

식품 중 타르색소의 동시분석 및 계통분석을 위한 HPLC 분석조건 및 정제과정 확립

박성관 · 홍 연 · 정용현 · 이창희 · 윤혜정 · 김소희 · 이종옥
식품의약품안전청 식품첨가물평가부

Optimization of HPLC Method and Clean-up Process for Simultaneous and Systematic Analysis of Synthetic Color Additives in Foods

Sung-Kwan Park, Yeun Hong, Yong-Hyun Jung, Chang-Hee Lee,
Hae-Jung Yoon, So-Hee Kim and Jong-Ok Lee

Division of Food Additives Evaluation, Korea Food and Drug Administration

To develop a method for separation process using Sep-pak C₁₈, simultaneous and systematic analysis of 8 permitted and 11 non-permitted synthetic food colors in Korea, optimization of analysis conditions for reverse phase ion-pair high performance liquid chromatography was carried out. For the best result of Sep-pak C₁₈ separation the pH of color standard mixture solution was 5~6 and 0.1% HCl-methanol solution were set as eluent. The colors eluted from Sep-pak C₁₈ cartridge were determined and confirmed by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector at 420 nm for yellow colors type, at 520 nm for red colors type, at 600 nm for blue and green colors type and at 254 nm for mixed colors. Conditions for HPLC analysis were as follows: column, Symmetry C₁₈ (5 m, 3.9 mm i.d.×150 mm); mobile phase, 0.025 M ammonium acetate (containing 0.01 M tetrabutylammonium bromide) : acetonitrile : methanol (65 : 25 : 10) and 0.025 M ammonium acetate (containing 0.01 M tetrabutylammonium bromide) : acetonitrile : methanol (40 : 50 : 10); flow rate, 1 mL/min. It takes 35 minutes for simultaneous analysis and 18 minutes for systematic analysis. The detection limits range of each colors were 0.01~0.05 µg/g.

Key words : ion-pair HPLC, synthetic food colors, systematic analysis, simultaneous analysis

서 론

착색료로서 많이 사용하고 있는 타르색소는 석탄타르 중에 함유된 벤젠핵(benzene ring)이나 나프탈렌핵(naphthalene ring)을 이용하여 합성한 물질로서 현재 식품첨가물로 허용되고 있는 것은 모두 산성타르색소에 속하며 화학구조상으로 아조계(azo type), 크산틴계(xanthene type), 트리페닐메탄계(triphenylmethane type)와 인디고계(sulfonated indigo type)로 분류되고 있다⁽¹⁾. 현재 식용색소로 사용이 허가된 것은 독성시험 결과 안전하다고 입증된 것들로 우리나라에서는 식품첨가물공전에 식용색소적색제2호와 식용색소황색제5호 등 8종 및 그 알루미늄레이크 7종(식용색소적색제3호 제외)이 식

품에 사용할 수 있도록 허용되어 각각 사용기준이 설정되어 있다⁽²⁾. 외국의 허용현황을 보면 일본의 경우는 12종⁽³⁾, EU는 16종⁽⁴⁾, 미국은 9종⁽⁵⁾이 허용되어 있는 등 국가마다 허용된 종류와 사용기준이 다르다. 우리나라에서 사용이 허용되지 않는 합성착색료가 수입식품으로부터 검출되거나 사용할 수 없는 식품에 검출되어 사용기준을 위반하는 사례가 종종 발생하고 있어 식품 중 착색료를 정확히 분석할 수 있는 방법 개발이 요구되고 있다. 착색료의 정량법은 허용된 합성착색료에 대해 종이크로마토그래피, 얇은막크로마토그래피, 자외선분광광도계 등을 이용한 방법이 식품공전⁽⁶⁾에 수재되어 있고 식품에 첨가된 혼합색소를 분리 정량한 보고⁽⁷⁻¹⁰⁾들과 색소혼합용액을 HPLC로 분리 정량한 보고⁽¹¹⁾가 있으나 적용식품 및 분석대상색소가 제한되어 있고 분석의 정확도와 정밀도 및 검출한계 면에서 보완할 필요성이 있다. 최근 분석속도와 분리능, 정량분석 및 분석방법 개발의 잠재성 면에서 HPLC는 착색료 분석에 있어서 우수한 방법으로 평가되고 있으며⁽¹⁶⁾ 일본 등 외국에서 최근 HPLC를 이용한 식품 중 색소의 분석법이 보고되고 있으나 분석과정의 방해물질을 제

Corresponding author : Jong-Ok Lee, Department of Food Additives Evaluation, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-ku, Seoul 122-704, Korea
Tel : 82-2-380-1686
Fax : 82-2-354-1399
E-mail : lee2713@kfda.go.kr

Table 1. Synthetic food colors used to set up the simultaneous and systematic HPLC analysis

Permitted ¹⁾	Non-permitted ¹⁾
Food Red No. 2 (Amaranth, R2)	Food Red No. 102 (Ponceau 4R, R102)
Food Red No. 3 (Erythrosine, R3)	Food Red No. 104 (Phloxine, R104)
Food Red No. 40 (Allura Red, R40)	Food Red No. 105 (Rose Bengal, R105)
Food Blue No. 1 (Brilliant Blue FCF, B1)	Food Red No. 106 (Acid Red, R106)
Food Blue No. 2 (Indigocarmine, B2)	Orange II (ORII)
Food Green No. 3 (Fast green FCF, G3)	Azo Rubine (Azo)
Food Yellow No. 4 (Tartrazine, Y4)	Red 2G (R2G)
Food Yellow No. 5 (Sunset Yellow FCF, Y5)	Brilliant Black BN (BBN)
	Patent Blue V (PBV) ²⁾
	Green S (GS)
	Quinoline Yellow (QY) ²⁾

¹⁾The aluminum lake salts of permitted food colors except Food Red No. 3 were also used.

²⁾PBV and QY are the products of Warner Jenkinson Co., King's Lynn, England.

거하기 위한 전처리 과정이 체계적으로 정리되지 않았고 그 대상식품의 범위를 우리나라에 그대로 적용할 수는 없었다⁽¹³⁻²⁰⁾. 타르색소를 HPLC로 분석하는 방법은 동시분석과 최대흡수파장에 따른 계통분석으로 구분할 수 있는데 시료에 따라 이 두가지 방법을 상호 보완하여야 한다⁽²¹⁾. 본 연구에서는 우리나라에서 허용된 8종(알루미늄레이크 포함 15종)과 일본, EU, 미국 등에서 허용되어 있으나 우리나라에서 허용되어 있지 않고 수입식품에서 검출사례들이 있는 11종 등 총 19종의 색소들을 대상으로 하여 그 HPLC 분석조건 및 정제 방법을 검토·확립하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

Methanol과 acetonitrile은 Merck 사(Germany)의 HPLC 급을, tetrabutylammonium bromide(TBA-Br)는 Junsei chemical 사(Japan)의 제품을 사용하였고 그의 시약은 Wako사(Japan)의 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 색소들은 TCI사(Japan)의 제품으로 Table 1에 정리하였다. 정제용 카트리지는 Sep-pak C₁₈(1 g, Waters Co., USA)을 미리 메탄올 10 mL 및 0.1% TBA-Br 수용액 10 mL를 사용하여 차례로 세정시킨 것을 사용하였다.

색소표준용액의 조제

적색계통과 황색계통, 청색·녹색계통색소 및 혼합색소표준용액의 1,000 µg/mL 수용액을 만든 후 이를 물로 희석하여 0~50 µg/mL의 농도 범위로 조제하였다.

색소의 HPLC 분석조건 및 컬럼 검토

분석에 사용한 HPLC는 Waters사(USA)의 M510 solvent delivery system과 717 Autosampler, 486 UV detector 및 996 Photodiode array detector로 구성된 것으로 Column은 Carbon loading량 및 길이에 따라 Nova-Pak C₁₈(3.9 mm i.d. × 300 mm, 4 m, Waters, USA), Zorbax ODS(4.6 mm i.d. × 250 mm, 7 m, HP, USA), µ-Bondapak C₁₈(3.9 mm i.d. × 300 mm, 10 m, Waters, USA) 및 Symmetry C₁₈(3.9 mm i.d.

× 150 mm, 5 m, Waters, USA) 등의 역상컬럼들을 비교검토하였다.

이동상의 유속은 1.0 mL/min으로 하고 시료용액은 20 µL를 주입하였으며 HPLC/PDA로 각 색소의 동시 및 계통분석을 위한 최대흡수파장을 결정하였으며 선택된 파장에서의 각 색소 종류별 검출한계를 측정하였다.

이동상에 첨가되는 이온쌍 시약인 TBA-Br의 농도 범위는 0.00~0.02 M, 초산암모늄의 농도 범위는 0.00~0.03 M로 변화시키면서 컬럼의 분리능(capacity factor, K')에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 이에 따른 이동상의 조성(초산암모늄 : 아세토니트릴 : 메탄올)을 일정용매조성법(isocratic mode) 및 구배용매조성법(gradient mode) 조건과 상호 비교검토하였다.

Sep-pak C₁₈ 카트리지의 색소보유 및 용출 조건검토

초산과 암모니아수용액으로 Sep-pak C₁₈ 카트리지를 통과시키는 혼합색소표준용액의 pH 범위를 3~9로 조정하여 보유 정도를 비교하였고, 색소 보유를 위해 TBA-Br의 농도 범위를 0.00~0.04%로 변화시켜 검토하였다.

색소의 용출액으로는 0.1% 염산-메탄올과 1% 초산-메탄올, 1% 인산-메탄올을 사용하여 산의 종류에 따른 용출 정도를 비교하였다. Sep-pak C₁₈을 통과하여 용출된 액은 물 2 mL를 가하여 증발농축하고 1% 암모니아수 1 mL로 수기를 세척하여 넣고 물을 가하여 정확히 10 mL로 한 후 HPLC용 시험용액으로 하였다.

결과 및 고찰

컬럼의 선택

일반적으로 타르색소 분석시 순상컬럼을 사용할 경우 머무름시간이 길어지고 피크모양이나 분리능이 저하된다는 보고⁽¹²⁾가 있어 컬럼충진물의 크기와 컬럼내경, 컬럼길이들이 서로 다른 4종류의 역상컬럼들 중 Nova-Pak C₁₈을 사용하였을 경우 19종의 색소를 분리하는데 걸리는 시간이 동시분석은 1시간, 계통분석은 35분 정도로 다소 많은 시간이 소요되고 동시분석시에는 R102와 R106, Azo와 BBN 및 PB의 분리가 곤란하였다. µ-Bondapak C₁₈은 동시분석시 R40과 R2의

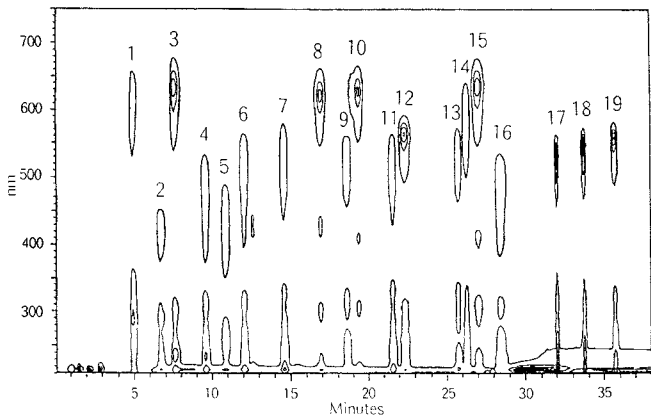


Fig. 1. HPLC/PDA plot of 19 mixed food colors at wide wavelength (210-750 nm)
 1.B2, 2.QY, 3.GS, 4.Y5, 5.Y4, 6.R40, 7.R2, 8.G3, 9.R2G, 10.B1, 11.R102, 12.R106, 13.Azo, 14.BBN, 15.PB, 16.ORII, 17.R3, 18.R104, 19.R105.

분리가 불가능하였고, Zorbax ODS는 분리능 면에서 Nova-Pak C₁₈과 비슷하였으나 pump의 압력이 높게 걸리는 단점이 있었다. Symmetry C₁₈을 사용하여 분석하였을 때는 모든 색소가 양호하게 분리되면서도 분석시간이 동시분석의 경우 35분 이내, 계통분석시 18분 이내로 단축되었으므로 본 컬럼을 실험에 사용하였다.

HPLC 조건

PDA검출기의 파장 선택: HPLC-PDA에 의해 색소표준용액을 분석한 결과 Fig. 1과 같이 황색과 적색, 청색 및 녹색 계통 색소의 분석을 위한 검출파장은 각각 420, 520, 620 nm로, 동시분석을 위해서는 모든 색소가 비교적 높은 흡광도를 보인 파장인 254 nm로 결정하였다. 각 타르색소마다 최대 흡수파장은 모두 다르나 식품에 사용되는 타르색소는 혼합색소 상태인 것이 많으므로 모든 색소의 검출이 가능한 254 nm와 황색과 적색, 청색 계통별로 한 파장씩을 선택하는 것이 바람직하다고 본다. 또, 동시분석법은 계통분석에 비하여 검출한계가 높고 254 nm에서 흡광도를 나타내는 물질이 식품으로부터 이행하여 색소의 검출을 방해할 수 있는 단점이 있으나 혼합색소를 동시에 모두 분리할 수 있는 장점이 있었다. 계통분석은 색소별 최대흡수파장에서 검출하므로 서로 다른 계통의 혼합색소는 2-3회 반복측정이 요구되나 검출한계가 동시분석에 비해 훨씬 낮고 다른 계통의 색소는 높은 농도에서도 거의 검출되지 않아 정성·정량분석이 용이하며 단시간내 분석이 가능하다(18,22). 따라서 식품에 첨가된 색소의 종류에 따라 동시분석법과 계통분석법을 선택하여 적용해야 할 것으로 사료된다.

이동상의 조성이 분리능에 미치는 영향: 용매의 조성 and 이온쌍 시약 및 염의 농도가 분리능에 미치는 영향을 검토하였다. 대부분의 타르색소는 이온성 물질이므로 역상컬럼에서의 선택적 분리를 위해서는 이온쌍 시약을 사용하여 비극성 이온쌍을 형성하여 머무름 시간을 지연시킬 필요가 있다(12). 이온쌍고속액체크로마토그래피법은 완충액을 사용하여 pH를 조정하는 이온억제(ion suppression)법을 적용하기 곤란한 강이온 화합물에 대해 주로 이용된다(23,24). 타르색소는 모두 분

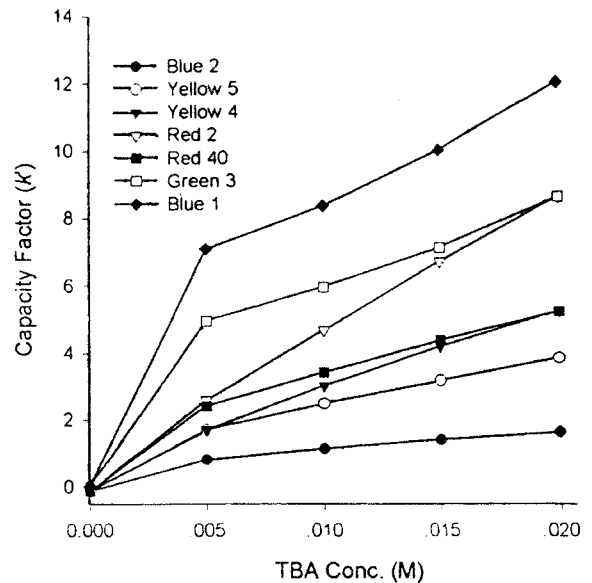


Fig. 2. Effect of TBA-Br concentration on the colum capacity factor (K') for the analysis of food colors

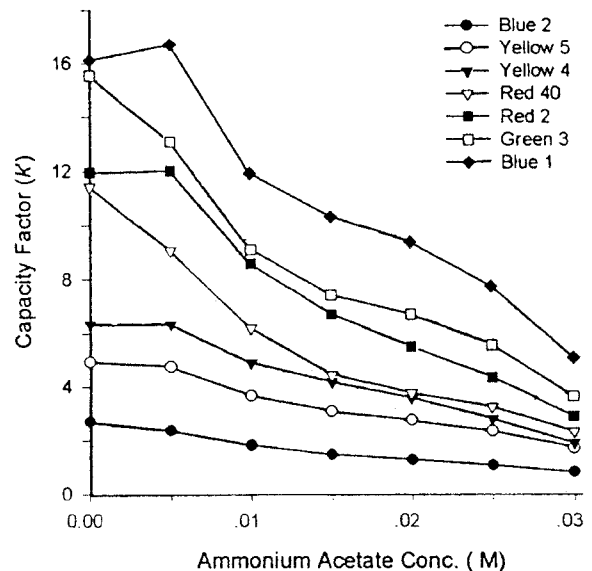


Fig. 3. Effect of ammonium acetate concentration on the colum capacity factor (K') for the analysis of food colors

자당 1개 또는 그 이상의 R-SO₃(sulfonyl group)이나 R-COO(carboxyl group)를 가진 이온성 물질이므로 이 방법의 적용이 가능하다. 이온쌍 시약으로 TBA-Br을 사용하여 농도에 따른 색소들의 분리능을 검토한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. TBA-Br의 농도가 높아질수록 비극성 이온쌍이 증가되어 비극성 컬럼에서의 색소들의 머무름시간이 대체적으로 증가하였으나 각 색소별로 이온쌍 시약 농도에 따른 머무름시간 증가 정도에 차이가 있어 0.005 M에서는 Y5와 Y4, R40과 R2의 분리가 어려웠으며 0.015 M에서는 Y4와 R40의 분리가 되지 않았지만 0.010 M에서는 모든 색소가 양호하게 분리되었다. TBA-Br을 첨가한 이동상은 TBA-Br의 농도가 높아질수록 색소의 용출시간이 길어 분석에 장시간이 걸리는 단점이 있으므로 분리능에 영향을 미치지 않으면서도 분석

Table 2. HPLC conditions for simultaneous and systematic analysis of 19 synthetic food colors

Color type	Wavelength of UV detector (nm)	Gradient system		Retention time (min)
		Mobile phase A ¹⁾	Mobile phase B ²⁾	
Mixed	254	100	0	2
		60	40	24
		0	100	26
Yellow	420	100	0	35
		0	100	8
Red	520	75	25	15
		0	100	8
Blue & Green	620	100	0	18
		40	60	7
				15

¹⁾0.025 M ammonium acetate(containing 0.01 M TBA-Br) : acetonitrile : methanol = 65 : 25 : 10

²⁾0.025 M ammonium acetate(containing 0.01 M TBA-Br) : acetonitrile : methanol = 40 : 50 : 10

시간을 단축시키기 위해 TBA-Br과 함께 초산암모늄을 혼합하여 pH를 조절함으로써 해결하고자 하였다⁽²⁵⁾. 즉, 이동상에 첨가되는 초산암모늄의 농도에 따른 분리능을 비교한 결과 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 초산암모늄의 농도가 낮을수록 분석시간이 많이 걸리는 것을 알 수 있었고 염의 농도가 높을 때는 컬럼의 분리능에 영향을 주었으므로 분석시간이 짧고 분리능에 영향주지 않는 0.025 M을 최적의 농도로 결정하였다. Lawrence 등⁽¹⁵⁾은 초산암모늄을 이동상에 첨가하여 분리능 향상과 분석시간 단축이 가능했다고 보고하였다.

19종의 색소를 분리하기 위한 용매의 조성을 검토한 바 이동상으로 물과 메탄올 또는 물과 아세토니트릴의 혼합액을 이용한 경우 용매의 비극성도를 적절히 조절하기가 어려워서 분리가 효율적이지 못하였으므로 물과 아세토니트릴, 메탄올의 세가지 용매를 혼합하여 검토하였다. 물-아세토니트릴-메탄올 혼합액의 경우 메탄올의 비율이 증가하면 색소들의 머무름시간에 차이가 없이 일제히 빨라져서 각 색소의 분리가 어려우므로 메탄올의 비율을 10%로 고정하였다. 즉, 메탄올의 비율은 10%로 하고 0.01 M TBA-Br을 함유한 0.025 M 초산암모늄 용액과 아세토니트릴의 비율을 65 : 25(용매 A)와 40 : 50(용매 B)의 두 가지로 조정하여 구배용매조성법으로 동시분석 및 색소종류별 계통분석을 실시하였다. 일정용매조성법을 적용하는 경우 분석에 장시간이 소요되었고 R3 등 크산틴계 색소는 이온쌍 시약과 반응하여 비극성 이온쌍을 형성하는 정도가 다른 색소에 비해 매우 커서 머무름시간이 지나치게 늦어졌으며 넓은 형태의 피크를 나타내어 정확한 정성 및 정량이 곤란하였다. 그러나 극성도의 차이가 있는 두 가지 용매의 비율 변화를 이용한 구배용매조성법을 사용한 결과 분석 후반부에 용매의 비극성이 증가되어 비극성도가 높은 색소들의 머무름 시간이 짧게 나타났다. 한편

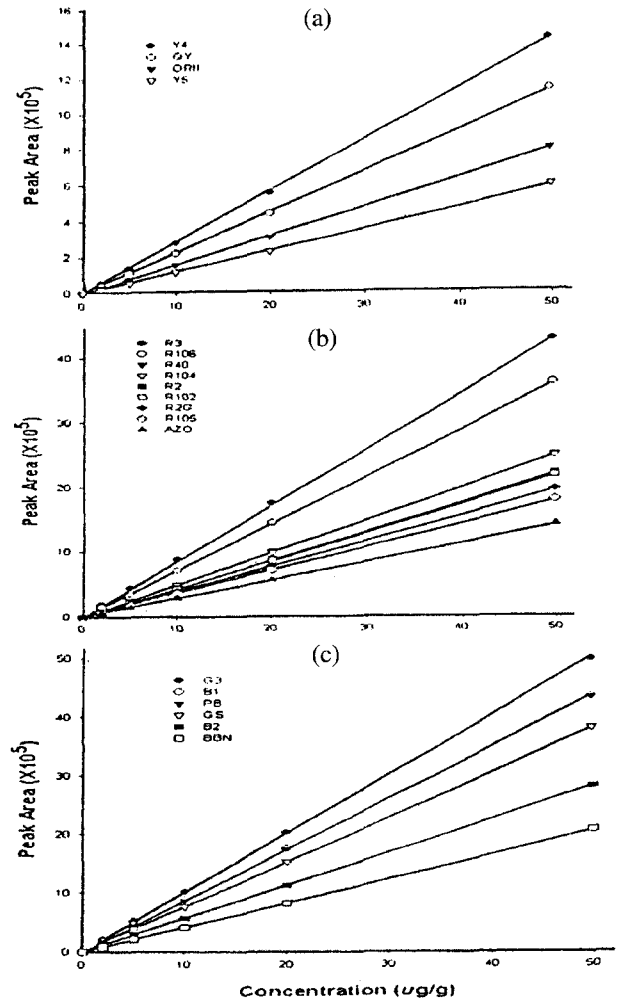


Fig. 4. Calibration curves of food colors by HPLC
(a) Yellow type colors, (b) Red type colors, (c) Blue and Green type colors.

설정된 각 색소 종류별 gradient 조건은 Table 2에 나타내었다. Lawrence 등⁽¹⁵⁾은 12종류의 타르색소 정량을 위해 메탄올과 물의 비율을 60 : 40과 45 : 55로 조정하고 0.005 M의 이온쌍 시약을 첨가하여 구배용매조성법으로 계통분석한 결과를 보고하였는데 색소별 최대 흡수파장은 본 연구 결과와 일치하였으나 계통분석임에도 불구하고 머무름시간이 긴 색소들이 있어 본 연구에서는 이를 보완하였다.

검출한계의 설정: 색소표준용액을 0, 2, 5, 10, 20 및 50 µg/mL의 농도로 조제하고 그 20 µL를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 검정곡선을 작성하였으며, 모두 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 4). 동일 농도에서 검출기에 대한 감도는 적색색소의 경우 R3와 R106이 다른 적색계통 색소들에 비하여 높았고 황색색소의 경우는 Y4, QY, ORII, Y5의 순서로, 청색 및 녹색색소의 경우는 G3가 가장 높았고 BBN이 가장 낮았다. 계통별 식용색소의 검출한계는 적색계통이 0.05 µg/g, 황색계통이 0.03 µg/g, 청색 및 녹색계통이 0.01 µg/g이었다. 이는 양과 허⁽²⁹⁾의 연구에서 보고된 검출한계인 적색과 황색계통 0.06 µg/g과 청색 및 녹색계통 0.03 µg/g보다 낮은 농도이었다.

Table 3. Retention (%) on Sep-pak C₁₈ cartridge of the 19 food colors at various TBA-Br concentration

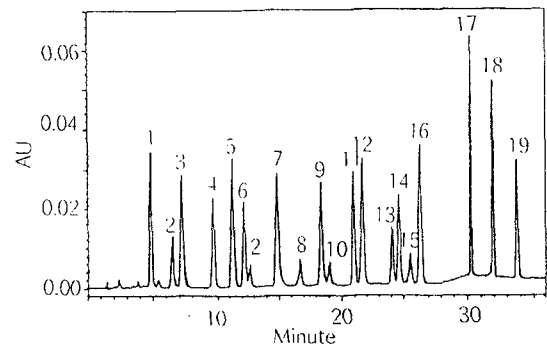
Food Colors	Concentration of TBA-Br (%)				
	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04
B2	0	12	92	100	101
QY	0	64	100	101	102
GS	100	100	100	99	101
Y5	0	45	98	101	101
Y4	0	4	86	100	101
R40	8	94	98	101	102
R2	7	9	91	101	102
G3	103	103	101	101	102
R2G	6	88	100	100	100
B1	101	102	102	100	102
R102	0	37	97	101	102
R106	99	100	100	100	101
Azo	17	96	100	101	102
BBN	21	90	100	103	103
PB	96	99	100	100	99
ORII	101	102	100	101	102
R3	98	99	98	100	101
R104	101	99	99	98	99
R105	101	94	89	95	97

Table 4. Elution (%) from Sep-pak C₁₈ cartridge of the 19 food colors add various acids

Food colors	Acids added to methanol		
	0.1% HCl	1% Acetic acid	1% Phosphoric acid
B2	92.8	99.1	99.4
QY	93.2	93.7	98.9
GS	95.1	96.1	95.1
Y5	97.9	98.9	97.6
Y4	98.2	98.7	98.3
R40	96.8	98.6	96.9
R2	98.2	98.7	98.8
G3	96.9	99.3	96.5
R2G	93.2	98.1	96.1
B1	100.8	100.1	97.3
R102	98.8	98.8	99.6
R106	98.8	99.0	97.1
Azo	98.4	97.9	94.1
BBN	93.4	98.4	98.2
PB	100.9	100.4	98.7
ORII	97.3	98.1	91.8
R3	94.1	83.9	59.1
R104	93.0	92.3	57.4
R105	87.9	73.3	57.6

Sep-pak C₁₈ 카트리지의 색소보유 및 용출조건 검토

식품 중의 타르색소를 정제하는 방법으로 모사염색법⁽⁶⁾, 용매추출법⁽²⁶⁾, 폴리아마이드킬럼흡착법⁽²⁸⁾ 등이 사용되어 왔으며 조작성이 간편한 C₁₈ 카트리지⁽²⁷⁾ 또는 음이온교환형카트리지⁽²⁸⁾의 활용이 증가하고 있다. 모사염색법은 양모에 색소를 흡착시켰다가 다시 용출시킬 때 퇴색하는 색소가 있고, 폴리아마이드킬럼에 색소를 흡착시켜 정제한 경우와 Sep-pak 카트리지를 사용하여 정제한 경우를 비교하였을 때 전자의 경우 일부 색소가 검출되지 않았다는 보고⁽²⁸⁾가 있다. Sep-pak C₁₈ 카트리지의 색소의 보유와 세척, 용출과정에 물이나 메탄올 등의 용매를 사용하는데^(27,28) 색소의 보유와 용출에 적합한 용매의 조성 및 pH를 찾을 필요가 있다. 따라서 초산과 암모니아수로 혼합색소표준용액의 pH를 3~9로 조정하여 색소들의 카트리지 보유 정도를 검토한 결과, pH 5~6의 범위에서 모든 색소가 보유되었다. B2, G3, R2, Y5의 경우는 알칼리 pH에서 변색되고 R3, R104, R105는 산에 의해 침전되어 색소산이 형성되었다. 이온쌍 시약인 TBA-Br 농도를 0.00~0.04%로 달리하여 검토한 바 0.03%이상에서 색소들이 비극성 이온쌍을 형성함으로써 C₁₈ 카트리지에 모두 보유되었으나(Table 3) 식품에 포함된 색소의 경우 식품 시료의 종류에 따라 카트리지의 보유능력이 저하되는 경우도 있었으므로 0.1%로 결정하였다. 카트리지에 보유된 색소의 용출 용매로 메탄올만을 사용하였을 경우 극성도와 pH 조건이 맞지 않아 청색과 적색계통 색소들 중 일부가 용출되지 않고 카트리지에 잔존하였으므로 0.1% 염산과 1.0% 초산, 1.0% 인산과 메탄올의 혼합액을 사용하여 용출율을 비교하였다(Table 4). 1.0% 인산-메탄올로 용출하였을 때는 R3와 R104, R105가, 1% 초산-메탄올로 용출하였을 때는 R105의 용출율이 각각 60%와 80% 미만으로 떨어졌으므로 모든 색소가 고르게

**Fig. 5. HPLC chromatogram of the 19 mixed food colors standard by simultaneous analysis (Numbers are same as in Fig. 1)**

용출되는 0.1% 염산-메탄올을 사용하였다. Puttermans 등^(16,21)은 이온쌍 시약을 이용한 타르색소의 추출과 정제 방법을 검토하여 색소의 회수율에 영향을 미치는 요인들로 이온쌍 시약의 농도와 시료용액의 pH, 추출용매의 조성 등을 제시하였다. 또, Lau 등⁽³⁰⁾은 pH에 따른 색소들의 용출율을 비교하였는데 R2와 GS, R102, Y5 등 색소들이 pH 5.6에서 가장 높은 값을 나타내었다고 보고하여 본 결과와 일치함을 알 수 있었다.

상기 결과로부터 색소표준용액의 pH를 5~6으로 조정하고 0.1% TBA-Br을 가하여 Sep-pak C₁₈에 색소를 보유시킨 후 0.1% 염산-메탄올로 용출한 액을 사용하여 확립된 HPLC 조건으로 혼합색소표준용액을 분석한 크로마토그램을 Fig. 5와 6에 나타내었다. 동시분석의 경우(Fig. 5) 대부분의 색소 피크들이 잘 분리되었으나 계통분석 결과(Fig. 6)와 비교하였을 때 동시분석에 소요된 시간은 35분, 계통분석은 18분이었다. 황

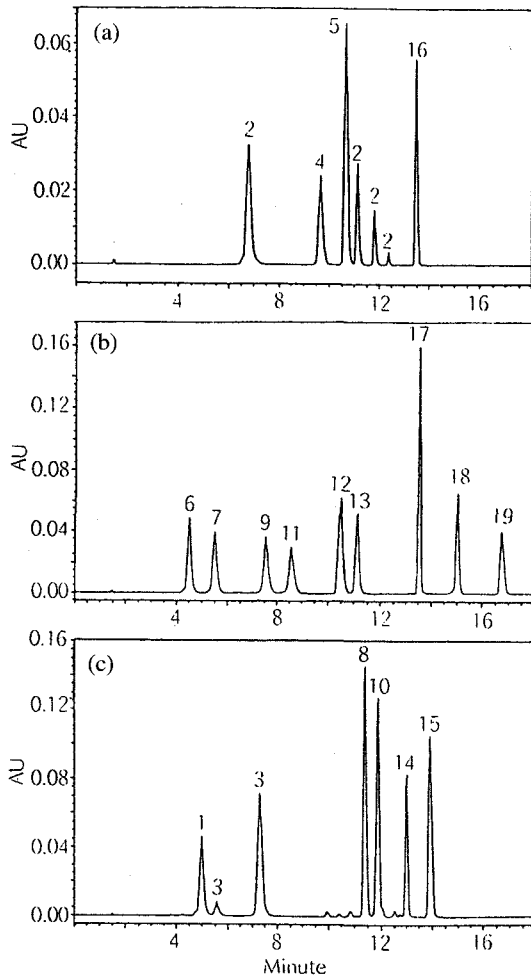


Fig. 6. HPLC chromatogram of the 19 mixed food colors standards by systematic analysis (Numbers refer to Fig. 1)
 (a) 4 Yellow type colors, (b) 9 Red type colors, (c) 6 Blue and Green type colors.

색계통 색소들의 경우 동시분석시 검출되지 않았던 QY3와 QY4, GS1과 GS2가 계통분석시 검출되어 보다 정확한 정성·정량 분석이 가능할 것으로 생각되며 청색과 녹색 계통 및 QY 계통 색소들의 피크 크기가 상대적으로 증가함을 보였다.

식품공전상의 중이크로마토그래피법 및 얇은막크로마토그래피법에 의한 타르색소 정성법은 미량의 색소가 사용된 경우나 일부 식품 중에 사용된 색소가 공존물질의 영향을 받아 R_f 값이 변하여 분리가 명확하지 않고 정량도 불가능하다^(7,16). 따라서 HPLC를 이용한 분석법은 혼합 타르색소를 포함하는 식품의 색소사용량까지 신속하고 정확하게 분석할 수 있으므로 현행 식품공전의 타르색소 분석법을 개선, 보완하고 식품관련 검사기관 및 식품업체에서 정확하고 원활한 검사를 수행할 수 있도록 기여하며 식이를 통한 합성착색료의 섭취량조사 등 위해도 평가시 분석방법으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

이온쌍고속액체크로마토그래피를 이용하여 현재 우리나라

에서 식품에 사용이 허용된 타르색소 8종과 일본등 외국에서는 허용되어 있으나 우리나라에서 허용되어 있지 않은 11종 등 총 19종의 동시 및 계통분석법을 확립하였다. HPLC에 사용한 컬럼은 Symmetry C₁₈, 이동상은 0.01 M TBA-Br이 함유된 0.025 M 초산암모늄용액-아세트니트릴-메탄올(65 : 25 : 10)과 0.01 M TBA-Br이 함유된 0.025 M 초산암모늄용액-아세트니트릴-메탄올(40 : 50 : 10)를 구배용매조성법(gradient mode)으로 사용하였다. 자외선 검출기의 파장은 동시분석의 경우 254 nm, 계통분석은 황색계통 420 nm, 적색계통 520 nm 그리고 청색 및 녹색계통은 620 nm로 설정하였다. 이때 색소들의 검출한계는 적색계통이 0.05 µg/g, 황색계통은 0.03 µg/g, 청색 및 녹색계통은 0.01 µg/g이었다. Sep-pak C₁₈을 이용한 색소의 정제 방법은 혼합색소표준용액의 pH를 5~6으로 조정하고 0.1% TBA-Br을 가하여 색소를 보유시킨 다음 0.1% 염산-메탄올로 색소를 용출하여 HPLC로 분석하였다. 19종의 타르색소를 동시분석하는데 35분이, 계통분석시에는 18분 정도가 소요되었고 두 경우 모두 양호한 분리를 보였다.

문 헌

1. Moon, B.S. Sikpoomchungamool. pp.134-149. Soohaksa, Seoul, Korea (1998)
2. K.F.D.A. Food Additives Code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea (1998)
3. Ministry of Health and Welfare, The Japanese Standards for Food Additives(7th edition). Tokyo, Japan (1999)
4. HMSO. The Colours in Food Regulations, United Kingdom (1995)
5. National Archives and Records Administration. Code of Federal Regulations. Washington, DC, USA (1996)
6. K.F.D.A. Food Code. Vol. 7. (1999)
7. Kwon, H.H., Kim, I.B. and Kim, J.H. Studies on the determination of mixed colours in foods (I). Report of NIH Korea 15:437-447 (1978)
8. Kwon, H.H., Kim, I.B. and Lee, J.O. Studies on the determination of mixed colours in foods (II). Report of NIH Korea 15:445-448 (1978)
9. Kim, K.S., Kim, B.Y., Shin, K.H., Kim, I.B. and Yoo, S.Y. Study on the determination of mixed colours in foods (V). Report of NIH Korea 18:393-398 (1981)
10. Kim, J.H., Kim, B.S., Kim, K.S., Oh, S.K., Han, S.W. and Lee, D.H. Studies on the determination of food tar color in candies. The Report of Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment 29:122-125 (1993)
11. Shin, K.H., Lee, Y.H., Lee, Y.J. and Lee, H.D. Studies on the simultaneous determination of food colors using HPLC. Report of NIH Korea 18:377-381 (1981)
12. Saag, K. HPLC in Food Analysis. pp. 259-275. Academic Press, New York, USA (1988)
13. Tsunoda, K., Inoue, N., Aoyama, M. and Hasebe, A. Rapid analysis of the food colors in foodstuffs using polyamide. J. Food Hyg. Soc. Japan 28:473-479 (1987)
14. Hurst, W.J., Mckim, J.M.A. and Martin, Jr. R.A. Determination of tartrazine in food products by HPLC. J. Food Sci. 46:419-420 (1981)
15. Lawrence, J.F., Lancaster, F.E. and Conacher, H.B.S. Separation and detection of synthetic food colors by ion-pair high performance liquid chromatography. J. Chromato. 210:168-173 (1981)
16. Puttemans, M.L., Dryon, L. and Massart, D.L. Isolation, identification, and determination of food dyes following ion-pair extraction. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65:737-745 (1982)
17. Chudy, J., Crosby, N.T. and Patel, I. Separation of synthetic food

- dyes using high-performance liquid chromatography. *J. Chromato.* 154:306-312 (1978)
18. Ishikawa, F., Nakazato, M., Moriyasu, T. and Tomomatsu, T. Analytical method of 21 coal tar dyes in foods by HPLC. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 37:281-287 (1996)
 19. Kai, S., Nikkawa, T., Takahashi, A., Koizumi, A., Hyoudou, Y., Suzuki, S. and Nakazawa, H. Preparation of sample solution for determination of acid coal-tar dyes in confectionery by the matrix solid-phase dispersion method. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 37:146-150 (1996)
 20. Kuwano, K. and Mitamura, T. Ion-pair high performance liquid chromatographic separation and determination of food coal-tar dyes. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 27:278-282 (1986)
 21. Puttemans, M.L., Dryon, L. and Massart, D.L. Evaluation of thin layer, paper and high performance liquid chromatography for identification of dyes extracted as ion-pair with tri-n-octylamine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65:730-736 (1982)
 22. Matsunaga, A. Simultaneous determination of food coal-tar dyes by ion-pair high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 29:192-198 (1988)
 23. Puttemaus, M.L., Dryon, L. and Massart, D.L. Ion-pair high performance liquid chromatography of synthetic water-soluble acid dyes. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64:1-8 (1981)
 24. Lau, O.W., Poon, M.M.K., Mok, S.C., Wong, F.M.Y. and Luk, S.F. Spectrophotometric determination of single synthetic food colour in soft drinks using ion-pair formation and extraction. *Int. J. Food Sci. and Tech.* 30:793-798 (1995)
 25. AOAC. Official Methods of Analysis Vol. 2, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1995)
 26. Pharmaceutical Soc. of Japan Standard methods of analysis for hygienic chemists. with Commentary. pp. 512-547. Tokyo, Japan (1995)
 27. Mary, L.Y. Rapid determination of color additives, using the C18 cartridge. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67:1022-1024 (1984)
 28. Hayashi, T., Kunimatsu, M., Hotta, I. and Oka, H. A novel method for clean-up of coal tar dyes using a quaternary amine cartridge. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 34:398-403 (1993)
 29. Yang, H.C. and Heo, N.C. Determination of synthetic food colours by HPLC with photodiode array detector. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31:30-35 (1999)
 30. Lau, O.W., Poon, M.M.K., Mok, S.C., Wong, F.M.Y., and Luk, S.F. Spectrophotometric determination of single synthetic food colour in soft drink using ion-pair formation and extraction. *Int. J. Food Sci. Technol.* 30:793-798 (1995)
-
- (2000년 10월 29일 접수)