

在來種갓의 Anthocyanin 色素에 관한 研究

〔第一報〕 Anthocyanin 의 構造推定

朴 根 亨

全南大學校 農科大學 食品加工學科

(1978년 11월 20일 수리)

Studies on the Anthocyanins in *Brassica juncea*

Part I. Identification of Anthocyanins

Kun-Hyung Park

Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture,

Chonnam National University, Kwang-ju

(Received Nov. 20, 1978)

Summary

The Anthocyanins in the Korean native *Brassica juncea*, which were favorably used directly for food or as condiments, were investigated.

Two kinds of anthocyanin were separated from Korean native *Brassica juncea* by T.L chromatography and then Robinson test, spectrophotometry, T.L. chromatography, partial hydrolysis were tested for the structural elucidation of these two anthocyanins.

It was known that two pigments were peonidin-3-glucoside and peonidin-3-galactoside.

I 緒 言

自然界에 존재하는 植物의 꽃이나 菜蔬 果實等의 多樣하고 아름다운 色은 예로부터 人間의 食慾增進에 貢獻하여 왔다. 特히 赤色 青色 紫色等을 나타내는 植物色素의 主成分을 이루며 細胞液에 있는 花靑素라고 불리워지는 anthocyanin 色素에 對해서는 많은 研究가 이루어 졌다.

즉 anthocyanin 色素의 形成은 遺傳的인 素質에 따라서 지배되는 同時에 環境에 따라서도 뚜렷하게 영향을 받는다고 하였다.

窒素나 Mg 의 缺乏에 依해서 anthocyanin 色素의 形成이 促進된다고 Delvin⁵⁾ 과 Meyer等¹⁷⁾ 이 報告하였으며 또 日光을 많이 받은 面에 그리고 植物體內的 水分이 不足하거나 傷處를 입혔을 때 그리고 組織內에 糖類가 滯積하게 되면 anthocyanin 色素의 形成이 促進된다는 Meyer等¹⁷⁾ 과

Leopold等¹⁵⁾의 報告도 있다.

Anthocyanin 色素의 分類와 分布 그리고 色調와 그 化學的인 構造에 關한 研究는 1913年 Wilstätter 에 依해 anthocyanin 이 結晶化되었고 1914年 Everest 에 依해 그 構造가 알려진 이후 많은 研究가 이루어 졌으며 中林¹⁸⁾은 꽃 일 열매 등의 色은 千差萬別하나 이들로부터 얻어지는 anthocyanin 의 種類는 限定이 되어 있으며 植物體內的 條件에 依해 多樣한 anthocyanin 의 色調가 보인다고 하였다. 色調의 變異¹³⁾에 對한 最初의 說明은 Wilstätter 의 pH에 따라 色調가 變한다고 하는 pH說을 報告하였으나 alkali 側에서 靑色을 띠지않는 anthocyanin 은 說明할 수 없었으며 Shibada等¹³⁾은 細胞液中에서 金屬鹽類와 錯鹽生成에 依한다는說을 報告하였으며 Robinson¹³⁾은 anthocyanin 과 다른 有機成分 즉 tannin, flavon 等の copigment 와 分子化合物을 만들어

色調의 變異를 보인다는 copigment 說을 報告하였다. Hayashi¹²⁾는 問題가 되는 靑色의 anthocyanin을 露草의 靑色花로부터 얻어진 針狀의 結晶에서 chlorophyll 모양의 Mg을 中心元素로 하는 錯色을 形成하여 安定한 靑色을 얻었다고 報告하였으며 Bayer¹³⁾는 수레菊花的 靑色花로부터 cyanin이 Fe, Al과 錯化合物을 이룬다고 報告하였다.

構造推定은 Bate-Smith³⁾에 依하여 anthocyanin의 分離에 paper chromatography가 利用된 후 Abe等¹⁾의 paper chromatography에 依한 部分加水分解에 依하여 結合糖의 數와 aglycone과의 結合形態를 간단히 確認하게 되었으며 Harbone⁶⁾에 依해서 anthocyanin의 構造와 結合糖의 種類에 따라 分光學的인 特徵이 있음이 報告된 후 Francis,⁷⁾ Somer,²²⁾ Flueki等⁸⁾, Philip²⁰⁾等에 依해서 anthocyanin과 anthocyanidin의 分光學的인 研究가 계속되어 構造確認을 더욱 容易하게 되었다.

本研究에서 試料로 使用한 在來種가 (*Brassica juncea*)은 겨자과에 屬하며 잎과 줄기를 食用으로 하는 두해살이 植物로써 우리나라에서는 菜蔬 또는 調味品으로 널리 利用되고 있으며 이 갓에서 우리나라의 赤紫色 色素는 性狀으로 보아 色素로 推定되나 아직 이에 關한 報文이 없어 이의 究明을 위한 研究에서 若干의 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

光州地方에서 栽培되고 있는 갓은 特別한 品種區別없이 自家採種에 依하여 栽培되고 있는 在來種으로 五月에 發育과 着色이 좋은 것으로 直接 產地에서 採取하여 食用部인 잎과 줄기를 試料로 使用하였다.

2. 色素의 抽出

新鮮한 갓 100g을 Hayashi¹²⁾의 方法으로 500 ml의 冷 1% methanol性 HCl로 24hr 동안 暗所에서 冷抽出하여 여과하고 40°C에서 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 色素의 分離에 使用하였다.

3. 色素의 分離

1) Thin layer의 調製

Wako gel (silicagel에 5% $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 포함)를 使用하여 300 μm 의 두께로 5×20, 20×20

cm의 plate를 만들어 110°C²⁴⁾에서 30分間 乾燥 活性시켰다.

2) 展開溶媒

갓의 anthocyanin 色素의 分離를 위해 Table 1과 같은 溶媒系로 一次的으로 5×20cm의 plate를 使用하여 上昇展開시키고 이어서 여러 溶媒系를 組合하여 二次元展開를 하여 anthocyanin 色素의 完全한 分離를 꾀하였다.

Table 1. Solvent systems for T.L. chromatography

Solvent	Composition	Ratio (v/v)	Layer used
I	n-Butanol-2NHCl ¹¹⁾	1 : 1	org. layer
II	n-Butanol-Acetic acid Water ⁴⁾	4 : 1 : 5	org. layer
III	Formic acid-Conc. HCl-Water ¹¹⁾	5 : 2 : 3	miscible
IV	Isoamylalcohol-Conc. HCl-Water ¹⁾	21 : 5 : 4	org. layer
V	Isopropylalcohol-10% HCl ¹⁹⁾	1 : 1	org. layer
VI	Acetone-10%HCl ¹⁹⁾	1 : 1	miscible
VII	Acetic acid-Conc. HCl-Water ¹⁾		miscible
VIII	n-Butanol-Conc. HCl- Water ¹⁾	7 : 2 : 5	org. layer
IX	Acetic acid-Conc. HCl-Water ¹⁹⁾	5 : 1 : 5	miscible

3) 分離된 anthocyanin의 吸收 spectra

分離된 갓의 anthocyanin을 1% HCl로 溶出하여 Shimadzu製 MPS-5000 Spectrophotometer로 V.L.領域에서 吸收 spectra를 만들었다.

4. 部分加水分解

T.L.上에 分離된 anthocyanin p-1과 p-2를 Abe等¹⁾의 方法으로 冷 1% methanol性 HCl로 溶出하여 여과하고 同量의 20% HCl을 加하여 70°C water bath에서 120分間 加溫하면서 두께 300 μm , 20×20cm의 silicagel T.L.에 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120分의 간격으로 spotting하여 溶媒系 VIII을 展開溶媒로하여 上昇展開하여 glycoside의 結合形式을 推定하였다.

5. Anthocyanin의 Aglycone成分과 糖成分의 分離

分離된 각각의 anthocyanin을 Robinson¹⁹⁾과 Albach等²⁾의 方法으로 Fig. 1과 같이 각각의 glycoside를 aglycone과 糖成分으로 分離하여

aglycone 과 糖의 定性用 試料로 하였다.

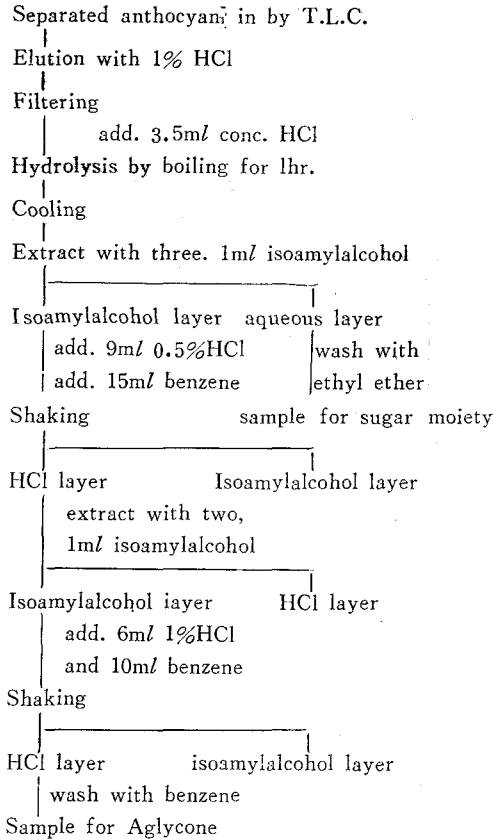


Fig. 1. Preparation of aglycone and sugar moiety in each anthocyanin

6. Anthocyanidin의 推定

1) Robinson 試驗¹⁹⁾에 의한 定性

i) Cyanidin 試藥 : cyclohexanol 1部와 toluene 5部の 混液을 aglycone의 酸性溶液에 等量 加하고 진탕하여 色素의 轉溶을 본다.

ii) 酸化試驗 : aglycone의 酸性溶液에 通氣시키면서 半量의 10% NaOH를 加하고 즉시 濃 HCl을 加하여 酸性으로 하여 加熱하고 冷却한 후 isoamyl alcohol을 加하고 진탕하여 色의 復元여부를 본다.

iii) aglycone의 酸性溶液에서의 色을 본다.

iv) FeCl₃를 加하여 呈色을 본다.

v) isoamylalcohol-CH₃COONa 試藥: aglycone의 isoamylalcohol層에 CH₃COONa溶液을 加하고 진탕하여 呈色을 본다.

2) Anthocyanidin의 T.L.Chromatography

分離된 anthocyanin을 加水分解하여 isoamyla-

lcohol로 抽出한 aglycone을 300 μ m 두께의 5 \times 20cm의 silicagel T.L.을 使用하여 溶媒系 I, V, K로 上昇展開하여 Rf-值를 測定하여 比較하였다

3) Anthocyanidin의 吸收 Spectra

分離된 各各의 anthocyanidin을 1% methanol性 HCl⁸⁾, 1% HCl, 0.1% methanol性 HCl^{8,23)}, 0.1% ethanol性 HCl^{8,23)} 등의 溶媒로 V.L.領域에서 吸收極大를 測定하여 anthocyanidin의 定性에 利用하였다.

7. 糖의 確認

얻어진 各各의 anthocyanin의 糖成分과 既知糖(glucose, galactose, arabinose, xylose, fructose, rhamnose)를 10%의 isopropylalcohol에 1%의 糖溶液으로 만들)을 두께 500 μ m의 20 \times 20cm silicagel plate에 spotting 하여

溶媒 A : n-BuOH-Pyridine-Water⁶⁾ (6 : 3 : 1 v/v)

溶媒 B : isopropylalcohol-Water⁹⁾ (4 : 1 v/v) 등의 溶媒系로 上昇展開후 發色試藥으로 anilindiphenyl amine⁹⁾을 분무하여 100°C oven에서 加熱 發色시켰다.

III 結果 및 考察

1. 色素 및 分離

溶媒系 I, II, IV에 의한 一次元展開를 한 結果는 Fig. 2와 같이 二種의 色素로 分離가 되었으나 溶媒 III, V, VI에 의해서는 分離가 分明하지 못했다. 이어서 溶媒 I을 一次元展開溶媒로 하고 二次元展開溶媒로 II, III, IV, V, VI을 組合하여 二次

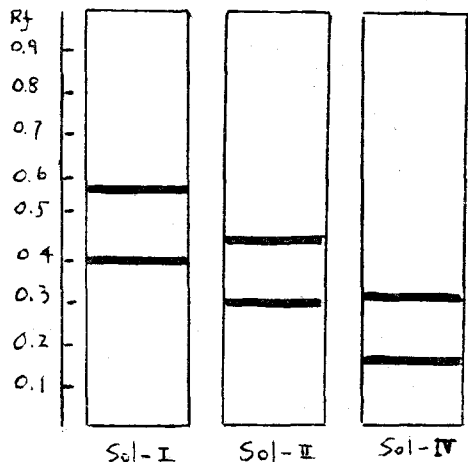


Fig. 2. T.L. Chromatograms of anthocyanins in *Brassica juncea*

元展開를 行하여 分離가 가장 良好한 chromatogram은 Fig. 3과 같다. Fig. 2와 Fig. 3의 chromatogram의 結果로 보아 該에서는 二種의 anthocyanin이 存在하고 있으며 높은 Rf-值順으로 p-1, p-2라고 記號를 붙였다.

2. 分離된 Anthocyanin의 吸收 Spectra

分離된 anthocyanin p-1, p-2를 1% HCl로 溶出하여 scanning한 吸收 spectra는 Fig. 4와 같다. 吸收極大는 p-1은 535nm이며 p-2는 530nm이었는데 이것은 anthocyanin의 酸性溶液에서 500~570nm에서 吸收極大가 存在¹⁹⁾한다는 것과 잘 一致하며 또 T.L.chromatogram과 吸收 spectra로 보아 該에는 二種의 anthocyanin이 混雜되어 있음이 確認되었다.

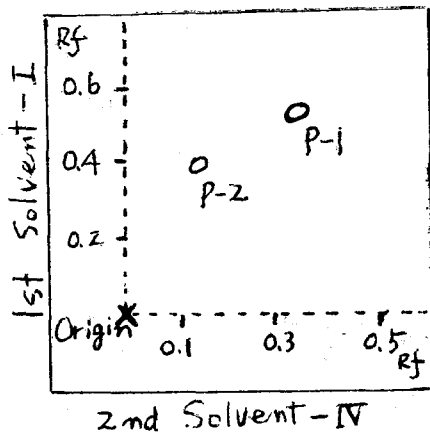


Fig. 3. Two dimensional T.L. chromatogram of anthocyanins in *Brassica juncea*

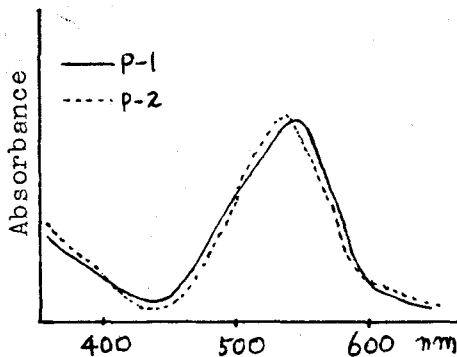


Fig. 4. Absorption spectra of anthocyanins in *Brssica juncea*, in 1% HCl solution

3. Glycoside의 結合形式의 判定

p-1, p-2의 anthocyanin을 70°C의 water bath에서 加水分解시키면서 一定한 間격으로 얻어

진 部分分解物을 spotting하여 溶媒VIII로 展開한 結果는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 chromatogram의 數가 p-1, p-2 共히 2個로 나타난 것으로 보아 모두 monoglucoside임을 알 수 있다.

4. Anthocyanidin의 推定

각 anthocyanidin의 酸性溶液에 對한 Robinson 試驗에 依한 定性反應의 結果는 Table 2와 같다.

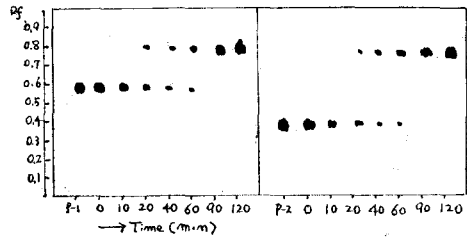


Fig. 5. T.L. Chromatograms of products of partial hydrolysis

Table 2. Qualitative responses of anthocyanidins by Robinson Test.

Test	P-1	P-2
Cyanidin reagent	elution (light red)	elution (light red)
Oxidation test	regeneration	regeneration
Ferric chloride	purplish red	purplish red
Isoamylalcohol sodium acetate	purplish red	purplish red
Acid solution	purplish red	purplish red

Robinson 試驗에 對한 定性反應의 結果로 보아 p-1과 p-2의 anthocyanidin은 同一하며 delphinidin, petunidin, malvidin보다 pelargonidin과 cyanidin에 屬하며 cyanidin보다는 pelargonidin系 즉 pelargonidin 아니면 peonidin으로 推定된다. 이것을 確認하기 위하여 isoamylalcohol로 推定한 각각의 anthocyanidins을 여러 展開溶媒에 依해 T.L.C. 조작을 하여 測定된 Rf-值는 Table 3과 같다.

Table 3. Rf-value of anthocyanidins

Anthocyanidin	Development solvents			
	I	V	VI	VIII
p-1	0.78	0.60	0.64	0.67
p-2	0.78	0.60	0.64	0.67

이 結果로 보아 p-1과 p-2의 anthocyanidin은 同一한 aglycone이 確實하며 paper chromatography에 依해서 Abe等¹⁹⁾이 同一한 展開溶媒로 上昇展開시켜서 얻은 Rf-値와 비교하면 가장 높은 Rf-値를 보인 溶媒 I로 展開한 pelargonidin (0.80)과 peonidin (0.72)의 Rf-値와는 상당히 類似하나 더 낮은 Rf-値를 나타낸 溶媒 V, M, VIII group은 paper 쪽 보다 더 높은 Rf-値를 보였다. 이것은 물론 paper와 T.L.의 差異에도 있겠지만 chromatography의 條件의 差에도 그 원인이 있을 것이다.

따라서 Rf-値에 依한 anthocyanidin의 推定은 不可能하였지만 적어도 p-1과 p-2의 anthocyanidin은 同一함은 再確認되었다.

Rboinson 試驗에 依한 定性反應과 T.L.C.에 依한 Rf-値測定에 이어 p-1, p-2의 anthocyanidin을 여러 溶媒로 溶出하여 V.L.領域에서의 吸收 spectra에서 測定된 吸收極大는 Table 4와 같다.

Table 4. Absorption max λ nm in each anthocyanidin

Solvent	Anthocyanidin	
	p-1	p-2
1% HCl	515	515
0.1% HCl in MeOH	536	536
0.1% HCl in EtOH	545	545

Shou²²⁾는 0.1% HCl-EtOH의 溶媒에서 pelargonidin은 504.5nm, peonidin은 511nm에서 吸收極大가 存在한다고 報告하였으며 Merck Index¹⁶⁾에 依하면 0.01% HCl-EtOH에서 pelargonidin은 530nm에서 吸收極大가 있다고 收錄하였으며 Sakamura等²¹⁾은 0.1N HCl-EtOH (15:85)에서 peonidin은 532nm에서 吸收極大가 있으며 Somers²³⁾는 peonidin은 0.1% HCl-MeOH의 溶媒에서는 536nm에서 그리고 0.1% HCl-EtOH에서는 546nm에서 吸收極大가 存在한다고 報告하였다.

Table 4에서 보는바와 같이 p-1, p-2의 각 anthocyanidin의 吸收極大는 Shou等の 報告와는 差異가 있으나 Somers의 測定値와는 거의 一致하였다. 또 p-1, p-2의 anthocyanidin의 吸收極大가 또한 一致하므로 p-1과 p-2의 anthocyanidin이 同一함이 再參 確認되었으며 이들의 結果로 보아 p-1과 p-2의 anthocyanidin은 peonidin으로 推定하였다.

5. 糖의 確認

完全히 酸加水分解하여 얻어진 糖成分을 既知 糖과 함께 T.L.C.에 依한 結果는 Table 5와 같다. Table 5의 結果로 보아 p-1의 糖은 glucose, p-2의 糖은 galactose임을 알 수 있었다.

Table 5. T.L. Chromatographic investigation of sugar moiety.

Sugar	Rg-value	
	Solvent-A	Solvent-B
p-1 Sugar	100	100
p-2 Sugar	72	96
Glucose	100	100
Arabinose	122	110
Xylose	145	115
Rhamnose	210	120
Fructose	116	110
Galactose	72	96

分離된 p-1, p-2의 anthocyanin의 V.L.領域에서의 吸收極大는 Table 6과 같다.

Table 6. Absorption max λ nm in each anthocyanin

Solvent	Anthocyanin	
	p-1	p-2
1% HCl	535	530
0.1% HCl in MeOH	536.5	534
0.1% HCl in EtOH	538	536
1% HCl in MeOH	537	535
0.1N HCl-EtOH (15:85)	537	533

Sakamura等²¹⁾과 Zapsalis等²⁵⁾은 0.1N HCl-EtOH (15:85)의 溶媒에서 peonidin-3-galactoside의 吸收極大가 532nm라고 報告하였으며 philip²⁰⁾은 0.1% HCl-MeOH에서 peonidin-3-glucoside의 吸收極大가 524nm라고 報告하였으며 Fuleki等⁸⁾은 0.1% HCl-MeOH에서 peonidin-3-glucoside의 吸收極大는 536nm 이었다고 引用報告하였다.

本實驗에서 使用한 1% HCl이나 1% HCl-MeOH 등의 溶媒에서 測定한 報告는 없었으나 0.1% HCl-MeOH 溶媒에서 測定된 p-1의 anthocyanin의 吸收極大는 Philip의 報告와는 差異가 있으나 Fuleki 등이 報告한 536nm와는 거의 一致하였다.

또 p-2의 anthocyanin 은 0.1N HCl-EtOH (15 : 85) 용매에서測定된 吸收極大는 Sakamura 와 Zapsalis 등이 同一한 용매에서測定한 peonidin-3-galactoside 의 吸收極大와 거의一致하였다.

따라서 p-1의 glycoside 는 peonidin-3-glucoside 이며 p-2는 peonidin-3-galactoside 임이 確認되었다.

V. 要 約

우리나라에서 菜蔬로 또 調味品으로 많이 利用되고 있는 在來種의 anthocyanin 色素의 究明을 爲한 實驗에서 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. T.L.C.에 依해 二種의 anthocyanin 을 分離하였다.

2. 이들 anthocyanin 의 構造究明을 爲하여 Robinson 試驗, Spectrophotometry, T.L. chromatography, 部分加水分解等의 方法으로 각각 peonidin-3-glucoside 와 peonidin-3-galactoside 임을 確認하였다.

參考文獻

- 1) Abe, Y. and Hayashi, K.: Bot. Mag. Tokyo, **69**, 822, 577 (1956)
- 2) Ablach, R.F., Kepner, R.E. and Webb, A. D.: Food Sci. **30**, 69 (1965)
- 3) Bate-Smith, E.C.: Nature **161**, 835 (1948)
- 4) Bate-Smith, E. C.: Biochem. Soc. Symposia Cambridge, Engl. **3**, 62 (1950)
- 5) Delvin, R.: Plant physiology 3rd edition, p.354 (Van Nostrand, New York, 1975)
- 6) Endo, T.: Botan. Mag. **72**, 10 (1959)
- 7) Francis, F.J.: Proc. Am. Soc. Hort. Sci. **99**, 296(1957)
- 8) Fuleki, T. and Francis, F.J.: Food Sci. **33**, 72 (1968)
- 9) 韓國生化學會: 實驗生化學(探求堂, 서울) p. 24 (1974)
- 10) Harbone, J.B.: Biochem. J. **70**, 22 (1958)
- 11) Harbone, J. B.: J. Chromatog. **1**, 473 (1958)
- 12) Hayashi, K. and Abe, Y.: Bot. Mag. Rokyō, **68**, 801, 71 (1955)
- 13) Hayashi, K.: Bot. mag. Tokyo, **24**, 4 (1963)
- 14) Hwang, I.K. and Ahn, S.Y.: J. Korean Agri. Chem. Soc. **18**, 4, 183 (1975)
- 15) Leopold, A.C. and Kriedmann, P.E.: Plant growth and development, 2nd edition, p.328 (McGraw-Hill, New York, 1975)
- 16) Merck Index, 9th edition, p.916 (1976)
- 17) Meyer, B., Anderson, D., Bohning, R. and Eratianne, D.: Introduction to plant physiology, 2nd edition, p.282 (Van Nostrand, New York, 1975)
- 18) 中林敏郎: 食品の變色とその化學(光琳書院, 東京, 日本) p.40 (1967)
- 19) 中林敏郎: 食品の變色とその化學(光琳書院, 東京, 日本) p.47 (1967)
- 20) Philip, T.: J. Food Sci. **39**, 449 (1974)
- 21) Sakamura, S. and Francis, F.J.: J. Food Sci. **26**, 318 (1961)
- 22) Shou, S.A.: Helv. Chim. Acta **10**, 907(1927)
- 23) Somers, T.C., J. Sci. Food Agric. **17**, 215 (1966)
- 24) Sthl, E.: Thin-layer chromatography, 2nd edition, p.60 (George Allen & Unwin Ltd., London, 1973)
- 25) Zapsalis, C. and Francis, F. J.: J. Food Sci. **30**, 396 (1965)