

# 유색미 함유 Cyanidin 3-glucoside 정량분석

한상준<sup>†</sup> · 류수노\* · 박순직\* · 김홍열\*\*

<sup>†</sup>서울대학교, \*한국방송통신대학교, \*\*농촌진흥청

## I. 서 언

안토시아닌은 식물계에 널리 분포하는 수용성 색소로 곡물, 과일, 채소 및 포도주 등에 함유되어 있다(Harborne and Grayer, 1988). 유색미의 흑자색도 안토시아닌에 기인하는데, 유색미에 함유된 안토시아닌은 cyanidin 3-glucoside(C3G), cyanidin 3-rhamnoside, malvidin 3-galactoside, peonidin 3-glucoside(P3G) 등이 알려져 있다(Ryu et al., 2003). 현재까지 국내에서 재배되고 있는 흑미에는 C3G와 P3G가 주요 성분으로 그 가운데 C3G의 함량이 다른 색소에 비해 특히 높은 것으로 보고되었다(Ryu et al., 1998). 기능성 성분으로서 C3G의 특성은 매우 잘 알려져 있다. 특히 그 구조적 특징에서 오는 강력한 항산화기능 중 ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity)에서 14종의 안토시아닌 가운데 C3G가 가장 높은 활성을 보였다(Wang et al., 1997). 또한 항돌연변이(Yoshimoto M et al., 2001), 항암기능(Wang and Mazza, 2002), 콜레스테롤 저하능력(Auger et al., 2001) 등 기타 다른 여러 분야에서 우수한 기능성들이 밝혀지고 있다.

C3G의 기능성은 “흑진주벼”와 같은 고C3G 품종의 육성을 가져왔고 또한 육종가들로 하여금 더 높은 함량의 품종육성을 위한 자극이 되고 있다. 그러나 그와 같은 연구를 하기 위해서는 안토시아닌 함량을 조사해야 한다. 유색미에 함유된 C3G의 함량은 HPLC를 이용하여 확인할 수 있는데, HPLC의 특성상 조사할 시료의 수가 증가하면 할수록 그 비용과 시간도 무시할 수 없을 만큼 증가하는 어려움이 따른다. Ryu 등(2003)은 UV-Vis Spectrophotometer를 이용하여 흑자색 유색미의 C3G 함량을 비교적 간편하게 조사할 수 있는 방법을 제시하였는데, HPLC를 이용한 방법에 비하면 10~30% 정도 함량이 높게 측정된다. 그러나 선발등과 같은 상대적 양을 평가하는 것이라면 비용과 시간의 절약을 위해 UV-Vis Spectrophotometer를 이용하여도 무방하리라 판단된다. 따라서 흑자색 유색미에 함유된 C3G 함량을 조사하는 방법으로 UV-Vis Spectrophotometer 법과 HPLC 법을 소개하고자 한다.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-02-740-8931 (E-mail) hsangjun@chollian.net

## II. 분석방법

### 1. 추출

#### 1) 장치, 기구 및 시약

- (1) 분쇄기
- (2) 교반기
- (3) 회전농축기
- (4) 50 ml 삼각플라스크
- (5) 50 ml 매스플라스크
- (6) 여과지(Whatman #2)
- (7) 추출용매 - 0.1% TFA-95% ethanol

#### 2) 조작

- (1) 잘 건조된 시료는 수집 후 가능한 냉장 보관한다.  
종자는 정조상태로 보관하고 분석시 필요한 양 만큼 현미로 만들고, 바로 분쇄하여 추출한다.
- (2) 분쇄된 시료 2g 을 50 ml 삼각플라스크에 넣고 추출용매 20ml를 가해 상온에서 교반기를 이용해 추출한다.
- (3) 추출이 끝난 플라스크의 추출액은 다른 용기에 조심스럽게 덜어낸 후 다시 추출용매 20ml를 가해 추가로 추출한다. 보통 3회 정도의 추출로 충분하나 함량이 매우 높은 품종은 추가로 추출해야하는 경우도 있다.
- (4) 추출액은 여과지(#2)를 이용해 여과시킨다. 여과지에 의한 손실을 최소화하기 위해 감압여과를 한다.
- (5) 여과액을 회전농축기를 이용하여 50ml 정도까지 농축한 후 정확히 50ml가 되게 정용한다. 이 때 온도는 상온을 넘지 않도록 주의한다.
- (6) 추출액은 바로 분석을 하며 부득이한 경우 빛이 들어가지 않도록 냉장보관하며 1일을 넘지 않도록 한다.

### 2. 표준검량선 작성

- 1) 표준품 C3G를 정확히 100 ppm(1 mg/10 ml 0.1% TFA-95% ethanol)이 되도록 평량하여 용해시킨다.
- 2) 1)을 75 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 5 ppm 등으로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액을 준비한다.
- 3) 2)에서 준비한 서로 다른 농도의 표준용액을 UV-Vis Spectrophotometer 530 nm에서 흡광도를 조사하고 HPLC로 분석하여 표준 검량선을 작성한다.
- 4) 3)에서 얻은 데이터를 이용해 두 개의 회귀식을 구한다.

### 3. C3G 함량 조사

#### 1) UV-Vis spectrophotometer

- (1) 1-나-(5)에서 준비한 추출액을 Whatman 0.45 µm PVDF syringe filter를 이용하여 여과한 후 530 nm에서 UV-Vis Spectrophotometer로 흡광도를 조사한다.
- (2) 조사된 흡광도를 2-(3)에서 얻은 UV-Vis Spectrophotometer용 회귀식을 이용해 농도(ppm)를 구한다.
- (3) (2)에서 구한 농도에 회석배수 50을 곱하면 시료(여기서는 종자 2 g)에 함유된 C3G 함량을 얻을 수 있다.

#### 2) HPLC

- (1) 3-가-(1)과 같이 각각의 추출액을 준비한다.
- (2) HPLC에 자동시료주입장치가 있을 경우는 (1)에서 준비되는 각각의 추출액을 vial에 담아 분석하고, 자동시료주입장치가 없을 경우는 각각의 샘플을 일일이 주사하여 분석한다.
- (3) HPLC를 이용한 C3G 분석조건 예시
  - 용매이송장치: Waters 515 pump,
  - 자동시료주입기: 717 plus autosampler
  - 검출기: 2996-PDA Detector
  - 컬럼: Develosil ODS-5 (4.6 mm×250 mm, Nomura Chemical, Japan)
  - 용매

A : 0.1% TFA-Water B : 0.1 % TFA-ACN

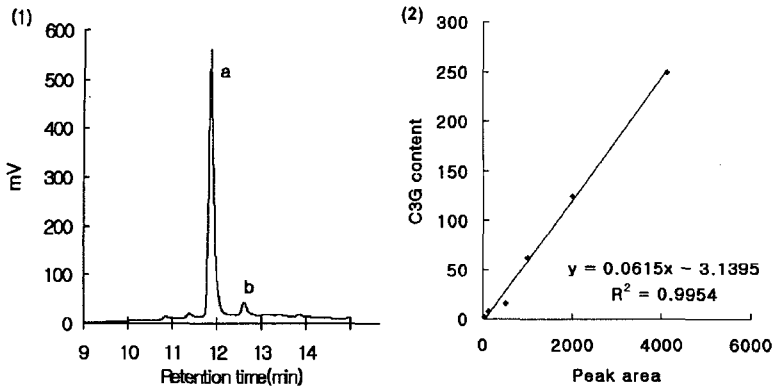
시 간(분)	유 속	A	B	기울기
초 기	1	100	0	*
12	1	60	40	6
14.5	1	0	100	6

#### 3) 결과해석

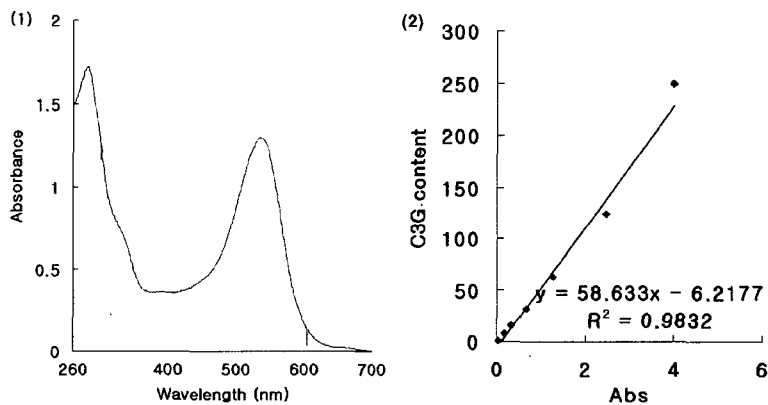
- (1) UV-Vis spectrophotometer로 구한 흡광도 및 HPLC 크로마토그램 상에 나타난 피크의 면적이 검량선 작성에 이용된 표준품의 농도 범위를 벗어나면 샘플을 추가로 희석하여 적정 범위내에서 분석이 이루어지도록 조절한 후 다시 분석한다.
- (2) UV-Vis spectrophotometer 및 HPLC를 이용하여 얻은 샘플의 C3G 함량은 표준 검량식을 이용하여 구한다.

#### 4) 비고

흑미에는 여러 종류의 안토시아닌 색소가 함유되어 있고 이들 색소는 모두 530 nm의 영역에서 흡광을 한다. 따라서 UV-Vis spectrophotometer를 통해 얻은 값은 C3G 뿐만 아니라 P3G 및 기타 극소량의 안토시아닌 색소들이 모두 포함된 것으로 C3G 단일 값이라고 판단할



**Fig. 1.** HPLC chromatogram of anthocyanin extracts of Heugjinjubyeo(1) and calibration curve prepared by plotting different concentration of standard C3G versus area measurements in HPLC (2). Peak identification as follow: (a) cyanidin 3-glucoside ( $R_t=11.83$ ); (b) peonidin 3-glucoside ( $R_t=12.60$ ).



**Fig. 2.** UV-Vis absorption spectra of anthocyanin extracts of Heugjinjubyeo (1), and calibration curve prepared by plotting different concentration of standard C3G versus absorbance intensity measurements at 530 nm (2).

**Table 1.** The difference of C3G content depending on the analytical instrument, UV-Vis spectrophotometer and HPLC.

Cultivar	Anthocyanin content (mg/100 g brown rice)			I-II
	UV-Vis (I)	HPLC (II)		
		C3G	P3G	
Heugjinjubyeo	592.0	417.2	5.9	169.1
Killimheugmi	591.4	407.4	6.8	177.2
Suwon425	192.3	153.2	4.4	34.7
Heugnambyeo	193.6	147.7	3.7	42.2
Sanghaehyanghyeolla	57.1	41.1	2.9	13.1

수는 없다. 다만 HPLC를 이용한 분석이 다소 번거롭고 비용이 많이 들기 때문에 선발등과 같은 상대적 크기를 비교하는데 있어서 대안으로 쉽고 빠르게 분석할 수 있다는 장점이 있어 소개한 것이다. 현재까지는 정확한 C3G 함량을 측정하기 위해서는 HPLC 이외에는 소개된 바가 없기 때문에 절대량을 조사하기 위해서는 HPLC를 이용하여야 한다.

## 참고문헌

1. Auger, C., B. Caporiccio, N. Landrault, P. L. Teissedre, C. Laurent, G. Cros, P. Besancon, and J. M. Rouanet. 2001. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic Golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Nutr. Metab.* 13(1) : 2837-2842.
2. Harborne, J. B. and R. J. Grayer. 1988. in: *The Flavonoids* (Harborne, J.B. Ed.), pp 1-20, Chapman and Hall, London.
3. Ryu, S. N., S. Z. Park, and C. T. Ho. 1998. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. *J. Food and Drug Analysis* 6(4) : 729-736.
4. Ryu, S.N., S.Z. Park, S.S. Kang, and S.J. Han. 2003. Determination of C3G content in blackish purple rice using HPLC and UV-Vis spectrophotometer. *Korean J. Crop Sci.* 48(5) : 369-371.
5. Wang, H., G. H. Cao, and R. L. Prior. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 3362-3367.
6. Wang J., and J. Mazza. 2002. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric. Food Chem.* 50 : 4183-4189.
7. Yoshimoto M., S. Okuno, M. Yamaguchi, and O. Yamakawa. 2001. Antiutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 : 1652-1655.

## *Analysis of Cyanidin 3-glucoside in Blackish Purple Rice*

***Sang-Jun Han<sup>†</sup>, Su-Noh Ryu\*, Sun-Zik Park\* and Hong-Yeol Kim\*\****

<sup>†</sup>*Seoul Nat'l univ., Institute of Natural Products, Seoul 110-460, Korea*

*\*Korea National Open Univ., Agricultural sci., Seoul 110-791, Korea*

*\*\*Rural Development Administration, Suwon 441-857, Korea*

*+82-2-740-8931, hsangjun@chollian.net*