

## 유색미 겨에 함유된 항산화 효과 관련 기능성 성분의 검정

강미영<sup>1</sup> · 남연주<sup>1</sup> · 남석현\*

<sup>1</sup>경북대학교 식품영양학과, 아주대학교 생명과학과

## Screening of Antioxidation-related Functional Components in Brans of the Pigmented Rices

Mi Young Kang<sup>1</sup>, Yeon Ju Nam<sup>1</sup> and Seok Hyun Nam\*

Department of Biological Sciences, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received June 30, 2005; Accepted August 18, 2005

Lipid-soluble fractions extracted with methylene chloride and ethyl acetate as well as 70% ethanolic extract were made from 5 cultivars of the pigmented rice brans (DZ 78, Elwee, LK1A-2-12-1-1, LK1-3-6-12-1-1 and Killimhukmi) to determine their antioxidative activities and to measure the contents of phenolic compounds, phytic acid, together with unsaponificated compounds such as retinol, tocopherol and stigmasterol. We also attempted to characterize candidate components in charge of antioxidation and measure their relative contents in each methylene chloride and ethyl acetate fraction by using GC-MS techniques. As the results, we found a 30% higher antioxidative activity with 26-fold greater phenolic compound content of the pigmented rices as compared to those of the normal rice. Especially, in Killimhukmi, the contents of the unsaponificated compounds such as retinol, tocopherol and stigmasterol were also found to be more than 2.3-fold greater than those of normal rice. However, we could not find the overall correlations between antioxidativity of rices and their color values, or unsaponificated compounds contents. Methylene chloride fraction from Killimhukmi and LK1A-2-12-1-1, both showing strong antioxidativity, contained relatively high contents of (Z)-9-hexadecenyl ester-9-octadecanoic acid and 2-Hydroxyl-1-1(hydroxymethyl) ethyl-9-octadecanoic acid, respectively. In ethyl acetate fractions, on the contrary, 1H indene, methyl ester-tetradecanoic acid and methyl ester-hexadecanoic acid were detected as the commonly-occurring substances in the 5 cultivars of pigmented rices, implying a possible role in antioxidative action.

**Key words:** pigmented rice, antioxidativity, phenolic compound, unsaponificated compound, GC-MS

### 서 론

과피의 색이 적갈색에서부터 흑자색에 이르는 다양한 품종의 유색미들은 일반미 품종들에 비해서 미강층 추출물의 항산화 활성이 우수하며,<sup>1)</sup> 이들이 가지는 항산화 성분으로서 cyanidin 3-O-β-D-glucoside 및 peonidine 3-O-β-D-glucoside 등이 보고되어 있다.<sup>2,3)</sup> 본 연구자들은 이미 수원 415 및 상해항혈나 품종의 에탄올 추출물<sup>4,5)</sup> 및 색소분획<sup>6)</sup>에서 높은 항산화활성과 항암활성, 그리고 염증발생에 대한 억제활성을 평가한 바 있다. 그 결과, 다양한 방법을 사용한 항산화 활성의 측정에서 유색미는 일반미보다 월등히 우수한 항산화 활성을 보유하고있음이

나타났을 뿐 아니라, 알리지 염증 발생에 대한 억제효과를 비만세포주인 RBL-2H3 세포주를 사용하여 검토한 결과도 유색미가 염증유발에 중요한 인자로 작용하는 histamine과 MMP (matrix metalloproteinase)의 분비를 저해하는 능력이 일반미 품종들보다 우수하다는 사실을 보여주었다.<sup>7)</sup> 이렇게 유색미가 나타내는 일련의 생리활성 효과들이 유색미에 함유되어 있는 어떠한 성분 특성과 연관성이 있는지의 여부를 파악함은 장차 유색미 품종 육종을 위한 정보 제공 및 유색미의 산업적 활용에 있어서 기여하는 바가 크리라고 사료된다. 이와 같은 배경에서 본 연구자들은 이미 국·외에서 수집·재배한 유색미들을 대상으로 항산화성 및 항변이원성을 검정한 바 있으며,<sup>8,9)</sup> 그 결과는 품종에 따른 이들 생리활성 효과의 차이와 유색미의 가장 큰 특성이라고 여겨지는 색소체 함량 사이에는 상관성이 없음을 보여주었다.<sup>10)</sup> 이에 본 연구에서는 유색미 품종 중 외관 및 색상에서 뚜렷한 차이를 보이는 5종류의 유색미를 시료로 사용

\*Corresponding author

Phone: +82-31-219-2619; Fax: +82-31-219-1615

E-mail: shnam@ajou.ac.kr

하여 이들의 외형 및 색상의 차이가 항산화성 및 항변이원성 등 생리활성 효과를 나타내는 기능성 성분들의 함량에 차이와 연관성을 가지는지의 여부를 검토하였다. 이와 함께, 항산화 효과가 우수하다고 보고된  $\alpha$ -tocopherol 및  $\gamma$ -oryzanol 등<sup>11)</sup>의 쌀겨에 풍부히 함유된 불검화물들과 이들 이외의 불검화물로서 retinol과 stigmaterol 함량 및 기타 쌀겨 함유 성분으로 항산화 활성과 관련성이 있을 것으로 판단되는 피틴산(phytic acid) 및 페놀성화합물(phenolic compounds)의 함량을 측정하였다. 특히, 염화메틸렌( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 및 에틸아세테트( $\text{EtOAc}$ )로 추출한 쌀겨의 지용성 분획에 함유된 직접 정량이 불가능한 다양한 화합물에 대해서는 GC-MS 분석으로 성분을 동정하고 성분간의 상대적 함유량을 결정하였으며 이들 결과에 의거하여 유색미 겨에 함유된 화합물의 함유 양상과 항산화 효과와의 상관성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

**시료 및 시약.** DZ 78, Elwee, LK1A-2-12-1-1, LK1-3-6-12-1-1 및 Killimhukmi(길림후미)의 유색미 5품종과 일반미인 추청의 종자는 서울대학교 농생대 농학과로부터 분양받았다. Sodium acetate, DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), Folin-Ciocalteu's phenol reagent,  $\text{FeCl}_3$ , sulfosalicylic acid, retinol,  $\alpha$ -tocopherol 등 실험에 사용된 시약들은 Sigma Chemicals Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 도정으로 얻어진 쌀겨에 3배량의 ethanol을 가하여 85°C에서 3시간 환류냉각 추출한 다음, 상징액과 침전물을 분리하여 상징액은 별도로 모아두고, 침전물을 위와 같은 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각각 추출 분리된 상징액은 여과, 농축하여 -20°C에서 보관하였다.

**항산화 활성의 측정.** 에탄올 1 ml, 시료 10  $\mu\text{l}$ , 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.5) 990  $\mu\text{l}$ 를 각각 분주한 시험관에 에탄올에 용해시킨 0.5 mM DPPH 용액 0.5 ml를 첨가한 후, 실온에서 30분간 반응하고 DPPH radical의 잔존 수준을 UV/VIS spectrophotometer(Beckman DU-65, USA)를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(%)은  $[(1-A_s/A_c) \times 100]$ 으로 산출하였고,  $A_s$ 와  $A_c$ 에는 각각 실험군과 대조군의 흡광도를 대입하였으며,<sup>12)</sup> 유색미 추출물만은 흡광도가 없음을 확인하고 이 방법에 의해서 측정된 전자공여능 50%를 나타내는 시료의 양을 1 unit라 정의하였다.

**Phenolic compound 함량 측정.** 총 페놀성 화합물의 함량은 Hills의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다.<sup>13)</sup> 시료(1 mg/ml) 0.5 ml를 시험관에 취하고 증류수 6.5 ml를 가한 후, Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 0.5 ml를 첨가하고 3분간 실온에서 방치하였다.  $\text{NaNO}_3$  포화용액 1 ml과 증류수 1.5 ml를 첨가하여 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 페놀성 화합물의 총량은 galic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

**피틴산 함량의 측정.** Hung<sup>14)</sup>와 Antonio<sup>15)</sup> 등의 방법을 참고하여 다음과 같이 실시하였다. 시료에 1.2% HCl-10%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  용액 50 ml를 첨가하여 2시간 동안의 진탕교반으로 얻은 여과액 10 ml에 0.2%  $\text{FeCl}_3$  용액 12 ml를 첨가하여 75분간 중탕 가열하였다. 가열 후 wade reagent(0.03%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0.3%

sulfosalicylic acid)와 10분간 반응시키고 나서 500 nm에서 흡광도를 측정하여, Na-phytic acid를 이용한 표준곡선으로부터 피틴산의 양을 결정하였다.

**레티놀, 토코페롤, 스티그마스테롤 함량 측정.** 시료의 추출은 Anne 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 시료 600 mg에 0.1% BHT가 포함된 에탄올 6 ml를 넣고 85°C 항온수조에서 5분간 반응시킨 후 80% KOH를 120  $\mu\text{l}$  첨가하여 85°C 항온수조에서 10분간 saponification반응을 수행하였다. 여기에 냉각된 탈이온수 3 ml와 hexane 3 ml를 넣고 vortex한 후 1,200 $\times$  g에서 10분간 원심분리하여 상징액만 15 ml 냉각 탈이온수가 담긴 분액 깔대기에 옮겼다. 침전물은 hexane으로 2번 더 추출하였으며 모여진 hexane층은 냉각 탈이온수로 3번 더 씻어낸 후 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과하여 갈색 유리시약병에 담아 진공증발기로 건조시켜 HPLC로 분석할 때까지 -20°C에 냉동 보관하였다. 구입한 retinol,  $\alpha$ -tocopherol, stigmaterol 표준시약을 각각 표준물질로 하여 Bondapak C-18 column, UV 검출기(292 nm), 이동상 95% 메탄올, retention time 10분, flow rate 2.0 ml/min의 조건하에서 HPLC 분석을 실시하였다.

**지용성 성분 분석.** 유색미 겨로부터  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  및 ethyl acetate 추출분획에 함유된 성분들을 Hewlett-Packard사의 HP 6890 series GC system에 의한 gas chromatography에 의해서 분석하였다. 분리관은 DB-5(30 m $\times$ 0.24 mm, film thickness; 0.25  $\mu\text{m}$ )를 사용하였고, 오븐온도는 50°C에서 2분간 유지한 후, 250°C까지 분당 10°C씩 온도를 올린 후, 250°C에서 10분간 유지시켰다. 질량분석기(MS)는 JMS-700(JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하였고, ion source chamber 온도는 230°C, ionizing voltage는 70 eV, scanning mass range는 50-500 amu 등의 조건에서 시료를 각각 측정하였다. 각 성분에 대한 mass spectrum 결과들 HP59970 Chemstation data system에 의한 Wiley 138 database의 검색 및 문헌상의 mass spectral data의 RI와 비교하며 구성 성분들을 확인하였다.<sup>17,18)</sup>

**통계분석.** 3회 이상 실험의 평균치는 mean $\pm$ SD로 표시하였으며, 반복실험 평균치간의 유의성은 SAS software를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의해서 검증하였고  $p < 0.05$ 에서 평균값사이의 유의적 차이를 구하였다. 쌀겨 추출물 성분들과 항산화 활성간의 상관관계는 SPSS PC+(ver. 10.0)를 사용하여 Pearson의 상관계수를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**유색미의 외형 및 색상.** 본 연구에서 검토하고자 하는 사용한 쌀 시료는 과피의 색상에서 차이를 보이는 5품종(DZ 78, Elwee, LK1A-2-12-1-1, LK1-3-6-12-1-1, Killimhukmi)과 대조군으로서 일반미 품종인 추청을 선택하여 사용하였다. 종자 과피의 색을 색차계로 측정된 결과, 밝은 정도를 나타내는 lightness는 일반미 품종인 추청이 가장 높은 수치를 나타내고 있었으며(Table 1), 육안으로 보았을 때 과피 색의 진한 정도가 유사한 DZ 78과 Elwee이나 LK1A-2-12-1-1과 LK1-3-6-12-1-1은 색차계를 사용하여 색의 밝은 정도를 측정해도 역시 유사한 수치로 분류됨을 알 수 있었다. 한편 육안으로도 가장 어두운

**Table 1. Color values of 5 cultivars of colored rice seeds\***

Cultivars	Lightness	Redness	Yellowness
Chuchung	56.0 ± 1.96	5.33 ± 0.40	15.7 ± 0.36
DZ 78	35.7 ± 1.24	15.0 ± 1.32	11.9 ± 0.25
Elwee	31.8 ± 0.68	15.9 ± 0.29	10.6 ± 0.44
LK 1A-2-12-1-1	22.4 ± 0.64	9.90 ± 0.78	3.27 ± 0.55
LK 1-3-6-12-1-1	23.2 ± 0.64	12.9 ± 0.47	4.93 ± 0.38
Killimhukmi	16.8 ± 0.32	4.73 ± 0.90	0.53 ± 0.23

\*Results are expressed as mean ± SD.

과피 색을 나타내고 있는 Killimhukmi는 lightness, redness, yellowness 모두에서 가장 낮은 수치를 나타내고 있었다. 이와 같이 색상에서 차이를 보이는 5품종의 유색미와 비교군인 추청을 대상으로 각 유색미에 있어서 품종별 항산화 활성 및 항산화 관련 화합물의 함량 차이를 조사하였다.

**품종별 페놀성화합물, 피틴산, 불검화물 함량 및 항산화활성.**

우선 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능을 측정하여 품종별 유색미 겨 추출물의 항산화활성을 평가하였다. 5품종의 유색미는 모두 DPPH 라디칼의 소거능이 약 89%로 매우 높았으며, 이에 비하여 일반미인 추청은 약 70% 정도로서 색차계에서 lightness가 높은 추청이 항산화능이 낮게 나타났다. 그러나 유색미 품종 간에는 과피 색의 밝은 정도와 항산화성 사이에 연관성이 보이지 않은 것으로 보아, 단지 과피 색의 밝기만으로 유색미의 항산화성을 평가할 수 없음을 알았다. 따라서 각 품종이 함유한 항산화 관련 화합물의 함량을 측정하였다. 식물 성분에서 항산화 활성의 발현과 연관성이 있는 페놀성화합물의 함량을 품종별로 측정된 결과(Table 2), 종자 100 g 당 페놀성 화합물의 함량은 유색미 품종들이 일반미에 비하여 11배에서 26배 더 높았다. 또한 유색미 품종 간에도 유의한 차이가 관찰되었으며, 페놀성화합물의 함량은 LK1-3-6-12-1-1 > DZ 78, LK1A-2-12-1-1 > Elwee > Killimhukmi의 순서를 보였다. 페놀성 화합물이 많이 함유된 LK1-3-6-12-1-1가 항산화활성도 높았으나, 선발된 유색미 중, 색차계에서 과피 색이 가장 짙게 측정되어 페놀성 화합물의 함량이 높을 것으로 기대되었던 Killimhukmi는 측정결과 페놀성 화합물의 함량이 낮았으며, 항산화활성도 다른 4품종의 유색미에 비하여 낮게 나타났다. 쌀겨에 함유되어 있는 항산화 성분 중 피틴산(myo-inositol hexaphosphate, IP<sub>6</sub>)은 원래 칼슘이나 철과 같은 이온과 결합함으로써 동물모델에서 영양저해기능을 가진 물질로 알려진 것이지만, 최근 항산화활성 및 항암활성이 발견되었을 뿐 아니라, 특히 철이온의 chelation을 통하여 hydroxyl radical의 발생을 억제한다는 사실이 알려져 있기 때문에<sup>20-22)</sup> 이 화합물의 함량을 측정하였다. Table 2의 결과에서 알 수 있듯이 유색미 5품종의 피틴산 함량은 일반미인 추청보다 전반적으로 약 3배 정도 높게 나타났다. 쌀과 같이 종자류를 포함하여 일반적으로 식물성 식품들에서 잘 알려진 건강 기능성 생리활성 물질로서 phytosterol류와 비타민 A, C, E 등 항산화성 비타민들이 알려져 있는데, 이 성분들 또한 항산화 활성에 기인하는 다양한 생리활성 효과들로서 널리 알려진 물질들이다. 따라서 본 실험에서는 항산화성 비타민에 해당하는 retinol과 tocopherol 및

**Table 2. Antioxidant activities of 70% ethanolic extracts and contents of total phenolic acid compounds and phytic acids from 5 cultivars of colored rice\***

Cultivars	#DPPH radical scavenging activity (%)	Phenolic compounds (mg)	Phytic acids (mg)
Chuchung	22.3 ± 1.11 <sup>d</sup>	2.504 ± 0.251 <sup>e</sup>	43.63 ± 0.355 <sup>d</sup>
DZ 78	84.3 ± 2.41 <sup>a</sup>	48.49 ± 1.592 <sup>b</sup>	138.1 ± 2.35 <sup>a</sup>
Elwee	85.4 ± 0.54 <sup>a</sup>	40.59 ± 1.739 <sup>c</sup>	138.4 ± 4.42 <sup>a</sup>
LK1A-2-12-1-1	81.8 ± 1.16 <sup>b</sup>	45.75 ± 1.357 <sup>b</sup>	131.4 ± 6.37 <sup>ab</sup>
LK1-3-6-12-1-1	86.4 ± 0.71 <sup>a</sup>	65.55 ± 2.066 <sup>a</sup>	131.7 ± 4.25 <sup>bc</sup>
Killimhukmi	76.5 ± 0.08 <sup>c</sup>	28.16 ± 0.997 <sup>d</sup>	130.9 ± 5.63 <sup>c</sup>

\*Results are expressed as mean ± SD.

Values not sharing common letter in column were significantly different at  $p < 0.05$ .

#Radical scavenging activity was measured at a sample concentration of 0.04 mg/ml.

**Table 3. Contents of various unsaponificated components in rice bran\***

Cultivars	Retinol (µg)	Tocopherol (µg)	Stigmasterol (µg)
Chuchung	1.44 ± 0.057 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.021 <sup>c</sup>	0.27 ± 0.053 <sup>c</sup>
DZ 78	3.66 ± 0.178 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.069 <sup>bc</sup>	0.36 ± 0.085 <sup>b</sup>
Elwee	2.86 ± 0.166 <sup>b</sup>	0.95 ± 0.139 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.061 <sup>b</sup>
LK1A-2-12-1-1	1.10 ± 0.083 <sup>d</sup>	0.89 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.066 <sup>b</sup>
LK1-3-6-12-1-1	0.85 ± 0.105 <sup>d</sup>	0.75 ± 0.031 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.089 <sup>b</sup>
Killimhukmi	3.67 ± 0.189 <sup>a</sup>	1.21 ± 0.050 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.097 <sup>a</sup>

\*Results are expressed as mean ± SD.

Values not sharing common letter in column were significantly different at  $p < 0.05$ .

phytosterol의 하나인 stigmasterol의 함량을 각각 유색미 품종별로 측정하였다(Table 3). Retinol과 tocopherol의 함량은 유색미 중에서도 Killimhukmi가 가장 높았으며, 일반미인 추청에 비하여 각각 2.5배 및 1.6배 정도 더 많이 함유되어 있음을 알았다. Stigmasterol의 경우도 역시 Killimhukmi가 추청에 비하여 함량이 2.3배 정도 배 더 많이 검출되었다.

**유색미 겨 추출물의 용매 분획별 항산화 활성.** 유색미 겨에 함유된 항산화성 성분을 확인하려는 실험의 일환으로, 지용성 성분을 포함한 염화메틸렌(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 분획과 에틸아세트(EtOAC) 분획을 제조하여 각 추출용매 분획별 · 품종별 항산화 활성을 DPPH 라디칼에 대한 전자공여능을 측정하였다(Table 4). 예상대로 유색미 겨의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획과 EtOAC 분획 모두 일반미 품종인 추청보다 항산화 활성이 각각 최고 2.4배, 4.3배 정도 높았으며, 특히 유색미 중에서도 LK1A-2-12-1-1과 LK1-3-6-12-1-1의 활성이 가장 높게 나타났다. Killimhukmi의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획에서는 LK1A-2-12-1-1이나 LK1-3-6-12-1-1보다 약간 낮은 수준의 항산화 활성이 검출되었다(추청의 2.2배). Killimhukmi EtOAC 분획의 항산화 활성은 추청의 2배 정도이지만 유색미 중에서도 가장 활성이 낮은 것으로 나타났다. 이와 같은 유전율이 다른 추출용매 별 항산화활성의 차이는 DZ 78과 Elwee에서도 관찰할 수 있었다(Table 4). 유색미와 일반미의 뚜렷한 항산화 활성의 차이에 미치는 각 추출분획 내 성분의 상대적 함

Table 4. Electron donating ability of the rice bran extracts to DPPH radicals

(per unmilled 100 g rice)

Cultivars	Yield (%)			Electron donating ability (units)	
	Bran layer	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Fr.	EtOAc Fr.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Fr.	EtOAc Fr.
Chuchung	16.0	8.19	1.12	87.00	51.48
DZ 78	26.4	3.56	1.25	109.9	158.7
Elwee	14.3	6.99	4.55	105.1	191.9
LK1A-2-12-1-1	30.8	4.64	3.28	210.8	219.8
LK1-3-6-12-1-1	27.3	5.38	3.39	210.6	220.5
Killimhukmi	25.9	5.75	1.47	194.7	102.4

Table 5. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> soluble components identified from colored rice brans

(units: %)

Components	Chuchung	DZ 78	Elwee	LK1A -2-12-1-1	LK1- 3-6-12-1-1	Killim- hukmi
C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O; (E)-2-Decenal		0.40	0.56	8.55	3.72	1.89
C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O; (E)-2,4-Decadienal	1.09	0.39	2.72	7.17	4.83	2.47
C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O; 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	8.55					
C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> ; 7-Methoxy-6-ethoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene	0.94					
C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ; Hexadecanoic acid		2.23	10.49	29.45	19.13	26.50
C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> ; Dibutyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid	25.42					
C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> ; 6(E),8(E)-Heptadecadiene					0.70	
C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> ; 1-Heptadecene					1.35	
C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> ; Methyl ester-hexadecanoic acid	6.75	0.18				
C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> OS; 1-Mercapto-2-heptadecanone	11.94					
C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ; 9,12-Octadecadienoic acid			32.71			
C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> ; Methyl ester-9-octadecanoic acid	45.31	0.31	2.49	3.67	2.28	
C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> ; Nonadecane					1.26	
C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> ; Eicosane					0.70	
C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> ; 2-Hydroxy-1-1(hydroxymethyl)ethyl-9-octadecenoic acid		2.65		49.36		
C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> ; Heneicosane					0.75	
C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> ; 2-(3,4-dimethylphenyl)-3,3-(2,2'-diphenyldiyl)-2-propene		6.60				
C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> N; 3',3'-Dimethylspirol[acridane-9,1'-indane]			9.83			
C <sub>24</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> ; 2-Formyl-8-isopropyl-peri-xanthenoxanthene-4,10-Quinone		15.11				
C <sub>25</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> ; 2-Acetyl-8-isopropyl-peri-xanthenoxanthene-4,10-Quinone		57.76				
C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub> ; 24-Oxocholesterol acetate		0.41			22.66	
C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub> ; (3β,22Z)-acetate-stigmasta-5,22-dien-ol		11.92			11.35	
C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub> ; (24R,25S)-Aplysterylacetate		2.04				4.75
C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub> ; (3β)-24-methylene-9,19-cycloostan-3-ol			41.2			
C <sub>34</sub> H <sub>64</sub> O <sub>2</sub> ; (Z)-9-Hexadecenyl ester-9-octadecenoic acid					30.14	64.38
	100	100	100	98.2	98.9	99.9

유 양상을 GC-MS로 조사하였고, 확인된 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획 내 성분들을 Table 5와 6에 탄소수가 적은 순서대로 정리하였다. 향산 화성이 낮은 일반미 추출은 탄소수가 19개 이상인 화합물이 측정되지 않은 반면, 유색미들은 전반적으로 다양한 탄소수의 화합물이 분포한다는 사실을 알았다. 이 결과는 탄소수 19개 이상의 화합물이 향산화 활성의 발현에 필요할지 모른다는 가능성을 시사하였다. 이와 같은 관점에서 볼 때, 유색미 중에서도 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획의 향산화 활성이 강한 LK1A-2-12-1-1와 Killimhukmi에 있어서 화합물의 함유 양상은 다양성이 낮았으나, Killimhukmi는 C<sub>34</sub>H<sub>64</sub>O<sub>2</sub>인 (Z)-9-Hexadecenyl ester-9-octadecanoic acid, LK1A-2-12-1-1의 경우는 C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>인 2-Hydroxyl-1-1(hydroxymethyl)ethyl-9-octadecanoic acid의 상대적 함량이 높다는 특징을 보였다. 따라서 이들 화합물이 품종별 향산화 활성의 표현에 어떤 영향을 미치는지에 관하여 검토해 볼 필요가 있다고 하겠다. 다

음으로 EtOAc 분획에 대해서도 동일한 실험을 수행하였다 (Table 6). 그 결과, C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O인 3,4-Dimethyl-benzaldehyde와 C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O인 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>인 Butyl phenylmethyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid, C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>인 Dicyclohexyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid 및 C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>O<sub>1</sub>인 Diphenyl 5-methylheptyl phosphate는 일반미 추출에서만 검출된 반면, C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>인 1H Indene과 C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>인 Methyl ester-tetradecanoic acid 및 C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>인 Methyl ester-hexadecanoic acid는 5품종 유색미에 공통적으로 검출되는 화합물로서, 추출에서는 발견되지 않았다. Killimhukmi의 EtAOC 분획은 향산화 활성이 추출의 2배 정도로 측정되었으나, 그 활성은 다른 유색미에 비하여 최소 1/3 수준에 지나지 않는데, 이것은 아마도 Killimhukmi에서 약 58%의 함량비를 가지는 C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>인 methyl ester-9-octadecanoic acid나 두 번째로 상대적 함량비

**Table 6. EtOAC soluble components identified from colored rice brans**

(units: %)

Components	Chuchung	DZ 78	Elwee	LK1A -2-12-1-1	LK1- 3-6-12-1-1	Killim- hukmi
C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> ; 1H Indene		0.53	16.4	5.94	3.02	1.82
C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O; 1,3-Dihydro-2H-indene-2-one			0.62			
C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O; 3,4-Dimethyl-benzaldehyde	1.85					
C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ; (4-Vinyl-2-methoxy-phenol)	4.67		0.85			
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> ; 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethanone	1.86	0.36				0.65
C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O; 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	4.14					
C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> ; Tetradecanoic acid		3.03			0.31	
C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> ; Methyl ester-tetradecanoic acid		1.77	0.80	0.72	0.75	0.78
C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ; Hexadecanoic acid		3.13	5.27	4.00	15.18	
C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> ; Dibutyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid	18.45		5.30	2.17		24.45
C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> ; Methyl ester-hexadecanoic acid	6.19	11.95	14.13	14.08	18.04	12.7
C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ; 9,12-Octadecadienoic acid		21.70	23.02	31.56	37.06	
C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> ; Ethyl ester-hexadecanoic acid			0.66		0.59	
C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> ; Butyl phenylmethyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid	4.02					
C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> ; Methyl ester-9,12-octadecanoic acid	44.43		30.61	35.96	21.08	
C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> ; Methyl ester-9-octadecanoic acid						57.92
C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub> ; Dicyclohexyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid	9.06					
C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>1</sub> P; Diphenyl5-methylheptylphosphate	5.33					
C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> ; Ethyl linolate				3.57	2.74	
C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> ; Methyl ester-11-eicosnoic acid						0.56
C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> ; Methyl ester-eicosnoic acid						0.40
C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> O; 1-(1-Hydroxy-2-naphthyl)acenaphthylene		59.05				
	100	102	97.7	98.0	98.8	99.3

가 높을 뿐 아니라 추청에서도 공통적으로 검출되는 성분인 C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>인 dibutyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid가 원인일 가능성이 대두된다. 이들 성분들과 항산화성분의 연관성을 보면, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획의 경우, DPPH 라디칼에 대한 전자공여능이 큰 것으로 나타난 Elwee, LK1A-2-12-1-1 및 LK1-3-6-12-1-1은 공통적으로 hexadecanoic acid(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>)의 함량이 높은 반면, 추청은 이 화합물이 검출되지 않는 특징을 보였다(Table 5). EtOAC 분획의 경우는 함유된 화합물의 분포와 항산화성에 있어서 더욱 뚜렷한 특징을 보여주었는데, 항산화성이 강한 DZ 78, Elwee, LK1A-2-12-1-1 및 LK1-3-6-12-1-1에서는 예외없이 9,12-Octadecadienoic acid(C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>)의 함량이 높았으며, 이와 같은 현상은 추청에서 발견되지 않았다(Table 6). 함유된 화합물 또는 기능성 사이의 상관성을 나타낸 Table 7에서 보는 바와 같이, (E)-2-decenal의 함량은 (E)-2,4-decadienal 및 dibutyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid의 함량과 높은 정의 상관성을 보이고 있었는데( $r=0.936, p<0.01$  및  $r=0.989, p<0.01$ ), (E)-2-decenal은 유색미의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획에서만 검출되는 반면, dibutyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid는 추청의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획과 추청 및 유색미 중 항산화성이 낮은 Killimhukmi의 EtOAC 분획에서만 관찰되는 것으로 보아, 이들 화합물의 함량이 쌀의 항산화성 발현에 영향을 줄 가능성이 시사되었다. (E)-2,4-decadienal의 함량은 methyl ester-9-octadecenoic acid의 함량과 정의 상관성이 있었고( $r=0.922, p<0.05$ ), hexadecanoic acid의 함량은 dibutyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid의 함량과 높은 정의 상관을 보이지만( $r=0.994, p<0.01$ ), methylester-9-octadecenoic acid 함량과 methyl ester-tetradecanoic acid 함

량과는 부의 상관성을 나타내었다( $r=-0.916, p<0.05$ ). Hexadecanoic acid는 유색미의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획 및 Killimhukmi를 제외한 유색미의 EtOAC 분획에 존재하지만, methylester-9-octadecenoic acid는 추청의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획에 다량 존재하는 반면, Killimhukmi를 제외한 다른 유색미에는 소량만 존재하는 것으로 보아, 역시 이들 화합물의 상대적 함량이 항산화성의 발현에 중요할 것으로 생각된다. 한편 피틴산의 함량은 지용성 성분 중 hexadecanoic acid 및 dibutylester-1,2-benzenedicarboxylic acid의 함량과는 부의 상관을 나타내고 있었으며( $r=-0.969, p<0.01$  및  $r=-0.996, p<0.05$ ), 지용성 비타민인 retinol 함량은 지용성 성분 중 (E)-2,4-decadienal 및 methyl ester hexadecanoic acid의 함량과 부의 상관성을 나타내고 있었다( $r=0.880, p<0.05$  및  $r=0.821, p<0.05$ ). 상관성 검정에서 DPPH radical 소거활성으로 대표되는 항산화활성과 불검화물인 stigmasterol의 함량 사이도 역시 부의 상관성이 나타났지만(Table 7), 이들 불검화물이 전체적인 항산화성의 발현에 미치는 효과를 평가하기 위해서는 보다 다양한 불검화물의 확인 및 이들의 항산화 활성의 측정에 대한 연구가 선행되어야 할 것으로 본다.

유색미는 추청과 같은 일반미에 비하여 항산화성이 높다고 검증되어 있고, 높은 항산화성을 나타내는 기능성물질로서  $\gamma$ -oryzanol이나  $\alpha$ -tocopherol, 그리고 색소성분인 cyanidine 3-O- $\beta$ -D-glucoside이나 peonidine 3-O- $\beta$ -D-glucoside에 주목하였다. 그러나 본 실험의 결과에서 나타나듯이, 이들 화합물의 함량 분석만으로는 총체적인 쌀 종자의 항산화성을 판단하기 어렵다. 따라서 향후 건강기능성 쌀의 육종에 있어서 가장 중요한 기능성 검정지표인 항산화성을 간단하지만 신뢰성 있게 판별할 수

Table 7. Correlation coefficients among antioxidative activities and amount of various components

Relevant characters		Correlation coefficients
DPPH radical scavenging activity	- Tocopherol	-0.894*
	- Stigmasterol	-0.867*
Phenolic compounds	- Tocopherol	-0.927*
	- Stigmasterol	-0.813*
Phytic acids	- Hexadecanoic acid	-0.969**
	- Dibutylester-1,2-benzenedicarboxylic acid	-0.996*
Retinol	- (E)-2,4-Decadienal	-0.880*
	- Methyl ester hexa decanoic acid	-0.821*
(E)-2-Decenal	- (E)-2,4-Decadienal	0.936**
	- Dibutylester-1,2-benzenedicarboxylic acid	0.989**
(E)-2,4-Decadienal	- Methyl ester-9-octadecanoic acid	0.922*
	- Dibutylester-1,2-benzenedicarboxylic acid	0.994**
Hexadecanoic acid	- Dibutylester-1,2-benzenedicarboxylic acid	0.994**
Methylester-9-octa-decanoic acid	- Methylester-tetradecanoic acid	-0.916*

\* and \*\* represent correlations at the level of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

있는 생화학적 마커의 개발을 위한 보다 상세한 성분분석 연구가 이루어질 필요가 있다.

## 초 록

5품종의 유색미(DZ 78, Elwee, LK1A-2-12-1-1, LK1-3-6-12-1-1, 길림흑미) 겨 70% 에탄올 추출물 및 염화메틸렌 및 에틸아세트로 추출한 지용성 분획들의 DPPH radical 소거활성을 측정하고 페놀성화합물 및 피틴산, 그리고 불검화물로서 retinol, tocopherol과 stigmasterol의 함량을 정량하였다. 또한 GC-MS를 사용하여 염화메틸렌 및 에틸아세트 분획이 함유한 구성분을 동정하고 상대적 함량을 측정함으로써 항산화 활성의 발현에 필요할 것으로 보이는 성분들을 조사하고자 하였다. 그 결과, 유색미의 항산화성은 일반미보다 약 30%정도 더 높았고, 페놀성화합물의 함량은 일반미보다 26배까지 더 많았다. 특히 길림흑미는 retinol이나 tocopherol, stigmasterol 같은 불검화물의 함량이 일반미보다 2.3배 이상 더 많았다. 그러나 항산화성과 색도 및 불검화물의 함량과는 전반적인 상관성은 없었다. 항산화성이 강한 길림흑미 및 LK1A-2-12-1-1의 염화메틸렌 분획은 각각 (Z)-9-Hexadecenyl ester-9-octadecanoic acid 및 2-Hydroxyl-1-1(hydroxymethyl)ethyl-9-octadecanoic acid의 상대적 함량이 높았다. 반면, 에틸아세트 분획에서는 1H Indene과 Methyl ester-tetradecanoic acid 및 Methyl ester-hexadecanoic acid가 5품종 유색미에서 공통적으로 검출되어, 이들 화합물이 항산화성에 관여할 가능성을 시사하였다.

**Key words:** 유색미, 항산화성, 페놀성화합물, 불검화물, GC-MS

## 감사의 글

본 연구는 과학재단 특정기초 연구비와 경북대학교 연구비 지원(과제번호: R01-1999-00165)에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드리며, 아울러 쌀 시료를 공급해 주신 서울대 농학과 고 희중 교수님께도 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M. and Kawakishi, S. (1988) Chemical studies on novel rice hull antioxidants I. Isolation, fractionation, and partial characterization. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 723-727.
- Choi, S. W., Kang, W. W. and Osawa, T. (1994) Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice. *Foods Biotechnol.* **3**, 131-135.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Kawakishi, S., Choi, S. W. and Osawa, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2407-2411.
- Kang, M. Y., Choi, Y. H. and Nam, S. H. (1996) Inhibitory mechanism of colored rice bran extract against mutagenicity induced by chemical mutagen Mitomycin C. *Agric. Chem. Biotechnol.* **39**, 424-429.
- Nam, S. H. and Kang, M. Y. (1997) *In vitro* inhibitory effect of colored rice bran extracts carcinogenicity. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**, 307-312.
- Choi, S. W., Nam, S. H. and Choi, H. C. (1996) Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Foods Biotechnol.* **5**, 305-309.
- Choi, S. P., Kang, M. Y. and Nam, S. H. (2004) Inhibitory activity of the extracts from the pigmented rice brans on inflammatory reactions. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 222-227.
- Nam, S. H., Chang, S. M. and Kang, M. Y. (2002) Screening of mutagenicity and antimutagenic activity against chemical direct mutagens of ethanolic extracts from colored rice bran. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 195-202.
- Kang, M. Y., Shin, S. Y. and Nam, S. H. (2003) Antioxidant and antimutagenic activity of solvent-fractionated layers of colored rice bran. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 951-958.
- Kang, M. Y., Shin, S. Y. and Nam, S. H. (2003) Correlation of lipid soluble compounds of colored rices and its mutagenicity, antimutagenicity and antioxidativity. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 214-219.
- Juliano, B. O. (1985) In Rice-Chemistry and Technology.

- AACC Press, New York.
12. Yen, G. C. and Chem, H. Y. (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenity. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 27-32.
  13. Kang, M. Y., Shin, S. Y. and Nam, S. H. (2003) Correlation of antioxidant and antimutagenic activity with content of pigments and phenolic compounds of colored rice seeds. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 968-974.
  14. Haung, W. and Lantzsch, H. J. (1983) Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and products. *J. Sci. Food Agric.* **34**, 1423-1426.
  15. Antonio, D., Inteaz A. and Selim K. (1991) Identification of phytate in proteins using polyacrylamide disc gel electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 2128-2130.
  16. Kurilich, A. C. and Juvik, J. A. (1999) Quantification of carotinoid and tocopherol antioxidants in *zea mays*. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1948-1955.
  17. Adama, R. P. (1995) In *Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Allured Publishing Co., Illinois.
  18. Kovarts, E. (1965) Gas chromatographic characterization of organic substance in the retention index system. *Adv. Chromatogr.* **1**, 229-247.
  19. Nam, S. H., Chang, S. M. and Kang, M. Y. (2003) Varietal difference in antioxidative activity of ethanolic extracts from colored rice bran. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 16-22.
  20. Reddy, N. R., Pierson, M. D., Sathe, S. K. and Salunkhe, D. K. (1989) In *Phytates in Cereals and Legumes*; CRC Press, Boca Raton, Florida.
  21. Graf, E. and Eaton, J. W. (1990) Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biol. Med.* **8**, 61-69.
  22. Shamsuddin, A. M., Vucenic, I. and Cole, K. E. (1997) A novel anticancer agent. *Life Sci.* **61**, 343-354.