

유색작물의 Cyanidin-3-Glucoside 최적 추출분석

김은실* · 신진철** · 정하숙*[†]

*덕성여자대학교 식품영양학과, **농촌진흥청 작물과학원

Quantitative Analysis of Cyanidin-3-Glucoside from Purple-Colored Crops

Eun-Shil Kim*, Jin-Chul Shin**, and Ha-Sook Chung*[†]

*Foods and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

**National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea

ABSTRACT Anthocyanins are water-soluble glycosides and acylglycosides of anthocyanidins, having different color variations due to its substitution patterns. Anthocyanins, present in various fruits, vegetables and crops as natural colorant, have been well characterized for its bioactive properties, anti-oxidant, anti-cancer, anti-proliferative and anti-inflammatory properties. During extraction and purification, the factors, such as pH, temperature, oxygen, light, enzymes, nucleophilic agents, sugar derivatives and co-pigments, have affected on anthocyanin stability. For this reason, the extraction method should be thoroughly checked for the qualitative/quantitative analysis of anthocyanin in particular plant material. To identify the optimum extraction method of cyanidin-3-glucoside, major anthocyanin of dark purple-colored grains, *Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo*, *Phaseolus vulgaris*, *Phynchosia gngularis*, *Sesamum indium*, *Rhynchosia nulubilis* and *Lablab purpureus*, reversed-phase HPLC analysis using solvent system of acetonitrile, methanol and water were accomplished.

Keywords : purple-colored crops, cyanidin-3-glucoside, HPLC, quantitative analysis

과실, 채소, 곡물 등의 고등식물계에 널리 분포되어 적색, 청색 및 자색을 나타내는 성분인 안토시아닌은 항산화, 항암, 항증식성 및 항염증 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Chen *et al.*, 2006; Fimognari *et al.*, 2005; Hyun & Chung, 2004; Katsuzaki *et al.*, 2003; Seeram *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2005). 건강기능 효과가 우수한 흑진주벼(*Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo*)의 경우, cyanidin-3-glucoside(C3G),

cyanidin-3-rhamnoside, malvidin-3-galactoside 및 peonidin-3-glucoside 등이 대표적인 안토시아닌 화합물로 확인되었으며, 특히 C3G의 함량이 가장 높은 것으로 보고되었다(Ryu *et al.*, 2006). 천연에 존재하는 C3G는 화합물에 존재하는 oxonium 구조로 인해 추출, 정제 시 pH, 온도, 산소, 효소 등에 의해 구조적 안전성에 영향을 받는다. 이러한 이유로 작물에 함유된 C3G의 이용을 극대로 하기 위해서는 화합물의 특성에 적합한 추출법이 선행되어야 한다. 이에 본 연구에서는 수종의 유색 작물에 함유된 기능성 화합물인 C3G의 최적 추출법을 규명하여, C3G 이용률 증진을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

연구에 사용된 유색미(*Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo*) 과피 부분(aleurone layer)은 2006년 경기도 수원에 위치한 농촌진흥청 작물과학원에서 공급받아 사용하였으며, 유색작물 C3G의 검량에 사용된 강낭콩(*Phaseolus vulgaris*), 팥(*Phynchosia gngularis*), 흑임자(*Sesamum indicum*), 서리태(*Rhynchosia nulubilis*) 및 울타리콩(*Lablab purpureus*)은 2005년 강원도 원주시 신림면에서 재배된 것을 사용하였다.

실험에 사용된 표준물질인 C3G(Fig. 1)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(USA)에서 구입하였으며, acetonitrile(ACN), H₂O, methanol(MeOH) 및 formic acid는 J. T. Baker Inc. (USA) 제품을 구입하여 HPLC 분석에 사용하였으며, 추출용매인 ethyl alcohol(EtOH), acetone 및 HCl은 덕산공업에서 GR 등급을 구입하여 사용하였다.

정량 분석에 사용된 HPLC 시스템은 Hitachi D-7000(Japan)으로 L-7100 pump, L-7300 column oven, L-7400 UV

[†]Corresponding author: (Phone) +82-2-901-8593
(E-mail) hasook@duksung.ac.kr

detector 및 L-7610 degasser를 이용하였다.

C3G의 최적 HPLC 분석 조건 확립을 위해 사용된 분석 컬럼은 YMC C₁₈(10×250 mm, Japan)을 사용하였고, 검량 파장은 280 nm이었으며, 이동상은 ACN, H₂O, MeOH을 사용하여 농도별로 화합물의 분리양상을 검토하였다. 이들 용매비율 중 가장 우수한 분리 양상을 나타낸 조건은 ACN, 5% formic acid in MeOH, formic acid 5% in water이었으며, 유속은 1.0 ml/min이었다.

Cyanidin-3-glucoside의 표준검량선 작성

C3G 표준품을 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm 및 100 ppm 농도로 EtOH에 희석하여 준비하였으며, 280 nm에서 최대 흡수파장을 나타내었으며, 분석 결과로 얻은 peak area를 계산하여 회귀식을 구하였다(Fig. 2).

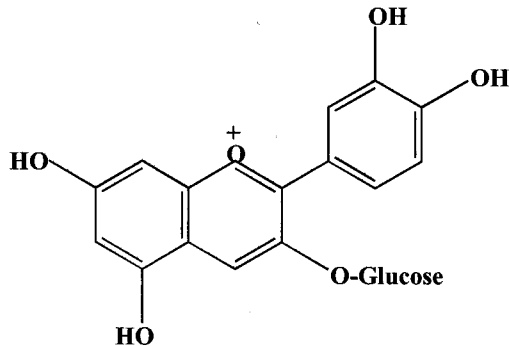


Fig. 1. Chemical structure of cyanidin-3-glucoside.

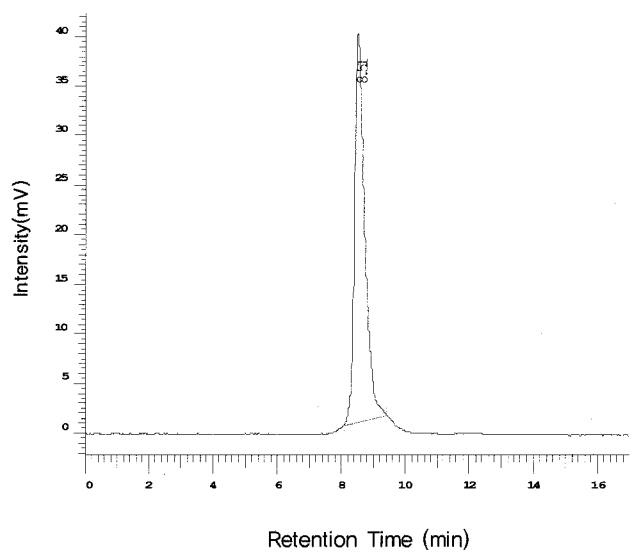
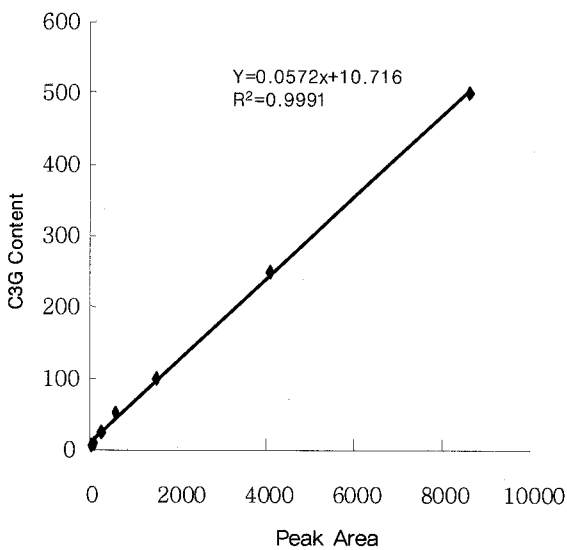


Fig. 2. Calibration curve (left) and peak identification of cyanidin-3-glucoside ($R_t = 8.51$) (right).

작물의 추출 및 농축

흑진주벼(*Oryza sativa* cv. *Heuginjubyeo*)의 C3G 함량 정량은 분쇄된 시료 1 g에 0.5% HCl in EtOH, EtOH 100%, EtOH 80% + distilled water(DDW) 20%, Acetone-EtOH 100%(Acetone으로 초음파 추출 후 EtOH 100% 처리) 및 DDW 100%를 사용한 추출법으로, 각각의 용매 50 ml를 가하여 90분씩 3회 초음파 추출 후 여과, 농축하였다. 강낭콩 팥, 흑임자, 서리태 및 울타리콩은 각각의 시료 50 g에 0.5% HCl in EtOH 추출 용매 50 ml를 가하여 90분씩 3회 초음파 추출, 여과한 후 최종 농도가 50 ml가 되도록 농축하였다. 추출된 작물의 농축액은 1.5 ml microcentrifuge tube에 담아 -20℃의 냉동고(FC-B53FMB : LG Co., Korea)에 밀봉 보관하였다.

작물의 Cyanidin-3-glucoside 함량 분석

준비된 작물 추출액을 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 C3G 표준품 분석을 통해 설정된 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. HPLC를 이용한 C3G 분리는 대체적으로 양호한 양상을 나타내었으나, 작물에는 다양한 종류의 2차 대사 산물이 함유되어 있으므로, C3G 표준품을 대상으로 한 분석 조건과는 다른 양상을 보여주었다. 작물 추출물의 C3G 농도 (ppm)는 표준검량선의 회귀식을 이용하였으며 각각의 희석 배수를 곱하여 C3G 함량을 구하였다(Fig 3).

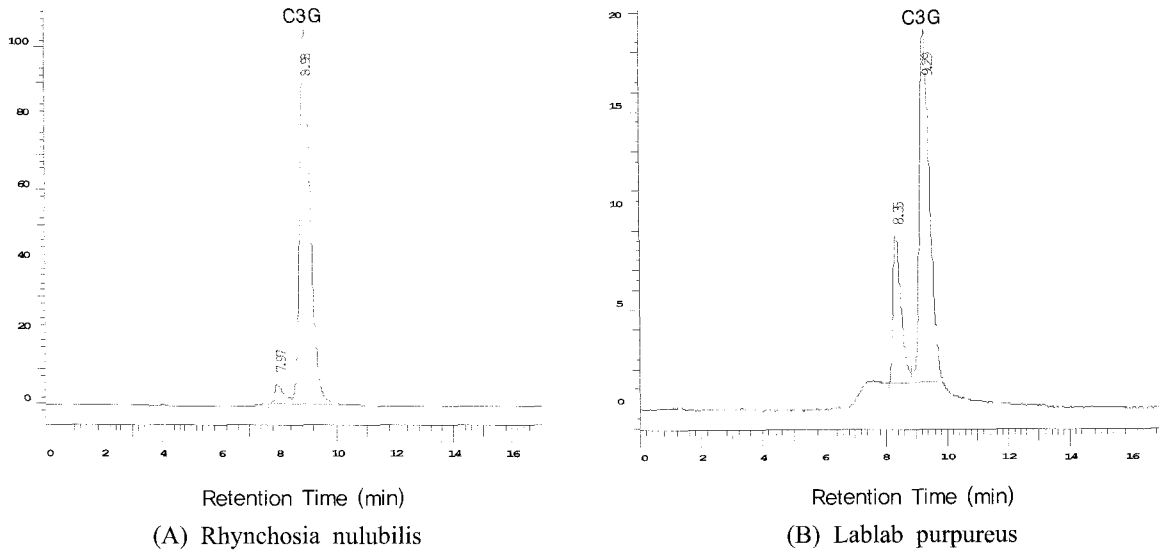


Fig. 3. (A) HPLC chromatogram of cyanidin-3-glucoside obtained from *Rhynchosia nulubilis* (Rt = 8.93) (B) from *Lablab purpureus* (Rt = 9.29).

결과 및 고찰

추출방법에 의한 흑진주벼 cyanidin-3-glucoside 함량 정량

각 추출방법에 의한 흑진주벼의 C3G 함량을 분석하기 위해 이동상 용매인 ACN, H₂O와 MeOH(40 : 5 : 55)로 HPLC chromatogram을 확인한 결과, 산성용액에서 안정한 C3G의 함량은 0.5% HCl in EtOH로 추출할 때 함량이 가장 높았으며, 이어서 DDW 추출, EtOH 80% - DDW 20% 추출, acetone 전처리 후 EtOH 100% 추출 및 EtOH 100% 추출물의 순으로 확인되었다(Table 1).

수용성 화합물인 C3G는 DDW 100% 추출보다는 0.5% HCl을 첨가한 추출용매에서 더 안정된 상태를 나타냈으며, wax 등의 비극성 화합물을 제거하기 위해 acetone으로 처리한 후 EtOH 100% 추출한 경우, EtOH 100%로 추출한 경우보다 C3G가 2.46 mg/g 더 많이 추출되는 것으로 보아,

종자에 함유된 C3G 추출은 acetone으로 전처리 하여 지방 성분을 제거한 후 추출하는 것이 C3G의 함량을 증가시킬 수 있는 것으로 확인되었다.

최적 추출법에 의한 작물의 cyanidin-3-glucoside 함량 분석

유색작물 중 강낭콩, 팥, 흑임자, 서리태 및 울타리콩의 C3G 함량을 검량하였다. 추출용매로는 선행연구에서 C3G 함량이 가장 높게 나타난 0.5% HCl in EtOH용매로 추출하였으며, 실험결과 서리태가 다른 어떤 작물보다 C3G 함량이 가장 높게 나타났고, C3G 보고로 주목받는 흑진주벼의 절반 정도 함량을 보여주므로 부식 작물로서의 우수성을 확인할 수 있었다(Table 2).

본 연구를 통해 유색 작물의 이용증대를 위해서는 항산화 작용, 면역증진 등 건강효능이 우수한 C3G등 안토시아닌 화합물의 함량이 높고 재배가 용이한 작물의 선별과 함께

Table 1. Contents of cyanidin-3-glucoside in different solvent extracts from *Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo*.

Extracts	Contents (mg/g)
0.5% HCl in EtOH	172.48
DDW 100%	147.14
EtOH 80%-DDW 20%	103.27
EtOH 100% (treat with Acetone)	40.29
EtOH 100%	37.83

Table 2. Contents of cyanidin-3-glucoside in various crops extracted with 0.5% HCl in EtOH.

Varieties	Contents (mg/g)
<i>Rhynchosia nulubilis</i>	78.69
<i>Lablab purpureus</i>	4.09
<i>Sesamum indicum</i>	2.70
<i>Phynchosia gngularis</i>	1.14
<i>Phaselous vulgaris</i>	0.21

품종개량이 요구될 뿐 아니라, 안토시아닌의 구조적 안정성 및 함량을 증진시키기 위한 분석법 개발 등 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Chen, P. K., S. C. Chu, H. L. Chiou, W. H. Kuo, C. L. C. Chiang, and Y. S. Hsieh. 2006. Mulberry anthocyanins, cyanidin-3-rutinoside and cyanidin-3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Lett.* 235 : 248-259.
- Fimognari, C., F. Berti, M. Nüsse, G. C. Forti, and P. Hrelia. 2005. In vitro antitumor activity of cyanidin-3-O- β -glucopyranoside. *Chemotherapy.* 51 : 332-335.
- Hyun, J. W. and H. S. Chung. 2004. Cyanidin and Malvidin from *Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo* mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G(2)/M phase and induction of apoptosis. *J Agric Food Chem.* 52 : 2213-2217.
- Katsuzaki H., H. Hibasami, S. Ohwaki, K. Ishikawa, K. Imai, K. Date, Y. Kimura, and T. Komiya. 2003. Cyanidin-3-O- β -D-glucoside isolated from skin of black *Glycine max* and other anthocyanins isolated from skin of red grape induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *Oncol. Rep.* 10 : 297-300.
- Ryu, S. N., S. J. Han, S. Z. Park, and H. R. Kim. 2006. Antioxidant activity of blackish purple rice. *Korean. J. Crop Sci.* 51 : 173-178.
- Seeram, N. P., R. A. Momin, M. G. Nair, and L. D. Bourquin. 2001. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomed.* 8 : 362- 369.
- Zheng, Y., S. Y. Wang, C. Y. Wang, and W. Zheng. 2005. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *Swiss Soc. Food. Sci. Technol.* 40 : 49-57.