



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2018年 8月
博士學位論文

베리류의 안토시아닌 조성과
주요 광학이성질체 향기성분의
ee-value에 관한 연구

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

洪 準 浩

베리류의 안토시아닌 조성
과 주요 광학이성질체 향기성분의
ee-value에 관한 연구

Studies on the Anthocyanins Composition
and Enantiomeric Excess of Chiral Volatile
Flavor Compounds of Berry Species

2018年 8月 24日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

洪 準 浩

베리류의 안토시아닌 조성과
주요 광학이성질체 향기성분의
ee-value에 관한 연구

指導教授 金 敬 洙

이 論文을 博士學位 申請論文으로 提出함.

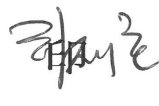


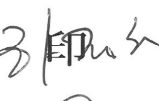

2018年 4月

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

洪 準 浩

洪準浩의 博士學位論文을 認准함

委員長	世界김치연구소	河 允浩	
委 員	食品醫藥品安全處	韓 相培	
委 員	朝鮮大學校	李 周珉	
委 員	朝鮮大學校	河 廷憲	
委 員	朝鮮大學校	金 敬洙	

2018年 6月

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT	xvi
 Part I. 베리류의 안토시아닌 조성 비교에 관한 연구	 1
제 1 장 서 론	2
 제 2 장 재료 및 방법	 10
제 1 절 실험재료 및 기기	10
1. 시료	10
2. 시약 및 기기	10
 제 2 절 실험방법	 13
1. 시료 조제	13
1) 베리류의 추출물 조제	13
2) 안토시아닌의 정제	13
2. 폴리페놀 함량	16
3. 총 플라보노이드 함량	16
4. 총 안토시아닌 함량	16
5. 안토시아닌 성분 분석	19
1) HPLC-PDA-ESI-TOF/MS 조건	19
2) 안토시아닌 정량 분석	20
3) 분석법 유효성 검증	24
6. 통계 처리	25
 제 3 장 결과 및 고찰	 26

제 1 절 베리류의 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 함량	26
제 2 절 베리류의 안토시아닌 개별 성분 분리 및 동정	31
1. 안토시아닌과 비당체의 분리분석 및 분광학적 이해	31
2. 베리류의 안토시아닌 분리동정	37
1) 양딸기(Strawberry)의 안토시아닌 동정	37
2) 라즈베리(Raspberry)의 안토시아닌 동정	40
3) 블루베리(Blueberry)의 안토시아닌 동정	44
4) 블랙베리(Korean Blackberry)의 안토시아닌 동정	53
5) 크랜베리(Cranberry)의 안토시아닌 동정	57
6) 아로니아(Aronia)의 안토시아닌 동정	62
7) 오디(Mulberry)의 안토시아닌 동정	66
3. 베리류의 안토시아닌 조성 비교	69
제 3 절 베리류의 안토시아닌 함량 비교	73
1. 안토시아닌 함량 분석법 유효성 검증	73
1) 특이성(specificity)	73
2) 직선성(Linearity)	73
3) 정확성(Accuracy)	73
4) 정밀성(Precision)	74
5) 검출한계 및 정량한계(LOD, LOQ)	74
2. 베리류의 안토시아닌 함량 분석	76
제 4 장 요 약	83
참고문헌	85

Part II. 베리류의 휘발성 향기성분 분석	94
제 1 장 서 론	95
제 2 장 재료 및 방법	100
제 1 절 실험재료 및 기기	100
1. 시료	100
2. 시약	100
3. 휘발성향기 추출장치 및 분석기기	100
제 2 절 휘발성 향기성분의 추출 및 분석조건 수립	102
1. 추출방법에 따른 휘발성 향기성분 비교	102
1) 연속수증기증류추출법(SDE)	102
2) 고체상미량추출법(SPME)	104
2. GC/MS를 이용한 휘발성 향기성분의 분리분석	106
제 3 절 베리류의 휘발성 향기성분 분석	109
1. 휘발성 향기성분의 동정	109
1) 머무름지수(RI)의 설정	109
2) 휘발성 향기성분의 동정	113
2. 휘발성 향기성분의 정량	113
제 3 장 결과 및 고찰	115
제 1 절 베리류의 휘발성 향기성분 추출을 위한 HS-SPME 조건 확립	115
1. SPME absorption fiber의 종류에 따른 비교	115
2. SPME 이용 향기성분 추출의 염색효과	118

제 2 절 SDE법에 의한 베리류 휘발성 향기성분	120
1. 양딸기(Strawberry)의 휘발성 향기성분	120
2. 라즈베리(Raspberry)의 휘발성 향기성분	128
3. 블루베리(Blueberry)의 휘발성 향기성분	133
4. 블랙베리(Korean Blackberry)의 휘발성 향기성분	139
5. 크랜베리(Cranberry)의 휘발성 향기성분	145
6. 아로니아(Aronia)의 휘발성 향기성분	152
7. 오디(Mulberry)의 휘발성 향기성분	158
제 4 장 요 약	162
참고문헌	164

Part III. 베리류의 키랄성 향기성분의 ee-value에 관한 연구 ...	172
제 1 장 서 론	173
제 2 장 재료 및 방법	178
제 1 절 실험재료 및 기기	178
1. 시료	178
2. 시약	178
3. 분석기기	178
제 2 절 키랄성 향기성분의 분석을 위한 MDGC/MS의 분석조건	181
1. 키랄성 향기성분의 분리를 위한 최적의 column 선택	181
2. MDGC/MS에 의한 키랄성 향기성분의 분석	181
제 3 장 결과 및 고찰	184
제 1 절 키랄성 향기성분의 분석 조건 확립	184
제 2 절 베리류의 주요 키랄성 향기성분의 이성질체 조성비 분석	189
1. 양딸기(Strawberry)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석	190
2. 블루베리(Blueberry)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석	196
3. 블랙베리(Korean Blackberry)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석	200
4. 크랜베리(Cranberry)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석	205
5. 아로니아(Aronia)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석	208
제 4 장 요 약	212
참고문헌	214

표 목 차

Table 1-1. Colors and structural features of some anthocyanidin	8
Table 1-2. Biological classification of berry species	12
Table 1-3. HPLC-PDA-ESI-TOF/MS analytical condition for anthocyanins of berry species	21
Table 1-4. Contents of total phenolic compound, total flavonoid and total anthocyanin of each extract of berry species	29
Table 1-5. Chemical structures and molecular weights of six common anthocyanidins and anthocyanins	34
Table 1-6. Identification of anthocyanins of strawberry by HPLC-DAD -ESI(+)-TOF/MS	39
Table 1-7. Identification of anthocyanins of raspberry by HPLC-DAD - ESI(+)-TOF/MS	43
Table 1-8. Identification of anthocyanins of blueberry by HPLC-DAD -ESI(+)-TOF/MS	51
Table 1-9. Identification of anthocyanins of Korean blackberry by HPLC -DAD-ESI(+)-TOF/MS	56
Table 1-10. Identification of anthocyanins of cranberryby HPLC-DAD -ESI(+)-TOF/MS	61
Table 1-11. Identification of anthocyanins of aronia by HPLC-DAD - ESI(+)-TOF/MS	65

Table 1-12. Identification of anthocyanins of mulberry by HPLC-DAD -ESI(+)-TOF/MS	68
Table 1-13. Identification of thirty-one anthocyanins of berry species	70
Table 1-14. Distribution of anthocyanin of berry species	72
Table 1-15. Repeatability of six common anthocyanin	74
Table 1-16. Result of method validation for the determination of anthocyanins of berry species	75
Table 1-17. Contents of anthocyanins of berry species	79
Table 1-18. Contents of anthocyanins as aglycon(anthocyanidin) of berry species	81
Table 2-1. GC/MS conditions for identification of volatile flavor compounds	107
Table 2-2. Retention time of n-alkanes for gas chromatographic retention index	112
Table 2-3. Contents of volatile flavor of blueberry according to differential SPME absorption fiber type	117
Table 2-4. Volatile flavor composition of strawberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)	124
Table 2-5. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of strawberry	127
Table 2-6. Volatile flavor composition of raspberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)	131

Table 2-7. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of raspberry	132
Table 2-8. Volatile flavor composition of blueberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)	136
Table 2-9. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds from blueberry	138
Table 2-10. Volatile flavor composition of Korean blackberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)	142
Table 2-11. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of Korean blackberry	144
Table 2-12. Volatile flavor composition of cranberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)	148
Table 2-13. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of cranberry	151
Table 2-14. Volatile flavor composition of aronia by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)	155
Table 2-15. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of aronia	157
Table 2-16. Volatile flavor composition of mulberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)	160
Table 2-17. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of mulberry	161
Table 3-1. MD-GC/MS conditions for identification of chiral volatile flavor	

compounds	183
Table 3-2. Cut time, retention time and retention index for MD-GC/MS analytical condition of chiral volatile flavor compounds	188
Table 3-3. Chiral volatile compounds of strawberry	192
Table 3-4. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of strawberry	195
Table 3-5. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of blueberry	199
Table 3-6. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of Korean blackberry	204
Table 3-7. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of cranberry	207
Table 3-8. Chiral volatile compounds of aronia	209
Table 3-9. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of aronia	211

그 립 목 차

Fig. 1-1. Structure of anthocyanin and anthocyanidin	7
Fig. 1-2. General mechanism involved in the structural transformations of anthocyanins in acidic to neutral solution	14
Fig. 1-3. Extraction and purification of anthocyanins fraction from various berry species	15
Fig. 1-4. Standard calibration curve of total phenolic concent(a) and total flavonoid content(b)	18
Fig. 1-5. HPLC chromatogram for comparison of C18(ODS) column(a) to C8 column(b) of antocyanins in blueberry	22
Fig. 1-6. Calibration curve of 6 anthocyanins (5 to 100 mg/L)	23
Fig. 1-7. Comparison of contents of total phenolics compound, total flavonoid and total anthocyanin in each extract of berry species	30
Fig. 1-8. HPLC(WL@520nm) chromatogram of six common anthcyanidin(a) and anthocyanins(b) mixture standard solution	33
Fig. 1-9. Chemical structures and UV spectra(λ_{max}) of six common anthocyanidins	35
Fig. 1-10. Chemical structures and UV spectra(λ_{max}) of six common anthocyanins	36
Fig. 1-11. HPLC(WL@520nm) chromatogram of three anthocyanins of strawberry	38

Fig. 1-12. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200-1000) spectra of three anthocyanins of strawberry	38
Fig. 1-13. HPLC(WL@520nm) chromatogram of five anthocyanins of raspberry	41
Fig. 1-14. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200-1000) spectra of five anthocyanins of raspberry	42
Fig. 1-15. HPLC(WL@520nm) chromatogram of twenty-one anthocyanins of blueberry	46
Fig. 1-16. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200-1000) spectra of twenty-one anthocyanins of raspberry	46
Fig. 1-17. HPLC(WL@520nm) chromatogram of six anthocyanins of Korean blackberry	54
Fig. 1-18. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200-1000) spectra of six anthocyanins of Korean blackberry	54
Fig. 1-19. HPLC(WL@520nm) chromatogram of twelve anthocyanins of cranberry	58
Fig. 1-20. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200-1000) spectra of twelve anthocyanins of cranberry	58
Fig. 1-21. HPLC(WL@520nm) chromatogram of seven anthocyanins of aronia	63
Fig. 1-22. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200-1000) spectra of seven anthocyanins of aronia	63
Fig. 1-23. HPLC(WL@520nm) chromatogram of four anthocyanins	

of mulberry	66
Fig. 1-24. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200-1000) spectra of four anthocyanins of mulberry	67
Fig. 1-25. Contents of aglycon of anthocyanins(as anthocyanidins) of berry species	82
Fig. 2-1. Diagram of apparatus for Likens-Nickerson simultaneous distillation /extraction(SDE)(a) and vigreux type distillation column system(b) of volatile flavor extract	103
Fig. 2-2. Structure of SPME and process of adsorption and desorption ...	105
Fig. 2-3. Schematic diagram of volatile flavor components extraction (SDE and SPME) from berry species	108
Fig. 2-4. Calculation of retention index(RI)	110
Fig. 2-5. GC/MS chromatogram of n-alkane standard mixture	111
Fig. 2-6. Experimental scheme for analysis of volatile flavor compounds from berry species	114
Fig. 2-7. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of blueberry according to different SPME absorption fiber type	116
Fig. 2-8. Peak area for four volatile flavor compounds extracted from blueberry with DVB/CAR/PDMS SPME fiber with and without addition of NaCl(salting out)	119
Fig. 2-9. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of strawberry	123
Fig. 2-10. Biosynthetic pathway of DMHF and derivatives	126

Fig. 2-11. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of raspberry	130
Fig. 2-12. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of blueberry	135
Fig. 2-13. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of Korean blackberry	141
Fig. 2-14. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of cranberry	147
Fig. 2-15. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of aronia	154
Fig. 2-16. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of mulberry	159
Fig. 3-1. Enantiomeric ratio of chiral volatile flavor compound (γ -jasmine lactone) in fruits and artificial product	175
Fig. 3-2. Multi-dimensional gas chromatography-mass spectrometry system	179
Fig. 3-3. Schematic Diagram of MDGC/MS System for chiral volatile compound analysis	180
Fig. 3-4. Characteristic of Selected chiral volatile flavor compounds of berry species	185
Fig. 3-5. Precolumn 1st GC-FID chromatogram(a) and chiral column 2rd GC/MS chromatogram(b) of standard materials of volatile flavors	186

Fig. 3-6. EI-GC/MS Spectrum of major chiral volatile compounds of berry species	187
Fig. 3-7. GC chromatogram of preseparation on a non-chiral column ((a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of strawberry	193
Fig. 3-8. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile compounds of strawberry	194
Fig. 3-9. GC Chromatogram of preseparation on a non-chiral column ((a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of blueberry	198
Fig. 3-10. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile compounds of blueberry	199
Fig. 3-11. GC chromatogram of preseparation on a non-chiral column ((a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of Korean blackberry	202
Fig. 3-12. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile compounds of Korean blackberry	203
Fig. 3-13. GC chromatogram of preseparation on a non-chiral column ((a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of cranberry	206
Fig. 3-14. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile	

compounds of Korean cranberry	207
Fig. 3-15. GC chromatogram of preseparation on a non-chiral column (a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of aronia	210
Fig. 3-16. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile compounds of aronia	211
Fig. 3-17. Racemization of α -ionone	211

ABSTRACT

Studies on the Anthocyanins Composition and Enantiomeric Excess of Chiral Volatile Flavor Compounds of Berry Species

Hong, Joon-Ho

Advisor : Prof. Kim, Kyong-Su, Ph.D.

Department of Food and Nutrition

Graduate School of Chosun University

In recent years, as the interest of modern people's has increased in maintain good health, their demand for berries has also been increasing rapidly. This study was carried out to provide basic research data as part of groping of measures for industrial utilization of major berries domestically produced and distributed. The composition and content of anthocyanin, which is a functional natural coloring matter derived from berries, were systematically established. In addition, the volatile flavor components of berries were isolated and identified for the purpose of providing basic data for the development of new flavor enhancers. Based on the results, the enantiomer composition ratios of major chiral flavor components of berries were identified using advanced techniques of enantio-MDGC/MS. From the flavor characteristics of individual berries it was found to judge the physicochemical authenticity of the natural flavors or bioflavors and artificial flavors. This can be applied to the flavoring industry by identifying the enantiomer composition ratios of major volatile flavor components of berries.

I. A Comparative study on the composition of anthocyanins of berry species

The anthocyanins of the seven species of berries distributed in South Korea were identified with the spectroscopic characteristics of the UV-VIS spectrum and the mass spectrum using HPLC-PDA-ESI-TOF/MS techniques and their contents were compared.

Before identifying the anthocyanins of berries, experiments were conducted using different extracts, under 0.2% HCl-methanol extraction conditions, and as a result it was identified that large amounts of bioactive substances of total polyphenols, total flavonoids, and total anthocyanins are contained in individual berries. Among the seven species of berries, blackberry, mulberry, and aronia were having relatively higher contents of bioactive substances than other berries.

To set the optimal conditions for anthocyanin separation analysis, the column efficiency levels of octadecylsilyl(C₁₈) and octylsilyl(C₈) as reversed HPLC were compared and as a result, it was identified that octylsilyl(C₈) columns had resolution up to 1.5 and excellent reproducibility. The anthocyanins of individual berries were separated and identified through analyses of the elution characteristics of chromatography according to the structures of anthocyanins, ultraviolet-visible light spectra, and mass spectra using HPLC-PDA and ESI-TOF/MS. As a result, a total of 31 species of berries were separated and identified as follows; 21 species of blueberries, 12 species of cranberries, 7 species each of blackberries and aronias, 5 species of raspberries, 4 species of mulberries, and three species of strawberries. The anthocyanins of berries were shown to exist in the form of anthocyanidin, which is an aglycon, combined with sugars including monosaccharides such as galactoside, glucoside, arabinoside, and xyloside and disaccharides such as rhamnose, sambubioside, and rutinoside. Some of the anthocyanins exist in acylated forms in which organic acids have been ester-linked with sugars. In this study, pelargonidin-3-(6-malonyl-glucose) was identified as a constituent anthocyanin of strawberries.

In the analysis of the anthocyanin contents of berries using HPLC, mulberries showed the highest content as 3680.1±81.0 mg/100g dried sample followed by blackberry, aronia, raspberry, cranberry, and strawberry in the decreasing order.

II. Analysis of volatile flavor compounds of berry species

In this study, with a view to preparing basic data for industrial utilization of major berries produced and distributed in South Korea as food flavor materials, the volatile flavor components of seven berries were analyzed.

The volatile flavor components of berries were extracted using the SPME and SDE methods. In particular, the extraction efficiency of flavor components using SPME was the highest when DVB/CAR/PDMS absorption fibers were used and the addition of NaCl increased the distribution coefficients of the flavor components of berries in samples. This positively affect the extraction of flavor components indicating that salting out was effective.

The flavor components of seven berry species were extracted with SDE and analyzed using GC/MS and as a result, 53 species were isolated and identified from strawberries. Major flavor components were identified as hexanal, linalool, (E)-nerolidol, γ -dodecalactone, and mesifuran. Alcohols, aldehydes, and ketones were shown to form mainstreams. A total of 25 different flavor components were detected from raspberries, and the flavor components were mainly composed of 1-hexanol, linalool, α -terpineol, γ -decalactone and γ -dodecalactone. A total of 35 flavor components of blueberries amounting to 73.93% were found and they were mainly composed of terpene alcohols such as hexanal, (Z)-3-hexenol, 1-hexanol, linalool, α -terpineol and geraniol. A total of 42 different flavor components were identified from blackberries and terpene alcohols such as α -pinene, linalool, (E)-verbenol, and myrtenol were identified as major components. A total of 59 different flavor components were identified from cranberries and aldehydes contributed 67.27% of total included hexanal, benzaldehyde, (E,E)-2,4-heptadienal, phenyl acetaldehyde, and (E)-2-decenal. It was judged that the volatile flavor components of most aldehydes show the characteristics of the flavors of cranberries by contributing to green-like, fatty, and tallow flavors. A total of 29 different volatile flavor components were identified from Aronia, and benzaldehyde was identified to have a high content accounting for 59.07% of the entire contents of volatile flavor components as a single component. In the case of mulberries, 12 different flavor

components, which are the smallest in number among the berries examined in this study, were identified from mulberries and alcohols and aldehydes such as 2-hexanone, 3-hexanol, hexanal phenylacetaldehyde, and nonanal were shown to form major components.

III. A study on the enantiomeric excess of chiral volatile flavor compounds of berry species

Among the volatile flavor components of subject berry fruits, those having chiral compounds were selected and mounted on dual column ovens and multi-deans switch modules (MDS) to analyze the major enantiomeric excess ratios($ee\%$) of berries using multidimensional gas chromatography/mass spectrometry(MDGC/MS) that enables heat-cut column switching. Among the enantiomeric flavor components of berries, α -pinene, limonene, linalool, terpinen-4-ol, α -terpineol, γ -decalactone, α -ionone, (Z)-nerolidol, and (E)-nerolidol were selected and the optimal heat-cut time was set to separate the enantiomers of individual enantiomeric flavor components.

The major enantiomeric flavor components of strawberries were identified as linalool, γ -decalactone, and (Z)-nerolidol, which have characteristics $ee\%$ of 50.8, 73.5, and 30.2% respectively. Blueberries were shown to have Limonene and α -terpineol with $ee\%$ of 18.78 and 25.39%, respectively, and (E)-nerolidol with an $ee\%$ of 100% as only (S)-enantiomer was detected. In the case of blackberries, among the enantiomers (R/S) of limonene and linalool, (R)-forms were dominant and the $ee\%$ was shown to be 73.31 and 65.38%, respectively. Among the enantiomers (R/S) of terpinen-4-ol and α -terpineol, (S)-forms were dominant and the $ee\%$ were shown to be 95.24 and 86.48% respectively. In the case of cranberries, the enantiomeric flavor components of limonene and α -terpineol were separated and identified. As with blackberries, (R)-enantiomers were dominant and among the enantiomers of α -terpineol. Limonene were the major components while (S)-enantiomers were dominant among the enantiomers of α -terpineol. However the $ee\%$ was identified as 51.45 and 65.57%, respectively. The enantiomeric flavor components of aronia were identified as terpinen-4-ol and α -ionone. In the case of terpinen-4-ol, (S)-enantiomers were absolutely dominant($> 99\%$), and the $ee\%$ was

shown to be 98.47%. In the case of α -ionone, (R)-enantiomers were dominant and the ee% was identified as 49.12%. It was identified that, in the process of metabolism of biosynthesis, hydrogen atoms were removed from the asymmetric center of (R)- α -ionone due to the movement of the double bond of the cyclic structure of (R)-form so that (R)- α -ionone was converted into β -ionone or (S)- α -ionone.

Part I

배리류의 안토시아닌 조성 비교에 관한 연구

A Comparative Study on Composition of Anthocyanins
of Berry Species

제 1 장 서 론

최근 급속한 사회·경제발전 속에 식습관, 흡연, 음주, 지속적인 스트레스 등의 생활 속 변인과 미세먼지, 중금속 등과 같은 환경오염과 더불어 유전 및 신체의 생리적 기전의 변화 등의 복합적 요인으로 암, 당뇨, 고혈압 심혈관계 질환 등과 같은 만성질환 유병률이 꾸준히 증가하여 이들 질병을 예방하거나 지연시키기 위한 노력들이 활발히 진행되고 있다(Siró et al., 2008; Lee, 2013). 1960년에는 52세였던 기대수명이 2015년에는 82세로 증가하여 고령화 사회 진입과 함께 적극적 건강지향(wellness) 등의 삶의 질 향상과 건강에 대한 관심이 크게 증가하고 추세이다(한국농수산식품유통공사, 2016). 또한, 최근 의학의 발달로 고혈압, 비만 등의 생활습관병(lifestyle related disease)에 의한 건강의 적신호는 영양섭취상태와 식습관의 연관성이 매우 높은 것으로 밝혀지면(Nigel & Shirley, 1991) 식품의 1차적 기능인 단순한 영양섭취를 넘어 3차적 기능으로 질병을 예방하거나 지연시키기 위한 목적으로 섭취하며 특히, 식품에 존재하는 기능성 물질이나 생리활성물질에 관심을 갖는 건강중시형 소비패턴의 변화로 국내·외 건강기능식품 관련 시장이 꾸준히 성장하고 있다. 더불어 국내·외 주요 언론매체에서는 매년 슈퍼푸드를 선정하여 발표하고 있으며 이중 과일과 채소류가 주류를 이루고 있다.

과일류에는 플라보노이드(flavonoid), 카로티노이드(carotenoid), 안토시아닌(anthocyanin) 등의 항산화 활성이 우수한 페놀성 화합물(phenolic compounds)의 식물 유래 생리활성물질(phytochemical)을 다량 함유하고 있어 그의 중요성이 부각되고 있으며 농식품 중 곡류, 채소류 다음으로 우리나라 국민 1인당 소비량이 많은 식품군이다(Kim et al., 2010; Park et al., 2013; Lee et al., 2015). 국내 과일류 생산량은 2011년 246만 톤에서 2015년 270만 톤으로 약 9.7% 상승하였고 감귤이 24.9%로 가장 높은 비중을 차지한 가운데 사과(21.6%), 감(14.3%), 배(9.7%), 포도(9.6%) 순으로 높게 확인되었다(한국농수산식품유통공사, 2016). 또한 최근 항산화작용이 높은 안토시아닌이 풍부한 과일로서 인지도가 상승하고 있는 베리류(berry fruits)의 소비도 지속적으로 증가하는 추세이다.

장과류(漿果類)인 베리류는 다수의 열매가 모여 하나의 과실을 이루는 과일을 총칭하는 것으로, 양딸기(strawberry), 라즈베리(raspberry), 블랙베리(blackberry), 오디(mulberry), 블루베리(blueberry), 등이 이에 속한다. 베리류는 세계적으로 중요한 과일작물로 당 및 유기산을 비롯하여 비타민, 무기질 및 식이섬유가 풍부하며 안토시

아닌이 다른 과일과 비교하여 상대적 함량이 높으며, polyphenol, phenolic acid 및 tannin 등이 함유되어 있어 항산화, 항암, 항염증, 심혈관계 질환 예방 등에 효과가 있다고 알려졌다(Vinson et al., 2001; Choi, Moon & Kwak, 2012; Bagchi et al., 2004; Badjakov et al., 2008; Seeram et al., 2006; Moyer et al., 2002). 이러한 영양적 가치를 인정받아 생과일, 주스 및 여러 가공식품으로 소비될 뿐만 아니라 향수, 세제, 정유, 화장품 등 다양한 분야의 원료로 폭넓게 이용되고 있다(Yu, Kim & Cha, 2008; Lee et al., 2008)

베리류(Berry fruits)는 생물학적 분류에 따라 양딸기, 라즈베리, 블랙베리, 아로니아(chokeberry)는 장미과(*Rosaceae*), 블루베리, 크랜베리 등은 진달래과(*Ericaceae*), 오디는 뽕나무과(*Moraceae*)에 속한다. 베리류의 수확시기에는 생과로 소비되고 장기 저장·유통을 목적으로 과채가공품인 냉동과일 형태로 판매 소비되고 있으며 특히, 블루베리의 경우 2012년부터 2016년의 냉동과일 소비품목 현황 통계자료에 따르면 전체 냉동과일 중 67%의 높은 비중을 보이는 것으로 나타났다. 최근 블랙베리의 일종인 복분자(*Rubus coreanus*)에 대한 다양한 생리활성 기능이 알려지면서 소비자로 하여금 관심이 고조되고 소비도 증가하고 있으며 더불어 블루베리와 아로니아의 소비도 증가되고 있다.

딸기(strawberry, *Fragaria × ananassa*)는 장미과 딸기속에 속하는 다년생 초본으로 비타민 C가 풍부하며 신맛과 단맛이 조화롭고 독특한 향기를 갖는 과채류로서 대부분 생과로 이용되고 있으며 아이스크림, 딸기주스, 케이크와 같은 가공식품 내 첨가물로 이용되고 있다(Lee, Kim & Lee, 2003). 특히 딸기는 항산화 활성이 우수한 anthocyanins과 flavonols, flavanols, ellagitannins의 일종인 ellagic acid가 다량 함유되어 있으며(Aaby, Skrede & Wrolstad, 2005). 이러한 항산화 성분은 품종이나 재배환경 등에 따라 조성이 상이한 것으로 알려져 있고 우리나라 딸기 생산량은 세계 3위로서 재배 초기 일본 품종을 도입한 이후 맛과 품질이 우수한 품종 개량을 통해 일본, 중국 등의 아시아 국가를 대상으로 수출이 꾸준히 증가하고 있다. 이에 반해, 국내산 딸기에 관한 체계적인 연구결과가 의외로 적은 실정이다.

나무딸기의 대표격인 라즈베리(raspberry, *Rubus crataegifolius*)는 열매의 빛깔에 따라 red·black·purple의 3종으로 구분되고, 특히 복분자(Korea blackberry, *Rubus coreanus* Miq.)는 한국 재래종으로서 고창, 해남 등에서 주로 재배, 생산되고 있으며 약용과 과실주로 사용되고 있다. 특히 복분자는 동의보감 등의 한방에서 당뇨병

(diabetes mellitus), 성욕 감퇴(sexual disinclination), 정애루(spermatorrhea), 유뇨증(enuresis), 천식(asthma) 및 알레르기 관련 질병에 치료에 이용되고 있다(Moon, 1991). 복분자에 관한 연구로는 잎과 줄기로부터 탄닌 및 플라보노이드 화합물 등이 보고되었으며, 열매에서는 gallic acid 및 sanguin H-4, sanguin H-5 등(Pang, Kim & Lee, 1996)의 가수성 탄닌(Hydrolyzable tannins)과 kaempferol, quercetin 등의 flavonoids가 존재하고 유기산으로는 isocitric acid, astragalol, isoquercitrin, tartaric acid, citric acid 등이 함유된 것으로 보고(Lee, 1995)되어 있다.

블루베리(blueberry, *Vaccinium corymbosum* L.)는 빌벨리(bilberry)와 함께 진달래과(*Ericaceae*) 산앵두나무속(*Vaccinium*)으로서 동남아시아를 중심으로 400여종이 분포되어 있다. 블루베리는 시력 향상 작용과 항산화 활성이 우수한 원예작물(Schmidt et al., 2004) 중 하나로 병해충에 강하여 친환경적 농법으로 재배할 수 있는 작물이며, 전세계적으로 하이부시 블루베리(*V. corymbosum*), 로우부시 블루베리(*V. angustifolium*) 및 래빗아이 블루베리(*V. ashei*) 등 3품종이 주로 생산되고 있다. 국내에서는 하이부시 블루베리가 주로 재배되고 있고(Kim et al., 2015). 최근 우리나라에서도 블루베리에 대한 관심이 높아지면서 생과 외 잼, 와인, 등의 단순가공을 넘어 제과, 제빵, 아이스크림 등의 식품첨가 원료로도 이용되고 있다. 국내에서는 블루베리에 대한 생리활성에 관한 연구와 원예학적 측면의 연구에 국한되어 있으나 북미 등 블루베리 주요 생산국을 중심으로 안토시아닌 및 페놀성 화합물의 조성 및 함량, 항산화 활성의 상관관계에 관한 다양한 연구가 추진되고 있다. 최근 블루베리 내 안토시아닌에 관한 연구로는 블루베리로부터 cyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, petunidin 등의 안토시아닌 화합물에 galactose, glucose, arabinose 등의 당류가 결합된 13종 이상의 배당체 형태의 안토시아닌 개별 성분을 분리, 동정 관한 연구(Castrejon et al., 2008)와 함께 블루베리에 대한 과실의 수량과 품질 등의 형태적 특성과 품종 및 가공 처리에 따라 조 추출물의 형태로 항산화 효과를 측정하는 연구가 많은 비중을 차지하고 있다(Skrede, Wrolstad & Durst, 2000).

크랜베리(cranberry, *Vaccinium macrocarpon*)는 블루베리와 동일하게 진달래과(*Ericaceae*) 산앵두나무속(*Vaccinium*)으로 음료, 소스, 캔디 등의 원료로 사용되고 있다. 여타의 베리류와 마찬가지로 anthocyanidin, proanthocyanidins, quercetin과 같은 항산화 성분을 함유하고 있어 항산화 활성이 우수하며 특히 감염성 질환 예방에 도움을 주며 심혈관계의 만성 염증성 질환에 효과가 있는 등의 다양한 생리활성이

밝혀지고 있다(Singh et al., 2009; Reed, 2002; Neto, 2007).

초크베리(chokeberry)라고 불리는 아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 안토시아닌이 풍부한 베리류로 북아메리카에서는 대표적인 상업적 과실로서 식품가공시 천연 색소의 원료로 광범위하게 사용되고 있다(Wu et al., 2004). 최근 우리나라에서도 아로니아에 대한 관심이 높아지면서 고소득 작물로서 재배가 활성화되고 있다. 아로니아 추출물은 위 점막 손상 회복, 면역증진, 대장암 등의 항암효과가 입증되면서(Vicheva-Kuzmanova et al., 2005; Lala et al., 2006) 슈퍼푸드라 불리고 있다. 아로니아는 생과 또는 동결건조 분말 형태의 건강보조식품 등으로 유통 판매되고 있다. 한편, 아로니아의 안토시아닌 조성은 cyanidin-3-galactoside와 cyanidin-3-arabioside, cyanidin-3-xyloside, cyanidin-3-glucoside의 4 종류 구성되어 있으며(Slimestad et al., 2005), 현재 아로니아 관련 연구는 에탄올 및 열수추출물 또는 특정 가공공정으로 생산되는 제품을 대상으로 안토시아닌 성분 조성 및 생리활성에 관한 연구가 주류를 이루고 있는 실정으로 아로니아 유래 안토시아닌 분획물 고유의 생리활성에 대한 연구는 전무한 실정이다.

오디(mulberry, *Morus alba*)는 뽕나무과(*Moraceae*)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba* L.)의 열매로서 5월부터 6월경 채취하여 식용하고 있고, 한방에서는 건조 후 상삼자라는 약재로서 강장제나 진정제로 사용되고 있다. 동의보감에서는 성질이 차고 맛은 달며 독이 없어 오장을 편하게 할 뿐만 아니라 오래먹으면 백발이 검게 변하고 노화를 예방한다고 기록되어 있다(Kim & Kim, 2010; Kim et al., 2007). 특히 오디는 유리당, 유기산 및 안토시아닌의 함량이 높아 잼, 주류 등의 가공식품과 함께 천연식용색소나 화장품 원료로 이용범위가 넓다(Kim et al., 2003). 오디는 항산화(Kim et al., 2004), 항당뇨(Kim et al., 2000), 항염증(Kim, Park & Lee, 1998), 항고지혈증(Kim, Park & Rho, 2008)의 유용성분으로 stibenes, prenylflavonoids, deoxynojirimycin(Kim et al., 2003) 및 coumarin(Oh et al., 2002)등을 함유하고 있어 기능성 식품 소재로도 활용되고 있다. 그러나, 오디의 안토시아닌에 관한 국내 연구는 Park 등(Park, Jung & Ko, 1997)이 보고한 오디 품종별 안토시아닌 정량 및 생리활성 평가 관련 연구에 불과한 것으로 확인되었다.

베리류의 주요 생리활성물질인 안토시아닌은 phenolic compounds의 일종으로 종자나 과실 또는 잎 등에 주로 존재하며, 과실이나 종자에서는 식물이 화분이나 종자를 전파하기 위해 곤충을 유인하는 역할을 하거나 잎에서는 식물체에 유해한 UV

광선으로부터 자신을 보호하기 위한 수단으로 이용된다는 것이 정설로 알려져 있고 (Mazza & Miniati, 1993), 기능성 측면에서 인체에 유독한 활성산소를 포집하는 항산화 기능이나, 콜레스테롤 저하, 시력 개선, 혈관보호, 동맥경화 및 심장병 예방, 항암, 당뇨 억제, 자외선 및 각종 스트레스로부터의 보호 등 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 보고되고 있다(Linda, 1999; Forkmann & Martens, 2001; Nichenametla et al., 2006; Zao et al., 2004).

안토시아닌은 그리스어로 꽃을 의미하는 anthos와 파란색의 kyanos가 어원이며 Marguart(1835)가 꽃의 푸른 색소를 안토시아닌이라 명명하면서부터 사용되어 왔다 (Markakis, 1982). 안토시아닌은 일반적으로 식물세포 내에 배당체(glucoside) 형태로 존재하며 이들 배당체는 물에 잘 녹는다. 이 배당체들은 산, 알칼리 또는 효소에 의해 쉽게 가수분해되어 비당체(aglycon)인 안토시아니딘(anthocyanidin)와 당류(sugars)로 분리된다(Fig. 1-1).

안토시아닌은 대표적인 hydronium 화합물 중 하나로서 안토시아닌을 구성하는 안토시아니딘은 2-phenylbenzopyrylium의 기본 골격으로 양이온(cation) 형태를 갖으며 이 양이온에 대한 음이온(anion)으로는 주로 염소 이온(Cl^-)이 결합하고 있어 $C_6-C_3-C_6$ 의 기본 구조를 갖는 플라보노이드와 궁극적으로 차이를 보인다. 이는 안토시아닌의 1번 위치에 존재하는 산소의 비공유 전자쌍 중에서 1전자가 2번 위치의 탄소와의 공유결합으로 인해 양이온의 하전으로 인해 구조적으로 불안정한 특징을 보인다.

안토시아닌을 형성하는 당류로는 galactose, rhamnose 그리고 penthoses가 주류를 이루며 주로 3, 5, 7 탄소 위치에 결합하여 monoglucoside, diglucoside, bioside, trioside 등으로 구성되어 있다. 또한 경우에 따라 당 고리에 방향족 또는 coumaric, caffeic, ferulic, sinapic, malonic, malic succinic 또는 acetic acid 등의 유기산이 결합되기도 하고 안토시아닌은 구성 당의 결합 위치, 개수 그리고 결합된 hydroxyl groups($-OH$)와 methoxy group($-OCH_3$)의 위치와 수에 따라 여러 종류의 안토시아닌이 생성된다. 안토시아닌의 비당질인 안토시아니딘은 크게 6종을 구분되는데 그 기본 구조에서 2 탄소 위치에 결합하고 있는 phenyl group에 hydroxyl groups가 한 개인 경우 pelargonidins, 두 개의 경우 cyanidins, 세 개가 있는 경우 delphinidins으로 분류되고 phenyl group의 hydroxyl groups가 methoxy group으로 치환된 위치와 수에 따라 peonidins, petunidins, malvidins으로 나뉜다(Table 1-1). 한편 phenyl

group 중 hydroxyl groups가 증가하면 청색이 강해지고 methoxy group가 증가하면 붉은색이 강해져 화학 결합에 따라 그 색깔 또한 달라지며 현재 질량분석법 등의 발달로 550여종에 달하는 안토시아닌이 자연계에 존재하는 것으로 밝혀졌다.

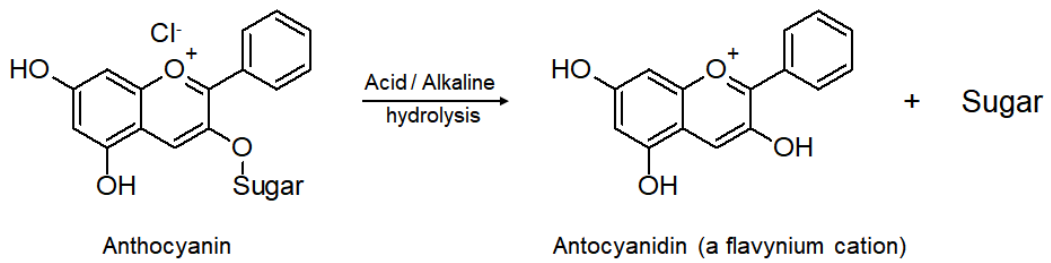


Fig. 1-1. Structure of anthocyanin and anthocyanidin

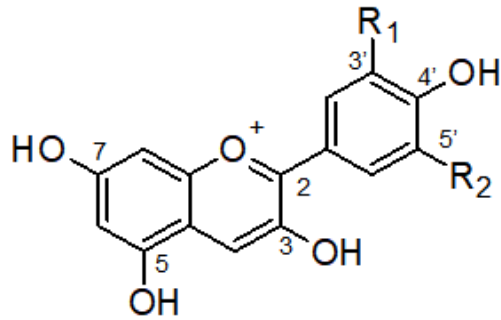


Table 1-1. Colors and structural features of some anthocyanidin

Anthocyanidin	Color	Substituents and their positions on phenyl group	
		R1	R2
Pelargonidin	Scalet(bright red)	-H	-H
Cyanidin	Crimson(deep red)	-OH	-H
Delphinidin	Bluish purple	-OH	-OH
Peonidin	Rosy red	-OCH ₃	-H
Petunidin	Purple	-OH	-OCH ₃
Malvidin	Mauve (Purplish)	-OCH ₃	-OCH ₃

현재 국내산 베리류 관련 국내 연구들은 대다수 생리활성 평가를 중심으로 이루어지고 있으며 안토시아닌 등의 화학적 조성에 관한 연구가 다소 미비한 실정이며 그마저도 단일 베리의 품종별, 혹은 몇 종의 베리류 간의 영양성분 및 기능성분의 화학적 조성과의 항산화 활성 비교 연구 등에 국한되어 있다. 다양한 과실 등에 함유되어 있는 각각의 안토시아닌의 조성 비교는 안토시아닌의 비당체인 안토시아니딘의 종류, 하이드록시기(hydroxy group)의 개수, 배당체를 구성하는 당의 종류와 개수, 아실화(acylation)의 유무에 따라 서로 다른 화학적 구조를 가지게 되고 이러한 구조적 차이에 의해 서로 다른 생리활성과 함께 생체이용률 등이 달라질 수 있다는 점(Wu et al., 2004)과 베리류의 생리활성은 플라보노이드계 색소인 안토시아닌과 깊은 관련이 있다는 선행 연구 결과를 토대로 각각의 베리류에 대한 안토시아닌의 분획물을 이용한 생리활성 검정을 별도로 수행할 필요가 있다고 판단되어진다.

또한 안토시아닌은 화학적 구조를 결정하는 비당체과 sugar의 형태 및 유기산(organic acid)의 조합에 따라 수백종으로 분류되어 정확한 구조동정이 어렵고, 안토시아닌의 화학구조적 불안정성의 문제로 분석에 많은 어려움이 있었으나, 최근 다양한 크로마토그래피와 질량분석 등의 기기분석의 발전으로 자연계에 존재하는 미량의 안토시아닌의 동정과 함께 정량분석도 가능하게 되었다.

이에 본 연구에서는 국내에서 생산, 유통되고 있는 주요 베리류를 활용한 기능성 식품 소재개발과 천연 식용 색소의 이용확대 재고에 필요한 기초자료를 제공하고자 국내 유통 베리류인 양딸기(strawberry), 라즈베리(raspberry), 블랙베리(Korean blackberry), 블루베리(blueberry), 크랜베리(cranberry), 아로니아(aronia; chokeberry), 오디(mulberry) 7종에 대해 HPLC와 LC-MS/MS를 이용하여 각 베리류의 특성을 규명할 수 있는 안토시아닌을 분리분석하고 구조동정한 후 각 베리류를 구성하는 개별 안토시아닌의 함량을 비교하고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 실험재료 및 기기

1. 시료

본 연구 소재인 베리류 7종-양딸기, 라즈베리, 블랙베리, 블루베리, 크랜베리, 아로니아, 오디는 광주광역시 소재 농산물 직거래 시장과 대형마트에서 판매되고 있는 생과일과 냉동과일을 직접 구입하여 사용하였으며, 베리류의 생물학적 분류 등은 table 1-2에 나타내었다. 실험에 앞서 생과일은 비가식 부위는 제거하고 증류수로 수세한뒤 냉동과일과 함께 영하 70°C 이하의 초저온냉동고(DF8517, Ilsinbiobase, Korean)에서 24시간 냉동시킨 후 동결건조기(FDCF-12003, Operon, Korean)에 넣고 응축기 온도 영하 120°C, 압력 10 mTorr의 조건하에서 72시간 동안 동결건조하였다. 이후 동결건조 시료는 액체질소(liquid nitrogen, LN₂)를 가하여 저온 분쇄한 다음 밀봉하여 진공 제습기(vacuum desiccator)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

실험에 사용한 모든 시약 및 용매는 특급시약(extra pure grade)과 HPLC급으로 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO), Junsei Chemical Co. (Tokyo), Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ), Burdick and Jackson Laboratories (Muskegon, MI)에서 구입하여 사용하였다. 생리활성물질과 안토시아닌의 확인 및 정량 실험을 위해 사용한 표준물질 중 gallic acid, quercetin는 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO)에서 구입하였고, pelargonidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, delphinidin-3-O-glucoside, petunidin-3-O-glucoside, malvidin-3-O-glucoside 각각의 anthocyanin 표준물질을 Polyphenols Laboratories(Sandnes, Norway)에 구입하여 암실의 냉동보관($\leq 20^{\circ}\text{C}$)하여 사용하였다.

각 베리류의 총 페놀성화합물, 총 플라보노이드 및 총 안토시아닌 함량 확인은 분

광분석법(spectrophotometric methods)으로 UV-VIS spectrophotometer(Evolution 600, Thermo Fisher scientific Inc, USA)를 이용하였고 안토시아닌의 분리·동정을 위한 크로마토그래피법(chromatographic method)은 다중파장 검출기(photodiode array detector, PDA)가 장착된 HPLC 시스템(LC-30A series, Nexera XR, Shimadzu, Japan)와 LC-ESI -TOF/MS(LCMS-IT-TOF[®], Shimadzu, Japan)을 이용하였다.

Table 1-2. Biological classification of berry species

Berry	Family	Genus	Scientific name	Type
Strawberry	Rosaceae	Fragaria	<i>Fragaria × ananassa</i>	Accessory fruit
Raspberry	Rosaceae	Rubus	<i>Rubus crataegifolius</i>	Aggregate fruit
Korean Blackberry	Rosaceae	Rubus	<i>Rubus coreanus</i> Miq.	Aggregate fruit
Chokeberry	Rosaceae	Aronia	<i>Aronia melanocarpa</i>	False berry
Blueberry	Ericaceae	Vaccinium	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	False berry
Cranberry	Ericaceae	Vaccinium	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	False berry
Mulberry	Moraceae	Morus	<i>Morus alba</i>	Multiple fruit



제 2 절 실험방법

1. 시료 조제

1) 베리류의 추출물 조제

안토시아닌 화합물의 안정성은 pH, 온도, 빛, 산소, 당류 조성, 유기산, 금속이온, 조색소(copigments) 등에 영향을 받으며(Wang, Cao & Prior, 1997) 특히 안토시아닌은 pH 2.0 정도의 산성용액에서 안정한 flavylum(2-phenylchromenylium) cation(AH⁺)으로 존재하여 적색을 띄고 pH 5.0 이상의 중성 또는 알칼리 용액에서는 carbinol pseudobase(B)와 chalcone 구조(C)를 형성하거나 quinonoidal base(A)이 형성되면서 매우 불안한 청색이나 무색을 띄게된다(Fossen, Cabrita & Andersen, 1998)(Fig. 1-2).

이에 산성 조건하의 물과 메탄올 추출물 조제하였으며 동결건조된 7종의 베리류 1g을 취한 후 80% methanol과 0.2% HCl-methanol, 5% formic acid-water를 각 추출용매 10mL 가한 다음 40℃에서 24 시간동안 추출하고 각 추출물은 10℃ 3,000rpm에서 10분 동안 원심분리(Centrifuge 5810R, Effendorf, Hamburg, Germany)한 뒤 PFTE membrane syringe filter(0.45 um, Whatman International Ltd., England)으로 여과하였다.

2) 안토시아닌의 정제

베리류로부터 안토시아닌의 정제는 Lee 등(2013)의 방법을 변형하여 실험하였다. SPE cartridge(Sep-Pak C18, Waters, Milford, MA, USA)를 methanol과 증류수 2 mL를 각각 순차적으로 가하여 활성화한 다음, 베리류 각 추출물 1 mL을 주입하여 하고 증류수 4 mL으로 세척한 후 methanol으로 용출하였다. 정제된 안토시아닌 여액은 N₂ gas으로 농축한 후 1 mL의 0.2% HCl-methanol으로 재용해한 후 HPLC-PDA와 LC-ESI-TOF/MS으로 분석하였다(Fig. 1-3).

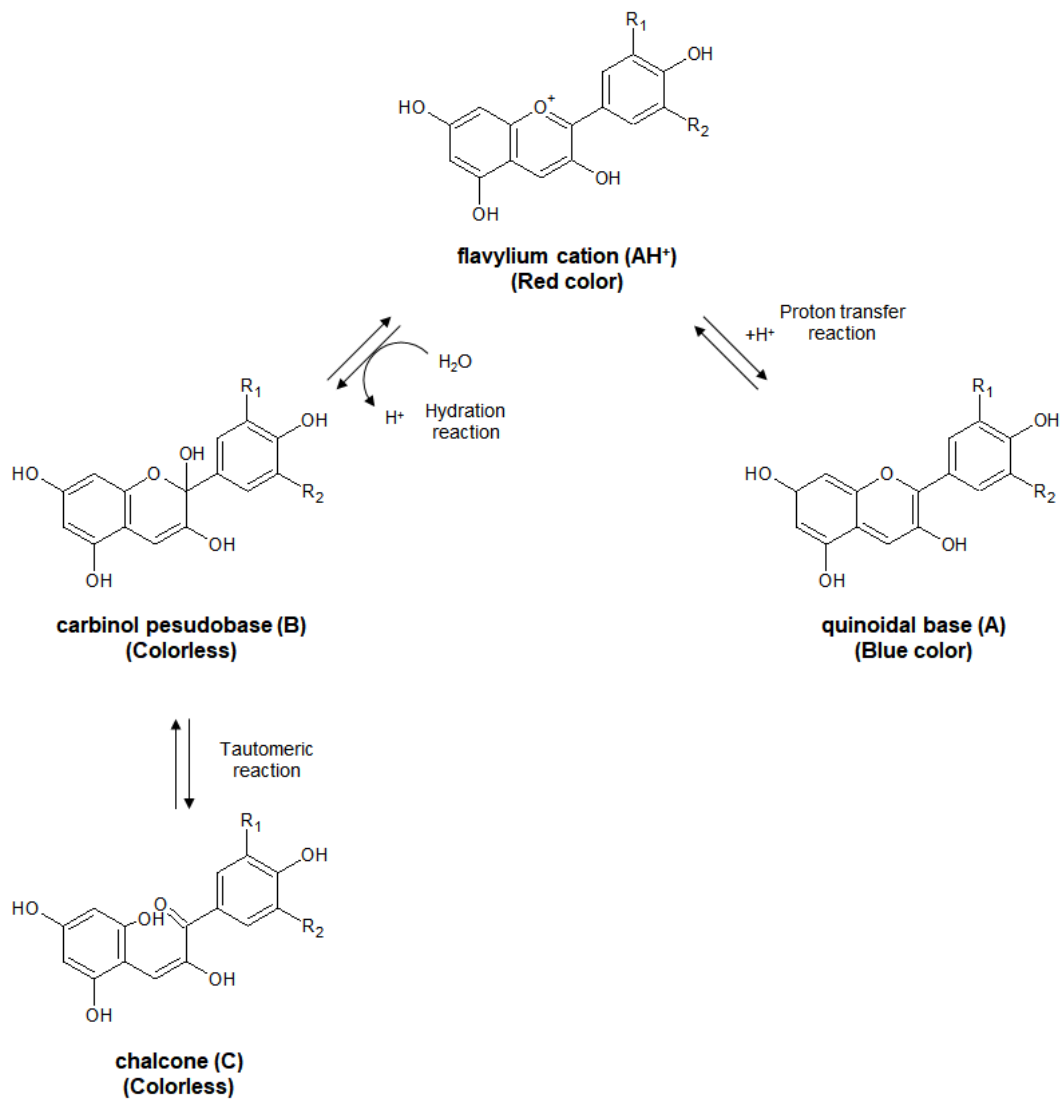


Fig. 1-2. General mechanism involved in the structural transformations of anthocyanins in acidic to neutral solution

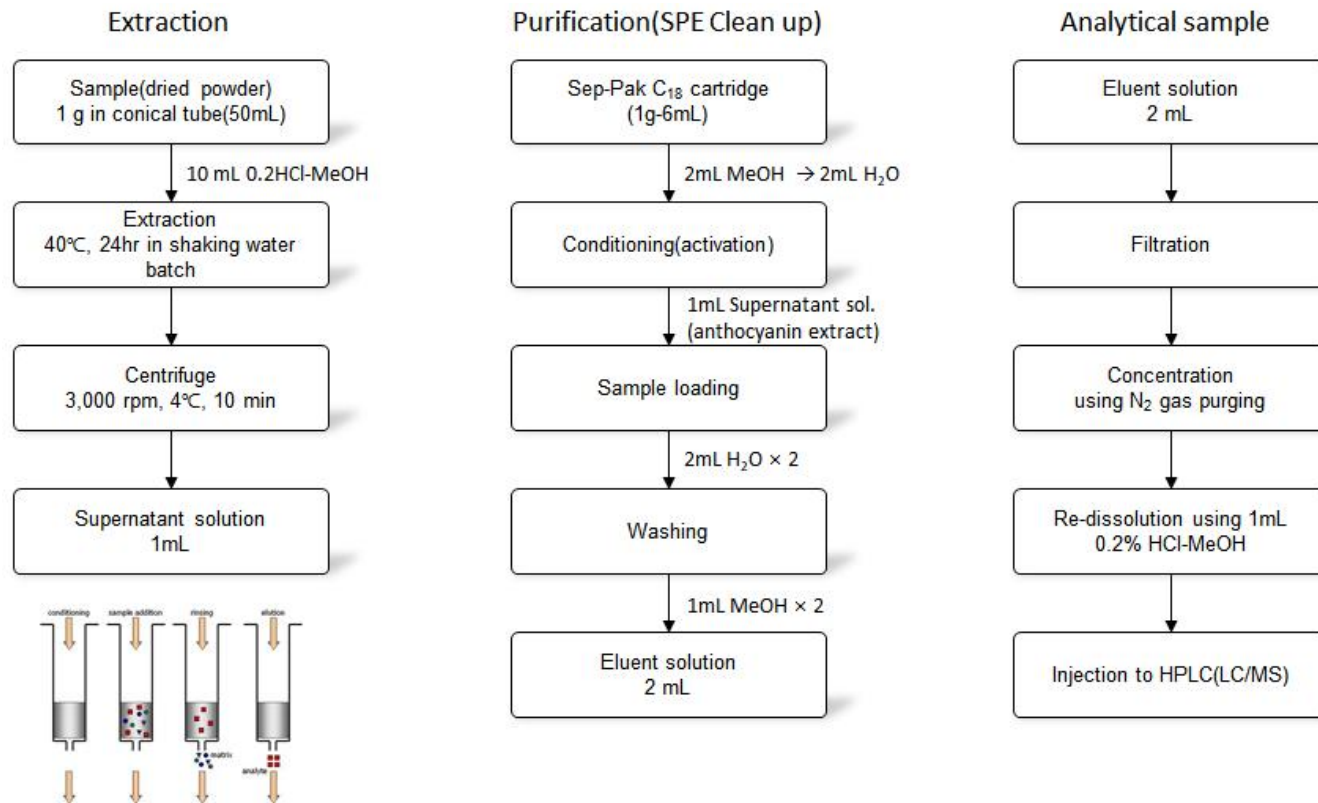


Fig. 1-3. Extraction and purification of anthocyanins fraction from various berry species

2. 폴리페놀 함량

총 폴리페놀의 함량(total polyphenol content, TPC)은 Folin-Ciocalteu 방법 (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos, 1999)을 변형하여 측정하였으며, 각 추출조건에 따라 조제된 추출물을 50배수로 희석한 다음, 희석액 1 mL에 10% (v/v) Folin-Ciocalteu's reagent(Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO) 5 mL을 넣고 균질화하여 5분간 반응시킨 후 7.5% (w/v) Na₂CO₃(Junsei Chemical Co., Tokyo) 4 mL를 첨가하여 균질하였다. 이 반응액을 실온, 암실에서 60분 동안 정치한 후 분광광도계(UV-VIS Spectrophotometer, Evolution 600, Thermo Fisher scientific Inc, USA)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였으며 모든 시료는 3회 반복하여 실험하였다. 시료의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid(Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO)으로 표준검량곡선을 작성하여 mg gallic acid equivalent(GAE)/100 g dried sample으로 나타내었다(Fig. 1-4(a)).

3. 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량(total flavonoid content, TFC)은 건강기능식품공전의 방법 (Korea Food and Drug Administration, 2013)을 개량하여 실험하였다. 각 추출조건에 따라 조제된 추출물을 2배수로 희석한 다음, 희석액 0.5 mL에 ethanol 1.5 mL, 10% (w/v) Al(NO₃)₃ 용액 0.1 ml, 1M CH₃COOK 용액 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 가하여 충분히 교반한 후 실온, 암실에서 40분 동안 반응시킨 후 분광광도계 (UV-VIS Spectrophotometer)를 이용하여 415 nm에서 3회 반복하여 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 플라보노이드 함량은 quercetin(Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO)으로 표준검량곡선을 작성하고 mg quercetin equivalent(QE)/100 g dried sample으로 나타내었다(Fig. 1-4(b)).

4. 총 안토시아닌 함량

총 안토시아닌 함량(total anthocyanin content, TAC)은 pH differential method(AOAC, 2006)에 따라 측정하였다. 각 추출용액 0.5 mL에 2.5 mM

potassium chloride buffer(pH 1.0)와 400 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)를 각각 가하여 최종부피 5 mL으로 희석한 다음 15 min 동안 안정화한 후 현탁물이 발생되지 않도록 하고 분광광도계(UV-VIS Spectrophotometer)를 이용하여 510 nm와 700 nm에서 각 흡광도를 3회 반복 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 cyanidin-3-O-glucoside(C3G, $C_{21}H_{21}ClO_{11}$)의 molecular weight($449.2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)와 molar absorptivity($\epsilon=26,900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)에 의해 다음과 같은 식으로 계산하여 monomeric anthocyanin pigment으로 산출하였다.

$$Total\ monomeric\ anthocyanin\ (mg/L) = \frac{A \times MW \times DF}{\epsilon \times V} \times 1000$$

$$A(\text{absorbance}) = (A_{510} - A_{700})_{pH 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH 4.5}$$

$$MW(\text{molecular weight of C3G}) = 449.2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$DF(\text{dilution factor}) = \text{dilution ratio of sample solution}$$

$$\epsilon(\text{molar absorptivity}) = 26,900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

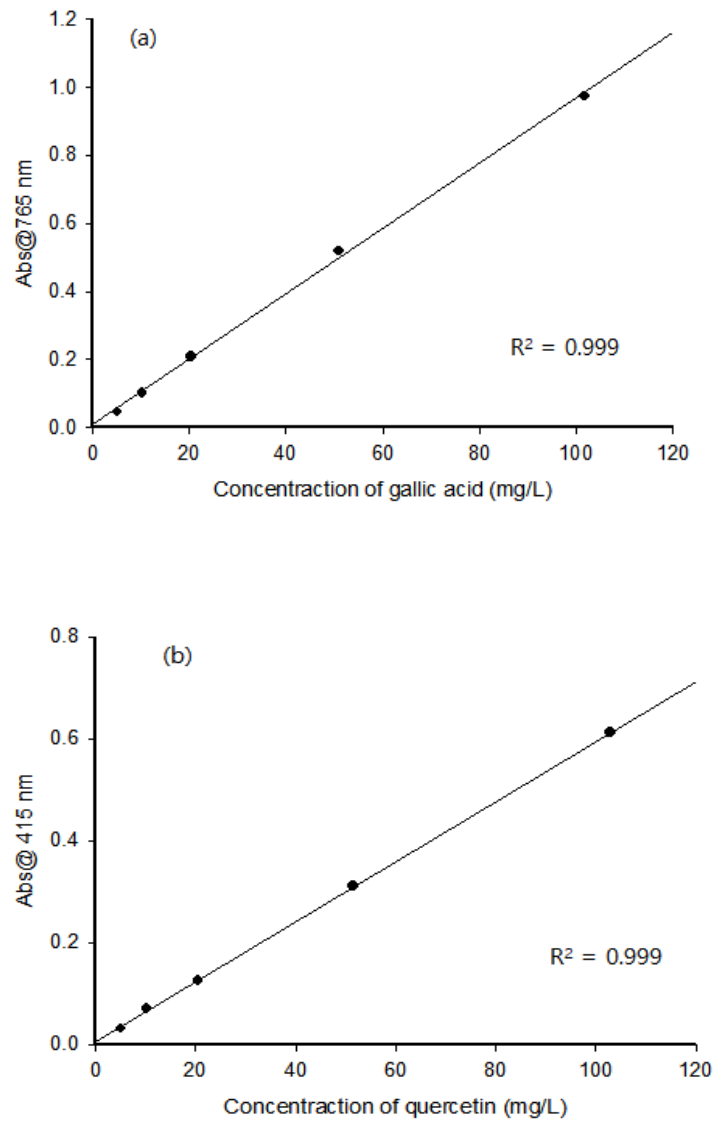


Fig. 1-4. Standard calibration curve of total phenolic content(a) and total flavonoid content(b)

5. 안토시아닌 성분 분석

1) HPLC-PDA-ESI-TOF/MS 조건

각 베리류의 안토시아닌 조성과 함량 확인을 위한 동정과 정량분석은 다중파장 검출기(photodiode array detector, PDA)가 장착된 HPLC와 LC-ESI-TOF/MS (LCMS-IT-TOF[®], Shimdazu, Japan)을 이용하였다. 이동상은 5% formic acid가 포함된 증류수(A)와 5% formic acid가 포함된 acetonitrile(CH₃CN)(B)를 사용하여 다음과 같은 용매구배(gradient elution) 조건으로 수행하였다. 초기에서 2분까지 이동상 B의 농도를 5%으로 유지하고 이후 10분 동안 12%으로 증가시킨 다음 18분까지 12%으로 유지시킨 후 다시 19분까지 15%으로 증가시켜 28분까지 15%으로 유지하고 35분까지 30%으로 증가시켜 40분까지 30%으로 일정하게 유지하였다. 이후 40.1분에서 45분까지 컬럼 세척 단계로 이동상 B의 농도를 95%을 설정하고 이후 5%의 조성으로 일정하게 감소시킨 다음 안정화 시켰다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min으로 설정하고 컬럼 온도는 35℃으로 유지하였다. 검출기는 190 - 800 nm 범위의 다중 파장(multi-wavelength)으로 설정하여 분리분석된 개별 안토시아닌의 UV Spectrum을 확인하였고, 520 nm의 단일 파장(single-wavelength)에서 HPLC chromatogram을 확인하였으며 시료는 10 uL를 주입하였다.

HPLC에 의해 분리된 안토시아닌의 동정을 위한 질량 분석은 electrospray ionization(ESI)를 이용하여 positive ion(4.5kV) mode으로 설정하고 nebulizing gas 는 N₂ gas 1.5 L/min으로 하고, drying gas 150 kPa, CDL과 block heater는 200℃, loop time 0.3초(event time 300 msec, repeat 3, ion accumulation 10 msec), detector voltage 1.72 kV, mass range는 m/z 100-1,000으로 설정하였다(Table 1-3). 모든 데이터는 Shimdazu사(Japan)의 LCMS Solution(ver. 3.60)과 accurate mass calculator 전용 소프트웨어인 formula predictor(ver. 1.2)를 활용하여 수집하고 해석하였으며, TOF(time of flight) mass analyzer에 대해 주기적인 tune으로 mass accuracy(≤ 5ppm)와 resolution(1,000@ m/z 1,000)을 유지하면서 본 실험을 수행하였다.

안토시아닌 성분 분리를 위한 column 선정으로 Lee 등(2013)과 Wu 등(2005)의 연구결과를 참고하여 octadecylsilyl groups(-Si-(CH₂)₁₇-CH₃, C18)의 Zorbax SB-C18

column(4.6 mm I.d. × 250 mm L., 5 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 과 octylsilyl groups(-Si-(CH₂)₇-CH₃, C8)의 Zorbax SB-C8 column(4.6 mm I.d. × 250 mm L., 5 μm)을 비교 분석한 뒤 베리류의 안토시아닌 개별 성분 분리분석 column으로 Zorbax SB-C8 column을 최종 선정하였다(Fig. 1-5).

2) 안토시아닌 정량 분석

각 베리류의 안토시아닌 개별 성분의 정량 분석을 위한 표준검량선은 anthocyanidin-mono-glucoside인 mirtillin(delphinidin-3-O-glucoside), chrysanthemin(cyanidin-3-O-glucoside), petunidin-3-O-glucoside, callistephin(pelagonidin-3-O-glucoside), peonidin-3-O-glucoside 및 oenin(malvidin-3-O-glucoside)의 6종의 표준 물질에 대한 혼합 표준용액(mixture working solution)을 5 - 100 mg/L의 범위내로 조제하여 Fig. 1-6과 같이 작성하고, 각 농도에 대해 3회 반복하여 분석하여 직선성과 정밀성을 확인한 후 이를 각 베리류에서 검출된 안토시아닌의 비당체(aglycon)인 안토시아니딘을 기준으로 계열 분리하여 정량 분석하였고 함량 확인은 아래 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Anthocyanin content (mg/100g dried berry)} = S \times \frac{v \times b}{w} \times \frac{100}{1000}$$

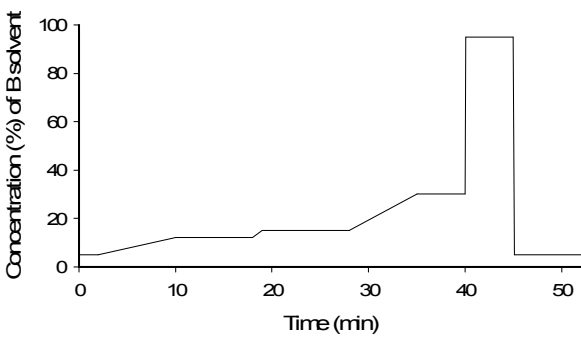
S : concentration of HPLC result(ug/mL)

v : sample volume(mL)

b : dilution factor

w : weight of dried berry(g)

Table 1-3. HPLC-PDA-ESI-TOF/MS analytical condition for anthocyanins of berry species

HPLC Condition	
System	LC-30A series Nexera XR, Shimadzu, Japan
Column	Zorbax SB-C8, 4.6 mm i.d. × 250 mm L., 5.0 μm, Agilent, USA
Mobile phase	A) 5% formic acid in deionized water(dH ₂ O) B) 5% formic acid in acetonitrile(MeCN)
Flow rate	1.0 mL/min
Column Temp.	35°C
Detection	photodiode array(PDA), 190-800 nm@520 nm
Injection vol.	10 μL
Gradient elution	
Run time	52 min
LC/MS condition	
System	LCMS-IT-TOF [®] , Shimadzu, Japan
Mass analyzer	Time-of-Flight(TOF) coupled Ion Trap(IT)
Ionization mode	Positive electrospray(ESI, +4.5kV)
Nebulization gas	N ₂ , 1.5 L/min
CDL, Heat block	both 200°C
Ion accumulation	10 msec(Loop time 0.3 sec, event time 300 msec, repeat 3)
Detector voltage	1.72 kV

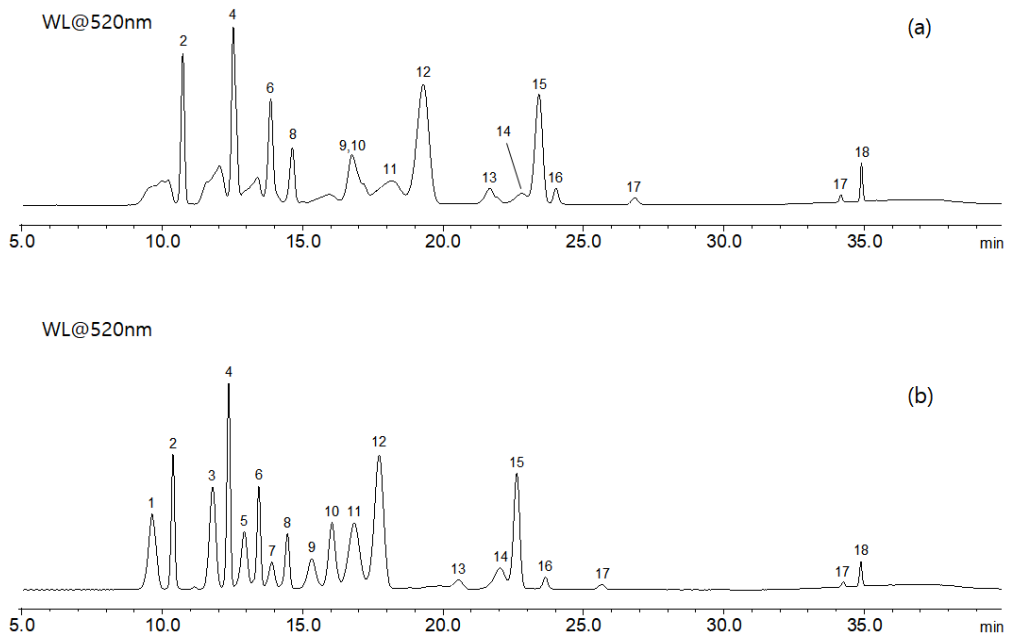


Fig. 1-5. HPLC chromatogram for comparison of C18(ODS) column(a) to C8 column(b) of anthocyanins in blueberry

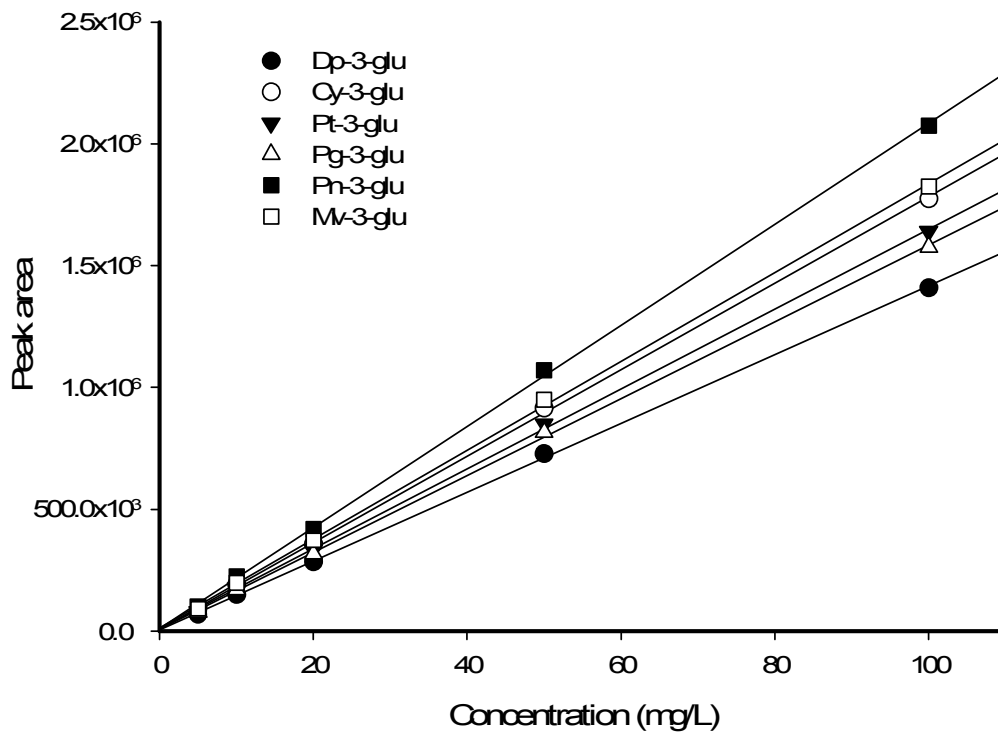


Fig. 1-6. Calibration curve of 6 anthocyanins (5 to 100 mg/L)
 (Dp-3-glu, delphinidin-3-O-glucoside; Cy-3-glu, cyanidin - 3-O-glucoside;
 Pt-3-glu, petunidin-3-O-glucoside; Pg-3-glu, pelagonidin-3-O - glucoside;
 Pn-3-glu, peonidin-3-O-glucoside and Mv-3-glu, malvidin-3-O-glucoside)

3) 분석법 유효성 검증(Method validation)

식품의약품안전처의 「식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인」에 기초하여 HPLC 분석법 유효성 검증(method validation)을 수행하고 이를 바탕으로 실험방법의 타당성 확인과 베리류의 안토시아닌 조성 및 함량 결과의 신뢰성을 확보하고자 하였다.

① 특이성(Specificity)

안토시아닌 6종의 100 mg/L 표준용액과 각 베리류의 추출물을 동일 HPLC 분석조건으로 분석하여 크로마토그램상의 머무름시간(retention time, t_R)과 UV 및 Mass spectrum의 일치 여부를 비교하였다.

② 직선성(Linearity)

안토시아닌 6종 표준물질을 0.2% HCl-methanol를 이용하여 표준원액(stock solution) 1,000 mg/L를 조제한 후 이를 순차적으로 희석하여 0.5 - 100 mg/L 농도 범위로 8개의 표준용액(working solution)을 조제하여 HPLC으로 분석하였다. 결과는 안토시아닌 6종 peak의 각 농도별 면적값(area)을 이용하여 1차식의 표준 검량선(standard calibration curve)을 작성하여 상관계수(correlation coefficient, R^2)를 확인하였고 분석시료의 농도가 해당 표준검량선 범위 내로 검출되는지 확인하였다.

③ 정확성(Accuracy) - 회수율(recovery ratio)

정확성은 회수율 시험을 통해 확인하였으며, 매질 보정법(matrix matching method)으로서 안토시아닌 표준물질 6종이 검출되지 않는 시료로서 양딸기를 회수율 대상 검체(matrix)로 하였다. 양딸기를 분쇄기로 파쇄한 후 안토시아닌 6종 혼합 표준원액을 시료 내 일정량 가하여 최종 목적농도 10, 50, 100 mg/L의 3농도로 조제한 다음 본 실험방법과 동일한 전처리 및 HPLC 조건으로 분석한 최종 결과값과 시료에 첨가한 표준물질의 기준값을 비교하여 회수율을 계산하였고 회수율은 70 - 120 % 범위를 기준으로 설정하였다.

④ 정밀성(Precision)

정밀성은 반복정밀성으로 일내분석(intra-day)과 일간분석(inter-day)의 변이성을 측정하였다. 정밀성은 표준용액을 3회 반복 측정하였다. Intra-day의 정확성은 하루 동안 표준용액을 1일 3구간에서 분석하였으며 inter-day의 정확성은 intra-day의 과정을 3일 동안 반복하여 그 변이성을 측정하였다. 안토시아닌 혼합 표준용액 50 µg/mL을 조제하여 일내분석과 일간분석에서 HPLC분석의 재현성을 확인하였다. 각 시험은 구간마다 3회 반복하였으며 정밀성의 결과값은 상대표준편차((relative standard deviation, %RSD)으로 산출하였다.

⑤ 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검출한계(limit of detection, LOD)는 기지량의 분석대상 물질을 함유하는 검체를 분석하고 그 분석대상 물질을 확실히 검출할 수 있는 최저 농도를 확인함으로써 결정되는데, 기지의 저농도 분석 대상물질을 함유하는 검체와 공시험 검체의 바탕선(baseline)를 비교하여 신호 대 잡음비(signal to noise, S/N)가 3.3일 때로 설정하고 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 S/N 비율이 10일 때로 계산하였다.

6. 통계 처리

실험 결과는 평균과 표준편차(mean±standard deviation)로 나타내었고, IBM SPSS Statistics Base 23를 이용하여 변량분석(one-way ANOVA)을 통해 유의확률, $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's Multiple Range Test(MRT)으로 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 베리류의 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 함량

베리류 7종, 양딸기, 라즈베리, 블랙베리, 블루베리, 크랜베리, 아로니아, 오디에 대해 80% methanol, 0.2% HCl-methanol, 5% formic acid-water의 각 용매조건별 추출물의 총 폴리페놀(total phenolic compounds, TPC), 총 플라보노이드(total flavonoid, TFC), 총 안토시아닌(total anthocyanin, TAC) 함량 측정 결과는 Table 1-4 및 Fig. 1-7과 같이 나타났다.

식물 소재로부터 유용성분 추출에는 추출용매, 온도, 시간의 변수의 고려가 요구된다(Lee & Widmer, 1996). 각 베리류에 대한 추출용매별 비교 실험을 통해 베리류의 안토시아닌 개별 성분 분리 동정을 위한 최적 추출 용매를 선정하고자 하였으며, 그 결과 0.2% HCl-methanol 추출물에서 베리류 7종 모두 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총 안토시아닌 함량이 높은 것으로 확인되었다. 각 추출물을 냉장(4°C 이하)보관하면서 6개월 동안 주기적으로 각 항목의 함량 변화를 확인한 결과 80% methanol 추출물의 경우 모든 항목에서 함량이 감소하는 경향으로 나타났고 pH 1 이하의 0.2% HCl-methanol, 5% formic acid-water 추출물에는 유의적으로 일정하게 그 함량을 유지하는 것으로 확인되었다. 이에 따라 0.2% HCl-methanol 추출물과 5% formic acid-water 추출물을 대상으로 베리류 7종의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총 안토시아닌 함량을 비교하였고, 안토시아닌 개별 성분 분리 동정은 0.2% HCl-methanol 추출물을 대상으로 실험하였다.

베리류의 총 폴리페놀 함량은 5% formic acid-water 추출물의 경우, 2144±104 - 6491±352 mgGAE/100g의 범위로 나타났고 이 중 아로니아가 가장 높은 함량을 보였으며, 오디, 블랙베리, 크랜베리, 라즈베리, 양딸기, 블루베리의 순으로 낮은 함량을 보였다. 0.2% HCl-methanol 추출물은 3170±88 - 9495±387 mgGAE/100g으로 블랙베리가 유의적으로 높은 함량으로 나타났고 블루베리가 가장 낮은 함량으로 확인되어 추출 용매조건에 따라 총 폴리페놀의 함량이 미미한 차이를 보였으나 함량의 경향은 유사한 것으로 확인되었다.

플라보노이드 함량은 5% formic acid-water 추출물과 0.2% HCl-methanol 추출물에서 각각 58 ± 10 - 490 ± 20 mgQE/100g, 101 ± 10 - 680 ± 84 mgQE/100g의 범위로 나타났으며 이중 오디가 두 추출물 모두에서 가장 높은 함량이었으며, 총 폴리페놀 함량과 마찬가지로 양딸기에서 가장 낮게 확인되었다.

복분자(Korean blackberry) 생과의 경우, 총 폴리페놀 함량은 341.5mg/100g으로 보고되어 있고(Kim & Padilla-Zakour, 2004), Kang(2005)은 국내산 복분자에 대해 재배종에서 228.89 mg/100g, 야생종에서 247.80 mg/100g으로 재배종이나 야생종간의 오차범위 내에서 차이가 없다고 보고하였다. Chung(2014)은 블루베리 70% methanol 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 각각 42.26 mg/g과 26.39 mg/g이라고 보고 하였고, Jeong 등(2008)은 총 폴리페놀 함량이 블루베리의 경우 9.028 mg/g, 라즈베리는 5.34 mg/g이라고 보고하여 본 연구와 차이를 보였다. 베리류의 페놀성 화합물은 플라보노이드와 페놀산(phenolic acid)으로 구분되고 베리류의 플라보노이드의 성분으로 quercetin, myricetin, kaempferol의 주성분으로 구성되어 있고(Häkkinen et al., 1999), p-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, p-hydroxybenzoic acid, gallic acid, ellagic acid의 페놀산을 함유하고 있는 것으로 보고되어 있다(Häkkinen, 2000).

안토시아닌의 안정성은 flavylium 양이온 구조에 기인하며 이 구조의 수화를 억제하면 안정화되는데(Yang, Lee & song, 1982) 이는 pH의 변화에 따라 가역적인 구조적 변형을 일으키는 것을 의미하며 안토시아닌은 pH 1.0에서는 유색의 oxonium 형태, pH 4.5에서는 무색의 hemiketal 형태가 우세하다. pH differential method에 의한 총 안토시아닌 함량은 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 결과와 동일하게 5% formic acid-water 추출물보다 0.2% HCl-methanol 추출물이 전체 베리류에서 상대적으로 함량이 높은 것은 것으로 확인되었다. 각 베리류의 안토시아닌 함량으로 는 오디의 5% formic acid-water 추출물과 0.2% HCl-methanol 추출물에서 각각 1944 ± 90 mgC3G/100g, 2164 ± 84 mgC3G/100g으로 가장 높은 함량을 보였으며 블랙베리가 1717 ± 93 mgC3G/100g, 1727 ± 63 mgC3G/100g으로 그 뒤를 이었고, 양딸기의 경우 83 ± 10 mgC3G/100g와 90 ± 10 mgC3G/100g으로 가장 낮은 함량을 보였다.

베리류의 안토시아닌 함량을 조사한 결과, 블루베리는 386.7 mg/100g, 블랙베리는 687 mg/100g, 라즈베리는 92.1mg/100g, strawberry는 21.2mg/100g이었으며, 1일 안토시아닌 섭취량은 12.53 mg 인 것으로 보고되어 있다. 이러한 안토시아닌은 약

77.0%가 비 acyl화 안토시아닌 구조로 되어 있으며, 1일 섭취량의 73.1%가 monoglycoside의 안토시아닌이며, 특히 cyanidin 계열이 44.7%로 가장 높은 비율을 차지하고(Wu et al., 2006), 블랙베리의 안토시아닌 함량은 70.3~201 mg/100g으로 이중 cyanidin-3-O-glucoside 비율은 44 - 95%에 이른다는 보고도 있다(Fn-Chiang & Wrolstad, 2005).

본 실험과 유사 연구결과를 바탕으로 총 폴리페놀의 함량과 항산화 활성은 품종, 산지 유전자 형질 별로 큰 차이를 보였다는 연구(Moyer et al., 2002; Connor et al., 2002)를 종합하여 비교해 볼 때 베리류 간의 명확한 비교를 위해서는 성숙도 및 토양 등과 같은 재배환경 이력과 추출물 조제 방법 등의 다양한 요인들을 고려할 필요성이 있다고 사료된다.

Table 1-4. Contents of total phenolic compound, total flavonoid and total anthocyanin of each extract of berry species

Berry	Total phenolic compound(TPC) (mg GAE/100g DW ¹⁾)			Total flavonoid(TFC) (mg QE/100g DW)			Total anthocyanin (TAC) (mg C3G/100g DW)		
	Acidic extract			Acidic extract			Acidic extract		
	80% MeOH	5% FA -H ₂ O	0.2% HCl -MeOH	80% MeOH	5% FA -H ₂ O	0.2% HCl -MeOH	80% MeOH	5% FA -H ₂ O	0.2% HCl -MeOH
Strawberry	1948±72 ^{a,2)}	2234±75 ^{a,3)}	3744 ± 81 ^b	45±10 ^a	58±10 ^a	101±10 ^a	10±2 ^a	84±10 ^a	90±10 ^a
Raspberry	1959±53 ^a	2624±65 ^b	3985±224 ^b	102±15 ^{ab}	88±8 ^b	149±15 ^{ab}	35±5 ^{ab}	287±22 ^b	314±15 ^b
Blueberry	1751±94 ^a	2144±104 ^a	3170±88 ^a	159±31 ^b	112±16 ^b	225±59 ^b	53±10 ^{bc}	608±82 ^c	728±59 ^d
Kor. Blackberry	3745±49 ^c	5525±59 ^d	9495±387 ^e	375±37 ^c	358±18 ^d	391±63 ^c	154±22 ^d	1717±93 ^d	1727±63 ^f
Cranberry	2867±59 ^b	3170±57 ^c	3562±100 ^b	321±31 ^c	205±20 ^c	384±22 ^c	37±20 ^{ab}	384±36 ^b	478±80 ^c
Aronia	6458±414 ^d	6491±352 ^f	7536±342 ^c	331±42 ^c	191±10 ^c	425±37 ^c	78±20 ^c	705±61 ^c	975±38 ^e
Mulberry	3910±214 ^c	6189±180 ^e	8030±188 ^d	527±65 ^d	490±20 ^e	680±84 ^d	182±21 ^d	1944±90 ^e	2164±84 ^g

¹⁾DW: Dried weight, ²⁾Value: Mean±Standard deviation (n=3)

³⁾The same superscripts (a-g) in a column are not significantly different each other at $p < 0.05$ level by the Duncan's multiple range test

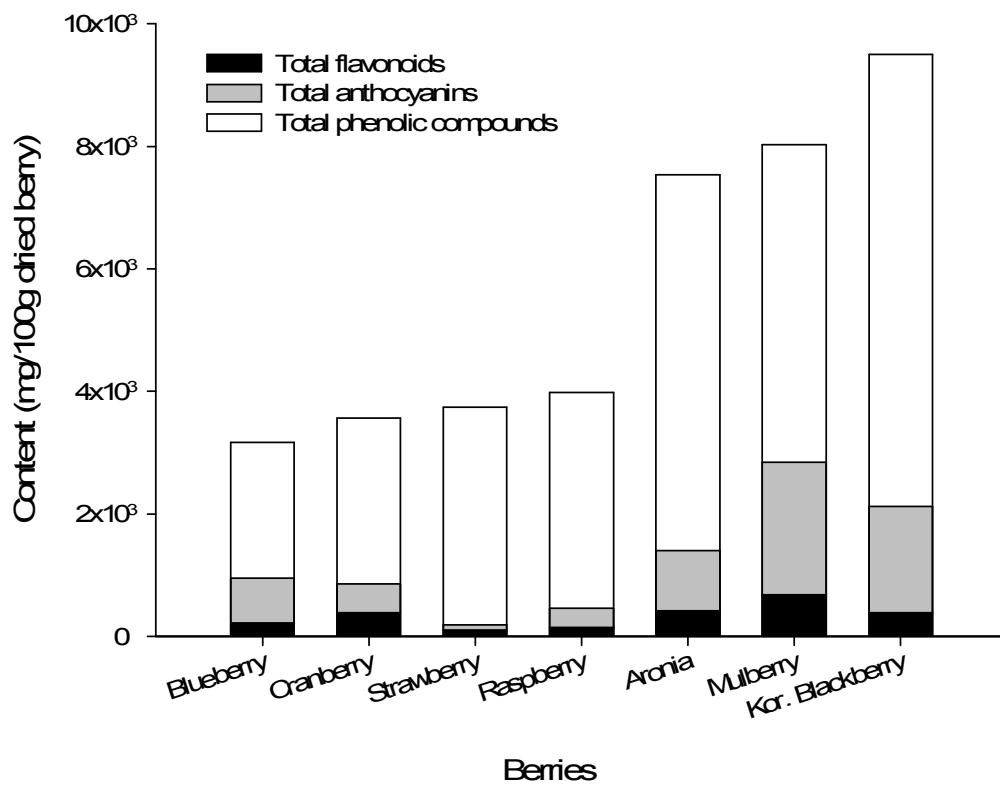


Fig. 1-7. Comparison of contents of total phenolics compound, total flavonoid and total anthocyanin in each extract of berry species

제 2 절 베리류의 안토시아닌 개별 성분 분리 및 동정

안토시아닌은 천연 식물 색소로서 크게 6종으로 구분되며, glucose, arabinose 등의 당과 아실화과 결합된 구조적 형태에 따라 약 600여종이 존재한다고 알려져 있다(Wu & Prior, 2005). 안토시아닌의 분석은 일반적으로 HPLC-PDA와 CE(capillary electrophoresis) 및 LC-MS 등을 이용되고 있으며, 최근 triple quadrupole의 tandem 질량분석법 등의 다양한 질량분석법 개발되어 이를 활용하여 다양한 식물체 유래 안토시아닌 분석에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

1. 안토시아닌과 비당체의 분리분석 및 분광학적 이해

안토시아닌은 B-ring 내의 hydroxyl group(-OH)의 수가 증가함에 따라 극성이 되고, methoxyl group(-CH₃) 수가 증가함에 따라 보다 비극성이 증가함에 따라 안토시아닌의 비당체(alglycon)인 anthocyanidin 기준으로 delphinidin → cyanidin → petunidin → pelargonidin → peonidin → malvidin 순서로 용출되었다. 배당체 형태인 안토시아닌은 당의 결합에 따라 극성을 증가시켜 비당체인 안토시아닌보다 짧은 시간 내에 용출되는 특성을 나타내었다(Fig. 1-8). 또한 당의 유형 및 치환 위치에 따라서도 극성이 달라지는데 단당류(monosaccharides)로 결합된 안토시아닌의 경우 galactoside → glucoside → arabinoside → xyloside → rhamnoside으로 용출되고 이당류(disaccharides)의 경우는 sophoroside → sambubioside → rutinoside의 순서로 분리되는 것을 보고되고 있다(Santos-Buelga et al., 2003).

안토시아닌의 구조를 파악하는데 있어 자외선 등을 이용한 분광학적 해석은 매우 유용하다(Hebrero, Santos-Buelga & Rivas-Gonzalo, 1988). 안토시아닌의 B-ring의 hydroxyl group(-OH)과 methoxyl group (-CH₃)의 수에 따라 최대 흡수 파장이 결정되고, 위의 작용기 1개로 구성된 cyanidin과 peonidin보다 작용기 2개로 구성된 delphinidin, petunidin 및 malvidin에서 11nm으로 최대 흡수파장 길어지는 것으로 보고되고 있으며 본 연구에서도 동일한 결과를 도출하였고 특히 본 연구에서의 단당류(monosaccharides)로 결합된 안토시아닌에서도 동일한 결과를 보이는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1-9).

한편 안토시아닌은 각 해당 비당체인 안토시아닌보다 약 10 nm 짧은 파장에서

최대 흡수파장이 나타나는 것을 확인하였는데(Fig. 1-10), Gonzalo 등(Santos-Buelga & Williamson, 2003)의 결과와 일치하였고 또한 안토시아닌의 몰 흡광계수(molar extinction coefficient, ϵ)는 동일 용매조성에서 안토시아닌의 몰 흡광계수보다 낮은 값을 갖는 것으로 보고하였다.

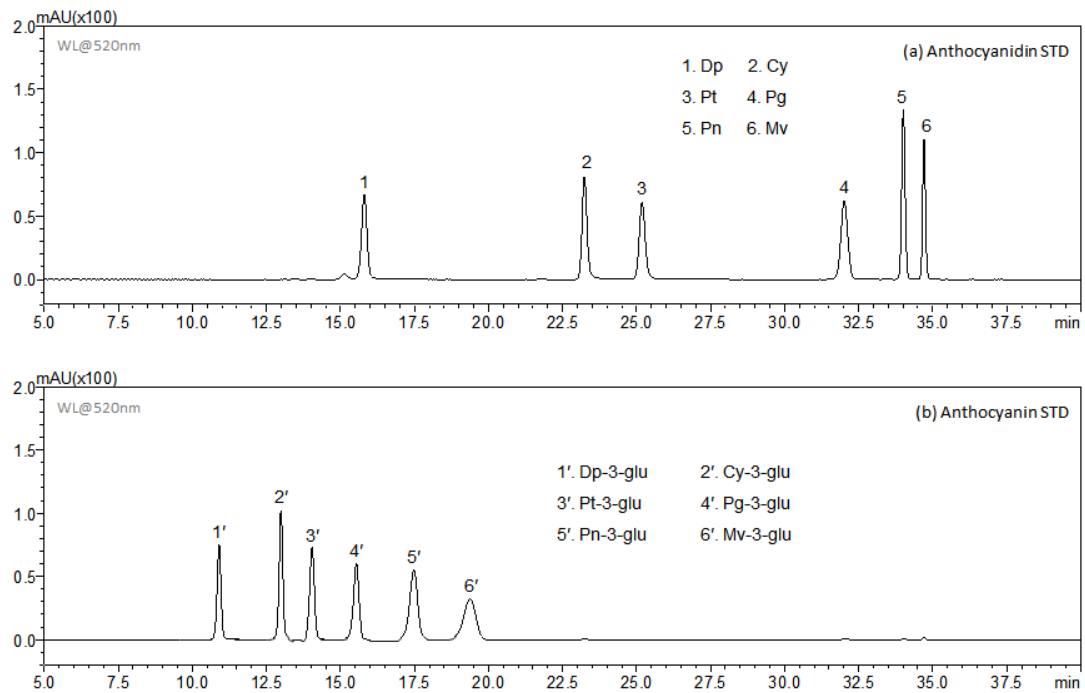
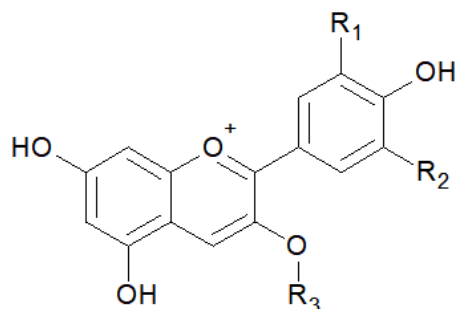


Fig. 1-8. HPLC(WL@520nm) chromatogram of six common anthocyanidin(a) and anthocyanins(b) mixture standard solution (concentration 20 mg/mL)

Table 1-5. Chemical structures and molecular weights of six common anthocyanidins and anthocyanins



Peak #	Compound	MW (g · mol ⁻¹)	R ₁	R ₂	R ₃
1	Delphinidin (Dp)	303	OH	OH	H
2	Cyanidin (Cy)	287	OH	H	H
3	Petunidin (Pt)	317	OH	OCH ₃	H
4	Pelagonidin (Pg)	271	H	H	H
5	Peonidin (Pn)	301	OCH ₃	H	H
6	Malvidin (Mv)	331	OCH ₃	OCH ₃	H
1'	Delphinidin-3-O-glucoside (Dp-3-glu)	465	OH	OH	Glu
2'	Cyanidin-3-O-glucoside (Cy-3-glu)	449	OH	H	Glu
3'	Petunidin-3-O-glucoside (Pt-3-glu)	479	OH	OCH ₃	Glu
4'	Pelagonidin-3-O-glucoside (Pg-3-glu)	433	H	H	Glu
5'	Peonidin-3-O-glucoside (Pn-3-glu)	463	OCH ₃	H	Glu
6'	Malvidin-3-O-glucoside (Mv-3-glu)	493	OCH ₃	OCH ₃	Glu

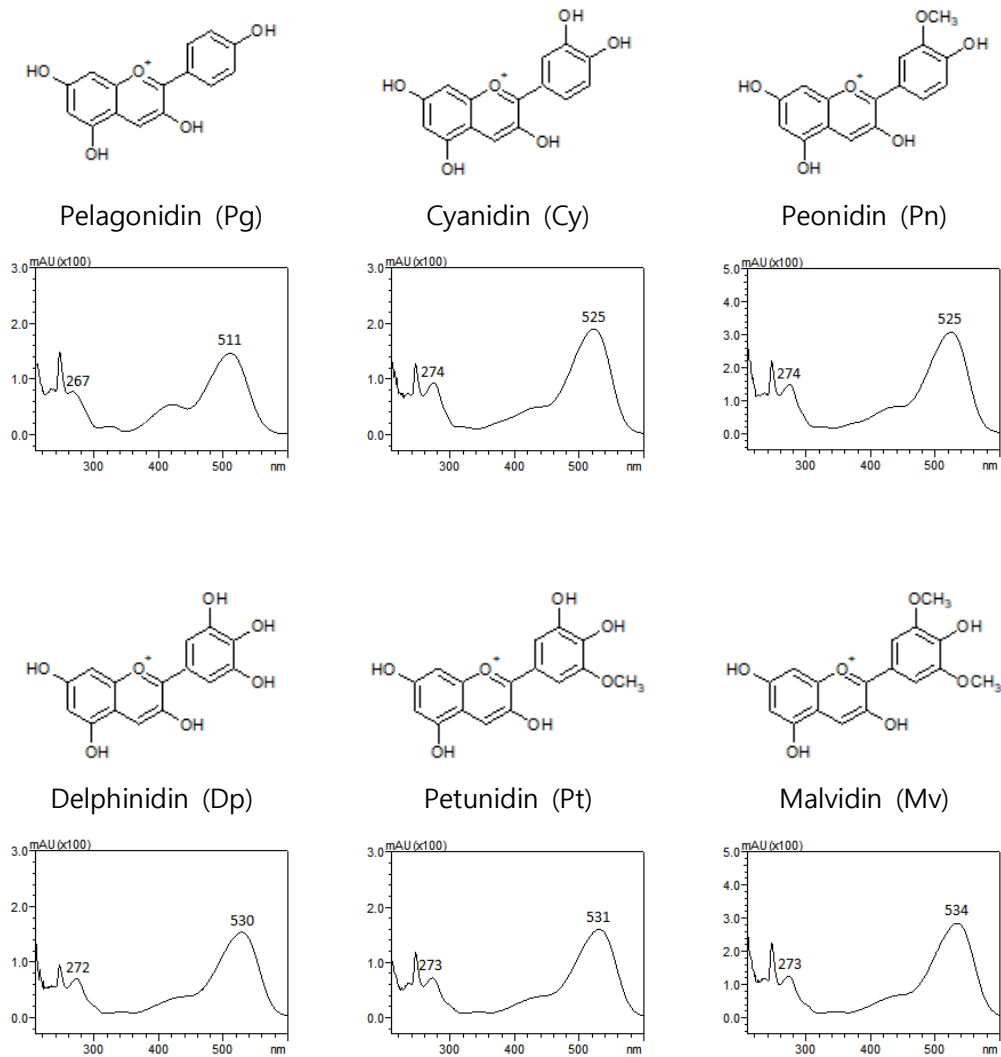


Fig. 1-9 Chemical structures and UV spectra(λ_{\max}) of six common anthocyanidins

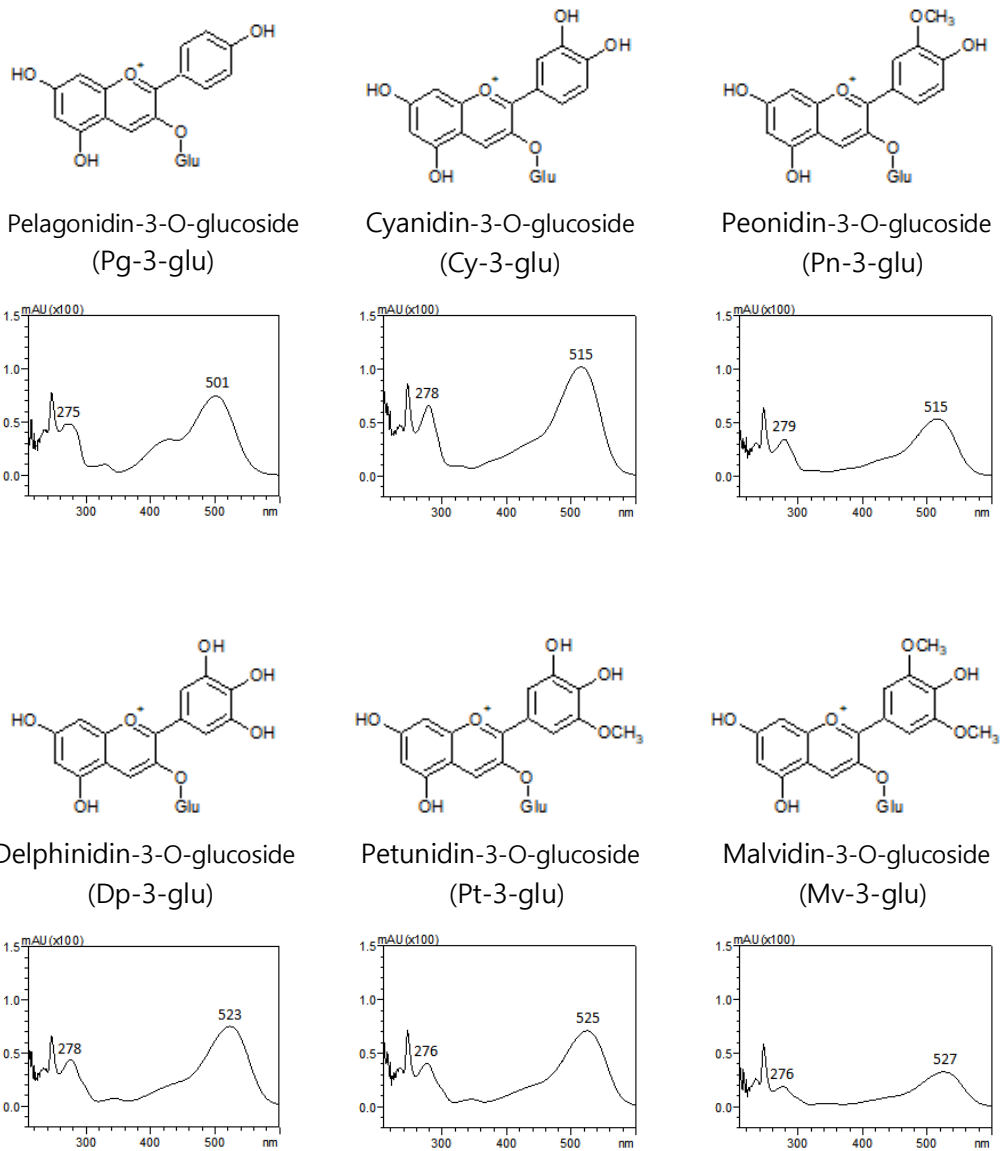


Fig. 1-10. Chemical structures and UV spectra(λ_{max}) of six common anthocyanins

2. 베리류의 안토시아닌 분리 동정

1) 양딸기(Strawberry)의 안토시아닌 동정

양딸기(strawberry)로부터 총 3종의 안토시아닌을 분리 분석하였으며(Fig. 1-11), ESI(+)-TIC(total ion chromatogram)상의 각 peak별 머무름시간(t_R)에 대한 mass spectrum를 확인결과(Fig. 1-12), peak 1에서는 m/z 595.12($[M]^+$), 449.11($[M-C_6H_{10}O_4]^+$), 287.06($[M-C_{12}H_{20}O_5]^+$)이 검출되었으며 m/z 287.06은 $C_{15}H_{11}O_6^+$ 으로서 안토시아닌인 cyanidin($C_{15}H_{11}O_6$)이고 이를 비당체(aglycon)로 하여 3-carbon 위치에 rutinose가 결합된 구조인 cyanidin-3-O-rutinoside($C_{27}H_{31}O_{15}$)으로 확인되었다. Peak 2는 m/z 433.11($[M]^+$)과 271.06($[M-C_7H_{10}O_5]^+$)이 검출되었고 m/z 271.06은 $C_{15}H_{11}O_5^+$ 으로서 pelagonidin($C_{15}H_{11}O_5$)이며, 최종 pelagonidin-3-O-glucoside($C_{21}H_{21}O_{10}$)으로 확인되었다. Peak 3은 m/z 519.11($[M]^+$)과 271.06($[M-C_9H_{12}O_8]^+$)이 검출되어 pelagonidin을 비당체로하고 malonic acid가 아실화(acetylation)되어 있는 구조로서 pelagonidin-3-O-(6-malonly - glucoside)($C_{24}H_{23}O_{13}$)으로 동정하였다.

아실화된 안토시아닌(acylated anthocyanin)의 경우 UV spectrum상 약 330 nm 범위에서 흡수파장이 나타나는데 본 연구에서 동정된 peak 3의 pelagonidin-3-O-(6-malonly-glucoside)의 UV spectrum을 확인한 결과, 326 nm의 흡수 파장을 확인 할 수 있었다. Bridle & Garcia-Viguera(1997)는 일부 딸기 품종에서 아실화된 안토시아닌과 함께 cyanidin-3-O-rutinoside가 일부 품종에서 검출되었다고 보고하였고, 특히 Takada & Yoshida(1995)는 딸기의 주요 안토시아닌 성분으로 pelagonidin-3-(6-malonly-glucoside)를 확인하였는데 본 연구의 결과와 일치하였고, pelagonidin-3-(6-malonly-glucoside)는 딸기의 안토시아닌 성분 중 5 - 30%가 함유되어 있다고 보고하였다.

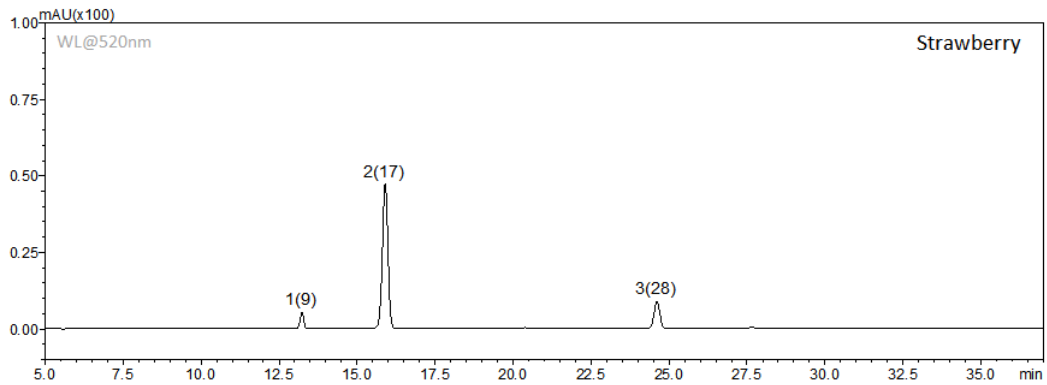
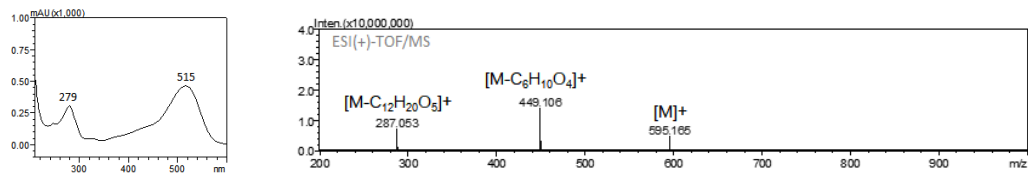
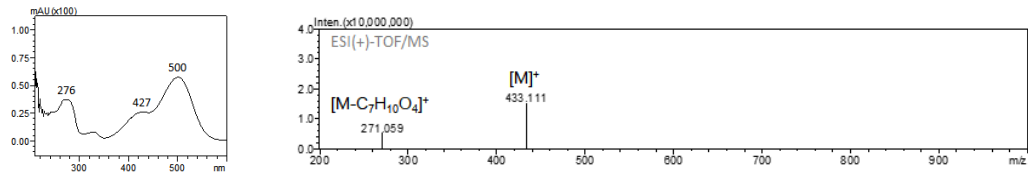


Fig. 1-11. HPLC(WL@520nm) chromatogram of three anthocyanins of strawberry

Peak #1. Cyanidin-3-O-rutinoside



Peak #2. Pelargonidin-3-O-glucoside



Peak #3. Pelargonidin-3-O-(malonly)glucoside

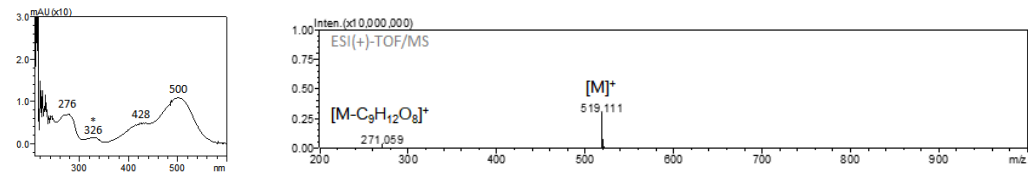


Fig. 1-12. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200-1000) spectra of three anthocyanins of strawberry

Table 1-6. Identification of anthocyanins of strawberry by HPLC-DAD-ESI(+)-TOF/MS

Peak #	t _R (min)	λ _{max} (nm)	ESI-TOF/MS (m/z)		Predicted formula			Identification
			Molecular ion [M] ⁺	Fragment ion	MW.	M.F.	error (mDa)	
1	13.22	515	595.1650	449.1045 /287.0531	595.1663	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	-0.7	Cyanidin-3-O-rutinoside
2	15.87	500	433.1114	271.5932	433.1135	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-1.5	Pelargonidin-3-O-glucoside
3	24.61	500	519.1083	271.059	519.1139	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃	-5.0	Pelargonidin-3-O-(malonyl) glucoside

2) 라즈베리(Raspberry)의 안토시아닌 동정

라즈베리(raspberry)에서는 5종의 안토시아닌이 검출되었으며, 각 안토시아닌의 HPLC chromatogram의 머무름시간(t_R), UV spectrum, ESI(+)-TOF/MS의 mass spectrum에 대해 Fig. 1-13과 Fig 1-14에 나타내었다.

라즈베리의 안토시아닌은 cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-rutinoside, pelagonidin-3-O-galactoside 그리고 pelagonidin-3-O-glucoside으로 4개의 안토시아닌과 안토시아닌딘으로서 cyanidin이 확인되었다.

Peak 1과 2의 UV spectrum 분석 결과, 최대 흡수파장(λ_{max})는 515 nm으로 나타나 cyanidin를 비당체(aglycon)으로 하는 안토시아닌으로 확인되었고 mass spectrum에서도 m/z 287.053의 fragment ion이 확인되어 cyanidin 계열의 안토시아닌으로 결정하고 peak 1은 molecular ion으로 m/z 449.106($[M]^+$)이 확인되고 peak 2는 m/z 595.165($[M]^+$)을 molecular ion으로 하고 m/z 449.106이 fragment ion으로 확인되었다. peak 1의 머무름시간(t_R) 12.65 min과 ESI(+)-TOF/MS의 mass spectrum를 토대로 cyanidin-3-O-glucoside($C_{21}H_{21}O_{11}$)으로 동정하였는데, cyanidin-3-O-glucoside는 cyanidin-3-galactoside와 동일 분자량으로 안토시아닌의 구조에서 galactoside와 glucoside의 hydroxyl group(-OH) 위치 차이에 의한 입체이성질체 화합물로서, Wu & Prior(2005) 등 reversed phase HPLC를 이용한 다수의 안토시아닌 분석 관련 연구 결과 따르면, 동일 비당체의 경우 galactoside가 결합된 안토시아닌 구조가 먼저 분리되고 이후 glucoside 형태의 안토시아닌 화합물이 그 이후로 분리되는 결과를 토대로 각 peak의 머무름시간 기준으로 cyanidin 3-O-galactoside와 cyanidin-3-O-glucoside으로 구분할 수 있었다.

Peak 2는 ESI(+)-TOF/MS의 mass spectrum에서 molecular ion인 m/z 595.165($[M]^+$)과 fragment ion으로 m/z 449.106($[M-C_6H_{10}O_4]^+$)과 m/z 287.053, ($[M-C_{12}H_{20}O_9]^+$)으로서 peak 1인 cyanidin-3-O-glucoside($C_{21}H_{21}O_{11}$)에 rhamnosyl ($C_6H_{10}O_4^+$)가 결합된 cyanidin-3-O-rutinoside($C_{27}H_{31}O_{15}$)으로 동정하였다.

Peak 3, 4는 각각 15.14 min과 15.90 min의 머무름시간으로서 UV spectrum과 mass spectrum 분석 결과, 최대 흡수파장(λ_{max})는 502 nm으로 동일하게 나타났으며 pelagonidin를 비당체으로하는 안토시아닌으로서 확인되고 또한 mass spectrum에서도 동일하게 molecular ion으로 m/z 433.111($[M]^+$)과 fragment ion으로 m/z

271.056($[M-C_6H_{10}O_5]^+$)이 확인되었다. 앞서 살펴본 바와 같이 단당류 (monosaccharides)의 극성에 따라 안토시아닌은 galactoside가 결합된 구조가 glucoside로 결합된 안토시아닌보다 먼저 용출되며 이를 바탕으로 peak 3과 4에 대해 pelagonidin-3-O-galactoside($C_{21}H_{21}O_{10}$)와 pelagonidin-3-O-glucoside($C_{21}H_{21}O_{10}$)으로 동정하였다.

Peak 5는 520 nm의 최대흡광파장과 mass spectrum상 m/z 287.054의 molecular ion($[M]^+$)으로서 안토시아닌인 cyanidin($C_{15}H_{11}O_6$)을 동정하였다.

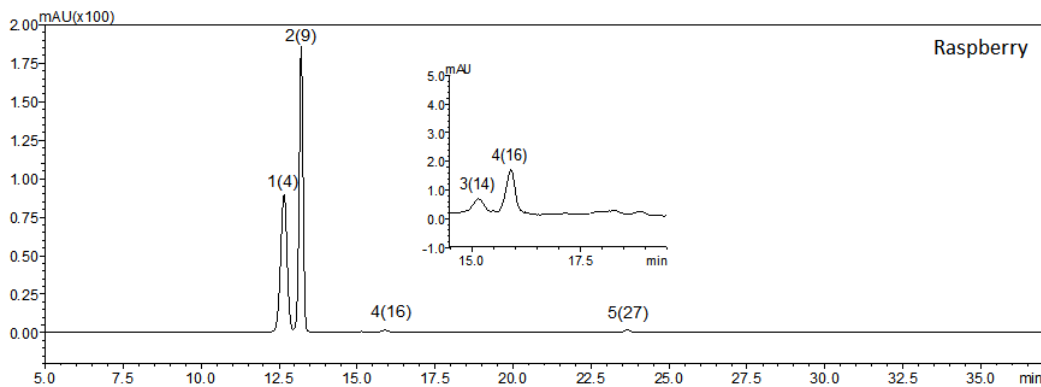
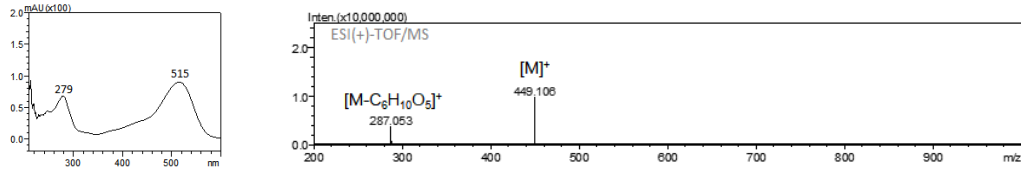
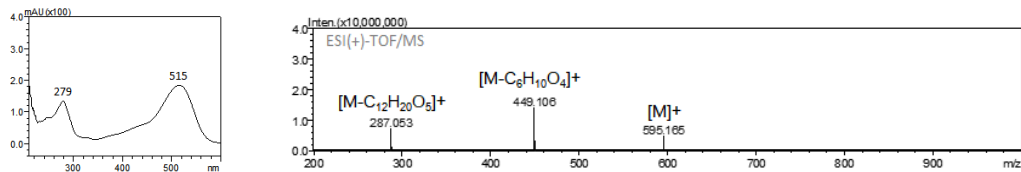


Fig. 1-13. HPLC(WL@520nm) chromatogram of five anthocyanins of raspberry

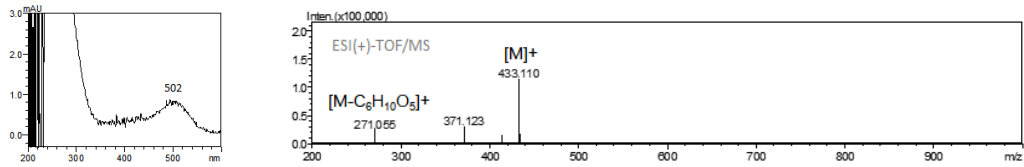
Peak #1. Cyanidin-3-O-glucoside



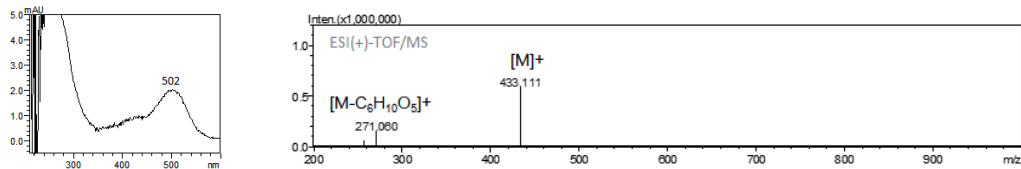
Peak #2. Cyanidin-3-O-rutinoside



Peak #3. Pelargonidin-3-O-galactoside



Peak #4. Pelargonidin-3-O-glucoside



Peak #5. Cyanidin

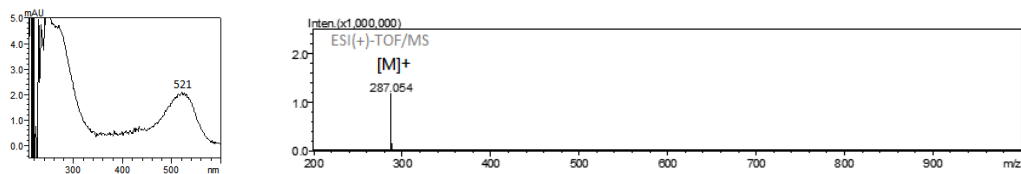


Fig. 1-14. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200-1000) spectra of five anthocyanins of raspberry

Table 1-7. Identification of anthocyanins of raspberry by HPLC-DAD - ESI(+)-TOF/MS

Peak #	t_R (min)	λ_{max} (nm)	ESI-TOF/MS (m/z)		Predicted formula			Identification
			Molecular ion [M] ⁺	Fragment ion	MW.	M.F.	error (mDa)	
1	12.65	515	449.1064	287.0548	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-1.4	Cyanidin-3-O-glucoside
2	13.20	515	595.1649	449.1055 287.5031	595.1663	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	-0.8	Cyanidin-3-O-rutinoside
3	15.14	502	433.1217	271.0558	433.1135	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-3.8	Pelagonidin-3-O-galactoside
4	15.90	502	433.1110	271.0534	433.1135	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-1.9	Pelagonidin-3-O-glucoside
5	23.67	521	287.0535	-	287.0556	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	-1.5	Cyanidin

3) 블루베리(Blueberry)의 안토시아닌 동정

블루베리(blueberry)의 안토시아닌은 본 연구의 베리류 7종 중 21종으로 가장 많은 성분이 분리 동정되었다(Fig. 1-15). HPLC에 의해 분리된 안토시아닌은 UV spectrum의 최대 흡수파장(λ_{max})을 이용하여 비당체(aglycon)인 안토시아닌 계열을 확인한 결과, Pelargonidin를 제외한 cyanidin, delphinidin, petunidin, peonidin, malvidin 형태의 다양한 비당체의 안토시아닌이 구성되어 있는 것으로 나타났고 ESI(+)-TOF/MS mass spectrum 해석으로 블루베리의 안토시아닌을 동정하였다(Fig. 1-16).

Peak 1, 2는 molecular ion($[M]^+$)과 fragment ion으로 m/z 465.100과 m/z 303.046으로 동일하였고, fragment ion인 m/z 303.046은 $[M-C_6H_{10}O_5]^+$ 으로서 비당체인 delphinidin으로 나타났으며 머무름시간이 각각 9.68 min과 10.38 min으로 galactose와 glucose가 결합된 delphinidin-3-O-galactoside($C_{21}H_{21}O_{12}$)와 dephinidin-3-O-glucoside($C_{21}H_{21}O_{12}$)으로 확인하였고, delphinidin 계열을 안토시아닌은 본 연구의 7종 베리류 중 블루베리에서만 동정되었다. Peak 3, 4는 m/z 449.105와 m/z 287.054으로서 molecular ion($[M]^+$)과 fragment ion($[M-C_6H_{10}O_5]^+$)으로 나타나 cyanidin을 비당체으로 하는 안토시아닌으로서 머무름시간을 토대로 cyanidin-3-O-galactoside($C_{21}H_{21}O_{11}$)와 cyanidin-3-O-glucoside($C_{21}H_{21}O_{11}$)으로 동정하였다. Peak 5, 6은 안토시아닌의 비당체로서 petunidin의 flagment ion으로 m/z 317.066($[M-C_6H_{10}O_5]^+$)이 확인되고 m/z 47.117의 molecular ion($[M]^+$)이 동일하게 검출되었으며 머무름시간을 통해 petunidin-3-O-galactoside($C_{22}H_{23}O_{12}$)와 petunidin-3-O-glucoside($C_{22}H_{23}O_{12}$)으로 동정하였다. Peak 7, 8은 molecular ion($[M]^+$)과 fragment ion으로 m/z 419.096과 m/z 287.054이 확인되었고 m/z 287.054은 $[M-C_5H_8O_4]^+$ 으로서 오탄당(pentose)이 탈락된 것으로 Wu 등(2005)의 안토시아닌 분석 결과의 머무름 시간을 토대로 peak 8에 대해 cyanidin-3-O-arabinoside(peak 8)으로 동정하였고 peak 7는 cyanidin에 구조해석 되지 않는 오탄당(pentose)이 결합된 cyanidin 계열의 화합물로 확인되었다.

Peak 9, 10은 HPLC에 의해 분리되지 않아 UV spectrum으로 안토시아닌 계열 분류를 할 수 없었지만 mass spectrum의 질량 패턴 확인 결과, molecular ion($[M]^+$)으로 m/z 463.121과 m/z 449.105, fragment ion으로 m/z 301.069의

$[M-C_6H_{10}O_5]^+$ 과 m/z 317.064의 $[M-C_5H_8O_4]^+$ 으로서 Peonidin-3-O-galactoside ($C_{22}H_{23}O_{11}$)과 구조해석 되지 않는 petunidin+pentose($C_{21}H_{21}O_{11}$)으로 동정하였다.

Peak 11, 12는 peak 9, 10과 마찬가지로 HPLC 크로마토그램에서 분리되지 않았으나 질량 패턴으로 확인한 결과 fragment ion으로 m/z 301.069의 $[M-C_6H_{10}O_5]^+$ 과 m/z 317.064의 $[M-C_5H_8O_4]^+$ 이 확인되어 비당체인 peonidin($C_{16}H_{13}O_6$)과 petunidin ($C_{16}O_{13}O_7$)으로 결정하고 hexose과 pentose가 결합된 형태로서 안토시아닌 당류에 의한 용출 순서에 따라 peak 11은 Peonidin-3-O-glucoside($C_{22}H_{23}O_{11}$)으로, peak 12는 Petunidin-3-O-arabinoside($C_{21}H_{21}O_{11}$)으로 동정하였다. Peak 13, 14, 16, 17은 mass spectrum의 질량 패턴 결과 fragment ion으로 m/z 331.079가 검출되어 malvidin($C_{17}H_{15}O_7$)의 비당체으로 하는 안토시아닌 계열 화합물로 확인되고 peak 13과 14는 molecular ion($[M]^+$)으로 m/z 493.132이 확인되었으며 peak 16, 17은 m/z 463.121이 검출되어 aglycone에 hexose(peak 13, 14)과 pentose(peak 16, 17)가 각각 결합된 형태로서 malvidin-3-O-galactoside($C_{23}H_{25}O_{12}$), malvidin-3-O-glucoside ($C_{23}H_{25}O_{12}$)와 malvidin+pentose($C_{22}H_{23}O_{11}$)과 malvidin-3-O-arabinoside($C_{22}H_{23}O_{11}$)으로 동정하였다. Peak 15는 molecular ion($[M]^+$)과 fragment ion으로 m/z 433.111, m/z 301.071($[M-C_5H_8O_4]^+$)이 검출되어 peonidin-3-O-arabinoside ($C_{21}H_{21}O_{10}$)으로 동정하였다. Peak 18, 19, 20, 21은 각 molecular ion($[M]^+$)이 m/z 287.054, m/z 317.064, m/z 301.069, m/z 331.077이 검출되어 cyanidin($C_{15}H_{11}O_6$), petunidin($C_{16}H_{13}O_7$), peonidin($C_{16}H_{13}O_6$), malvidin($C_{17}H_{15}O_7$)으로 안토시아닌이 순차적으로 동정되었으며 각 안토시아닌 표준용액의 분석 결과와 동일한 순서로 용출되는 것으로 나타났다

블루베리의 안토시아닌 동정 결과, 비당체에 결합된 주된 당류는 galactoside과 glucoside의 hexose와 arabinose 등의 pentose의 monosaccharide가 주류를 이루는 것으로 나타났고, 미동정된 pentose와 cyanidin, petunidin, malvidin가 결합된 형태의 안토시아닌 3종이 검출되어 해당 성분에 대해 분취용 HPLC 등을 이용한 분획물로서 NMR 등의 구조해석이 요구될 것으로 사료되었다. 또한 동일한 비당체를 갖는 안토시아닌의 경우 당 종류에 따라 머무름 시간의 차이가 있는 것을 알 수 있었고 galactose, glucose, arabinose의 순으로 검출되는 것을 확인하였다.

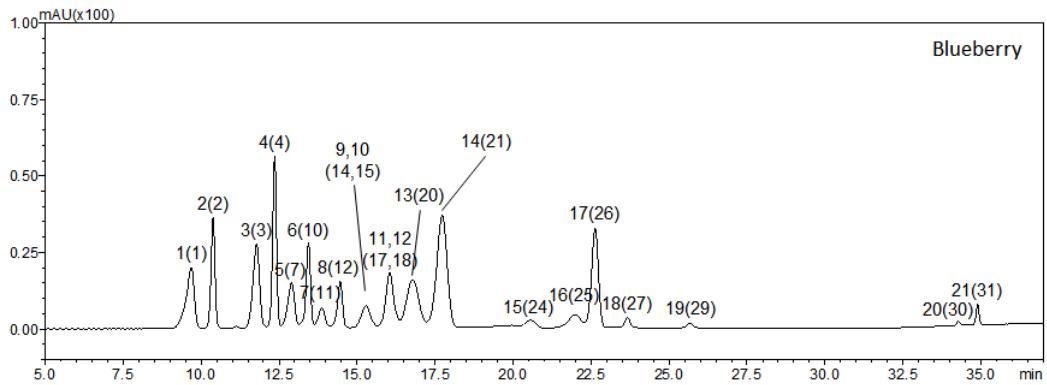
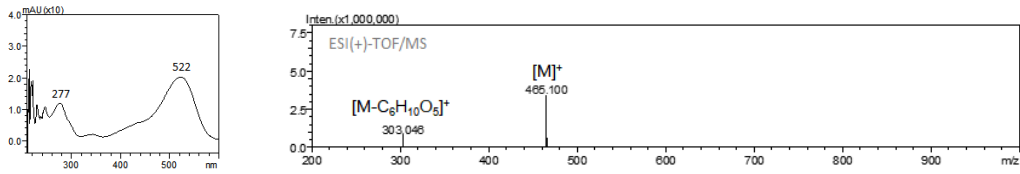
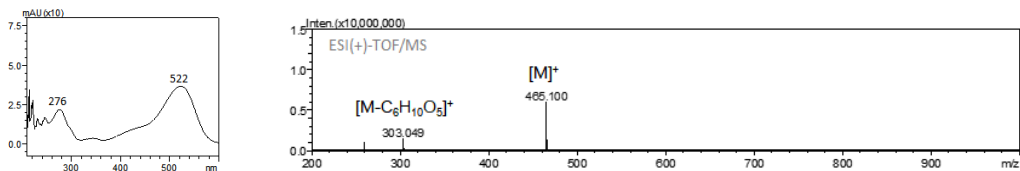


Fig. 1-15. HPLC(WL@520nm) chromatogram of twenty-one anthocyanins of blueberry

Peak #1. Delphinidin-3-O-galactoside



Peak #2. Delphinidin-3-O-glucoside



Peak #3. Cyanidin-3-O-galactoside

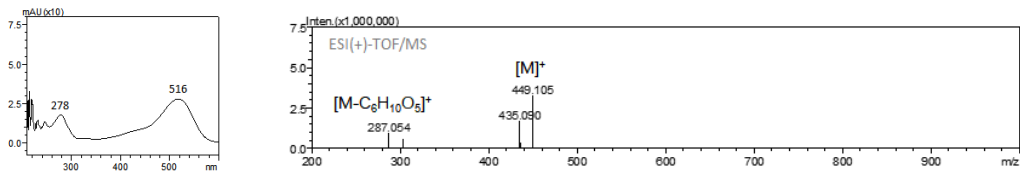
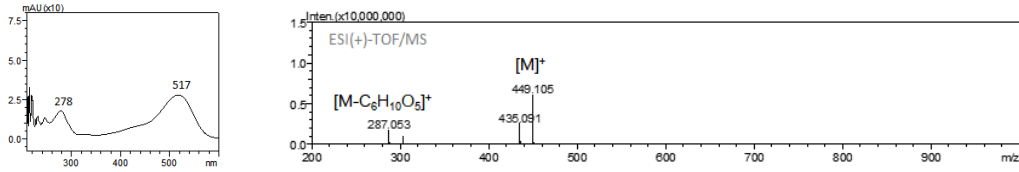
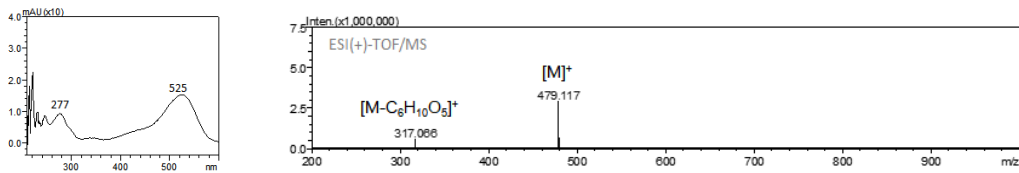


Fig. 1-16. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200-1000) spectra of twenty-one anthocyanins of blueberry (1/5)

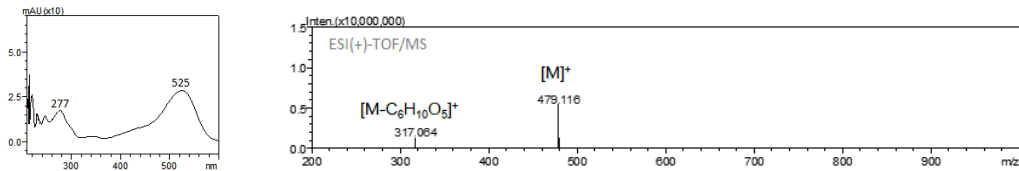
Peak #4. Cyanidin-3-O-glucoside



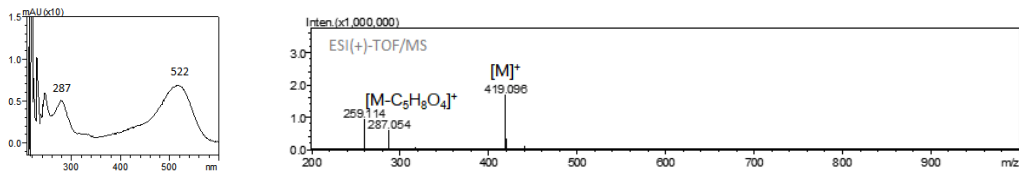
Peak #5. Petunidin-3-O-galactoside



Peak #6. Petunidin-3-O-glucoside



Peak #7. Petunidin+pentose



Peak #8. Cyanidin-3-O-arabinoside

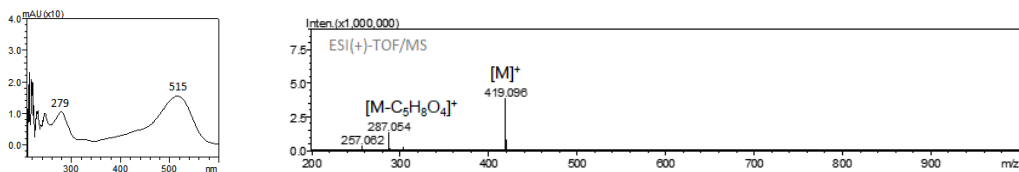
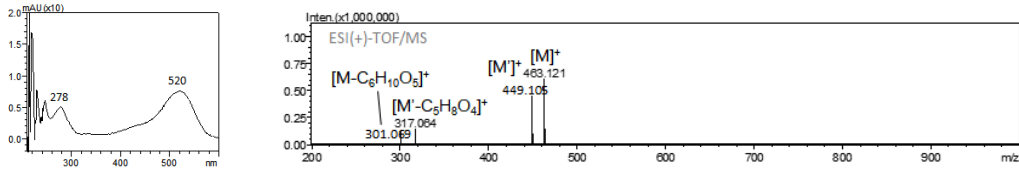
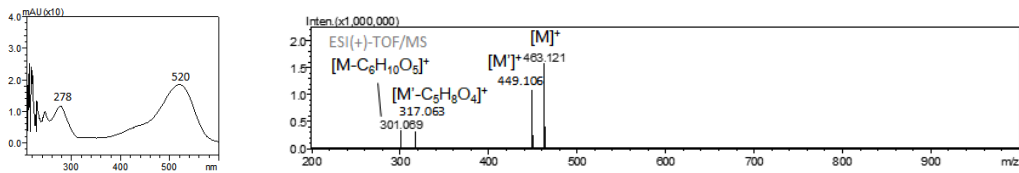


Fig. 1-16. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200-1000) spectra of twenty-one anthocyanins of blueberry (2/5)

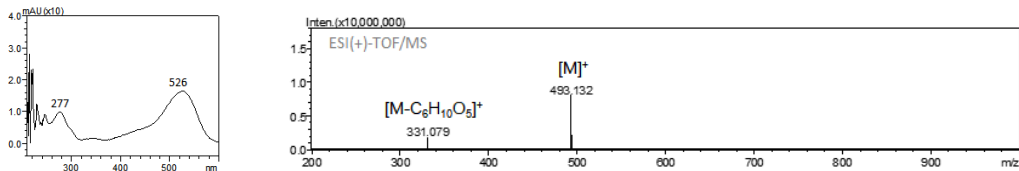
Peak #9. Peonidin-3-galactoside, Peak #10. Petunidin+pentose



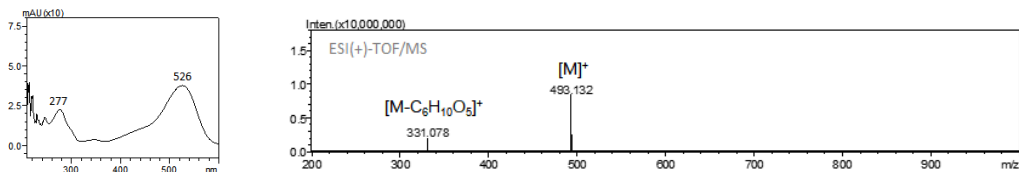
Peak #11. Peonidin-3-O-glucoside, Peak #12. Petunidin-3-O-arabinoside



Peak #13. Malvidin-3-O-galactoside



Peak #14. Malvidin-3-O-glucoside



Peak #15. Peonidin-3-O-arabinoside

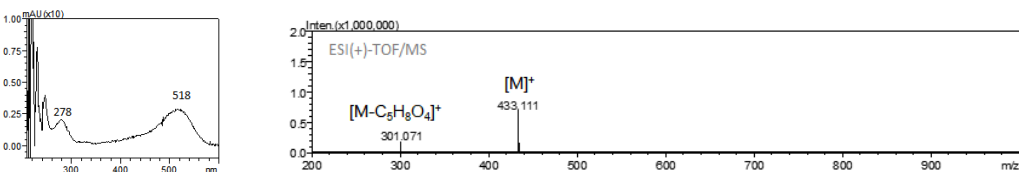
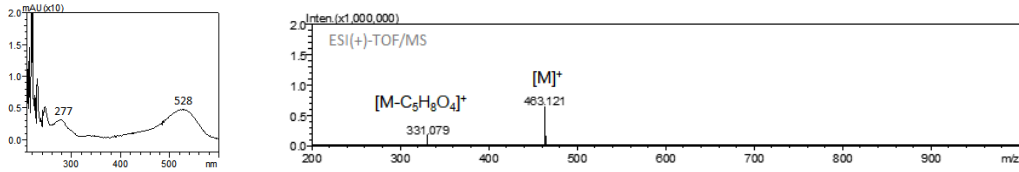
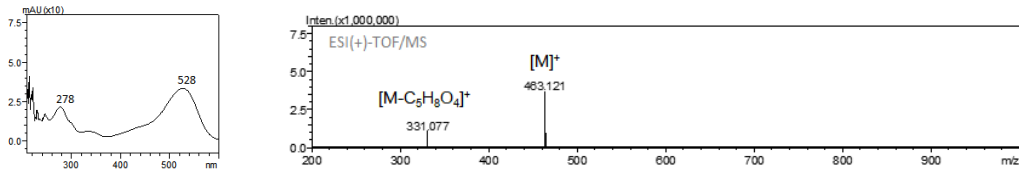


Fig. 1-16. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200-1000) spectra of twenty-one anthocyanins of blueberry (3/5)

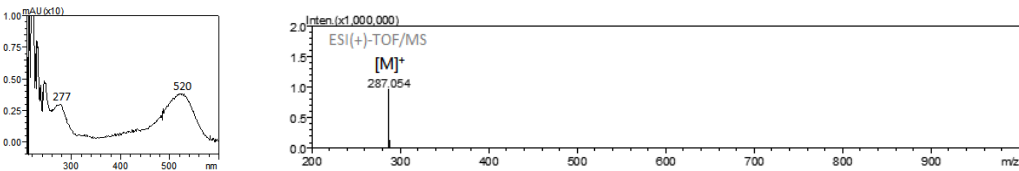
Peak #16. Malvidin+Pentose



Peak #17. Malvidin-3-O-arabinoside



Peak #18. Cyanidin



Peak #19. Petunidin

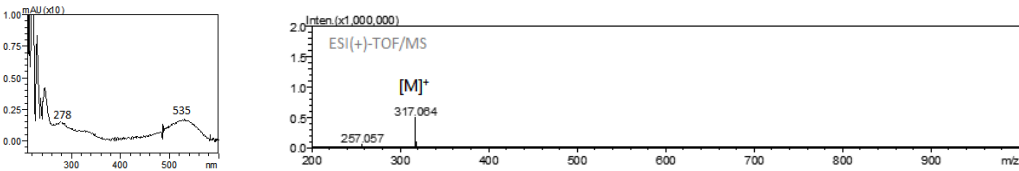
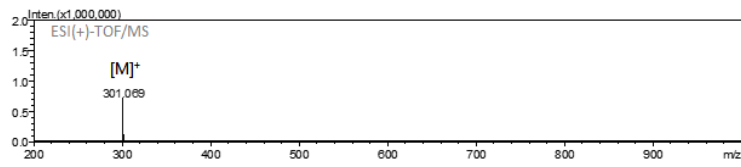
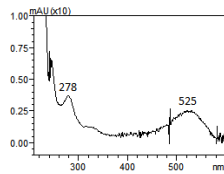


Fig. 1-16. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200-1000) spectra of twenty-one anthocyanins of blueberry (4/5)

Peak #20. Peonidin



Peak #21. Malvidin

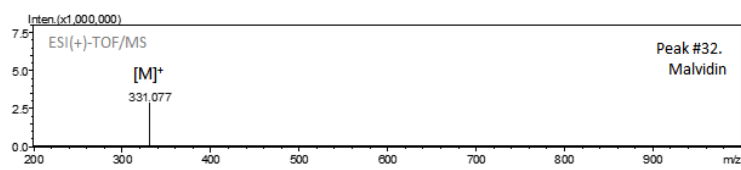
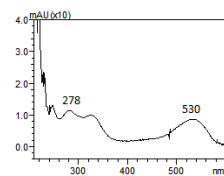


Fig. 1-16. UV spectra(210–600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200–1000) spectra of twenty-one anthocyanins of blueberry (5/5)

Table 1-8. Identification of anthocyanins of blueberry by HPLC-DAD-ESI(+)-TOF/MS

Peak #	t _R (min)	λ _{max} (nm)	ESI-TOF/MS (m/z)		Predicted formula			Identification
			Molecular ion [M] ⁺	Fragment ion	MW.	M.F.	error (mDa)	
1	9.68	522	465.1010	303.0466	465.1033	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	-1.8	Delphinidin-3-O-galactoside
2	10.38	522	465.0992	303.0493	465.1033	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	-3.6	Delphinidin-3-O-glucoside
3	11.78	516	449.1047	287.0548	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-3.1	Cyanidin-3-O-galactoside
4	12.36	517	449.1038	287.0540	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-4.0	Cyanidin-3-O-glucoside
5	12.90	525	479.1136	317.0629	479.1190	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	-4.8	Petunidin-3-O-galactoside
6	13.44	525	479.1182	317.0630	479.1190	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	-0.2	Petunidin-3-O-glucoside
7	13.86	522	419.0958	287.0542	419.0978	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	-1.5	Cyanidin+Pentose
8	14.46	515	419.0952	287.0536	419.0978	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	-2.1	Cyanidin-3-O-arabinoside
9	15.28	520	463.1208	301.0695	463.1240	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	-2.7	Peonidin-3-O-galactoside
10	15.28	520	449.1051	317.0634	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-2.7	Petunidin+Pentose
11	16.04	520	463.1207	301.0687	463.1240	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	-2.8	Peonidin-3-O-glucoside

Table 1-8. Continued

Peak #	t _R (min)	λ _{max} (nm)	ESI-TOF/MS (m/z)		Predicted formula			Identification
			Molecular ion [M] ⁺	Fragment ion	MW.	M.F.	error (mDa)	
12	16.04	520	449.1055	317.0633	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-2.3	Petunidin 3-O-arabinoside
13	16.78	526	493.1332	331.0806	493.1346	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	-0.9	Malvidin- 3-O-galactoside
14	17.72	526	493.1316	331.0772	493.1346	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	-2.5	Malvidin- 3-O-glucoside
15	20.54	518	433.1111	301.0709	433.1135	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-1.8	Peonidin- 3-O-arabinoside
16	21.99	528	463.1210	331.0791	463.1240	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	-2.5	Malvidin +pentose
17	22.63	528	463.1221	331.0789	463.1240	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	-1.4	Malvidin- 3-O-arabinoside
18	23.66	520	287.0553	-	287.0556	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	-1.7	Cyanidin
19	25.67	535	317.0636	-	317.0661	C ₁₆ H ₁₃ O ₇	-2.0	Petunidin
20	34.27	525	301.0690	-	301.0712	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	-1.7	Peonidin
21	34.88	530	331.0787	-	331.0818	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	-2.5	Malvidin

4) 블랙베리(Korean Blackberry)의 안토시아닌 동정

블랙베리(Korean blackberry)에서는 7종의 안토시아닌이 검출되었으며, 각 안토시아닌의 HPLC chromatogram의 머무름시간(t_R), UV spectrum, ESI(+)-TOF/MS의 mass spectrum에 대해 Fig. 1-17과 Fig. 1-18에 나타내었으며 5종의 cyanidin 계열과 2종의 pelagonidin 계열의 안토시아닌이 동정되었다.

Peak 1의 mass spectrum의 질량 패턴 분석 결과 fragment ion으로 m/z 581.145, m/z 287.049이 확인되어 rhamnoside가 탈락된 $[M-C_6H_{10}O_4]^+$ 과 비당체으로서 cyanidin의 $[M-C_{17}H_{28}O_{13}]^+$ 으로 확인되었으며 molecular ion($[M]^+$)으로 m/z 727.201이 확인되어 cyanidin-3-O-sambubioside-5-O-rhamnoside($C_{32}H_{39}O_{19}$)으로 동정하였다. Peak 2는 molecular ion($[M]^+$)으로 m/z 581.145이 검출되었고 fragment ion으로 m/z 449.103, m/z 287.052이 확인되어 $[M-C_5H_8O_4]^+$ 와 $[M-C_{11}H_{17}O_9]^+$ 으로서 hexose의 탈락 이온과 비당체인 cyanidin으로 검출되어 cyanidin-3-O-sambubioside($C_{26}H_{29}O_{15}$)으로 동정하였다. Peak 3은 m/z 727.200의 molecular ion($[M]^+$)이 확인되어 cyanidin-3-O-xylosylrutinoside($C_{32}H_{39}O_{19}$)으로 동정하였으며 peak 4의 질량 패턴 확인 결과, fragment ion으로 m/z 287.053이 확인되어 비당체인 cyanidin 계열로서 molecular ion($[M]^+$) m/z 595.160의 조합으로 이당류가 결합된 cyanidin-3-O-rutinoside($C_{27}H_{31}O_5$)으로 동정하였다. Peak 5, 6은 m/z 271.056의 fragment ion이 확인되어 pelagonidin 계열의 안토시아닌으로 분류하고 각 molecular ion($[M]^+$)이 m/z 433.109과 m/z 579.166으로서 pelagonidin-3-O-glucoside($C_{21}H_{21}O_{10}$)와 pelagonidin-3-O-rutinoside($C_{27}H_{31}O_{14}$)으로 동정하였다.

블랙베리는 주로 cyanidin 계열과 pelagonidin 계열의 안토시아닌의 조성으로 구성되어 있는 것으로 나타났으며 Lee 등(2013)은 *R. occidentalis*의 주요 안토시아닌 조성으로 cyanidin-3-O-sambubioside, cyanidin-3-O-xylosylrutinoside, cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-rutinoside, pelagonidin-3-O-glucoside, pelagonidin-3-O-rutinoside이 함유되어 있다고 보고한 결과와 일치하는 것을 확인하였다.

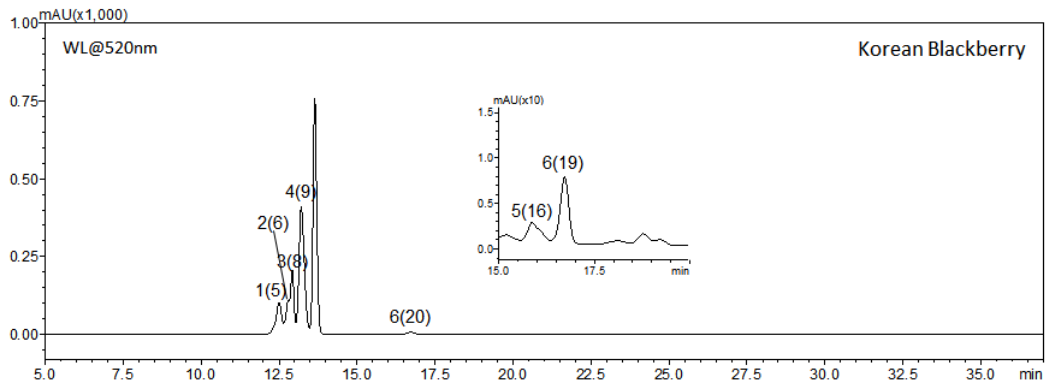
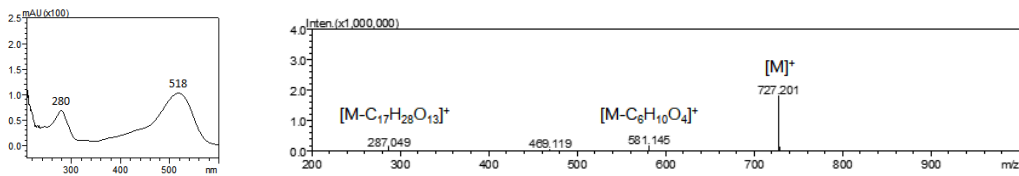
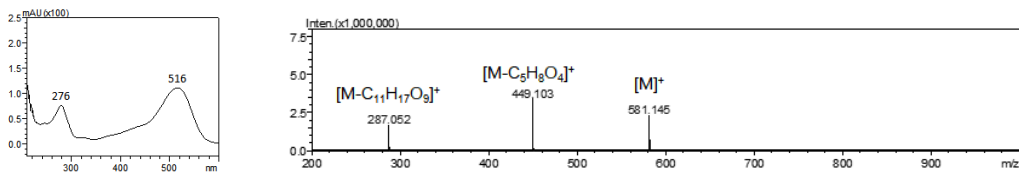


Fig. 1-17. HPLC(WL@520nm) chromatogram of six anthocyanins of Korean blackberry

Peak #1. Cyanidin-3-O-sambubioside-5-O-rhamnoside



Peak #2. Cyanidin-3-O-sambubioside



Peak #3. Cyanidin-3-O-xylosylrutinoside

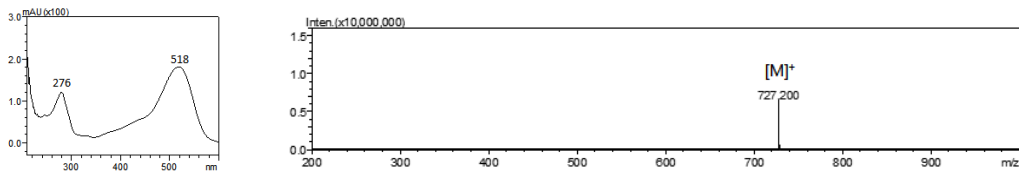
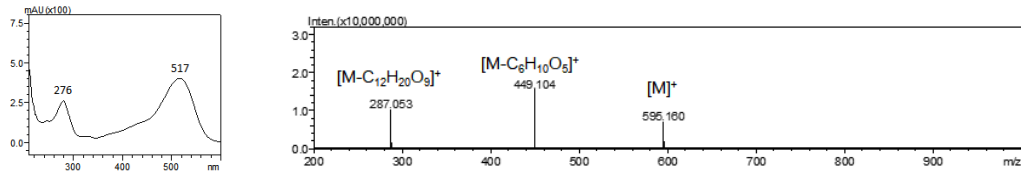
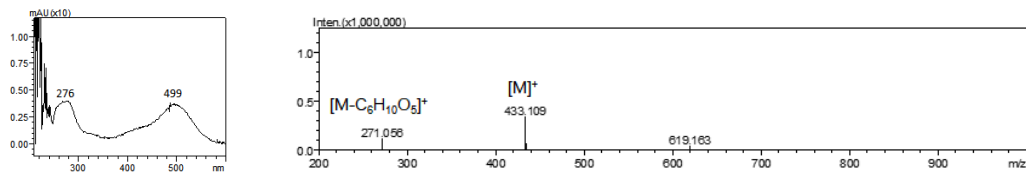


Fig. 1-18. UV spectra(210–600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200–1000) spectra of six anthocyanins of Korean blackberry (1/2)

Peak #4. Cyanidin-3-O-rutinoside



Peak #5. Pelagonidin-3-O-glucoside



Peak #6. Pelagonidin-3-O-rutinoside

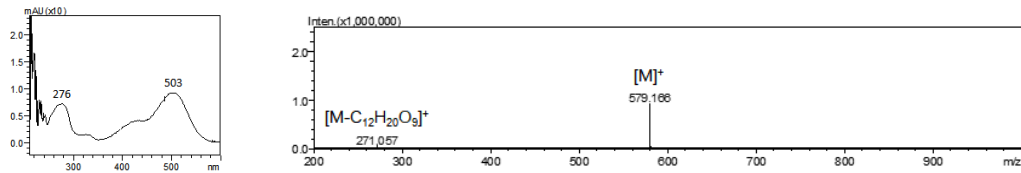


Fig. 1-18. UV spectra(210–600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200–1000) spectra of six anthocyanins of Korean blackberry (2/2)

Table 1-9. Identification of anthocyanins of Korean blackberry by HPLC-DAD-ESI(+)-TOF/MS

Peak #	t _R (min)	λ _{max} (nm)	ESI-TOF/MS (m/z)		Predicted formula			Identification
			Molecular ion [M] ⁺	Fragment ion	MW.	M.F.	error (mDa)	
1	12.50	518	727.2006	581.1432/ 287.0514	727.2086	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₉	-7.4	Cyanidin-3-O-sambubioside-5-O-rhamnoside
2	12.80	516	581.1438	449.1039/ 287.0523	581.1506	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₅	-6.3	Cyanidin-3-O-sambubioside
3	12.92	518	727.2023	-	727.2086	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₉	-5.7	Cyanidin-3-O-xylosyl-rutinoside
4	13.21	517	595.1610	449.1036/ 287.0523	595.1663	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	-4.7	Cyanidin-3-O-rutinoside
5	15.87	499	433.1087	271.0569	433.1135	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-4.2	Pelagonidin-3-O-glucoside
6	16.72	503	595.1657	271.0577	579.1714	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	-5.1	Pelagonidin-3-O-rutinoside

5) 크랜베리(Cranberry)의 안토시아닌 동정

크랜베리(cranberry)는 12종의 안토시아닌이 검출되었으며, 각 안토시아닌의 HPLC chromatogram의 머무름시간(t_R), UV spectrum, ESI(+)-TOF/MS의 mass spectrum에 대해 Fig. 1-19와 Fig. 1-20에 나타내었다. UV spectrum의 최대 흡수 파장(λ_{max})을 이용하여 안토시아닌의 계열을 분석한 결과 cyanidin, peonidin, malvidin으로 구성되어 있는 것으로 확인하였다.

Peak 1과 2의 mass spectrum을 질량 패턴은 molecular ion($[M]^+$)으로 m/z 449.104, fragment ion은 m/z 287.053, hexose가 탈락된 이온 형태로서 $[M-C_6H_{10}O_5]^+$ 으로 확인되고 동일 비당체에서 당류 형태에 따라 머무름시간이 결정됨으로서 peak 1은 cyanidin-3-O-galactoside($C_{21}H_{21}O_{11}$)으로, peak 2는 cyanidin-3-O-glucoside($C_{21}H_{21}O_{11}$)으로 동정하였다. Peak 3과 4의 mass spectrum상 질량 패턴은 peak 1,2와 마찬가지로 m/z 287.052의 fragment ion이 확인되고 molecular ion($[M]^+$)은 m/z 449.104이 관찰되어 두 질량 이온의 차이에 의해 오탄당(pentose)가 결합되어 있는 것으로 확인하였고 머무름 시간에 따라 peak 3은 안토시아닌의 당류의 구조가 동정되지 않고 pentose가 결합된 cyanidin+pentose($C_{15}H_{11}O_6 + C_5H_{10}O_5 - H_2O$)이며 peak 4는 cyanidin-3-O-arabioside($C_{20}H_{19}O_{10}$)으로 동정하였다. Peak 5, 6, 7, 8의 mass spectrum상 질량 패턴 확인 결과, fragment ion으로 m/z 301.069가 확인되어 peonidin의 질량 이온으로 확인되었으며 peak 5, 6의 molecular ion($[M]^+$)으로 m/z 419.111이 확인되어 hexose의 당류가 결합된 형태의 안토시아닌으로서 peak 5는 peonidin-3-O-galactoside($C_{23}H_{22}O_{11}$), peak 6는 peonidin-3-O-glucoside($C_{23}H_{22}O_{11}$)으로 동정하고 peak 7, 8은 fragment ion과 molecular ion($[M]^+$)의 질량 차이(Δm)가 m/z 132.043으로서 pentose($C_6H_{10}O_5$)가 비당체(aglycone)인 peonidin에 결합된 형태로서 peak 7은 peonidin+pentoside, peak 8은 peonidin-3-O-arabioside($C_{21}H_{21}O_{10}$)으로 동정하였다. Peak 9는 m/z 331.079의 fragment ion, $[M-C_5H_8O_4]^+$ 과 m/z 463.121의 molecular ion($[M]^+$)이 확인되어 malvidin-3-O-arabioside으로 동정하였고, peak 10, 11, 12는 molecular ion($[M]^+$)으로 m/z 287.054, m/z 301.069, m/z 331.079가 확인되어 안토시아닌으로서 cyanidin($C_{15}H_{11}O_6$), peonidin($C_{16}H_{13}O_6$), malvidin($C_{17}H_{15}O_7$)으로 동정하였다.

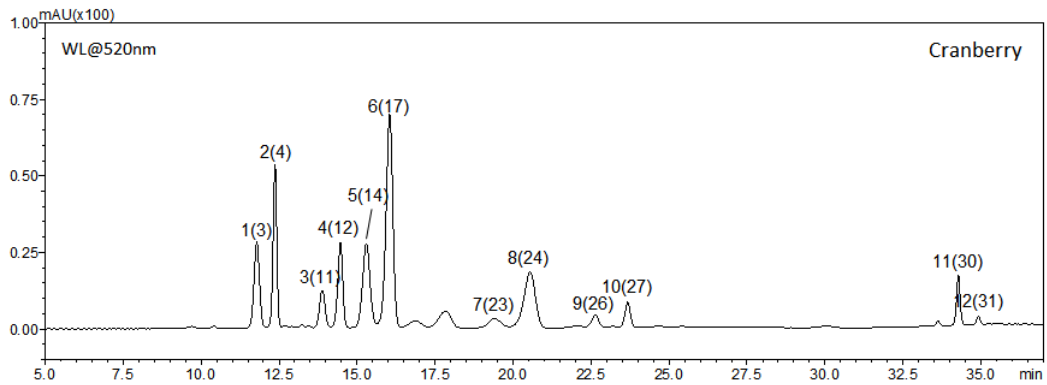
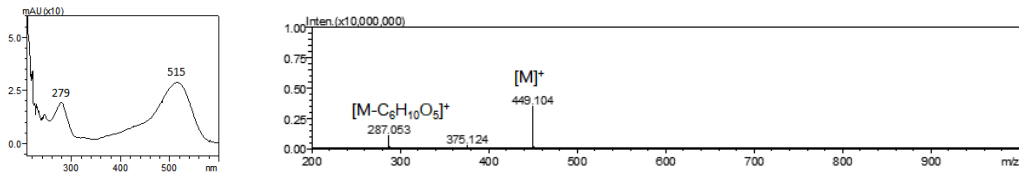
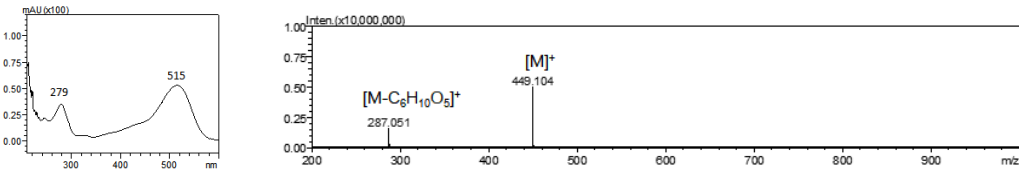


Fig. 1-19. HPLC(WL@520nm) chromatogram of twelve anthocyanins of cranberry

Peak #1. Cyanidin-3-O-galactoside



Peak #2. Cyanidin-3-O-glucoside



Peak #3. Cyanidin+pentose

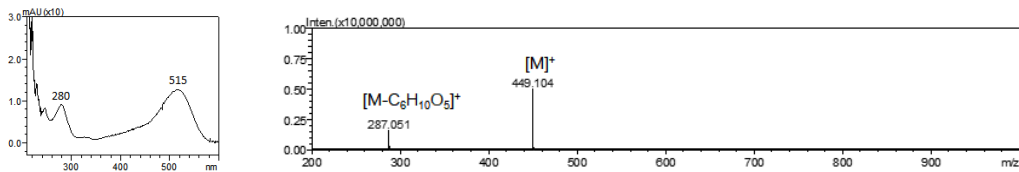
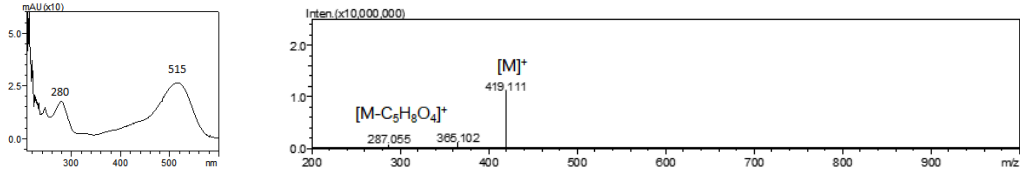
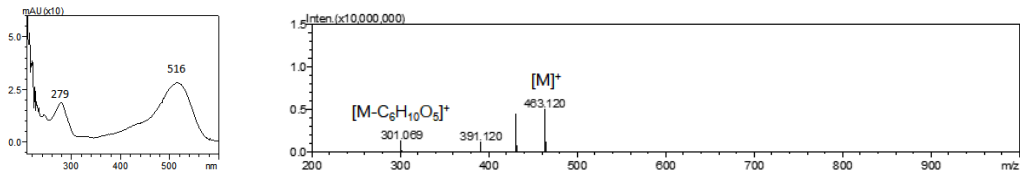


Fig. 1-20. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200-1000) spectra of twelve anthocyanins of cranberry (1/3)

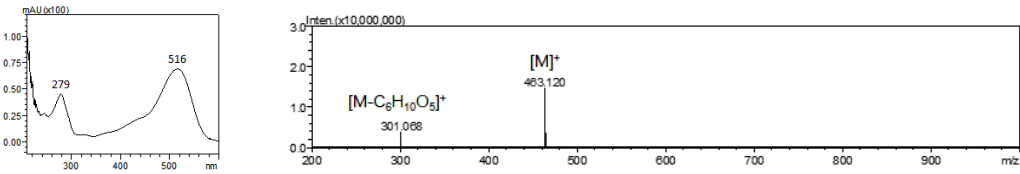
Peak #4. Cyanidin+3-O-arabinside



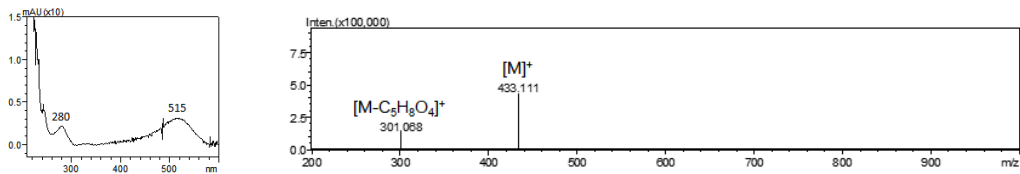
Peak #5. Peonidin-3-O-galactoside



Peak #6. Peonidin-3-O-glucoside



Peak #7. Peonidin+pentose



Peak #8. Peonidin3-O-arabinside

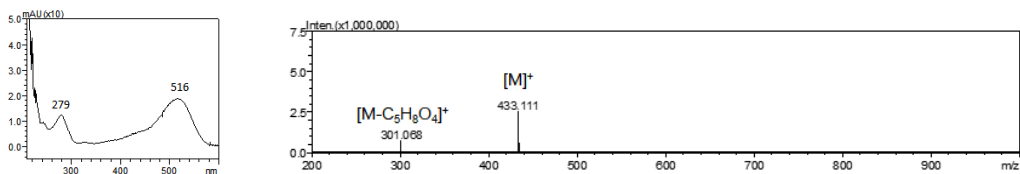
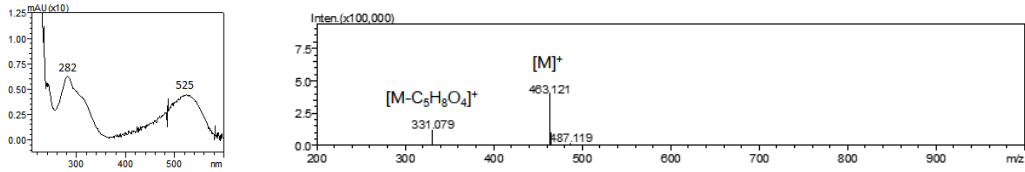
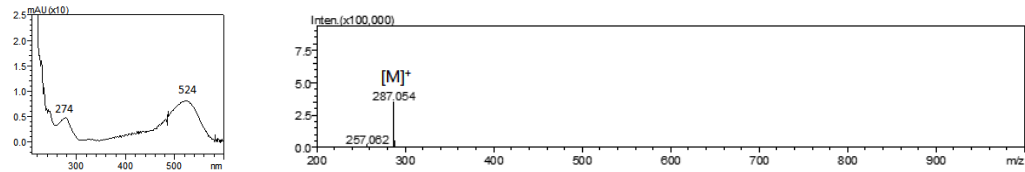


Fig. 1-20. UV spectra(210–600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200–1000) spectra of twelve anthocyanins of cranberry (2/3)

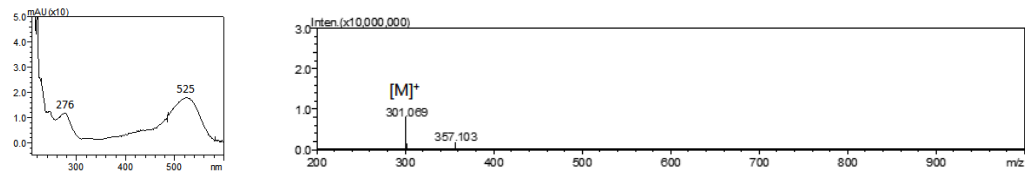
Peak #9. Malvidin-3-O-arabinoside



Peak #10. Cyanidin



Peak #11. Peonidin



Peak #12. Malvidin

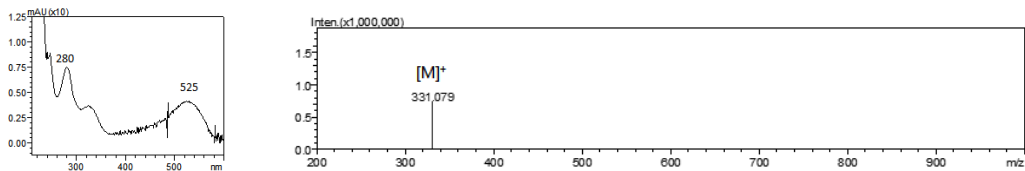


Fig. 1-20. UV spectra(210–600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200–1000) spectra of twelve anthocyanins of cranberry (3/3)

Table 1-10. Identification of anthocyanins of cranberry by HPLC-DAD-ESI(+)-TOF/MS

Peak #	t _R (min)	λ _{max} (nm)	ESI-TOF/MS (m/z)		Predicted formula			Identification
			Molecular ion [M] ⁺	Fragment ion	MW.	M.F.	error (mDa)	
1	11.78	515	449.1050	287.0528	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-2.8	Cyanidin-3-O-galactoside
2	12.37	515	449.1045	287.0529	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-3.3	Cyanidin-3-O-glucoside
3	13.88	515	419.1001	287.0536	419.0978	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	2.8	Cyanidin +pentose
4	14.46	515	419.0938	287.0530	419.0978	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	-3.5	Cyanidin-3-O-arabioside
5	15.30	516	463.1201	301.0687	463.1240	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	-2.5	Peonidin-3-O-galactoside
6	16.04	516	463.1201	301.0695	463.1240	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	-3.4	Peonidin-3-O-glucoside
7	19.39	515	433.1113	301.0682	433.1135	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-1.6	Peonidin +pentose
8	20.54 4	516	433.1112	301.0684	433.1135	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-1.7	Peonidin-3-O-arabioside
9	22.63	525	463.1202	331.0796	463.1240	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	-3.3	Malvidin-3-O-arabioside
10	23.67	524	287.0535	-	287.0556	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	-1.5	Cyanidin
11	34.27	525	301.0687	-	301.0712	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	-2.0	Peonidin
12	34.91	525	331.0783	-	331.0818	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	-2.9	Malvidin

6) 아로니아(Aronia)의 안토시아닌 동정

아로니아(aronia, chokeberry)는 7종의 안토시아닌이 검출되었으며, 각 안토시아닌의 HPLC chromatogram의 머무름시간(t_R), UV spectrum, ESI(+)-TOF/MS의 mass spectrum에 대해 Fig. 1-21과 Fig. 1-22에 나타내었다. UV spectrum의 최대 흡수 파장(λ_{max})을 분석한 결과, cyanidin의 단일 계열의 안토시아디닌으로 구성되어 있는 것으로 나타났다.

아로니아는 7종의 안토시아닌의 mass spectrum의 질량 패턴 확인 결과, fragment ion으로 m/z 287.053이 검출되어 비당체인 cyanidin으로 확인되었으며 peak 1, 2의 molecular ion($[M]^+$)은 m/z 449.106으로서 hexose가 결합된 안토시아닌으로서 머무름시간을 고려하여 peak 1은 cyanidin-3-galactoside($C_{21}H_{21}O_{11}$), peak 2는 cyanidin-3-glucoside($C_{21}H_{21}O_{11}$)으로 동정하였다. Peak 3은 cyanidin의 질량 이온인 m/z 287.053 외 m/z 449.104의 fragment ion이 검출되어 $[M-C_6H_{10}O_5]^+$ 으로 해석하고 molecular ion($[M]^+$)은 m/z 595.160으로서 cyanidin-3-O-runtinoside ($C_{27}H_{31}O_{15}$)으로 동정하였다. Peak 4, 5, 6은 molecular ion($[M]^+$) m/z 419.091과 fragment ion m/z 287.053의 질량 차이(Δm)가 m/z 132.038으로 계산되고 이를 토대로 pentose ($C_5H_8O_4$)가 비당체인 peonidin에 결합된 형태로 해석하였으며 안토시아닌의 당류에 의한 분리 순서와 머무름시간을 고려하여 peak 4는 cyanidin+pentose ($C_{20}H_{19}O_{10}$), peak 5는 cyanidin-3-O-arabinoside($C_{20}H_{19}O_{10}$), peak 6은 cyanidin-3-O-xyloside ($C_{20}H_{19}O_{10}$)으로 동정하였다. peak 7은 molecular ion($[M]^+$)으로 m/z 287.053이 검출되어 cyanidin($C_{15}H_{11}O_6$)으로 확인하였다(Table 1-11).

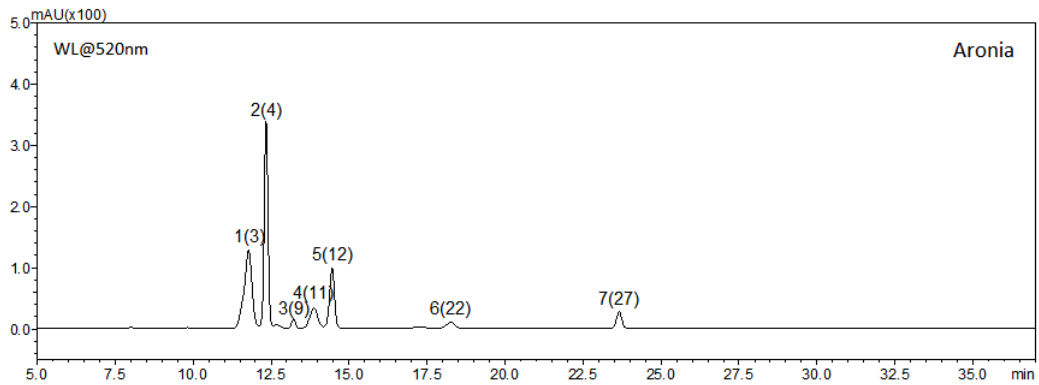
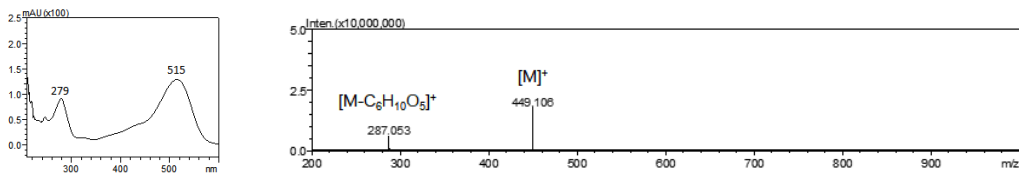
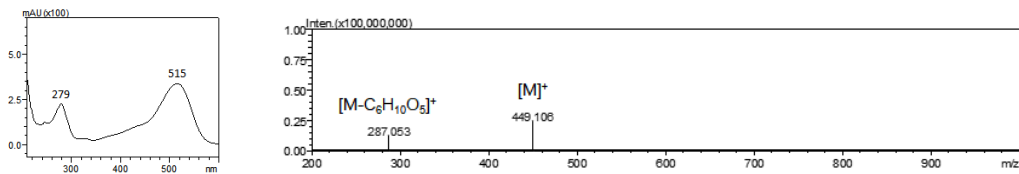


Fig. 1-21. HPLC(WL@520nm) Chromatogram of seven anthocyanins of aronia

Peak #1. Cyanidin-3-O-galactoside



Peak #2. Cyanidin-3-O-glucoside



Peak #3. Cyanidin-3-O-rutinoside

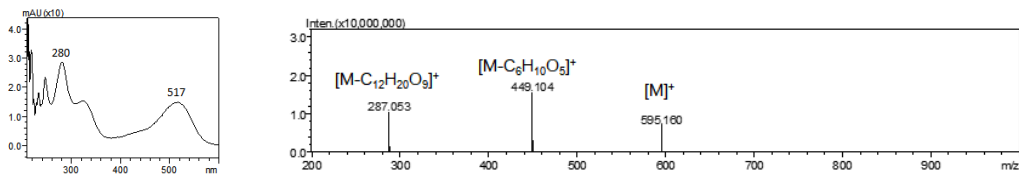
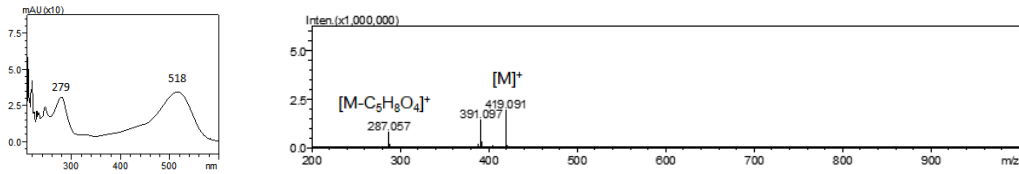
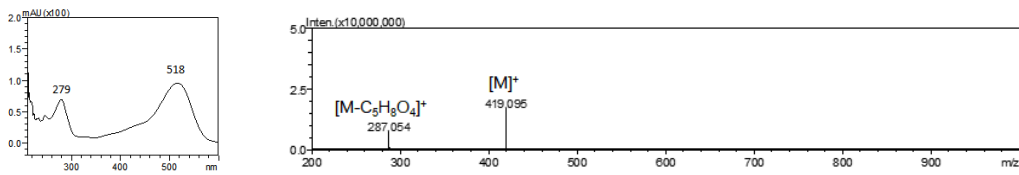


Fig. 1-22. UV spectra(210–600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200–1000) spectra of seven anthocyanins of aronia (1/2)

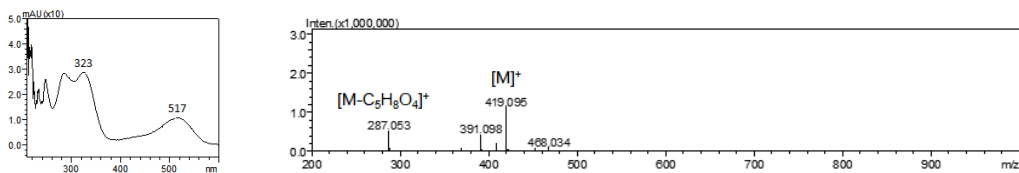
Peak #4. Cyanidin+pentose



Peak #5. Cyanidin-3-O-arabinoside



Peak #6. Cyanidin-3-O-xyloside



Peak #7. Cyanidin

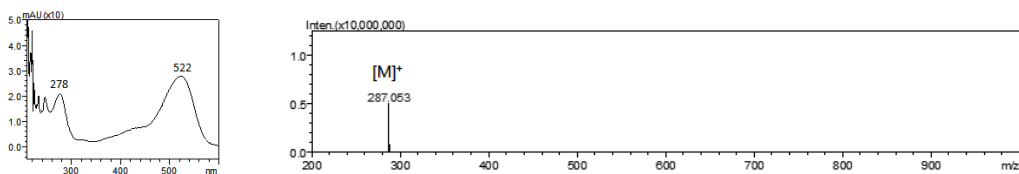


Fig. 1-22. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS (m/z 200-1000) spectra of seven anthocyanins of aronia (2/2)

Table 1-11. Identification of anthocyanins of aronia by HPLC-DAD-ESI(+)-TOF/MS

Peak #	t _R (min)	λ _{max} (nm)	ESI-TOF/MS (m/z)		Predicted formula			Identification
			Molecular ion [M] ⁺	Fragment ion	MW.	M.F.	error (mDa)	
1	11.77	515	449.1058	287.0532	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-2.0	Cyanidin-3-O-galactoside
2	12.34	515	449.1054	287.0522	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-2.4	Cyanidin-3-O-glucoside
3	13.22	517	595.1608	449.1036/ 287.0523	595.1663	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	-4.2	Cyanidin-3-O-rutinoside
4	13.87	518	419.0940	287.0538	419.0978	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	-3.3	Cyanidin +pentose
5	14.45	518	419.0951	287.0535	419.0978	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	-2.2	Cyanidin-3-O-arabinoside
6	18.26	517	419.0953	287.0532	419.0978	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	-2.0	Cyanidin-3-O-xyloside
7	23.65	522	287.0532	-	287.0532	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	-1.8	Cyanidin

7) 오디(Mulberry)의 안토시아닌 동정

오디(mulberry)는 5종의 안토시아닌이 검출되었으며, 각 안토시아닌의 HPLC chromatogram의 머무름시간(t_R), UV spectrum, ESI(+)-TOF/MS의 mass spectrum에 대해 Fig. 1-23과 Fig. 1-24에 나타내었다. UV spectrum의 최대 흡수파장(λ_{max})을 분석한 결과, cyanidin과 pelagonidin 계열의 안토시아닌으로 구성되어 있는 것으로 확인되었다.

Peak 1, 2의 mass spectrum의 질량 패턴 확인 결과, 비당체(aglycon)의 질량 이온 m/z 287.053의 fragment ion이 관찰되어 cyanidin 계열의 안토시아닌으로 확인되었으며 peak 1과 2에서 m/z 449.106이 확인되었는데 peak 1은 molecular ion($[M]^+$)으로, peak 2는 fragment ion $[M-C_6H_{10}O_5]^+$ 의 질량이온으로 glucosyl이 탈락된 형태로 확인되고, 특히 peak 2의 molecular ion($[M]^+$)으로 m/z 595.161으로 확인되었으며, peak 1은 cyanidin-3-O-glucoside($C_{21}H_{21}O_{11}$), peak 2는 cyanidin-3-O-rutinoside($C_{27}H_{31}O_{15}$)으로 동정하였다. Peak 3, 4는 fragment ion m/z 271.058이 검출되어 pelagonidin 계열로서 peak 3의 molecular ion($[M]^+$)은 m/z 433.111이 확인되어 pelagonidin-3-O-glucoside ($C_{21}H_{21}O_{10}$)으로 동정하였고, peak 4는 molecular ion($[M]^+$) m/z 597.169으로서 질량 차이(Δm)가 326.111으로서 이당류가 결합된 안토시아닌으로서 pelagonidin-3-O-rutinoside($C_{27}H_{31}O_{14}$)으로 동정하였다.

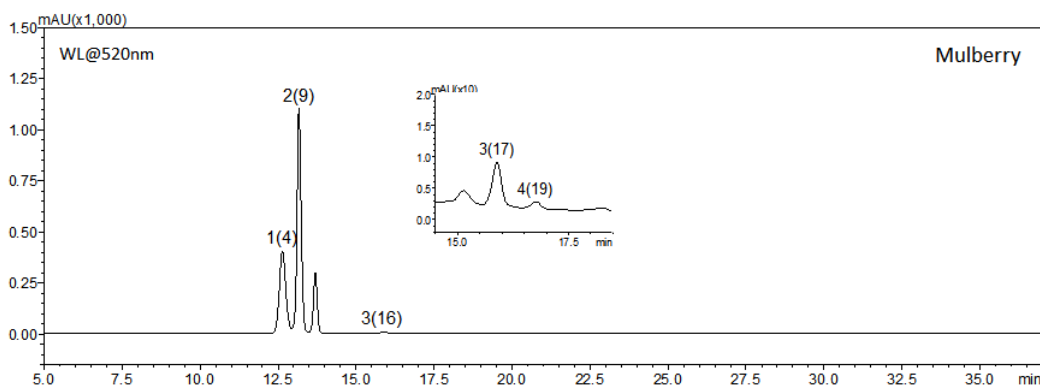
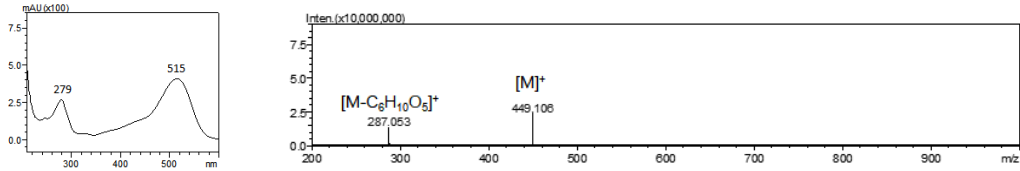
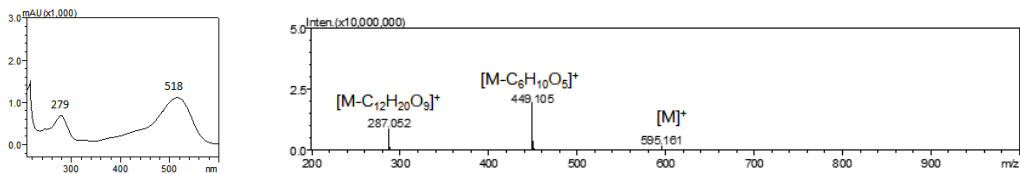


Fig. 1-23. HPLC(WL@520nm) chromatogram of four anthocyanins of mulberry

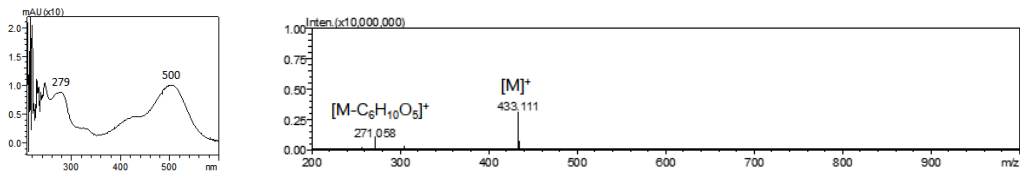
Peak #1. Cyanidin-3-O-glucoside



Peak #2. Cyanidin-3-O-rutinoside



Peak #3. Pelargonidin-3-O-glucoside



Peak #4. Pelargonidin-3-O-rutinoside

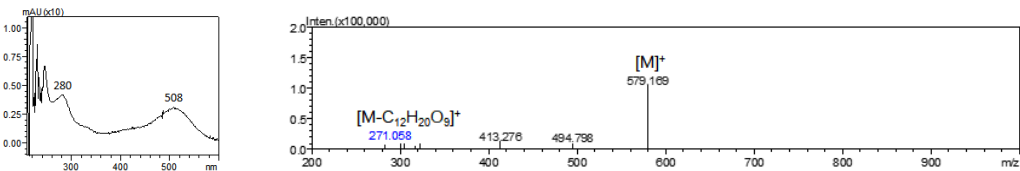


Fig. 1-24. UV spectra(210-600nm) and ESI(+)-TOF/MS(m/z 200-1000) spectra of four anthocyanins of mulberry

Table 1-12. Identification of anthocyanins of mulberry by HPLC-DAD-ESI(+)-TOF/MS

Peak #	t _R (min)	λ _{max} (nm)	ESI-TOF/MS (m/z)		Predicted formula			Identification
			Molecular ion [M] ⁺	Fragment ion	MW.	M.F.	error (mDa)	
1	12.63	515	449.1055	287.0526	449.1084	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-2.3	Cyanidin-3-O-glucoside
2	13.16	518	595.1666	449.1066/ 287.0544	595.1663	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	0.9	Cyanidin-3-O-rutinoside
4	15.88	500	433.111	271.0547	433.1135	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-1.8	Pelagonidin-3-O-glucoside
5	16.76	508	579.1672	271.0578	579.1714	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	-3.6	Pelagonidin-3-O-rutinoside

3. 베리류의 안토시아닌 조성 비교

베리류 7종의 안토시아닌 동정은 HPLC와 ESI(+)-TOF/MS를 이용하여 분석한 결과 총 31종의 안토시아닌이 확인되었고 각 베리류의 안토시아닌 구성과 분포는 Table 1-13와 1-14에 나타내었다.

베리류 7종의 안토시아닌 조성은 양딸기 3종, 라즈베리 5종, 블루베리 21종, 블랙베리 6종, 크랜베리 12종, 아로니아 7종, 오디 4종으로서 블루베리가 다양한 안토시아닌 조성으로 구성되어 있는 것으로 나타났다. 안토시아닌의 비당체(algcycon)인 안토시아닌 계열은 cyanidin이 본 연구의 베리류에서 모두 검출되었고, 아로니아는 cyanidin으로만 구성되어 있었으며 delphinidin, petunidin은 블루베리에서만 확인되었다. 양딸기, 라즈베리, 오디는 cyanidin 이외 pelagonidin으로 구성되어 있는 것으로 나타났다. 안토시아닌의 당류(sugar) 구성은 단당류(monosaccharide)로 6탄당(hexose)과 5탄당(pentose)이 주류를 이루고 있고 rutinose와 sambubiose와 같은 이당류(disaccharide)으로도 구성되어 있는 것을 확인하였다. 안토시아닌의 당류로서 glucose는 베리류 모두에 함유되어 있었으며 rutinose도 주요 이당류로서 비당체인 안토시아닌과 주로 결합하여 베리류의 안토시아닌을 형성하는 것으로 나타났다. 일부 안토시아닌은 배당체의 당류에 유기산(organic acid)과 같은 방향족산(aromatic acid)이 에스테르 결합된 아실화(acylated) 형태로 존재하기도 하는데, 본 연구에서는 stawberry의 구성 안토시아닌으로서 pelagonidin-3-(6-malonyl-glucosie)이 구성되어 있는 것으로 나타나 Wu 등(2005)의 연구결과와 일치하는 것을 확인하였다. 또한 다수의 베리류에서 안토시아닌의 비당체인 안토시아닌의 조성도 확인되었다.

Table 1-13. Identification of thirty-one anthocyanins of berry species

Peak #	Identification			Berry species ²⁾					
	Compound	Formula	MW. ¹⁾						
1	Delphinidin 3-galactoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.4	Bu					
2	Delphinidin 3-glucoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.4	Bu					
3	Cyanidin 3-galactoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.4	Ar	Bu	Cr			
4	Cyanidin 3-glucoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.4	Ar	Bu	Cr	Mu	Rp	
5	Cyanidin 3-sambubioside-5-rhamnoside	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₉	727.2	K.Bk					
6	Cyanidin 3-sambubioside	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₅	581.5	K.Bk					
7	Petunidin 3-galactoside	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	479.5	Bu					
8	Cyanidin 3-xylosylrutinoside	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₉	727.2	K.Bk					
9	Cyanidin 3-rutinoside	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.5	Ar	K.Bk	Mu	Rp	St	
10	Petunidin 3-glucoside	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	479.5	Bu					
11	Cyanidin+pentoside	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	419.4	Ar	Bu	Cr			
12	Cyanidin 3-arabinoside	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	419.4	Ar	Bu	Cr			
13	Pelagonidin 3-galactoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.4	Rp					
14	Peonidin 3-galatoside	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463.4	Bu	Cr				
15	Petunidin+pentoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.4	Bu					
16	Pelagonidin 3-glucoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.4	K.Bk	Mu	Rp	St		
17	Peonidin 3-glucoside	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463.4	Bu	Cr				
18	Petunidin 3-arabinoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.4	Bu					
19	Pelargonidin 3-rutinoside	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	579.5	K.Bk	Mu				
20	Malvidin 3-galactoside	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	493.4	Bu					
21	Malvidin 3-glucoside	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	493.4	Bu					
22	Cyanidin 3-xyloside	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	419.4	Ar					
23	Peonidin+pentose	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.4	Cr.					

¹⁾MW: molecular weight(g · mol⁻¹)

²⁾Berry species: **Bu**, blueberry; **Cr**, cranberry; **K.Bk**, Korean blackberry; **Mu**, mulberry; **Rp**, raspberry; **St**, strawberry

Table 1-13. Continued

Peak #	Identification			Berry species ²⁾		
	Compound	Formula	MW. ¹⁾			
24	Peonidin 3-arabinoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.4	Bu	Cr	
25	Malvidin+pentoside	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463.4	Bu		
26	Malvidin 3-arabinoside	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	463.4	Bu	Cr	
27	Cyanidin	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.2	Ar	Bu	Cr Rp
28	Pelargonidin 3-(6-malonyl-glucoside)	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃	519.4	St		
29	Petunidin	C ₁₆ H ₁₃ O ₇	317.3	Bu		
30	Peonidin	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301.3	Bu	Cr	
31	Malvidin	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	331.3	Bu	Cr	

¹⁾MW: molecular weight(g · mol⁻¹)

²⁾Berry species: **Bu**, bluebrry; **Cr**, cranberry; **K.Bk**, Korean blackberry; **Mu**, mulberry; **Rp**, raspbrry; **St**, strawberry

Table 1-14. Distribution of anthocyanins of berry species¹⁾

Berry	Anthocyanidin						Sugar groups							Acylated groups	
	Dp	Cy	Pt	Pg	Pn	Mv	Glc	Gal	Ara	Xyl	Rha	Rut	Sam	Unk	Mal
Strawberry		+		+			+					+			+
Raspberry		+		+			+	+				+			
Blueberry	+	+	+		+	+	+	+	+					+	
Kor. Blackberry		+		+			+			+	+	+	+		
Cranberry		+			+	+	+	+	+					+	
Aronia		+					+	+	+	+		+		+	
Mulberry		+		+			+					+			

¹⁾Abbreviations: (for anthocyanidins) Dp, delphinidin; Cy, cyanidin; Pt, petunidin; Pg, pelargonidin; Pn, peonidin; Mv, malvidin; (for sugar groups) Glc, glucose; Gal, galactose; Ara, arabinose; Xyl, xylose; Rha, rhamnose; Rut, rutinose; Sam, sambubiose; Unk, unknown sugar(as pentose); (for acylated group) Mal, malonyl

제 3 절 베리류의 안토시아닌 함량 비교

1. 안토시아닌 함량 분석법 유효성 검증

베리류의 안토시아닌 동정에 사용한 HPLC-DAD 및 ESI-TOF/MS의 분석법에 대한 타당성을 확인하고 안토시아닌의 함량 분석을 위한 분석법을 확립하기 위해 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계, 정량한계의 분석법 유효성 검증(method validation)을 실시하였으며 그 결과에 대한 신뢰성을 확보하였다(Table 1-16).

1) 특이성(Specificity)

안토시아닌 6종의 혼합 표준용액과 각 베리류 추출물의 크로마토그램의 머무름시간(retention time, t_R)과 분리능(resolution)을 비교한 결과, 표준용액과 각 안토시아닌이 검출된 베리류 추출물간의 머무름 시간은 일치하였고, 1.5 이상의 분해능으로서 안토시아닌 표준물질간의 간섭이 일어나지 않고 단일 성분으로 분리되었다. 또한 UV 스펙트럼과 질량 스펙트럼에서도 동일한 결과를 나타내어 본 시험법의 특이성을 확인할 수 있었다.

2) 직선성(Linearity)

안토시아닌 혼합 표준용액을 각 농도별로 단계적으로 조제한 표준용액을 HPLC으로 분석하여 농도비에 대한 피크 면적비의 관계를 나타내는 표준 검량선을 작성하였다. 표준용액 농도 0.5-100 mg/L의 농도범위에서 3회 반복 분석하여 작성한 검량선의 결정계수(R^2)는 0.9997 이상으로 높은 직선성을 보였다.

3) 정확성(Accuracy)

안토시아닌 표준물질 6종이 검출되지 않는 strawberry 건조물에 안토시아닌 혼합

표준용액 10, 50 100 mg/L을 첨가 후 동일 전처리와 HPLC 분석 조건으로 시험하여 표준물질의 회수율(recover ratio)을 확인 결과, 94.2-104.4%의 범위로서 본 분석법의 정확성을 확인하였다.

4) 정밀성(Precision)

정밀성은 반복 정밀성(repeatability)으로서 50 mg/L으로 조제된 안토시아닌 혼합 표준용액을 3회 반복하여 분석하였다. 실험결과, 50.3±1.3 - 51.4±0.6 mg/L의 범위로 표준용액 조제농도 50 mg/L와의 근소한 차이로 확인되었고, 반복 분석에 대한 오차 범위로서 RSD%을 확인결과 3.0% 이하로서 정밀성이 적합함을 확인하였다(Table 1-15).

Table 1-15. Repeatability of six common anthocyanins

	Concentration (mg/L)					
	Dp-3-glu	Cy-3-glu	Pt-3-glu	Pg-3-glu	Pn-3-glu	Mv-3-glu
Repeat 1	51.2	49.8	50.6	50.6	49.2	50.6
Repeat 2	50.9	50.6	52.1	58.9	51.1	51.2
Repeat 3	52.0	51.8	49.1	51.5	50.9	50.1
Mean±SD	51.4±0.6	50.7±1.0	50.6±1.5	50.3±1.3	50.4±1.0	50.6±0.6
RSD%	1.11	1.98	2.96	2.62	2.07	1.09

5) 검출한계 및 정량한계(LOD, LOQ)

안토시아닌 6종의 검출한계(limited of detection, LOD)와 정량한계(limited of quantitation, LOQ)는 표준용액의 최저농도로서 신호 대 잡음비(signal to noise, S/N)를 기준으로 산출하였으며, 검출한계는 0.083-0.142 mg/L의 범위이고 정량한계는 0.252 - 0.430 mg/L으로서 베리류의 안토시아닌 정량 분석 결과 산출에 적용한 표준용액 조제 농도 범위 0.5 - 100 mg/L는 적합한 것으로 확인하였다.

Table 1-16. Result of method validation for the determination of anthocyanins of berry species

Anthocyanin	Correlation coefficient(R^2)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	RSD%	Recovery (%)
Dp-3-glu	0.9998	0.122	0.370	1.11	96.4
Cy-3-glu	0.9998	0.092	0.279	1.98	95.5
Pt-3-glu	0.9998	0.083	0.252	2.96	94.2
Pg-3-glu	0.9998	0.102	0.309	2.62	96.6
Pn-3-glu	0.9998	0.120	0.364	2.07	104.4
Mv-3-glu	0.9997	0.42	0.430	1.09	96.2

2. 베리류의 안토시아닌 함량 분석

베리류 7종의 안토시아닌 함량은 다중과장검출기(photodiode array detector)가 장착된 HPLC를 이용하였으며, 표준물질 delphinidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside, petunidin-3-O-glucoside, pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, mavidin-3-O-glucoside를 이용하여 안토시아닌의 비당체(aglycon) 계열별로 구분하여 상대적 정량 분석 결과를 Table 1-17, Table 1-18 및 Fig. 1-25와 같이 확인되었다.

베리류의 안토시아닌 분석으로 총 안토시아닌 함량 분석법인 pH differential 분광광도법과 크로마토그래피(HPLC) 분석법 간의 비교 결과, 각 베리류의 안토시아닌 함량은 분석 방법에 따라 차이가 있으나, 각 베리류의 안토시아닌 총 함량 비교는 유의적 결과로서 두 분석법 모두 오디가 가장 높은 함량으로 확인되고, 양딸기가 가장 낮은 함량을 보이는 것으로 나타났다.

베리류 7종의 안토시아닌 함량은 오디가 3680.1 ± 81.0 mg/100g dried sample으로 가장 높은 함량으로 나타났고 블랙베리와 아로니아가 각각 1984.9 ± 76.0 mg/100g dried sample, 1693.1 ± 84.7 mg/100g dried sample의 함량을 보였으며 라즈베리, 크랜베리, 양딸기는 756.0 ± 28.3 mg/100g dried sample, 668.1 ± 234 mg/100g dried sample, 183 ± 6.0 mg/100g dried sample의 순으로 낮은 함량으로 확인되었다. 양딸기는 비당체으로 pelargonidin 계열의 안토시아닌 함량이 174.3 ± 5.8 mg/100g dried sample으로서 전체 함량 비율의 95.2%으로 다수를 차지하였으며 아실화된 안토시아닌으로 pelargonidin-3-O-(malnoly)glucoside가 28.0 ± 1.4 mg/100g dried sample의 함량으로 확인되었다. 양딸기는 p-cumaryl-glucoside, p-hydroxy-benzoic acid-glucoside등과 같은 phenolic acid와 flavonoids가 다수 함유되어 있으며 딸기의 가장 중요한 안토시아닌은 수용성의 pelargonidin-3-O-glucoside으로서 딸기의 항산화능에 주된 작용을 하는 것으로 보고되었다(Klopotek, Otto & Böhm, 2005). 라즈베리는 안토시아닌 계열로 cyanidin 배당체가 총 함량의 99.2%를 차지하였고 개별 성분으로 cyanidin-3-O-rutinoside와 cyanidin-3-O-glucoside가 각각 366.2 ± 14.6 mg/100g dried sample (54.8%), 292.6 ± 8.8 mg/100g dried sample(43.8%)의 높은 함량을 보이는 것으로 나타났다. 다양한 안토시아닌 조성으로 구성된 블루베리는 mulvidin 계열의 안토시아닌이 435.7 ± 10.7 mg/100g dried sample으로 전체 함량의

37.5%을 차지하였고 cyanidin 배당체와 delphinidin 배당체가 전체 함량의 24.2% 17.5%의 함량으로 확인되었으며 개별 안토시아닌으로는 malvidin-3-O-glucoside가 192.7±3.9 mg/100g dried sample으로 가장 높은 함량으로 나타났고 그 다음으로 cyanidin-3-O-glucoside가 111.8±2.2 mg/100g dried sample, malvidin-3-O-arabinoside 110.7±2.2 mg/100g dried sample, delphinidin-3-O-galactoside 108.2±2.2 mg/100g dried sample으로 근소한 차이의 함량으로 나타났다. 타 연구결과와 마찬가지로 blueberry의 안토시아닌 배당체 중 glucose 결합이 galactose 결합보다 더 많은 비중을 차지하는 것으로 나타났고, blueberry의 주요 안토시아닌 계열로 malvidin 배당체가 총 함량의 약 52%, 다음으로 delphinidin 배당체가 약 26%을 차지한다고 보고된 결과와 상이 하게 나타났는데, 이는 블루베리 내 안토시아닌 조성과 함량의 차이가 품종을 포함한 여러 가지 요인에 의해 설명 될 수 있음을 의미하며 타 연구에 의하면 빛, 온도, 토양, 재배법 등의 환경적인 요인이 이차대사산물의 합성에 영향을 미칠 수 있다고 보고하였으며(Saure, 1990) 이로 인하여 안토시아닌 합성에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다. 블랙베리는 안토시아닌 비당체으로 cyanidin 계열이 1949.0±69.9 mg/100g dried sample으로 전체 함량의 98.2%를 차지하였고 개별 안토시아닌은 cyanidin-3-O-rutinoside이 1104.7±46.4 mg/100g dried sample의 높은 함량으로 나타났는데 라즈베리의 안토시아닌의 조성비와 개별 성분의 함량비와도 유사한 것으로 확인되었다. 크랜베리는 peonidin 계열의 안토시아닌이 429.3±19.6 mg/100g dried sample으로 전체 함량의 56.8%을 차지하였고 다음으로 cyanidin 배당체가 308.4±8.5 mg/100g dried sample으로 전체의 40.8%을 차지하는 것으로 나타났으며 개별성분은 peonidin-3-O-glucoside와 cyanidin-3-O-glucoside가 각각 206.9±13.0 mg/100g dried sample과 100.9±3.2 mg/100g dried sample의 함량으로 확인되었다. 아로니아는 cyanidin 계열의 안토시아닌이 100%의 조성으로 확인되었고 개별 안토시아닌으로는 cyanidin-3-O-glucoside와 cyanidin-3-O-galactoside가 641.9 ±36.6 mg/100g dried sample과 515.5±24.7 mg/100g dried sample의 높은 함량을 보이는 것으로 나타났다. 오디는 cyanidin 계열의 안토시아닌이 3652.5±113.3 mg/100g dried sample으로 전체 함량의 99.3%을 차지하는 것으로 나타났으며 cyanidin-3-O-rutinoside와 cyanidin-3-O-glucoside가 각각 2322.5 ±53.4 mg/100g dried sample과 1330.0±59.8 mg/100g dried sample의 함량으로 확인되었는데. cyanidin-3-O-glucoside는 뽕나무의 종류에 관계없이 공통적으로 존재하

며, 그 함량은 0.55 - 1.27%로 보고된 바 있다(Lee et al., 2004). 완숙 오디 중 안토시아닌은 cyanidin-3-O-glucoside와, cyanidin-3-O-rutinoside가 안토시아닌의 90%를 차지하며, 그 중 cyanidin-3-O-glucoside의 함량이 다소 높은 것으로 보고되어 있다(Oki et al., 2006).

베리류의 안토시아닌의 조성과 그 함량은 다양하고 베리류의 안토시아닌의 비교에 있어 구성된 비당체인 안토시아닌의 종류와 결합된 당류(sugars)의 종류와 개수, 아실화(acylation)의 유무에 기인하여 서로 다른 화학적 구조를 가지게 되고 이러한 화학적 구조에 의해 서로 다른 생물학적 활성, 생체이용률 등이 달라질 수 있다(Felgines et al., 2002)는 점을 고려하여 각 베리류에 포함된 안토시아닌의 분획물에 의한 생리활성평가 필요할 것으로 사료된다.

Table 1-17. Contents of anthocyanins of berry species

Peak#	Anthocyanin	Content (mg/100g DW ¹⁾)	Ratio (%)
Strawberry			
9	Cyanidin 3-rutinoside	8.8 ± 0.2 ²⁾	4.8 ± 0.1
17	Pelagonidin 3-glucoside	146.3 ± 4.4	79.7 ± 2.4
27	Pelargonidin 3-(malonly)glucoside	28.0 ± 1.4	15.3 ± 0.8
Raspberry			
4	Cyanidin 3-glucoside	292.6 ± 8.8	43.8 ± 1.3
9	Cyanidin 3-rutinoside	366.2 ± 14.6	54.8 ± 2.2
13	Pelagonidin 3-galactoside	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0
17	Pelagonidin 3-glucoside	4.3 ± 0.0	0.6 ± 0.0
27	Cyanidin	4.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0
Blueberry			
1	Delphinidin 3-galactoside	108.2 ± 2.2	9.3 ± 0.2
2	Delphinidin 3-glucoside	95.0 ± 4.7	8.2 ± 0.4
3	Cyanidin 3-galactoside	94.4 ± 0.9	8.1 ± 0.1
4	Cyanidin 3-glucoside	111.8 ± 2.2	9.6 ± 0.2
7	Petunidin 3-galactoside	57.6 ± 2.9	5.0 ± 0.2
10	Petunidin 3-glucoside	70.2 ± 2.8	6.0 ± 0.2
11	Cyanidin+pentose	23.0 ± 0.5	2.0 ± 0.0
12	Cyanidin 3-arabinoside	40.9 ± 1.2	3.5 ± 0.1
14	Peonidin 3-galactoside	31.1 ± 1.9	2.7 ± 0.2
15	Petunidin+pentose		
17	Peonidin 3-glucoside	65.5 ± 3.3	5.6 ± 0.3
18	Petunidin 3-arabinoside		
20	Malvidin 3-galactoside	97.8 ± 3.9	8.4 ± 0.3
21	Malvidin 3-glucoside	192.7 ± 3.9	16.6 ± 0.3
24	Peonidin 3-arabinoside	12.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0
25	Malvidin+pentose	25.6 ± 0.5	2.2 ± 0.0
26	Malvidin 3-arabinoside	110.7 ± 2.2	9.5 ± 0.2
27	Cyanidin	10.9 ± 0.4	0.9 ± 0.0
29	Petunidin	4.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0
30	Peonidin	1.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0
31	Malvidin	8.9 ± 0.2	0.8 ± 0.0

¹⁾DW: Dried weight, ²⁾Value: Mean±Standard deviation (n=3)

Table 1-17. Continued

Peak#	Anthcyanin	Content (mg/100g DW)	Conc.(%)
Kor. Blackberry			
5	Cyanidin 3-sambubioside-5-rhamnoside	291.1 ± 8.2	8.5 ± 0.2
6	Cyanidin 3-sambubioside	190.7 ± 5.9	5.6 ± 0.2
8	cyanidin 3-xylosylrutinoside	362.5 ± 9.4	10.6 ± 0.3
9	Cyanidin 3-rutinoside	1104.7 ± 46.4	32.3 ± 1.4
16	Pelagonidin 3-glucoside	9.3 ± 0.2	0.3 ± 0.0
19	Pelargonidin 3-O-rutinoside	26.5 ± 1.5	0.8 ± 0.0
Cranberry			
3	Cyanidin 3-galactoside	79.1 ± 1.1	10.5 ± 0.1
4	Cyanidin 3-glucoside	100.9 ± 3.2	13.3 ± 0.4
11	Cyanidin+pentoside	35.8 ± 0.8	4.7 ± 0.1
12	Cyanidin 3-arabinoside	71.2 ± 3.2	9.4 ± 0.4
14	Peonidin 3-galatoside	91.2 ± 3.7	12.1 ± 0.5
17	Peonidin 3-glucoside	206.9 ± 13.0	27.4 ± 1.7
23	Peonidin 3-pentose	16.1 ± 0.1	2.1 ± 0.0
24	Peonidin 3-arabinoside	89.8 ± 2.1	11.9 ± 0.3
26	Malvidin 3-arabinoside	13.2 ± 0.1	1.7 ± 0.0
27	Cyanidin	21.4 ± 0.3	2.8 ± 0.0
30	Peonidin	25.3 ± 0.6	3.4 ± 0.1
31	Malvidin	5.2 ± 0.0	0.7 ± 0.0
Aronia			
3	Cyanidin 3-galactoside	515.5 ± 24.7	30.4 ± 1.5
4	Cyanidin 3-glucoside	641.9 ± 36.6	37.9 ± 2.2
9	Cyanidin 3-rutinoside	31.9 ± 0.7	1.9 ± 0.0
11	Cyanidin+pentoside	135.2 ± 4.6	8.0 ± 0.3
12	Cyanidin 3-arabinoside	249.2 ± 15.7	14.7 ± 0.9
22	Cyanidin 3-xyloside	44.0 ± 0.7	2.6 ± 0.0
27	Cyanidin	75.5 ± 1.7	4.5 ± 0.1
Mulberry			
4	Cyanidin 3-glucoside	1330.0 ± 59.8	31.3 ± 1.4
9	Cyanidin 3-rutinoside	2322.5 ± 53.4	54.7 ± 1.3
16	pelagonidin 3-glucoside	24.7 ± 0.5	0.6 ± 0.0
19	Pelargonidin 3-rutinoside	3.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0

¹DW: Dried weight, ²Value: Mean±Standard deviation (n=3)

Table 1-18. Contents of anthocyanins as aglycon(anthocyanidin) of berry species

Anthocyanidin	Content (mg/100g DW ¹⁾)						
	Strawberry	Raspberry	Blueberry	Korean blackberry	Cranberry	Aronia	Mulberry
Delphinidin	- ²⁾	-	203.2±6.9 ³⁾	-	-	-	-
Cyanidin	8.8±0.2	663.0±23.4	281.0±5.2	1949.0±69.9	308.4±8.5	1693.1±84.7	3652.5±113.3
Petunidin	-	-	132.2±5.8	-	-	-	-
Pelagonidin	174.3±5.8	5.1±0.0	-	35.8±0.2	-	-	27.6±0.5
Peonidin	-	-	109.9±5.3	-	429.3±19.6	-	-
Malvidin	-	-	435.7±10.7	-	18.3±0.2	-	-
Total	183.1±6.0	668.1±23.4	1162.0±33.9	1984.9±76.0	756.0±28.3	1693.1±84.7	3680.1±81.0

¹⁾DW: Dried weight, ²⁾-: Not detected, ³⁾Value: Mean±Standard deviation (n=3)

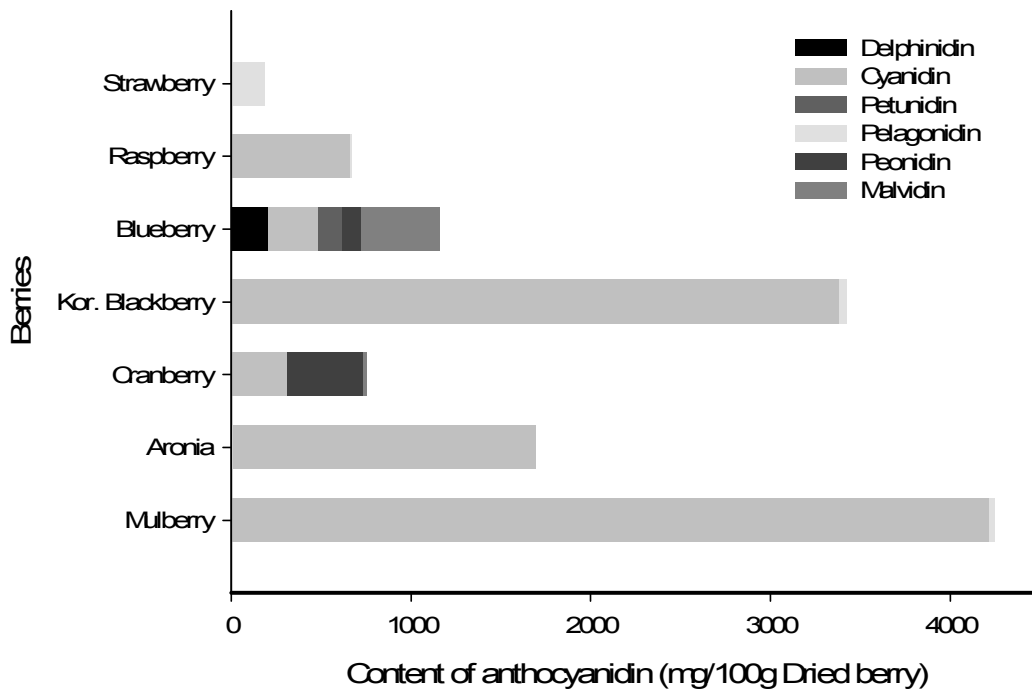


Fig. 1-25. Contents of aglycon of anthocyanins(as anthocyanidins) of berry species

제 4 장 요약

본 연구에서는 국내에서 생산, 유통되고 있는 주요 베리류를 활용한 가공식품과 천연 식용 색소의 이용확대 등 산업적 활용 방안을 마련하기 위한 연구 일환으로서 위해 국내 유통 베리류 7종에 대해 각 베리류의 특성을 규명할 수 있는 안토시아닌을 동정하고 각 베리류를 구성하는 개별 안토시아닌의 함량을 비교 하였다.

베리류의 안토시아닌 동정에 앞서 추출 용매별 실험 결과, 0.2% HCl-methanol 추출 조건에서 각 베리류의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총 안토시아닌의 생리활성 물질이 다량 함유되어 있는 것을 확인하였고, 베리류 7종 중 블랙베리, 오디, 아로니아가 여타의 베리류보다 생리활성물질이 상대적으로 높은 함량을 차지하는 것을 확인 할 수 있었다.

안토시아닌의 구조적 안정성 등의 이유로 HPLC의 이동상은 낮은 pH 조건으로 설정하여야 함에 따라 안토시아닌 분리분석의 최적 조건 설정을 위해 reversed HPLC로서 octadecylsilyl(C₁₈)와 octylsilyl(C₈)의 컬럼 효율을 비교한 결과, octylsilyl(C₈) 컬럼이 1.5 이상의 분리능(resolution)과 재현성이 우수한 것을 확인하였다. 각 베리류의 안토시아닌은 HPLC-PDA와 ESI-TOF/MS를 이용하여 안토시아닌의 구조에 따른 크로마토그래피의 용리(elution) 특성과 자외선-가시광선 스펙트럼 및 질량 스펙트럼의 해석을 통해 각 베리류의 안토시아닌으로 블루베리 21종, 크랜베리 12종, 블랙베리와 아로니아가 각 7종, 라즈베리 5종, 오디 4종, 양딸기 3종으로 총 31종을 분리·동정하였다. 베리류의 안토시아닌은 비당체(aglycon)인 안토시아니딘에 당류(sugars)로서 galactoside, glucoside, arabinoside 및 xyloside의 단당류(monosaccharides)와 rhamnose, sambubioside 및 rutinoside의 이당류(disaccharides)가 결합된 형태로 존재하는 것으로 나타났으며, 일부 안토시아닌은 배당체의 당류에 유기산이 에스테르 결합된 아실화(acylated) 형태로 존재하기도 하는데, 본 연구에서는 pelagonidin-3-(6-malonyl-glucose)가 양딸기의 구성 안토시아닌으로 확인되었다.

HPLC(chromatography)에 의한 베리류의 안토시아닌 함량 분석은 오디가 3680.1 ±81.0 mg/100g dried sample으로 가장 높은 함량으로 나타났고 다음으로 블랙베리, 아로니아, 라즈베리, 크랜베리, 양딸기 순의 낮은 함량으로 확인되었으며 앞서 분광분석법(spectrophotometric method)에 의한 pH differential method와 동일한 결과로 확인되었다.

결과적으로, 베리류의 안토시아닌 조성에 있어 모체를 구성하는 비당체인 안토시아닌의 종류와 결합된 당류(sugars)의 종류와 개수 및 아실화(acylation) 여부 등의 안토시아닌의 구조적 해석과 함량 확인을 통해 국내 생산, 유통되는 주요 베리류와 이를 활용한 기능성 식품 소재 및 천연 식용색소 개발에 필요한 기초자료로 제 공할 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

Aaby, K., Skrede, G., & Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 53(10), 4032-4040.

AOAC. 2006. Official Methods 2005. 02: Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines pH Differential Method, Association of Official Analytical Chemists. Inc, (37.1. 68), 2005.

Badjakov, I., Nikolova, M., Gevrenova, R., Kondakova, V., Todorovska, E., & Atanassov, A. (2008). Bioactive compounds in small fruits and their influence on human health. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(1), 581-587.

Bagchi, D., Sen, C. K., Bagchi, M., & Atalay, M. (2004). Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Moscow)*, 69(1), 75-80.

Berger, R. G. (Ed.). (2007). *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer Science & Business Media. p, 409-414

Bridle, P., & García-Viguera, C. (1997). Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chemistry*, 59(2), 299-304.

BRUCE, N., & BURNETT, S. (1991). Prevention of lifestyle-related disease: general practitioners' views about their role, effectiveness and resources. *Family Practice*, 8(4), 373-377.

Castrejón, A. D. R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W., & Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109(3), 564-572.

Chalker Scott, L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant

stress responses. *Photochemistry and photobiology*, 70(1), 1-9.

Choi, I. S., Moon, Y. S., & Kwak, E. J. (2012). Composition of resveratrol and other bioactive compounds, and antioxidant activities in different mulberry cultivars. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 30(3), 301-307.

Chung, H. J. (2014). Comparison of total polyphenols, total flavonoids, and biological activities of black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 43(9), 1349-1356.

Connor, A. M., Luby, J. J., Tong, C. B., Finn, C. E., & Hancock, J. F. (2002). Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(1), 89-97.

Fan Chiang, H. J., & Wrolstad, R. E. (2005). Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*, 70(3).

Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Fraisse, D., Lamaison, J. L., & Rémésy, C. (2002). Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. *The Journal of nutrition*, 132(6), 1249-1253.

Forkmann, G., & Martens, S. (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 155-160.

Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, O. M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 63(4), 435-440.

Häkkinen, S. (2000). Flavonols and phenolic acids in berries and berry products (Doctoral dissertation, University of Kuopio).

Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., & Törrönen, A. R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2274-2279.

Hebrero, E., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (1988). High performance liquid chromatography–diode array spectroscopy identification of anthocyanins of *Vitis vinifera* variety Tempranillo. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(3), 227–233.

Jeong, C. H., Choi, S. G., & Heo, H. J. (2008). Analysis of nutritional compositions and antioxidative activities of Korean commercial blueberry and raspberry. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37(11), 1375–1381.

Kang H. 2005. Changes of antioxidational components and activity during fermentation of *Rubus coreanum* Miq. and *Morus alba* L. fruit. Master thesis, Jeonju University

Kim, A. J., Bang, I. S., Park, H. Y., Lee, G. S., & Yuh, C. S. (2007). An investigation the preparation and physicochemical properties of oddi jelly using mulberry fruit powder. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 20(1), 27–33.

Kim, A. J., Kim, M. W., Woo, N. R. Y., Kim, S. Y., Kim, H. B., Lim, Y. H., & Kim, M. H. (2004). Study on the nutritional composition and antioxidative capacity of mulberry fruit (*Ficus-4x*). *Korean Journal of Food Science and Technology*, 36(6), 995–1000.

Kim, A. J., Park, S. J., & Rho, J. O. (2008). Mulberry fruit extract consumption is inversely associated with hyperlipidemia in middle-aged men. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 21(2), 121–126.

Kim, D. O., & Padilla Zakour, O. I. (2004). Jam processing effect on phenolics and antioxidant capacity in anthocyanin rich fruits: cherry, plum, and raspberry. *Journal of food science*, 69(9).

Kim, E. O., Lee, Y. J., Leem, H. H., Seo, I. H., Yu, M. H., Kang, D. H., & Choi, S. W. (2010). Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberrys from seven different *Morus alba* L.

cultivars. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39(10), 1467-1475.

Kim, H. B., Chang, S. J., Kim, S. L., & Moon, J. Y. (2003). Quantification and varietal variation of free sugars in mulberry fruits. *Korean Journal of Sericultural Science*.

Kim, H. J., Cha, J. Y., Choi, M. L., & Cho, Y. S. (2000). Antioxidative activities by water-soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *Applied Biological Chemistry*, 43(2), 148-152.

Kim, J. W., Kim, S. U., Lee, H. S., Kim, I. S., Ahn, M. Y. & Ryu, K. S. (2003). Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A* 1002, 93-99.

Kim, K. I., & Kim, M. L. (2010). Characteristics of wine fermented from mulberry juice. *Korean Journal of Food Preservation*, 17(4), 563-570.

Kim, S. J., Bae, K. S., Koh, S. W., Kim, H. C., & Kim, T. C. (2015). Morphology and characteristics of floral organ in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars. *Korean Journal of Plant Resources*, 28(2), 235-242.

Kim, S. Y., Park, K. J., & Lee, W. C. (1998). Antiinflammatory and antioxidative effects of *Morus* spp. fruit extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 6(3), 204-209.

Klopotek, Y., Otto, K., & Böhm, V. (2005). Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5640-5646.

Korea Food and Drug Administration. 2013. *Health functional food code testing methods*, p. 307-309. Cheongju, Korea.

Lala, G., Malik, M., Zhao, C., He, J., Kwon, Y., Giusti, M. M., & Magnuson, B.

A. (2006). Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutrition and cancer*, 54(1), 84-93.

Lee, H. R., Jung, B. R., Park, J. Y., Hwang, I. W., Kim, S. K., Choi, J. U., ... & Chung, S. K. (2008). Antioxidant activity and total phenolic contents of grape juice products in the Korean market. *Korean Journal of Food Preservation*, 15(3), 445-449.

Lee, H. S., Widmer, B. W. (1996). Phenolic compounds. In: Nollet LML, ed. *Handbook of Food Analysis. Physical Characterization and Nutrient Analysis*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., Vol 1, 821 - 894.

Lee, H. Y. (2013). Approval of functional ingredient of health/functional foods in Korea. *Food Industry and Nutrition*, 18. 1-7

Lee, J., Dossett, M., & Finn, C. E. (2013). Anthocyanin fingerprinting of true bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) fruit. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1985-1990.

Lee, J. M., Kim, S. K., & Lee, G. D. (2003). Monitoring on alcohol fermentation characteristics of strawberry. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 32(5), 679-683.

Lee, J. Y., Moon, S. O., Kwon, Y. J., Rhee, S. J., Park, H. R., & Choi, S. W. (2004). Identification and quantification of anthocyanins and flavonoids in mulberry (*Morus* sp.) cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 13(2), 176-184.

Lee, M. J., Park, J. S., Choi, D. S., & Jung, M. Y. (2013). Characterization and quantitation of anthocyanins in purple-fleshed sweet potatoes cultivated in Korea by HPLC-DAD and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(12), 3148-3158.

Lee, M. W. (1995). Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *Journal of pharmaceutical society of Korea*, 39, 200-204

Lee, Y., Lee, J. H., Kim, S. D., Chang, M. S., Jo, I. S., Kim, S. J., ... & Kim,

J. H. (2015). Chemical composition, functional constituents, and antioxidant activities of berry fruits produced in Korea. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44(9), 1295-1303.

Markakis, P. (1982). *Stability of anthocyanins in foods* (Vol. 245). Academic Press, New York.

Mazza, G., & Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains* (CRC). Press Inc.: Boca Raton, FL, 362.

Moon, G. S. (1991). *Constituents and uses of medicinal herbs*. Ilweolseogak, Seoul, 310-311.

Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 519-525.

Neto, C. C. (2007). Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular nutrition & food research*, 51(6), 652-664.

Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., & Exon, J. H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(2), 161-183.

Oh, H., Ko, E. K., Jun, J. Y., Oh, M. H., Park, S. U., Kang, K. H., ... & Kim, Y. C. (2002). Hepatoprotective and free radical scavenging activities of prenylflavonoids, coumarin, and stilbene from *Morus alba*. *Planta medica*, 68(10), 932-934.

Oki, T., Kobayashi, M., Nakamura, T., Okuyama, A., Masuda, M., Shiratsuchi, H., & Suda, I. (2006). Changes in Radical scavenging Activity and Components of Mulberry Fruit During Maturation. *Journal of food science*, 71(1).

Pang, K. C., Kim, M. S., & Lee, M. W. (1996). Hydrolyzable tannins from the

fruits of *Rubus coreanum*. Korean Journal of Pharmacognosy (Korea Republic).

Park, J. H., Hong, S. I., Jeong, M. C., & Kim, D. (2013). Quality characteristics and changes in mulberry (*Morus alba* L.) depending on their maturity during distribution. Korean Journal of Food Preservation, 20(3), 304-316.

Park, S. W., Jung, Y. S., & Ko, K. C. (1997). Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. Journal of the Korean Society for Horticultural Science (Korea Republic)

Reed, J. (2002). Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42(S3), 301-316.

Santos-Buelga, C., & Williamson, G. (Eds.). (2003). Methods in polyphenol analysis. Royal Society of chemistry. p, 92

Saure, M. C. (1990). External control of anthocyanin formation in apple. Scientia horticulturae, 42(3), 181-218.

Schmidt, B. M., Howell, A. B., McEniry, B., Knight, C. T., Seigler, D., Erdman, J. W., & Lila, M. A. (2004). Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(21), 6433-6442.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. Journal of agricultural and food chemistry, 54(25), 9329-9339.

Singh, A. P., Wilson, T., Kalk, A. J., Cheong, J., & Vorsa, N. (2009). Isolation of specific cranberry flavonoids for biological activity assessment. Food chemistry, 116(4), 963-968.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In Methods in enzymology (Vol. 299, pp. 152-178).

Academic press.

Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.

Skrede, G., Wrolstad, R. E., & Durst, R. W. (2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of food science*, 65(2), 357-364.

Slimestad, R., Torskangerpoll, K., Nateland, H. S., Johannessen, T., & Giske, N. H. (2005). Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), 61-68.

Tamura, H., Takada, M., & Yoshida, Y. (1995). Pelargonidin 3-O-(6-O-Malonyl- β -D-glucoside) in *Fragaria x ananassa* Duh. cv. Nyoho. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(6), 1157-1158.

Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *The Journal of nutrition*, 133(7), 2125-2130.

Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5315-5321.

Valcheva-Kuzmanova, S., Marazova, K., Krasnaliev, I., Galunska, B., Borisova, P., & Belcheva, A. (2005). Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 56(6), 385-392.

Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(2), 304-309.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the

United States and estimation of normal consumption. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(11), 4069-4075.

Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., & McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7846-7856.

Wu, X., & Prior, R. L. (2005). Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(7), 2589-2599.

Yang, H. C., Lee, J. M., & Song, K. B. (1982). Anthocyanins in cultured omi ja (*Schizandrae chinensis* Baillon) and its stability. *Han'guk Nonghwa Hakhoe chi=Journal of the Korean Agricultural Chemical Society*.

Yu, O. K., Kim, J. E., & Cha, Y. S. (2008). The quality characteristics of jelly added with Bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37(6), 792-797.

Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. (2004). Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 52(20), 6122-6128.

2016 가공식품 세분시장 현황 : 건조과일채소류 시장. 2016. 한국농수산물유통공사
2016 가공식품 세분시장 현황 : 고령친화식품 시장. 2016. 한국농수산물유통공사

Part II

배리류의 휘발성 향기성분 분석

Analysis of Volatile Flavor Compounds of Berry Species

제 1 장 서 론

모든 식품은 일반적으로 그 고유의 향기 내지는 냄새를 가지고 있으며 오랫동안의 경험을 바탕으로 각기 식품들의 고유의 향기에 익숙해있다. 식품의 향미(flavor)는 맛과 향기 등의 감각적인 요인과 더불어 조직감과 같이 복합적인 상호작용에 의한 것으로 주로 맛과 냄새의 화학적 요소에 의해 결정되며 근본적으로 식품 내에 존재하는 화합물에 의해 발현된다. 향미를 구성하는 화합물은 혀의 미뢰에 존재하는 수용체에 의해 인지되어 맛으로 표현되는 휘발성 화합물과 후각기관의 수용체로부터 인지되는 냄새로 휘발성 화합물로 분류되며, 특히 후각은 미각, 시각, 촉각 등과 함께 식품들의 외형적인 품질을 결정하여 주는 가장 중요한 관능적 요인들(organoleptic factor)의 하나이다.

식품산업에서 향료의 중요성은 식품에 대한 기호나 소비자의 선택을 좌우할 수 있는 결정적인 가치를 부여하고 있으며, 현재 가공식품 80% 이상이 제조 생산 시 향료를 첨가하거나 강화하고 있는 추세이다. 향료산업은 고부가가치, 기술집약적 산업으로서 식품을 비롯한 향장분야에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있으며, 세계 시장규모는 약 95억 - 100억 달러 정도이고 국내시장은 연간 약 2,000억 원 규모로 매년 증가하고 있다. 국내시장에서 향료의 수입규모는 전체의 약 90%를 차지하며 거의 모든 향료가 완제품의 형태로 수입되는 등 외국기술에 전적으로 의존하고 있다. 특히 천연향료의 경우 천연 자원이 부족한 것도 큰 원인이지만 관련 노하우를 전혀 확보하지 못하여 수입에 의존하고 있는 실정이기 때문에 향료소재 개발을 위한 지속적인 노력과 대응책을 강구할 필요성이 있다.

식품의 향기 또는 냄새 특성을 파악하기 위한 휘발성 화합물의 연구들은 고성능의 기체크로마토그래피(gas chromatography)나 질량분석기(mass spectrometry) 등과 같은 기기분석의 발전과 함께 향기 구성 휘발성 화합물들의 분리, 동정, 구조결정 등이 신속하고 정밀한 분석이 가능하게 되었으나, 향기의 화학적 감각(chemical senses)의 고유 특징으로 인해 주관적인 방법에 의존하지 않을 수 없는 요소들도 있다.

과실 등의 식품으로부터 휘발성 향기성분을 분리하는 방법으로는 증류법(steam distillation extraction, SDE), 압착법(expression), 용매추출법(solvent extraction, SE)법, (headspace법, 고체상 미세추출법(solid-phase microextraction, SPME) 등

(Flavors and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing, and Sustainability, 2007) 이 있는데, 향기 성분을 직접 이용하기 위한 목적과 휘발성 화합물을 순수하게 분석을 위한 목적에 따라 나누어 고찰할 수 있다. 향기 성분의 추출은 원하는 화합물을 해당 원료로부터 있는 그대로 추출 또는 분리하는 것이 가장 중요하며 수득하고자 하는 성분의 특성에 따라 적절한 추출방법을 선택하여야 한다(Song et al., 2000). 증류법이나 용매추출법은 용매의 잔류성과 농축과정 중의 향의 손실, 증류 등의 가열에 의한 변성 등을 고려하여야 하는 단점이 있다. 비교적 열에 안정한 시료인 경우에는 연속수증기증류추출법(simultaneous steam distillation and extraction, SDE)이 많이 이용되고 있고, SPME법은 유기용매를 사용하지 않고 적은 양의 시료를 간단하게 전처리할 수 있어 최근에 많이 사용되고 있다(Yun, Hong & Choi, 2006; Lee et al., 2000; Arthur et al., 1992).

또한, 향기성분 추출로서 초임계유체 기술이 대두되고 있다. 초임계유체는 온도와 압력이 임계점(critical point) 이상에서 높은 용해력, 빠른 물질이동 및 열 이동, 낮은 점도, 높은 확산계수, 낮은 표면장력으로 기체와 액체의 두 가지 성질을 갖는 특징이 있다. 이러한 초임계유체를 이용하여 향기 성분을 추출할 경우, 비교적 낮은 온도 조건하에서 변질없이 천연 고유의 향기 특성이 보존되며 용매가 잔류하지 않고 향기성분의 산화를 억제할 수 있는 장점이 있다(Reikkola, Manninen & Hartonen, 1992). 초임계 유체 기술은 온도, 압력의 변화로 용질 성분을 선택적으로 추출 가능하며, 유독성 유기용매를 대처할 수 있는 무독성, 친환경, 저에너지 용매를 사용하는 기술로서 식품산업에서도 그 중요성을 인식되고 특히, 대표적인 초임계유체인 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide, Sc-CO₂)는 임계 이산화탄소는 31.06°C, 74 bar의 낮은 임계치를 가지고 있어 유기용매 나 물과 비교하여 10 - 100 배의 높은 확산계수의 특징으로 독성이 없고, 불연성이며 비활성으로 추출, 분리 공정에서 순환하여 재사용 가능한 친환경적이며, 휘발성이 높은 용매로서 잔류 용제를 완전히 제거 할 수 있기 때문에 잔존 용제가 없는 추출물(Extract)을 얻을 수 있을 뿐 아니라 추출용매를 손실 없이 거의 완전하게 회수 할 수 있는 특징으로 전통적인 향기성분 추출방법의 대체기술로서의 응용이 증가하고 있는 추세이다(Lang & Wai, 2001).

최근들어 합성향료(artificial flavor)의 건강유해성에 대한 소비자 불안으로 인해 대체 향료의 필요성이 대두되면서 천연향료(natural flavor)에 대한 소비자의 관심이

증대 되고 있다. 식품 향료는 식품의 풍미 부여, 기호성 향상 등의 식품의 향기를 재현할 목적으로 주로 식음료, 제빵 등의 식품가공품에 널리 사용되며 다수의 향료 화합물과 천연향료를 원료가 조합되어 식품성분과 같거나 유사한 것을 사용한다.

우리나라에서 향료는 식품첨가물공전 총칙에서 Codex, FEMA, IOFI 등 국제적으로 식품향료로 통용되는 것은 사용할 수 있으나, 안전성에 문제가 있을 때는 예외로 규정하고, 식품 첨가물의 기준 및 규격 고시에 따라 2,445개의 합성향료 개별허용물질목록을 지정하였으며, 천연 향료는 「II. 화학적합성품, 천연첨가물 및 혼합 제제류 제3. 나. 천연첨가물 157. 천연첨가물」 의정의에 따라 추출, 증류 등의 제법과 물, 주정, 식물성 기름의 사용용매를 제한하고 있다(식품의약품안전처, 2006).

과실의 향기는 그 구성 성분에 비하여 수 ppb 이하의 극미량으로 존재하지만 특정 휘발성 화합물의 구성과 다양성에 의해 소비자의 기호와 제품의 품질 평가에 중요한 영향을 미치고 과실에 포함 된 휘발성 향기 화합물은 다양하고 수백 종의 서로 다른 화합물로 이루어져 있어 각 과실의 고유 독특한 풍미를 자아낸다. 또한 과실의 재배환경은 물성과 같은 품질이 결정되는 반면 육종과 같은 품종개량은 유전적 요인으로 인하여 과실 고유 특징 이외 새로운 향미 특성(flavor profile)을 나타내기도 하여 과실의 육종 선택에 있어서도 향기는 매우 중요한 역할을 한다. 결과적으로 과실 고유의 향미 특성을 결정하는 관련 화합물들의 생합성의 이해와 구성 성분의 데이터베이스 구축 등의 연구를 수행한다면 소비자의 욕구와 수요에 충족 할 수 있는 맞춤형 과실 육종이 가능할 것으로 사료된다.

2010년 이후 국내외 각종 언론보도와 최근 소비자들의 건강이 관심이 고조되면서 기능성식품 등 안전하고 건강한 유익한 식품들이 주목받고 있다. 특히 블루베리, 아사이벨리, 아로니아와 같은 베리류(berries, 소과류)는 해외 주요 언론매체 등에서 매년 슈퍼푸드 목록으로 선정하여 발표하고 있다. 이에 베리류와 관련된 식품시장과 소비자 수요가 꾸준히 증가하는 추세이며 국내에서 고소득 작물로서 베리류의 재배 농가가 늘어나고 있으며 또한 베리류의 가공품이나 생과의 수입도 가파르게 증가하고 있다. 관세청에 따르면 2015년 기준으로 미국산 블루베리 수입량은 45,210톤으로서 우리나라는 미국의 제3위의 블루베리 수입국으로 자리 잡았다.

국내산 양딸기(strawberry)의 경우, 상품성 향상이 향상된 품종 개발, 원예 기술개발, 품종 보급 확대와 더불어 최근 국내 딸기 품종의 맛과 품질에 대해 전세계적인 인정을 받으면서 일본, 중국, 싱가포르 등 동아시아를 중심으로 신선농산물의 수출

주력 품목으로 부상하고 있다.

일반적으로 베리류는 양딸기(strawberry), 라즈베리(raspberry), 블랙커런트(blackcurrant), 블루베리(blueberry), 엘더베리(elderberry) 등과 같이 모양이 작고 둥근 형태로 달콤한 맛의 과일을 총칭하며(Honkanen & Hirvi, 1990), 신선 과일이나 냉동 형태뿐만 아니라, 주스, 잼 및 젤리 등 다양한 식품가공품 형태로 소비되고 있다. 또한, 기능성 식품 및 식품 첨가물로서 베리 추출물(berry extract) 사용이 증가하고 있다. 베리류는 식이섬유, 비타민, 미네랄 영양성분과 함께 anthocyanins, flavonols, flavanols, ellagitannins, gallotannins, proanthocyanidins 등의 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있다. 이러한 페놀성 화합물은 항산화, 항암, 항염증 등과 같은 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Seeram et al., 2006). 이러한 영양적 가치 이외 베리류의 향미는 소비자의 선택에 있어 매우 중요한 요소 중 하나임에도 베리류의 향미에 관한 연구는 모든 식품군에서 정량화하기 어려운 특성으로 인하여 극히 제한적으로 연구되고 있는 실정이다.

베리류의 향미를 구성하는 화합물은 다양하며 이 화합물은 과일에서 지질, 탄수화물, 단백질 및 아미노산 등에 의한 효소적 생합성으로 형성된다. 각 생물자원은 각각의 고유 대사 경로(metabolic pathways)가 있으며 이 대사산물로서 각 종의 독특한 휘발성 향기를 생성하여 과일의 특유한 향미를 발현한다. 이러한 특징적인 향미는 유전자적 요인과 재배 환경적 요인의 상호 작용에 의한 것으로 일반적으로 유전적 요인은 전구체, 효소 시스템에 의한 향미 형성으로 결정된다. 품종간의 향미의 차이는 각 휘발성 향기성분의 차이보다는 함량의 차이에 기인하는 것이 일반적이며, 이러한 함량의 차이는 지리적 위치, 토양의 영양상태, 날씨 및 관개 등 다양한 재배 조건과 환경적 요인으로부터 발생할 수 있다.

한편, 국내 경제성장과 함께 소비자의 미각의 질적 수준이 향상되면서 향료의 이용이 급증하면서 국내 향료시장도 확대되었으나 대부분 수입에 의존하고 있으면 국내 천연 식품소재를 활용한 다양한 향료소재 개발의 필요가 대두되고 있다. 국내의 휘발성 향기성분에 관한 연구는 천연 향기성분의 향기조성에 대한 연구보거나 미생물 등을 이용한 천연향 생산에 관한 연구 또는 전자코를 이용한 향기성분 분석에 의한 식품 평가 등이 대부분이며 양딸기, 블랙베리, 오디 등 국내 다소비 베리류에 대한 종합적인 향기성분의 연구가 매우 미약한 실정이다.

따라서 주요 식품향료의 산업화 활용방안 마련하기 위해 국내 유통 베리류 사과 7종, 양딸기, 라즈베리, 블루베리, 블랙베리, 크랜베리, 아로니아, 오디에 대해 관능적 특징을 좌우하는 휘발성 유기성분을 분석하여 그 특성을 파악한 후 키랄성 향기성분 탐색을 위한 기초자료로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 실험재료 및 기기

1. 시료

베리류의 휘발성 향기성분 분석은 안토시아닌 조성 분석과 동일한 시료를 대상으로 실시하였으며 다만 비휘발성 유기성분의 안토사이닌 분석은 동결건조 시료를 이용하였고 휘발성 향기성분 분석은 생과(fresh fruit)를 냉동 보관(max. -20°C)하면서 실험시 20°C 이상의 상온으로 해동한 후 사용하였다.

2. 시약

본 연구에 사용한 모든 시약 및 용매는 특급시약(extra pure grade)과 HPLC급으로 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA), Burdick and Jackson Laboratories (Muskegon, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 휘발성 향기 추출에 사용한 diethylether와 n-pentane은 HPLC급으로 이를 다시 wire spiral packed double distilling(Normschliff Geratebau, Germany)장치로 재증류한 것을 사용하였다. 증류수는 초순수제조장치(Arium comport I, Sartorius, Germany)에서 얻은 resistivity $18.2\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, TOC 2 ppb 이하의 ultrapure water grade를 사용하였다. 휘발성 향기 추출물의 탈수를 목적으로 사용된 무수 Na_2SO_4 (Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)는 650°C 회화로에서 하룻저녁 태운 뒤 desiccator에서 방냉한 후 사용하였다.

3. 휘발성향기 추출장치 및 분석기기

휘발성 향기성분의 추출을 위하여 연속수증기증류추출장치(Likens & Nickerson type simultaneous steam distillation & extraction apparatus, SDE, Normschliff, Wertheim, Germany)(Fig. 2-1(a))와 고체상미량추출(solid phase microextraction,

SPME) module이 장착된 기체크로마토그래피 전용 다목적 시료자동주입기 (multipurpose autosampler, PAL system, AOC-6000, shimdazu, Kyoto, Japan)를 사용하였으며, vigreux column(250 mL, Normschliff, Wertheim, Germany)(Fig. 2-1(b))을 이용하여 SDE 추출용매를 제거하였고 SPME absorption fiber assembly는 Supelco Co., Ltd. (Bellefonte, PA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출된 휘발성 향기성분의 정성 및 정량 분석을 위하여 poly(5% diphenyl/95% dimethylsiloxane)가 solid phase인 Rtx-5ms(60 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, Resteck Co., Bellefonte, PA, USA) fused silica capillary column과 flame ionization detector(FID)가 장착된 gas chromatograph(GC-2010AF plus, Shimadzu, Kyoto, Japan)와 single quadrupole mass analyzer의 gas chromatography/mass spectrometer(GCMS-QP2010plus, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하였다.

제 2 절 휘발성 향기성분의 추출 및 분석조건 수립

1. 추출방법에 따른 휘발성 향기성분 비교

1) 연속수증기증류추출법

(SDE, simultaneous steam distillation and extraction)

약 300g의 시료를 취한 후 증류수 1 L를 혼합하여 분쇄기(Blender 8010S, Waring Conair Co. Ltd., USA)로 분쇄한 후 1 N NaOH 용액을 첨가하고 pH 6.5-7.0 범위로 조정된 것을 휘발성 향기성분의 추출용 시료로 사용하였다. 휘발성 향기성분의 추출은 Schultz 등(1977)의 방법에 따라 개량된 연속수증기증류추출장치(SDE)(Nikerson & Likens, 1966)를 이용하여 추출용 시료에 재증류한 n-pentane과 diethylether를 50% (v/v)으로 혼합한 용매 200 mL으로 상압 하에서 2시간 동안 추출하였다. 정량분석을 위해 100 mg/L n-butylbenzene 5 mL를 시료에 첨가하여 정량 기준 0.5 mg이 되도록 시료에 첨가하였다. 휘발성 향기 추출완료 후 회수한 유기용매 분획구에 무수 Na₂SO₄를 가한후 암실에서 24시간동안 방치하여 수분을 제거한 다음, vigreux column과 N₂ gas purge를 통해 약 0.5 mL까지 농축하였다.

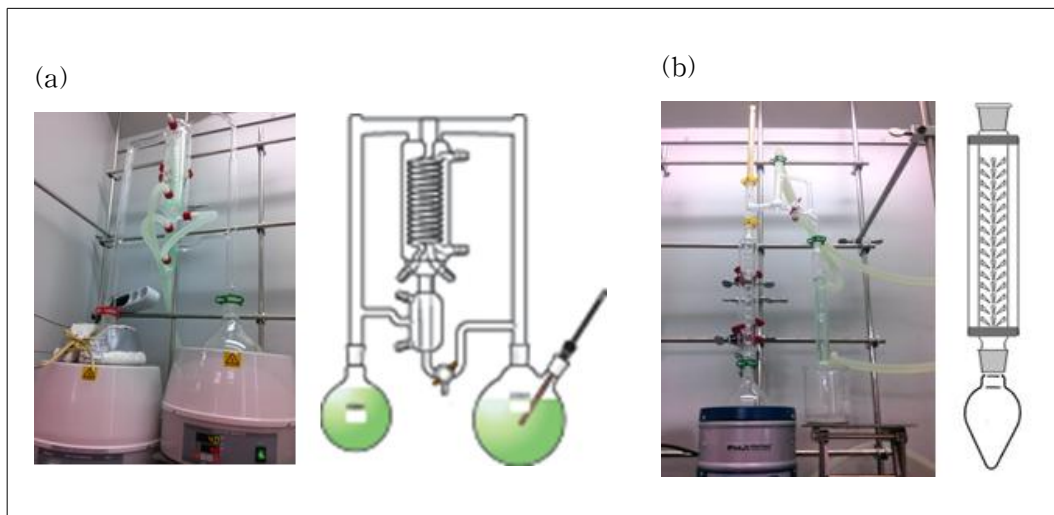


Fig. 2-1. Diagram of apparatus for Likens-Nickerson simultaneous distillation/extraction(SDE)(a) and vigreux type distillation column system(b) of volatile flavor extract

2) 고체상미량추출법(SPME, solid phase microextraction)

SPME법은 고정상(stationary phase, adsorbent)이 코팅되어 있는 fiber가 시료내 상부(headspace)에 위치하여 시료와 fiber 간의 분배에 의해 휘발성 유기화합물이 흡착(absorption)되는데, 일반적으로 분자량이 크고 극성도가 낮은 시료일수록 분배계수가 크며, 분배계수가 클수록 흡착 평형에 도달하는 시간이 오래 걸린다. 흡착평형시간은 시료를 교반함으로써 조절할 수 있으며 분배상수는 염을 첨가하거나 pH의 조절, 적합한 fiber의 선택으로 증가시킬 수 있다. SPME법의 직선성 범위는 대부분의 분석물질(analyte)에 대해 상당히 우수한 편이며 최소 검출한계(limit of detection)도 EPA에서 규정한 값보다 훨씬 낮을 뿐만 아니라 %RSD를 30 이하로 규정하고 있는 EPA 규정을 대부분 만족하고 용해도차에 의한 염석 효과(salting out effect)를 이용하였을 때 더욱 향상된 검출한계를 얻을 수도 있다. 한편, SPME fiber에 흡착된 화합물은 gas chromatography(GC)의 injector에 주입되어 열 탈착(desorption)에 의해 SPME fiber로부터 분리되는데, 분석 대상(analyte)의 종류에 따라 fiber의 solid phase의 thickness와 종류를 결정하여야 한다.

본 연구에서는 베리류 생과(fresh fruit)의 휘발성 향기성분 분석에 가장 적합한 fiber를 선정하기 위해 고정상으로 CAR(carboxen[®]), DVB(divinylbenzene), PDMS(polydimethylsiloxane)가 일정 두께로 규격화된 시판중인 SPME fiber(Supelco Co., Ltd., Bellefonte, PA, USA)로서 100 um PDMS, 85 um CAR/PDMS, 65 um DVB/PDMS, 50/30 um DVB/CAR/PDMS fiber을 이용하여 각 시료의 휘발성 향기성분에 대한 흡착능을 비교 검토하였다. 또한 분석대상과 SPME법 fiber간의 분배상수를 극대화하기 위한 목적으로 NaCl를 이용한 염석효과를 확인하고자 하였다. 각 시료에 NaCl 첨가량은 포화용해도를 고려하여 분쇄된 시료 2.0 g에 NaCl 1.0 g을 첨가하였고 내부표준물질(internal standard)로서 100 mg/L n-butylbenzene 100 uL을 첨가하여 시료내 휘발성 향기성분의 함량을 상대 정량(comparative relative quantification)하였다.

SPME법을 이용한 휘발성 향기 추출은 50°C, 250rpm으로 5분간 안정화한 다음 30분 동안 안정화와 동일 조건으로 휘발성 향기 성분을 SPME fiber에 흡착하였다. 이후 250°C의 GC injector에 fiber를 주입하여 5분 동안 탈착시켜 각기의 베리류에 대한 휘발성 향기 성분을 분석하였고 SPME fiber는 분석 전 활성화(activation)와 시료간 교차오염(cross-contamination) 방지를 위해 매 실험 전 250°C에서 30분간 conditioning하였다(Fig. 2-2).

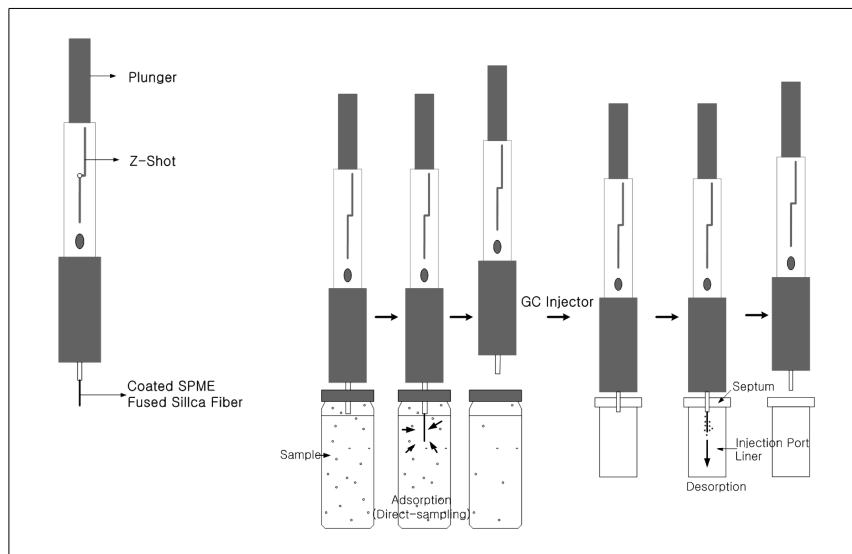


Fig. 2-2. Structure of SPME and process of adsorption and desorption(Chang, 2007).

2. GC/MS를 이용한 휘발성 향기성분의 분리분석

베리류로부터 추출된 향기성분 분석을 위해 GC/MS분석기기의 최적 조건을 수립하였다.

휘발성 향기성분의 분석조건을 수립하기 위하여 poly(5% diphenyl/95% dimethylsiloxane) 계열의 Rtx-5ms(60 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, Resteck Co., Bellefonte, PA, USA) fused silica capillary column을 이용하여 다양한 승온 프로그램(temperature programed chromatography)과 carrier gas의 유속(flow rate)을 조절하여 분리능(resolution)이 가장 우수한 분석조건을 수립하였다.

본 실험에 사용한 GC/MS는 single quadrupole mass analyzer가 장착된 GCMS-QP2010Plus(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였고 carrier gas는 He으로 1.0 mL/min을 유지하였다. 컬럼 온도조건(column temperature program)은 40°C에서 5분 간 유지한 후 200°C까지 2 °C/min으로 승온하고 5분 동안 유지하였으며 이후 컬럼 내 잔류성분을 제거하기 위해 15°C/min 으로 280°C까지 온도를 상승시킨 후 10분 동안 유지하였다. injector의 온도는 250°C으로 설정하였고 GC 컬럼 온도조건에 의해 분리된 휘발성 향기성분은 electron impact ionization(EI) 모드에서 70eV으로 이온화하였고, interface와 ion source의 온도는 각각 250°C와 210°C을 유지하였다. 또한 질량 분석은 Mass spectrum scan 모드로서 m/z 40-400 범위로 설정하고 이때 scan speed는 5000 u/sec으로 설정하였다. SDE법에 의해 추출 농축된 시료는 1 uL를 split ratio 20:1으로 주입하였고, SPME법에 의해 포집된 시료는 splitless으로 주입하였다.

Table 2-1. GC/MS conditions for identification of volatile flavor compounds

GC Condition	
System	GC-2010Plus, Shimadzu, Japan
Column	Rtx-5ms(60 m L. × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, Resteck, USA)
Carrier gas	He(99.995%), 1.0 mL/min
Flow control mode	Linear velocity
Injector temp.	250°C
Injection vol.	1.0 uL / split ratio 1:20, at SDE sample injection
Column Temp. program	40°C (5 min) - 2°C/min - 200°C (5 min) - 15°C/min - 280°C (10 min)
Total run time	105.33 min
GC/MS condition	
System	GCMS-QP2010Plus, Shimadzu, Japan
Mass analyzer	Single quadrupole mass filter
Ionization mode	EI(electron impact), 70eV
Interface temp.	250°C
Ion source temp.	210°C
Data accumulation	Scan mode (m/z 40 - 400), scan speed 5000 u/sec
MS library	Wiley 9, NIST 14, FFNSC 2.0
Compound Identification	RI(C8 - C20), similarity > 90

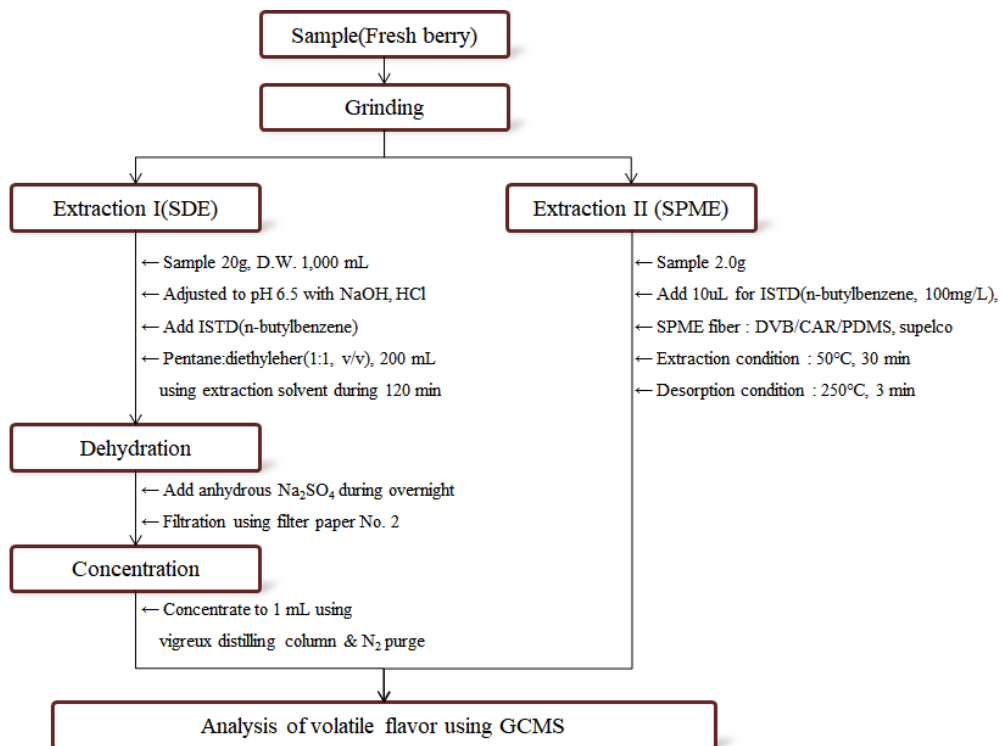


Fig. 2-3. Schematic diagram of volatile flavor components extraction (SDE and SPME) from berry species.

제 3 절 베리류의 휘발성 향기성분 분석

1. 휘발성 향기성분의 동정

GC-MS에 의해 분리된 각 휘발성 향기성분은 머무름시간(t_R)과 머무름지수(RI) 상관관계와 total ion chromatogram(TIC) 각 peak의 mass spectrum을 이용하여 동정하였다.

1) 머무름 지수(RI)의 설정

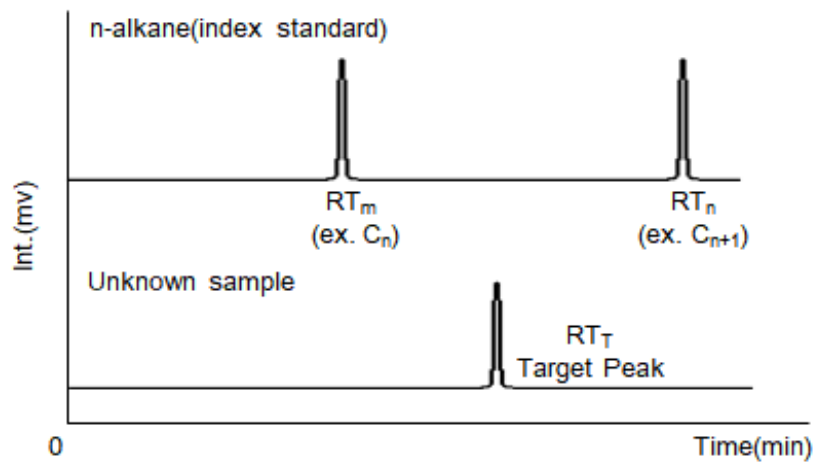
머무름 지수(Kovats retention index, KI 또는 RI)는 헝가리의 스위스 화학자 Ervin Kováts(1958)가 기체 크로마토그래피를 이용한 에센셜 오일의 휘발성 화합물 분석에서 제안한 것으로 기체 크로마토그래피에서의 머무름 지수(RI)는 머무름 시간(retention time, t_R)과 무관하게 독립적인 상수로 변환하는데 사용되며, 직쇄 알칸(aliphatic alkane)의 등간격으로 검출된 머무름시간을 머무름지수로 변환하여 설정하였다.

머무름 시간은 컬럼의 내경, 길이 및 film thickness과 함께 이동상의 유속, 압력 및 void time 등의 개별 크로마토그래피 설정에 따라 차이가 발생하는 반면, 머무름 지수는 위의 매개변수와는 완전히 독립적이며 다양한 조건하에서도 실험적 결과를 확보함으로써 미지의 성분을 확인하다는 매우 효율적이며, 특정 머무름 지수는 특정 화합물의 머무름 시간의 앞과 뒤에 나타나는 두 개의 직쇄 알칸의 머무름 시간으로부터 구할 수 있다.

머무름 지수의 정의에 따르면, 크로마토그래피의 세부조건과 무관하게 aliphatic alkane의 RI는 탄소 수(carbon number)의 100배와 같은 값을 갖으며 n-alkane은 어떠한 분석 조건에서도 항상 CH_4 (RI=100), ... C_nH_{2n+2} (RI=100n)의 표준지표를 나타낸다(Schultz et al., 1977)(Fig. 2-4).

이에 따라 휘발성 향기 성분의 머무름 지수를 설정하기 위하여 40mg/L $C_8 - C_{20}$ chain의 n-alkane 표준용액(Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA) 1 μ L를 동일 분석조건(Table 2-1)하에서 GC-MS으로 분석하여 각 alkane의 머무름 시간

(t_R)과 탄소 수(carbon number)의 100배수로 n-alkane(C_8 - C_{20})의 RI를 확립하고 이를 각 베리류 시료의 휘발성 향기 분석 결과에 적용하였다(Fig. 2-5).



$$Kovats\ RI_T = RI_{C_n} + 100 \times \frac{RT_T - RT_{C_n}}{RT_{C_{n+1}} - RT_{C_n}}$$

$$RT_{C_n} = 100 \times n \text{ (carbon number)}$$

Fig. 2-4. Calculation of retention index(RI)

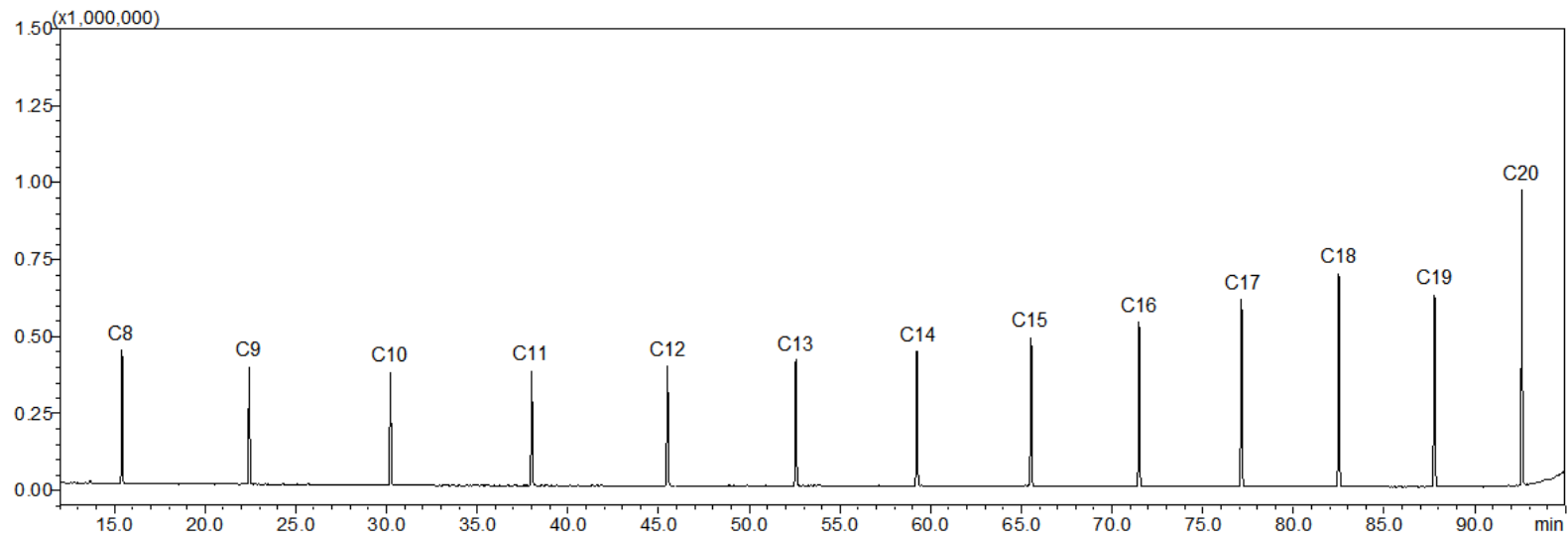


Fig. 2-5. GC/MS chromatogram of n-alkane standard mixture(C_8H_{18} - $C_{20}H_{42}$)

Table 2-2. Retention time of n-alkanes for gas chromatographic retention index

NO	RI ¹⁾	n-Alkane	Chemical name	t _R (min)
1	800	C ₈ H ₁₈	n-Octane	15.42
2	900	C ₉ H ₂₀	n-Nonane	22.43
3	1000	C ₁₀ H ₂₂	n-Decane	30.22
4	1100	C ₁₁ H ₂₄	n-Undecane	38.01
5	1200	C ₁₂ H ₂₆	n-Dodecane	45.49
6	1300	C ₁₃ H ₂₈	n-Tridecane	52.57
7	1400	C ₁₄ H ₃₀	n-Tetradecane	59.24
8	1500	C ₁₅ H ₃₂	n-Pentadecane	65.54
9	1600	C ₁₆ H ₃₄	n-Hexadecane	71.49
10	1700	C ₁₇ H ₃₆	n-Heptadecane	77.14
11	1800	C ₁₈ H ₃₈	n-Octadecane	82.50
12	1900	C ₁₉ H ₄₀	n-Nonadecane	87.78
13	2000	C ₂₀ H ₄₂	n-Eicosane	92.59

¹⁾RI : Retention index

2) 휘발성 향기성분의 동정

GC-MS에 의해 분리된 각 휘발성 향기성분은 total ion chromatogram(TIC) 각 peak의 mass spectrum에 대해 mass spectral data book(Stehagen, Abbrahansom & McLafferty, 1974; Adams, 2017)과 EI-MS library(Wiley 9, NIST 14, FFNSC 2.0)를 비교하여 유사도(similarity) 90 이상의 기준과 함께 C₈-C₂₀의 n-alkane 의해 설정된 머무름 지수(RI)(Kovats, 1965)를 구하여 문헌상의 RI(The Sadtler standard gas chromatography retention index library, 1986)와 비교하여 동정하였다.

2. 휘발성 향기성분의 정량

휘발성 향기성분의 정량분석은 추출시 내부표준물질로 첨가한 n-butylbenzene과 동정된 휘발성 향기성분의 peak area의 비율을 이용하여 단위 중량당 함량으로서 mg/kg으로 상대 정량치를 산출하였다.

$$\text{Component relative content (mg/kg)} = \frac{\text{Area}_{\text{peak}} \times \text{Weight}_{\text{ISTD}}}{\text{Area}_{\text{ISTD}} \times \text{Weight}_{\text{sample}}} \times 1000$$

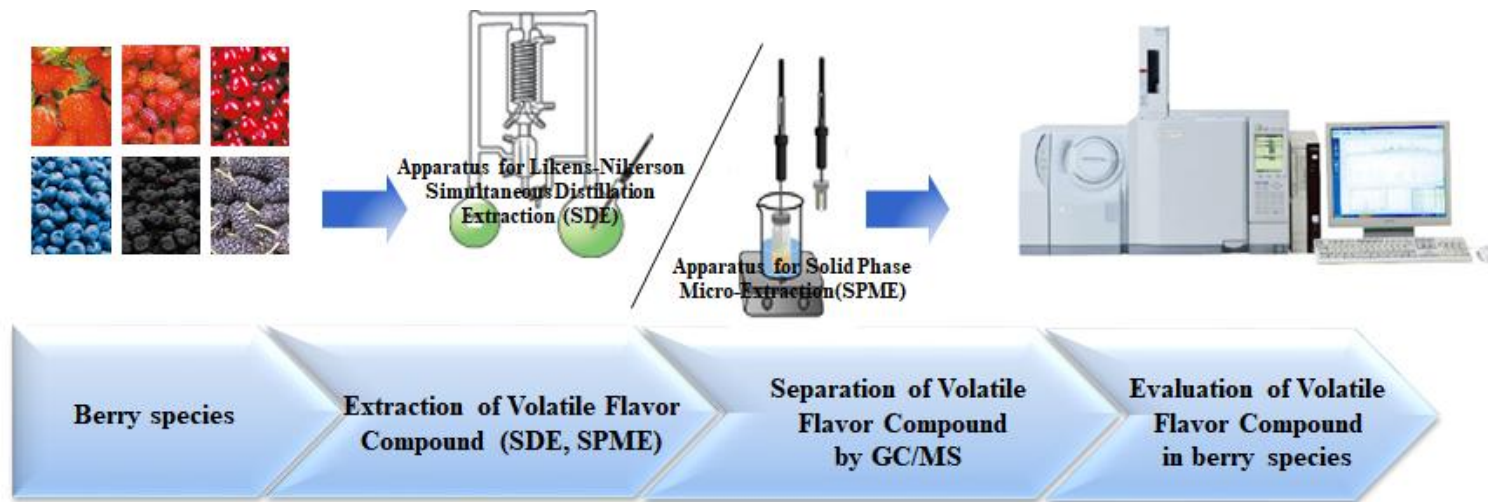


Fig. 2-6. Experimental scheme for analysis of volatile flavor compounds from berry species

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 베리류의 휘발성 향기성분 추출을 위한 HS-SPME 조건 확립

1. SPME absorption fiber의 종류에 따른 비교

SPME법에 있어 목적 물질을 흡착시키는 fiber의 선택 기준은 fiber에 coating되어 있는 화합물의 극성도에 의해 좌우된다. 고정상은 fused silica에 다양한 화합물을 결합시킨 형태를 갖는다. 본 실험에서 사용한 SPME 흡착제는 상업적으로 판매되고 있는 fiber로서 비결합 형태의 비극성인 PDMS(polydimethylsiloxane)과 비교적 극성이 높은 CAR(carboxen)과 DVB(divinylbenzene)을 가교결합(cross-linking)한 fiber로서 각 시료의 휘발성 향기성분에 대한 흡착능을 GC/MS으로 Fig. 2-7과 같이 비교하였다.

본 연구에 사용할 최적의 SPME fiber를 선택하고자 블루베리를 대상으로 향기성분을 추출하였고, SPME fiber는 100 um PDMS, 85 um CAR/PDMS, 65 um PDMS/DVB, 50/30 um DVB/CAR/PDMS를 각각 이용하여 50°C에서 30 min 동안 휘발성 향기성분을 포집한 GC/MS으로 분석하였으며 휘발성 향기성분의 정량분석은 SPME 추출시 내부표준물질로 첨가한 n-butylbenzene과 동정된 휘발성 향기성분의 peak area를 비교하여 상대적 정량값으로 산출하였다(Table. 2-3). 그 결과, SPME fiber 종류에 따라 블루베리의 휘발성 향기성분의 함량뿐만 아니라 검출성분의 종류와 성분 수가 차이를 보였으며, 100 um PDMS에서는 4종의 향기성분만 검출되었고 2.06 mg/kg의 낮은 함량으로 나타났고 85 um CAR/PDMS는 비교적 휘발성이 높은 화합물로 8종이 검출되었고 함량은 4.55 mg/kg으로 확인되었다. 65 um PDMS/DVB와 50/30 um DVB/CAR/PDMS는 각각 21종과 25종의 휘발성 향기성분이 검출되었으며 함량은 65 um PDMS/DVB가 9.15 mg/kg, 50/30 um DVB/CAR/PDMS은 29.81 mg/kg으로 확인되어 휘발성 향기성분의 검출 수와 함량이 가장 높은 50/30 um DVB/CAR/PDMS의 SPME fiber가 베리류의 휘발성 향기성분을 추출하는데 가장 효과적으로 사료되었다.

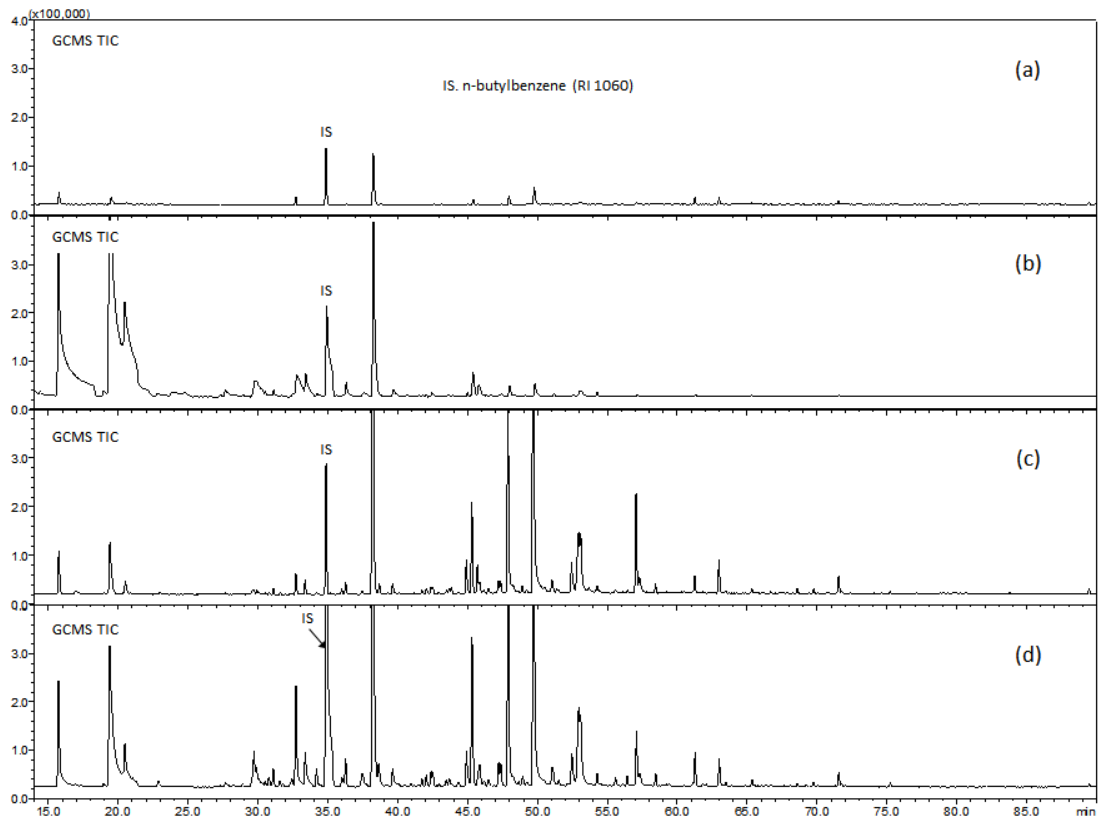


Fig. 2-7. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of blueberry according to different SPME absorption fiber type

Table 2-3. Contents of volatile flavor of blueberry according to differential SPME absorption fiber type

(Unit : mg/kg)

NO	RI	Compound	MF	MW	SPME absorption fiber			
					PDMS	CAR /PDMS	DVB /PDMS	DVB/CAR /PDMS
1	857	(Z)-3-Hexenol	C ₆ H ₁₂ O	100	-	0.02	tr	0.02
2	868	(E)-2-Hexenol	C ₆ H ₁₂ O	100	-	0.02	tr	-
3	870	1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	-	0.04	-	-
4	874	1-Methoxy-2-propyl acetate	C ₆ H ₁₂ O ₃	132	-	0.20	tr	-
5	965	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	106	-	0.01	-	-
6	995	(E)-2-Ethenyltetrahydro-2-methyl-5-(1-methylethenyl)-furan	C ₁₀ H ₁₆ O	152	-	-	0.02	0.05
7	1010	(Z)-Dehydrolinalool oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	152	-	0.10	0.08	0.12
8	1031	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.26	-	0.34	0.33
9	1074	1-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	130	-	-	0.01	-
10	1076	(Z)-Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	-	-	0.04	0.04
11	1092	α-Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	136	-	-	0.02	-
12	1102	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.65	3.93	3.43	11.47
13	1107	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	-	-	0.01	0.01
14	1192	p-Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	-	0.24	0.22	1.16
15	1197	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	0.55	1.61
16	1205	(Z)-Dihydrocarvone	C ₁₀ H ₁₆ O	152	-	-	0.03	0.05
17	1226	(E)-Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	-	-	0.11	0.06
18	1233	(Z)-Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	1.21	4.65
19	1259	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	2.72	6.92
20	1303	p-Menth-1-en-9-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	0.04	0.18
21	1305	Limonen-10-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	-	-	0.01	0.63
22	1307	Perilla alcohol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	-	-	0.07	0.67
23	1367	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	-	-	0.09	0.54
24	1432	(E)-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.06	-	0.05	0.09
25	1459	Dihydropseudoionone	C ₁₃ H ₂₂ O	194	0.09	-	0.07	1.05
26	1600	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	220	-	-	tr	0.09
27	1935	Methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	-	-	-	0.09
Total					2.06	4.55	9.15	29.81

2. SPME 이용 향기성분 추출의 염석효과

SPME를 이용한 향기성분 추출은 absorption fiber와 대상 시료간의 분배계수를 증가시키는 것이 관건으로 분배계수를 변화시키는 실험인자들로 흡착 시 온도, 염석 효과(salt effect)나 시료의 pH 조절 등이 있다. 이중 일반적으로 SPME를 이용한 시료 내 휘발성 향기성분의 추출에서 이온들에 의한 영향(염석효과)은 다음과 같다. 첫째, 수용액에서 NaCl의 용해는 SPME fiber의 물리적 성질을 변화시켜서 분석물질이 추출용매로 확산되어 가는 속도가 감소된다. 둘째, 염(salt)이 첨가됨에 따라 용액의 이온 세기가 증가되어 수용액에서의 분석 물질의 용해도가 감소됨에 따라 유기상으로의 분배가 증가된다. 셋째, 염을 첨가하면 상비(phase ratio)에 영향을 미친다. 이와 같은 영향에 따라서 첫 번째와 세 번째 효과는 추출효율을 감소시키는 요인이 되며, 두 번째 요인은 추출효율을 증가시키는 요인이 된다. 이러한 영향을 적절히 조절함으로써 시료 내 휘발성 향기성분에 대한 염석효과로서 추출 효율을 증가시킬 수도 있고 감소시킬 수도 있다(Kudlejova et al. 2012).

앞서 결정된 50/30 um DVB/CAR/PDMS의 SPME fiber를 이용하여 블루베리를 대상으로 NaCl의 포화 용해도를 고려하여 30% w/w으로 NaCl을 시료에 혼합하여 SPME를 이용한 휘발성 향기성분 추출의 염석효과 여부를 확인하였으며 그 결과 NaCl 첨가가 블루베리의 향기성분 추출에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 특히 limonene, linalool, α -terpineol, geraniol와 같은 terpene류의 휘발성 향기성분이 대체적으로 함량이 높아지는 것으로 나타나 SPME를 이용한 베리류의 휘발성 향기성분을 추출시 NaCl의 의한 염석효과가 효과적인 것으로 사료되었다(Fig 2-8).

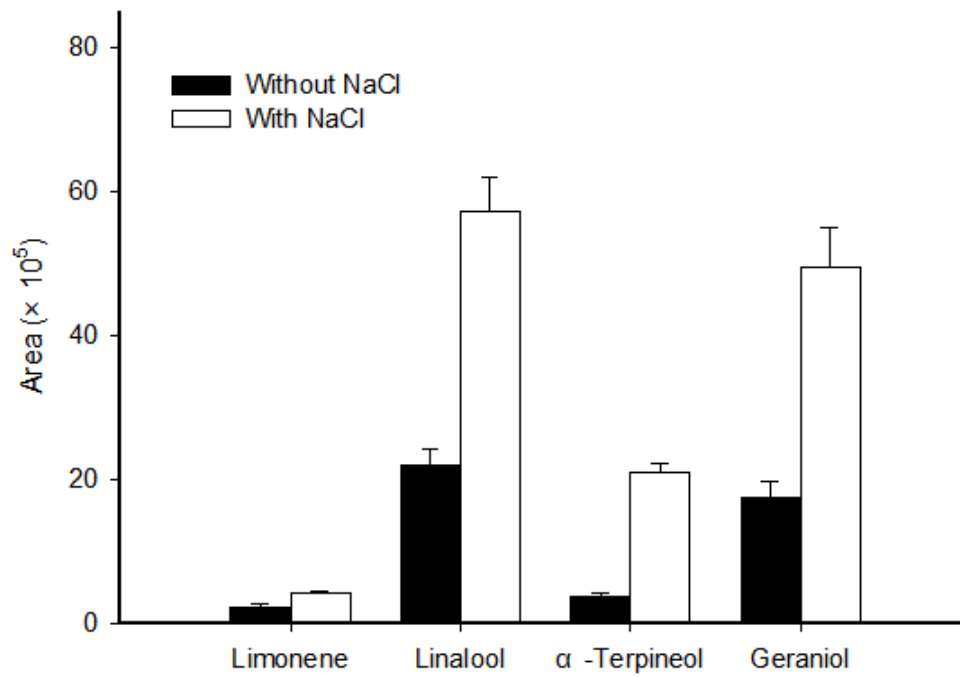


Fig 2-8. Peak area for four volatile flavor compounds extracted from blueberry with DVB/CAR/PDMS SPME fiber with and without addition of NaCl(salting out)

제 2 절 SDE법에 의한 베리류의 휘발성 향기 성분

1. 양딸기(Strawberry)의 휘발성 향기성분

양딸기(strawberry)로부터 SDE법으로 휘발성 향기 성분을 추출하여 GC/MS으로 분석한 결과 total ion chromatogram(TIC)는 Fig. 2-9에 나타내었고, 동정된 향기성분의 조성과 함량은 Table 2-4에 나타내었다.

양딸기에서 분리 동정된 휘발성 향기성분은 총 53종으로, alcohol류와 ester류는 각각 12종, 16종으로 전체 향기 화합물 성분의 다수를 이루며 그 외 aldehyde류 9종, oxygenated 화합물 8종, ketone류 3종, hydrocarbon류 2종 및 기타 3종의 화합물이 동정되었다. 휘발성 향기성분의 구성 비율(area%)는 성분 개수와 동일하게 alcohol류가 42.64%을 가장 많은 함량을 차지하였고 다음으로 aldehyde, ester, ketone, oxygenated 화합물 순으로 20.32%, 14.65%, 12.12%, 8.82% 확인되었다.

양딸기의 휘발성 향기 성분 중 ester류는 딸기 고유 신선한 향을 나타내는 매우 중요한 화합물로 보고(Pyysalo, Suihko & Honkanen, 1977; Schreier, 1980)되었고, 본 연구에서는 ethyl butyrate($C_6H_{12}O_2$, $116 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), methyl caporate ($C_7H_{14}O_2$, $130 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), ethyl caproate($C_8H_{16}O_2$, $116 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 등이 검출되었다. Alcohol류 중 sesquiterpene alcohol인 (Z)-nerolidol ($C_{15}H_{26}O$, $222 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 1.898 mg/kg 으로 가장 높은 함량을 보였으며 이는 Shreier의 결과(Schreier, 1980)와 일치하는 것으로 확인되었다. Nerolidol은 sesquiterpenes의 전구체로 알려진 farnesyl diphosphate(FDP)로부터 nerolidol synthase에 의해 (E)-nerolidol으로 전환되며 (Bouwmeester et al., 1999), 일부 식물의 방어 체계에서 매우 적극적인 역할을 하는 것으로 보고되면서 여러 연구자들의 의해 약리학적 등 다양한 측면에서 많은 연구가 수행되어 현재까지 밝혀진 생리활성으로 anti-microbial, anti-biofilm, anti-oxidant, anti-parasitic, skin-penetration enhancer, anti-inflammatory 및 anti-cancer 등에 효능이 있는 것으로 보고되었다(Vinholes et al., 2014; Hada et al., 2003; Kubo & Morimitsu, 1995). 또한 다양한 약리 효능이 밝혀지면서 nerolidol은 산업적으로 이용하고자 linalool으로부터 geranyl esters 합성과정의 중간체로서 nerolidol을 제조하고 있다(Nigmatov & Yanovskaya, 1987).

그 외 alcohol류로 linalool($C_{10}H_{18}O$, $154 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), (E)-2-hexenol($C_6H_{12}O$, $100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 그리고 1-hexanol($C_6H_{14}O$, $102 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 각각 0.206, 0.079, 0.082 mg/kg의 함량으로 나타났다. 딸기의 휘발성 향기를 구성하는 성분 중 linalool, nerolidol은 꽃향기를 내는 중요 화합물로 보고되어 있다(Drinck et al., 1983). Aldehyde류로는 1,1-Diethoxyethane($C_6H_{14}O_2$, $118 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), (E)-2-hexenal ($C_6H_{10}O$, $98 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), Hexanal($C_6H_{12}O$, $100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 검출되었다.

일반적으로 ester류, alcohol류 및 aldehyde류 등은 acid류가 전구체로서 식물체에 존재하는 효소에 의해 전화되는 것으로 알려져 있고 특히 hexanol과 hexanal과 같은 C_6 계열의 휘발성 화합물은 lipoxygenase pathway (LOX)에서 hyperperoxide의 효소작용으로 의해 fatty acid으로부터 유도되며 ester류 화합물에 전구체 역할을 하는 것으로 보고되었다(Hatanaka, 1993; Hatanaka, Kajiwara & Sekiya, 1987).

Ketone류의 향기 특성으로 복숭아 또는 신선한 코코넛 향기와 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 ketone류 또한 딸기의 향기 성분으로 중요한 역할을 하며(Ho et al., 1990) 특히 γ -dodecalactone($C_{12}H_{22}O_2$, $198 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 많은 부분을 차지하는 것으로 보고되고 있다(Drinck et al., 1983). 본 연구에서는 γ -dodecalactone이 0.678 mg/kg으로 ketone류 중 가장 많은 함량을 보였으며 전체 휘발성 향기성분에서도 (E)-nerolidol 다음으로 두 번째로 많은 함량을 보이는 것으로 확인되었다.

Furaneol(2,5-dimethyl-4-hydroxy - 2H-furan-3-one, DMHF, $C_6H_8O_3$, $128 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)은 딸기의 대표적인 주요 향기성분으로 threshold 값이 $4 \times 10^{-5} \text{ mg/kg}$ 으로 극미량이나 딸기 전체 향기에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데(Volatile Compounds in foods and beverages, 1991), 본 연구에서는 검출되지 않았고 다만 hydroxyl group 이 methoxyl group으로 치환된 mesifuran(2,5-dimethyl-4-methoxy - 2H- furan - 3-one, $C_7H_{10}O_3$, $142 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 4.216 mg/kg 함유되는 것으로 나타났으며 mesifuran는 sweet cherry-like 및 herbal note의 향으로 표현되는 것으로 알려져 있다.

Roscher 등(1997)은 mesifuran이 아미노산의 일종인 S-adenosyl-L-methionine (SAM)의 methoxyl group과 furanone 구조의 DMHF로부터 유도되는 것으로 보고 하였고, 또한 이를 뒷받침하기 위한 Perez 등(Sanz, Richardson & Perez, 1995; Zabetakis, Gramshaw & Robinson, 1999)의 연구결과에서는 DMHF의 경우, 딸기의 숙성의 시작과 그 후의 단계에서 mesifuran, DMHF-glucoside, DMHF-malonyl-

glucoside 형태의 유도체 화합물로 전환되며(Fig. 2-10) 이들 화합물은 과일 전체의 특유의 향기와 연관이 깊다고 보고하였다.

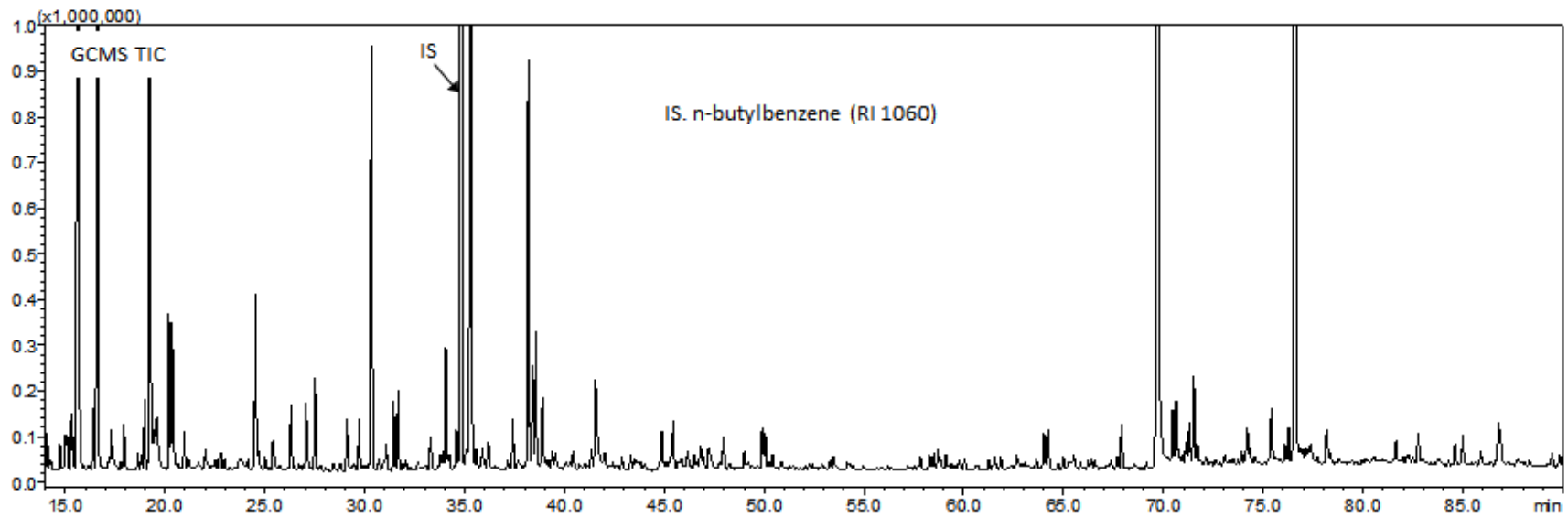


Fig. 2-9. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of strawberry

Table 2-4. Volatile flavor composition of strawberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
1	15.29	798	3-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	0.603	0.019	RI, MS
2	15.55	802	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	2.127	0.068	RI, MS
3	15.65	803	Ethyl butyrate	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	5.109	0.163	RI, MS
4	16.40	814	Isopropylal	C ₇ H ₁₆ O ₂	132	0.850	0.027	RI, MS
5	16.59	817	Acetal	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	14.403	0.458	RI, MS
6	17.29	827	Methylpyrazine	C ₅ H ₆ N ₂	96	0.520	0.017	RI, MS
7	17.93	836	Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	96	0.680	0.022	RI, MS
8	18.98	851	Ethyl 2-methylbutanoate	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	0.613	0.019	RI, MS
9	19.22	854	(E)-2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	98	2.710	0.086	RI, MS
10	20.19	868	(E)-2-Hexenol	C ₆ H ₁₂ O	100	2.018	0.064	RI, MS
11	20.34	870	1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	1.869	0.059	RI, MS
12	20.95	879	Isoamyl acetate	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	0.417	0.013	RI, MS
13	22.77	904	Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	114	0.050	0.002	RI, MS
14	24.53	927	Methyl caproate	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	1.945	0.062	RI, MS
15	25.40	938	Ethyl 3-hydroxybutyrate	C ₆ H ₁₂ O ₃	132	0.101	0.003	RI, MS
16	26.31	950	3-Hexyl hydroperoxide	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	0.550	0.017	RI, MS
17	27.06	959	2-Hexyl hydroperoxide	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	0.648	0.021	RI, MS
18	27.46	965	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	106	0.966	0.031	RI, MS
19	29.72	994	2-Pentyl-furan	C ₉ H ₁₄ O	138	0.877	0.028	RI, MS
20	30.33	1002	Ethyl caproate	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	2.681	0.085	RI, MS
21	31.45	1016	Hexyl acetate	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	0.769	0.024	RI, MS
22	31.67	1019	2-Hexenyl acetate	C ₈ H ₁₄ O ₂	142	0.893	0.028	RI, MS
23	33.28	1039	Benzyl alcohol	C ₇ H ₈ O	108	0.251	0.008	RI, MS
24	34.05	1049	Phenylacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	120	2.167	0.069	RI, MS
25	34.59	1056	Methyl 3-hydroxyhexanoate	C ₇ H ₁₄ O ₃	146	0.286	0.009	RI, MS
26	35.28	1065	2,5-Dimethyl-4-methoxy- 2,3-dihydro-3-furanone	C ₇ H ₁₀ O ₃	142	6.798	0.216	RI, MS
27	36.16	1076	(Z)-Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	0.112	0.004	RI, MS
28	37.41	1092	(E)-Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	0.308	0.010	RI, MS

Table 2-4. Continued

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
29	38.18	1102	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	2.469	0.079	RI, MS
30	38.40	1105	2,4-Dimethyl-3-hexanol	C ₈ H ₁₈ O	130	0.656	0.021	RI, MS
31	38.53	1107	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	0.726	0.023	RI, MS
32	38.91	1112	1-Methylbutyl butyrate	C ₉ H ₁₈ O ₂	158	1.009	0.032	RI, MS
33	41.56	1147	Methyl nicotinate	C ₇ H ₇ NO ₂	137	0.610	0.019	RI, MS
34	44.89	1192	Ethoxydiglycol acetate	C ₈ H ₁₆ O ₄	176	0.330	0.011	RI, MS
35	45.45	1199	Ethyl caprylate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	0.243	0.008	RI, MS
36	46.82	1219	3-Ethyl-3-methyl-2-pentanol	C ₈ H ₁₈ O	130	0.025	0.001	RI, MS
37	47.23	1224	Ethyl nicotinate	C ₈ H ₉ NO ₂	151	0.046	0.001	RI, MS
38	47.97	1235	3-(2,2-dimethylpropoxy)-2-Butanol	C ₉ H ₂₀ O ₂	160	0.375	0.012	RI, MS
39	49.91	1262	Methyl-3-hydroxyoctanoate	C ₉ H ₁₈ O ₃	174	0.099	0.003	RI, MS
40	50.05	1264	2-Phenethyl acetate	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	0.527	0.017	RI, MS
41	64.02	1476	(E)-Ethyl cinnamate	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	176	0.337	0.011	RI, MS
42	64.22	1479	γ-Decalactone	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	0.633	0.020	RI, MS
43	67.90	1540	(Z)-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.264	0.008	MS
44	69.73	1570	(E)-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	20.760	0.660	RI, MS
45	70.46	1583	Unknown			0.266	0.008	
46	70.64	1586	Octyl hexanoate	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	0.115	0.004	RI, MS
47	71.29	1597	Ethyl undecanoate	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214	0.215	0.007	RI, MS
48	71.52	1600	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.266	0.008	RI, MS
49	76.60	1690	γ-Dodecalactone	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	198	18.365	0.584	RI, MS
50	78.18	1719	(E)-Nerolidyl acetate	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264	0.115	0.004	RI, MS
51	84.60	1840	Neophytadiene	C ₂₀ H ₃₈	278	0.021	0.001	RI, MS
52	85.00	1847	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	C ₁₈ H ₃₆ O	268	0.062	0.002	MS
53	86.79	1881	α-Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.147	0.005	RI, MS
Total						100	3.181	

1) Retention indices on a 60 m L. × 0.25 mm i.d. film thickness 0.25 um column, relative to C₈-C₂₀ alkanes

2) Relative quantitation, calculated from (peak area × IS weight) / (IS peak area × sample weight). RSD 0.1 - 20% (mean 5%) (n=3)

3) Identification based on retention index and mass spectra library (FFNSC 2.0, NIST 14, Wiley 9)

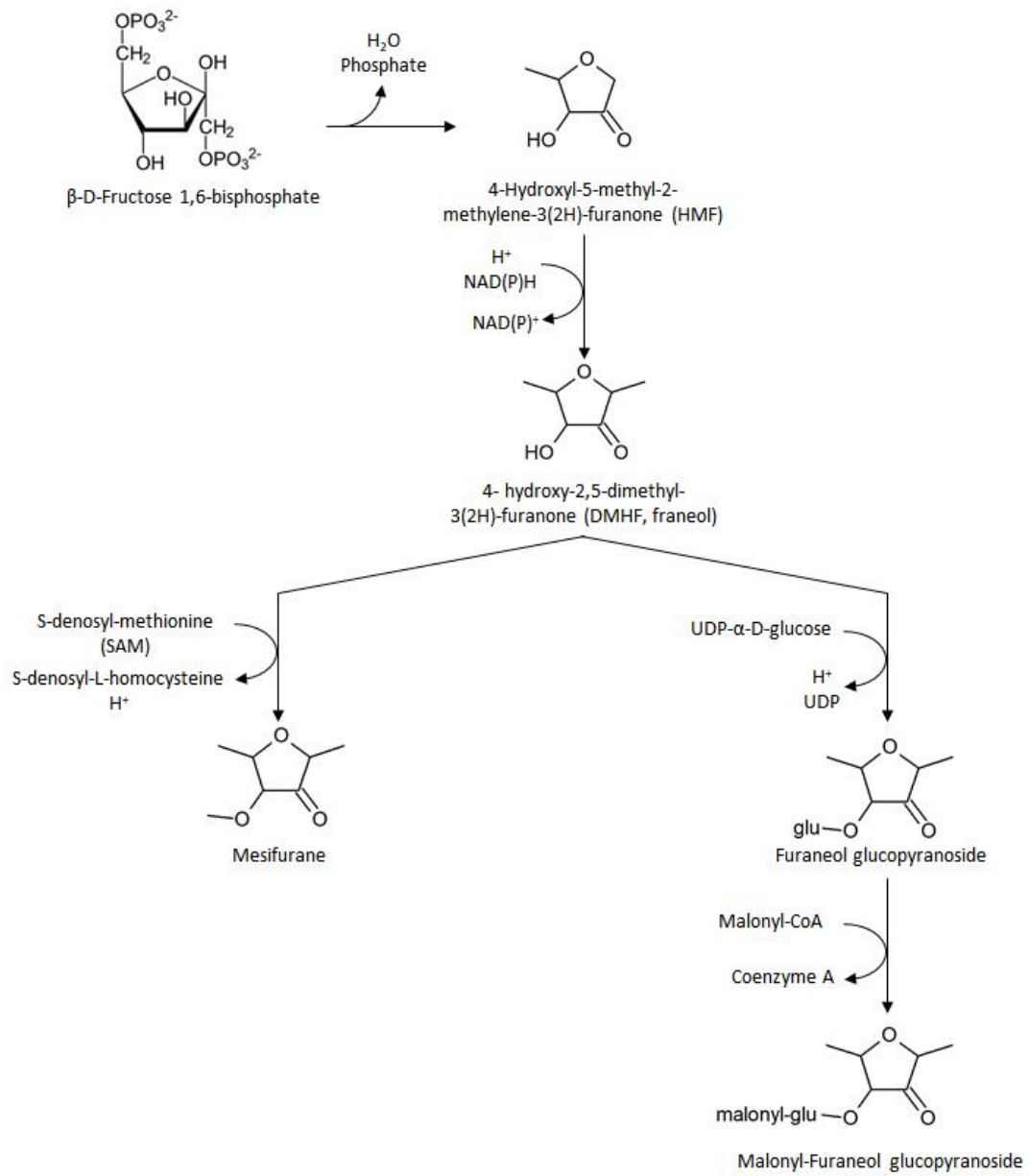


Fig. 2-10. Biosynthetic pathway of DMHF and derivatives

Table 2-5. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of strawberry

Functional group	Number	Conc.%
Alcohols	12	42.64
Aldehydes	9	20.32
Esters	16	14.65
Hydrocarbons	2	0.59
Ketones	3	12.12
Oxygenated compounds	8	8.82
Miscellaneous	3	0.84
Total	53	100.00

2. 라즈베리(Raspberry)의 휘발성 향기성분

라즈베리(raspberry)로부터 SDE법으로 휘발성 향기 성분을 추출하여 GC/MS으로 분석한 결과, total ion chromatogram(TIC)는 Fig. 2-11에 나타내었고 동정된 향기 성분의 조성과 함량은 Table 2-6에 나타내었다.

본 연구에서 분리 동정된 라즈베리의 휘발성 향기성분은 총 26종으로, alcohol류가 9종으로 가장 많은 성분으로 구성되어 있고 aldehyde류와 oxygenated 화합물이 각 6종으로 이루어져 있으며 그 외 ketone류 3종, ester류 2종의 화합물이 동정되었다. 휘발성 향기성분의 구성 비율(area%)로는 성분 개수와 동일하게 alcohol류가 49.85%을 가장 높은 함량을 차지하였고 다음으로 aldehyde, oxygenated 화합물, ketone, ester 순으로 21.94%, 15.27%, 7.32%, 5.63%으로 나타났다(Table 2-7).

라즈베리의 주요 휘발성 향기성분은 linalool($C_{10}H_{18}O$, $154 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), (Z)-Linalool oxide($C_{10}H_{18}O_2$, $170 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), 2-Hexanol($C_6H_{14}O$, $102 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), 2-Hydroxy benzaldehyde($C_7H_6O_2$, $122 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)으로 alcohol류와 aldehyde류가 주로 구성되어 있으며, 특히 linalool은 전체 함량의 24.09%의 높은 함량을 차지하는 것으로 나타났다. Ester류는 methyl hexanoate($C_7H_{14}O_2$, $130 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)와 methyl hexadecanoate ($C_{17}H_{34}O_2$, $270 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 확인되었는데 ester류의 휘발성 향기성분들은 매우 불안정하여 가공시 γ -lactone 화합물로 전환되는 것으로 알려져 있다. Ketone류는 2-hexanone($C_6H_{12}O$, $100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), γ -decalactone($C_{10}H_{18}O_2$, $170 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), γ -dodecalactone($C_{12}H_{22}O_2$, $198 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 검출되었고 fruity peach, sweet cream의 향기 특성을 나타내는 γ -decalactone은 전체 함량의 4.43%에 해당하는 것으로 확인되었다.

라즈베리의 향을 결정하는 주요 화합물(character impact compounds)로 인식되어 raspberry ketone이라 불리우는 4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-one($C_{10}H_{12}O_2$, $164 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)은 본 연구에서는 검출되지 않았다. Eugenio등의 보고(2015)에 따르면 raspberry ketone 등 raspberry의 γ -lactone 화합물은 재배종보다 야생종에서 3배 이상 높은 함유량을 보이는 것으로 확인되고 α -pinene, β -pinene, β -caryophyllene, (Z)-sabinol, methol, α -elemene과 같은 mono- 및 sesquiterpene류도 야생종에서 종종 관찰된다고 보고되었다(Honkanen, Pyysalo & Hirvi, 1980).

또한 Malowicki 등(2008)은 stir bar sorptive extraction(SBSE)를 이용하여 (Z)-

hexenol, hexanal, (E)-2-hexenal, 2-heptanone, δ -octalactone, δ -decalactone, geraniol, α -ionone, β -ionone, and terpinen-4-ol 등의 라즈베리 유래 향기 화합물 30여종을 동정하였다. Malowicki 등의 연구 결과(Malowicki, Martin & Qian, 2008)에서는 라즈베리의 휘발성 향기 성분은 재배 지역 간의 화합물의 구성이 다양하며 이러한 차이가 토양 등 원예 조건에 따라 차이가 나타나는 것으로 보고하였으며, 과일 향은 숙성 정도에 따라서 향기 화합물의 구성과 함량의 차이가 발생하는데 Guichard 등(1984)은 숙성 과정에서 terpene 화합물은 그 함유량이 크게 증가하는 반면 ester류는 소폭 증가하는 경향을 보인다고 보고하였다. 이를 종합하여 볼 때 본 연구와 문헌상의 휘발성 향기성분 구성 및 함유량의 유의적 차이가 발생하는 요인은 품종의 차이와 함께 숙성 상태, 추출용매, 추출방법 등의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

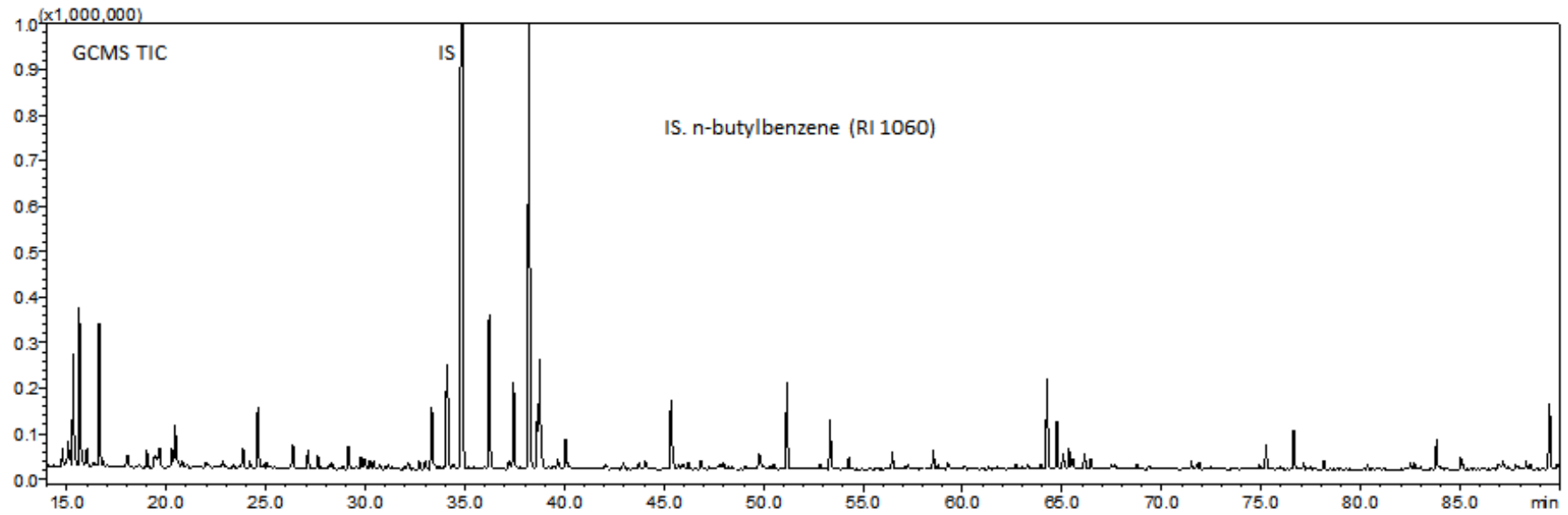


Fig. 2-11. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of raspberry

Table 2-6. Volatile flavor composition of raspberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
1	15.05	795	2-Hexanone	C ₆ H ₁₂ O	100	1.012	0.007	RI, MS
2	15.29	798	3-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	5.895	0.040	RI, MS
3	15.61	803	2-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	12.493	0.085	RI, MS
4	16.01	808	3-Methyl-1-pentanol	C ₆ H ₁₄ O	102	0.103	0.001	RI, MS
5	16.59	817	Acetal	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	8.295	0.057	RI, MS
6	20.34	870	1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	2.796	0.019	RI, MS
7	23.86	918	Unknown			1.106	0.008	RI, MS
8	24.53	927	Methyl caproate	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	3.397	0.023	RI, MS
9	26.31	950	3-Hexyl hydroperoxide	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	0.804	0.005	RI, MS
10	27.06	959	2-Hexyl hydroperoxide	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	0.840	0.006	RI, MS
11	33.28	1039	Benzyl alcohol	C ₇ H ₈ O	108	3.310	0.023	RI, MS
12	36.16	1076	(Z)-Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	5.285	0.036	RI, MS
13	37.41	1092	(E)-Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	2.819	0.019	RI, MS
14	38.18	1102	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	16.773	0.115	RI, MS
15	38.53	1107	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	1.054	0.007	RI, MS
16	38.75	1110	Ethyl hexyl acetal	C ₁₀ H ₂₂ O ₂	174	6.294	0.043	RI, MS
17	40.05	1127	(2E)-1-(1-Ethoxyethoxy)-2-hexene	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	1.317	0.009	RI, MS
18	45.27	1197	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	2.626	0.018	RI, MS
19	49.67	1259	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.730	0.005	RI, MS
20	51.17	1280	3-(Benzyloxy)-2-butanol	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	180	5.784	0.040	RI, MS
21	53.35	1312	Undecanal	C ₁₁ H ₂₂ O	170	0.774	0.005	RI, MS
22	64.22	1479	γ -Decalactone	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	8.411	0.057	RI, MS
23	64.74	1487	3-(1-Ethoxyethoxy)-3,7-dimethyl-1,6-octadiene	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226	2.244	0.015	RI, MS
24	76.60	1690	γ -Dodecalactone	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	198	2.363	0.016	RI, MS
25	89.47	1935	Methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	3.474	0.024	RI, MS
Total						100	0.683	

1) Retention indices on a 60 m L. \times 0.25 mm i.d. film thickness 0.25 μ m column, relative to C₈-C₂₀ alkanes

2) Relative quantitation, calculated from (peak area \times IS weight) / (IS peak area \times sample weight). RSD 0.1 - 20% (mean 5%) (n=3)

3) Identification based on retention index and mass spectra library(FNNSC 2.0, NIST 14, Wiley 9)

Table 2-7. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of raspberry

Functional group	Number	Conc.%
Alcohols	9	49.85
Aldehydes	6	21.94
Esters	2	5.63
Ketones	3	7.32
Oxygenated compounds	5	15.27
Total	25	100.00

3. 블루베리(Blueberry)의 휘발성 향기성분

SDE법을 이용하여 블루베리(buleberry)의 휘발성 향기 성분을 추출하고 GC/MS으로 분석한 결과로서 total ion chromatogram(TIC)는 Fig. 2-12와 같고, 동정된 향기성분의 조성과 함량은 Table 2-8에 나타내었다.

블루베리는 쌍떡잎식물인 진달래과(Ericaceae) 산앵두나무속(Vaccinium)에 속하는 관목성 식물로서 약 400 여종이 있으며, 그 중에서 highbush 블루베리(*V. corymbosum*), lowbush 블루베리(*V. angustifolium*) 및 hexaploid rabbiteye 블루베리(*V. virgatum*; *V. ashei*) 등 세 종류가 상업적으로 중요한 과실로서 재배되고 있다(Temperate-zone pomology, 1993). 블루베리는 뛰어난 생체 조절 기능성을 갖는 생리활성 화합물들을 다수 함유하고 있어 각종 성인병예방에 효과적이라는 연구 결과가 보고(Jeong et al., 2012)되면서, 2002년 미국 주요 주간지, Time은 블루베리를 세계 10대 건강식품의 하나로 선정하기도 하였으나 블루베리의 향기에 관한 연구는 앞서 살펴본 양말기, 라즈베리에 비해 연구가 미비한 실정이다.

본 연구에서 분리 동정된 블루베리의 휘발성 향기성분은 총 35종으로, alcohol류가 17종으로 가장 많은 성분으로 구성되었고 함량 또한 전체 향기 성분 중 72.93%으로 5.077 mg/kg이 함유된 것으로 확인되었으며, aldehyde류는 7성분으로 1.169 mg/kg(17.02%)의 함량을 보였다. 그 외 oxygenated 화합물 5종, 0.244 mg/kg (3.55%), terpene 계열의 hydrocarbon류가 3종으로 0.225 mg/kg(3.27%), ketone류는 2종, 0.102 mg/kg(1.49%) 그리고 ester류는 1종, 0.051 mg/kg(0.75%)으로 나타났다.(Table 2-9) 블루베리의 개별 휘발성 향기성분으로 alcohol류인 linalool($C_{10}H_{18}O$, $154 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)과 geraniol($C_{10}H_{18}O$, $154 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 각각 1.420 mg/kg(20.68%), 1.368 mg/kg (19.92%)의 높은 함량으로 나타났고 1-hexanol($C_6H_{14}O$, $102 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), (Z)-3-hexenol($C_6H_{12}O$, $100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), α -terpineol($C_{10}H_{18}O$, $154 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)도 검출되었다. 블루베리의 휘발성향기 성분 중 aldehyde류는 hexanal과 (E)-2-hexenal이 0.525 mg/kg(7.65%), 0.437 mg/kg(6.36%)의 함량으로 나타났다.

Parliment 등(1975)은 highbush 블루베리의 주요 휘발성 향기 성분이 ethyl acetate, (E)-2-hexenal, (E)-2-hexenol, hexanal, (Z)-3-hexenol, linalool, and geraniol 등으로 구성되어 있다고 발표하였다. lowbush 블루베리에서는 acetaldehyde, methyl acetate, ethyl acetate, methyl 2-methylbutanoate, methyl 3-methylbutanoate, ethyl

2-methylbutanoate, ethyl 3-methylbutanoate, methyl butanoate and linalool의 휘발성 향기성분이 확인되어 ester류의 화합물이 highbush 블루베리보다 lowbush 블루베리에서 다양하게 구성한다고 보고하였다(Forney, 2001; Lujemwa et al., 1989). 또한 rabbiteye 블루베리의 주요 향기성분으로 (Z)-3-hexenol, (E)-2-hexenol, (E)-2-hexenal, linalool 및 geraniol이 확인되었고(Horvat, Senter & Dekazos, 1983). (E)-2-hexenal, (E)-2-hexenol, (Z)-3-hexenol, α -terpienol, and β -caryophyllene는 주로 미숙과에서 높은 함량으로 나타나고 성숙과로 숙성되면서는 미숙과에서 확인되었던 저분자량의 휘발성 향기 화합물은 감소하는 경향이 있는 반면, linalool과 geraniol과 같은 고분자량의 화합물은 증가하는 경향을 보이는 것으로 나타났다(Horvat et al., 1996).

한편, 블루베리의 향기의 식품첨가물 등의 산업적 이용을 위한 조합향료 연구에서는 (E)-2-hexenal, (E)-2-hexenol, (Z)-3-hexenol 및 linalool의 조합으로 블루베리의 green note의 고유 향기로서 발현됨을 확인함으로써 C₆의 alcohol류와 linalool이 블루베리의 특징적인 향을 결정하는 주요 화합물(character impact compounds)로 확인되었다(Parliment & Kolor, 1975; Parliment & Scarpellino, 1977).

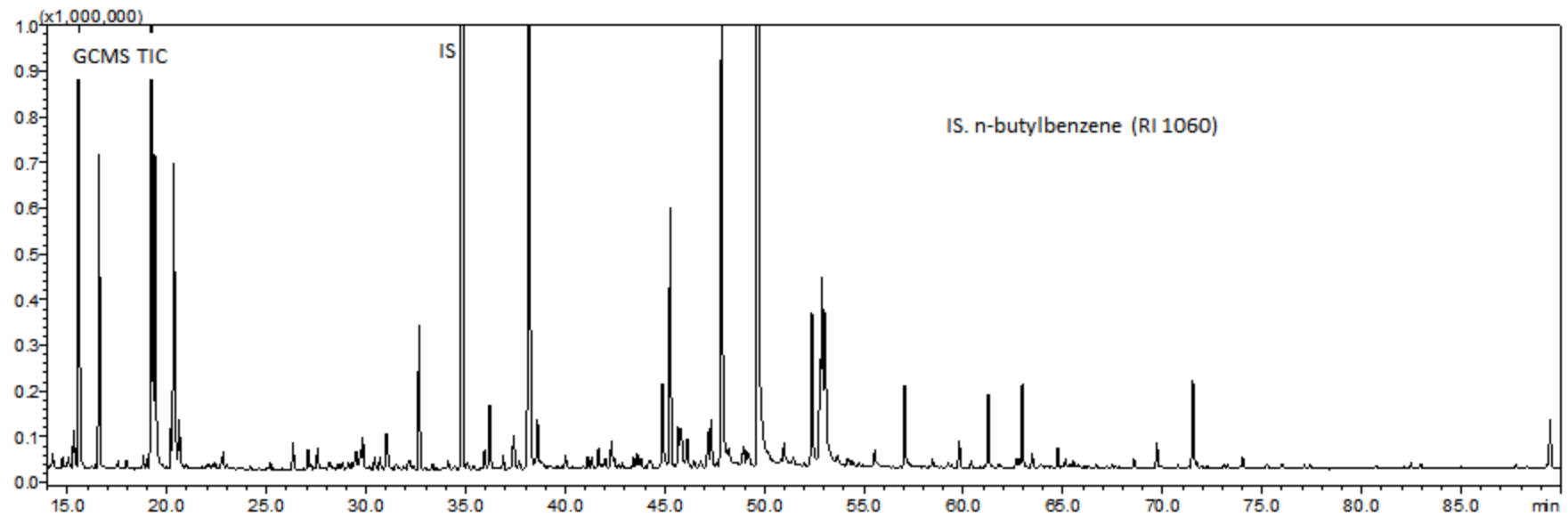


Fig. 2-12. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of blueberry

Table 2-8. Volatile flavor composition of blueberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
1	15.29	798	3-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	0.582	0.021	RI, MS
2	15.55	802	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	5.282	0.192	RI, MS
3	16.59	817	Acetal	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	5.465	0.198	RI, MS
4	19.22	854	(E)-2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	98	4.468	0.162	RI, MS
5	19.39	857	(Z)-3-Hexenol	C ₆ H ₁₂ O	100	4.619	0.168	RI, MS
6	20.19	868	(E)-2-Hexenol	C ₆ H ₁₂ O	100	0.767	0.028	RI, MS
7	20.34	870	1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	6.532	0.237	RI, MS
8	20.61	874	1-Methoxy-2-propyl acetate	C ₆ H ₁₂ O ₃	132	1.475	0.054	RI, MS
9	22.77	904	Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	114	0.103	0.004	RI, MS
10	26.31	950	3-Hexyl hydroperoxide	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	0.339	0.012	RI, MS
11	27.46	965	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	106	0.223	0.008	RI, MS
12	29.84	995	(E)-2-Ethenyltetrahydro-2-methyl-5-(1-methylethenyl)-Furan	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.208	0.008	RI, MS
13	31.03	1010	(Z)-Dehydrolinalool oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.431	0.016	RI, MS
14	32.66	1031	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	136	1.545	0.056	RI, MS
15	35.95	1074	1-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	130	0.141	0.005	RI, MS
16	36.16	1076	(Z)-Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	0.527	0.019	RI, MS
17	37.40	1092	α -Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.120	0.004	RI, MS
18	38.18	1102	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	15.956	0.579	RI, MS
19	38.53	1107	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	0.371	0.013	RI, MS
20	44.88	1192	ρ -Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	1.848	0.067	RI, MS
21	45.27	1197	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	3.093	0.112	RI, MS
22	45.83	1205	(Z)-Dihydrocarvone	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.150	0.005	RI, MS
23	46.14	1209	Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	156	0.131	0.005	RI, MS
24	47.32	1226	(E)-Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.383	0.014	RI, MS
25	47.86	1233	(Z)-Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	8.346	0.303	RI, MS
26	49.67	1259	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	29.838	1.084	RI, MS
27	52.39	1297	8-Hydroxylinalool	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	1.201	0.044	RI, MS
28	52.80	1303	ρ -Menth-1-en-9-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.321	0.012	RI, MS

Table 2-8. Continued

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
29	52.91	1305	Limonen-10-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	1.388	0.050	RI, MS
30	53.06	1307	Perilla alcohol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	1.215	0.044	RI, MS
31	57.05	1367	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	0.591	0.021	RI, MS
32	61.25	1432	(E)-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.341	0.012	RI, MS
33	62.95	1459	Dihydropseudoionone	C ₁₃ H ₂₂ O	194	1.380	0.050	RI, MS
34	71.52	1600	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.209	0.008	RI, MS
35	89.47	1935	Methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	0.410	0.015	RI, MS
Total						100	3.632	

1) Retention indices on a 60 m L. × 0.25 mm i.d. film thickness 0.25 μm column, relative to C₈-C₂₀ alkanes

2) Relative quantitation, calculated from (peak area × IS weight) / (IS peak area × sample weight). RSD 0.1 - 20% (mean 5%) (n=3)

3) Identification based on retention index and mass spectra library (FFNSC 2.0, NIST 14, Wiley 9)

Table 2-9. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds from blueberry

Functional group	Number	Conc.%
Alcohols	17	73.93
Aldehydes	7	17.02
Esters	1	0.75
Hydrocarbons	3	3.27
Ketones	2	1.49
Oxygenated compounds	5	3.55
Total	35	100.00

4. 블랙베리(Korean blackberry)의 휘발성 향기성분

우리나라의 토종 블랙베리(Bokbunja, *Rubus coreanus Miquel*)는 장미과(Rosaceae) 나무딸기속(Rubus)에 속하며, 최근 나무딸기속 품종에 대해 항산화, 항암, 항염, 통증완화 효과 등의 다양한 생리활성이 밝혀지면서(Juranic et al., 2005; Huang et al., 2011; Liu et al., 2002) 토종 블랙베리과 유사 품종인 blackberry (*Rubus fruticosus*), black raspberry(*Rubus occidentalis*), boysenberry(*Rubus ursinus*×*idaeus*) 등의 품종이 수입 유통되고 있다.

SDE법을 이용하여 블랙베리에서 추출된 휘발성 향기 성분의 GC/MS total ion chromatogram(TIC)는 Fig. 2-13와 같으며, 동정된 향기성분의 조성과 함량은 Table 2-10에 나타내었다.

블랙베리에서 분리 동정된 휘발성 향기성분은 총 42종으로, alcohol류가 17종, monoterpene가 주류인 hydrocarbon류가 9종으로 전체 향기 화합물 성분의 다수를 이루며 그외 aldehyde류가 6종, ketone류와 oxygenated 화합물이 각각 4종이 검출되었고 또한 2종의 ester류 화합물도 동정되었다. 휘발성 향기성분의 구성 비율(area%)로는 여타의 베리류와 동일하게 alcohol류 55.74%으로 가장 많은 함량을 차지하였고 검출 성분과 다르게 hydrocarbon류보다 aldehyde류가 22.01%의 두 번째로 높은 함량을 보였으며, 다음으로 hydrocarbon류가 16.97%으로 확인되었고 그 외 oxygenated 화합물, ketone류, ester류 순으로 각각 2.66%, 1.78%, 0.84%으로 확인되었다(Table 2-11).

블랙베리의 휘발성 향기성분으로는 1,1-diethoxyethane($C_6H_{14}O_2$, $118 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), α -pinene($C_{10}H_{16}$, $136 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), (E)-verbenol($C_{10}H_{16}O$, $152 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), α -terpineol($C_{10}H_{18}O$, $154 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), myrtenol($C_{10}H_{16}O$, $152 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), p-cymen-8-ol($C_{10}H_{14}O$, $150 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 등이 확인 되었으며 향기성분의 대부분을 차지한 화합물은 1,1-diethoxyethane, α -pinene, (E)-verbenol, α -terpineol으로 각각 17.65%(0.538 mg/kg), 12.44%(0.379 mg/kg), 11.22%(0.342 mg/kg), 10.40%(0.317 mg/kg)이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 1,1-Diethoxyethane은 세부적으로 acetal($R_2C(OR')_2$) 계열의 화합물로서 맥아로 만든 위스키나 백포도주(sherry)와 같은 증류주에서 주로 확인되는 향기성분으로 보고되었는데(Luis et al., 2015) 본 향기 성분은 SDE법의 증류추출법에 의해 형성된 것으로 사료된다.

Alcohol류의 휘발성 향기성분 중 2-heptanol($C_7H_{16}O$, $116 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)은 fruity와 herbaceous note으로 표현되며 terpenic alcohol류인 p-cymen-8-ol의 경우 flowery 및 fruity note로서 산업적으로 sweet floral 계열의 향을 내는데 주로 쓰이는 방향성 화합물이다. Aldehyde류에서도 furfural($C_5H_4O_2$, $96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), (E)-2-hexenal($C_6H_{10}O$, $98 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), octanal($C_8H_{16}O$, $128 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), nonanal($C_9H_{18}O$, $142 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 blackberry의 전반적인 향에 기여하는 것으로 확인되었다. 그리고 주요 ketone류 화합물로서 2-hexanone($C_6H_{12}O$, $100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)과 terpenic ketone류인 verbenone($C_{10}H_{14}O$, $150 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 및 carvone($C_{10}H_{14}O$, $150 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 검출되었고 verbenone은 α -pinene의 산화에 의해 형성되는 것으로 보고되었다(Banthorpe, Charlwood & Francis, 1972).

국내산 블랙베리(Bokbunja)의 주요 향기성분으로 Lee와 Do(2000)는 α -terpineol, linalool, 4-terpineol, p-cymen-8-ol, octanal, nonanal, methyl Palmitate을 보고하였고 Georgilopoulos 등(Georgilopoulos & Gallois, 1987)은 동아시아, 남북아메리카가 원산지인 유럽지역의 주요 재배종인 ‘Thornless Evergreen’ blackberry(*Rubus laciniata* L.)의 향기 성분으로 2-heptanol, p-cymen-8-ol, 1-hexanol, α -terpineol, myrtenol, 4-terpineol, carvone 등을 보고하였으며 본 연구결과와 일치한 것으로 확인되었다. 고온으로 가열한 블랙베리 음료의 경우 향기 조합(flavor profiling)이 크게 변화하는데 aldehyde류, lactone류 및 furan 화합물이 가열시 상당량 증가하며 블랙베리 가열 농축액의 경우 furfural, benzaldehyde, 2-heptanol 및 and (E)-linalool oxide가 주요 향기 화합물이 확인되는 것으로 나타났다(Georgilopoulos & Gallois, 1988; Georgilopoulos & Gallois, 1987).

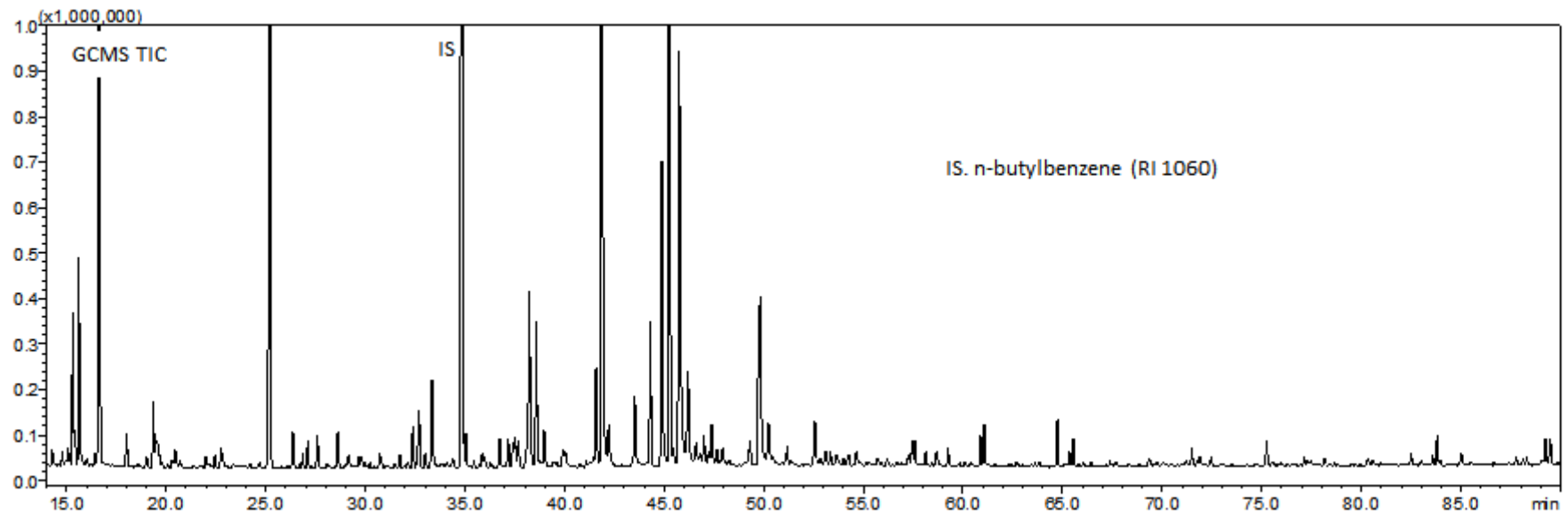


Fig. 2-13. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of Korean blackberry

Table 2-10. Volatile flavor composition of Korean blackberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
1	15.05	795	2-Hexanone	C ₆ H ₁₂ O	100	0.404	0.007	RI, MS
2	15.29	798	3-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	2.781	0.049	RI, MS
3	15.41	800	Octane	C ₈ H ₁₈	114	0.496	0.009	RI, MS
4	15.61	803	2-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	5.763	0.101	RI, MS
5	16.59	817	Acetal	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	26.095	0.456	RI, MS
6	17.93	836	Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	96	0.978	0.017	RI, MS
7	19.22	854	(E)-2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	98	0.712	0.012	RI, MS
8	22.75	904	2-Heptanol	C ₇ H ₁₆ O	116	0.552	0.010	RI, MS
9	25.18	935	α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	14.373	0.251	RI, MS
10	26.31	950	3-Hexyl hydroperoxide	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	0.567	0.010	RI, MS
11	27.06	959	2-Hexyl hydroperoxide	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	0.472	0.008	RI, MS
12	27.46	965	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	106	0.562	0.010	RI, MS
13	28.62	979	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.559	0.010	RI, MS
14	30.66	1006	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	128	0.062	0.001	RI, MS
15	32.36	1028	ρ -Cymene	C ₁₀ H ₁₄	134	0.971	0.017	RI, MS
16	32.66	1031	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.624	0.011	RI, MS
17	33.28	1039	Benzyl alcohol	C ₇ H ₈ O	108	1.778	0.031	RI, MS
18	35.03	1062	γ -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.461	0.008	RI, MS
19	36.74	1084	2-Heptyl formate	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	0.329	0.006	RI, MS
20	37.17	1089	2-Pinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.120	0.002	RI, MS
21	37.40	1092	α -Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.202	0.004	RI, MS
22	37.52	1094	ρ -Cymenene	C ₁₀ H ₁₂	132	0.337	0.006	RI, MS
23	38.18	1102	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.787	0.031	RI, MS
24	38.53	1107	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	1.285	0.022	RI, MS
25	39.94	1126	(E)-p-2,8-Menthadien-1-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.140	0.002	RI, MS
26	41.58	1148	(Z)-Verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.453	0.008	RI, MS
27	41.87	1152	(E)-Verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	4.134	0.072	RI, MS
28	43.53	1174	α -Phellandren-8-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	1.040	0.018	RI, MS

Table 2-10. Continued

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
29	44.29	1184	4-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.948	0.017	RI, MS
30	44.88	1192	<i>ρ</i> -Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	8.744	0.153	RI, MS
31	45.27	1197	<i>α</i> -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	8.531	0.149	RI, MS
32	45.76	1204	Myrtenol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	9.701	0.169	RI, MS
33	46.99	1221	Verbenone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	0.045	0.001	RI, MS
34	47.32	1226	(E)-Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.347	0.006	RI, MS
35	49.31	1254	Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	0.132	0.002	RI, MS
36	49.67	1259	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.496	0.009	RI, MS
37	50.24	1267	4-Phenyl-2-butanol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	0.591	0.010	RI, MS
38	52.57	1300	4-Protoadamantanone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	0.202	0.004	RI, MS
39	61.07	1429	3-(1-Methyl-2-phenylethoxy) -2-butanol	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	208	0.573	0.010	RI, MS
40	64.74	1487	3-(1-Ethoxyethoxy)-3,7-dimethyl -1,6-octadiene	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226	0.840	0.015	RI, MS
41	65.54	1500	Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	212	0.357	0.006	RI, MS
42	89.47	1935	Methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	0.457	0.008	RI, MS
Total						100	1.747	

1) Retention indices on a 60 m L. × 0.25 mm i.d. film thickness 0.25 μm column, relative to C₈-C₂₀ alkanes

2) Relative quantitation, calculated from (peak area × IS weight) / (IS peak area × sample weight). RSD 0.1 - 20% (mean 5%) (n=3)

3) Identification based on retention index and mass spectra library (FFNSC 2.0, NIST 14, Wiley 9)

Table 2-11. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of Korean blackberry

Functional group	Number	Conc.%
Alcohols	17	55.74
Aldehydes	6	22.01
Esters	2	0.84
Hydrocarbons	9	16.97
Ketones	4	1.78
Oxygenated compounds	4	2.66
Total	42	100.00

5. 크랜베리(Cranberry)의 휘발성 향기성분

크랜베리(cranberry)는 진달래과(*Ericaceae*) 산앵두나무속(*Accinum*)에 속하는 베리류의 일종으로서 음료, 젤리, 아이스크림, 캔디, 베이커리 등의 원료로 사용되며 골다공증을 예방하고 혈중 콜레스테롤 수치는 낮춰 심혈관질환과 같은 성인병 예방에 큰 효과(Hui, 2004)가 있을 뿐만 아니라 항암(Kim et al., 2008) 등의 다양한 효능효과가 알려지면서 국외는 물론 국내에서도 크랜베리에 대한 소비자의 관심도 크게 증가하고 있다. SDE법을 이용하여 크랜베리에서 추출된 휘발성 향기 성분의 GC/MS total ion chromatogram(TIC)는 Fig. 2-14와 같으며, 동정된 향기성분의 조성과 함량은 Table 2-12에 나타내었다.

크랜베리에서 분리 동정된 휘발성 향기성분은 총 60종으로, aldehyde류가 20여종으로 전체 향기 화합물 성분의 다수를 이루고 있으며 hydrocarbon류 11종, oxygenated 화합물 9종, alcohol류 8종, ketone류 7종, ester류 4종 및 기타로서 황 함유 화합물(sulfur-containing compound) 1종이 동정되었다. 휘발성 향기성분의 구성 비율(area%)로는 aldehyde류가 67.27%으로 가장 많은 함량을 차지하였고 oxygenated 화합물, alcohol류, hydrocarbon류, ketone류, ester류가 각각 11.52%, 7.04%, 6.39%, 4.30%, 3.23%의 순으로 확인되었다(Table 2-13). 개별 휘발성 향기성분으로는 (E,E)-2,4-decadienal($C_{10}H_{16}O$, $152 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 1.806 mg/kg 으로서 전체의 24.63%으로 가장 높은 함량을 차지하는 것으로 확인되었고, (E,E)-2,4-heptadienal($C_7H_{10}O$, $110 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), hexanal($C_6H_{12}O$, $100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), benzaldehyde(C_7H_6O , $106 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)는 각각 7.93%(0.582 mg/kg), 7.03%(0.516 mg/kg), 5.26%(0.386 mg/kg)의 함량으로 나타났다.

크랜베리의 휘발성 향기 화합물 중 benzaldehyde과 함께 benzyl alcohol 및 benzyl benzoate 등의 benzenoid 계열의 화합물이 다수 확인되었으며 이는 크랜베리의 독특한 향과 맛을 발현하는 것으로 확인되었고(Croteau & Fagerson, 1968), 크랜베리의 숙성 과정에서 benzoic acid가 benzaldehyde, benzyl alcohol, benzyl benzoate으로 전환되며 미숙과 크랜베리에는 benzenoid 계열 향기 화합물의 전구체인 benzoic acid가 0.05 - 0.1% 함유되어 있는 것으로 보고되었으며(Croteau, 1977), 본 연구에서 benzoic acid는 검출되지 않았다.

Zhu 등(2016)의 GC-olfactometry를 이용한 크랜베리의 향기 성분 분석결과에 의하면 hexanal, pentanal, (E)-2-heptenal, (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, (E)-2-nonenal, octanal 등의 aldehyde류가 품종과 무관하게 크랜베리의 고유 특징적인 향을 결정하는 주요 화합물(character impact compounds)로 보고하였으며 본 연구에서도 hexanal 외 다수의 aldehyde류가 비교적 낮은 농도 범위로 검출되어 상기 연구결과와 일치함을 확인하였다. 또한 hexanol, hexanal 및 (E)-2-hexenal 등의 C₆ 계열의 휘발성 화합물은 불포화 지방산의 효소분해 대사산물이다. 대부분의 aldehyde류의 휘발성 향기성분은 비교적 낮은 농도에서 green-like, fatty, tallow 계열의 향에 기여하지만 aldehyde류의 낮은 역가(threshold)로 인해 고농도로 존재 시 썩은 냄새 등의 불쾌한 향으로 느껴지기도 한다.

한편, 황 함유 화합물(sulfur-containing compound)로서 2-acetyl thiazole (C₅H₅NOS, 127 g · mol⁻¹)이 확인되었고 일반적으로 황 함유 아미노산의 마이알 반응(maillard reaction)에 의해 형성되며 nutty, cereal, and popcorn flavor를 갖는 것으로 보고되고 있다.

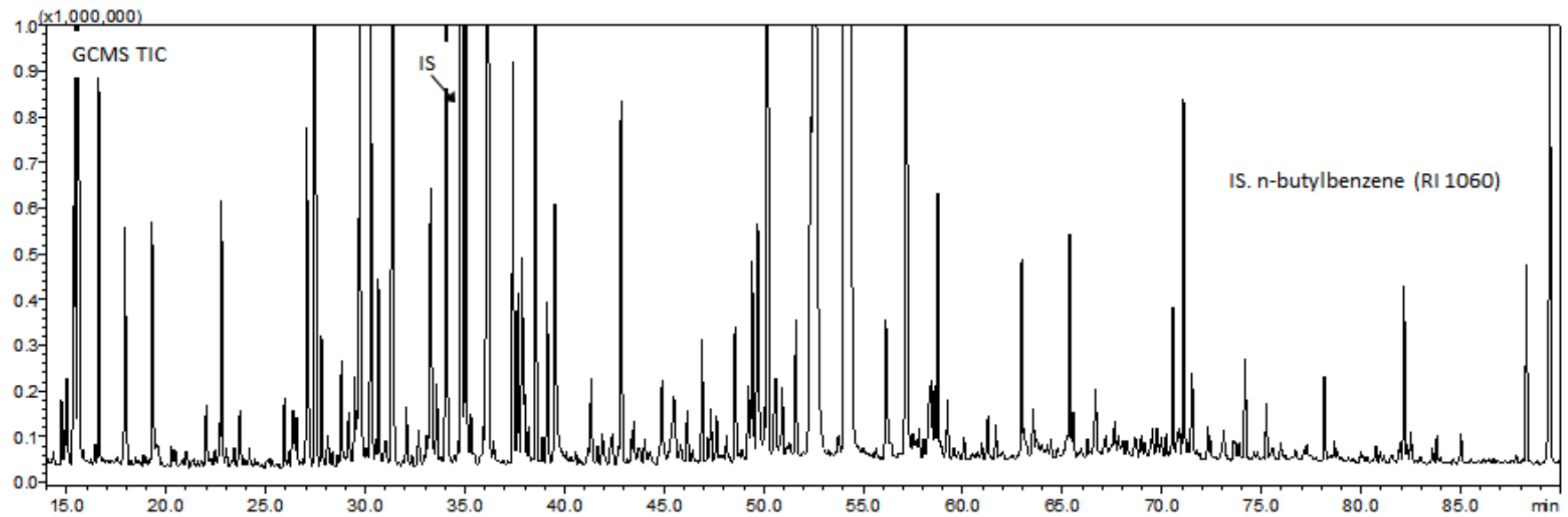


Fig. 2-14. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of cranberry

Table 2-12. Volatile flavor composition of cranberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
1	15.41	800	Octane	C ₈ H ₁₈	114	2.562	0.188	RI, MS
2	15.55	802	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	7.032	0.516	RI, MS
3	16.59	817	Acetal	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	2.020	0.148	RI, MS
4	17.93	836	Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	96	2.005	0.147	RI, MS
5	19.22	854	(E)-2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	98	0.781	0.057	RI, MS
6	22.01	894	2-Heptanone	C ₇ H ₁₄ O	114	0.370	0.027	RI, MS
7	22.77	904	Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	114	0.718	0.053	RI, MS
8	23.71	916	Methyl 2-furyl ketone	C ₆ H ₆ O ₂	110	0.484	0.035	RI, MS
9	25.94	945	(E,E)-2,4-Nonadiene	C ₉ H ₁₆	124	0.196	0.014	RI, MS
10	27.06	959	2-Hexyl hydroperoxide	C ₆ H ₁₄ O ₂	118	0.902	0.066	RI, MS
11	27.46	965	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	106	5.264	0.386	RI, MS
12	27.79	969	5-Methyl-furfural	C ₆ H ₆ O ₂	110	0.750	0.055	RI, MS
13	28.80	982	1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	128	0.561	0.041	RI, MS
14	29.17	987	Phenyl hexanoate	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	192	0.237	0.017	RI, MS
15	29.47	990	6-Methyl-5-hepten-2-one	C ₈ H ₁₄ O	126	0.295	0.022	RI, MS
16	29.72	994	2-Pentyl-furan	C ⁹ H ₁₄ O	138	4.152	0.304	RI, MS
17	30.28	1001	Unknown			3.199	0.235	
18	30.66	1006	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	128	0.300	0.022	RI, MS
19	31.34	1014	(E,E)-2,4-Heptadienal	C ₇ H ₁₀ O	110	7.934	0.582	RI, MS
20	32.07	1024	2-Acetylthiazole	C ₅ H ₅ NOS	127	0.248	0.018	RI, MS
21	33.28	1039	Benzyl alcohol	C ₇ H ₈ O	108	1.551	0.114	RI, MS
22	33.58	1043	Oct-3-en-2-one	C ₈ H ₁₄ O	126	0.418	0.031	RI, MS
23	34.05	1049	Phenyl acetaldehyde	C ₈ H ₈ O	120	4.236	0.310	RI, MS
24	35.03	1062	2-Octenal	C ₈ H ₁₄ O	126	1.710	0.125	RI, MS
25	36.16	1076	(Z)-Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	2.406	0.176	RI, MS
26	37.41	1092	(E)-Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	1.285	0.094	RI, MS
27	37.66	1095	Guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	124	0.878	0.064	RI, MS
28	37.87	1098	3,5-Octadien-2-one	C ₈ H ₁₂ O	124	1.212	0.089	RI, MS

Table 2-12. Continued

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
29	38.00	1100	(E)-3-Nonenol	C ₉ H ₁₈ O	142	0.054	0.004	RI, MS
30	38.53	1107	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	1.510	0.111	RI, MS
31	39.13	1115	3,4-Dimethylcyclohexanol	C ₈ H ₁₆ O	128	0.483	0.035	RI, MS
32	39.52	1120	Phenethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	122	2.287	0.168	RI, MS
33	41.34	1144	3-Nonen-2-one	C ₉ H ₁₆ O	140	0.440	0.032	RI, MS
34	42.84	1165	(E)-2-Nonenal	C ₉ H ₁₆ O	140	0.762	0.056	RI, MS
35	44.90	1192	1-Dodecene	C ₁₂ H ₂₄	168	0.191	0.014	RI, MS
36	46.14	1209	Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	156	0.078	0.006	RI, MS
37	46.91	1220	(E,E)-2,4-Nonadienal	C ₉ H ₁₄ O	1218	0.923	0.068	RI, MS
38	47.35	1226	Phenoxyethene	C ₈ H ₈ O	120	0.166	0.012	RI, MS
39	48.56	1243	7-Ethenyl-5-undecene	C ₁₃ H ₂₄	180	0.838	0.061	RI, MS
40	49.23	1253	2-Decyne-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.082	0.006	RI, MS
41	49.42	1255	1-Hexylcyclopentene	C ₁₁ H ₂₀	152	1.092	0.080	RI, MS
42	49.67	1259	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.437	0.105	RI, MS
43	50.19	1266	(E)-2-Decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	154	2.298	0.168	RI, MS
44	51.62	1287	1-Butenylidenecyclohexane	C ₁₀ H ₁₆	136	0.339	0.025	RI, MS
45	52.54	1300	Unknown			24.641	1.806	
46	56.14	1353	5-Pentyl-2(5H)-furanone	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.500	0.037	RI, MS
47	57.17	1369	Undec-(8Z)-enal	C ₁₁ H ₂₀ O	168	1.733	0.127	RI, MS
48	58.42	1388	Geranyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	0.327	0.024	RI, MS
49	58.74	1393	1-Tetradecene	C ₁₄ H ₂₈	196	0.440	0.032	RI, MS
50	59.24	1400	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198	0.208	0.015	RI, MS
51	61.25	1432	(E)-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.044	0.003	RI, MS
52	62.95	1459	(E)-Geranylacetone	C ₁₃ H ₂₂ O	194	0.872	0.064	RI, MS
53	65.36	1497	β -Ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	192	0.691	0.051	RI, MS
54	71.08	1593	1-Tetradecanol	C ₁₄ H ₃₀ O	214	0.592	0.043	RI, MS
55	71.51	1600	Dotriacontane	C ₃₂ H ₆₆	451	0.203	0.015	RI, MS

Table 2-12. Continued

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
56	78.16	1719	Hexadecanal	C ₁₆ H ₃₂ O	240	0.119	0.009	RI, MS
57	82.16	1794	1-Octadecene	C ₁₈ H ₃₆	252	0.280	0.021	RI, MS
58	88.30	1911	Methyl palmitoleinate	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268	0.292	0.021	RI, MS
59	89.47	1935	Methyl hexadecanoate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	2.375	0.174	RI, MS
Total						100	7.331	

- 1) Retention indices on a 60 m L. × 0.25 mm i.d. film thickness 0.25 um column, relative to C₈-C₂₀ alkanes
- 2) Relative quantitation, calculated from (peak area × IS weight) / (IS peak area × sample weight). RSD 0.1 - 20% (mean 5%) (n=3)
- 3) Identification based on retention index and mass spectra library(FNNSC 2.0, NIST 14, Wiley 9)

Table 2-13. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of cranberry

Functional group	Number	Conc.%
Alcohols	8	7.04
Aldehydes	20	67.27
Esters	4	3.23
Hydrocarbons	11	6.39
Ketones	6	4.30
Oxygenated compounds	9	11.52
Miscellaneous	1	0.25
Total	59	100.00

6. 아로니아(Aronia)의 휘발성 향기성분

아로니아(aronia)는 장미과(*Rosales*)의 아로니아속(*Aronia*)으로 choke-berry)로도 불리며, 안토시아닌이 풍부한 베리류로서 북아메리카에서는 상업적으로 중요한 과일중 하나이다(Wu, 2004). 아로니아는 항산화 활성 이외 위보호, 항염증, 면역증진 등의 효능이 있다고 연구결과가 보고되고 있다(Tanaka & Tanaka, 2001; Kokotkiewicz, Jaremicz & Luczkiewicz, 2010). 이에 따라 최근 우리나라에서도 아로니아에 대한 소비자의 관심이 증대되면서 원예 농가를 중심으로 재배 확산되고 있으며 아로니아를 식품재료나 기능성 소재로 활용하는 경우가 점차 증가하고 있다.

SDE법을 이용하여 아로니아에서 추출된 휘발성 향기 성분의 GC/MS total ion chromatogram(TIC)는 Fig. 2-15와 같으며, 동정된 향기성분의 조성과 함량은 Table 2-14에 나타내었다. 아로니아에서 분리 동정된 휘발성 향기성분은 총 28종으로, alcohol류가 10종 aldehyde류가 7종으로 전체 향기 화합물 성분의 다수를 이루고 있으며 hydrocarbon류 5종, ester류 3종, oxygenated 화합물 2종 및 ketone류 1종이 동정되었다. 휘발성 향기성분의 구성 비율(area%)은 관능기별 검출 성분 수와 상반되게 aldehyde류가 74.45%을 가장 많은 함량을 차지하였고 그 다음으로 alcohol류 8.16%, hydrocarbon류 6.41%으로 나타났다(Table 2-15).

아로니아의 개별 휘발성 향기성분으로는 benzaldehyde(C_7H_6O , $106 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)가 전체의 59.89%, 4.344 mg/kg으로 가장 많은 함량을 차지하는 것으로 나타났는데, Hirvi 등(1985)의 결과에서도 benzaldehyde가 아로니아의 개별 휘발성 향기성분으로 가장 많은 함량을 차지하는 것으로 나타났으며 다음으로 hexanal($C_6H_{12}O$, $100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 5.34%, 0.353 mg/kg의 함량을 차지하였고 (E)-2-hexenal($C_6H_{10}O$, $98 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)은 2.02%으로 0.136 mg/kg의 함량을 보였으며 그 외 aldehyde류로 phenylacetaldehyde (C_8H_8O , $120 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), nonanal($C_9H_{18}O$, $142 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 등이 검출되었다. Furfural은 sugars 또는 amino acid와 같은 nitro-containing 화합물들이 관련된 갈색화 반응(browning reaction)에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다(Ames, 1990; Belitz, Grosch & Schieberle, 2009). Alcohol류는 terpene alcohol류의 4-terpineol이 3.14%으로 0.208 mg/kg의 함량으로 나타났고 benzyl alcohol(C_7H_8O , $154 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), phenethyl alcohol($C_8H_{10}O$, $122 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 1-hexanol($C_6H_{14}O$, $102 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) 등이 검출되었으며 특히 phenylethyl alcohol은 장미향으로 표현되며 sweet floral 계열의 향

을 내는데 주로 쓰이는 방향성 화합물이다. Ester류는 methyl benzoate($C_8H_8O_2$, $136 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)와 ethyl benzoate ($C_9H_{10}O_2$, $150 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 확인되었다.

식품에 존재하는 불포화 지방산들은 lipoxygenase (LOX) pathway를 거쳐 화, 분해되어 (E)-2-hexenal, (E)-2-nonenal과 같은 aldehyde류와 (E)-2-hexenol 등의 alcohol류를 형성하는 것으로 알려져 있는데, Fracisc 등(2012)이 연구한 black chokeberry(*Aronia melanocarpa* Ell.)의 지방산 조성에 관한 결과에 따르면 linoleic acid(18:2, n-6)가 26.08 - 69.25 %으로서 블루베리보다 2배 이상 높은 함유량을 보인다는 연구결과가 이를 뒷받침하는 것으로 사료된다. 또한 HS-SPME법과 SDE법을 이용하여 아로니아의 휘발성 향기 특성을 연구한 Vilma 등(2013)은 연구결과와 비교해 볼 때 주요 향기 화합물의 조성은 비슷하나 함량은 다소 큰 차이를 보였는데, 원물에 대한 기후 조건, 영토, 물 가용성 및 기타 재배환경과 더불어 지리적 위치 뿐만 아니라 추출 용매 등의 추출조건의 차이 등 다양성에 기인 한 것으로 사료된다.

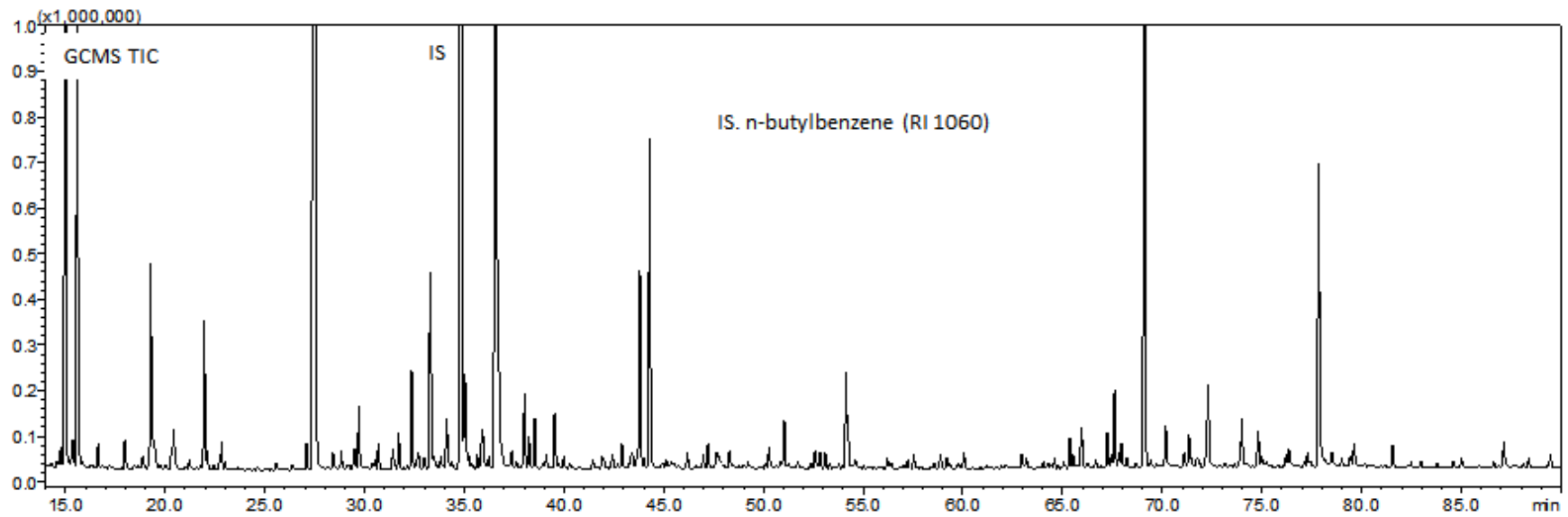


Fig. 2-15. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of aronia

Table 2-14. Volatile flavor composition of aronia by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
1	15.55	802	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	3.061	0.155	RI, MS
2	17.93	836	Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	96	0.352	0.018	RI, MS
3	19.22	854	(E)-2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	98	1.096	0.055	RI, MS
4	20.34	870	1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	0.398	0.020	RI, MS
5	27.46	965	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	106	59.067	2.983	RI, MS
6	29.72	994	2-Pentyl-furan	C ₉ H ₁₄ O	138	0.830	0.042	RI, MS
7	31.71	1019	α -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.168	0.008	RI, MS
8	32.36	1028	ρ -Cymene	C ₁₀ H ₁₄	134	1.050	0.053	RI, MS
9	33.28	1039	Benzyl alcohol	C ₇ H ₈ O	108	1.728	0.087	RI, MS
10	34.05	1049	Phenylacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	120	0.401	0.020	RI, MS
11	35.03	1062	γ -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.540	0.027	RI, MS
12	36.54	1081	Dihydro-3-methylene-5-methyl-2-furanone	C ₆ H ₈ O ₂	112	22.061	1.114	RI, MS
13	38.02	1100	Methyl benzoate	C ₈ H ₈ O ₂	136	0.743	0.038	RI, MS
14	38.24	1103	(E)-Sabinene hydrate	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.092	0.005	RI, MS
15	38.53	1107	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	0.182	0.009	RI, MS
16	39.52	1120	Phenethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	122	0.655	0.033	RI, MS
17	42.84	1165	(E)-2-Nonenal	C ₉ H ₁₆ O	140	0.038	0.002	RI, MS
18	43.80	1177	Ethyl benzoate	C ₉ H ₁₀ O ₂	150	2.496	0.126	RI, MS
19	44.29	1184	4-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	2.051	0.104	RI, MS
20	51.05	1278	2,3,6-Trimethylphenol	C ₉ H ₁₂ O	136	0.376	0.019	RI, MS
21	65.36	1497	β -Ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	192	0.060	0.003	RI, MS
22	65.96	1507	Epi-cubebol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.053	0.003	RI, MS

Table 2-14. Continued

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
23	67.25	1529	Cubebol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.049	0.002	RI, MS
24	67.61	1535	δ -Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.246	0.012	RI, MS
25	69.10	1560	(E)-Cadinene ether	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1.093	0.055	RI, MS
26	70.17	1578	β -Copaen-4- α -ol		220	0.041	0.002	RI, MS
27	73.99	1644	Epicubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.146	0.007	RI, MS
28	74.81	1659	1,10-Diepicubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.019	0.001	RI, MS
29	77.84	1713	Dehydroaromadendrene	C ₁₅ H ₂₂	202	0.910	0.046	RI, MS
Total						100	5.050	

- 1) Retention indices on a 60 m L. \times 0.25 mm i.d. film thickness 0.25 μ m column, relative to C₈-C₂₀ alkanes
- 2) Relative quantitation, calculated from (peak area \times IS weight) / (IS peak area \times sample weight). RSD 0.1 - 20% (mean 5%) (n=3)
- 3) Identification based on retention index and mass spectra library(FNNSC 2.0, NIST 14, Wiley 9)

Table 2-15. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of aronia

Functional group	Number	Conc.%
Alcohols	10	8.16
Aldehydes	8	74.45
Esters	3	3.02
Hydrocarbons	5	6.41
Ketones	1	0.32
Oxygenated compounds	2	7.63
Total	29	100.00

7. 오디(Mulberry)의 휘발성 향기성분

오디(mulberry)는 뽕나무과(Moraceae)의 뽕나무속(Morus)으로 온대에서 아열대지역에 걸쳐 널리 분포하고 있으며 한국을 비롯하여 일본 및 중국 등 동아시아를 중심으로 많이 재배되고 있다. 뽕나무 열매를 칭하며 예로부터 오디는 뽕잎과 함께 항당뇨, 항염증, 항고지혈을 위한 식용 혹은 약용 자원으로 이용되고 있고(Kim & Kwon, 1996; Kim, Park & Lee, 1988; Kim et al., 2001), 최근에는 오디의 건강 기능성에 관한 관심 및 수요 증가가 증가하고 있을 뿐만 아니라 여타의 베리류와 유사하게 음료, 젤리, 아이스크림, 유제품 등의 식품 원료로도 활용되고 있으며 특히 mulberry의 고유 색상과 향 등의 풍미와 함께 약효를 극대화하기 위해 상심주(桑椹酒)라는 전통 약용주 형태로 생산 판매되고 있다.

SDE법에 의해 오디에서 분리 동정된 휘발성 향기성분은 Fig. 2-16과 Table 2-16과 같이 총 12종이 검출되었고, 이 중 aldehyde류가 7종으로 다수를 이루고 있으며 oxygenated 화합물이 2종, 그 외 hydrocarbon류, alcohol류, ketone류가 각각 1종으로 동정되었다. 휘발성 향기성분의 전체 함량은 0.453 mg/kg으로서 앞서 살펴본 양딸기의 5종보다 상대적으로 낮은 함량을 보였으며, 구성 비율(area%)로는 aldehyde류가 75.00%으로 0.340 mg/kg을 차지하였고 oxygenated 화합물이 10.84%, 0.049 mg/kg의 함량으로 나타났다(Table 2-17). 오디의 휘발성 향기의 주성분은 hexanal($C_6H_{12}O$, $100 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), nonanal($C_9H_{18}O$, $126 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), (E)-2-hexenal($C_8H_{14}O$, $114 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), heptanal($C_7H_{14}O$, $114 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)의 fatty aldehyde류로서 각각 20.50% (0.093 mg/kg), 16.43% (0.074 mg/kg), 12.32% (0.056 mg/kg), 10.00% (0.045 mg/kg)이 함유되어 있었다. Umit 등(2011)은 mulberry 종자 내 27.5-33%의 오일이 함유되어 있고 이 중 linoleic acid($C_{18:2}$, n-6)가 지방산의 78.7%을 차지하는 것으로 보고하였다. 이는 앞서 살펴본바와 같이 지방산은 지방 산화효소인 lipoxygenases(LOX)에 의해 산화, 분해하여 특정 aldehyde류와 alcohol류를 생성하는데, 오디 종자에 함유되어 있는 linoleic acid에 의하여 aldehyde류의 휘발성 향기 화합물이 형성되는 것으로 사료되며 alcohol류로는 단일 성분으로 3-hexanol($C_6H_{14}O$, $102 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)이 3.99%(0.018 mg/kg)으로 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

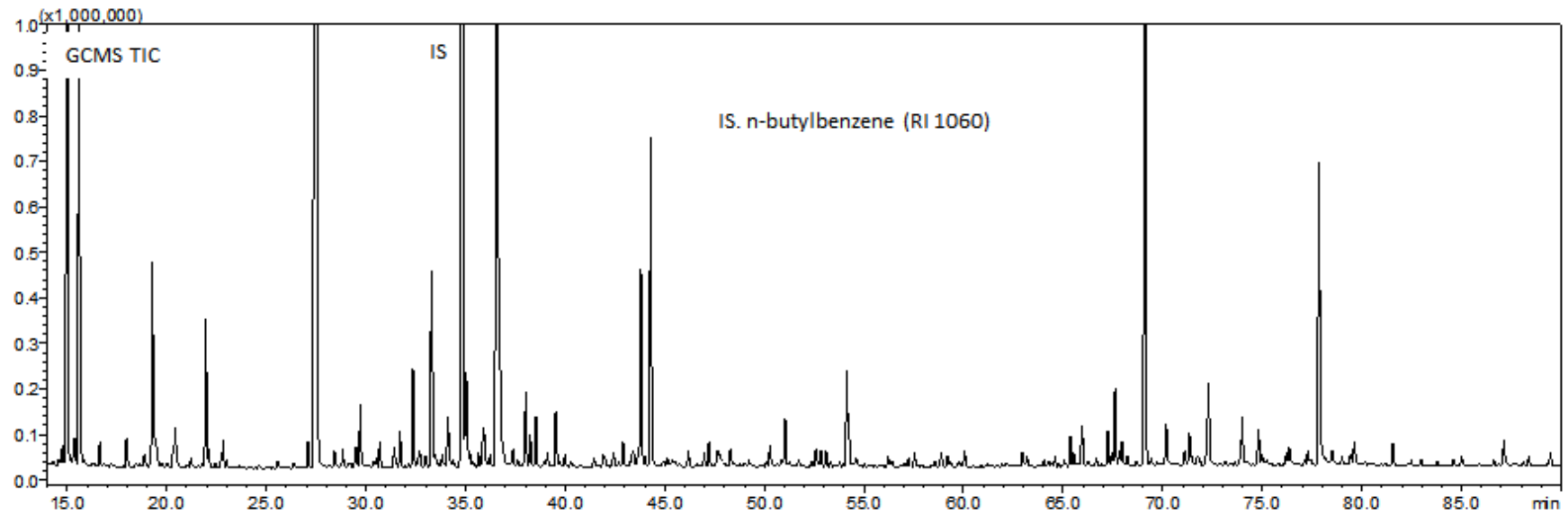


Fig. 2-16. GC/MS total ion chromatogram of volatile flavor of mulberry

Table 2-16. Volatile flavor composition of mulberry by using simultaneous steam distillation and extraction(SDE)

NO	R.T. (min)	RI	Compound	M.W.	M.F. (g·mol ⁻¹)	Total%	Content (mg/kg)	ID
1	15.05	795	2-Hexanone	C ₆ H ₁₂ O	100	7.500	0.017	RI, MS
2	15.29	798	3-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	102	7.048	0.016	RI, MS
3	15.41	800	Octane	C ₈ H ₁₈	114	8.052	0.018	RI, MS
4	15.55	802	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	100	14.045	0.032	RI, MS
5	19.22	854	(E)-2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	98	9.278	0.021	RI, MS
6	20.59	874	1-Butoxy-1-ethoxyethane	C ₈ H ₁₈ O ₂	146	6.360	0.015	RI, MS
7	22.77	904	Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	114	6.766	0.015	RI, MS
8	29.72	994	2-Pentyl-furan	C ₉ H ₁₄ O	138	14.741	0.034	RI, MS
9	34.05	1049	Phenylacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	120	14.358	0.033	RI, MS
10	38.53	1107	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	10.236	0.023	RI, MS
11	42.84	1165	(E)-2-Nonenal	C ₉ H ₁₆ O	140	0.870	0.002	RI, MS
12	78.16	1719	Pentadecanal	C ₁₅ H ₃₀ O	226	0.746	0.002	RI, MS
Total						100.00	0.453	

1) Retention indices on a 60 m L. × 0.25 mm i.d. film thickness 0.25 um column, relative to C₈-C₂₀ alkanes

2) Relative quantitation, calculated from (peak area × IS weight) / (IS peak area × sample weight). RSD 0.1 - 20% (mean 5%) (n=3)

3) Identification based on retention index and mass spectra libray(FNNSC 2.0, NIST 14, Wiley 9)

Table 2-17. Relative contents of functional groups in volatile flavor compounds of mulberry

Functional group	Number	Conc.%
Alcohols	1	3.99
Aldehydes	7	75.00
Hydrocarbons	1	6.34
Ketones	1	3.83
Oxygenated compounds	2	10.84
Total	12	100.00

제 4 장 요약

본 연구에서는 국내에서 생산, 유통되고 있는 주요 베리류를 대상으로 식품향료 소재로서의 산업적 활용을 도모하고 천연향료(natural flavor)와 인공합성향료(artificial flavor)의 이화학적 판별을 위한 광학이성질체 향기성분의 선정을 위해 양딸기 등 7종의 베리류에 대한 휘발성 향기성분을 분석하였다.

베리류의 휘발성 향기성분의 추출은 SPME와 SDE법 이용하였고 특히 SPME를 이용한 향기성분 추출은 DVB/CAR/PDMS absorption fiber가 가장 효율이 우수하였고 NaCl 첨가가 시료내 베리류의 향기성분의 분배계수를 증가시켜 향기성분 추출에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타나 염석효과(salting out)가 효과적인 것을 확인하였다.

베리류 7종의 향기성분은 SDE으로 추출하고 GC/MS으로 분석한 결과 양딸기에서 총 53종을 분리 동정하였고 주요 향기성분으로 hexanal, linalool, (E)-nerolidol, γ -dodecalactone, mesifuran 등으로 확인되었고 alcohol류, aldehyde류 및 ketone류가 주류를 이루는 것으로 나타났다. 라즈베리에서는 총 25종의 향기성분이 검출되었고 1-hexanol, linalool, α -terpineol, γ -decalactone, γ -dodecalactone 등이 주류로 구성되었다. 블루베리의 향기성분은 총 35종으로 hexanal, (Z)-3-hexenol, 1-hexanol, linalool, α -terpineol, geraniol 등의 alcohol류가 73.93%으로 주류를 이루는 것으로 나타났다. 블랙베리는 총 42종의 향기성분이 동정되었으며 주요 향기성분은 α -pinene, linalool, (E)-verbenol, myrtenol의 terpene alcohol류가 주류로 확인되었다. 크랜베리의 향기성분은 총 59종으로서 hexanal, benzaldehyde, (E,E)-2,4- heptadienal, phenyl acetaldehyde, (E)-2-decenal 등의 aldehyde류가 67.27%으로 확인되었으며 대부분의 aldehyde류의 휘발성 향기성분은 비교적 낮은 농도에서 green-like, fatty, tallow 계열의 향에 기여하는 것으로 cranberry의 향기 특성을 나타내는 것으로 판단되었다. 아로니아는 총 29종의 휘발성 향기성분이 동정되었고 benzaldehyde가 단일 성분으로서 전체 함량의 59.07%의 높은 함량으로 확인되었다. 오디는 본 연구의 베리류 중 가장 적은 12종의 향기 성분이 동정되었고 2-hexanone, 3-hexanol, hexanal phenylacetaldehyde, nonanal 등의 alcohol류와 aldehyde류가 주류를 이루는 것으로 나타났다.

결론적으로 SDE법과 GC/MS를 이용하여 베리류 7종의 주요 휘발성 향기성분의 구성과 함량 비율을 확인하였으며 베리류의 천연향료 진위 판별을 위한 광학이성질체 향기성분을 선정에 필요한 기초자료를 확보하였다.

참고문헌

- Ames, J. M. (1990). Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 150-154.
- Aprèa, E., Biasioli, F., & Gasperi, F. (2015). Volatile compounds of raspberry fruit: From analytical methods to biological role and sensory impact. *Molecules*, 20(2), 2445-2474.
- Arthur, C. L., Killam, L. M., Buchholz, K. D., Pawliszyn, J., & Berg, J. R. (1992). Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 64(17), 1960-1966.
- Banthorpe, D. V., Charlwood, B. V., & Francis, M. J. O. (1972). Biosynthesis of monoterpenes. *Chemical reviews*, 72(2), 115-155.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Aroma compounds*. In *Food Chemistry*, 4th ed.; Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 2009; pp 340-402.
- Bouwmeester, H. J., Verstappen, F. W., Posthumus, M. A., & Dicke, M. (1999). Spider mite-induced (3S)-(E)-nerolidol synthase activity in cucumber and lima bean. The first dedicated step in acyclic C11-homoterpene biosynthesis. *Plant physiology*, 121(1), 173-180.
- CROTEAU, R. (1978). Biosynthesis of benzaldehyde, benzyl alcohol and benzyl benzoate from benzoic acid in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of Food Biochemistry*, 1(4), 317-326.
- Dirinck, P. J., De Pooter, H. L., Willaert, G. A., & Schamp, N. M. (1981). Flavor quality of cultivated strawberries: the role of the sulfur compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(2), 316-164
- Dulf, F. V., Andrei, S., Bunea, A., & Socaciu, C. (2012). Fatty acid and phytosterol contents of some Romanian wild and cultivated berry pomaces.

Chemical Papers, 66(10), 925-934.

Forney, C. F. (2001). Horticultural and other factors affecting aroma volatile composition of small fruit. *HortTechnology*, 11(4), 529-538.

Georgilopoulos, D. N., & Gallois, A. N. (1987). Aroma compounds of fresh blackberries (*Rubus laciniata* L.) Über die Aromastoffzusammensetzung von Brombeeren (*Rubus laciniata* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 184(5), 374-380.

Gecgel, U., Velioglu, S. D., & Velioglu, H. M. (2011). Investigating some physicochemical properties and fatty acid composition of native black mulberry (*Morus nigra* L.) seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(8), 1179-1187.

Georgilopoulos, D. N., & Gallois, A. N. (1988). Flavour compounds of a commercial concentrated blackberry juice. *Food chemistry*, 28(2), 141-148.

Georgilopoulos, D. N., & Gallois, A. N. (1987). Volatile flavour compounds in heated blackberry juices Über flüchtige Aromastoffe in erhitzten Brombeersäften. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 185(4), 299-306.

Guichard, E. (1984). Comparison of two N₂ entrainment methods for the extraction of volatile compounds from raspberry. *Sciences des Aliments (France)*. 4(2), 317 - 324.

Hada, T., Shiraishi, A., Furuse, S., Inoue, Y., Hamashima, H., Matsumoto, Y., ... & Shimada, J. (2003). Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Natural medicines = 生藥學雜誌*, 57(2), 64-67.

Hatanaka, A. (1993). The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, 34(5), 1201-1218.

Hatanaka, A., Kajiwara, T., & Sekiya, J. (1987). Biosynthetic pathway for C₆-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44(2-4), 341-361.

Hirvi, T., & Honkanen, E. (1985). Analysis of the volatile constituents of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Ell.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9), 808-810.

Ho, C. T., Sheen, L. Y., Wu, P., Kuo, M. C., Hartman, T. G., & Rosen, R. T. (1990). Glycosidically bound aroma compounds in pineapple and peach. *Flavour science and technology*, 77-80.

Honkanen, E.; Hirvi, T. The flavor of berries. *Dev. Food Sci.* 1990, 3C, 125 - 193, *Food Flavours*, Pt. C.

Honkanen, E., Pyysalo, T., & Hirvi, T. (1980). The aroma of finnish wild raspberries, *Rubus idaeus*, L. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 171(3), 180-182.

Horvat, R. J., Schlotzhauer, W. S., Chortyk, O. T., Nottingham, S. F., & Payne, J. A. (1996). Comparison of volatile compounds from rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) and deerberry (*V. stamineum*) during maturation. *Journal of Essential Oil Research*, 8(6), 645-648.

Horvat, R. J., Senter, S. D., & Dekazos, E. D. (1983). GLC MS Analysis of Volatile Constituents in Rabbiteye Blueberries. *Journal of Food Science*, 48(1), 278-279.

Huang, H. P., Chang, Y. C., Wu, C. H., Hung, C. N., & Wang, C. J. (2011). Anthocyanin-rich Mulberry extract inhibit the gastric cancer cell growth in vitro and xenograft mice by inducing signals of p38/p53 and c-jun. *Food Chemistry*, 129(4), 1703-1709.

Hui, J., Choy, J., Suwandarantne, S. P., Shervill, J., Gan, B. S., Howard, J. C., & Reid, G. (2004). Antimicrobial activity of *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) produced proanthocyanidin (PAC) on the growth and adhesion properties of *Staphylococcus aureus*. *Preventive Nutrition and Food Science*, 9(1), 29-33.

Jeong, H. R., Jo, Y. N., Jeong, J. H., Kim, H. J., & Heo, H. J. (2012).

Nutritional composition and in vitro antioxidant activities of blueberry (*Vaccinium ashei*) leaf. *Korean Journal of Food Preservation*, 19(4), 604-610.

Jinno, K. (Ed.). (1992). *Hyphenated techniques in supercritical fluid chromatography and extraction* (Vol. 53). Elsevier. p, 275-304

Juranic, Z., Zizak, Z., Tasic, S., Petrovic, S., Nidzovic, S., Lepasovic, A., & Stanojkovic, T. (2005). Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars. *Food Chemistry*, 93(1), 39-45.

Kim, H. B., Kim, S. Y., Ryu, K. S., Lee, W. C., & Moon, J. Y. (2001). Effect of methanol extract from mulberry fruit on the lipid metabolism and liver function in cholesterol-induced hyperlipidemia rats. *Korean J Seric Sci*, 43(2), 104-108.

Kim, M. J., Jung, H. N., Kim, K. N., & Kwak, H. K. (2008). Effects of cranberry powder on serum lipid profiles and biomarkers of oxidative stress in rats fed an atherogenic diet. *Nutrition Research and Practice*, 2(3), 158-164.

Kim, S. Y., Park, K. J., & Lee, W. C. (1998). Antiinflammatory and antioxidative effects of *Morus* spp. fruit extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 6(3), 204-209.

Kim, T. W., Kwon, Y. B., Lee, J. H., Yang, I. S., Youm, J. K., Lee, H. S., & Moon, J. Y. (1996). A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean Journal of Sericultural Science*.

Kokotkiewicz, A., Jaremicz, Z., & Luczkiewicz, M. (2010). *Aronia* plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *Journal of medicinal food*, 13(2), 255-269.

Kovats, E. (1958). Characterization of organic compounds by gas chromatography. Part 1. Retention indices of aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones. *Helv. Chim. Acta*, 41(7), 1915-1932.

Kovats, E. S. (1965). Gas chromatographic characterization of organic

substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr.*, 1, 229.

Kraujalytė, V., Leitner, E., & Venskutonis, P. R. (2013). Characterization of *Aronia melanocarpa* volatiles by headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME), simultaneous distillation/extraction (SDE), and gas chromatography-olfactometry (GC-O) methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(20), 4728-4736.

Kubo, I., & Morimitsu, Y. (1995). Cytotoxicity of green tea flavor compounds against two solid tumor cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(6), 1626-1628.

Kudlejova, L., S. Risticovic, and D. Vuckovic (2012). Solid-phase microextraction method development, 201 - 249 in J. Pawliszyn, ed., *Handbook of solid phase microextraction*. Elsevier, Waterloo, ON.

Lang, Q., & Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782.

Lee, J. G., Jang, H. J., Kwag, J. J., & Lee, D. W. (2000). Comparison of the volatile components of Korean ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by different extraction methods. *Korean J. Food Nutr*, 13, 66-70.

Lee, J. W., Do, J. H. (2000). Chemical compounds and volatile flavor of *Rubis coreanum*, *Kor. J Food & Nutr*, 13(5), 453-459.

Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 2926-2930.

Lugemwa, F. N., Lwande, W., Bentley, M. D., Mendel, M. J., & Alford, A. R. (1989). Volatiles of wild blueberry, *Vaccinium angustifolium*: possible attractants for the blueberry maggot fruit fly, *Rhagoletis mendax*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 37(1), 232-233.

Maarse, H. (2017). *Volatile compounds in foods and beverages*. Routledge.

Malowicki, S. M., Martin, R., & Qian, M. C. (2008). Volatile composition in raspberry cultivars grown in the Pacific Northwest determined by stir bar sorptive extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(11), 4128–4133.

Nickerson, G. B., & Likens, S. T. (1966). Gas chromatography evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *Journal of Chromatography A*, 21, 1–5.

Nigmatov, A. G., & Yanovskaya, L. A. (1987). Improved method for the isolation of geranyl esters of (4E/Z, 8E)-and (4E/Z, 8Z)-farnesylacetic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 21(7), 529–533.

PARLIMENT, T. H., & Kolor, M. G. (1975). Identification of the major volatile components of blueberry. *Journal of Food Science*, 40(4), 762–763.

Parliment, T. H., & Scarpellino, R. (1977). Organoleptic techniques in chromatographic food flavor analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(1), 97–99.

Pyysalo, T., Suihko, M., & Honkanen, E. (1977). Odour thresholds of the major volatiles identified in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) and arctic bramble (*Rubus arcticus* L.). *LWT Lebensmittel Wissensch Technol.*

Adams, R. P. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed.

Roscher, R., Schreier, P., & Schwab, W. (1997). Metabolism of 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2 H)-furanone in detached ripening strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3202–3205.

Sadtler Research Laboratories. (1986). The Sadtler standard gas chromatography retention index library (Vol. 4). Sadtler Research Laboratories.

Sanz, C., Richardson, D. G., & Pérez, A. G. (1995). 2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-3 (2 H)-furanone and derivatives in strawberries during ripening. P 268–275.

Schreier, P. (1980). Quantitative composition of volatile constituents in

cultivated strawberries, *Fragaria ananassa* cv. Senga Sengana, Senga Litessa and Senga Gourmella. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(5), 487-494.

Schultz, T. H., Flath, R. A., Mon, T. R., Eggling, S. B., & Teranishi, R. (1977). Isolation of volatile components from a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(3), 446-449.

Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(25), 9329-9339.

Song, J. S., Ryu, S. N., Kim, K. S., Bang, J. K., Lee, B. H., & Chae, Y. A. (1999). Analytical technique and agricultural application of essential oil in plant. *The Journal of The Korean Society of International Agriculture*.

Stenhagen, E., Abrahamsson, S., & McLafferty, F. W. (1974). Registry of mass spectral data.

Chang, S. W. (2007). The optimal analytical method of NDMA (n-nitrodimethylamine) by solid-phase microextraction analysis(SPME), *J. Kor. Soc. Envir. anal.* 10(1), 1-7

Tanaka, T., & Tanaka, A. (2001). Chemical components and characteristics of black chokeberry. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*.

Vinholes, J., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M. A., & Rocha, S. M. (2014). Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. *Food chemistry*, 156, 204-211.

Westwood, M. N. (1988). *Temperate-zone pomology* (No. Ed. 2). Timber press

Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., & McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food*

chemistry, 52(26), 7846–7856.

Youn, K. S., Hong, J. H., & Choi, Y. H. (2006). Characteristics of *Elsholtzia splendens* extracts on simultaneous steam distillation extraction conditions. *Korean Journal of Food Preservation*, 13(5), 623–628.

Zabetakis, I., Gramshaw, J. W., & Robinson, D. S. (1999). 2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis – a review. *Food chemistry*, 65(2), 139–151.

Zea, L., Serratos, M. P., Mérida, J., & Moyano, L. (2015). Acetaldehyde as key compound for the authenticity of sherry wines: a study covering 5 decades. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 681–693.

Zhu, J., Chen, F., Wang, L., Niu, Y., Chen, H., Wang, H., & Xiao, Z. (2016). Characterization of the Key Aroma Volatile Compounds in Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon* Ait.) Using Gas Chromatography - Olfactometry (GC-O) and odor activity value (OAV). *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(24), 4990–4999.

백형의, 정시섭, 김용수. 식품첨가물 관리체계 개선 연구, 식품의약품안전처, 2006.

Part III

배리류의 키랄성 향기성분의 ee-value에 관한 연구

A Study on the Enantiomeric Excess
of Chiral Flavor Compounds of Berry Species

제 1 장 서 론

천연 향료는 다른 주요 성분에 비하여 미량의 식품의 색이나 조직감과 더불어 제품의 품질을 평가하고, 식품에 대한 기호나 소비자의 선택을 좌우할 수 있는 결정적 요인을 부여하고 있고, 현재 가공식품 80% 이상이 제조시 향료를 첨가하거나 강화하고 있는 추세이다(Birch & Lindley, 1986; Memory, 1968). 전세계적으로 건강에 대한 관심이 고조되면서 향료산업에 대해 보다 다양하고 건강 지향성을 강조하는 수요가 증가하고 있는 추세로서 인위적 조작의 의해 제조된 인공향이나 인공합성향에 대한 안전성 문제가 제기됨에 따라 EU 연합 등 선진각국에서 몇몇 인공향과 인공합성향의 식품첨가에 대해 엄격한 규제로서 제한하고 있다. 따라서 최근 사회적 요구에 따라 천연향의 수요가 급격히 증가고 세계 각국에서 천연향의 소재개발 뿐만 아니라 천연향의 생산 및 생합성에 대한 연구(Williams, Sefton & Wilson, 1989)가 매우 활발히 진행되고 있으며(Trell, 1990), 국내에서도 천연향에 대한 부가가치에 대해 인식하고 이에 대한 연구가 활발하게 추진되고 있다.

최근 안전성 선호와 함께 천연향료에 대한 관심이 고조되면서 천연향 사용을 선호하는 경향이 나타나고 있으나 천연향료의 안정성에 대한 기준 및 법규 적용 등에 차이를 보이고 있다. 향료산업은 고부가가치, 기술집약적 산업으로서 식품을 비롯한 향장분야에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있으며, 향료산업의 발달을 위해서는 숙련된 조향사와 배합 balance에 대한 know-how가 요구되며, 배합 기술에 의한 balance의 차이는 향에 매우 예민한 영향을 미치는 특징이 있다. 세계 시장규모는 약 95억-100억 달러 정도이고 국내시장은 연간 약 2,000억 원 규모로 매년 증가하고 있다. 국내시장에서 향료의 수입규모는 전체의 약 90%를 차지하며 거의 모든 향료가 완제품의 형태로 수입되는 등 외국기술에 전적으로 의존하고 있다. 특히 천연향료의 경우 천연 자원이 부족한 것도 큰 원인이지만 관련 노하우를 전혀 확보하지 못하여 수입에 의존하고 있는 실정이기 때문에 향료소재 개발을 위한 지속적인 노력과 대응책을 강구할 필요성이 있다.

식품제조나 향장품에 사용되는 향료는 자연에 존재하지 않는 구조를 가진 화합물의 인공향료(artificial flavor), 자연에 존재하는 화합물을 인공적으로 합성한 인공 합성향(natural identified flavor), 그리고 자연에서 직접 추출한 천연향(natural flavor)

등으로 분류하여 산업적으로 이용되고 있다.

한편 이성질체(isomer)는 공간상에서 위치가 서로 다른 화합물에 대한 일반적인 명칭이며, 구조이성질체(constitutional isomer)와 입체이성질체(stereoisomer)로 구분되고, 입체이성질체 일종인 거울상 이성질체(enantiomer)는 편광면을 다른 방향으로 회전시켜 분자 비대칭성(chirality)을 갖는 특징을 보이는데 이러한 특징으로 어떤 분자가 그 거울상과 겹칠 수 없는 화합물 즉, 서로 한쌍의 거울상 이성질체로 존재하는 화합물을 키랄성 화합물(chiral compound)라고 하는데, 이들 거울상 이성질체는 서로 겹쳐지지 않는 거울상이지만 비점, 밀도 및 반응속도와 같은 물리·화학적 특성이 유사하다. 그러나 거울상 이성질체는 서로 다른 약물동태학적 특성과 약리효과 또는 독성을 나타낼 수 있어 선진국의 많은 제약 관련 업체들은 오래 전부터 라세미체와 키랄성 화합물간의 임상적인 효능 및 독성의 차이에 관련된 연구, 순수한 거울상 이성질체의 합성 및 분리 등에 관한 연구에 많은 노력을 기울이고 있고, FDA 등 각국의 규제당국의 정책으로 키랄성 화합물이 약물인 경우 입체이성질체의 구성이 밝혀야 하는 것으로 규제, 관리하고 있다.

화학적 합성 등을 통한 인공향의 휘발성 키랄 화합물은 거울상 형태가 동일한 양, 즉 50:50으로 존재하게 되며, 이를 라세미 혼합물(racemic mixture)이라고 한다. 반면, 천연의 휘발성 키랄 화합물은 향 생성의 메커니즘에 관여하는 효소들의 입체특이성 반응에 의해 생성되기 때문에 대부분의 경우 단일 거울상 이성질체만이 존재하거나 각각의 거울상 이성질체들이 특징적인 비율(ee-value)로 혼합되어 존재한다(Werkhoff, 1991; Werkhoff, Bretschneider & Brennecks, 1991)(Fig. 3-1). 이러한 이유로 합성에 의한 인공향은 자연의 천연향과 매우 다른 관능적 차이를 나타내게 된다. 따라서 천연 소재로부터 광학적으로 순수한 chiral성 화합물의 분리와 수득은 고부가가치 천연향(bioflavor)으로써 새롭게 인식되고 있다.

동물과 인간이 인지하는 향기성분이나 곤충등의 pheromon등에서 거울상 이성질체 화합물들(enantiomer)은 서로 다른 구조에 따라 향기가 판이하게 다르고(Hong & Harlander, 1989; Bernreuther, Christoph & Schreier, 1989) 특히 곤충의 경우 식물에서 발현하는 향기 성분 중 특정 이성질체에만 감응 할 수 있고(Ohloff, 1990) 이에 대한 antipode에는 전혀 반응하지 않는 특성을 가지고 있다.

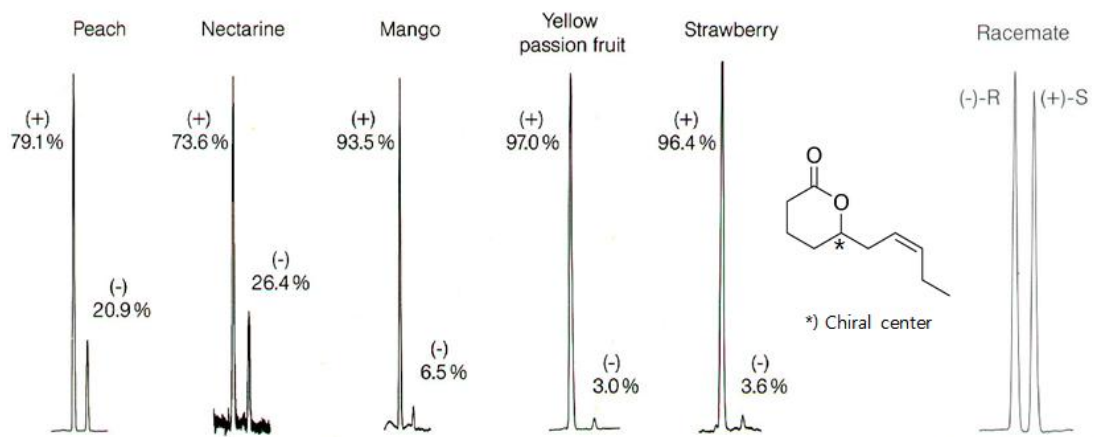


Fig 3-1. Enantiomeric ratio of chiral volatile flavor compound (γ-jasmine lactone) in fruits and artificial product

일반적으로 식물체 내에 존재하는 거울상 이성질체 화합물은 품종을 구별할 수 있게 하거나 고유 특성 및 약리학적 활성을 결정 짓는 중요한 변수로 작용하며 특히, 키랄성 향기 화합물(chiral volatile compound)은 향 생성의 mechanism에 관여하는 효소들의 입체 특이성 반응으로 생성되기 때문에 대부분의 경우 한 형태의 enantiomer만이 존재하거나 일부 각각의 거울상 이성질체들이 혼합된 채로 존재할 수 있으나 그들의 혼합비(ee-value)가 일정하게 구성(Werkhoff, 1991)되어 있어 인공합성향과는 관능적으로 매우 상이하므로 천연의 휘발성 향기성분에 대한 이성질체의 키랄성 판별은 대단히 중요한 항목이다. 인공합성향은 화학적 합성과정에서 발생하는 부산물이나, 특히 자연에 존재하지 않는 이성질체(stereoisomer)의 생성으로 인하여 안전성 문제가 야기되어 미국 등 주요 국가에서는 인공합성향의 식품첨가에 대해 엄격히 제한하고 있는 실정으로(Auslaendische Lebensmittelrecht Behr's Verlag, 1993), 식품 산업적으로 중요한 향료의 천연향(natural flavor)과 인공합성향(artificial flavor)의 구별 방법이 요구되고 있다. 천연향과 인공합성향의 구별 가능성을 제공하는 방법은 stereochemistry 분야의 키랄성 유기화합물에 대한 enantiomeric excess(ee-value) 판별로서 가능하고 일반적으로 입체이성질체들은 상이한 물리적 성질 뿐만 아니라 서로 다른 생물학적 특성 보이며 종종 두 가지의 enantiomer 중의 하나만이 자연에서 발견된다. 또한 향료 특성을 보이는 휘발성 키랄 화합물은 광학이성질체 간에 상이한 향과 맛의 특성을 가지고 있을 뿐 아니라 거울상 형태에 따라 생물학적으로 독성 또는 생리활성을 보이기도 한다. 이러한 이유로 우리나라를 비롯한 주요 국가에서는 키랄 의약품으로 별도 구별하여 규제·관리하고 있으며, 또한 미국을 포함한 선진 각국에서는 식품첨가물 형태의 합성 향료에 대해서도 엄격한 규제와 사용제한을 하고 있다.

Ionone류나 lactone류의 향기역가(aroma thresshold)가 높고 경제적 가치가 우수한 향기 화합물들은 박테리아, 곰팡이 등의 미생물을 이용한 생물공학적인 방법이나 세포 조직배양 등의 방법으로 천연향(bioflavor)의 대량 생산을 위한 연구가 활발히 추진되고 있고 또한 고부가가치 키랄성 향기 성분에 대한 연구도 추진되고 있다.

휘발성 향기성분의 키랄성을 분석을 위한 방법으로 cyclodextrin류의 chiro-specific capillary column(Tressl & Engel, 1984)을 고정상으로 하는 기체크로마토그래피(gas chromatography)가 고안되었으나 수 십종의 향기 화합물로 구성된 향료 화합물에서 단일 향기 화합물의 키랄성을 판단하는 것은 용이 하지 않았다. 이에 Deans(1968)의

gas chromatography의 heat-cutting의 의한 column switching 기술(Deans, 1968)을 기반한 multi-dimensional gas chromatography(MD-GC) 시스템이 상용화된 이후 휘발성 향기성분에 대한 거울상 이성질체의 분리 분석이 간편해짐에 따라 식품 등에 함유된 인공합성 첨가 여부 판별이 가능하게 되어 천연향의 키랄성을 평가하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

국내의 휘발성 향기에 관한 연구는 천연 향기성분의 조성이나 전자코를 이용한 가공식품의 기호적 품질평가 또는 미생물 발효 등을 이용한 천연향 생산에 관한 연구 등이 대부분으로 아직 키랄성 향기성분의 대한 연구 보고가 미약하다.

본 연구에서는 국내에서 주로 생산 및 유통되고 있는 베리류로서 양딸기, 블루베리, 블랙베리, 크랜베리, 아로니아에 함유된 키랄성 향기성분의 enantiomeric excess (ee%)를 평가하고자 하였다. 베리류는 저장성이 취약하여 대부분 냉동 또는 착즙이나 농축물 형태의 가공식품 형태로 유통되고 있고 또한 제품의 상품성 향상을 위해 착향료로서 인공 베리향을 첨가하기도 한다. 이에 본 연구에서는 베리류 유래 휘발성 향기성분의 특성을 분석하고, 주요 키랄성 향기 성분의 이성질체 조성비를 분석하여 베리류를 원료로 하는 가공식품 내 천연향 또는 인공향의 진위여부를 판별할 수 있는 기초자료를 제공하고자 하였다. 또한 이 결과를 토대로 베리류 및 베리류 가공품의 품종간의 판별과 원산지 구별을 위한 기초연구에 활용되고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 실험재료 및 기기

1. 시료

키랄성 향기성분의 이성질체 조성비 분석을 위하여 각 베리류로부터 pentane/diethylether(1:1, v/v)를 추출용매로 하여 SDE(simultaneous steam distillation and extraction)방법으로 추출하고 vigreux column으로 농축한 휘발성 향기성분 농축물을 MDGC-MS 분석용 시료로 사용하였다.

2. 시약

본 연구에 사용한 모든 시약은 특급시약으로 Sigma사(St. Louis, MO, USA)와 Fisher Scientific(USA)사로부터 구입하였으며, enantiomer의 분리를 위한 각 향기성분의 표준물질은 Sigma사와 Fluka사(Switzerland)에서 구입하였다. 추출 및 chromatography에 사용한 유기용매는 HPLC grade로 구입하여, 이를 다시 wire spiral packed double distilling(Normschliff Geratebau, Germany) 장치로 재증류한 것을 사용하였다.

3. 분석기기

휘발성 키랄 화합물은 사이클로덱스트린으로 유도된 모세관 컬럼(derivatized cyclodextrin capillary GC column)을 이용한 키랄 크로마토그래피(chiral chromatography)로 분리·분석이 가능한데, 천연향이든 인공향은 매우 다양한 휘발성 화합물들의 조합으로 구성되어 있어 single chiral chromatography로는 분리, 분석에 다소 한계가 있는데, 최근 Gas chromatography의 heat-cutting의 의한 column switching 기술을 기반한 multidimensional gas chromatography(MDGC) 시스템이 개발, 상용화된 이후 휘발성 향기성분에 대한 거울상 이성질체의 분리 분석이 간편

해짐에 따라 식품 등에 함유된 인공합성 첨가 여부 판별이 가능하게 되어 천연향의 키랄성을 평가하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 중 키랄성 향기성분의 enantiodifferentiation의 분석을 위해 dual column oven이 장착된 Multi dimensional gas chromatography-mass spectrometry(MD-GC/MS) system(MD-GCMS-QP2010Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하였으며(Fig. 3-2), 키랄 화합물을 precolumn에서 main column으로 이동시키기 위해 MDS(multi-deans switching) system을 사용하였고 MDS control은 전용 MDGC workstation(MDGC solution, shimadzu, Japan)(Fig. 3-2)를 이용하여 1차 컬럼에서 분리된 화합물 중 키랄 화합물에 대해서 최적 cut time을 설정하여 2차 컬럼인 키랄 컬럼으로 분리하였으며 MDS system 작동 모드는 아래 그림(Fig 3-3)과 같다.

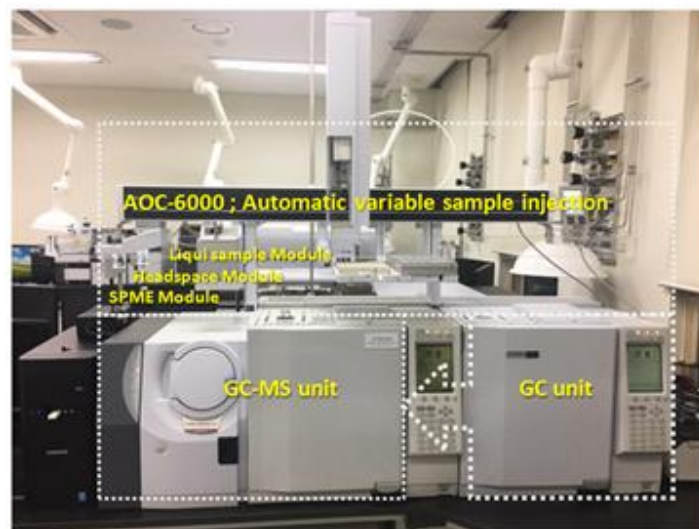


Fig 3-2. Multi-dimensional gas chromatography-mass spectrometry system(MD-GC/MS-PQ2010plus, Shimadzu, Japan)

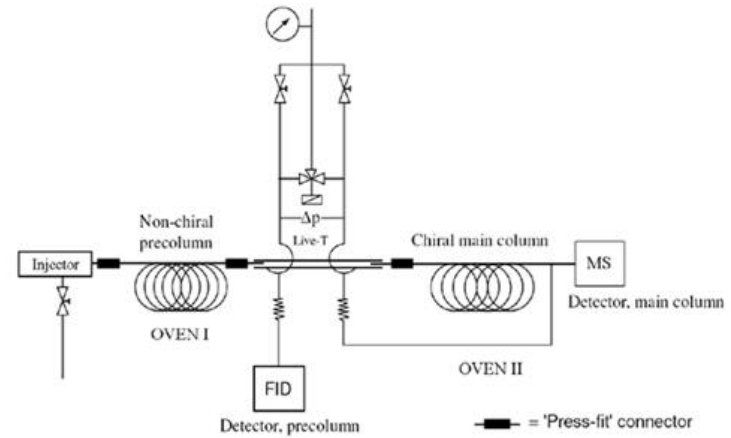
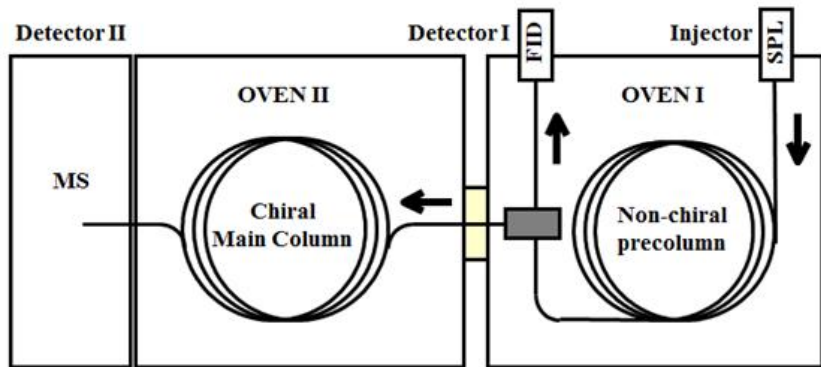


Fig 3-3. Schematic Diagram of MDGC/MS System for chiral volatile Compound analysis

제 2 절 키랄성 향기성분 분석을 위한 MDGC/MS의 분석조건

각 시료로부터 선택된 indicator의 enantiomeric composition의 분석을 위해 mass spectrometry(MS)가 장착된 multidimensional gas chromatography(MDGC)를 수행하였다.

1. 키랄성 향기성분의 분리를 위한 최적의 column 선택

MDGC의 경우 서로 다른 column을 결합시키는 것이 가능하여 극미량 화합물 또한 복잡한 matrix로부터 분리할 수 있다. 서로 다른 극성의 두 가지 column의 응용(예, first column; nonpolar, second column; polar)은 복잡한 혼합물의 탁월한 분리 효과를 나타내며, 첫번째 column(1st column)은 예비분리(preseparation)을 위해 사용되고, 반면에 두번째 column(2nd column)은 특별한 분리 목적을 위하여 선택된다. 본 연구에서는 예비분리를 위해 극성 column을 사용하였고, 키랄성 향기성분의 분석을 위해 cyclodextrin column을 사용하였다. Preseparation은 Rtx[®]-5MS(30m × 0.25 mm id, 0.25 um film thickness, restek, USA)를 사용하여 수행하였고, Enantiomer의 분리는 cyclodextrin 유도체의 stationary phase를 기본골격으로 한 2,3-di-O-ethyl-6-O-tert-butyl dimethylsilyl beta cyclodextrin(Rt[®]-BDEXse, 30m × 0.32 mm id, 0.25 um film thickness, restek, USA)를 사용하였다.

2. MDGC/MS에 의한 키랄성 향기성분의 분석

키랄성 향기성분의 enantiomer 분리를 위해 MD-GCMS-QP2010Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan)으로 dual-oven MDGC system(oven I, GC-2010AF; oven II, GCMS-QP2010plus)을 사용하였으며, 키랄화합물을 precolumn에서 main column으로 이동시키기 위해 multi-deans switching(MDS) valve을 GC-oven I에 장착하였다. Preseparation은 Rtx[®]-5MS(30m × 0.25 mm id, 0.25 um film thickness)를 사용하여 수행하였고, GC-FID로 분리 분석 한 후 키랄성 화합물의 머무름시간을 모니터하여 cut time을 설정하였다. Enantiomer 분리는 Rt[®]-BDEXse(30m × 0.32 mm id, 0.25 um film thickness)을 이용하여 수행하였으며, 키랄성 향기성분의 최적 분리를 위해 oven II의

온도조건을 최적화하였다. GC oven I과 II는 interface heater unit으로 연결하여 230°C 항온으로 설정하였고 multi-deans switching(MDS) valve와 GC-FID는 deactivated metallic capillary tube(0.5m × 0.15 mm id)으로 연결하였다. MD-GC/MS system을 이용한 키랄성 향기성분 분석조건은 다음과 같다(Table. 3-1).

Carrier gas는 He(99.995%)으로 1.22 mL/min의 유속으로 하고 등압 모드(pressure mode, 165.7 kPa)로 설정하였다. Injector와 FID의 온도는 각각 280, 320°C으로 설정하고 컬럼 온도는 초기 60°C에서 2 min 동안 유지한 다음 5°C/min의 승온으로 250°C 까지 상승시킨 다음 10 min 동안 유지하였다. 시료는 1μL을 split ratio 10:1으로 주입하였다. pre-separation에 의해 FID으로 휘발성 향기성분을 검출한 뒤 키랄성 화합물에 대해 최적 Heat-cut time 설정으로 분석하였고, MDS valve의 switching recovery 100%을 유지할 위해 switching pressure는 100.0 kPa으로 하였다.

Enantiomer 분리(GC2, main separation)을 위한 컬럼 온도는 70°C에서 9.5 min 동안 유지한 다음 5°C/min의 승온으로 200°C까지 상승시킨 다음 다시 15°C/min의 승온으로 220°C까지 상승시킨 다음 10 min 동안 유지하여 총 분석시간을 48.33 min으로 설정하였다.

GC-2에 의해 분리되는 분리된 enantiomer는 electron impact ionization(EI) 모드에서 70eV으로 이온화하였고, interface와 ion source의 온도는 각각 210°C와 220°C을 유지하였다. 또한 질량 분석은 mass spectrum scan 모드로서 m/z 40-400 범위로 설정하고 이때 scan speed는 5000 u/sec으로 설정하였다.

MDGC/MS에 의해 total ionization chromatogram(TIC)에 분리된 enantiomer의 분석은 표준물질의 retention time과 mass spectrum을 비교하여 확인하였다. Enantiomeric composition은 TIC로부터 얻어진 peak area로부터 환산하였으며, enantiomeric purity는 ee-value(enantiomeric excess, %)로 나타내었고, 다음과 같이 환산하였다.

$$ee\% = \frac{(Major\ enantiomer - Minor\ enantiomer)}{(Major\ enantiomer + Minor\ enantiomer)} \times 100$$

Table 3-1. MD-GC/MS conditions for identification of chiral volatile flavor compounds

1st GC system(GC-FID)	
System	GC-2010AF, Shimadzu, Japan
Column	Rtx [®] -5MS(30m × 0.25 mm id, 0.25 um film thickness)
Carrier gas	He(99.995%), 1.22 mL/min
Flow control mode	Constant pressure, 165.7 kPa
Injector temp.	210°C
Injection vol.	1.0 uL / split ratio 1:10
Column Temp. program	60°C(2 min) - 5 °C/min - 250°C(10 min)
Detector	FID(320°C) (Makeup gas(He) 30 mL/min, H ₂ 40 mL/min, Air 400 mL/min)
Multi-dean switching	100.0 kPa (switching recovery 100%)
Transfer heating block	230 °C
2rd GC system(GC/MS)	
System	GCMS-QP2010Plus, Shimadzu, Japan
Column	Rtx [®] -BDEXse, 30m × 0.32 mm id, 0.25 um film thickness
Column Temp. program	70°C(9.5 min) - 5 °C/min - 200°C - 15 °C/min - 220°C(10 min)
Mass analyzer	Single quadrupole mass filter
Ionization mode	EI(electron impact), 70eV
Interface temp.	210°C
Ion source temp.	220°C
Data accumulation	Scan mode (m/z 40 - 400), scan speed 5000 u/sec
MS library	Wiley 9, NIST 14, FFNSC 2.0
Control software	MDGCsolution Ver.2.42

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 키랄성 향기성분의 분리 조건 확립

베리류의 향기성분 동정 후 선정된 키랄성 향기 성분으로 α -pinene, limonene, linalool, terpinen-4-ol, α -terpineol, α -ionone, γ -decalactone, (Z)-neronidol, (E)-neronidol, 9종의 표준물질(Fig. 3-4)에 대해 multi dimensional gas chromatography-mass spectrometry(MD-GC/MS) system을 이용하여 enantiomer 분리 여부를 확인하였다.

키랄성 향기성분의 선택성을 높이기 위해 예비분리한 후 키랄 고정상으로 분리하여 확인하였다. 키랄성 향기성분의 분리를 위한 예비분리(preseparation)는 Rtx[®]-5MS(30m × 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness)를 사용하여 수행하였고, GC-FID로 분리 분석 한 후 키랄성 화합물의 머무름시간(t_R)을 모니터하여 cut time을 설정하였다. enantiomer의 분리효율을 향상시키고자 1st GC(precolumn)과 2rd GC(main chiral column)에 다양한 온도 program을 설정하여 MDGC를 수행하였으며, 예비분리 1st GC-FID의 온도조건과 키랄성 향기성분의 분리를 위한 2rd GC-MS의 온도 조건 및 각 화합물의 cut time은 Table 3-2에 나타내었으며 α -pinene 등 10종의 표준물질은 1st GC-FID와 2rd GC/MS에서 표준물질간의 간섭 영향이 발생되지 않고 단일 성분으로 분리되는 것을 확인하였고(Fig. 3-5), limonene, linalool, α -terpineol은 표준물질의 표기되지 않았던 라세미체(racemate) 형태의 표준물질인 것으로 나타났다.

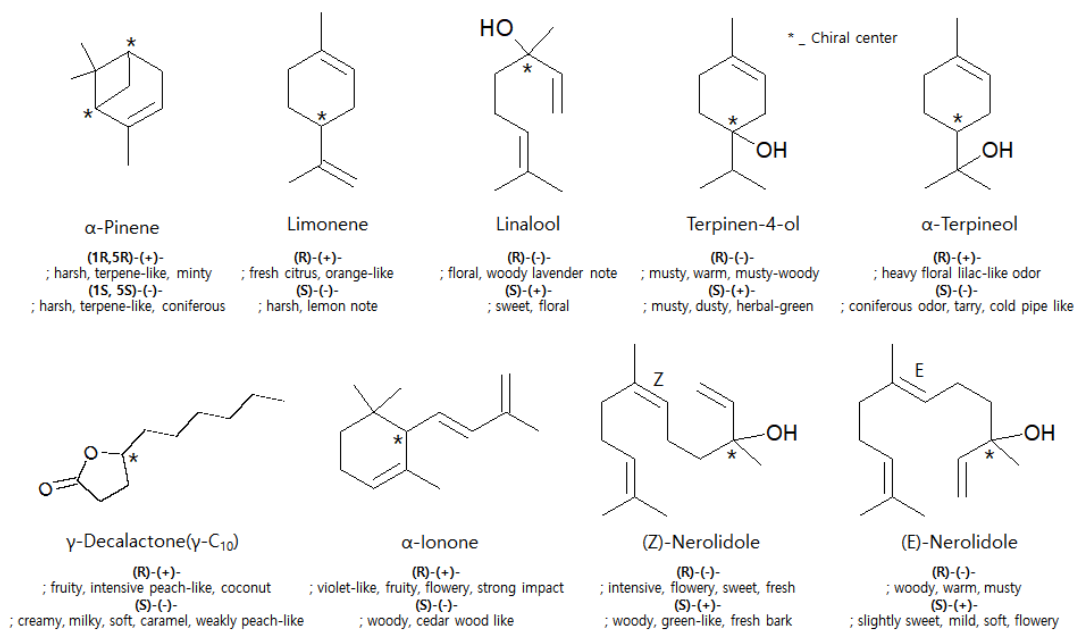


Fig 3-4. Characteristic of Selected chiral volatile flavor compounds of berry species

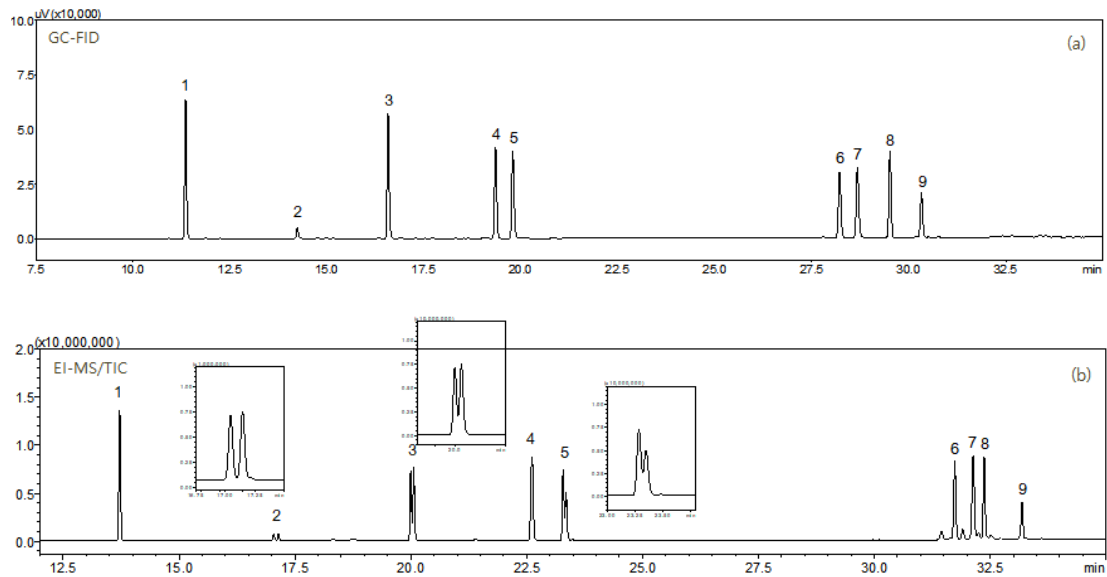


Fig 3-5. Precolumn 1st GC-FID chromatogram(a) and chiral column 2nd GC/MS chromatogram(b) of standard materials of volatile flavors

(1.(±)- α -pinene; 2.(±)-limonene; 3.(±)-linalool; 4.(±)-terpinen-4-ol; 5.(±)- α -terpineol;
 6.(±)-decalactone; 7.(±)- α -ionone; 8.(±)-(Z)-nerolidol; 9.(±)-(E)-nerolidol)

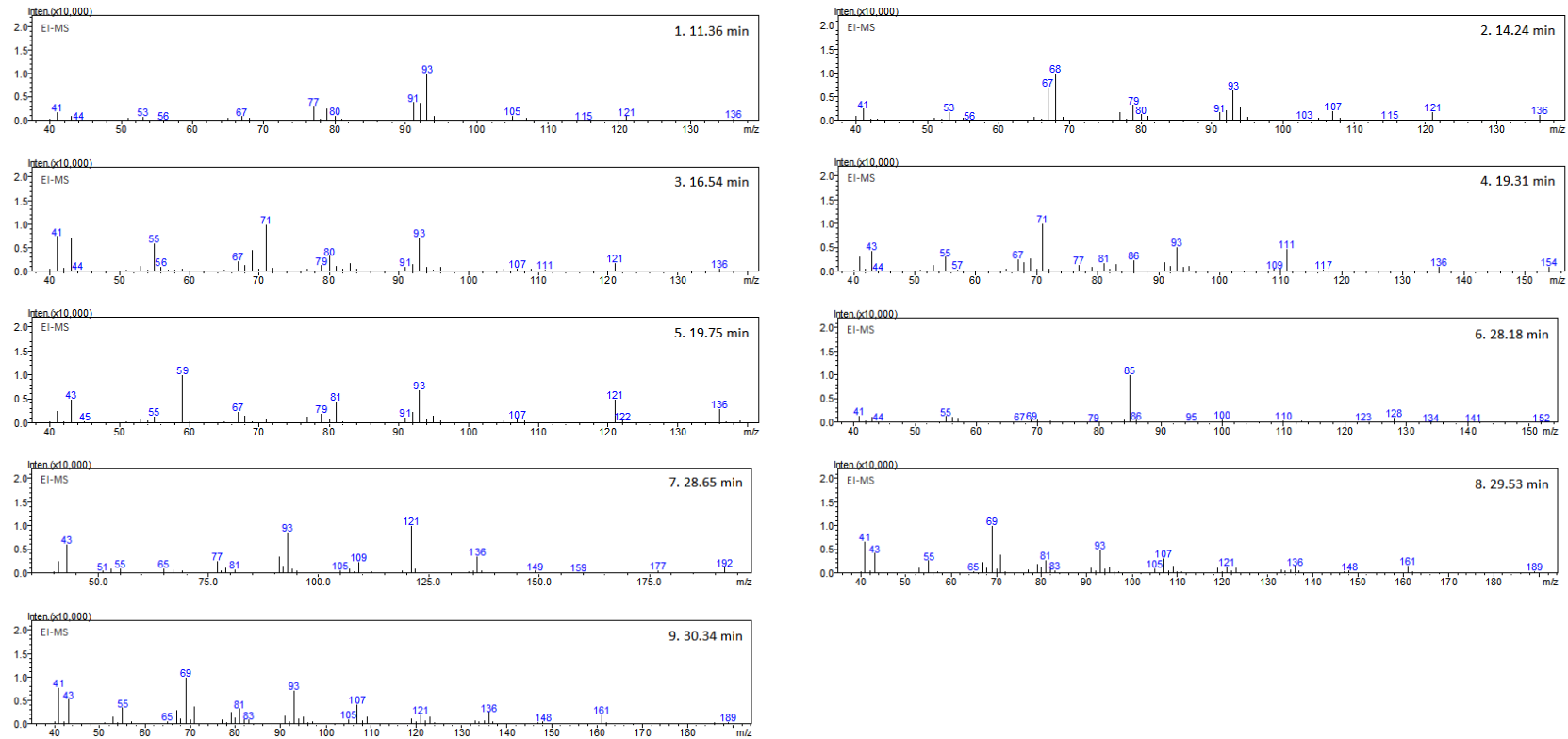


Fig 3-6. EI-GC/MS Spectrum of major chiral volatile compounds of berry species

Table 3-2. Cut time, retention time and retention index for MD-GC/MS analytical condition of chiral volatile flavor compounds

Peak #	Compound	RI	RT (min)	Cut time(Cut-window) (min)
1	α -Pinene	933	11.36	11.18-11.56 (0.38)
2	Limonene	1030	14.24	14.08-14.47 (0.39)
3	Linalool	1101	16.54	16.38-16.86 (0.48)
4	Terpinen-4-ol	1180	19.31	19.19-19.59 (0.40)
5	α -Terpineol	1195	19.75	19.64-20.07 (0.43)
6	γ -Decalotone	1469	28.18	28.06-28.48 (0.42)
7	α -Ionone	1490	28.65	28.52-29.03 (0.51)
8	(Z)-Nerolidol	1531	29.53	29.34-29.75 (0.41)
9	(E)-Nerolidol	1561	30.34	30.20-30.53 (0.33)

제 2 절 베리류의 주요 키랄성 향기성분의 이성질체 조성비 분석

휘발성 향기성분의 키랄성을 분석을 위한 방법으로 사이클로텍스트린을 고정상으로 하는 전용 chiroselective column을 이용한 기체크로마토그래피(gas chromatography)가 고안(Konig, 1992)되었으나 수 십종의 조합된 향기 성분들 중 단일 성분의 거울상 이성질체(enantiomer)를 분리하는 것은 다소 어려움이 따르는데, 이를 극복하고자 1960년대 후반 Gas chromatography의 column switching 기술 접목하여 다차원 기체크로마토그래피(multi-dimensional gas chromatography, MDGC) 시스템이 사용되어 이후 휘발성 향기성분에 대한 거울상 이성질체의 분리 분석이 용이하게 되었으며 식품향료 뿐만 아니라 환경 및 임상 응용분에서도 널리 이용되었다. 특히 식품 분야에서 휘발성 향기 성분의 거울상 이성질체의 선택적 분석은 과일 풍미의 기원을 효율적으로 평가할 수 있는 방법임과 동시에 착향료의 관리 규제를 위한 새로운 접근법으로 주목받고 있다(Mosandl, 1992).

한편 천연의 휘발성 향기 성분은 향 생성의 메커니즘에 관여하는 효소들의 입체특이성 반응에 의해 생성되어 휘발성 향기성분의 거울상 이성질체(enantiomer)의 특정 비율의 배합으로 발현되며 광학이성질체의 구조적 특징에 따라 서로 다른 생물학적 특성 보이며 두 가지의 이성질체 중의 하나만이 자연에서 발견되기도 한다. 베리류는 여타의 과일과 마찬가지로 다양한 생합성 경로에서 유래하는 휘발성 향기성분으로 탄화수소류, 에스터류, 알코올류, 알데히드류, 케톤류 및 함유질소 화합물과 극미량의 함유황 화합물로 구성되어 있다. 본 연구에 앞서 수행한 베리류의 휘발성 향기성분 조성 결과를 토대로 각 베리류의 휘발성 키랄 화합물을 선정하고 이를 multi-dean column switch 방법으로 heat-cut이 가능한 MD-GC/MS 시스템으로 분석하여 거울상 이성질체 조성과 그 비율을 확인하였다.

1. 양딸기(Strawberry)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석

양딸기(strawberry)의 향미는 품종에 따라 다양하며, 구성 당류 및 휘발성 향기성분의 조합에 의해 결정되어지는데(Sanz & Pérez, 2010), 양딸기의 휘발성 향기 성분으로 esters, aldehydes, ketones, alcohols, terpenes, furanones 및 sulfur compounds 등을 포함하여 360 여종이 넘는 화합물이 검출된 것으로 보고되었다(Mararse, 1991; Zabetakis & Holden, 1997; Zorrilla-Fontanesi, 2012). 양딸기의 주요 구성 향기성분 중 γ -또는 δ - 형태의 lactone류는 역가(aroma threshold)가 높고 경제적 가치가 높아 박테리아, 곰팡이 등의 미생물을 이용한 생물공학적인 방법(Tyrrell, 1990)이나 세포조직 배양(Drawert, 1988) 등의 방법으로 천연향의 대량 생산을 위한 연구가 시도되고 있으며 lactone류 거울상 이성질체에 조성비에 대한 연구가 보고되고 있다.

앞선 연구 수행으로 SDE와 SMPE를 이용한 베리류의 향기 성분을 추출하고 GC/MS를 이용한 양딸기의 휘발성 향기성분 분석 결과를 토대로 양딸기의 주요 거울상 이성질체를 선정하여 MD-GC/MS를 분석을 통해 서로 다른 구조의 enantiomer를 분리하였으며 그 화합물의 이성질체 조성비(enantiomeric excess, ee%)를 계산하였다. 양딸기의 주요 거울상 이성질체 향기성분으로 terpene류인 linalool, (Z)-, (E)-nerolidol와 strawberry의 key aroma compound 중 하나로서 lactone류인 γ -decalactone 및 γ -dodecalactone으로서 총 5종을 선별하였다(Table 3-3).

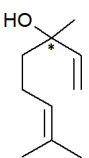
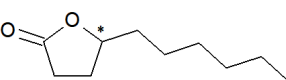
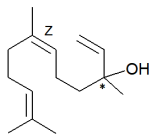
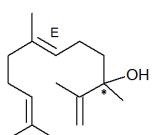
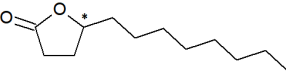
MD-GC/MS를 이용한 enantiomer의 분리에 앞서 예비분리(preseparation)와 동일한 조건의 GC-FID으로 양딸기의 휘발성 향기 성분의 머무름시간(t_R)과 분리능(resolution) 등을 확인한 후 미리 선정한 거울상 이성질체 향기성분에 대해 dean-switch valve의 heat-cut time을 설정하고 이를 MD-GC/MS에 도입하여 1st GC(preseparation)의 chromatogram를 확인하고 해당 거울상 이성질체 향기 성분이 2rd GC(main separation)에 의한 각 향기 성분의 enantiomer의 분리 정도를 확인하여 이성질체 조성비(enantiomeric excess, ee%)를 산출하였다(Fig. 3-7).

양딸기의 주요 MD-GC/MS 분석결과, linalool, γ -decalactone 및 (Z)-nerolidol은 R(rectus; right) form과 S(sinister; left) form의 enantiomer이 일정한 비율로 존재하였으며, (E)-nerolidol과 γ -dodecalactone는 단일 enantiomer로서 (S)-(E)-nerolidol과 (R)- γ -dodecalactone만이 검출되었다(Table 3-4). 양딸기 유래 linalool는

(R)-linalool와 (S)-linalool가 24.6 : 75.4의 비율로서 (S)-enantiomer가 우세한 것으로 나타났으며 γ -decalactone는 (R)- 및 (S)-가 86.7 : 13.3으로서 (R)-enantiomer가 우세하였다. (Z)-nerolidol은 (R)- 및 (S)-가 65.1 : 34.9의 비율로서 γ -decalactone와 같이 (R)-enantiomer가 우세한 것으로 나타났다. 양딸기의 주요 거울상 이성질체 향기 성분으로 linalool, γ -decalactone, (Z)-nerolidol의 ee%는 50.8, 73.5, 30.2%의 특징적인 이성질체 조성비로 확인되었으며(Fig. 3-8) 이를 활용한 양딸기의 품종이나 천연과 인공향료에 대한 진위 판별(authenticity)의 indicator로 이용 가능 할 것으로 사료되었다.

Kreck 등(2001)은 SBSE(stir bar sorptive extraction)-enatio-MDGC를 이용하여 품종별 양딸기의 주요 거울상 이성질체 향기성분인 methyl-, ethyl-2-methylbutanoate와 γ -decalactone 및 γ -dodecalactone를 분리하여 enantiomeric purity(%)를 확인하였는데 methyl-, ethyl-2-methylbutanoate는 (S)-form이 모든 시료에서 99% 이상으로 나타났으나, γ -decalactone은 품종에 따라 (R)/(S)-enantiomer이 49.6/50.4 - >99.0의 다양한 것으로 보고하였고, Cagliari 등(2012)은 peach에서 γ -decalactone의 (R)/(S)-enantiomer가 85/15 - 97/3으로 (R)-enantiomer가 우세하다고 보고하였다. γ -C₈, γ -C₁₀, γ -C₈ 등의 lactone류는 peach, apricot, coconut, melon 등의 과일 향기의 volatile key compound이며 enantiomeric purity(%)는 원물의 종(origin)에 기인하는 것으로 보고되고 있다. 거울상 이성질체 향기 성분은 enantiomer 구조에 따라 특징적인 향기를 나타내는데 본 연구에서 분리한 strawberry의 주요 거울상 이성질체 향기 성분인 (S)-Linalool는 sweet, floral으로 인지되고 (S)-(E)-Nerolidol은 slightly sweet, mild, soft, flowery으로 묘사되며 (R)- γ -Dodecalactone은 strong, fruity-sweet, bloomy note으로 인식된다(Leffingwell, 2018).

Table 3-3. Chiral volatile compounds of strawberry

No	Compound	Structure	Enantiomer	Odor description
1	Linalool		(R)-(-)	floral, woody lavender note
			(S)-(+)	sweet, floral,
2	γ -Decalactone		(R)-(+)-	racemate-like, fruity, intensive peach-like, coconut
			(S)-(-)-	creamy, milky, soft, caramel, weakly peach-like
3	(Z)-Nerolidol		(R)-(-)-	intensive, flowery, sweet, fresh
			(S)-(+)-	woody, green-like, fresh bark
4	(E)-Nerolidol		(R)-(-)-	pleasant, woody, warm, musty
			(S)-(+)-	slightly sweet, mild, soft, flowery
5	γ -Dodecalactone		(R)-(+)-	strong, fruity -sweet, bloomy note
			(S)-(-)-	fatty-fruity, milky note

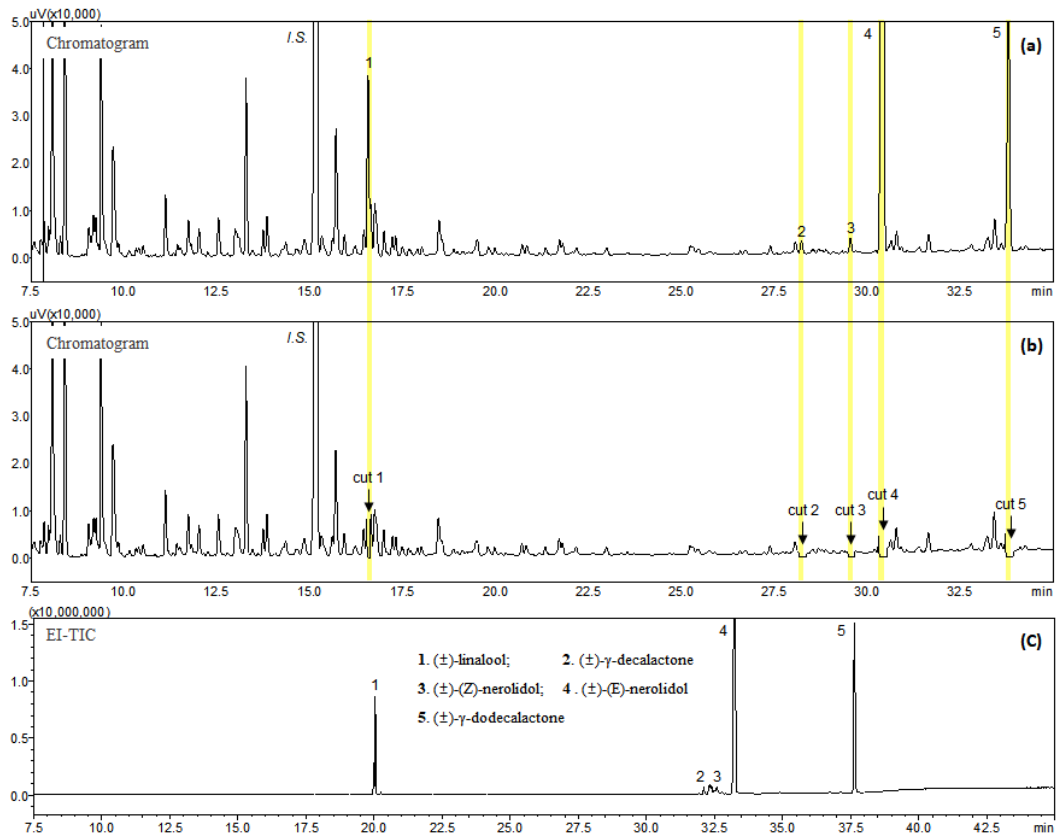


Fig 3-7. GC chromatogram of preseparation on a non-chiral column((a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of strawberry

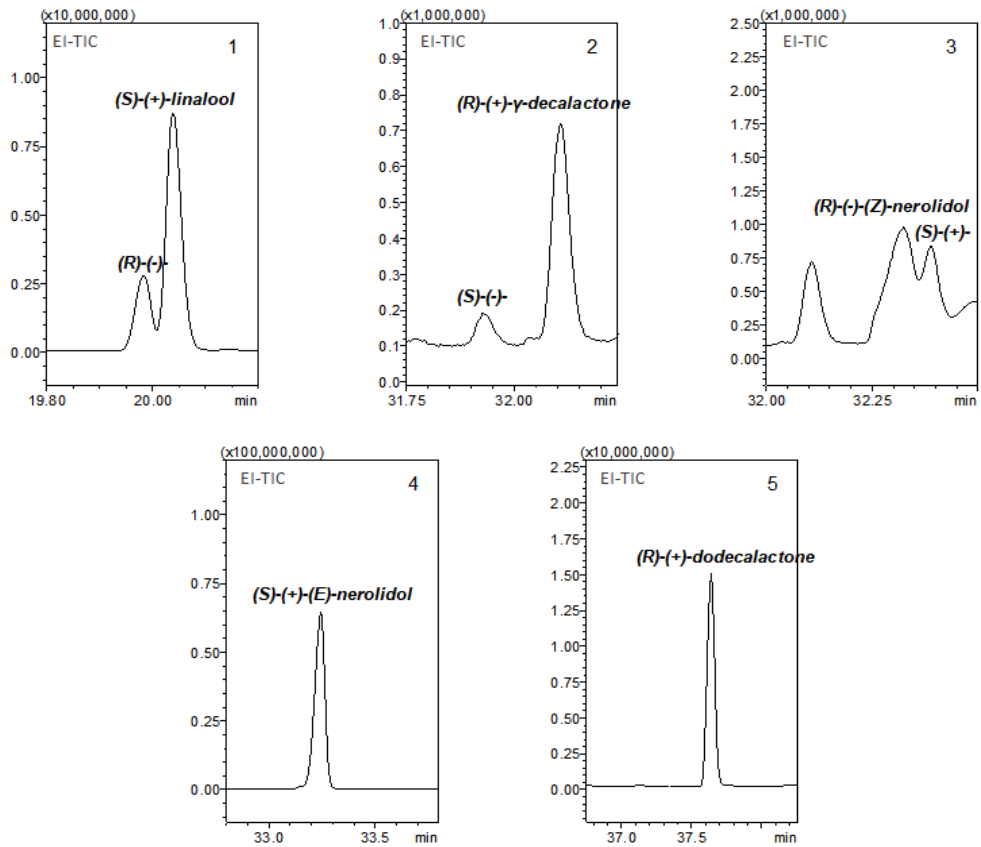


Fig 3-8. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile compounds of strawberry

Table 3-4. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of strawberry

NO	Compound	Enantiomeric ratio		Eanatiomeric excess, ee(%)
		R	S	
1	Linalool	24.62	75.38	50.77
2	γ -Decalactone	86.73	13.27	73.47
3	(Z)-Neronidol	65.12	34.88	30.24
4	(E)-Neronidol	-	100.00	100.00
5	γ -Dodecalactone	100.00	-	100.00

2. 블루베리(Blueberry)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석

가공식품의 원료 진위판별(authenticity)은 소비자의 신뢰뿐만 아니라 소비자의 구매 욕구를 극대화하기 하기 위해 ‘진통(authentic)’, ‘천연(natural)’, ‘수제(homemade)’ 및 ‘지역(local)’과 같은 용어를 식품포장에 사용합니다. 소비자의 선택은 안전 및 위생에 대한 우려뿐만 아니라 식품 원료, 첨가제 등의 가공식품 제조 배경에 의해도 결정되기 때문에 진위판별은 소비자의 보호와 더불어 가공식품 제조업체로부터 고품의 제품을 생산할 수 있도록 유도할 수 있다.

식품의 특정 고유 향미를 얻거나 향상시키기 위해 천연향료나 인공합성향료가 식품첨가물로서 이용되고 있다. 천연향료의 진위판별은 소비자의 식품 선택 측면에서 매우 중요하며 특히 천연향료는 재배환경 이력 또는 식물의 품종에 좌우된다. 따라서 식품 원료에 대한 보다 정확한 진위판별 기술이 요구되고 이를 위해서는 지표인자(origin parameter) 설정과 분석법 개발 요구된다.

블루베리(Blueberry)는 생과 이용과 더불어 향미 특성이 우수하여 식품 원료로 오랫동안 이용되고 있고, 최근 블루베리의 각종 생리활성이 밝혀지면서 다양한 제품으로 개발되고 있는데 경제적 이익 등을 목적으로 상대적으로 가격이 저렴한 원료나 유사 향미 특성을 나타내는 식품첨가제 형태의 조합향료 등으로 대체하는 경우도 발생하고 있다. 따라서 앞서 살펴본 블루베리의 휘발성 향기 성분 조성에서 키랄 중심(chiral center)를 갖는 거울상 이성질체 향기 성분에 대해 enantio-MDGC/MS으로 분석가능한 5종을 블루베리의 진위판별을 위한 지표성분(indicator compound)으로 선정하였다. 블루베리에서 선택된 거울상 이성질체 향기성분 5종은 peach, apricot, mango, pineapple 등의 과일류와 basil oil, lavender oil, orange oil, ylang-ylang oil 등의 향신료 에센셜 오일(essential oil)의 주성분으로 알려진 terpene류와 γ -또는 δ - 형태의 lactone류로서 α -pinene, limonene, linalool, α -terpineol, (E)-nerolidol을 선정하였다.

MD-GC/MS를 이용한 enantiomer의 분리에 GC-FID으로 휘발성 향기성분에 대해 모니터링하고 dean-switch valve의 heat-cut time을 설정하여 1st GC(preseparation)에서 분리된 거울상 이성질체 향기성분을 MD-GC/MS에 도입하여 각 향기성분의 enantiomer를 분리하였다(Fig. 3-9). 각 화합물의 거울상 이성질체 조성비는 enantiomeric ratio와 enantiomeric excess, ee%으로 산출하였다(Table 3-5).

Enantiomer separation column으로 사용한 Rt[®]-BDEXse(di-ethyl TBDMS-β-CD)는 α-pinene enantiomer의 resolution이 0.8으로 확인되어 블루베리의 α-pinene는 (S/R)-α-pinene으로서 분리되지 않아 enantiomeric ratio를 확인할 수 없었다. Limonene은 (R)- 및 (S)-form이 혼합된 상태로 존재하였으며 enantiomeric ratio(R/S)는 40.6/59.4이고 ee%는 18.8%으로 나타났다. 과일에 존재하는 limonene는 enantiomeric ratio(R/S)가 다양하였는데 apricot 47/53, grape 28/72, pear 51/49, sweet cherry 70/30, sour cherry 51/49으로 나타나(Vyviurska, Zvrškovcová & Špánik, 2017) 과일 종류에 따라 enantiomeric ratio가 상이한 것으로 확인되었고, Limonene의 (S)-enantiomer는 turpentine like odor를 가지고 있는 반면에 (R)-enantiomer는 orange-type smell과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Reineccius, Reineccius & Peppard, 2004). Linalool는 enantiomer의 (S)-form이 우세하였고 enantiomeric ratio(R/S) 25.5/74.47, ee% 48.9%으로 나타났고 앞서 확인된 양딸기의 Linalool ee%와 유사한 것으로 확인되었다. α-terpineol은 (S)-enantiomer가 우세하게 확인되고 ee%는 25.4%으로 나타났다. α-terpineol은 geranium oils(Ravid, Putievsky & Katzir, 1995)과 morio muscat-wine에서 천연 라세미 혼합물(racemic mixtrue)로서 존재하였고 lavender와 citrus oil에서도 α-terpineol의 enantiomer가 혼합되어 있었다. 수증기 증류로 처리한 bergamot에서도 α-terpineol은 라세미체(racemate)로 존재하였다(Bayer & Mosandl, 1992). 원물의 품종과 essential oil의 생산 또는 추출방법에 따라 휘발성 향기성분의 거울상 이성질체의 구성은 상이하였다. Sesquiterpene alcohol류인 (E)-nerolidol은 양딸기와 마찬가지로 (S)-enantiomer가 100%으로 높은 enantiomeric purity로 확인되었다. 결론적으로 enantio- MDGC/MS로 분석된 거울상 향기성분의 ee%는 블루베리를 판별할 수 있는 지표물질로 활용가능할 것으로 사료된다.

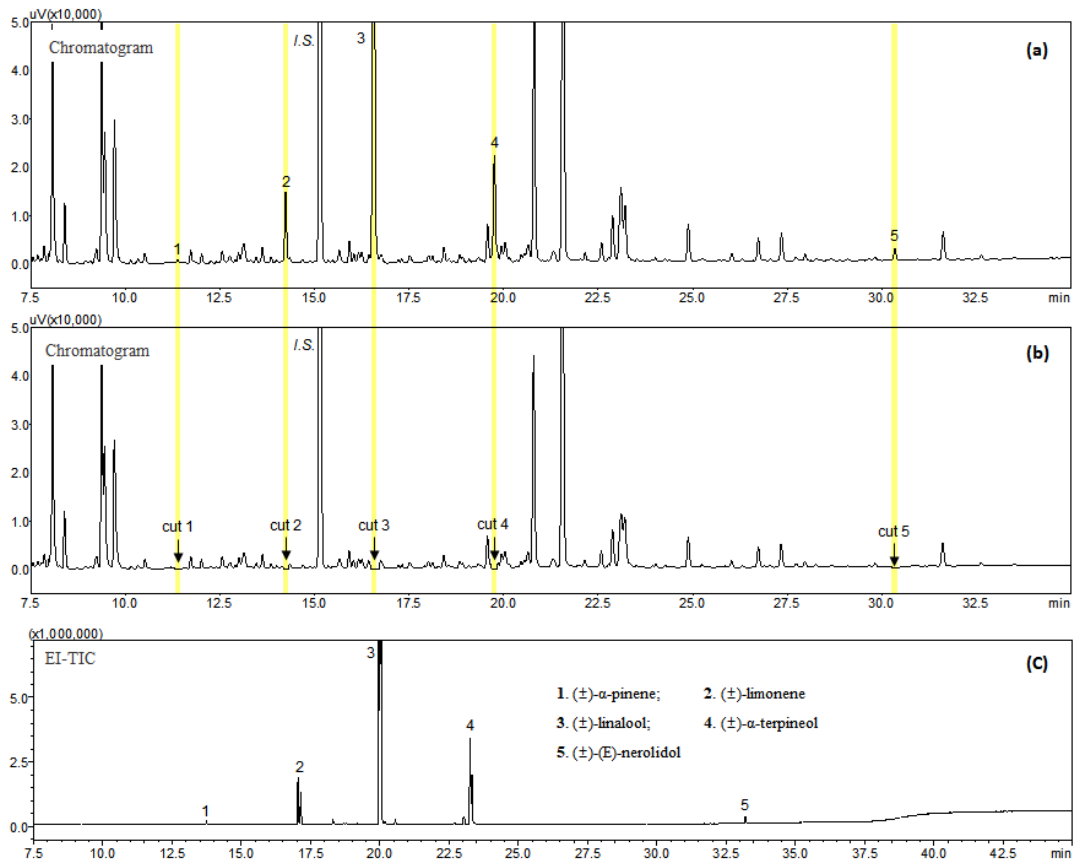


Fig. 3-9. GC chromatogram of preseparation on a non-chiral column ((a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of blueberry

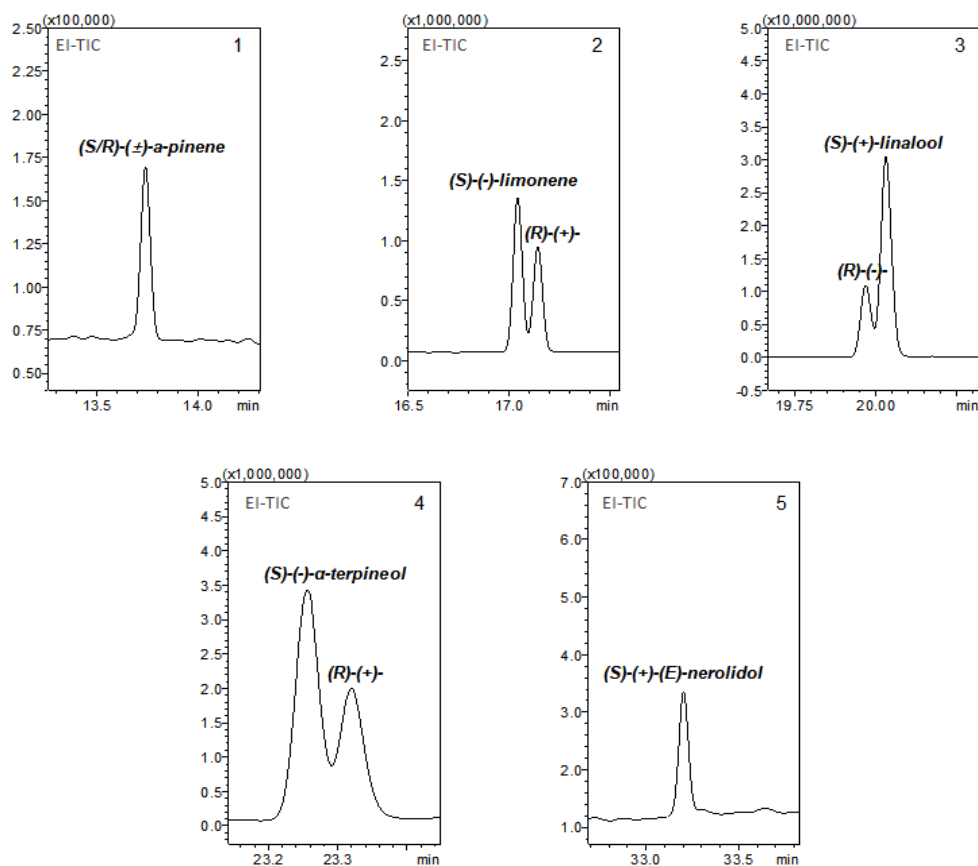


Fig. 3-10. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile compounds of blueberry

Table 3-5. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of blueberry

NO	Compound	Enantiomeric ratio		Enantiomeric excess, ee(%)
		R	S	
1	Limonene	40.62	59.38	18.75
2	Linalool	25.53	74.47	48.94
3	α-terpineol	37.30	62.70	25.39
4	(E)-Nerolidol	-	100.00	100.00

3. 블랙베리(Korean Blackberry)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석

식물에서 생합성에 의해 생성된 휘발성 향기 즉 aroma compounds의 경우, 입체특이적 효소 반응에 의해 (R) 및 (S)의 거울상 이성질체의 일정 비율로 존재하거나 하나의 enantiomer가 과량 존재한다. 이와 반대로 키랄성 향기 화합물의 화학적 합성은 거의 동일한 양의 양쪽 거울상 이성질체를 함유하는 라세미 혼합물(racemic mixture) 형태로 생성된다. 식물체의 향기 화합물의 두 가지 거울상 이성질체 사이의 비율은 화합물의 대사 경로를 파악하는데 용이하게 이용되기도 한다.

블랙베리(Korean blackberry)의 진위판별을 위한 정보를 제공하기 위해 원물에 함유된 키랄성 향기 성분의 거울상 이성질체 조성비를 MDGC/MS으로 분석한 결과를 Fig. 3-11과 Fig. 3-12에 나타내었다.

원물에 함유되어 있는 휘발성 향기성분 중 본 연구의 분석조건에 확인이 가능하고 원물의 진위판별이 용이한 α -pinene, limonene, linalool, terpinen-4-ol, α -terpineol의 5종의 terpenes 화합물을 선별하였다. 본 연구의 enantiomer 분리 컬럼인 Rt[®]-BDEXse(di-ethyl TBDMS- β -CD)은 α -pinene의 거울상 이성질체가 분리되지 않았다. 블랙베리에 함유된 limonene의 거울상 이성질체는 혼합물로 존재하였으며 (R)-enantiomer가 우세하였고 enantiomeric distribution(R/S)은 86.7/13.6으로 나타났고 enantiomeric excess(ee%)는 73.3으로 확인되었다. 블랙베리에 함유된 limonene의 ee%는 18.8%로서 (S)-enantiomer가 우세한 결과와 대조되었다. Linalool은 limonene과 마찬가지로 (R)-enantiomer가 우세하였고 enantiomeric distribution(R/S)은 82.7/17.3으로서 ee%는 65.4%으로 확인되었다. Limonene과 Linalool은 bergamot oil에서 (R)-enantiomer가 거의 독점적으로 우세하였고 (S)-limonene의 경우 2 % 이하의 낮은 조성으로 구성되어 있다(Table. 3-6). 여타의 연구결과에서도 (S)-limonene는 ≤ 2 %으로 매우 낮은 함량으로서 거의 존재하지 않는 것으로 보고되었다. (Casabianca & Graff, 1994; Ravid et al., 2010). 이로써 Limonene과 Linalool의 거울상 이성질체의 ee% 확인은 블랙베리 원물의 진위판별을 위한 지표로 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

Terpinen-4-ol은 lavender, hyssop, pine, nutmeg, thyme, marjoram, tarragon, meroli, rosemary, juniber berry 및 passion fruit 등 다수의 향신료와 과일의 에센셜 오일(essential oil) 내 (S)-enantiomer가 높은 비율로 존재하며 특히 lavender essential oil은

품종(origin)에 따라 enantiomer purity가 상이하였다. 블랙베리에 함유된 terpinen-4-ol도 여타의 과일과 동일하게 (S)-enantiomer가 우세하였고 enantiomeric ratio(R/S)는 2.4/97.6으로서 95.2%의 높은 ee%으로 나타났다. Terpinen-4-ol의 (S)-enantiomer는 musty, dusty의 향기 특성을 보이고 (R)-enantiomer와 공존시 강한 herbal-green 및 flowery의 향기를 발산하며, (S)-enantiomer는 warm, peppery, mildly earthy, musty-woody odor으로 묘사된다(Nishimura, 2001).

α -Terpienol의 enantiomer ratio(R/S)는 6.8/93.2로서 (S)-enantiomer가 우세하였고 ee%는 86.5%의 높은 enantiomeric excess(ee%)으로 나타났고, 블루베리에 함유된 α -Terpienol의 25.4%의 ee%와 대조적인 결과로 확인되었다. 이로서 본 연구에서 분석된 휘발성 키랄 향기성분으로 α -pinene을 제외한 limonene, linalool, terpinen-4-ol, α -terpienol이 블랙베리 원물의 진위 여부를 판별할 수 있는 지표성분으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

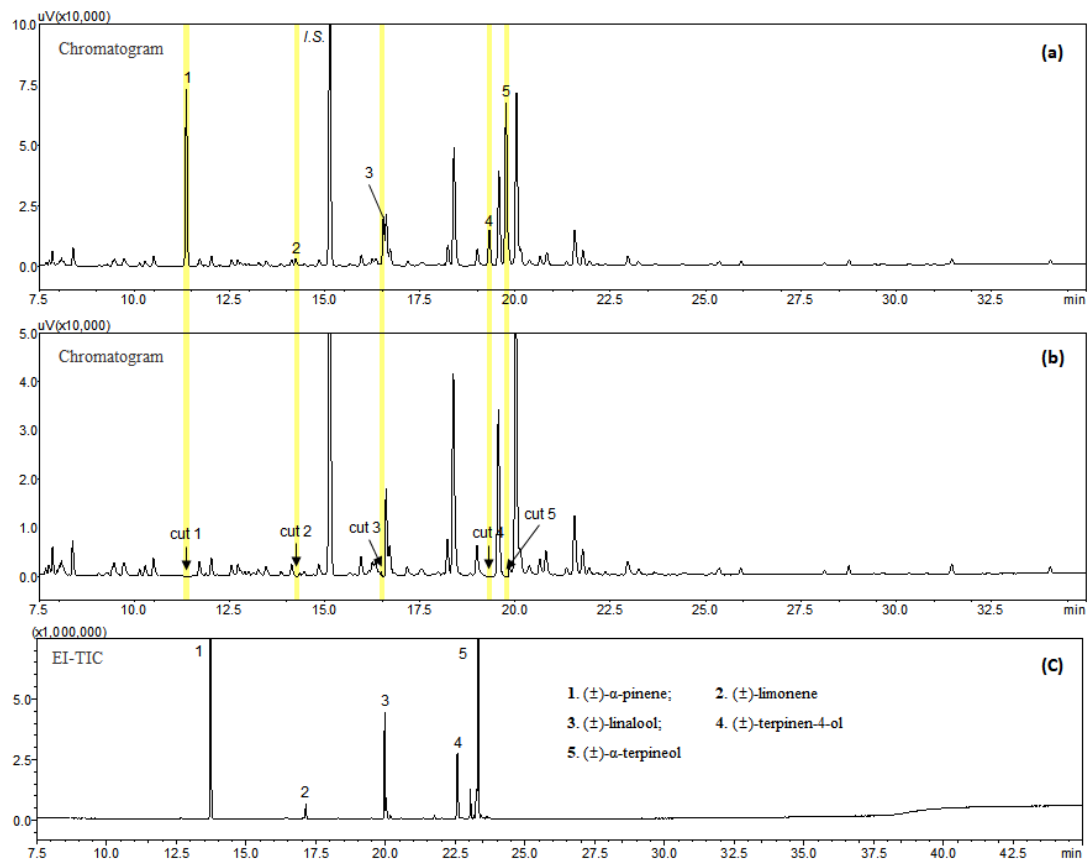


Fig. 3-11. GC chromatogram of prepreparation on a non-chiral column ((a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of Korean blackberry

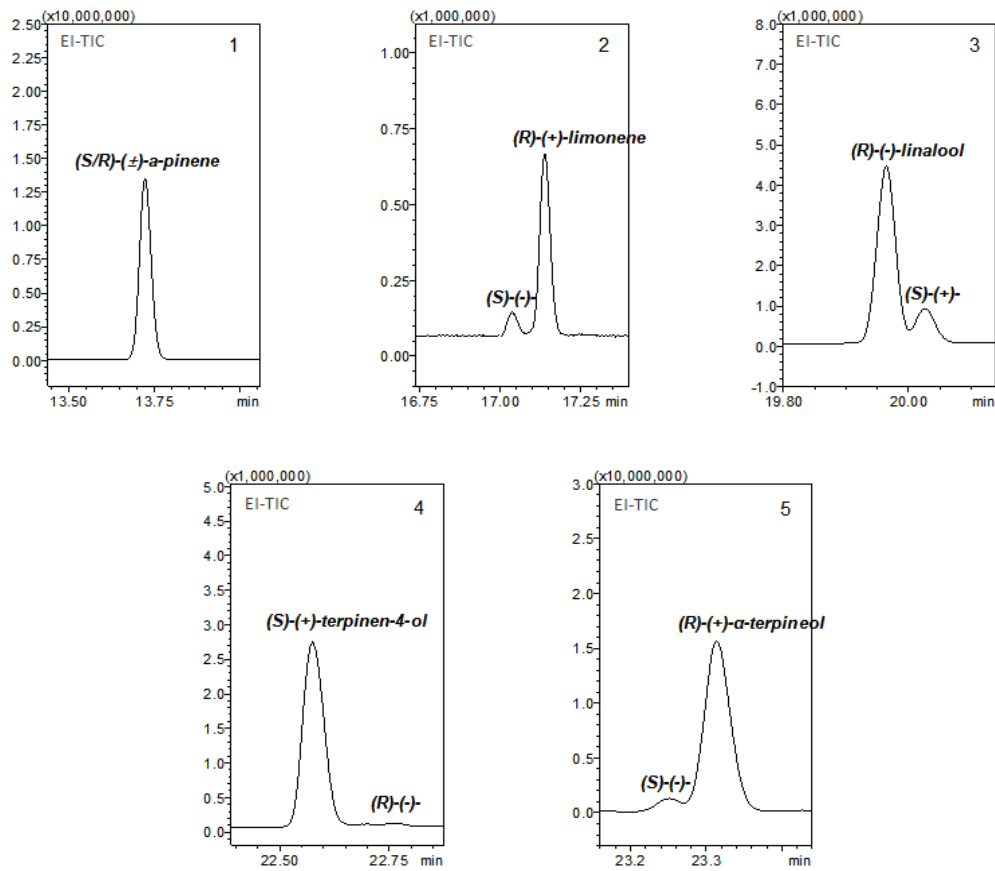


Fig. 3-12. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile compounds of Korean blackberry

Table 3-6. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of Korean blackberry

NO	Compound	Enantiomeric ratio		Eanatiomeric excess, ee(%)
		R	S	
1	Limonene	86.65	13.35	73.31
2	Linalool	82.69	17.31	65.38
3	Terpinen-4-ol	2.38	97.62	95.24
4	α -Terpienol	6.76	93.24	86.48

4. 크랜베리(Cranberry)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석

크랜베리의 진위판별을 위한 정보를 제공하기 위해 원물에 함유된 키랄성 향기 성분의 거울상 이성질체 조성비를 MDGC/MS으로 분석한 결과를 Fig. 3-13과 Fig. 3-14에 나타내었다. 원물에 함유되어 있는 휘발성 향기성분 중 본 연구의 분석조건에 확인이 가능하고 원물의 진위판별이 용이한 terpene alcohol류인 linalool과 α -terpineol을 크랜베리의 키랄성 향기성분으로 선정하였다. 크랜베리에 함유된 linalool의 거울상 이성질체는 (R)-과 (S)-enantiomer으로 구성되어 있으며 조성비(R/S)는 75.7/24.3으로 (R)-enantiomer가 우세하였고, enantiomeric excess(ee%)는 51.5으로 확인되었다. 크랜베리는 블랙베리와 동일한 결과로 (R)-enantiomer가 우세한 반면, 양말기, 블루베리에 함유되는 linalool은 (S)-enantiomer가 우세한 것으로 나타났으며 (R)-Linalool은 floral, woody lavender note 으로 인지(Boelens, Boelens & Gemert, 1993)되고 (S)-linalool은 sweet, floral, lavender odor 묘사되는데 베리류의 품종에 따라 키랄성 향기 성분의 enantiomer의 구성으로 인해 원물의 특징적 향미를 결정하는 것으로 사료된다. α -Terpineol의 거울상 이성질체도 linalool로 동일하게 (R)-과 (S)-enantiomer으로 구성되어 있으며 enantiomer ratio(R/S)는 17.2/82.8으로 (S)-enantiomer가 우세하고, enantiomeric excess(ee%)는 65.57%으로 확인되었다. 본 연구의 베리류 중 α -terpineol이 검출된 블루베리, 블랙베리 및 크랜베리 모두 (S)-enantiomer가 우세하였으나 enantiomer ratio(R/S)는 차이가 있으며 특히 ee%는 각각 25.4%, 86.5%, 65.6%으로 상이한 것으로 확인되었다(Table. 3-7).

결과적으로 크랜베리 원물에 함유되는 linalool과 α -terpienol의 키랄성 향기성분이 크랜베리의 진위판별을 위한 지표성분(indicator component)을 활용가능 할 것으로 사료된다.

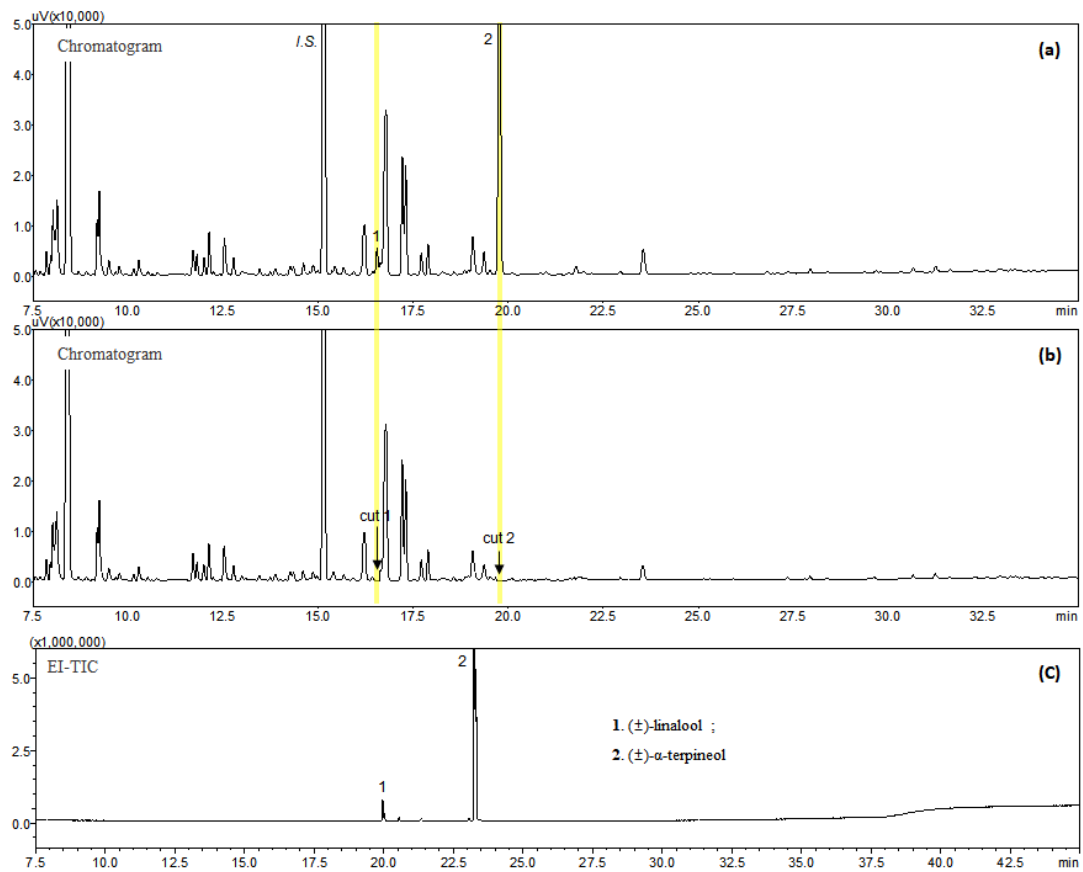


Fig. 3-13. GC chromatogram of preseparation on a non-chiral column((a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of cranberry

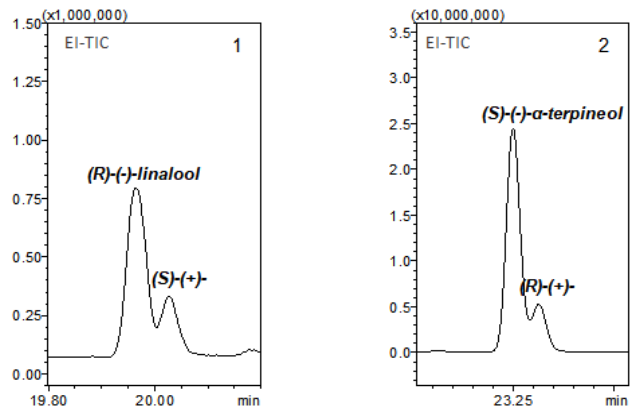


Fig. 3-14. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile compounds of cranberry

Table 3-7. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of cranberry

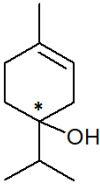
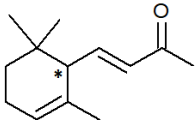
NO	Compound	Enantiomeric ratio		Enantiomeric excess, ee(%)
		R	S	
1	Linalool	75.73	24.27	51.45
2	α-Terpienol	17.22	82.78	65.57

5. 아로니아(Aronia)에 함유된 키랄성 향기성분의 조성비 분석

아로니아의 진위판별을 위한 정보를 제공하기 위해 원물에 함유된 키랄성 향기 성분의 거울상 이성질체 조성비를 enantio-MDGC/MS로 분석한 결과를 Fig. 3-15과 Fig. 3-16에 나타내었으며 원물에 함유되어 있는 휘발성 향기성분 중 본 연구의 분석조건에 확인이 가능하고 원물의 진위판별이 용이한 terpinen-4-ol과 α -ionone을 아로니아의 키랄성 향기성분으로 선정하였다(Table 3-8). 아로니아에 함유된 terpinen-4-ol의 거울상 이성질체는 (S)-enantiomer가 지배적으로 > 99%의 enantiomeric ratio으로 나타나 98.5%의 높은 enantiomeric excess(ee%)으로 확인되었다. α -ionone은 베리류의 주요 향기성분으로 알려져 있는데, 본 연구에서는 여타의 베리류에서는 검출되지 않았고 아로니아에서만 확인되었다. 아로니아에 함유된 α -ionone의 거울상 이성질체는 혼합물로 존재하였으며, (R)-enantiomer가 우세하였고 enantiomeric ratio(R/S)는 74.6/25.4로서 49.12%의 enantiomeric excess(ee%)으로 확인되었다(Table. 3-9). α -ionone이 함유된 라즈베리 인공 합성 향료의 경우 (R)-과 (S)-enantiomer가 50:50으로 존재하며 α -ionone은 violet-like, fruiy, raspberry-like, flowery odor로서 (R)- α -ionone이 (S)-enantiomer 보다 상대적으로 더 강한 향이 발현되는 것으로 보고(Mans, 1993; Yamamoto, Yagi & Ishida, 2011)되고 있다. 합성 α -ionone은 식품의 풍미를 높이고 원료 단가를 낮추기 위해 인위적으로 첨가할 수 있는데 이 경우, α -ionone의 enantiomeric ratio 확인을 통해 합성 향료의 첨가여부를 확인할 수 있다. 베리류를 포함한 대다수의 식물은 α -ionone 거울상 이성질체로서 (R)-enantiomer이 절대적으로 우세하며 99% 이상의 enantiomeric excess(ee%)로 확인되는데, 생합성의 대사과정에서 α -ionone의 cyclic 구조의 이중결합의 이동으로 α -ionone의 비대칭 중심(asymmetric center)으로부터 수소 원자가 제거되어 β -ionone 또는 isomeric ketone이 생성될 수 있으며 (R)-enantiomer가 (S)-enantiomer 형태로 전환되기도 한다(Sobotka, 1943)(Fig. 3-17).

결과적으로 아로니아에 함유되어 있는 terpinen-4-ol과 α -ionone의 키랄성 향기성분이 aronia의 진위판별을 위한 지표성분(indicator component)을 활용가능 할 것으로 사료된다.

Table 3-8. Chiral volatile compounds of aronia

No	Compound	Structure	Enantiomer	Odor description
1	Terpinen-4-ol		(R)-(-)-	musty, warm, peppery, mildly earthy, musty-woody odor
			(S)-(+)-	musty, dusty, herbal-green odor
2	α -Ionone		(R)-(+)-	such as a violet -like, fruit-like
			(S)-(-)-	such as a fresh juicy greenish flavor, wood-like, cedarwood-like

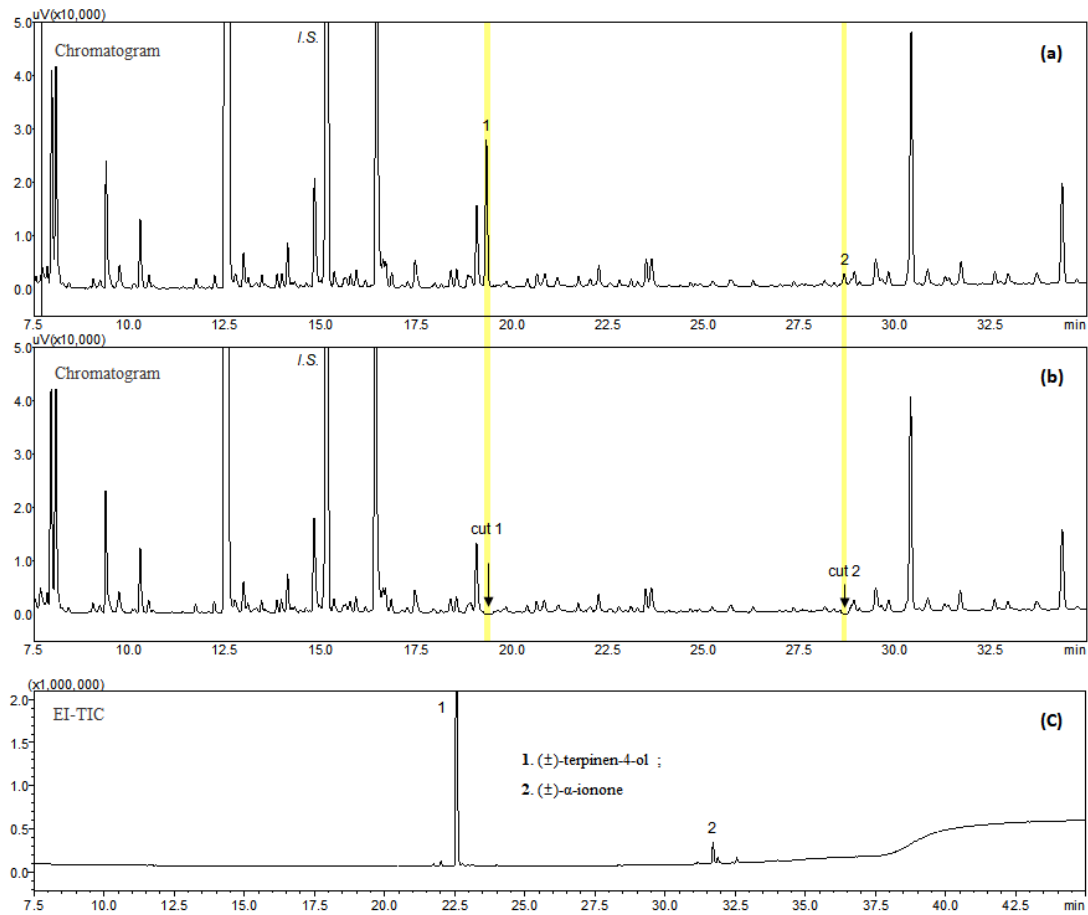


Fig. 3-15. GC chromatogram of prepreparation on a non-chiral column ((a)normal and (b)heat-cut mode) and enantioselective MD-GC/MS total ion chromatogram(c) of selected chiral volatile compounds of aronia

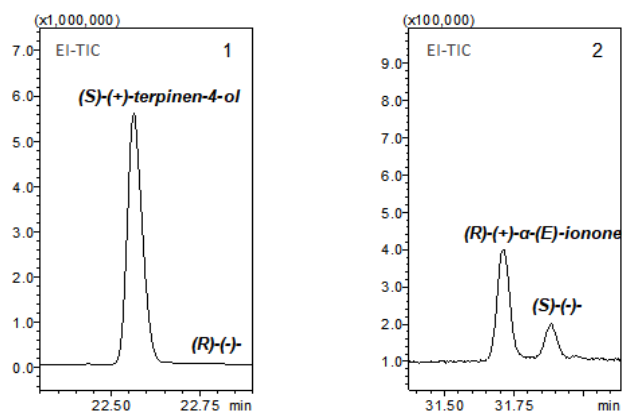


Fig. 3-16. MD-GC/MS total ion chromatogram of selected chiral volatile compounds of aronia

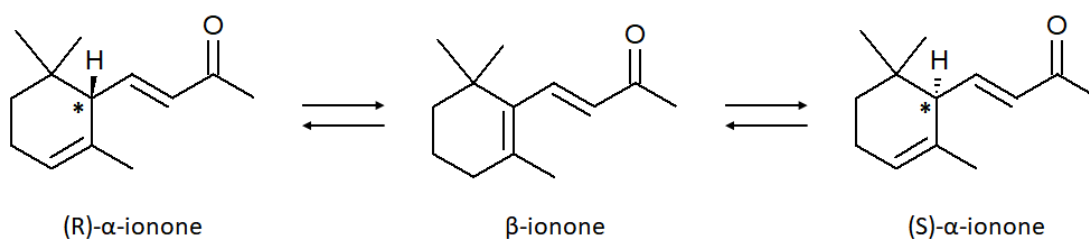


Fig 3-17. Racemization of α -ionone(*asymmetric center)

Table 3-9. Enantiomeric distribution of chiral volatile compounds of aronia

NO	Compound	Enantiomeric ratio		Enantiomeric excess, ee(%)
		R	S	
1	Terpinen-4-ol	0.76	99.24	98.47
2	α -Ionone	74.56	25.44	49.12

제 4 장 요약

본 연구에서는 앞서 확인하였던 베리류의 휘발성 향기성분 중 분자비대칭성(chirality)를 갖는 향기성분을 선정하고 이를 dual column oven과 multi-deans switch module(MDS)이 장착되어 heat-cut의 column switching이 가능한 다차원 기체크로마토그래피 질량분석기(multidimensional gas chromatography mass spectrometry, MDGC/MS)를 이용하여 베리류의 주요 거울상 이성질체 향기성분의 조성비(enantiomeric excess, ee%)를 분석하였다.

베리류의 휘발성 향기성분의 preseparation은 poly(5% diphenyl/95% dimethyl siloxane) 계열의 Rtx-5ms 컬럼으로 분리하여 GC-FID을 통해 모니터하고 거울상 이성질체 향기성분(chiral volatile flavor compounds)의 main separation은 2,3-di-O-ethyl-6-O-tert-butyl dimethylsilyl beta cyclodextrin(Rt[®]-BDEXse) 컬럼을 사용하였으며 베리류의 거울상 이성질체 향기성분은 α -pinene, limonene, linalool, terpinen-4-ol, α -terpineol, γ -decalactone, α -ionone, (Z)-nerolidol, (E)-nerolidol으로 선정하고 최적의 heat-cut time을 설정하여 각 거울상 이성질체 향기성분의 enantiomer를 분리하였다.

양딸기의 주요 거울상 이성질체 향기 성분으로 linalool, γ -decalactone, (Z)-nerolidol의 ee%는 50.8, 73.5, 30.2%의 특징적인 이성질체 조성비로 확인되었으며, 블루베리는 Limonene, α -terpineol의 ee%가 18.78, 25.39%으로 나타났고, (E)-nerolidol는 (S)-enantiomer만이 검출되어 ee%가 100%으로 확인되었다. 블랙베리는 Limonene과 linalool의 enantiomer(R/S)으로 (R)-form이 우세하였고 각각의 ee%는 73.31, 65.38%으로 나타났으며, terpinen-4-ol과 α -terpineol의 enantiomer(R/S)는 (S)-form이 우세하였고 ee%는 95.24, 86.48%으로 확인되었다. 크랜베리는 limonene과 α -terpineol의 거울상 이성질체 향기성분이 분리 동정되었으며 블랙베리와 마찬가지로 limonene의 (R)-enantiomer가 우세하였고, α -terpineol는 (S)-enantiomer이 우세하였으며 각 ee%는 51.45, 65.57%으로 확인되었다. Aronia의 거울상 이성질체 향기성분은 terpinen-4-ol과 α -ionone이 확인되었고 terpinen-4-ol의 경우 (S)-enantiomer이 절대적으로 우세하였고(> 99%), ee%는 98.47%으로 나타났으며 α -ionone은 (R)-enantiomer 우세하였고 ee%는 49.12%으로 확인되었는데 생합성의 대사과정에서 (R)-form의 cyclic 구조의 이중결합의 이동으로 (R)- α -ionone의 비대칭 중심(asymmetric center)으로부터 수소 원자가 제거되어 β -ionone나 (S)- α -ionone으로 전환되는 것을 확인하

였다.

결론적으로 enantio-MDGC/MS를 활용하여 베리류에 함유된 거울상 이성질체 향기성분에 대한 enantiomer ratio와 enantiomeric excess(ee%)의 기초자료를 마련하였고, 본 연구 결과를 바탕으로 식품 등의 향료산업 등에 적용 가능한 천연향(natural flavor 또는 bioflavor)과 인공향(artificial flavor)의 이화학적 진위판별이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

Aromenverordnung i.d. F. des Verordnung zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Kennzeichnungsvorschriften vom 22.12.(BGBl. I.S. 1652, 1676), der 1. Aend V vom 10.5.(BGBl. I.S. 602) und der ZV erd V vom 10.7.(BGBl. I.S. 897).

Codex Alimentarius : Auslaendische Lebensmittelrecht Behr's Verlag, Muenchen (1993).

Bayer, M., & Mosandl, A. (2004). Improved gas chromatographic stereodifferentiation of chiral main constituents from different essential oils using a mixture of chiral stationary phases. *Flavour and fragrance journal*, 19(6), 515-517.

Bernreuther, A., Christoph, N., & Schreier, P. (1989). Determination of the enantiomeric composition of γ -lactones in complex natural matrices using multidimensional capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 481, 363-367.

Birch, GG and Lindley, MG. (1986) *Development in food flavors*, Elsevier, London and New york.

Boelens, M. H., Boelens, H., & van Gemert, L. J. (1993). Sensory properties of optical isomers. *Perfumer & flavorist*, 18(6), 1-16.

Cagliero, C., Bicchi, C., Cordero, C., Rubiolo, P., Sgorbini, B., & Liberto, E. (2012). Fast headspace-enantioselective GC-mass spectrometric-multivariate statistical method for routine authentication of flavoured fruit foods. *Food chemistry*, 132(2), 1071-1079.

Casabianca, H., & Graff, J. B. (1994). Separation of linalyl acetate enantiomers: Application to the authentication of bergamot food products. *Journal of High Resolution Chromatography*, 17(3), 4-6

Chirospecific analysis in flavor and essential oil chemistry Part B. Direct enantiomer resolution of *trans*- α -ionone and *trans*- α -damascone by inclusion gas chromatography
 Chirale Analysen von Aroma-und etherischen Öl-Inhaltsstoffen

Teil B. Direkte Trennung der Enantiomeren von trans- α -Ionon und trans- α -Damascon mittels Inklusion gas chromatographie. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung.

Deans, D. R. (1968). A new technique for heart cutting in gas chromatography [1]. *Chromatographia*, 1(1-2), 18-22.

Drawert, F. (1988). Bioflavor – what does it mean. *Bioflavour*, 87, 3-32.

Hong, Y. C., & Harlander, S. K. (1989). Plant tissue culture systems for flavor production. *Flavor Chemistry of Lipid Foods*, 348-366.

Konig, W. A. (1992). Gas chromatographic enantiomer separation with modified cyclodextrins. Huthig.

Kreck, M., Scharrer, A., Bilke, S., & Mosandl, A. (2001). Stir bar sorptive extraction (SBSE)-enantio-MDGC-MS - a rapid method for the enantioselective analysis of chiral flavour compounds in strawberries. *European Food Research and Technology*, 213(4-5), 389-394.

Latrasse A: Fruits III. In *Volatile Compounds in Fruits and Beverages*. Edited by

Maarse H. New York: Marcek Dekker, Inc; 1991:329 - 387.

Leffingwell JC. *Chirality & Odour Perception*. Leffingwell & Associates. Available web site: <http://www.leffingwell.com/chirality/chirality.htm>, Accessed April 2018.

Mans H. Boelens, Harrie Boelens & Leo J. van Gemert, (1993) *Perfumer & Flavorist*, Vol. 18, No. 6, 1-15.

Merory, J. (1960). *Food flavorings: composition, manufacture and use*. The Avi Publishing.

Mosandl, A. (1992). Capillary gas chromatography in quality assessment of flavours and fragrances. *Journal of Chromatography A*, 624(1-2), 267-292.

Nishimura, O. (2001). Enantiomer separation of the characteristic odorants in Japanese fresh rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) using

multidimensional GC system and confirmation of the odour character of each enantiomer by GC - olfactometry. *Flavour and fragrance journal*, 16(1), 13-18.

Ohloff, G. (1990). *Animalische Drogen Als Riechstoffe*. In *Riechstoffe und Geruchssinn* (pp. 195-220). Springer, Berlin, Heidelberg.

Ravid, U., Elkabetz, M., Zamir, C., Cohen, K., Larkov, O., & Aly, R. (2010). Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto HS - SPME stereoselective GC - MS. *Flavour and fragrance journal*, 25(1), 20-27.

Ravid, U., Putievsky, E., & Katzir, I. (1995). Determination of the enantiomeric composition of a terpineol in essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 10(4), 281-284.

Reineccius, T. A., Reineccius, G. A., & Peppard, T. L. (2004). Utilization of β cyclodextrin for improved flavor retention in thermally processed foods. *Journal of food science*, 69(1), 58-62

Sanz, C., & Pérez, A. G. (2010). Handbook of fruit and vegetable flavors. 437-455

Sobotka, H., Bloch, E., Cahnmann, H., Feldbau, E., & Rosen, E. (1943). Studies on Ionone. II. Optical Resolution of dl- α -Ionone. *Journal of the American Chemical Society*, 65(11), 2061-2062.

Yamamoto, T., Yagi, K., & Ishida, K. (2011). Method for producing optically active α -ionone, U.S. Patent No. 8,053,592. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Tyrrell, M. H. (1990). Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. *Food technology (USA)*.

Tressl, R., Engel, K. H. (1984). *Analysis for volatiles, Methods and Application*. Schreier P, ed. Gruyter, Berlin, Germany, 323-343.

Tyrrell, M. H. (1990). Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. *Food technology (USA)*. 68-72.

Vyviurska, O., Zvrškovcová, H., & Špánik, I. (2017). Distribution of enantiomers of volatile organic compounds in selected fruit distillates. *Chirality*, 29(1), 1-5.

Werkhoff, P., Bretschneider, W., & Brennecke, S. (1991). *Multidimensionale Praeparative kapillar-gaschromtographie in der Aromastoff-Forschung*. Gerstel GmbH, 5.

Werkhoff, P., Bretschneider, W., Güntert, M., Hopp, R., & Surburg, H. (1991).

Williams, P. J., Sefton, M. A., & Wilson, B. (1989). Nonvolatile conjugates of secondary metabolites as precursors of varietal grape flavor components.

Zabetakis, I., & Holden, M. A. (1997). Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(4), 421-434.

Zorrilla-Fontanesi, Y., Rambla, J. L., Cabeza, A., Medina, J. J., Sánchez-Sevilla, J. F., Valpuesta, V., ... & Amaya, I. (2012). Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of O-methyltransferase FaOMT as the locus controlling natural variation in mesifurane content. *Plant physiology*, 159(2), 851-870.