

<연구논문(학술)>

Fe(II)와 Cu(II)에 의해 킬레이트화 된 수수추출물 함유 바이오플라스틱의 색상 안정성

이가현 · 이성준 · 정상원 · 김현철 · 최진현¹ · 배도규¹ · 한상익² · 이세근[†]

대구경북과학기술원 나노바이오연구부, ¹경북대학교 바이오섬유소재학과, ²국립식량과학원 기능성작물부

Color Stability of the Bioplastic containing Sorghum Extract Chelated by Fe(II) and Cu(II)

Ga Hyun Lee, Sung June Lee, Sang Won Jeong, Hyun-Chul Kim,
Jin Hyun Choi¹, Do Gyu Bae¹, Sang Ik Han² and Se Geun Lee[†]

Nano and Bio Research Division, Daegu Gyeonbuk Institute of Science and Technology, Daegu, Korea

¹Department of Bio-fibers and Materials Science, Kyungpook National University, Daegu, Korea

²Department of Functional Crop, National Institute of Crop Science, Milyang, Korea

(Received: August 25, 2014 / Revised: September 15, 2014 / Accepted: December 19, 2014)

Abstract: To improve the color stability of the bioplastic containing sorghum extract, sorghum extract was chelated by a metal ion. The chelating activity was quantitatively evaluated under the various conditions. Chelation of sorghum extract by Cu(II) was determined by reaction with pyrocatechol violet, whereas Fe(II) chelation was investigated by forming complexes with ferrozine. Chelation of sorghum extract was increased rapidly with increasing concentrations of metal salt and sorghum extract. At a 0.1g/L metal salt addition level, the chelating activity of Fe(II) and Cu(II) were 66.7% and 54.2%, respectively. According to the chelation pH conditions, the sorghum extract was chelated almost 100% by Fe(II) above the pH 6.5. It was confirmed that Fe(II) was a strong chelator of sorghum extract than Cu(II). The sorghum extract chelated with metal salt exhibit higher thermal stability. The bioplastic containing chelated sorghum extract showed relatively less color change than the control.

Keywords: sorghum extract, chelation, metal salts, color stability, bioplastic

1. 서 론

최근 합성색소의 유해성이 끊임없이 제기되면서 유용한 천연색소에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 천연색소의 항균 및 항산화 활성 등 기능성에 대한 검증이 지속적으로 진행 중에 있다. 식물의 열매, 꽃, 과식, 줄기, 잎, 뿌리 등에 폭넓게 함유되어 있는 천연색소들은 폐놀계 화합물이 주를 이루고 식물마다 다양한 구조로 존재한다¹⁾.

천연색소들은 생물학적 기능성 및 안전성을 가져 다양한 분야에서 각광 받고 있으나 일광, pH, 온도 등의 외부 변화에 매우 불안정하여 다양한 산

업적 이용이 제한적이다²⁻⁴⁾. 이러한 색소의 안정성을 향상시키기 위하여 유기산을 첨가하여 색소의 pH를 낮추거나, 금속염을 첨가하는 방법⁵⁾, copigmentation에 의한 방법 등이 알려져 있다^{6,7)}.

특히 금속염을 첨가하는 방법을 통해 안정성을 향상시킨 색소의 경우 응용 분야가 섬유에 국한되어 있거나 최적의 안정성을 구현하기 어려워 산업적인 활용이 제한되어 있다. 또한 최적 조건을 찾기 위해 금속이온의 킬레이트화 반응 효율을 정량하는 것이 쉽지 않다. 금속이온 정량에는 분광광도법⁸⁾, 분광형광법⁹⁾, FAAS¹⁰⁾, ET-AAS¹¹⁾, ICP-AES¹²⁾, ICP-MS¹³⁾, 전위차법¹⁴⁾, 그리고 이온 크로마토그래피¹⁵⁾ 등이 사용되고 있으며, 이 중 ET-AAS와 ICP-MS은 농도를 직접 측정할 수 있으나 기기가 복잡하고 비싸며, 유지비도 많이 들고, 분석시간도 오래 걸릴

[†]Corresponding author: Se Geun Lee (sklee@dgist.ac.kr)

Tel.: +82-53-785-2520 Fax.: +82-53-785-3559

©2015 KSDF 1229-0033/2015-3/62-69

뿐만 아니라 또 다른 분석적 방해가 생기기도 한다¹⁶⁾. 또한 이러한 방법들은 주로 단일 물질에 적용되어 왔다.

그러나 본 연구는 분광광도계를 사용하여 손쉽게 정량할 수 있는 방법을 사용하여 여러 가지 성분이 혼재되어 있는 천연추출물에 적용하여 킬레이트화 반응 효율을 평가하였다.

수수(Sorghum, *Sorghum bicolor* L. Moench)는 외떡잎식물 벼목 화본과의 한해살이풀로 phenolic compound인 플라보노이드, 탄닌, 페놀산 등을 포함하고 있다. 수수는 대규모 가공 시 대부분 껍질을 제거하여 사용하기 때문에 수수 껍질에 존재하는 천연색소를 추출, 분리하여 사용한다면 천연색소로서의 가치뿐만 아니라 폐자원의 활용도 증진 면에서도 그 의의가 대단히 커질 것으로 기대되어 최근 수수의 기능성 및 활용에 관한 연구들이 많이 보고되고 있다¹⁷⁻²⁰⁾.

본 연구에서는 수수추출물의 안정성 향상을 위해 금속이온에 의해 킬레이트화 시키고 킬레이트 반응 효율을 손쉽게 정량함으로써 최적 조건 설정을 용이하게 하였다. 또한 킬레이트화 된 수수추출물을 플라스틱에 도입하여 색상 안정성이 향상된 바이오플라스틱 소재로의 적용 가능성을 검토하였다.

2. 실험

2.1 시료 및 시약

본 연구에 사용된 수수는 강원도 원주 지방에서 생산된 수수를 도정하여 얻어지는 껍질을 분리하여 시료로 사용하였다.

Ferrous Sulfate heptahydrate($Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$), Copper(II) sulfate pentahydrate($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Ferrozine(3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt), pyrocatechol violet, Poly(ethylene glycol)(PEG) (Mw 600)는 sigma-aldrich에서 구매하였다. Cellulose acetate(Mw 50,000, DS=2.5)는 Eastman에서 공급되었으며 그 외의 시약들은 정제하지 않고 1급 시약을 그대로 사용하였다.

2.2 수수 색소 추출

추출 용매로 증류수를 사용하였으며 수수껍질을 액비 1:100으로 40°C, 24시간 동안 추출한 후 evaporation(Tokyo Rikakikai Co. Ltd., EYELA,

N-1110S)에 의해 물을 증발시킨 후 동결건조(ilShinbiobase Co. Ltd., TFD Series)하여 분말을 수득하였다.

2.3 금속염에 의한 수수추출물 킬레이트화

금속염으로는 $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 를 사용하였다. 수수추출물을 1~5% 농도로 물에 녹인 후 금속염의 농도를 0.1~10mg/L로 첨가하여 40°C에서 2시간 반응 후 물을 증발시키고 동결 건조하여 분말을 수득하였다.

2.4 수수추출물 킬레이트화 반응의 정량적 평가

수수추출물의 Cu(II)에 의한 킬레이트화 정도를 pyrocatechol violet을 이용하여 정량하였다. 다양한 조건으로 킬레이트화 된 수수추출물 용액 3ml에 1mM pyrocatechol violet을 첨가하고 10분간 상온에서 방치한 후 UV-visible spectrometer를 사용하여 632nm에서 확인하였다. 또한 Fe(II)의 경우 수수추출물 용액 3ml에 10mM의 ferrozine을 첨가하고 10분 후 562nm에서 흡광도를 확인하였다. 킬레이트화 효율은 식(1)에 의해 계산하였다²¹⁾.

$$\{(\text{Blank absorbance} - \text{Sample absorbance}) / \text{Blank absorbance}\} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

2.5 킬레이트화 된 수수추출물의 열적특성 평가

금속이온에 의해 킬레이트화 된 수수추출물의 열적특성의 변화를 확인하기 위하여 열 중량 분석(TGA, thermogravimetric analysis, TA Instruments, SDT Q600)을 실시하였다. 질소분위기에서 ~600°C 까지 10°C/min의 승온 속도로 가열하여 가열감량곡선을 확인하였다.

2.6 수수추출물 도입 플라스틱 제조

상기 방법으로 킬레이트화 된 수수추출물을 함유하여 바이오플라스틱을 제조하였다. Cellulose acetate (CA) 40g에 가소제로써 polyethyleneglycol(PEG)를 12g을 혼합한 후 킬레이트화 된 수수추출물을 0.3% 농도로 첨가하여 230°C에서 4분간 가열 후 몰더(BauTech, Mini molder, Ba-915A)에 주입하여 가로 10mm, 세로 65mm, 두께 3mm의 바이오플라스틱 시편을 제조하였다.

2.7 수수추출물 도입 플라스틱 색상안정성 평가

수수추출물 함유 바이오플라스틱을 UV(4×10^3 J/s, 254nm)하에 UV와의 거리 30cm, 240시간 방치 후 색상변화를 색차계(CCM, Computer Color Matching, Konica Minolta Inc., Chroma Meter CR-400)를 통해 측정하여 UV에 대한 색상안정성을 평가하였다.

색상측정을 위해 색차계 광학부에 흡광통을 놓고 영점조정을 한 후 표준 백색판을 사용하여 표준조정을 하였고 영점조정과 표준조정이 끝난 후 시편을 광학부에 밀착시키고 색상을 측정하였다. 이때 색상측정은 시편 중 무작위로 3점을 선택하여 L, a, b 값을 측정하였다. 색차계는 spectral sensor 방식의 측정경 3mm를 가지며 표준광원으로 D65 광원을 사용하고 시야각은 2° 로 하였다.

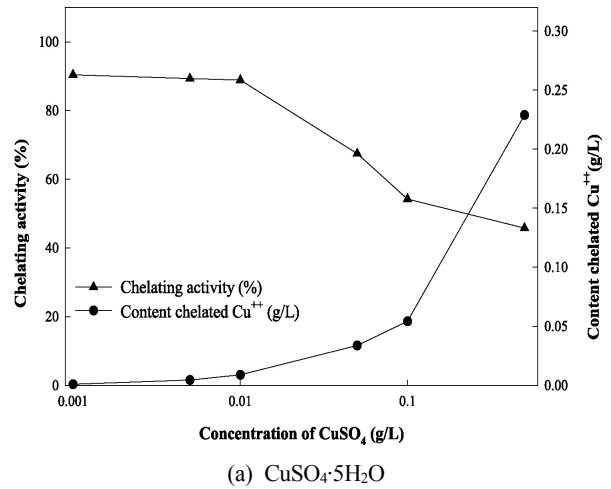
3. 결과 및 고찰

3.1 수수추출물의 킬레이트화

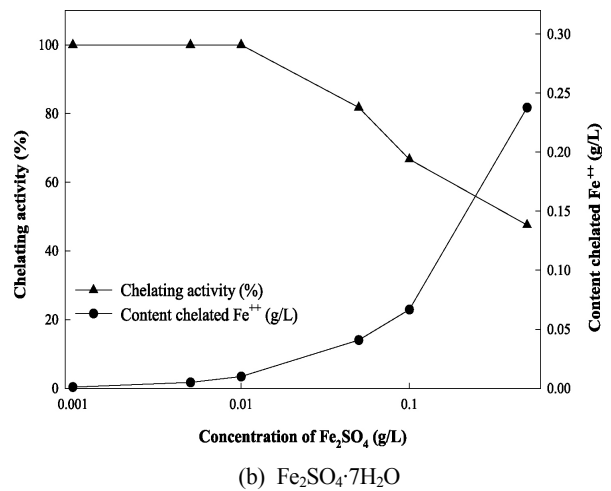
금속 이온에 의한 수수추출물의 킬레이트화 효율을 알아보기 위해 금속염의 농도, pH, 수수추출물의 농도를 변화시켜 킬레이트화 반응을 실시하였다.

Cu(II)에 의한 수수추출물의 킬레이트화 효율은 pyrocatechol violet에 의해 측정되었다. 수수추출물과 킬레이트화 되지 않은 Cu(II)은 pyrocatechol violet과 결합하여 푸른색을 띠는 complex를 형성하여 632nm에서 최대흡수파장을 나타내게 된다. 따라서 수수추출물과 complex를 형성하지 않고 남아있는 Cu(II) 양을 측정할 수 있다. 투입된 Cu(II) 양과 수수추출물과 결합하지 않고 남아있는 Cu(II)의 양을 비교하여 Cu(II)의 킬레이트화 효율을 정량할 수 있다.

수수추출물의 농도를 1%로 고정하고 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 0.001~0.5g/L의 농도로 투입하였을 때 0.01g/L의 농도로 투입된 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 에 대해 90% 이상의 Cu(II)가 수수추출물과 결합하였으며 0.05g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 투입한 경우 투입 양에 비해 반응한 Cu(II)의 비율은 낮으나 수수추출물과 결합한 금속이온의 양은 점점 증가하여 0.2g/l 이상이 수수추출물과 complex를 형성한 것을 Figure 1(a)에 나타냈다. 또한 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 0.01%로 고정하고 수수추출물의 농도를 0.1~5g/L로 반응시킨 결과 Figure 2에 나타낸 것과 같이 수수추출물의 농도가 높아짐에 따라서 킬레이트화 효율이 높아



(a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



(b) $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Figure 1. Effect of metal salt concentration on the chelating activity.

지며 5g/l의 수수추출물에 대하여 투입한 Cu(II)의 95%까지 반응 효율을 보였다. 같은 양의 Cu(II)에 대해서 수수추출물의 농도에 따라서 킬레이트화 효율이 6%에서 95%까지 높아짐을 알 수 있다.

Figure 3에 나타낸 pH에 의한 킬레이트화 효율은 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 0.01%, 수수추출물의 농도를 1%로 고정하고 pH를 변화시키면서 측정한 결과 pH 5.5에서만 50% 이상 반응하였고 pH 6.5 이상에서는 40% 이하의 낮은 킬레이트화 효율을 나타내었다. 반면 Fe(II)의 킬레이트 효율은 ferrozine을 사용하여 평가하였다. Ferrozine은 Fe(II)과 결합하여 붉은색의 매우 안정한 complex를 형성하고 562nm에서 최대흡수파장을 나타낸다.

$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0.001~0.5g/L의 농도로 투입한 결과 Figure 1(b)에서와 같이 Cu(II)와 유사한 경향을 나타

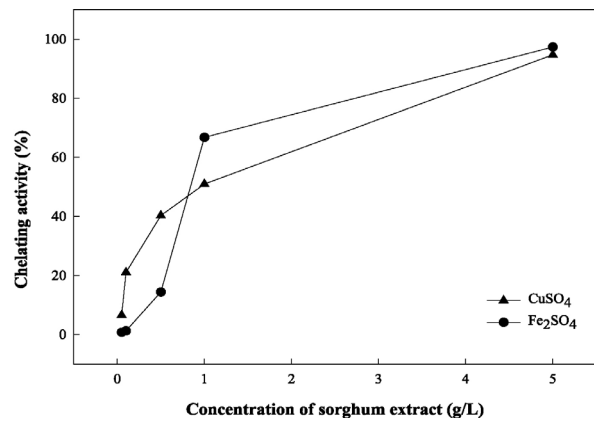


Figure 2. Effect of sorghum extract concentration on the chelating activity.

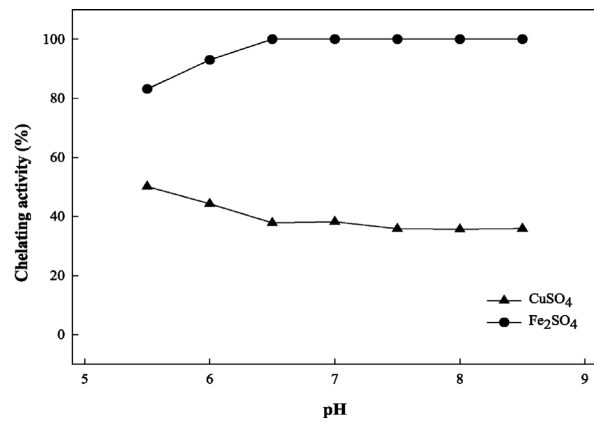


Figure 3. Effect of pH on the chelating activity.

내는 것을 알 수 있다. Fe₂SO₄·7H₂O를 0.01g/L 농도까지 첨가하였을 경우 첨가한 금속이온이 전부 반응하였으며 0.05g/L Fe₂SO₄·7H₂O를 투입한 경우 0.2g/l 이상이 수수추출물과 complex를 형성한 것으로 나타난다. 수수추출물의 농도에 따른 킬레이트화 효율도 수수추출물의 농도에 따라 95% 이상까지 높아지고 있음을 알 수 있다.

pH의 변화에 따라서는 Cu(II)와 달리 pH 6.5 이상에서 매우 높은 킬레이트화 효율을 나타내고 있음을 Figure 3에서 알 수 있다. 이러한 phenolic compound와 금속이온 간의 킬레이트화 반응은 수수추출물 내에 존재하는 phenolic compound의 구조²²⁾에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

Figure 4에서 나타낸 수수추출물에 주로 존재하는 phenolic compound 내에는 Fe(II) 및 Cu(II)와

같은 금속 이온이 결합 될 수 있는 리간드가 존재하여 금속 이온과 phenolic compound complex를 형성 한다. 금속 이온은 phenolic compound 내의 중심 aromatic ring에 결합하기보다 중심 aromatic ring에 연결된 catecol group(o-dihydroxyphenyl group)에 주로 결합한다. 반면 측쇄에 glycoside가 존재하면 킬레이트화를 방해하는 역할을 한다. Phenolic compound 내의 catecol group은 금속이온이 결합되는 사이트로서 ortho-methoxy 또는 ortho-hydroxy를 많이 가질수록 높은 킬레이트화 효율을 가지게 된다^{23,24)}.

Phenolic compound 구조 이외에 킬레이트화 효율에 영향을 주는 인자에 대해 Kumamoto²⁵⁾는 phenolic compound의 해리 상수와 연관이 있다고 하며 이에 따라 pH에 영향을 받는다고 서술하고 있다. 이러한

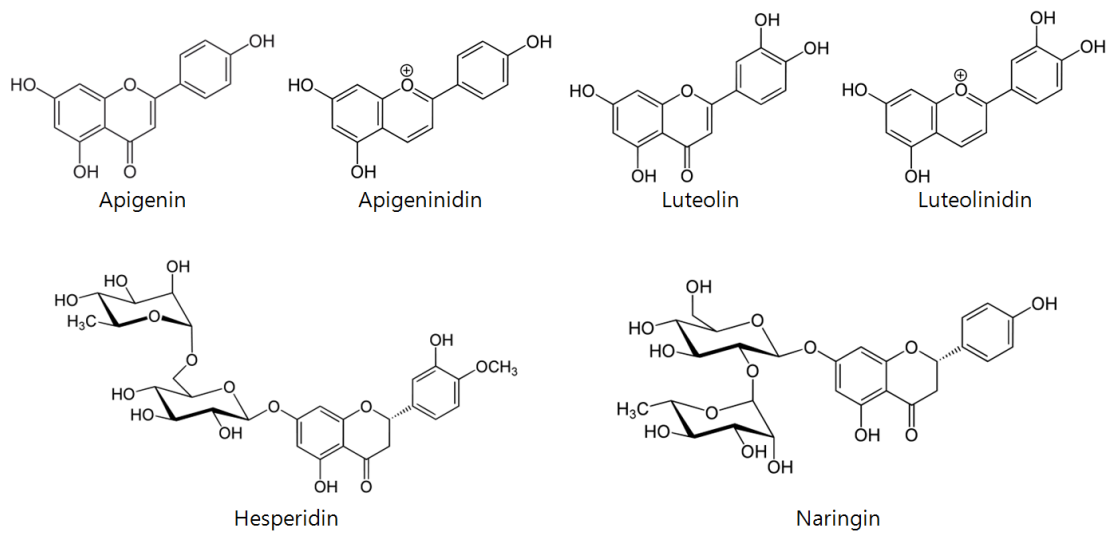


Figure 4. Structure of phenolic compound in sorghum extract.

현상들은 단일 성분일 때 적용 가능하여 수수추출물과 같이 여러 가지 phenolic compound가 혼재되어 있을 경우에도 적용 가능한지는 더 많은 연구가 요구된다.

따라서 수수추출물의 킬레이트화 거동을 예측하기가 어렵기 때문에 이를 정량할 수 있는 방법이 필요하다. 또한 금속 이온과 phenolic compound가 complex를 형성할 경우 매우 안정하며 물을 비롯한 acetic acid 등 용매 내에서도 용해성이 매우 낮은 안정한 침전물이 형성되는 것으로 나타났다²⁶⁾. 이에 따라 수수추출물을 Fe(II) 및 Cu(II)에 의해 킬레이트화 시킴으로써 수수추출물의 안정성 향상에 효과적으로 적용할 수 있을 것이다.

3.2 킬레이트화 된 수수추출물의 열적특성

수수추출물을 플라스틱 소재로 적용하기 위해서는 플라스틱 성형 시 고온 공정 내에서의 열적 안정성이 중요하다.

금속염의 농도 0.01%, 수수추출물의 농도 0.1%로 킬레이트화 한 수수추출물의 열적특성 평가를 위한 TGA 측정 결과를 Figure 5에 나타내었다.

100~500℃ 사이에서 금속이온으로 킬레이트화 된 수수추출물의 무게 감소율이 더 적은 것으로 나타났다. 특히 고분자의 성형 온도인 200~230℃에서 무게 감소율은 킬레이트화 되지 않은 수수추출물에 비해 약 6% 정도의 무게 감소율이 적게 나타나 230℃까지는 수수추출물의 분해가 거의 일어나지 않은 것을 알 수 있다. 수수추출물이 Fe(II) 및 Cu(II)와 complex를 형성하여 열안정성이 향상된 것으로 보인다.

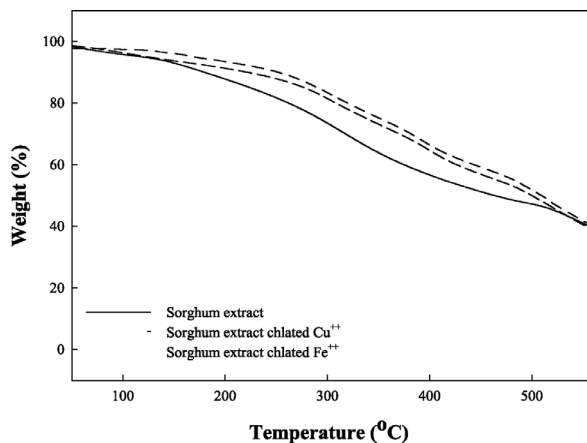


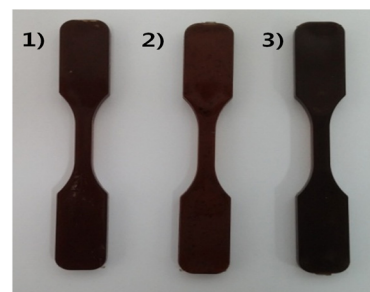
Figure 5. TGA diagram of sorghum extract chelated metal ion.

3.3 수수추출물 함유 플라스틱의 색상안정성

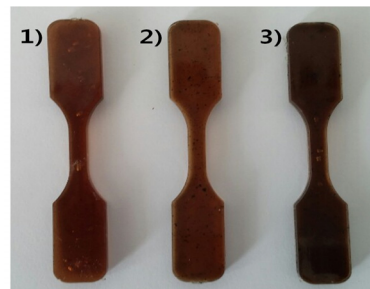
수수추출물을 다양한 방면에 적용하기 위해서는 일광, pH, 온도 등 외부변화에 대한 견뢰도가 요구된다. 특히 천연색소의 경우 일광에 약해 플라스틱으로의 응용에 제한적이다. 따라서 금속이온에 킬레이트화에 의해 안정성이 향상된 수수추출물을 제조하여 바이오플라스틱에 도입하여 일광에 대한 색상안정성을 평가하였다.

Cellulose acetate(CA)는 풍부한 바이오매스 기반 고분자 원료로 재생성과 생분해성이 있어²⁷⁾ 고부가가치 바이오플라스틱 소재로 널리 사용되고 있으므로 이를 원료로 사용하였다. 또한 가소제로써 유해성이 대두되고 있는 프탈레이트계 가소제를 대신하여 인체 친화성 고분자인 polyethylene glycol(PEG)를 도입하여 수수추출물 함유 바이오플라스틱을 제조하였다.

Figure 6(a)에 수수추출물 첨가하여 제조한 바이오플라스틱을 나타내었다. 수수추출물의 진한 갈색을 띠는 아령형 시료를 제조하였다. 제조된 시료의 일광에 대한 안정성을 알아보기 위해 거리 30cm 위치에서 UV를 240시간 동안 조사한 후 색상변화를



(a) before UV irradiation



(b) after 240hr UV irradiation

Figure 6. Photographs of bioplastic containing sorghum extract by UV irradiation: 1) sorghum extract, 2) sorghum extract chelated Cu(II), 3) sorghum extract chelated Fe(II).

육안으로 관찰한 결과 Figure 6(b)에 제시하였다.

킬레이트화 되지 않은 수수추출물 및 Cu(II)에 의해 킬레이트화 된 수수추출물을 함유한 바이오플라스틱의 경우 변색이 일어난 것을 관찰할 수 있다. 반면 Fe(II)에 의해 킬레이트화 된 수수추출물을 함유한 바이오 플라스틱은 육안으로 관찰하였을 때 색상변화가 눈에 띄게 나타나지 않은 것을 알 수 있다.

이러한 색상 변화를 정량적으로 나타내기 위해 색차계 측정을 실시하였다. UV 조사에 의한 변색을 파장에 따른 반사율 변화에 따라 측정 된 L, a, b 값을 다음 식(2)에 의해 색차 값인 ΔE를 계산하였다.

$$\Delta E = \{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2\}^{1/2} \dots \dots \dots (2)$$

L은 white와 black 정도를 나타내고, a는 red와 green 정도를 나타내며 b는 yellow와 blue의 정도를 나타낸다. ΔE값이 1보다 큰 경우 육안으로 색상 변화 인지가 가능한 수준이고, ΔE값이 3보다 작은 경우 천연색소가 함유 된 소재로서 응용이 가능한 것으로 알려져 있다.

각 시료의 ΔE값을 Figure 7에 나타내었다. 킬레이트화 되지 않은 수수추출물과 Cu(II)에 의해 킬레이트화 된 수수추출물을 함유한 바이오플라스틱의 경우 ΔE값이 각각 6, 5를 나타내어 광에 의한 변색이 일어났음을 알 수 있었으며 Fe(II)에 의해 킬레이트화 된 수수추출물을 함유한 바이오플라스틱의 경우 UV 조사 전·후의 색차 값이 2.5를 나타내어 다른 시료에 비해 색상 변화가 적은 것을 알

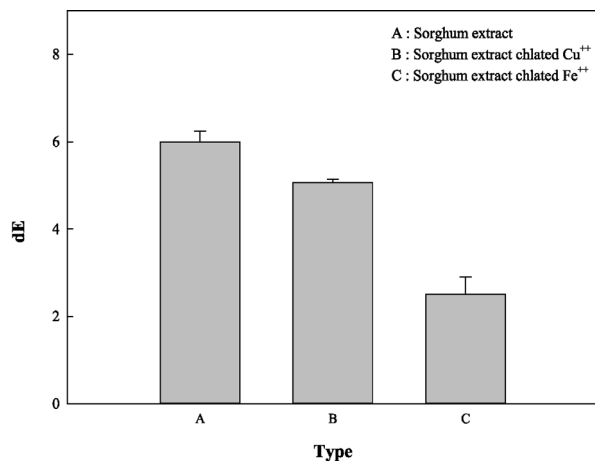


Figure 7. ΔE of bioplastic containing sorghum extract by UV irradiation.

수 있다. 다양한 조건에 의한 킬레이트화 효율이나 열적안정성에 있어서는 Cu(II) 및 Fe(II)의 거동이 유사하게 나타났으나 일광에 의한 색상 안정성에 있어서는 Fe(II)에 의해 킬레이트화 된 수수추출물이 높은 색상안정성을 나타내고 있는 것을 알 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 수수추출물의 안정성 향상을 위하여 금속이온에 의해 킬레이트화 시키고 킬레이트 반응 효율을 손쉽게 정량함으로써 최적 조건 설정을 용이하게 하고자 하였다.

각각의 금속염은 Cu(II)는 pyrocatechol violet에 의해 Fe(II)는 ferrozine에 의해 형성된 complex를 UV-visible spectrometer 측정을 통해 투입 된 금속염 대비 킬레이트화 효율을 정량하는 것이 가능하다. 금속염의 농도가 높아질수록 수수추출물과 반응하는 금속염의 양이 많아지며, 수수추출물의 농도가 높아짐에 따라 킬레이트화 효율이 현저하게 향상되는 것을 알 수 있다.

pH의 변화에 따라서는 킬레이트화 효율에는 큰 영향을 미치지 않는 않지만 Cu(II)에 의한 킬레이트화 효율이 50% 정도로 나타나고 있다. 수수추출물과 같이 여러 가지 phenolic compound가 혼재 되어 있을 경우 킬레이트화 거동을 예측하는 것이 어렵기 때문에 킬레이트화 효율을 손쉽게 정량하는 방법은 매우 용이하게 사용 될 것으로 기대된다. 또한 금속이온으로 킬레이트화 된 수수추출물은 안정성 향상에 있어서도 효과를 나타내어 이를 바이오플라스틱에 함유하여 색상안정성을 평가한 결과 Fe(II)에 의해 킬레이트화 된 수수추출물을 함유한 바이오플라스틱의 경우 색차 값이 2.5이하로 킬레이트화 되지 않은 수수추출물에 비해 색차 값이 매우 낮아지는 것을 알 수 있다.

따라서 이를 이용하여 일광에 안정한 천연색소를 함유한 바이오플라스틱 소재를 다방면에 응용하는데 효과적으로 적용될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(천연색소 안정화, 색상고정화 및 대량 생산기술 개발 PJ00920403) 및 미래창조과학부 대구경북과학기술원의 기관고

유사업(14-NB-01)으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

References

1. P. Bridle and C. F. Timberlake, Anthocyanins as Natural Food Colours-selected Aspects, *Food Chemistry*, **58**(1), 103(1997).
2. F. J. Francis and P. C. Markakis, Food Colorants: Anthocyanins, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **28**(4), 273(1989).
3. M. Choi, D. I. Yoo, and Y. Shin, Pretreatment Process for Production of the *Gromwell Colorants Powder*, *Textile Coloration and Finishing*, **24**(1), 18(2012).
4. K. Y. Nam and J. S. Lee, Dyeing Properties and Functionality of Hot-water Extract from *Juniperus Chinensis* Heartwood, *Textile Coloration and Finishing*, **25**(3), 181(2013).
5. Y. S. Jung and D. G. Bae, Chelation of Tannin from Sorghum Extract by Fe(II), Proceedings of the Korean Society of Dyers and Finisher Conference, Daegu, Vol.25, p.34, 2013.
6. P. Markakis and L. Jurd, Anthocyanins and their Stability in Foods, *Critical Reviews in Food Technology*, **4**(4), 437(1974).
7. G. Mazza and R. Brouillard, Recent Developments in the Stabilization of Anthocyanins in Food Products, *Food Chemistry*, **25**(3), 207(1987).
8. D. Vendramini, V. Grassi, and E. A. G. Zagatto, Spectrophotometric Flow-injection Determination of Copper and Nickel in Plant Digests Exploiting Differential Kinetic Analysis and Multi-site Detection, *Analytica Chimica Acta*, **570**(1), 124(2006).
9. A. B. Tabrizi, Development of a Cloud Point Extraction-spectrofluorimetric Method for Trace Copper(II) Determination in Water Samples and Parenteral Solutions, *J. of Hazardous Materials*, **139**(2), 260(2007).
10. A. M. H. Shabani, S. Dadfarnia, and Z. Dehghani, On-line Solid Phase Extraction System Using 1,10-phenanthroline Immobilized on Surfactant Coated Alumina for the Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Copper and Cadmium, *Talanta*, **79**(4), 1066(2009).
11. M. A. Belarra, C. Crespo, M. Resano, and J. R. Castillo, Direct Determination of Copper and Lead in Sewage Sludge by Solid Sampling-graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry Study of the Interference Reduction in the Gaseous Phase Working in Non-stop Flow Conditions, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **55**(7), 865(2000).
12. E. L. Silva, P. S. Roldan, and M. F. Gine, Simultaneous Preconcentration of Copper, Zinc, Cadmium, and Nickel in Water Samples by Cloud Point Extraction Using 4-(2-pyridylazo)-resorcinol and Their Determination by Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry, *J. of Hazardous Materials*, **171**(1), 1133(2009).
13. T. Kagawa, M. Ohno, T. Seki, and K. Chikama, Online Determination of Copper in Aluminum Alloy by Microchip Solvent Extraction Using Isotope Dilution ICP-MS Method, *Talanta*, **79**(4), 1001(2009).
14. M. Lin, M. Cho, W. Choe, Y. Son, and Y. Lee, Electrochemical Detection of Copper Ion Using a Modified Copolythiophene Electrode, *Electrochimica Acta*, **54**(27), 7012(2009).
15. W. Zeng, Y. Chen, H. Cui, F. Wu, Y. Zhu, and J. S. Fritz, Single-column Method of Ion Chromatography for the Determination of Common Cations and Some Transition Metals, *J. of Chromatography A*, **1118**(1), 68(2006).
16. H. N. Lee and H. S. Choi, Determination and Preconcentration of Cu(II) Using Microcrystalline p-Dichlorobenzene Loaded with Salicylaldehyde, *J. of Analytical Science and Technology*, **23**(3), 240(2010).
17. H. R. Grimmer, V. Parbhoo, and R. M. McGrath, Antimutagenicity of Polyphenol-rich Fraction from Sorghum Bicolor Grain, *J. of the Science of Food and Agriculture*, **59**(2), 251(1992).
18. H. Y. Kil, E. S. Seong, B. K. Ghimire, I. M. Chung, S. S. Kwon, E. J. Goh, K. Heo, M. J. Kim, J. D. Lim, D. Lee, and C. Y. Yu, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crude Sorghum

- Extract, *Food Chemistry*, **115**(4), 1234(2009).
19. J. M. Awika, L. W. Rooney, and R. D. Waniska, Anthocyanins from Black Sorghum and Their Antioxidant Properties, *Food Chemistry*, **90**(1-2), 293(2004).
 20. L. Dykes and L. W. Rooney, Sorghum and Millet Phenols and Antioxidants, *J. of Cereal Science*, **44**(3), 236(2006).
 21. R. S. Vioque, M. Polissiou, K. Astraka, M. M. Pascual, P. Tarantilis, D. H. Peñalver, and O. S. Méridas, Polyphenol Composition and Antioxidant and Metal Chelating Activities of the Solid Residues from the Essential Oil Industry, *Industrial Crops and Products*, **49**, 150(2013).
 22. J. E. Ra, W. D. Seo, K. C. Jang, S. I. Han, K. J. Choi, H. W. Kang, S. W. Oh, and S. Y. Kim, Korea Pat. 10-2013-0076558(2013).
 23. M. Karamac, FE(II), CU(II) and ZN(II) Chelating Activity of Buckwheat and Buckwheat Groats Tannin Fractions, *Polish J. of Food and Nutrition Sciences*, **57**(3), 357(2007).
 24. M. Karamac, Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by Tannin Constituents of Selected Edible Nuts, *International J. of Molecular Sciences*, **10**, 5485(2009).
 25. M. Kumamoto, T. Sonda, K. Nagayama, and M. Tabata, Effects of pH and Metal Ions on Antioxidative Activities of Catechins, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **65**(1), 126(2001).
 26. M. McDonald, I. Mila, and A. Scalbert, Precipitation of Metal Ions by Plant Polyphenols: Optimal Conditions and Origin of Precipitation, *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **44**(2), 599(1996).
 27. P. Rustemeyer, "Cellulose Acetate: Properties and Applications", Willy Freiburg, Germany, pp.255-267, 2003.