

인디고 분석 표준액의 제조법 및 쪽 육성계통의 인디고 함량변이

김성주* · 고재형* · 박시형**** · 김명석** · 김관수****†

*목포대학교 자연과학대학 한약자원학과, **전라남도농업기술원 쌀연구소, ***목포대학교 한방산업연구소

Preparation Method of Indigo Standard Solution and Variation of Indigo Contents in Blue Dye Extract from Breeding Lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross

Seong Ju Kim*, Jae Hyung Ko*, Si Hyung Park*, Myeong Seok Kim** and Kwan Su Kim****†

*Department of Oriental Medicine Resources, College of Natural Science, Mokpo National University, Muan 534-729, Korea.

**Jeonnam Agricultural Research and Extension Services, Naju 520-725, Korea.

***Institute of Korean Medicine Industry, Mokpo National University, Muan 534-729, Korea.

ABSTRACT : This study was carried out to find out the optimum method of preparation of indigo standard solution and its stability, and to investigate the indigo contents in Niram, blue dye extract, from a total of 7 indigo plants and 34 breeding lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross. Proper solvent for indigo standard was dimethyl sulfoxide (DMSO), and appropriate concentration was 1 mg of indigo in 10 mL of DMSO. Absorbance value of UV/Vis Spectrophotometer at 620 nm of standard solution was changed decreasingly 12 hours after the preparation of standard solution irrespective of the storage conditions such as temperature and light. Average value of absorbance of 8-fold diluted standard solutions prepared daily during 16 days was 0.210 ± 0.005 , indicating the powder of indigo compound was stable chemically. Calibration curve was made for quantitative analysis of indigo of 7 Niram samples, and indigo contents ranged from 0.69% to 18.76% showing relatively larger variation. Across all 34 breeding lines, the range of indigo content was from 7.9 mg to 56.4 mg per 100 g of fresh leaves, averaging 25.2 mg of indigo content and showing a 47.7% coefficient of variation.

Key Words : Indigo, Quantitative Analysis, Blue Dye Extract, Niram, Breeding Lines, *Persicaria tinctoria* H. Gross

서 언

천연색소성분인 인디고 (indigo)를 함유하고 재배생산되어 사용되는 식물은 세계적으로 3개 종 (species)이 알려져 있는데, 한국, 중국, 일본 등에서 재배하는 마디풀과 (Polygonaceae) 일년생 초본식물인 쪽 (*Persicaria tinctoria* H. Gross), 유럽지역에서 주로 생산하는 월년생 십자화과 초본식물 대청 (*Isatis tinctoria* L.) 및 인도, 아프리카 등 열대지방에서 재배하는 콩과 목본식물 인도쪽나무 (*Indigofera tinctoria* L.) 등이다 (Jang *et al.*, 2011; John and Angelini, 2009). 우리나라에서 쪽을 이용한 염색방법으로 신선한 잎 생즙을 이용한 염색법과 생잎으로부터 청색염료 (니람)를 제조 후 환원시켜 염색하는 방법 (Park *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2009a, b, 2010)이 있

다. 쪽 천연염료는 세탁, 일광에 비교적 강한 견뢰도를 가지고 있으며 (Crews, 1987; Ye *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2011) 향균성, 항암성, 항산화 작용 등 여러 가지 생리기능을 갖는 것으로 알려져 있다 (Han and Choi, 2000; Seo, 2008; Lin *et al.*, 2009).

쪽이나 대청의 생잎 중에는 색소 성분인 indigo는 함유되어 있지 않고, Fig. 1과 같이 무색의 indican (indoxyl-3-β-D-glucoside)이나 indoxyl-3-ketogluconate (isatan B)가 존재하며 가수분해가 되면 glucose와 무색의 indoxyl을 생성하고 indoxyl이 산화되어 indoxyl 2개 분자가 결합하면 indigo를 생성하는 것으로 알려져 있다 (Minami and Pandalai, 2001). 천연 인디고에 대한 염료의 특성조사나 색소성분의 구조동정에 대한 정성 및 정량분석 연구 (Chung *et al.*, 1998; Choi

†Corresponding author: (Phone) +82-61-450-2661 (E-mail) kskim@mokpo.ac.kr

Received 2013 April 20 / 1st Revised 2013 May 13 / 2nd Revised 2013 May 30 / 3rd Revised 2013 June 6 / Accepted 2013 Revised June 7

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

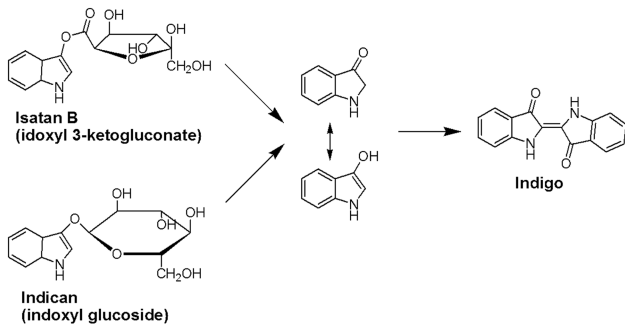


Fig. 1. Formation of Indigo from the precursors isatan B in *Isatis tinctoria* L. and indican in *Persicaria tinctoria* H. Gross. Free indoxyl is released by hydrolysis from isatan B and indican, and then dimerises to indigo by air oxidation.

et al., 2002, 2004)와 쪽 니람, 쪽 생즙액 및 합성 indigo의 염색조건이나 염색특성에 관한 연구 (Jung *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2005, 2011; Jang *et al.*, 2011)가 보고되었다.

쪽이나 대청의 생잎에 함유된 인디고 전구물질인 indican이나 isatan B 성분은 HPLC를 사용하여 정량하고, 인디고 성분은 생엽을 직접 열수추출하거나 glucosidase와 같은 효소처리 후 UV 분광기로 정량하는 방법이 일반적으로 이용되고 있다 (Maugard *et al.*, 2002; Angelini *et al.*, 2003; Puchalska *et al.*, 2004). 보통 지치 등 염료작물의 색소성분 정량은 HPLC를 사용하지만 (Kim *et al.*, 2011), 많은 시료를 신속하게 분석하기 위해서는 UV 분광기를 이용하는 것이 일반적으로 보다 용이한 것으로 알려져 있다.

재배농가에서는 7~8월 중에 쪽잎을 수확하여 니람을 제조하고 저장하면서 염색에 사용하는데, 제조된 니람의 색소 품질을 평가하기 위해서는 니람함량뿐만 아니라 니람에 함유된 인디고 함량을 측정하는 것이 중요하다. 그러나 쪽으로부터 추출 및 침전시켜 제조된 니람에 함유된 인디고성분의 정량방법이나 인디고 안정성에 대한 연구는 매우 적은 편이다.

인디고 표준액은 제조 후 4~5일이 경과하면 청색에서 노란색으로 색이 변하고, 이에 따라 표준액의 흡광도는 시간이 지날수록 낮아져 분석결과의 재현성이 낮아지는 경향이 나타났는데, 이에 따라 UV 분광기를 이용한 분석에서 적절한 용매를 찾기가 어렵다는 보고도 있었다 (Garcia-Macias and John, 2004; John, 2009).

따라서 본 연구는 인디고 표준액 제조방법 및 안정성에 대한 연구를 수행하여 쪽 니람에 함유된 인디고성분의 표준정량조건을 알아보고자 분석실험을 하였으며, 아울러 니람시료와 쪽 육성계통의 인디고 정량분석을 하여 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

1. 시험재료 및 기기

실험에 이용한 쪽 니람은 나주, 보성, 무안 등지에서 생산된 국내산 4종 (B, D, E, G), 그리고 인도, 중국, 대만 등 외국에서 수입된 수입산 3종 (A, C, F)이었으며, 인디고 분석 표준품은 합성 indigo (Cat. No. 229296, Dye content 95%, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였으며, 기존 정량분석에서 추출용매로 많이 사용하는 dimethyl sulfoxide (DMSO), tetrahydrofuran (THF), ethyl acetate (EtOAc), acetonitrile (ACN) 이외에 toluene, pyridine 등을 사용하였는데, 용매는 Sigma 사 또는 (주) 덕산의 HPLC급과 특급시약을 구입하여 이용하였다. 추출된 분석시료액은 96 Well Plate에 분주하여 UV/Vis 분광기 (Epoch Microplate Reader, BioTek Instruments, Inc., USA)로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 또한 쪽 육성계통육성 중 선발된 34계통의 인디고 함량변이를 조사하였다.

2. 인디고 표준액 제조

보통 인디고 분석을 위한 용매는 DMSO, THF, EtOAc를 사용하며 이중 DMSO가 가장 용해도가 높아 용매로 좋지만, 시간이 경과하면 색이 변하고 저온에서 여는 문제점이 있다 (Garcia-Macias and John, 2004; John, 2009). 따라서 적정 용해도를 갖고 용매 사용량이 과다하지 않으면서 표준액의 안정성을 갖는 용매를 찾고 적정 농도로 제조하여야 재현성이 있는 분석결과를 얻을 수 있을 것이다. 이와 같이 인디고 성분 추출을 위한 가장 알맞은 용매를 선정하기 위해 THF, toluene, pyridine, ACN, EtOAc, DMSO 및 혼합액 (DMSO:ACN = 9:1, 6:1, 3:1)을 용매로 하여 표준물질 인디고 1mg에 용매 10mL로 녹인 뒤 8배 희석하고 UV/Vis 분광기로 흡광도를 측정하여 비교하였다. 표준액의 모액을 8배 희석한 것은 흡광도가 값이 너무 높지 않고 니람시료 추출액의 흡광도와 가급적 동일하게 맞추기 위해서였다. DMSO의 어는점이 16~17℃ 정도로 낮아 쪽 수확 후 분석하는 10월 이후에 용매가 얼거나 용해도가 떨어질 수 있기 때문에 이 시기에 DMSO가 낮은 온도에 영향을 받지 않고 사용할 수 있는 혼합용매를 알아보기 위하여 4℃이하에서 얼지 않으며 인디고 HPLC 분석에 사용하는 ACN을 DMSO에 혼합하여 사용하여 비교하였다.

인디고 표준액을 만들기 위한 인디고의 적정 함량 (농도)을 알아보기 위해 인디고 1mg에 DMSO 2mL, 4mL, 10mL 및 20mL로 녹인 후 희석하여 다시 동일농도를 맞춘 후 흡광도를 측정하여 가장 인디고 용해도가 높은 DMSO 부피를 알고자 하였다. 동일한 양의 인디고를 녹인 용매량 처리에서 각기 다른 DMSO 부피 2mL, 4mL, 10mL, 20mL는 동일한

쪽 니람의 인디고 정량분석

농도로 맞추기 위해 각각 10배, 5배, 2배, 1배로 희석하였으며 대조구는 20 mL이었다.

3. 인디고 표준액의 안정성 분석

인디고 4 mg을 DMSO 40 mL에 녹여 표준액을 만든 후 명 조건과 암조건에 저장하면서 경과일수에 따른 흡광도 변화를 조사하였으며, 표준액을 -70°C, 4°C 및 상온에서 저장하면서 시간별 및 경과일수별 흡광도를 비교하였다. 또한 표준액을 매일 제조하고 흡광도를 측정하여 표준액 농도의 변이를 알아보았다.

4. 쪽 니람의 인디고 정량 분석

국내산 4종과 수입산 3종의 쪽 니람 각 5 mg을 DMSO로 녹였는데, 표준액의 농도별 검량선 범위를 벗어나 농도가 진한 것은 20 mL, 농도가 낮은 것은 5 mL를 추출용매량으로 하여 분석하였다. 표준액은 인디고 4 mg을 DMSO 40 mL에 녹이고 희석하여 흡광도를 측정하고 표준액 농도에 대한 흡광도를 나타내는 인디고 검량선을 작성하여 시료액 분석에 사용하였다. 검량선에 사용된 농도별 표준액은 모액 (1 mg/ 10 mL)을 2, 4, 8, 16, 32 및 64배로 희석한 것으로서, 표준액 농도의 범위는 15.6 ~ 500 µg/10 mL이었으며 각 표준액은 3반복으로 측정하였다.

5. 쪽 육성계통의 니람 및 인디고 함량 분석

쪽 우량계통육성시험에서 모집단 나주재래종으로부터 집단 선발된 34계통의 니람과 인디고 함량 분포를 조사하였다. 니람추출은 생엽을 채취하여 물에 24시간 침지하여 추출한 액을 거른 후 소석회 Ca(OH)₂를 넣어 인디고추출물을 침전시켜 만들었다. 파종은 4월 20일 경에 하였으며 8월 10일경에 잎 시료를 채취하여 니람을 추출한 후 인디고 함량분석을 하여 생엽 100 g당 mg 함량으로 환산하여 선발계통들의 인디고 함량 변이를 조사하였다.

6. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, SPSS PASW STATISTICS 18.0 (IBM Corp., USA) 프로그램의 Duncan 다중범위검정으로 5% 유의수준에서 평균간 검정을 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 인디고 표준액 제조

인디고 1 mg을 THF, toluene, pyridine, ACN, EtOAc,

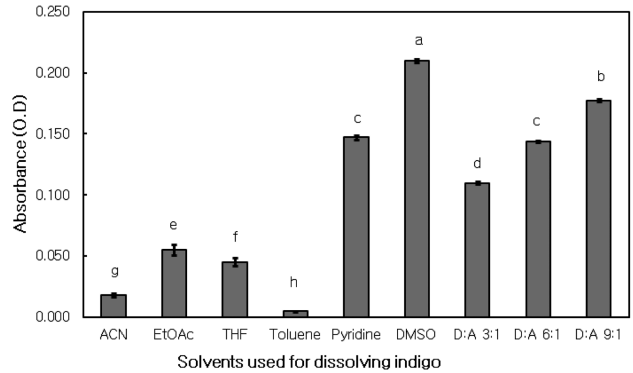


Fig. 2. Absorbance of indigo standard solution dissolved with different solvents and mixed solution. D:A means DMSO:Acetonitrile. Results followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$.

DMSO 및 혼합액 DMSO:ACN (9:1, 6:1, 3:1) 용매 10 mL로 녹인 후 8배 희석하여 분광기로 흡광도를 측정된 결과 (Fig. 2), DMSO가 가장 높은 흡광도를 보여 가장 좋은 인디고 용매로 조사되었다. THF, toluene, pyridine, ACN은 용해도가 낮아 흡광도가 낮았으며 EtOAc는 HPLC 분석에서 추출 용매로 사용한 보고 (Angelini *et al.*, 2003)가 있으나 용해도가 낮아 UV 분석에는 부적합한 것으로 생각되었다. 일반적으로 인디고 용매로 많이 사용하는 용매는 DMSO이지만 (Chung *et al.*, 1998), 표준액 제조 후 며칠이 경과하면 색이 변하는 특성을 보였다.

DMSO 용매가 어는점 이하의 낮은 온도 (16 ~ 17°C)에서 얼지 않고 추운 겨울에도 용해도를 유지하기 위하여 어는점이 낮은 ACN을 혼합하여 인디고 용해도가 높으면서 저온 (4°C)에서 얼지 않는 혼합용매를 제조하였다. 혼합용매 (DMSO:ACN)을 만들어 흡광도를 비교한 결과 9:1, 6:1, 3:1 순으로 DMSO가 높을수록 흡광도가 높았다. 혼합용매 9:1은 100% DMSO와 같이 4°C에서 얼었으며, 6:1과 3:1은 얼지 않았으나 흡광도 값은 낮아지는 문제점을 나타냈다. 4°C에서 얼지 않는 혼합용매 6:1에서 3:1 보다 높은 흡광도를 보였다. 따라서 6:1 정도의 혼합용매를 사용하여 100% DMSO 사용시보다 더 많이 낮은 농도로 표준액을 제조한다면 사용이 가능한 것으로 생각되었다. DMSO 다음으로 용해도가 높은 용매는 pyridine이었으며 인디고표준액의 안정성이 있는 장점이 있지만, 완전하게 인디고를 녹인 표준액을 만들기 위해서는 DMSO의 경우보다 6배 이상 높은 인디고 1 mg당 50 mL 이상의 용매량이 소요되었으며, 많은 니람 시료를 추출 분석할 경우에 너무 많은 용매가 소비되는 단점을 갖는 것으로 판단되었다. UV 분광기를 이용하여 인디고 정량을 위한 인디고 용매로 N-methyl-2-pyrrolidone (NMP)를 사용하기도 하였으나 곧바로 흡광도가 낮아졌으며 암조건에서도 색이 얼어졌으며 (Green and Daniels, 1992), 항산화제로 BHT (butylated

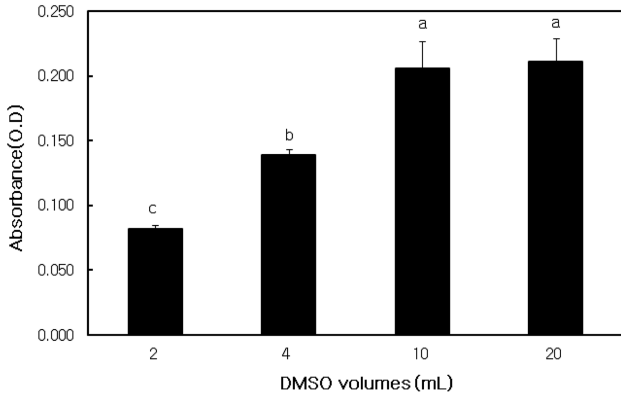


Fig. 3. Absorbance of indigo standard solutions with different volumes of DMSO solvent used for dissolving the same amount of indigo, and then diluted to be same concentration in all DMSO volumes. Results followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$.

hydroxytoluene)를 첨가하여 안정성을 높였으나 점차 흡광도는 낮아졌다 (Garcia-Macias and John, 2004; John, 2009). Pyridine이나 NMP는 용매소요량이 크고 용매가격도 DMSO 보다 비싸고 냄새나 용이성 측면에서도 문제가 있어 보이며, 특히 국산 DMSO는 시그마사 제품보다 10배 이상 가격이 낮은 장점이 있어 희석농도 등 적절한 조건하에서 다량의 시료를 분석하기 위한 용매로 DMSO가 적합한 것으로 생각되었다.

인디고 표준액 제조시 적절한 용해도를 갖는 농도를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 인디고 1 mg을 DMSO 2 mL, 4 mL, 10 mL, 20 mL로 각각 녹인 후 희석 및 동일한 농도로 맞춘 후 흡광도를 측정하는 결과는 Fig. 3과 같다. 다른 DMSO 부피 2 mL, 4 mL, 10 mL, 20 mL는 동일한 농도로 맞추기 위해 각각 10배, 5배, 2배, 1배로 희석하였다. 결과적으로 용매 DMSO 양이 많을수록 흡광도 값이 높아짐을 알 수 있었고 인디고 1 mg 당 DMSO 10 mL 이상에서 좋은 용해도를 가지므로 이 농도에서 표준액 제조시 적당한 희석농도로 생각되었다. 이는 다른 인디고 분석 논문에서 인디고 20 mg에 500 mL를 사용하거나 (Chung *et al.*, 1998) 5 mg에 50 mL를 사용한 보고 (Puchalska *et al.*, 2004)와 유사한 결과였다.

2. 인디고 표준액의 안정성 분석

인디고를 DMSO에 녹여 만든 표준액 (Indigo 4 mg/DMSO 40 mL)의 저장조건 및 시간을 달리하여 흡광도를 측정하여 제조 후 즉시 측정된 흡광도를 대조로 하여 상대적 비율의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. 표준액은 제조 다음일 부터 흡광도 값이 낮아져 인디고 분석을 위해서는 매일 새로 표준액을 만들어 사용하여 할 것으로 판단되었으며 저장조건은 명조조건과 암조조건은 큰 차이를 보이지 않았다.

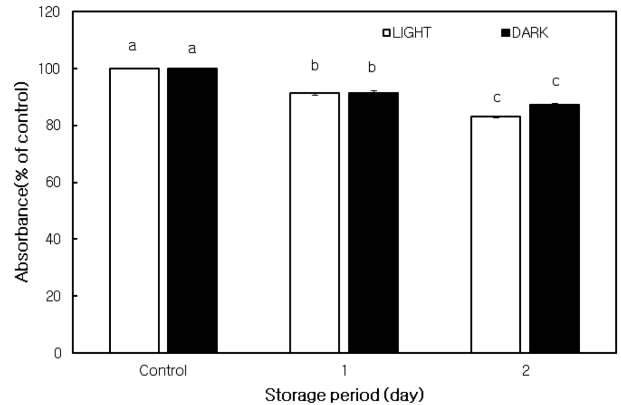


Fig. 4. Daily changes of absorbance value of indigo standard solution by different conditions of light during storage (□ light, ■ dark condition). Results within same light condition followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$. Control means the absorbance value measured immediately after the preparation of standard solution.

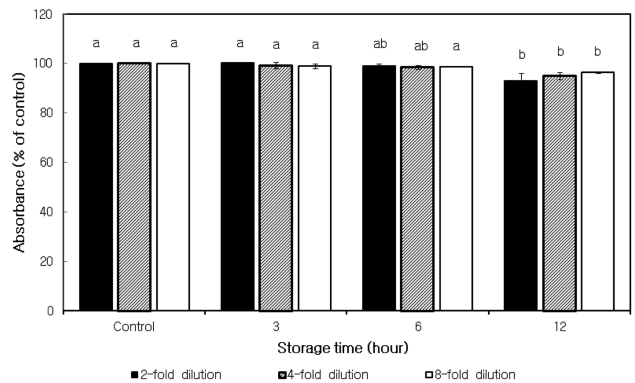


Fig. 5. Changes of absorbance value of indigo standard solution with different storage times (■ 2-fold, ▨ 4-fold, □ 8-fold dilution). Results within same dilution condition followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$. Control means the absorbance value measured immediately after the preparation of standard solution.

동일한 인디고 표준액 (Indigo 4 mg/DMSO 40 mL)을 2배, 4배, 8배로 희석시켜 상온의 명조조건에서 시간별로 흡광도를 측정하였다. 이 실험을 수행한 이유는 표준액 제조후 시간이 경과함에 따른 변화를 조사하기 위함이며, 인디고 검량선 작성시 보통 표준액 모액을 희석시켜서 농도별 흡광도를 측정하기 때문에 각 농도별 표준액의 흡광도변화를 확인할 필요가 있었기 때문이다. 각 희석배수별로 표준액 제조후 즉시 측정된 흡광도를 대조 (100%)로 하여 시간별로 흡광도를 측정하여 상대적 비율을 나타낸 결과는 Fig. 5와 같다. 표준액 제조 6시간 이후부터는 흡광도가 낮아졌으며 12시간이 지나서 더 많이 낮아지므로 표준액 제조 후 6시간을 가능한 넘지 않게 분석을 마치는 것이 좋을 것으로 판단되었다. 희석배수별로 비교하면

쪽 니람의 인디고 정량분석

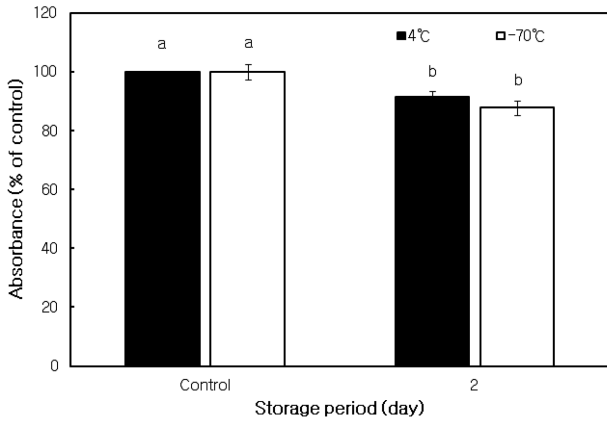


Fig. 6. Absorbance values of indigo standard solution at different storage temperatures, -70 °C and 4 °C of freezing condition of DMSO (■ 4°C, □ -70°C). Results within same temperature condition followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$. Control means the absorbance value measured immediately after the preparation of standard solution.

모액의 농도가 같으므로 흡광도 값의 차이는 보이지 않았으며, 12시간 경과후의 희석배수별 흡광도를 보면 유의성은 없으나 2배 희석액에서 다소 낮은 농도가 높을수록 조금 더 용해도가 떨어질 가능성이 있는 것으로 생각되었다.

인디고 표준액 (Indigo 4 mg/DMSO 40 mL)을 4°C와 -70°C에서 얼은 상태로 저장 후 흡광도를 측정하여 표준액 제조직후의 값을 대조 (100%)로 하여 상대적 비율을 나타낸 것은 Fig. 6과 같다. 표준액을 저온저장 하여도 2일 후에 흡광도 값이 낮아지는 것을 알 수 있었고 표준액은 분석당일 제조하여 하루만 사용해야 분석결과의 재현성을 보장할 수 있는 것으로 생각되었다.

분말상태의 표준물질 인디고의 안정성을 알아보기 위해 16일간 매일 표준액 (Indigo 4 mg/DMSO 40 mL)을 제조하고 8배 희석액을 매일 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 표준액의 모액을 8배 희석한 것은 흡광도가 값이 너무 높지 않고 니람시료 추출액의 흡광도와 가급적 동일하게 하기 위해서였다. 처음부터 8배 희석액과 같은 농도로 표준액을 만든다면 인디고 4 mg 당 320 mL가 소비가 되어 매일 제조함에 따라 과도한 용매가 소비가 될 것이므로 실험에 사용한 표준액은 8배 희석액을 사용하였다.

전 시험기간의 표준액 흡광도 평균값은 0.210이었고 표준오차는 0.005이었으며, 최대 흡광도 값은 0.217, 최소 흡광도 값은 0.202로 나타났다. 시험기간 중 흡광도 차이에 대한 변이계수는 2.43% 정도로 낮아 분말상태의 인디고는 안정한 것으로 확인되었지만, 용매로 녹인 용액상태에서 인디고 성분의 안정성과 용해도가 떨어지는 것으로 생각되었다. 따라서 인디고 표준액이 제조 후 12시간이 지나면 흡광도가 낮아졌지만, 매

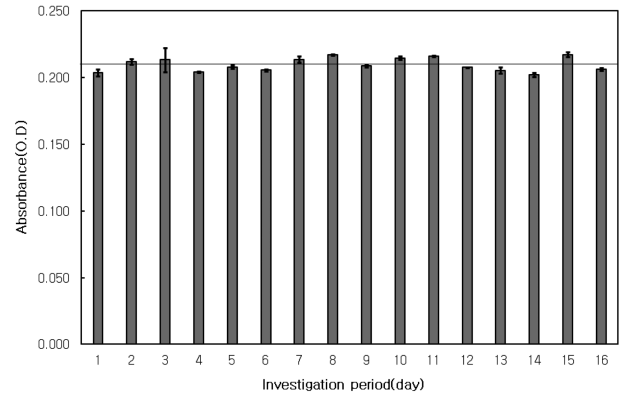


Fig. 7. Daily variation of absorbance values of indigo standard solution. Each standard solution was prepared daily during 16 days. A horizontal line indicates the average value of absorbance.

일 제조하여 재현성을 확인한 결과로 보면 매일 표준액을 제조하여 사용했을 경우 분석시험에 문제가 없는 것으로 확인되었다.

인디고 표준액은 제조 후 4~5일 정도가 되면 청색은 점점 줄어들어 노란색으로 바뀌는 것을 알 수 있었다. 노란색으로 변한 표준액을 UV/Vis 스펙트럼을 측정한 결과 620 nm에서 흡광피크는 없었으며 다른 특이한 흡광피크를 관찰하기 어려웠으며, 인디고를 침전시킬 때 사용하는 소석회를 투여해도 청색을 회복하지 못했으며 다른 물질로 변환된 것으로 추정되었다. 쪽 생잎 수확 후 추출하고 소석회로 침전시켜 건조된 니람의 경우는 비교적 색변화가 적게 나타는 경향이었는데, 추후 인디고 표준물질이나 니람의 안정성과 화학적 변화에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

3. 쪽 니람의 인디고 함량 분석

국내산 4종 (B, D, E, G)과 수입산 3종 (A, C, F)의 니람에 함유된 인디고 분석을 수행하고자 인디고 표준액의 검량선을 Fig. 8과 같이 작성하였으며 각 니람시료의 인디고 정량결과는 Fig. 9와 같다. 검량선에 사용된 농도별 표준액은 모액 (1 mg/10 mL)의 2배에서 64배까지의 희석농도와 같고 충분한 용해도를 가지므로 모액과 안정성은 동일하였으며 표준액 농도에 대한 흡광도 값의 회귀식은 고도로 유의하여 ($p < 0.001$) 시료 정량에 이용할 수 있었다.

시료 A는 수입산 니람인데, 인디고 함량은 18.76%로 가장 높았으며 시료 C가 가장 낮게 나타났다. 시료 A는 니람 추출시 사용된 식물 종이 인도쪽나무 (*Indigofera tinctoria* L.)로 인디간의 함량이 높은 종이며, 소석회를 사용하여 추출하지 않고 생잎에서 직접 인디고를 추출한다. 따라서 수입산 니람은 소석회를 포함하지 않기 때문에 인디고 함량이 높은 것으로

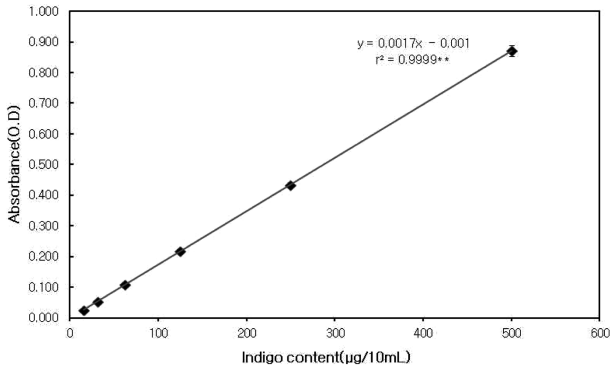


Fig. 8. Calibration curve of indigo standard.

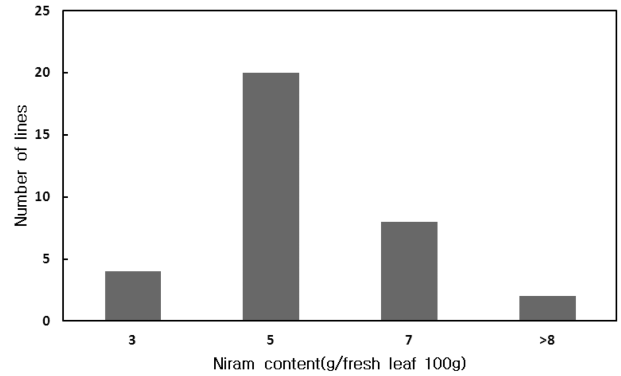


Fig. 10. Frequency distribution for Niram contents in a total of 34 breeding lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross.

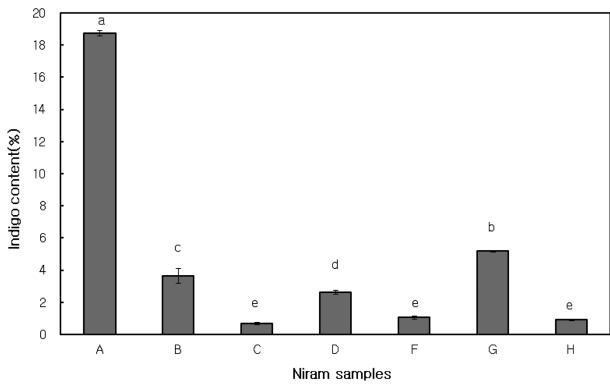


Fig. 9. Comparison of indigo content in a total of 7 samples of Niram. Results followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$.

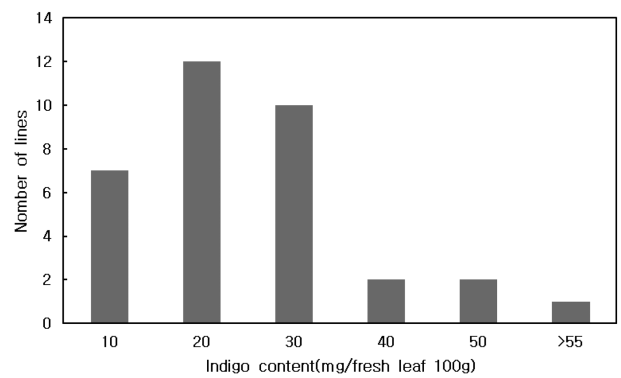


Fig. 11. Frequency distribution for indigo contents in a total of 34 breeding lines of *Persicaria tinctoria* H. Gross.

알려져 있다. 시료 A 이외의 쪽 (*Persicaria tinctoria* H. Gross)에서 추출된 니람 시료들의 인디고 함량을 보면 수입처나 제조지역에 따라 차이가 비교적 크다는 것을 알 수 있었다.

4. 쪽 육성계통의 니람 및 인디고 함량 분석

나주재래종을 모본으로 하여 선발된 34개 계통의 니람을 추출하고 인디고 함량을 분석하여 육성계통들의 니람과 인디고 함량변이를 조사한 결과는 Fig. 10과 Fig. 11과 같다. 총 34개 육성계통의 니람함량은 최저 3.1%에서 최고 8.9%의 범위를 보였으며 평균 5.4% 함량을 나타냈다. 선발계통의 생엽 100 g당 인디고 함량은 평균 25.2 mg이었으며 최저 7.9 mg에서 최고 56.4 mg의 범위를 나타냈다. 쪽 육성계통들의 인디고 함량에 대한 변이계수는 47.7%로 나타나 인디고 함량변이가 비교적 큰 편이었다.

이상의 결과를 종합하면 인디고 추출에 적합한 용매는 DMSO이었으며 표준액 제조는 인디고 1 mg당 DMSO 10 mL 이상이 가장 적당하였으며, 광이나 온도와 같은 저장조건에 관

계없이 표준액 제조이후 1일 이상이 지나면 흡광도 값이 낮아지며, 6시간 이후부터 흡광도 값이 낮아지기 시작하였다. 분말 인디고 물질은 안정적이었으며 인디고 표준액 (indigo 1 mg/10 mL)의 8배 희석액의 흡광도 (620 nm)는 0.210 ± 0.005 정도로 나타났다. 인디고 표준액의 검량선은 유의하게 작성되었으며 7종의 니람시료의 인디고 함량은 0.69%에서 18.76%의 범위를 보여 함량변이가 비교적 크게 나타났다. 또한 34개 육성계통의 생엽 100 g당 인디고 함량은 최저 7.9 mg에서 최고 56.4 mg의 범위를 나타냈다. 본 시험의 결과는 많은 시료를 신속하게 분석해야 하는 쪽 재배시험이나 우량계통육성시험에서 색소평가기술이나 함량기준으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원의 농림바이오기술산업화지원사업 “인디고/인디루빈 생산작물 산업화 연구사업단(810003-03-1-SB110)”의 연구비 지원에 의해 수행된 연구결과의 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Angelini LG, Campeol E, Tozzi S, Gilbert KG, Cooke DT and John P.** (2003). A new HPLC-ELSD method to quantify indican in *Polygonum tinctorium* L. and to evaluate α -glucosidase hydrolysis of indican for indigo production. *Biotechnology Progress*. 19:1792-1797.
- Choi C, Jang MK, Kong BG, Choi HY, Na SK, Lee DB, Yang SH and Nah JW.** (2002). Comparison of physicochemical characterization of *Polygonum tinctorium* dye substances and synthetic indigo. *Applied Chemistry*. 6:595-598.
- Choi C, Yang SH and Nah JW.** (2004). Characterizations of single phase *Polygonum tinctorium* dyes. *Applied Chemistry*. 8:398-401.
- Chung IM, Kim IH and Nam SW.** (1998). Structural analysis of natural indigo colorants extracted from *Polygonum tinctorium*. *Journal of the Korean Society of Dyers and Finishers*. 10:20-28.
- Crews PC.** (1987). The fading rates of some natural dyes. *Studies in Conservation*. 32:65-72.
- Garcia-Macias P and John P.** (2004). Formation of natural indigo derived from woad(*Isatis tinctoria* L.) in relation to product purity. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 52:7891-7896.
- Green LR and Daniels VD.** (1992). The use of *N*-methyl-2-pyrrolidone(NM2P) as a solvent for the analysis of indigoid dyes. *Dyes in History and Archaeology*. 11:10-18.
- Han SY and Choi SC.** (2000). A study on the physiological effects and dyeing properties of the extract of fermented indigo(Part I). *Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles*. 24:96-104.
- Jang HG, Lee SJ, Park YJ and Heo BG.** (2011). Effect of *Polygonum tinctorium* and *Indigofera tinctoria* fresh leaf juice on the dyeability of textile fabrics. *Journal of Life Science and Natural Resources*. 33:70-79.
- John P and Angelini LG.** (2009). Indigo - Agricultural aspects. In Bechtold T and Mussak R. (eds.). *Handbook of natural colorants*. John Wiley & Sons. Chichester, England. p.75-103.
- John P.** (2009). Indigo - Extraction. In Bechtold T and Mussak R. (eds.). *Handbook of natural colorants*. John Wiley & Sons. Chichester, England. p.107-108.
- Jung YJ, Lee MH, Choi HW and Lee EP.** (2000). A study on the dyeing properties of natural indigo complex powder and synthetic indigo with natural fiber. *Journal of the Korean Society of Dyers and Finishers*. 12:16-24.
- Kim GS, Park CG, Lee KH, Choi J, Lee SE, Noh HJ, Lee JH and Kim SY.** (2011). Investigation of shikonin pigments and antioxidant activity of the roots from *Lithospermum erythrorhizon* according to the different growth stages and areas of cultivation. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:435-440.
- Lin YK, Leu YL, Huang TH, Wu YH, Chung PJ, Pang JHS and Hwang TL.** (2009). Anti-inflammatory effects of the extract of indigo naturalis in human neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology*. 125:51-58.
- Maugard T, Enaud E, Sayette A, Choisy P and Legoy MD.** (2002). α -Glucosidase-catalyzed hydrolysis of indican from leaves of *Polygonum tinctorium*. *Biotechnology Progress*. 18:1104-1108.
- Minami Y and Pandalai SG.** (2001). Indican metabolism in *Polygonum tinctorium*. *Recent Research Development in Plant Biology*. 1:155-162.
- Park DN, Beak SR and Jeon DW.** (2011). A study on the effect of the changes of dyeing conditions on the dyeability of silk fabrics dyed with natural *Polygonum tinctoria*. *Journal of Fashion Business*. 15:120-130.
- Park YJ, Yun JG, Jang HG and Heo BG.** (2005). Effect of dyeing conditions on dyeing characteristics in silk during natural dyeing using the raw juice of indigo plants. *Korean Journal of Plant Resources*. 18:417-423.
- Puchalska M, Polec-Pawlak K, Zadrozna I, Hryszko H and Jarosz M.** (2004). Identification of indigoid dyes in natural organic pigments used in historical art objects by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 39:1441-1449.
- Seo HS.** (2008). The experimental study on anti-inflammation and anti-oxidation of Indigo Naturalis and Rehmanniae Radix. *Journal of the Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*. 21:104-110.
- Shin YS, Cho AR and Yoo DI.** (2010). Natural indigo dyeing of cotton fabric - One-step reduction/dyeing process-. *Textile Coloration and Finishing*. 22:101-109.
- Shin YS, Son KH and Yoo DI.** (2009a). Dyeing Properties and storage stability of leaf powder prepared from dyer's knotweed(1) - by freeze drying method-. *Textile Coloration and Finishing*. 21:10-20.
- Shin YS, Son KH and Yoo DI.** (2009b). Natural indigo dyeing by using glucose reduction. *Textile Coloration and Finishing*. 21:10-18.
- Ye Y, Salmon LG and Cass GR.** (2000). The ozone fading of traditional Chinese plant dyes. *Journal of the American Institute for Conservation*. 39:245-257.