

## 紫根으로부터 분리한 Naphthoquinone류 색소의 pH 안정성 및 관능검사

정미숙 · 이미순  
덕성여자대학교 식품영양학과

### Stability and Sensory Evaluation of Naphthoquinone Pigments from the Roots of *Lithospermum erythrorhizon*

Mi-Sook Chung and Mie-Soon Lee

Department of Foods and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul

#### Abstract

The purplish red pigment from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*, a Korean edible wild plant, has been investigated concerning its value as a natural colorant for Korean traditional foods. An attempt was made to isolate pigments and define their characteristics. Two compounds of isobutylshikonin and acetylshikonin were identified by melting point determination and spectra of UV, IR, and <sup>1</sup>H-NMR. To examine the utility of these naphthoquinone pigments for foods, the effect of various pH values on stability were determined over a period of storage. Buffered solutions of acetylshikonin and isobutylshikonin at pH 3 and 5 showed stable purplish red. The absorption maxima of acetylshikonin and isobutylshikonin over the range of pH 3 to 7 were 518 nm and 520 nm, respectively. A bathochromic shift to 588 nm at pH 10 was observed on these two naphthoquinone pigments. Sensory evaluation was performed with acetylshikonin and isobutylshikonin of identical absorbance. These two pigments revealed purplish red color in Munsell system.

Key words: naphthoquinone, acetylshikonin, isobutylshikonin, stability, sensory evaluation

#### 서 론

식품을紫色으로 착색하기 위하여 우리나라에서 전통적으로 사용되어온 천연착색료인 紫根(*Lithospermum erythrorhizon*)은 지치과(*Boraginaceae*)에 속하는 宿根草로 紫草, 紫芝, 芝草 혹은 紫丹이라고도 한다. 紫根의 種名 *erythrorhizon*에 나타나 있듯이 *erythro*는 붉은색을, *rhizon*은 뿌리를 의미하며 뿌리의 外皮 부위에 붉은 색소가 함유되어 있다<sup>(1)</sup>.

최근, 식품에의 합성착색료 사용 제한으로 천연착색료에 대한 중요성이 새롭게 재 인식되고 있는데 천연착색료는 일반적으로 인체에 대한 안전성이 높고 영양가 및 약리작용이 있을 수 있으며 가공식품에 첨가된 경우 사용된 색소재료를 포장에 표시하지 않아도 되는 등의 장점이 있다<sup>(2)</sup>. 자근에는 quinone류의 naphthoquinone이 함유되어 있으므로 항균작용 및 瀉下작용이 있으며 한 방에서는 下熱, 解毒, 水泡, 동상, 화상 등의 치료에 사용하기도 한다. 민간에서는 이뇨제 및 피인약으로 이용하거나 자근을 참기름에 달여서 소화제로 복용하며 물에

끓여서 해열제로도 이용한다<sup>(3-5)</sup>. 자근 성분인 pentaacetylated shikonin은 遲延形 알레르기를 억제하며 肉芽腫 형성을 촉진하는 작용이 있어 현재 약품으로 사용하기 위하여 개발단계에 있다<sup>(6)</sup>.

우리나라에서는 예로부터 자근을 식품재료 및 식품의 천연착색료로 사용하였는데 찹쌀가루로 만드는 차노치라는 떡과 강정에 붉은색을 착색시키기 위하여 자근을 천연착색료로 사용하였다<sup>(7,8)</sup>. 또한 자근이 술 제조에도 이용되어 오고 있는데 대표적인 예가 진도에서 생산되는 珍島紅酒이다<sup>(9)</sup>.

이상과 같이 식품재료 및 천연착색료로 이용되어온 자근에 관하여 전체 색소 함량 분석<sup>(10)</sup>, 전체 색소의 pH에 대한 안정성<sup>(11,12)</sup>에 관한 연구는 있으나 자근으로부터 naphthoquinone 색소를 분리한 후 분리된 개별 색소에 대한 안정성 연구는 시도 되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 자근 색소를 식품가공의 천연착색료로 사용하기 위하여 자근으로부터 naphthoquinone 색소를 분리하여 pH에 대한 안정성 및 관능검사를 실시하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

Corresponding author: Mie-Soon Lee, Department of Foods and Nutrition, Duksung Women's University, Ssangmun-dong, Dobong-ku, Seoul 132-714, Korea

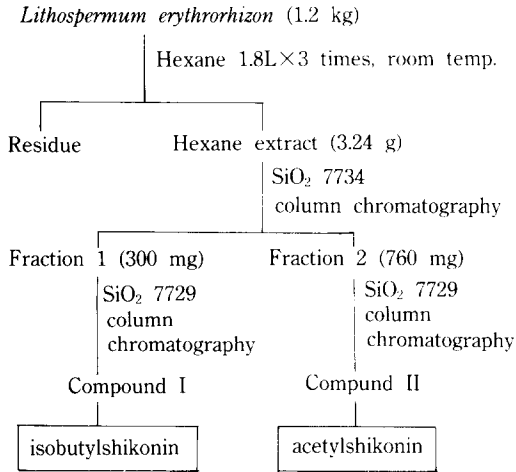


Fig. 1. Solvent fractionation of hexane extract of *Lithospermum erythrorhizon*

본 실험에 사용된 자근(*Lithospermum erythrorhizon*)은 경동시장 한약건재상에서 1991년 3월에 구입하였다.

자근색소의 분리

세절한 자근 1.2 kg을 1.8l의 hexane으로 24시간 동안 3회 반복 추출하였다. Hexane에 추출된 색소액은 40℃에서 회전농축기로 감압농축하여 3.24g의 hexane 추출물을 얻었다. Silicagel 7734(Merck제 60)를 충전시킨 3.5 cm×40 cm column에 hexane 추출물을 apply한 후 hexane : ethylacetate=30 : 1 혼합용매를 전개용매로 시작하여 점차 극성을 높여 주면서 column chromatography로 분획하여 2가지 회분으로 나누었다. 회분 1(300 mg)은 silicagel 7729(Merck제 60)로 만든 2.5 cm×20 cm column, 회분 2(760 mg)는 2.5 cm×30 cm silicagel 7729 column에 각각 apply한 후 hexane 및 ethylacetate를 이용하여 gradient column chromatography를 실시하였다(Fig. 1). 용출액은 thin layer chromatography(TLC : Merck제 60F<sub>254</sub>), 자외선등, 10% 황산용액 및 육안관찰로 확인하였으며 회분 1에서 油狀物質의 compound I을 분리하였고 針狀結晶의 compound II는 회분 2로부터 분리되었다. 분리한 색소는 -80℃ 냉동고(Forma Scientific Inc.)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 이와 같이 분리된 물질을 확인하기 위하여 compound II는 용접측정기(Mitamura Riken Heat Block Model-MRK)로 용접을 측정하였으며 compound I과 II는 nuclear magnetic resonance spectrometer(NMR, Varian FT-80A Spectrometer, 80 MHz for <sup>1</sup>H), infrared spectrometer(IR, Perkin-Elmer 281B Spectrometer) 및 ultraviolet spectrophotometer(UV, Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer)를 이용하여 분석하였다.

pH의 영향

Acetylshikonin과 isobutylshikonin 색소에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 3과 5는 citric acid-sodium citrate 완충용액, pH 7은 tris(hydroxymethyl)aminomethane-maleate 완충용액 그리고 pH 9와 10은 Clark and Lubs 완충용액을 사용하였다. 두 가지 색소를 각각 95% 에탄올에 녹여 공진시험관에 취하고 위의 3가지 완충용액으로 pH를 3, 5, 7, 9 및 10으로 조절하였다. 이 색소용액을 실온의 자연광선 조건에서 저장하면서 색의 변화를 조사하기 위하여 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 및 32일에 UV spectrophotometer를 이용하여 acetylshikonin의 최대흡수파장인 518 nm, isobutylshikonin의 최대흡수파장인 520 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 각 pH에서 색소의 안정성 및 저장기간에 따른 색소 잔존량을 조사하였다.

$$\text{색소의 잔존량} = \frac{A_{518(520)} \text{ at time } t}{A_{518(520)} \text{ at time } 0} \times 100 \text{으로 계산하였다.}$$

실험의 결과는 PC-STAT(University of Georgia, USA) package를 사용하여 분산분석(ANOVA)과 최소유의차(LSD) 검정을 하였다.

관능검사

Acetylshikonin과 isobutylshikonin의 색깔을 비교하기 위하여 훈련된 덕성여자대학교의 관능검사자 23명을 대상으로 두가지 색소를 각각 95% 에탄올에 용해시켜 518 nm 또는 520 nm에서 흡광도를 0.58로 조절한 후 시료로 하여 삼점검사(triangle test)를 실시하였다. 관능검사 결과는 Chi-square 검정으로 통계처리 하였다<sup>13)</sup>. 또한 두가지 색소의 기호도 검사를 위하여 시료와 관능검사자는 삼점검사와 동일하게 하여 5점 기호법으로 평가하였다. 색소의 색깔표사는 우리말 색이름 사전<sup>14)</sup>을 참고로 하여 묘사하였으며 색의 강도는 매우 진한색을 5점, 매우 흐린색을 1점으로 하였다.

결과 및 고찰

자근색소의 분리

자근의 n-hexane 추출물을 silicagel column chromatography로 분획한 회분 1에서 暗紫色 油狀物質로 분리된 compound I은 hexane/ethylacetate(10 : 1) 혼합용매로 TLC하였을 때 R<sub>f</sub>값이 0.39이었으며, 95% 에탄올에 용해한 후 UV spectrophotometer로 측정하였을 때 흡수극대는 520 nm이었다. IR spectrum에서 1740 cm<sup>-1</sup>의 C=O band, 3400 cm<sup>-1</sup>의 OH band 등이 확인되었으며 <sup>1</sup>H-NMR분석(CDCl<sub>3</sub>)에 의하면 1.14, 1.23(2×3H, each s, -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.56, 1.67(2×3H, each s, =C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.50(2H, m, Ar-COH-CH<sub>2</sub>-), 5.11 (1H, t, -CH=C<), 5.20

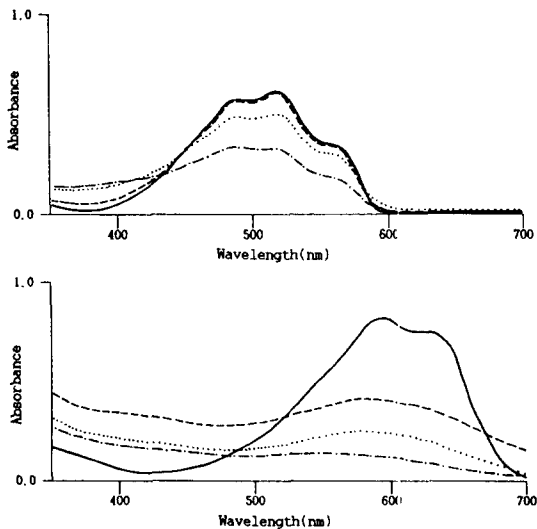


Fig. 2. Absorption spectra of acetylshikonin pigment during storage period at pH 3 (top) and 10 (bottom) —; 0 day, ---; 1 day, ···; 8 days, - · - ·; 32 days

(1H, m, -CO-CH<), 6.00(1H, t, Ar-CO<), 6.94(1H, s, aromatic H), 7.14(2H, s, aromatic H), 12.38, 12.54(2×1 H, each s, aromatic OH)로 나타났다.  $\sigma$ 와 같은 성상은 문헌을 통하여 isobutylshikonin으로 확인되었다<sup>(15,16)</sup>.

Compound II는 hexane 추출물의 회분 2에서 赤色針狀結晶으로 얻어졌으며 용점이 92°C 이었고 hexane/ethylacetate(10 : 1) 혼합용매로 TLC하였을 때 R<sub>f</sub>값이 0.2이였으며, 95% 에탄올에 용해한 후 UV 측정시 흡수극대는 518 nm이었다. IR spectrum에서 1740 및 1610 cm<sup>-1</sup>의 C=O band, 3400 cm<sup>-1</sup>의 OH band 등이 확인되었으며 <sup>1</sup>H-NMR분석(CDCl<sub>3</sub>)에서 1.57, 1.68(2×3H, each s, =C(CH<sub>3</sub>)), 2.12(3H, s, -CO-CH<sub>3</sub>), 2.51(2H, m, Ar-CO-CH<sub>2</sub>), 5.11(1H, t, -CH=C<), 6.02 (1H, t, Ar-CO<), 6.97(1H, s, aromatic H), 7.16(2H, s, aromatic H), 12.35, 12.50(2×1H, each s, aromatic OH)으로 나타났다. 따라서 이 화합물은 acetylshikonin으로 동정되었다<sup>(15,16)</sup>.

**pH의 영향**

폐놀성 물질인 naphthoquinone 색소의 안정성은 pH에 따라 다르게 나타나므로 대부분 식품의 pH 범위인 pH 3~7과 알칼리 범위인 pH 9 및 10에서의 안정성을 살펴보았다.

Acetylshikonin 색소 pH 3 용액의 저장기간에 따른 흡수스펙트럼 변화는 Fig. 2와 같으며 isobutylshikonin 색소도 이와 유사하다. 산성 및 중성용액의 acetylshikonin의 최대흡수파장은 518 nm이었으나 알칼리용액에서는 최대흡수파장이 588 nm로 bathochromic shift를 일으켰으며(Fig. 2) isobutylshikonin도 520 nm에서 588 nm로 변화했다. 이와 같은 현상은 폐놀성 물질이 중성용액

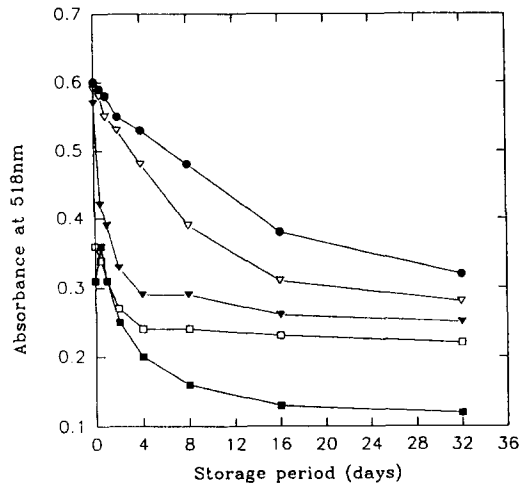


Fig. 3. Changes in absorbance of acetylshikonin pigment as influenced by pH during storage period at room temperature ●; pH 3, ▽; pH 5, ▼; pH 7, □; pH 9, ■; pH 10

보다 알칼리성용액에서 스펙트럼이 장파장 쪽으로 이동하는 특성이 있다는 결과<sup>(17)</sup>와 일치한다. 김 등<sup>(12)</sup>에 따르면 자근색소가 pH 4~9에서는 흡수 스펙트럼의 변화가 나타나지 않다가 pH 10 이상에서 큰 변화가 보였다고 하였는데 본 실험에서는 acetylshikonin 및 isobutylshikonin 모두 알칼리 범위인 pH 9부터 bathochromic shift를 나타내기 시작하여 pH 10에서는 스펙트럼이 현저하게 변화되었다.

Acetylshikonin 용액의 경우 pH를 달리하여 실온의 자연광선에서 32일간 저장하였을 때 저장 초기에 pH 3과 5에서는 매우 안정한 붉은 색을 나타내었고 pH 7에서도 산성범위에서와 유사한 색을 보였으며 pH 9와 10 완충용액에서는 acetylshikonin 용액이 푸른색으로 나타났다.

Acetylshikonin 색소용액(Fig. 3) pH 3과 5에서는 저장 0일부터 16일까지는 비교적 많은 흡광도의 감소를 보였으나 그 이후에는 완만한 감소를 나타냈으며 다른 pH 범위에 비하여 높은 흡광도를 보였다. 실온의 자연광선 조건에서 32일간 저장하였을 때 pH 3에서 색소의 잔존량은 53%, pH 5의 경우는 47%이었다. pH 7 색소용액의 저장 0일에는 산성범위에서와 유의차가 없는 흡광도를 나타냈으나 저장 후 4일까지 흡광도의 많은 감소가 있었으며 그 이후부터 32일까지는 완만한 변화를 보였고 색소잔존량은 44%로 나타났다. Acetylshikonin의 색이 푸른색을 나타냈던 pH 9 용액에서는 저장초기인 4일까지 흡광도가 급격히 감소된 이래 저장 32일까지는 완만한 감소를 보였다. 또한 pH 10에서는 저장 직후에 흡광도가 증가하였다가 감소되는 경향을 나타냈다.

Isobutylshikonin 색소용액을 실온의 자연광선에서 32일간 저장하면서 pH에 의한 영향을 살펴본 결과는 Fig. 4

와 같다. pH 3의 경우 저장 후 0일부터 8일까지는 색소의 흡광도가 빠른 속도로 감소되다가 8일 이후부터 32일까지는 완만한 감소를 보였으며 색소잔존량은 58%이었다. pH 5용액에서는 저장 8일까지 pH 3에서와 유사한 흡광도의 감소 추세를 보였으나 8일부터 16일까지도 많은 감소를 나타내어 pH 3에서보다 다소 불안정함을 알 수 있었으며 저장 32일의 색소잔존량은 48%이었다. pH 7에서는 acetylshikonin pH 7 용액에서와 마찬가지로 저장 0일부터 2일까지 흡광도의 급격한 감소가 나타났으며 색소용액 저장 32일의 잔존량은 48%이었다. 따라서 중성 pH에서 색소용액이 불안정함을 알 수 있었다. 푸른색을 나타낸 pH 9에서는 저장 0일의 흡광도가

산성 및 중성에서와 달리 현저하게 낮았으며 저장기간 동안 흡광도의 감소추세가 완만하였다. pH 10에서 발현된 isobutylshikonin 색은 pH 9에서 나타났던 색과 차이가 없었으며 acetylshikonin 색소용액 pH 10에서와 마찬가지로 색소용액의 흡광도가 저장 직후에는 증가하다가 다시 감소되는 양상을 보였다.

이상과 같은 결과를 통하여 acetylshikonin과 isobutylshikonin 색소가 산성범위에서 안정하며 대부분 식품의 pH가 3.0~7.0사이 이므로<sup>(18)</sup> 이 두 가지 색소의 식품에 대한 적용범위는 매우 넓을 것으로 사료된다.

관능검사

Acetylshikonin과 isobutylshikonin 색소의 흡광도를 0.58로 조절한 후 삼점검사를 하여 Chi-square 검정 결과, 두 가지 색소는 색깔의 차이가 없는 것으로 나타났다. Table 1에 제시된 바와 같이 acetylshikonin 및 isobutylshikonin 색소의 강도와 기호도의 정도가 "good"으로 나타나 천연착색료로서의 선호도가 매우 높을 것으로 여겨진다. 우리말 색이름 사전에 기초하여 표현된 색깔을 살펴보면 acetylshikonin 색소용액의 경우 진달래색 (strong purplish red), 장미색(vivid purplish red), 자홍색 (strong purplish red), 진분홍색(deep purplish pink) 및 분꽃색(strong purplish red)로 표현되었다. 한편 isobutylshikonin 색소용액의 색깔표현으로는 진달래색(strong purplish red), 장미색(vivid purplish red), 자홍색(strong purplish red), 꽃분홍색(strong purplish red), 진분홍색 (deep purplish pink) 및 따오기색(moderate purplish pink)으로 묘사되어 acetylshikonin의 색깔 묘사와 유사하게 나타났다.

따라서 이러한 결과를 통하여 볼때 acetylshikonin과 isobutylshikonin의 색깔은 Munsell system의 purplish red(紫紅)계에 속하며 사람의 시각으로 판단하기에 동

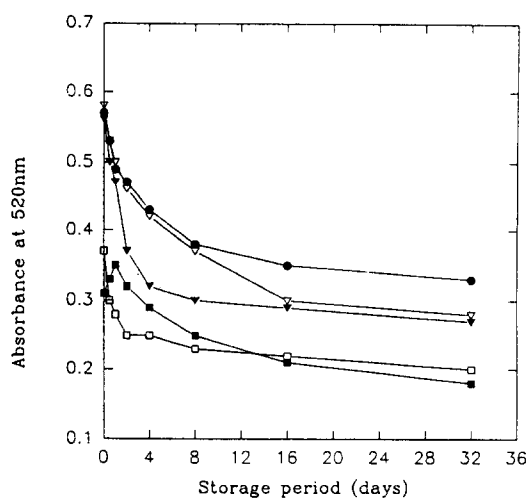


Fig. 4. Changes in absorbance of isobutylshikonin pigment as influenced by pH during storage period at room temperature

●; pH 3, ▽; pH 5, ▼; pH 7, □; pH 9, ■; pH 10

Table 1. The sensory evaluation results of the color of acetylshikonin and isobutylshikonin pigments<sup>1)</sup>

|                  | Description of color <sup>2)</sup><br>(no. of Munsell system) | Frequency of description | Intensity <sup>3)</sup> | Preference <sup>4)</sup> |
|------------------|---|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Acetylshikonin   | Strong purplish red (7.5RP 5/12)                              | 19                       | 3.1±0.8                 | 3.6±0.8                  |
|                  | Vivid purplish red (10 RP 5/14)                               | 15                       |                         |                          |
|                  | Strong purplish red (10 RP 4/12)                              | 7                        |                         |                          |
|                  | Deep purplish pink (7.5 RP 6/10)                              | 4                        |                         |                          |
|                  | Strong purplish red (5 RP 4/12)                               | 1                        |                         |                          |
| Isobutylshikonin | Strong purplish red (7.5 RP 5/12)                             | 19                       | 2.9±0.9                 | 3.6±0.9                  |
|                  | Vivid purplish red (10 RP 5/14)                               | 15                       |                         |                          |
|                  | Strong purplish red (10 RP 4/12)                              | 5                        |                         |                          |
|                  | Strong purplish red (5 RP 5/12)                               | 3                        |                         |                          |
|                  | Deep purplish pink (7.5 RP 6/10)                              | 3                        |                         |                          |
|                  | Moderate purplish pink (7.5 RP 7/8)                           | 1                        |                         |                          |

<sup>1)</sup>Values are means±S.D.; n=3.

<sup>2)</sup>Description of color from "Concise manual of color names".

<sup>3)</sup>Intensity: 5=very deep color to 1=very light color.

<sup>4)</sup>Preference: 5=very good to 1=very poor.

일한 색깔로 감지됨을 알 수 있었으며 식품의 천연착색료로 다양하게 적용할 수 있으리라고 사료된다.

## 요 약

우리나라에 자생하는 야생 식용식물자원 개발의 일환으로 예로부터 사용되어온 천연 착색료인 紫根(*Lithospermum erythrorhizon*)의 색소 연구를 시도하였다. 자근을 n-hexane으로 추출한 후 column chromatography하여 용적측정과 IR 및 <sup>1</sup>H-NMR 분석에 의하여 暗紫色의 油狀物質인 isobutylshikonin과 赤色針狀結晶인 acetylshikonin을 분리 동정하였다. Acetylshikonin과 isobutylshikonin 색소를 pH별로 나누어 32일간 저장하면서 pH에 의한 영향을 조사한 결과 두 가지 색소 모두 pH 3과 5에서는 안정한 붉은색을 나타내었고 pH 7에서도 붉은색을 나타내었으나 저장 0.5일부터 흡광도가 급격히 감소하여 중성 pH에서 이들 색소가 불안정함을 시사하였다. 또한 알칼리범위에서는 두 색소 모두 푸른색으로 발현되었으며 pH 9부터 두가지 색소가 bathochromic shift를 일으켰고 pH 10에서는 최대흡수파장이 각각 518 nm 및 520 nm에서 588 nm로 이동되었으며 매우 불안정하였다. Acetylshikonin과 isobutylshikonin 두 색소간의 차이를 관능검사 하였을때 색깔의 차이가 없는 것으로 나타났으며 기호도는 "good"(3점)으로 등급 지워졌다. 또한 두 가지 색소의 묘사분석 결과 Munsell system의 자홍(purplish red)계에 속하는 진달래색과 장미색으로 표현되었다. 따라서 acetylshikonin과 isobutylshikonin은 자홍계열에 속하는 색소이며 산성범위에서 가장 안정하므로 대부분의 음료 및 일반식품의 천연착색료로서의 가치가 있다고 사료된다.

## 감사의 말

본 연구는 1991년도 한국과학재단 박사과정 학위논문 연구비 지원에 의하여 이루어 졌으며 원고틀 세밀하게 수정해 주신 동덕여대 윤석권 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

## 문 헌

1. 이창복 : 대한식물도감. 향문사, p.640(1985)

2. 이춘녕, 김우정 : 천연 향신료와 식용색소. 향문사, p.117(1988)
3. 우원식 : 천연물화학연구법. 민음사, p.108(1984)
4. 민족문화추진회 : 국역 산림경제 제2권. 민족문화문고간행회, p.102(1985)
5. 김영상, 송정섭, 성종환, 이봉호, 홍영표, 한인승, 정주호, 장영선 : 원색 도감 한국의 자생식물 초본편. 농촌진흥청, p.257(1989)
6. Seto, Y., Motoyoshi, S., Nakamura, H., Imuta, J., Ishitoku, T. and Isayama, S.: Effect of shikonin and its derivatives, pentaacetylated shikonin(MDS-004) on granuloma formation and delayed-type allergy in experimental animals. *Yakugaku Zasshi*, 112, 259(1992)
7. 정양환 : 규합총서. 보진재, p.401(1992)
8. 윤서석 : 한국음식 역사와 조리. 수확사, p.327(1988)
9. 성순택 : 진도홍주의 제조법과 사적고찰. 목포대학 논문집, 10, 245(1989)
10. 윤광재, 박승진, 이형원, 육창수 : 자초뿌리의 成分 및 抗菌力에 關한 研究. 경희약대 논문집, 16, 155(1988)
11. 윤희남, 김 호, 신용달, 유무영 : 紫草 추출물의 외관상 변색. 한국식품과학회지, 17, 426(1985)
12. 김선재, 박근형 : 진도홍주색소의 저장안정성에 관한 연구. 한국식품과학회지, 24, 183(1992)
13. 김광옥, 이영춘 : 식품의 관능검사. 학연사, p.259(1991)
14. KBS 한국색채연구소 : 우리말 색이름 사전. KBS 문화사업단, (1991)
15. Kyogoku, K., Terayama, H., Tachi, Y., Suzuki, T. and Komatsu, M.: Studies on the constituents of "Shikon". I. Structure of three new shikonin derivatives and isolation of anhydroalkannin. *Shoyakugaku Zasshi*, 27, 24(1973)
16. Hsu, H.Y., Chen, Y.P. and Hong, M.: *The chemical constituents of oriental herbs*. Oriental Healing Arts Institute, p.170(1982)
17. Hisamichi, S. and Yoshizaki, F.: Studies on the shikon. I. Structures of new minor pigments and isolation of two isomers of shikonin derivatives from *Lithospermum erythrorhizon* SIEB. et ZUCC. *Shoyakugaku Zasshi*, 36, 154(1982)
18. Huang, A.S. and von Elbe, J.H.: Stability comparison of two betacyanine pigments-amaranthine and betanin. *J. Food Sci.*, 51, 670(1986)

(1993년 12월 31일 접수)