韓國産 Comfrey의 成熟中의 一般成分과 아미노酸의 含量變化

조 재 흥·최 칠 남·정 오 진·김 일 수

朝鮮大學校 師範大學 化學科

Changes in contents of general components and amino acids of comfrey during growth

Jei-Heung Cho, Chil-Nam Choi, Oh-Jin Jung and Il-Su Kim

Dept. of Chemistry, Teacher's College, Chosun University

Abstract

Changes in contents of general components of comfrey cultured in Korea were experimented and amino acids were analyzed by thin layer chromatography (T.L.C.) and gas chromatography (G.L.C.). The results obtained were as follows;

1. General components of comfrey such as moisture, fat, protein, carbohydrate, crude fiber and total ash were 13.20, 2.22, 22.30, 37.62, 9.38 and 15.06%, respectively, after 60 days growth.
2. The root of comfrey after 60 days contained 6.03% of alanine, 2.24% valine, 10.77% arginine, 2.96% glycine, 4.08% histidine, 1.54% isoleucine, 0.58% cystein, 1.72% methionine, 7.55% aspartic acid, 7.81% glutamic acid and 4.65% lysine in the gas chromatographic analysis of amino acid composition
3. The crude protein was decreased after 60 days of growth whereas the contents of carbohydrate, crude fiber and total ash were increased.
4. The total amount of amino acids in root was greater than that in leaf of comfrey.

서 론

comfrey는 구주일대, 미국, 카나다, 오스트리아, 뉴질랜드 동남아시아 등지에 널리 분포되어 있는 *Symphtum peregrium*이라는 學名을 가진 고단백질 含有植物로써 각종 vitamin은 물론 重要한 無機物質을 多量으로 含有하고 있어[1] 야채, 한약제, 가공식품등으로 널리 利用되고 있으며 근래에는 comfrey차로서 향기와 맛이 좋아 각광을 받고 있는 실정이다. 이에 저자들은 한국토양에서도 잘 자라는 comfrey를 포장에서 재배하여가며 comfrey의 잎부분과 뿌리부분을 채취하여 comfrey의 성숙과정에 따른 일반성분과 amino acids의 變量에 관해서 조사연구하였기에 보고한다.

재료 및 실험

1. 재 료

1977년 5~8月 사이에 본대학교 실험포장에서 채취한 comfrey를 15日 간격으로 잎과 뿌리부분을 채취하여 뿌리부분은 겉껍질을 벗기어서 분석에 사용할 예비시료로하고 냉장고(4°C이하)에서 보관하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시약

① 표준용액을 만들기위해 사용된 amino acids은 日本 Shandon Scientific Co.와 Azinomoto Co. 제품을 사용하였다.

② Merck특급 methanol과 buthanol을 염산기체 발생장치를 만들어서 포화시켜 염산 methanol과 염산 buthanol을 만들었다.

③ 기타시약들은 日本 Wako제품을 사용하였다.

2) 발색액 조제

① Soln. Ⅰ; 0.1g의 ninhydrin을 50ml absolute alcohol, 10ml glacial acetic acid 및 2ml-2.4.6-collodine에 녹인다.[2]

② Soln. Ⅱ 0.6g의 Copper nitrate [$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$]을 50ml-absolute alcohol에 녹인다.[2]

3) 장치

Shimadzu gas chromatography model GC-1C에 flame ionization detector(F.I.D.)을 장치 하였으며 temperature programer Model Tp-2A로 온도를 일정한 비율로 상승시켜가며 single pen recorder에 의하여 기록하였고 column은 U-shaped stainless steel columm 3mm×1.865m를 ethanol로 세척하여 건조한 다음 이를 다시 acetone으로 씻어 공기를 통하여 용매를 완전히 제거한 다음 냉각시켜 사용하였다. 그리고 Pyrex 16×75mm의 glass crew up에 teflon linning이 되어있는 captube를 acylation 反應시키는데 사용하였다.

4) Packing materials

① E.G.A. Column 0.65w/w%를 40°C에서 12시간 건조한 chromosorb W(80~100 mesh)에 coating 시키고 carrier gas(N_2)를 통과하면서 column이 완전히 연결되어 있는가를 soap film으로 살핀다음 정상적으로 온도를 서서히 올려 210°C에서 24시간 aging시켜 사용하였다.

② OV-17 2 w/w% 및 OV-210 1 w/w%을 취하며 acetone에 녹여 일정량의 chromosorb G를 加하여 coating하고 acetone을 감압하에서 날려 보내면서 건조시켜 ①과 同一한 方法으로 aging하였다.

5) 시료의 전처리

① 시료의 뿌리와 잎을 각각 100mg 평량하여 6N-HCl 200ml을 加하여 수욕상에서 72시간 가수분해시켜서[3] 가수분해액을 감압하에서 $AgNO_3$ 수용액을 통과시키면서 염산을 날려보낸다. 증발건조된 가수분해물을 증류수에 녹여 300ml로 하고 위의 가수분해액을 10ml 취하여 증발건고시킨 다음 염산 methanol 10ml을 30분간 흔들면서 상온에서 methylation[4]하여 다시 염산 butanol 10ml을 가하여 잘 흔들어 섞고 밀봉하여 약 2시간동안 sand bath상에서 90°C로 가열하여 butylation[5] 시킨다음 감압하에서 나머지의 염산을 완전히 날려보낸다. 수분을 완전히 날려보내기 위하여 3~5ml의 methylene chloride를 가한다. 여기에다 약 4.5ml의 methylene chloride 및 0.6ml trifluoro acetic acid를 가하여 acylation tube에 옮겨담고 100°C로 sand bath상에서 한시간동안 acylation시켜 n-butyl N-trifluoro acetyl amino acids esters 유도체[5,6]로 만든다음 4°C하에서 보관하여 micro-syringe(Hamilt에 71N type 10μl)로 3μl을 주사하여 gas chromatography에 의해 분석하였다.

② 시료의 뿌리와 잎 100g을 hot alcohol에 10분간 처리하여 homogenize한 후 75% ethanol을 넣어 5일간 4°C에서 냉각하여 추출여과하여 감압농축한 것을 5% HCl로 활성화한 후 0.1-N HCl로서 pH 2로 조절후 Amberlite IR-120에 통하여 amino acids를 흡착시키고[7] 이것을 5%-NH_4OH로 elution하여 감압 농축한후 정량한후 정량한 것을 유리 amino acids가 검액으로하여 T.L.C.로 분석하였다.

6) 기기조작조건

① Shimadzu GC-IC gas chromatography는 두개의 column을 부착시킬 수 있으며 조작방법으로 single column method을 택했으며 OV-17, OV-210 mixed phase column은 input 1 에서, E.G.A. column은 input 2에 충전하고 실험하였으며 G.L.C. operational condition은 Table 1과 같다.

② comfrey의 뿌리와 잎에 함유된 free amino acid들의 T.L.C.에 의한 분리조건은 다음과 같다.

Table 1. G.L.C. operational condition

Column	E.G.A. (0.65w/w %) Chromosorb W. (80/100 mesh)	2w/w%OV-17 +1.0w/w% OV-210 Chromosorb G. (100/120)
Flow rate	45 psi	55 psi
Attenuation	8	8
Input	10	10
Initial Temp.	60°C	95°C
Injection port	200°C	220°C
Detector Temp.	250°C	270°C
Temp. rise	165°C	170°C
Inlet Temp.	210°C	210°C
Range	10	10
Voltage	10V	10V
Air(to detector)	350ml/min.	350ml/min.
Hydrogen(to detector)	30ml/min.	30ml/min.
Carrier gas (N_2)	30ml/min.	30ml/min.
Diluent gas (N_2)	20ml/min.	20ml/min.
Injection capacity	3 μl	3 μl
Chart speed	5mm/min.	5mm/min.

0.25mm두께와 22×22cm의 넓이의 thin layer plate에다 2분동안 20×20cm 넓이로 silica-gel을 흡착시켜서 실온에서 건조시킨 다음 30분동안 110°C로 dry oven에서 다시 건조하고 다시 실온에서 냉각시킨 다음 즉시 plate에 30~50㎕정도의 sample을 주입 한다. paper용 여지는 동양여지 No. 50(40×40cm)를 사용하였고 전개액으로서는 일차원은 phenol-water(75+25 v/v) 이차원은 n-butanol-glacial acetic acid-water(80+20+20 v/v)를 사용하였다. 일차원은 90분동안, 2차원은 4시간동안 전개하고 80°C~90°C건조기 속에서 건조시킨 다음 ninhydrin copper nitrate soln.으로 spray하고 건조기 속에서 110°C로 가온하여 건조 발생시켰다.

결과 및 고찰

1. 일반성분의 분석결과는 Table 2와 같다.

comfrey의 뿌리와 잎에 포함된 일반성분은 이식후

Table 2. General componemts of comfrey produced in Korea (wt %)

Days of growth	Samples	components					
		Moisture	Crude fat	Crude protein	Carbohydrate	Crude fiber	Ash
30 day		33.27	1.54	1.52	30.36	8.21	10.23
45	Root of	23.4	1.95	18.37	33.06	8.78	13.05
60	comfrey	13.2	2.22	22.30	37.62	9.38	15.06
75		12.0	2.05	21.70	38.05	10.13	16.03
90		9.3	1.98	20.03	39.03	11.06	17.26
30 day		34.68	1.52	14.3	30.73	8.31	9.05
45	Leaf of	23.1	1.92	17.39	24.26	8.92	13.76
60	comfrey	14.26	2.20	20.26	38.85	9.42	13.98
75		12.65	2.20	20.26	39.13	11.52	14.27
90		9.2	1.83	19.45	39.56	13.27	15.05

60일 정도 성장한 것이 조단백질 함량이 제일 많이 나타났으며 comfrey가 성장함에 따라 탄수화물과 조섬유, 회분은 증가하였으나 수분과 조지방은 감소현상을 보여주고 있다. 그리고 잎보다 뿌리에 일반적으로 성분함량이 더 많이 포함되어 있으나 탄수화물은 잎에 더 많이 함유하고 있음을 보여주고 있다.

2) G.L.C.에 의한 amino acids의 분리

6)-①의 조작조건에 의하여 분리된 amino acids의 gas chromatogram은 Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3 및 Fig. 4와 같다. Fig. 1과 Fig. 3은 표준 amino acids의 gas chromatogram이며 Fig. 2와 Fig. 4는 시료의 gas chromatogram이다.

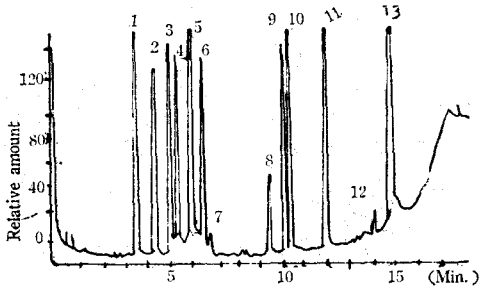

Fig. 1. Gas chromatogram for standard protein amino acids, injected 0.3㎕ of standard solution to 0.65w/w% E.G.A. on 80/100 mesh chromosorb W.

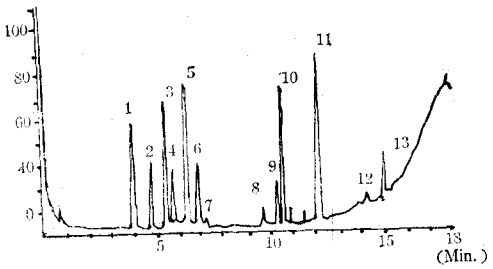

Fig. 2. Gas chromatogram for N-T.F.A. n-butyl ester of protein amino acids in Korean comfrey, injected 0.3㎕ of hydrolysate of dried shrimp and seasoned top shell to 0.65 w/w% E.G.A. on 80/100 mesh chromosorb W.

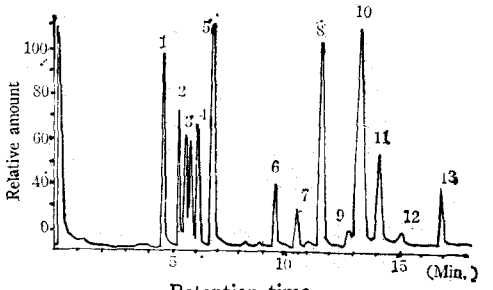

Fig. 3. Gas chromatogram for standard protein amino acid, injected 0.3㎕ of standard solution to 2 w/w%, OV-17, 0.1% OV-210 on 100/120 chromosorb G.

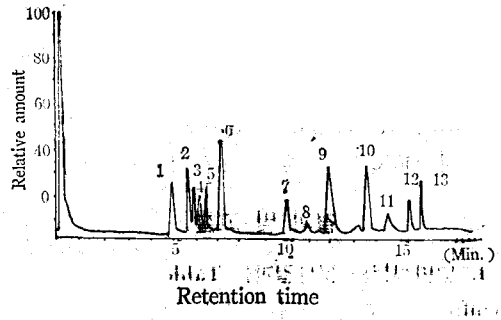

Fig. 4. Gas chromatogram for N-T. F. A n-butyl ester of protein amino acid in Korean comfrey, injected 0.3μl of hydrolysate of dried shrimp and seasoned top shell to 2w/w% OV-17, 1.0% OV-210 on 100/120 chromasorb G.

3) T.L.C.에 의한 amino acids의 분리

6)-②의 조작조건에 의해 분리된 amino acids의 thin layer chromatogram은 Fig. 5, Fig. 6및 Fig. 7과 같다. Fig. 5은 표준 amino acids의 thin layer chromatogram 이며 Fig. 6은 comfrey 잎의 thin layer chromatogram 이며 Fig. 7은 뿌리의 thin layer chromatogram이다.

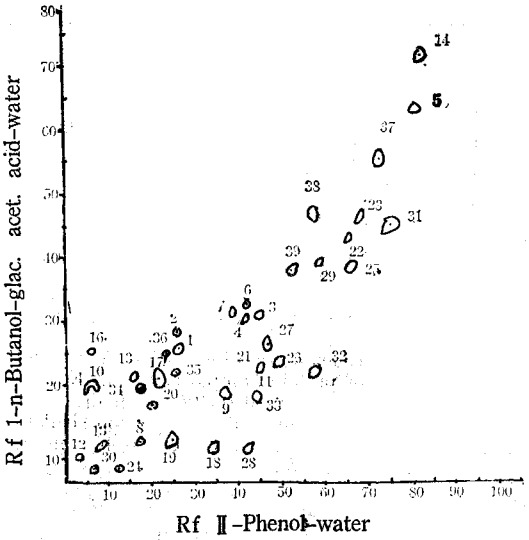

Fig. 5. Schematic drawing of two dimensional separation of 39 ninhydrin positive spots of standard amino acids up on the thin layer chromatogram. The numbers refer to the substances in Table 4.

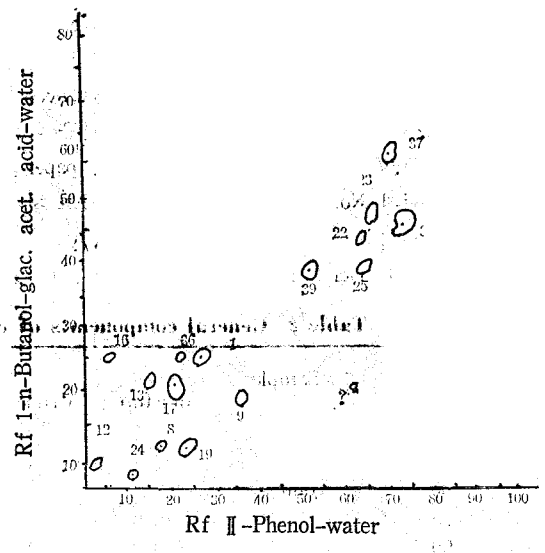

Fig. 6. Schematic drawing of dimensional separation of 39 ninhydrin positive spots of leaf of comfrey upon the thin layer chromatogram. The numbers fefer to the substances in Table 5.

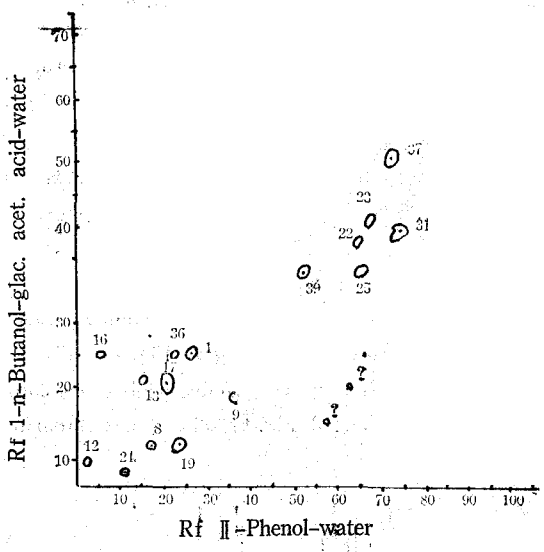

Fig. 7. Schematic drawing of dimensional separation of 39 ninhydrin positive spots of root of comfrey upon the thin layer chromatogram. The numbers refer to the substances in Table 5.

Fig. 2와 4에서 볼 수 있는 바와 같이 β-alanine, valine glysine, isoleusine, methionine, aspartic acid, glutamine, lysine, arginine, histidine, cystine, tryphtophane과 phenylamine이 G.L.C.에 의해서 확인되었으며 이외에도 cysteic acid과 leusine을 T.L.C.에 의해서 확인할 수 있음은 Fig. 6과 Fig. 7에서 보여 주고 있다.

2. Amino acids의 정량 및 확인

검출된 amino acids을 internal standard method로 정량한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. The ratio of composition of changing quantity of amino acid extracted from root and leaf of comfrey produced in Korea (wt %)

Amino acid(wt %)	Days									
	Root					Leaf				
	30	45	60	75	90	30	45	60	75	90
Alanine	3.35	5.27	6.03	5.84	5.76	3.17	4.39	5.82	5.76	5.21
Valine	1.93	2.03	2.24	2.18	2.16	1.86	1.91	1.96	1.93	1.89
Arginine	8.41	9.62	10.77	10.27	10.21	7.69	8.27	9.65	9.16	9.16
Glysine	1.47	2.81	2.96	2.82	2.82	1.03	2.40	2.54	2.41	2.41
Histidine	2.46	3.83	4.08	3.96	3.92	2.24	2072	3.45	3.02	2.96
Isoleusine	1.21	1.57	1.64	1.64	1.48	0.87	1.42	1.52	1.47	1.38
Cysteine	—	0.23	0.58	0.50	0.36	—	—	0.21	0.21	0.18
Phenylanine	1.23	1.69	1.72	1.72	1.64	—	1.20	1.20	1.20	0.93
Threonine	0.83	1.03	1.21	1.14	1.09	—	—	1.26	1.26	0.98
Methionine	0.72	0.88	1.05	0.93	0.87	—	—	0.68	0.62	0.53
Aspartic acid	6.85	7.11	7.55	7.18	6.98	5.43	6.17	6.52	6.28	6.23
Glutamic acid	6.24	6.34	7.81	7.92	7.46	4.21	5.96	6.21	6.06	5.85
Lysine	4.03	4.23	4.65	4.37	3.98	3.07	3.64	4.02	3.95	3.84

T.L.C. 를 이용하여 시료의 잎과 뿌리에서 검출한 비교한 값은 Table 4와 같다.
amino acids와 standard amino acids의 색갈과 R_f 치를

Table 4. Rf values of the standard amino acid and amino acid of comfrey at room temperature on T. L. C. in three different solvents

No.	Standard amino acid	Rf A	x B	100 C	Root	Leaf	Rf A	x B	100 C	Color after development
1.	Alanine	50	22	21	Alanine	Alanine	48	20	18	rose 2 bluishgray
2.	β-Alanine	31	23	21						
3.	L-amino-I-butyric acid	52	25	29						rose
4.	L-amino-n-butyric acid	59	26	28						rose
5.	L-amino-otanoic acid	80	50	59						rose
6.	β-amino-i-butylic acid	47	27	27						dark yellow
7.	R-amino-n-butylic acid	31	26	25						reddish yellow
8.	Arginine	7	8	15	Argine	Arginine	7	93	95	rose
9.	Aspragine	42	14	25						rose
10.	Aspartic acid	21	20	25	Aspartic acid	Aspartic acid	19	18	3	gray
11.	Citrulline	46	14	26						rose
12.	Glutamic acid	31	24	7	Glutamic acid		31	23	6	orange
13.	Cystine	45	10	7	Cystein	Cystein	43	9	5	reddish blue
14.	Di-iodo-triosine	61	56	65						red
15.	Ethanolamine	35	18	16						rose
16.	Cysteic acid	38	9	3	Cysteic Acid	Cysteic Acid	36	8	2	brownish blue
17.	Glycine	39	18	18	Glycine	Glycine	37	17	18	dark purple
18.	Histamine	69	5	28	Histidine	Histidine	69	5	28	dark purple
19.	Histidine	52	6	23						yellow gray
20.	Homocystine	48	17	16						
21.	hydroxyaroline	38	15	34						rose
22.	Isoleucine	70	36	44	Isoleucine	Isoleucine	69	35	43	rose
23.	Leucine	72	38	46	Leucine	Leucine	72	37	46	rose
24.	Lysine	6	4	10	Lysine	Lysine	6	3	9	rose
25.	Methionine	70	33	44	Methionine	Methionine	70	31	43	yellow red
26.	Methionine sulphone	59	14	37						yellow red
27.	Methionine sulpiode	61	18	34						mauve

28. Methylhistidine	61	3	32					rose
29. Norvaline	67	33	39					rose
30. Ornithine	5	6	7					brownish orange
31. Phenylalanine	78	42	58	Phenylalanine	Phenylalaine	77	40	52
32. Proline	37	15	43					yellowish rose
33. Sarcosine	33	13	30					red
34. Serine	26	18	16					reddish yellow
35. Taurine	60	18	19					reddish gray
36. Threonine	53	21	20	Threonine	Threonine			reddish yellow
37. Tryptophan	75	46	54	Tryptophan	Tryptophan			violet
38. Tyrosine	62	41	41					reddish yellow
39. Valine	65	33	36	Valine	Valine	64	30	37

60일간 성장한 comfrey를 T.L.C.로 분리한 각시료의 각 spot를 Awapara의 추출비색법[8]으로 정량한 amino acids의 비율은 Table 5와 같다.

Table 5. The ratio of amino acid composition of each spot separated with T. L. C.

Spot No.	Amino acid	Sample		color
		Root	Leaf	
1	Alanine	6.08	4.65	rose
8	Arginine	10.23	9.65	rose
9	Aspartic acid	7.21	6.68	gray
12	Cysteic acid	2.86	2.73	rose
13	Cystein	0.58	0.36	brownish blue
16	Glutamic acid	7.86	6.89	orange
17	Glycine	2.90	2.87	dark purple
19	Histidine	4.025	3.82	yellw gray
22	Isoleucine	1.52	1.38	rose
23	Leucine	1.42	0.89	rose
25	Methionine	1.05	0.92	yellow red rose
24	Lysine	4.87	4.32	brownish
31	Phenylanine	1.68	0.92	orange.
36	Threonine	1.25	1.61	reddish gray
37	Tryptophan	0.56	0.32	violet
39	Valine	2.52	2.04	rose

Table 3에서 나타난 바와 같이 comfrey에서 분리된 amino acid의 종류별 함량을 보면 arginine이 가장 많은 양으로 나타났으며 또 우유[10]등에 제일 많이 함유되어있는 *glutamic acid*의 함량이 비교적 많음을 알수 있다. Korsers[9]의 분석치와 비교하여 볼 때 저자들의 분석결과와 거의 일치하고 있으나 Korsers[9]가 검출하지 못한 여러가지의 유리 amino acids을 분석할 수 있었다. G.L.C와 T.L.C.에 의해서 분리된 유리 amino acids의 정량수치도 거의 비슷하였으나 G.L.C.가 T.L.C.보다는 재현성이 낮았고 시료 채취용량이 μl단위이므로 시료주사용 syringe의 중요한 분석오차의 가능성이 있다. 그리고 전처리 조작에 있어서 상당한 기술이 필요하며 T.L.C.에 비해 실험준비에 많은 시간과 경비를 요구하는 것이 단점이라 할 수 있으나 정확한 정량적인 근거로 함량을 산출할 수 있는 정확성과 예민성이 있다. Table 3에서 보면 잎보다 뿌리에 amino acids의 함량이 많았고 파종후 60일경에 채취한 comfrey에서 제일 많은 amino acids을 포함하고 있음을 알 수 있다. 이는 식물이 성장함에 따라 단백질이 뿌리에 저장되고 섬유질이나 탄수화물 등으로 변하여 amino acids들의 감소를 가져올 것으로 사료된다. 이런 결과들로 보아 가공식품이나 동물의 사료는 60일내외로 채취하는 것이 바람직하다.

요 약

comfrey의 잎과 뿌리에 함유된 free amino acid의 종류 및 함량을 G.L.C와 T.L.C로 측정한 결과는 다음과 같다.

① G.L.C.에 의해서 검출한 free amino acid는 13

종이었으며 alanine, valine, glycine, isoleucine, methionine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, histidine, cystine, tryphtophan, phenylalnine 등 13종이 정량되었으며 이들 중 arginine은 전질소 100%중에서 10.77%로 제일 많았고 그 다음이 glutamic acid, aspartic acid, lysine, histidine순이었다.

② T.L.C로 검출한 amino acid는 G.L.C로 검출한 것보다 cysteic acid, leucine를 검출할 수 있었으며, 정량적인 면에서도 G.L.C방법과 일치하였으나 검출감도가 나쁘고 1종은 미확인 되었다.

③ G.L.C의 분석은 T.L.C 분석보다도 검출감도가 높고 정량적이었으나 재현성이 낮았고 실험과정이 복잡하여 비용이 많이 든다.

④ comfrey 중에서 잎과 뿌리에 함유된 amino acid의 함량과 성분을 비교해볼때 잎보다는 뿌리에 amino acids의 함량과 종류가 약간 많았다.

⑤ 60일후에 채취한 comfrey뿌리의 일반성분은 수분 13.2%, 조지방 2.2%, 조단백질 22.30%, 탄수화물 37.62%, 조섬유 9.38%, 회분 15.06%로 되어 있으며 60일 전후로 하여 조단백질의 함량이 감소되고 60일이전의 comfrey는 수분의 함량이 많았고 60일이후에 채취한 comfrey는 탄수화물 조섬유, 회분의 함량이 증가되었다.

⑥ 60일정도 성장한 comfrey가 제일 많은 amino acids을 함유하고 있으며 그 함량도 제일 많았다.

⑦ comfrey에는 많은 amino acids가 함유되어 있는 것으로 보아 동물의 사료용으로 광범위하게 쓰일 수 있으며 comfrey차 이외의 다른 가공 식품을 만들수 있으리라고 사료된다.

References

1) Minoru Ikeda, Itaru Kunizaki, and Hiroko Matsumura; Hirosima Univ. Funkyama, Japan, 5, 165 (1963)
2) Kim C.S., C.H. Kim, and K.S. Koh; J. of Chosun Univ. 3, 365 (1972)
3) Hamilton P.B.; Anal. Chem., 35, 2055 (1963)
4) Piez K.A. and L. Morris; Anal. Chem., 1 (1960)
5) Gehrke, C.W. Kenneth Kuo and Robert Wo Zuwalt; J of Chromato 557, 209 (1971)
6) McBride, W.J. J.R. and J.D. Klingman; Lect. Gas Chromato., 2, 1 (1968)
7) Lee S.W.; J. Korean Agricultural Chem. Soc., 14, 1 (1971)
8) Awpara, T.; J. Biol. Chem., 178, 113(1949)
9) 久保利夫; コンフリー, 3, 52 (1968)
10) Yoo Y.J., T.Y. Kim. and T.J. Kim; J. of Korean Chem. Soc., 21, 2 (1977)