

오디에서 C3G(cyanidin-3-glucoside)의 분리, 동정 및 계통별 함량분석

김현복* · 김선림¹⁾
농업과학기술원 잠사곤충부, ¹⁾작물시험장

Identification of C3G(cyanidin-3-glucoside) from Mulberry Fruits and Quantification with Different Varieties

Hyun-Bok Kim*, and Sun-Lim Kim¹⁾

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agriculture Science and Technology,
Rural Development Administration, Suwon 441-100, Korea

¹⁾National Crop Experiment Station, Rural Development Administration, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to identify of C3G (cyanidin-3-glucoside) from mulberry fruits and quantify with different varieties. C3G of mulberry fruits was extracted with 1% HCl-MeOH and purified with open column (5×90 cm) which filled with Amberlite IRC-50 ion exchange resin. The λ_{max} ranges of the purified C3G on UV/Vis spectrum were 516 nm and 280 nm. Also, molecular weight of C3G from mulberry fruits by LC-Mass was determined as 449. From above results, we concluded that anthocyanin pigment of mulberry fruits was C3G only. The cyanidin-3-glucoside (C3G) was separated and quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system using a Nova-Pack C₁₈ column. Mean content of the 35 tested accessions was 0.89%. Also fruity characteristics as well as C3G content to select the desirable mulberry varieties for the production of fruit were researched and analyzed. We selected three suitable varieties such as 'Susungppong', 'Kangsun', and 'Jeolgokchosaeng (Chungpuk)'.

Key words : C3G, Cyanidin-3-glucoside, Anthocyanin, Mulberry fruit, Fruity characteristic

서 론

뽕나무 오디는 동의보감 탕액편(湯液篇)에 '까만 오디는 뽕나무의 정령(精靈)이 모여 있는 것이며, 당뇨병에 좋고 오장에 이로우며 오래먹으면 배고픔을 잊게 해준다(黑椹桑之精英 盡在於此 主消渴利五臟 久服不飢)'고 하고 '귀와 눈을 밝게 한다(明耳目)'라고 했으며, '오디를 오래 먹으면 백발이 검게 변하고 노화를 방지한다(久服 變白不老)'고 기록되어 있어 기능성에 있어서 기대가 되는 작물이다.

오디의 항당뇨 효능(김 등, 1996), 오디 품종간 안토시아닌 색소의 쥐적출 대동맥의 수축·이완작용 구명(박 등, 1997), 항산화·항염증 효능(김 등, 1998), 오디추출물의 콜레스테롤 억제효능(김 등, 2001), 분획물의 지질대사 및 간장기능에 미치는 영향(김 등, 2001; 김 등, 2002) 등 생리활성기능에 대해 보고되고 있다.

최근 anthocyanin 색소의 노화억제, 망막장애의 치료 및 시력개선 효과, 항산화 작용 등 다양한 생리활성이 보고

됨(Hong *et al.*, 1997)에 따라 뽕나무 오디에 다량 함유된 색소가 인체에 무해한 천연색소로서 뿐 만 아니라 기능성 소재로서의 가능성이 제시되고 있다.

3번 탄소에 당이 결합한 anthocyanin은 polyphenol 화합물인 flavonoid에 속하는 대표적인 천연색소로서 꽃, 과일(특히 베리류), 야채 등에 널리 분포하며 오렌지, 적색, 청색과 같은 밝은 색깔을 나타내는데, anthocyanin의 종류는 aglycone인 anthocyanidin에 결합된 당의 종류에 따라 결정된다. Anthocyanin은 광과 pH에 민감하고 각종 금속 이온들과 여러 가지 색깔을 나타내는 복합체를 형성하기도 하며 분해 효소, 혼합 성분, 탄닌의 공존 여부 및 색소의 농도에 따라서도 다른 색을 띤다. 이렇게 anthocyanin의 색깔이 불안정한 이유는 C환의 2번 탄소와 공유결합한 oxonium 구조 때문인 것으로 알려져 있다.

따라서 색소의 분리 및 정제가 어렵고, 조리 또는 가공 중에 쉽게 변색되며, 또한 식품의 보존제로 이용시 SO₂와 반응하며 단백질과 결합하여 침전물을 형성하는 문제점

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

등이 지적되고 있다(김 등, 1999).

그러나 뽕나무 오디에 다량 함유된 anthocyanin 색소는 C3G 단일물질로 존재하여 보다 안정적이고 분리 방법이 간단할 뿐 아니라, 과실 전체에 색소를 함유함으로써 함량이 높고 수율 또한 높을 것으로 기대되어 색소자원으로서 이용 가능성이 제시되고 있다(김 등, 2002; 김, 2003).

본 연구는 오디의 C3G에 대한 분리방법을 구명하고 분리된 C3G를 표준물질의 분자량과 비교·동정하였기에 보고하는 바이다. 또한 유전자원으로 보존되고 있는 뽕 품종 및 계통에 대한 C3G 함량을 분석하여 고품종 계통을 선발함으로써 오디생산용 뽕나무 품종 육성에 기여코자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 시험에 공시된 재료는 농업과학기술원 잠사곤충부 시험포장에 유전자원으로 보존되고 있는 뽕 품종(계통) 중 오디가 결실된 계통에 대하여 2002년 5월 27일~6월 17일 사이에 채취하였으며 즉시 -70°C 의 초저온 냉동고(ilShin DEEP FREEZER, ilShin Lab Co., Ltd)에 보관하였다. 각 계통별 C3G 정량시료는 -90°C 에서 동결 건조(ilShin VACUUM TRAY FREEZE DRYER, ilShin Lab Co., Ltd) 하여 사용하였다.

2. C3G(cyanidin-3-glucoside)의 추출 및 정제

동결 건조된 오디를 취하여 1%의 HCl을 함유한 methanol로 색소를 2회 추출하였는데, 색소 추출 효율을 높이기 위하여 진탕기를 이용하여 4°C 저온에서 색소를 추출 후 Buchner funnel로 흡인여과 하였다. 여과액은 35°C 이하에서 감압농축 후 ethylether:hexane(1:6, V/V) 용액으로 2회 세척하여 지질성분을 제거하였다. 이를 다시 slurry 상태로 농축하여 남아있는 ethylether와 hexane을 제거하였다.

지질이 제거된 색소 추출물은 Fuleki & Francis(1968 b) 및 Francis(1982)의 방법을 응용한 김 등(1999, 2000)의 방법에 따라 정제하였다. 즉 Amberlite IRC-50 ion exchange resin(ALDRICH, 428833)이 충전된 유리 column을 이온교환수로 충분히 세척한 후 5% HCl으로 column을 산성화시켰다. 산성으로 치환된 column을 1시간 방치한 후 다시 이온교환수로 중성이 될 때까지 세척하여 과량을 HCl을 제거함으로써 column의 세척 및 산성으로의 활성화를 마쳤다.

다음으로 색소 농축액을 Amberlite IRC-50 column에 적재하여 흡착시킨 후 이온교환수로 유출액의 색이 무색에 도달될 때까지 세척하여 비흡착색소, 수용성 당류, 유기산 및 아미노산 등을 제거하였다. 마지막으로 0.7% HCl-

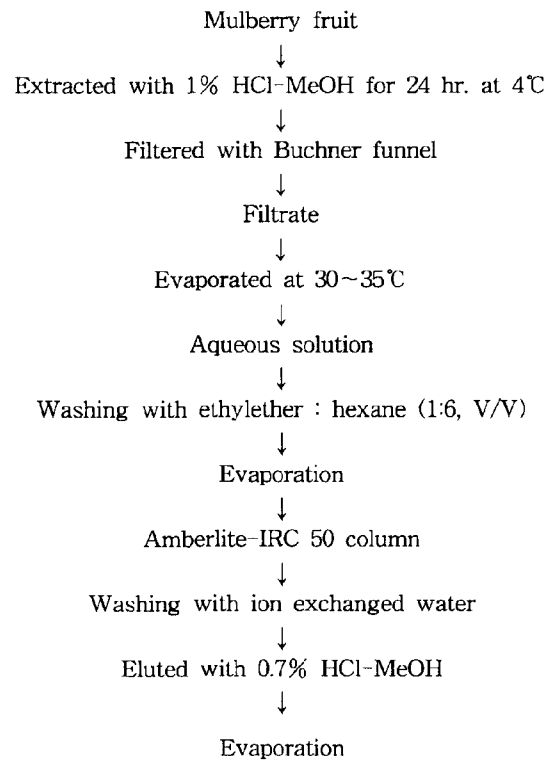


Fig. 1. Extraction and purification of C3G from mulberry fruit.

MeOH로 column에 흡착된 색소를 용출시켰으며 용출액을 40°C 에서 감압농축하여 분말상태로 정제된 색소물질 C3G(cyanidin-3-glucoside)를 얻었다. 그림 1과 2는 색소의 추출 및 정제과정을 나타낸 것이다.

3. LC-MASS에 의한 C3G의 흡수 Spectrum 및 분자량 확인

위 방법에 의해 정제된 C3G를 동정하기 위해 Waters 996 Photodiodes Array Detector를 이용하여 흡수 spectrum을 측정하였으며, LC-MASS(Waters 2690 alliance Separation Module)를 사용하여 분자량을 확인하였다.

4. 뽕나무 계통별 오디의 C3G(cyanidin-3-glucoside) 정량

Anthocyanin의 표준물질인 cyanidin-3-glucoside(C3G)와 HPLC chromatogram을 비교하여 계통별 함량분석을 실시하였다. 각 시료에 대한 C3G의 농도는 C3G 표준물질의 농도를 기준으로 면적비로 계산하였으며, anthocyanin 표준물질인 C3G는 Genay France 社로부터 구입하여 사용하였다.

지질이 제거된 각 계통별 오디의 색소 추출물은 표 1의 HPLC 분석조건에 따라 Shimadzu LC system에 주입하여 538 nm에서 분석하였다. Column은 Nova-Pack C₁₈

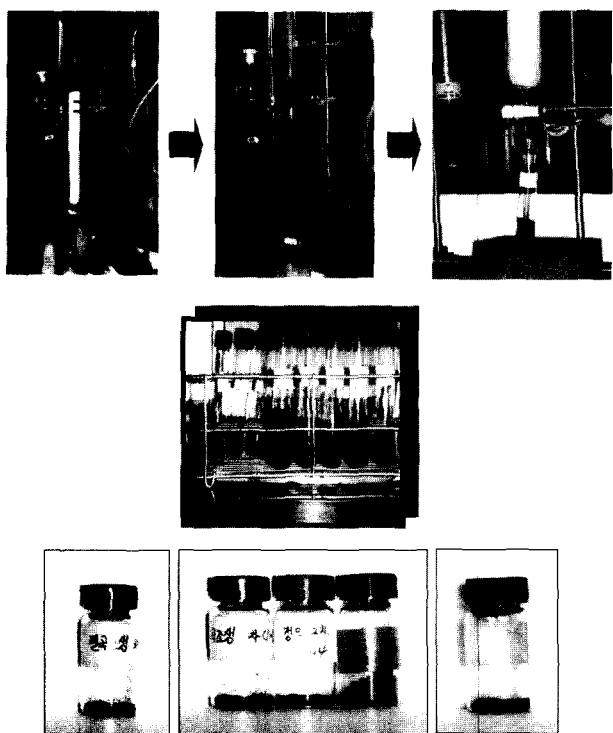


Fig. 2. Identification and purification of C3G from mulberry fruit.

(300×3.9 mm)을 사용하였으며, column의 온도는 35°C를 유지하였다. 이동상으로는 H₂O:CH₃CN:HoAC:H₂PO₄= 81.7:8.4:8.4:1.5(V/V)를 사용하였으며, Flow rate는 1.0 ml/min 이 되도록 하였다.

결과 및 고찰

1. 오디함유 C3G의 흡수 spectrum 및 분자량 확인

김 등(2002)은 오디에 함유된 색소물질을 검토한 결과 그림 3과 같이 3원상(*M. alba L.*, *M. Lhou KOIDZ.*, *M. bombycis KOIDZ.*) 모두 1개의 peak가 검출되었으며, 오디에 함유된 anthocyanin 색소는 RT가 2.928인 C3G로서 Harbone(1962)과 일치함을 보고하였다. 또한 오디의 색소 농축물을 가수분해하여 색소의 기본골격인 aglycon(anthocyanidin)을 분석한 결과 RT가 5.90인 cyanidin을 구명하였으며, 오디의 anthocyanidin에 결합된 당은 glucose(RT 10.31)임을 확인하였다(그림 4).

본 연구는 위의 C3G에 대한 분리·정제방법을 구명하고 정제된 C3G를 동정하기 위하여 수행되었다. 그림 1과 2에 의하여 오디로부터 C3G를 정제하였으며, Waters 996 Photodiodes Array Detector를 이용하여 정제된 C3G(cyanidin-3-glucoside)의 흡수 spectrum을 조사한 결과, 각각 516 nm 과 280 nm에서 최대흡수 spectrum을 보임으로써 anthocyanin

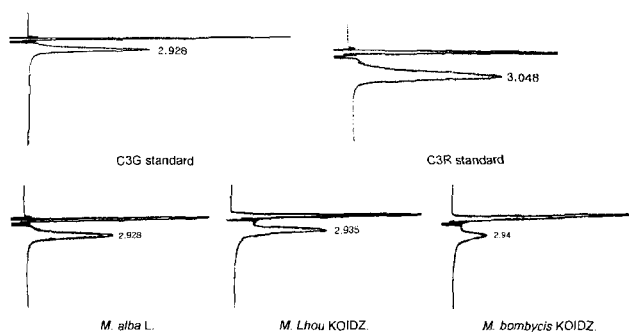


Fig. 3. Anthocyanin pigment patterns among mulberry fruits. Anthocyanin pigment was analyzed by Nova-Pack C₁₈ (300×3.9 mm), using a H₂O:CH₃CN:HoAC:H₂PO₄ (81.7:8.4:8.4:1.5, V/V).

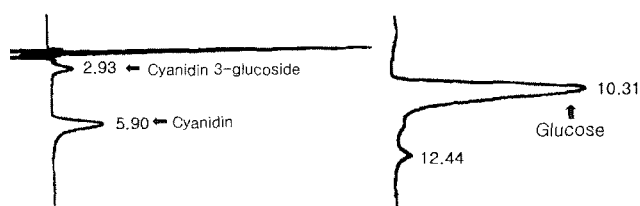


Fig. 4. Aglycone and conjugated sugar in the pigment of hydrolyzed mulberry (*M. alba L.*) fruit.

계 색소의 특이적 흡수 파장 영역인 500~550 nm(Band I) 과 280 nm 전후(Band II)와 일치하여 open column에 의해 분리된 색소가 anthocyanin 계열의 색소임을 확인하였다(그림 5).

또한 LC-Mass(Waters 2690 alliance Separation Module)를 사용하여 분자량을 확인한 결과, 449로 나타나 C3G 표준물질의 분자량과 일치하였다(그림 6).

이상에서와 같이 오디가 함유한 천연색소는 anthocyanin 색소이며, 특히 anthocyanin 색소 중 가장 안정한 형태인 C3G 단일물질로 존재하기 때문에 분리, 정제하기 쉽고 수율도 높아 천연색소 자원으로서 이용가치가 기대된다.

2. 뽕나무 계통별 오디의 C3G 함량

C3G와 같은 flavonoid계 화합물은 UV 광선, 해충 및 미생물로부터 식물체의 보호, 항산화 작용, 효소활성 조절작용, 타감작용 및 꽃 색깔의 결정성분으로 작용하는 등 식물체의 생존에 중요한 역할을 하는데, 이러한 2차 대사산물의 종류 및 함량은 환경의 영향에 의한 변화정도가 낮아서 종 및 품종(계통) 분류의 기준으로 사용되어 왔다(이, 1992; Seigler, 1981).

이를 뽕나무 품종(계통)에 적용하여 생리활성물질인 C3G 고함유 계통을 선발코자 동일포장에서 동일조건으로 재배되어 보존중인 뽕나무 유전자원의 C3G 함량분석을 실시하였다(표 2). 그 결과, 공시한 35계통의 C3G 평균 함량

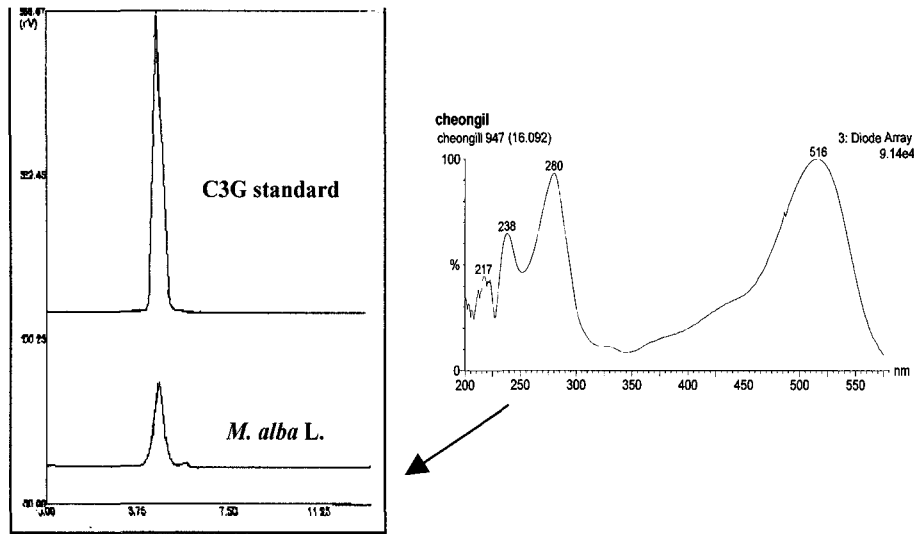


Fig. 5. Comparison of chromatogram between C3G standard and mulberry fruit.

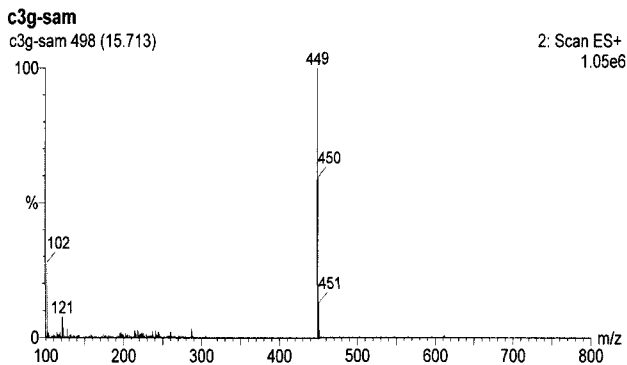


Fig. 6. Molecular weight of C3G isolated from mulberry fruit.

은 0.89%였으며 계통간 함량의 차이가 있는 것으로 나타났다.

공시 품종(계통) 중 ‘각용상’은 1.27%으로서 가장 높은 함량을 나타내었고, ‘수성뽕’ 1.21%, ‘강선’ 1.17%, ‘화조십문자’ 1.14%, ‘사방소’ 1.11%, ‘자산’ 1.08%, ‘태전조생’ 1.06%, ‘만생백피노상’ 1.06%, ‘국부’ 1.04%, ‘절곡조생(충북)’ 1.00%로서 1% 이상 함유하는 것으로 나타났다.

반면, ‘장소상’은 0.55%로서 C3G 함량이 가장 적었으며, ‘환십조생’ 0.65%, ‘환엽대엽’ 0.68, ‘당상7호’ 0.68%로

C3G의 함량이 낮았다. 이들 품종(계통) 중 ‘수성뽕’, ‘강선’ 및 ‘절곡조생(충북)’은 C3G 함량은 물론 수량, 과중 및 당도에 대한 과실적 특성조사에서 양호한 성적을 나타내어 오디생산용 유망 계통으로 선발하였다(표 3).

이상의 결과와 같이 수량성, 과중, 당도 등 과실로서의 오디특성을 만족시키는 동시에 생리활성물질 및 천연색소 자원으로서 C3G 함량까지 높은 유전자원의 선발은 오디 생산용 뽕나무 품종 육성에 있어서 육종의 효율을 높일 수 있을 뿐만 아니라 기능성식품 소재에 대한 이용성을 증대시킬 수 있을 것으로 보인다.

적 요

최근 천연색소의 다양한 생리 활성이 보고됨에 따라 오디에 함유된 C3G 색소에 대해서도 관심이 높아지고 있다. 이에 오디로부터 C3G를 분리·정제하고 정제된 C3G와 표준물질의 분자량을 비교·동정하였다. 또한 유전자원으로 보존되고 있는 뽕 품종 및 계통에 대한 C3G 함량을 분석하여 고품종 계통을 선발하였다.

1. Amberlite IRC-50 ion exchange resin이 충전된 유리

Table 1. Instrument and analysis conditions for C3G in mulberry fruits

Classification	Anthocyanin
Instruments	Shimadzu LC system
Wave length	538 nm
AUFS	0.04
Column	Nova-Pack C ₁₈ (300×3.9 mm)
Column Temp.	35°C
Mobile phase	H ₂ O:CH ₃ CN:HoAC:H ₂ PO ₄ = 81.7:8.4:8.4:1.5 (V/V)
Flow rate	1.0 ml/min

Table 2. Cyanidin-3-glucoside (C3G) content in the fruits of mulberry strains/variety

Accession	C3G content (% DW)	Accession	C3G content (% DW)
Amloesang	0.775	Jasan	1.077
Baechunil	0.778	Jeolgokchosaeng(Chungpuk)	1.001
Busa	0.910	Jeonwon 1	0.726
Cheongilppong	0.872	Jukcheonchosaeng	0.807
Cheongnosang	0.851	Junghosang	0.937
Cheonhyunnosang	0.834	Kangsun	1.168
Daegajokbaepisang	0.848	Kukbu	1.040
Daejeongsun	0.873	Mansaengbaekpinosang	1.064
Dangsang 7	0.677	Palcheongsipyung	0.895
Deokcheonsang	0.776	Pilipin 1	0.765
Edaena 1	0.803	Sabangso	1.109
Eoguknosang	0.796	Sacheongeum	0.968
Ficus	0.909	Sangchonchosaeng	0.746
Gakyongsang	1.265	Simseul	0.704
Hwachosipmunja	1.140	Susungppong	1.206
Hwansipchosaeng	0.647	Suwonnosang	0.874
Hwanyoupdaisyoup	0.676	Taejeonchosaeng	1.061
Jangsosang	0.550		
Mean ± S.D.		0.889 ± 0.17	
CV(%)		19.2	

Table 3. Fruity characteristics of mulberry varieties/strains

Varieties	Yield (kg)*	Weight of single fruit (g)	Soluble solids (Brix %)
Susungppong	34	3.1	14.5
Kangsun	12	3.0	19.5
Jeolgokchosaeng (Chungpuk)	21	4.6	16.6

*: Weight of fruits from 2 trees

column을 산성화시킨 후 이온교환수로 비흡착색소, 수용성 당류, 유기산 및 아미노산 등을 제거하였으며, column에 흡착된 색소를 용출 및 감압농축하여 분말상태로 정제된 색소물질 C3G(cyanidin-3-glucoside)를 얻었다.

2. Waters 996 Photodiodes Array Detector를 이용하여 정제된 C3G(cyanidin-3-glucoside)의 흡수 spectrum을 조사한 결과, 각각 516 nm과 280 nm에서 최대흡수 spectrum을 보임으로써 anthocyanin계 색소의 특이적 흡수 파장 영역인 500~550 nm(Band I)과 280 nm 전후(Band II)와 일치하여 open column에 의해 분리된 색소가 anthocyanin 계열의 색소임을 확인하였다.

3. LC-Mass(Waters 2690 alliance Separation Module)를 사용하여 분자량을 확인한 결과, 449로서 C3G 표준물질의 분자량과 일치하였다.

4. 유전자원으로 보존되고 있는 뽕 품종 및 계통에 대한 C3G 함량을 분석한 결과, 공시한 35계통의 C3G 평균 함량은 0.9%였으며 계통간 함량의 차이가 있는 것으로 나타났다.

5. ‘수성뽕’, ‘강선’ 및 ‘절곡조생(충북)’은 C3G 함량은

물론 수량, 과중 및 당도에 대한 과실적 특성조사에서 양호한 성적을 나타내어 오디생산용 유망 계통으로 선발하였다.

인용문헌

Harborne, J.B. (1962) Distribution of anthocyanins in higher plants. In: T. Swain, ed., Chemical Plant Taxonomy. Academic Press, London. pp. 359~388.

Hong Wang · Guohua Cao and Ronald L. Prior (1997) Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem* 45: 304~309.

Francis FJ (1982) Analysis of the anthocyanins. anthocyanins as a food colors. Academic Press, Inc. Chapter 7: 181~207.

Fuleki T and Francis FJ (1968b) Quantitative methods for anthocyanins. 3. Purification of cranberry anthocyanins. *J. of Food Sci.* 33: 266~274.

김현복(2003) 오디와 포도의 안토시아닌 색소물질 조성 비교 및 C3G 정량. *韓農學誌* 45(1) : 1~5.

김현복·김선림·문재유(2002) 오디 Anthocyanin 색소 정량 및 품종 변이. *韓育誌* 34(3): 207~211.

김현복·김선여·류강선·이완주·문재유(2001) 뽕나무 품종별 오디추출물의 섭취가 흰쥐의 지질대사 및 간장기능에 미치는 영

- 향. 韓蝨學誌 43(2): 104~108.
- 김현복·이용우·이완주·문재유(2001) 청일뽕 오디를 이용하여 제조된 침출주의 관능평가 및 생리활성연구. 韓蝨學誌 43(1): 16~20.
- 김현복·박광준·석영식·김선림·성규병·남학우·문재유(2002) 황성군 일대에서 채취한 야생뽕의 형태학적 특성 및 오디의 효능. 韓蝨學誌 44(1): 4~8.
- 김선림·황종진·송진·송정춘·정국현(2000) 유색미, 검정콩, 검정찰옥수수수의 안토시아닌 색소의 추출, 정제 및 정량. 韓育誌 32(2): 146~152.
- 김선림·김이훈·손영구·송정춘·황종진·허헌순(1999) 검정찰옥수수 종실에서 안토시아닌색소 분리 및 동정. 韓育誌 31(4): 408~415.
- 金善礪·朴光駿·李杭周(1998) 뽕나무 오디추출물의 抗炎症·抗酸化 작용에 대한 生理活性 檢索. 藥作誌 6(3): 204~209.
- 김태완·권영배·이장현·양일석·염종경·이희삼·문재유(1996) 오디의 항당뇨 효능에 관한 연구. 韓蝨學誌 38(2): 100~107.
- 李惟美(1992) 조팝나무屬 植物의 分類學的 研究-形態 및 플라보노이드 특성을 중심으로-. 서울대학교 대학원 박사학위논문.
- 박세원·정이숙·고광출(1997) 오디 품종간 안토시아닌 정량분석 및 생리활성 검색. 韓園誌 38(6): 722~724.
- Seigler, D.S. (1981) Secondary metabolites and plant systematics in the biochemistry of Plants (P.K. Stumpf and E.E. Conned.). Vol. 7. Academic Press. New York. pp. 139~176.