

## HPLC를 활용한 천연염료 적합성 평가 연구 (1)

이은미 · 오동기 · 윤홍진 · 김종훈<sup>†</sup>

(재)FITI시험연구원 연구개발본부 융복합연구팀

### A Study for the Conformity Assessment on the Natural Dye by HPLC (1)

Eun Mi Lee, Dong Ki Oh, Hong Jin Yoon, and Jong Hoon Kim<sup>†</sup>

Convergence Technology Team, Research and Development Department, FITI Testing & Research Institute; Seoul, Korea

**Abstract:** Due to environmental pollution and human hazards of some synthetic dyes, the global fashion companies are increasingly interested in eco-friendly products, especially natural dye. For the globalization of natural dyeing industry based on this concern, however, there are some deficiencies of standardization, specification, and conformity assessment on natural dyestuffs as well as natural dyeing process. These obstacles should be not only studied but also defined for a commercial transaction. Accordingly, a study for conformity assessment on commercialized natural dyestuffs (red) was conducted by HPLC analysis in this study. As the results of HPLC analysis, alizarin and purpurin, representative index ingredients, were detected in most of the samples, but the index ingredient content in each sample was different. In addition, some samples showed the variety of peaks including the index ingredients and others. It was inferred that the representative index ingredients could be used on the traceability of natural sourced dyestuffs. These results are related to the index ingredient consistency, standardization, and reproducibility of natural dyed products including such as yarns, fabrics, garments, and so on. Therefore, the present study was demonstrated that in order to determine the conformity assessment system for the satisfaction of all stakeholders, the offering of information on the origin, manufacturing process, and index ingredient content of natural dyes should be prioritized.

**Key words:** natural dye (천연염료), conformity assessment (적합성 평가), HPLC (크로마토그래피)

## 1. 서 론

페루 와이카(Huaca)에서 발견된 6200년 된 인디고 블루 직물이 보여주듯(Splitstoser et al., 2016) 인류는 오랜 기간 천연염료를 사용해왔으나, 1856년 영국의 윌리엄 헨리 퍼킨(William Henry Perkin)이 발명한 최초의 빨강 보라색 합성염료, 모브(Mauve)를 시작으로 우수한 염색 물성과 대량 생산 가능성을 보유한 합성염료의 발전에 의해 천연염료는 점차 밀려나게 되었다. 그러나, 염색 폐수 배출로 인한 수질 오염 등 합성염료의 환경오염 유발 문제와 일부 합성염료의 알레르기, 피부염 유발 등의 인체 유해성으로 1990년 이후 강화되고 있는 국제 환경규제 및 환경규격 적용은 글로벌 의류패션 관련 기업과 소비자들로 하여금 환경친화형 제품에 대한 관심을 지속적으로 높이고 있다.

이러한 관심을 바탕으로 현재 전통적이고 소량생산의 천연염색산업이 국내뿐만 아니라 국외 기술 수준에 맞춰 글로벌 비즈니스로의 발전 전개되기 위해 다양한 관심과 노력을 기울이고 있으나, 천연염색의 수급 불균형으로 인한 천연염료 대량생산의 어려움과, 같은 염료라도 산지나 채취 시기, 보관상태, 추출법 등에 따른 천연염색 공정의 색상 표준화, 그리고 염색 재현성 표준화 등이 이루어지지 않아 많은 어려움을 겪고 있다.

따라서 국내 천연염색 산업이 글로벌 비즈니스 시장에서 바이어와 소비자의 요구에 부합하는 대량생산과 품질경쟁력을 확보하기 위해서는 천연염료의 표준화, 규격화 및 적합성 평가에 대한 정의와 시스템 체계 구축이 우선적으로 진행되어야 하며, 적합성평가 시스템 구축을 위한 적합성 평가 기반 기술 확보를 위해서는 시중에서 판매되고 있는 천연염료 제품에 대한 지표물질(index ingredient) 검출 여부 및 색소 성분 함량 등의 특성 연구 필요성이 우선 요구된다.

꼭두서니(Madder)는 기원전 2300~1750년 경의 인더스 문명 모헨조다로(Mahenjodaro) 유적에서 발견된 붉은색 먼 조각이 꼭두서니로 염색된 것으로 확인될 정도로 역사적으로 오래된 천연염료이다(Bhardwaj & Jain, 1982). 꼭두서니는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 다년생의 덩굴성 초본식물로, 염색에는 꼭

<sup>†</sup>Corresponding author; Jong Hoon Kim  
Tel. +82-2-3299-8141, Fax. +82-2-3299-8160  
E-mail: teramaze@chol.com

© 2018 (by) the authors. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

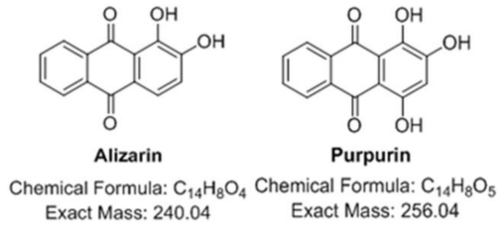


Fig. 1. Chemical structure of alizarin and purpurin.

두서니의 뿌리를 사용하며, 황색을 띤 적색의 색소를 함유하고 있으며(Vankar, 2017), 1826년 프랑스의 화학자 장 자크 콜린(Jean Jacques Colin)과 피에르 장 로비케(Pierre-Jean Robiquet)는 꼭두서니 뿌리에 Fig. 1과 같은 두 가지 염료성분 알리자린(alizarin)과 퍼푸린(purpurin)이 포함되어 있는 것을 발견하였다(Oma, 2012). 꼭두서니는 아시아, 유럽 및 아프리카 등 전세계적으로 분포하기에 대량생산을 위한 공급 안정성 조건도 갖추고 있어 천연염료 적합성 평가 연구에 우선되어야 하는 천연염료로 판단된다.

이에 본 연구에서는 시중에서 판매되고 있는 천연염료 중 적색을 띠는 꼭두서니 천연염료에 대하여 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, 이하 HPLC)를 활용한 지표물질 검출 여부 및 염료 성분 함량 등의 특성 연구를 통해 천연염료 적합성 평가 연구를 진행하였다.

## 2. 연구방법

### 2.1. 시료 및 시약

본 연구에서는 시판중인 천연염료 중 제조사와 사용된 천연염료가 명확한 적색 천연염료 5종을 구매하여 시료로 사용하였으며, 제조사명 순서대로 Red 1, Red 2, Red 3, Red 4, Red 5로 표기하였다(Table 1). 염료 추출 및 HPLC 분석 등 본 연구에서 사용된 모든 용매와 표준물질(reference standard)은 머크(Merck, Germany)에서 HPLC 등급으로 구매하여 별도의 정제 없이 사용하였으며, 증류수는 Milli-Q 시스템으로 정제하여 사용하였다.

### 2.2. 분석 용액의 조제

시료의 염료 성분을 추출하기 위하여 각 시료 10mg을 50% 메탄올 1mL에 넣어 25~30°C에서 1h 동안 초음파 처리한 후, 추출 용액을 3000rpm으로 15min 동안 원심 분리하여 상층액을 분리하고, 0.2 $\mu$ m의 시린지 필터(syringe filter)로 미세입자를 걸러내었다. 본 과정을 시료당 3회 반복하여 분석 용액을 제조하였다.

### 2.3. HPLC-DAD 측정

HPLC는 DAD(diode-array detector)가 장착된 Agilent Infinity

Table 1. Natural dyestuff used in the study

Sample	Country	Manufacturer	Product information by manufacturer
Red 1	India	Company A	Madder ( <i>Rubia cordifolia</i> )
Red 2	U.S.A	Company E	Madder extract
Red 3	India	Company S	Madder/soap nut
Red 4	France	Company R	Madder ( <i>Rubia tinctorum</i> )
Red 5	Netherland	Company R	Madder root ( <i>Rubia tinctorum</i> )

Table 2. Analytical conditions of HPLC

HPLC Condition	
Column	Phenomenex Luna C18 (150 × 4.6mm, 5 $\mu$ m)
Flow rate	1mL/min
Injection Vol.	10 $\mu$ L
Mobile phase	(A) water, (B) acetonitrile in both 0.1% formic acid
Gradient method	0min : 90% (A), 10% (B) ~ 30min : 0% (A), 100% (B)
DAD UV detector	430nm for alizarin and purpurin

Table 3. Analytical conditions of Ultra HPLC

Ultra HPLC Condition	
Column	Kinetics EVO C18 (100 × 2.1mm, 1.7 $\mu$ m)
Flow rate	0.3mL/min
Injection Vol.	3 $\mu$ L
Mobile phase	(A)water, (B)acetonitrile in both 0.1% formic acid
Gradient method	0min : 90% (A), 10% (B) ~ 30min : 0% (A), 100% (B)
Column oven	35°C
MS System	Shimadzu LCMS 2020
Ionization method	ESI-, ESI+
Data acquisition	Scan 100-1500m/z
Nebulizer gas flow	1.5L/min
Dry gas flow	15L/min
Interface temp.	250°C
Interface voltage	3.5kV

1200 시리즈를 사용하여, Table 2의 조건에 따라 분석을 수행하였다.

### 2.4. Ultra HPLC-MS 측정

Ultra HPLC-MS는 MS(mass spectrometer)가 장착된 Shimadzu Nexera X2 시리즈를 사용하여, Table 3의 조건에 따라 분석을 수행하였다.

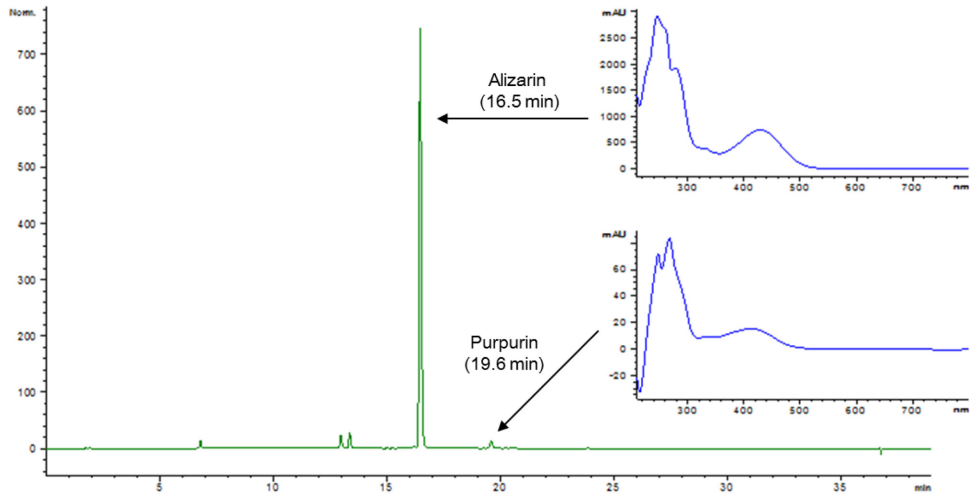


Fig. 2. HPLC chromatogram and DAD UV spectra of Red 1.

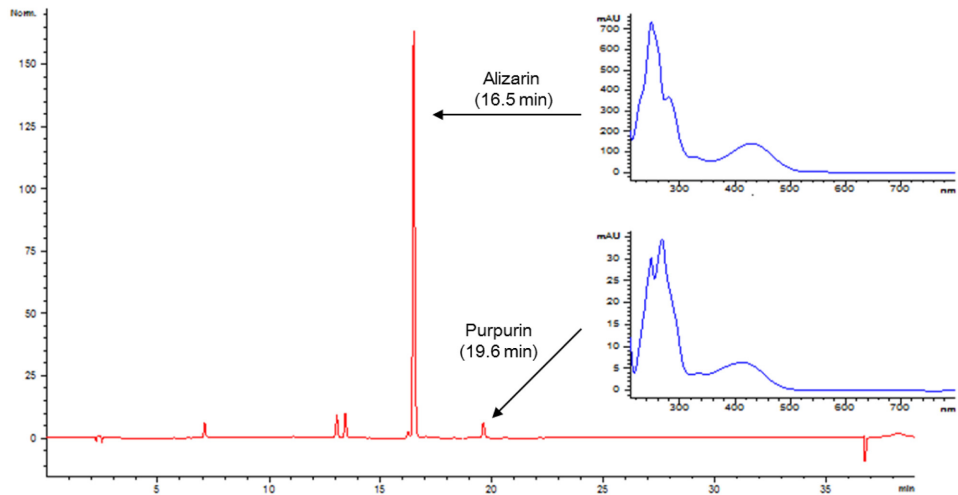


Fig. 3. HPLC chromatogram and DAD UV spectra of Red 2.

### 3. 결과 및 논의

#### 3.1. HPLC에 의한 성분분석

시판의 적색 천연염료 5종에 대해 HPLC 분석을 실시하여, 각 시료에서 나타나는 크로마토그램 피크(chromatogram peak)의 머무름 시간(retention time)과 DAD의 UV 스펙트럼(spectrum)을 통해 각 시료의 색소 성분을 확인하였다.

Red 1과 Red 2의 HPLC 크로마토그램과 DAD의 UV 스펙트럼을 나타낸 Fig. 5와 6을 살펴보면, 주요 지표성분인 알리자린과 퍼푸린이 검출되었던 Red 1~3의 크로마토그램과 확인한

다(Mouri & Laursen, 2012).

Red 3의 HPLC 크로마토그램과 DAD의 UV 스펙트럼은 Red 1과 Red 2의 패턴과 동일하였다(Fig. 4). Fig. 4를 보면 16.5min에 알리자린의 피크가 매우 강하게 나타나고, 19.6min에 퍼푸린의 작은 피크가 추가로 검출된다. 제조사에서 제공하는 정보에 따라 소프넛(soap nut)의 함유성분인 사포닌(saponin)계 화합물을 검출하기 위해 DAD의 UV 검출기(detector)를 203nm으로도 분석하였으나 사포닌 화합물은 검출되지 않았다(Murgu & Edson, 2006).

Red 4와 Red 5의 HPLC 크로마토그램과 DAD의 UV 스펙트럼을 나타낸 Fig. 5와 6을 살펴보면, 주요 지표성분인 알리자린과 퍼푸린이 검출되었던 Red 1~3의 크로마토그램과 확인한

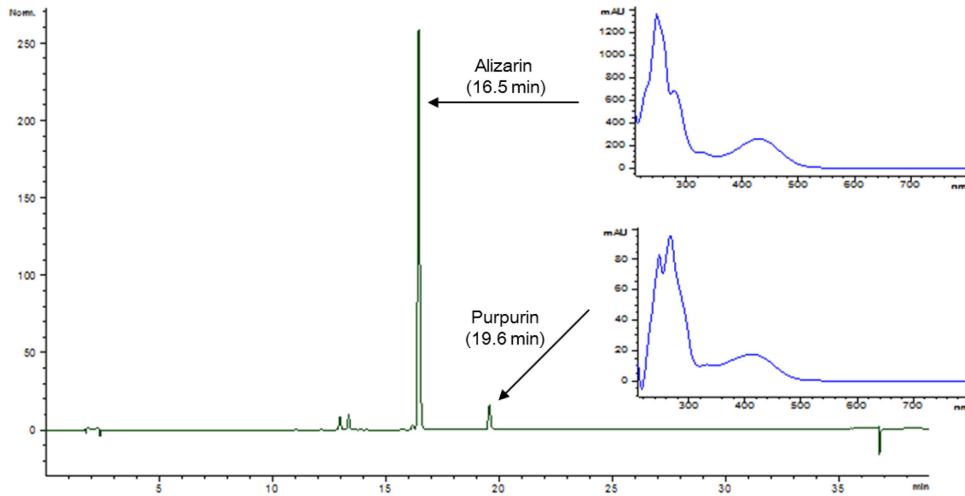


Fig. 4. HPLC chromatogram and DAD UV spectra of Red 3.

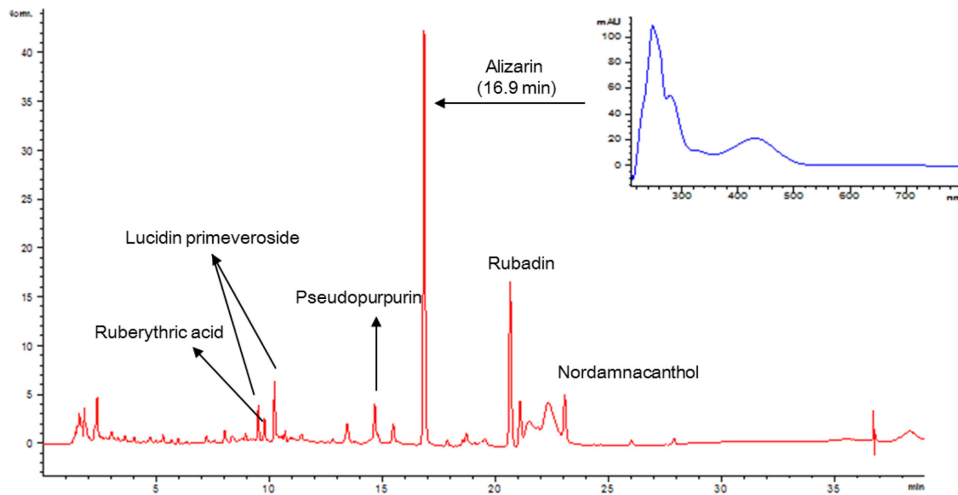


Fig. 5. HPLC chromatogram and DAD UV spectra of Red 4.

차이를 보였다. Red 4에서는 주요 성분으로 쪽두서니의 지표물질인 알리자린과 그 밖에 ruberythric acid, lucidin primeveroside, pseudopurpurin, rubadin, nordamnacanthol 화합물들이 검출되었으나, 퍼푸린은 검출되지 않았다. 반면, Red 5는 galiosin, pseudopurpurin-O-glucoside, lucidin primeveroside, ruberythric acid가 주요 성분으로 검출되었고(Hemen & Ledwani, 2012), 쪽두서니의 주요 지표성분인 알리자린과 퍼푸린은 가장 강하게 나타나는 피크와 비교하여 피크가 작지만 검출이 확인되었다(Fig. 7). Red 4와 Red 5에서 검출되는 알리자린과 퍼푸린 외, 안트라퀴논(anthraquinone)계 화합물들은 선행연구(Santis & Moresi, 2007)에서 *Rubia tinctorum*에서 나타나는 주요 화합물로 확인되었다.

상기 HPLC 분석 결과 크로마토그램(Fig. 2~6)과 천연염료

제조 시 사용한 쪽두서니 염료의 속(屬, genus)에 대한 정보(Table 1)로부터, 사용된 쪽두서니 염색의 근원(origin)에 대한 정보가 제공되지 않은 Red 2와 Red 3은 HPLC 분석 크로마토그램 패턴이 거의 유사한 Red 1과 동일한 *Rubia cordifolia* 속으로 추정되며, 이러한 천연염료의 근원에 대한 정보는 다음의 Ultra HPLC-MS 분석을 통해 확인한 색소 함량과 연관성이 커, 천연염료 적합성 평가의 주요 요소가 될 수 있을 것이다.

### 3.2. Ultra HPLC에 의한 색소성분 함량 분석

Ultra HPLC-MS 분석을 실시하여 얻은 크로마토그램 피크의 면적을 토대로 각 시료에 포함된 색소 함량을 조사하였다. 분석 결과, Red 5를 제외한 나머지 4종의 시료들에 퍼푸린보다 알리자린 색소성분을 더 많이 함유하고 있으며, 이 알리자린 색소성

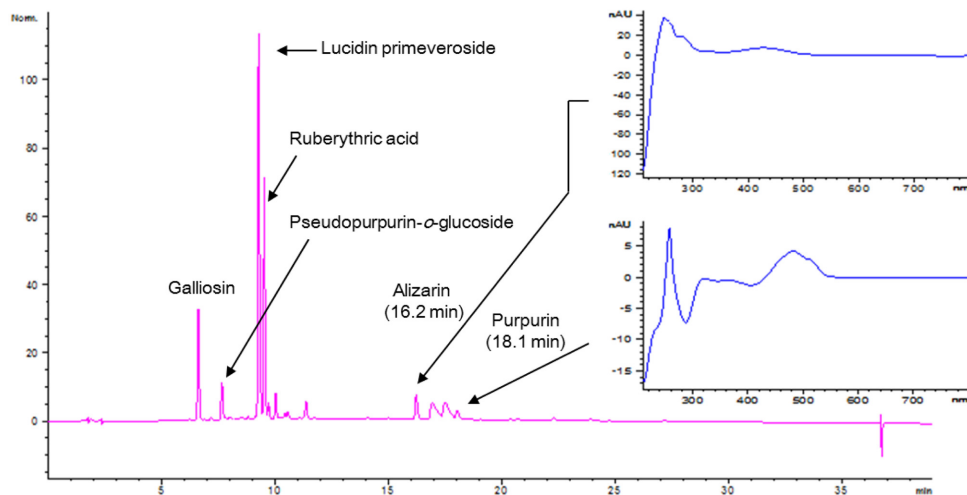


Fig. 6. HPLC chromatogram and DAD UV spectra of Red 5.

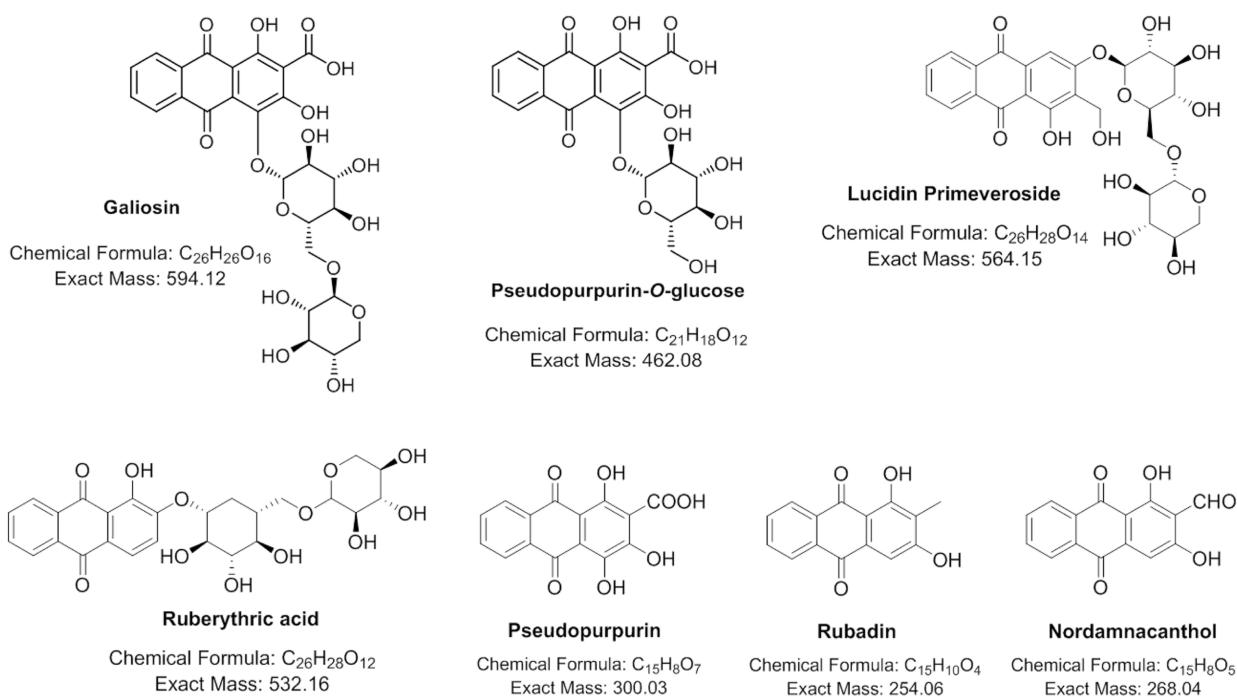


Fig. 7. Detected compounds except for alizarin and purpurin in Red 4 and 5.

Table 4. Content of alizarin and purpurin in each sample (Unit: mg/g)

Sample	Alizarin	Purpurin
Red 1	184.44	6.73
Red 2	12.26	4.72
Red 3	116.0	13.6
Red 4	9.3	-
Red 5	1.8	2.0

분도 시료별 1.8mg/g에서 184.44mg/g으로 100배 정도의 함량 차이가 나는 것으로 확인되었다(Table 4).

선행연구(Cronquist, 1981; Karadag & Dolen, 2007; Melchior, 1964; Perkin & Everset, 1918; Schweppe, 1989 (as cited in Lim & Jang, 2013); Saxena & Raja, 2014)에 의하면, 일반적으로 말하는 쪽두서니는 서양 쪽두서니(European madder)라고 하는 *Rubia tictorum*으로 알리자린이 주성분이고, 오렌지-레드 계열의 염료로 사용되며, 인도 쪽두서니(Indian madder)라

불리는 *Rubia cordifolia*는 퍼푸린이 주성분으로 붉은 편이라 보고되고 있다. 이에 본 연구에서 사용된 쪽두서니 염료의 속에 대한 정보가 확인되는 Red 1은 *Rubia cordifolia*로 퍼푸린이, Red 4와 Red 5는 *Rubia tinctorum*이므로 알리자린이 주성분으로 함유되어 있어야 하나, Red 1에서 알리자린이 퍼푸린보다 약 30배 정도 더 많이 검출되었으며, Red 5는 퍼푸린이 알리자린보다 미량이지만 조금 더 많이 함유되어 있었다. Red 4는 퍼푸린이 검출되지 않고 알리자린만 검출되었다. 이와 같이 선행연구와 상이한 조사 결과는 제조사가 사용한 천연염색의 근원에 대한 정보 표기 오류나 추출방법의 차이 등과 같은 다양한 이유에 기인한 것으로 생각되므로 좀 더 많은 쪽두서니 염료에 대한 사례 연구가 필요할 것으로 판단된다.

색소 성분의 함량 차이에 따른 염색성 연구 등에 대한 연구 (Kim & Bae, 2013; Oh & Ahn, 2013)에서 보여주듯 색소성분 함량 차이는 염색물의 겉보기 색 농도(K/S)와 직결되어 있어 천연염색 공정의 색상 표준화, 염색 재현성 문제 발생의 요인이 되므로 천연염료 적합성 평가에서 다루어야 하는 주요 요소로 판단되며, 본 연구에서 다른 시료들의 색소성분 함량 차이에 따른 염색성 등의 물리적인 특성에 대해서는 후속 연구에서 별도로 다루고자 한다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 환경친화형 제품에 대한 글로벌 비즈니스 업계의 관심을 바탕으로 국내 천연염색 산업이 글로벌 비즈니스 시장에서 품질경쟁력 확보를 위한 천연염료의 표준화, 규격화 및 적합성 평가에 대한 정의와 시스템 체계 구축에 필요한 요소 기술 확보에 의의를 두고, 시판되고 있는 적색의 쪽두서니 천연염료 5종에 대하여 HPLC를 활용한 쪽두서니 지표물질 알리자린과 퍼푸린 검출 여부 및 각 염료에 함유된 색소성분 함량을 확인하였다. 수행된 적색의 쪽두서니 천연염료에 대한 적합성 평가 연구 결과, 대부분의 염료에서 천연염료 쪽두서니의 지표물질 알리자린과 퍼푸린이 검출되었으나 제조사 별로 색소성분 함량 차이가 큰 것으로 확인되었다.

천연염료는 염색의 산지별, 채취시기별, 추출방법 등에 따라 다르며, 천연염색에 포함된 염료성분의 함유량 또한 산지별, 시기별 및 처리방법 등과 같은 다양한 원인에 따라 다를 수 있다고 알려져 있다. 이에 천연염료의 지표물질 유무 및 각 색소성분의 함량은 천연염료의 사용여부와 천연염색 공정의 색상 표준화 그리고 염색 재현성 및 표준화와 밀접하게 연관되어 천연염료 적합성 평가에서 꼭 다루어야 하는 주요 요소로 선택되어야 하며, 대량생산, 글로벌 소싱(global sourcing) 및 이해관계자 모두가 만족할 수 있는 적합성 평가 체계 확보를 위해서는 천연염료뿐만 아니라 천연염색물의 추적성(Traceability) 평가를 통한 적합성 여부를 판단할 수 있도록 천연염료 제조사들의 사용한 천연염색의 속 등 천연염료의 근원과 색소 함량에 대한 정보제공이 우선되어야 할 것이다.

#### 감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부 원천기술개발사업의 STEAM 연구사업 중 전통문화연구개발사업(NRF-2017M3C1B5018878)의 연구비 지원으로 수행되었음.

#### References

- Bhardwaj, H. C., & Jain, K. K. (1982). Indian dyes and dyeing industry during 18th-19th century. *Indian Journal of History of Science*, 17(1), 70-81.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University press.
- Hemen, D., & Ledwani, L. (2012). A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3(3), 291-319.
- Karadag, R., & Dolen, E. (2007). Re-examination of Trukey red. *Societa Chimica Italiana*, 97(7), 583-589.
- Kim, Y. B., & Bae, S. E. (2013). Dyeabilities with various fabrics and chemical composition of brown colorants from pine bark. *Fashion & Textile Research Journal*, 15(1), 138-146. doi:10.5805/SFTI.2013.15.1.138
- Lim, J. Y., & Jang, J. D. (2013). Dye extraction and silk dyeing of rubia cordifolia using solvent. *Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles*, 37(4), 506-513. doi:10.5850/JKSCT.2013.37.4.506
- Melchior, H. (1964). *A Engler's syllabus der pflanzenfamilien* (12th ed.). [The plant classification system (12th ed.)]. Berlin: Gebruder Borntraeger.
- Mouri, C., & Laursen, R. (2012). Identification of anthraquinone markers for distinguishing Rubia species in madder-dyed textiles by HPLC. *Microchimica Acta*, 179(1-2), 105-113. doi:10.1007/s00604-012-0868-4
- Murgu, M., & Edson, R. (2006). Dereplication of glycosides from *Sapindus saponaria* using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(7), 1281-1290. doi:10.1590/S0103-50532006000700013
- Oh, J. E., & Ahn, C. S. (2013). Analysis of the pigment contents of commercial indigo powders and their effect on the color and the antimicrobial function of dyed cotton fabrics. *Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles*, 36(1), 17-26. doi:10.5850/JKSCT.2013.37.1.17
- Oma, M. M. (2012). *The chemical history of color* (1st ed.). Berlin: Springer Science & Business Media.
- Perkin, A. G., & Everset, A. E. (1918). *The natural organic colouring matter*. London: Longmans Green.
- Santis, D. D., & Moresi, M. (2007). Production of alizarin extraction from *Rubia tinctorum* and assessment of their dyeing properties. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 151-162. doi:10.1016/j.indcrop.2007.02.002
- Schwepe, H. (1989). Identification of red madder and insect dyes by thin-layer chromatography. In S. H. Zeronian & H. L. Needles (Eds.). *Historic textile and paper materials II: Conservation and characterization* (pp. 188-219). Washington DC: American Chemical Society.
- Splitstoser, J. C., Dillehay, T. D., Wouters, J., & Claro, A. (2016). Early

pre-Hispanic use of indigo blue in Peru. *Science Advances*, 2(9), e1501623. doi:10.1126/sciadv.1501623

Saxena, S., & Raja, A. S. M. (2014). Natural dyes: Sources, chemistry, application and sustainability issues. In S. S. Muthu (Eds.). *Roadmap to Sustainable Textiles and Clothing: Eco-friendly Raw Materials, Technologies, and Processing Methods* (pp. 37-80). Singa-

pore: Springer.

Vankar, P. S. (2017). *Natural dyes for textile: Sources, chemistry and application* (1st ed.). Cambridge: Woodhead publishing.

(Received 30 October, 2018; 1st Revised 6 November, 2018; 2nd Revised 13 November, 2018; Accepted 23 November, 2018)