

植物性 色素의 利用에 關한 研究

I. 꽃잎 맨드라미(*Amaranthus tricolor* L.)의 Anthocyanin 色素의 分離 同定

尹泰憲 · 李相稷 · 金光秀

嶺南大學校 食品營養學科

(1978년 3월 15일 수리)

Studies on the Utilization of Plant Pigments

I. Isolation and Identification of Anthocyanin Pigments in Ganges Amaranth

by

Tai-Hyeun Yoon, Sang-Jik Lee and Kwang-Soo Kim

Dept. of Food & Nutrition, Yeungnam University, Daegu, Korea

(Received March 15, 1978)

Abstract

In order to evaluate the utility of the anthocyanin pigments in Ganges Amaranth as an edible pigment, this study was designed to isolate and identify the anthocyanins.

The anthocyanins present in leaves of Ganges Amaranth were extracted with 0.1% HCl in methanol. The extracted pigments were purified by organic solvent treatment and Amberlite CG-400 Type cation exchanger, and then separated into individual pigments by paper chromatography with n-butanol-formic acid-water(100:25:60, v/v) as a solvent system. The separated pigments were identified by their R_f values, sugar moieties, complete hydrolysis and spectral characteristics in the visible and ultraviolet regions. The amounts of individual anthocyanins were also determined.

The results obtained from these experiments were as follows.

1. Chromatograms of the Ganges Amaranth extract developed with BFW yielded three anthocyanin bands. The two of the anthocyanin bands were tentatively identified as malvidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid) in band 1 and peonidin-3-glucoside (acylated with caffeic acid) in band 2. But the anthocyanin in band 3 was not identified due to extremely low concentration.

2. The amount of total anthocyanins was 101.57 mg/100g fresh weight of leaves in which 82.15 mg of malvidin-3-glucoside (acylated with caffeic acid) and 27.20 mg of peonidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid) were contained per 100g fresh weight. Malvidin-3-glucoside acylated with the acid was, therefore, the most abundant pigment in the Ganges Amaranth.

서 론

천연색소를 용해도에 따라 나누어 보면 지용성 색소에 속하는 chlorophyll과 carotenoid, 수용성 색소에 속하는 anthoxanthin과 anthocyanin으로 대별할 수 있다. 이 수용성 색소에 속하는 anthocyanin은 그리스어인

anthos(flower)와 kyanos(blue)가 합하여 이루어진 말로 1835년 Marquart에 의해서 처음으로 명명되었다. 이는 식물계에 널리 분포하고 있는 red, pink, scarlet, mauve, violet 및 blue색을 띠는 색소로서 과일류, 야채류, 꽃 등의 화려한 색깔을 이루고 있다.

식물체로부터 anthocyanin의 분리는 1849년 Morot에 의해 처음으로 시도되었으나 1913년 Willstätter와 Eve-

rest가 알코올성 염산으로 팔랑개비국화의 꽃잎에서 분리한 것이 최초이다. (1) 그 이후 딸기, (2,8) 포도, (4~11) 사과, (12,13) 배, (13) 토마토, (14) sour cherries, (15) 석류, (16,17) fig fruits (18) 등의 과실류와 토란, (19) 양파, (20,21) 마늘 (22) 등의 야채류 및 꽃 (23~28) 등에서 분리·동정되어 현재까지 알려진 anthocyanin 수는 120여종에 달하고 있다.

19세기 후반에 이르러서 과학의 발달과 더불어 색소가 화학적으로 합성됨에 따라 인공색소의 독성이 문제가 되어 현재 식품에서의 사용이 규제가 되고 있는 실정이며 천연색소인 anthocyanin의 독성에 관해서도 많은 실험이 행하여진 결과 인체에 독성이 없음이 밝혀진 바 있는데 특히 Horowitz와 Gentili (30)는 flavonoid는 intestinal microflora에 의해서 A환으로부터 CO₂, B환으로부터는 여러가지의 방향산으로 대사되기 때문에 인체에 해를 끼칠만한 것은 아무것도 없다고 보고하고 있다.

이미 이탈리아에서는 전 세계 과실 생산량의 1/4을 차지하고 있는 포도과실의 anthocyanin(주로 malvidin계)을 분말이나 용액형태로 하여 Encianina 혹은 Encocyanin (31)의 이름으로 상품화하고 있으며 Chiriboga 등 (32,33)은 cranberry juice cocktail에 cranberry anthocyanin의 이용에 대한 연구, 劍時 (34) 등은 붉은 마늘과 붉은 양파의 anthocyanin 이용에 관한 기초 연구를 행하고 있어서 근래에 천연색소의 개발이용의 연구경향이 점차로 늘어나고 있는 상황에 있다.

그래서 관광용으로 널리 재배되고 있는 꽃잎맨드라미 (*Amaranthus tricolor* L.)는 토박한 토질에서도 생육이 왕성할 뿐만 아니라 anthocyanin 색소의 함유량이 많기에 이를 이용할 목적으로 본 실험을 계획하였다. 이에 따른 기초 조사로서 우선 꽃잎맨드라미 anthocyanin을 0.1% HCl/MeOH로 추출한 다음 분리, 동정하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 꽃잎맨드라미는 4월 초에 파종하여 6월 중순경에 이식·재배하였으며 9월 5일에 상단부의 완전된 잎을 채취하여 시료로 하였다.

2. Anthocyanin의 추출

꽃잎맨드라미 약 2.5kg을 채취하여 Dekazos (35)의 방법에 따라 stainless steel knife로 세절한 것을 Fig.1에 표시되어 있는 바와 같이 0.1% HCl/MeOH에 넣고 Homogenizer로 약 5분간 마쇄한 다음 이 마쇄액을 0°C 암소에서 2일간 방치하였다.

병암소에 방치한 이 색소추출액에 다시 celite(Cham-

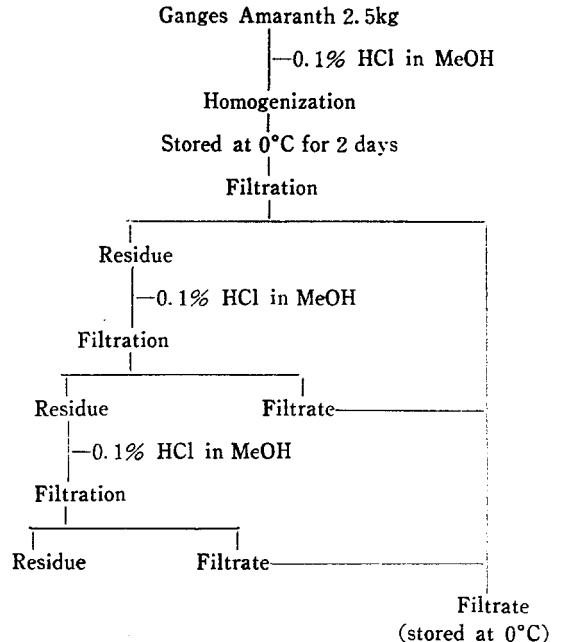


Fig. 1. Flow diagram for the extraction of Ganges Amaranth anthocyanins

eleon Chemical Reagent)를 소량 넣어 혼합한 후 Whatman No.1 paper를 사용하여 Büchner funnel로 흡인여과하였으며 잔사에 남아있는 색소는 동일용매로 반복 추출·여과한 후 상기 여과액과 합하여 이 여액을 anthocyanin의 분리용 시료로 하였다.

3. Anthocyanin의 분리 및 정제

Anthocyanin의 분리는 Fig. 2에서 보는바와 같이 Shrikhande (36) 등의 방법에 따라 상기 여과액을 rotary evaporator(Tokyo Rikakikai Co.)로 30±5°C에서 농축하여 그 양을 1000ml로 줄인 다음, 다시 분액여두에 넣고 여기에다 과잉의 petroleum ether를 4회 가하여 chlorophyll, carotenoid, waxy material등을 제거하고 다시 ethyl ether, ethyl acetate 순으로 역시 4회 세척하여 anthocyanin을 분리·정제하였다. 그런데 ethyl acetate는 epigallo-catechin등의 polyphenol을 완전 제거시키지 못하기 때문에 (37) 다시 chloroform을 처리하여 10시간정도 방치한 후 이상부 색소층을 rotary evaporator로 감압농축시켜 Fuleki와 Francis (38)의 방법에 따라 column에 통과시켜 분리·정제하였다. 즉 양이온교환수지인 Amberlite CG-400 Type-2(Rhom and Hass Co.)를 미리 증류수에 넣어 미세입자를 제거한 다음 2×30cm column에 충전하고 여기에다 상기 색소농축액을 주입한 후 증류수를 통과시켜 수용성 당류, 유기산, 아미노산등을 제거하였다. 다음에 0.25% HCl/MeOH로 조금씩 그 양을 증가시키면서 흡착된 anthocyanin을 용출시켰

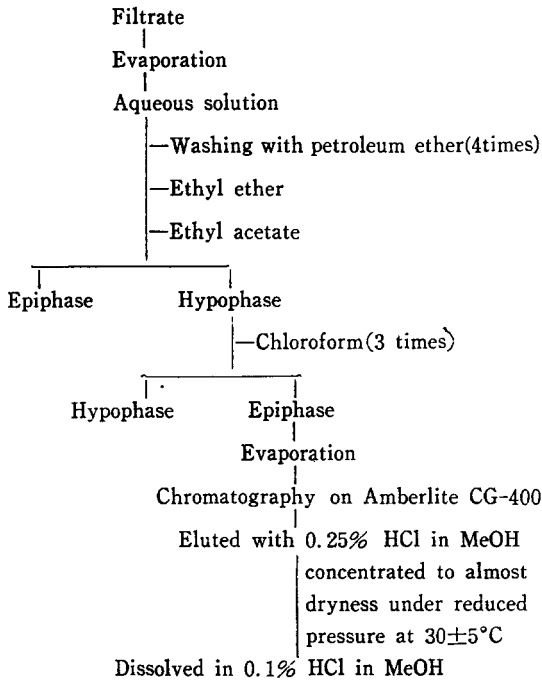


Fig. 2. Flow diagram for the separation of Ganges Amaranth anthocyanins by organic solvents and column chromatography

다.

상기 column으로 부터 용출시켜 농축한 색소액을 Whatman No. 3MM paper(20×50cm)에 폭 1cm의 대상으로 도포한 후 전개용매 (Table 1참조)로 BFW⁽³⁰⁾를 사용하여 상승법에 의해서 48시간 전개시켰다. 전개가 끝난 여과지를 실온에서 풍건시키고 분리된 각 band는

하단으로 부터 차례로 1, 2, 3의 번호를 붙였으며 이 band를 끊어서 0.1% HCl/MeOH⁽⁴⁰⁾을 사용하여 하강법으로 glass chamber내에서 용출시켰다. 이 용출액을 감압농축한 다음 다시 BAW, 1% HCl순으로 정제하였다.

그리고 anthocyanin의 분리, 정제, Rf치 측정 및 유기산 분자의 동정 등에 사용한 용매계는 Table 1에 표시된 바와 같다.

4. Anthocyanin의 동정

1) Aglycone과 당 분자의 동정

Aglycone 및 당분자의 확인은 Philip⁽⁴¹⁾의 방법에 따라 행하였는데 각 band의 정제색소 3—5mg에 2N HCl 1-2ml를 가하여 waterbath(80°C)상에서 60분간 가수분해시켰다. 이 가수분해액을 냉각시켜 aglycone을 isoamyl alcohol로 추출해낸 다음 감압농축하여 Whatman No.1 paper에 spot한 후 forestal로 전개하여 Rf치를 측정하였다.

그리고, aglycone을 추출하고 남아있는 수층부는 5% NaOH⁽⁴²⁾로 중화시킨 후 감압농축하고 이 농축액에 pyridine을 가하여 당을 pyridine에 녹인 다음 다시 감압농축하여 pyridine을 휘발시키고 소량의 증류수에 용해하여 phenol-water로서 authentic compound(glucose, galactose, arabinose, rhamnose)와 함께 Whatman No.1 paper에 spot하여 전개시켰다. 전개가 끝난 후 여과지를 풍건시키고 aniline hydrogen phthalate⁽⁴³⁾(0.93g aniline과 1.66g phthalic acid를 수포화시킨 n-butanol 100ml에 녹임)를 분부하여 105°C에서 5분간 가열, 발색시켰다.

2) peroxide 가수분해

Table I. Solvent systems used for paper chromatography.

Abbreviations	Phase used	Composition(v/v)	Running time(hr)	Solvent used for
BFW ^a	Upper phase	n-butanol-formic acid-water(100:25:60)	48	Anthocyanins
BAW ^a	Upper phase	n-butanol-acetic acid-water(4:1:5)	15	Anthocyanins, Sugars,
BuHCl ^b	Upper phase	n-butanol-2N HCl	15	Anthocyanidin
1%HCl	Miscible	water-concHCl(97:3)	4	Anthocyanins
FAW	Miscible	formic acid-conc HCl-Water(5:2:3)	5	Anthocyanins
AWH	Miscible	acetic acid-water conc HCl(15:82:3)	10	Anthocyanins
IBAW	Miscible	isobutanol-acetic acid-water(8:2:3)	12	Anthocyanins
0.5% citric acid	Miscible		6	Anthocyanins
2% HOAc	Miscible	acetic acid-water(2:98)	4	Phenolic acids
Forestal	Miscible	acetic acid-water conc HCl(30:10:3)	16	Anthocyanidin
Phenol		phenol-water(4:1)	12	Sugars
0.1% HCl/MeOH	Miscible	water-conc HCl(99:0.3)		Elution

^aBAW and BFW were used within 1-2hr of mixing for Rf value measurement.

^bPaper equilibrate 24hr after spotting and before running in the chamber containing aqueous phase.

Anthocyanin 3위치에 결합되어 있는 당의 확인은 Chandler와 Harper⁽⁴⁴⁾의 방법에 준하여 행하였다. Anthocyanin 약 0.2ml에 0.88N-NH₄OH로 pH를 6.5로 조정 한 후 30%-H₂O₂ 40μl(약 3적)를 가하여 실온에서 20시간 방치한 다음 다시 0.88N NH₄OH 50μl를 넣고 water bath(80°C)상에서 10분간 가온하였다. 이 용액에다 ethyl ether를 가하여 가용부를 제거해 버리고 남아있는 수층부는 감압농축한 후 Whatman No.1 paper에 상기 당의 확인조작과 같이 행하였다.

3) Acyl화색소의 유기산 분자의 동정

Screw cap 시험관에 색소 2-3mg과 2N-NaOH 1.0ml를 넣고 질소가스로 충전시킨 다음 screw cap을 막아 실온에서 2시간 정도 방치한 후 2N-HCl 1.5ml로 중화시키고 유기산을 ethyl ether로 1회당 10ml씩 4회 추출해 내었다. 이 ether추출액을 증류수로 세척한 다음 감압농축시켜 ether를 제거하였다. 이 농축액에 다시 ether 수적을 가하여 녹여서 표준품(ferulic acid, caffeic acid)과 함께 Whatman No.1 paper에 spot하여 2% HOAc를 전개용매로 4시간 전개한 후 풍건시키고 이 여과지에다 diazotized p-nitroaniline⁽⁴⁵⁾ (DPNA;2N HCl에 용해시킨 0.5% p-nitroaniline용액 1ml, 5% NaNO₂ 10ml, 20% Na₂ CO₃ 30ml를 혼합시킨 용액) reagent를 분무하여 발색시켰다. 그리고 발색된 spot에 NH₃ vapor를 찍기 전후의 색깔변화도 동시에 조사하였다.

4) 배당체의 종류

Anthocyanin의 배당체 종류는 Ribereau-Gayon과 Penaud⁽⁴⁶⁾의 방법에 따라 확인하였는데 본 색소를 여과지에 spot하여 0.5% citric acid를 전개용매로 6시간 전개시킨 후 UV light하에서 붉은 색깔의 형광유무를 관찰하였다.

5) Anthocyanin의 광학적 성질

Anthocyanin의 흡수 spectra는 BAW, 1%HCl로 정제한 색소를 0.01% HCl/MeOH에 용해시켜 Shimadzu UV-210A double beam spectrophotometer를 사용하여 조사하였다. 이때 blank는 0.01% HCl/MeOH를 사용하였고 최대흡수파장(λ_{max})의 이동은 5% AlCl₃용액 3적을 가하여 5분 후⁽⁴⁷⁾에 조사하였다.

6) 정색반응 시약

Anthocyanin, polyphenol등의 정색반응에 사용한 시약들은 다음과 같다.

- (1) 5% Aluminum chloride⁽⁴⁸⁾-AlCl₃ 5g을 95% ethanol 100ml에 녹임
- (2) Molybdate reagent⁽⁴⁹⁾-수포화시킨 ammonium molybdate에 2N-HCl을 사용하여 pH 2로 조정
- (3) 1% Lead acetate⁽⁵⁰⁾-1g의 lead acetate를 75%

ethanol 150ml에 녹임

(4) Vanillin-H₂SO₄⁽⁴⁴⁾-Vanillin 1g을 conc H₂SO₄ 100ml에 녹임

(5) FeCl₃-K₃Fe(CN)₆⁽⁵¹⁾-FeCl₃와 K₃Fe(CN)₆의 각 150mg/100ml의 동량혼합액

5. Anthocyanin의 함량측정

꽃인덴드라미 잎 250g을 전술한 추출방법으로 처리하여 이 색소추출액을 1000ml로 정용한 후 일정량을 정제, 추출하여 Whatman No. 3MM paper(30×40cm)에 도포하여 BFW로 전개시켰다. 분리된 각 band를 stainless steel knife로 긁어 0.1% HCl/MeOH로 하강법에 의하여 용출시키고 그 양을 각각 100ml로 정용한 후 이들 최대흡수파장에서 흡광도를 측정하여 개별색소의 함량을 구하였으며, 다시 각 band의 용출액 5ml씩을 혼합한 색소액의 최대흡수파장의 흡광도로부터는 총 anthocyanin량 (TAN)을 구하였다.

이때 anthocyanin함량은 Fuleki와 Francis^(52,53) 및 Philip⁽⁴¹⁾의 방법에 따라 다음 식을 사용하여 계산하였다.

$$TAN \text{ in mgs per } 100g = OD \times DV \times 100 / SV \times TEV / SW \times 10 / E_{1\%}^{1cm}$$

OD=흡광도, DV=회석량, SV=시료량, TEV=총 색소추출액.

$$SW = \text{시료무게}, E_{1\%}^{1cm} = \frac{\text{molar absorbance} \times 10}{\text{molecular weight}}$$

결과 및 고찰

1. Paper chromatography에 의한 개별 Anthocyanin의 분리 및 정제

꽃인덴드라미 anthocyanin 색소를 분리하기 위해 Fig. 1, 2와 같이 추출-정제시킨 후 전개용매로 BAW(4:1:5,6:1:2), BFW, 1BAW, FHW 그리고 BuHCl을 사용해 보았는데 이들 중에서 BFW가 가장 분리능이 좋았

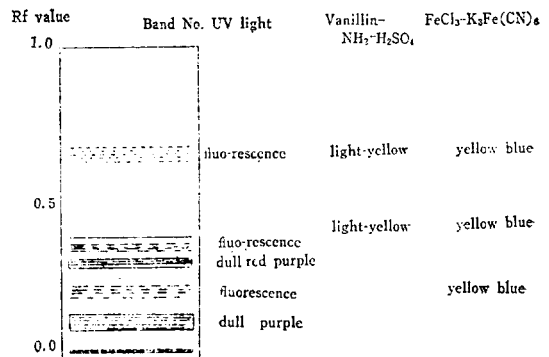


Fig. 3. Schematic diagram of the chromatogram of anthocyanins in Ganges Amaranth

다.

그래서 BFW를 전개용매로 0.1% HCl/MeOH에 용해한 색소를 Whatman No. 3MM paper(20×50cm)에 1cm로 대상도포한 다음 상승법에 의하여 48시간 전개한 결과 Fig. 3에 표시되어 있는 바와 같이 3개의 band로 분리되었다.

특히 band 3은 minor anthocyanin으로서 존재만 인식할 수 있었다. 그리고 이 paper chromatogram을 Harbone⁽⁶⁴⁾의 방법에 따라 UV light(360nm)하에서 형광유무를 관찰하였는데 band 1,2 다같이 형광을 발하지 않아서 이들 anthocyanin은 monoglycoside임을 추정할 수 있었다. 또 UV light하에서 band 1과 band 2사이, band 2와 band 3사이 그리고 band 3의 상단부위에 밝은 흰빛깔의 형광이 발하였기에 polyphenol 성분이 아닌가 하여 정색반응시약인 Vanillin-H₂SO₄, NH₃, FeCl₃-K₃Fe(CN)₆등을 분무하여 그때의 색깔을 조사하였던 바 Vanillin-H₂SO₄에 의해서는 light yellow, NH₃ vapor를 쫓았을시는 노랑색으로 FeCl₃-K₃Fe(CN)₆에 의해서는 푸른색으로 변색하였으므로 이들 형광물질이 polyphenol성분임을 확인할 수가 있었다.

보통 anthocyanin B환에 OH기 두개를 갖고있는 cyanidin, delphinidin, petunidin은 5% AlCl₃, ammonium molybdate, 1% lead acetate를 분무하였을때 푸른색으로 변색되나, OH기 하나를 갖고있는 pelargonidin, peonidin, malvidin들은 색깔변화가 없는데 상기 정색반응 시약들을 분무해 본 결과 band 1,2 다같이 이 정색반응 시약들에 의한 색깔 변화가 음성이었다. 따라서 band 1,2의 anthocyanin은 pelargonidin, peonidin, malvidin계열에 속하는 색소임을 추정할 수 있었다.

이 정색반응 시험을 더욱 확인하기 위하여 Sakellariades와 Luh⁽⁶⁵⁾의 방법에 따라 두개의 시험관에 95%

ethanol 1ml씩을 넣고 그중 한 시험관에 AlCl₃를 수직가한 다음 여기에다 각 band의 정제 색소용액을 양 시험관에 2~3적울 가하여 본 결과 역시 정색반응이 음성이었다.

2. Anthocyanin의 동정

1) 배당체의 종류

Band 1과 band 2의 anthocyanin의 배당체 종류를 확인하기 위해서 0.5%(W/V) citric acid를 전개용매로 paper chromatography를 행하였던 바 paper chromatogram상에 하나의 band를 형성하여 상승하였기에 배당체의 종류가 한 종류단임을 알 수가 있었고, 또 이 paper chromatogram이 UV light하에서 어떤 형광도 발하지 않아 band 1,2의 anthocyanin은 monoglycoside임을 확인할 수 있었다.

2) Rf치와 색조

각 band별의 색소를 BFW, BAW, 1% HCl 및 AHW 4종의 용매계로 paper chromatography를 행하여 얻은 Rf치와 가시광선 및 UV light 하에서의 색조를 Table 3에 표시하였는데 band 1은 BAW, 1%HCl, AHW의 용매계에서 35, 05, 26이었고, band 2는 30, 08, 32이었다. 그리고 가시광선 및 UV light하에서 band 1은 red purple, dull purple, band 2는 다같이 dull red purple로서 Harbone⁽⁶⁾의 보고치와 비교해 보았을 때 band 1은 malvidin계, band 2는 peonidin계의 monoglycoside 색소임을 추정할 수 있었다.

3) Aglycone과 당분자의 동정

Anthocyanin의 당분자는 2N-HCl로 정제색소를 가수분해한 후 표준품의 당과 함께 paper chromatography 방법으로 확인하였다. Table 4는 anthocyanin의 당분자와 표준품 당의 Rf치를 나타낸 것인데 band 1,2의 당분자의 Rf치가 다같이 33으로 표준품 glucose의 Rf치와 거

Table 2. Comparison of Rf values and color characteristics of individual anthocyanins in Ganges Amaranth.

Band No	Rf values (×100)				Colors in	
	BFW	BAW	1%HCl	AHW	Visible Light	UV Light
1	05	35	05	26	Red purple	Dull purple
2	07	30	08	32	Dull red purple	Dull red purple

Reported*

Peonidin-3-glucoside	35	05	26	Magenta	Dull magenta
Peonidin-3,5-diglucoside	31	17	44	Magenta	Fluorescent pink
Malvidin-3-glucoside	38	06	29	Mauve	Dull purple
Malvidin-3,5-diglucoside	31	13	42	Mauve	Fluorescent cerise

*Harbone, J. B.:Comparative Biochemistry of the Flavonoids, 23, Academic Press (1967).

Table 3. Detection of sugar moieties in anthocyanins of Ganges Amaranth

	Rf value($\times 100$) in phenol	Color*
Band 1	33	Brown
Band 2	33	Brown
Standard sugars		
Glucose	35	Brown
Galactose	39	Brown
Arabinose	50	Red
Rhamnose	60	Yellow

*Developed with Partriges reagent.

의 비슷하였으며 Partriges reagent를 분무한 후의 색깔도 표준품 glucose와 동일한 갈색으로서 band 1,2의 당분자는 glucose임을 확인하였다.

Harbone과 Sherratt⁽⁵⁸⁾는 용매계가 HCl과 같은 mineral acid를 함유하고 있고 Whatman No. 3MM paper를 사용하여 anthocyanin을 정제할 시에 artifact로 arabinose가 생성된다고 보고하였는데, 이는 anthocyanin을 paper chromatography법으로 정제할 때 모든 paper chromatogram에는 arabinose가 존재하고 있음을 의미하는 것이다. 그래서 paper chromatography법으로 정제하지 않은 색소액을 산 가수분해한 후 추출한 당을 상기의 당분자 확인법과 동일하게 행하였던 바 arabinose는 검출되지 않아서 band 1,2의 당분자는 glucose 만임을 확인할 수가 있었다.

Aglycone은 상기의 산 가수분해물을 isoamyl alcohol로 추출하여 농축한 다음 Whatman No.1 paper에 spot한 후 Rf치를 측정하였으나 문헌의 Rf치와 비교하여

보았으나 그 값에 차이가 있어서 Rf 치만으로는 동정하기에 어려움이 있었다.

4) Acyl화색소의 유기산분자의 동정

Acylating acid는 paper chromatography하였을 때 보통 두개의 spot가 나타나는데⁽⁵⁷⁾ 문헌에 보고된 Rf치는 major spot에 대한 것이다. Acylating acid 중 caffeic acid일 경우 UV light하에서 bright-blue형광을 발하며 NH₃ vapor에 쪼이면 minor spot는 UV light하에서 녹색형광을 발하나 major spot는 색깔변화없이 그대로 bright-blue 형광을 띤다. 또 p-coumaric acid일 경우에는 UV light하에서 형광을 발하지 않으나 NH₃ vapor를 쪼이면 bright-blue 형광을 띤다. 그리고 2% HOAC, BAW 등의 용매계에서의 Rf치와 DPNA를 분무하였을 때의 색깔 특징 등이 acyl moiety 동정에 도움이 되고 있다.

Table 5에 표시되어 있는 바와 같이 band 1은 2% HOAC, BAW의 용매계에서 0.32, 0.81, band 2는 0.30, 0.80으로 표준품 caffeic acid의 Rf치와 비슷한 값을 보여주고 있다. 그리고 UV light하에서 색깔변화를 살펴보면 band 1,2 다같이 푸른형광 NH₃ vapor를 쪼였을 때는 변화가 없었으며 DPNA를 분무하였을 때에는 tane으로 나타나 Chen과 Luh⁽⁴⁶⁾의 보고치 및 표준품 caffeic acid와 비교한 결과 caffeic acid로 동정하였다.

5) 개별 Anthocyanin의 광학적 성질

정제한 각 band의 색소를 0.01% HCl/MeOH에 용해하여 흡수 spectra를 측정한 결과는 Fig.4와 같으며 band별 색소의 최대흡수파장, E₄₄₀/E_{λmax7} 및 AlCl₃에 의한 최대흡수파장의 이동 등이 Table 5에 표시되어

Table 4. Rf values and color characteristics of the acyl component of anthocyanins in Ganges Amaranth

Pigment	Rf value at 20°C		Color			Identification
	2% HOAC	BAW(4:1:5)	UV light	UV+NH ₂	DPNA	
Band 1	0.32	0.81	Blue F*	Blue F	Tan	Caffeic acid
Band 2	0.30	0.80	Blue F	Blue F	Tan	Caffeic acid
Standard						
Ferulic acid	0.38	0.82	Blue F	Green F	Red	
Caffeic acid	0.32	0.81	Blue F	Blue F	Tan	
Reported**						
p-coumaric acid	0.44	0.88	—	Blue F		Light Orange
Caffeic acid	0.33	0.80	Blue F	Blue F		Tan
Ferulic acid	0.39	0.82	Blue F	Blue F		Red
Chlorogenic acid	0.62	0.58	Blue F	Blue F		Tan

* Fluorescence

** Chen, L. F and Luh, B. S.: *J. Food Sci.*, 32,66(1967).

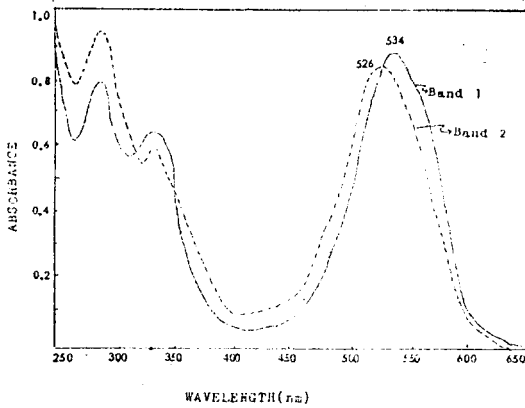


Fig. 4. Absorption spectra of Ganges Amaranth anthocyanins

있다.

Anthocyanin의 흡수 spectra에 있어서 3,5-diglycoside와 5-glycoside는 440nm에서의 흡수가 3-glycoside와 유리의 anthocyanidin에 비하여 약 50% 정도밖에 되지 않고, 440nm의 흡광도를 최대흡수파장의 흡광도로 나눈 값은 monoglycoside인 경우 20부근, diglycoside는 10부근이며 acyl화된 anthocyanin의 spectra는 UV영역에서 acyl기(주로 cinnamic acid)의 superimposition 때문에 두개의 peak가 나타난다.

Table 6에서 보면 각 band의 440nm에서의 흡광도를 최대흡수파장(λmax)의 흡광도로 나눈값(E440/Eλmax)이 band 1과 band 2가 각각 22, 25이어서 이 두 band의 색소가 3-glycoside임을 추정할 수 있었으며 이미 당분자 동정에서 glucose로 확인되었기 때문에 이 색소들은 3-glycoside임을 알 수 있었다. UV 영역에서 band 1은 273, 320nm, band 2는 273, 315nm에서 두개의 peak가 나타났기 때문에 acyl화가 되어 있음을 알 수 있었고 유기산분자의 동정으로 caffeic acid임이 확인되었다. 그런데 모든 acyl화된 glycoside는 유리의 phenol성 OH기 보다는 3위치의 당에 acyl화가 된다고 보고되고 있기 때문에 본 꽃잎맨드라미 anthocyanin도 3위치의 glucose에 caffeic acid가 결합되어 있는 것으로 추정된다.

유리의 ortho-dihydroxylic group을 갖고있는 anthocyanin(cyanidin, delphinidin, petunidin)은 Al³⁺의 존재 하에서 25-35nm 정도의 bathochromic spectral shift를 나타내는데 (1) band 1, 2 다같이 Al³⁺의 존재 하에서 이동을 하지 않았으며 또 최대 흡수파장이 534, 526nm로서 Harbone(64), Philip(41)등의 보고치와 비교하여 band 1은 malvidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid) band 2는 peonidin-3-glucoside (acylated with caffeic acid)

Table 5. Absorption spectra of anthocyanins in Ganges Amaranth.

Band No	λmax(nm)	E440/Eλmax(as%)	AlCl ₃ shift
1	273, 320, 534.	22	—
2	273, 315, 526.	25	—

로 각각 동정하였다.

3. Anthocyanin의 정량

일반적으로 분자흡광계수($E_{1\%}^{1cm}$)값은 anthocyanin의 종류, 용매등에 따라 상당히 변하는데 본 꽃잎맨드라미의 총 anthocyanin 정량에 있어서의 분자흡광계수는 malvidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid)가 주 색소를 이루고 있어서 Philip(41)이 malvidin-3-glucoside (acylated with caffeic acid)에 대해서 보고한 분자흡광계수 420.3을 사용하여 Fuleki와 Francis(52,53)의 방법에 따라 계산하였던 바 총 anthocyanin의 함량은 신선물 100g당 101.57mg이었다.

그리고 band 1의 색소인 malvidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid)의 분자흡광계수는 상기와 같이 420.3을 사용하였으나, band 2의 peonidin-3-glucoside (acylated with caffeic acid)에 대한 526nm에서 측정된 분자흡광계수가 보고된 것이 없어서 524nm에서 peonidin-3-glucoside의 분자흡광계수의 값이 218.8이었다고 보고한 Philip(41)의 값을 사용하여 계산해 본 결과 band 1, 2의 값이 각각 82.15mg, 27.20mg이었다. 그래서 본 잎꽃잎맨드라미의 주 색소는 바로 band 1의 색소인 malvidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid)임을 알 수 있었다.

일반적으로 anthocyanin의 함량은 식물의 종류, 환경조건, 생리적 상태, 화학약품 등의 요인들에 의해서 상당히 변하는데 (58,59) seedless grapes(41)는 그 함량이 62.0mg%, cranberry(52)는 55.8mg%, 토란(10) 16.0mg%, red raspberry(60) 60.0mg%, miracle fruit(61) 14.3mg%, campbell early(62) 33mg/g dried skins, 그리고 bailey alicante A(63)가 106mg/g dried skins인 것으로

Table 6. The amount of anthocyanins in Ganges Amaranth

Band No	Compounds	λmax. (nm)	mg% f.w.
1	Malvidin-3-glucoside (acylated with caffeic acid)	534	82.15
	Peonidin-3-glucoside (acylated with caffeic acid)	526	
2	Total anthocyanins	534	101.57

보고 되었는데 이상의 것들과 비교하여 불매 꽃잎맨드라미 총 anthocyanin 101.57mg%는 보다 많은 함량이라고 볼수 있겠다.

결 론

꽃잎맨드라미의 anthocyanin 색소를 식용색소로의 이용에 따른 기초조사로서 우선 본 색소를 0.1%HCl/MeOH로 추출하고 유기용매처리 및 Amberlite CG-400 Type-2 양이온 교환수지로 정제한 다음, 전개용매 BFW로 paper chromatography에 의해서 개별색소들로 분리하여 Rf치, sugar moieties. 가수분해, 가시부와 자외부에서의 흡수 spectra 특징 등으로 동정을 하고 함량도 구하였는데 그 결과는 다음과 같다.

1. 꽃잎맨드라미 anthocyanin 색소는 paper chromatography에 의해서 3개의 band로 분리되었는데 그중 2개의 band는 malvidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid)와 peonidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid)로 각각 동정이 되었고 band 3은 극히 미량이어서 동정하지 못하였다.

2. 총 anthocyanin 함량은 신선물 100g당 101.57mg이었고, malvidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid) | 82.15mg, peonidin-3-glucoside(acylated with caffeic acid)는 27.20mg로서 malvidin-3-glucoside (acylated with caffeic acid)가 주 색소를 이루고 있었다.

References

- 1) Harbone, J. B.: "Comparative Biochemistry of the Flavonoids." Academic Press.(1967).
- 2) Sondheimer, E. and kertesZ, Z. I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3476(1948).
- 3) Wrostad, R. E. and Putnam, T. B.: *J. Food Sci.*, **34**, 154(1969).
- 4) Akiyoshi, M., Webb, A. D. and Kepner, R. E.: *J. Food Sic.*, **28**, 177(1963).
- 5) Somaatmadja, D. and Power, J. J.: *J. Food Sci.*, **28**, 617(1963).
- 6) Koeppen, B. H. and Basson, D. S.: *Phytochem.*, **5**, 183(1966)
- 7) Anderson, D. W., Gueffroy, D. E., Webb, A. D. and Kepner, R. E.: *Phytochem.*, **9**, 1579(1970).
- 8) Liao, F. W. H. and Luh, B. S.: *J. Food Sci.*, **35**, 41(1970).
- 9) Hrazdina, G.: *J. Agr. Food Chem.*, **18**(2), 243 (1970).
- 10) 芥田三郎・松富直利: *食品工誌*, **23**, 108(1976).
- 11) 太田英明・茂島豊・澤村正義・中村浩・芥田三郎: *食品工誌*, **23**, 345(1976).
- 12) Sun, B. H. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **32**, 647(1967).
- 13) Timberlake, C. F. and Bridle, P.: *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 509(1971).
- 14) Wrolstad, R. E. and Heatherbell, D. A.: *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 1221(1974).
- 15) Li, K. C. and Wagenknecht, A. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 979 (1956).
- 16) Lee, S. W., Kim, K. S. and Kim, S. D.: *Jour. Kor. Soc. Hort. Sci.*, **15**, 64(1974).
- 17) Du, C. T., Wang, P. L. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **40**, 417(1975).
- 18) Puech, A. A., Pebeiz, C. A., Catlin, P. B. and Crane, J. C.: *J. Food Sci.*, **40**, 775(1975).
- 19) Chan JR., H. T., KAO-JAO, T. H. C. and NAKAYAMA, T. O. M.: *J. Sci.*, **42**, 19(1977).
- 20) Fuleki, T.: *J. Food Sci.*, **36**, 101(1971).
- 21) Du, C. T., Wang P. L. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **39**, 1265(1974).
- 22) Du, C. T. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **40**, 1101(1975).
- 23) Bragt, J. V.: *Landbouwhogeschool*, Wageningen, **62**(4), 1-43(1962).
- 24) Dayton, T. O.: *J. Genetics*, **54**, 249(1959).
- 25) 河瀬晃・四郎・塚本洋太郎: *園藝學雜誌*, **45**(1), 65(1976).
- 26) Loose, R. D.: *J. Hort. Sci.*, **45**, 265(1970).
- 27) 遠藤元庸・山田健二: *岐阜大農研報*, **33**, 51(1972).
- 28) 林考三: *植雜*, **5**, 168(1937).
- 29) Ayres, J. C., Kraft, A. A., Synder, H. E. and Walker, H. W.: The Iowa State University Press (1962).
- 30) Horowitz, R. M. and Gentili, B.: *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 697(1969).
- 31) Garoglio, P. G.: *La Nuova Enologia*. Istituto di Industrie Agrarie. Florence, Italy(1965).
- 32) Chiriboga, C.D.: Ph. D.thesis, Univ. Mass. (1972).
- 33) Chiriboga, C. D. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **38**, 464(1973).
- 34) 劍持久仁子・片山脩: *食品工業*, **22**, 598(1975).
- 35) Dekazos, E. D.: *J. Food Sci.*, **35**, 237(1970).

- 36) Shrikhande, A. J. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **39**, 904(1974).
- 37) Bhatia, I. S. and Ullah, M. R.: *J. Sci. Fd Agric.* **19**, 535(1968).
- 38) Fuleki, T. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **33**, 266(1968).
- 39) Fuleki, T.: *J. Food Sci.*, **34**, 365(1969).
- 40) Trevisan, L. M., Bobbio, F. O. and Bobbio, P. A.: *J. Food Sci.*, **37**, 818(1972).
- 41) Philip, T. *J. Food Sci.*, **39**, 449 (1974).
- 42) 芥田三郎 · 松富直利 : 食品工業, **23**, 101(1976).
- 43) Partridge, S. M.: *Nature*, **164**, 443(1949).
- 44) Chandler, B. V. and Harper, K. A.: *Australian J. Chem.*, **14**, 586. (1964)
- 45) Chen, L. F. and Luh, B. S.: *J. Food Sci.*, **32**, 66 (1967).
- 46) Ribereau-Gayon, T. and Peynaud, E.: *Analyse et controle des vins*. Beranger, Paris(1958).
- 47) Mabry, T. J. Markham, K. R. and Thomas, M. B.: "Systematic Identification of Flavonoids." Springer Verlag, New York (1970).
- 48) Harbone, T. B.: *Bochem. J.*, **70**, 22(1958).
- 49) 芥田三郎 · 太田英明 · 茂島豊 : 食品工業, **24**, 346 (1977).
- 50) Fuleki, T. and Francis, F. J.: *Phytochem.*, **6**, 1161(1967).
- 51) Yu, K. and Carlson, R. F.: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **100**(5), 536(1975).
- 52) Fuleki, T. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **33**, 72 (1968).
- 53) Fuleki, T. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **33**, 78(1968).
- 54) Harbone, J. B.: *J. Charamatog.*, **1**, 473(1958a)
- 55) Sakellariades, H. C. and Luh, B. S.: *J. Food Sci.*, **39**, 329(1974).
- 56) Harbone, J. B. and Sherratt, H. S. A.: *Experimenta*. **13**, 486(1957).
- 57) Williams, A. H.: *Chem. & Ind. (London)* 1955, 120, (1955).
- 58) Blank, F.: In "Handbuch der pflanzenphysiologie". **10**, 300-353. Springer Verlag, Berlin. Germany (1958).
- 59) Ribereau-Gayon, P.: *Application augenre vitis*. Doctoral dissertation, University of Bordeaux. 118 pp. Libraire Generale de l'Enseignement. Paris, France(1959).
- 60) Torre, L. C. and Barritt, B. H.: *J. Food Sci.*, **42**, 488(1977).
- 61) Buckmire, R. E. and Francis, F. J.: *J. Food Sci.*, **41**, 1363(1976).
- 62) 松富直利 · 山村益士 · 太田英明 · 茂島豊 · 芥田三郎 : 食品工業, **24**, 342(1977).
- 63) _____, _____, _____, _____, _____ : 食品工業, **24**, 279(1977).