

한국산 유색미의 Anthocyanin 색소 동정

윤혜현¹ · 백영숙² · 김준범² · 한태룡^{3*}

¹충남대학교 가정대학 식품영양학과, ²경희대학교 자연과학대학 ³화학과 및 ³유전공학과

초록 : 한국산 유색미(수원 415호)로부터 안토시아닌 색소를 분석하였다. 1% HCl-methanol로 추출된 색소액을 자외선-가시광선 분광분석기로 측정한 결과 280 nm와 530 nm에서 최대흡광도를 보여 안토시아닌임을 확인하였다. 분리된 색소를 산 분해하여 얻은 aglycon을 여러종류의 용매계로 전개시켜 R_f값을 비교하고, 흡광성질 및 ¹H-NMR 자료를 분석한 결과 aglycon은 cyanidin 및 malvidin으로 동정되었고, 결합당을 종이 크로마토그래피로 분석한 결과 monoglucose로 확인되었다. 따라서 한국산 유색미(수원 415호)의 안토시아닌 색소는 cyanidin-3-glucoside 및 malvidin-3-glucoside로 추정된다(1995년 9월 22일 접수, 1995년 11월 15일 수리).

서 론

유색미(pigmented rice)는 쌀겨 고유의 색 외에 붉은색(red)이나 자색(purple)을 띠고 있는 쌀(*Oryza* spp.)로서, 붉은색의 쌀은 스리랑카나 아프리카 지역에서 이용되며 자색미는 필리핀에서 오래전부터 purple rice cake을 제조하는데 사용되어왔다.¹⁾ 유색미의 anthocyanin에 관한 연구는 1940~50 년대에 벼의 여러부분에 존재하는 anthocyanin의 분포에 관한 연구가 이루어졌다.²⁾ Suzu-shiro 등³⁾과 Nagai 등⁴⁾에 의해서 벼의 anthocyanin 색소는 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rhamnoside, cyanidin-3,5-diglucoside와 malvidin-3-galactoside 의 대표적인 4가지로 이루어지며, 특히 cyanidin-3-glucoside와 malvidin-3-galactoside가 쌀의 주요 색소임이 보고되었다. 지금까지 국내산 유색미의 색소에 관한 보고는 전무한 상태이다. 본 연구에서는 고부가가치 물질인 천연 식용 색소의 개발과 유색미의 산업적 이용성 증진의 기초연구로서 한국산 유색미에 함유되어있는 anthocyanin의 정성분석을 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

유색미는 농촌진흥청 작물시험장에서 1994년에 수확한 수원 415호(*Oryza sativa* var. Suwon 415)의 겨층을 제거한 현미를 빛과 습기를 차단한 상태로 저온(4°C)에 보관하면서 시료로 사용하였고, 실험에 사용한 유기용매와 시약들은 분석용 등급이었다.

Anthocyanin의 추출 및 분리

추출용매로는 몇가지 유기용매를 사용한 예비 실험에서 가장 수율이 좋았던 1% HCl을 함유한 methanol이나 ethanol을 전체 anthocyanin 추출에 사용하였다. 1%

HCl-methanol로써 추출한 색소액을 자외선 분광분석기(Varian DMS 300)로 측정한 결과 530 nm와 280 nm에서 최대흡광도 peak를 보여 추출된 색소가 anthocyanin임을 확인하였다. 유색미 20 g을 1% HCl-methanol 100 ml에 넣어 상온에서 2시간 동안 빠른속도로 회전교반 시키며 색소를 추출한 후 여과지(Whatman No.1)을 통과시켜 얻은 색소용액을 40°C에서 감압농축하여 색소농축액 약 5 ml를 얻었다. 색소추출액을 chromatography용 여과지(Whatman chromatography paper #1)를 사용하여 BAW, BH, 1% HCl (Table 1)의 전개용매로 각 성분을 분리한 후, 각 성분의 R_f값을 구하였다.

Anthocyanin의 산가수분해

색소농축액(3 ml)에 10 ml의 2 N-HCl을 가해 끓는 물에서 1시간동안 가열하면서 5, 10, 20, 60분에 부분 가수분해물을 1 ml씩 받았다. 각 색소용액에 0.1 ml의 ethyl acetate를 넣어 불순물을 제거하고, 0.3 ml의 amyl alcohol을 넣어 흔들어 섞은 후 분리된 amyl alcohol층을 aglycone분석에 사용하였고, 수용액층을 결합당 분석에 사용하였다.

Anthocyanin과 결합당의 정성분석

한 시간동안 산가수분해 후 분리한 aglycone용액을 40°C에서 감압농축하여 건조시킨다음 1 ml의 1% HCl-methanol에 녹여 BAW, HAW, HFW 등의 전개용매(Table 1)로 paper chromatography한 후 R_f값을 얻었다. 자외선 분광분석기로 최대흡광파장을 측정하고 5% AlCl₃-methanol을 첨가하였을때의 흡광도 변화를 관찰하였다. 또한 건조된 aglycone을 DMSO-d₆에 녹여 TMS를 표준 물질로 하여 핵자기공명분석기(Hitachi R-1100 60 MHz for ¹H)로 분석하였다. 수용액층은 glucose, galactose, xyllose의 표준물질과 함께 BAW, BTPW의 전개용매 (Table 1)로 분리한 후에 aniline hydrogen phthalate(aniline 9.2

찾는말 : anthocyanin, pigmented rice, cyanidin, malvidin

*연락처

Table 1. Developing solvent systems for paper chromatography

Abbreviation	Key	Proportion (v/v)	Layer used
BAW	n-Butanol-Acetic Acid-Water	4:1:5	top layer
BH	n-Butanol-2M HCl	1:1	top layer
1% HCl	conc.HCl-Water	3:97	miscible
HFW	conc.HCl-Formic Acid-Water	2:5:3	miscible
HAW	conc.HCl-Acetic acid-Water	3:30:10	miscible
BTPW	n-Butanol-Toluene-Pyridine-Water	5:1:3:3	miscible

ml/ phthalic acid 16 g / n-butanol 490 ml/ diethyl ether 490 ml/distilled water 20 ml)로 발색시켜 결합당의 종류를 정성분석하였다.

결과 및 고찰

Anthocyanin 색소의 분리

유색미로 부터 추출한 색소농축액을 paper chromatography로 분리한 결과, BAW와 1% HCl의 어느 전개조건에서도 하나의 spot으로 전개되었고, BH로 전개시켰을 때 2개의 spots으로 전개되었다(Table 2). 각 spot의 R_f값을 Harborne,⁵⁾ Jackman⁶⁾ 등의 결과와 비교하여 볼 때 각각 malvidin-3-glucoside와 cyanidin-3-glucoside의 R_f값과 비슷하였다.

Paper chromatography에서 분리된 2개의 spot을 잘라서 1% HCl-methanol로 색소를 용출시킨 후 가시광선에서의 흡광도를 조사한 결과 색소1(R_f=0.19)은 540 nm에서, 색소2(R_f=0.24)는 528 nm에서 최대흡광도를 나타내어, 색소1과 색소2는 Harborne⁷⁾이 제시한 malvidin-3-glucoside의 535 nm 및 cyanidin-3-glucoside의 525 nm의 값과 각각 유사하였다.

Aglycone의 분리 및 확인

추출된 색소를 2 N-HCl로 분해하여 3가지 용매계로 전개시킨 후 얻은 aglycone의 R_f값들을 Table 3에 정리하였다. Harborne,⁵⁾ Strack와 Wray,⁸⁾ 황과 인⁹⁾의 값과 비교할 때, aglycone 1은 cyanidin으로 aglycone 2는 malvidin으로 추정되었다. 또한 각 aglycone을 1% HCl-methanol에 녹여 가시광선영역에서의 최대흡수파장과 5% AlCl₃-methanol 첨가시의 색변화를 관찰한 결과 aglycone 1은 530 nm에서 최대흡수파장을 보였고 AlCl₃ 첨가시 bathochromic shift를 나타내어 o-dihydroxy group을 갖는 cyanidin으로 추정되었고, aglycone 2는 543 nm에서 최대흡수파장을 나타내고 o-dihydroxy group이 없는 malvidin으로 추정되었다. 60 MHz ¹H-NMR 분석(DMSO-d₆) 결과 TMS를 표준물질로 할 때 7.0, 7.3, 8.2, 8.9 ppm에서 chemical shift를 나타내어 Tarahara와 Yamaguchi¹⁰⁾ 및 Idaka 등¹¹⁾의 보고와 유사한 결과를 보여 aglycone의 확인에 도움이 되었다.

결합당의 확인

Anthocyanin의 부분 산가수분해물의 수용액층을 gluc-

Table 2. R_f values and spectral maxima of anthocyanins in pigmented rice (Suwon 415)

Pigment	R _f values in			λ _{max} (nm)
	BAW	BH	1% HCl	
1		0.19	0.07	535
2	0.36	0.24	0.06	528

Table 3. Properties of authentic anthocyanidins and two aglycones in Korean pigmented rice (Suwon 415)

Pigment	R _f values in			1% HCl-Methanol λ _{max} (nm)	Color shift with AlCl ₃	Visible color
	BAW	HAW	HFW			
Pelargonidin ^{a)}	0.80	0.68	0.33	520	-	red
Cyanidin ^{a)}	0.68	0.49	0.22	535	+	magenta
Peonidin ^{a)}	0.71	0.63	0.30	532	-	"
Delphinidin ^{a)}	0.42	0.32	0.13	546	+	purple
Petunidin ^{a)}	0.52	0.46	0.20	543	+	"
Malvidin ^{a)}	0.58	0.60	0.27	542	-	"
Aglycone 1	0.65	0.49	0.30	530	+	magenta
Aglycone 2	0.56	0.56	0.27	543	-	purple

^{a)}from Harborne (1984a)⁵⁾ and Kim *et al.* (1973)¹³⁾

Table 4. R_f values of the sugar moiety of anthocyanins in pigmented rice (Suwon 415)

Sugar	R _f values in		Colors with aniline hydrogen phthalate
	BAW	BTPW	
5 min.hydrolysis	0.16	0.23	brown
20 min.hydrolysis	0.15	0.25	brown
60 min.hydrolysis	0.16	0.27	brown
Glucose	0.16, 0.12 ^{a)}	0.23, 0.24 ^{a)}	brown
Galactose	0.14, 0.12 ^{a)}	0.21, 0.21 ^{a)}	brown
Xylose	0.25, 0.20 ^{a)}	0.35, 0.35 ^{a)}	red
Arabinose ^{a)}	0.18	0.29	red
Rhamnose ^{a)}	0.32	0.47	yellow-brown

^{a)}from Harborne (1984b)¹²⁾

ose, galactose, xylose 등을 표준당으로 하여 BAW와 BTPW (Table 1)로 전개했을 때 Table 4의 결과와 같이 모든 시료에서 갈색의 glucose spot만이 검출되었고, R_f값이 Harborne¹²⁾이 제시한 값과 근사하여 유색미에 함유되어있는 anthocyanin은 monoglucose의 배당체로 추정할 수 있었다.

결론적으로, 유색미 수원 415호에 함유된 anthocyanin 색소를 paper chromatography 방법과 자외선 분광분석기로 분석한 결과, 주된 aglycone은 cyanidin과 malvidin이며, 결합당은 monoglucose로 확인됨으로서, cyanidin-3-glucoside와 malvidin-3-glucoside가 유색미의 주요 anthocyanin일 것으로 추정된다.

감사의 글

본 연구의 유색미 시료(수원 415호)를 제공하여 주신 농촌진흥청 작물시험장 문헌팔 박사님과 연구결과에 대해 여리가지로 조언하여 주신 서울대학교 농화학과 김수연 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

참 고 문 헌

1. Juliano, B. O. (1985) In Rice: Chemistry and Technology. Juliano, B. O ed. pp.59-174, American Association of Cereal Chemists, St. Paul.
2. Mazza, G. and E. Miniati (1993) Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. pp.225-248, CRC Press, Boca Raton.
3. Suzushino, G., A. Hatanake, Y. Suzuki, and I. Nagai (1957) Anthocyanins in rice. *Nihon Daigaku Nojuigakubu Gakujutsu Kenkyu Hokoku* **8**, 65 (CA 55, 702c).
4. Nagai, I., G. Suzushino, and Y. Suzuki (1960) Anthoxanthins and anthocyanins in *Oryzaceae*. *Japan J. Breed* **10**, 247-252.
5. Harborne, J. B. (1984a) Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. pp.37-99, Chapman and Hall, New York.
6. Jackman, R. L., R. Y. Yada, and M. Y. Tung (1987) A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. *J. Food Biochem.* **11**, 279-308.
7. Harborne, J. B. (1958) Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* **70**, 22-28.
8. Strack, D. and V. Wray (1989) Anthocyanins. *Methods Plant Biochem.* **1**, 325-356.
9. 황인경, 안승요 (1975) 머루 anthocyanin에 관한 연구. *한국농화학회지* **18**, 188-193.
10. Terahara, N. and M.-A., Yamaguchi (1986) ¹H NMR spectral analysis of the malylated anthocyanins from *Dianthus*. *Phytochemistry* **25**, 2906-2907.
11. Idaka, E., H. Yamakita, T. Ogawa, T. Kondo, M. Yamamoto, and T. Goto (1987) Structure of three diacylated anthocyanins isolated from red cabbage, *Brassica oleracea*. *Chem. Lett.* 1213-1216.
12. Harborne, J. B. (1984b) Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. pp.222-242, Chapman and Hall, New York.
13. 김경임, 남주형, 권태완 (1973) 오미자의 일반성분, 유기산 및 anthocyanin 색소에 관하여. *한국식품과학회지* **5**, 178-182.

Identification of Anthocyanins from Korean Pigmented Rice

Hye-Hyun Yoon,¹ Young-Sook Paik,² Jun-Beom Kim² and Tae-Ryong Hahn^{3*} (¹Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Department of ²Chemistry and ³Genetic Engineering, Kyung-Hee University, Suwon 449-701, Korea)

Abstract : Anthocyanins in Korean pigmented rice (*Oryza sativa* var. Suwon 415) were analyzed to develop value-added natural pigment from rice. The pigment extracted with 1% HCl in methanol was determined as anthocyanins by characteristic absorption spectra in UV-visible ranges showing maximum absorbance at 280 nm and 530 nm. Two aglycones from acid-hydrolyzed anthocyanins were identified as cyanidin and malvidin by their R_f values in several developing solvents, spectral properties, and ¹H-NMR analysis. Sugar moiety was determined as monoglucose by paper chromatography. The main anthocyanins in Korean pigmented rice were tentatively identified as cyanidin-3-glucoside and malvidin-3-glucoside.

*Corresponding author