

## 한국산 자초 적색소의 분리 및 확인

이제현 · 오문현\* · 이회봉

충북대학교 식품공학과, \*충청대학 식품과학부

### Isolation and Identification of Red Color Pigments from the Korean *Lithospermum erythrorhizon*

Je-Hun Lee, Moon-Hun Oh\* and Hee-Bong Lee

Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-713, Korea

\* Faculty of Food Science, Chungcheong College, Cheongwon, 363-792, Korea

#### Abstract

Conditions of isolation for the red color pigments from the Korean *Lithospermum erythrorhizon* were investigated and identification of the red pigment was analysed. Non-polar solvents were more effective than water. Especially, 95% ethanol was observed as optimum solvent for the pigments extraction. About 20 minutes at 40°C with 95% ethanol was enough for the extraction of the red pigments. The major pigment was analysed as acetylshikonin by TLC, IR, NMR and GC/MS.

· Key words : isolation, identification, red color pigments, *Lithospermum erythrorhizon*, acetylshikonin.

#### 서 론

식품의 착색을 위하여 천연색소 특히 식물색소를 많이 사용해 왔으나, 타르색소를 합성한 후, 지난 100여년 동안 타르계 합성색소를 주로 식품의 착색제로 써 사용해 왔다<sup>1)</sup>.

합성색소는 천연색소보다 가격, 안정성, 응용성 등에서 많은 장점을 지니고 있어 널리 사용되어 왔으나, 인체에 대한 독성이나 발암성 등 안전성에 대한 문제가 제기됨에 따라 그 사용이 제한되고 있는 실정이다<sup>2)</sup>.

식품에서 색상은 식품의 관능적인 품질을 결정하는 중요한 요소이다. 그러므로 식품의 조리나 가공시에 색소를 인위적으로 첨가해서 식품을 착색하여 식감을 좋게 해주는 경우가 많았다<sup>3)</sup>.

식품을 적색으로 착색하기 위하여 우리나라에서 전통적으로 사용되어온 천연착색료인 자초(*Lithospermum erythrorhizon*)는 지치과(*Boraginaceae*)에 속하는 숙근초로 자초(紫草), 지초(芝草), 혹은 자단(紫丹)이라고도 한다<sup>4)</sup>. 자초의 종명, *erythrorhizon*에

나타나 있듯이 erythro는 붉은색을, rhizon은 뿌리를 의미하며 자초뿌리의 외피 부위에 붉은 색소가 함유되어 있다<sup>4-6)</sup>.

자초를 이용하여 술을 제조한 경우, 주정함량이 높을수록 색소 용출량이 증가하고 주정함량 35% 이하에서는 색소 용출이 급격히 감소한 것으로 보고되었다<sup>6)</sup>.

이 붉은 색소는 naphthoquinone 유도체인 색소배당체로 알려져 있으며 예로부터 자초의 뿌리는 해독, 소염 등의 약재로 사용되어 왔다<sup>7)</sup>.

본 연구에서는 약재 및 천연 착색료로 이용되어온 자초에 대하여 적색소의 추출용제 및 추출조건과 적색소의 주성분을 규명하여 몇 가지 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 실험 재료

본 연구에 사용된 시료는 1998년 가을 제천에서 재배 수확한 자초의 뿌리로 이를 음건, 마쇄한 분말

\* Corresponding author : Je-Hun Lee

을 45mesh의 체를 통과시켜 5°C에서 냉장 보관하면서 사용하였다.

## 2. 색소의 추출

용제별로 추출능을 측정하기 위한 실험은 증류수, 에탄올, 메탄올, *n*-hexane, 아세톤, 벤젠, 에테르 등과 각 용제를 일정 비율로 혼합하여 시료 0.5g에 각 용제를 넣어 100 ml로 하고 25°C의 암소에서 10분간 침출시킨 후 여과하여 색차계(Color Quest II, Hunter Lab, USA)를 이용하여 Hunter value를 측정하였다.

온도별로 추출능을 측정하기 위한 실험은 시료 0.5g에 95% 에탄올을 넣어 100 ml로 하고 25°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C의 Incubator에서 10분간 침출시킨 후 여과하여 Hunter value를 측정하였다.

시간별로 추출능을 측정하기 위한 실험은 시료 0.5g에 95% 에탄올을 넣어 100 ml로 하고 25°C의 암소에서 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분간 침출시킨 후 여과하여 Hunter value를 측정하였다.

색상변화의 관찰은 Hunter's color value인 명암을 나타내는 L값(lightness), 적색 및 녹색을 나타내는 a값(red-ness), 황색 및 청색을 나타내는 b값(yellow-ness) 및 전체적인 색차를 나타내는 ΔEab값을 Rhim 등의 방법에 따라 결정하였다<sup>8)</sup>.

## 3. 추출 색소의 건조

시료 100g에 95% 에탄올을 넣어 1,000 ml로 하여 추출한 다음 95% 에탄올 3,000 ml를 가하여 수세하면서 여과시킨 후 evaporator를 이용하여 45°C에서 감압 농축시켜 전체량을 100 ml로 한 후 -45°C로 동결 건조하였다.

## 4. 색소의 분리 및 정제

TLC 분석은 동결 건조한 시료를 *n*-hexane으로 추출한 후 감압하에서 여과하여 전개용매 (*n*-hexane : ethyl acetate = 8 : 2)로 전개하여 spraying agent (EtOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>COOH : Anisaldehyde = 90 : 15 : 1 : 15)로 착색한 후 건조시켰다.

색소의 정제는 동결 건조한 시료를 *n*-hexane으로 추출하여 감압농축시킨 후 정 등의 방법에 따라<sup>9)</sup> silica gel을 충전시킨 3.5×40 cm column에 *n*-hexane 추출물을 apply한 후 전개용매(*n*-hexane : ethylacetate = 30 : 1)로 시작하여 점차 극성을 높혀 주면서 gradient column chromatography를 실시하여 fraction에서 침상결정의 compound를 분리 정제하였다.

## 5. 색소 성분의 확인

Column chromatography로 정제한 색소를 24시간 진공건조한 후 KBr과 5:95의 비율로 섞어 KBr pellet으로 만들고 FT-IR spectrometer(Varian, USA)을 사용하여 적외선 흡수 스펙트럼을 조사하였다<sup>10)</sup>.

정제한 색소를 24시간 진공건조한 후 CDCl<sub>3</sub>에 녹여 200MHz NMR (Varian 200, USA)로 분석하였다<sup>11)</sup>.

정제한 색소를 24시간 진공건조한 후 에탄올에 용해시켜 Saturn 2000 GC/MS (Varian, USA)로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 색소의 추출

각 용제에 의한 색소 추출능력은 색소추출 후 Hunter L, a, b값을 측정하여 Table 1로 나타내었다.

Benzene, ethyl ether, *n*-hexane의 용제는 적색색소의 추출능은 좋으나, 황색색소의 추출능은 낮은 것으로 나타났고, 물은 적색색소의 추출능이 낮았으며, 메탄올과 acetone은 비교적 추출능이 우수하였고, 95% 에탄올이 적색색소 및 황색색소의 추출능력이 가장 뛰어났다. 이와 같은 결과는 전통적 진도 홍주 제조 방법에서와 같이 에탄올에 자초의 적색소가 잘 용출되는 것과 같은 결과를 나타냈다<sup>6)</sup>.

침출온도 조건에 따른 색상의 차이는 Table 2와 같다. 적색소는 침출온도가 상승함에 따라 약간 감소하는 경향을 보였으며 황색소는 약간 증가하는 경향이

Table 1. Hunter values of *Lithospermum erythrorhizon* pigments extracted with differences solvents at 25°C

	Solvents	L	a	b
1	Ethanol(95%)	57.74	44.96	12.24
2	Water	73.81	6.34	14.99
3	W:E (70:30)	63.18	20.44	13.63
4	W:E (50:50)	51.54	37.84	14.03
5	W:E (30:70)	55.48	40.81	13.88
6	W:E (10:90)	57.17	43.91	13.04
7	Methanol	57.52	41.16	15.13
8	W:M(50:50)	56.03	31.89	14.17
9	<i>n</i> -Hexane	62.76	43.97	5.13
10	Acetone	58.04	43.12	12.75
11	Benzene	57.11	47.36	0.56
12	Ethyl ether	58.49	47.91	9.91

**Table 2. Changes of Hunter values of *Lithospermum erythrorhizon* pigments by temperature change**

°C	L	a	b	ΔEab
25	57.04	44.65	11.94	
30	57.23	44.51	11.97	0.24
40	57.21	44.22	12.22	0.61
50	56.79	44.66	12.55	1.02
60	57.95	42.67	12.03	2.14

**Table 3. Changes of Hunter values of *Lithospermum erythrorhizon* pigments by retention time change at 25°C**

Mns	L	a	b	ΔEab
10	58.48	42.94	11.34	
20	57.61	44.08	11.91	1.73
30	57.71	44.06	11.73	1.53
40	57.31	44.47	11.97	2.23
50	56.36	43.94	11.95	2.64
60	57.37	44.31	12.02	2.13

있으나 ΔEab 값으로 볼 때 40°C 이하의 온도에서는 거의 변화가 없었다.

침출시간별에 따른 색상의 차이는 Table 3과 같다. 침출시간이 증가함에 따라 적, 황색소 모두 약간 증가하는 경향이었으나 ΔEab값으로 볼 때 20분 경과후부터는 무시할 수 있는 값으로 색소는 약 20분 정도면 충분히 추출되는 것으로 나타났다.

**2. 색소의 성분 동정**

TLC 분석 결과는 Rf = 0.6, 0.8의 spot이 각각 나타났는데 Rf=0.8이 대부분을 차지하였다.

IR spectroscopy의 분석 결과는 Fig. 1과 같다. 3300 cm<sup>-1</sup>~3400cm<sup>-1</sup>부근에서 -OH stretching 흡수 peak를 나타내었고 1729cm<sup>-1</sup>에서는 >C=O stretching 흡수 peak를 나타냈다.

<sup>1</sup>H-NMR의 분석 결과는 Fig. 2와 같다. 1.255, 1.306 (-COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.603 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.777, 2.806 (Ar-COH-CH<sub>2</sub>-), 5.345 (-CH=C<), 5.371 (-CO-CH<), 7.477 (Ar-COH-), 7.510 (ArH), 12.13 (ArOH) peak로 각각 나타났다.

GC와 MS의 분석 결과는 Fig. 3과 같다. GC peak는 하나의 물질을 나타내고 있으며, MS결과 분자량이 336으로 나타났으며, IR과 <sup>1</sup>H-NMR의 spectrum과 비교하여 볼 때 naphthoquinone계 유도체인 acetylshiko-

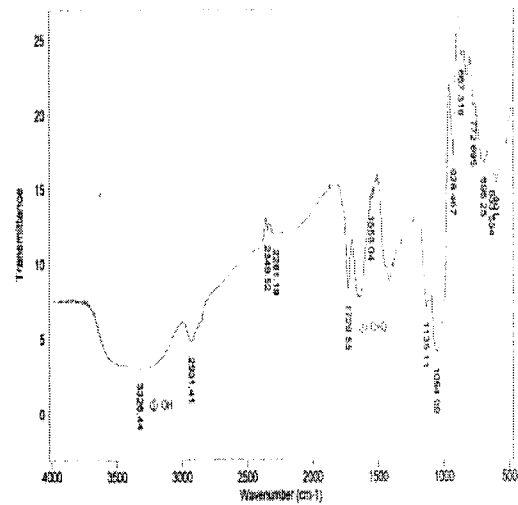


Fig. 1. IR absorption spectrum of *Lithospermum erythrorhizon* pigment.

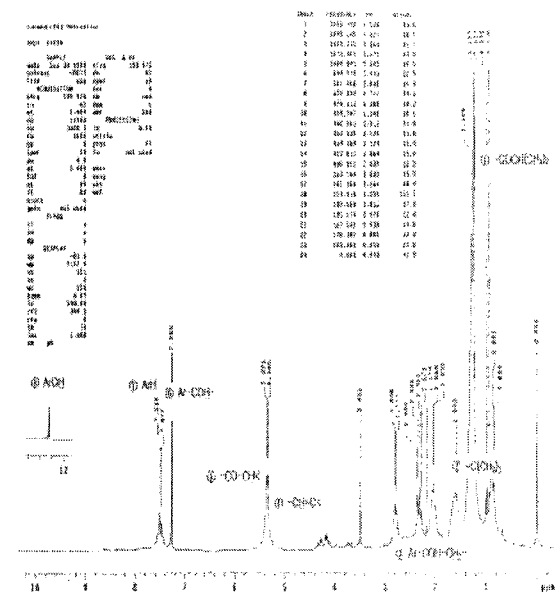


Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of *Lithospermum erythrorhizon* pigment.

닌으로 동정되었다. 이와 같은 결과는 일본산 자초를 분리 동정한 결과 naphthoquinone유도체인 acetylshikonin, isobutylshikonin, propionylshikonin이었다는 Hisamichi 등의 실험 결과와 유사하였다<sup>12-14)</sup>.

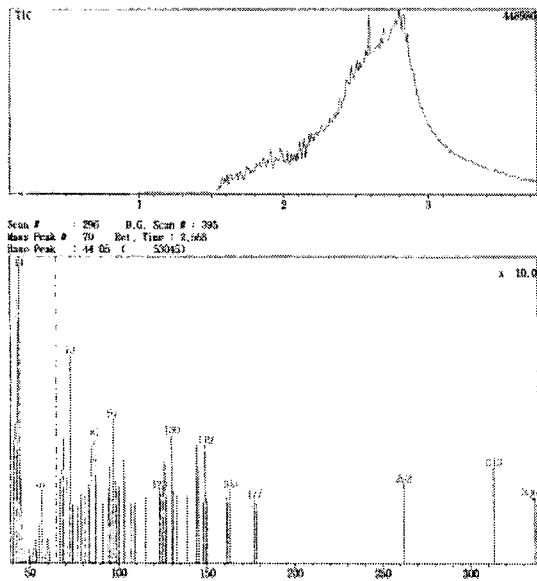


Fig. 3. TIC chromatogram and MS spectrum of *Lithospermum erythrorhizon* pigment.

## 요 약

한국산 자초 적색소의 추출조건과 적색소를 확인한 결과 자초에서 색소성분의 추출은 지용성 용제가 물에 비해서 추출력이 좋으며 특히 95% 에탄올이 적색소 추출에 효과적이었다. 적색소 성분의 추출은 침출 시간에 관계없이 비교적 고른 추출력을 보였으며 40°C 이하에서 20분 정도 추출하면 적색소가 충분히 추출되었다.

한국산 자초뿌리의 적색소 성분을 분리하여, IR, NMR, GC/MS로 확인한 결과 대부분이 acetylshikonin으로 동정되었다.

## 감사의 글

본 연구는 충북대학교 발전 기금 재단의 지원으로 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Jackman, R. L., Yada, R. Y. and Tung, M. A. : Separation and chemical properties of anthocyanins used for their quantitative analysis. *J. food Biochem.*, 11, 279~284 (1987).
2. Dees, C., Askari, Garrett, S., Gehrs, K., Henley, D. and Ardies, C. M. : Estrogenic and DNA- damaging activit of Red No 3 in human breast cancer cells. *Environmental Health Perspectives*, 105, 625~632 (1997).
3. Rosetta, L. : Food colors. *Food Technology*, 49~56 (1986).
4. 이춘녕, 김우정 : 천연향신료와식용색소. 향문사 (1985).
5. 정순택 : 진도 홍주의 제조법과 사적고찰. *목포대학논문집*, 10, 245 (1989).
6. 김선재, 정지훈, 박근형 : 진도홍주색소의 사용기준에 관한 연구. *한국식문화학회지*, 7, 19 (1992).
7. Morimoto, L., Kishi, T. and Ikegami, S. : Naphthoquinone derivatives from *Lithospermum erythrorhizon* siebold et zuccarint. *Tetrahedron Letters*, 52, 4739 (1965).
8. Rhim, J. W., Nunes, R. V., Jones, V.A. and Swartzel, K. R. : Kinetics of color changes of grape juice generates using linearly increasing temperature. *J. Food Sci.*, 54, 776~777 (1989).
9. 정미숙, 이미순 : 자근으로부터 분리한 Naphthoquinone류 색소의 pH 안정성 및 관능검사. *한국식품과학회지*, 26(2), 152~156 (1994).
10. Charles J., Pouchert. : The Aldrich library of FT-IR Spectra. 2nd ed. (1993).
11. Jeremy K., M. Sanders, Brian K. Hunter : Modern NMR Spectroscopy-A guide for chemists. 2nd ed. (1993).
12. Hisamichi, S. and Yoshizaki, F. : Studies on the shikonin I. Structures of new minor pigments and isolation of shikonin derivatives from *Lithospermum erythrorhizon* Sied. et zucc. *Shoyakugaku Zasshi*, 36, 154 (1982).
13. 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).
14. Hsu, H. Y., Chen, Y. P. and Hang, M. : The chemical constituents of orientalherbs. Oriental Healing Arts Institute, p.170 (1982).