

HPLC를 이용한 타르색소의 분리정량

양호철 · 허남철

전남보건환경연구원 식품분석과

Determination of Synthetic Food Colours by HPLC with Photodiode Array Detector

Ho-Chul Yang and Nam-Chil Heo

Food Analysis Division, Chonnam Institute of Health and Environment

Abstract

A simple, rapid, efficient method is proposed for extraction of 13 synthetic water-soluble food colours (Tartrazine, Amaranth, Indigo carmine, New coccine, Sunset yellow FCF, Allura red AC, Eosine, Fast Green FCF, Brilliant Blue FCF, Erythrosine, Acid red, phloxine, Rose Bengal) by polyamide resin and for their quantitative by high performance liquid chromatography (HPLC). Colours (coal-tar dyes) were extracted with polyamide resin and then determined by HPLC. The HPLC conditions using a reverse phase partition type column (Nova-pak C₁₈), photodiode array (PDA) detector and 1% Ammonium acetate / 60% acetonitrile in water as eluent, were acceptable for various kinds of colorants. By the use of the proposed method, a survey of coal-tar dyes was carried out on 20 samples and that were detected 4.76~133.47 ppm.

Key words: Coal-tar dyes, Photodiode array (PDA), HPLC, Polyamide resin

서 론

천연의 농수산물은 각기 그 고유의 색을 지니고 있지만 이를 식품으로 조리·가공하거나 혹은 보존하는 동안에 변색 또는 퇴색하기 쉬워서 색을 그대로 유지하기가 극히 어려우며 심할 경우에는 기호적 가치를 손상시키는 수도 있다. 그러므로 식품에 따라서는 식품의 천연색을 보완·미화하여 선호도를 높이기 위한 인공적인 착색료(colouring matters)의 사용이 요구되어진다. 그러나 천연색소는 색의 종류가 적고, 선명도가 떨어지며, 원료의 제약 때문에 필요할 때 손쉽게 구할 수 없는 데다가 식품공업의 발달로 그 수요를 충족할 수 없게 되어 1800년대말부터 합성색소가 크게 발전하면서 값싸고 쉽게 구할 수 있는 합성착색료가 많이 사용되어 지고 있다⁽¹⁾.

합성착색료중 타르색소는 대표적인 착색료로서 그 수가 수천에 이르지만 급성독성뿐 아니라 만성독성이 문제가 되는 것이 많으므로 안전성이 확인된 것만이

사용허가되고 있는데 세계적으로 지용성색소는 안전성때문에 사용이 금지되고 있고, 수용성색소로서 30개 미만의 품목만이 허용되어 있다. 우리나라에서 식품위생법이 처음으로 공포된 1962년에는 19 품목의 타르색소가 허가 되었으나 최근 12품목의 사용이 금지되었고 적색 40호가 새로이 추가되어 현재 8품목이 허가되어 있다⁽²⁾. 현재 식품첨가물로서 사용이 허가된 합성착색료는 타르색소 8품목(식용적색 2호, 3호, 40호 식용황색 4호, 5호, 식용녹색 3호, 식용청색 1호 및 2호), 그 알루미늄레이크 6품목(적색 3호, 40호 제외) 및 비 tar계 착색료가 8 품목(삼산화철, 수용성안나토, β-카로틴, β-아포-8'-카로티날, 철크로로필린나트륨, 동크로로필린나트륨, 동크로로필린나트륨, 이산화티타늄)등 모두 22품목이다⁽³⁾.

한편, 타르색소의 정량에 있어 가장 큰 문제중의 하나는 식품성분과의 화학적 결합으로부터 색소 성분만을 추출하는 단계이다. 식품색소의 추출과 정제에 관한 초기의 방법중의 하나가 탈지양모를 사용하는 방법(wool dyeing procedure)⁽⁴⁾이며 우리나라의 식품공정시험법⁽⁵⁾에서도 채택하고 있으나 정성분석법에 가까우며 염료분자의 비가역적인 화학적 변화를 초래할

Corresponding author: Ho-Chul Yang, Chonnam Institute of Health and Environment, 291-1 Nongsung-dong Seo-gu, Kwangju 502-201, Korea

수 있는 등 몇가지 정량적인 한계를 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 Lehmann 등⁶⁾의 추출방법과 Yasuhide 등⁶⁾의 검출방법을 응용하여 許容 및 不許容 타르색소를 대상으로 추출, 정제 및 정량의 최적조건을 확립하고 시중에서 유통되고 있는 몇가지 색소함유 식품을 대상으로 정량을 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 검체는 타르색소를 사용한 국내산 캔디류 10종, 빙과류 5종, 청량음료류 5종등 총 20종의 시료를 시중에서 구입하여 사용하였다. 표준물질로 사용한 14종의 許容 및 不許容 타르색소의 표준용액의 조제, 구입원 및 순도는 Table 1과 같다. Polyamide column 제작을 위한 polyamide C-200 (wako pure chemical Industries, LTD, Japan) 은 100~200 mesh 크기를 갖는 것이다.

추출 및 정제

시료의 추출 및 정제는 Lehmann 등⁶⁾의 방법을 변형하여 Fig. 1과 같은 방법을 사용하였다. 즉 50 g 정도의 시료를 정확히 분액여두에 취한다음 1% methanolic sodium hydroxide 50 mL를 넣고 5분 정도 진탕하여 색소를 추출하고 원심분리하여 경사여과 후 잔사에 다시 위의 추출 조작을 2번 더 반복하여 얻은 추출액을 초산으로 산성화시켰다. 추출액을 미리 준비한 2 cm 높이의 polyamide column에 통과시켜 색소를 polyamide에 흡착시킨 다음 온수와 아세톤으로 씻고 1% methanolic sodium hydroxide 용액으로 흡착되어진 산성염료를 poly-

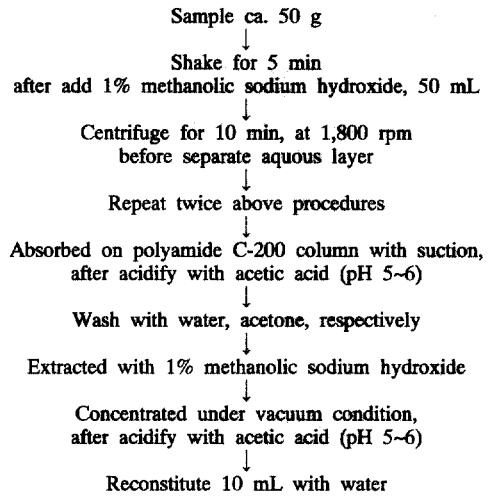


Fig. 1. Procedure for the extraction of synthetic coal-tar dyes used by polyamide C 200.

amide column으로부터 탈착시켜 초산으로 산성화시킨 후 감압농축하여 분석에 사용하였다. 사탕처럼 추출이 필요없는 것은 온수에 녹여 원심분리 조작을 생략하였다.

타르색소의 정량

타르색소의 정량은 Yasuhide 등⁶⁾의 방법을 응용하여 정량하였으며 분석기기 및 HPLC 분석조건은 Table 2와 같다.

최소검출한계 및 회수율 측정

각 타르색소마다 최대 흡수파장이 다르므로 각 타르색소마다 최대흡수부에서의 최소검출한계가 있겠

Table 1. Manufactures and purity of 14 Tar colours standards

Tar colour	Purity (%)	Purchase Supplier	Conc. (ppm)
Tartrazine	91.8	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	44.046
Amaranth	90.4	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	64.184
Indigo carmine	88.4	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	51.272
New coccine	84.4	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	55.704
Sunset yellow FCF	91.4	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	50.270
Allura Red AC	F0325	Tokyo Chem. Co. Japan	65.000
Eosine	91.0	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	53.690
Fast Green FCF	F0146	Tokyo Chem. Co. Japan	92.000
Brilliant blue FCF	95.0	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	125.40
Erythrosine	95.7	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	63.162
Acid red	93.7	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	44.976
Phloxine	89.4	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	54.534
Rose Bengal	91.7	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	65.107
Acid violet 6B	89.3	Sam Young Chem. Co. Tokyo, Japan	84.835

Table 2. Operating conditions for the analysis of coal-tar dyes by HPLC

Instrument : Waters Associate
 Detector : Waters M991 Photodiode Array Detector
 Wavelength : 220-800 nm (254 nm)
 Chart speed : 7 mm/min
 Column : Nova-pak C₁₈ Column (15 cm × 3.9 mm, 4 m)
 Attenuation : 0.02 AUFS,
 Injection volume : 10 μL
 Mobile phase :
 Solution A : 1% ammonium acetate solution
 (adjusted to pH 8 with 10% Sodium hydroxide solution)
 Solution B : 60% acetonitrile in water

Gradient Table

Time (min.)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
initial	1.0	100	0	*
20	1.0	50	50	6
26	1.0	0	100	8
29	1.0	0	100	6
31	1.0	100	0	6

으나 동시분석이라는 점을 감안하여 photo diode array 검출방법이 아닌 단파장 분석에서도 이용 가능하도록 254, 540, 620 nm의 3개의 파장을 선택하여 각각에서의 최소검출한계를 S/N 비를 3으로 하여 산출하였으며, 회수율은 조제한 혼합 표준용액을 타르색소가 함유되지 않은 사탕 50 g에 정제한 혼합 표준용액 10 mL를 첨가하여 시료와 같은 추출과정을 거쳐 회수율을 측정하였다.

결과 및 고찰

최소검출한계 측정

Polyamide column에 의한 추출과 PDA 검출기가 장착된 HPLC에 의한 정량을 시도한 결과 Fig. 2와 같은 3차원 입체 영상과 Fig. 3과 Fig. 4와 같은 2차원적인 결과치 등을 얻을 수 있어 기존의 단파장 검출기보다 많은 정보를 제공하였는데, 특히 색소처럼 다양한 최대흡수부를 갖는 물질들을 동시분석하고자하는 경우에는 좋은 검출기로 생각되어졌다.

각 타르색소마다 최대 흡수파장은 다르지만 최대 흡수파장에 근사한 254, 540, 620 nm의 3개의 파장을 선택하여 각 파장에서의 크로마토그램과 최소검출한계(S/N=3)를 Fig. 4와 Table 3에 각각 나타내었다. 식용녹색색소 3호의 경우 최소검출한계는 18.7~277.3 ng으로 620 nm의 파장에서 가장 낮은 최소검출한계를 보인 반면 식용황색색소 4호의 경우 540 nm와 620 nm는 검출되지 않아 매우 높은 농도에서도 검출되기

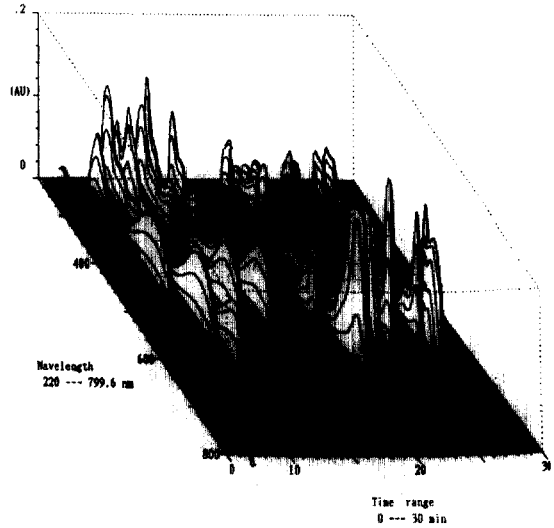


Fig. 2. Three dimensional plot of the dye mixture at wide wavelength (220-800 nm).

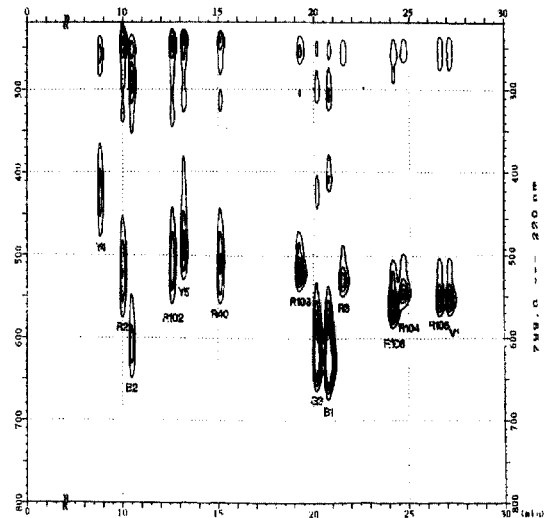


Fig. 3. Contour Plot of dye mixtures at wide wavelength (220-800 nm). Y4: Tartrazine, R2: Amaranth, B2: Indigo carmine, R102: New coccine, Y5: Sunset yellow FCF, R40: Allura red AC, R103: Eosine, G3: Fast Green FCF, B1: Brilliant Blue FCF, R3: Erythrosine, R106: Acid red, R104: phloxine, R105: Rose Bengal.

어려움을 알 수 있었다. 이처럼 선택 파장에 따라 최소검출한계가 큰 차이를 나타낸 것은 각 타르색소마다 최대흡수부가 다르기 때문이며 이러한 이유로 타르색소의 분석에 있어 파장 선택은 매우 중요함을 알 수 있다. 따라서 검출기가 diode array가 아닌 단일 파장에서 측정한다면 254 nm에서 측정하는 것이 최소 검출한계에 차이는 있지만 전체적인 검출이 가능하

며, 특히 520~540 nm는 적색 계통의, 620 nm는 청색이나 녹색 계통의 검출에 적합한 파장임을 알 수 있었다. 하지만 식품에 사용되어지는 타르색소는 대개 혼합색소가 많으므로 일단 모든 색소의 검출이 가능한 254 nm에서 일단 측정한 후 다른 파장에서 검출하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

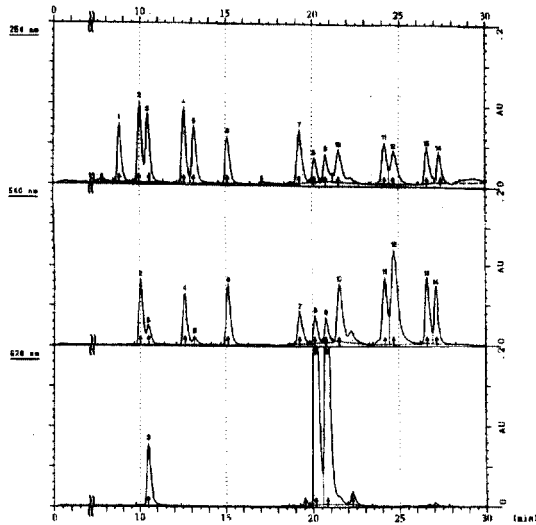


Fig. 4. Chromatograms of the dye mixture at three detecting wavelengths.

- | | |
|----------------------|------------------------|
| 1: Tartrazine | 8: Eosine |
| 2: Amaranth | 9: Fast Green FCF |
| 3: Indigo | 10: Brilliant Blue FCF |
| 4: carmine | 11: Erythrosine |
| 5: New cocaine | 12: Acid red |
| 6: Sunset yellow FCF | 13: phloxine |
| 7: Allura red AC | 14: Rose Bengal |

회수율 측정

추출에 polyamide column을 사용하였을때의 회수율을 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. 실험의 회수율에 가장 큰 영향을 미치는 인자는 추출, 정제 및 탈착하는 과정인데 청색 1호가 가장 낮은 94.4%를 보였으며, 전체적으로 100%에 가까운 아주 높은 회수율을 얻었다.

Yasuhide 등⁶⁾은 본 실험과 달리 Amberlite LA-2를 이용하여 추출하였는데, 건조새우와 새우 페이스트에 100 ppm와 1000 ppm농도로 적색 3호와 황색 5호를 첨가하여 회수율시험을 한 결과 100 ppm보다는 1000 ppm이 회수율이 더 좋았으나, 이 경우에도 적색 3호의 경우 83.5%, 황색 5호의 경우 95%를 넘지 못하였다. 이것은 Amberlite LA-2보다는 Polyamide C-200의 흡탈착이 더 우수한 것으로 생각된다.

Table 4. Recovery of synthetic food colores from candies

Dye	Recovery (%)
FD&C Yellow No. 4 (Tartrazine)	102.0
FD&C Red No. 2 (Amaranth)	100.0
FD&C Blue No. 2 (Indigo carmine)	100.2
FD&C Red No. 102 (New cocaine)	100.8
FD&C Yellow No. 5 (Sunset yellow FCF)	101.8
FD&C Red No. 40 (Allura Red AC)	102.0
FD&C Red No. 103 (Eosine)	98.4
FD&C Green No. 3 (Fast Green FCF)	100.7
FD&C Blue No. 1 (Brilliant blue FCF)	94.4
FD&C Red No. 3 (Erythrosine)	101.0
FD&C Red No. 106 (Acid red)	102.3
FD&C Red No. 104 (Phloxine)	99.3

Table 3. Detection limit of dyes on three wavelengths

Dyes	254 nm	540 nm	620 nm
FD&C Yellow No. 4 (Tartrazine)	54.8	-*	-
FD&C Red No. 2 (Amaranth)	59.0	68.3	-
FD&C Blue No. 2 (Indigo carmine)	47.6	164.1	43.0
FD&C Red No. 102 (New cocaine)	51.4	76.2	-
FD&C Yellow No. 5 (Sunset yellow FCF)	56.5	387.1	-
FD&C Red No. 40 (Allura Red AC)	88.0	68.6	-
FD&C Red No. 103 (Eosine)	57.0	98.2	-
FD&C Green No. 3 (Fast Green FCF)	277.3	249.1	18.7
FD&C Blue No. 1 (Brilliant blue FCF)	290.2	385.9	19.6
FD&C Red No. 3 (Erythrosine)	97.5	58.7	-
FD&C Red No. 106 (Acid red)	65.5	37.7	-
FD&C Red No. 104 (Phloxine)	70.6	23.8	-
FD&C Red No. 105 (Rose Bengal)	105.3	52.1	-
FD&C Violet No. 1 (Acid violet 6B)	51.7	35.6	-

*: Not detected.

타르색소의 정량

타르색소를 사용한 국내산 캔디류 10종, 빙과류 5종, 청량음료류 5종을 대상으로 타르색소를 정량분석한 결과 Table 5와 같았다. 국내에서 허용되지 않은 타르색소는 검출되지 않았으며, 분석결과 주로 적색계통의 적색 2호와 40호, 황색계통의 황색 4호와 5호가 많이 사용되고 있음을 알 수 있었다. 녹색은 황색 4호에 청색 1호를 혼합한 혼합색소였고, 보라색은 적색과 청색을 혼합한 혼합색소임을 알 수 있었다. 이처럼 혼합색소를 많이 사용하는 것은 가장 자연스러운 색상을 얻기위한 것으로 생각된다.

국내에서 첨가물로서 식품에 사용할 수 있는 타르색소의 허용량은 1% (10000 ppm)이하⁽⁶⁾인데, 실험에 사용되어진 20종의 식품의 분석결과는 이에 훨씬 못미치는 4.76~133.47 ppm 정도가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 비교대상은 되지 못하나 참고로 Puttemans 등⁽⁷⁾은 3종의 rice milk에서 황색 4호가 12.4~21.2 ppm이

함유되어 있다고 정량보고하였고, Yasuhide 등⁽⁸⁾은 건조새우와 새우 페이스트에서 황색이나 적색계통의 색소가 각각 44개, 26개 시료에서 검출되었으며 그 함유량은 최저 60 ppm에서 최고 940 ppm까지 함유되어 있음을 보고한 바 있다.

요 약

기존의 PC나 TLC에 의한 타르색소의 정성은 많은 시간이 소요되고 회수율이 낮아 혼합색소의 경우 주색소만이 검출되는 단점이 있고, 많은 표준용액이 동시에 전개되어질 수 없다는 단점이 있어 본 실험에서는 Polyamide와 Photodiode array 검출기가 장착된 HPLC를 이용하여 타르색소의 추출, 정제 및 정량을 여러 각도로 검토하여 정량분석의 최적 조건을 확립하였다.

검출 파장은 각 타르색소마다 고유의 최대흡수부가 있으나 동시분석을 위해서는 254 nm의 파장에서 가

Table 5. Results for determination of colorants in foods

Species	No.	Colour	Dyes detected	Amount detected (ppm)
Candies	1	Red	FD&C Red No. 2	22.25
			FD&C Red No. 40	21.74
	2	Red	FD&C Red No. 2	5.12
			FD&C Red No. 40	5.78
	3	Red	FD&C Red No. 2	9.45
	4	Red	FD&C Red No. 2	17.15
	5	Red	FD&C Red No. 40	31.25
	6	Yellow	FD&C Yellow No. 4	58.16
	7	Yellow	FD&C Yellow No. 5	48.34
	8	Green	FD&C Yellow No. 4	3.99
		FD&C Blue No. 1	0.77	
	9	Green	FD&C Red No. 2	106.41
		FD&C Blue No. 1	27.06	
	10	Violet	FD&C Red No. 2	51.64
		FD&C Blue No. 1	43.77	
Ice candies	11	Red	FD&C Red No. 2	2.42
			FD&C Red No. 40	2.48
	12	Red	FD&C Red No. 2	8.56
	13	Red	FD&C Red No. 2	21.34
	14	Red	FD&C Red No. 2	27.15
			FD&C Red No. 40	23.71
	15	Violet	FD&C Red No. 2	41.24
		FD&C Blue No. 1	33.37	
Soft drinks	16	Red	FD&C Red No. 2	17.21
	17	Yellow	FD&C Red Yellow No. 4	20.32
			FD&C Red Yellow No. 5	8.17
	18	Yellow	FD&C Red Yellow No. 5	18.26
	19	Green	FD&C Yellow No. 4	19.14
			FD&C Blue No. 1	1.67
	20	Violet	FD&C Red No. 2	35.51
		FD&C Blue No. 1	26.36	

장 광범위한 타르색소의 검출이 가능하였으며 적색계통은 520~540 nm, 청색이나 녹색계통은 620 nm에서 최소검출한계가 낮음을 알 수 있었다. 따라서 타르색소의 분석에는 photodiode array detector가 장착된 HPLC를 이용함으로써 220 nm에서 800 nm까지의 넓은 영역의 파장에 걸쳐 일시에 분석하므로써 시간 절약과 함께 타르색소 피크 마다 3차원 스펙트럼을 제공함으로써 실험의 정확도를 높일 수 있었다. 한편 Polyamide column을 사용하였을때의 회수율을 측정한 결과 청색 1호가 가장 낮은 94.4%를 보였으며, 전체적으로 100% 부근의 아주 높은 만족할만한 회수율을 얻었다.

타르색소를 사용한 국내산 빙과류, 캔디류, 청량음료류를 시료로 하여 타르색소의 정량을 시도한 결과 허용의 타르색소는 검출되지 않았으며, 주로 적색계통의 적색 2호와 40호가, 황색계통의 황색 4호, 5호가 많이 사용되고 있음을 알 수 있었고 타르색소의 사용량도 200 ppm을 초과하는 것은 발견되지 않았다. 한편 녹색은 황색 4호에 청색 1호를, 보라색은 적색과 청색을 혼합한 혼합색소를 사용되어지고 있는 것을 알 수 있었다.

문헌

1. Beom-soo Moon : Food additives (a revised edition),

Soohak Co., 119-153 (1991)

2. Ministry of Health and Welfare : Code of Food Additives regulation, Korean Society of Food industry, 291-321 (1994)
3. Association of Public Analyti : Separation and Identification of Food Colours Permitted by the Colouring Matter in Food Regulations, Association of Public Analyti, London (1957)
4. Health and Walfare Ministry : Code of Food Additives regulation, Korean Society of Food industry, 697-699 (1994)
5. Lehmann G., Collet P., Hahn H. G. and Ashworth, M. R. F.: Rapid method for detection and identification of synthetic water-soluble coloring matters in foods and drugs. *J. of Asso. Off. Analyt. Chem.* **53**, 1182-1189 (1970)
6. Yasuhide T., Amara K. and Chaweewon H.: Quantitative determination of colorants in dried shrimp and shrimp paste using ion-exchange extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Food Protection*, **46**(7), 592-595
7. Marc L. P., Louis D. and D sir L.M.: High pressure liquid chromatographic determination of tartrazine in rice milk following ion-pair extration with tri-N-Octylamine. *J. of Asso. Off. Alal. Chem.*, **66**(3) 670-672 (1983a)

(1998년 10월 16일 접수)