 저장 중 대사체의 변이를 방지하기 위해 농장에서 수확한 블루베리는 냉장상태로 바로 실험실로 운반 후 세척, 냉동건조 과정을 거친 후 -80°C 냉동고에 저장하면서 실험에 사용하였다.

대사체 추출

블루베리 대사체의 추출은 Määttä-Riihinen 등(18)의 방법을 일부 수정하여 ethyl acetate와 methanol을 이용하여 실시하였다. 냉동건조한 블루베리분말(2.5 g)에 10 mL의 ethyl acetate를 가하고 상온에서 30분간 교반 후 4°C , $4,000\times g$ 에서 10분간 원심분리(Hanil combi-514R, Incheon, Korea) 하여 상등액만 분획하는 과정을 2회 반복

실시한 뒤 이를 ethyl acetate 추출 분획으로 사용하였다. 원심분리 후 남은 침전물에 acidic methanol(1 mL의 2 M HCl과 10 mL methanol)을 가하고 상온에서 30분간 교반 후 원심분리 하여 상등액을 취한 뒤 methanol 분획으로 사용하였다.

LC-MS/MS 분석

대사체 추출물은 감압 농축하여 용매를 제거한 후 methanol에 용해시켜 LC-MS/MS(Accela HPLC, LTQ-Velos ion trap mass spectrometer, Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 물질의 분리는 UPLC-BEH C18 column($1.7\ \mu\text{m}$, $100\times 2.1\ \text{mm i.d.}$, Acquity, Waters, Milford, MA, USA)에 용매 A(0.1% formic acid in water)와 용매 B(0.1% formic acid in acetonitrile)를 $0.3\ \text{mL/min}$ 의 유속으로 흘리면서 수행하였다. 용매 조건은 용매 B를 40분 동안 90%까지 linear gradient를 가하였고, 칼럼의 온도는 36°C 로, $180\sim 800\ \text{nm}$ 에서의 흡광도를 측정하였다. MS 정보는 positive와 negative ion mode 모두 $100\sim 1,000\ \text{kDa}$ 에서 수집하였고, capillary 온도는 275°C , source voltage는 5 kV로 조정하였다.

대사체 및 통계 분석

블루베리 추출물에 함유된 대사체의 동정을 위해서 LC-MS/MS 분석은 최소 3회 이상 반복하였고, 얻어진 크로마토그램 peak의 detection, alignment는 SIEVE software(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. 물질의 정확한 동정은 MS에서 얻어진 mass값, UV/visible spectra와 MS/MS fragmentation pattern을 기반으로 하였고, 각 물질들의 MS/MS pattern과 다양한 database(ChemSpider, KEGG, PubChem, METLIN, MassBank)의 자료를 기반으로 하여 정확한 대사체 동정을 실시하였다. Ethyl acetate와 methanol 추출 분획에 함유된 대사체의 변이와 특징적인 대사체 규명을 위한 다변량 통계 분석은 SIMCA-P+ software(ver.12.0, Umetrics, Umeå, Sweden)로 principal component analysis(PCA)와 orthogonal partial least squares-discriminant analysis(OPLS-DA)를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

LC-MS/MS 분석

블루베리 추출물의 대사체 분석을 위한 LC-MS/MS 크로마토그램을 Fig. 1에 정리하였다. Ethyl acetate와 methanol 추출 분획 모두에서 positive ion mode보다는 negative ion mode에서 좀 더 다양한 대사체가 검출되었고, ethyl acetate 분획에서는 플라보노이드 계열의 화합물들이 주로 검출되었으며, methanol 분획에서는 안토시아닌 계열의 색소 관련 화합물들이 주로 검출되는 것을 볼 수 있었다.

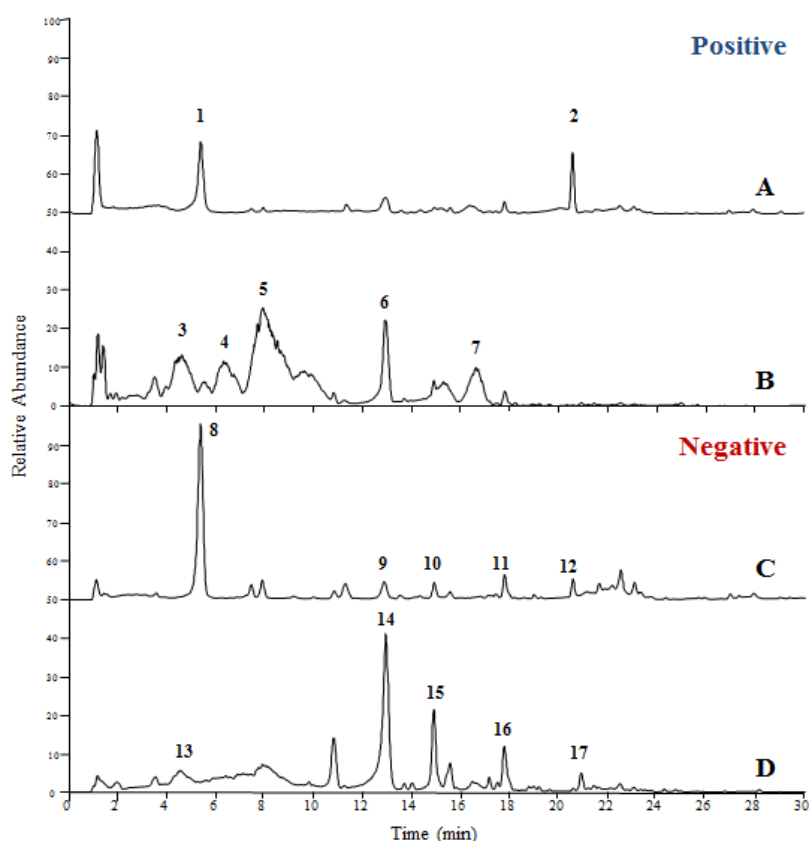


Fig. 1. LC-MS/MS chromatograms for the methanol and ethyl acetate extracts of blueberry (cultivar "Spartan"). Samples were run in positive and negative ion mode and the resulting peaks were identified. A, ethyl acetate fraction in positive ion mode; B, methanol fraction in positive ion mode; C, ethyl acetate fraction in negative ion mode; D, methanol fraction in negative ion mode. 1, chlorogenic acid; 2, 6,8-di-*C*-arabionopyranosyl-luteolin; 3, delphinidin-3-arabinoside; 4, petunidin-3-hexoside; 5, malvidin hexoside; 6, 5-*O*-feruloylquinic acid; 7, malvidin-3-(6-acetylglucoside); 8, chlorogenic acid; 9, 5-*O*-feruloylquinic acid; 10, quercetin hexoside; 11, quercetagenin dimethyl ether-glucoside; 12, abscisic acid; 13, delphinidin hexoside; 14, 5-*O*-feruloylquinic acid; 15, quercetin hexoside; 16, quercetagenin dimethyl ether-glucoside; 17, 4-caffeoyl-5-feruloylquinic acid.

Positive ion mode의 ethyl acetate 분획에서는 chlorogenic acid와 luteolin에 당이 결합한 배당체 화합물이 주요 화합물로 검출되었고, methanol 분획에서는 feruloylquinic acid와 함께 delphinidin, petunidin, malvidin과 같은 안토시아닌 계열 화합물들의 배당체들이 다양하게 검출되는 것을 확인할 수 있었다. Negative mode에서는 5.2분에 chlorogenic acid가 positive ion mode와 동일하게 크게 검출되었고, 그 외에 feruloylquinic acid와 quercetin의 유도체 등 다양한 플라보노이드 화합물들이 검출되었다. 반면 methanol 분획에서는 positive ion mode에서와는 다르게 quercetin, ferulic acid, isorhamnetin 등과 같은 플라보노이드 계열의 화합물들과 함께 delphinidin이 검출되어, ethyl acetate 분획에 비해 좀 더 다양한 대사체들로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. Kader 등(16)은 블루베리에 함유된 페놀성 화합물의 동정을 위해 다양한 추출 조건과 분석 조건의 설정에 따른 주요 화합물의 분석을 실시한 바 있다. 이들에 따르면 플라보노이드 계열의 화합물은 주로 ethyl acetate 층에 추출되었고, 색소 성분인 안토시아닌 계열의 화합물들은 그 외의 methanol, ethanol 등의 용매에 효율적으로 추출되는 것으로 보고되고 있다. Phenolic acid 계열 성분들 중에서는 chlorogenic acid가 주성분으로 보고된 바 있는데(16,19), 이것은 본 연구 결과와 동일한 경향을 나타낸다. 그 외에도 caffeic acid, ferulic acid 등이 검출되어 기존의 보고들과 유사한 profiling을 나타내었다. 블루베리

에는 다양한 종류의 안토시아닌 성분이 존재하는 것으로 보고되고 있고, 이러한 특성은 berry류 내의 과실 중에서도 매우 특징적인 조성으로 알려져 있다(1,11). 본 연구에 사용된 methanol 분획에는 기존 보고들과 같이 다양한 종류의 안토시아닌과 배당체가 존재함을 확인할 수 있었고, ethyl acetate 분획과의 확연한 조성의 차이를 볼 수 있었다.

대사체 및 통계분석

블루베리와 같은 천연물에 함유된 대사체들의 분석에 있어서는 목적하는 대사체의 종류에 따라 다양한 추출법이 사용될 수 있으나 아직까지 정형화된 추출용매의 선택에 대한 정립은 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에 사용한 각 추출 분획에 존재하는 특징적인 대사체들의 발굴과 동정을 위해서 다변량 통계분석을 실시하여 유의적 차이를 보이는 대사체를 선별하고 이들에 대한 동정을 실시하였다. Principal component analysis(PCA) 결과 ethyl acetate 분획과 methanol 분획에 함유된 대사체들은 positive ion mode에서는 주성분1 62.2%, 주성분2 25.2%의 변이에 의해 유의적인 차이를 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Negative ion mode에서 검출된 대사체들의 경우는 positive ion mode와 다르게 대사체들 간 변이의 92.7%가 주성분1에 의해 유의적인 차이를 나타내고 있었다(Fig. 2). 좀 더 세부적인 대사체들의 변이 분석을 위해서 OPLS-DA 분석을 실시하고 5% 유의수준에서 두 가지 용매 분획에 함유

된 특이적인 대사체들의 존재를 확인하여 관련 대사체들의 동정을 실시하였다(Fig. 3, Table 1). 동정 결과 positive

ion mode에서는 5-*O*-feruloylquinic acid, malvidin hexoside, malvidin-3-arabinoside, petunidin-3-arabi-

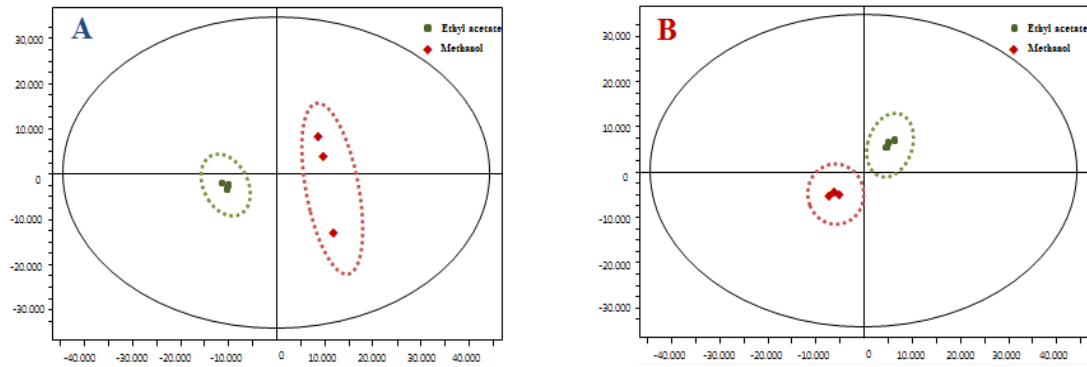


Fig. 2. Principal component analysis (PCA) score plot by different solvent extracts from blueberry (cultivar "Spartan"). A, positive ion mode; B, negative ion mode.

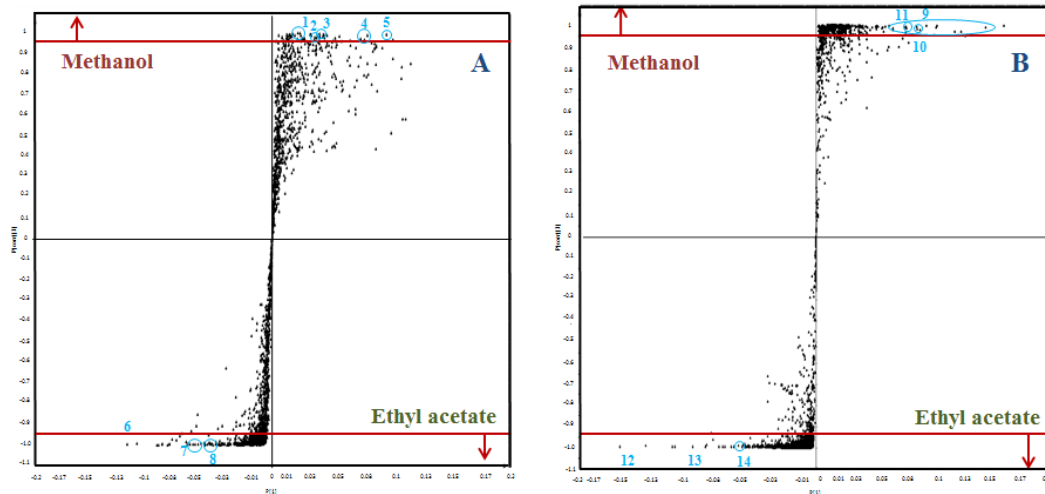


Fig. 3. S-Plot generated by orthogonal partial least squared discriminant analysis (OPLS-DA) for the metabolites in different solvent extracts from blueberry (cultivar "Spartan"). A, positive ion mode; B, negative ion mode. Refers to tentatively major biomarkers in Table 1.

Table 1. Identified metabolites differing between methanol and ethyl acetate extracts from blueberry (cultivar "Spartan") by LC-MS/MS spectrometry

No. ¹⁾	Time (min)	UV (nm)	m/z	MS/MS	Putative assignment
1	11.38	214, 325, 528	463.23	331.3	Malvidin-3-arabinoside
2	7.47	279, 328, 523	449.25	317.2	Petunidin-3-arabinoside
3	4.52	202, 277, 521	303.16	257.21, 302.94, 229.18	Delphinidin
4	10.05	208, 276, 524	369.22	163.29	5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid
5	7.56	208, 329, 523	493.27	330.97	Malvidin hexoside
6	5.37	203, 321	355.15	163.2	Chlorogenic Acid
7	20.56	223, 282	551.36	286.89, 346.97	6,8-di- <i>C</i> -Arabionopyranosyl-luteolin
8	19.19	225, 307	287.80	269.47	Luteolin
9	12.97	256, 330, 513	367.27	191.02, 178.96, 135.10	5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid
10	5.19	282, 295, 523	463.26	301.58	Delphinidin hexoside
11	6.47	207, 323, 526	477.22	314.95	Petunidin hexoside
12	5.37	288, 304, 336	707.53	352.95	Chlorogenic acid dimer
13	5.29	219, 236, 324	353.20	190.92	Chlorogenic acid
14	20.54	242, 263	527.42	263.20, 481.12	Abscisic acid dimer

¹⁾Metabolites tentatively selected as biomarkers in methanol and ethyl acetate extracts through OPLS-DA as indicated in Fig. 3.

noside, delphinidin 등의 대사체들이 methanol 분획에 존재하는 특이적인 화합물들로 나타났고, ethyl acetate 분획에는 chlorogenic acid, 6,8-di-*C*-arabinopyranosyl-luteolin, luteolin이 동정되었다(Table 1). Negative ion mode에서는 5-*O*-feruloylquinic acid, delphinidin hexoside, petunidin hexoside와 같이 주로 안토시아닌 계열의 화합물들이 존재하였고, ethyl acetate 분획에서는 플라보노이드 계열의 화합물들인 chlorogenic acid, chlorogenic acid dimer, abscisic acid dimer가 특이적 대사체로 추출되었음을 확인하였다(Table 1). 이러한 경향은 블루베리의 안토시아닌 추출을 위해서는 methanol이 가장 적절한 용매라는 Barnes 등(11)의 보고와 일치하는 결과였다. 블루베리에 함유된 유용 화합물들의 분석을 위해서 다양한 추출방법들이 사용되어 왔으나(1-13,15,17), 복잡한 단계를 거쳐 여러 종류의 단순한 조성의 추출물을 준비하는 과정에서 소량의 화합물들은 소실되어 분석 과정에서 그 존재를 확인하기 어려워 연구자들에 따라 상이한 결과가 나타나는 등의 어려움이 있었다. 또한 정확한 동정을 위한 표준물질이 없어 일반적인 PDA 검출기의 분석에서는 많은 한계가 있어 왔다. 이러한 한계점들의 극복을 위해 대사체학에 기반을 둔 대사체 profiling은 매우 유용한 접근법으로 다양한 시도가 이루어지고 있다(1,2,17). LC-MS/MS 분석에 기반을 둔 대사체 profiling은 기존의 복잡한 분석 단계와 달리 단순한 추출물로부터 전체적인 대사체의 profiling뿐 아니라, 목적하는 특정 유용 성분의 스크리닝까지 가능한 장점을 가지고 있다. 특히 블루베리와 같은 과실류에 존재하는 2차 대사산물인 폴리페놀 관련 대사체의 분석에 있어서는 기존의 분석법에서는 불가능했던 물질의 동정과 선별이 가능하게 된다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 positive와 negative ion mode 모두에서 methanol과 ethyl acetate 분획으로 추출할 수 있는 특징적인 대사체들을 OPLS-DA 분석을 통해서 손쉽게 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용한 블루베리의 methanol과 ethyl acetate 추출 분획에 존재하는 대사체의 분석을 통해 효율적인 대사체 profiling의 가능성을 탐색하였다. LC-MS/MS에서 검출되는 대사체를 통계 처리한 결과, methanol 추출 분획에서는 5-*O*-feruloylquinic acid, malvidin hexoside, malvidin-3-arabinoside, petunidin-3-arabinoside, delphinidin hexoside, delphinidin, petunidin hexoside와 같은 안토시아닌 계열의 화합물들이 존재하였고, ethyl acetate 분획에서는 chlorogenic acid, chlorogenic acid dimer, 6,8-di-*C*-arabinopyranosyl-luteolin, luteolin과 같은 플라보노이드 계열의 화합물이 검출되었다. 본 연구는 기존 연구와 달리 대사체학 기법을 이용한 블루베리 추출물 전체 대사물질의 profiling을 시도한

최초의 연구로서 블루베리에 함유된 유용 성분의 스크리닝 등 향후 응용 연구에 유용한 기반으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 아젠다연구과제(과제번호 PJ008550) 예산으로 수행된 연구의 일부로서 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Jimenez-Garcia SN, Guevara-Gonzalez RG, Miranda-Lopez R, Feregrino-Perez AA, Torres-Pacheco I, Vasquez-Cruz MA. 2013. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Res Int* 54: 1195-1207.
2. Heo SJ, Lee DY, Choi HK, Lee J, Kim JH, Cho SM, Lee HJ, Auh JH. 2011. Metabolite fingerprinting of bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel) by UPLC-qTOF-MS. *Food Sci Biotechnol* 20: 567-570.
3. Su MS, Chien PJ. 2007. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chem* 104: 182-187.
4. Martineau LC, Couture A, Spoor D, Benhaddou-Andaloussi A, Harris C, Meddah B, Leduc C, Burt A, Vuong T, Mai Le P, Prentki M, Bennett SA, Arnason JT, Haddad PS. 2006. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine* 13: 612-623.
5. Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. 2010. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the phenol-explorer database. *Eur J Clin Nutr* 64: S112-S120.
6. Perez-Jimenez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A. 2010. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: a application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem* 58: 4959-4969.
7. Westwood MN. 1993. *Temperate-zone pomology*. Timber Press, Portland, OR, USA. p 100-101.
8. Park HM, Yang SJ, Kang EJ, Lee DH, Kim DI, Hong JH. 2012. Quality characteristics and granule manufacture of mulberry and blueberry fruit extracts. *Korean J Food Cookery Sci* 28: 375-382.
9. Jeon MH, Lee WJ. 2011. Characteristics of blueberry added *Makgeolli*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 444-449.
10. Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. 2008. Analysis of nutritional compositions and antioxidative activities of Korean commercial blueberry and raspberry. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1375-1381.
11. Barnes JS, Nguyen HP, Shen S, Schug KA. 2009. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216: 4728-4735.
12. Ayaz FA, Hayirlioglu-Ayaz S, Gruz J, Novak O, Strand M. 2005. Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) fruit by HPLC-MS. *J Agric Food Chem* 53: 8116-8122.
13. Ballinger WE, Maness EP, Kushman LJ. 1970. Anthocyanins

- in ripe fruit of the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L. *J Am Soc Hortic Sci* 95: 283-285.
14. Saper GM, Burgher AM, Phillips JG, Jones SB, Stone EG. 1984. Color and composition of highbush blueberry cultivars. *J Am Soc Hortic Sci* 109: 105-111.
 15. Azar M, Verette E, Brun S. 1987. Identification of some phenolic compounds in blueberry juice *Vaccinium myrtillus*. *J Food Sci* 52: 1255-1257.
 16. Kader F, Rovel B, Girardin M, Metche M. 1996. Fractionation and identification of the phenolic compounds of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *Food Chem* 55: 35-40.
 17. Lee DY, Heo S, Kim SG, Choi HK, Lee HJ, Cho SM, Auh JH. 2013. Metabolomic characterization of the region- and maturity-specificity of *Rubus coreanus* Miquel (*Bokbunja*). *Food Res Int* 54: 508-515.
 18. Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *J Agric Food Chem* 52: 6178-6187.
 19. Hancock JF. 1989. Blueberry research in North America. *Acta Hortic* 214: 19-30.