

梔子(Gardenia Fructus)를 利用한 食用色素 開發에 關한 研究

徐 華 中

朝鮮大學校 藥學大學

A Study on the Development of Food Dye from Gardenia Fructus

Sheo, Hwa Jung

Choson University

=ABSTRACT=

Crocin was extracted from Gardenia fructus in order to manufacture a natural food dye.

In the extraction and purification process methanol and ethanol were used as the most suitable solvent selected in preliminary test and 9.28%g/100g of Crocin product in 99.89% of purity was acquired.

The lethal dose of Crocin administered in mouse by intra peritoneal was 5.36g/kg which is much lower toxic than any other. The toxic dose which caused diarrhoea in rat was 2.55 g/kg and maximum no effect level was found to be 272mg/kg. From the 1%~2.5% content of Crocin in rat diet reduction of body weight appeared and GTP and GOT (Transaminase) value increased significantly. Crocin showed a good properties of tolerating acid, alkali, sunlight, reductant, oxidant, and salt compared with tar dyes. The range from 100 ppm to 500ppm bring out bright yellow~orange color, the most effective color, with a good solubility in water-slightly in oil. The acceptable daily intake of crocin was calculated as 2.72 mg/kg based on maximum no effect dose (2% additive dose).

序 論

梔子나무(Gardenia jasminoides)는 溫帶性 常綠灌木으로 우리 나라에서 주로 南端에 分布하고 古來로 民間에서 栽培하여 그 열매를 梔子라하여 藥用과 食用色素 및 옷감의 染料로 使用하여온 優秀한 黃色素 原料이다. 近來에 人工色素의 工業化에 의한 多量生産으로 他天然色素처럼 梔子色素의 開發의 必要性을 느끼지 않았으므로 아직도 이 色素의 純粹 抽出分離方法과

急慢性毒性實驗에 의한 安全性評價가 이루어져 있지 않는 狀態이다. 따라서 우리나라를 비롯한 대부분의 나라에서 食品添加物公定書에는 아직 收錄되어 있지 않다¹⁾. 그러나 오늘날과 같이 人工合成色素에 의한 品公害가 날로 增大해가고 있는 實情에서는 無害한 天然色素開發의 必要性은 아주 甚矣하다. 梔子色素은 옛날부터 水製 엑기스로 만들어 食品의 着色料로 使用되어온 比較的 無毒한 色素로 알려져 있으며 그 優秀한 Orange 色相은 近來에 開發된 食品들의 着色料로서 適合하다. 따라서 이 色素를 開發하여 生産性을 增大시키면 他天然色素처럼 高價의 市場性을 維持하여 外貨所得源으로 큰 몫을 차지할 것으로 料된다. 自

접수일자 : 1981년 2월 21일

然히 市場性이 增大되어저면 原料需給을 위해 農家에서 所得源으로 梔子 나무재배에 대한 促進效果를 가져 올 것이다.

梔子の 黃色素의 主成分은 Carotenoid 系인 α -Crocin 으로 알려졌고 其外 非色素成分인 Iridoid glucoside 等을 含有하고 있다²⁾. 梔子色素의 分離研究에서 R. Kuhn 等³⁾이 梔子の Acetone Ex 를 加水分解하여 生成된 Crocetin 을 分離해낸 바 있으나 이 成分은 梔子の Original pigment 인 Crocin 과는 色相과 諸般性質에서 差異가 많을 뿐만 아니라, 收率도 아주 낮다. 現在까지 Crocin 만을 分離하는 方法은 Chromatography 를 利用한 方法以外는 알려져 있지 않다¹⁾. 梔子是 色素로서 뿐만 아니라, 消炎, 鎮靜, 利尿, 解熱 및 緩下 等の 藥理作用이 있으며 實際 黃疸治療에 臨床적으로 應用되고 있다⁴⁾. 따라서 食用色素로 使用하기 위해서는 連用에 의한 急性, 慢性毒性 誘發有無에 대한 實驗이 必須的으로 施行되어야 할 것이다. 그러나 現在까지의 藥理 및 毒性에 關한 研究에서 Miwa 와 Musatoshi 等이 藥效成分인 Geniposide 에 對한 報告는 있으나 色素成分인 Crocin 에 對한 實驗은 아직 없었다⁵⁾. 따라서 著者는 安全 無害한 食用色素를 開發할 目的으로 梔子로부터 製品收得率이 좋고 純도가 높은 Crocin 色素 抽出法을 實驗하고 食用色素로서 安全性 評價를 위한 毒性實驗 및 性狀을 實驗한 것을 土臺로 하여 Crocin 色素의 攝取許容量을 計算하여 그 結果를 報告한다.

實驗 方法

1. 色素製品 抽出 및 精製

Crocin 定量: 實驗材料인 全南 寶城産 乾梔子로부터 TLC 에 의해 純粹分離된 Crocin 을 標準品으로 하여 450mm 에서 比色定量하였다⁷⁾.

Crocin 抽出 및 精製: 抽出溶媒 選擇實驗을 통하여 가장 適合한 溶媒로 採擇한 methanol 로 抽出한 梔子 Ex 를 ethanol 과 methanol 로 分割抽出法에 의해 精製하였다.

2. 毒性實驗

Mouse 腹腔內 急性毒性 測定: mouse 6匹을 1群으로 한 18個群에 對하여 Crocin 의 稀釋液을 腹腔內에 注入한 後 1日間의 死亡數로부터 Behrens-Kärber 法에 의해 致死量(LD₅₀)을 產出하였다⁸⁾.

Rat 徑口 慢性毒性 實驗: rat 6匹을 1群으로 한 30群에 對하여 飼料에 Crocin 을 配合하여 90日間 飼

育하면서 中毒發生數를 調査하였다⁹⁾.

Rat 의 體重 增加率 實驗: 慢性調 調査中 10日間隔으로 體重을 測定하였다¹⁰⁾.

Rat 의 臟器毒性 調査: 慢性毒性 實驗直後·中毒을 誘發한 rat 의 血液을 採取하여 血清中 Transaminase 活性值(GOT 및 GPT)를 測定하였다¹¹⁾.

3. Crocin 色素製品의 性狀調査

常法 및 AOAC 法에 準하였다¹²⁾¹³⁾.

4. 色素許容量

FDA 規定된 方法에 準하였다¹⁴⁾.

實驗 및 考察

1. Crocin 抽出 및 精製

適合한 溶媒 選擇과 製品純度 檢査를 위하여 먼저 梔子에서 물로 抽出한 Crude Crocin Ex 로부터 Thin layer chromatography 에 의해 純粹分離된 Crocin 을 標準品으로하여 Spectrophotometer 에 의해 다음과 같이 比色定量하고 Stamm 法과 比較하였다⁷⁾.

標準品 Crocin 의 純粹 分離: 梔子粉末 1g 을 蒸溜水 20ml 씩으로 80°C 에서 5回抽出後 全 Crude crocin Ex 를 10ml 로 濃縮하였다. Silcagel 을 個定相으로 하여 Ex 0.05ml 를 CHCl₃:methanol(3:1) 溶媒로 展開한 後 100°C 에서 乾燥하였다²⁾.

展開板上의 黃色斑點 部位를 收集하여 methanol 5ml 로 反復하여 完全 抽出하고 Glass filter 로 濾過後 80°C 에서 蒸發乾固하고 105°C 恒量 乾燥시켰다. 以上과 같은 操作을 反復하여 約 20mg 의 純粹 Crocin(mp

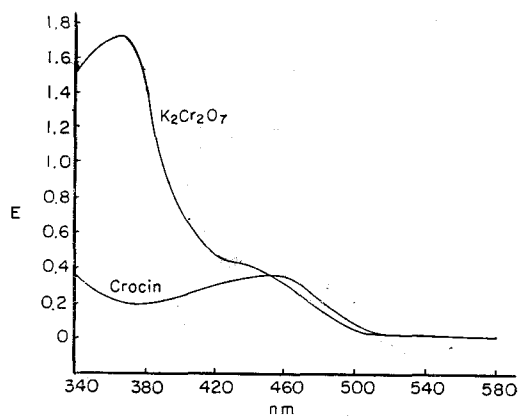


Fig. 1. Absorption curve of K₂Cr₂O₇ and crocin solution.

186.)를 分離하였다. 이때 梔子 1g 當 平均 13.8%의 Crocin 含量을 보였다.

Crocin 標準液 및 $K_2Cr_2O_7$ 標準液의 吸收曲線 :
Stamm에 의하면 0.8% $K_2Cr_2O_7$ 液의 色度는 0.1% Crocin 液의 色相과 比較된다고 했다. 따라서 $K_2Cr_2O_7$, 8mg/10ml 液과 Crocin 1mg/10ml 水溶液에 대하여 Spectrophotometer에 의한 吸收曲線 比較는 Fig. 1 과 같다.

Fig. 1을 보면 450nm 波長에서 $K_2Cr_2O_7$ 溶液(黃色)의 2次 吸收極大點과 Crocin(黃色)의 1次 吸收極大點이 처음으로 收斂한 後 同一한 樣相의 吸收曲線을 만든다. 그러므로 Crocin 標準品 對身 $K_2Cr_2O_7$ 標準液을 使用하여 450nm에서 Crocin에 대한 間接 比色 定量的 可能性이 立證되었다.

Crocin 및 $K_2Cr_2O_7$ 標準液의 檢量線 : 純品 $K_2Cr_2O_7$ 1g/100ml 溶液의 0.1, 0.2, 0.3,1.5ml을 取하고 蒸溜水를 加하여 各各 100ml로 만든다. 別途로 TLC에서 分離된 Crocin 12.5mg/10ml 溶液의 0.1, 0.2, 0.3.....1.5ml를 取하고 蒸溜水를 加하여 各各 100ml로 만들고 Spectrophotometer를 使用하여 兩 溶液에 대한 吸光度(E)를 測定한 結果는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 볼 때 Crocin은 1.25~18ppm 範圍에서, $K_2Cr_2O_7$ 은 10~130ppm 範圍에서 Lambert-Beer 法則이 잘 成立되고 있음을 본다.

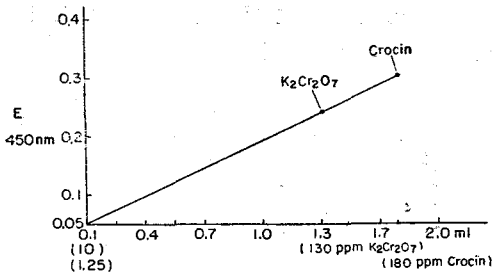


Fig. 2. Calibration curve of $K_2Cr_2O_7$ and crocin solution.

抽出溶媒의 選擇 : 適合한 溶媒選擇은 製品生産의 成敗 與否와 抽出時間 및 製品收得量에 關係되므로 製品 生産에 앞서 重要한 實驗이 아닐 수 없다. 溶媒 選擇 實驗으로 乾梔子 1g을 80°C 1時間 蒸溜水, Ethanol, Methanol, Acetone 및 石油 Ether 各各 50ml 씩으로 1回 抽出한 후 Ex를 5ml로 濃縮하여 各 抽出 Ex에 대한 前述한 方法으로 Crocin을 定量的 結果는 Table

Table 1. Efficiency test of solvent for crocin extraction(sample 1g)

Solvent	Water	Methanol	Ethanol	Acetone	Prtroleum ether
Ex. g	0.174	0.135	0.170	0.155	0.089
Ex %	17.4	13.5	17.0	15.5	8.9
Crocing	0.075	0.133	0.057	0.101	—
Crocin %in Ex	43.1	98.7	33.7	65.1	—
Yield %	54.5	96.2	41.4	73.1	—

과 같다.

Table 1에서 methanol의 경우 Crocin 含量 98.7%인 純度 높은 色素抽出物을 얻었고 原料로부터 96.2%의 Crocin 抽出效果(yield)를 갖는다. 石油 ether의 抽出物量은 8.9%이나 엑기스에 Crocin은 거의 함유되지 않아 엑기스는 大部分 梔子中の 脂肪樣物質인 것 같다. 水溶媒의 경우 엑기스 量은 가장 많으나 엑기스 中에 Crocin 純度は methanol 경우 보다 折半(43.1%) 以下이고 yield도 54.4%이다. 그러므로 물은 Crocin 以外의 不純物을 多量 抽出시켜 精製操作이 매우 困難하므로 經濟性이 낮을 것이다. Ethanol에 의한 抽出物質量은 물의 것과 비슷한 0.170g이나 시험용매 中에서 Crocin 純도가 가장 낮은 33.7%이고 收率도 41.4%로 가장 낮다. 따라서 Ethanol에 대한 Crocin의 溶解度는 매우 작으나 不純物의 溶解度는 큰 것으로 밝혀졌다. Acetone은 물 및 Ethanol보다 純度 및 抽出效果가 좋으나 methanol 보다는 훨씬 멀어진다. 따라서 短時間 1回 抽出로 Crocin의 純도와 收率은 높은 溶媒는 methanol로 밝혀졌다.

精製操作에서 溶媒의 具備條件은 可及的 Crocin의 溶解度는 작으나 不純物의 溶解도가 큰 1次溶媒와 反對로 不純物의 溶解度는 작으나 Crocin의 溶解도가 큰 2次溶媒가 要求된다. 이에 相當한 溶媒는 以上の 實驗結果 Ethanol(1次)과 methanol(2次)이었다. 그리고 原料의 脫脂는 石油 ether이 適合했다.

Crocin의 抽出 : 乾梔子를 dry oven 內에서 70°C, 24時間 乾燥後 破碎한 粉末 300g을 石油 ether 1l로 2回 脫脂한 후 大型 Flask에 넣고 methanol 2l을 加하여 水冷式 還流冷却器를 垂直으로 連結하고 80°C 恒溫水槽內에서 3時間 抽出하고 다시 1l의 溶媒로 2時間 抽出한 後 Crude Crocin의 全 Ex를 濾過한다. 이때 Ex의 色相은 暗赤色이었다. 색소 Ex를 80°C 水槽內에서 約 5時間 蒸發濃縮하여 0.5l로 만들었다. 이때

溶媒는 冷却方式에 의해 回收했다. 濃縮된 Crude crocin Ex를 石油 ether 100ml 씩으로 2回 抽出하여 물에 不溶性인 物質(非 色素性 不純物質)을 抽出 除去하였다. 濃 Ex를 더욱 80°C 水槽內에서 減壓蒸發하여 約 200ml의 Ex로 만들었다.

Crocin 製品의 精製: 溶媒 選擇實驗에서 溶媒에 대한 不純物의 抽出比率는 methanol 對 ethanol이 1:1.3인 反面 Crocin의 抽出比率는 3:1이므로 methanol로 추출한 Crude Crocin의 濃 Ex에 ethanol을 加할 때 不純物은 主로 ethanol에 移行하고 大部分의 Crocin은 溶解度가 減少되어 沈澱될 것이다. 이 原理에 따라 分割抽出에 의해 Crocin을 不純物(主로 Geniposide, Gardenoside 등)로 부터 分離 精製가 可能하였다.

以上の 200ml methanol의 Crude Crocin 濃 Ex에 ethanol 500ml를 加하니 赤色の Crude이 沈澱하였다. Glass Filter로 濾過한 沈澱을 Ethanol로 洗滌後 沈澱을 收集하여 卽時 Desiccator 內에 保管했다. 沈澱 少量을 蒸溜水 少量에 溶解하니 梔子 元來의 黃色을 띠었고 TLC에 展開하니 移動比(Rf 值) 0.57에서 黃色斑點을 얻었다. 다음 Ethanol 濾液을 100°C 水浴內에서 蒸發濃縮하여 50ml로 만든 후 冷却시킬 때 再次 Crocin이 沈澱하여 濾過後 色素沈澱을 收集하였다. Ethanol 濾液에 methanol 100ml을 加하니 赤黃色 溶液中에 白色不純物이 沈澱하여 濾過後 沈澱을 除去하였다. 다시 濾液을 50ml로 濃縮하니 不純物이 再次 沈澱하여 濾過後 濾液에 Ethanol 100ml 加하니 少量의 Crocin 色素沈澱이 생겼다. 이와 같은 精製操作을 2回 反復하여 얻은 結果를 精製 以前의 成績과 함께 Table 2에 比較한다.

Table 2. Out put of crocin product after purification (Sample 100g)

Procedure	Product (g)	Crocin(%) purity	Yield (%)
Extraction (methanol)	14.13	95.68	97.97
Purification (Methanol ethanol)	1st	11.47	98.86
	2nd	9.28	99.89

Table 2에서 볼 때 2回 精製操作으로 原料 100g 당 9.28g의 Crocin을 얻었고 純度는 99.89% 이었다. 精製操作에 의한 純度向上은 1回에서 約 3.18%, 2回로 約 1.03% 向上되었고 反面 Crocin의 損失은 每回 精

製時마다 約 15% 内外이고 最終 67.17%의 收率을 보였다. 1回 精製로 純度가 約 99%이므로 經濟性을 考慮할 때 2回 精製操作은 別로 큰 意義가 없을 것 같다. 冷却方式에 의해 約 80%의 溶媒가 回收되었다.

2. Crocin의 毒性評價

Mouse 腹腔內 急性毒(LD₅₀) 調査: 體重 23~25g의 mouse(ICR種) 암수 各 3마리씩인 6마리를 1群으로서 6個群을 1組로 하고 3個組에 대하여 Table 3과 같은 實驗食餌로 飼育하면서 豫備實驗에서 얻은 情報를 土臺로 하여 純度 99.89%인 Crocin의 11.4, 12, 12.6, 13.2, 13.8, 14.4g씩을 Saline 30ml에 各各 溶解後 그 0.3ml씩을 mouse 腹腔內에 注入한 結果 投與 8時間 以後 漸次 食餌拒否와 瀉瀉 泄瀉 症勢를 보이고 尿와 糞은 顯著的한 黃色을 띠었다. 16時間 以後 부터 모든 實驗群이 完全 食餌拒否와 瀕死狀態에 이르고 24時間까지의 死亡하는 mouse 數를 調査한 結果는 Table 4와 같다.

Table 3. Diet composition of test animal

Carbohydrate(Rice powder)	660g
Protein(casein)	200g
Fat(Lard)	150g
Salt mixture	40g
Vitamin mixture	1Tab

Table 4. Raw data of lethal toxicity of crocin in mouse(IP, 24hr)

Crocin g/kg	Group		
	A	B	C
4.75	0/6	0/6	1/6
5.0	1/6	1/6	2/6
5.25	3/6	2/6	2/6
5.5	3/6	4/6	3/6
5.75	5/6	4/6	4/6
6.0	6/6	5/6	6/6

以上の 成績을 Behrens-Kärber 法에 의해 計算한 致死量(LD₅₀)은 Table 5와 같다.

Table 5. Median lethal dose of crocin in mouse (IP, 24hr)

Group	A	B	C	Mean
Crocing(g)/kg	5.37	5.43	5.39	5.36

Table 5 에서와 같이 平均 致死量(LD₅₀) 5.36g/kg 은 許容 Tar 色素中 가장 低毒性인 食用 黃色 4號 Tartrazine 의 LD₅₀ 2g/kg(mouse 腹腔) 보다 毒性이 매우 낮아 거의 無毒性이었다¹⁴⁾.

梔子の 毒性은 過量 投與時 主藥效成分인 Geniposide (6% 含有)에 의해 惹起되는 것으로 알려졌으나 Musatoshi, Harada 等¹⁵⁾이 行한 Geniposide 와 梔子 水劑 Ex 의 mouse 腹腔內 急性毒實驗에서 水劑 Ex 를 5g/kg 까지, Geniposide 를 3g/kg 投與해도 死亡例가 없었음을 報告했는데 著者가 豫備實驗한 結果 Crocin 含量 43%인 水劑 Ex 에 대한 腹腔內 急性中毒量에서 確實한 致死量은 6~7g/kg 을 보여 Crocin 의 LD₅₀보다 多少 높은 것으로 判斷된다.

Rat 의 徑口投與 慢性毒(Toxic Dose) 調査: 體重 110±10g 의 rat(Wistar strain) 암수 各各 3마리인 6마리를 1群으로 한 10群을 1組로 하고 3個組에 對하여 食餌條件은 mouse 急性毒 調査와 같게 하고 Crocin 을 rat 食餌에 對하여 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%를 各各 配合하고 90日間 飼育하면서 每日 中毒發生 與否를 對照群과 比較하고 中毒發生數를 調査한 結果는 Table 6 과 같다.

以上の 實驗에서 Crocin 投與量을 0.01%부터 始作한 것은 許容 Tar 系 色素는 普通 添加量이 0.001~0.05%이고 Carotenoid 系 色素는 0.0006~0.05%이므로 이들 許容量의 1~400倍 濃度에서 毒性을 調査함이 妥當할 것이다¹⁴⁾.

Table 6 의 成績에서 볼 때 中毒으로 因한 死亡의 例는 거의 없었고 外觀上 中毒의 Criteria는 輕症의 泄瀉症勢이었다. 投與後 23日間은 全群에서 別 異常이

Table 6. Raw data of Chronic toxicity of crocin in rat(P.O 90 days)

Crocin content in diet(%)	Group		
	A	B	C
0.01	0/6	0/6	0/6
0.05	0/6	0/6	0/6
0.1	0/6	0/6	0/6
0.2	0/6	0/6	0/6
0.3	0/6	0/6	0/6
0.5	0/6	0/6	0/6
1.0	0/6	1/6	0/6
1.5	1/6	1/6	1/6
2.0	3/6	4/6	3/6
2.5	6/6	6/6	5/6

없었고 그 以後부터 2.5% 添加群에서 中毒의 例가 徐徐히 보이오 56日 以後 2% 群에서, 70日 以後는 1.5% 群에서 85日 以後는 1%의 群에서 거의 모두 中毒(설사증세)을 보였었다. 그러나 0.01~0.5% 群은 外觀上 變化를 認知할 수 없었다.

Table 7. Toxic dose of crocin in rat(PO. 90days)

Group	A	B	C	mean
Crocin content in diet(%)	1.92	1.75	1.96	1.87
Crocin(g)/kg	2.61	2.38	2.66	2.55

以上에서 長期投與로 因한 中毒數 增加 傾向은 Crocin 의 體內 蓄積의 結果로 보이며 一般 Carotenoid 系

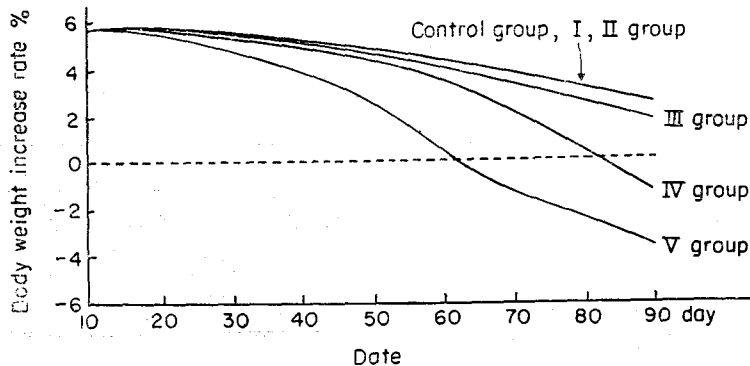


Fig. 3. Increasing rate of body weight

Table 8. Rat body weight gained in experimental period

Group	Initial body weight(g)	Date/Item	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Control	109.2	weight gained %	115.5	122	128.5	135	141.3	147.2	152.5	157	160.7
			6.3	6.5	6.5	6.5	6.3	5.9	5.3	4.5	3.7
I 0.01~0.05%	110.2	"	116.5	123.1	129.7	136.3	142.5	148.5	153.5	158.1	161.8
			6.3	6.6	6.6	6.6	6.2	5.9	5.1	4.6	3.7
II 0.1~0.2%	111.3	"	117.7	124.4	131.1	137.6	143.9	149.7	154.9	159.3	162.9
			6.4	6.7	6.7	6.5	6.3	5.8	5.2	4.4	3.6
III 0.3~0.5%	107.5	"	113.7	120.1	126.5	132.8	138.9	144.3	148.9	152.6	155.1
			6.2	6.4	6.4	6.3	6.1	5.4	4.6	3.7	2.5
IV 1~1.5%	112.4	"	118.9	125.5	132	138.2	144	148.7	151	151.3	149.6
			6.5	6.6	6.5	6.2	5.8	4.7	2.6	0.3	-1.7
V 2~2.5%	110.5	"	116.7	123	128.9	133.9	137.1	137.3	135.3	131.9	127.1
			6.2	6.3	5.9	5	3.2	0.27	-1.9	-3.3	-4.7
			5.7	5.4	4.8	3.9	2.4	0.2	-1.4	-2.5	-3.6

化合物(β -Carotene 등)의 一般의 性質과 一致된다¹⁾. Table 6의 成績으로부터 計算된 中毒量은 Table 7과 같이 平均 2.55g/kg 이었다.

Rat의 體重 變化率: Rat의 長期 毒性實驗 期間中 Crocin의 0.01~0.05%, 0.1~0.2%, 0.3~0.5%, 1~1.5% 및 2~2.5% 添加群 範圍를 다시 各群(36匹)으로 묶은 5群에 對하여 10日마다 體重을 測定한 結果는 Table 8과 같고 體重 增加率은 Fig. 3과 같다.

Fig. 3의 體重增加率에서 0.01~0.05%와 0.1~0.2% 群은 對照群과 거의 一致되나 0.3~0.5% 群은 僅少한 減少를 보인다. 1~1.5 및 2~2.5% 群은 Crocin 添加量 增加에 따라 時差를 갖고 體重 增加率이 濕著히 下降되어 1~1.5% 群은 約 70日 以後부터, 2~2.5% 群은 50日 以後부터 -1.1~-3.6%의 體重 減少를 보였다.

Rat 血清中 Transaminase 活性值: 慢性毒性 調査直後 前記한 體重實驗과 同一하게 묶은 rat 群에 對하여 各群에서 抽出한 rat 3마리를 Ether 麻醉後 血液 5ml를 取한뒤 GOT, GPT 測定用 Kit를 使用하여 Reitman-Frankel法에 따라 測定한 GOT, GPT 値는 Table 9와 같다.

Table 9에서와 같이 0.01~0.05% 및 0.1~0.2% 群은 對照群보다 僅少하게 높은 GOT 및 GPT 値를 보이나 大體로 거의 같은 水準이고 Crocin 增量에 따라 測定值가 增加하는 傾向이다. 特히 0.3~0.5% 群부터 有意的인 增加를 보이고 中毒을 일으켰던 1~1.5% 및

2~2.5% 群은 顯著히 上昇되어 前記한 體重實驗 結果와도 잘 一致된다. 따라서 以上の 3項目의 慢性毒實驗結果를 分析하면 Crocin의 最大無作用量은 0.2% (0.272g/kg. rat) 添加量으로 밝혀졌다.

3. Crocin 色素의 性狀

Crocin 粉末 혹은 100ppm 水溶液에 對한 性狀實驗

Table 9. Transaminase activity in intoxicated rat serum

Group	Transaminase activity		GOT		GPT	
	unit	mean	unit	mean	unit	mean
Control	321		75			
	315	315	81		74	
	310		68			
I 0.01~0.05%	331		78			
	301	318	72		75	
	322		75			
II 0.1~0.2%	323		84			
	301	320	76		76	
	336		68			
III 0.3~0.5%	345		76			
	352	344	83		80	
	335		82			
IV 1~1.5%	499		99			
	482	497	105		104	
	510		108			
V 2~2.5%	532		118			
	528	533	117		116	
	540		115			

結果는 다음과 같다.

液性(pH)에 따른 色狀變化: pH 2~11에서 黃色~橙黃色을 維持하여 液性에 저항하여 比較的 安定한 色相을 가진다. 따라서 一般 食品에서 液性에 따른 色相의 變化는 거의 없을 것으로 보인다.

耐酸性 및 耐알칼리性: 1N-H₂SO₄ 溶液中에서 黃綠色, 1N-NaOH 液에서 赤黃色을 보인다.

耐光性: Crocin 液을 直射光에 20日間 露出後 同一量의 Tartrazine 과 比較하니 Crocin 은 $\frac{1}{20}$ 量, Tartrazine 은 $\frac{1}{18}$ 量이 消失되어 耐光性은 비교적 좋았다.

耐酸化性 및 耐還元性: Crocin 液을 10時間 曝氣(aeration)할 때 色相의 減少가 없었고 100ppm의 SO₂ (Na₂SO₃+HCl) 液과 同量의 Crocin 液을 混合時 色相의 變化는 거의 없었다.

耐鹽性 및 耐熱性: 20% 食鹽水와 同量의 Crocin 液을 混合後 100°C로 加熱時 色相變化는 없었고 Crocin 粉末을 灰化爐內에서 加熱時 245°C에서 赤褐色으로 分解하였다. 따라서 一般食品의 調理中 色相의 變化는 없을 것이다.

溶解性 및 濃度에 따른 色相: Crocin 粉末은 冷, 溫水에 모두 잘 녹아 1ppm 以下는 微黃色, 10~100ppm 以內는 淡黃色, 100~200ppm 以內는 鮮명한 黃色, 200~500ppm 以內는 Orange 色, 500~1000ppm 以內는 짙은 橙黃色, 1000~2000ppm 以內 橙赤色, 2000ppm 以上은 赤色을 띤다. 油脂에도 多少 녹아 黃色을 띤다. 따라서 Crocin 水溶液의 鮮명한 黃色~Orange 色相의 有效濃度 範圍는 100~500ppm 이고 同一 濃度의 Tartrazine 色度와 거의 一致된다.

味와 着染性: 500ppm 以下에서 無味, 500ppm~1000ppm 以上에서 若干 苦味를 낸다. 따라서 有效色相濃度로 食品에 添加할 때 食品本來의 맛에는 影響을 주지 않을 것이다. 말린 무우를 Crocin 液에 3日間 沈積시킨 후 꺼내어 1回 洗滌時 約 4.5%의 色素가 溶出되어 Tartrazine 의 3.7%의 溶出量보다 많으나 色相에는 큰 差가 없으므로 着染性은 比較的 優秀했다.

4. Crocin 色素의 攝取許容量

食品 添加物의 許容量은 實驗動物의 最大 無作用量(Maximum no effect level)이 土臺가 된다¹⁴⁾. 前記한 慢性毒性 實驗에서 最大 無作用量은 0.2% 添加量 即 272mg/kg·rat·day 이고 이를 사람의 安全係數 100으로 나눈 2.72mg/kg·man·day 또는 0.163g/60kg 이 1人 1日 攝取許容量(Acceptable daily intake)이 된다. 따라서 1日 食品의 攝取量과 攝取回數에 따라 Crocin 의 1日 總 攝取量이 以上의 攝取許容量(0.163g

/60kg 體重)을 초과하지 않고 有效色相을 유지하는 範圍內에서 常用量을 定하면 좋을 것이다. 例로서 하루 1回 500g을 攝取하는 食品에 對해 Crocin 의 元來色相의 有效濃度범위 中에서 300ppm(0.03%)을 添加할 때 1日 攝取量은 0.15g/60kg 이 되어 攝取許容量 0.163g/60kg에 未達되므로 0.03% 添加量은 安全하게 使用할 수 있는 量이 된다.

結 論

梔子の 食用色素 開發에 關한 研究結果를 要約하면 다음과 같다.

Crocin 色素 抽出溶媒 選擇實驗에서 methanol 이 가장 優秀한 溶媒로 選定되었으며 精製溶媒는 methanol 과 Ethanol 이 適合했다.

梔子로부터 抽出된 Crude crocin 을 分割抽出法에 의해 2回 精製 操作으로 純度 99.89%, 인 9.28g/100g 의 Crocin 製品을 얻었고 收率은 67.1% 이었다.

Crocin 의 mouse 腹腔內 思性毒 調查結果에서 致死量은 5.36g/kg 으로서 거의 無毒性이었다. rat 經口投與 3個月間의 慢性毒 調查結果 主된 中毒症狀인 泄瀉를 일으킨 Crocin 의 中毒量은 2.55g/kg(1.87% 添加量) 이었고 0.1~0.2% 添加量은 매우 安全하여 最大 無作用量은 0.2% 添加量 即 0.272g/kg 이었다. 0.3~0.5% 添加量 以上에서 有意的인 體重減少와 GOT 및 GPT 值 上昇을 보였다. Crocin 色素의 性狀檢査에서 pH 變化에 따른 色相, 耐酸性, 耐알칼리性, 耐光性耐酸化性, 耐還元性, 耐鹽性, 着染性 溶解性等이 比較的 良好하고 鮮명한 黃色~橙黃色 色相의 有效濃度는 100~500ppm 이었다. 이 濃度에서 味覺檢査 結果도 良好하여 食用色素로서 條件을 具備하였다.

實驗動物에 대한 Crocin 의 最大 無作用量을 土臺로 計算한 이 色素의 攝取 許容量은 2.72mg/kg 또는 0.163g/60kg·man day 이었다.

따라서 比較的 低廉하고 簡便한 溶媒抽出精製法으로 梔子로부터 Crocin 製品生産의 工業化가 可能하며 毒性檢査 및 性狀調查에서 食用色素로서의 理想的인 條件을 具備하고 있다. 現在와 같은 制限된 原料生産量 으로서는 經濟性이 낮으나 原料生産의 多量化가 이루어지면 無害한 天然食用色素의 수요증대 추세에 부응하여 梔子色素의 商品化에 대한 展望은 밝은 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

- 1) 日本 食品添加物 公定書 解説書 편찬회 : 日本 食品添加物 公定書 解説書, B-555, 1977.
- 2) K. Yamauchi et al.: *Biological and Chemical assay of Geniposide, planta, medica, Vol. 25 (1), 219-223, 1974.*
- 3) R. Kuhn, et al.: *The coloring matter of the Chinese fruit of the gardenia, Helv., chim., acta, 11, 16-24, 1928.*
- 4) 原田 等 : 山梔子의 藥理學的 研究(第1報), 日本 藥學雜誌, 94(2), 157-162, 1974.
- 5) 赤松 : 山梔子, 和漢藥, 297, 1975.
- 6) Sunshine: *Hand book of analytical toxicology, CRC, 175, 1976.*
- 7) J. Stamm, et al.: *Assay of Saffron, Farm, No-tisble, (40. 29), Quart, J. Pharm. Pharmacol., 4, 642, 1931.*
- 8) Avram Gold stein, et al.: *Principles of drug action, Wiley Biomedical-Health publication, 3 83-390, 1974.*
- 9) 宋聖鎬 : 紫根色素의 毒性에 關한 研究, 圓大 學位 論叢, 第2輯, 137-143, 1979.
- 10) 林鍾弼 : 들기름이 흰쥐의 肝臟의 重量에 미치는 影響, 圓大 學位論文叢, 第2輯, 145-153, 1979.
- 11) 丁鍾甲 : 食餌 脂肪量이 鍊中毒 rat의 血清 *Transaminase*의 活性에 미치는 影響, 圓大 學位論叢, 第2輯, 155-161, 1979.
- 12) 日本 藥學會編 : 日本 衛生試驗法 注解, 118, 1980.
- 13) AOAC, 348-383, 1975.
- 14) 文範洙 : 食品添加物, 28-32, 1979.