

# 이온쌍-고성능 액체크로마토그래피에 의한 감기약 시럽에서 타르색소 첨가물의 동시분석

김경옥<sup>1</sup> · 황 호 · 이범규<sup>2</sup> · 이원재\*

조선대학교 약학과, <sup>1</sup>Zhejiang Apelo Jaiyuan 제약회사, <sup>2</sup>조선대학교 화학과

## Simultaneous Determination of Tar Color Additives in Cold Syrups by Ion Pair-high Performance Liquid Chromatography

Jing Yu Jin<sup>1</sup>, Hu Huang, Beom-Gyu Lee<sup>2</sup>, and Wonjae Lee\*

College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea

<sup>1</sup>Zhejiang Apelo Jaiyuan Pharmaceutical Co. Ltd., Hengdian Industrial Zone, Dongyang Zhejiang, 322118, China

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea

**Abstract** A simple and efficient analytical method for the simultaneous determination of seven tar color additives was developed using ion pair high performance liquid chromatography. The conditions for HPLC analysis were as follows: column,  $\mu$ -Bondapak C18 (10  $\mu$ m, 300  $\times$  3.9 mm i.d.); gradient mobile phase, 0.025 mol/L ammonium acetate (containing 0.01 mol/L tetrabutylammonium bromide)-acetonitrile-methanol (65 : 25 : 10) as a mobile for fraction A and 0.025 mol/L ammonium acetate (containing 0.01 mol/L tetrabutylammonium bromide)-acetonitrile-methanol (40 : 50 : 10) as a mobile for fraction B; flow rate, 1.0 mL/min; detection wavelength, 254/520/620 nm. We could attain to the detection limits as 0.01-0.05  $\mu$ g/mL (254 nm) and 0.005-0.01  $\mu$ g/mL (520 nm) for six red tar color additives, and 0.05  $\mu$ g/mL (254 nm) and 0.002  $\mu$ g/mL (620 nm) for Fast green FCF. This analytical method was applicable to determine the tar color additives contained in several commercial cold syrups.

**Keywords:** Tar color additives, ion-pair high performance liquid chromatography, simultaneous determination, cold syrups

### 서 론

타르색소는 석탄의 타르 중에 함유된 benzene ring이나 naphthalene ring을 함유한 organic synthetic coloring agent로 착색제로 많이 사용하고 있다 [1,2]. 이들 타르색소는 국가별로 각각 허용과 규제, 사용범위가 다르며 식품, 의약품, 화장품 등의 착색을 위한 첨가제로 사용되고 있다 [3-6]. 이들 타르색소에 대한 분석법으로 UV, HPLC, CE 등을 이용한 여러 가지 방법들이 나와 있지만 편리성, 범용성, 분리

능 등의 측면에서 HPLC를 이용한 분석방법이 가장 효과적으로 이용되고 있다 [7-15]. 식품 첨가제로 사용된 여러 식용 타르색소의 분석을 위해 고체상 추출법을 이용하여 전처리를 거친 후 HPLC를 사용하여 효과적인 분석을 한 결과가 대부분이며 [8-13] 유기용매로 추출한 후에 분광학적인 방법으로 측정하거나 [14], 고체상으로 처리한 후에 모세관 전기영동법 (CE)을 사용하여 분석한 결과도 보고되었다 [15]. 그러나 이제까지 첨가제로 사용한 타르색소의 정성 및 정량 분석에 대한 연구 결과는 식품에 첨가된 경우의 연구로만 국한되었으며 의약품에 함유된 다른 타르색소의 검출 및 함량분석은 보고된 바가 없다 [8-15]. 그러므로 본 연구에서는 식품에서는 사용되지 않았던 타르색소들까지 포함해서 앞선 연구에서 사용한 이온쌍 (ion-pair) HPLC 방법을 응용

### \*Corresponding author

Tel: +82-62-230-6376, Fax: +82-82-62-222-5414

e-mail: wlee@chosun.ac.kr

하여 의약품의 첨가제로 사용한 타르색소들을 분석하고자 시도하였다 [11,12]. 특히 본 연구에서는 감기약 시럽에서 의약품의 첨가제로 사용되는 타르색소 검출과 함량 분석을 위한 간편하고 효과적인 분석법을 개발하고자 하였다. 이를 위해 여러 타르색소 검출을 위한 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)의 동시분석법을 개발하여 이 분석법을 실제 시판하는 감기약 시럽 속에 함유된 타르색소의 검출분석 및 함량 분석을 위해 응용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

액체크로마토그래피 실험은 다음의 기기들로 구성된 HPLC를 사용하여 상온에서 수행하였다. HP Model-1100 Series (Agilent Technologies)로 HP1100 Series quaternary pump, HP1100 Series auto-sampler, HP1100 Series Diode Array detector와 Luminescence Spectrometer LS-55 (PerkinElmer)를 사용하였다. Methanol과 acetonitrile은 J. T. Baker사의 HPLC급을, n-tetrabutylammonium bromide (TBA-Br), ammonium acetate는 Sigma-Aldrich사의 제품을 사용하였다. Allura Red AC (R40)는 Aldrich, Rhodamine B (R213)는 Sigma, Rose Bengal (R105)는 Aldrich, Phloxine B (R104)는 Aldrich, Eosin Y disodium salt (R103)는 Sigma, Lake Red CBA (R204)는 일본 동경화성공업주식회사, Fast green FCF (G3)는 Aldrich에서 구매하였고, 시판하고 있는 감기약 시럽들은 시중 약국에서 구입하여 실험하였다. Table 1에 본 연구에서 사용한 여러 타르색소 명칭에 대한 것을 비교하여 나타내었다.

### HPLC 측정조건

정지상으로는 Waters사의  $\mu$ -Bondapak C18 (10  $\mu$ m, 300  $\times$  3.9 mm i.d, Waters, USA) 컬럼을 사용하였다. 이동상 0.025 mol/L ammonium acetate 수용액에 이온쌍을 형성시키는 물질로 0.01 mol/L TBA-Br을 사용하였으며, acetonitrile, methanol을 65 : 25 : 10 (이동상 A 용액)과 40 : 50 : 10 (이동상 B 용액)의 비율로 혼합한 두 가지 조성의 용매를 사용하여 gradient mode로 분석하였다. 이동상의 유속을

1.0 mL/min으로 하여 시료를 20  $\mu$ L 주입하였으며, 검출기의 파장과 이동상의 gradient 조건 (A : B = 100 : 0/2 min, 100 : 0  $\rightarrow$  0 : 100/17 min, 0 : 100/30 min)에서 분리하였다.

### 표준용액의 제조

저장 (stock)용액: 적색 계통 (R40, R213, R105, R104, R103, R204)과 녹색 계통 (G3)을 3차 증류수에 용해시켜 1 mg/mL의 표준 저장용액을 조제한다.

표준용액: 표준 저장용액을 각각 2  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 40  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 400  $\mu$ L, 600  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L을 취하여 증류수로 희석하여 20 mL 되도록 조제하여 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50  $\mu$ g/mL 농도의 표준용액을 조제한다. Lake Red CBA (R204)는 물에 잘 녹지 않아, 직접 30  $\mu$ g/mL 농도의 표준용액을 조제하여 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30  $\mu$ g/mL 농도의 표준용액을 조제하였다.

### Assay validation

본 분석법의 intra-day와 inter-day 정확도와 정밀도 실험을 위해 Allura Red AC (R40)의 6개의 시료농도 (2, 5, 10, 20, 30, 50  $\mu$ g/mL)에 대해 각각 6회씩 측정하여 얻어진 표준 편차 값을 비교하였다.

### 시료 전처리

시판하는 감기약 시럽 시료를 일회용 주사기에 결합시킨 PTFE 0.45  $\mu$ m hydrophilic disposable syringe filter (Advanted, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan)를 사용하여 여과한 후 측정하였다.

## 결과 및 고찰

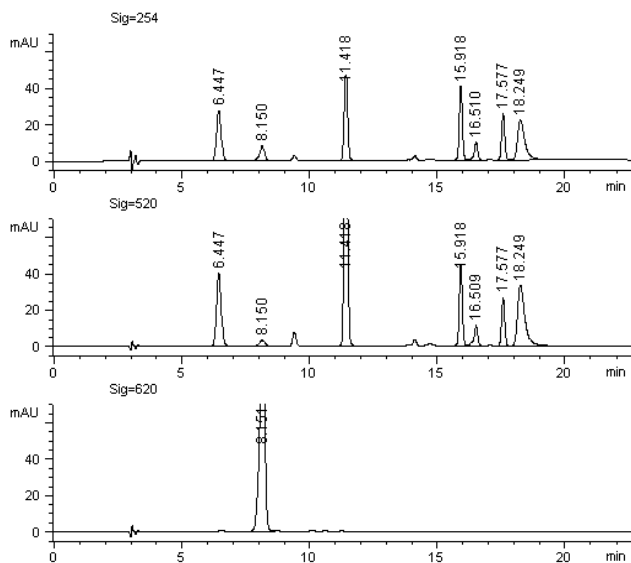
### 컬럼의 선택

분리용 컬럼으로는  $\mu$ -Bondapak C18 (10  $\mu$ m, 300  $\times$  3.9 mm i.d, Waters, USA), Capcell Pak C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm i.d, Shiseido Fine chemicals, Japan), Capcell Pak C18 (5  $\mu$ m, 150  $\times$  4.6 mm i.d, Shiseido Fine chemicals, Japan), Agilent

**Table 1.** The specification of synthetic tar color additives used in this study [3-7]

Tar color additives	Common name	FDA name	Color index number	Color index name	Other common name
R40	Allura Red AC	FD&C Red No.40	16035	Food Red 40	Food Red 17
R103	Eosin Y disodium salt	D&C Red No.22	45380	Acid Red 87	Eosin Yellow
R104	Phloxine B	D&C Red No.28	45410	Acid Red 92	Eosin 10B
R105	Rose Bengal	-	45440	Acid Red 94	Rose Bengal Extra
R204	Lake Red CBA	D&C Red No.9	15585	Pig. Red 53 (Ba)	-
R213	Rhodamine B	D&C Red No.19	45170	Basic Violet 10	Brilliant Pink B
G3	Fast green FCF	FD&C Green No.3	42053	Food Green 3	-

C18 (10  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6 mm i.d, Agilent, USA), Symmetry C18 (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4.6 mm i.d, Waters, USA) 등의 여러 역상 컬럼들을 비교 검토하였다. Capcell Pak과 Agilent 컬럼의 경우, R40과 G3가 잘 분리되지 않았으며 Symmetry C18의 경우, 타르색소와 실제 시료의 불순물의 겹치는 피크로 인해 사용할 수 없었다. 앞선 연구에서  $\mu$ -Bondapak C18의 경우 식용 타르색소 분리분석으로는 적당하지 않은 것으로 보고되었고 Capcell Pak C18의 경우에는 식용 타르색소 종류에 따라 이들의 분리분석으로 적절한 것으로 보고되었지만 [11-13], 본 연구에서 의약품에 첨가하는 여러 타르색소들의 정성과 정량분석을 위한 최적의 컬럼으로  $\mu$ -Bondapak C18을 선택하여 최적의 분석조건을 얻도록 조절하였다. 또한 사용한 컬럼에 따라 타르색소의 용리 순서 (elution order)가 동일하지 않고 약간씩 다르게 나타났는데,  $\mu$ -Bondapak C18 컬럼을 사용하여 7개 합성 타르색소를 분석한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 7개 타르색소의 혼합용액은 위의 분석조건에서 20분 이내의 용리시간에 R40, G3, R103, R104, R204, R105, R213의 순서대로 용리된 분석결과를 보여주었다.



**Fig. 1.** HPLC chromatograms of the 7 mixed synthetic tar color additives standards in 3 different wavelength detection (top: 254nm, middle: 520nm, bottom: 620nm). Elution order of tar color additives: R40,  $t = 6.447$ ; G3,  $t = 8.151$ ; R103,  $t = 11.418$ ; R104,  $t = 15.918$ ; R204,  $t = 16.510$ ; R105,  $t = 17.577$ ; R213,  $t = 18.249$ .

## 파장의 선택

각 타르색소마다 UV-VIS 최대 흡수파장이 각각 다르나 적색과 녹색 타르색소의 분석을 위한 색소별 계통분석 (systematic analysis)의 검출과장으로 각각 520 nm 및 620 nm를 사용하였으며, 광범위한 여러 가지의 타르색소 검출을 위한 동시분석을 위해서는 모든 색소가 비교적 높은 흡광도를 보인 파장인 254 nm를 검출과장으로 사용하였다. 이렇게

하여 Fig. 1에 나타난 용리 순서는 R40,  $t = 6.447$ ; G3,  $t = 8.151$ ; R103,  $t = 11.418$ ; R104,  $t = 15.918$ ; R204,  $t = 16.510$ ; R105,  $t = 17.577$ ; R213,  $t = 18.249$ 의 머무름 시간을 보여 주고 있다. 여러가지 타르색소들의 동시분석은 254 nm 검출과장에서 검출하므로 색소의 검출 감도가 떨어지는 점과 254 nm에서 흡광도를 나타내는 물질의 경우 다른 색소의 검출을 방해하는 matrix effect의 단점이 있으나, 혼합된 타르색소를 동시에 모두 분리할 수 있다는 장점이 있다. 반면 색소별 계통분석은 색소별 최대 흡수과장에서 검출하므로 검출 감도가 동시분석에 비해 더욱 좋고 다른 계통의 색소는 거의 검출되지 않아, 정성 및 정량분석이 용이한 매우 좋은 장점이 있다.

## 이동상의 조성이 분리능에 미치는 영향

용매의 조성 and 이온쌍 시약 및 염의 농도가 분리능에 미치는 영향을 검토하였다. 실험에서 분석한 타르색소는 일반적으로  $\text{R-SO}_3^-$  (sulfonyl group)이나  $\text{R-COO}^-$  (carboxyl group)을 가진 이온성 물질이므로 역상 컬럼에서의 선택적 분리를 위해서 이온쌍 (ion-pair) 시약을 사용하여 분석시료가 비극성 이온쌍을 형성하게 함으로 머무름 시간을 지연시킬 필요가 있다 [10]. 일반적으로 이온쌍 HPLC법은 완충용액을 사용하여 pH를 조정하여 이온억제법을 적용하기 곤란한 강한 이온성 화합물에 대해 주로 이용되는데 [11-13], 본 실험에서도 이온쌍 시약으로 TBA-Br 사용하여 농도에 따른 변화를 관찰하였다. Fig. 2와 Fig. 3은 TBA-Br 농도와 초산암모늄 농도에 따른 타르색소들의 용량인자 (capacity factor,  $k'$ )에 미치는 실험결과를 각각 보여주고 있다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 TBA-Br의 농도가 높아질수록 비극성 이온쌍이 증가되기 때문에 C18의 비극성 컬럼에서 색소들의 용량인자 (capacity factor) 값이 R213 색소를 제외하고는 모두 증가하는 경향을 보여주고 있다. R213 색소는 다른 타르색소들과 달리  $\text{R-SO}_3^-$  (sulfonyl group)이나  $\text{R-COO}^-$  (carboxyl group) 그룹을 가지고 있지 않는 4차 ammonium salt 형태의 화합물이므로 용량인자 값이 약간씩 감소되는 실험결과를 보여주고 있다. TBA-Br 농도에 따라 여러 타르색소들의 머무름 시간과 함께 분리능에 상당한 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.005~0.015 mol/L TBA-Br 농도 범위에서는 실험한 타르색소들의 용리순서의 변동은 없는 것으로 관찰되었으나, 0.015 mol/L 이상의 농도에서 용리순서에 변화도 일부는 일어날 수가 있으므로 TBA-Br 농도를 높게 사용하는 경우에는 이를 확인하여야 한다. 또한 Fig. 3에서 보는 바와 같이 이동상에 첨가되는 초산암모늄의 농도에 따른 용량인자 값들을 비교한 결과 초산암모늄의 농도가 증가한다 할지라도 대체적으로 큰 변화가 없이 거의 일정한 값을 보여주고 있다. 물론 R105의 경우 0.025 mol/L 근처에서 약간의 변화가 나타났지만, 반복 실험으로 확인한 결과 용리되는 색소들의 순서에는 영향을 주지 않았다. 앞에서의 이러한 실험결과를 기초로 하여

**Table 2.** Regression equations, correlation coefficients, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) for tar color additives

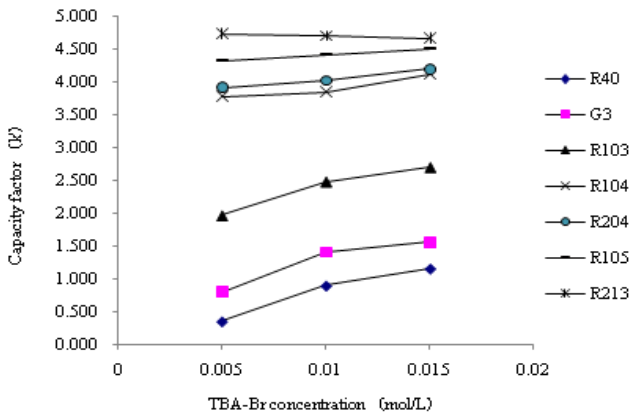
Tar color additives	Detection at 254 nm			
	Regression equation	Correlation coefficient	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Allura Red AC (R40)	Y = 36.695X + 0.783	0.998	0.01	0.04
Fast green FCF (G3)	Y = 10.584X - 0.085	0.998	0.05	0.1
Eosin Y disodium salt (R103)	Y = 47.804X - 15.525	0.997	0.01	0.04
Phloxine B (R104)	Y = 41.955X - 9.615	0.996	0.01	0.04
Lake Red CBA (R204)	Y = 11.935X + 0.097	0.998	0.05	0.1
Rose Bengal (R105)	Y = 30.280X + 1.279	0.996	0.01	0.04
Rhodamine B (R213)	Y = 61.158X - 30.880	0.995	0.01	0.05

Tar color additives	Detection at 520 nm			
	Regression equation	Correlation coefficient	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Allura Red AC (R40)	Y = 51.703X - 10.881	0.998	0.005	0.02
Fast green FCF (G3)	Y = 152.927X + 8.865 <sup>1)</sup>	0.998 <sup>1)</sup>	0.002 <sup>1)</sup>	0.01 <sup>1)</sup>
Eosin Y disodium salt (R103)	Y = 125.340X - 11.278	0.996	0.005	0.02
Phloxine B (R104)	Y = 42.122X + 0.716	0.995	0.005	0.02
Lake Red CBA (R204)	Y = 13.496X + 0.877	0.998	0.01	0.05
Rose Bengal (R105)	Y = 31.336X - 6.704	0.996	0.01	0.05
Rhodamine B (R213)	Y = 93.305X - 65.264	0.996	0.005	0.02

<sup>1)</sup>: Wavelength at 620 nm.

이동상으로 0.01 mol/L TBA-Br을 함유한 0.025 mol/L 초산 암모늄이 혼합된 조성의 용매를 사용하여 gradient mode로 분석하였다. µ-Bondapak C18 컬럼을 사용한 HPLC 분석조건으로 7개 합성 타르색소를 분리한 결과 Fig. 1에서 얻어진 것과 같은 좋은 분석결과를 보여주고 있으므로, 이들의 결과를 미지 농도 용액의 정량에 활용할 수 있음을 확인하였다.

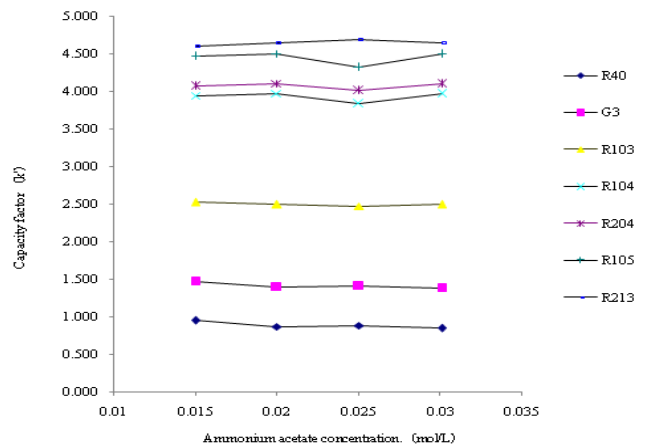


**Fig. 2.** Effect of TBA-Br concentration on the column capacity factor (*k'*) for tar color additives.

**검출한계 및 정량한계**

각각 타르색소 표준용액을 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 µg/mL 농도로 (Lake Red CBA는 0.05~30 µg/mL) 조제하고 각각 20 µL를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램의 표준 검량선을 작성했을 때 검출과장 254 nm, 520 nm, 620 nm에서 우수한 직선성 ( $r^2 = 0.995\sim 0.998$ )을 나타내었다. 또한 검출한계를 측정하고자 직선적 영역을 갖는 더 낮

은 농도까지 사용하여 얻은 검정선으로 7가지 타르색소의 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)는 ICH의 Q2B 가이드라인에서 제시하는 방법으로 구하였다 [16]. Table 2에서 보여 주는 바와 같이 6개의 적색 타르색소의 검출한계는 254 nm에서 0.01~0.05 µg/mL, 520 nm에서 0.005~0.01 µg/mL을 나타내어 520 nm에서 더 좋은 검출한계를 보여주었다. 또한 Fast green FCF (G3)의 검출한계는 254 nm에서 0.05 µg/mL, 620 nm에서 0.002 µg/mL를 나타내었다.



**Fig. 3.** Effect of ammonium acetate concentration on the column capacity factor (*k'*) for tar color additives.

**시판 감기약 시럽 약물 중 타르색소 검출 및 함량 측정**

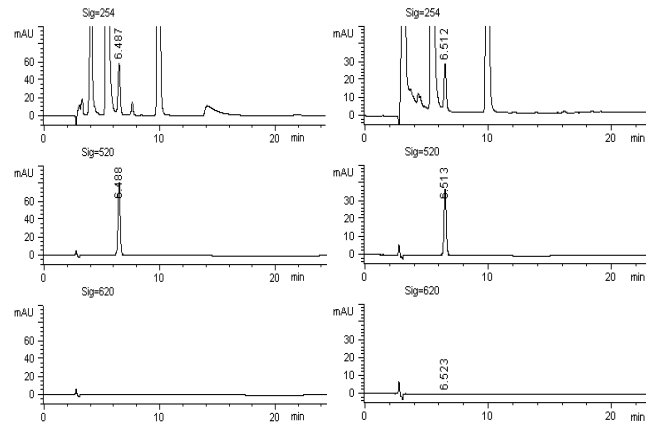
시중에서 판매하고 있는 4가지 감기약 시럽 약물 (A~D)을 구입하여 시럽 속에 포함된 타르색소를 정성, 정량 분석하였다. 각각의 시럽 약물을 0.45 µm disk-filter로 여과한 후

**Table 3.** Determined concentrations of R40 (Allura Red AC) in 4 commercial cold syrups

Cold syrups	Mean( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD	
	Detection at 254 nm	Detection at 520 nm
A	9.94 $\pm$ 0.44	9.08 $\pm$ 0.07
B	42.78 $\pm$ 0.40	42.06 $\pm$ 0.17
C	19.96 $\pm$ 0.77	18.65 $\pm$ 0.44
D	20.96 $\pm$ 0.33	20.82 $\pm$ 0.12

20  $\mu\text{L}$ 씩 직접 주입하여 검출 파장 254 nm, 520 nm, 620 nm에서 동시 검출하면서 분리 분석한 결과, 여러 타르색소 가운데 R40 만이 검출되었다. 또한 각 시료에서 분석하여 얻은 R40 타르색소의 농도는 Table 3에 나타난 것과 같이 검출파장 254 nm 검출조건에서 R40 타르색소가 A시료 9.94  $\mu\text{g/mL}$ , B시료 42.78  $\mu\text{g/mL}$ , C시료 19.96  $\mu\text{g/mL}$ , D시료 20.96  $\mu\text{g/mL}$ 으로 각각 측정되었다. 검출파장 520 nm 검출조건에서는 R40 타르색소가 A시료 9.08  $\mu\text{g/mL}$ , B시료 42.06  $\mu\text{g/mL}$ , C시료 18.65  $\mu\text{g/mL}$ , D시료 20.82  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었다. Fig. 4는 시판중인 4개 시럽 약물 중에서 얻은 대표적인 크로마토그램을 보여주고 있다. 타르색소가 포함된 실제 시럽 약물 대상으로 검출 파장 254 nm, 520 nm, 620 nm에서 동시 검출이 가능하도록 실험했을 때 검출한계가 검출 파장 254 nm보다 520 nm (또는 620 nm)에서 2~5배정도 더 낮아 520 nm (또는 620 nm)에서의 분석감도가 더 우수하다. 또한 일반 검출파장 254 nm에서는 다른 피크의 영향으로 인한 matrix effect가 일부 있으나 검출파장 520 nm (또는 620 nm)에서는 타르색소 이외에 다른 물질은 검출되지 않아 matrix effect에서 자유로운 매우 좋은 장점을 가지고 있다. 실제 본 실험에서 시럽 약물의 정량분석시, 520 nm 검출파장 조건에서 다른 계통의 색소는 거의 검출되지 않고 유일하게 R40 피크

만이 나타나므로 분리분석이 매우 용이한 장점을 보여주고 있다. Table 3에서 보여주는 것과 같이 520 nm 검출파장에서의 표준편차 값이 254 nm 검출파장에서의 것보다 작은 이를 증명해준다.



**Fig. 4.** Typical chromatograms of B (left) and C (right) in commercial cold syrups. See experimental conditions for chromatographic conditions under 3 detection wavelengths (top: 254 nm, middle: 520 nm, bottom: 620 nm).

**분석법 validation**

정량에 사용한 분석법의 validation을 위해 intra-day와 inter-day precision을 측정하였는데, Allura Red AC (R40)의 6개의 시료농도 (2, 5, 10, 20, 30, 50  $\mu\text{g/mL}$ )에 대해 각각 6회씩 측정하여 얻어진 표준편차 값으로 비교하였다 (Table 4, 5). 실험결과 R40의 intra-day의 정확도를 반영하는 상대오차 (relative error, RE)는 254 nm와 520 nm 검출

**Table 4.** Intra-day relative error and relative standard deviation of R40 (Allura Red AC) at detection wavelength 254 nm and 520 nm

Concentration of R40 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Detection at 254 nm			Detection at 520 nm		
	Mean ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD	RE (%)	RSD (%)	Mean ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD	RE (%)	RSD (%)
2	1.98 $\pm$ 0.02	-1.11	0.94	2.00 $\pm$ 0.031	-0.02	1.53
5	4.89 $\pm$ 0.13	-2.23	2.75	4.89 $\pm$ 0.23	-2.29	4.67
10	9.97 $\pm$ 0.07	-0.34	0.76	9.93 $\pm$ 0.08	-0.74	0.80
20	19.79 $\pm$ 0.42	-1.03	2.13	19.66 $\pm$ 0.52	-1.72	2.66
30	30.76 $\pm$ 0.43	2.53	1.39	30.80 $\pm$ 0.40	2.67	1.30
50	51.04 $\pm$ 1.88	-2.08	3.69	50.21 $\pm$ 0.95	0.42	1.89

RE (%) = (measured value - true value)/true value $\times$ 100%, RSD (%) = (standard deviation/mean) $\times$ 100%

**Table 5.** Inter-day relative error and relative standard deviation of R40 (Allura Red AC) at detection wavelength 254 nm and 520 nm

Concentration of R40 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Detection at 254 nm			Detection at 520 nm		
	Mean ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD	RE (%)	RSD (%)	Mean ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD	RE (%)	RSD (%)
2	1.95 $\pm$ 0.09	-2.64	4.93	1.94 $\pm$ 0.08	-3.01	3.93
5	5.05 $\pm$ 0.10	0.98	1.98	5.06 $\pm$ 0.06	1.27	1.28
10	9.85 $\pm$ 0.34	-1.51	3.45	9.88 $\pm$ 0.29	-1.18	2.98
20	19.94 $\pm$ 0.32	-0.33	1.59	19.85 $\pm$ 0.31	-0.75	1.55
30	29.42 $\pm$ 0.39	-1.92	1.34	29.46 $\pm$ 0.34	-1.80	1.14
50	48.78 $\pm$ 1.21	-2.44	2.49	48.99 $\pm$ 1.16	-2.02	2.37

RE (%) = (measured value - true value)/true value $\times$ 100%, RSD (%) = (standard deviation/mean) $\times$ 100%

조건에서 각각 0.34-2.53%와 0.02-2.67%, 정밀도를 나타내는 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD)는 0.76-3.69%와 0.80-4.67%였다. inter-day의 상대오차는 254 nm와 520 nm 검출조건에서 각각 0.33-2.64%와 0.75-3.01%, 상대표준편차는 1.34-4.93%와 1.14-3.93%로 나타나 본 연구의 분석법이 상당히 우수한 것으로 판단되었다.

### 회수율 실험

본 실험에서 표준물 첨가법으로 정밀도와 회수율 실험을 하였다. 마이크로 피펫으로 시판되고 있는 4가지 감기약 시럽 샘플을 각각 500 µL 취하여 10 mL 용량플라스크에 넣고 농도가 각각 20 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL인 R40 표준용액을 500 µL씩 넣는다. 그리고 시료를 전처리법으로 처리한 후 각각 254 nm와 520 nm 검출과장에서 4가지 감기약 시럽에 R40을 첨가한 회수율과 정밀도를 측정하였다. Table 6에서 보여주는 바와 같이 254nm와 520nm 검출과장에서 4가지 감기약 시럽에 R40을 첨가한 회수율은 각각 92.7%~101.9%, 93.5%~101.7%이고, RSD는 각각 1.75%이하, 1.53%이하로 나타나 본 분석법이 상당히 신뢰할 만한 것으로 나타났다.

**Table 6.** Average recovery of R40 (Allura Red AC) in cold syrups (n = 3)

Cold syrups	Added (µg/mL)	Detection at 254 nm		Detection at 520 nm	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
A	20	95.1	1.52	96.3	1.14
	40	98.8	1.14	99.3	1.34
	50	96.8	0.98	95.6	0.89
B	20	96.9	1.73	97.3	1.25
	40	100.4	1.06	100.6	1.23
	50	94.3	0.92	94.5	0.85
C	20	98.4	1.75	96.5	1.53
	40	101.9	1.34	101.7	1.26
	50	92.7	1.02	93.9	0.95
D	20	93.2	1.20	93.5	1.06
	40	99.4	1.16	99.8	0.93
	50	95.3	1.05	95.7	0.86

### 결론

본 연구에서는 HPLC를 이용한 여러 개의 합성 타르색소 첨가제의 단순하고 효과적인 동시 검출 분석법을 확립하였다. 고정상으로는 µ-Bondapak C18 컬럼을 사용하였고 이동상으로는 0.01 mol/L TBA-Br을 함유한 0.025 mol/L ammonium acetate와 acetonitrile, methanol을 65 : 25 : 10 과 40 : 50 : 10으로 혼합한 두 가지 조성의 용매를 사용하여 gradient mode로 분석하였다. 검출을 위한 검출과장은 동시 분석의 경우 254 nm, 계통분석은 적색 계통은 520 nm, 녹색

계통은 620 nm로 설정하였다. 본 연구에서 확립된 역상 HPLC 분석조건하에서 검출과장 254, 520, 620 nm에서 상관계수는 모두 0.995~0.998로 우수한 직선성을 나타내었다. 검출한계는 적색 타르색소들은 0.01~0.05 µg/mL (검출과장 254 nm), 0.005~0.01 µg/mL (검출과장 520 nm) 녹색타르색소 (G3)는 0.05 µg/mL (검출과장 254 nm), 0.002 µg/mL (검출과장 620 nm)로 나타났다. 위의 분석법을 응용하여 시중에서 판매하고 있는 4가지 감기약 시럽 약물 속에 함유된 타르색소가 R40임을 확인하였고 520 nm 검출조건에서 첨가된 함량이 9.08-42.06 µg/mL임을 측정할 수 있었다.

### 감사

이 논문은 2010학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

접수 : 2010년 9월 10일, 게재승인 : 2010년 10월 22일

### REFERENCES

1. Branen, A. L., P. M. Davidson, S. Salminen, J. H. Thorngate III (2002), *Food Additives*. 2nd ed., Marcel Dekker, New York, USA.
2. Mitsui, T (1997), *New Cosmetic Science*. Elsevier. New York, USA.
3. U. S. Food and Drug Administration Center for Industry, Summary of Color Additives for Use in the United States in Food, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices. <http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm115641.htm>.(2007).
4. Ministry of Health. Labour and Welfare, Ministry of Health, Labour and Welfare Notification No.112. <http://kousei.active-reader.net/32/3241/046029.html>.(2004).
5. Ministry of Health of the People's Republic of China, Hygienic Standard for Cosmetics. [http://www.moh.gov.cn/open/web\\_edit\\_file/20070124145740.pdf](http://www.moh.gov.cn/open/web_edit_file/20070124145740.pdf).(2007).
6. Korea food & Drug Administration, Korea food & Drug Administration Notification No. 2007-40, [http://search.kfda.go.kr/Admin\\_rule/index.jsp?SEQPARAM=54](http://search.kfda.go.kr/Admin_rule/index.jsp?SEQPARAM=54).(2007).
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006), Combined compendium of food additive specifications. Vol. 4. Rome, Italy.
8. Ishikawa, F., S. Shigeoka, M. Nagashima, M. Takahashi, H. Kamimura, K. Onishi, and M. Nishijima (2000), Analytical method of 21 coal-tar dyes in protein-rich foods by solid-phase extraction and HPLC. *J. Food Hyg. Soc. Japan*. 41: 194-199.

9. Jaworska, M., Z. Szulińska, M. Wilk, and E. Anuszevska (2005), Separation of synthetic food colourants in the mixed micellar system: Application to pharmaceutical analysis. *J. Chromatogr. A*. 1081: 42-47.
10. Ishikawa, F., K. Saito, M. Nakazato, K. Fujinuma, T. Moriyasu, and T. Tomomatsu (1996), Analytical method of 21 coal tar dyes in foods by HPLC. *J. Food Hyg. Soc. Japan*. 37: 281-287.
11. Park, S. K., C. H. Lee, J. S. Park, H. J. Yoon, S. H. Kim, Y. Hong, J. O. Lee, and C. W. Lee (2000), Simultaneous analytical techniques for determination of 8 synthetic food colors in foods by HPLC. *Anal. Sci. & Tech*. 13: 378-384.
12. Park, S. K., Y. Hong, Y. H. Hung, C. H. Lee, H. J. Yoon, S. H. Kim, and J. O. Lee (2001), Optimization of HPLC method and clean-up process for simultaneous and systematic analysis of synthetic color additives in foods. *Kor. J. Food Sci. Tech*. 33: 33-39.
13. Lee, H. M. and C. O. Rhee (2005), Analysis of tar color content in children's favorite foods. *Kor. J. Food Preserv*. 12: 355-360.
14. Lau, O. W., M. M. K. Poon, S. C. Mok, F. M. Y. Wong, and S. F. Luk (1995), Spectrophotometric determination of single synthetic food colour in soft drinks using ion-pair formation and extraction. *Int. J. Food Sci. Tech*. 30: 793-798.
15. Ishikawa, F., M. Oishi, K. Kimura, A. Yasui, and K. Saito (2003), Determination of synthetic food dyes in food by capillary electrophoresis. *J. Food Hyg. Soc. Japan*. 45: 150-155.
16. Christian, G. D. (2004), *Analytical Chemistry*. 6th ed., pp. 128-129. John Wiley & Sons Inc., USA.