

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

[第 2 報] 머루 Anthocyanin의 構造 確認

黃 仁 京 · 安 承 堯

서울대학교 家政大學 食品營養學科

(1975년 11월 10일 수리)

Studies on of the Anthocyanins in Wild Vines (*Vitis amurensis Ruprecht*) (Part 2)

Identification 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 Nov. 10, 1975)

SUMMARY

The studies on the structure of anthocyanins in wild vines have been carried out. The pigments were extracted with 0.5% HCl in methanol from the wild vines which were wildy grown in the mountain area of Korea and purified with Amberlite IRC-50 cation exchange resin. The individual pigments were separated by paper chromatography.

Seven pigments were identified by partial acid hydrolysis, sugar moiety, alkaline degradation, R_f values of paper chromatography in various solvents and absorption spectra in the visible region. The identified pigments were delphinidin 3-monoglucoside, petunidin 3-monoglucoside, cyanidin 3-monoglucoside, delphinidin 3,5-diglucoside, malvidin 3-monoglucoside, petunidin 3,5-diglucoside and malvidin 3,5-diglucoside.

I. 緒 論

自然界에서의 anthocyanin의 分布와 그 化學構
造에 관한 研究는 일찌기 Willstätter(1913~1916),
Robinson(1922~1934), Karrer(1927)等에 의하여
廣範圍하게 이루어졌다. 그 후 Bate-Smith¹⁾에 의하
여 paper partition chromatography가 anthocyanin
分離에 처음 紹介되어 分離操作은 빠르고 간편하
게 되었으며 Harborne²⁾에 의해 더욱 改善되어 微
量의 色素를 가지고도 分離確認이 可能하게 되었

다. 또 Harborne³⁾은 anthocyanin의 構造와 結合
糖의 形態에 따라 spectral curve에 있어서의 特徵
이 있음을 發見하여 構造確認을 더욱 容易하게 하
였다. 특히 Abe⁴⁾等의 anthocyanin 部分 酸加水分
解法에 의하여 結合糖의 數와 그 結合形態를 간단
하게 確認할 수 있게 되었다.

anthocyanin이 含有된 果實中에서 특히 포도에
관하여 많은 研究들이 行하여지고 있다. 포도는
그 品種에 따라 構成 anthocyanin에 差異가 있다
고 報告되고 있다. Somaatmadja等⁵⁾은 Cabernet

Sauvignon 포도중에 delphinidin 3-monoglucoside, petunidin 3-monoglucoside, malvidin 3-monoglucoside 및 malvidin 3-monoglucoside의 chlorogenic acid ester 등이 존재함을 報告하였고 Rafael⁶⁾ 등은 Trousseau 포도 중에 petunidin 3-monoglucoside, cyanidin 3-monoglucoside, malvidin 3-monoglucoside 및 peonidin 3-monoglucoside 등이 존재함을 報告하였다.

Smith⁷⁾ 등은 Rubired 포도중에는 malvidin 3,5-diglucoside, peonidin 3,5-diglucoside, malvidin 3-monoglucoside, peonidin 3-monoglucoside, delphinidin 3-monoglucoside 외에 아실화된 3개의 색소가 있음을 報告하였다. 이외에도 Tinta Pinheira 포도,⁸⁾ Beauty Seedless 포도,⁹⁾ Barbera 포도¹⁰⁾ 등 많은 포도 種類에 관한 研究가 있다.

植物體內에서 anthocyanin의 生合成은 그 品種에 따라 固有한 pattern을 가지고 있음이 알려져 있다. Ribéreau-Gayon¹¹⁾, Rankine¹²⁾, Albach¹³⁾ 등은 *V. vinifera* 포도에는 monoglucoside 만이 존재하고 *V. labrusca* 포도에는 monoglucoside와 diglucoside 등 두가지가 존재한다고 報告하였다.

本 研究에서는 우리나라 山間地帶에 野生되고 있는 머루中에서 7종의 anthocyanin을 分離하고 그 化學構造를 確認하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 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.

2. 色素의 抽出 및 精製

머루에서 씨와 果肉을 除去하고 果皮만을 同量の 0.5% HCl methanol에 넣어 waring blender로 5分間 磨碎하였다. 이 磨碎液에 Celite(Johns-Manville 545)를 少量 넣어 混合하고 Büchner 깔대기를 통하여 吸引濾過하였다. 殘渣는 0.5% HCl methanol에 懸탁시켜 15分間 放置하였다가 다시 吸引濾過하였다. 이 操作을 色素가 完全히 抽出될 때까지 反復하였다. 濾過液을 모두 합쳐서 40°C에서 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 methanol을 完全히 除去하였다. 濃縮液中の 有機酸, 糖類 등은 弱陽이온 交換樹脂管을 통과시켜 除去하였다. 樹脂管은 Morris等¹⁴⁾의 方法에 依하여 Amberlite IRC-50 (Rhom and Hass社 製品)을 4cm×40cm의 管에 充塡하고 使用前에 5% HCl溶液, 500ml을 注入하여 H⁺型으로 만들어 使用하였다.

色素濃縮液을 이온 交換樹脂管에 注入시켜 色素를 吸着시킨 후 蒸溜水를 流下시켜 流出液이 無色이 될 때까지 씻었다. 다음 0.5% HCl ethanol 250ml을 注入하여 色素를 溶出시켰다. 이 色素溶出液을 40°C에서 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 少量의 0.3% HCl methanol에 溶解시켜 0°C에 貯藏하였다.

3. 個別 色素의 分離

精製된 色素液을 30cm×30cm 크기의 濾過紙 (Toyo filter paper 514)에 帶狀으로 칠하고 Table 1의 溶媒系Ⅲ으로 展開시켜 個別色素를 分離하였다.

分離된 色素帶들은 下端으로 부터 順序에 따라 1, 2, 3, 4, 5로 記號를 부치고 各 色素帶를 오려서 0.3% HCl methanol로 抽出하여 各 色素를 더욱 精製하기 위하여 40°C에서 減壓濃縮하여 濾過紙에 帶狀으로 칠하고 溶媒系Ⅰ로 展開하였다. 이중 色素 2, 3, 4를 溶媒系Ⅱ로 다시 展開시켜 分離된 두 色素帶를 下端에서 부터 各各 2-a, 2-b, 3-a, 3-b, 4-a 및 4-b로 記號를 부쳤다.

4. 結合糖의 確認

1) 部分 酸加水分解 (Partial acid hydrolysis)

精製된 各 色素를 Smith⁷⁾의 方法에 따라 試驗管中에서 2ml의 1N HCl과 함께 brine bath中에서 30分間 加熱하며 2分 間隔으로 毛細管으로 反應液을 取하여 Whatman No. 1 濾過紙에 各各 點으로 찍어 溶媒系Ⅰ로 展開시켰다.

2) 結合糖 (Sugar moiety)

精製된 各 色素를 試驗管中에서 3ml의 1N HCl과 함께 brine bath中에서 30分間 加熱하여 加水分解시켰다. 加水分解된 液을 冷却한 後 Albach⁸⁾ 등이 使用한 方法에 따라 每回마다 1ml의 iso-amyl alcohol을 加하여 aglycone을 3回 抽出하였다. 試驗管內에 남아 있는 水溶液에 2ml의 ethyl ether를 3回 加하여 不純物을 抽出 除去하였다. 얻어진 糖溶液을 Whatman No. 1 濾過紙와 Avicel SF(フナコシ藥品株式會社 製品) 板에 既知糖 xylose, arabinose, glucose, galactose 등과 함께 點으로 찍어 濾過紙는 溶媒系Ⅶ로 Avicel SF 板은 溶媒系Ⅷ로 展開하였으며 分離效果를 높이기 위하여 各各 同一한 溶媒로 3回 展開하였다. Avicel SF 板은 Avicel SF 10g에 蒸溜水 35ml을 加하여 잘 섞어서 유리板에 얇게 바른 後 2~3時間 두어 어느정도 바른 後 70°C 恒溫器에서 20分間 乾燥하여 使用하였다. 展開가 끝난 濾過紙와 TLC 板에 aniline hydrogen phthalate¹⁵⁾ 試藥(0.93g aniline과 1.66g

Table 1. Solvent systems for the chromatography.

Solvent	Composition	Proportions (v/v)	Layer used
I	Acetic acid—water—conc. HCl	15 : 82 : 3	miscible
II	n-Butanol—acetic acid—water	4 : 1 : 5	upper
III	Formic acid—conc. HCl—water	5 : 2 : 3	miscible
IV	Acetic acid—water—conc. HCl	30 : 10 : 3	miscible
V	conc. HCl—water	1 : 99	miscible
VI	Ethyl acetate—formic acid—water	80 : 15 : 15	miscible
VII	n-Butanol—pyridine—water	6 : 3 : 1	miscible
VIII	n-Butanol—pyridine—water	6 : 3 : 3	miscible
IX	Benzene—acetic acid—water	2 : 2 : 1	upper
X	Benzene—methanol—acetic acid	90 : 16 : 8	miscible

phthalic acid를 100ml 水飽和 n-butanol에 녹였다)을 噴霧하고 105°C에서 10分間 加熱하여 發色시켰다.

5. Aglycone의 確認

精製된 各色素를 試驗管中에서 2ml의 1N HCl과 함께 brine bath 中에서 30分間 加熱한후 karrer¹⁶⁾ 등의 方法에 따라 15% BaOH₂ 현탁液 5ml을 加하여 brine bath 中에서 30分間 加熱하였다. 分解物을 冷却시킨 후 濃 HCl 2ml을 加하고 每回 5ml의 ethyl ether로 3回 抽出시켰다. 抽出한 ethyl ether를 모아 水洗한 다음 濃縮하여 Avicel SF板에 既知化合物 phloroglucinol, protocatechuic acid, vanillic acid, gallic acid, syringic acid, p-hydroxy benzoic acid 등과 함께 點으로 찍어 溶媒系 IX와, X으로 展開하였다. 展開가 끝난 TLC板에 diazotized p-nitroaniline 試藥(2N HCl에 0.3% p-nitroaniline을 녹인 溶液 10ml, 5% NaNO₂ 溶液 1ml와 20% CH₃COONa 溶液 20ml를 使用前에 混合하였다)을 噴霧하여 發色시켰다. 그후 ammonia를 찍어서 色變化를 觀察하였다.

6. Anthocyanin과 Aglycone의 Paper Chromatography

7種의 分離된 anthocyanin을 Whatman No. 1 濾過紙에 點으로 찍어 溶媒系 I, II, III, V로 各各 展開하였다. 그리고 aglycone으로서 anthocyanin을 酸加水分解하여 얻어진 aglycone의 iso-amyl alcohol 溶液을 點으로 찍어 溶媒系 I, II, III, IV로 各各 展開하였다. 展開가 끝난 各色素의 R_f值를 測定하고 Smith⁷⁾ 등의 方法에 따라 5% AlCl₃ ethanol 溶液을 噴霧하여 變色 與否를 觀察하였다.

7. 可視部 吸收 Spectra

各色素들을 0.01% HCl methanol에 溶解시켜 自動記錄 spectrophotometer(Shimadzu U.V. 200)

로 吸收曲線을 求하였다. 한편 色素溶液이 들어있는 吸收 cell에 5% AlCl₃ ethanol 溶液 5滴을 加하여 吸收極大波長의 移動與否를 測定하였다.

III. 結果 및 考察

1. 個別 色素의 分離

머루 色素 抽出液을 溶媒系 III으로 展開시켜 Fig. 1의 A에서와 같이 5個의 色素帶로 分離하였다. 이 중 2, 3, 4번 등 세 色素帶에는 各各 두 色素가 重複

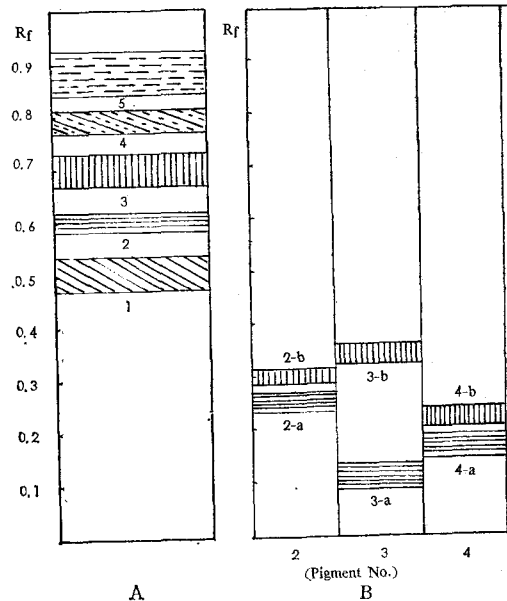


Fig. 1. Paper chromatograms of anthocyanin pigments in wild vines.

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)

되어 있었는데, 이 세 색소들을 용媒系Ⅱ로 다시 展開시키므로써 Fig. 1의 B에서와 같이 明瞭하게 分離할 수 있었다. 이리하여 얻어진 8가지의 색소들은 용媒系Ⅵ를 사용하여 Silica-gel TLC에 의하여 純粹함을 確認하였다.

2. 結合糖의 確認

配糖體 색소의 部分 酸加水分解에 의하여 얻어진 分解物의 斑點의 數에 따라서 結合糖의 殘基數와

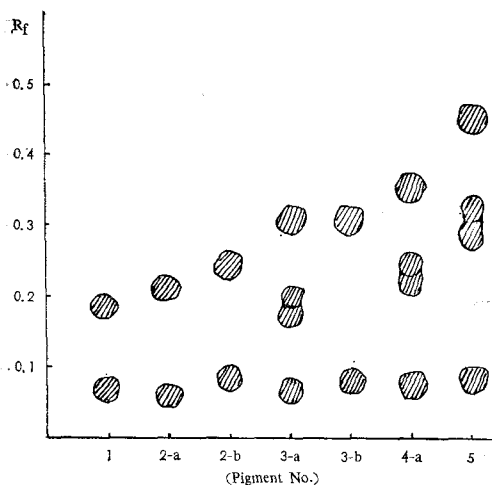


Fig. 2. Partial acid hydrolysis of anthocyanin pigments isolated from wild vines. Developing solvent: acetic acid—water—conc. HCl (15 : 82 : 3).

그 結合狀態를 알 수 있다. Fig. 2에서와 같이 색소 1, 2-a, 2-b, 3-b로부터는 두 斑點이 얻어진 것으로 보아 monoside 配糖體임을 알 수 있고, 색소 3-a, 4-a, 5는 세 斑點으로 보였으나, 紫外線을 照射하여 본 結果, 中間의 斑點에 두 點이 이웃하고 있음을 觀察하였다. 그러므로 이들 색소는 3,5-bioside 配糖體임을 알 수 있다. 이것은 E 440과 Emax의 比에 있어서도 Harborne³⁾의 結果와 거의 一致되었다.

各 색소의 完全 酸加水分解로 얻어진 糖은 paper chromatography와 Avicel SF TLC에 의하여 Table 2에서와 같이 R_f值과 R_g值가 모두 既知糖 glucose와 同一하였다. 그러므로 各 색소에 結合된 糖은 glucose임이 確認되었다.

그러나 結合糖의 chromatogram 上에서 모두 arabinose가 檢出되었는데, 이것은 artifact로서 이와같은 事實은 일찌기 Harborne에 의하여 보고된 바 있다. Harborne²⁾은 색소를 paper chromatography로 展開하여 分離시킬 때 색소와 結合한 糖의 一部가 展開溶媒로 使用한 鑛酸과 反應하여 arabinose로 變한다고 報告하였다. 本實驗에서 Amberlite 이온 交換樹脂를 通過시켜 얻은 原 色素液을 paper chromatography를 거치지 않고 직접 酸加水分解시켜 얻은 糖을 分離한 結果 arabinose가 檢出되지 않았다.

Table 2. R_f and R_g values of the sugar moiety in wild vines anthocyanins.

Sugar	Paper chromatography n-butanol-pyridine-water (6 : 3 : 1) threefold development		Avicel SF T.L.C. n-butanol-pyridine-water (6 : 3 : 3) threefold development	
	R _f value	R _g value	R _f value	R _g value
Pigment 1	0.33	1	0.52	1
2-a	0.33	1	0.52	1
2-b	0.33	1	0.52	1
3-a	0.33	1	0.52	1
3-b	0.33	1	0.52	1
4-a	0.33	1	0.52	1
5	0.33	1	0.52	1
galactose	0.27	0.8	0.44	0.86
glucose	0.33	1	0.52	1
arabinose	0.42	1.25	0.58	1.12
xylose			0.67	1.30

3. Aglycone의 確認

各 색소들의 15% BaOH₂ 溶液으로 分解하여 얻어진 分解物들을 Avicel SF 板에 既知化合物과 並行하여 용媒系Ⅱ, X으로 展開하여 얻은 斑點의

R_f值과 發色試藥에 의해 나타난 색 및 ammonia氣體에 의한 색의 變化를 Table 3에 表示하였다. 색소 1, 3-a에서는 phloroglucinol과 gallic acid가 檢出되었으므로 이 색소의 aglycone은 delphinidin

Table 3. R_f values and color characteristics of alkaline degradation Products.^a

Pigment	R _f value		Color		Identification
	Benzene: Acetic acid: Water (2 : 2 : 1)	n-Butanol: Methanol: Acetic acid (90 : 16 : 8)	DPNA	DPNA + NH ₃	
1	0.01	0.10	yellow	tan-gray	Gallic acid
2-a	0.10	0.45	reddish tan	purple	3-o-Methylgallic acid ^b
2-b	0.05	0.4	tan	purple	Protocatechuic acid
3-a	0.01	0.11	yellow	tan-gray	Gallic acid
3-b	0.71	0.83	orange	navy purple	Syringic acid
4-a	0.09	0.43	tan	purple	3-o-Methylgallic acid ^b
5	0.72	0.83	orange	navy purple	Syringic acid
Authentic compound Gallic acid	0	0.11	yellow	tan gray	
Protocatechuic acid	0.05	0.42	tan	purple	
p-hydroxy benzoic acid	0.27	0.54	pale yellow	purple	
Vanillic acid	0.79	0.85	yellow	dark purple	
Syringic acid	0.72	0.83	orange	navy purple	
Phloroglucinol	0.01	0.30	orange red	dark orange	

a. Phloroglucinol was detected in all the degradation products.

b. Authentic compound was not used for comparison.

임을 알 수 있었고 色素 2-a, 4-a 에서는 phloroglucinol과 3-o-methylgallic acid가 檢出되었으므로 petunidin으로 생각되고 色素 2-b 에서는 phloroglucinol과 protocatechuic acid가, 色素 3-b와 5 에서는 phloroglucinol과 syringic acid가 얻어졌으므로 色素 2-b의 aglycone은 cyanidin이고 色素 3-b와 5의 aglycone은 malvidin임을 알 수 있었다. 既知의 3-o-methylgallic acid는 本實驗에서 얻을 수 없었으므로 Smith 등⁷⁾과 Rafael⁸⁾ 등의 R_f 値와 發色試藥에 의한 色과 ammonia 氣體에 의한 色의 變化에 의해 確認하였다. 한편, anthocyanidin의 B環의 ortho-phenol OH 基를 갖는 色素의 確認에 이용하였던 Geissman²⁰⁾의 AlCl₃ test에 의하여, 試驗한 結果는 Table 6 에서와 같이 1, 2-a, 2-b, 3-a, 4-a 는 靑變하였으나, 色素 3-b, 5 는 變하지 않았다.

4. Anthocyanin과 Aglycone의 Paper Chromatography.

各 anthocyanin과 aglycone을 各種 溶媒系로 展開시켜 얻은 R_f 値를 Table 4, 5에 表示하였다.

各 色素의 R_f 値를 Harborne²⁾, Abe⁴⁾, Somaatmadja⁵⁾ 등의 R_f 値와 比較하여 보면 값이 적은 delphinidin 같은 色素의 R_f 値는 비슷하나 R_f 値가 큰 色素일수록 차이가 컸다. 이것은 paper chromatography 時의 條件의 差異에 基因하는 것 같다. 그러나 個別 色素의 R_f 値의 相對的인 값은 비교적 같으므로

Table 4. R_f values of anthocyanins isolated from wild vines.

Pigment	Solvent	Solvent	Solvent	Solvent
	I	II	III	V
1	0.18	0.26	0.45	0.03
2-a	0.22	0.26	0.56	0.04
2-b	0.27	0.31	0.56	0.05
3-a	0.30	0.12	0.71	0.04
3-b	0.30	0.34	0.71	0.05
4-a	0.36	0.17	0.75	0.07
5	0.46	0.27	0.89	0.13

Table 5. R_f values of anthocyanidins (aglycones).

Pigment	Solvent	Solvent	Solvent	Solvent
	I	II	III	IV
1	0.06	0.50	0.07	0.27
2-a	0.05	0.51	0.22	0.42
2-b	0.08	0.59	0.23	0.44
3-a	0.06	0.50	0.10	0.29
3-b	0.08	0.61	0.30	0.60
4-a	0.07	0.51	0.21	0.43
5	0.08	0.61	0.29	0.60

相互間的 比較에 의하여 色素의 構造確認에 도움이 되었다.

5. 可視部 吸收 Spectra

各 色素의 0.01% HCl methanol 溶液에서의 吸收極大波長과 AlCl₃에 의한 吸收極大波長の 移動

Table 6. Absorption peak and characteristics of anthocyanins isolated from wild vines.

Pigment	λ max	E 440/E max(%)	AlCl ₃ Reaction
1	541	20	+
2-a	540	21	+
2-b	530	25	+
3-a	537	14.2	+
3-b	538	23.4	-
4-a	536	11	+
5	536	13	-

및 E 440과 E max의 비등은 Table 6과 같다.

Harborne³⁾이 얻은 수値와 比較하면 모든 色素의 吸收極大波長이 약간 차이가 있으나 Smith⁷⁾등과 Albach⁸⁾등의 수値와는 거의 一致하였다. Harborne³⁾은 440nm에서의 吸光度와 吸收極大波長(λ max)에서의 吸光度의 비는 3位 配糖體와 5位 配糖體 間에 뚜렷한 差異가 있으며 5位 配糖體의 값은 遊離狀態의 5-OH基를 갖는 同一 anthocyanin 값의 約 半이 된다고 報告하였다. Table 6에서 보는 바와 같이 色素 3-a, 4-a, 5의 E 440/E max의 값은 各各 14.2, 11, 13 이므로 이 色素들은 3,5-diglucoside 配糖體임을 알 수 있다. 本 實驗에서 芻中에서 確認된 anthocyanin 들을 Table 7에 要約하여 들어 두었다.

Table 7. The identified anthocyanins in wild vines.

Pigment No.	Structure
1	Delphinidin 3-monoglucoside
2-a	Petunidin 3-monoglucoside
2-b	Cyanidin 3-monoglucoside
3-a	Delphinidin 3,5-diglucoside
3-b	Malvidin 3-monoglucoside
4-a	Petunidin 3,5-diglucoside
4-b	Cyanidin 3,5-diglucoside like
5	Malvidin 3,5-diglucoside

IV. 要 約

우리나라의 山間地方에 野生하는 芻中의 anthocyanin의 構造를 確認하였다.

芻中에서 0.5% HCl methanol로 抽出하여 얻은 色素 抽出液을 Amberlite IRC-50 이온 交換樹脂管을 通過시켜 精製하고, paper chromatography에 의하여 個別色素를 分離하였다. 各 個別色素에 대하여 部分 酸加水分解, 結合糖의 確認試驗, aglycone

의 alkali 分解, paper chromatography에서 얻어진 R_f值, 可視部에서의 吸收 spectra 測定 등에 의하여 構造를 確認하였다. 確認된 芻中의 7가지 色素는 delphinidin 3-monoglucoside, petunidin 3-monoglucoside, cyanidin 3-monoglucoside, delphinidin 3,5-diglucoside, malvidin 3-monoglucoside, petunidin 3,5-diglucoside 및 malvidin 3,5-diglucoside 이었으며 cyanidin 3,5-diglucoside로 추측되는 色素 4-b는 確認되지 못하였다.

參 考 文 獻

- 1) Bate-Smith, E. C.; Nature, **161**, 835 (1948).
- 2) Harborne, J. B.; J. Chromatog. **1**, 473(1958).
- 3) Harborne, J.B.; Biochem. J. **70**, 22 (1958).
- 4) Abe, Y., and Hayashi K.; Botan. Mag. (Tokyo) **69**, 577 (1956).
- 5) Somaatmadja, D., and Powers J. J.; J. Food Sci. **28**, 617 (1963).
- 6) Rafael, C. D., and Luh B. S.; J. Food Sci., **34**, 415 (1969).
- 7) Smith, R. M. and Luh B. S.; J. Food Sci. **30**, 995 (1965).
- 8) Albach, R. F. and Webb A. D.; J. Food Sci., **30**, 69 (1965).
- 9) Philip, T.; J. Food Sci. **39**, 449 (1974).
- 10) Sakellariades, H. C. and Luh B. S.; J. Food Sci. **39**, 329 (1969).
- 11) Ribéreau-Gayon, J. and Ribéreau-Gayon, P.; Am. J. Enol. **9**, 1 (1958).
- 12) Rankine, B. C., Kepner, R. E. and Webb A. D.; Am. J. Enol. **9**, 105 (1958).
- 13) Albach, R. F., Kepner, R. E. and Webb A. D.; Am. J. Enol. Viticult. **10**, 164 (1959).
- 14) Morris, Q. L., Gage, T. B., and Wender, S. H.; J. Am. Chem. Soc. **73**, 3340 (1951).
- 15) Partridge, S. M.; Nature **164**, 443 (1949).
- 16) Karrer, P., and Widmar R.; Helv. Chim. Acta **10**, 5 (1927).
- 17) Swain, T.; Biochem. J. **53**, 200 (1953).
- 18) Lynn, D. Y. C., and Luh B. S.; J. Food Sci. **29**, 735 (1964).
- 19) Luh, B. S., Stachowicz, K. and Hsia C. L.; J. Food Sci. **30**, 300 (1965).
- 20) Geissman, T. A.; Modern Methods of Plant Analysis Vol. III. (1955)