

머루(*Vitis amurnesis Ruprecht*) Anthocyanin에 關한 研究

[第 1 報] 머루 Anthocyanin의 分離 및 定量

黃仁京·安承堯
서울대학교 家政大學 食品營養學科
(1975년 10월 1일 수리)

Studies on the Anthocyanins in Wild Vines (*Vitis amurensis Ruprecht*). (Part 1)

Separation and Determination of Anthocyanins in Wild Vines

In-Kyeong Hwang and Seung-yo Ahn

Dept. of Food and Nutrition, College of Home Economics, Seoul National University

(Received Oct. 1, 1975)

SUMMARY

The content of total and individual anthocyanins in the wild vines (*Vitis amurensis Ruprecht*), which were wildly grown in the mountain area of Korea, has been carried out. The pigments were extracted with 0.1% hydrochloric acid in methanol from the wild vines and the content of the total anthocyanin in the extract was determined spectrophotometrically at 538nm (λ_{max}).

Individual anthocyanins in the extract were separated by paper chromatography and eluted with 0.1% HCl in methanol. The optical densities of the individual pigment solutions were determined at each absorption maxima of the pigments.

The content of total anthocyanins in wild vines was 3.95mg per 1g fresh weight. The content of individual pigments were as follows: 12.5% delphinidin 3-monoglucoside, 3.5% petunidin 3-monoglucoside, 2.1% cyanidin 3-monoglucoside, 10.1% delphinidin 3,5-diglucoside, 4.3% malvidin 3-monoglucoside, 8.3% petunidin 3,5-diglucoside, 4.1% cyanidin 3,5-diglucoside like and 55.1% malvidin 3,5-diglucoside. It was found that the most abundant pigment in wild vines studied was malvidin-3,5-diglucoside.

緒 論

Anthocyanin은 植物界에 널리 分布되어 있는 赤色, 赤紫色 또는 靑藍色을 띠는 色素로서 특히 꽃이나 果實에 많이 含有되어 있다. 果實 中の anthocyanin의 含量은 品種, 生育狀態, 附着位置 등에 따라 差異를 갖는다⁽¹⁾. 그러나 果實에 含有된 個

別 anthocyanin의 종류와 그 含量은 遺傳的으로 決定되기 때문에 品種에 따라 特色을 가지고 있다는 것이 잘 理解되고 있다^(2,3).

果實 中の 個別 anthocyanin의 종류와 組成은 그 加工品の 品質에 미치는 影響이 크다. anthocyanin의 B 코리에 o-phenol OH基를 가지고 있는 것들은 色調가 짙고 金屬 이온과 쉽게 錯化合

물을 形成한다. 따라서 果實 중에 含有된 anthocyanin의 종류와 組成에 따라 加工中에 金屬容器와 接觸할 때 色素의 變化 정도에 差異가 생기게 된다.

植物體중에 含有된 總 anthocyanin 含量은 대개 色素抽出液을 알맞는 濃도로 희석하여 測定되고 있다. Francis等^(4,5)은 果實을 ethanol-0.1% HCl (85:15)로 抽出하여 anthocyanin 色素가 溶液의 pH에 따라 吸收極大 波長과 分子 吸光係數에 變動이 크다는 事實⁽⁶⁾을 감안하여 抽出溶液의 pH를 1로 조정하여 測定하였다. Dickinson等⁽⁷⁾ 및 Swain等⁽⁸⁾은 anthocyanin 抽出液에 chlorophyll이나 그 밖에 有色的 妨害物質의 影響을 排除하기 위하여 anthocyanin 抽出液중의 anthocyanin을 亞黃酸소다 또는 過酸化水素로 破壞시키기 前後에 吸光度를 測定함으로써 精確한 總 anthocyanin의 測定이 可能하다고 報告하였다. 個別 anthocyanin 組成의 測定에 있어서는 chromatography 分離가 必須인 操作으로 이용되고 있다⁽⁹⁾.

포도와 같은 屬에 속하는 머루는 일반적으로 anthocyanin의 含量이 높고 또 한편 그 안에 들어 있는 anthocyanin이 安定하다고 알려져 있다. 本實驗에서는 우리나라 山間地方에 野生되고 있는 머루의 總 anthocyanin含量과 個別 anthocyanin의 組成比를 究明하기 위해서 分光光度計法에 의하여 總 anthocyanin의 含量을 測定하였고 paper chromatography 分離에 의하여 個別 anthocyanin의 含量을 測定하였다.

實驗材料 및 方法

實驗材料

實驗에 使用한 머루는 우리나라 高山地帶에 野生하고 있는 것으로서 9월에 東大門 市場에서 購入하였다.

色素의 抽出

약 100g의 머루를 250ml의 0.1% HCl methanol과 함께 microhomogenizer (VIRTIS "23" the VIRTIS Co.製)로 組織이 微細하게 粉碎될 때까지 磨碎한 다음 1000ml volumetric flask에 옮겨 담고 0.1% HCl methanol로 標線까지 채웠다. 이 色素溶液 中에서 組織과 溶液 사이에 平衡이 이루어지도록 0°C 暗所에 一夜 放置하였다.

總 Anthocyanin 含量 測定

暗冷所에 放置하였던 色素抽出液으로 부터 1ml를 取하여 0.1% HCl methanol로 50배로 稀釋하였다. 이 溶液을 自動記錄 spectrophotometer

(Shimadzu UV 200)로 吸收曲線을 그려서 吸收極大 波長을 찾았다. 그리고 Fig. 3에서와 같이 吸收極大 波長, 538nm에서 吸光度를 測定하여 다음의 計算式⁽⁶⁾을 사용하여 總 anthocyanin의 含量을 malvidin-3-monoglucoside로써 計算하였다.

mg anthocyanin/g fresh weight

$$= \frac{A}{\frac{1\%}{E_{538}} \times 1\text{cm}} \times \text{dilution factor} \times \frac{10}{W}$$

A : 測定된 吸光度

W : 試料의 무게

$\frac{1\%}{E_{538}}$: malvidin 3-monoglucoside의 吸收極大波長인 538nm에서의 Extinction coefficient

$$E_{10\%} = \frac{\text{Molar absorbance} \times 10}{\text{Molecular weight}}$$

二次元 Chromatography

머루 色素 抽出液 中의 anthocyanin들의 組成을 알기 위하여 二次元 paper chromatography 分離를 하였다. 色素溶液을 30cm×30cm 크기의 Whatman No.1 濾過紙의 한쪽 끝에 點狀으로 塗付하고 Table 1의 溶媒系 I로 一次元 展開를 시켰다. 展開가 끝난 後 風乾시켜 一次展開의 直角方向으로 溶媒系 II를 사용하여 二次元 展開를 시켰다. 分離된 色素斑點은 一次元 展開時 分離된 順序에 따라 Rf值가 적은 것 부터 1, 2, 3, 4 및 5로 記號를 붙이고, 다시 二次元 展開時의 分離에 의하여 色素 2, 3, 4로부터 分離된 것들을 2-a, 2-b, 3-a, 3-b, 4-a 및 4-b로 記號를 붙였다.

個別 色素의 分離

0.1% HCl methanol로 抽出한 色素溶液을 rotary evaporator로 40°C에서 減壓濃縮하였다. 濃縮溶液을 Whatman No. 1 濾過紙에 帶狀으로 칠하고 Table 1의 溶媒系 I로 分離하였다. 分離된 色素帶들을 오려내어 10ml의 0.1% HCl methanol에 담고 0°C 暗所에 一夜 放置하여 色素를 溶出시켰다. 이들 色素들을 Whatman No. 1 濾過紙에 溶媒系 II를 사용하여 展開시켜 精製하였다. 이것들중 2, 3, 4번 色素들은 각각 두 色素들이 重複되어 있으므로 다시 溶媒系 II로 分離하여 앞에서와 같이 色素帶를 오려 내어 10ml의 0.1% HCl methanol에 담고 暗冷所에서 一夜 放置하였다.

個別 Anthocyanin의 定量

暗冷所에 放置하였던 色素溶液들의 吸收曲線을 自動記錄 spectrophotometer에 의하여 求하고 吸

Table 1. Solvent systems for the chromatography.

Solvent	Composition	Ratio (v/v)	Layer used
I	Formic acid—conc. HCl—Water	5 : 2 : 3	Miscible
II	n-Butanol—Acetic acid—Water	4 : 1 : 5	Upper layer
III	Acetic acid—Water—conc.HCl	15 : 82 : 3	Miscible

收極大 波長을 求하였다. 그리고 各 色素溶液들의 吸收極大 波長에서 吸光度를 測定하여 濃度比를 計算하였다.

結果 및 考察

二次元 Chromatography

本 實驗에 使用한 머루의 色素溶液을 溶媒系 I, II로 二次元展開를 시켜서 Fig. 1에서와 같이 8種類의 色素斑點이 얻어졌다. 溶媒系 II로 一次 分離시켰을 때에는 다섯개의 色素斑點이 分離되었으나 다시 溶媒系 II로 二次展開시킨 結果 色素 2, 3, 4가 각각 두 斑點으로 分離되었다. 따라서 머루 中에는 8 種류의 anthocyanin이 含有되어 있다는 것을 確認할 수 있었다.

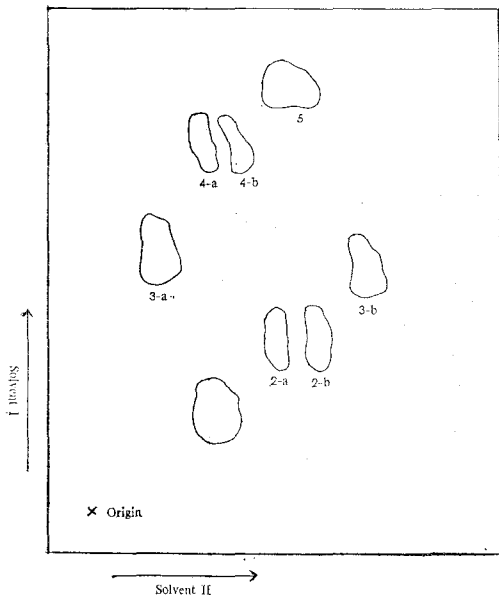


Fig. 1. Two dimensional paper chromatogram of anthocyanins in wild vines.

個別 Anthocyanin의 分離

머루 色素 抽出液 中에 含有되어있는 個別 anthocyanin을 分離하고자 Whatman No. 1 濾過紙에 抽出液을 帶狀으로 塗付하고 溶媒系 I로 分離하면 Fig. 2의 A와 같이 5種의 色素帶가 얻어졌다.

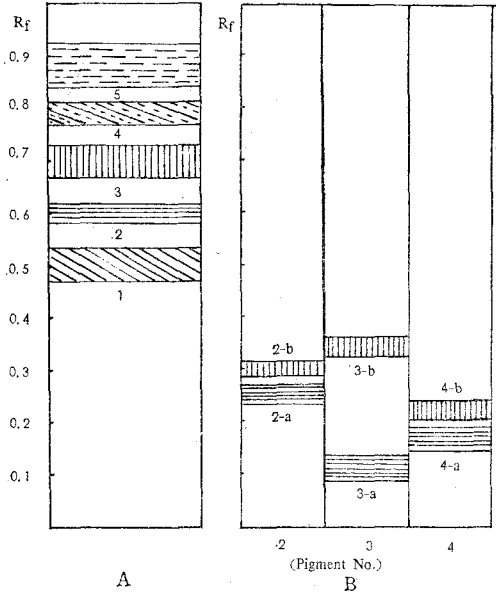


Fig. 2. Paper chromatograms of anthocyanins in wild vines.

A: Total pigments separated with solvent system; Formic acid—conc. HCl—water (5 : 2 : 3)

B: Pigments 2, 3 and 4 separated secondarily with solvent system; n-Butanol—acetic acid—water (4 : 1 : 5)

그리고 두 色素가 重複되어 있는 2, 3, 4번 色素帶를 濾過紙에서 溶出시켜 다시 溶媒系 II로 chromatography 分離하면 Fig. 2의 B에서와 같이 세 色素帶에서 모두 각각 두가지 色素가 明瞭하게 分離 되었다. 濃度 測定을 할수 있을 만큼 充分한 量의 純粹한 色素를 얻기 위하여 帶狀으로 塗付하여 一次元 chromatography만 하여도 二次元 chromatography로 確認된 8種의 色素가 얻어질 수 있었다.

Anthocyanin의 定量

本 實驗에서 anthocyanin의 定量을 위하여 使用된 色素液의 吸收極大波長은 Fig. 3에서와 같이 538nm이므로 같은 吸收極大波長을 갖는 malvidin 3-monoglucoside로써 總 anthocyanin 量을 計算하였다. 計算에 필요한 malvidin 3-monoglucoside

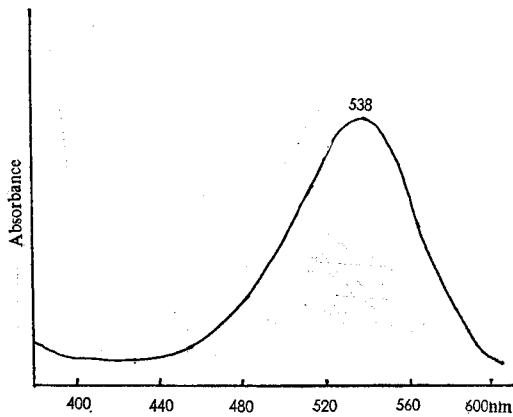


Fig. 3. Absorption spectra of total anthocyanins in wild vines.

의 分子吸光係數는 Somers⁽¹⁰⁾ 등에 의하면 0.1% HCl methanol 溶液에서 546.0이었고 Koepfen等⁽¹¹⁾에 의하면 같은 溶媒에서 538.0이었다고 報告되었으나, 본 實驗에서는 Koepfen 등의 數値를 使用하였다. 計算된 總 anthocyanin의 量은 머루 1g 당 3.59mg이었다. 머루의 總 anthocyanin의 量은 같은 方法으로 計算된 Beauty seedless 포도 anthocyanin 量⁽⁹⁾의 약 6배에 달하며 重量法으로 求한 Trouseau 포도 anthocyanin量⁽¹²⁾의 4배 이상이었다.

個別 anthocyanin들의 組成比는 各各의 吸收極大波長에서 吸光度를 測定하여 百分比로 計算하였다. 머루에서 分離된 個別 anthocyanin들의 吸收曲線들은 Fig. 4, 5와 같다. 個別 anthocyanin의 百分比 및 量은 Table 2에 提示하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 5번 色素가 전체의 50% 이상을 차지하는 主色素이었다. 黃等⁽¹³⁾의 머루의 anthocyanin의 構造研究에 의하면 머루의 主色素인 5번 色素

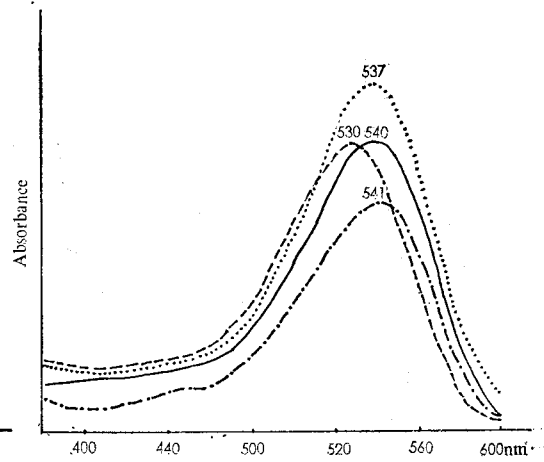


Fig. 4. Absorption spectra of anthocyanins in wild vines.

--- pigment 1, — pigment 2-a,
- - - pigment 2-b, pigment 3-a.

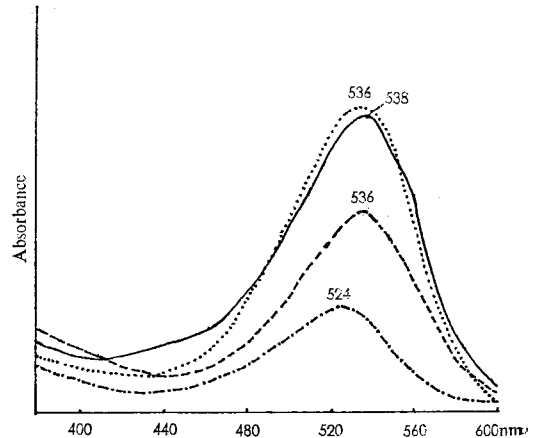


Fig. 5. Absorption spectra of anthocyanins in wild vines.

— pigment 3-b, - - - pigment 4-a,
- - - pigment 4-b, pigment 5.

Table 2. The content of anthocyanins in wild vines.

Pigment No.	Identification ^{(13)*}	mg/g fresh wt.	Relative ratio of pigment(%)
1	Delphinidin 3-monoglucoside	0.49	12.5
2-a	Petunidin 3-monoglucoside	0.14	3.5
2-b	Cyanidin 3-monoglucoside	0.08	2.1
3-a	Delphinidin 3,5-diglucoside	0.40	10.1
3-b	Malvidin 3-monoglucoside	0.17	4.3
4-a	Petunidin 3,5-diglucoside	0.33	8.3
4-b	Cyanidin 3,5-diglucoside like	0.16	4.1
5	Malvidin 3,5-diglucoside	2.18	55.1
Total		3.95	100.0

* Cited from Reference (13)

는 malvidin-3,5-diglucoside이고 3-b 色素는 그 aglycone은 역시 5번 色素와 같은 malvidin-3-monoglucoside임이 밝혀졌다. 따라서 머루 중에는金屬 이온과 쉽게 錯化合物을 形成하지 않는 anthocyanin이 주로 含有되어 있기 때문에 흔히 目擊되는 茶와 같이 머루酒와 같은 머루 加工品 中에서 色素가 安定하다는 것이 理解된다.

要 約

우리나라 山間地方에 野生하는 머루 中의 總 anthocyanin의 含量과 個別 anthocyanin의 組成을 測定하였다. 머루로 부터 色素를 0.1% HCl methanol로 抽出하여 波長 538nm (λ_{max})에서 吸光度를 測定하여 總 anthocyanin 含量을 求하였다.

抽出液中的 個別 anthocyanin들은 paper chromatography로 分離하고 0.1% HCl methanol로 溶出하였다. 分離된 個別 anthocyanin들의 溶液을 各己의 吸收極大 波長에서 吸光度를 測定하여 組成比를 求하였다.

머루 中の 總 anthocyanin 含量은 新鮮物의 g 당 3.95mg 이었다. 個別 anthocyanin들의 組成比率은 다음과 같다. delphinidin-3-monoglucoside 12.5%, petunidin-3-monoglucoside 3.5%, cyanidin-3-monoglucoside 2.1%, delphinidin-3,5-diglucoside 10.1%, malvidin-3-monoglucoside 4.3%, petunidin-3,5-diglucoside 8.3%, cyanidin-3,5-diglucoside like 4.1%, malvidin-3,5-diglucoside 55.1%.

머루 中の 主 色素는 malvidin-3,5-diglucoside 이었다.

參 考 文 獻

1. Blank F.: Bot. Rev' 13, 241 (1947)
2. Dodds K.S. and Long D.H.: J. Genet. 53, 136 (1955)
3. Harborne J. B: Plant physiol. 74, 262 (1960).
4. Francis F.J.: Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 99, 296 (1957)
5. Fluleki T. and Francis F.J.: J. Food Sci. 33, 72 (1968)
6. Sondheimer E.: J. Am. Chem. Soc. 75, 1507 (1953)
7. Dickinson D. and Gawler J. H.: J. Sci. Food Agr. 7, 699 (1956)
8. Swain T. and Hillis W. E.: J. Sci. Food Agr. 10, 63 (1959)
9. Philip. T.: J. Food Sci. 39, 449 (1974)
10. Somers T. C.: J. Sci. Food Agr. 17, 215 (1966)
11. Koeppen B. H. and Basson D. S.: Phytochemistry 5, 183 (1966)
12. Rafael, C.D. and Luh B. S. J.: Food Sci, 34, 415 (1969)
13. In-Kyeong Hwang and Seung-Yo Ahn: J. Korean Agr. Chem. Soc. 18, 188 (1975)