

나무딸기 Anthocyanin에 관한 연구

주광지, 박정미

계명대학교 이공대학 식생화과
(1983년 1월 5 일수리)

Studies on Identification of the Anthocyanins in Raspberries

Kwang Jee Joo and Jung Mi Park
Science and Engineering College, Keimyung University
Daegu, Korea
(Received January 5, 1983)

Abstract

The anthocyanins isolated from raspberries, were studied by column chromatography on polyvinylpyrrolidone, paper chromatography, total hydrolysis, partial hydrolysis, color classification and spectroscopy.

Four individual pigments were identified as cyanidin 3 digalactoside with caffeic acid, cyanidin 3 diglucoside with caffeic acid, cyanidin-3,5-diglucoside with caffeic acid and cyanidin-3-monoglucoside with caffeic acid, respectively.

序論

우리나라에 分布되어 있는 나무딸기의 주요계통은 16種이며¹⁾, 有望視되고 있는 것은 5系統으로 *Rubus Crataegifolius*, *R. Coreanus*, *R. Parvifolius*, *R. corcholifolius*, *R. Corceacantha* 등이다. 이중에서 *R. Crataegifolius*는 果汁이 많고 濃赤色으로서 비교적 다른 種보다 우수하다²⁾. 대체로 나무딸기 anthocyanin에 대한 報文은 稀小한데 Torre와 Barritt³⁾가 *Rubus*류에 관하여 보고한 바에 의하면 *R. Crataegifolius*에는 cyanidin-3-glucoside와 pelargonidin-3-glucoside가 함유되어 있다고 보고하였다.

본 연구자는 우리나라 남부지방에서 생산되는 나무딸기 주요품종인 *R. Crataegifolius*의 果汁色素를 분리하여 개별색소를 확인하였기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

濃赤色의 나무딸기 (*R. Crataegifolius*)로써 경남

진주 고려식품주식회사로부터 寄贈받은 果粒을 사용하였다.

2. 方 法

1) Anthocyanin의 抽出 및 精製

원과즙에 포화염기성 초산납처리를 하여 前報⁴⁾와 동일한 방법으로 색소를抽出하였다.

2) 개별색소의 分離

개별색소의 수를 確認하기 위하여 avicel cellulose를 도포한 TLC에 정제한 색소액을 점찍어 2차전개 (i-BAW, AWH) 시켜서 개별색소의 수를 確認하였다.

확인된 개별색소의 分取를 위하여 不溶性 polyvinylpyrrolidone(PVP)를 혼탁시켜 上澄液을 20회 세척 세거⁵⁾한 후 column(4.2×30)에 充填시켜 탈이온수로 세척하였다. 이 column에 정제된 색소액 250 ml를 流入시켜 다시 세척하고 0.1%HCl-80% ethanol로 전개하여 fraction collector로 용출액을 3 ml씩 分取하였으며 吸光度는 520nm에서 측정했다. 이때 얻은 개별 색소는 진공 진조기로 乾固시켜 사용

하였다.

3) Aglycone과 糖

乾固시킨 개별색소를 0.01N HCl-MeOH로 녹인 2ml 용액에 2N HCl 2ml를 가하고 냉각관을 부착 시켜 질소가스 통과하에서 80°C, 30분간 가열 냉각 시킨 후 isoamylalcohol 을 1ml씩 3회 加하여 aglycone 부분을抽出하고 증류수로 세척한 후濃縮하였다⁶⁾. 이 추출 용액에 포화 Ba(OH)₂를 2ml 가하여 역시 냉각관을 부착시켜 질소가스를 加하면서 100°C에서 30분간 가열하고 열음물로 냉각시킨 후 2N HCl로 중화시켰다⁷⁾.

다시 ethyl ether를 10ml씩 3회 加하여 aglycone 부분을 추출하고 증류수로 세척한 후 농축하였다. 몇방울의 물을 加하여 기지물질인 vanillic acid, syringic acid, gallic acid, protocatechuic acid, p-hydroxy benzoic acid, phloroglucinol 등을 사용하여 2%HOAc BAW로 PPC를 실시하고 aglycone을 확인했다. 발색제로는 DPNA와 20% Na₂CO₃를 사용했다.

당용액은 aglycone을 제거한 용액에 ethylether로 3회 세척 불순물을 제거하고 1ml의 chloroform으로 두 번 세척하여 잔여 amine을 제거하였으며 질소가스 通氣下에서濃縮 후 소량의 물에 용해시켰다. 기지의 당인 glucose, xylose, galactose, rhamnose, arabinose로 PPC를 행하였다.

4) Acyl 基

색소 2~3mg을 2ml의 methanol에 녹여서, 2N NaOH 1ml 加하여 질소를 충진시킨 후 실온에 2시간 방치하고 2N HCl 1.5ml로 중화시켰다. 유기 산 부분은 10ml의 ethyl ether로 3회抽出하여 증류수로 2회 세척하고 질소공기 通氣下에서 농축, 몇방울의 에테르로 녹여 PPC를 행하였다. 이때 사용된 표준품은 p-coumaric acid, chlorogenic acid,

caffeiic acid, ferulic acid였으며 전개용매는 BAW, 2% HOAc를 사용했다. 그리고 발색제로는 DPNA와 20%Na₂CO₃를 사용했다.

5) 酸部分 加水分解

色素 1~2mg을 2ml의 2N HCl을 가하여 水浴槽上에서 가온하면서 0, 1, 2, 5, 10, 15, 25, 30분 그리고 45분에 각각 색소액 0.2ml씩을 채취 냉각시킨 후 PPC를 행하였다⁸⁾. 전개용매로 BAW와 AWH를 사용했다.

6) 分光学의 方法

자외 및 가시 吸收 spectra로서 個別色素의 極大吸收波長과 5% AlCl₃에 의한 波長의 이동을 测定했다.¹⁰⁾

溶媒는 0.01%HCl-MeOH로서 Beckman model 26, Shimadzu UV-100-01 spectrophotometer를 사용했다.

結果 및 考察

1. 個別色素의 分離

개별색소의 수를 確認하기 위하여 avicel S. F. cellulose를 도포한 TLC에 색소를 2차 전개시킨結果를 Fig. 1에 표시했다.

4개의 斑點이 나타났으며 상승순위에 따라 아래로부터 1, 2, 3, 4라고 번호를 붙였다. 이상의 4개의 色素는 UV조사에서 형광을 발하였고 molybdate 시약에 푸른색으로呈色하였으므로 分離된 개별색소 1, 2, 3, 4는 acyl화된 색소이며 anthocyanin의 B 환에 수산기를 2개 갖고 있는 cyanidin이나 delphinidin, petunidin으로推定되었다.

상기 확인된 개별색소를 分取하기 위하여 PVP를 충진시킨 column에 色素液을 용출시켜 3ml씩 分

Table 1. Solvent systems used in chromatography

Composition (abbreviation)	Proportion(v/v)	Solvent used for	Phase used
Isobutanol-acetic acid-water (i-BAW)	8 : 2 : 3	Anthocyanin	Miscible
Acetic acid-water-HCl (AWH)	15 : 82 : 3	Anthocyanin	Miscible
Butanol-acetic acid-water (BAW)	4 : 1 : 5	Anthocyanidin, Sugar	Upper phase
Acetic acid-water (2% HOAc)	2 : 98	Anthocyanidin	Miscible
Butanol-pyridine-water (BPW)	6 : 3 : 1	Sugar	Miscible
Butanol-formic acid-water (BFW)	100 : 25 : 60	Anthocyanin	Upper phase

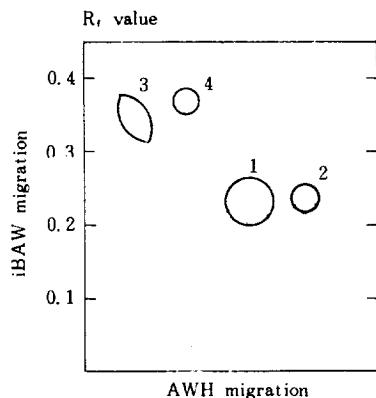


Fig. 1 Two-dimentional thin-layer chromatogram of anthocyanins in raspberries.

画한結果 Fig. 2의 A에서 보는 바와 같이 4개의 peak를 얻었으며 용출순서에 따라 이를 각각 1, 2, 3, 4라고 번호를 붙여서 分取하고 이 4개의 개별

색소를 點찍어 展開溶媒 BFW를 사용하여 PPC를 행한 결과를 Fig. 2의 B에 나타내었다.

이 分離된 개별색소 1, 2, 3, 4의 PPC R_f 값의 결과는 개별색소의 수를 확인하기 위하여 행한 TLC의 개별색소 1, 2, 3, 4의 R_f 값보다 다소 높았으나 이는 TLC와 PPC의 분리기능의 차이라고 생각되어 진다. 이 두 물질의 상태적 R_f 값과 色調, molybdate 시약의 반응 등으로 보아 個別色素 1, 2, 3, 4 (Fig. 1)은 fraction collector로부터 分取한 4개의 색소 (Fig. 2의 B)와 동일 물질임이 확인되었다.

2. Aglycone과 糖

個別色素의 알카리 加水分解物로부터 抽出한 aglycone을 PPC시킨 결과 R_f 값과 色調는 Table 2와 같다. 전개용매 BAW에서는 각 개별색소에서 분리된 2點이 관찰되어 졌는데 표준품의 R_f 값인

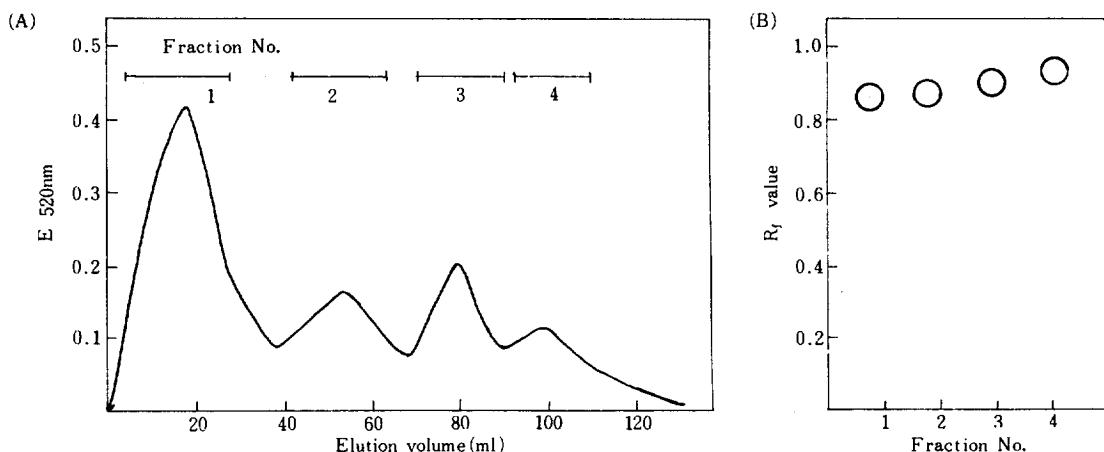


Fig. 2 Column chromatogram on polyvinylpyrrolidine of anthocyanins from raspberries (A) and paper chromatogram of four pigment fraction (B)

Table 2. R_f values and color characteristics of alkaline degradation products

Pigment	R_f values BAW 2%HOAc	Color DPNA + Na ₂ CO ₃	Identification
1	0.90 0.50	Pink-brown	Protocatechuic acid
	0.81 0.59	Pale-brown	Phloroglucinol
2	0.90 0.50	Pink-brown	Protocatechuic acid
	0.81 0.59	Pale-brown	Phloroglucinol
3	0.90 0.50	Pink-brown	Protocatechuic acid
	0.81 0.59	Pale-brown	Phloroglucinol
4	0.90 0.50	Pink-brown	Protocatechuic acid
	0.81 0.59	Pale-brown	Phloroglucinol
Phloroglucinol	0.81 0.59	Pale-brown	
Protocatechuic acid	0.90 0.50	Pink-brown	
Vanillic acid	0.96 0.55	Violet	
p-OH benzoic acid	0.97 0.64	Blue-orange	
Gallic acid	0.76 0.43	Blue-brown	
Syringic acid	0.93 0.53	Yellow	

0.81의 phloroglucinol과 0.90인 protocatechuic acid와 동일했고 전개용매를 2%CH₃COOH를 사용했을 때 분리된 두 점은 역시 표준품의 R_f값인 0.59의 phloroglucinol과 0.50인 protocatechuic acid와 동일했다. 또한 DPNA와 20% Na₂CO₃를 분무했을 때 phloroglucinol은 연한 갈색, protocatechuic acid는 미赤褐色으로 변하였으며 각 개별색소에서 분리된 두 점도 동일하게 변색되었다. 이 결과로 개별색소 1, 2, 3, 4는 각각 aglycone이 cyanidin임이 확인되어졌다.

結合糖을 알기 위하여 가수분해 용액으로부터 분리된 糖溶液을 기지의 당과 PPC한 결과를 Table 3에 표시하였다. BAW전개용매에서는 용매 기능을 높이기 위하여 2회 전개하였으며 1회 전개한 것, 2회 전개한 것 모두에 있어서 개별색소 1은 galactose 2, 3, 4 번은 glucose로 판찰되었다.

Table 3. R_f value of sugar moiety in the raspberry anthocyanin

Sugar	BAW(1)	BAW(2)	BPW	Identification
Pigment 1	0.19	0.33	0.22	Galactose
2	0.25	0.38	0.24	Glucose
3	0.25	0.38	0.24	Glucose
4	0.25	0.38	0.24	Glucose
Galactose	0.19	0.33	0.22	
Glucose	0.25	0.38	0.24	
Arabinose	0.26	0.44	0.31	
Xylose	0.33	0.46	0.28	
Rhamnose	0.38	0.61	0.40	

BAW (1) : Development one time

BAW (2) : Development two time

또한 BPW 용매계에 있어서도 개별색소 1번은 galactose, 2, 3, 4 번은 glucose와 R_f값이 동일하였으므로 개별색소 1의 결합당은 galactose 개별색소 2, 3, 4는 glucose가 결합되어 있음이 확인되었다. BPW용매계로 사용하였을 때는 galactose, glucose의 R_f값의 차이가 근소하였으나 반점의 형태가 뚜렷하며 육안으로도 분명히 구분되었다. 발색제는 aniline hydrogen phthalate를 사용했으며 진한 갈색으로 발색되었다.

3. Acyl 基의 變化

개별색소에서 분리추출한 용액으로부터 유기산 분자를 확인하기 위하여 기지의 유기산과 더불어 PPC를 행한 결과를 Table 4에 나타내었다.

개별색소 1, 2, 3, 4는 전개용매 BAW와 2%HOAC에서 R_f값이 0.87과 0.25로써 표준물질인 caffeic acid와 R_f값이 일치하였다. 또한 NH₃ 가스를 죄었을 때 변화는 없었고 DPNA를 분무하였을 때 황갈

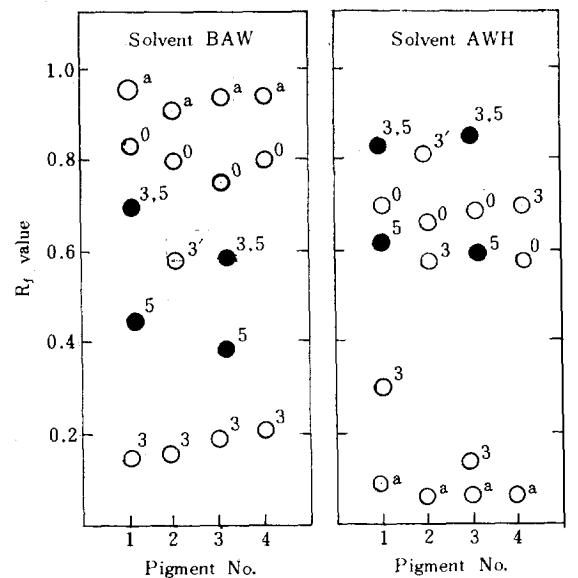
색으로 변하였으며 UV light下에서 각각 푸른 형광을 나타내었다.

이상의 결과로 개별색소 1, 2, 3, 4는 모두가 유기산으로 caffeic acid와 결합되어져 있다는 것을 확인하였다.

4. 酸部分 加水分解의 結果

配糖體에 결합되어 있는 당의 수와 결합형태를 확인하기 위하여 4개의 개별색소를 염산에 의한 부분분해를 했으며 각각 일정한 시간에 용액을 채취하여 PPC를 행하였다.

가수분해 시간이 경과함에 따라 색소와 당이 분해되고 aglycone만이 남게 되었는데 이중 분해시작 후 25분에 채취한 용액이 각개별색소의 분해물들이 가장 잘 나타났으므로 이 결과를 Fig. 3에 나타내었다.



a: aglycone, 3: 3-glycoside, 5: 5-glycoside, 3, 5: 3, 5-diglycoside,
0: original pigment ●: fluorescent pigment

Fig. 3 Paper chromatograms of partial hydrolysis products of anthocyanins in raspberries.

전개용매는 유기성인 BAW와 수용성인 AWH를 사용했으며 유기성 용매일 때 수용성인 경우보다 각 분해물질의 R_f값이 더 높았으며 aglycone의 R_f값은 서로 逆轉되어졌다. 이 결과를 太田 등^{14, 15)}의 보고와 일치하였다. UV light下에서 형광을 발하는 색소는 anthocyanin A 환에 C₅-OH에 당이 결합되어 있으며^{9, 10)} 3 혹은 5-monoside는 색소와 aglycone의 두 점으로 분리되며 3-bioside는 색소와 monoside, aglycone의 3 점, 3, 5-dimonoiside는 색소, 두개의 monoside, aglycone의 4 점으로 나타나며 acyl

Table 4. R_f values and color characteristics of the acyl group of raspberry.

Acyl group	R_f values BAW 2% HOAc	Color with DPNA + Na ₂ CO ₃	Identification
Pigment 1	0.86	0.25	Yellow-brown
2	0.86	0.25	Yellow-brown
3	0.87	0.25	Yellow-brown
4	0.87	0.25	Yellow-brown
p-Coumaric acid	0.97	0.36	Tan
Chlorogenic acid	0.70	0.59	Purple
Caffeic acid	0.87	0.25	Yellow-brown
Ferulic acid	0.93	0.30	Blue-brown

화 색소일 때는 각각 중간 생성물인 3MG, 3DG, 3,5DG의 1점씩 더 나타난다는 보고가^{9, 10, 11, 12)} 있다. 그러므로 각 개별색소는 전부 cafferic acid를 유기 산으로 가진 색소로 1번은 3,5-digalactoside, 2번은 3-diglucoside, 3번은 3,5-diglucoside, 4번은 3-monoglucoside라고 확인하였다. Fig. 3에 나타난 당류의 R_f 값이 상호간에 반드시 일치하지 않았으나 이를 각각 다른 조건으로 PPC 행하여 그 결과를 한곳에 취합하였으므로 다소의 차이가 있다고 생각되며 형광이나 색소에 따라 각 糖의 斑點物質을 3-glucoside, 5-glucoside, 3,5-diglucoside라고 추정할 수 있었다^{14, 15)}.

5. 分光学的 確認

각 개별색소를 0.01% HCl-MeOH에 용해하여吸光度를 측정한 결과는 Table 5와 같다. 각 개별색소는 273nm에 특징적인吸光度를 나타내어서 cafferic acid의 존재¹⁰⁾를 확인하였으며 역시 acyl화된 기의 특징적인 두 개의 273nm, 304nm의 peak를 나타내었다. AlCl₃를 몇 방울 加하므로 Vis λ_{max} 가 이동함으로써^{14, 15, 16)} aglycone이 cyanidin임을 다시 확인하였다.

이상의 모든 결과로 개별색소 1번은 cyanidin-

3,5-digalactoside with caffeic acid, 2번은 cyanidin-3-diglucoside with caffeic acid, 3번은 cyanidin-3,5-diglucoside with caffeic acid, 4번은 cyanidin-3-monoglucoside with caffeic acid라는 사실을 確認하였다.

要 約

나무딸기 果汁色素를 포화염기성 초산 납처리를 하여 色素를 抽出하고 polyvinylpyrroldione을 充填시킨 column에 색소를 流入시켜 fraction collector로 分離하여 4개의 個別色素을 分離, 真空乾燥시켜 乾固시켰으며 각 개별색소에 대해 糖, aglycone 酸部分 加水分解, acyl기, 分光学的인 성질 등의 실험결과에 의하여 anthocyanin의 구조를 確認하였다. 개별색소 1은 cyanidin-3, 5-digalactoside with caffeic acid 2번은 cyanidin-3-diglucoside with caffeic acid 3번은 cyanidin-3,5-diglucoside with caffeic acid 4번은 cyanidin-3-monoglucoside with caffeic acid로 同定하였다.

文 献

Table 5. Spectral absorption characteristics of individual anthocyanins

Pigment	λ_{max} (nm)	AlCl ₃ shift
1	274 304 528	+
2	274 304 525	+
3	273 304 528	+
4	273 304 530	+

Table 6. Result of identification of anthocyanins in raspberries.

Pigment	Name of anthocyanins
1	Cyanidin-3-digalactoside with caffeic acid
2	Cyanidin-3-diglucoside with caffeic acid
3	Cyanidin-3,5-diglucoside with caffeic acid
4	Cyanidin-3-monoglucoside with caffeic acid

1. 임업시험장 한국수목도감 81(1966)
2. 나무딸기과집 농예시험장(농촌진흥청) (1968)
3. Torre Louis C. and Barritt Bruce H.: *J. Food Sci.*, **42**(2), 488(1977)
4. 박정미, 주광지 : 한국영양식량학회지, **11**(3), 67(1982)
5. 太田英明, 芥田三郎, 白石貞一, 磯島豊 : 日本食品工業学会誌, **25**(8), (1978)
6. Philip Thomas: *J. Food Sci.*, **39**, 449(1974)
7. Dekazos Elias D.: *J. Food Sci.*, **35**(237)(1970)
8. Du C. T. and Francis F. J.: *J. Food Sci.*, **38** 810(1973)

9. Puech A., Constantine A., Cattin Rebeiz B and Crane Tulianc: *J. Food Sci.*, **40**, 775 (1975)
10. Sakellariades H. C. and Luh B. S.: *J. Food Sci.*, **39**, 329 (1974)
11. Tibor Fuleki: *J. Food Sci.*, **36**, 101 (1971)
12. 太田英明, 篠島豊: 日本 果汁協会報, **25**, 1, 11 (1978)
13. 津久井亜紀夫, 桑野和民, 三田村敏男, 谷村和八郎: 日本 豊化誌, **51**(8), 41 (1977)
14. 芥田三郎, 松富直利: 日本食品工業学会誌, **23** (3), 101 (1976)
15. 芥田三郎, 松富直利: 日本食品工業学会誌, **23** (3), 108 (1976)
16. 松富直利, 山村益士, 太田英明, 篠島豊芥田三郎: 日本食品工業会誌, **24**(7) 342 (1977)
17. Lynn D. Y. C. and Luh B. S.: *J. Food Sci.*, **30**, 735 (1965)
18. 윤태현, 이상직, 김광수: 한국식품과학회지, **10** (2), (1978)