

## 천연인디고 색소의 구조분석

정인모\* · 이광길 · 성규병 · 김현복 · 남성희 · 홍인표  
농촌진흥청 농업과학기술원 농업생물부

### Structural Analysis of Natural Indigo Colorants Extracted from *Polygonum tinctorium*

In Mo Chung\*, Kwang Gill Lee, Gyou-Byung Sung, Hyun-Bok Kim, Sung-Hee Nam and In-Pyo Hong

Dept. of Agricultural Biology, The National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA. 441-100 Suwon Korea

#### ABSTRACT

Natural indigo colorants were prepared by extraction of *Polygonum tinctorium* which was harvested just in the blooming season (in the late of July). The components were analyzed by TLC and HPLC, and its structures were analyzed by FT-IR, EI-mass. The results obtained are summarized as follows; The natural indigo powder was dissolved in DMSO and developed in eluent,  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$  (8.5 : 1.5 v/v) by means of TLC for its quality analysis. It was segregated into indirubin as a red colour and indigo as a blue colour. In case of HPLC analysis, FT-IR spectrum of indirubin showed a peak for NH residue between 3200 and 3300  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  spectrum for indigo displayed AA'BB' spin system caused by indole structure between 6.5 and 7.7 ppm of H4, 5, 6 and 7, and -NH proton for indirubin showed a singlet between 10.88 and 11.0 ppm. EI-mass spectrum of indigo and indirubin both disclosed their molecular size as 262 and it implies that these two substances are isomer.

**Key words :** Indirubin, TLC, HPLC, Isomer

#### 서 론

본 연구에 사용한 쪽풀은 여뀌과에 속하는 *Polygonum tinctoria*로서 1년생 초본으로 초장은 60~100 cm 내외이며, 쪽풀 생잎 중에는 색소성분인 indigo 는 함유되어 있지 않고, indigo로 변화될 수 있는 물질인 indican이 존재하며, 이것은 glucose 화합물로서 수용액 중에서 가수분해되면 glucose 와 무색의 indoxyl의 두성분으로 분리된다. 이 indoxyl 상태로 섬유와 결합된 후 공기 중의 산소에 의하여 indigo로 변화된다고 알려져 있다(Minagawa *et al.* 1980).

Epstein *et al.*(1967)의 연구논문에 의하면 대칭에는 indigo의 전구체인  $\beta$ -D-glucoside가 존재하지 않으며, "Isatan"이라고 하는 유리된 indoxyl 이란 다른 물질이 존재한다고 하였고, 그의 구조는 Indoxyl-5-ketogluconate로 증명되었으며, 그 이름을 Isatan B이라 명명하였다.

Petters *et al.*(1955)은 vat 염료의 셀룰로오스에 대한 표준친화력 측정법 및 평형흡착력의 측정에 관하여 발표하

였고, 또한 흡착력은 극성, 소수결합과 van der Waal's 힘에 의하며, 염료의 mol 흡광계수( $\epsilon$ 값)에 의해서 결정된다고 하였다.

Wouters *et al.*(1991)은 쪽풀 색소 중에 있는 blue와 purple 색을 HPLC 를 이용하여 성분 분석한 결과 indigo, indirubin,  $\beta$ -monobromo-indigotin과 6,6'-dibromoindigotin이 포함되어 있다고 하였다.

Usida *et al.*(1995) [수꾸모]의 HPLC 분석결과 indigo 색소와 indirubin 색소 이외에 2종의 미확인 불순물이 분리되었으며, 이러한 불순물은 쪽풀 색소 염색직물과 합성 indigo 염색직물의 식별에 이용할 수 있다고 하였다.

Yamada *et al.*(1970)은 indigo와 thioindigo 염료들에 대한 mass spectra 를 측정된 결과, 대다수의 분열은 metastable 이온과 isotopic 이온으로 확인하였으며, 최초의 분열은 CO radical이 없어진 것으로 관찰되었으나 다른 radical이 없어진 것에 대한 증명은 할 수 없다고 보고하였다.

최근의 연구로는 Kim *et al.*(1996)이 *P. tinctorium* Ait의

\*Corresponding author. E-mail: chim22@rda.go.kr

조직배양에 의하여 재배된 indigo 식물의 뿌리와 싹에서 적색색소가 추출되었고, 이것은 indirubin 인 것을 증명하였다.

이 연구는 쪽 자체의 성분 분석을 위하여 TLC, HPLC 를 이용하여 분석 하였으며 구조 분석으로서는 FT-IR, <sup>1</sup>HNMR 및 EI-mass를 이용하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 쪽색소의 제조 및 성분 분석

#### 가. 소석회 첨가 염료 제조

이 연구에 사용한 쪽풀은 *Polygonum tinctorium*으로 여 귀족에 속하는 1년생 초본으로 초장은 60~100 cm 내외이며, 3월 초순에 농업생물부에 파종하여 5월 초순에 밭에 옮겨 심고, 7월 중순에 잎을 수확하여 사용하였다.

물 1 l에 100 g의 생잎을 넣고 30°C에서 30시간 우려낸 다음 쪽풀을 건져내고, 그 물에 3 g/l의 소석회(Ca(OH)<sub>2</sub>)를 넣고, 공기 불어 넣어서 파란 침전물이 형성되면, 2시간 정도 더 두었다가 윗물은 따라 버리고, 침전물을 deep freezer를 이용하여 영하 70°C에서 24시간 동결시킨 후 얼린 침전물을 동결건조기((주)일신엔지니어링)에 넣고 영하 50°C에서 동결 건조하여 유리병에 넣어 상온에 보관하여 사용하였다.

#### 나. 색소의 성분 분석

##### 1) 각종 용제에 따른 분광특성

100 mg의 합성 indigo와 1 g의 쪽풀 색소를 chloroform, DMSO, acetonitrile의 용제에 용해하여, UV/Vis. spectrometer (Perkin Elmer, Lamda 10) 로 분광곡선을 각각 측정하였다.

##### 2) TLC에 의한 성분분석

시료를 10 mg 씩을 DMSO와 Acetonitrile(2 : 1 v/v)로 용해한 후 그 액을 알루미늄 플렛에 놓고 전개 액으로 chloroform : Acetonitrile(8.5 : 1.5 v/v)에 전개 하였다.

##### 3) HPLC를 이용한 성분분석

쪽 0.3 g에 Acetonitrile : DMSO (1 : 2)의 혼합용액 75 ml 를 첨가하여서 5일간 암소에 보관한 후 실온에서 액을 filtering하였으며 HPLC(LSTP4000, USA)에서 이동상 70% MeOH(isocratic), coulumn LUNA C18(2) 4.6 × 250 mm, 5 μm, Flow: 1 ml min<sup>-1</sup>, UV detector 540 nm로 측정하였다.

##### 4) 색소 성분의 mol 흡광계수(ε값) 구하기

###### (1) DMSO(100%) 용매에 대한 Indigo의 값 구하기

20 mg Standard Indigo를 500 ml DMSO에 완전히 녹인 후 5배 희석한 1 ml를 취하여 다음과 같이 흡광도를 구하

여 다음 식에 의하여 계수를 구하였다.

$$A = \epsilon bc, \quad c = A/b\epsilon (b = 1 \text{ cm length})$$

$$A = 0.603 \text{ 언음(at 620 nm)}$$

$$\therefore c = 0.603 \times 1/\epsilon \times 1/0.2 \quad \text{①}$$

$$c = (0.02/262)/0.5 \text{ l} \quad \text{②}$$

$$0.02/131 = 3.015/\epsilon$$

$$\epsilon = 19748 = 10^{4.295}$$

(2) DMSO : CH<sub>3</sub>CN (1 : 9) 용매에 녹여 indirubin mol 흡광계수(ε)값 구하기

70.2 mg standard indirubin을 780 ml의 용매에 완전히 녹인 후 2.5배 희석한 1 ml를 흡광도를 구하여 아래 식에 의하여 mol 흡광 계수를 구하였다.

$$A = 0.569 \text{ (at 549 nm)}$$

$$c = 0.569 \times 1/\epsilon \times 1/0.4 \quad \text{①}$$

$$c = (0.070/262 \text{ mol})/0.78 \text{ l} \quad \text{②}$$

$$0.07/204.36 = 1.4/\epsilon$$

$$0.07\epsilon = 286.104$$

$$\epsilon = 4087.2 = 10^{3.61}$$

##### 5) 색소의 구조해석

쪽 색소 중의 indigo 색소와 indirubin 색소의 시료 정제는 다음과 같이 하였다. 즉 2 g의 쪽풀 색소를 200 ml의 acetonitrile 로 1일 1회씩 추출하여 6일 동안 반복 추출한 후, 나머지 용해되지 않는 청색소를 indigo 색소분석 용으로 사용하였고, indirubin은 5 g의 쪽풀 색소를 acetonitrile 용액으로 3회 반복 추출하여 얻은 용액을 glass filter(3G<sub>2</sub>)로 여과하고, 여과액을 원심분리기(Vision, Super speed vacuum)로 12,000 rpm, 10분간 원심분리한 후 상등액을 evaporator로 증발시킨 후 그 액을 분자량 측정에 사용하였고, 용제를 완전히 증발시킨 후 굵어 모아서 구조 분석용으로 사용하였다.

FT-IR(M series, Midac Corporation, USA)은 KBr-pellet 법으로 측정하였고, 각 색소를 DMSO-d<sub>6</sub>로 용해시켜 <sup>1</sup>H-NMR(Bruker Drx-300 MHz) spectrum, EI-Mass(Jeol AX505WA spectrometer)으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 쪽풀 색소의 성분 분석

#### 가. 쪽색소와 합성 indigo 색소의 정성분석

UV/vis. 측정에 의해 쪽 색소에는 주로 청색색소와 적색색소가 함유되어 있다는 것을 알았고, 합성 indigo에는 주로 청색색소가 있다는 것을 알았는데, 각각에 함유되어

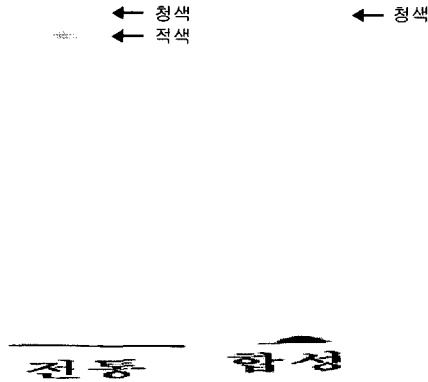


Fig. 1. TLC bands of natural and synthetic indigo dyes measured by  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$  (8.5 : 1.5 v/v) eluant.

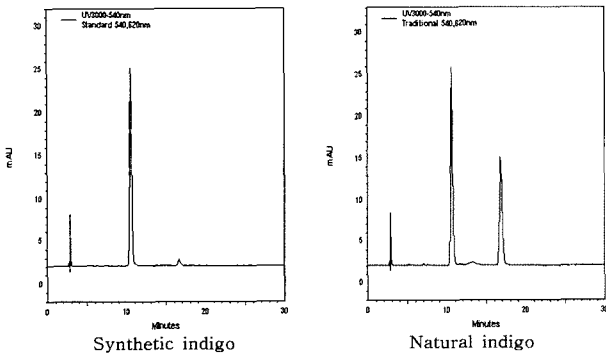


Fig. 2. HPLC profiles of the indigo dyes measured by  $\text{CH}_3/(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  (1 : 2 v/v) eluant.

있는 성분을 확인하기 위하여, 우선 박층크로마토그래피 (TLC)와 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 정성 분석한 결과는 Fig. 1, 2와 같다.

Fig. 1는 쪽풀 색소와 합성 indigo의 색소성분을 조사하기 위하여 각각의 염료를 DMSO로 용해하여, 전개제로  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ (8.5 : 1.5) 혼합용액을 사용하여 전개시켜 얻은 TLC band이다. 쪽 색소 시료는 청색색소 인디고와 적색색소 인디루빈으로 분리되어 있고, 합성인디고는 청색색소 1개 색소로 되어있다.

쪽 색소의 HPLC에 의한 분리에 관한 연구로는, Usida *et al.*(1995)의 [수구모]를 DMSO와 acetonitrile의 혼합액의 비율에 따라 HPLC로 성분분석한 결과 indigo 색소, indirubin 색소 이외의 협잡물의 2종이 분리되었으며, 2종

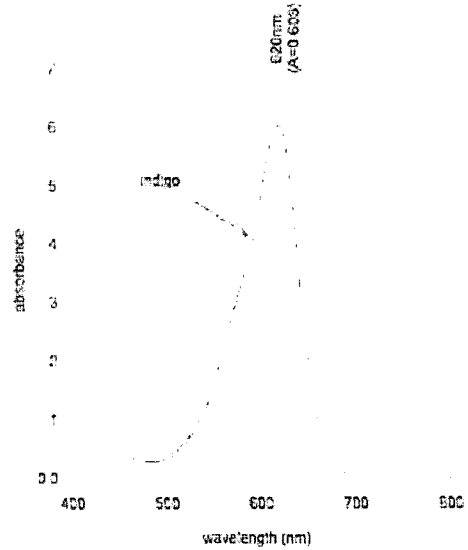


Fig. 3. Indigo standard spectrum.

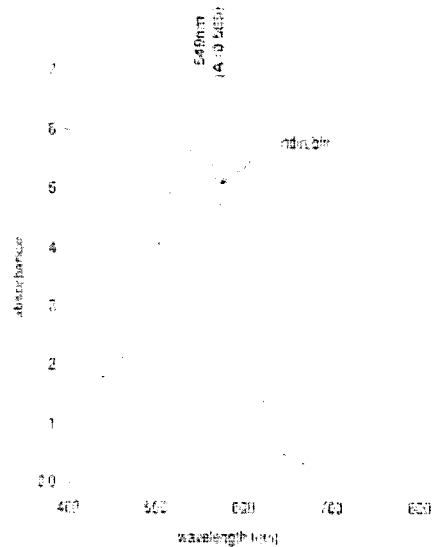


Fig. 4. Indirubin standard spectrum.

의 협잡물은 flavonide와 탄닌물질이라고 추정된 결과와 일치하였다.

Fig. 2는 쪽 색소와 합성 indigo를 각각 DMSO에 용해시켜 얻은 HPLC profiles이며, 합성 indigo는 단 한 개의 청색 색소가 분리되었고 2개의 색소가 분리되었다. 앞의 peak가 인디고 뒤의 것이 인디루빈 이라는 것을 TLC를 측정된 결과로 보아서 알 수 있다.

#### 나. 색소의 함량 구하기

Fig. 3, 4에 의하여 앞에서 구한 각 색소의 몰 흡광계수

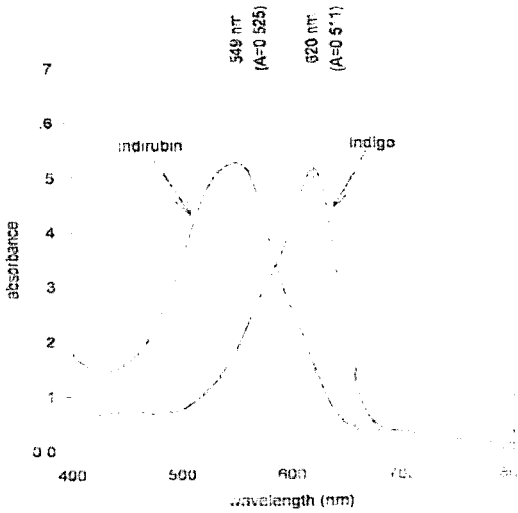


Fig. 5. UV/Visible Spectra of natural indigo sample.

는 각각 indigo  $10^{4.295}$ , Indirubin  $10^{3.61}$ 로 계산 되어 졌다. 몰 흡광계수 구한 후 Fig. 5에 의하여 구한 흡광도를 이용하여 각각 성분의 함량을 나타냈다.

1) Sample을 DMSO(100%) 용매에 녹여 Indigo 정량하기  
Sample 590 mg을 DMSO에 녹여 Indigo를 추출하여 완전한 Indigo 추출을 위해 매일 2회씩, 5일 반복(total 10회) 하여 363 ml의 추출액을 얻었다. 이 용액을 10배 희석하여 1 ml를 취하였다.

$$A = \epsilon b c$$

$$A = 1.511 \times 1/10^{4.3} \times 1/0.1 = 2.59 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$(x/262)/0.363 = 2.56 \times 10^{-4}$$

$$x = 2.43 \times 10^{-2} \text{ g indigo}$$

$$\therefore \text{indigo \% 함량} = 2.43 \text{ mg}/590 \text{ mg} \times 100 = 4.06\%$$

2) Sample을 DMSO : CH<sub>3</sub>CN(1 : 9)에 녹여 indirubin을 추출 한 후 완전한 indirubin 추출을 위해 매일 1회씩 6일 반복(total 6회)하여 184 ml의 추출액을 얻었고, 이것을 희석하지 않고 그대로 1 ml를 취하여 아래식에 따라 값을 구하였다.

- A = 0.525를 얻음(at 549 nm)

$$C = 0.525 \times 1/10^{3.6} \times 1.1 = 1.28 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$(x/262)/0.184 = 1.28 \times 10^{-4}$$

$$x = 6.27 \times 10^{-3} \text{ indirubin}$$

$$\therefore \text{indirubin \% 함량} = 6.27 \text{ mg}/590 \text{ mg} \times 100 = 1.06\%$$

청색색소인 인디고 색소 몰 흡광계수가 붉은 색인 인디루빈보다 크기 때문에 염색시 인디고 색소의 친화력이 큼

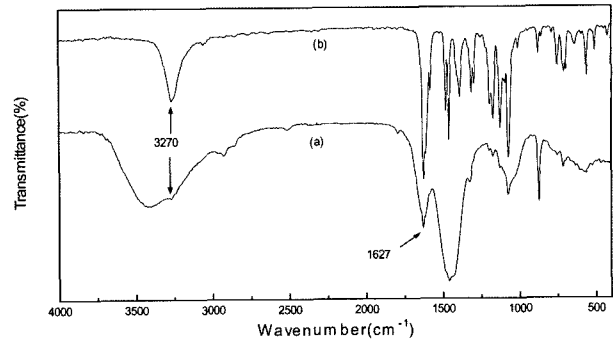


Fig. 6. FT-IR Spectra of indigo (A) and indirubin (B) pigments isolated from acetonitrile extracts of natural indigo powder.

을 예상할 수 있다. 또한 각 색소의 정량값은 인디고가 4.06%, 인디루빈 1.06%를 얻었다.

#### 다. 인디고 색소의 구조해석

Indigo의 FT-IR 분석에 관한 연구로는 Song(1994)의 indigo 생잎에서 chloroform으로 추출한 indirubin 색소의 spectrum에서 수소결합 및 secondary amine group 등의 carbonyl group이  $1600 \text{ cm}^{-1}$ 과  $1650 \text{ cm}^{-1}$ 에서 각각 나타나고 있다고 보고하였다.

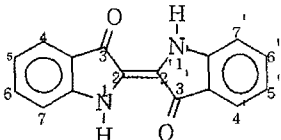
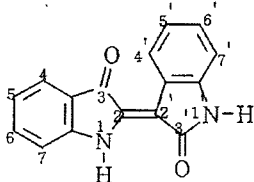
NMR 분석에 관한 연구로는 Hart *et al.*(1992)이 무성생식한 *Rhodococcus* gene 에 함유된 *Escherichia coli*에 의하여 생산된 indigo와 관련된 색소의 분석에서 blue 색소는 indole-type N-H 공명에 의한 signal이 10.45 ppm에 나타나고 4개의 AA'BB' spectrum으로 관찰되었고, 그것은 6.5-7.7 ppm 영역에 indole을 기초로 한 색소였다. 이 중 7.66 ppm이 중심축이며 7.63(d), 7.50(t), 7.32(d) 그리고 6.94(t) ppm으로 관찰되어지고 있다.

Fig. 6에서와 같이  $1627 \text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring과 C=O stretching에 의한 흡수대가 나타난 것과  $3200\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$ 에서 -NH- stretching에 의한 흡수대가 관찰되며, 청색색소와 적색색소의 IR spectrum의 차이는 나타나지 않았다.

이것은 Song(1994)의 쪽풀 생잎에서 추출한 indirubin 색소의 IR spectrum, 또한 Kume(1967)의 합성 및 쪽풀 색소의 C=O stretching에 의한 흡수대를 나타내는 IR Spectrum 결과와  $1630 \text{ cm}^{-1}$ 에 나타난 것과  $3278 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 -NH- stretching에 의한 흡수대를 나타내는 IR spectrum 결과와 일치한다.

표 1에서 보는 바와 같이 청색색소의 H4, 5, 6, 7은 6.5~7.7 ppm에서 Indole 구조를 기본으로 하는 AA'BB' system 스피닝 현상을 나타내고 있으며, H4, 7은 7.61 및 7.33 ppm에서 각각 2중선을 나타내고 있고, H5, 6은 7.51 및 6.97 ppm에서 3중선으로 나타난 것을 알 수 있다. 또한 10.48 ppm의 단일선은 NH의 proton으로 추정된다.

**Table 1.** <sup>1</sup>H-NMR spectral data of indigo and indirubin isolated from natural indigo powder

Pigment	Proton	Chemical shift (ppm, δ)*
 Indigo	H4	7.61(d)**
	H5	7.51(t)
	H6	6.97(t)
	H7	7.33(d)
	NH	10.48(br s)
 Indirubin	H4, 4'	7.65(d), 7.41(d)
	H5, 5'	7.55(t), 7.25(t)
	H6, 6'	7.01(t)
	H7, 7'	6.90(d)
	NH	10.88(br s), 11.01(br s)

\* TMS as internal reference in DMSO-d<sub>6</sub>  
 \*\* br s : broad singlet, d : doublet, t : triplet

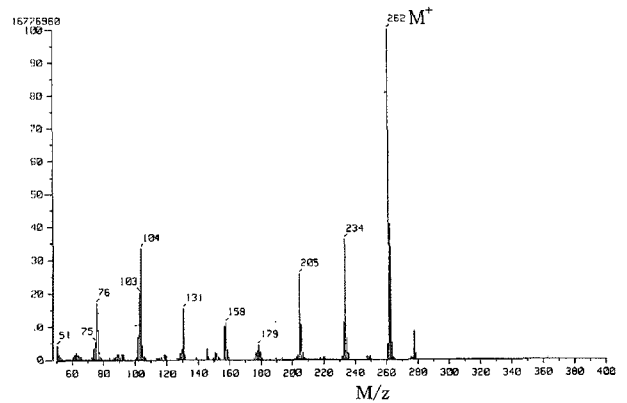
이것은 Hart et al.(1992)이 *Rhodococcus gene*에 함유된 *Escherichia Coli*에서 생산된 indigo 색소의 분석에서 Indole-type N-H 공명과 4개의 spin AA'BB' spectrum 구조 6.5~7.7 ppm 영역이 일치하므로 동일구조임을 확인하였다. 즉, 청색색소는 indigo 임이 확인되었다.

한편, NH의 proton은 10.88과 11.01 ppm에서 각각 단일 선을 나타내고 있으며, Indole 기본구조의 H4, 5, 6, 7과 H4', 5', 6' 7'는 6.9~7.7 ppm에서 나타나고 있으며, AA'BB' System 스핀분열현상으로 인해 H4, 4'는 각각 7.65 및 7.41 ppm 에서 H7, 7'는 6.90 ppm에서 이중선으로 나타나고 있다. 그리고 7.55, 7.25 ppm의 삼중선은 H5, 5'의 proton으로, 7.01 ppm의 삼중선은 H6, 6'의 proton으로 해석된다.

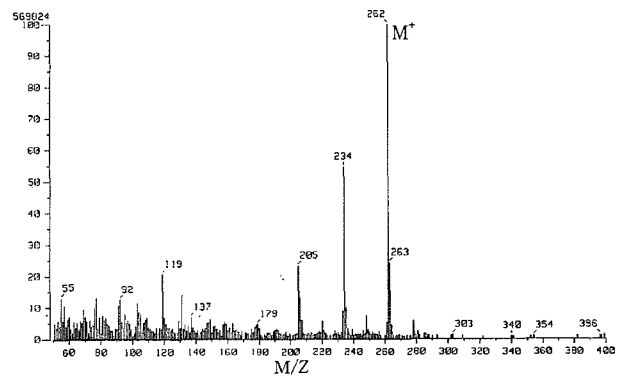
이것은 적색색소의 Indole-type N-H 공명이 10.82와 10.98 ppm에서 관측되어지고 이것이 indirubin 일것이라고 추정 한 것과 같이 이 실험에서도 triplet 3 sets와 4 sets의 doublet가 관측되어져 Hart의 NMR 결과와 일치하므로 동일 구조임을 확인하였다. 즉, 적색색소는 indirubin 임이 확인되었다. 표 1은 위의 결과를 정리한 것으로서 indigo 색소와 indirubin 색소의 각각의 proton의 화학적 이동(ppm)을 명확한 결과이다.

Fig. 7-8는 쪽풀 색소 중의 indigo 색소와 indirubin 색소의 EI-mass spectrum 을 나타낸 것으로서 분자이온은 262[M]<sup>+</sup>였고, 그의 fragment 이온은 234[M-28]<sup>+</sup>에서 나타난다.

이 결과는 Jung et al.(1995)은 chloroform으로 indirubin 을 추출한 후 EI-mass로 측정하여 분자이온 peak를 조사한 결과와 fragment 이온의 m/z가 일치하였다.



**Fig. 7.** EI-mass spectrum of indigo pigment isolated from DMSO extracts of natural indigo powder.



**Fig. 8.** EI-mass spectrum of indirubin isolated from acetonitrile extracts of natural indigo powder.

이러한 쪽풀 색소의 주색소인 indigo 색소와 indirubin 색소는 FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, EI-mass spectrum이 일치하고 <sup>1</sup>H-NMR 결과로부터 이 두 색소는 이성질체임을 알 수 있다.

## 적 요

쪽풀 생잎에서 우려낸 색소 액에 소석회를 첨가한 후 쪽풀 색소의 침전물을 만들어서 냉동 건조시켜 쪽풀 색소를 제조하여, 그 성분을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. UV 분광광도, TLC 정성 분석, HPLC 측정 결과 쪽 분말 용액의 2개 bend가 나타났으며, 적색색소대인 540 nm 와 청색 색소대인 620 nm가 존재함을 알 수 있었다.
2. FT-IR 분석으로부터 1627 cm<sup>-1</sup>에서 채, 3200~3300 cm<sup>-1</sup>에서 NH의 흡수대가 나타나고, 적색 및 청색 색소의 IR spectrum이 일치하였으며,
3. EI-mass 분석 결과 청색과 적색 색소의 fragment 이

- 온의 m/z가 일치하고, <sup>1</sup>H MNR 분석결과로부터 두 색소는 이성질체임을 알 수 있었고,  
 4. 쪽 염료 성분 함량을 조사한 결과 인디고 색소 4.06% 와 인디루빈 1.06%이었다.

### 인용문헌

- Epstein, E., Nabors, M. W., and Stowe, B. B. (1967) Origin of Indigo of Woad, *Nature*, **216**: 547~549.
- Hart Stephen, Klaus R. Koch and David R. Woods (1992) Identification of indigo-related pigments produced by *Escherichia coli* Containing a cloned *Rhodococcus* gene, *J. General Microbiology*, **138**: 211~216.
- Jung, D. S. (1995) Biosynthesis of indigoid pigments in root and shoot cultures of *polygonum tinctorium*, A thesis for the degree of master of science, Seoul National University.
- Kume Jun (1967) 自然産藍 と最近の研究, *繊維加工*, **19**(10): 27~32.
- Klingsberg Ekwin (1954) Qualitative and quantitative analysis of vat dyes by paper chromatography, *J.S.D.C.*, 70 Dec., 563~568.
- Kim, S. U., Song, K. S., Jung, D. S., and Chae, Y. A. (1996) Production of indoxyl derivatives in indole-supplemented tissue cultures of *polygonum tinctorium*, *Panta Medica*, **62**: 54~56.
- Minagawa Motoi, Yoshida Yoshiko and Matsumoto Kanko (1980) 絹の染色に関する研究 (第10報), *大阪市立大學 生活科學部 記要*, **28**: 87~97.
- Peters, R. H. and Summer, H. H. (1955) The Affinities of vat dyes in relation to their constitutions, *J.S.D.C.*, **71**: 130-139.
- Song, K. S. (1994) Biosynthetic Studies of indigoid in *polygonum tinctorium* leaves and suspension cells, A thesis for the degree of master of science, Seoul National University.
- Usida Satoshi, Ohta Maki (1995) すくも中に含まれる赤色素の抽出と分析, *日本家政學會誌*, **46**(12): 1167~1171.
- Wouters, J. and Verhecken, A. (1991) High-performance liquid chromatography of blue and purple indigoid natural dyes, *J.S.D.C.*, **107**: 266~269.
- Yamada Kautoshi, Konakahara Takeo and Iida Hirohada (1970) Mass spectrometry of dyes, II. Mass spectrometry of indigoid and thioindigoid dyes, *Kogyo Kagaku Zasshi*, **73**(5): 984~988.