

HPLC-DAD-MS를 이용한 천연염색 면직물의 천연색소 지표성분에 대한 분석

Analysis of Natural Pigment Indicator Components of Natural Dyed Cotton Fabrics Using HPLC-DAD-MS

*Corresponding author

Bum Hoon Lee
(bhlee@shinhan.ac.kr)

**Co-corresponding author

Yoon Cheol Park
(yepark@kitech.re.kr)

이원경, 김종훈, 김문정, 박윤철^{1*}, 이범훈^{2*}

한국섬유소재연구원, ¹한국생산기술연구원, ²신한대학교 섬유소재공학과

Won Kyoung Lee, Jong Hoon Kim, Moon Jung Kim, Yoon Cheol Park^{1**}
and Bum Hoon Lee^{2*}

Korea High Tech Textile Research Institute, Yangju, Korea

¹Korea Institute of Industrial Technology, Ansan, Korea

²Department of Textile Materials Engineering, Shinhan University, Dongducheon, Korea

Received_November 26, 2020

Revised_December 15, 2020

Accepted_December 21, 2020

Textile Coloration and Finishing

TCF 32-4/2020-12/255-264

© 2020 The Korean Society of
Dyers and Finishers

Abstract With the development of synthetic dyes, excellent dyeing properties and massive production became possible. On the other hand, natural dyeing technology has gradually disappeared. However, the international environmental and human safety requirements of the apparel and textile industry are increasing, and there is a growing interest in safer and more environmentally friendly products. Accordingly, the public's interest in natural dyeing is increasing. To meet these demands, it is first necessary to clarify the stages of production and distribution of natural dyes. It is necessary to evaluate whether the product is a natural dye product and study the suitability of the natural dye product through qualitative and quantitative assessment of the indicator components of the natural dye. Typical of three natural dyes did qualitative and quantitative analysis by HPLC-DAD and HPLC-MS. Products dyed using natural dye three products were analyzed, and the presence or absence of detection of each indicator components was confirmed to confirm whether the product was dyed using natural dyes.

Keywords natural dye, natural dyed products, conformity assessment, high performance liquid chromatography, *Rubia cordifolia*, *Rheum emodi*, *Indigofera tinctoria*

1. 서 론

인간은 수천 년 동안 자연에 존재하는 천연염료를 활용하여 색을 얻어 왔다. 1856년 퍼킨(W. H. Perkin)에 의해 합성염료가 개발되면서, 우수한 염색성 확보와 대량생산 실현으로 천연염색은 기술이 점차 떨어지게 되었다. 합성염료를 이용한 염색은 폐수 배출로 인한 환경오염문제와 일부 합성염료가 함유한 유해물질로 인한 알레르기 및 피부염 등 인체 유해성에 대한

논란이 끊이지 않고 있다^{1,2)}.

최근 세계적인 친환경 및 Well-being에 대한 소비자의 관심이 커지면서 의류 및 섬유산업 전반에 친환경 및 인체에 대한 안전성 요구가 강화되어 사람에게 보다 안전하고 환경을 저해하지 않는 친환경 제품에 대한 수요가 증가 하고 있다. 2011년 ZDHC(Zero Discharge of Hazardous Chemicals)라는 단체의 설립은 섬유류산업 분야에 상당한 영향을 끼치게 되었고, 유해물질 배출이 없는 제품에 대한 정책과 규제가 강화되었다. 대부분의 선진국 제조 기업들은 친환경 제품에 대한 공급을 확

대해 나가고 있고, 친환경 섬유소재와 제품에 대한 수요는 증가하고 있으며, 의류 소비자들의 친환경에 대한 의식도 상당히 변하고 있다^{3,4)}. 이러한 추세와 동향으로 인하여 천연염색제품은 합성염료에 의해 염색된 제품보다는 친환경에 더 가까울 것으로 생각하는 소비자들이 많다. 천연염색제품은 친환경에 웰빙 개념까지 더해져서 점차 부각되고 있다.

이에 따라 천연염색의 산업화를 위한 연구가 여러 방면에서 시도되고 있으나 가장 중요한 원료인 천연염색의 산지나 채취 시기·보관상태·추출방법 등에 따른 천연염료제품의 공급에 대한 안정성이 떨어지고 제품의 유통단계가 매우 불분명한 편이다. 일부 합성염료는 고가의 천연염료로 포장되어 판매되고 있는 실정이다. 천연염색제품이라고 홍보하거나 광고를 하면서 실제로는 천연염색으로 만든 천연염료로 염색하지 않거나, 합성염료를 혼합하여 사용하는 경우도 있는 것으로 보인다⁵⁾. 천연염색 제품은 고가에 판매가 이루어지고 있으나 천연염색 여부의 적합성 평가체계가 미비하여 소비자가 구매를 하는데 있어 구매의 신뢰도가 떨어지고 그로 인하여 제품의 판매가 부진해 지면서 천연염색제품의 수요가 더 이상 증가되지 못하고 있다.

수요를 더욱 증가시키기 위해서는 사용하는 염료에 대한 추적시스템이 있어야 하며, 유해물질로부터의 안전을 확인하고 검증절차가 필요하다. 기존의 섬유소재, 의류에 대한 안전관리 프로그램들은 인간의 Oeko-Tex 100, Eco Label, Higg Index, ZDHC, GOTS, 법령으로는 GB, KC, CPSIA, REACH, US EPA 등이 있다. 천연염색과 관련해서 천연염료의 생산 및 유통 단계를 명확하게 하고 제품 여부와 최종 단계의 천연염색 제품에 대한 천연염료의 지표물질 확인여부 및 함량과 같은 추적성(Traceability) 평가를 통한 적합성에 대한 검토가 필요하다.

지표물질로서는 꼭두서니 추출물이 주요 색소성분인 경우는 Alizarin, Purpurin, 대황의 추출물인 경우는 Emodin, Rhein, Chrysophanol, Aloe-emodin, 쪽 추출물인 경우는 Indigo가 알려져 있다⁶⁻¹²⁾.

시판 적색 꼭두서니 천연염료 5종에 대한 지표물질 분석을 통하여 제조사별 색소성분 및 함량 차이를 확인한 이전 연구 결과¹³⁾를 바탕으로 청색과 황색 색상으로 확대할 필요가 있어 본 연구에서는 시판중인 적색, 청색 및 황색 천연염료 중 3가지를 선정하고 고성능 액체크로마토그래피(High performance liquid chromatography)와 질량분석기(Mass spectrometer)를 활용하여 천연염료의 해당 지표성분을 분석하고 실험에 사용한 천연염료로 염색한 섬유에서 천연염료를 추출하여 동일 지표성분 확인을 통한 추적성 평가를 하여 천연염료와 천연염색 제품에 대한 적합성 연구를 수행하였다.

2. 실험

2.1 시료 및 시약

본 연구에서는 Rubia(꼭두서니), Insect(대황), Indigo(쪽)을 상용품 그대로 사용하였다(Table 1). 그리고 면직물의 천연염색 절차는 Table 2와 같다.

HPLC의 이동상과 천연염료 및 피염물 추출에 사용된 용매는

Acetonitrile(J.T Baker, USA), Methanol(J.T Baker, USA), DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, USA), Formic acid(Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였으며, 지표성분 확인 및 검량선 작성에 필요한 표준물질(Reference standard, Avention, USA)에서 HPLC 등급으로 구매하여 사용하였다(Table 3). 실험 사용된 증류수는 Milli-Q System로 생산된 3차 증류수를 사용하였다.

2.2 지표성분 표준물 제조

지표성분 물질을 10mg 칭량하고 1mL DMSO(dimethyl sulfoxide)를 사용하여 용해시킨 후 9mL Methanol로 희석하여 용액을 제조하였다. 제조한 용액은 검량선 작성을 위하여 Methanol로 1-100mg/g 범위의 5개 농도로 희석하여 사용하였다.

2.3 지표성분 추출 및 분석용액 제조

실험에 사용한 염료의 지표성분을 확인하고, 염료만을 사용하여 분석용액을 제조하였고, 실험절차는 염료 20mg을 정확히 칭량하여 50mL 용량의 바이알에 넣고 50% 메탄올 20mL를 넣은 후, 초음파 수조 50±5°C에서 1시간 처리한 후 추출용액을 5,000rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 분리하여 0.2um PVDF(polyvinylidene fluoride) 실린지 필터로 미세입자를 걸러낸 후 분석용액으로 사용하였다. 단, Indigo 염료는 Methanol에 녹지 않아 DMSO와 Methanol을 1:1로 배합하여 추출용매로 사용하였다. 그리고 천연염색 면직물에서 염료를 추출하고, 지표성분을 확인하였다.

실험방법은 표준면포(KS K ISO 105-F02 텍스타일-염색 견뢰도 시험-제F02부 : 면과 비스코스 첨부포 규격)에 각각 염색된 제품을 오븐 타입 건조기에 60°C, 3시간 컨디셔닝하여 사용하였다. 시료를 5mm x 5mm 크기로 잘라 중량 1g을 정확히 측정하여 50ml 바이알에 담고, 50% 메탄올 10mL를 넣은 후 초음파 수조 50±5°C에서 1시간 동안 처리하여 바이알을 상온으로 냉각시키고, 처리용액을 5,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 0.2um PVDF Syringe filter로 미세입자를 걸러내어 분석용액으로 사용하였다. 단, Indigo로 염색된 제품의 경우 DMSO와 Methanol을 1:1로 배합한 추출용매를 사용하였다.

2.4 천연염료 및 천연염색 직물의 HPLC-DVD 분석

HPLC는 DAD(diode-array detector)가 장착된 Nexera X2 UHPLC System(Shimadzu, Japan)을 사용하여 Table 4의 조건에 따라 분석하였다.

2.5 천연염료 및 천연염색 직물의 HPLC-MS 분석

HPLC-MS는 Nexera X2 UPLC LCMS-2020(Singapore Quadrupole Mass Spectrometer, Shimadzu, Japan)가 장착된 시스템을 사용하고 ESI(Electrospray Ionization)방식으로 이온화하여 full scan 방식으로 MS data를 획득하였으며 자

Table 1. Natural dyes in this experimental

Natural dye	Color	Main ingredient	Maker
Rubia	Red and Orange	<i>Rubia cordifolia</i> extract	AMA Herbal(India)
Insect	Light brown	<i>Rheum emodi</i> extract	AMA Herbal(India)
Indigo	Blue	<i>Indigofera tinctoria</i> extract	AMA Herbal(India)

Table 2. Natural dyeing process

Fabric	Standard cotton fabric(KS K ISO 105-F02)
Mordanting condition	Ferrous sulfate(FeSO ₄) 1g/L, 40°C×30min, Liquor ratio 30:1
Dyeing condition	3% o.w.f.(Rubia, Insect, Indigo), 90°C×30min, Liquor ratio 30:1
Washing and Drying	60°C×10min×2time, Room temperature 1 day

Table 3. Reference standard in this study

Name	Fomula	Molecular weight	CAS No.	Purity
Alizarin	C ₁₄ H ₈ O ₄	240.21	72-48-0	97%
Purpurin	C ₁₄ H ₈ O ₅	256.21	81-54-9	98%
Emodin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	518-82-1	98%
Rhein	C ₁₅ H ₈ O ₆	284.22	478-43-3	98%
Chrysophanol	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.24	81-74-3	98%
Aloe-emodin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	481-72-1	99%
Indigo	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	262.27	482-89-3	98%

Table 4. Analytical condition of HPLC-DAD

HPLC Condition	
Column	Phenomenex Omega Pola C18 (150 x 2.1mm, 1.6µm)
Flow rate	0.3mL/min
Column oven	35°C
Injection vol	3µL
Mobile phase	(A) Water (B) MeCN in both 0.1% formic acid
Gradient method	10% B(0min) ~ 100% B(30min)
DAD detector	430nm for Rubia and Insect 600nm for Bio indigo

제한 분석 조건은 Table 5에 따라 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 천연염료의 지표성분 분석

천연염료 3종을 HPLC-DAD 및 HPLC-MS로 분석하여 각 염료에서 나타나는 크로마토그램의 머무름 시간(Retention time, RT)과 DAD의 UV-Spectrum 그리고 MS-data을 통하여 각각의 천연염료 지표성분을 확인하였다.

Rubia 천연염료 제품은 갈퀴 꼭두서니를 추출하여 만든 천연염료로 분석결과 주요 지표성분으로 Alizarin과 Purpurin이 검출되었다. Alizarin과 Purpurin의 표준물질과 검출된 DAD UV-Spectrum(Figure 1)을 비교한 결과 동일한 스펙트럼이 확인되었으며, 질량분석기를 통해 동일한 스펙트럼을 확인할 수 있는 Scan data를 얻을 수 있었다. 지표성분에 대한 표준물질을 1-100mg/g 범위 내 5개의 농도로 측정하여 검량선

Table 5. Analytical conditions of HPLC-MS

HPLC Condition		
Column	Phenomenex Omega Pola C18 (150 x 2.1mm, 1.6 μ m)	
Flow rate	0.3mL/min	
Column oven	35°C	
Injection vol	3 μ L	
Mobile phase	(A) Water, (B) MeCN in both 0.1% formic acid	
Gradient method	10% B(0min) ~ 100% B(30min)	
MS System condition (LCMS 2020)	Ionization mode	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

(Figure 2)을 작성하였으며, 염료 내 지표성분 함유량을 분석한 결과 Alizarin과 Purpurin이 각각 9.68mg/g, 1.9mg/g으로 검출되었다.

Insect는 히말리아대황을 추출하여 만든 천연염료로 분석결과 주요 지표성분으로 Emodin, Rhein, Chrysophanol 그리고 Aloe-emodin이 검출되었다. 검출된 4종의 물질 UV-Spectrum (Figure 3)을 표준물질과 비교한 결과 동일한 스펙트럼을 확인할 수 있었으며, 질량분석기를 통한 Scan data와 동일함을 확인하였다. 지표성분에 대한 표준물질을 1-100mg/g 범위 내 5개의 농도로 측정하여 검량선(Figure 4)을 작성하였으며, 염료 내 지표성분 함유량을 분석한 결과 Emodin, Rhein, Chrysophanol 그리고 Aloe-emodin이 각각 1.46mg/g, 7.34mg/g, 4.08mg/g, 5.60mg/g이 검출되었다.

Indigo 천연염료 제품은 인도람을 추출하여 만든 천연염료로 분석결과 주요 지표성분으로 Indigo가 검출되었으며 UV-Spectrum (Figure 5)을 표준물질과 비교한 결과 동일한 스펙트럼으로 나타났다. 질량분석기를 통한 Scan data 또한 동일한 스펙트럼을 얻을 수 있었다. 지표성분에 대한 표준물질을 1-100mg/g 범위 내 5개의 농도로 측정하여 검량선(Figure 6)을 작성하였으며, 염료 내 지표성분 함유량을 분석한 결과 751.21mg/g이 검출되었다.

HPLC Chromatogram, DAD UV-Spectra 및 MS-data를 통해, AMA Herbal(India)사에서 공급된 3종의 염료는 각각 꼭두서니, 히말라야대황 및 쪽의 지표물질을 갖고 있으며, 이들의 검량선은 천연염색을 위한 염액을 정량적으로 준비하는데 활용할 수 있을 것이다.

하지만 시중에서 판매되고 있는 천연염료가 천연유래인지 합

성인지에 대해 고찰해야 할 필요가 있는 경우에는 방사성탄소 (C_{14}) 분석(ISO-16620-2:2015)과 같은 보다 정밀하고 과학적인 방법을 통해 검증해야 할 것이다.

3.2 천연염색 식물의 지표성분 추적

3종의 천연염색 원단제품을 HPLC-DAD와 HPLC-MS로 분석된 주요 지표성분 Peak의 UV-Spectrum 및 MS-data를 표준물질과 비교하여 천연염료 지표성분을 추적하였다. 다양한 천연염료에 적용하기 위하여 HPLC-DAD의 분석시간을 60분으로 설정하였으며, HPLC-DAD를 활용하여 동시에 다파장 설정 후 시험하여 동시 다 성분의 결과를 확인하였다. 또한 검출된 지표성분은 MS-data를 확인하여 재확인하였다.

Figure 7에 Rubia 원단 HPLC-DAD 분석결과 꼭두서니의 주요 지표물질인 Alizarin(430nm, RT 35min)을 확인하였으나, 또 다른 주요 지표물질인 Purpurin은 검출되지 않았다. 이것은 Purpurin이 처음부터 염색되지 않았거나, Alizarin보다 상대적으로 추출되지 않는 두 가지 경우 중 하나일 것이며, 천연염색 잔액과 추출한 이후의 피염물에 대한 보다 정밀한 연구를 통해서 확인이 가능할 것이다.

그러나 본 연구에서는 ISO 22195-1:2020이 Alizarin을 Index ingredient로 정의하고 있는 것과 마찬가지로 Alizarin을 활용하여 천연염색과정을 포함한 천연염색 섬유제품의 제조 과정에 대한 추적성 가능 여부를 검토하고자 한다.

Figure 8에 Insect 원단 HPLC-DAD 분석결과 430nm 파장에서 머무름 시간 35분부터 45분 사이에 지표성분 Aloe-emodin, Rhein, Emodin 그리고 Chrysophanol이 검출되었으며, 이외에 미량의 다른 물질이 검출되었다. 히말라야 대황의 주요 지

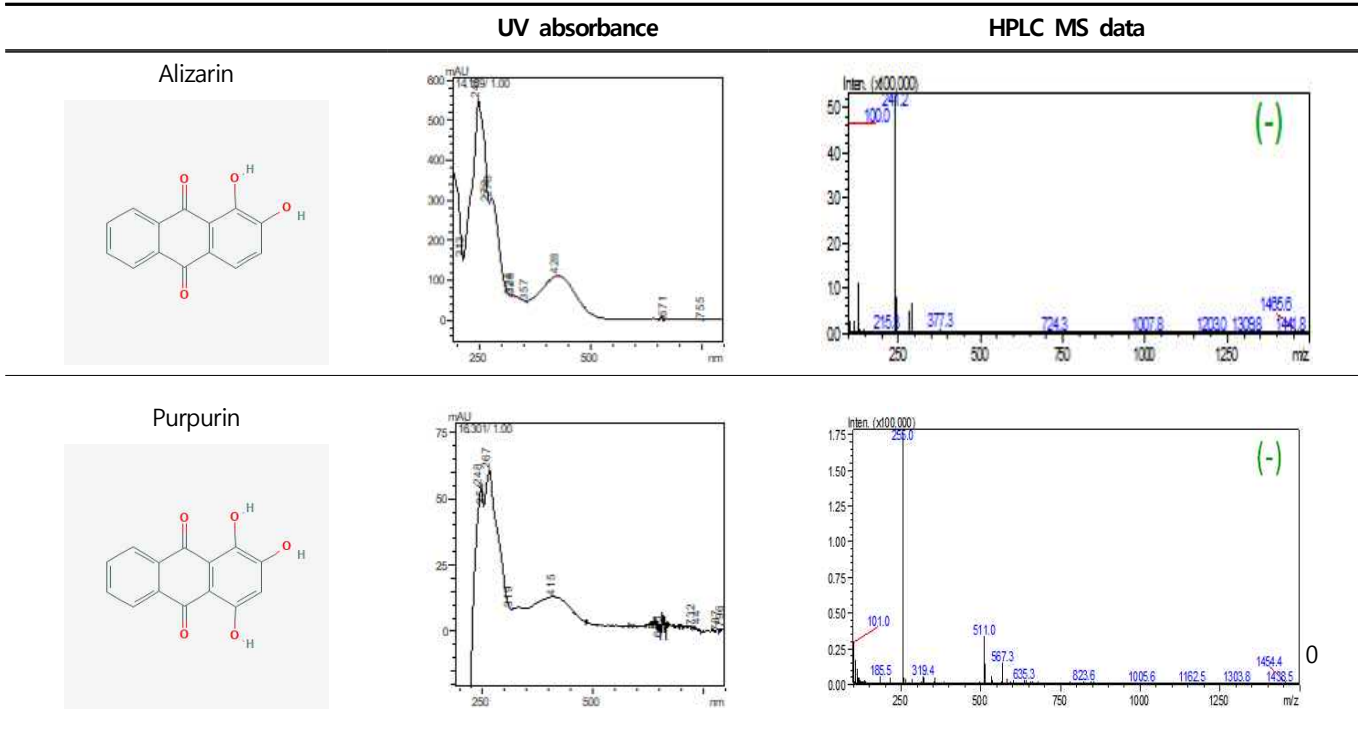
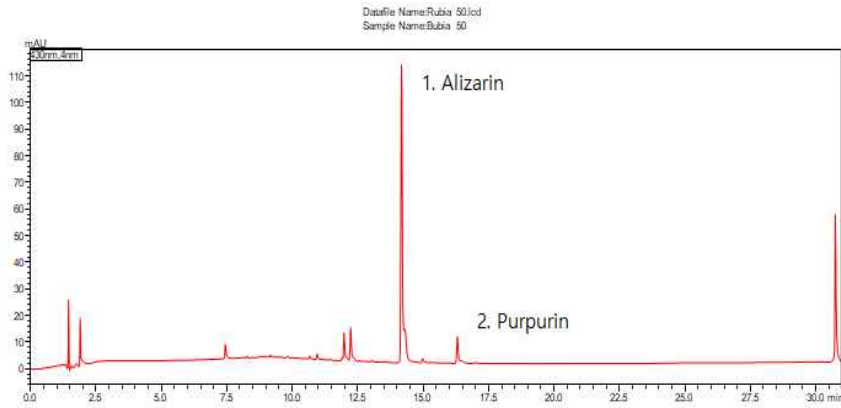


Figure 1. HPLC Chromatogram, DAD UV-spectra and MS-data of rubia natural dye.

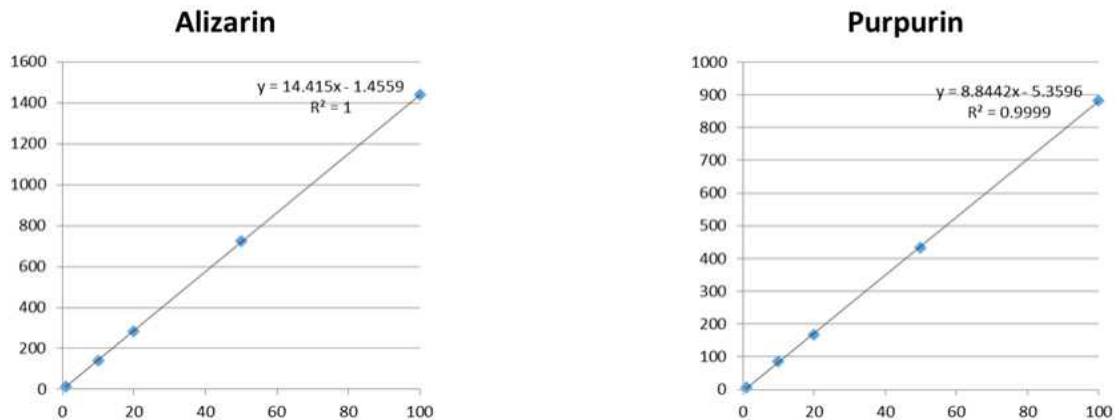


Figure 2. Calibration curve of rubia natural dye.

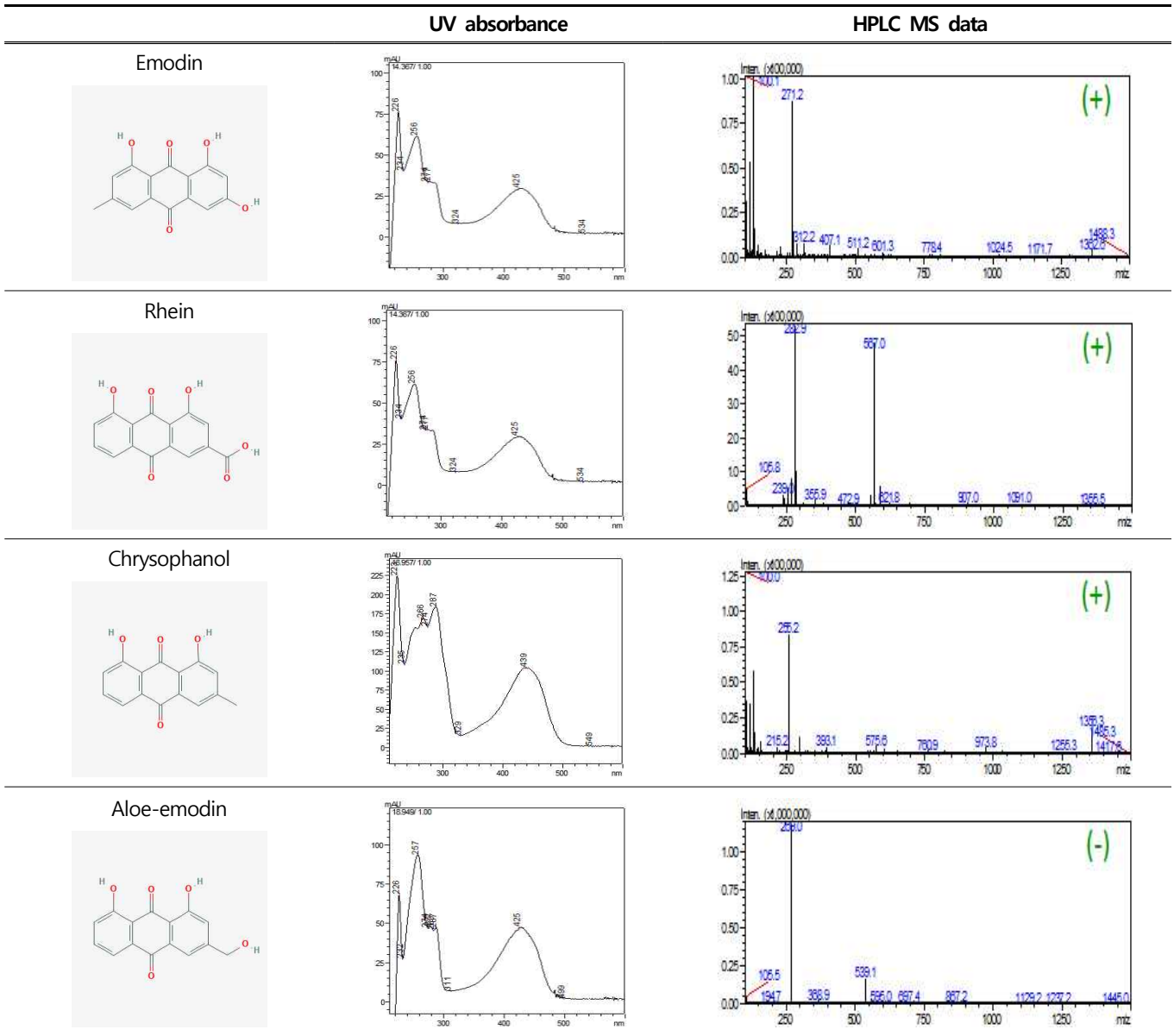
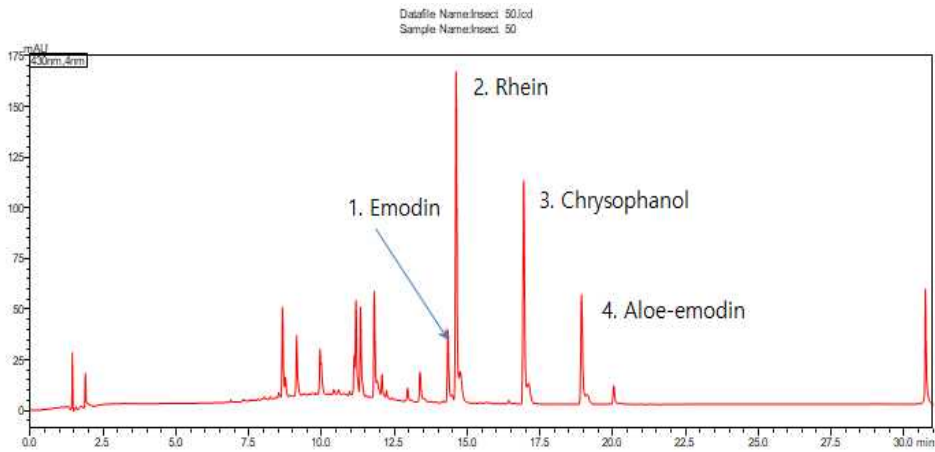


Figure 3. HPLC Chromatogram, DAD UV-spectra and MS-data of insect natural dye.

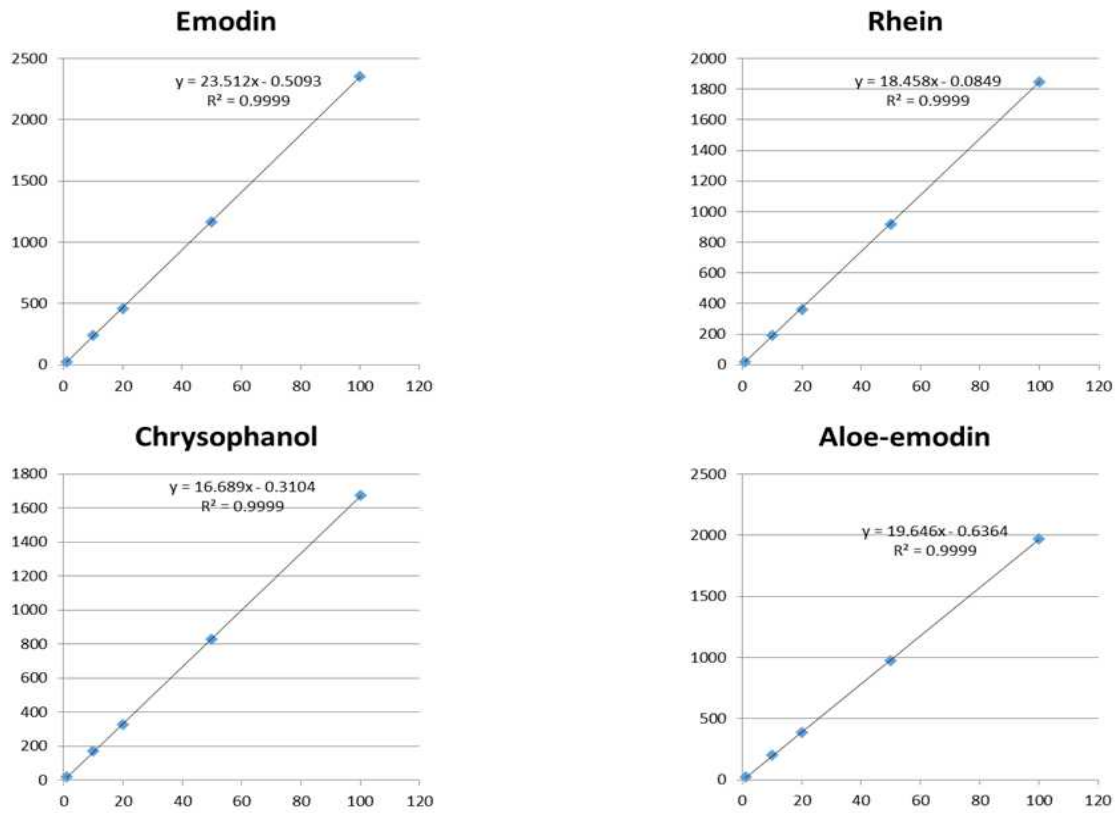
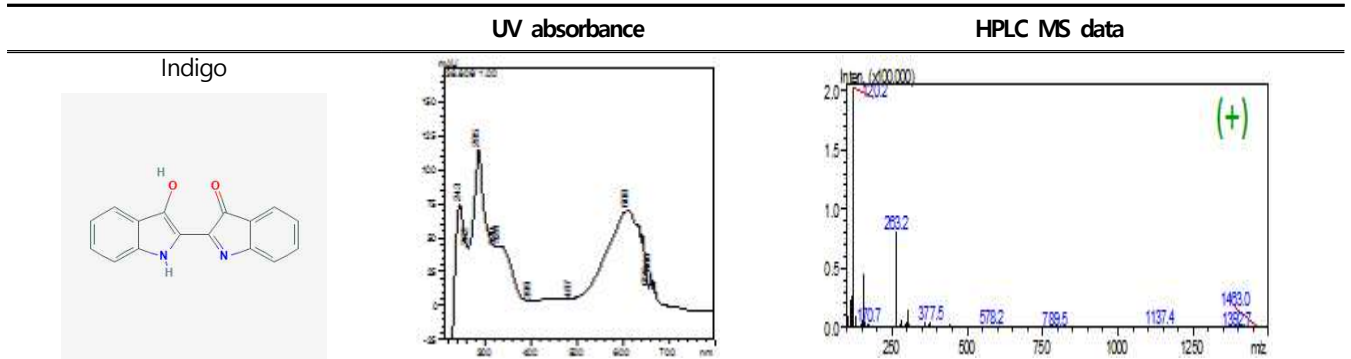
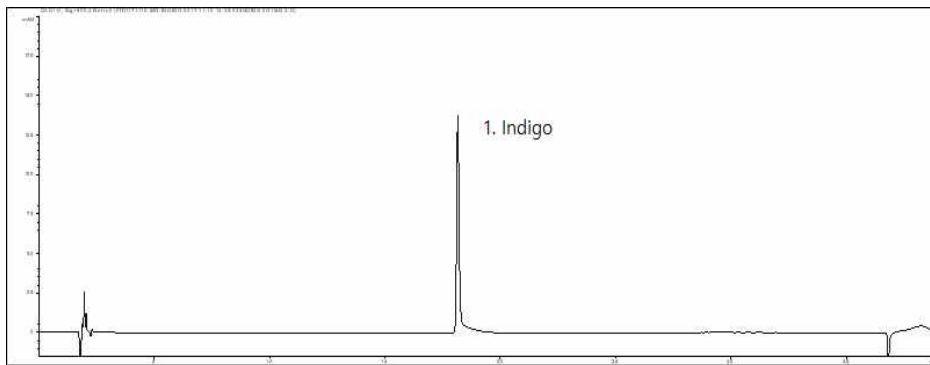


Figure 4. Calibration curve of insect natural dye.



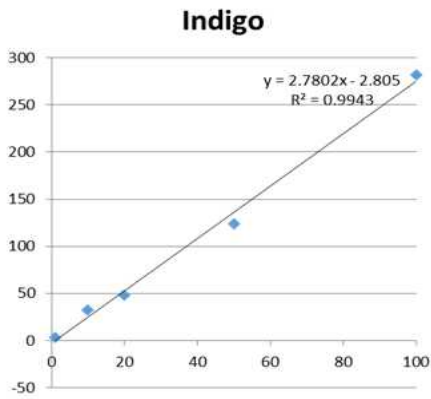


Figure 6. Calibration curve of indigo natural dye.

표물질인 Aloe-emodin, Rhein, Emodin 그리고 Chrysophanol를 확인되어, 천연염료와 천연염색 사이의 추적성 검토가 가능할 것으로 판단된다. 그래서 본 연구는 각 지표물질의 면직물에 대한 염착성능 비교를 목적으로 하고 있지 않으나, 지표물질 간의 비율 변동은 추가적인 고찰이 필요할 것이다.

Figure 9에 Indigo 원단 HPLC-DAD 분석결과 600nm, RT 37min에서 인도람의 주요 지표물질인 Indigo를 확인하였다. 따라서 천연염료의 주요 지표물질과 천연염료를 사용하여 만든 원단 추출물에서의 지표물질 비교가 천연염료에서 천연염색 제품까지의 과정에 대한 추적성 평가의 수단으로 활용될 수 있다고 판단된다. 다만, 사용되는 천연염료 자체에 대한 천연이나 아나에 대한 검토는 천연염료 단계에서 이루어져야 할 것이며, 확보된 정보는 천연염료와 함께 다음 단계로 제공되어야 소비자의 천연염색 제품에 대한 선택권을 보호할 수 있을 것이다.

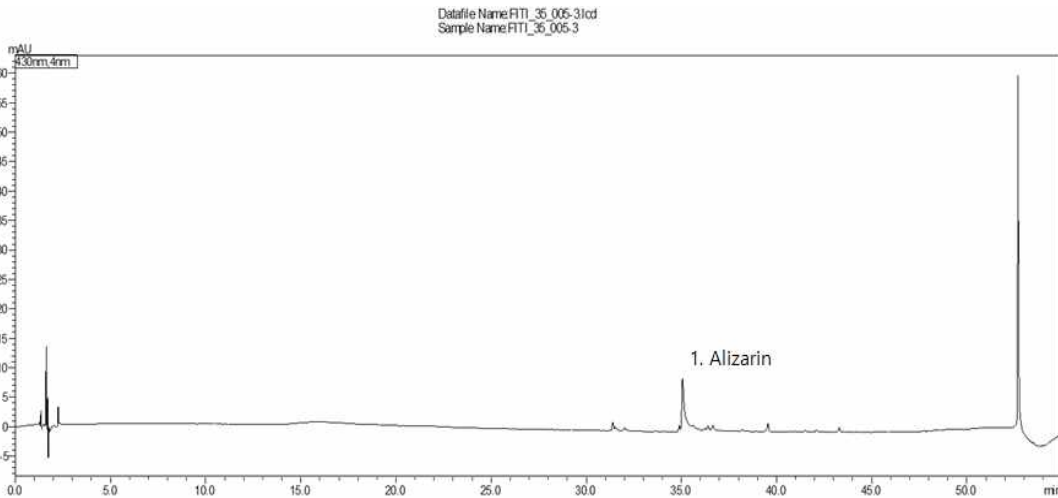


Figure 7. HPLC Chromatogram of extract from dyed with rubia on cotton fabric.

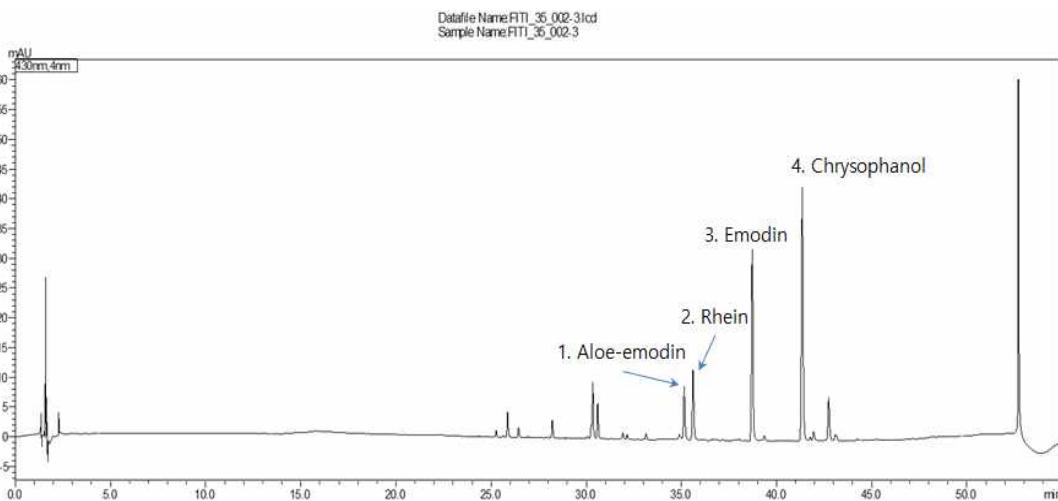


Figure 8. HPLC Chromatogram of extract from dyed with insect on cotton fabric.

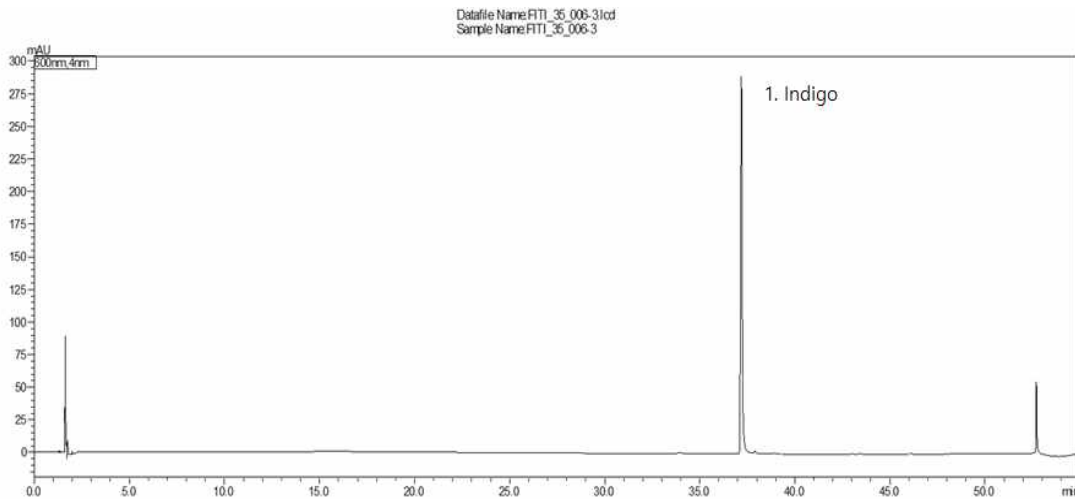


Figure 9. HPLC Chromatogram of extract from dyed with indigo on cotton fabric.

4. 결 론

본 연구에서는 시판되고 있는 섬유 염색용 천연염료 3종의 지표성분을 HPLC-DAD와 HPLC-MS 정량 및 정성분석을 통하여 지표성분의 종류 및 함량을 확인하였다. 적색의 꼭두서니를 원료로 한 Rubia 제품의 주요 지표성분은 Alizarin과 Purpurin이 검출되었으며 함량은 각각 9.68mg/g, 1.9mg/g으로 확인되었다. 황색 계열의 히말리야 대황을 원료로 만든 제품 Insect는 다양한 지표성분을 확인할 수 있었으며, 그 중 대표적인 지표성분 Emodin, Rhein, Chrysophanol 그리고 Aloe-emodin의 함량은 각각 1.46mg/g, 7.34mg/g, 4.08mg/g, 5.60mg/g으로 확인되었다. 푸른색 계열의 인도람을 원료로 만든 제품 Indigo는 주요 지표성분인 Indigo가 검출되었으며 함유량은 751.21mg/g으로 확인되었다.

Rubia 염색 직물의 추출물에서 꼭두서니의 주요 지표성분인 Alizarin이 확인되었고, Insect 염색 직물의 경우에는 Aloe-emodin, Rhein, Emodin 그리고 Chrysophanol이 확인되었으며, Indigo로 염색된 직물의 추출물에서는 Indigo가 확인되어, 천연염료에서 천연염색 섬유제품까지의 색소지표성분의 검증에 의한 추적이 가능하다는 것을 확인하였다.

감사의 글

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

References

1. M. L. Gulrajani, Present Status of Natural Dyes, *Indian Journal of Fiber and Textile Research*, **26**, 191(2001).
2. D. D. Santis and M. Moresi, Production of Alizarin Extracts from Rubia Tinctorum and Assessment of their Dyeing Properties, *Industrial Crops and Products*, **26**, 151(2007).
3. M. K. Kim, Study on Natural Polygoum Tinctoria Dyeing of Sustainable Eco-friendly Cellulose Fabric and its Application, Ph.D. Thesis, Ehwa Women's University, 2012.
4. S. H. Youn, The Prospect of Industrial Value and Potential of Natural Dyeing, *Dyeing and Finishing*, **4**, 47(2009).
5. <https://www.betalabservices.com/natural-products/curcuminanalysis.html>, 2020.11.10.
6. D. Hemen and L. Ledwani, A Review on Anthraquinones Isolated from Cassia Species and their Applications, *Indian Journal of Natural Products and Resources*, **3**(3), 291(2012).
7. S. H. Youn and Y. J. Lim, Stabilization of Natural Dyes and Establishment of Reproducibility of Dyeing, *Fiber Technology and Industry*, **9**(2), 162(2005).
8. J. E. Oh and C. S. Ahn, 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*, **37**(1), 17(2013).
9. J. Y. Lim and J. D. Jang, Dye Extraction and Silk Dyeing of Rubia Cordifolia using Solvent, *Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles*, **37**(4), 506(2013).
10. M. R. S. Fuh and H. J. Lin, Analysis of Rhubarb by Liquid Chromatography Electrospray-mass Spectrometry, *Tamkang Journal of Science and Engineering*, **6**(1), 31(2003).
11. C. S. Ahn, X. Zeng, and S. K. Obendorf, Simultaneous Analysis of the Coloring Compounds in Indigo, Phellodendron bark, and Madder Dye Using HPLC-DAD-MS, *Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles, Textile Coloration and Finishing*, Vol. 32, No. 4

- 37(6), 827(2013).
12. C. S. Ahn and S. K. Obendorf, Separation of Chromophoric Substance from Madder Plant under Different Extraction and Analytical Conditions, *Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles*, **27**(11), 1350(2003).
13. E. M. Lee, D. K. Oh, H. J. Yoon, and J. H. Kim, A Study for the Conformity Assessment on the Natural Dye by HPLC(1), *Fashion and Text. Res. J.*, **20**(6), 2287(2018).

Authors

이원경 한국섬유소재연구원 선임연구원
김종훈 한국섬유소재연구원 수석연구원
김문정 한국섬유소재연구원 수석연구원
박윤철 한국생산기술연구원 수석연구원
이범훈 신한대학교 섬유소재공학과 교수