

한국산 자리공 열매의 적색소를 이용한 식용색소 I. 색소의 추출과 활성 사포닌계 물질의 제거

박용석* · 황혜정 · 박기환 · 윤광로
중앙대학교 식품공학과, * (주)해태제과 식품연구소

Utilization of Red Pigments of Korean Pokeberries as Food Colorant I. Extraction of pigments and removal of active saponoidal principles

Yong-Seok Park*, Hea-Jeung Whang, Ki-Hwan Park, Kwang-Ro Yoon
Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University
*Food Research Institute, Haitai Confectionery Co., LTD.

Abstract

A new method involving the treatment of absolute ethanol was devised for the removal of active saponin moieties from the pigment extracts of Korean pokeberries which were supposed to be a good source of food red colorant. The dissolved saponins being rather toxic to human body were in supernatant whereas pigments on precipitation after adding the absolute ethanol. The purity of pigments precipitate was 53.22% whereas that of purified with an existing procedure was only 19.40%. Saponin content remaining in pigment precipitate was 2.47 mg%, which means about 96% of active saponins was removed from pokeberry extract. This pigment product could be purified further by chromatography through silica gel or Sephadex G-25 column. The purities were 60.06 and 62.60% respectively. The LD50 of pokeberry pigment product and crude seed saponin were calculated as 13.5 g/kg and 2.8 g/kg, respectively. This means that the acute toxicity of purified pigment products seems to be below the toxic level.

Key words: betacyanin, betanin, pokeberry, food colorant, natural pigment, removal of active saponin, acute toxicity of betanin

서 론

자리공과(Phytolaccaceae) 식물은 척박한 토양에서도 잘 자라는 다년생 초본식물로서 우리나라 원종으로 자리공, *Phytolacca esculenta*과 섬자리공, *Phytolacca insularis* (정태현, 1956)이 자생하며 외래종인 양자리공 (또는 미국장녹), *Phytolacca americana* (송주택, 1983)도 전국에 걸쳐 큰 군락을 형성하고 있다. 포도모양의 모든 자리공열매에는 phytolaccanin (von Wyler와 Dreiding, 1961; 이근구와 윤광로, 1990)이라는 batalin계 붉은색소가 풍부하게 함유되어 있는데 이 색소는 beet red로 이미 상품화되어 식품에 널리 응용되고 있는 사탕무의 붉은색소(von Elbe 등, 1974a; Dhillon과 Maurer, 1975; Pasch 등, 1975, Freund 등, 1988)인 betanin과 동

일한 물질이다.

자리공과식물의 열매(윤광로, 1994)는 자원성이 좋고 이미 식용색소로 널리 이용되고 있는 betanin이 주 성분이므로 천연식용색소원으로 검토해볼 충분한 가치가 있다. 그러나 이 식물에 광범위하게 분포된 사포닌계 물질들(Theodore와 Howard, 1973; Glombitza 등, 1975; Razdan 등, 1982; Kang과 Woo, 1986)이 지니는 항이노작용, 항염효과, 진정작용 그리고 장관운동저해 작용등의 활성(Saito 등, 1979)이 때로는 인체에 해로울 수 있기 때문에 자리공열매색소의 식용색소로의 전면적인 이용은 제한되고 있다.

따라서 자리공 열매의 색소를 식용색소화하려면 일차적으로 이 식물에 존재하는 사포닌계 활성물질의 제거방법을 확립할 필요가 있다. 실제로 Driver와 Francis (1979)는 여러 종류의 유기용매를 이용하여 미국산 자리공열매추출물에서 사포닌계 물질의 제거를 시도하였으며 Forni 등 (1983; 1984)은 이태리산 추출

Corresponding author: Kwang-Ro Yoon, Professor, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung, Kyonggi, 456-756, Republic of Korea

물에 황산을 가하여 활성사포닌을 침전제거한 바 있다. 자리공과 식물열매의 색소를 실용적인 면에서 정제하려는 연구는 이들 연구외에 알려진 바 없다.

본 연구의 목적은 이상의 모든 사실을 감안하여 일차적으로 우리나라산 자리공열매의 적색추출물에 섞여있는 사포닌계 활성물질을 효율적으로 제거하고 고순도의 색소추출물을 확보할수 있는 새로운 정제조건을 모색하는데 있다.

재료 및 방법

실험재료

우리나라에서 야생하는 자리공과 식물의 열매를 9월 초순부터 10월 중순까지 전국에 걸쳐 무작위로 선정된 군락에서 채취, 잘 익은것만을 선별후 열매에 포함된 씨의 평균중량, 한송이의 평균중량 그리고 송이당 평균열매수를 산출하였다. 모든 시료는 -20°C에서 냉동 보관하면서 실험에 이용하였다.

재료식물은 대부분 *P. americana* (송주택, 1983)로 판단되는 것이었으나 식물학적인 확인은 생략하였다.

기기 및 시약

사용된 기기들은 HPLC system (Gilson 302 또는 Waters 510, 미국), UV/visible spectrophotometer (GBC 914, 호주)와 liquid chromatography system (Gilson 203, 미국), TLC system (Camag, 스위스), high speed centrifuge, refrigerated (Sigma 3K30, 독일), rotary evaporator (Buchi RE 121, 스위스), pH meter (Suntex 2000A, 대만), Abbe refractometer (AR2, A. Krauss, 독일) 등이었다.

컬럼충진제는 silica gel 60(E. Merck, 독일)과 Sephadex G-25 (Sigma, 미국), Dowex 5×2-200 (Sigma, 미국), polyvinylpyrrolidone, insoluble (PVPP) (Sigma, 미국), TLC용 박판은 silica gel F₂₅₄ precoated plate (두께 0.25 mm) (E. Merck, 독일), 크로마토그래피용 용매들은 HPLC급을 그리고 그 밖의 시약은 특급 또는 일급시약을 이용하였다.

표품

색소표품은 시판품 beet red (Wako, 일본)와 Adams와 von Elbe (1977)의 방법에 따라 사탕무색소를 정제한 것 그리고 이와 윤(1990)의 방법에 따라 정제한 자리공열매색소를 활용하였다. 자리공씨의 사포닌추출물 표품은 자리공열매의 씨를 모아 윤(1994)의 방법에 따라 추출, 정제하여 표품 자리공 사포닌으로 하였다.

분석

HPLC: Schwartz와 von Elbe (1980)의 방법과 Pourrat 등 (1988)의 조건을 응용하여 μ -Bondapak C₁₈ 컬럼에 시료를 주입하고 538 nm에서 검출하였다. 사용용출용매는 phosphoric acid 소량으로 pH를 2.75로 조절한 methanol-0.05 M KH₂PO₄ (18:82, v/v)이었고 용출속도는 분당 1.0 mL이었다. 표품들과 직접비교하여 색소의 t_R을 확인하였다.

TLC: 상법에 따라 silica gel 박판과 chloroform-methanol-water (65:35:10, v/v) 전개용매를 사용하여 얻은 색소의 붉은색 반점을 일광하에서 육안으로 확인하고, 사탕무에서 얻은 표품의 R_f치와 비교하였다.

흡광도및 흡수 스펙트럼의 측정: 각 색소액의 흡광도는 538 nm에서 상법에 따라 측정하였다. 한편, 색소액의 흡수스펙트럼은 색소액의 흡광도가 0.51±0.05가 되도록 희석하고 200~700 nm 사이에서 측정하였다.

색소의 정량: 시료용액의 흡광도가 0.2~0.6 범위에 들도록 일정배수로 희석하고 Nilsson (1970)과 Schwartz 등 (1981)의 방법에 따라 색소액의 흡광도를 538 nm에서 측정하였다(E^{1%}=1120). 색소함량은 betanin당량으로 표시하였다.

사포닌계 물질: TLC에 의한 확인은 자리공색소의 분석과 같은 조건에서 시료를 전개한 후 10% H₂SO₄를 분무하고 110°C에서 10분간 방치하였다. 이때 생성되는 흑청색 반점을 표품과 비교하였다. HPLC는 μ -Bondapak C₁₈ 컬럼과 용출용매로서 acetonitrile:0.1% phosphoric acid (20:80, v/v)혼합액을 이용, 크로마토그램을 얻었으며 이때의 용출속도는 분당 1.0 mL이었다. 얻어진 크로마토그램의 t_R과 면적을 계산하고 자리공사포닌 표품으로 검량곡선을 작성, 정량하였다.

추출

냉동 보관하였던 자리공열매를 실온에서 해동시킨 후 10 g을 각각 취하여 다음의 세가지 방법에 따라 암소에서 추출하였다; ① 증류수에 citric acid를 녹여 pH를 4.5로 조절한 용액으로 해동된 재료를 가능한 한 씨가 파괴되지 않도록 으깨 후 질소가스를 통과시키면서 진탕, 추출 ② 증류수만을 이용하여 ①항과 같은 방법으로 진탕, 추출 ③ 착즙기를 이용한 직접착즙.

이상의 3가지 방법으로 얻은 각각의 추출액을 여과한 후 여지에 흡착된 붉은색이 없어질 때까지 씻어준 세척액과 여액을 모아 100 mL로 정용하였다. 이 추출액들의 흡광도와 pH 그리고 betanin의 함량을 비교하였다. 한편 이들 추출액을 37°C에서 48시간동안 방치하면서 시간별 흡광도의 변화를 조사하였다.

무수에탄올을 이용한 사포닌 제거

색소의 침전조건: 자리공열매 500 g을 citric acid 용액(pH 4.5) 1000 mL로 추출한 후 원심분리하고 상정액을 취하여 이 추출액의 1/2량을 4등분 한후 각각 15, 20, 25°Bx, 그리고 30°Bx까지 50°C에서 감압농축하여 엑기스들을 얻었다. 이 엑기스들을 각각 4등분하고 4, 6, 8배 그리고 10배량의 무수에탄올을 섞어준 후 4°C에서 정치하였다. 24시간 후 이 용액들을 원심분리하여 얻은 상정액의 흡광도를 측정하였다.

한편 나머지 1/2량의 엑기스들도 같은 방법으로 4등분하고 각각에 대하여 무수에탄올, 95%, 90% 그리고 80% 에탄올을 가하여 잘 섞어 주었다. 4°C에서 24시간 정치후 생성된 침전물을 원심분리하고 항량을 구하였다.

무수에탄올 처리: 일정량의 열매를 citric acid 용액(pH 4.5)으로 추출한 색소액을 20°Bx 될때까지 50°C에서 감압농축하였다. 이 농축액에 10배량의 무수에탄올을 첨가하여 잘 진탕한 후 24시간 냉장, 방치하였다. 이 무수에탄올 첨가 색소침전액을 냉동원심분리(1000×g, 0°C, 15분)하여 상등액과 적색 침전물을 분리한 후 건조물량을 칭량하고 TLC 및 HPLC하여 색소와 사포닌 함유 여부를 확인하였다. 또한 이 침전물중의 betanin과 사포닌을 정량하고 색소침전물 수용액의 흡수스펙트럼을 측정하였다.

컬럼 크로마토그래피에 의한 부분정제

다음의 3가지 정제조건을 설정하였다: ① 색소추출액을 직접 Sephadex G-25 컬럼으로 처리 (용출용매는 pH 4.5의 citric acid 용액) ② 무수에탄올 침전물을 Sephadex G-25 컬럼으로 처리(용출용매는 ①과 동일) ③ 무수에탄올 침전물을 silica gel 컬럼으로 처리 (용출용매는 95% 에탄올).

이상의 각 컬럼(15×300 mm)을 상법에 따라 제작하고 재료 10 g을 처리한 자리공 추출물 또는 무수에탄올 침전물을 각각의 용출용매에 녹여 5 mL로 정용하여 해당되는 컬럼에 주입한 후 상온, 상압에서 용출시켰다. 분획은 색소층을 중심으로 색소층 이전의 용출물(fr. 1), 색소층(fr. 2) 그리고 색소층이 모두 용출된 이후의 용출물(fr. 3)으로 하였다. 이 용출물들을 50°C에서 감압농축하고 광선을 차단한 저온 데시케이터에서 보관하였다. 각 분획에 대하여 TLC와 HPLC를 하여 정제정도를 확인하였다. 또한 자외선-가시광선 영역의 흡수스펙트럼을 조사하였다. 따로 Forni 등(1983)이 제안한 기존방법으로 자리공열매를 처리하여 색소 농축물을 조제하였다.

이상 색소농축물들의 건조물량과 betanin함량을 측정하고 수득율과 잔존율을 다음과 같이 계산하였다. 또한 시판품 beet red의 순도도 함께 구하였다.

%색소 수득율=

$$\frac{\text{정제된 색소의 건조물량(g)}}{\text{씨를 제외한 건조 자리공 열매의 무게(g)}} \times 100$$

% 잔존율=

$$\frac{\text{정제 색소중의 betanin 함량(g)}}{\text{씨를 제외한 건조자리공열매중의 betanin함량(g)}} \times 100$$

LD₅₀의 측정

자리공 종자에서 추출한 표품 사포닌 분획과 무수에탄올처리로 얻은 색소침전물의 LD₅₀을 측정하였다. 사용한 동물은 10 g전후의 마우스(ICR종) 수컷이었다. 실험동물을 한달간 표준사료로 사육한 후 Behrens-Kaerbar법(약대협약물학회, 1993)에 따라 10마리를 1군으로 하여 kg당 4, 6, 8, 12, 14 그리고 16 g을 투여한 후 24시간 이후의 치사율을 조사하여 LD₅₀을 계산하였다.

결과 및 고찰

전국 각지에서 야생하고 있는 자리공과 식물중에서 그 분포가 가장 넓고 생육이 왕성한 *Phytolacca americana*로 판단되는 것들의 잘익은 과일을 9월 중순부터 10월 초순에 걸쳐 전국의 군락지에서 채집하였다. 채집한 자리공 열매 한송이의 평균무게는 16.5 g이었고 송이당 40~50개 정도의 열매가 달려 있었다. 씨의 중량비는 9.7%정도이었고, 씨를 제거한 열매중의 평균 수분함량은 82%이었다. 자리공 열매중의 적색소 betanin의 함량(윤광로, 1994)은 건조물 평균 g당 55.57 mg정도로 높은편이다.

추출조건

자리공 열매의 색소 추출은 색소의 변색을 방지하기 위하여 빛을 차단하고 저온에서 질소가스를 주입

Table 1. Betanin content and pH of Korean pokeberry extract

extraction condition	betanin* (mg/g of dry sample)	pH
citric acid solution (pH 4.5)	48.56	4.5
distilled water	47.81	6.8
juicing	46.24	5.7

*determined by spectrophotometry.

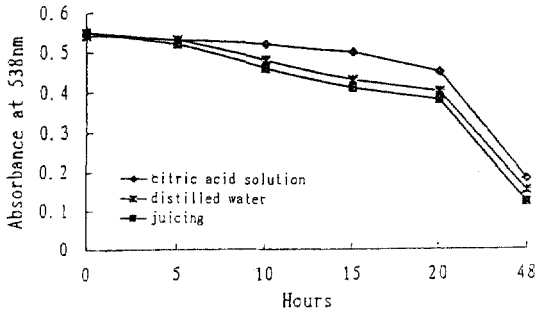


Fig. 1. Absorbance changes of pigment extract incubated at 37°C for 48 hours.

하며 실시하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 채택한 모든 방법에 따른 색소의 추출량에는 큰 차이가 없었으나 추출액의 pH는 증류수로 추출하거나 직접착즙하는 경우 각각 6.8과 5.7이었다. 한편 37°C에서 48시간동안 방치하면서 추출액들의 흡광도를 조사 비교한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 4.5의 citric acid용액 추출물이 다른 추출물에 비하여 흡광도의 변화가 다소 완만하여 변색이 억제됨을 알 수 있었다.

이상의 결과는 von Elbe 등(1974b)에 의하여 betanin의 추출용매로 제안되었던 pH 4.5의 citric acid용액은 자리공색소의 추출용매로도 매우 적합함을 의미하는 것이다.

사포닌계 물질들의 제거

자리공 열매의 즙에 함유된 사포닌계 물질들은 원래부터 과즙에 함유된 것들과 추출할 때 물리적인 자극에 의하여 씨가 과쇄되면서 사포닌들이 과즙으로 유입될 수 있기 때문에 추출 또는 착즙시에 씨앗의 손상을 최대로 억제할 필요가 있다. 자리공열매의 과즙에 함유된 사포닌계 물질을 제거하기 위하여 Driver와 Francis (1979)는 용매처리 방법을 Forni 등(1983)은 황산처리법을 제안하였다. 전자의 경우는 16단계에 달하는 용매처리로 그 과정이 너무 복잡하고 많은 종류의 유기용매를 사용한다는 문제점이 있으며 후자의 경우는 사용한 황산을 제거할 때 생성되는 BaSO₄의 잔류문제가 있다. 이와 같은 기존방법들의 단점을 보완하고 효율성이 큰 정제방법을 확립하기 위한 목적으로 본 연구에서는 무수에탄올 처리에 의한 사포닌계 물질들의 제거방법을 모색하였다.

일반적으로 사포닌들은 농도가 높은 에탄올에 잘 녹지만 betanin등의 betacyanin계 색소(Bilyk, 1979)는 잘 녹지 않기 때문에 색소농축물에 무수에탄올을 적당히 가해주면 색소들은 침전으로 남고 사포닌은 용

Table 2. Amounts of red precipitate from pokeberry extract by ethanol treatment (unit: mg)

concentration (°Bx)	ethanol			
	absolute	95%	90%	80%
15	0.84*	0.66	0.50	0.32
20	0.88	0.73	0.55	0.34
25	0.96	0.76	0.88	0.39
30	1.15	1.14	1.03	0.69

*weight of the dried precipitates

해된다. 그러나 가하는 에탄올의 농도가 낮아지면 betanin의 에탄올 용해도는 증가하여 색소도 같이 녹게 된다. 따라서 무수에탄올처리에 있어서 색소추출액의 농도(Brix)와 첨가하는 에탄올 농도의 비율을 효과적으로 조합해야 한다.

Table 2에서 보는 바와 같이 색소의 농축정도가 커지고 에탄올 농도가 높아질수록 당연히 색소침전물의 양은 증가하였다. 한편 추출액이 30°Bx 정도로 농축된 경우는 에탄올 농도를 90%까지 낮추어도 무수 에탄올을 사용할 때와 비슷한 양의 색소가 침전됨을 알 수 있었다. 색소침전율을 높힐 수 있는 색소농축물 농도와 무수에탄올의 비율을 조사한 결과(Table 3) 대체적으로 농축물에 대하여 10배량의 알코올을 사용하는 것이 적절한 것으로 판단되었다. 실험에서는 이상과 같은 결과를 감안하여 색소추출액의 농축정도를 25°Bx이상으로 조절하고 무수에탄올을 이 농축물량의 10배 정도로 가하여 색소를 침전시켰다. 이 색소침전물을 원심분리한후 침전과 상정액을 TLC와 HPLC를 통하여 비교하였다.

Fig. 2에서 보는바와 같이 육안으로 확인되는 붉은 색 반점(R_f=0.15)이 자리공 열매 색소 추출액(Fig. 2의 a), 무수에탄올을 처리하여 얻은 적색침전물(b) 및 betanin 표준(e)에서 검출되었으며, 황산에 의한 발색에서 사포닌에 해당하는 R_f=0.71 부근의 흑청색 반점들(d)이 색소추출액 및 무수에탄올처리 상정액(c)에서는 검출되었으나 무수에탄올을 처리 적색 침전물에서는 검

Table 3. Absorbances of supernatant at various ratio between concentrated from pokeberry extract and absolute ethanol

concentration (°Bx)	ratio of extract and absolute ethanol			
	1:4	1:6	1:8	1:10
15	1.36*	0.38	0.28	0.23
20	1.24	0.37	0.24	0.22
25	0.98	0.27	0.23	0.16
30	0.87	0.18	0.14	0.13

*absorbances were detected at 538 nm.

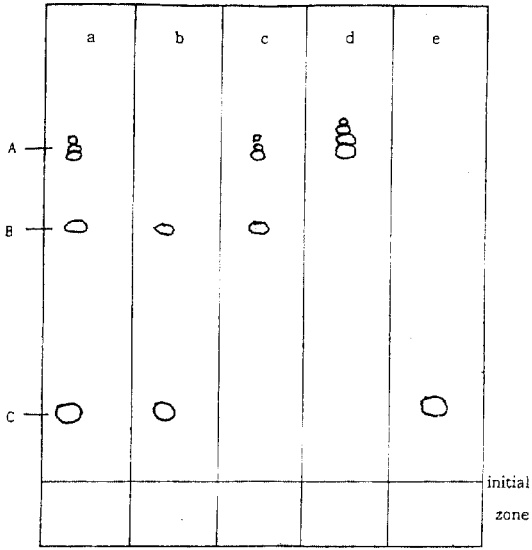


Fig. 2. TLC chromatograms of pokeberry juice and absolute ethanol treated fractions. A and B: dark blue spot under 10% H₂SO₄ sparying (110°C, 10 min), C: red spot under visible light, a: pokeberry juice, b: precipitate from absolute ethanol treatment, c: supernatant from absolute ethanol treatment, d: authentic saponin moieties, e: betanin standard

출되지 않았다. 한편 자리공씨에서 분리 정제하였던 사포닌 분획의 HPLC (Fig. 3의 D)에서 $t_R=10$ 전후의 피크가 4~5개 확인되었다. 이 크로마토그램들은 자리공과즙(A)과 무수알콜처리후 원심분리하여 얻은 상정액(C)에서도 확인되었지만 침전물(B)에서는 거의 소실되어 있었다. 이상과 같은 HPLC와 TLC의 결과는 자리공열매추출물중의 사포닌계 물질 대부분이 무수 에탄올 처리에 의하여 효과적으로 제거될 수 있음을 의미한다.

컬럼크로마토그래피를 이용한 부분정제

붉은색의 betacyanin계 색소를 정제하기 위하여 사탕무의 경우 양이온교환수지를 이용한 흡착크로마토그래피(Nilsson, 1970; von Elbe 등, 1972)가 흔히 응용되고 있으며 Vergeront 등(1980)은 상업적인 규모의 Sephadex G-25 컬럼을 검토한 바 있다. 그러나 자리공 열매의 경우는 색소를 순수분리하는 과정에서 Dowex 50×2-200 (Driver과 Francis, 1979; Forni 등, 1984)과 polyvinylpyrrolidone (Forni 등, 1984)컬럼이 복합적으로 이용된 적은 있으나 실용적인 정제방법으로서 컬럼의 활용은 검토된 바 없다.

본 연구에서는 silica gel과 Sephadex G-25컬럼을 이용한 크로마토그래피의 활용가능성을 검토하였다. 일

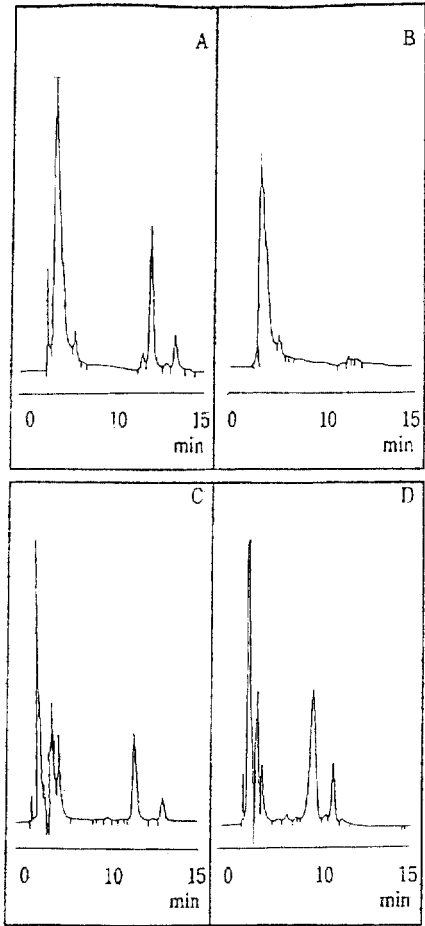


Fig. 3. HPLC chromatograms of saponin moieties composed in the juice of Korean pokeberry and in precipitate and supernatant of absolute ethanol teatments. A: pokeberry juice, B: precipitates by absolute ethanol, C: supernatant of absolute ethanol, D: saponin fraction from pokeberry seeds

반적으로 silica gel컬럼은 저분자물질들의 분획에 가장 널리 이용되고 있다. 실제로 Fig. 2에서 보는 바와 같이 silica gel 박판을 이용한 TLC에서 사포닌계 물질과 색소 그리고 미지의 반점이 매우 효과적으로 분리되고 있었다. 한편 Sephadex G-25의 경우 정제하고자 하는 색소들의 분자량이 betanin기준으로 560정도이므로 열매추출물에 공존하는 고분자 물질들의 분리를 기대할 수 있었다.

선정된 컬럼들을 통하여 얻은 분획들에 대하여 TLC한 결과는 Fig. 4와 같다. 무수알콜처리를 거쳐 Sephadex G-25나 silica gel컬럼에 적용시킨 색소분획(fr. 2)들의 경우 시료를 고농도로 점적한 TLC에서 색소외의 반점은 검출되지 않았다. 그러나 무수알콜을

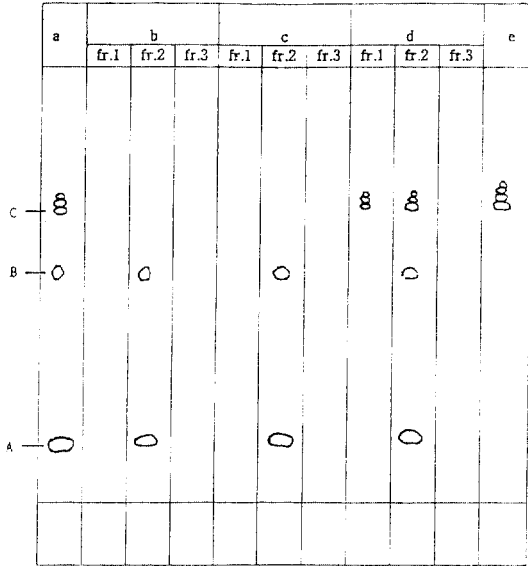


Fig. 4. TLC of column chromatographic fractions. A: red spot under visible light, B and C: dark blue spot under 10% H₂SO₄ sparying, a: pokeberry juice, b: precipitate by absolute ethanol treatment-silica gel column, c: precipitate by absolute ethanol treatment-Sephadex G-25 column, d: pokeberry juice-Sephadex G-25 column, e: authentic saponin moieties, fr. 1: fraction before pigment eluted, fr. 2: fraction of pigment eluted, fr. 3: fraction after pigment eluted

처리하지 않고 시행한 Sephadex G-25 컬럼크로마토그래피에서는 사포닌반점이 검출되었다(Fig. 4의 d). 따라서 Sephadex G-25 컬럼만으로는 사포닌계 물질의 제거가 원활하지 않음을 알 수 있다. HPLC의 결과(Fig. 5)도 TLC의 그것과 대동소이한 결과를 보였다. 한편 컬럼정제물과 정제하지 않은 추출물의 흡수스펙트럼을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 색소원액에서 보였던 280 nm부근의 흡수대가 컬럼정제물 모두에서 소실되고 있음을 알 수 있었다.

부분정제된 색소제품의 비교

이상에서 논의 되었던 정제 단계들을 거친 색소제품들을 50°C에서 감압건조한후 수득율과 잔존율 그리고 순도 등을 계산하여 기존의 Forni법 (Forni 등, 1983)으로 정제한 제품 및 시판 beet red와 비교하였다. Table 4에서 보는 바와같이 무수에탄올침전-silica gel 컬럼의 단계를 거친 제품과 무수에탄올-Sephadex G-25 컬럼에서 얻은 제품들의 수득율은 46.84%와 47.69% 색소잔존율은 78.08%와 81.25%인 반면에 Forni법의 수득율은 62.60%, 색소잔존율은 87.40%이었다. 한편 무수에탄올처리만 했을때에는 수득율이 82.66%, 색소잔존

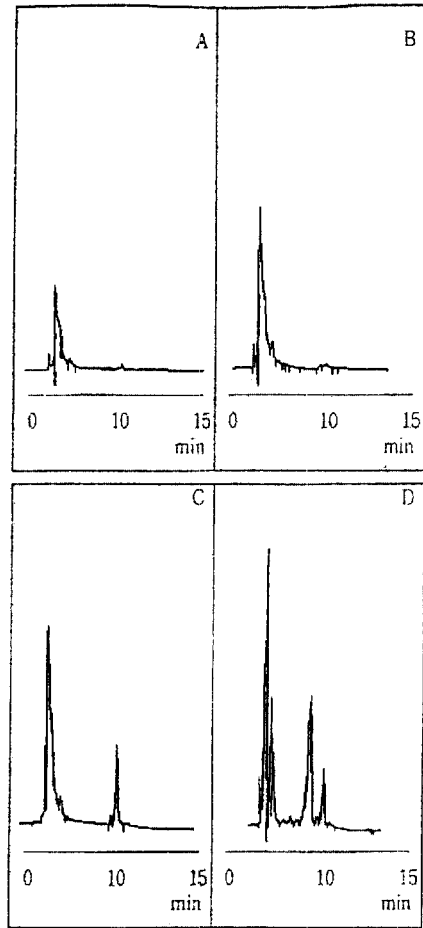


Fig. 5. HPLC of pigment fractions through column chromatography. A: precipitate by absolute ethanol treatment-silica gel column, B: precipitate by absolute ethanol treatment-Sephadex G-25 column, C: pokeberry juice-Sephadex G-25 column, D: authentic saponin moieties

율은 88.60%으로 비교한 모든 방법중에서 가장 높은 값이었다.

본 연구에서 검토된 제품들의 순도를 비교하면 (Table 5) 자리공열매즙의 betanin 함량이 5.2%임에 비하여 무수에탄올 침전물이 53.22%, silica gel 컬럼정제물 60.60% 그리고 Sephadex G-25 정제물이 62.60%로서 모든 조건에서 10배이상 정제될 수 있었다. 한편 Forni법의 경우 19.40%로써 본 연구의 부분정제법들을 응용할 경우 3배 이상의 고순도 제품을 확보할 수 있을것으로 판단되었다. 그리고 시판되고 있는 beet red의 경우는 순도가 0.19%로서 컬럼정제한 것들에 비하여 1/300 정도 낮았다.

각 제품들의 사포닌계 물질의 함량은 무수에탄올침

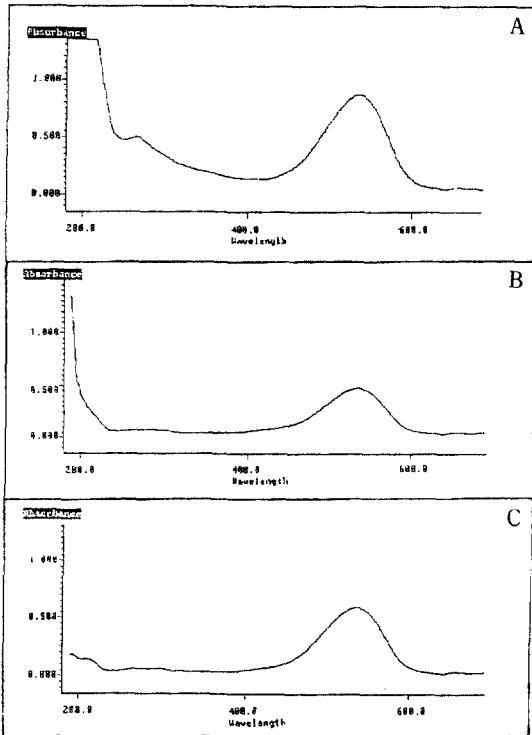


Fig. 6. Absorption spectra of Korean pokeberry juice and purified pigment fractions through chromatographic column. A: pokeberry juice, **B:** purified pigment fraction by silica gel column, **C:** purified pigment fraction by Sephadex G-25column

Table 4. Yields and remains of Korean pokeberry pigment products

treatment	yield (%)	remain (%)
Absolute ethanol precipitation	82.66,	88.60
Absolute ethanol & Sephadex G-25 column	47.72	81.30
Absolute ethanol & silica gel column	46.80	78.10
H ₂ SO ₄ precipitation by Forni method*	62.60	87.40

*reference (Forni *et al.*, 1983)

전물의 경우 2.47 mg%로서 열매즙의 62.30 mg%에 비하여 96% 정도 제거되었음을 알 수 있었다. 이 침전물을 silica gel컬럼으로 처리한 경우는 사포닌 함량이 2.22 mg% 그리고 Sephadex G-25의 경우는 1.75 mg%으로 낮아졌다. 이러한 값은 Forni 등(1983)의 방법이나 Driver와 Francis (1979)의 것과 비슷한 수준이었다. 따라서 본 연구에서 검토한 무수에탄올처리에 의한 자리공열매추출물의 정제방법은 기존 방법들과

Table 5. Betanin and total saponin contents of pokeberry juice and pigment products (dry matter basis)

	pokeberry juice*	absolute ethanol precipitates	silica gel column product	Sephadex G-25 column product
betanin (%)	5.20	53.22	60.60	62.60
saponin (mg%)	62.30	2.47	2.22	1.75

*extracted with distilled water

비교하여 사포닌계 활성물질을 비슷한 수준에서 제거하면서 3배 이상의 높은 순도를 지니는 색소를 확보할 수 있는 유망한 것으로 판단되었다.

독성의 예비조사

본 실험에서 얻은 자리공 열매즙의 무수에탄올 침전물을 ICR종 마우스에 경구투여하고 Behrens-Kaerbar법(대약협약물학분과회, 1993)에 의하여 측정된 LD₅₀은 13.1 g/kg으로 급성독성은 거의 문제가 없음을 알 수 있었다. Schwart 등(1983)은 사탕무의 betanin색소의 동물실험을 통하여 이 물질이 간암종의 유발에는 전혀 관여치 않았음을 밝힌 바 있다. 한편 Krantz 등(1980)에 의하면 경구투여된 betanin들의 흡수는 매우 안좋은 편이며 소량 흡수되더라도 쉽게 대사되기 때문에 독성은 우려할 정도가 아니라고 한다. 다만 동물 시험에서 정맥주사시 혈압과 심장박동이 상승되는 경우가 있었다고 한다.

한편, 본 실험에서 측정된 자리공 씨에서 추출한 사포닌 분획의 LD₅₀은 2.8 g/kg으로서 Saito 등(1979)이 측정된 자리공에 함유된 phytolaccasaponin E의 LD₅₀, 1.2 g/kg보다 큰 값이었다. 이 정도의 값은 자리공색소에 미량 포함된 사포닌계물질의 급성독성은 대단히 낮은 수준임을 말하는 것이다. 그러나 Saito 등(1979)이 지적한 항염작용, 항이노작용, 진정작용 그리고 장관운동저해능력은 물론 기타의 만성독성은 차후의 연구를 통하여 검토할 필요가 있다.

요약 및 결론

우리나라에서 자생하는 자리공열매의 색소추출물에 공존하는 사포닌계 활성물질을 제거하기 위하여 무수에탄올처리를 하였다. 색소추출물을 20°Bx 이상으로 농축한후 10배량 이상의 무수에탄올을 가하면 색소는 침전물로 남고 사포닌들은 상정액으로 분리되었다. 이렇게 얻은 침전물중 색소의 함량은 53.22%로서 기존방법에 따른 제품의 약 3배, 시판 beet red의 300배에 이르는 순도를 확보할 수 있었다. 이 색소침

전물의 사포닌 함량은 2.47 mg%로서 열매즙의 62.30 mg%에 비하여 96%정도 제거되었다. 한편 무수에탄올에 의한 침전물을 silica gel컬럼이나 Sephadex G-25컬럼에서 부분정제하면 각각의 순도를 60.60%와 62.60%로 향상시킬 수 있었다. 무수에탄올 처리한 자리공열매 색소침전물의 마우스에 대한 LD₅₀은 13.1 g/kg이었으며 자리공씨에서 추출한 사포닌분획의 LD₅₀은 2.8 g/kg으로 이 색소추출물의 급성독성은 무시할 정도였다.

이상의 연구성과를 감안할 때 이 무수에탄올 처리법은 자리공열매에서 사포닌계 활성물질을 효과적으로 제거하고 순도가 뛰어난 붉은색 천연식용색소를 정제할 수 있는 방법으로 실용가능성이 크다고 판단된다. 그러기 위하여 정제공정의 최적화연구와 안전성을 보장할 수 있는 본격적인 독성학적 검토가 요구된다.

감사의 글

이 논문의 일부는 학술진흥재단 자유공모과제 연구비 지원에 의하여 수행된 것임을 밝히며 이에 고마움을 표시합니다.

문헌

송주택. 1983. 신판 한국자원식물. 미로문화사, 서울, 대한민국. p321.

윤광로. 1994. 한국산 자리공과(Phytolaccaceae)식물열매중의 적색색소를 이용한 식용색소의 개발. 학술진흥재단 자유공모과제 연구보고서.

약대협약물분과회. 1993. 약물학·독성학실험. 신일상사, 서울, 대한민국. p43.

이근구, 윤광로. 1990. 자리공, *Phytolacca esculenta* Van Houttuyn 열매의 적색 색소. 중앙대학교 식량자원연구소 논문집 1: 25-39.

정태현. 1956. 한국식물도감, 하권(초본부). 신지사, 서울, 대한민국. p198.

Adams, J. P. 1977. Betanine separation and quantification by chromatography on gels: In Betacyanine separation and betanine degradation rate studies. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin, Madison, USA. pp47-80.

Bilyk, A. 1979. Extractive fractionation of betalaines. *J. Food Sci.* **44**: 1249-1251.

Dhillon, A. S. and A. J. Maurer. 1975. Evaluation of betalain pigments as colorants in turkey summer sausages, *Poultry Sci* **54**: 1272-1277.

Driver, M. G. and F. J. Francis. 1979. Purification of phytolaccanin (betanin) by removal of phytolaccatoxin from *Phytolacca americana*. *J. Food Sci.* **44**: 521-523.

Forni, E., A. Trifilo and A. Polesello. 1983. Research on the

utilisation of the pigment from '*Phytolacca decandra* L.' as a food colourant: Part 1-Preparation of extract free from toxic substance. *Food Chem.* **10**: 35-46.

Forni, E., A. Trifilo and A. Polesello. 1984. Research on the utilisation of the pigment from '*Phytolacca decandra* L.' as a food colourant: Part 2-Tests on pigmenting power and stability of phytolaccanin in model solutions. *Food Chem.* **13**: 149-160.

Freund, P. R., C. J. Washam and M. Maggion. 1988. Natural color for use in foods. *Cereal Foods World* **33**: 552-559.

Kang, S. S. and S. W. Woo. 1986. Triterpenes from the seeds of *Phytolacca* sp. *Kor. J. Pharmacogn.* **17**(1): 55-61.

Krantz, C., M. Monier and B. Wahlstorm. 1980. Absorption, excretion, metabolism and cardiovascular effects of beetroot extract in the rat. *Fd. Cosmet. Toxicol.* **18**: 363.

Nilsson, T. 1970. Studies into the pigments in beet root, *Lantbrukshoegsk. Annal.* **36**: 179-219.

Parsh, J. H., J. H. von Elbe and R. J. Sell. 1975. Betalaines in dairy products. *J. Milk Food Technol.* **38**: 25-28.

Pourrat, A., B. Lejeune, A. Grand and H. Pourrat. 1988. Betalains assay of fermented red beet root extract by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* **53**: 294-295.

Razden, T. K., S. Harkar, V. Kachroo and G. L. Koul. 1982. Phytolaccanol and epiacetylaeuritic acid, two triterpenoids from *Phytolacca acinosa*. *Phytochemistry* **21**: 2339-2342.

Saito, H., E. H. Park, T. Urushidani and J. Shoji. 1979. Pharmacological studies of phytolaccasaponin E. *Shoyakugaku Zasshi* **33**(2): 111-116.

Schwartz, S. J. and J. H. von Elbe. 1980. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. *J. agric. Food Chem.* **28**: 540.

Schwartz, S. J., B. E. Hildenbrand and J. H. von Elbe. 1981. Comparison of Spectrophotometric and HPLC methods to quantify betacyanins. *J. Food Sci.* **46**: 296-297.

Schwartz, S. J., J. H. von Elbe, M. W. Pariza, T. Goldsworthy and H. C. Pitot. 1983. Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* **21**: 531-535.

Theodore, H. and C. Howard. 1973. A saponin and sugar from saponins of *Phytolacca octandra*, *Phytochemistry* **12**: 2307-2308.

Vergeront, T. A., J. H. von Elbe and C. H., Amundson. 1980. Large-scale isolation of betalaines by gel filtration. *Process Biochemistry. Feb.*: 2.

von Elbe, J. H., S. H. Sy, I.-Y. Maing and W. H. Gabelman. 1972. Quantitative analysis of betacyanins in red beets (*Beta vulgaris*). *J. Food Sci.* **37**: 932-934.

von Elbe, J. H., J. T. Klement, C. H. Amundson, R. G. Casens and R. C. Lindsay. 1974a. Evaluation of betalain pigments as sausage colorants. *J. Food Sci.* **39**: 128-132.

von Elbe, J. H., I.-Y. Maing and C. H. Amundson. 1974b. Color stability of betanin. *J. Food Sci.* **39**: 334-337.

von Wyler, H. and A. S. Dreiding. 1961. Phytolaccanin, der Farbstoff der Kermesbeere (*Phytolacca decandra* L.) 1. Mitteilung zur kenntnis der Betacyane. *Helve. Chem. Acta.* **44**: 249-251.