

Panax屬의 果皮 Anthocyanin 色素

第一報. 主色素의 同定

朴 貴 姬 · 朴 薰
高麗人蔘研究所
(1980년 12월 15일 수리)

Studies on the Anthocyanin Pigments in Fruits of *Panax* Species Part I. Identification of major Pigment

Qwihee Park-Lee and Hoon Park
Korea Ginseng Research Institute, Seoul, Korea

Abstract

The anthocyanin pigments in the fruit skin of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* were extracted with 1% HCl/propanol. The pigments were purified by preparative thin layer and paper chromatography. The major bands in the 2 varieties were identified as pelargonidin-3-monoglucoside by chromatographic, spectrophotometric and high performance liquid chromatographic methods. The possibility of the anthocyanin acylation was not studied in this report. One of minor red band found in the *Panax ginseng* (not identified) was missing in the *Panax quinquefolius*.

緒 言

植物黃色系の flavonoids는 脂溶性 carotenes와 구별되어 cell sap에 녹아 있는 반면 carotenes는 plastids에 존재한다.

고려 인삼 *Panax ginseng*의 대표적 品種은 紫莖種과 黃熟種으로 大別된다. 자경종은 줄기가 紫色을 띄우며 果實은 赤色이고 황숙종 줄기는 葉綠素의 綠色빛갈이며 果實은 黃色을 띄운다. 자경종 줄기의 紫色의 정도는 個體마다 다르며 이는 황숙종과의 自然交雜에 의한 결과로 보고되고 있다.⁸⁾ 靑莖種은 희귀하며 줄기의 색깔이 黃熟種과 유사하나 果實은 紫莖種과 같은 赤色이다. 인삼의 Anthocyanins 色素에 대해서는 지금까지 알려진바가 없다.

實驗材料 및 方法

實驗資料 및 色素의 分離

Panax ginseng C.A Meyer (var. atropurpureo, 紫莖種)과 *Panax quinquefolius*의 성숙한 果實을 고려인삼연구소 증평시험장에서 채취하여 赤色果皮를 벗겨서 1% HCl/propanol 용액에 넣고 暗상태 2°C에서 24시간 이상을 抽出한후 silica gel(M. Woelm·Fschwege·Germany) thin layer chromatography로 色素를 分離하였다. silica gel plate는 약 1.5mm 두께의 silica gel layer로 만들어 농축된 액소를 분리하기에 편리하도록 만들었다⁷⁾. silica gel plate에 色素를 streaking 方法으로 올려서 용매 n-butanol : 2NHCl(1 : 1, 上層)을 사용하여 용매의 첨단이 적당한 거리에 도달할때까지 전개시켰다. 이때 chromatogram의 Band 3 (Fig. 2 참조)을 stainless steel 칼로 긁어내어 이를 0.1% HCl/methanol 또는 0.01% HCl/ethanol로 녹이고 원심분리기로 상층을 분리하여 분석용으로 사용하였다.

Anthocyanin의 同定

Paper chromatography

Thin layer에서 분리되고 抽出된 色素를 whatman paper No.1에 올려서 전개용매 n-butanol: acetic acid: water (6:1:2, v/v), n-butanol: 2N HCl(1:1, 上層)을 사용하여 Rf치를 구하였다¹⁾.

Table 1. Rf values for Anthocyanins in fruits of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*.

	a	b
<i>Panax ginseng</i>		
Band 3	0.34	0.44
<i>Panax quinquefolius</i>		
Band 3	0.36	0.47

Solvents: a. n-butanol: acetic acid: water(4:1:5, top layer), b. n-butanol: 2NHCl(1:1, top layer)

Lead acetate 침전반응

1% HCl/propanol로 추출된 적색색소에 neutral lead acetate를 넣고 침전상태를 관찰하였다⁴⁾.

Spectrophotometric method.

Shimadzu UV-200S double beam spectrophotometer를 사용하여 Thin layer에서 분리된 색소를 scanning하였으며 5% AlCl₃를 사용하여 최대 흡광도 파장의 이동을 관찰하였다^{1,4,5,9)}.

配糖體의 同定

Thin layer로 분리된 Band 3에 해당하는 색소를 0.1% methanol로 추출하고 여기에 同량의 20% HCl을 가해서 80°C의 수조에서 1시간 동안 가수분해 시켰다^{9,10)}. 이 加水分解液을 감압 건조시킨 후 증류수에 다시 녹이고 aglycone은 isoamylalcohol로 제거하였다. Aglycone이 제거된 나머지 수용액은 감압 농축시키고 이를 whatman No.1 paper에 spot하여 전개용매 n-butanol: ethanol: H₂O(40:11:19, v/v), phenol: water(73:27, w/w)로 糖 표준품과 함께 전개시켰으며 전개후 풍건하였다. 여기에 aniline hydrogen phthalate (0.93g aniline과 1.66g phthalic acid를 水泡化시킨 n-butanol 100ml에 녹임)을 분무하여 105°C에서 10분간 가열 발색시켰다^{4,5,9)}. 또 일부의 용액은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)로 糖을 同定하였는데 그 조

Table 2. Rg values and color with anilin hydrogen phthalate of sugars from acid hydrolysis of anthocyanins in fruits of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*.

	a	b	Color
<i>Panax ginseng</i>			
Band 3	0.98	0.99	brown
<i>Panax quinquefolius</i>			
Band 3	1.01	0.99	brown
Authentic sugars:			
Glucose	1.00	1.00	brown
Galactose	0.91	1.10	brown
Rhamnose	1.63	1.58	brown

Solvent: a. n-butanol: acetic acid: water(6:1:2v/v), b. phenol: water(73:27w/w)

건은 다음과 같다. Waters Associate Model 244, column은 μ bandapak carbohydrate analysis (3.9mm ID×30cm), 檢出器는 differential refractometer R401을 使用하였다. Solvent system은 mobile phase溶媒로 acetonitrile/H₂O (85:15), flow rate, 3.0ml/min. 감도는 8X로 하였다³⁾. 사용한 시약은 HPLC grade였다.

結果 및 考察

TLC에 의한 色素의 分離.

Anthocyanin이 HCl과 같은 mineral acid를 함유한 용매에 녹아 있을 때는 paper chromatography로 이를 정제할 경우 arabinose가 filter paper에서 생기는 결합이 있으므로⁴⁾ thin layer에서는 이런결합을 없애고 농축된 색소를 분리할 수가 있었다. Fig. 1과 Fig. 2는 TLC에 의해 분리된 5 赤色色素 band를 나타낸다. *Panax ginseng*의 경우 主色素(Band 3)의 Rf치는 0.62이고 第二色素(Band 4)의 Rf치는 0.53이었다. 3개의 trace band의 Rf치는 0.86, 0.75, 0.25 등의 극히 미량의 색소 band로 나타났다. *Panax quinquefolius*(미국종) 경우는 主色素(Band 3)의 Rf치가 *Panax ginseng*과 同一하였으나 *Panax ginseng*의 Band 4에 해당하는 색소가 없었다. flavonoids계의 色素形成이 환경뿐아니라 유전적 소질에 의해서 지배된다는 사실은 잘 알려져있으며 위의 두 품종의 색소 분석결과도 이를 뒷받침 해

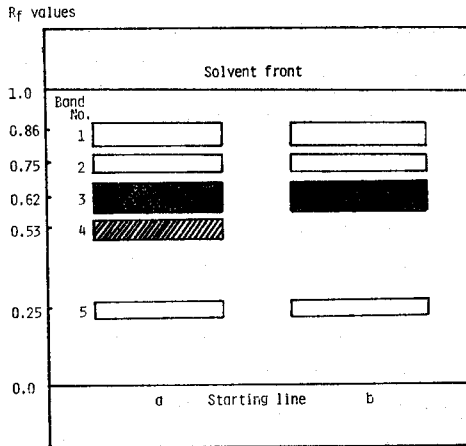


Fig. 1. Schematic diagram of thin layer chromatogram of anthocyanins from fruits of *Panax ginseng*(a) and *Panax quinquefolius*(b).

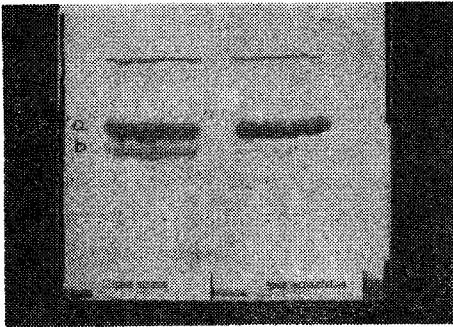


Fig. 2. Thin layer chromatogram of anthocyanins from fruits of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*.(a. Band 3, b. Band 4-Refer Fig. 1).

주요 있다. 또 여기서 언급해야 할것은 황숙종 (yellow berry variety, or var. xanthocarpus)의 과피색소에 관한 것이다. 황숙종의 과실은 투명한 無色の 과피를 통해서 黄色의 果肉이 비쳐서 黄色果實로 보인다. Carotenes계 색소가 세포 속에 존재하면, 黄色, 레몬색, 귤감색, 주황색 등 여러가지의 색으로 발현될수가 있지만, anthocyanin색소를 비롯한 flavonoids계통의 색소가 존재하면, 그 자체의 색깔을 유지하는 것으로 알려져 있다. 황숙종은 가을 단풍이 들때도 赤色계통은 전혀 보이지 않는다. 이로 미루어 보아서 황숙종에는 赤色, 靑色 또는 紫色系의 anthocyanins는 없는 것으로 간주되나 黄色系의 flavonoids계통 색소에 대해서는 더욱 더 검토가 되어야 할것이다.

Lead acetate 침전반응

1% HCl/propanol로 추출된 색소에 과잉의

neutral lead acetate를 加하여도 lead salt침전이 극히 일부만 생기었으며 남은 용액은 pelargonidin glucoside의 scarlet red색갈이었다. 이는 Halevy의 보고와 一致한다⁴⁾.

Spectrophotometric method

Thin layer로 분리된 색소층을 paper chromatography로 다른색소의 유무를 다시 확인한 후 (Table 1), 0.1% HCl/methanol 또는 0.01% HCl/ethanol 용매를 사용하여 Scan한 결과를 Fig. 4에 표시하였다. 主色素(Band 3) spectra는 *Panax ginseng*과 *Panax quinquefolius*와 同一한 양상을 나타내었으며 최대 흡광 파장 max은 *Panax ginseng*의 경우 0.01% HCl/methanol에서 518nm, 0.1% HCl/methanol에서 508nm였다 (Table 3).

Table 3. Wavelengths of maximum absorption for anthocyanins from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*.

	λ_{max}		
	0.1% HCl in MeOH	0.01% HCl in EtOH	E_{440}/E_{max} (%)
<i>Panax ginseng</i>			
Band 3	508	518	38
<i>Panax quinquefolius</i>			
Band 3	508	517	38
Authentic anthocyanins (Reported)			
Pelargonidin-3-glucoside	506	518	38

이것은 *Panax quinquefolius*의 主色素와 同一한 것이었고 다른 흡수파장 491nm, 330nm, 270nm의 peak도 *Panax ginseng*과 同一하였다. 이것은 문헌상에 나타난 pelargonidin계 糖類 配糖體 - 특히 3-rhamnoside 또는 3-glucoside 계통과 일치한다^{1,4)}. 糖類 paper chromatography에서 (Table 2) 이미 당의 종류가 glucose임이 확인되었으므로 rhamnose의 가능성은 제거되었다. anthocyanin의 흡수 spectra에 있어서 3,5-diglucoside는 E_{440}/E_{max} 가 15이며 5-glucoside는 21로 보고된 바가 있다^{1,9)}. Fig. 4에 있는 2 spectra에서 E_{440}/E_{max} 를 계산하면 각각 약 38이 된다 (Table 3). 이 같은 문헌에 보고된 callistephiu(3-glucoside)와 일치한다¹⁾. 이 配糖體 glucose는 산가수 분해액을 HPLC로 분석하여 재 확인하였다 (Fig. 3). Fig. 3에 나타난 peak 1의 성분은 동정되지

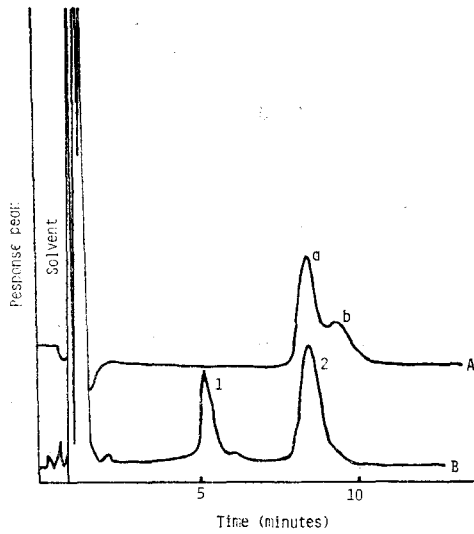


Fig. 3. Separation of sugars by HPLC,
A : Authentic sugars. a. glucose, b. galactose.
B : Acid hydrolysates of Anthocyanins from *Panax ginseng* fruit. 1. unknown, 2. glucose.

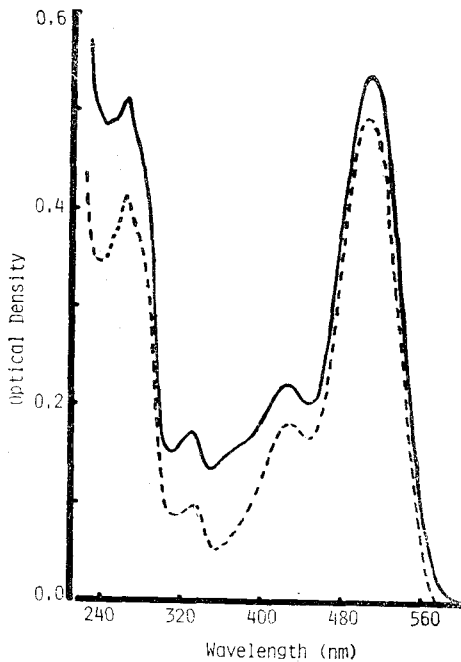


Fig. 4. Absorption spectra of pelargonidin-3-glucoside dissolved in 0.1% HCl/Methanol, purified from fruit skin.
— *Panax ginseng* (var. atropurpreacaulo)
..... *Panax quinquefolius*

아니하였다. 5% $AlCl_3$ 용액을 가한 색소의 spectra 분석에서 최대흡광파장에 변화를 볼수가 없었으며, 분리된 색소는 육안으로는 Scarlet red이나 UV下에서 orange red로서 문헌상의 pelargonidin 계의 색소와 일치하였다¹¹. 이상의 자료들은 종합하여 볼때 Band 3 색소는 pelargonidin-3-monoglucoside로 확인되었으나 UV range에서 흡광도가 크므로 acylation의 가능성이 있으나 이는 확인되지 않았다.

要 約

*Panax ginseng*의果皮 anthocyanins 색소를 1% HCl/propanol로 추출하여 thin layer chromatography로 분리하였으며 이를 다시 paper chromatography로 검정하였다. 침전반응, spectral analysis 등의 방법으로 주색소가 pelargonidin-3-monoglucoside임을 확인하였다. *Panax quinquefolius*의 색소도 같은 방법으로 동정하였으며 주색소가 pelargonidin-3-monoglucoside임이 확인되었으며 *Panax ginseng*에 있는 5색소 Band중에서 第二色素(Band 4)가 결여되어 있었다.

참고문헌

1. Arditti, J. and A. Dunn: Experimental Plant Physiology p.138. (1968)
2. Buttery, B.R. and R.L.: Buzzell, Crop Sci. 13, 108. (1973)
3. Conrad, E.C. and J.K. Palmer: Food Tech. (October) p.84. (1976)
4. Halevy, A.H. and Asen, S: Pl. Phys. 34 : 494. (1959)
5. Park, K.H: J. Korean Agri. Chem. Soc. 22(1) : 33. (1979)
6. Philip, T: J. Food Sci. 39 : 449. (1974)
7. Sthal, E.(1973): Thin layer chromatography 2nd ed. George Allen & Unwin Ltd., London, 1973.
8. Takahasi, N. and Osumi T: Jap. Jour. Genet. 16 : 273. (1940)
9. Yoon, T.H., Lee, S.J. and Kim, K.S: Korean J. Food Sci. Technol. 10(2) : 194. (1978)
10. 中林敏郎, 木村 進, 加藤博通 : (1967) 食品의 變色とその化學 p.34
11. 桃谷好英, 寺村 貞 : 化學と生物 9(12), p. 767. (1971)