

# 안토시아닌 분석

정명근

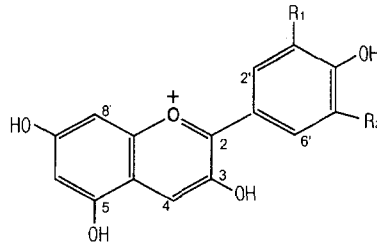
삼척대학교

## I. 서 언

고등식물의 꽃, 과일, 줄기, 잎, 뿌리 등 식물체 각 부위에 폭넓게 함유되어 있는 안토시아닌(Anthocyanin)색소는 적색, 자색, 청색을 나타내는 수용성 flavonoid 색소이다. Anthocyanin이라는 용어는 그리스어로 꽃을 의미하는 anthos와 푸른색을 의미하는 kyanos로부터 유래되었으며, 1835년 Marquart가 꽃의 푸른 색소를 명명하기 위해 최초로 이 용어를 사용하였다. 안토시아닌은 일반적으로 식물체의 액포 혹은 세포질에 배당체 형태로 존재하며 가수분해가 되면 당(sugar)이 제거된 비당체(aglycone)인 안토시아니딘(anthocyanidin)이 생성된다. 안토시아닌의 비당체인 안토시아니딘은 크게 6종류로 분류되는데 자홍색을 나타내는 cyanidin이 가장 흔히 있는 물질이며, 주황색은 cyanidin보다 hydroxyl(OH)기가 하나 작은 pelargonidin에 의한 것이고, 반면 담자색, 적자색 및 청색은 일반적으로 cyanidin보다 hydroxyl기가 하나 더 많은 delphinidin에 의한 것이다. 또한 이들 3종류의 비당체 외에 anthocyanidin methylester가 흔히 발견되며 cyanidin의 유도체인 peonidin, delphinidin의 유도체인 petunidin 및 malvidin이 안토시아닌의 비당체로 존재한다(그림 1).

기본적으로 안토시아닌 색소는 안토시아니딘과 당의 결합체로서 구성되어지는데 화학적 구조 중 3번, 5번 및 7번 탄소에 glucose, galactose, xylose, arabinose, rhamnose 등이 결합하여 monoglucoside, diglucoside, bioside, trioside 등으로 구성되고 있으며, 경우에 따라서 당 고리에 방향족 혹은 비방향족 유기산(*p*-coumaric, caffeic, ferulic, sinapic, *p*-hydroxybenzoic, malonic, oxalic, malic, succinic 혹은 acetic acid)이 결합되기도 하고, 그 결합방법 및 위치에 따라 자연계에 수백종이 존재하고, 현재 그 화학적 구조가 밝혀진 것이 300여종이나 된다.

안토시아닌은 중성 또는 알칼리용액에서 불안정하며 산성용액이라도 빛에 노출되면 색이 서서히 탈색되는 현상을 나타내어 구조적으로 가장 불안정한 물질 중 하나로 꼽힌다. 특히 색상의 안정성에 영향을 주는 요인으로서는 안토시아닌의 화학적 구조, 색소의 농도, 용액의 pH, 온도, 공존색소의 유무, 금속이온, 효소, 산소, ascorbic acid, 당 등을 들 수 있으며, 이들 요인의 차이에 의해 색도의 유지, 즉 구조적 안정성에 차이를 나타낸다. 안토시아닌은 1번 위치에 존재하는 산소의 비공유 전자쌍 중에서 전자 한 개가 2번 위치의 탄소와 공유결합을 하고 있기 때문에 양이온으로 하전 되어 있는데 이와 같은 것을 oxonium 화합물이라 하며, 안



Anthocyanidin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Anthocyanidin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pelargonidin	H	H	Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Cyanidin	OH	H	Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH
Delphinidin	OH	OH	Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Fig. 1. Chemical structures of anthocyanidin.

토시아닌의 구조적 불안정은 바로 이 oxonium 구조에 기인한 것이다.

앞에서 언급한 것처럼 안토시아닌은 화학적 구조를 결정하는 비당체, 당 및 유기산의 조합에 따라 수백종으로 다양하게 분류되어지므로 정확한 물질의 동정이 어려우며, 또한 구조적 불안정의 문제로 분석에 많은 어려움이 있었으나 최근 다양한 분광적 기법 및 크로마토그래피 기술의 발전으로 미량 함유된 안토시아닌의 동정 및 정량분석도 가능하게 되었다. 따라서 본 장에서는 안토시아닌 색소의 동정 및 분석에 가장 널리 사용되는 방법을 소개하여 깊은 화학실험의 지식이 없는 초심자들도 소기의 연구목적을 달성하고, 더 나아가 재배식물에 함유된 안토시아닌 색소의 포괄적 연구가 수행될 수 있기를 바란다.

## II. 분석방법

### 1. 여지크로마토그래피(PC, Paper Chromatography) 및 흡수 스펙트럼 분석을 통한 정성분석

여지크로마토그래피는 사용하는 장치나 조작방법이 간단하며 분석에 필요한 시료량이 작기 때문에 안토시아닌의 미량분리 및 정성분석에 널리 이용되며, scanning densitometry를 이용할 경우 정량분석도 가능하다. 여지크로마토그래피는 밀폐용기 중에서 전개용매를 여지에 침투시키는 방법에 따라 상승법 및 하강법으로 나누어지는데 용매를 여과지의 아래로부터 모세관 현상으로 스며들게 하는 상승법이 일반적으로 많이 이용된다. 또한 자외-가시 분광광도계를 이용한 흡수 스펙트럼 분석을 통하여서도 안토시아닌의 정성분석이 가능하다. 흡수 스펙트럼 분석을 통하여 안토시아닌의 정성분석을 실시할 경우에는 먼저 분석시료에 함유된 안토시아닌을 각각 순수하게 분리하여야 한다. 따라서 분석시료가 미량일 경우에는 앞에서 언급한 여지크로마토그래피를 대량으로 실시한 후 여지에서 분리된 안토시아닌을 회수하여 흡광 스펙트럼 분석을 실시하며, 분석시료가 대량일 경우에는 Open column chromatography(Sephadex LH-20, C<sub>18</sub> 및 Amberlite XAD-7 등)를 실시하여 분리 할 수도 있다. 자연계에 존재하는 안토시

아닌은 그 종류가 매우 다양함으로 이들 분석방법을 이용하여 안토시아닌을 분석 할 경우 분석방법은 비교적 간단하나 데이터를 정확히 해석하기 위해서는 많은 경험이 필요한 경우도 있다.

### 1) 장치 및 기구

- (1) 크로마토그래피용 여지 : Whatman No.1Chr 혹은 동양여지(TOYO) No. 51
- (2) 여지크로마토그래피장치(전개조)
- (3) 모세관
- (4) 자외-가시 분광광도계

### 2) 시약

- (1) 전개용매

AHW-1(Forestal, HOAc:HCl:H<sub>2</sub>O = 30:3:10), FHW(HCOOH:HCl:H<sub>2</sub>O = 5:2:3), BAW(*n*-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O = 4:1:5, 상층), BuHCl(*n*-BuOH:2N-HCl=1:1, 상층), AHW-2(HOAc:HCl:H<sub>2</sub>O = 5:1:5), 1%HCl, HAc-HCl(HOAc:HCl:H<sub>2</sub>O = 15:3:82)

- (2) 추출용매

1% HCl-MeOH 혹은 1% HCl-H<sub>2</sub>O(35% 농염산을 메탄올 및 물에 35배로 희석)

### 3) 조작

- (1) 여지크로마토그래피법

- ① 분석시료 0.1-1 g에 1% 염산-메탄올 혹은 1% 염산-증류수 약 30 ml를 첨가하고 4°C 조건의 저온고에서 1일-2일 정도 방치하면 색소가 용출되고, 추출은 3회 정도 반복하면 충분하다.
- ② 추출용액은 TOYO No. 5B 혹은 Whatman No.1 여과지로 여과한다.
- ③ 여과용액은 그대로 여지크로마토그래피의 시료로 사용해도 가능하며, 여과용액에 약 3배 용량의 ether를 혼합해서 잠시 방치하면 적색의 안토시아닌 색소는 시럽상으로 침전하게 되는데, 이 침전물을 회수하여 다시 1% 염산-메탄올에 녹여 시료로 사용하면 ether의 가용물이 제거되어 좋은 분석 결과를 얻을 수도 있다.
- ④ 모세관을 이용하여 여지에 직경 3 mm 이하의 spot으로 시료를 하적하고 전개용매로는 *n*-부탄올/농염산/물(7:2:5의 상층), *n*-부탄올/2N 염산(1:1의 상층), 초산/농염산/물(3:1:8 또는 15:3:82), 1% 염산, *n*-부탄올/초산/물(4:1:5의 상층 또는 4:1:2) 등을 이용하여 전개조에서 분리한다.
- ⑤ 전개가 완료된 여지는 상온에서 전개용매가 휘발 될 정도로만 건조하고 전개용매가 총 이동한 거리에 대한 안토시아닌의 이동 거리(이동율, rate of flow, Rf)를 계산한다.

- (2) 흡수 스펙트럼 분석법

- ① 분석시료는 여지크로마토그래피의 방법과 동일하게 추출하고, 여과한 뒤 크로마토그래피용 여과지에 가로로 길게 하적한 후 색소를 충분히 분리할 수 있는 적당

한 전개용매로 전개하여 각각의 안토시아닌을 순수하게 분리한다. 이때 전개용매로는 BAW 및 초산:염산:증류수(3:1:8)용매를 자주 사용하지만 분리하고자 하는 안토시아닌이 잘 분리 되는 조건을 실험자가 스스로 미리 조사해 두는 것이 바람직하다.

- ② 전개 후 전개용매가 휘발 될 정도로만 건조하고 안토시아닌이 전개된 여지를 올려내고 5% 초산함유-메탄올 혹은 0.1-1% 염산함유-메탄올을 이용하여 안토시아닌 색소를 여지로부터 용출한다.
- ③ 용출된 안토시아닌은 순수하지 않을 수 있으므로 용출된 색소를 반복하여 여지크로마토그래피를 실시한다. 이때 전개용매는 앞의 ①의 과정에서 사용했던 전개용매와 조성이 다른 것을 이용하여 분리정도를 검토하는 것이 바람직하다.
- ④ 순수하게 분리된 안토시아닌일 경우 자외-가시 분광광도계를 이용하여 200-700 nm 범위에서 흡광 스펙트럼을 측정하고 자외영역 및 가시영역의 최대 흡광범위와 흡광도를 측정한다.

#### 4) 안토시아닌의 정성적 평가

##### (1) 여지크로마토그래피법

###### ① 이동율(Rf)의 계산

$$R_f = \frac{\text{원점으로부터 안토시아닌이 이동한 거리 (cm)}}{\text{원점으로부터 용매가 총 이동한 거리 (cm)}}$$

###### ② Rf치 비교에 의한 안토시아닌의 동정(표 1)

##### (2) 흡수 스펙트럼 분석법

###### (가) 유기산이 결합되지 않은 안토시아닌의 정성적 평가

- ① 유기산이 결합 되지 않은 안토시아닌은 자외선 영역(270-280 nm)과 가시광선 영역에서 각각 흡수 극대를 1개씩 나타낸다. 자외선 영역의 흡수 극대는 안토시아닌의 종류에 따라 큰 변화가 없으나 가시광선 영역은 종류에 따라 상당한 차이를 나타낸다. 안토시아닌 중 식물계에 가장 흔히 존재하는 3-glucoside와 3,5-diglucoside의 흡수 극대 파장을 살펴보면 비당체인 안토시아닌딘이 동일하면 거의 차이를 나타내지 않지만 400-460 nm 파장 영역의 흡광도는 서로 다른 양상을 나타낸다.
- ② Harborne은 440 nm에서의 흡광계수  $E_{440}$ 과 가시부 흡수 극대에서의 흡광계수  $E_{max}$ 와의 비율을 구하고, 이 수치를 이용하여 안토시아닌딘의 C-5 위치의 OH기가 glucosyl화 되었는지 아닌지를 판별할 수 있는 방법을 제시하였다. 표 2에서와 같이 pelargonidin계 안토시아닌에서 C-5 위치의 OH기가 glucosyl화 되어 있지 않은 것에서는  $E_{440}/E_{max}$ 가 약 40%가 되는 반면 C-5 위치의 OH기가 glucosyl화 된 것에서는 약 19%로 낮은 수치를 나타낸다. Harborne이 제시한 이 방법은 당의 결합 부위 결정에 매우 유용한 정보를 제공하고 있다.

**Table 1.** Comparison on the Rf values of major anthocyanin.

	Anthocyanin	BAW	BuHCl	1%HCl	HAc-HCl
Pelargonidin glucoside	3-glucoside	0.44	0.38	0.14	0.35
	3-galactoside	0.39	0.37	0.13	0.33
	3-rutinoside	0.37	0.30	0.22	0.44
	3-sophoroside	0.36	0.30	0.38	0.65
	3,5-diglucoside	0.31	0.14	0.23	0.45
	3-rutinoside-5-glucoside	0.29	0.13	0.40	0.58
Cyanidin glucoside	3-glucoside	0.38	0.25	0.17	0.26
	3-galactoside	0.37	0.24	0.07	0.26
	3-rutinoside	0.37	0.25	0.19	0.43
	3-sophoroside	0.33	0.22	0.34	0.61
	3,5-diglucoside	0.28	0.06	0.16	0.40
	3-rutinoside-5-glucoside	0.25	0.08	0.36	0.59
Peonidin glucoside	3-glucoside	0.41	0.30	0.09	0.33
	3-galactoside	0.39	0.28	0.10	0.32
	3-rutinoside	0.34	0.14	0.16	0.41
	3,5-diglucoside	0.31	0.10	0.17	0.44
	3-rutinoside-5-glucoside	0.29	0.12	0.37	0.60
Delphinidin glucoside	3-glucoside	0.26	0.11	0.03	0.18
	3-galactoside	0.23	0.11	0.03	0.18
	3-rutinoside	0.30	0.15	0.11	0.37
	3,5-diglucoside	0.15	0.03	0.08	0.32
	3-rutinoside-5-glucoside	0.20	0.06	0.37	0.61
Petunidin glucoside	3-glucoside	0.35	0.14	0.04	0.22
	3-galactoside	0.33	0.13	0.04	0.20
	3-rutinoside	0.35	0.16	0.13	0.42
	3-sophoroside	-	0.17	0.36	0.66
	3,5-diglucoside	0.24	0.04	0.08	0.32
	3-rutinoside-5-glucoside	0.23	0.06	0.37	0.61
Malvidin glucoside	3-glucoside	0.38	0.15	0.06	0.29
	3-galactoside	0.36	0.15	0.06	0.29
	3-rutinoside	0.35	0.16	0.15	0.45
	3,5-diglucoside	0.31	0.03	0.13	0.42
	3-rutinoside-5-glucoside	0.30	0.05	0.40	0.63

③ 따라서 유기산이 결합되어 있지 않은 안토시아닌의 경우 표 2에 나타난 E<sub>440</sub> 및 E<sub>max</sub>의 흡수 분광 특성의 차이를 참고하여 각각의 안토시아닌을 동정할 수 있다.  
 (나) 유기산이 구조적으로 결합된 acyl화 안토시아닌의 정성적 평가

**Table 2.** UV-Vis. characterization of non-acylated anthocyanin.

Glucoside		E <sub>max</sub> (nm)	E <sub>440</sub> /E <sub>max</sub> (%)	Mean(%)
OH of C-5 position is free form.				
Pelargonidin	pelargonidin	520	39	40
	3-glucoside	506	38	
	3-Rhamnoside	508	40	
	3-diglucoside-7-glucoside	498	42	
Cyanidin	cyanidin	535	19	22
	3-glucoside	535	22	
	3-Rhamnoside	523	23	
	3-xyloside	523	22	
Peonidin	peonidin	532	25	26
	3-glucoside	523	26	
Delphinidin	delphinidin	544	16	17
	3-glucoside	535	18	
	3-Rhamnoside	537	17	
Petunidin	petunidin	543	17	18
	3-glucoside	535	18	
Malvidin	malvidin	542	19	19
	3-glucoside	535	18	
OH of C-5 position replace with glucoside form.				
Pelargonidin	5-glucoside	513	15	19
	3,5-diglucoside	504	21	
	3-rhamnoside-5-glucoside	505	19	
	3-diglucoside-5-glucoside	503	21	
Cyanidin	3,5-diglucoside	522	13	13
	3,5-diglucoside	523	13	
Peonidin	3-rhamnoside-5-glucoside	523	12	12
	5-glucoside	528	12	
	3,5-diglucoside	534	11	
Delphinidin	3,5-diglucoside	534	11	11
	3,5-diglucoside	533	10	
Petunidin	3-rhamnoside-5-glucoside	535	10	10
	3,5-diglucoside	533	12	
Malvidin	3,5-diglucoside	533	12	11
	3-rhamnoside-5-glucoside	534	9	

① 안토시아닌의 구조에 유기산이 결합되어 있는 경우 310-335 nm 영역에서 새로운 흡수 피크가 나타나므로 자외선 영역에서 2개의 흡수 극대가 나타나 비 acyl화 안토시아닌과는 흡수 분광 특성에 차이가 있다.

- ② Harborne은 안토시아닌에 유기산이 여러 가지 몰 비로 결합되어 있을 때의 흡수 스펙트럼과 acyl화 되지 않은 안토시아닌의 흡수 스펙트럼을 비교하고, acyl기의 흡광계수  $E_{acyl}$ 와 가시광선 영역의 최대 흡광계수  $E_{max}$ 와의 비율 즉  $E_{acyl}/E_{max}$ 의 비율 수치로 acyl화된 안토시아닌 분자 내에 존재하는 유기산의 대략적인 개수와 종류 알 수 있다고 보고하였다. 따라서  $E_{acyl}/E_{max}$ 의 비율 조사에 의해 acyl화 된 안토시아닌의 정성적 평가가 가능하다.
- ③ 유기산이 구조적으로 결합된 acyl화 안토시아닌은 표 3의 흡수 분광 특성의 차이를 참고하여 각각의 안토시아닌을 동정한다.

**Table 3.** UV-Vis. characterization of acylated anthocyanin.

Anthocyanidin	Glucoside form*	Organic acid (No.)	Absorbance peak (nm)	$E_{acyl}/E_{max}$ (%)
Pelargonidin	3G 5G	<i>p</i> -coumaric acid (1)	289, 313, 507	60
	3G 5G	caffeic acid (1)	285, 329, 507	48
	3X 5G	<i>p</i> -coumaric acid (1) ferulic acid (1)	289, 328, 509	92
Cyanidin	3DG 5G	ferulic acid (2)	282, 333, 530	88
	3G	<i>p</i> -coumaric acid (1)	284, 310, 527	64
Petunidin	3R 5G	<i>p</i> -coumaric acid (1)	282, 310, 538	71
Malvidin	3G 5G	<i>p</i> -coumaric acid (1)	280, 305, 536	64

\*G: monoglucoside, X: xyloside, DG: diglucoside, R: rhamnoside.

5) 비고

- (1) 분석할 식물재료를 장시간 상온에서 방치하면 갈변하거나 조금씩 퇴색되어 안토시아닌이 분해 되는 양상이 발생하므로 가능하면 빨리 추출하거나 냉동고에서 보관하는 것이 바람직하다.
- (2) 안토시아닌은 산성용액에서 안정한 화합물이므로 보통 추출에는 1% 염산-메탄올 혹은 1% 염산-증류수를 사용한다. 분석하고자 하는 식물체 부위가 잎이나 줄기처럼 체내 물 질합성이 이루어지는 기관일 경우에는 많은 대사 중간 생성물이 공존하고 있으므로 가능하면 1% 염산-증류수를 사용하고, 종피 혹은 과피처럼 최종 합성산물이 집적되는 기관일 경우에는 1% 염산-메탄올을 사용하여 추출한다.
- (3) 특히 복잡한 구조를 가진 안토시아닌과 미지의 안토시아닌을 제외하고는 여지크로마토그래피의 분리 양상과 흡수 스펙트럼의 측정에 의해 안토시아닌의 정성이 가능하다. 그러나 안토시아닌은 그 종류가 매우 다양하고 여지크로마토그래피상에서 같은 Rf치를 가지는 것이 있으므로 안토시아닌의 정성분석 시 여지크로마토그래피 분석의 Rf치만으로 동정하는 것은 바람직하지 못하며, 순수한 표준품과 Rf치의 상대적 비교가 반드시 필요하다. 또한 여지크로마토그래피와 흡수 스펙트럼의 특성 분석을 병행하면 안토시아닌의 정성분석은 보다 정확하게 수행될 수 있다.

## 2. HPLC를 이용한 안토시아닌의 정량분석

HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 안토시아닌의 분석은 재현성이 뛰어나고 정확하며, 정성 및 정량분석이 가능한 이점 때문에 최근 가장 많이 이용되는 안토시아닌 분석방법이다. 정량분석을 위해서는 먼저 분석하고자 하는 안토시아닌의 특성을 잘 알고 있어야 한다. 분석하고자 하는 안토시아닌의 화학적 구조 및 공존성분에 따라 분리도에 차이가 있고 사용되는 컬럼의 종류, 이동상의 종류에 따라서도 분리능에 많은 차이를 나타낸다. 일반적으로 안토시아닌을 분석하기 위해 사용되는 컬럼은 ODS(C<sub>18</sub>)계열의 컬럼들이 사용되며 이동상으로는 산을 첨가한 메탄올과 물의 혼합용매 혹은 산을 첨가한 아세토나이트릴 및 물의 혼합용매를 사용한다. 이동상에 산을 첨가하는 이유는 흡광력의 증대 및 분리 peak의 tailing(꼬리 끌림)현상을 억제하여 분리능을 향상시키기 위함이다.

앞에서 언급한 것처럼 안토시아닌은 일반적으로 자외선 영역(270-280 nm)과 가시광선 영역(510-530 nm)에서 흡수극대를 나타내므로 두 영역 중 어느 파장에서 검토되어도 무관하나 실제 가시광선 영역에서 최대 흡광영역을 나타내므로 검출기는 UV-VIS. 검출기 혹은 Diode array 검출기의 520 nm 범위에서 분석하는 것이 가장 바람직하다.

HPLC를 이용하여 안토시아닌의 정량분석을 실시할 경우 반드시 분석하고자 하는 안토시아닌의 분리 표준품이 준비되어 있어야 한다. HPLC를 이용한 정성, 정량분석은 분석 표준품의 머무름 시간(retention time, Rt)과 분석하고자 하는 시료 성분의 머무름 시간 비교에 의해서 분석 결과가 해석되어지므로 분석 표준품이 없이는 분석이 불가능하다. 아울러 사용하는 HPLC pump의 재현성에 따라 머무름 시간이 조금씩 차이가 날 수 있으므로 동일한 안토시아닌 성분이라 할지라도 머무름 시간의 차이를 나타낼 수 있으므로 경우에 따라서는 분석하고자 하는 시료에 특정 농도의 순수 표준품을 혼합하여 분석한 후 분석 시료의 peak와 표준품의 peak가 하나로 합쳐 지는지를 확인하는 peak test를 수행하여야 할 경우도 있다.

### 1) 장치 및 기구

- (1) 고속액체크로마토그래피(HPLC)
- (2) Micro syringe
- (3) 0.45 μm membrane filter
- (4) 1회용 주사기(10 ml)

### 2) 시약

- (1) 안토시아닌 표준품
- (2) HPLC용 Acetonitrile(ACN)
- (3) HPLC용 Methanol(MeOH)
- (4) HPLC용 3차 증류수
- (5) 개미산(Formic acid)



### 3) 조작

#### (1) 시료의 조제

- ① 분석시료 0.1-1 g에 1% 염산-증류수 10 ml를 첨가하여 4°C 조건의 저온고에서 1일간 방치하여 색소를 추출하고, 3회 반복하여 추출한다.
- ② 반복 추출된 색소는 혼합하여 여과지로 1차 여과를 수행하고, 다시 0.45  $\mu\text{m}$ 의 membrane filter를 이용하여 2차 여과를 실시한 후 20  $\mu\text{l}$ 를 HPLC에 주입하여 정량분석을 실시한다.

#### (2) 이동상의 조제

- ① 안토시아닌 분석에 사용되는 이동상 용매는 일반적으로 산을 함유한 메탄올 혹은 아세트나이트릴과 산을 함유한 물의 혼합용매를 이용한다.
- ② 이동상 용매 중 개미산의 농도를 5%로 조절하여 혼합용매를 가공한 후 여과, 탈기 등을 완전히 마친 후 사용한다.
- ③ 일반적으로 분석하고자 하는 안토시아닌의 구조가 mono- 혹은 di-glucoside일 경우 메탄올 농도를 약 15 - 25% 농도로 조절하여 이동상을 조제하면 좋은 분석 결과를 얻을 수 있다.

#### (3) 표준품의 조제

- ① 순수한 안토시아닌 표준품을 구입하여 사용하거나 분석자가 직접 분리하여 구조와 상대적 순도를 확인한 후 분석 표준품으로 사용하여야 한다. 최근 일부 구조가 간단한 안토시아닌의 표준품이 상업적으로 판매가 되기도 하나 종류가 워낙 다양하고 화학적 합성이 되지 않는 관계로 표준품을 구입할 수 없는 경우가 대부분이므로, 이 경우 실험자가 필요한 표준품을 직접 분리, 정제하여야 할 경우가 많다.
- ② 순수한 표준품은 HPLC용 메탄올 혹은 분석에 사용되는 이동상으로 용해하여 적정농도로 조제 한다. 만약 분석하고자 하는 안토시아닌이 여러 종류일 때는 농도별 혼합 표준품을 만드는 것이 정량분석 시 작업의 편의성을 도모해 줄 수 있다.
- ③ 안토시아닌은 수용성이므로 메탄올 및 물에 잘 용해되며 각 안토시아닌에 대해 1,000 ppm 수준의 stock solution을 조제한 후 사용 시 적정 농도로 희석하여 사용한다.
- ④ 조제된 안토시아닌 표준용액은 고온조건 및 빛에 의해 구조적 파괴가 수반되므로 분석 때마다 새롭게 희석하여 사용하고, 보관 시에는 빛이 없는 암흑상태로 -20°C 이하의 저온고에서 보관하여야 한다.

#### (4) HPLC 분석 조건

##### (가) 컬럼

- ① 안토시아닌 분석을 위한 HPLC 컬럼은 ODS( $\text{C}_{18}$ )계열의 컬럼이 많이 사용된다.
- ② 일반적으로 길이는 15-25 cm, 내경은 4.6 mm 수준, 입자크기는 5  $\mu\text{m}$  수준의 ODS( $\text{C}_{18}$ )계열 컬럼이면 안토시아닌 분석에 문제가 없다. 특별한 경우 컬럼의 높은 분리능을 요하는 경우도 있으나 Tosoh사의 ODS-120T(4.6×150 mm) 혹은 Waters사의 Nova-pak  $\text{C}_{18}$ (3.9×150 mm) 수준의 컬럼이면 분석에 무리가 없다.
- ③ 분석 컬럼의 보호를 위해 guard column의 장착이 필요할 경우 역시 분석 컬럼과 동일한 재질의 ODS( $\text{C}_{18}$ )계열 guard column을 사용하면 된다.

- ④ 각 분석용 컬럼은 용매를 이송시키는 방향이 있으므로 방향을 잘 검토하여 펌프에 연결한다.
- ⑤ 분석 시 컬럼의 온도는 상온에서 분석하여도 큰 문제가 되지 않으나 아침, 저녁으로 일교차가 심할 경우 머무름 시간이 변하고, 이에 따라 peak area 값이 변하게 되므로 기온차가 심하게 발생하는 장소에서는 컬럼 오븐을 이용하여 항온조건(25°C 수준)에서 분석을 실시한다.

(나) 펌프 및 유속

- ① 분석시료의 안토시아닌 조성이 비교적 간단할 때에는 특정 비율로 혼합된 용매만을 이송(Isocratic elution)하여 분석이 가능하나 조성이 복잡하고 극성의 차이가 다양한 안토시아닌이 혼재해 있을 경우에는 이동상의 농도구배(gradient elution)를 이용하여 분석하여야 한다.
- ② 유속은 펌프의 재현성이 있는 수준에서 분석하면 되지만 보통 0.7-1.0 ml/min.의 유속이 무난하다. 유속이 늦어지면 분석에 소요되는 시간이 길어지며 이론단수가 줄어들고, 반대로 유속이 빨라지면 분석에 소요되는 시간은 단축되나 분리능이 불량해지거나 컬럼에 과도한 압력이 발생하는 경우가 있으므로 주의한다.
- ③ 보통 시료 주입장치(injector)는 펌프에 장착이 되어 있거나 별도의 자동 시료주입기(auto sampler)를 이용하는데 반드시 시료주입기의 sample loop 용량을 확인하고 사용하도록 한다. 보통 시료주입량은 sample loop의 양보다 많은 양을 주입하고 함량을 계산할 때 시료의 주입량은 sample loop의 용량으로 계산하는 것이 일반적이다.

(다) 검출기

- ① HPLC를 이용하여 안토시아닌을 분석할 때 사용가능한 검출기는 여러 가지가 있으나 가장 많이 사용되는 검출기는 UV-VIS. 검출기 혹은 Diode array 검출기이다.
- ② UV-VIS. 검출기를 사용할 경우 분석 파장을 520 nm 부근의 단일파장에서 분석을 실시하는 것이 바람직하며, Diode array 검출기일 경우 520 nm 부근의 단일파장에서 분석하여도 되지만 분석 물질의 다양한 spectrum 정보를 얻기 위해서는 (On-line spectrum 분석) 200-700 nm의 영역으로 파장 범위를 설정하여 분석하는 것이 유리하다.
- ③ 분석을 실시하기 전에는 반드시 검출기의 흡광도가 안정된 상태에서 분석을 실시하여야 한다.

(5) 검량식의 작성 및 분석 시료 중 안토시아닌의 함량 계산

- ① 시료의 안토시아닌 분석에 앞서 순수한 표준품을 HPLC로 분석하여 각 안토시아닌의 머무름 시간을 확인하고, 농도별 표준품을 분석하여 각 안토시아닌의 정확한 검량식을 작성한다.
- ② 검량식은 최소 4 point 검량식(4개의 서로 다른 농도로 표준품을 분석하여 peak area를 계산)을 작성하여야 하고, 각 농도에 대해 3반복으로 분석을 실시한다.
- ③ 표준품의 농도별 분석이 완료되면 직선회귀공식에 의해 검량식을 제작하는데 상관계수 r 값이 1에 근접하는 정확한 검량식을 작성한다.

$$Y = aX + b$$

Y : HPLC에 주입된 표준품의 농도(ppm :  $\mu\text{g/ml}$ )

X : HPLC 크로마토그램에서 얻어진 표준품의 peak 면적 혹은 높이

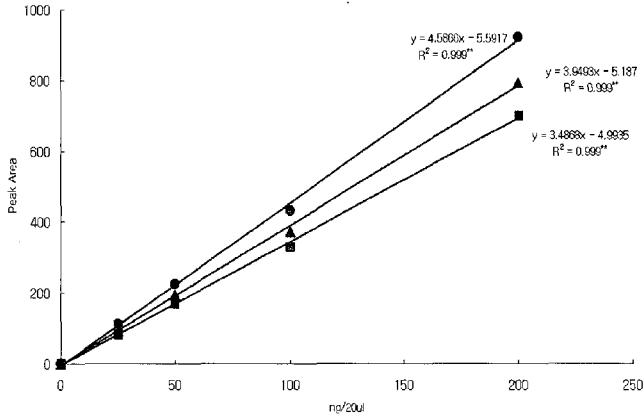


Fig. 2. Calibration curves of anthocyanin standard.

- ④ 분석하고자 하는 시료의 추출물을 HPLC로 분석하여 면적 혹은 높이를 계산하고 검량식에 대입하여 시료 주입량에 대한 분석시료의 함량을 계산한다. 그 후 추출 시료의 양, 회석배수를 환산하여 총 시료 량에 대한 함량을 계산해 준다. 일반적으로 분석 시료 g 당 mg의 함량으로 표현하는 것이 일반적이다.

$$\text{분석 시료 중 안토시아닌의 함량(mg/g)} = Y' \times \frac{V}{S}$$

Y' : 검량식에 대입하여 얻은 분석시료의 농도

V : 추출용액의 총 부피(ml)

S : 추출에 이용된 시료의 무게(g)

### 3. 분석결과

- 1) 여지크로마토그래피 및 흡수 스펙트럼 분석을 통한 검정콩 안토시아닌의 정성분석

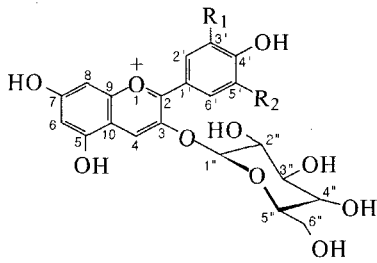
Table 4. Chromatographic and spectral properties of black soybean anthocyanins.

Anthocyanin	Rf value		UV-VIS. Characterization in 0.5% HCl-50% MeOH			
	FHW <sup>1)</sup>	BAW <sup>2)</sup>	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$E_{\text{uv}}/E_{\text{vis}}$	$E_{\text{acyl}}/E_{\text{vis}}$	$E_{440}/E_{\text{vis}}$
Delphinidin 3-glucoside	0.26	0.28	279, 530	71	11	27
Cyanidin 3-glucoside	0.44	0.38	282, 520	69	10	30
Petunidin 3-glucoside	0.36	0.35	279, 529	67	8	26

<sup>1)</sup> FHW : (HCOOH : HCl : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 2)

<sup>2)</sup> BAW : (n-butanol : HoAc : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 5, upper phase)

$E_{\text{uv}}$ , extinction coefficient of maximum absorption peak in UV region;  $E_{\text{vis}}$ , extinction coefficient of maximum absorption peak in visible region;  $E_{\text{acyl}}$ , extinction coefficient at 330 nm;  $E_{440}$ , extinction coefficient at 440 nm (Source: Choung *et al.*, 2001. J. Agric. Food Chem. 49: 5848-5851)



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Anthocyanin
1	OH	OH	D3G(C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> )
2	OH	H	C3G(C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> )
3	OCH <sub>3</sub>	OH	Pt3G(C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> )

Fig. 3. Chemical structures of anthocyanins in black soybean.

2) HPLC를 이용한 검정콩 안토시아닌의 정량분석

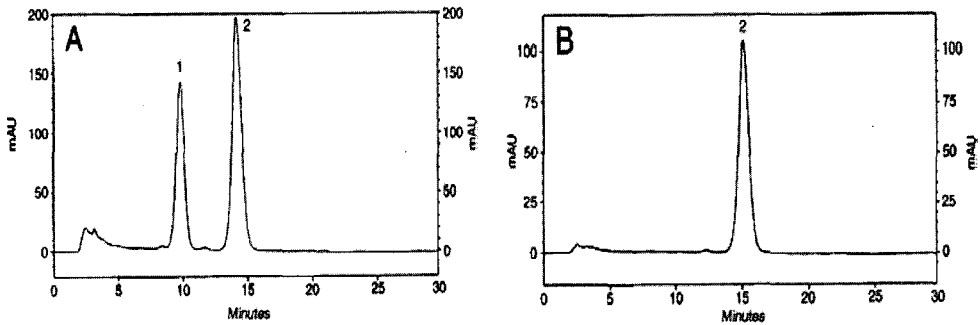


Fig. 4. HPLC chromatograms of anthocyanins obtained from Heugchong(A) and Geomjeong 1(B) (Source: Choung *et al.*, 2001. J. Agric. Food Chem. 49 : 5848-5851).

Table 5. Comparison of anthocyanin contents in black soybean varieties.

Variety	Anthocyanin content (mg/g)				
	D3G	C3G	Pt3G	Total	CV(%)
Heugchong	0.64	0.94	-	1.58	2.96
Gemjeong #1	-	4.50	-	4.50	3.61
Tawon	1.30	2.93	1.03	5.26	3.25
Tanbaguro	0.89	5.46	-	6.35	1.28
Cheongja	1.56	5.30	0.31	7.16	4.33
Peking	-	7.88	-	7.88	4.13
Milyang #95	1.98	6.45	1.41	9.83	4.05
Geomjeongol	2.78	7.36	0.47	10.62	3.57
IT 180220	3.71	14.80	0.30	18.81	3.22
YJ 100-1	3.21	15.98	0.99	20.18	3.35

(Source: Choung *et al.*, 2001. J. Agric. Food Chem. 49: 5848-5851)

## 참고문헌

1. Andersen, Ø.M., R.I. Viksund, and A.T. Pedersen. 1995. Malvidin 3-(6-acetylglucoside)-5-glucoside and other anthocyanins from flowers of *Geranium sylvaticum*. *Phytochemistry* 38 : 1513-1517.
2. Choung, M.G., I.Y. Baek, S.T. Kang, W.Y. Han, D.C. Shin, H.P. Moon, and K.H. Kang. 2001. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max(L.) Merr.*). *J. Agric. Food Chem.* 49 : 5848-5851.
3. Choung, M.G., B.R. Choi, Y.N. An, Y.H. Chu, and Y.S. Cho. 2003. Anthocyanin profile of korean cultivated Kidney bean (*Phaseolus vulgaris L.*) *J. Agric. Food Chem.* 51 : 7040-7043.
4. Fiorini, M. 1995. Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins. *J. Chromatogr. A.* 692 : 213-219.
5. Harborne, J.B. 1958. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* 70 : 22-28.
6. Kidø y, L., A. Nygard, Ø.M. Andersen, A.T. Pedersen, D.W. Aksnes, and B.T. Kiremire. 1997. Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. *J. Food Comp. Anal.* 10 : 49-54.
7. Mazza, G., and E. Miniati. 1993. Legumes. In *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. CRC Press, Inc. : Boca Raton, FL, pp 254-255.
8. Petri, G., U. Krawczyk, and A. Kery. 1997. Spectrophotometric and chromatographic investigation of bilberry anthocyanins for quantification purposes. *Microchem. J.* 55 : 12-23.
9. Wang, H., M.G. Nair, A.F. Iezzoni, G.M. Strasburg, A.M. Booren, and J. Gray. 1997. Quantification and characterization of anthocyanin in balaton tart cherries. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 2556-2560.
10. Ryu, S.N. 2000. Recent process and future of research on anthocyanin in crops. I. Rice, barley, wheat, maize and legumes. *Kor. J. Intl. Agri.* 12(1) : 41-53

## *Analysis of Anthocyanins*

***Myoung-Gun, Choung***

*Samcheok National University, Dept. of Pharmacognosy Material Development,  
Samcheok 245-711, Korea  
+82-33-570-6491, cmg7004@samcheok.ac.kr*