

## 식품 중 수단색소의 분석법에 관한 연구

김희연<sup>†</sup> · 윤혜정 · 최장덕 · 최우정 · 박선영 · 이경주 · 김지혜  
식품의약품안전청 식품첨가물과

### A Study for Analytical Method of Sudan Colorants in Foods

Hee-Yun Kim<sup>†</sup>, Hae-Jung Yoon, Jang-Duk Choi, Woo-Jeong Choi,  
Sun-Yong Park, Kyoung-Joo Lee and Ji-Hye Kim

Food Additives Division, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

#### Abstract

A simple, efficient and accurate method was developed for the simultaneous determination of non-permitted oil soluble colorants (sudan I, II, III and IV) in foods. The identification has been carried out for sudan colorants by TLC as well as HPLC with photodiode array (PDA) detection. Separation of sudan colorants was achieved within 20 min by a gradient elution with water and acetonitrile as eluents. Sudan colorants showed good linear relationships in the range of 0.1~100 µg/mL. The correlation coefficients of the calibration curve for sudan colorants exceeded 0.999. The detection limits (signal-to-noise ratio 3:1) for sudan I, II, III and IV were 0.01, 0.01, 0.02 and 0.02 µg/mL, respectively. This method has been successfully applied to the analysis of red pepper powder, *Kimchi* and *Kakdugi*, and the average recoveries for real samples ranged from 83.02% to 104.3%.

**Key words:** sudan colorant, HPLC-PDA, red pepper powder

#### 서 론

우리나라의 식생활 중 김치는 없어서는 안될 국민 다소비 식품으로서 장내 유해세균의 번식을 차단하며 정장작용을 하는 것으로 그 효능은 익히 알려져 있다. 김치 원료 중의 하나인 고춧가루의 맛은 일반적으로 매운맛과 단맛 및 다른 맛 성분과 혼합되어 나타나며 특히 환원당인 포도당과 과당은 단맛에 관여한다. 매운맛을 나타내는 성분인 캡사이신(capsaicin)을 함유하며 영양이 많고 식욕증진과 더위와 추위에 견디는 힘을 증진시킨다(1). 이 캡사이신은 체지방을 줄여 비만의 예방과 치료에 큰 도움이 되며 여러 가지 생물학적 활성 특히, 항노화성, 항돌연변이성, 그리고 항암성에 직접 관련이 있다고 보고되어 있다(2). 그 외에도 고춧가루의 붉은 색은 carotenoid계 성분으로 capsanthin(3,4)이 주종을 이루고 β-carotene, capsorubin등이 함유되어 있다(5). 비타민 A 활성이 있는 β-carotene은 호흡기 계통의 감염에 대한 저항력을 높이고 면역력을 증진시켜, 질병의 회복을 빠르게 하며 어두운 곳에서도 밝은 눈을 지니게 해준다.

최근 이러한 고춧가루에 공업용 색소인 수단(sudan) 1,4호가 착색되어 시중에 유통되었다는 국내의 언론 보도와 프랑스에서도 수입된 hot chili에서 수단 1호가 발견됨에 따라 고춧가루가 함유된 식품의 안전성에 대한 규명 및 식품의 품질

관리를 위한 분석법 확립이 요구되고 있는 실정이다. 수단색소는 동물실험결과에서 구토, 설사 및 위통 등이 생길 수 있으며 사람이 섭취하였을 경우 정확한 유해성은 의학적으로 규명되지 않아 전 세계적으로 식품첨가물로 허용되어 있지 않은 공업용 색소(6)로서 물에는 녹지 않고 메탄올, 아세톤 등 유기용매에 용해되는 용용성 색소로서 현행 식품공전(7), 식품의약품안전청연구보고서(8) 및 Lenk 등(9)에 의한 논문에는 TLC 확인시험법만이 수재되어 있으며 정량분석법에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 고춧가루, 김치, 깍두기 등 식품을 대상으로 수단 1호, 2호, 3호 및 4호의 색소에 대한 정성 및 정량분석법을 확립하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

본 실험에 사용한 고춧가루, 김치 및 깍두기는 서울지역에서 유통되고 있는 것을 구입하여 사용하였다.

##### 시약 및 기구

분석에 사용된 표준품 수단 1호, 2호, 3호 및 4호는 Aldrich 사(USA)에서 구입하였고 N,N-dimethyl formamide(DMF)는 Sigma 사(USA), isoamyl acetate 및 chloroform은 Merck

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: pmheekim@kFDA.go.kr  
Phone: 82-2-380-1669, Fax: 82-2-380-1359

사(Germany)의 시약을, 무수황산나트륨(sodium sulfate anhydrous)은 Wako 사(Japan)의 시약을 구입하여 사용하였다. 추출 및 분석에 사용한 methanol, acetonitrile 및 석유에테르는 HPLC 등급을 사용하였다. TLC plate는 Merck 사(Germany)의 silica gel과 Sigma-Aldrich 사(USA)의 C<sub>18</sub>-silica를 사용하였다.

#### 표준용액 조제

수단 1호, 2호, 3호 및 4호의 표준품을 정밀하게 달아 100 µg/mL의 농도가 되도록 acetonitrile용매에 녹여 혼합표준용액을 만들어 냉장고에 보관하였으며 필요시 적당한 농도로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

#### 박층크로마토그래피(TLC)를 이용한 정성분석

고춧가루, 김치 및 깍두기를 잘 분쇄한 다음 각각 3 g을 플라스크에 취하고 수단 혼합표준용액(100 µg/mL) 1 mL를 첨가한 후 석유에테르 100 mL를 가하여 때때로 흔들어 준 후 색소를 추출(10)하여 이 액 30 mL를 분액여두에 취하고 같은 양의 N,N-dimethylformamide를 가하여 추출(11-13)한 다음 층 분리가 되도록 정치하였다. 아래층의 N,N-dimethylformamide 용액을 분취하여 석유에테르 10 mL로 3회 씻은 후 석유에테르를 버리고 물 30 mL를 가하여 혼합하고 chloroform 10 mL를 가하여 흔들어 섞고 분리된 chloroform 용액을 물로 씻은 후 무수황산나트륨으로 탈수하고 40°C 이하의 수욕상에서 rotary evaporator를 사용하여 감압농축한 다음 시험용액으로 사용하였다. TLC plate는 C<sub>18</sub>-silica를, 전개용매는 methanol : water(95 : 5) 및 n-hexane : chloroform (6 : 4)을 사용하여 비교실험하였다.

#### 고속액체크로마토그래피를 이용한 정성 및 정량분석

고춧가루, 김치 및 깍두기를 잘 분쇄한 다음 각각 3 g씩을 취하여 수단 혼합표준용액(100 µg/mL) 1 mL를 첨가하고 약 24시간 후 이동상 100 mL로 정용하여 15분 동안 초음파 처리한 다음 이 추출액을 micro membrane filter(0.2 µm)로 여과하여 HPLC-PDA(Photo diode detector)분석에 시험용액으로 사용하였다. 시험용액 및 표준용액은 물과 acetonitrile을 사용하여 Table 1, 2의 조건에 따라 분석하였다.

#### pH의 영향

고춧가루 3 g을 취하여 10 µg/mL의 농도가 되도록 수단

**Table 2. High performance liquid chromatography gradient condition**

Time (min)	Flow (mL/min)	H <sub>2</sub> O (%)	CH <sub>3</sub> CN (%)
0.0	1.0	12.0	88.0
5.0	1.0	12.0	88.0
10.0	1.0	0	100.0
20.0	1.0	0	100.0

1호, 2호, 3호 및 4호 색소를 첨가한 후 acetonitrile 1 : 9 혼합용액을 사용하여 pH 2, pH 5, pH 7, pH 9 및 pH 11로 조정하여 100 mL로 정용한 다음 냉장고에 보관하였다. 24시간 및 72시간 후 15분 동안 초음파 처리한 다음 이 추출액을 micro membrane filter(0.2 µm)로 여과하여 HPLC-PDA 분석에 시험용액으로 사용하였다. 시험용액 및 표준용액은 물과 acetonitrile을 사용하여 Table 1, 2의 조건에 따라 분석하였다.

## 결과 및 고찰

#### 박층크로마토그래피에 의한 정성분석

Silica gel을 사용하여 n-hexane : chloroform (6 : 4)으로 전개하였을 때 각각의 색소를 판별하기는 양호하였으나 R<sub>f</sub> 값이 너무 낮은 결과 0.14~0.25를 보인 반면, C<sub>18</sub>-silica를 사용하여 methanol : water(95 : 5)으로 전개하였을 때 각각의 색소가 보다 더 명확히 분리되며 적당한 R<sub>f</sub> 값 0.27~0.59를 나타냈다(Fig. 1, Table 3).

#### 고속액체크로마토그래피에 의한 정성 및 정량분석

수단 1호, 2호, 3호 및 4호 성분 각각의 최대흡수파장은 476, 493, 507 및 520 nm이며 520 nm에서 HPLC-PDA를 이용하여 동시 분석한 크로마토그램을 나타내었다(Fig. 2). 분리한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 수단 1호(RT: 3.5), 수단 2호(RT: 7.0), 수단 3호(RT: 12.3) 및 수단 4호(RT: 15.6)으로 분리되었으며, 각각의 고유한 UV spectrum으로 일치여부를 확인하였다.

#### 검량선 및 검출한계

수단 1호, 2호, 3호 및 4호의 혼합표준용액 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL을 HPLC-PDA에 주입하여 농도변화에 따른 흡광도에 대한 검량선을 작성한 결과, 넓은 농도범위에서 양호한 직선성(r = 0.9991~0.9999)을 보여주었다(Fig. 3). 또한,

**Table 1. Analytical conditions of HPLC for simultaneous measurement of sudan colorants**

Analytical conditions of HPLC	
Model	High performance liquid chromatograph (Waters HPLC System)
Column	Symmetry C <sub>18</sub> (150×3.0 mm, 5 µm)
Mobile phase	A = H <sub>2</sub> O, B = CH <sub>3</sub> CN, Gradient
Detector	PDA (Waters 996)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	30 µL

1

2

3

4

**Fig. 1. Chromatogram of sudan I, II, III and IV by TLC.** 1 = sudan I, 2 = sudan II, 3 = sudan III, 4 = sudan IV. TLC plate: C<sub>18</sub>-silica, Solvent: methanol · water (95 : 5).

Table 3. R<sub>f</sub> value of sudan colorants by TLC plate and solvents

Colorant	Silica gel	Solvent	C <sub>18</sub> -silica	Solvent
Sudan I	0.25	n-hexane : chloroform (6 : 4)	0.59	methanol : water (95 : 5)
Sudan II	0.17		0.43	
Sudan III	0.17		0.42	
Sudan IV	0.14		0.27	

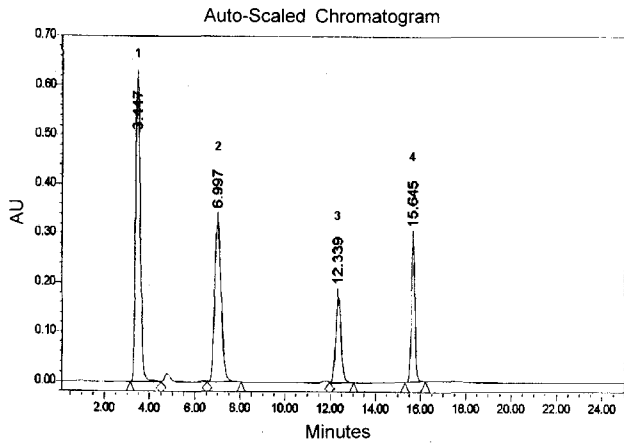


Fig. 2. Chromatogram of sudan I, II, III and IV by HPLC-PDA.

Peak: 1 = sudan I, 2 = sudan II, 3 = sudan III, 4 = sudan IV.

각각의 검출한계(S/N=3)를 측정된 결과는 0.01, 0.01, 0.02 및 0.02 µg/mL이었으며 비교적 낮은 검출한계를 나타내었다.

pH의 영향

젓산 등의 생성에 의해 김치가 숙성되면 pH가 변할 것으로 판단하여 이에 대한 영향을 알아보았다. 수단 1호, 2호, 3호 및 4호 색소를 첨가하여 24시간과 72시간 후 pH에 대한 영향을 측정된 결과, pH에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다 (Table 4). 이러한 결과는 수단 1호, 2호, 3호 및 4호가 유용성 색소로서 불과 반응성이 낮아 pH에 영향을 거의 받지 않기

Table 4. Effects of pH on sudan colorant contents

Time	pH	Result (mg/mL)			
		I	II	III	IV
24 hr	pH 2	9.73±0.31	9.38±0.25	8.86±0.16	8.54±0.22
	pH 5	9.52±0.09	9.67±0.29	8.60±0.14	8.76±0.30
	pH 7	9.81±0.27	9.53±0.15	8.72±0.28	8.69±0.18
	pH 9	9.66±0.20	9.64±0.32	8.61±0.17	8.59±0.24
	pH 11	9.68±0.18	9.37±0.18	8.77±0.23	8.47±0.19
72 hr	pH 2	9.69±0.26	9.43±0.23	8.72±0.24	8.56±0.21
	pH 5	9.54±0.14	9.66±0.34	8.58±0.22	8.73±0.08
	pH 7	9.76±0.30	9.56±0.28	8.75±0.31	8.74±0.25
	pH 9	9.70±0.25	9.59±0.21	8.62±0.19	8.57±0.18
	pH 11	9.67±0.28	9.41±0.24	8.71±0.17	8.52±0.23

Table 5. Recoveries of sudan I, II, III and IV in red pepper powder, Kimchi and Kakdugi by HPLC

Sample	Recovery (%)			
	I	II	III	IV
Red pepper powder	96.95±1.19	94.80±2.47	86.52±1.32	85.84±2.37
Kimchi	93.32±1.19	86.24±0.67	101.82±1.26	104.30±0.95
Kakdugi	99.93±2.53	86.58±1.81	84.37±1.01	83.02±1.97

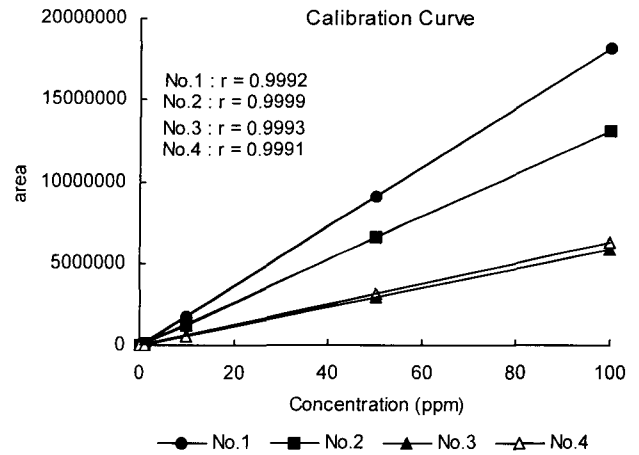


Fig. 3. Calibration curve of sudan I, II, III and IV by HPLC-PDA.

No. 1 = sudan I, No. 2 = sudan II, No. 3 = sudan III, No. 4 = sudan IV.

때문인 것으로 사료된다.

대상식품에서의 회수율

회수율을 측정하기 위하여 분쇄한 고춧가루, 김치 및 깍두기 각각 3 g씩을 취하여 각각 50 µg/mL의 농도로 수단 1호, 2호, 3호 및 4호 색소를 첨가한 후 3회 반복한 결과를 Table 5에 나타내었으며, 고춧가루에서는 85.84~96.95%, 김치에서는 86.24~104.30%, 깍두기에서는 83.02~99.93%의 각각의 양호한 결과를 얻었다.

## 요 약

본 연구는 식품 중 식품에 사용이 불가한 수단 1호, 2호, 3호 및 4호 등 4종의 유용성색소에 대한 안전성 확보 및 효율적 품질관리를 위해 박층크로마토그래피(TLC)와 고속액체 크로마토그래피(HPLC-PDA)를 이용한 정성, 정량분석법을 확립하고자 수행하였다. C<sub>18</sub>-silica를 사용하여 methanol : water(95:5)으로 전개하였을 때 수단색소들의 R<sub>f</sub> 값은 0.27~0.59로 산출되었다. HPLC-PDA를 이용하여 water와 acetonitrile 용매를 사용하여 분석한 결과 20분내에 모두 분리되었으며 검량선의 농도 범위는 0.1~100.0 µg/mL으로 나타났다. 본 연구에서 고춧가루, 김치 및 깍두기 등 식품을 대상으로 적용한 결과, 회수율은 고춧가루에서는 85.84~96.95%, 김치에서는 86.24~104.30%, 깍두기에서는 83.02~99.93%의 양호한 결과를 얻었으며, 검출한계는 수단 1호 및 2호는 0.01 µg/mL, 수단3호 및 4호는 0.02 µg/mL으로 나타났다.

## 문 헌

1. Son SM, Lee JH, Oh MS. 1995. A comparative study of nutrients and taste components in Korean and imported red peppers. *Korean J Nutrition* 28: 53-60.
2. Jung SJ, Kim GE, Kim SH. 2001. The changes of ascorbic acid and chlorophylls content in *Gochu-jangachi* during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 814-818.
3. Korea Foods Industry Association. 1974. *Food and Additives Standard*. p 25.
4. Nagle BJ, Burns EE. 1979. Color evaluation of selected Capsicum. *J Food Sci* 44: 416-418.
5. Song YO, Bin SM, Moon JW. 1996. A study on the standardization of *Kimchi* for the children. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 893-898.
6. World Health Organization. 1995. *International agency for research on cancer (IARC)*. 8: 225.
7. Korea Food & Drug Administration. 2002. *Food Law*. p 60-61.
8. Kim HY, Hong KH, Lee CH, Park SK. 2000. Study for intake of food additives in food by total diet. *The Annual Report of KFDA* 4: 119-128.
9. Lenk HP, Gruber H. 1969. Tube-chromatographie auf selbstgefertigten achichten II. Prufung der beschichteten tubes. *J Chromatography A* 43: 355-360.
10. Lee HD, Kim MH, Lee CH. 1992. Relationships between the taste components and sensory preference of korean red peppers. *Korean J Food Sci Technol* 24: 266-271.
11. Hawer WS, Ha J, Hwang J, Nam Y. 1994. Effective separation and quantitative analysis of major heat principles in red pepper by capillary gas chromatography. *Food Chem* 49: 99-103.
12. Kim RK. 1992. Vitamin A content measurement of red pepper and red processing product by HPLC. *MS Thesis*. Korea National University of Education.
13. Bai KW, 1984. Studies on the quality of Korean red peppers. *PhD Dissertation*. Hanyang University.

(2003년 8월 30일 접수; 2004년 2월 2일 채택)