

식품과학과 산업 Vol. 55, No. 1, pp. 23~32 (2022)

<https://doi.org/10.23093/FSI.2022.55.1.23>

국내 미지정 식품첨가물의 식품 중 분석법 개발에 관한 고찰

A study on the development of analytical methods for undesignated food additives in Korean foods

이세정¹ · 권민섭² · 한옹호¹ · 문효¹ · 최선일^{1*} · 이옥환^{1,2*}

Se-Jeong Lee¹, Min-Seop Kwon², Xionggao Han¹, Xiao Men¹, Sun-Il Choi^{1*} and Ok-Hwan Lee^{1, 2*}

¹강원대학교 식품환경융합학과, ²강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학과

¹Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea;

²Department of Food Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

Abstract

Processed foods using food additives designated as the other countries but not yet in Korea can be mixed and distributed among imported foods in Korea. Accordingly, it is necessary to develop an analysis method of undesignated food additives in order to continuously monitor. This paper introduced a study on the development and validation of analytical methods conducted in academia. The development of analytical

methods was conducted using the analytical methods presented in previous studies. We first exhibited that simultaneous analysis of 12 food dyes was easy to reproduce, but the second introduced analytical method of emulsifiers cannot be utilized analysis using expensive equipment not provided in general laboratories, and it is difficult to reproduce due to the old publications. Therefore related national institutions, research and industry-academia circles need to constantly conduct research on the development of

*Co-corresponding authors: Ok-Hwan Lee

Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, 24341, Korea

Tel: 82-33-250-6454

Fax: 82-33-259-5561

E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

*Co-corresponding authors: Sun-Il Choi

Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, 24341, Korea

Tel: 82-33-250-6454

Fax: 82-33-259-5561

E-mail: docgotack89@hanmail.net

Received January 14, 2022; revised February 4, 2022; accepted February 4, 2022

analytical methods for undesignated food additives.

Keywords: food additives, analytical method validation, ICH guideline, food dyes, emulsifiers

서론

고품질 식품에 대한 현대 소비자의 요구는 꾸준히 증가하고 있는 추세로서 과거의 양적 풍부함에 초점을 맞추던 것과는 달리, 식품산업이 발달한 오늘날에는 품질향상, 영양강화, 식중독 예방 측면뿐만 아니라 물리적 특성 및 관능적 요소 등 기호성 증진을 위한 효과를 위해 식품을 제조·가공하는 과정에서 식품첨가물이 사용된다(Borràs E, 2015). 우리나라에서는 1962년 식품위생법이 제정·공포되면서 식품첨가물의 개념이 처음 도입되었으며, 현행 식품위생법 제 2조 2항에 의하면 식품첨가물이란 “식품을 제조·가공·조리 또는 보존하는 과정에서 감미, 착색, 표백 또는 산화방지 등을 목적으로 식품에 사용되는 물질을 말한다. 이 경우 기구·용기·포장을 살균·소독하는 데에 사용되어 간접적으로 식품으로 옮겨갈 수 있는 물질을 포함한다.”로 정의하고 있다(식품의약품안전처, 2016). 국제적으로는 국제식품규격위원회(CODEX, Codex Alimentarius)에서 “식품으로 섭취하지 않고, 영양적 가치 유무에 관계없이 식품의 통상적인 성분으로 사용되지 아니하는 물질로, 식품의 제조, 가공, 준비, 처리, 외 포장, 개별 포장, 운송, 또는 저장 시 의도적으로 첨가하여 기술적(관능적 목적 포함) 목적을 달성할 수 있거나, 식품첨가물 자체 혹은 부산물이 식품의 성분이 되거나, 식품의 특성에 영향을 줌으로써(직접 또는 간접적으로) 목적을 달성할 수 있을 것으로 기대되는 물질을 의미한다. 이 용어에는 오염물질(contaminants) 또는 영양적 품질을 향상시키거나 유지하기 위하여 첨가되는 물질을 포함하지 않는다.”로 규정하고 있으며, 유럽 연합 법률(EU, European Union)은 “영양가의 유무에 관계없이 일반적으로 그 자체가 식품으로 섭취되지 않으며, 특징을 갖는 식품 원료로도 사

용되지 않는 물질을 의미한다. 또한, 기술적인 이유로 제조, 가공, 조리, 취급, 포장, 운송 또는 보관 과정에서 식품에 의도적으로 첨가한 결과로 그 자체 또는 그 부산물이 직접 또는 간접적으로 식품의 구성성분이 되거나, 그렇게 될 것이라고 합리적으로 예상되는 물질”로 정의한다(CODEX, 2014; EU, 2008). 국가별 식문화적 배경과 산업적 특성 등이 달라 식품첨가물을 정의하는 관점에 약간의 차이가 있다(식품의약품안전처, 2017).

가공식품을 통해 섭취하는 식품첨가물에 대한 인체에서의 안전성은 소비자들의 관심 대상이 되고 있다(Lee, 2009). 국내에서 사용되는 식품첨가물은 과학적 근거를 바탕으로 안전성 평가가 수행된 후 식품위생법에 의해 기준규격 및 사용기준이 허용되어 식품에 사용됨에도 불구하고, 언론과 대중매체의 자극적인 용어 사용 및 검증되지 않은 정보에 대한 문제 제기성 보도와 식품산업계의 ‘무첨가 마케팅’ 등이 식품첨가물의 안전성에 대한 물음을 제기하면서 가공식품 내 식품첨가물이 불필요하게 과량 사용된다거나 건강에 유해한 영향을 미치는 물질이라는 잘못된 인식을 갖게 되어 소비자의 불안과 불신을 가중시키는 결과를 초래하였다(한국보건사회연구원, 2015; Lee 등, 2014). 이러한 식품첨가물은 각 가공식품에서 목적으로 하는 기능이 있으나 목적하는 기능 외의 부작용을 일으키는 독성과 관련된 안전성에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(Kwon 등, 2007). 국내에서 식품첨가물은 식품안전 관리요소의 화학적 요소 중 사전에 안전성을 평가하여 사용이 허가된 물질로써 의도적 사용물질로 분류한다. 인체 내 안전성 평가를 통한 식품첨가물의 기준 규격 설정은 국민건강영양통계 등의 섭취량 자료 및 식품 중 함유량(사용량)을 고려하여 평가한 1일섭취허용량(ADI, Acceptable Daily Intake)과 1일최대섭취량(TMDI, Theoretical Maximum Daily Intake)을 검토하여 TMDI가 ADI를 초과하지 않도록 기준을 설정하며, FAO/WHO 합동 식품첨가물 전문가 위원회(JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), CODEX 등 국제기구에서의 안전

성 평가 결과 및 사용기준과 우리나라의 식품섭취 현황 등을 종합하여 과학적인 평가를 통해 이루어진다 (Choi 등, 2009; Choi, 2016).

국가별로 식문화와 식품산업의 특성이 달라 식품첨가물의 기준규격 및 사용기준과 이에 대한 정의가 다르며, 지정된 식품첨가물의 종류 또한 상이하다. 이에 따라 제외국에서는 식품첨가물로 지정되어 있으나 국내에서는 아직 지정되지 않은 미지정 식품첨가물에 대하여 수입식품 중 혼입가능성을 배제하지 않을 수 없다. 이에 따라 국내에서 허용되지 않은 식품첨가물이 수입식품으로부터 검출되거나 식품첨가물이 사용가능한 용도 이외 대상 식품에서 검출되어 식품첨가물공전 사용기준에 위반되는 사례가 발생하기도 한다. 이러한 미지정 식품첨가물이 가공식품에 의도적·비의도적으로 혼입되어 수입 및 유통되어도 국내에서는 아직 기준규격 및 분석법이 마련되어 있지 않아 체계적인 안전관리가 어려운 실정이다(Lee 등, 2014). 이에 본고에서는 분석법 개발 연구에 근거가 되는 가이드라인을 검토하고, 실제 학계에서 진행된 국내 미지정 식품첨가물의 분석법 개발 연구에 대하여 고찰하고자 한다.

본론

1. 분석법 검증 (method validation)

1-1. 분석법 검증 개요

시험/분석법 검증(method validation)은 개발된 분석법의 신뢰성과 의도한 용도에 대한 적합성을 평가하여 재현 가능한 결과를 제공할 수 있음을 입증하기 위해 필요한 과정이다. 생물, 환경, 의약품, 식품 등 분석법 검증이 활용되는 분야는 다양하며, 국제적으로 논의되고 있는 분석법 검증에 관한 여러 가지 규정이 있다. 그 중 대표적으로 CODEX 지침, AOAC 인터내셔널(Association of Official Analytical Chemists International)의 공식 분석법 프로그램, 국제 표준화 기구(ISO, International Standards Organization), EU 규정 법률, 미국약전

(USP, United States Pharmacopeia), 국제의약품 규제조화위원회(ICH, International Conference on Harmonization) 가이드라인 등이 있다. 다양한 분야에 응용되는 분석법 검증의 각 규정마다 특성은 다르지만, 분석법 검증에 사용되는 모든 규정의 공통적인 목적은 분석법의 적합성을 입증하여 접근방식이 효율적이고 신뢰할 수 있는 방법을 사용하여 각 분야의 관리를 목표로 하는 것이며, 이를 효과적으로 검토하기 위해 분석법 검증 규정의 기준이 결정된다.

1-2. 분석법 검증 가이드라인 제정 흐름

지난 30여 년 동안 분석법 검증에 대한 많은 논의가 있었다. 1990년 미국 식품의약국(FDA, Food and Drug Administration)와 미국 약학회(AAPS, American Association of Pharmaceutical Scientists)가 주최한 워크숍에서 분석법 검증을 주제로 한 논의가 처음 이루어졌다. 이 논의에서 분석법 검증 항목인 특이성, 안정성, 정확성, 정밀도, 민감도, 재현성의 일반적인 지침이 제공되었으며, 1992년 발간된 이 워크숍의 보고서는 현대 분석법 검증의 기초가 되었다. FDA 외에도 다른 규제 기관 및 조직에서도 분석법 검증에 대한 논의가 이루어졌다. 유럽에서는 1990년 ICH가 설립되어 1994-1996년에 전문가에 의해 개발된 인체용 의약품 등록을 위한 기술 요구 사항 조화에 관한 국제 회의 "Validation of Analytical Procedures Q2(R1)"에서 분석법 검증에 대해 다루었다. 분석 화학의 발전으로 공식 문서의 필요성이 명백해져 1999년에 FDA에서 "산업용 지침 초안: 생물 분석법 검증"을 발표했고, 그로부터 10년 뒤 두 번째 워크숍에서 10년 동안 축적된 경험을 공유하여 이를 바탕으로 2001년에 공식 문서 "산업용 지침: 생물분석법 검증"이 발표되었다(González, 2014). 많은 실험실에서 이 가이드라인에 의거한 검증 절차를 표준화했으며, 이후 이를 가이드라인의 초석으로 참조하여 기존 가이드라인이 보완되고 새로운 가이드라인들이 제안되었다(Hubert, 2004). 국제적으로 분석법 검증의 중요성이 커지면서 유럽의약품기구(EMA, European Medical Agency), 브라질 식품의약품인증(ANVISA, Agencia

Nacional de Vigilancia Sanitaria), 일본 후생노동성 (MHLW, Ministry of Health and Labor Welfare) 등에서 분석법에 대한 가이드라인을 제시하고 있다. 오늘날 여러 국제 기관에서 분석법 검증을 규제하고 있으며, 분석 기기의 지속적인 발전과 까다로운 분석 물질의 등장으로 인해 이를 연구하기 위하여 관련 과학도(업계, 통계학자, 분석 화학자, 학자 등)의 참여 및 협조가 필요하다. 국내에서도 분석법 개발 연구에서 분석법 검증의 중요성이 대두되고 있다. 식품의약품안전처에서는 2004년 「의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인」을 자체적으로 발간하였고, 2016년에는 ICH에 가입하여 ICH 운영에 참여하며 의약품의 품질, 안전성, 유효성에 대한 가이드라인 제정 등 규제 조화에 주도적으로 참여하고 있다.

1-3. ICH 가이드라인

최종적으로, 분석법 검증은 인정받는 기관이 규정한 특정 표준 기준에 부합하는 최적화된 시험/분석법을 얻는 것이다. 분석법 검증을 규제하는 다양한 기관이 있지만, ICH는 가장 보편적으로 인정받는 기관 중 하나이다. ICH는 모든 약제학 및 생물약제학적 검증과 기업, FDA, EMA, 유럽 공동조달협정(JPA, European Joint Procurement Agreement)를 포함한 주요 규제 기관들을 관장하고 있으며, 분석법을 어떻게 검증해야 하는가에 관하여 제약과 바이오 산업은 물론 규제 기관들의 의견도 반영하고 있다. 분석법 검증에는 특이성(specificity), 반복성(repeatability), 재현성(reproducibility), 완건성(robustness), 견뢰성(ruggedness), 시스템 적합성(system suitability), 검출 한계(limits of detection), 정량 한계(limits of quantitation) 등과 같은 여러 측면이 있는데, 이러한 항목의 본질은 제약 및 바이오 분야와 규제 분야에서 사용될 과학 분석법의 타당성, 실용성, 재현 가능성을 보장하는 것이다. 따라서 동물 실험, 인체 임상 연구, 처방 약과 마케팅에 대해 규제 승인을 얻고자 하는 모든 기업은 반드시 이러한 ICH 가이드라인을 따라야 하며, 분석법을 검증하고자 하는 대부분의 간행물에서도 ICH 가이드라인을 따르고 있다(Krull,

2017; Shewiyo 등, 2012). 또한, 식약처에서는 분석법 검증 및 의약품 등의 품질 기준을 국제 기준에 맞게 개선함으로써, 국내 의약품 제품 등의 해외 진출을 지원하는 것은 물론 우수한 품질의 제품이 유통될 수 있도록 하기 위해 ICH 가이드라인의 국제 조화를 추진하고 있다. 다음 절에서는 ICH 가이드라인을 따라 실제 학계에서 진행된 분석법 개발 및 검증을 연구 사례를 소개하고자 한다.

2. 식품 중 식품첨가물의 분석법 개발 및 검증

2-1. 12가지 식품 착색료의 동시분석법 개발 및 검증

식품첨가물로 사용되는 착색료의 동시분석법 개발

합성 식품 착색료는 식품 가공 중 손실되는 자연적인 색상을 대체하고 최적화하기 위해 사용된다. 이러한 착색료는 일반적으로 산성의 수용성 나트륨염이며, 안정성이 우수한 여러 종류의 합성 식품 착색료는 천연 착색료보다 비교적 저렴한 비용으로 사용할 수 있다. 그러나 합성 착색료의 과량 섭취로 인한 부작용 사례에 대한 보고가 있어 많은 국가에서 합성 착색료의 사용량을 규제하고 있다. 이는 국가마다 식품에 사용하는 착색료에 대한 법적 제한 및 문화적 선호도가 다르기 때문에 식품에 첨가되는 식품첨가물로서의 함량은 제조 국가에 따라 다르다. 이에 따라 국내에서 자주 소비되는 식품에 함유된 식품 착색료를 동시에 분석하기 위한 검증 방법이 필요한 실정이다. 따라서 Jang 등(2021)에서 기 발표한 연구는 국내에서 많이 소비되는 추잉껌과 음료에 허가된 9가지 식품 착색료와 허가되지 않은 3종의 식품 착색료를 동시에 분석하기 위한 분석법을 제안하고자 하며, 식품 착색료 총 12종의 동시분석이 가능한 HPLC-PDA 분석법을 개발하고 검증하는 것을 소개하고자 한다. 또한, LC-MS/MS 분석법을 이용하여 식품 착색료의 일치 여부를 확인하고, 실제로 우리나라에서 유통되는 추잉껌과 음료의 실제 샘플을 분석하여 개발한 분석법의 실제 샘플에 적용 가능 여부를 확인하였다(Jang 등, 2021).

표준물질을 이용한 HPLC-PDA 분석법 확립 및 추출 방법의 최적화

먼저, HPLC-PDA 분석 조건을 설정하기 위해 세 가지 분석방법을 비교하여 12종의 착색료에 대한 분리도가 가장 우수한 한 가지 방법을 선택하였다. 다음, 확립된 HPLC-PDA 조건에서 최상의 분리능을 지닌 컬럼을 선택하기 위하여 세 가지 컬럼을 비교하여 피크의 가장 우수한 분해능과 피크 면적을 제공하는 컬럼을 선택하였다. 마지막으로, 컬럼의 온도를 세 가지 조건으로 조절하여 이동상의 점도 및 컬럼 내부 이동상 흐름의 저항을 낮추어 HPLC-PDA 시스템 전체의 압력을 줄이기 위한 온도 설정 조건을 비교하여 식품 착색료의 검출시간과 각 요소의 피크 분해능 및 에너지 효율을 고려하여 최적온도를 설정하였다.

최적의 매트릭스 전처리 방법을 확립하기 위하여 스파이킹 실험을 진행하고 회수율을 비교하였다. 이는 특정 분석 물질이 포함되어있지 않은 대상 시료에 임의로 특정 표준 물질을 첨가한 후 얻어진 분석 결과를 본래의 무첨가 시료의 분석 결과와 비교하는 실험이며, 특정 표준 물질의 회수율을 비교 분석하여 전처리 방법의 적합성을 평가하는 것이다. 이에 따라 분석하고자 하는 착색료가 함유되지 않은 추잉껌과 음료 시료를 준비하여 분석하고자 하는 특정 착색료를 일정 농도 스파이킹하여 여러 가지 전처리 방법에 따라 추출을 진행하고 회수율을 비교하여 가장 높은 회수율을 가지는 최적의 추출 방법을 선택하였다 (Jang 등, 2021).

분석법 검증

추잉껌과 음료 두 가지 매트릭스의 식품 착색료 측정을 위한 HPLC-PDA 방법의 분석법 검증은 세 가지 농도(저·중·고)로 스파이킹을 한 시료와 하지 않은 시료를 확립된 추출 방법에 따라 추출한 후 진행하며, ICH 가이드라인에 따라 특이성, 직선성, 정밀도, 정확도, 검출한계(LOD, Limit of Detection) 및 정량한계(LOQ, Limit of Quantitation)의 관점에 대해 검증되었다. 이러한 항목들의 검증을 위해

ICH의 가이드라인에 따라 하루 중(일내) 3회 반복 및 하루 간(일간) 3회 반복 측정하여 총 9회의 결과에 대해 평가되었다(Jang 등, 2021).

1) 특이성 (Specificity)

HPLC-PDA를 사용하여 식품 착색료의 동시 분석을 진행하였으며, 12가지의 식품 착색료 분석물이 각각 서로 다른 성분의 간섭을 받는지 여부를 평가하였다. 이는 분석법 검증의 항목 중 특이성을 나타내며

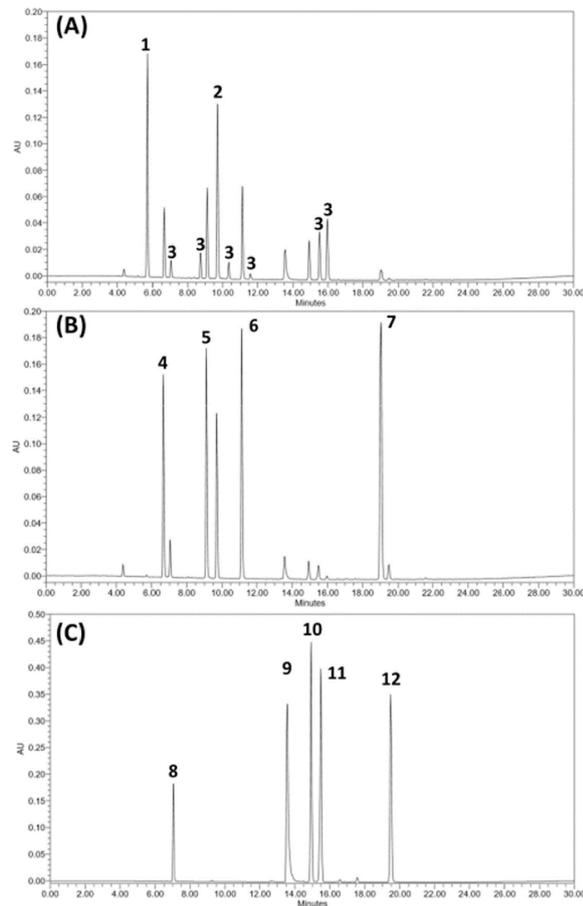


그림 1. 450 nm (A), 520 nm (B), and 620 nm (C)에서 식품 착색료의 HPLC-PDA 크로마토그램. 1, Tartrazine; 2, Sunset yellow; 3, Quinoline yellow; 4, Amaranth; 5, New cocchine; 6, Allura red; 7, Erythrosine; 8, Indigo carmine; 9, Green s; 10, Fast green FCF; 11, Brilliant blue; 12, Patent blue V. (Jang, 2021)

분석법이 다른 성분의 간섭 없이 매트릭스의 특정 분석 물질을 결정할 수 있는 정도를 나타낸다. HPLC-PDA 방법을 사용한 크로마토그램에서 각 피크는 서로 간섭을 받지 않는 것을 확인하였으며, 여러 번 표현된 Quinoline yellow (그림 1. (A) peak 3)는 주된 disulfonates와 monodulfonates 및 trisulfonate 등의 혼합물로 이루어진 화학적 특성에 대한 결과가 HPLC 크로마토그램을 통해 나타났다(그림 1) (Jang 등, 2021; Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1991).

2) 직선성 (linearity)

직선성은 시료 매트릭스에 농도별 표준 분석물을 첨가하여 전처리 후 HPLC-PDA로 분석하여 검량곡선의 상관 계수를 확인하는 것이며, 상관계수는 1에 가까운 0.9995-0.9999로 우수한 직선성이 간주되었다(Jang 등, 2021).

3) LOD 및 LOQ

검출한계는 검체 중에 존재하는 분석대상 물질의 검출 가능한 최소량이고, 정량한계는 정량적으로 분석될 수 있는 검체 중에 존재하는 분석대상물의 최저량이며, ICH 가이드라인에 명시된 방법에 따라 계산식을 사용하여 산출되었다. 국내 미지정 식품첨가물 분석법을 제안하기 위해 중요한 요인 중 하나인 LOD 및 LOQ는 제외국의 식품첨가물 허용 수준 미만으로 설정되어야 정량적 검출에 적합한 분석법이라고 할 수 있다. 추잉껌과 음료에서 LOD와 LOQ 모두 EU에서 규정한 최대 허용 수준 미만이므로 HPLC-PDA를 이용한 해당 분석법은 12가지의 식품 착색료의 정량적 검출에 적합하다고 할 수 있다(Jang 등, 2021).

4) 정확성 및 정밀성

세 가지 농도(저·중·고)로 스파이킹 실험을 진행하여 각 농도에서 분석 물질에 대한 일내 및 일간 3회 반복의 분석 자료로 산출하며, 회수율로써 분석법의 정확성을 평가하고, 상대표준편차로써 분석법의 정밀성을 평가하였다. ICH 가이드라인에 따라 80-

120%의 회수율 범위와 5% 미만의 상대표준편차 결과는 탁월한 정확도와 정밀도를 가지는 것이라 판단할 수 있으며, 확립된 분석법 및 추출 방법을 이용한 분석의 결과는 추잉껌과 음료 샘플에서 적절한 정확도와 정밀도를 보였다(Jang 등, 2021).

12가지 착색료의 동시분석법 개발 연구는 비교적 선행연구의 재현이 가능하였으며, HPLC-PDA 분석에서 피크의 분리도가 우수하여 이를 이용한 분석법 검증 연구 절차를 주로 설명하였다. 앞선 과정에 따라 개발된 추출 방법 및 HPLC-PDA 분석법은 ICH 가이드라인에 따라 신뢰성이 검증되었으며, 국내에서 지정된 착색료와 미지정된 착색료 모두 검출이 가능한 것으로 평가할 수 있다. 검증된 분석법을 이용해 국내에서 유통되는 추잉껌과 음료 샘플을 수집하여 12가지 식품 착색료의 함량에 대해 분석하였으며, 실제 샘플에서 검출된 식품 착색료의 농도는 샘플이 지닌 색상과 일치하는 결과를 확인하여 실질적인 분석법의 적용이 입증될 수 있었다. 또한, 낮은 수준의 첨가물 측정에 대하여 LC-MS/MS는 샘플 중 식품 착색료 존재의 확인단계로 사용되었다. 이 외에도 저장 중 pH 및 유기산에 영향을 받는 식품 착색료에 대하여 분광 광도계를 이용한 안정성 평가와 HPLC-PDA를 이용한 식품 색소 잔류량을 측정하여 식품 착색료의 기능성을 평가하였으며, 추가적으로 전반적인 측정불확도를 확인하였다(Jang 등, 2021).

2-2. 유화제 SAIB(Sucrose Acetate Isobutyrate)의 분석법 개발 및 검증

식품첨가물로 사용되는 유화제 SAIB의 분석법 개발

식약처에서 고시된 “식품첨가물의 기준 및 규격”에 따르면 유화제는 물과 기름 등 섞이지 않는 두 가지 또는 그 이상의 상(phases)을 균질하게 섞어 주거나 유지시키는 기능을 하며, 자당지방산에스테르(Sucrose Esters of Fatty Acids)의 이명으로 불리는 SAIB는 유화제로써 음료에 사용되는 식품첨가물 중 하나이다(식품의약품안전처, 2021). 최근 여러 연구에서 일부 유화제가 장내 미생물군을 변화



시키고, 장내 염증 및 비만 촉진과 혈당 조절을 손상시키는 것으로 보고되었으며, 유럽 식품안전청(EFSA, European Food Safety Authority)에서는 식품 과학 위원회(SCF, Scientific Committee on Food) 또는 EFSA에 의한 식품첨가물의 마지막 평가 이후 오랜 시간이 경과되었으며 사용조건이 변화하고 새로운 과학적 정보가 추가되는 등 필요할 때마다 식품첨가물을 재평가하는데, SAIB는 JECFA에 의해 1993년과 1997년에 평가가 진행된 이후 2008년 EU에서 식품첨가물로 승인됨에 따라 안전성에 대한 재평가의 대상이 되었다(EFSA, 2016). 또한, 식품 중 SAIB를 분석하는 방법에 대한 선행 연구는 1972년, 1973년과 2001년에 마지막으로 진행되었으며, 2001년에 진행된 분석법 연구에서 LOQ는 현재 EU에서 규정하고 있는 최대허용수준(MPL, Maximum Permissible Level)과 일치하기 때문에 이 방법은 EU 법률 준수 여부를 확인하는 데 적절하지 않다(Conacher HBS 등, 1972; Conacher HBS 등, 1973; Uematsu 등, 2001). 따라서 발전된 기술 수준을 이용한 SAIB의 분석법 개발 연구가 필요한 실정이다. 국내에는 식품첨가물로 등록 되어있으나 사용량에 대한 기준 규격이 설정되어있지 않고, 식품 중 SAIB의 함량을 분석할 수 있는 분석법이 전무하기에 관리가 어려운 상황이다. 이에 본 연구에서는 식품첨가물 SAIB의 분석법을 개발 및 검증하고, 실제 국내에서 유통되는 음료 샘플에 적용 가능성을 평가하였다.

SAIB 표준물질 분석

1) HPLC-PDA

우선, 자당에스터(Sucrose Ester)의 이성질체와, 자당지방산에스테르(Sucrose Ester of Fatty Acids)의 선행연구에서 진행된 HPLC 분석 조건을 참고하여 분석을 재현하였다. SAIB는 아세트산 무수물 및 이소부티르산 무수물로 자당과 에스테르화하여 화학적인 합성으로 생산되는 물질이며, 주요 합성 구조인 (Sucrose)1, (Acetate)2, (Isobutyrate)6외에도 다양

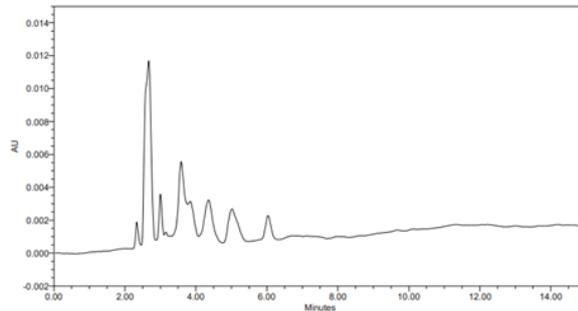


그림 2. CODEX 기준 500 mg/L의 농도에서 SAIB의 HPLC-PDA 크로마토그램

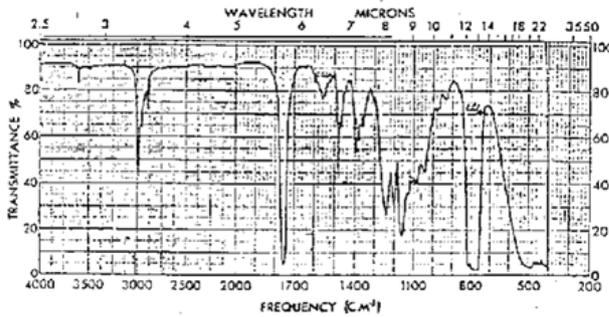
한 이성질체를 가지기 때문에 선행연구와 마찬가지로 분석 결과 무수한 피크가 분리되지 않았다. 이에 따라 물에 불용성이며 대부분의 유기용매에 용해되는 SAIB의 용매를 변경하거나 이동상의 조성이나 구배 조건을 변화시키는 등 분석 조건을 달리하여 수차례 시도하였으나 SAIB의 피크는 분리되지 않았다(그림 2)(Moh 등, 2000; Kaufman 등, 1981).

2) TLC

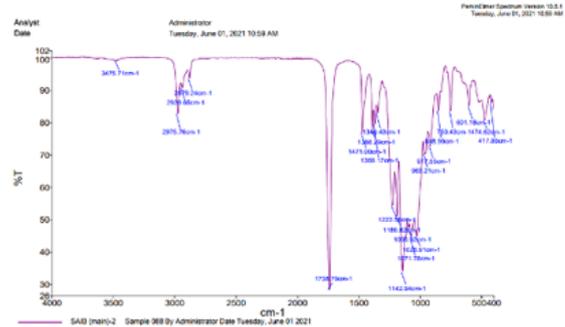
SAIB의 정성적 검출을 위하여 박막크로마토그래피(TLC, Thin Layer Chromatography)를 이용하여 자당옥타아세테이트(Sucrose Octaacetate)를 확인한 선행연구를 참고하여 분석을 진행하였



그림 3. SAIB의 TLC 분석. 1. 250 mg/L; 2. 500 mg/L; 3. 1,000 mg/L; 4. 5,000 mg/L.



(A)



(B)

그림 4. SAIB의 FT-IR 스펙트럼. (A) JECFA에서 명시한 SAIB의 FT-IR 스펙트럼(FAO JECFA, 2006); (B) 측정된 SAIB의 FT-IR 스펙트럼

다. 그 결과 CODEX에서 규정하는 SAIB 사용량 기준인 500 mg/L의 농도 이하에서는 검출이 확인되지 않았으며, 1,000 mg/L의 농도에서는 희미하게 검출이 확인되었고, 그 10배에 해당하는 5,000 mg/L의 농도에서는 선명하게 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 실제 샘플에서 우수한 방법으로 SAIB의 추출이 가능하여도 기준 사용량 이하에 해당하는 함량 범위에서는 정성 분석이 불가능하다(그림 3)(Petkova 등, 2017).

3) FT-IR

SAIB의 분자 구조에 따른 분자 진동에 의해 나타나는 특정 흡수 스펙트럼을 확인하여 정성적 평가를 하기 위한 푸리에 변환 적외선 분광법(FT-IR, Fourier-transform infrared spectroscopy)을 이용하여 분석을 진행하였다. 4000-400 cm^{-1} 의 파수 범위에서 확인한 결과 JECFA에서 제공하는 SAIB의 IR 스펙트럼과 일치하였다. FT-IR을 이용한 분석의 가장 큰 장점은 시료의 전처리 없이 그대로 분석을 진행할 수 있다는 것이며, 단점으로는 물의 간섭을 크게 받는다는 특징이 있다. 이는 분자의 구조적 특징에 따른 스펙트럼을 확인하여 정성적 분석 결과를 얻을 수 있지만 물이 대부분을 차지하는 실제 음료 샘플을 이용한 분석은 어려울 것으로 판단되었다(그림 4) (Petkova 등, 2017).

4) GC-FID

SAIB에 대한 분석법을 제안한 선행연구는 모두 기체크로마토그래피(GC, Gas Chromatography)를 사용하였다. 50여 년 전인 1972년과 1973년에 수행된 연구의 분석조건은 현재의 분석 장비로 재현하기 어려워 2001년에 진행된 연구의 분석조건을 활용하여 사용된 장비에 맞게 조건을 일부 수정하여 분석을 진행하였다. GC-FID를 이용하여 분석한 결과 HPLC-PDA를 이용한 분석에서 분리되지 못했던 수많은 피크에 대한 분리도가 증가하였지만 분석법 검증을 하기 위해 그 중 하나의 피크만 선택할 수 없었으며, 상위 몇 개 혹은 몇 %의 피크의 면적을 합하는 기준을 설정하는 것 또한 모호하여 특이적으로 일정 시간대에 나오는 피크 면적을 모두 합한 것으로 함량을 산출하는 방식이 결정되었다(그림 5)(Petkova 등, 2017; Uematsu 등, 2001).

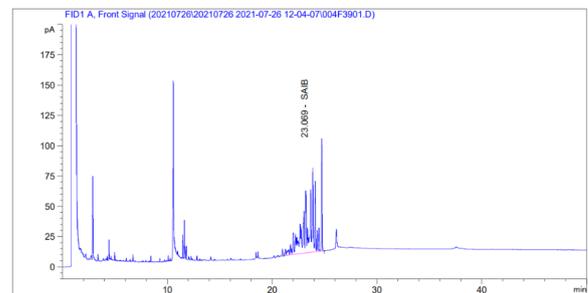


그림 5. SAIB 스팅킹 500 mg/L에서 GC-FID 크로마토그램



본 연구에서는 분석이 까다로운 표준물질의 분석법 개발 과정에 초점을 맞추어 설명하였다. 최적화된 추출 방법은 확립된 GC-FID 분석법을 적용해 각 전처리 방법의 회수율을 비교하여 선정되었다. SAIB 분석법의 검증으로 앞서 언급된 방법 외에도 SFC-MS와 NMR을 이용하는 방법 등 여러 가지 분석 장비를 이용하는 대안이 있었으나 이러한 장비들은 매우 고가이며, 일반적인 실험실에서 일상적인 분석을 위한 용도로 사용하기 힘들다(Petkova 등, 2017; Hori 등, 2014). HPLC-PDA를 이용한 분석이 어려워 TLC와 FT-IR를 이용한 방법으로 분석을 시도하였으나 음료 중 첨가물의 분석에는 적합하지 않았고, 비교적 보편적으로 사용되는 분석 장비인 GC-FID가 분석법 검증을 위해 채택되어 피크의 총 합을 이용해 ICH 가이드라인에 의거한 항목들을 평가하였다. 특이성, 직선성, 검출한계 및 정량한계와 정확도 및 정밀도 측면에서 ICH 가이드라인에 근거하는 적절한 분석 결과를 나타내었고, 해당 분석법의 신뢰성이 검증되었다. 이를 통해 국내에서 유통되는 음료 샘플에서의 적용 가능 여부를 확인하였으며, 원재료명에 자당지방산에스테르 혹은 유화제 등의 표시가 되어 있는 제품에서 검출이 확인되어 분석법의 실제 활용 가능성을 확인하였다. 이에 더하여, 지방산(리놀레인산) 에멀전에서 유지의 산패에 대한 SAIB의 항산화 기능을 평가하였다.

요약

제외국에는 지정되었지만 국내에는 아직 미지정된 식품첨가물의 종류가 많다. 전세계적으로 가공식품이 꾸준히 개발됨에 따라 새로운 유형의 가공식품의 등장이 증가하고 있으며, 국가별로 수출입에 관한 법률 규정이 상이하여 우리나라에서는 안전성 검정 및 사용량 제한이 되어있지 않은 식품첨가물을 이용한 새로운 가공식품이 국내 수입식품 중 혼입되어 유통될 수 있다. 이에 따라 국민의 안전한 먹거리를 보장하기 위한 지속적인 모니터링을 하기 위하여 미지정 식품첨가물의 분석법 개발이 필요하다. 본 고에서는

학계에서 진행된 분석법 개발과 검증에 대한 연구를 소개하였으며, 선행연구에서 제시된 분석법을 활용하여 분석법 개발을 진행하였다. 첫 번째 소개된 12가지 식품 착색료에 대한 동시분석법은 선행연구 분석법의 재현이 용이하였지만, 두 번째 소개된 유화제의 분석법은 일반적인 연구실에는 구비되지 않은 고가의 장비를 이용한 분석법에 대해 활용이 불가하고, 선행 연구된 간행물이 오래되어 재현이 어려운 문제점이 있었다. 가공식품 시장이 커지면서 식품첨가물이 신생되기도 하고, 까다로운 분석물질이 등장함에 따라 미지정 식품첨가물의 분석법 개발 연구는 중요하다. 따라서 이에 관련된 국가기관(식약처 등)과 산업계, 연구계, 학계에서는 미지정 식품첨가물의 분석법 개발에 대한 끊임없는 연구 진행이 필요하며, 본 연구 분야의 발전 가능성은 무궁무진할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 한국연구재단의 재원(NRF-2017R1D1A3B06028469) 및 2021년도 교육부의 재원(NRF-2021R1A6A1A03044242)과 한국연구재단의 4단계 두뇌한국21 사업(4단계 BK21 사업)(4299990913942)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Borràs E, Ferré J, Boqué R, Mestres M, AceñaL, Busto O. Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment – A review. *Anal.Chim. Acta* 891: 1-14 (2015)
- Choi SH, Weon J, Park HK, M GI, Kim MS, Lee MS. Survey of food additive intake. *Food Sci. Ind.* 42(3): 20-27 (2009)
- Choi SH. Evaluation of food additive intake. *Food Sci. Ind.* 19(1): 38-47 (2016)
- Conacher HBS, Chadha RK. Gas-liquid chromatographic estimation of sucrose diacetate hexaisobutyrate in soft drinks. *J. AOAC Int.* 55(3): 511-513 (1972)
- Conacher HBS, Chadha RK, Lyengar JR. Determination of sucrose diacetate hexaisobutyrate in soft drinks by gas-liquid chromatographic analysis of isobutyric and acetic acid components as decyl esters. *J. AOAC Int.* 56(5): 1264-1266 (1973)
- EFSA Panel on Food additives and Nutrient Sources added to Food

- (ANS). Re-evaluation of sucrose acetate isobutyrate (E 444) as a food additive. *EFSA J.* 14(5): e04489 (2016)
- González O, Blanco ME, Iriarte G, Bartolomé, L, Maguregui MI, Alonso RM. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *J. Chromatogr. A* 1353: 10-27 (2014)
- Hori K, Tsumura K, Fukusaki E, Bamba T. High-throughput analysis of Sucrose fatty acid esters by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom.* 3(1): A0033 (2014)
- Hubert P, Nguyen-Huu JJ., Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36(3): 579-586 (2004)
- Jang GW, Choi SI, Choi SH, Han X, Men X, Kwon HY, Choi TE, Ok-Hwan Lee. Method validation of 12 kinds of food dye in chewing gums and soft drinks, and evaluation of measurement uncertainty for soft drinks. *Food Chem.* 356: 129705 (2021).
- Kaufman VR, Garti. N. Analysis of sucrose fatty acid esters composition by HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* 4(7): 1195-1205 (1981)
- Kwon YK, Choi JD, Kim MS, Lim HS, Chang SY, Kim MS, Moon GI, Hong KH, Hong JH, Kim MC. Management on standards and specifications for food additives. *Food Sci. Ind.* 40(4): 55-60 (2007)
- Lee JS, Kim YH, Kim JM, Gang SR, Lee C, Shin JW, Chun HS, Lee OH. Current permitted status and management system of food additives in the inside and outside of the country. *Food Sci. Ind.* 47(1): 46-53 (2014)
- Lee JY, Kim KD. A study on the perception of and concern for food safety among urban housewives. *Korean J. Food Preserv.* 16(6): 999-1007 (2009)
- Moh MH, Tang TS, Tan GH. Improved separation of sucrose ester isomers using gradient high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Food Chem.* 69: 105-110 (2000)
- Petkova N, Vassilev D, Grudeva R, Tumbarski Y, Vasileva I, Koleva M, Denev P. “Green” synthesis of sucrose octaacetate and characterization of its physicochemical properties and antimicrobial activity. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 31(4): 395-402 (2017)
- Uematsu Y, Hirata K, Suzuki K, Iida K, Kan T and Saito K. Determination of sucrose esters of fatty acids in food additive premixes by gas chromatography and confirmation of identity by gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 84(2): 498-506 (2001)
- CODEX. CODEX STAN 192-1995 (2014)
- EU. REGULATION (EC) No 1333/2008 제 3조 제 2항 (2008)
- FAO JECFA. Online Edition: “Combined Compendium of Food Additive Specifications” (2006)
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Guide to specifications for general notices: general analytical techniques, identification tests, test solutions, and other reference materials (1991)
- 식품의약품안전처. 식품위생법 제 2조 (2016)
- 식품의약품안전처. 식품 등 기준 설정 원칙 (2017)
- 식품의약품안전처. 식품첨가물의 기준 및 규격 (2021)
- 한국보건사회연구원. 식품첨가물의 안전성에 대한 국민 인식 개선 전략 (2015)
- Krull I. 분석법 검증(analytical method validation) 가이드라인: 재현 불가능한 결과와 계재 철회를 피하는 방법. Available from <https://www.editage.co.kr/insights/guidelines-for-analytical-method-validation-how-to-avoid-irreproducible-results-and-retractions>. Accessed Apr. 19, 2017.