KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 33, No. 5, pp. 641~644 (2001)

연구노트

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

식품 중 홍국색소의 분석법에 관한 연구

이달수* · 이영자 · 권용관 · 박재석 · 고현숙 · 심규창 · 이주연 · 신재욱 · 송지원 · 이철원
식품의약품안전청 식품첨가물평가부 천연첨가물과

Studies on the Determination Method of *Monascus* Pigments in Foods

Tal Soo Lee*, Young Ja Lee, Yong Kwan Kwon, Jae Seok Park, Hyun Sook Ko, Kyu Chang Sim, Ju yeun Lee, Jae Wook Shin, Jee Won Song and Chul Won Lee
Division of Natural Food Additives, Department of Food Additives Evaluation, Korea Food and Drug Administration

This study was performed for development of new analytical method of *monascus* pigments in foods. In this method, analysis of *monascus* pigment in foods has been carried out by detection of monascin and ankaflavin of the main color component of *monascus* pigment as indicator compounds. Monascin and ankaflavin were isolated and identified by TLC, HPLC, Prep. HPLC, ^{1}H-NMR and Mass spectrophotometer. The analysis of monascin and ankaflavin in foods such as massal, sausage, mixed press ham, mixed fish sausage, semi-dried sausage and syrup was performed by using reverse phase high performance liquid chromatograph with Capcell Pak C18 column at wave length 390 nm. The quantitative results of monascin were as follows : 0.01~3.31 μg/g item in massal, 0.05~0.10 μg/g in mixed fish sausage, and 0.34~0.35 μg/g in semi-dried sausage. But the quantitative results of ankaflavin were as follows: 0.02~0.89 μg/g in massal, ankaflavin were not founded in other samples

Keywords: *Monascus* pigment, monascin, ankaflavin

서 론

식품의 제조·가공시 사용되는 색소는 식품의 품질 및 소비자의 기호성에 영향을 크게 미치며 주로 타르계 합성색소가 사용되어 왔다[1]. 그러나, 최근 소비자들이 식품의 안전성에 대한 관심을 갖게 되면서 가공식품 제조시에 합성색소보다 천연색소의 사용이 점차 증가되고 있는 추세이며, 이러한 천연색소는 합성색소보다 가격이 비싸고 내열성, 내광성 및 pH에 대한 안정성이 낮은 단점은 있으나 식품에 사용하였을 때 색조가 자연스럽다는 장점이 있는 것으로 알려지고 있다[2-4].

현재 우리나라에서 허용된 천연색소는 "천연식품[식육류, 어패류(경육포함), 과실류, 채소류, 해조류, 두류 등 및 그 단순가공품(탈피, 절단 등)], 다류, 고춧가루 및 실고추, 김치류, 고추장 및 식초"에 사용금지토록 규정되어 있으나[5] 이들 색소에 대한 식품중 분석방법이 확립되어 있지 않아 가공식품의 품질관리를 위해 분석시험법의 확립이 요구되고 있다. 또한, 천연색소는 합성색소와 달리 기원물질 또는 균주에 따라 단일색소성분이 아닌 복합색소성분들로 이루어져 있으며 특히, 홍국색소의 경우도 황색계열인 monascin과 ankaflavin, 등색계열인 monascorubrin과 rubropunctatin, 적색계열인 monascorubramine과 rubropunctatamine을 색소성분으로 구성되어있음이 보고되고 있으며[6,7] 홍국색소확인에 대한 TLC 정성분석은 일부 보고되고 있으나, 홍국색소의 각 개별성분들은 매우 미량으로 존재하기 때문에 각 성분별 분리정량에 대해서는 연구보고가 매우 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 천연색소인 홍국색소의 색소성분들에 대한 식품중 분석방법을 확립하고자 하였으며 확립된 분석법을 적용하여 국내유통식품 중 홍국색소가 사용되고 있는 맛살, 소시지 등의 식품을 대상으로 하여 홍국색소 함유량 조사를 실시하였다.

*Corresponding author : Tal-Soo Lee, Department of Natural Food Additives, Division of Food Additives, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-Ku, Seoul 122-704, Korea
Tel: 82-2-380-1691
Fax: 82-2-380-1625
E-mail: tslee@kfda.go.kr

재료 및 방법

재료

국내유통식품중 홍국색소를 많이 사용하고 있는 맛살, 소시지, 혼합어육소시지, 반건조소시지, 혼합프레스햄 및 시럽을 대상품목으로 하였다. 홍국색소표준품으로는 *Monascus* pigment(Wako chemical Co.)를 구입하여 TLC, Prep. HPLC, HPLC, ^{1}H-NMR 및 Mass spectrophotometer(MS)로 monascin과 ankaflavin 성분을 분리·정제한 다음 화학구조를 확인

한 후 이들을 각각 표준품으로 사용하였다. 시약으로 실리카겔은 칼럼크로마토그라피용 Silicagel 60(Merck)을 사용하였고 그 외의 시약도 모두 특급시약을 사용하였다. 색소성분정제를 위해 Sep-pak C_{18} 카트리지(Waters Co.)와 TLC plate (20×20 cm, Silicagel 60, G 5-40 m, Merck)를 사용하였으며, 색소성분 분석을 위한 사용기기로는 UV/Vis spectrophotometer (Varian Cary 3C), Prep. HPLC 및 HPLC(Waters. Co), NMR(JNM LA 400 Spectrometer 600 MHz, JEOL), MS (JEOL AX505WA) 등을 이용하였다.

실험방법

TLC에 의한 홍국색소성분 분리

시판되고 있는 홍국색소를 메틸알콜에 녹여 1000 ppm으로 한 액을 헥산, 클로로포름, 벤젠, 아세토니트릴, 메틸알콜 및 물을 전개용매로 TLC를 수행하여 홍국색소를 이루고 있는 황색, 등색 및 적색색소성분을 분리하고자 하였다.

홍국색소의 주색소성분인 monascin과 ankaflavin의 분획물

시판되고 있는 홍국색소 2 g을 달아 메틸알콜 3 mL에 녹인 액을 미리 클로로포름에 적신 실리카겔로 45 cm 충전한 칼럼(4×60 cm)에 가해준 다음 이를 클로로포름 · 메틸알콜 (9 : 1)을 전개용매로 하여 3 mL/min의 유속으로 통과시켰다. 여기서 홍국색소의 색소성분별로 분리된 분획물의 주색소성분중 황색색소성분인 monascin과 ankaflavin을 분리하였으며 Prep HPLC와 HPLC를 이용하여 monascin과 ankaflavin에 대한 최적파장과 분리능이 우수한 이동상 용매에 대하여 검토한 결과로 최적의 기기조건을 얻을 수 있었다. Prep. HPLC 분석은 최적파장 390 nm에서 칼럼은 Capcell Pak C18 UG 120Å(20×250 mm, 5 μm), 이동상은 메틸알콜 · 물(80 : 20), 유속은 분당 10 mL로 하였으며, HPLC 분석은 최적파장 390 nm에서 칼럼은 Capcell Pak C_{18} UG 120Å(4.6×150 mm, 5 μm), 이동상은 메틸알콜 · 물 · 초산(75 : 25 : 0.5), 유속은 분당 1 mL으로 하여 monascin과 ankaflavin의 단일성분별 분리 · 정제를 수행하였다. 각각의 단일성분에 대하여 UV/Vis spectrophotometer로 최적파장을 검토하였다.

식품중 홍국색소성분의 에틸알콜 농도별 추출수율검토

추출수율이 가장 우수한 에틸알콜의 농도별에 따른 추출수율검토를 위해 조사대상식품중 맛살과 소시지를 각각 50 g씩을 취한 다음 에틸알콜을 농도별(10~100%)로 조제한 액을 200 mL를 가하여 각각 6시간씩 추출한 액을 각 시험용액으로 하여 UV/Vis spectrophotometer를 사용하여 각각의 흡광도를 측정하여 에틸알콜 농도별 추출수율을 비교검토 하였다.

Monascin과 ankaflavin 표준용액의 조제

Prep. HPLC 및 HPLC를 통해 얻어진 홍국색소의 분획물중 monascin과 ankaflavin으로 확인규명된 성분을 각각 일정량 달아 메틸알콜로 녹여 최종농도가 각각 5 ppm의 농도가 되도록 조제한 것을 각각의 표준용액으로 하였다.

시험용액의 조제

시료 100 g을 취하여 분쇄시킨 후 에틸알콜 300 mL를 가하여 6시간 동안 홍국색소를 추출하였다. 시료의 색소추출물을 여지로 여과한 후 40°C의 수욕중에서 10 mL로 감압농축한 다음, 그 액을 Sep-pak C_{18} 카트리지에 넣어 색소성분을 흡착시켰다. 여기에 물 10 mL를 가하여 세척하고 메틸알콜 10 mL로 색소성분을 추출한 다음 40°C의 수욕중에서 감압농축하여 2 mL로 한 액을 0.2 μm membrane filter로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

식품중 홍국색소성분인 monascin과 ankaflavin 분석

상기의 조작에 따라 얻어진 홍국색소의 주색소성분인 monascin과 ankaflavin의 표준용액과 시험용액 각각 20 μL씩을 HPLC에 주입하여 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

TLC에 의한 홍국색소성분의 분리결과

시판되고 있는 홍국색소에 대한 TLC를 행한 결과 홍국색소의 주성분을 이루는 황색계열이 가장 넓고 분명하게 분리된 띠를 나타내었는데 Takatsuki 등[8]이 보고한 홍국색소의 주성분은 황색계열이라는 내용과 일치함을 알 수 있었다. 이때의 전개용매는 용매별로 극성의 차이가 있는 헥산, 클로로포름, 벤젠, 아세토니트릴, 메틸알콜 및 물을 사용하여 전개용매의 조건을 검토한 결과 클로로포름 : 메틸알콜(9 : 1)이 홍국색소중 황색계열색소성분의 분리를 위한 가장 최적의 용매조건이었다.

홍국색소의 주성분인 monascin과 ankaflavin의 분획물 분리확인

시판 되고 있는 홍국색소중 주성분으로서 황색색소성분인 monascin과 ankaflavin을 분리하기 위해 실리카겔이 충전되어 있는 칼럼크로마토그라피를 통해 얻은 황색색소성분은 다량의 분획물을 얻기 위하여 Prep. HPLC를 이용하여 분리 · 정제하였으며, 여기서 얻은 각 분획물을 다시 HPLC를 이용하여 분리한 결과 칼럼유지시간에 따라 monascin과 ankaflavin으로 각각 분리시켰다. 또한, 이 두 성분이 각각 단일성분임을 확인하기 위하여 UV-Vis spectrophotometer, MS 및 ^{1}H-NMR을 이용하여 분석한 결과, UV-Vis 스펙트럼의 경우 각각의 최대흡수파장이 385 nm와 386 nm이었으며, MS 스펙트럼 및 ^{1}H-NMR 스펙트럼은 박 등[6,9-11]이 보고한 결과와 각각 동일한 패턴구조를 보였으며, monascin($C_{21}H_{26}O_5$)과 ankaflavin($C_{23}H_{30}O_5$)의 분자량은 각각 358과 386로 일치함을 확인하였다.

식품중 홍국색소성분의 에틸알콜 농도별 검토결과

물, 메틸아콜, 에틸알콜, 아세토니트릴, 클로로포름 및 초산에틸을 사용하여 식품중 홍국색소의 추출수율을 비교검토한 결과, 에틸알콜이 가장 높았으며, 에틸알콜의 농도별 추출수율은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 에틸알콜의 농도가 높아질수록 증가되었으며 특히, 에틸알콜농도 100%에서의 흡광도값이 3.53으로 추출수율이 가장 높았음을 알 수 있었다.

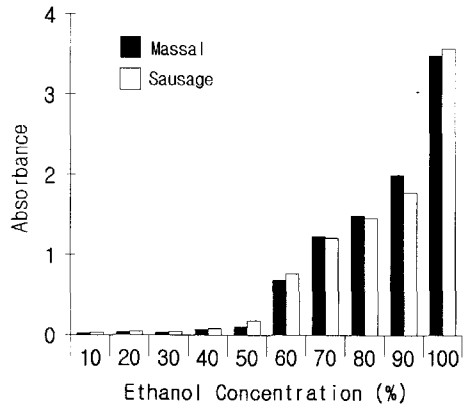

Fig. 1. Absorbance of *Monascus* pigments in extraction according to ethanol concentration.

회수율 검토결과

홍국색소중 주색소성분인 monascin과 ankaflavin이 검출되지 아니한 맛살, 소시지, 혼합어육소시지, 반건조소시지, 혼합프레스햄 및 시럽을 대상으로 하여 monascin 및 ankaflavin을 각각 5 ppm이 되도록 첨가한 후 HPLC로 분리·정제하였으며 결과는 Table 1과 같다.

Monascin의 회수율은 혼합어육소시지, 시럽, 맛살, 반건조소시지, 소시지, 혼합프레스햄순으로 나타났으며, 혼합어육소시지에서는 monascin 및 ankaflavin 각각에 대하여 평균 94.1%와 92.9%로 가장 높은 회수율을 보였고, 맛살에서는 monascin, ankaflavin 각각에 대하여 평균 85.1%와 85.8%의 회수율을 보였다. 그 중 혼합어육소시지에서는 monascin이 98.1%로 가장 높은 회수율을 보였으며, 시럽 중에서는 ankaflavin이 40.0%로서 가장 낮은 회수율을 보였다.

식품중 홍국색소성분인 monascin과 ankaflavin의 분석결과

조사대상식품중 맛살, 소시지, 혼합어육소시지, 혼합프레스햄, 반건조소시지 및 시럽 등 총 6종을 대상으로 하여 확립된 시험방법으로 홍국색소의 성분을 분석한 결과, monascin의 경우 맛살에서 0.01~3.31 g/g, 혼합어육소시지에서 0.05~0.10 g/g, 반건조소시지에서 0.34~0.35 g/g이 각각 검출되었고, 나머지 품목에서는 모두 불검출이었다. 한편, ankaflavin의 경우 맛살에서만 0.02~0.89 g/g이 검출되었으며, 나머지 품목에서는 모두 불검출이었다.

요 약

우리나라에서 허용된 천연색소인 홍국색소는 "천연식품[식육류, 어패류(경육포함), 과실류, 채소류, 해조류, 두류 등 및 그 단순가공품(탈피, 절단 등)], 다류, 고춧가루 및 실고추, 김치류, 고추장 및 식초"에 사용금지토록 사용기준이 규정되어 있으나, 현재 식품중 홍국색소의 분석방법이 아직 확립되어 있지 않은 실정이므로 식품중 홍국색소의 최적분석방법을 확립하고자 하였으며, 확립된 분석법을 적용하여 국내유통중인 식품중 홍국색소의 함유량을 조사하였다. 따라서, 식품중의 홍국색소는 TLC, HPLC, Prep. HPLC, H^1-NMR 및 MS로 홍국색소성분 중 monascin과 ankaflavin을 분리·확인하였으며, 이 두 성분을 표준물질로 하여 다음과 같은 정량분석법을 확립하였다. 역상계 칼럼인 Capcell pak C_{18} UG120을 이용하여 HPLC 분석을 하였으며, 이 때 이동상 및 파장조건은 각각 메틸알콜 : 물 : 초산(75 : 25 : 0.5) 및 390 nm이었다. Monascin, ankaflavin의 회수율은 혼합어육소시지, 시럽, 맛살, 반건조소시지, 혼합프레스햄, 소시지 순으로 나타났으며, 혼합어육소시지에서는 평균 94.1%, 92.9%로 가장 높았고 맛살에서는 평균 85.1%. 85.8%의 회수율을 나타냈다. Monascin은 소시지, 반건조소시지, 혼합프레스햄, 시럽 등에서 평균 71.5~88.6%로 양호하였으나, ankaflavin은 평균 40.0~59.4%로 비교적 낮은 회수율을 나타냈다. 조사대상식품인 국내유통 가공식품중 맛살, 소시지, 혼합어육소시지, 반건조소시지, 혼합프레스햄 및 시럽 등 총 6종에 대하여 monascin과 ankaflavin의 함량을 확립된 분석법으로 정량분석한 결과는 다음과 같았다. Monascin의 경우 맛살에서 0.01~3.31 g/g, 혼합어육소시지에서 0.05~0.10 g/g, 반건조소시지에서 0.34~0.35 g/g이 각각 검출되었고, 나머지 품목에서는 모두 불검출이었다. 한편, ankaflavin의 경우 맛살에서만 0.02~0.89 g/g이 검출되었으며, 나머지 품목에서는 모두 불검출이었다.

Table 1. Recovery rates of monascin and ankaflavin in Foods

Sample	*Monascus* pigments			
	monascin		ankaflavin	
	Ave (%)	SD	Ave (%)	SD
Massal	85.1	0.67	85.8	0.10
Mixed fish sausage	94.1	5.52	92.9	4.62
Sausage	73.6	1.21	59.4	0.57
Mixed press ham	71.5	0.67	54.8	0.46
Semi-dried sausage	74.7	6.66	55.6	10.39
Syrup	88.6	0.10	40.0	0.10

문 헌

1. Hendry, G.A.F. and Houghton, J.D. Natural food colorants. 2nd ed., Blackie Academic and Professional Co. (1996)
2. Satue-Gracia, M.T., Heinonen, M. and Frankel, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. J. Agric. Food Chem. 45: 3363 (1997)
3. Sarma, A.D., Sreelakshmi, Y. and Sharma, S. Antioxidant activity of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. Phytochemistry 45: 67 (1997)
4. Yoshimato, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamagawa, O., Yamaguchi, M. and Yamada, J. Antimutagenicity of sweet patato(Ipomoea batatas) roots. Biosci. Biotech. and Biochem. 63: 537-541 (1999)
5. Korean Food Additive Code, Korea Food and Drug Administration. (2000)
6. Park, Y.H. Isolation and chemical characterization of yellow food pigment from *Monascus* purpureus, J. Fd Hyg. Safety 11: 123-127 (1996)
7. Lee. W.S. Natural product chemistry. Younglim Press, 356-358 (1997)
8. Keigo T., Shigeru S., Isamu U. and Takuro S. Confirmation of *Monascus* pigments colored on the skin of fresh fishes. Hyg. Chem. 34: 350-358 (1998)
9. Manchand, P.S. and Whalley, W.B. Isolation and structure of ankaflavin: A new pigment from *monascus anka*, Phytochemistry

12: 2531-2532 (1973)
10. James, G.S., Maria, C.E., Guillermo, A.I., Hiroji, S. and Sadao, S. Photoprotection of the red pigment of *Monascus* anka in agueous media by 1,4,6-trihydroxynaphtalene, J. Agric. Food Chem. 29: 1189-1193 (1981)
11. Kyoko, S., Yukihiro G., Shiho, S.S., Hiroshi, S., Tomio, M. and Takashi, Y. Identification of major pigment containing D-amino acid units in commerial *Monascus* pigment, Chem. Pharm. Bull. 45: 227-229 (1997)

(2001년 5월 10일 접수)