

한국산 및 Canada산 High Bush Blueberry 열매의 항산화 활성 비교

윤주희 · 김지민 · 황완균[#]

중앙대학교 약학대학

(Received March 17, 2015; Revised May 22, 2015; Accepted June 4, 2015)

Comparative Anti-oxidant Activity of Korean and Canadian High Bush Blueberry Fructus

Ju-Hee Youn, Ji-Min Kim and Wan-Kyunn Whang[#]

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

Abstract — Blueberries (Ericaceae) are cultivated worldwide, and are used not only as foodstuff but also for reliefment of eyestrain. Blueberry species representatively includes highbush blueberry (*V. corymbosum* L.), lowbush blueberry (*V. angustifolium* AIT.), rabbiteye blueberry (*V. ashei* READE), and bilberry blueberry (*V. myrtillus* L.). All of these species contain large amounts of phenolics and anthocyanins. In this regard, we isolated six compounds from Korea cultivated blueberry and identified as 3-*O*-caffeoylquinic acid (1), 5-*O*-caffeoylquinic acid (2), myricetin-3-*O*- β -D-galactoside (3), quercetin-3-*O*-rutinoside (4), ethyl-3-*O*-caffeoylquinic acid ester (5), ethyl-5-*O*-caffeoyl quinic acid ester (6) by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS. Anti-oxidative activities of six compounds were verified by anti-oxidant assay such as DPPH, ABTS and Hypoxanthine/xanthine oxidase system. And then, anti-oxidant activities of Korea blueberry and Canadian were compared with each other. These results support that Korean blueberry has also the possibility to be potential supplementary material as healthy food like Canadian blueberry. Therefore, Korean blueberry can be used as a substitute of Canadian blueberry.

Keywords □ high bush blueberry (*V. corymbosum* L.), 3-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoyl quinic acid, myricetin-3-*O*- β -D-galactoside, quercetin-3-*O*-rutinoside, ethyl-3-*O*-caffeoyl quinic acid ester, ethyl-5-*O*-caffeoylquinic acid ester, anti-oxidant activity

Highbush blueberry(*Vaccinium. corymbosum*)는 진달래과(Ericaceae) 산앵도나무속(*Vaccinium*)의 낙엽성 또는 상록성의 과수로써 야생종은 열대 산악지대에서 온대와 아한대까지 널리 분포하고 있으며¹⁾ 키가 낮은 관목으로 최종 연령에 빨리 도달한다. 항산화 작용과 시력증진작용 등의 강력한 기능성을 보유한 원예 작물의 하나로 병해충이 적어 무농약으로 재배할 수 있는 친환경적 작물이라는 장점 때문에 한국, 미국, 캐나다, 독일, 우크라이나, 네덜란드, 이탈리아, 노르웨이, 루마니아, 스웨덴 등 많은 재배가 이루어지고 있다.¹⁾ 같은 기원임에도 산지에 따라 성장 또는 이화학적 차이를 확인할 수 있으며 대표적으로 수입산(Canada cultivated blueberry)은 열매가 매우 작아 흡사 앵두 *Prunus tomentosa* Thunb를 연상케 하는 반면 국내산은 포도알과 같이

크고 굵은 편이라는 점을 들 수 있다.

Blueberry는 acetic acid와 phenolics성분에 대한 항산화 효능 연구²⁻⁴⁾를 비롯하여 이미 많은 강력한 항산화효과가 입증되었으며 현재에도 활발히 연구가 이루어지고 있다. blueberry 열매에는 18종의 anthocyanins, 5종의 flavonols, 2종의 flavan-3-ols, 9종의 hydroxycinnamic acid derivatives 등의 성분들이 존재하며⁵⁾ 이 중 myricetin, quercetin, chlorogenic acid, rutin, laricitrin, kamferol, syringetin, isorhamnetin 등과 이들의 isomer는 blueberry fruit의 주된 성분으로 주로 이를 기반으로 한 연구가 많이 이루어졌고^{6,7)} 항암,^{8,9)} 항염증¹⁰⁾에도 탁월한 효능을 지닌 것으로 알려져 있다. 반면 국내에서 재배되는 blueberry는 외국산에 비해 연구가 미비하여 고가의 수입 blueberry가 효능적 측면에서 국내산 blueberry보다 월등히 좋다는 잘못된 인식이 생김에 따라 국내산 blueberry 역시 높은 효용가치를 지녔음에도 불구하고 국내산 blueberry의 대중화가 힘든 실정이다. 때문에 국내에서 재배하는 blueberry의 성분과 그 효능적인 측면에서의 연구가 필요하다.

[#]Corresponding Author

Wan-Kyunn Whang
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea
Tel.: 02-820-5614 Fax.: 02-826-8756
E-mail: whang-wk@cau.ac.kr

이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 국내산과 수입산 blueberry의 activity-guided fractionation을 통해 활성성분을 분리하여 구조 규명을 실시하였으며 또한 항산화능 실험을 진행하여 수입 blueberry를 국내 blueberry로 대체가능하다는데 과학적 근거를 제시할 목적으로 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용한 국산 blueberry 시료는 고관목성 highbush blueberry(*V. corymbosum*)로써 2011년 2월 강원도 평창에서 재배된 것을 수집, 외국산은 Canada에서 재배된 것을 냉동 구입하여 중앙대학교 약품자원식물화학연구실에서 자문위원 경희대학교 육창수교수님께서 기원 및 형태학적 감정을 거친 후 연구의 재료로 사용하였으며 그 표본은 중앙대학교 표본실에 위치하고 있다.

실험기기 및 시약

본 연구에 사용한 기기로는 UV/VIS spectrophotometer(Human TU-1800PC, Korea, Optizen 2120 UV), ELISA reader (VERSAMMax), FAB-MS spectrometer(VG 70-VSEQ, England), Bath(Daihan-Sci LSB-045S, Korea), Balance(Mettler-Toledo ML204, Switzerland), Centrifuge(Hanil science industrial Co. Union Combi-514R, Korea), Vortex mixer(Thermolyne type 37600 mixer, U.S.A, Shaking Water), $^1\text{H-NMR}$ spectrometer (Varian Gemini 2000, 600MHz, Varian, Palo Alto, U.S.A.), $^{13}\text{C-NMR}$ spectrometer(Varian Gemini 2000, 150 MHz, Varian, Palo Alto, U.S.A.) 등이 있으며 Column chromatography 충전제로는 Diaion HP-20(Nippon Rensui Co., Japan), Sephadex LH-20(25~100 μm , pharmacia, Sweden), MCI gel CHP20P(75~150 μm , Mitsubishi, Japan)를 사용하였다. 항산화 활성 측정을 위한 Trolox, Allopurinol, Hypoxanthine, L-ascorbic acid, Potassium persulfate, Potassium phosphate, Dimethyl sulfoxide (DMSO), 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, Nitrotetrazolium blue chloride(NBT), Xanthine oxidase Grade IV: From milk, Ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA), L-Ascorbic acid, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfate Acid)(ABTS)는 Sigma Aldrich(Milw., WI, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

추출 및 분리

냉동 Korea cultivated blueberry(*V. corymbosum*) 2 kg과 냉동 Canada cultivated blueberry(*V. corymbosum*) 90 g을 분쇄기를 이용하여 세절한 후 시료에 50% ethanol 2 l를 첨가하여 3시간 초음파 추출 후 24시간 방치, 여과 감압 농축하였으며 이를 2회

반복 실시하여 Korea cultivated blueberry extracts 175 g, Canada cultivated blueberry extracts 10 g을 얻었다. 이 추출물을 증류수 1 l에 현탁시키고 hexane, ethyl acetate, butanol을 이용하여 차례로 분획을 실시한 후 각 분획물들에 대한 항산화능을 DPPH 시험법에 따라 측정된 결과, 높은 항산화능을 보인 Korea cultivated blueberry의 ethyl acetate층을 이용하여 분리를 진행하였다.

Sephadex LH-20(이동상 30% methanol)을 이용하여 크게 분획을 나눈 다음 sephadex LH-20(이동상 20% methanol), MCI (30% methanol) gel을 이용하여 ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester, ethyl-5-O-caffeoylquinic acid ester를 분리하였고, sephadex LH-20(이동상 30% methanol) gel을 이용하여 myricetin-3-O- β -D-galactoside를, sephadex LH-20(이동상 30% methanol), MCI (20% methanol), sephadex LH-20(20% methanol) gel을 이용하여 5-O-caffeoylquinic acid, 3-O-caffeoylquinic acid를 분리하였다. 또한 MCI(50% methanol) gel을 이용하여 quercetin-3-O-rutinosid를 분리하였다.

3-O-Caffeoylquinic acid

얇은 분홍색의 무정형.

Positive FAB-MS: m/z 355[M+H]⁺, 377[M+Na]⁺

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD₃OD): 1.83~1.77(1H, dd, J=1.4, 7.2 Hz, H-6 α), 2.03~1.99(2H, m, H-2 $\alpha\beta$, 6 $\alpha\beta$), 2.16(1H, dd, J=3.6, 15.6 Hz, H-2 α), 3.71(1H, dd, J=3, 10.8 Hz, H-4), 4.15(1H, d, H-5), 5.36(1H, m, J=3.6, 4.8, 5.4 Hz, H-3), 6.31(1H, d, J=15.6 Hz, H-8'), 6.80~6.96(1H, dd, d, J=1.2, 7.8 Hz, H-6'), 7.07(1H, s, H-2'), 7.57(1H, d, J=16.2 Hz, H-7').

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD₃OD): 40.5(C-2), 74.1(C-3), 74.7(C-4), 57.9(C-5), 42.1(C-6), 171.0(C-7), 129.5(C-1'), 116.9(C-2'), 148.3(C-3'), 151.1(C-4'), 118.3(C-5'), 124.7(C-6'), 148.6(C-7'), 117.2(C-8'), 167.8(C-9').

5-O-Caffeoylquinic acid

얇은 분홍색의 무정형.

Positive FAB-MS: m/z 355[M+H]⁺, 377[M+Na]⁺

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD₃OD): 2.10~2.02(1H, br ddd, H-2 α), 2.19~2.13(3H, br dd, H-2 β , 6 α , 6 β), 4.16~4.14(1H, d, J=8.5 Hz, H-3), 3.72(1H, d, J=8.5, 3.0 Hz, H-4), 5.34~5.28(1H, m, H-5), 7.03(1H, s, H-2'), 6.76(1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.94(1H, d, J=8, 2.0 Hz, H-6'), 7.54(1H, d, J=15.5 Hz, H-7'), 6.24(1H, d, J=16.0 Hz, H-8').

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD₃OD): 38.0(C-2), 69.9(C-3), 72.1(C-4), 72.5(C-5), 38.7(C-6), 176.6(C-7), 127.2(C-1'), 116.1(C-2'), 146.9(C-3'), 149.7(C-4'), 117.3(C-5'), 123.2(C-6'), 146.6(C-7'),

115.9(C-8'), 167.5(C-9').

Myricetin-3-O-β-D-galactoside

황색의 무정형

Positive FAB-MS: m/z 479[M+H]⁺, 316[M+H-Glc]⁺ (myricetin).

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD); 6.20(1H, d, J=1.8 Hz, H-6), 6.42(1H, d, J=2.4 Hz, H-8), 7.57(1H, d, J=1.8 Hz, H-2'), 7.57(1H, d, J=1.8 Hz, H-6'), 5.39(1H, d, J=7.8 Hz, anomeric H glc), 3.82~3.80(1H, r, J=9 Hz, anomeric H-4' gala), 3.56(1H, s, J=3.6 Hz, anomeric H-3' gala).

¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD): 157.0(C-2), 134.2(C-3), 178.0(C-4), 161.6(C-5), 95.8(C-6), 164.8(C-7), 93.4(C-8), 157.0(C-9), 104.3(C-10), 120.5(C-1'), 106.7(C-2'), 147.4(C-3'), 138.5(C-4'), 147.4(C-5'), 106.7(C-6'), 102.7(gal-1), 71.8(gal-2), 73.6(gal-3), 68.6(gal-4), 75.9(gal-5), 60.8(gal-6).

Quercetin-3-O-rutinoside

황색의 무정형.

Positive FAB-MS: m/z 487[M+Na]⁺, 447[M+H-Glg-Rha]⁺ (quercetin).

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD); 7.61(1H, s, H-2'), 7.16(1H, s, H-6'), 6.87(1H, d, J=8.4 Hz, H-5'), 6.39(1H, d, J=1.8 Hz, H-8), 6.19(1H, d, J=2.1 Hz, H-6), 5.34(1H, d, J=6.6 Hz, anomeric Glc H), 0.54(1H, d, J=8.4 Hz, Rha CH₃).

¹³C-NMR(150 MHz, CD₃OD): 157.5(C-2), 135.0(C-3), 178.7(C-4), 158.1(C-5), 103.7(C-6), 162.4(C-7), 95.4(C-8), 158.1(C-9), 104.8(C-10), 123.4(C-1'), 116.8(C-2'), 149.9(C-3'), 56.6(C-3'-OCH₃), 146.2(C-4'), 117.5(C-5'), 122.7(C-6'), 103.7(glc-1), 75.6(glc-2), 77.2(glc-3), 71.3(glc-4), 78.9(glc-5), 69.4(glc-6), 102.6(rha-1), 72.7(rha-2), 72.9(rha-3), 74.6(rha-4), 71.3(rha-5), 17.3(rha-CH₃).

Ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester

열은 황색의 무정형.

Positive FAB-MS: m/z 405[M+Na]⁺

¹H-NMR(600 MHz, DMSO-d₆); 7.41(1H, d, J=15.6 Hz, H-7'), 7.01(1H, d, J=2.4 Hz, H-2'), 6.94(1H, dd, J=8.4, 2.4 Hz, H-6'), 6.70(1H, d, J=7.8 Hz, H-5'), 6.07(1H, d, J=15.6 Hz, H-8'), 3.89(1H, J=4.2, 3 Hz, H-3.), 5.01(1H, dt, J=9.6 Hz, H-5), 3.60(1H, dd, H-4), 3.60(1H, m, H-8), 2.15(1H, ddd, J=12.6, 5.4, 3.6 Hz, H-6a), 1.96(J=13.2 Hz, H-2), 1.67(1H, t, H-9).

¹³C-NMR(150 MHz, DMSO-d₆): 77.6(C-1), 39.7(C-2), 72.1(C-3), 74.3(C-4), 74.0(C-5), 39.5(C-6), 177.0(C-7), 64.6(C-8),

16.1(C-9), 129.4(C-1'), 118.5(C-2'), 117.0(C-3'), 151.4(C-4'), 149.2(C-5'), 116.8(C-6'), 148.5(C-7'), 125.0(C-8'), 170.4(C-9').

Ethyl-5-O-caffeoylquinic acid ester

열은 황색의 무정형

Positive FAB-MS: m/z 405[M+Na]⁺

¹H-NMR(600 MHz, DMSO-d₆); 7.53(1H, d, J=15.6 Hz, H-7'), 7.07(1H, d, J=2.4 Hz, H-2'), 6.81(1H, dd, J=7.8 Hz, H-6'), 6.69(1H, d, J=8.4, 1.8 Hz, H-5'), 6.23(1H, d, J=15.6 Hz, H-8'), 5.26(1H, brs, J=12.6, 7.2 Hz, H-3.), 3.61~3.76(1H, dd, dt, H-4, H-5), 4.18~4.10(1H, m, H-8), 2.21(1H, ddd, H-6a), 1.96(m, J=13.8 Hz, H-2), 1.23(1H, t, H-9).

¹³C-NMR(150 MHz, DMSO-d₆): 77.4(C-1), 39.5(C-2), 74.0(C-3), 73.9(C-4), 71.8(C-5), 39.2(C-6), 176.9(C-7), 64.5(C-8), 16.0(C-9), 129.2(C-1'), 118.4(C-2'), 116.9(C-3'), 151.2(C-4'), 149.0(C-5'), 116.6(C-6'), 148.3(C-7'), 124.8(C-8'), 170.3(C-9')

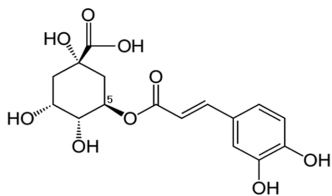
항산화활성측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 항산화능 측정 - 각각의 시료 10 μl(control: 95.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH용액 190 μl(99.5% ethanol)을 가하여 4가지 농도(3 mM, 1 mM, 500 μM, 200 μM)의 검액을 조제하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 20분 동안 incubation시키고 tecan austria gmbh(ELISA reader, BIO-RAD, US)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하여 역시 4가지 농도로 조제하여 측정하였으며 각 시료의 항산화능은 IC₅₀으로 나타내었다.

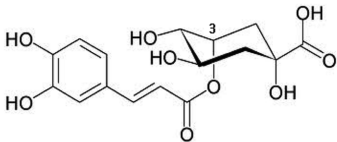
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)를 이용한 항산화능 측정 - ABTS assay는 Arnao MB의 방법에 의거하여 항산화능을 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate 용액을 혼합하여 12시간 차광 방치 하였고 이 용액을 stock solution으로 하여 methanol을 이용해 732 nm에서 흡광도가 0.8~1.2 범위에 들어오도록 희석하였다. 농도별 시료 50 μl와 희석된 ABTS⁺ radical solution 950 μl을 혼합하여 실온에서 20분간 차광 방치 후 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 732 nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 trolox를 사용하여 농도별로 조제하여 측정하였으며 각 시료의 항산화능은 IC₅₀으로 나타내었다.

Hypoxanthine/xanthine oxidase system을 이용한 항산화능 측정 - 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)와 10 mM K-EDTA, 30 mM hypoxanthine, 10 mM NBT를 혼합한 후 distilled water로 부피를 맞추어 reaction mixture를 만들었다. 96well에 reaction mixture 160 μl와 시료 20 μl, xanthine oxidase 20 μl을 함께 소분하여 37°C에서 8분간 incubation시킨

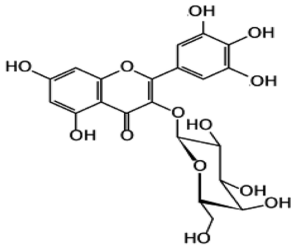
후 상온에서 2분간 방치한 뒤 tecan austria gmbh(ELISA reader, BIO-RAD, USA)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 Xanthine oxidase억제제로 알려진 allopurinol을 사용하였으며 각 시료의 항산화능은 IC_{50} 으로 나타내었다.



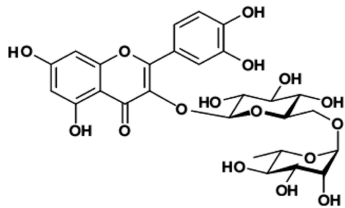
3-*O*-caffeoylquinic acid (C₁₆H₁₈O₉)



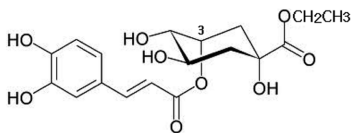
5-*O*-caffeoylquinic acid (C₁₆H₁₈O₉)



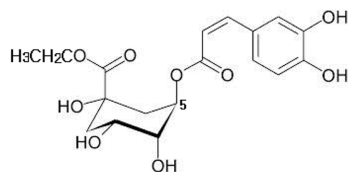
Myricetin-3-*O*-β-D-galactoside (C₂₁H₂₃O₁₂)



Quercetin-3-*O*-rutinoside (C₂₈H₃₂O₁₆)



Ethyl-3-*O*-caffeoylquinic acid ester (C₁₈H₂₃O₉)



Ethyl-5-*O*-caffeoylquinic acid ester (C₁₈H₂₃O₉)

Fig. 1 – Structure of compound.

결과 및 고찰

Korea, Canada cultivated blueberry(*V. corymbosum*)를 각각 50% ethanol로 추출한 후 hexane, ethyl acetate, butanol 순으로 용매분획을 실시하여 4가지 분획물을 얻었다. 산지별로 각각의 분획물을 DPPH를 이용하여 항산화능을 비교한 결과 산지별 차이가 적으면서 최상의 활성층인 ethyl acetate 분획층을 대상으로 Sephadex LH-20과 MCI open column을 통하여 6종의 화합물을 얻었다. 얻어진 화합물을 이화학적 성상 및 문헌조사, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS를 이용하여 3-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, myricetin-3-*O*-β-D-galactoside, quercetin-3-*O*-rutinoside, ethyl-3-*O*-caffeoylquinic acid ester, ethyl-5-*O*-caffeoylquinic acid ester로 최종 구조 동정하였다(Fig. 1).

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 항산화능 측정

한국 및 Canada에서 수확한 blueberry의 50% ethanol 추출물과 용매분획을 통해 얻은 분획층을 최종농도 150, 50, 25, 10 ppm으로 조제하여 DPPH를 이용한 항산화능을 측정된 결과 한국 및 Canada 산 blueberry ethyl acetate층이 양성대조군인 L-ascorbic acid와 비교하였을 때 우수한 항산화능을 가진 것으로 나타났다. 두 산지모두 ethyl acetate 분획층의 radical scavenging activity가 가장 우수하였으며 이어서 butanol>hexane>extract>water 순으로 그 효능을 확인하였다. 캐나다산 역시 ethyl acetate>hexane>butanol>extract>water 순으로 국내산과 비슷한 패턴을 가지는 것으로 나타났다(Table I).

Blueberry의 활성 분획인 ethyl acetate층에서 분리한 compound를 농도별(50, 25, 10, 5 μM)로 조제하여 실험한 결과 비교적 우수한 항산화능을 가지는 것을 확인하였으며 ethyl-3-*O*-caffeoylquinic acid ester>ethyl-5-*O*-caffeoylquinic acid ester>myricetin-3-*O*-β-D-galactoside>3-*O*-caffeoylquinic acid>5-*O*-caffeoylquinic acid>quercetin-3-*O*-rutinoside의 순으로 확인하였고 그 중 ethyl-5-*O*-caffeoylquinic acid ester의 경우 양성대조군인 L-ascorbic acid와 비교적 흡사한 항산화능을 보였다(Table II).

Table I – IC_{50} values of extract and fractions from Korea, Canada cultivated blueberry in DPPH free radical scavenging activity. Each value represents the mean±S.D. (n=3)

Korea blueberry	IC_{50} (ppm)*	Canada blueberry	IC_{50} (ppm)*
Ethyl acetate	70.4±2.9	Ethyl acetate	45.9±1.3
Butanol	153.8±8.5	Hexane	101.0±4.4
Hexane	206.1±4.4	Butanol	145.4±3.3
Extract	231.3±9.2	Extract	301.6±4.4
Water	468.6±182.4	Water	537.9±168.9

Table II – IC₅₀ values of compound from Korea, Canada cultivated blueberry in DPPH free radical scavenging activity. Each value represents the mean±S.D. (n=3)

Sample	IC ₅₀ (ppm)*
3-O-Caffeoylquinic acid	41.7±1.8
5-O-Caffeoylquinic acid	47.2±3.9
Myricetin-3-O-β-D-galactoside	34.6±0.6
Quercetin-3-O-rutinoside	98.9±6.6
Ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester	29.7±2.8
Ethyl-5-O-caffeoylquinic acid ester	30.9±0.7

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)를 이용한 항산화능 측정

한국 및 Canada에서 수확한 blueberry의 50% ethanol 추출물과 분획물에 대한 DPPH free radical scavenging activity를 기반으로 항산화능이 높을 것으로 예상되는 ethyl acetate와 butanol 분획층을 선별하여 ABTS를 이용한 항산화능의 비교 분석을 시행하였다. 한국 및 Canada 산 blueberry 각각의 ethyl acetate, butanol 분획층을 농도별(150, 50, 25, 10 ppm)로 제조하여 이를 검액으로 radical scavenging activity를 측정된 결과 Korean, Canadian blueberry의 ethyl acetate층이 양성대조군인 trolox와 비교하였을 때 우수한 항산화능을 가진 것으로 나타났다. Canadian blueberry의 ethyl acetate의 radical scavenging activity가 가장 높았으며 다음으로 Korean blueberry의 ethyl acetate>Canadian blueberry의 butanol>Korean blueberry의 butanol 순으로 수치를 확인할 수 있었다(Table III).

Blueberry의 활성 분획인 ethyl acetate층에서 분리한 compound를 대상으로 농도별(50, 25, 10, 5 μM) 시료를 조제하여 실험한 결과 비교적 우수한 항산화능을 가지는 것을 quercetin-

Table III – IC₅₀ values of ethyl acetate, butanol fraction from Korea, Canada cultivated blueberry in ABTS free radical scavenging activity. Each value represents the mean±S.D. (n=3)

Sample	IC ₅₀ (ppm)*
Canadian blueberry의 ethyl acetate	44.6±1.0
Korean blueberry의 ethyl acetate	80.5±0.3
Canadian blueberry의 butanol	98.1±0.1
Korean blueberry의 butanol	122.2±3.1

Table IV – IC₅₀ values of compound from Korea, Canada cultivated blueberry in ABTS free radical scavenging activity. Each value represents the mean±S.D. (n=3)

Sample	IC ₅₀ (ppm)*
3-O-caffeoylquinic acid	39.6±0.1
5-O-caffeoylquinic acid	40.1±0.9
Myricetin-3-O-β-D-galactoside	41.8±0.3
Quercetin-3-O-rutinoside	22.6±0.4
Ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester	34.9±0.2
Ethyl-5-O-caffeoylquinic acid ester	39.0±0.4

3-O-rutinoside>ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester>ethyl-5-O-caffeoylquinic acid ester>3-O-caffeoylquinic acid>5-O-caffeoylquinic acid>myricetin-3-O-β-D-galactoside의 순으로 확인하였고 그 중 quercetin-3-O-rutinoside의 경우 양성대조군인 trolox와 비교적 흡사한 항산화능을 보였다(Table IV).

Hypoxanthine/xanthine oxidase system을 이용한 항산화능 측정

한국 및 Canada에서 수확한 blueberry의 50% ethanol 추출물과 분획물에 대한 DPPH free radical scavenging activity를 기반으로 항산화능이 높을 것으로 예상되는 분획층인 ethyl acetate와 butanol을 선별하여 superoxide scavenging activity의 비교 분석을 시행하였다. 한국 및 Canada 산 blueberry 각각의 ethyl acetate, butanol 분획층을 농별 (100, 50, 20, 10 ppm)로 제조하여 이를 검액으로 radical scavenging activity를 측정된 결과 Canada 산 blueberry ethyl acetate층이 양성대조군인 allopurinol와 비교하였을 때 가장 우수한 항산화능을 가진 것으로 나타났으며 Canada blueberry의 ethyl acetate>Canada blueberry의 butanol>Korea blueberry의 ethyl acetate>Korea blueberry의 butanol 순으로 효능을 확인하였다(Table V).

Blueberry의 활성 분획인 ethyl acetate층에서 분리한 compound를 대상으로 농도별(50, 25, 10, 5 μM) 시료를 조제하여 실험한 결과 비교적 우수한 항산화능을 가지는 것을 ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester>3-O-caffeoylquinic acid>myricetin-3-O-β-D-galactoside>quercetin-3-O-rutinoside>ethyl-5-O-caffeoylquinic acid ester>5-O-caffeoylquinic acid의 순으로 확인하였고 그 중 ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester의 경우 양성대조군인 allopurinol와 비교적 흡사한 항산화능을 보였다(Table VI).

Table V – IC₅₀ values of ethyl acetate, butanol fraction from Korea, Canada cultivated blueberry in superoxide scavenging activity. Each value represents the mean±S.D. (n=3)

Sample	IC ₅₀ (ppm)*
Canadian blueberry의 ethyl acetate	35.5±2.0
Korean blueberry의 ethyl acetate	68.8±7.0
Canadian blueberry의 butanol	66.9±8.5
Korean blueberry의 butanol	92.2±1.2

Table VI – IC₅₀ values of compound from Korea, Canada cultivated blueberry in superoxide scavenging activity. Each value represents the mean±S.D. (n=3)

Sample	IC ₅₀ (ppm)*
3-O-caffeoylquinic acid	33.0±4.1
5-O-caffeoylquinic acid	55.8±7.4
Myricetin-3-O-β-D-galactoside	33.4±10.4
Quercetin-3-O-rutinoside	50.0±3.3
Ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester	25.3±4.9
Ethyl-5-O-caffeoylquinic acid ester	53.5±3.5

결 론

Highbush blueberry(*V. corymbosum*)의 국내 재배는 이미 활발하게 이루어지고 있으나 아직도 수입산에 대한 의존도가 월등히 높은 상태이기 때문에 수입 blueberry와 국내 blueberry의 비교를 통해 국내산이 수입산의 대체품으로서 효능이 있음에 과학적 근거를 제시할 목적으로 본 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 국내산과 수입산 blueberry를 각각 추출, 분획하여 DPPH를 이용해 항산화능을 측정 및 비교 분석하였고, 활성이 높은 ethyl acetate층에서 활성성분을 분리하여 각종 구조 분석을 통해 3-O-caffeoylquinic acid(1), 5-O-caffeoylquinic acid(2), myricetin-3-O-β-D-galactoside(3), quercetin-3-O-rutinoside(4), ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester(5), ethyl-5-O-caffeoylquinic acid ester(6)으로 동정하였다.

분리된 6종의 성분을 대상으로 DPPH, ABTS, hypoxanthine/xanthine oxidase system의 세 가지 anti-oxidant assay를 실시한 결과, quercetin-3-O-rutinoside와 ethyl-3-O-caffeoylquinic acid ester를 비롯한 대부분의 성분들이 양성대조군과 비교하여 우수한 항산화능을 가지는 것을 확인하였고 이를 통해 한국산 blueberry의 항산화적 효능에 대한 과학적 근거를 제시하였다.

또한 국내산과 수입산의 각 분획층의 DPPH free radical scavenging activity 측정을 기반으로 높은 항산화능을 보였던 ethyl acetate, butanol 분획층을 선정하여 이에 대한 ABTS free radical scavenging activity, hypoxanthine/xanthine oxidase를 이용한 superoxide scavenging activity를 측정하여 IC₅₀을 비교한 결과 국내산이 수입산보다 우수하지는 않으나 그 차이가 미비하여 유사한 항산화능을 가지는 것을 확인하였다.

따라서 본 연구자료는 국내산 blueberry에서 분리 동정한 성분들을 기반으로 국내산과 수입산 blueberry의 항산화능을 비교 분석한 객관적이고 과학적인 근거 제시를 통해 국내산 blueberry가 수입산 blueberry의 대용으로 기능성 식품, 화장품 등의 원료로서 사용가능함을 보여주는 자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 2014년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(14172천원물276)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- 1) 농촌진흥청, 블루베리, p. 18, 19, 20-25, 28, 30 (2009).
- 2) Ono, M., Masuoka, C., Koto, M., Tateishi, M., Komatsu, H., Kobayashi, H., Igoshi, K., Ito, Y., Okawa, M. and Nohara T. : Antioxidant ortho-benzoyloxyphenyl acetic acid ester, vacihein a, from the fruit of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*). *Chem. Pharm. Bull.* **50**, 1416 (2002).
- 3) Sellappan, S., Akoh, C. C. and Krewer, G. : Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2432 (2002).
- 4) Zheng, W. and Wang, S. Y. : Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 502 (2003).
- 5) Gavrilo, V., Kajdzanoska, M., Gjamovski, V. and Stefova, M. : Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 4009 (2011).
- 6) Cho, M., Howard, L. R., Prior, R. L. and Clark, J. R. : Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **84**, 1771 (2004).
- 7) Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H. and Hermosín-Gutiérrez, I. : Flavonol 3-O-glycosides series of vitis vinifera Cv. petit verdot red wine grapes. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 219 (2009).
- 8) Murphy, B. T., MacKinnon, S. L., Yan, X., Hammond, G. B., Vaisberg, A. J. and Neto, C. C. : Identification of triterpene hydroxycinnamates with in vitro antitumor activity from whole cranberry fruit(*Vaccinium macrocarpon*). *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3541 (2003).
- 9) Catherine, C. and Neto, C. C. : Ursolic acid and other pentacyclic triterpenoids: anticancer activities and occurrence in berries. *Berries and Cancer Prevention* **41** (2011).
- 10) Jeong, C. H., Choi, S. G. and Heo, H. J. : Analysis of nutritional compositions and antioxidative activities of korean commercial blueberry and raspberry. *Korean Society of Food Science and Nutrition* **37**, 1375 (2008).