

축산물가공품 중 타르색소의 정제과정 확립 및 HPLC 분석조건 연구

이승미[†] · 정경태 · 김홍태 · 이우원 · 이강록 · 김금향 · 이동수

축산물 위생검사소

Method Optimization for Separation Process and HPLC Analysis of Synthetic Color Additives in Livestock Processing Products

Seung-Mee Lee[†], Kyung-Tae Jung, Hong-Tae Kim, Woo-Won Lee, Gang-Rok Lee, Geum-Hyang Kim and Dong-Soo Lee

Veterinary Service Laboratory

Abstract

To establish a method for sample preparation and analysis condition of high performance liquid chromatography (HPLC) in livestock processing products, simultaneous and systematic analysis was carried out for 9 permitted and 3 non-permitted synthetic color additives in Korea. All of 12 color additives were well detected on XBridge C₁₈ column within 25 minutes and determined by HPLC with a photodiode array detector at 420 nm for yellow color type, at 520 nm for red color type, at 620 nm for blue and green color type and at 254 nm for mixed colors.

For a comparative study, two different sample processing methods were performed. One was a wool dyeing method which is a current official method, and the other was a solid phase extraction method using Sep-pak C₁₈ cartridge. The average recovery efficiencies of spiked sample were 69.5% in the former method and 86.6% in the latter. 12 synthetic color additives were not detected in 24 livestock processing products including ham, grinded meat and sausage.

Key Words : HPLC, Synthetic food colors, Systematic and simultaneous analysis

서 론

식품산업의 발달과 함께 여러 종류의 가공식품이 개발됨에 따라 식품 첨가물의 종류와 소비량 또한 증가하고 있다. 식품 첨가물은 식품을 제조, 가공하는데 부득이 사용되기는 하지만 엄밀한 의미에서 식품 본래의 성분이 아닌 이물이며 따라서 안전성 문제가 따르게 된다. 현재 허용된 식품첨가물은 약 600여 가지로 그 사용이 일반화 되어 있으나¹⁾ 최근 소비자의 화학적 합성품에 대한 불신과 식품의 안전성에 대한 요구가 증가하고 있는 실정이다. 한편 식품첨가물 중 안전성 문제에서 중요한 것이 합성색소이다. 합성색소 중 가장 대표적인 타르색소는 1856년 영국의 퍼킨(William H. Perkin)이 콜타르(coal tar) 중에 함유된 아닐린(anilin)이란 물질을 사용하여 처음 합성에 성공하면서 사용되기 시작하였으며 또한 여기서 타르색소라는 이름이 유래되었다. 타르색소는 콜타르 중에 함유된 벤젠고리(benzene ring)나 나프탈렌고리(naphthaleneing)를 이용하여 합성한다. 현재 식품첨가물로 허용되고 있는 것은 모두 수용성인 산성타르색소에 속하며 화학구조상 아조계(azo type), 크산텐계(xanthene type), 트리페닐메탄계(triphenylmethane

type)와 인디고계(sulfonated indigo type)로 분류되고 있다²⁾. 현재 국내에서 허용되고 있는 타르색소는 황색 제4호, 황색 제5호, 적색 제2호, 적색 제3호, 적색 제40호, 적색 제102호, 녹색 제3호, 청색 제1호, 청색 제2호의 9종(알루미늄레이크포함 16품목)이며³⁾, 외국의 경우 일본은 12종³⁾, 미국은 9종⁴⁾, EU(유럽공동체연합)는 16종⁵⁾, CODEX(국제식품규격위원회)는 14종⁶⁾으로 국가마다 허용되는 종류에 차이가 있다.

국내에서는 사용가능한 타르색소라 하더라도 영·유아용 조제식품, 면류, 건강기능식품 등 국민다소비식품을 포함하여 총 47품목에는 사용할 수 없으며 그 외 식품에는 사용이 허용되어 있으나 각각의 타르색소에 대한 기준은 설정되어 있지 않은 실정이다⁷⁾. 반면 EU 등 선진국과 CODEX에서는 대상 식품과 함께 최대허용량을 규제하고 있으며 적색 제2호의 경우 미국에서는 1976년 발암성이 있다는 이유로 식품에서 사용이 금지되었고, 적색 제3호의 경우도 미국 식품의약국(FDA)에서 발암성 판정을 받은 바 있다. 합성타르색소는 미량이지만 장기간 노출 시 생체기능에 변화를 가져오고 발암성 및 유전적인 독성 등 안전성에 영향을 미친다고 보고되어있어 이들에 대한 안전성 및 유해성에 대한 논란이 계속 제기되고 있다⁷⁻¹⁰⁾.

[†] Corresponding author. E-Mail: bona4860@busan.go.kr
Phone: 051-331-0095, Fax: 051-338-8266

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

Classification	Common name	Nick name	Manufacturer
Permitted	Yellow No. 2(Tartrazine)	Y4	TCI Co.
	Yellow No. 5(Sunset Yellow FCF)	Y5	TCI Co.
	Red No. 2(Amaranth)	R2	TCI Co.
	Red No. 3(Erythrosine)	R3	TCI Co.
	Red No. 40(Allura red)	R40	TCI Co.
	Red No. 102(Ponceau 4R)	R102	TCI Co.
	Green No. 3(Fast Green FCF)	G3	TCI Co.
	Blue No. 1(Brilliant Blue FCF)	B1	TCI Co.
	Blue No. 2(Indigocarmine)	B2	TCI Co.
Non-permitted	Red No. 104(Phloxine)	R104	TCI Co.
	Red No. 105(Rose Bengal)	R105	TCI Co.
	Red No. 106(Acid Red)	R106	TCI Co.

현재 식품공전과 '축산물 가공기준 및 성분규격'에 따른 타르색소의 분석법²³⁾은 색소를 모사염색법으로 추출하여 종이크로마토그래피(paper chromatography)나 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 이용한 정성분석으로 이 방법은 여러 요인에 의해 정밀도와 정확도가 떨어지고 있다. 이러한 문제점을 보완하기 위한 색소의 정량법으로 자외선 분광광도계(UV/VIS spectrophotometry) 등을 이용한 다양한 방법이 시도되었으며 최근에는 분석속도와 분리능 등에서 우수한 방법으로 평가되고 있는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 분석방법들이 연구되고 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

본 연구에서는 HPLC를 이용하여 허용 타르색소 9종을 포함한 12종의 타르색소에 대한 각각의 분석과 동시분석 및 정제방법을 확립하여 축산식품 검사에 적용가능성을 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시 재료

공시재료는 식육가공품 중 소시지 4종, 햄 10종, 분쇄가공육 10종을 대상으로 호모게나이저로 균질화한 뒤 냉동보관하여 시험에 사용하였다. Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), ammonium acetate, ethanol (EtOH), acetic acid, hexan, tetrabutylammonium bromide (TBA-Br), ammonium hydroxide 등 시약표준품은 Merck사 제품을 사용하였고, 색소표준품들은 TCI (Tokyo Chemical Industry)사 제품으로 Table 1과 같다.

색소표준용액의 조제 및 표준곡선의 작성

각 색소표준품 100 mg에 증류수를 가해 1,000 µg/mL 수용액을 만든 후 이를 증류수로 희석하여 적색, 황색, 청색, 녹색 계통 색소 및 혼합표준액을 0~5.0 µg/mL 농도로 조제하여 사

용하였으며, 표준곡선은 이들 용액 10 µL씩 HPLC/PDA (Agilent 1100 series HPLC system, photodiode array detector)에 주입하여 얻은 면적값으로 작성하였다.

회수율

예비실험을 실시하여 색소가 첨가되지 않은 시료를 취하여 각각 40 g/mL 되도록 색소를 첨가한 후 추출 및 정제과정을 거쳐 측정하였다.

모사염색법을 이용한 시료용액의 조제

시료 5 g을 취하여(지방을 함유한 시료의 경우는 hexan 50 mL로 2회 추출하여 지방제거) 증류수 25 mL을 가하여 수용상에서 때때로 흔들어 혼합하면서 80°C에서 30분간 가온하였다. 원심분리(3,000 RPM, 10분)하여 침전물을 제거하고 균질화시킨 용액 5 mL을 취해 1% acetic acid 1 mL을 가하고 양모 0.2 g을 넣어 60°C에서 30분간 반응시킨 후 염색된 양모를 건져내어 1% ammonium hydroxide 5mL로 양모의 색소를 용출시킨 다음 pH를 1% acetic acid로 중화하고 증류수로 10 mL가 되게한 다음 0.45 µm filter로 여과하여 HPLC 시료용액으로 사용하였다.

고체상 추출법을 이용한 시료용액의 조제

시료 5 g을 취하여(지방을 함유한 시료의 경우는 hexan 50 mL로 2회 추출하여 지방제거) 증류수 25 mL을 가하여 수용상에서 때때로 흔들어 혼합하면서 80°C에서 30분간 가온하였다. 원심분리(3,000 RPM, 10분)하여 침전물을 제거하고 균질화시킨 용액 5 mL을 취해 1% ammonium hydroxide로 pH를 5~6으로 조정하였으며, Sep-Pak C₈ cartridge는 메탄올 10 mL 및 0.1% TBA-Br 수용액 10mL로 순차적으로 세정한 후 시료용액을 2 mL/min의 유속으로 통과시켜 색소들을 카트리지에 보유시켰다. 이어 증류수 10 mL로 카트리지를

Table 2. HPLC chromatographic operating condition for synthetic food color additives

Color type	Wavelength of UV (nm)	Gradient system			
		Mobile A*	Mobile B**	Time	Flow (mL/min)
Mixed	254	100	0	0	0.5
		0	100	18	0.8
		0	100	25	0.8
Post run : 5 min					
Yellow	420	100	0	0	0.5
		100	0	7	0.5
Red	520	100	0	0	0.5
		0	100	18	0.8
		0	100	25	0.8
Post run : 5 min					
Blue & green	620	100	0	0	0.5
		60	40	10	0.5

* 0.025 M ammonium acetate containing 0.01 M TBA-Br : ACN : MeOH = 65 : 25 : 10

** 0.025 M ammonium acetate containing 0.01 M TBA-Br : ACN : MeOH = 40 : 50 : 10

씻은 후 0.1% 염산-메탄올 8 mL 및 1% 암모니아성 메탄올 2mL로 용출시킨 후 증류수로 정확히 10 mL로 맞추어 0.45 um filter로 여과하여 HPLC 시료용액으로 사용하였다.

HPLC 분석조건 및 컬럼 검토

컬럼은 carbon loading량 및 길이에 따라 XDB C₁₈ (3.5 um, 4.6×150 mm, HP), Zorbax ODS (3.5 um, 4.6×75 mm, HP), Nova-Pak C₁₈ (3.9 150 mm, Waters), XBridge C₁₈ (3.5 um, 3.0×100 mm, Waters) 등 4종의 역상컬럼을 사용하였다.

이동상의 유속은 컬럼에 따라 0.5~1.0 mL/min으로 다양하게 하였고 시료용액은 10 uL를 주입하였으며 HPLC/PDA로 각 색소의 동시 및 계통분석을 위한 최대흡수파장을 결정하였으며 선택된 파장에서의 각 색소 종류별 검출한계를 측정하였다. 이동상 용매는 A용매(0.025 M ammonium acetate containing 0.01 M TBA-Br : ACN : MeOH = 65 : 25 : 10) 와 B용매 (0.025 M ammonium acetate containing 0.01 M TBA-Br : ACN : MeOH = 40 : 50 : 10)를 제조하여 Table 2와 같이 A와 B용매의 조성을 진행시간별로 달리하는 구배용매조성법으로 하여 각 색소의 계통별 또는 혼합표준액을 동시분석하였다.

Nova-Pak C₁₈의 경우 동시분석시간이 40분 이상으로 길었고 R102의 검출이 용이하지 않았다. Zorbax ODS의 경우 모든 색소가 동시분석 가능하였으나 압력이 높게 걸리는 단점이 있었다. XBridge C₁₈의 경우 모든 색소가 양호하게 분리되더라도 동시분석의 경우 분석시간이 25분 이내로 단축되었으며 0.5 mL/min의 유속만으로도 압력이 안정되어 이동상용매의 낭비도 줄일 수 있어 본 컬럼을 실험에 사용하였다.

결 과

HPLC 분석조건

컬럼의 선택 : 컬럼 충전물의 크기와 내경, 길이가 다른 4종류의 역상컬럼을 사용한 결과 XDB C₁₈을 사용한 경우 시간이 다소 많이 걸리고 일부색소의 피크모양이 일정치 않았으며,

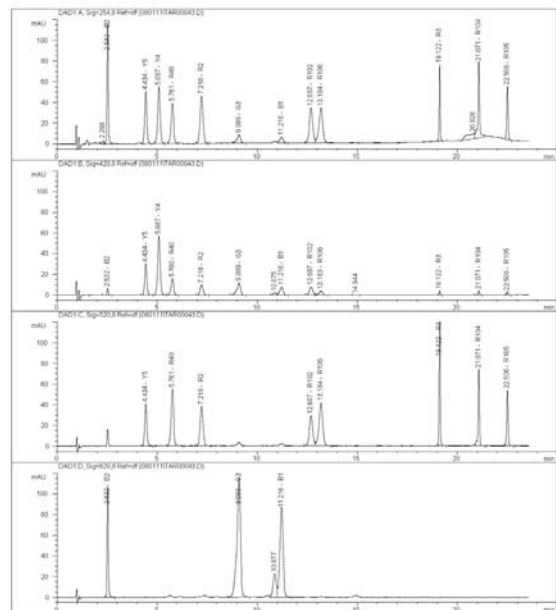


Fig. 1. HPLC chromatogram of the 12 mixed color standards by simultaneous analysis.

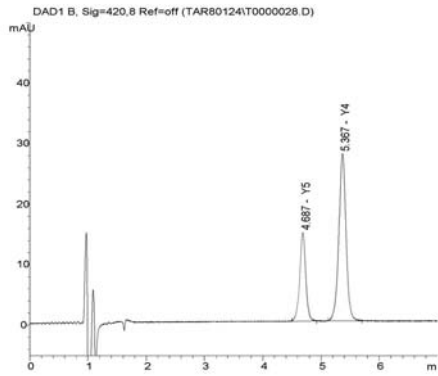


Fig. 2. HPLC chromatogram of yellow color standards.

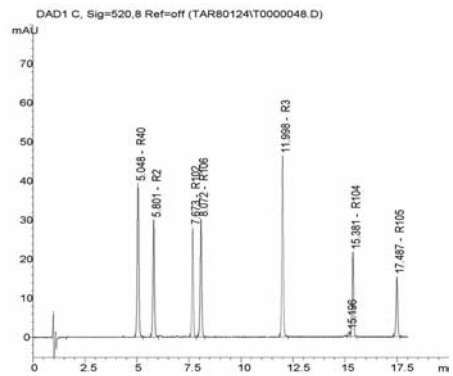


Fig. 3. HPLC chromatogram of red color standards.

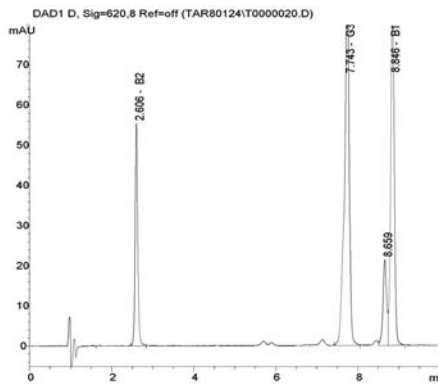


Fig. 4. HPLC chromatogram of blue and green color standards.

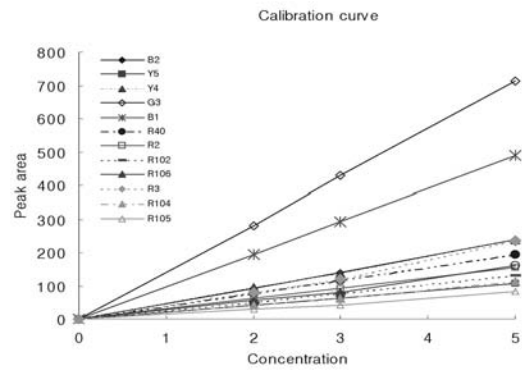


Fig. 5. Calibration curves of colors by HPLC

PDA검출기의 파장선택 : HPLC/PDA에 의한 색소표준용액의 검출 결과는 Fig. 1~4와 같이 계통별 색소 분석을 위한 파장은 황색 420 nm, 적색 520 nm, 청색·녹색 620 nm에서 가장 높은 흡광도를 보였으며 동시분석 시에는 전 색소가 다 검출되는 254 nm의 파장이 적합하였다. 청색·녹색계통의 경우에는 최대흡수 파장인 620 nm와 동시분석파장인 254 nm에서의 검출감도에 차이를 보였다.

검량선작성

계통별 색소표준액의 농도를 0.0, 2.0, 3.0, 5.0 µg/mL로 하여 각 파장별로 Fig. 5와 같이 검량선을 작성하였으며 색소표준용액의 농도변화에 따른 크로마토그램의 상관관계는 양호한 직선성($r > 0.999$)을 나타내었다. 또한 색소의 검출한계는 적색, 황색 및 청색·녹색계통에서 0.03 µg/g으로 나타났다.

회수율

분석대상 시료에 대한 회수율 시험 결과는 Table 3과 같이 평균회수율은 모사염색법 69.5%, 고체상추출법 86.6%였다. B2의 회수율은 모사염색법 54.3%, 고체상추출법 80.7%, R3의 회수율은 모사염색법 60.3%, 고체상추출법 80.8%로 상대적으로 낮게 나타났다.

유통 중인 시료로부터 색소함량 분석결과

유통 중인 축산식품 24종(소시지 4종, 햄 10종, 분쇄가공육 10종)을 대상으로 타르색소의 함량을 분석한 결과 모두에서 검출되지 않았다.

고찰

현재 식품첨가물중 타르색소는 식품공전상 9종의 색소가 허용되고 있으나 적색 제2호의 경우 쥐에서 임신율을 저하시키고 사산을 일으키는 등 배자독성을 유발하고, 황색 제5호는 2년간 장기 투여 시 일부 개에서 체중감소와 설사를 초래하였다는 보고가 있으며 황색 제4호는 어린이에게서 과민증을 유발하는 원인이 된다는 보고가 있는 등 안전성 논란이 계속되고 있다.^{8,17)}

식품 중 타르색소의 분석법은 식품공전상의 종이크로마토그래피법, TLC법 외에도 UV/VIS spectrophotometry 등의 방법이 보고되었으며 최근에는 HPLC를 이용한 분석방법이 많이 시도되고 있다. HPLC는 용매에 녹일 수 있는 거의 모든 시료에서 분석이 가능하며 화학 구조가 비슷한 많은 시료들을 동시에 분리할 수 있을 뿐만 아니라 최근에는 컬럼의 발달과

Table 3. Recovery rates of 12 tar colors by HPLC

Color type	Recovery rate (%)		Unit (%)
	A*	B**	
Y 5	67.8	82.1	
Y 4	72.9	83.4	
R 2	69.1	90.8	
R 3	60.3	80.8	
R40	75.1	83.9	
R102	75.3	88.4	
R104	70.1	87.4	
R105	69.3	92.3	
R106	67.1	94.1	
B 2	54.3	80.7	
B 1	76.1	87.9	
G 3	76.5	87.6	
Average	69.5	86.6	

* Official method

** Solid phase extraction method

다양한 검출기의 개발로 우수한 분리능, 분석시간 단축, 극미량까지의 검출한계, 결과의 재현성 등 여러 가지 장점을 가지고 있다^{18,19)}.

HPLC를 이용한 타르색소의 분석 시 일반적으로 순상컬럼을 사용할 경우 머무름시간이 길어지고 피크모양이나 분리능이 저하된다는 보고가 있어^{16,20)} 본 연구에서는 4종의 역상컬럼을 비교분석하였다. 그 결과 XDB C₁₈과 Nova-Pak C₁₈을 사용하였을 경우 동시분석시간이 다소 길었으며 Zorbax ODS의 경우 모든 색소가 동시분석 가능하였으나 압력이 높게 걸리는 단점이 있었다. XBridge C₁₈의 경우 12종 색소가 모두 양호하게 분리되면서도 동시분석의 경우 분석시간이 25분 이내로 단축되었으며 0.5 mL/min의 유속만으로도 안정된 압력이 걸리므로 이동상의 낭비도 줄일 수 있어 분석컬럼에 적합하다고 판단되었다.

PDA검출기의 파장을 조절하면서 최적의 검출 조건을 확립한 결과 계통별 검출파장은 황색 420 nm, 적색 520 nm, 청색·녹색 620 nm에서 가장 높은 흡광도를 보였으며, 동시분석에서는 254 nm에서 가장 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 향후 축산식품 중 타르색소의 정량검사는 이번에도 확립된 조건을 이용하여 동시분석한 다음 검출된 색소의 계통별 분석을 실시함으로써 시간 단축과 용매 절감은 물론 정확한 검사 결과를 얻을 수 있으리라 사료된다. 또한 색소의 검출한계는 적색, 황색 및 청색·녹색 계통에서 0.03 µg/g으로 나타나 김 등¹⁵⁾과 박 등¹⁶⁾의 연구에서 보고된 검출한계와 비슷하여 충분한 검출한계가 확보된 것으로 판단되지만 앞으로 더 나은 추출방법 등에 관한 연구가 이루어진다면 더 낮은 검출한계가 가능하리라 사료된다.

확립된 분석법을 기초로 하여 12종 색소의 회수율에 대한

모사염색법과 고체상추출법을 비교한 결과 모사염색법에 의한 평균 회수율은 69.5%, 고체상추출법을 이용한 경우는 86.6%로 고체상추출법을 이용한 회수율이 상대적으로 높고 전체적으로는 고른 회수율을 보여 고체상추출법이 적절한 전처리방법으로 판단된다. 본 연구에 있어서 B2와 R3의 경우 회수율이 다소 낮음을 보이는 것은 B2 색소는 100°C에서 5분 처리 시 거의 분해되므로 전처리 시 주의가 요구되며 R3와 R40의 경우 산성조건에서 광선에 약하다^{11,21)}는 연구 보고를 미루어 볼 때 이는 산이나 온도의 영향으로 분해되거나 지방 함량이 높은 햄이나 소시지 등의 시료에 재흡착되어 카트리지에서 용출이 완전하지 못한 결과라고 추측된다. 향후 회수율을 높이기 위해서는 각 색소별 특성을 고려하여 적절한 전처리 방법을 응용하여야 할 것으로 사료된다.

한편 유통 중인 검사 시료를 대상으로 분석한 결과 타르색소가 검출되지 않은 것은 ‘축산물가공품의 가공기준 및 성분규격’에서 소시지류를 제외한 모든 식육가공품에서 타르색소를 첨가하지 못하도록 규정 되어있어 제조과정에서 이 기준이 잘 지켜지고 있음을 확인할 수 있었지만 향후 축산식품의 안전성 확보를 위해서는 지속적인 검사가 필요하리라 사료된다.

결 론

본 연구에서는 HPLC를 이용하여 국내 허용타르색소 9종과 비허용타르색소 3종 등 총 12종의 전처리 방법, 동시분석 및 정량분석조건을 확립하고자 하였다. HPLC에 사용한 컬럼은 XBridge C₁₈으로 12종의 모든 색소가 25분 이내에 안정적으로 분리되었다. 자외선 검출기의 최적파장은 동시분석의 경우 254 nm, 계통분석은 황색계통 420 nm, 적색계통 520 nm

그리고 청색 및 녹색계통은 620 nm에서 가장 높은 흡광도를 보였다. 시료용액 조제방법으로 공전법인 모사염색법과 고체상 추출법을 이용하여 회수율을 비교한 결과 모사염색법은 69.5%, 고체상추출법을 이용한 경우는 86.6%로 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 검사 대상인 축산물가공품 시료 24종에서는 타르색소가 모두 검출되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Korea Food Additives Code, Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea(2004)
2. Moon, B.S., Sikpoomchumgamool, Soohaksa, Korea, pp134-149(1988)
3. Ministry of Health and Welfare, The Japanese Standards for Food Additives, 7th edition, Tokyo, Japan(1999)
4. National Archives and Records Administration, Code of Federal Regulations, Washington, DC, USA (1996)
5. HMSO. The Colours in Food Regulations, United Kingdom(1995)
6. FAO/WHO : Food Additives, 2nd edition, CODEX Alimentarius, pp159~196
7. Jo, Y.H., and Ham, T.S. "Safe use of coloring agent and administrative status of each country", *Food Technology*, 10, pp28-54(1997)
8. Yun, M.H., Kim, G.J., Kim, J.I., Hwang, S.I., Mun, S.K., Jung, E.J., and Kim, J.G. "Evaluation of tar dyes used in commercial foods", *J. Food Hyg. Safety*, 15, pp108-113(2000)
9. Lee, H.M and Rhee, C.O, Analysis of tar color content in children's favorite foods, *J. Food Preserv. vol. 12, No. 4*, pp355-360(2005)
10. Dean, B.J., Books, T.M., Hodson-Walker, G. and Huston, D.H. "Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals", *Mutation Reserch*, pp57-77(1985)
11. Park, S.K., Lee, T.S., and Park, S.K. "Method development for the sample preparation and quantitative analysis of synthetic colors in foods", *Korean J. Food Sci. Technol.* 36(6), pp893-899(2004)
12. AOAC. : Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 17th edition, Association of Official Analytical Communities, USA(2002)
13. Berzas Nevado, J.J. *et al.* "Resolution of ternary mixtures of tartrazine, sunset yellow and ponceau 4R by derivative spectrophotometric ratio spectrum-zero crossing method in commercial foods", *Talanta*, 46, pp933-942(1998)
14. Gennaro, M.C. *et al.* "Identification and determination of red dyes in confectionery by ion-interaction high performance liquid chromatography", *J. Chromatography*, 767, pp87-92(1997)
15. Kim, T.W. *et al.* "Optimization of simultaneous analysis and quantitative analysis of synthetic colors in foods by HPLC Method", *Rep. Inst. Health & Environ.* 17, pp40-46(2006)
16. Park, S.K., Hong, Y., Jung, Y.H., Lee, C.H., Yoon, H.J., Kim, S.H. and Lee, J.O. "Optimization of HPLC method and clean-up process for simultaneous and systematic analysis of synthetic color additives in foods", *Korean J. Food Sci. Technol.* 33(1), pp33-39(2001)
17. Han, S.T. *et al.* "Analysis of synthetic color additives in livestock processing products using HPLC", *The report of Chungbuk Livestock & Veterinary Research Institute*, pp81-86(2007)
18. Snyder, L. R. *Anal. Chem.*, 11, 412A(2000)
19. Kim, T.J, *et al.* "Gas and liquid chromatography and mass spectrometry", *Freedom Academy*, pp125-130(2007)
20. Saag, K. "HPLC in food analysis", *USA Academic Press*, pp259-275(1988)
21. Tsuji S, *et al.* "Preparation of sample solution using pronase treatment for determination of food coal tar dyes in foods", *J. Food Hyg. Soc., Japan*, 36, pp68-76(1995)
22. 국립수의과학검역원, 축산물의 가공기준 및 성분규격, 검역원고시 제 2007-20호, pp140-142(2007)