pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 5, pp. 371~380 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.5.371

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

유색 농산물 중 안토시아닌과 폴리페놀 함량 비교 연구

정일형* · 오문석 · 전종섭 · 김한택 · 홍세라 · 박광희 · 윤미혜
경기도보건환경연구원 보건연구기획팀

A Comparative Study on Anthocyanin and Polyphenol Contents in Colored Agricultural Products

Il-Hyung Jeong*, Moon-Seog Oh, Jong-Sup Jeon, Han-Taek Kim,
Se-Ra Hong, Kwang-Hee Park, and Mi-Hye Yoon
Public Health Research Planning Team, Gyeonggi-do Institute of Health and Environment, Suwon, Korea
(Received July 10, 2017/Revised August 3, 2017/Accepted September 21, 2017)

ABSTRACT - In this study, 17 kinds of polyphenols and 5 kinds of anthocyanins were analyzed to compare the contents of polyphenols and anthocyanins in 76 colored agricultural products. A total of 17 polyphenols were analyzed simultaneously by 9 phenolic acids (gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, *t*-ferulic acid, *t*-cinnamic acid) and 8 flavonoids ((+)catechin, syringic aldehyde, rutin, epicatechin gallate, naringin, luteolin, naringenin, kaempferol) and 5 anthocyanins (delphinidin-3-glucoside, delphinidin-3-rutinoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside) were simultaneously analyzed. The total content of 17 polyphenols was determined as seoritae 255.1 ± 7.5 μg/g, seomoktae 275.8 ± 5.3 μg/g, black rice 78.5 ± 4.6 μg/g, black sesame 75.8 ± 3.2 μg/g, blueberry 143.3 ± 5.5 μg/g, aronia 195.2 ± 4.9 μg/g and blackcurrent 131.6 ± 3.2 μg/g, the highest content was found in the order of seomoktae > seoritae > aronia > blueberry > blackcurrant > black rice > black sesame. The total content of 5 anthocyanins was determined as seoritae 82.4 ± 17.2 μg/g, seomoktae 95.2 ± 6.1 μg/g, black rice 74.1 ± 9.7 μg/g, black sesame were not detected, blueberry 110.8 ± 1.9 μg/g, aronia 218.9 ± 6.1 μg/g and blackcurrent 209.7 ± 4.0 μg/g, the highest content was found in the order of aronia > blackcurrant > blueberry > seomoktae > seoritae > black rice. These results indicated that seomoktae and aronia possessed the high level of functional components and further study will be needed to develop high value-added foods based on the colored agricultural products.

Key words : Colored Agricultural Products, Polyphenols, Anthocyanins

건강 100세 시대를 맞이하여 컬러푸드(color food)가 인기를 끌고 있으며, 조화로운 식생활과 건강한 삶을 유지하는 데 큰 도움을 주는 건강식품으로 노화를 예방하는 검정색 식품, 면역력과 항암 효과를 높이는 주황색 식품, 혈관과 위장을 깨끗하게 하는 초록색 식품, 콜레스테롤을 낮추는 하얀색 식품, 심장병 예방과 독소를 제거하는 보라색 식품, 피부가 좋아지는 노란색 식품, 항암 효과와 혈관을 튼튼하게 하는 빨간색 식품 등이 있다[1]. 컬러푸드의 빨강, 노랑, 초록, 보라, 검정, 흰색 등의 색깔은 식품의 파이토케미컬(phytochemical)이라는 성분에 의한 것이며, 식품의 색뿐 만이 아니라 식품 고유의 독특한 맛과 향을 부여하며, 항산화 작용이나 면역기능 증가 등을 통해 건강에 이로운 역할을 하는 자연 발생의 생리활성을 가지는 물질이다[2-3]. 파이토케미컬은 carotenoids, phenolics, alkaloid, nitrogen-containing compounds, organosulfur compounds로 분류된다[4]. 그중에서도 폴리페놀은 녹색 식물의 광합성 작용에 의해 생성된 당의 일부가 변화한 2차 대사산물로 벤젠고리(C_6H_6)의 수소 중 하나가 수산기(OH–)로 치환된 물질을 페놀이라 하고 2개 이상 갖고 있는 물질을 폴리페놀 또는 다가 페놀이라고 한다[5]. 폴리페놀은 산화방지와 종양세포억제, 자유라디칼 소거 역할을 하며[6], 혈소판 응집억제, 심혈관질환 예방, 항암효과, 알츠하이머병에 의한 뇌손상 예방 역할을 한다[7]. 또한 안토시아닌은 식물계에 널리 분포되어 있는 페놀 화합물 중 하나로 열매, 꽃, 과실, 줄기, 잎, 뿌리 등 식물체 각 부위에 폭넓게 분포되어 있

*Correspondence to: Il-Hyung Jeong, Public Health Research Planning Team Gyeonggi-do Institute of Health and Environment 95, Pajangcheon-ro, Jangan-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 16025, Korea
Tel: 82-31-250-2571, Fax: 82-31-250-2606
E-mail: jih1010@gg.go.kr

는 적색, 자색, 청색 등의 색을 나타내는 수용성 flavonoid 계 색소이다[8]. 안토시아니딘과 당이 결합된 배당체를 안토시아닌이라고 하며, 자연계에 다양한 색깔로 존재하고 있으며, 항산화 및 항염 활성 뿐만 아니라 특정 암세포에 대하여 세포증식억제, 세포주기정지, 세포사멸유도 등의 메커니즘을 통해 강력한 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[9]. 이처럼 파이토케미컬에 관한 연구는 성인병 예방과 관련된 항암효과[10], 심혈관 질환 예방[11], 면역증진[12], 노화지연[13] 등 건강증진 효과와 관련하여 작용 기작이나 구조 활성 관계를 중심으로 연구가 수행되어 왔으며, 최근에는 ESI (electrospray ionization)를 기반으로 질량분석 기술을 적극 활용하여 분석하고 있으나[14-15], 대부분의 연구가 정성적 특성평가에 국한되어 있으며[16-17], 여러 개별 성분을 동시에 분석할 수 있는 정량분석의 기본이 되는 분석조건에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 인터넷 쇼핑몰에서 유통되는 유색 농산물 76건을 대상으로 폴리페놀 17종 및 안토시아닌 5종을 동일한 전처리 방법으로 동시 분석하여 개별 성분 함량을 비교 조사하여 이를 이용한 다양한 기능성 식품 개발의 기초자료를 제공하고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료

본 실험에서는 인터넷 쇼핑몰에서 유통되는 콩류(서리태 10건, 서목태 10건) 20건, 곡류(흑미) 20건, 유지종실류(흑임자) 10건, 장과류(블루베리 14건, 아로니아 7건, 블랙커런트 5건) 26건으로 총 76건을 구입하여 시료로 사용하였다.

표준물질 및 시약

폴리페놀 표준물질로는 gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, (+)catechin, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, *t*-ferulic acid, *t*-cinnamic acid, syringic aldehyde, naringin, naringenin, kaempferol 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였고, rutin, epicatechin gallate, luteolin 등은 Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)사의 제품을 사용하였다. 안토시아닌 표준물질로는 delphinidin-3-glucoside, delphinidin-3-rutinoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였다. methanol과 acetonitrile의 경우 Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)사의 제품이며, trifluoroacetic acid와 acetic acid는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였고, potassium ferrocyanide trihydrate 및 zinc acetate dihydrate는 Daejung Chemicals & Metals (Siheung, Republic of Korea)사의 제품을 사용하였다. water는 Thermo Scientific Barnstead NANO Pure Diamond (Reverse Osmosis, Model D126611/D11911, Dubuque, Iowa, USA)로 제조한 3차 water (> 18.2 MΩ cm resistivity)를 사용하였다.

장비

HPLC 분석은 Agilent사의 1100 series (Agilent Technologies, Boeblingen, Germany)를 사용하였고, HPLC-MS/MS는 SPLC (Shiseido, Tokyo, Japan)와 TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)로 구성되었으며, 원심분리기(Hanil Scientific, Combi-514R, Gimpo, Republic of Korea)와 질소농축기(Biotage, TurboVap-LV, Uppsala, Sweden)를 사용하였다.

실험방법

시료 전처리

시료 약 5 g에 1% acetic acid in 50% methanol 50 mL를 첨가한 후 상온상태에서 24시간 추출한 후, Whatman No. 1 여과지(Toyo Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 시료 추출액으로 사용하였다. 시료의 단백질 등 간섭물질 제거를 위해 다른 연구에서 사용된 전처리법을 변형하여 추출액에 카레스(carrez) 침전제 제1액(15% 페로시안화칼륨용액) 1 mL를 가해 흔들어 섞은 다음 다시 제2액(30% 초산아연용액) 1 mL를 가해 흔들어 섞고, 원심분리(3500 rpm, 10분, 4°C)하여 상층액 2 mL을 취하였다[18-19]. Sep-pak C18 cartrdge (Waters, Milford, MA, USA)를 methanol 5 mL, H_2O 5 mL의 순으로 흘려주어 활성화시킨 다음, 상층액 2 mL을 loading 후, 5 mL 1% acetic acid in 50% methanol로 2회 용출 한 후, 45°C에서 N_2 가스로 농축한 다음, 50% methanol 2 mL로 용해하고 Membrane syringe filter (PTFE 25 mm, 0.45 μm, Advantec, Toyo Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

표준용액 조제

각 표준물질의 표준원액(stock standard)은 약 100 μg/mL의 농도가 되도록 methanol에 녹여 조제하여 냉장 보관하여 사용하였다. 혼합표준용액(working standard mix)는 표준원액(stock standard)을 50% methanol로 적정한 농도로 희석하여 사용하였다.

폴리페놀 정량

분석대상 폴리페놀은 gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, *t*-ferulic acid, *t*-cinnamic acid 등 9종의 phenolic acid와 (+)catechin, syringic aldehyde, rutin, epicatechin gallate, naringin, luteolin, naringenin, kaempferol

Table 1. Conditions of polyphenol analysis by HPLC

Parameter	Condition		
Instrument	Agilent 1100 series		
Column	Zorbax Eclipse plus C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)		
Column temp.	30°C		
Wavelength	VWD Detector 280 nm		
Mobile phase	A : 0.1% acetic acid B : 0.1% acetic acid in acetonitrile		
Gradient table	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	95	5
	5.0	90	10
	20.0	87	13
	25.0	85	15
	35.0	75	25
	40.0	70	30
	50.0	65	35
	60.0	95	5
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volumn	10 μL		

Table 2. Conditions of anthocyanin analysis by HPLC

Parameter	Condition		
Instrument	Agilent 1100 series		
Column	YMC-Pack ODS-AM C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)		
Column temp.	30°C		
Wavelength	VWD Detector 530 nm		
Mobile phase	A : 1% TFA in H_2O B : acetonitrile		
Gradient table	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	89	11
	25.0	85	15
	30.0	85	15
	40.0	89	11
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volumn	10 μL		

등 8종의 flavonoid로 총 17종의 폴리페놀을 서 등[20]의 방법을 변형하여 동시 분석하였고, HPLC 분석조건은 Table 1과 같다.

안토시아닌 정량

분석대상 안토시아닌은 delphinidin-3-glucoside, delphinidin-3-rutinoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside 등 5종을 정[21]의 방법을 변형하여 동시 분석하였고, HPLC 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 3. Operation conditions of HPLC-MS/MS

Parameter	Condition		
Instrument	SPLC/TSQ Quantum ultra		
Column	Thermo Hypersil gold C18 (2.0 × 150 mm, 3 μm)		
Column temp.	40°C		
Detector	MS/MS		
Mobile phase	A : 0.1% acetic acid B : 0.1% acetic acid in acetonitrile		
Gradient table	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	95	5
	2.0	90	10
	10.0	50	50
	15.0	50	50
	18.0	90	10
	20.0	95	5
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Ionization source	ESI^+ or ESI^-		
Spray voltage	positive 4000V negative 3000V		
Capillary temp.	330°C		
Vaporizer temp.	300°C		
Sheath gas	40.0 psi		
Aux gas	20.0 psi		
Collision gas	1.5 mTorr		

HPLC-MS/MS 확인

폴리페놀 17종 및 안토시아닌 5종의 확인시험은 selected reaction monitoring (SRM) mode를 이용하였고, 이온화는 electrospray ionization (ESI) 방식으로 하였으며, 각 성분의 표준용액(1 μg/mL)을 개별적으로 질량분석기에 직접 주입하여 ESI Positive & Negative mode에서의 이온화 조건을 검토하였고, 각 성분의 이온화된 parent ion과 product ion으로의 이행조건을 검토하여 product ion에 대한 최적의 collision energy를 선정하였으며, 검액은 정량시험용으로 조제된 시료를 50% methanol로 10배 희석하여 사용하였다. HPLC-MS/MS 분석조건은 Table 3에 나타내었고, 다른 연구에서 사용된 시험방법을 응용하였다[22-23].

Results and Discussion

시험법의 유효성 검토

직선성

직선성을 평가하기 위하여 5단계로 희석한 혼합표준용액을 HPLC로 5회 반복 측정하여 검량선을 구해 1차 회

Table 4. Regression, R^2, LOD, LOQ and linear range for the studied compounds

Compounds	Regression equation	R^2	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	Linear range (μg/mL)
Gallic acid	y = 28.293x – 3.9376	0.9997	0.0920	0.2789	0.6~10.0
Protocatechuic acid	y = 15.676x + 0.9054	0.9999	0.0604	0.1831	0.6~10.0
Chlorogenic acid	y = 16.787x – 1.1093	0.9992	0.0831	0.2518	0.6~10.0
(+) Catechin	y = 13.763x + 0.1070	0.9998	0.0762	0.2311	0.6~10.0
Vanillic acid	y = 16.702x + 0.6885	0.9999	0.0223	0.0675	0.6~10.0
Caffeic acid	y = 32.967x – 0.7672	0.9998	0.0870	0.2636	0.6~10.0
Syringic acid	y = 29.677x + 2.3212	0.9999	0.0766	0.2321	0.6~10.0
p-Coumaric acid	y = 32.828x – 2.7234	0.9992	0.0472	0.1431	0.6~10.0
Syringic aldehyde	y = 20.183x – 0.8285	0.9998	0.0106	0.0322	0.6~10.0
t-Ferulic acid	y = 30.863x – 2.8988	0.9995	0.1030	0.3124	0.6~10.0
Rutin	y = 15.321x – 2.5780	0.9991	0.0382	0.1158	0.6~10.0
Epicatechin gallate	y = 18.067x – 0.0287	0.9999	0.0367	0.1112	0.6~10.0
Naringin	y = 17.943x + 0.5086	0.9999	0.0142	0.0432	0.6~10.0
Luteolin	y = 17.820x – 0.4748	0.9999	0.0246	0.0746	0.6~10.0
t-Cinnamic acid	y = 37.987x – 1.2039	0.9998	0.0552	0.1673	0.6~10.0
Naringenin	y = 32.487x – 0.3756	0.9999	0.0371	0.1125	0.6~10.0
Kaempferol	y = 15.284x + 0.1123	0.9999	0.0476	0.1445	0.6~10.0
Delphinidin-3-glucoside	y = 20.669x – 1.4986	0.9996	0.0975	0.2955	0.3~5.0
Delphinidin-3-rutinoside	y = 18.428x – 1.7369	0.9998	0.0450	0.1366	0.3~5.0
Cyanidin-3-galactoside	y = 16.248x – 0.0252	0.9994	0.0739	0.2240	0.3~5.0
Cyanidin-3-glucoside	y = 30.222x + 1.5264	0.9997	0.0836	0.2534	0.3~5.0
Cyanidin-3-arabinoside	y = 29.010x – 0.9881	0.9998	0.0911	0.2761	0.3~5.0

귀방정식(y = Sx + b)으로 결정계수(determination coefficient, R^2)를 구하고 직선성(Linearity)을 검토하였다. 그 결과 폴리페놀 17종의 결정계수(R^2) 값은 0.9991~0.9999, 안토시아닌 5종의 결정계수(R^2) 값은 0.9994~0.9998로 1과 거의 유사한 값이므로 검량선 범위 내에 있는 각각의 농도에 대하여 직선적인 측정값을 나타냄을 알 수 있었고, Table 4에 나타내었다.

정확성과 정밀성

서리태, 흑미, 흑임자, 블루베리를 유형별 대표식품으로 선정하여 폴리페놀 및 안토시아닌의 혼합표준용액을 첨가한 후 혼합표준용액을 첨가하지 않은 시료와 동시에 전처리한 후 혼합표준용액 첨가 시료와 비첨가 시료의 폴리페놀 및 안토시아닌 함량을 HPLC로 구한 후 그 차를 회수율로 이용하였고, 이 과정을 3회 반복하여 정밀성을 확인하였다. 그 결과 폴리페놀 17종의 회수율은 서리태 84.5~105.2%, 흑미 83.7~98.6%, 흑임자 85.1~102.5%, 블루베리 88.5~106.1% 사이에서 확인되었고, 안토시아닌 5종의 회수율은 서리태 93.2~102.4%, 흑미 91.6~99.5%, 흑임자 90.8~97.3%, 블루베리 94.9~101.3% 이었다. 이는 AOAC (Association of official analytical chemists)에서 제시하는 회수율 적정범위 75~120%를 만족한다[24]. 또한 상대표준편차(Relative Standard Deviation)는 폴리페놀 17종은 서리태 1.2~4.1%, 흑미 1.4~3.9%, 흑임자 1.3~4.5%, 블루베리 1.5~3.6% 사이에서 확인되었고, 안토시아닌 5종은 서리태 1.4~3.3%, 흑미 1.6~3.5%, 흑임자 1.5~3.9%, 블루베리 1.3~3.4%로 나타나 AOAC에서 제시하는 8% 미만으로서[24], 정밀성이 양호한 시험법임을 확인할 수 있었고, Table 5에 나타내었다.

검출한계 및 정량한계

검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)는 직선성 시험에서 구한 1차 회귀방정식으로 검량선의 기울기(S)를 구하고 반응의 표준편차(σ)를 이용하여 검출한계는 신호 대 잡음비(S/N비)의 3.3배, 정량한계는 10배의 값으로 ICH (International Council for Harmonisation)[25]에서 제시한 아래의 식으로 계산하였다.

$$LOD = 3.3 \times \sigma/S$$

$$LOQ = 10 \times \sigma/S$$

σ = the standard deviation of the response

S = the slope of the calibration curve

Table 5. Recovery of the studied compounds in colored agricultural products

Compounds	Concentration (μg/mL)	Seoritae		Black rice		Black sesame		Blueberry	
		Recovery (%)	RSD[1)] (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Gallic acid	5.1	98.5	1.2	92.1	1.5	94.6	1.8	98.0	1.5
Protocatechuic acid	5.1	97.7	1.7	95.4	1.4	102.5	1.3	96.4	1.6
Chlorogenic acid	4.7	91.6	2.8	90.5	2.5	95.8	2.1	106.1	2.6
(+) Catechin	4.6	92.4	3.2	89.6	2.6	91.3	3.4	96.5	3.1
Vanillic acid	5.1	89.3	3.0	96.2	2.6	98.7	2.8	92.5	2.2
Caffeic acid	5.1	88.2	2.9	89.7	2.4	97.9	2.2	91.1	2.6
Syringic acid	5.0	95.8	2.5	98.6	1.9	96.3	2.6	102.4	2.8
p-Coumaric acid	5.2	93.6	3.3	90.5	3.9	92.5	3.2	95.8	3.5
Syringic aldehyde	5.2	89.2	2.6	92.8	2.2	87.4	3.0	88.5	2.8
t-Ferulic acid	5.1	97.5	1.6	91.1	2.7	95.2	2.2	98.8	1.8
Rutin	5.0	88.9	3.4	89.2	2.5	98.1	2.4	94.7	2.1
Epicatechin gallate	5.3	93.8	3.5	83.7	3.0	94.9	3.6	96.3	3.3
Naringin	5.3	101.3	1.9	95.2	2.3	99.7	2.0	98.1	2.3
Luteolin	5.1	95.4	2.4	86.5	2.7	89.2	3.2	92.3	2.5
t-Cinnamic acid	5.0	88.2	4.1	90.3	3.4	85.1	4.5	91.1	3.6
Naringenin	5.1	105.2	2.5	95.5	2.2	97.6	2.8	98.4	1.8
Kaempferol	5.1	84.5	2.6	86.1	2.8	88.7	2.0	90.2	2.5
Delphinidin-3-glucoside	5.1	98.2	1.7	94.7	2.0	98.6	2.1	98.9	1.3
Delphinidin-3-rutinoside	4.9	93.2	3.3	91.6	3.5	92.5	3.9	96.7	3.4
Cyanidin-3-galactoside	5.2	94.6	2.5	95.2	1.7	90.8	2.3	94.9	2.1
Cyanidin-3-glucoside	5.1	102.4	1.4	99.5	1.6	97.3	1.5	101.3	1.4
Cyanidin-3-arabinoside	5.0	96.1	1.9	97.2	1.6	93.9	2.2	99.5	1.8

[1)]RSD : Relative Standard Deviation

그 결과 폴리페놀 17종의 검출한계(LOD)는 0.0106~0.0920 μg/mL, 정량한계(LOQ)는 0.0322~0.3124 μg/mL이었고, 안토시아닌 5종의 검출한계(LOD)는 0.0450~0.0975 μg/mL, 정량한계(LOQ)는 0.1366~0.2955 μg/mL로 각 성분별 분석 농도보다 낮은 정량한계를 나타냄으로서 정량이 가능한 수준을 보여 주었으며, Table 4에 나타냈다.

폴리페놀의 정량 결과

폴리페놀 17종에 대해 정량 분석한 결과는 Table 6과 같이 나타났으며, 표준물질 17종에 대한 크로마토그램은 Fig. 1와 같다.

서리태는 6종의 폴리페놀이 검출되었고, 이들 중 *p*-coumaric acid 함량이 105.0 ± 18.3 μg/g으로 가장 높았으며, protocatechuic acid 95.1 ± 16.9 μg/g, naringenin 20.0 ± 9.6 μg/g, gallic acid 17.3 ± 3.4 μg/g, syringic acid 9.0 ± 2.3 μg/g, epicatechin gallate 8.7 ± 1.5 μg/g 순으로 나타났고, 서목태는 7종의 폴리페놀이 검출되었고, 이들 중 protocatechuic acid 함량이 93.8 ± 12.3 μg/g으로 가장 높았으며, (+)catechin 76.3 ± 16.2 μg/g, *p*-coumaric acid 42.8 ± 11.6 μg/g, naringenin 25.2 ± 9.4 μg/g, gallic acid 14.7 ± 2.7 μg/g, epicatechin gallate 11.8 ± 2.3 μg/g, syringic acid 11.2 ± 4.8 μg/g 순으로 검출되었다. 흑미는 protocatechuic acid 42.9 ± 13.9 μg/g, syringic acid 23.3 ± 8.8 μg/g, vanillic acid 12.3 ± 4.8 μg/g 순으로 3종의 폴리페놀이 검출되었다. 흑임자는 protocatechuic acid 31.8 ± 8.3 μg/g, chlorogenic acid 18.5 ± 4.7 μg/g, naringin 9.3 ± 1.6 μg/g, *t*-cinnamic acid 8.3 ± 1.3 μg/g, gallic acid 7.9 ± 0.9 μg/g 순으로 5종의 폴리페놀이 검출되었다. 블루베리는 6종의 폴리페놀이 검출되었고, 이들 중 chlorogenic acid 함량이 62.2 ± 15.6 μg/g으로 가장 높았으며, epicatechin gallate 40.8 ± 11.6 μg/g, syringic acid 16.7 ± 6.3 μg/g, naringin 9.5 ± 3.6 μg/g, (+)catechin 8.0 ± 2.5 μg/g, gallic acid 6.1 ± 1.9 μg/g 순으로 나타났으며, 아로니아는 protocatechuic acid 87.0 ± 14.8 μg/g, chlorogenic acid 75.2 ± 12.5 μg/g, (+)catechin 21.1 ± 7.5 μg/g, syringic acid 11.9 ± 3.9 μg/g 순으로 4종의 폴리페놀이 검출되었다. 블랙커런트는 protocatechuic acid 55.3 ±

Table 6. Contents of 17 polyphenol compounds in colored agricultural products

Compounds	Concentration, Mean ± S.D.[1] (μg/g)						
	Seoritae (n = 10)	Seomoktae (n = 10)	Black rice (n = 20)	Black sesame (n = 10)	Blueberry (n = 14)	Aronia (n = 7)	Blackcurrent (n = 5)
Gallic acid	17.3 ± 3.4	14.7 ± 2.7	N.D.	7.9 ± 0.9	6.1 ± 1.9	N.D.	N.D.
Protocatechuic acid	95.1 ± 16.9	93.8 ± 12.3	42.9 ± 13.9	31.8 ± 8.3	N.D.	87.0 ± 14.8	55.3 ± 13.3
Chlorogenic acid	N.D.[2]	N.D.	N.D.	18.5 ± 4.7	62.2 ± 15.6	75.2 ± 12.5	N.D.
(+) Catechin	N.D.	76.3 ± 16.2	N.D.	N.D.	8.0 ± 2.5	21.1 ± 7.5	N.D.
Vanillic acid	N.D.	N.D.	12.3 ± 4.8	N.D.	N.D.	N.D.	17.4 ± 5.5
Caffeic acid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Syringic acid	9.0 ± 2.3	11.2 ± 4.8	23.3 ± 8.8	N.D.	16.7 ± 6.3	11.9 ± 3.9	N.D.
p-Coumaric acid	105.0 ± 18.3	42.8 ± 11.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Syringic aldehyde	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
t-Ferulic acid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Rutin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	27.5 ± 8.7
Epicatechin gallate	8.7 ± 1.5	11.8 ± 2.3	N.D.	N.D.	40.8 ± 11.6	N.D.	31.4 ± 8.8
Naringin	N.D.	N.D.	N.D.	9.3 ± 1.6	9.5 ± 3.6	N.D.	N.D.
Luteolin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
t-Cinnamic acid	N.D.	N.D.	N.D.	8.3 ± 1.3	N.D.	N.D.	N.D.
Naringenin	20.0 ± 9.6	25.2 ± 9.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Kaempferol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total	255.1 ± 7.5	275.8 ± 5.3	78.5 ± 4.6	75.8 ± 3.2	143.3 ± 5.5	195.2 ± 4.9	131.6 ± 3.2

[1]S.D.: Standard Deviation
[2]N.D.: Not Detected

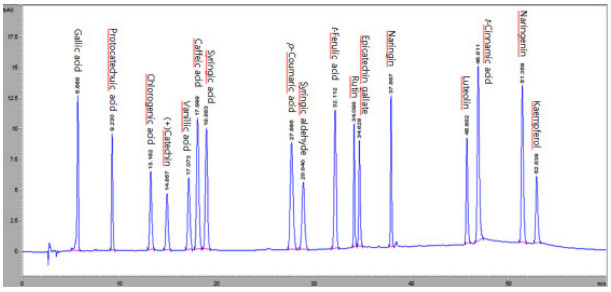

Fig. 1. Chromatogram of 17 polyphenol standards by HPLC.

13.3 μg/g, epicatechin gallate 31.4 ± 8.8 μg/g, rutin 27.5 ± 8.7 μg/g, vanillic acid 17.4 ± 5.5 μg/g 순으로 4종의 폴리페놀이 검출되었고, 분석한 17종의 폴리페놀 성분 중 서리태 6종, 서목태 7종, 흑미 3종, 흑임자 5종, 블루베리 6종, 아로니아 4종, 블랙커런트 4종의 개별 성분을 정량하였다. 서리태, 서목태, 흑임자, 블루베리, 아로니아, 블랙커런트는 phenolic acid, flavonoid 계열을 함유하고 있었지만, 흑미는 phenolic acid 계열만을 함유하고 있었다. 페놀성 물질의 정량방법으로 Folin-Ciocalteu 시약을 이용하는 Folin-Denis 방법[26]이 실험자들에게 있어서 가장 널리 이용되고 있다. 이 방법은 간단하면서도 비교적 감도가 높고, 페놀성 물질들의 중합도에 관계없이 정량성을 나타낸다는 점에서 유용성을 가지고 있다[27]. 하지만 Folin-Ciocalteu 시약과 반응할 수 있는 다양한 종류의 화합물들로 인해 시료 중의 페놀성 물질 정량에 있어서 간섭요인들이 발생되어[28-29], 대략적인 폴리페놀의 함량을 측정하는 방법으로 이용되고 있다[30]. 폴리페놀 17종의 총 함량은 서리태 255.1 ± 7.5 μg/g, 서목태 275.8 ± 5.3 μg/g, 흑미 78.5 ± 4.6 μg/g, 흑임자 75.8 ± 3.2 μg/g, 블루베리 143.3 ± 5.5 μg/g, 아로니아 195.2 ± 4.9 μg/g, 블랙커런트 131.6 ± 3.2 μg/g로 나타나 서목태 > 서리태 > 아로니아 > 블루베리 > 블랙커런트 > 흑미 > 흑임자 순으로 높은 함량을 나타내었다. 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 물질로 다양한 구조와 분자량을 가지며 페놀성 화합물의 phenolic hydroxyl기가 단백질과 같은 거대분자와의 결합을 통해 항산화, 항암 및 항균 등의 생리기능을 가지는 것으로 알려져 있다[31].

안토시아닌의 정량 결과

안토시아닌 5종에 대해 정량 분석한 결과 Table 7과 같이 나타났으며, 표준물질 5종에 대한 크로마토그램은 Fig. 2와 같다.

서리태는 cyanidin-3-glucoside 63.9 ± 15.3 μg/g, delphinidin-

Table 7. Contents of 5 anthocyanin compounds in colored agricultural products

Compounds	Concentration, Mean ± S.D.[1] (μg/g)						
	Seoritae (n = 10)	Seomoktae (n = 10)	Black rice (n = 20)	Black sesame (n = 10)	Blueberry (n = 14)	Aronia (n = 7)	Blackcurrent (n = 5)
Delphinidin-3-glucoside	12.8 ± 6.1	18.6 ± 7.4	N.D.	N.D.	24.2 ± 5.7	N.D.	39.5 ± 6.3
Delphinidin-3-rutinoside	N.D.[2]	N.D.	2.0 ± 1.2	N.D.	N.D.	N.D.	158.3 ± 11.2
Cyanidin-3-galactoside	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.5	6.1 ± 1.6	N.D.	28.7 ± 9.5	169.6 ± 15.9	N.D.
Cyanidin-3-glucoside	63.9 ± 15.3	69.5 ± 14.3	61.9 ± 20.6	N.D.	31.4 ± 9.2	6.5 ± 3.8	11.9 ± 3.4
Cyanidin-3-arabinoside	4.7 ± 2.0	5.9 ± 3.0	4.1 ± 1.0	N.D.	26.5 ± 6.3	42.8 ± 10.7	N.D.
Total	82.4 ± 17.2	95.2 ± 6.1	74.1 ± 9.7	N.D.	110.8 ± 1.9	218.9 ± 6.1	209.7 ± 4.0

[1]S.D.: Standard Deviation
[2]N.D.: Not Detected

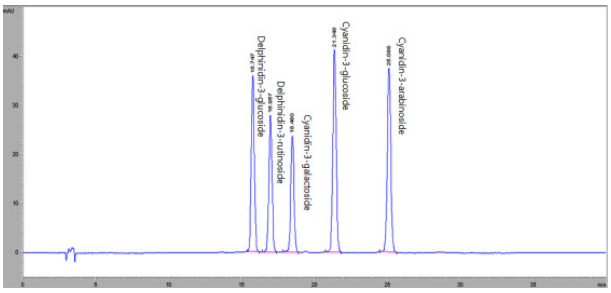

Fig. 2. Chromatogram of 5 anthocyanin standards by HPLC.

3-glucoside 12.8 ± 6.1 μg/g, cyanidin-3-arabinoside 4.7 ± 2.0 μg/g, cyanidin-3-galactoside 1.0 ± 0.4 μg/g 순으로 나타났으며, 서목태는 cyanidin-3-glucoside 69.5 ± 14.3 μg/g, delphinidin-3-glucoside 18.6 ± 7.4 μg/g, cyanidin-3-arabinoside 5.9 ± 3.0 μg/g, cyanidin-3-galactoside 1.2 ± 0.5 μg/g 순으로 나타났다. 흑미는 cyanidin-3-glucoside 61.9 ± 20.6 μg/g, cyanidin-3-galactoside 6.1 ± 1.6 μg/g, cyanidin-3-arabinoside 4.1 ± 1.0 μg/g, delphinidin-3-rutinoside 2.0 ± 1.2 μg/g 순으로 나타났으며, 흑임자는 안토시아닌 5종이 불검출 되었다. 블루베리는 cyanidin-3-glucoside 31.4 ± 9.2 μg/g, cyanidin-3-galactoside 28.7 ± 9.5 μg/g, cyanidin-3-arabinoside 26.5 ± 6.3 μg/g, delphinidin-3-glucoside 24.2 ± 5.7 μg/g 순으로 나타났고, 아로니아는 cyanidin-3-galactoside 169.6 ± 15.9 μg/g, cyanidin-3-arabinoside 42.8 ± 10.7 μg/g, cyanidin-3-glucoside 6.5 ± 3.8 μg/g 순으로 나타났으며, 블랙커런트는 delphinidin-3-rutinoside 158.3 ± 11.2 μg/g, delphinidin-3-glucoside 39.5 ± 6.3 μg/g, cyanidin-3-glucoside 11.9 ± 3.4 μg/g 순으로 검출되었고, 5종의 안토시아닌 성분 중 서리태 4종, 서목태 4종, 흑미 4종, 흑임자 10종, 블루베리 4종, 아로니아 3종, 블랙커런트 3종의 개별 성분을 정량하였다. 5종의 안토시아닌 성분은 흑임자만 함유하지 않았고, 서리태, 서목태, 흑미, 블루베리, 아로니아, 블랙커런트는 폴리페놀 성분과 함께 함유하고 있었다. 방 등[32]의 연구에서도 블루베리는 안토시아닌, 플라보노이드, 각종 페놀화합물 등을 함유하고 있다고 보고하였다. 안토시아닌 5종의 총 함량은 서리태 82.4 ± 17.2 μg/g, 서목태 95.2 ± 6.1 μg/g, 흑미 74.1 ± 9.7 μg/g, 흑임자는 불검출, 블루베리 110.8 ± 1.9 μg/g, 아로니아 218.9 ± 6.1 μg/g, 블랙커런트 209.7 ± 4.0 μg/g로 나타나 아로니아 > 블랙커런트 > 블루베리 > 서목태 > 서리태 > 흑미 순으로 높은 함량을 나타내었다.

HPLC-MS/MS의 확인 결과

분석의 신뢰도를 향상시키고자 HPLC-MS/MS를 이용하여 확인 시험을 실시하였다. 분석대상의 성분명, 분자량, parent 이온 분자량, product 이온 분자량, 충돌에너지(CE, collision energy), polarity 등 질량분석 조건은 Table 8에 나타내었다. 각 성분의 product ion은 1 μg/mL 표준용액을 개별적으로 질량분석기에 직접 주입하여, collision energy (CE)를 가하여 parent ion이 product ion으로 깨어지도록 하고 collison energy 값을 미세하게 조절하여 정량이온과 정성이온 별로 가장 좋은 collision energy 값을 결정하였고, 이동상과 함께 표준용액을 주입하면서 MS parameter의 조건을 최적화하였다. 폴리페놀 17종에 대한 SRM chromatogram은 Fig. 3과 같다. 그중 gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, *t*-Ferulic acid, *t*-cinnamic acid, (+)catechin, rutin, epicatechin gallate, naringin, luteolin, naringenin, kaempferol이 ESI negative mode에서 높은 감도를 나타내었고, ESI positive mode에서는 syringic aldehyde가 높은 감도를 나타내었다. 다른 논문에서는 페놀 화합물 분석시 ESI 방식의 경우 positive mode보다 negative mode에서 감도가 더 좋다고 보고 되어있다[33-34]. 본 연구에서는 표준용액의 검출조건을 결정할 때 positive, negative mode를 사용하여 비교해본 결과 대체로 negative mode에서 더 높은 감도를 보였으나, syringic aldehyde만 ESI positive mode에서 더 높은 감도를 보였다. 안토시아닌 5종에 대한 SRM chromatogram은 Fig. 4에 나타냈고 delphinidin-3-glucoside, delphinidin-3-rutinoside, cyanidin-

Table 8. SRM parameters of the studied compounds by HPLC-MS/MS

Compounds	MW[1)]	Parent ion	Product ion	CE[2)] (V)	Polarity
Gallic acid	170	169	125	17	negative
			79	25	
Protocatechuic acid	154	153	109	17	negative
			81	18	
Chlorogenic acid	354	353	191	24	negative
			85	46	
(+) Catechin	290	289	245	16	negative
			203	20	
Vanillic acid	168	167	152	17	negative
			108	20	
Caffeic acid	180	179	135	19	negative
			134	28	
Syringic acid	198	197	123	26	negative
			95	33	
p-Coumaric acid	164	163	119	17	negative
			93	37	
Syringic aldehyde	182	183	155	7	positive
			77	23	
t-Ferulic acid	194	193	134	19	negative
			178	16	
Rutin	610	609	300	38	negative
			271	58	
Epicatechin gallate	442	441	289	19	negative
			125	43	
Naringin	580	579	271	34	negative
			151	44	
Luteolin	286	285	133	39	negative
			151	27	
t-Cinnamic acid	148	147	62	15	negative
			103	17	
Naringenin	272	271	119	32	negative
			151	21	
Kaempferol	286	285	93	40	negative
			117	47	
Delphinidin-3-glucoside	465	465	303	24	positive
			229	52	
Delphinidin-3-rutinoside	611	611	303	29	positive
			465	18	
Cyanidin-3-galactoside	449	449	287	24	positive
			137	54	
Cyanidin-3-glucoside	449	449	287	25	positive
			137	50	
Cyanidin-3-arabinoside	419	419	287	22	positive
			137	50	

[1)]MW : Molecular Weight
[2)]CE : Collision Energy

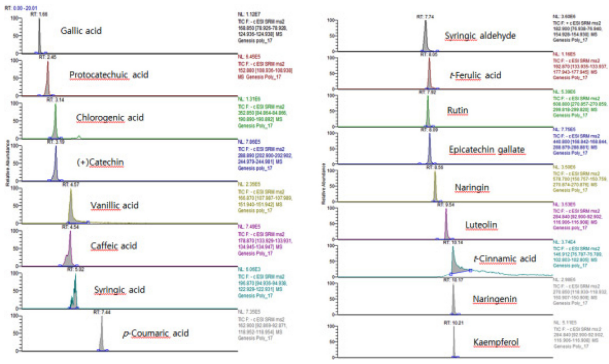

Fig. 3. SRM chromatogram of 17 polyphenol standards.

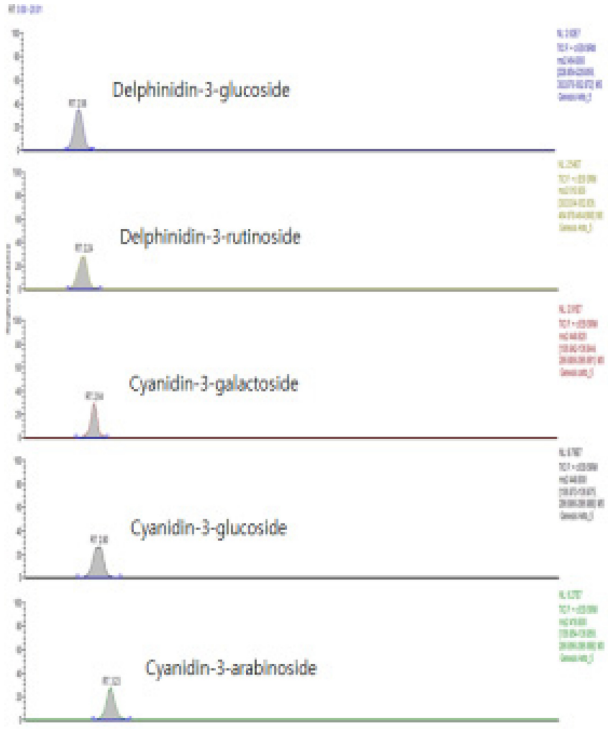

Fig. 4. SRM chromatogram of 5 anthocyanin standards.

3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside 등은 ESI positive mode에서 높은 감도를 나타내었다. 김 등[35)]의 연구에서도 안토시아닌 정성 및 정량 MS 분석시 electrospray ionization (ESI) source를 이용하여 positive ionization mode로 진행하였다. HPLC-MS/MS로 ESI positive와 negative mode에서의 이온화 조건은 폴리페놀 17종 중 16종은 ESI negative mode, 1종은 ESI positive mode, 안토시아닌 5종은 ESI positive mode에서 높은 감도를 확인할 수 있었다. 본 실험결과 폴리페놀은 서목태, 안토시아닌은 아로니아가 가장 높은 함량을 나타내었으며 향후 유색 농산물을 활용한 기능식품 개발이 필요한 것으로 판단된다.

국문요약

본 연구에서는 인터넷 쇼핑몰에서 유통되는 컬러푸드 중 블랙푸드 76건을 대상으로 폴리페놀 17종 및 안토시아닌 5종을 동일한 전처리 방법으로 HPLC, HPLC-MS/MS 분석하여 정량 및 정성시험을 실시하였다. 분석대상 폴리페놀은 gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, *t*-ferulic acid, *t*-cinnamic acid 등 9종의 phenolic acid와 (+)catechin, syringic aldehyde, rutin, epicatechin gallate, naringin, luteolin, naringenin, kaempferol 등 8종의 flavonoid로 총 17종의 폴리페놀을 동시분석 하였고, 안토시아닌은 delphinidin-3-glucoside, delphinidin-3-rutinoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside 등 5종을 동시분석 하였다. 폴리페놀 17종의 총 함량은 서리태 255.1 ± 7.5 μg/g, 서목태 275.8 ± 5.3 μg/g, 흑미 78.5 ± 4.6 μg/g, 흑임자 75.8 ± 3.2 μg/g, 블루베리 143.3 ± 5.5 μg/g, 아로니아 195.2 ± 4.9 μg/g, 블랙커런트 131.6 ± 3.2 μg/g로 나타나 서목태 > 서리태 > 아로니아 > 블루베리 > 블랙커런트 > 흑미 > 흑임자 순으로 높은 함량을 나타냈다. 안토시아닌 5종의 총 함량은 서리태 82.4 ± 17.2 μg/g, 서목태 95.2 ± 6.1 μg/g, 흑미 74.1 ± 9.7 μg/g, 흑임자 불검출, 블루베리 110.8 ± 1.9 μg/g, 아로니아 218.9 ± 6.1 μg/g, 블랙커런트 209.7 ± 4.0 μg/g로 나타나 아로니아 > 블랙커런트 > 블루베리 > 서목태 > 서리태 > 흑미 순으로 높은 함량을 나타났다. 본 실험결과 폴리페놀은 서목태, 안토시아닌은 아로니아가 가장 높은 함량을 나타내었으며 향후 유색 농산물을 활용한 기능식품 개발이 필요한 것으로 판단된다.

References

1. Lee J.J.: Colored foods and diabetes. *J. Korean Diabetes*, **12**, 219-224 (2011).
2. Kim D.O., Jeong S.W. and Lee C.Y.: Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plum. *Food Chemistry,* **81**, 321-326 (2003).
3. Oliver Chen, C.Y. and Blumberg, J.: Phytochemical composition of nuts. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **17**, 329-332 (2008).
4. Tsao, R.: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**(12), 1231-1246 (2010).
5. Cieslik, E., Greda, A., Adamus, W.: Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry,* **94**, 135-142 (2006).
6. Schijlen, E.G., de Vos, R.C.H., van Tune, A.J., Bovy, A.G.: Modification of flavonnoid biosysthesis in crop plants. *Phytochemistry,* **65**, 2631-2648 (2004).
7. Havsteen, B.: Flavonoids a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmaco.,* **32**, 1141-1148 (2003).
8. Kim Y.H., Yun H.T., Park K.Y. and Kim, S.D.: Extraction and separation of anthocyanins in black soybean. *Korean J. Crop Sci.,* **39**(1), 35-38 (1997).
9. Kong J.M., Chia L.S., Goh N.K., Chia T.F. and Brouillard, R.: Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry,* **64**, 923-933 (2003).
10. D'Incalci, M., Steward, W.P., Gesoher, A.J.: Use of cancer chemopreventive phytochemicals as antineoplastic agents. *Lancet Oncol*, **6**, 899-904 (2005).
11. Steinberg, F.M., Bearden, M.M., Keen, C.L.: Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *Am J. Diet. Assoc.,* **103**, 215-223 (2003).
12. Sforcin, J.M. Orsi, R.O., Bankova, V.: Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J. Ehthopharmacol*, **98**, 301-305 (2005).
13. Blaylock, R.L.: Neurodegeneration and aging of the central nerous system : prevention and treatment by phytochemicals and metabolic nutrients. *Integ. Med.,* **1**, 117-133 (1999).
14. Zhang M.W., Guo B.J., Zhang R.F., Chi J.W., Wei Z.C., Xu Z.H., Zhang Y. and Tang X.J.: Separation, purification and identification of antioxidant compositions in black rice. *Agricultural Sciences in China*, **5**(6), 431-440 (2006).
15. Zhang M.W., Zhang R.F., Zhang F.X. and Liu R.H.: Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 7580-7587 (2010).
16. Choung M.G., Han W.Y., Kang S.T., Baek I.Y., Shin D.C., Kim S.D., Kim S.C., Moon H.P. and Kang K.H.: Structural analysis of anthocyanins in black soybean. *Korean Soybean Digest*, **19**(2), 68-77 (2002).
17. Kim S.L., Kim H.B., Choi H.Y., Park N.K., Son J.R., Yun H.T. and Kim S.J.: Variation of anthocyanins and isoflavones between yellow-cotyledon and green-cotyledon seeds of black soybean. *Food Sci. Biotechnol.,* **14**(6), 778-782 (2005).
18. Fujioka, K. and Shibamoto, T.: Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chem.,* **106**(1), 217-221 (2008).
19. Ceirwyn, S.J.: Analytical chemistry of foods. *Blackie Academic and Professional, London*, 153 (1995).
20. Seo M.C., Ko J.Y., Song S.B., Lee J.S., Kang J.R., Kwak D.Y., Oh B.G., Yoon Y.N., Nam M.H., Jeong H.S., Woo K.S.: Antioxidant compounds and activities of foxtail millet, proso millet and sorghum with different pulverizing methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **40**(6), 790-797 (2011).
21. Choung M.G.: Optimal HPLC Condition for Simultaneous Determination of Anthocyanins in Black Soybean Seed Coats. *Korean J. Crop Sci.*, **53**(4), 359-368 (2008).
22. Kim H.W., Kim J.B., Chu S.M., Kim S.Y., Kim S.N., Cho Y.S., Cho S.M., Baek H.J., Kim J.H., Park H.J., Lee D.J., Hiba A. Ali and Derek, S.: Analysis of Anthocyanin Composition and Content Contained from Grains of the Korean Purple Rice Varieties by Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization/Mass Spectrometry (LC-DAD-ESI/MS). *Korean J. Intl. Agri.*, **22**(3), 267-272 (2010).
23. Shin S.O., Shin S.H., Lim S.G., Lee J.H., Kang N.S., Suh D.Y., Park K.Y., Ha T.J.: Isolation and Identification of New

Anthocyanins from the Black Seed Coat of Soybean (*Glycine max L.*) by HPLC-DAD-ESI/MS Analysis. *Korean Soybean Digest*, **24**(1), 23-33 (2007).
24. AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002).
25. The International Council for Harmonisation (ICH): Validation of analytical procedures, text and methodology Q2(R1), 1-17 (2005).
26. Folin, O. and Denis, W.: On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, **12**, 239-249 (1912).
27. Prior, R., Wu, X., Schaich, K.: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.,* **53**, 4290-4302 (2005).
28. Box, J.D.: Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.,* **17**, 511-525 (1983).
29. Ikawa, M., Schafer, T., Dollard, C., Sasner, J.: Utilization of Folin-Ciocalteu reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. Food Chem.,* **51**, 1811-1815 (2003).
30. Bradley, W.B., Oliver Chen, C.Y., Diane, L.M., Jeffrey, B.B.: Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant, capacity, bioactivity, impact factors. A systemic review of almonds, brazils, cashews, hazelnuts, macadamia, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutrition Research Reviews*, **24**, 244-275 (2011).
31. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G.: Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.,* **2**, 152-159 (1997).
32. Bang I.S., Yu C.Y., Lim J.D.: Effects of temperature and UV irradiation on stability of anthocyanin-polyphenol copigment complex in mulberry fruits. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **18**(3), 191-200 (2010).
33. Nováková, L1., Vildová, A., Mateus, J.P., Gonçalves, T. and Solich, P.: Development and application of UHPLC-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. *Talanta,* **82**(4), 1271-1280 (2010).
34. Gruz, Jiří, Novák, Ondřej and Strnad Miroslav.: Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food chemistry*, **111**(3), 789-794 (2008).
35. Kim H.W., Kim J.B., Chu S.M., Kim S.Y., Kim S.N., Cho Y.S., Cho S.M., Baek H.J., Kim J.H., Park H.J., Lee D.J., Ali, H.A. and Stewart, D.: Analysis of anthocyanin composition and content contained from grains of the korean purple rice varieties by liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization/mass spectrometry. *Korean J. Intl. Agri.*, **22**(3), 267-272 (2010).